UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS DE BORO LUMINISCENTES ENLAZADOS AL COLESTEROL Y SU APLICACIÓN EN BIOIMÁGENES *IN VITRO*

POR:

M. C. LEONARDO XOCHICALE SANTANA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Química de los Materiales

Agosto, 2022

“Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de boro luminiscentes enlazados al colesterol y su aplicación en bioimágenes *in vitro*”

Aprobación de tesis:

Dra. Blanca M. Muñoz Flores
UANL

Dr. Rodrigo Alonso Chan Navarro
UANL

Dra. Thelma Elizabeth Serrano Quezada
UANL

Dr. Marcelo Fernando Videa Vargas
Tecnológico de Monterrey

Dr. Mario Sánchez Vázquez
CIMAV

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de posgrado

“Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de boro luminiscentes enlazados al colesterol y su aplicación en bioimágenes *in vitro*”

Revisión de tesis:

Dra. Blanca M. Muñoz Flores
Director de Tesis

Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez
Codirector de Tesis

Dr. Israel Alejandro López Hernández
Comité tutorial

Dr. Rodrigo Alonso Chan Navarro
Comité tutorial

Dr. Eduardo Maximiano Sánchez Cervantes
Comité tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de posgrado

RESUMEN

M. C. Leonardo Xochicale Santana **Fecha de graduación:**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **"Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de boro luminiscentes enlazados al colesterol y su aplicación en bioimágenes *in vitro*"**

Número de páginas: **Candidato para el grado en Doctor en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales.**

Área de estudio: Química de los Materiales

Propósito y método de estudio: Interesados en la obtención de nuevos materiales con propiedades luminiscentes, el presente trabajo está enfocado en el diseño de nuevos materiales a partir de derivados de bases de Schiff provenientes del ácido 4-aminobenzoico e hidroxialdehídos aromáticos. Para la síntesis de los materiales se hará uso de herramientas "verdes" como la irradiación con ultrasonido, el empleo de la mecanoquímica y las microondas con el fin de desarrollar metodologías con un enfoque amigable al medio ambiente. Los materiales desarrollados serán estudiados bajo diferentes estímulos como: pH, temperatura, perturbación mecánica y viscosidad del medio, con el objetivo de observar la variación en las propiedades ópticas del material. Además se busca obtener materiales con una potencial aplicación como tintes fluorescentes para la biología celular y en el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos.

Conclusiones y contribuciones: Este trabajo se divide en tres secciones. En la primera sección se describe una serie de bases de Schiff derivados de ácido 4-aminobenzoico obtenidas a partir de métodos sintéticos "verdes" que presentan propiedades fotoluminiscentes en estado sólido y propiedades halocrómicas,

adicionalmente, estos materiales presentan buenas propiedades para tinción fluorescente en células; En la segunda sección se reportan una serie de materiales derivados de bases de Schiff que en combinación con el ácido difenilborínico generan materiales denominados “BOSCHIBAs”, durante su síntesis se hace el uso de herramientas verdes como el ultrasonido, la mecanoquímica y las microondas, estos materiales presentan excelentes propiedades fotofísicas lo cual les permite clasificarse como fluoróforos y poder ser acoplados a diversos materiales con interés fluorescente; y finalmente, se describen los esfuerzos sintéticos dirigidos hacia la síntesis de nuevos marcadores celulares fluorescentes derivados de BOSCHIBAs y colesterol. El reporte sintético y los resultados obtenidos que se describen en esta sección involucran operaciones químicas para la esterificación de las BOSCHIBAs con el colesterol, una alternativa de síntesis de las sondas celulares, su caracterización fotofísica y su respectiva caracterización espectroscópica de RMN de ^{1}H y ^{13}C.

FIRMA DEL ASESOR:

_____

Dra. Blanca M. Muñoz Flores

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Materiales III, en el área de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Blanca M. Muñoz Flores y el Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez, contando con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca No. 751838.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS I
LISTA DE ESQUEMAS II
LISTA DE TABLAS III
LISTA DE GRÁFICAS IV
Abreviaturas VI
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 Química de materiales 1
2. ANTECEDENTES 3
2.1 La fluorescencia 3
2.2 Bases de Schiff fluorescentes 5
2.3 Compuestos de organoboro derivados de bases de Schiff: BOSCHIBAs 11
2.3.1 BODIPYs y Dioxaborinos 12
2.4 Sondas celulares fluorescentes 19
2.4.1 La célula: membrana celular 21
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 27
3.1. HIPÓTESIS 27
3.2 OBJETIVO GENERAL 27
3.2.1 Objetivos particulares 27
4. MATERIALES Y MÉTODOS 29
4.1. Reactivos y equipo 29
4.2 Disposición de residuos 30
4.3 Caracterización 30
4.3.1 Resonancia magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B 30
4.3.2 Caracterización fotofísica 31
4.3.3 Caracterización por difracción de rayos-X de monocristal 31
4.3.4 Ensayo de viabilidad celular en células MCF-7 31
4.3.5 Bioimágenes fluorescentes in vitro 32
4.4 Métodos 32
4.4.1 Síntesis de las bases de Schiff 3 y 4 32
4.4.1.1 Síntesis especifica de la base de Schiff 3 32
4.4.1.2 Síntesis especifica de la base de Schiff 4 34

4.4.2 Síntesis de la base de Schiff SB-H, SB-OMe, SB-NEt, SB-tBu y SB-Nap 34

4.4.3 Síntesis de las BOSCHIBAs BSB-OMe, BSB-NEt, BSB-tBu y BSB-Nap 37

4.4.4 Síntesis de las sondas celulares fluorescentes col-BSB-Nap, col-BSB-NEt y col-BSB-OMe 39

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 42

5.1 Bases de Schiff con propiedades fluorescentes 42

5.1.1 Caracterización por difracción de rayos-X de monocristal 46

5.1.2 Caracterización fotofísica 48

5.1.3 Viabilidad celular 50

5.1.4 Tinción celular 51

5.1.5 Multifuncionalidad 52

5.2 Compuestos de boro luminiscentes: BOSCHIBAs 55

5.2.1 Propiedades fotofísicas de las BOSCHIBAs 63

5.2.2 Materiales multi-respuesta 70

5.3 Síntesis de sondas celulares a partir de compuestos de organoboro: una aproximación hacia el marcaje selectivo de la membrana plasmática 75

5.3.1Caracterización fotofísica col-BSB-OMe, col-BSB-NEt y col-BSB-Nap.. 84

5.3.2 Ensayos de citotoxicidad de col-BSB-OMe y col-BSB-Nap 86

5.3.3 Bioimágenes de col-BSB-OMe y col-BSB-Nap 88

6. CONCLUSIONES 90

7. REFERENCIAS 92

8. ANEXOS 102

Anexo A 102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción gráfica de un proceso de absorción y emisión..... 3
Figura 2. Diagrama de Jablonski..... 4
Figura 5. Algunos ejemplos de fluoróforos intrínsecos y extrínsecos. 5
Figura 4. Estructura general de los BODIPYs. 12
Figura 5. La combinación del núcleo dioxaborino con diferentes estructuras generan materiales con una diversidad de propiedades ópticas..... 13
Figura 6. Compuestos organoboro derivados de bases de Schiff. 19
Figura 7. Estructura general de las sondas celulares fluorescentes..... 20
Figura 8. Algunas sondas celulares utilizadas para el marcaje selectivo de un componente celular. 21
Figura 9. El colesterol es uno de los principales componentes estructurales de la célula, la parte hidrofóbica se inserta entre la bicapa, mientras que la parte polar se encuentra en la superficie externa e interna. 22
Figura 10. Descripción gráfica de la interacción membrana celular-sonda fluorescente derivada del colesterol. 23
Figura 11. Vista frontal (A) y lateral (B) de compuesto **3** 47
Figura 12. Vista frontal (A) y lateral (B) del compuesto **4**. 47
Figura 13. Formación de dímero de los compuestos **3** (arriba) y **4** (abajo) en estado sólido. 48
Figura 14. Espectros de absorción y emisión en MeOH de los compuestos **3** (izquierda) y **4** (derecha). 49
Figura 15. Bioimágenes fluorescentes en células MCF-7 tratadas con el disolvente control (DMSO)(izquierda), sin ningún tipo de autofluorescencia (centro) y células tratadas con el compuesto **3** (derecha). 52
Figura 16. Imágenes de estudios halocrómicos en solución del compuesto **3**..... 53
Figura 17. Espectro de emisión en estado sólido del complejo **3**-HCl. El espectro de emisión muestra un máximo de longitud de onda a 637 nm..... 53
Figura 18. Estructura propuesta del complejo formado entre la base de Schiff **3** y el HCl que muestra nuevas propiedades fluorescentes. 54
Figura 19. Imágenes del estudio de vaporcromismo del compuesto **33**, se muestra de procedimiento de tratamiento del compuesto con diferentes vapores (acido y básico) y calentamiento. 55
Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto SB-H en acetona-d_6. 57
Figura 21. Espectros de RMN de ^{1}H en acetona-d_6 de las bases de Schiff siintetizadas en este trabajo 59
Figura 22. Espectros de absorcion de los compuestos SB en metanol. 63
Figura 23. Espectros de absorcion de las BOSCHIBAs en cloroformo..... 64
Figura 24. Espectros de excitación de las BOSCHIBAs en cloroformo..... 65
Figura 25. Espectros de emisión de las BOSCHIBAs en cloroformo comparado con el sulfato de quinina en H_2SO_4 0.1 M. 66
Figura 26. Espectros de emisión de las BOSCHIBAs normalizado. 67

Figura 27. Dos de las posibles conformaciones de la estructura general de las BOSCHIBAs 75
Figura 28. Espectro de RMN ^{1}H en $CDCl_3$ del concentrado de la fase orgánica obtenida en la reacción. 77
Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto col-BSB-Nap en $CDCl_3$. 79
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto col-BSB-Nap en $CDCl_3$. 80
Figura 31. Espectro de RMN de ^{11}B del compuesto col-BSB-Nap en $CDCl_3$. 80
Figura 32. Espectros de absorción (arriba) y espectros de emisión (abajo) de los compuestos **BSB-OMe** y **BSB-Nap**. 85
Figura 33. Bioimágenes fluorescentes en células B16F10 con el compuesto **col-BSB-Nap**, campo brillante (derecha) y campo oscuro (izquierda). 88
Figura 34. Bioimágenes fluorescentes en células B16F10 con el compuesto **col-BSB-OMe**, campo brillante (derecha) y campo oscuro (izquierda). 89

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de condensación de un aldehído y una amina aromática para la formación de una base de Schiff. 6
Esquema 2. Representación general de la síntesis de una BOSCHIBA. 11
Esquema 3. Esquema general de síntesis para las bases de Schiff. 43
Esquema 4. Síntesis de SB-H a temperatura ambiente. 56
Esquema 5. Síntesisi de las bases de Schiff con diferentes sustituyentes. 57
Esquema 6. Síntesis general de las BOSCHIBAs. 61
Esquema 7. Plan retrosintético para la obtención de las sondas celulares derivadas de BOSCHIBAs. 75
Esquema 8. Reacción de esterificación entre la BOSCHIBA BSB-NAP y colesterol. 76
Esquema 9. Componentes obtenidos en la reacción de esterifación. 76
Esquema 10. Síntesis del compuesto col-BSB-Nap a través de una esterificación con DCC. 78
Esquema 11. Nuevo plan sintético para la obtención de las sondas. 82
Esquema 12. Síntesis del compuesto col-SB-Nap. 82
Esquema 13. Reacción entre col-SB-Nap y el ácido difenilborínico usando ultrasonido. 83
Esquema 14. Síntesis del compuesto col-BSB-Nap a partir del compuesto col-SB-Nap. 84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bases de Schiff con propiedades fluorescentes y su aplicación. 8
Tabla 2. Algunos compuestos derivados de BODIPYs; características fotofísicas y sus aplicaciones. 14
Tabla 3. Algunos compuestos derivados de dioxaborinos; características fotofísicas y sus aplicaciones. 16
Tabla 4. Sondas representativas para el marcaje selectivo de la membrana celular. 24
Tabla 5. Equipos de espectroscopía y espectrometría así como su respectiva ubicación. 29
Tabla 6. Tabla de reactivos. 29
Tabla 7. Clasificación de residuos peligrosos y contenedor en el cual se depositaron. 30
Tabla 8. Propiedades físicas y rendimiento químico de los productos **3** y **4** por síntesis convencional. 43
Tabla 9. Rendimiento químico de las bases de Schiff **3** y **4** por diferentes métodos sintéticos. 44
Tabla 10. Imágenes de los compuestos **3** y **4** por diferentes métodos sintéticos bajo lampara de UV y luz de día. 45
Tabla 11. Datos obtenidos por difracción de rayos-X de monocristal de los compuestos **3** y **4**. 46
Tabla 12. Bioimágenes fluorescentes en células hepáticas con el compuesto **3** (λ_{Ex} = 500 nm). 52
Tabla 13. Imágenes de SB-H bajo luz de día y bajo luz UV. 56
Tabla 14. Imágenes de las bases de Schiff **SB-OMe**, **SB-NEt**, **SB-tBu** y **SB-Nap** bajo luz de día y bajo luz UV. 58
Tabla 15. Síntesis de las bases de Schiff por diversos métodos. 59
Tabla 16. Comparación de los rendimientos químicos para la síntesis de las BOSCHIBAs mediante ultrasonido y a temperatura ambiente. 61
Tabla 17. Las BOSCHIBAs en estado sólido bajo luz de día y bajo luz UV. 62
Tabla 18. Datos y valores fotofísicos más relevantes de las BOSCHIBAs. 68
Tabla 19. Comparación del rendimiento cuántico de compuestos de boro. 69
Tabla 20. Imágenes de los ensayos de mecanocrómicos de las bases de Schiff. 70
Tabla 21. Imágenes de los ensayos de mecanocrómicos de las BOSCHIBAs. 71
Tabla 22. Solidos cristalinos de la base de Schiff **SB-H** y **BSB-Nap**. 71
Tabla 23. Imágenes de los estudios termocrómicos de las BOSCHIBAs. 72
Tabla 24. Estudios de viscosidad de las diferentes BOSCHIBAs en mezclas metanol-glicerol. 73
Tabla 25. Optimización de las condiciones de reacción para la síntesis de **col-BSB-Nap**. 81
Tabla 26. Rendimiento químico obtenido en cada paso de la síntesis de las sondas y su respectivo rendimiento químico global. 84

Tabla 27. Datos y valores fotofísicos mas relevantes de los compuestos **BSB-OMe**, y **BSB-Nap.**..... 86

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efectos citotóxicos del compuesto **3** en células MCF-7 con diferentes concentraciones del compuesto durante 20 min. Como controles se usaron células tratadas con DMSO y células no tratadas. (Los datos representan media SD de tres experimentos independientes)..... 51
Gráfica 2. Resultados de los estudios de citotoxicidad del compuesto col-BSB-Nap en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml en DMSO..... 87
Gráfica 3. Resultados de los estudios de citotoxicidad del compuesto col-BSB-OMe en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml en DMSO..... 87

Abreviaturas

°C	Grados Celsius	**RMN ^{11}B**	Resonancia magnética nuclear de boro-11
a	Señal ancha	**RMN ^{13}C**	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
Ac	Acetilo	**RMN ^{1}H**	Resonancia magnética nuclear de protón
Boc	ter-butiloxicarbonilo	**DCC**	N, N'-diciclohexilcarbodiimida
BODIPYs	Boro dihidropirano	**s**	Segundos
Bz	Benzoilo	**S**	Singulete
CCF	Cromatografía en capa fina	**S_0**	Estado basal singulete
CH_2Cl_2	Diclorometano	**S_1**	Estado excitado singulete
$^{-}ClO_4$	Ion clorato	**t-Bu**	Ter-butil
DiD	Perclorato de1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetrametilindodicarbocianine	**UV-vis**	Ultravioleta-visible
DiR	yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina	**π**	Enlace pi
DiO	Perclorato de 3,3'-Dioctadeciloxacarbocianine	**π***	Antienlace pi
DCC	N, N'-diciclohexilcarbodiimida	**σ**	Enlace sigma
DMAP	4-dimitilaminopiridina	**σ***	Antienlace sigma
DMSO	Dimetilsulfoxido	**ϕ**	Rendimiento cuántico
E	Energía	**λ**	Longitud de onda
EtOH	Etanol	**s**	Segundos
F	Flúor	**S**	Singulete
h	Horas		
H_2SO_4	Ácido sulfúrico		
hv	Luz (energía radiante)		
Hz	Hertz		
J	Constante de acoplamiento		
K	Potasio		
KOH	Hidróxido de potasio		
MeOH	Metanol		
MHz	Mega Hertz		
min	Minutos		
n	Pares de electrones libres		
^{-}OMs	Ion mesilato		
Ph	Fenil		
pH	Potencial de hidrogeno		
ppm	Partes por millón		
R	Radical alquilo		

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Química de materiales

"La química de materiales implica el uso de la química para el diseño y síntesis de materiales con características físicas interesantes o potencialmente útiles. También implica la caracterización, procesamiento y compresión a nivel molecular." [1]

Cuando nos adentramos a una nueva área del conocimiento es necesario matizar una definición adecuada para entender el estudio del área, por ejemplo, la descripción anterior, es una de las muchas definiciones de química de materiales que expone de una manera unívoca la compresión de este campo, cuyo fundamento subyace de la relación entre la estructura-composición-síntesis de una sustancia para preceder de un conjunto de propiedades únicas. En este sentido, es indudable decir que los materiales son *"sustancias que tienen propiedades que las hacen útiles en maquinaria, estructuras, dispositivos y/o productos*". [2]

Dicho lo anterior, los materiales pueden exhibir una gran diversidad de propiedades debido a su composición y estructura [3], una de las características más atractivas de los materiales son las propiedades ópticas [4], las cuales describen el comportamiento de un material cuando interaccionan con la radiación electromagnética, entre estas propiedades se encuentra la fotoluminiscencia, propiedad que consiste en la emisión de luz sin elevar la temperatura del material. Es importante mencionar que existen materiales tanto inorgánicos como orgánicos que presentan esta propiedad. En el caso de los materiales orgánicos es muy común encontrar en la literatura a los polímeros conjugados [5], no obstante, moléculas de bajo peso molecular también han presentado excelentes propiedades fotoluminiscentes como son los derivados de dipirrometano [6], aminoácidos [7], chalconas [8], derivados del antraceno o bases de Schiff [9] [10]. Las bases de Schiff han llamado la atención en especial debido a que la incorporación de elementos como: Al, B, Si, Sn o Ag en su estructura molecular se ha observado una mejora en cuanto a sus propiedades fotoluminiscentes.

Hoy en día, la comunidad científica busca desarrollar materiales fotoluminiscentes que posean numerosas aplicaciones prácticas en diversas áreas de la ciencia y tecnología así como de materiales multi-respuesta que tengan la capacidad de responder a estímulos externos observando un cambio en sus propiedades

fotoluminiscentes con el fin de poder evaluar determinado objeto de interés [11] [12] [13]. No obstante, además de desarrollar materiales funcionales, se ha buscado implementar métodos de síntesis sustentables cuyo propósito sea reducir el impacto ambiental y costos para su obtención [14]. Los métodos sintéticos que implican el uso de las microondas, la mecanosíntesis y la síntesis asistida por ultrasonido han demostrado ser herramientas que cumplen con estas expectativas comparados con métodos sintéticos convencionales. A pesar de la preeminencia de estas herramientas, aún es muy escasa su implementación para la obtención de materiales fotoluminiscentes.

Por lo que, en el presente trabajo se expone la síntesis de bases de Schiff y compuestos de organoboro luminiscentes mediante métodos de síntesis sustentables, su respectiva caracterización química-óptica y la aplicación de los nuevos materiales luminiscentes como sensores y tintes celulares

CAPITULO 2

ANTECENDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 La fluorescencia

Desde la primera observación de una sustancia luminiscente en una infusión acuosa de la madera del árbol mexicano *Lignum nephriticum* por el médico y botánico N. Monardes en 1565 [15], o el aislamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) por O. Shimomura [16], hasta el día de hoy se han descubierto y desarrollado un inmenso número de materiales *fluorescentes*. La *fluorescencia* es un proceso de emisión, en este fenómeno las moléculas o átomos son capaces de emitir fotones, que percibimos como luz, debido a la relajación de un estado excitado $\mathbf{S_1}$ a su respectivo estado fundamental $\mathbf{S_0}$, a causa de la excitación por la absorción de radiación electromagnética (**Figura 1**) [17].

$$S_0 + h\nu \xrightarrow{\text{Absorción}} S_1$$

$$S_1 \xrightarrow{\text{Emisión}} S_0 + h\nu$$

Figura 1. Descripción gráfica de un proceso de absorción y emisión.

Sin duda alguna, una de las maneras más didácticas de explicar el fenómeno de la *fluorescencia* es mediante el diagrama de Jablonski (**Figura 2**), que ilustra las posibles formas y caminos que una molécula o átomo excitado libera su exceso de energía para retornar a su estado fundamental, es indispensable mencionar que la fotoluminiscencia exhibe dos fenómenos; la *fluorescencia* y la *fosforescencia*.

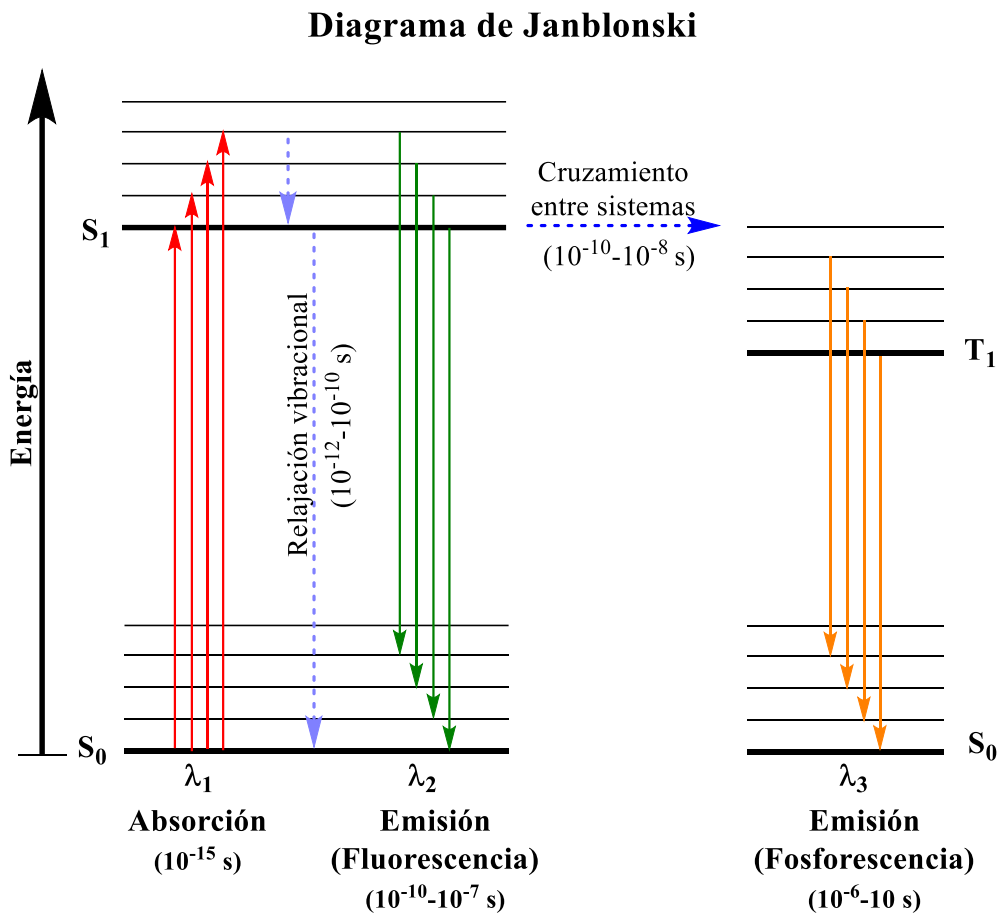


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

De acuerdo con el diagrama de Jablonski, los procesos de relajación pueden clasificarse de dos maneras: no radiactivos y radiactivos. La relajación no radiante consiste en la disipación de la energía al medio (solvente o ambiente) debido a las colisiones y a las vibraciones de la especie excitada, un ejemplo de ello es la relajación vibracional que es tan eficaz que el tiempo de vida media de este proceso ronda entre los 10^{-10}-10^{-12} s. Por otra parte, la relajación radiante se basa en la emisión de radiación electromagnética (comúnmente en el rango del espectro visible). En este proceso de relajación, las especies en el estado excitado $\mathbf{S_1}$ (líneas gruesas color negro) se relajan a cualquier estado vibracional del estado fundamental $\mathbf{S_0}$ (líneas delgadas color negro), se debe tomar en cuenta que, si el proceso de relajación vibracional tiene un tiempo de vida media menor que la relajación radiante, no se manifestara el proceso de emisión.

El *fluoróforo* es la parte principal del material que hace que presente el fenómeno de fluorescencia, existe una gran diversidad de fluoróforos los cuales difieren en las

longitudes de onda de excitación y emisión. Además, los *fluoróforos* se clasifican en intrínsecos y extrínsecos, los primeros presentan el fenómeno de fluorescencia por naturaleza, mientras que los segundos son desarrollados en el laboratorio bajo ciertos componentes y características estructurales (***Figura 3***) *[18]*.

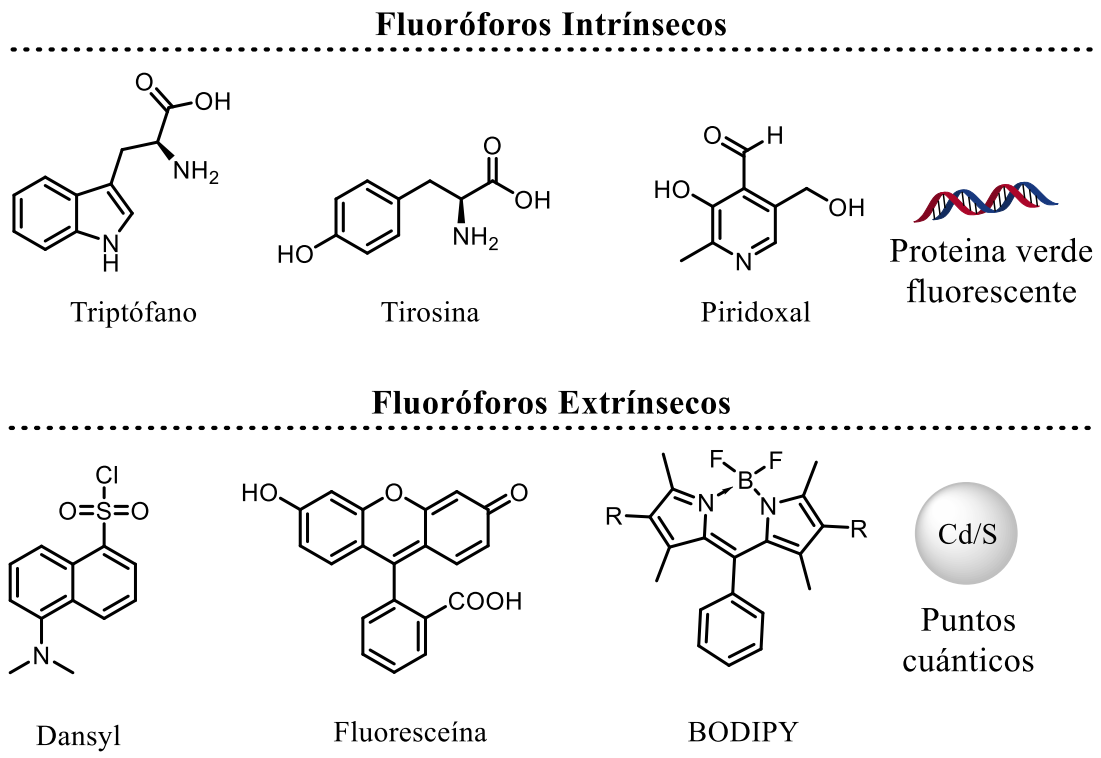
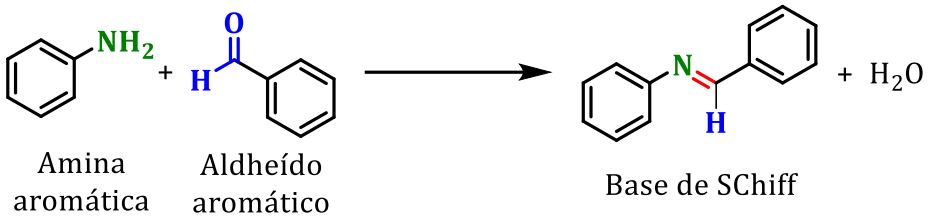


Figura 3. Algunos ejemplos de fluoróforos intrínsecos y extrínsecos.

Una de las importancias de los fluoróforos radica en que pueden ser la parte indicadora de los materiales para una aplicación específica, la unión de estos a diversas estructuras da como resultados materiales capaces de identificar contaminantes, minerales, y estructuras biológicas de manera selectiva y ser estudiadas mediante espectroscopía de fluorescencia, ya sea por el incremento de la intensidad, la activación o la supresión de la fluorescencia.

2.2 Bases de Schiff fluorescentes

Las bases de Schiff **fueron descritas por primera vez** en 1964 por Hugo Schiff, a quien deben su nombre [19]. Son el producto de condensación entre un aldehído o cetona con una amina aromática (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Una de las ventajas de esta clase de compuestos es su fácil preparación y la posibilidad de modificar su estructura con distintos sustituyentes, dada la diversidad existente de aminas primarias, aldehídos y cetonas.



Esquema 1. Reacción de condensación de un aldehído y una amina aromática para la formación de una base de Schiff.

Las bases de Schiff son compuestos de gran importancia en la química debido a su versatilidad, por ejemplo, en la química de coordinación son usadas como ligandos en metales para la obtención de catalizadores [20] [21], mientras que en la química orgánica se utilizan como intermediarios sintéticos o estructuras base para la síntesis de productos con una importante actividad biológica [22] [23].

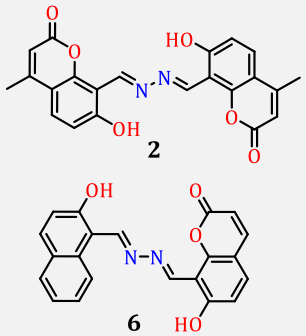
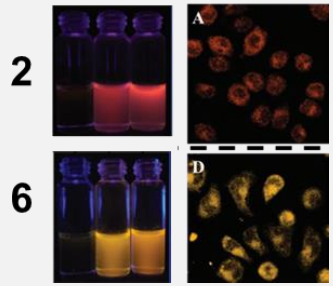
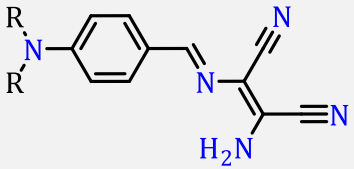
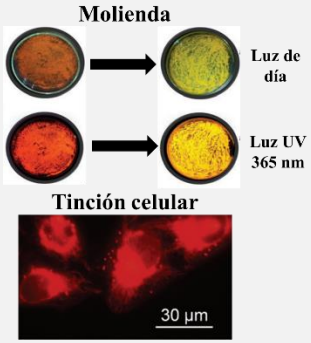
Debido a que las bases de Schiff suelen tener un sistema conjugado, estas absorben fuertemente en la región UV-Visible del espectro electromagnético generando compuestos muy coloridos. La incorporación de grupos funcionales o estructuras moleculares "complejas" mejoran las propiedades fotofísicas de las bases de Schiff. Estas modificaciones estructurales les ha otorgado aplicaciones en áreas como en la analítica (indicadores), en la optoelectrónica (desarrollo de sensores y dispositivos fotovoltaicos), y especialmente, en la bilogía celular para el desarrollo de sondas celulares fluorescentes.

Hoy en día, hay una plétora de sondas celulares fluorescentes para observar los organelos celulares mediante técnicas de imagenología fluorescente, sin embargo, muchas de estas son sondas complejas y de elevado costo. La imagenología por fluorescencia se ha estado convirtiendo en una herramienta de gran importancia en el diagnóstico médico tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, las bases de Schiff para la aplicación en imagenología fluorescente siguen siendo escaso, pues la mayoría de las bases de Schiff son utilizadas como quimio-sensores de metales como: Al^{3+}, Cu^{2+} o Zn^{2+} y evaluar su respuesta de fluorescencia a estos iones. Sin embargo, es cierto que las sondas celulares fluorescentes derivadas de bases de Schiff han demostrado ser una promesa para este propósito, estos compuestos tienen características aceptables tales como baja citotoxicidad, facilidad de síntesis, no invasivos y alta fotoestabilidad, además, es destacable mencionar que algunas bases de Schiff pueden presentar diferentes propiedades atractivas para ciertos estímulos

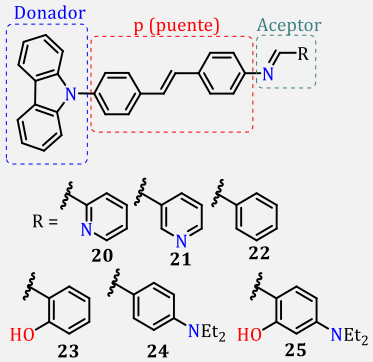
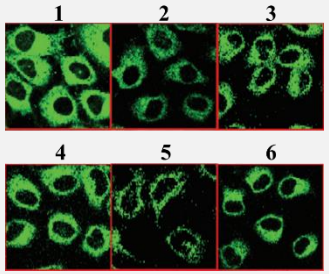
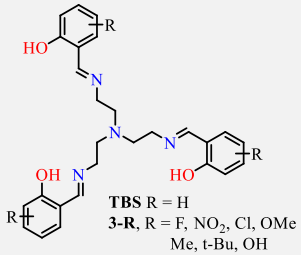
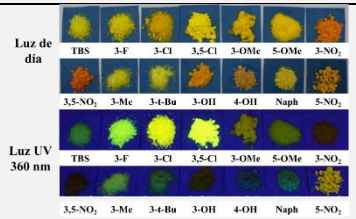
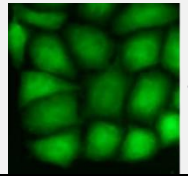
externos como son el vaporcromismo [24], termocromismo [25], piezocromismo o halocromismo [26] [27]. Debido a sus aplicaciones potenciales, estos materiales han atraído un considerable interés de investigación.

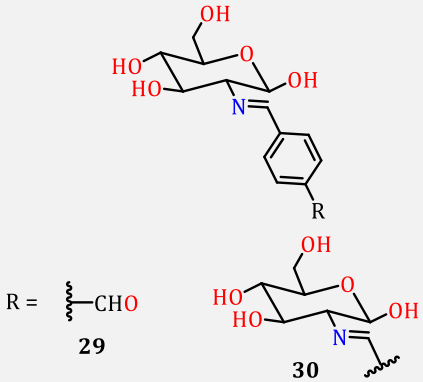
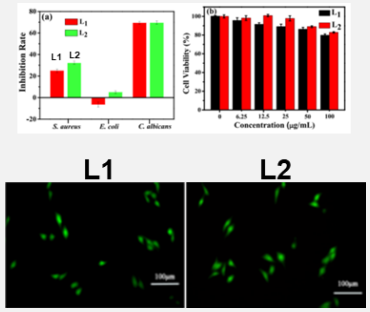
Aunque en la literatura podemos encontrar, en mayoría, bases de Schiff para sensado de un ion metálico y como resultado evidenciar una alta eficiencia de fluorescencia del complejo obtenido, existen pocos reportes de bases de Schiff que presentan el fenómeno de fluorescencia que muestran interesantes fenómenos y aplicaciones en imagenología celular fluorescente sin la intervención de algún ion metálico (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Bases de Schiff con propiedades fluorescentes y su aplicación.

Base de Schiff	Imágenes	Descripción	Ref.
		Bases de Schiff derivadas de la cumarina obtenidas mediante síntesis convencional. Estas moléculas presentan una alta eficiencia de fluorescencia inducida por agregación en mezclas DMSO-H_2O. Los agregados son estables en tiempos prolongados y con un rendimiento cuántico de 0.827 para **2** y 0.546 para **6**. Debido a las buenas propiedades fluorescentes de **2** y **6**, estos se aplicaron para la obtención de bioimágenes fluorescentes en células HeLa donde se observó principalmente el citoplasma usando una concentración 5µM de los compuestos.	[28]
 **10** R = CH_3 **11** R = $(CH_2)_3CH_3$		bases de Schiff derivados del diaminomaleonitrilo (**10** y **11**), los compuestos se obtuvieron a través de una reacción de condensación catalizada en medio acido a 50 °C. Debido a la incorporación de cadenas alquílicas en la unidad donadora el compuesto **11** genero un material con emisión en la región del rojo, además de presentar propiedades mecanocrómicas y aplicación en imagenología celular a causa de la formación de agregados tipo *J* en el estado sólido. para la tinción celular se empleó una solución de **11** en DMSO con una concentración de 5 mM.	[29]

Continuación de la **Tabla 1**…

		Bases de Schiff derivados del carbazol con una estructura tipo D-π-A. Para la síntesis de estos compuestos se hace el uso de reactivos corrosivos y de disolventes tóxicos. Los seis compuestos no presentaron luminiscencia en solución, sin embargo, la formación de agregados en mezclas acetonitrilo/agua tuvo un incremento de hasta 7 veces la intensidad de florescencia. Los seis compuestos tienen una efectiva internalización en las células HepG2 tiñendo de manera uniforme en el citoplasma en concentraciones de 20 μM.	[30]
 **TBS** R = H **3-R**, R = F, NO_2, Cl, OMe Me, t-Bu, OH **4-R**, R = OH **5-R**, R = OMe, NO_2 **3,5-R**, R = Cl, NO_2 **Naph**, R = Naftilo	  Compuesto **3,5-Cl** en células HeLa	Bases de Schiff no conjugadas derivadas del salicilaldehído y una triamina. Algunos de estos derivados presentaron fluorescencia (**3-F**, **3-Cl**, **3,5-Cl**) mientras que en otros fue de muy baja intensidad o incluso nula (**TBS**, **5-OMe**, **3-OMe**, **5-NO_2**, **3-NO_2**, **3,5-NO_2**, **3-Me**, **3-t-Bu**, **3-OH**, **Napth**). Es evidente que la presencia de auxocromos como los átomos de F y Cl en los derivados de las tri-bases de Schiff intensificaron notablemente la fluorescencia. Debido a la buena intensidad de fluorescencia de la tri-base de Schiff **3,5-Cl**, además de presentar el mayor rendimiento cuántico (Φ = 0.18), esta fue implementada como tinte fluorescente en células HeLa donde se observó una notable tinción del citoplasma	[31]

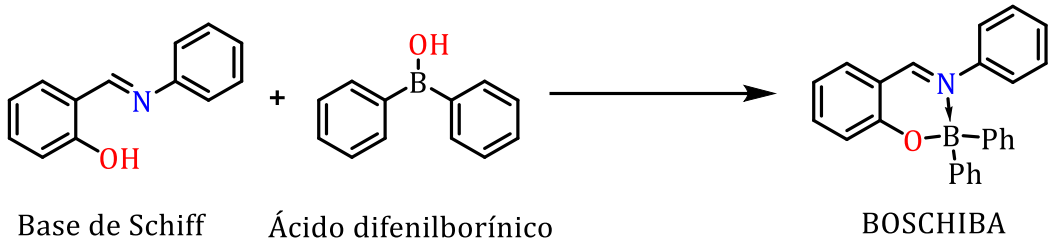
Continuación de la **Tabla 1**…			
		Bases de Schiff (*mono-* y *di-*) derivadas de la D-glucosamine. Los compuestos **29** y **30** presentaron una banda de emisión a una longitud de onda de 450 nm debido a la presencia de electrones π-conjugados en una estructura plana rígida. Aunque teóricamente los compuestos parecieran ser equivalentes, el compuesto **30** tuvo efecto antibacterial mientras que el compuesto **29** presentó mejores propiedades para la tinción celular	[32]

Como se ha observado, hoy en día existe una variedad de bases de Schiff que están destinados a la tinción del citoplasma, pese a que muestran buenas propiedades fluorescentes y de selectividad, la implementación de nuevos métodos sintéticos más amigables con el medio ambiente para su obtención sigue siendo escaso. Es por ello que la implementado tecnologías verdes para la producción de materiales más sustentables y con un costo de elaboración relativamente bajo es una área de oportunidad para explorar, además cuya producción podría adaptarse a nivel industrial debido a la naturaleza del proceso de síntesis.

2.3 Compuestos de organoboro derivados de bases de Schiff: BOSCHIBAs

Una de las principales características de las bases de Schiff es su función como ligandos en química de coordinación. El grupo funcional imina es básica (debido al par electrónico disponible sobre el átomo de nitrógeno) y exhibe propiedades π-aceptoras lo que le permite donar electrones a través de la formación de un enlace σ y una retrodonación sobre los orbitales π de antienlace del ligando.

BOSCHIBA, es un acrónimo proveniente del inglés resultado de la unión de las palabras "**Bo**ron **Schi**ff **Ba**se" [33], y hace referencia a compuestos que en su estructura contienen una base de Schiff y un átomo de boro (**Esquema 2**)



Esquema 2. Representación general de la síntesis de una BOSCHIBA.

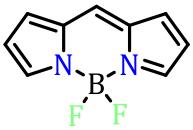
Se ha reportado que estos compuestos presentan excelente fluorescencia, debido a su sistema aromático conjugado y a su estructura rígida, dos de las variables dependientes de la fluorescencia. Además, las vacantes electrónicas del orbital *p* en compuestos trivalentes de boro le confieren propiedades ópticas valiosas, como es la transferencia de carga en el sistema D-π-A (donador-π-aceptor) [34], generando clases de materiales fluorescentes altamente eficientes y modulables para una variedad de aplicaciones. Además, cuando los átomos de boro tienen sustituyentes

voluminosos y se combinan con compuestos donantes de electrones, forman compuestos fluorescentes estables al aire [35].

La combinación de moléculas orgánicas y compuestos de boro generan otros tipos de complejos metalorgánicos luminiscentes que han mostrado potenciales aplicaciones en optoelectrónica [36], óptica no lineal [37], materiales químicos usados como sensores fluorescentes [38], y como tintes fluorescentes en bioimágenes [39], por ejemplo: los BODIPYs y los dioxaborinos.

2.3.1 BODIPYs y Dioxaborinos

Los BODIPYs son derivados del dipirrometano (**Figura 4**), esta clase de compuestos presentan buenas características ópticas como: una fuerte intensidad de fluoresceína, altos rendimientos cuánticos, cortos desplazamientos Stokes y buena fotoestabilidad. Sin embargo, la principal desventaja subyace en la estrategia sintética para su obtención, puesto que debido al empleo de catalizadores metálicos para la funcionalización del anillo pirrólico, el uso de disolventes altamente tóxicos y el empleo de condiciones de reacción estrictas (disolventes anhidros y atmósfera inerte) hacen que el costo de la síntesis se incremente considerablemente, además de provocar un impacto ambiental mayor.



Núcleo
BODIPY

Figura 4. Estructura general de los BODIPYs.

Por su parte, los dioxaborinos (**Figura 5**), compuestos derivados de las β-dicetonas son moléculas que al igual que los BODIPYs presentan buenas propiedades ópticas, adicionalmente, pueden mostrar una fuerte fluorescencia en la región del rojo en estado sólido. La funcionalización de estos compuestos o la incorporación de cadenas poliméricas les ha permitido ser aplicados en materiales fluorescentes con respuesta a diferentes parámetros en un sistema como la temperatura, la polaridad del medio, el oxígeno y la viscosidad [40] [41]. En cuanto a la síntesis, es relativamente menos compleja que la síntesis de los BODIPYs, debido a que las β-dicetonas derivan de la condensación entre dos cetonas o una cetona y un éster [42].

Desafortunadamente, los núcleos dioxaborinos presentan una baja estabilidad especialmente hidrolítico [43].

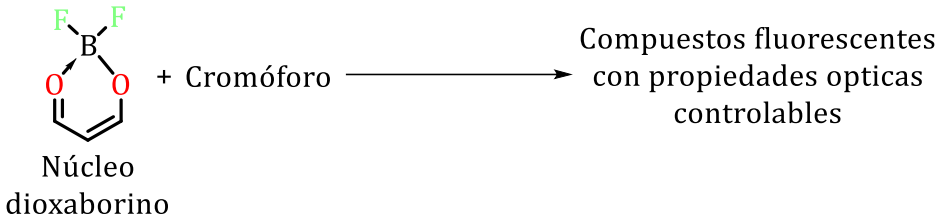
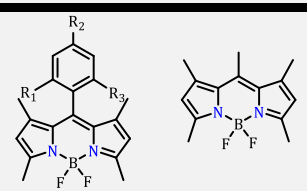
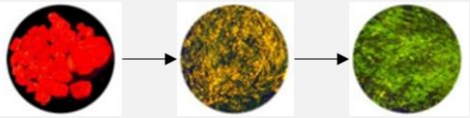
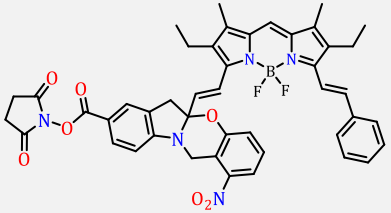
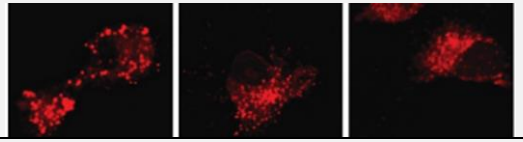
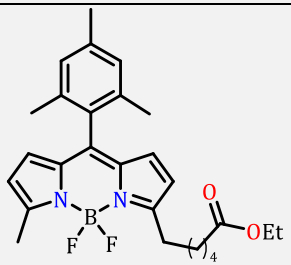
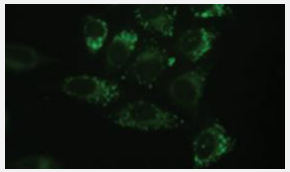


Figura 5. La combinación del núcleo dioxaborino con diferentes estructuras generan materiales con una diversidad de propiedades ópticas.

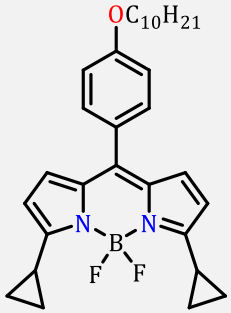
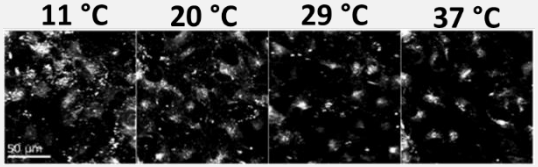
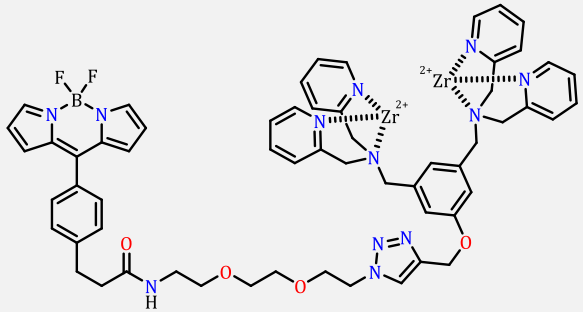
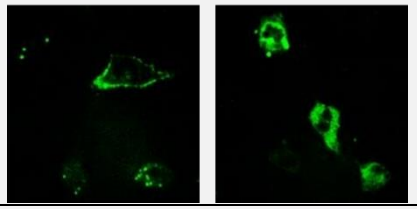
En la **Tabla 2** y **Tabla 3** se muestran ejemplos de BODIPYs y dioxaborinos con diversas aplicaciones, así también se exponen algunas características fotofísicas como la λ_{max} de absorción, longitud de onda de emisión y rendimiento cuántico.

Tabla 2. Algunos compuestos derivados de BODIPYs; características fotofísicas y sus aplicaciones.

BODIPY	Condiciones de reacción	R. Q. (%)	λ_{max} (nm)	λ_{emi} (nm)	Φ_F (%)	Aplicación	Ref.
 **B1** $R_1=R_2=R_3=CH_3$ **B2** $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$ **B3** $R_1=R_2=R_3=H$	Síntesis convencional Disolventes anhidros Atmósfera inerte Reactivos tóxicos	81 71 80 20	500 500 500 494	520 520 519 512	84 73 46 85	Presentan propiedades mecanocrómicas 	[44]
	Síntesis convencional Más de 10 etapas Disolventes anhidros Atmósfera inerte Reactivos tóxicos Empleo de catalizadores	14	608	623	165	Visualización de compartimientos lisosomales 	[45]
	Síntesis convencional Empleo de catalizadores Disolventes anhidros y tóxicos Atmósfera inerte	75	509	519	94	PM546 	[46]

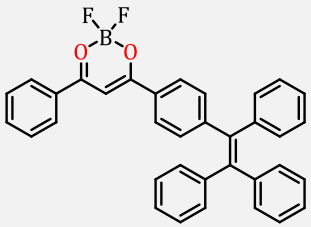
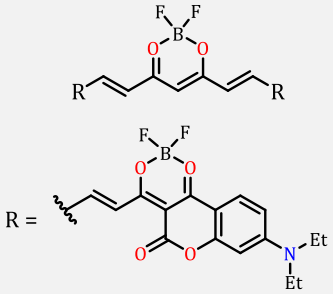
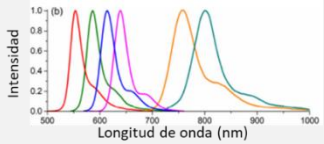
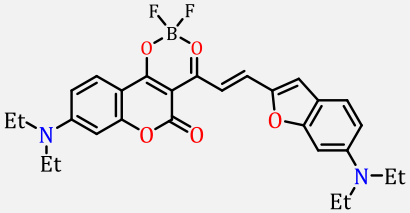
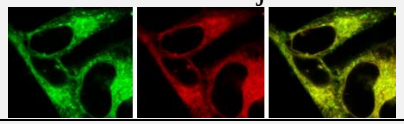
Nota: los rendimientos químicos (R. Q.) reportados en la tabla solo consideran la reacción final y no el global.

Continuación de la **Tabla 2**…

BODIPY	Condiciones de reacción	R. Q. (%)	λ_{max} (nm)	λ_{emi} (nm)	Φ_F (%)	Aplicación	Ref.
	Síntesis por calentamiento convencional Empleo de catalizadores Atmósfera inerte	71	529	538	61	Sensor de temperatura 	[47]
	Síntesis convergente (7 etapas) Usa de catalizadores Disolventes anhidros Atmósfera inerte	*	497	512	63	Rotor molecular fluorescente para la distinción de células apoptóticas 	[48]

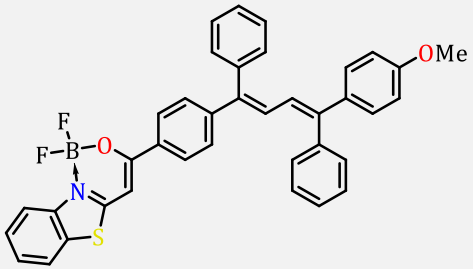
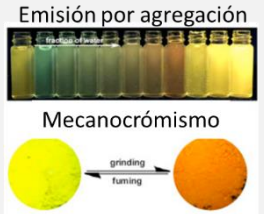
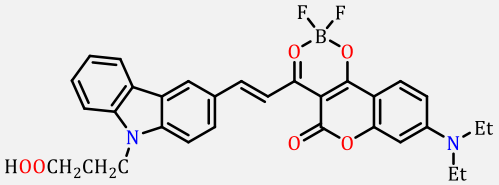
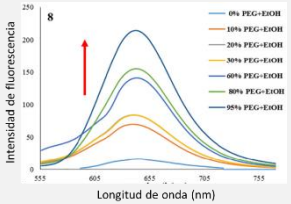
Nota: los rendimientos químicos (R. Q.) reportados en la tabla solo consideran la reacción final y no el global.
*Cuantitativo

Tabla 3. Algunos compuestos derivados de dioxaborinos; características fotofísicas y sus aplicaciones.

Dioxaborino	Condiciones de reacción	R. Q. (%)	λ_{max} (nm)	λ_{emi} (nm)	Φ_F (%)	Aplicación	Ref.
	Uso de catalizadores Disolventes anhidros Atmósfera inerte	84	433	560	80	Un material fluorescente polimórfico con emisión en estado sólido y respuesta a múltiples estímulos (presión, temperatura y disolvente) 	[49]
	Síntesis convergente Disolventes anhidros Atmósfera inerte	33	728	757	37	Fluoróforo que emite entre el rango visible e infrarrojo cercano. Desplazamiento hipsocrómico en disolventes próticos polares 	[50]
	Síntesis lineal Disolventes anhidros Reactivos tóxicos Atmósfera inerte	57	602	622	93	Sonda solvatocrómica de infrarrojo cercano para mapeo de polaridad de membranas en células bajo estrés 	[51]

Nota: los rendimientos químicos (R. Q.) reportados en la tabla solo consideran la reacción en la etapa final y no el global.

Continuación de la **Tabla 3**…

Dioxaborino	Condiciones de reacción	R. Q. (%)	λ_{max} (nm)	λ_{emi} (nm)	Φ_F (%)	Aplicación	Ref.
	Síntesis convergente Disolventes anhidros y tóxicos Empleo de catalizadores Atmósfera inerte	60	420	516	37	Este compuesto presenta emisión inducida por agregación, además de tener propiedades mecanocrómicas 	[52]
	Síntesis lineal Calentamiento convencional Disolventes anhidros Reactivos tóxicos Atmósfera inerte	21	559	621	51	Compuesto con sensibilidad a la viscosidad. También presenta propiedades solvatocrómicas 	[53]

Nota: los rendimientos químicos (R. Q.) reportados en la tabla solo consideran la reacción en la etapa final y no el global.

Como se observa en la tabla los compuestos derivados de BODIPYs y dioxaborinos presentan buenas propiedades ópticas como: una absorción en longitudes de onda entre el rango de 450-700 nm, emisiones fluorescentes en el rango de 500-700 nm o en el infrarrojo cercano (750-2600 nm), así como rendimientos cuánticos superiores al 37%. Como se ha visto anteriormente, estas características ópticas de los derivados de boro les han permitido tener una gran variedad de aplicaciones en áreas como: la electroluminiscencia, luminiscencia, imagenología celular, cuantificación de sustancias ilícitas, aplicaciones en química forense, sensores para la evaluar la calidad y frescura de los alimentos, el desarrollo de nuevos colorantes laser, sensores químicos para la determinación de metales pesados en fuentes de agua potable, y terapia fotodinámica, esto gracias a la posible modificación estructural, no obstante, comúnmente suele ser complicada debido a las condiciones de reacción para llevar a cabo la modificación.

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado materiales multifuncionales a partir de compuestos organoboro derivados de bases de Schiff [54] [55] [56] (**Figura 6**). Estos materiales han presentado buenas propiedades fotofísicas al igual que los fluoróforos más utilizados en los compuestos anteriormente mencionadas. Además, se ha observado que estos derivados de boro (BOSCHIBAs) presentan baja citotoxicidad o incluso nula, y gracias a esto, se han utilizado para la tinción celular. Además de presentar propiedades mecanocrómicas, termocrómicas y sensibilidad al medio viscoso. Asimismo, la síntesis de estos materiales se ha obtenido a partir de métodos sintéticos verdes, química sustentable y tiempos de síntesis muy cortos comparados con la síntesis de los BODIPYs o dioxaborinos.

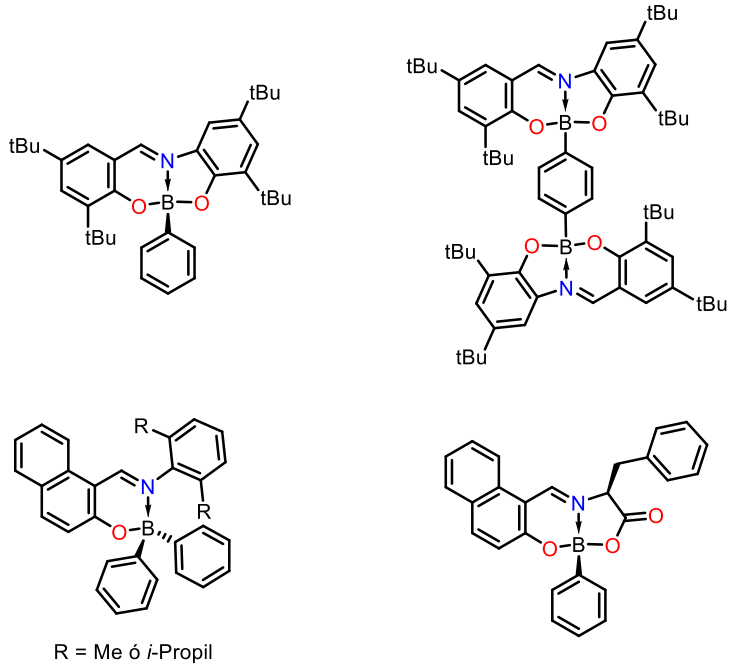


Figura 6. Compuestos organoboro derivados de bases de Schiff.

Con base en esto, la síntesis de nuevos materiales derivados de bases de Schiff provenientes del ácido 4-amonibenzoico y aldehídos aromáticos, así como sus derivados de organoboro puedan tener un potencial uso como fluoróforo en diversos materiales para la aplicación en campos como: la optoelectrónica, la analítica, la medicina e incluso en la biología celular para obtención de bioimágenes fluorescentes, presentando baja citotoxicidad, excelentes propiedades fotofísicas y sintetizados mediante métodos verdes a diferencia de fluoróforos dioxaborinos y BODIPYs que suelen ser sintetizados por métodos químicos clásicos en condiciones extritas de reacción y bajos rendimientos.

2.4 Sondas celulares fluorescentes

La biología celular es una subdisciplina de la biología que se encarga del estudio de las células en lo que respecta a las propiedades, estructura, funciones y ciclo vital. El uso de sondas fluorescentes ha permitido captar imágenes de células cancerígenas sin que interfieran las sanas, lo que ha permitido desarrollar estudios y diagnósticos en la biología celular [57]. También, esta tecnología ha permitido visualizar la morfología o las actividades biológicas de organelos específicos [58] [59]. El área de la biología celular necesita nuevos materiales luminiscentes capaces de marcar específicamente un organelo dentro de la célula que sean asequibles y de alta estabilidad, ya que, si

existen anormalidades a nivel celular esto permite relacionarlo con alguna enfermedad como Alzheimer, diabetes, Parkinson y cáncer [60] [61]. Los organelos como la mitocondria, lisosomas, núcleo, gotas lipídicas y membrana citoplasmática son excelentes monitores para la detención oportuna de enfermedades y diagnóstico médico [62].

Las sondas celulares fluorescentes son materiales capaces de distinguir parte o partes específicas de la célula debido a sus características inherentes, además estos deben poder medirse objetivamente y ser evaluados como un indicador, así como tener color o luminiscencia de cualquier tipo, por ejemplo: quimioluminiscencia, fosforescencia o fluorescencia [63] [64].

De manera general, las sondas fluorescentes están constituidas por tres componentes: una unidad indicadora "fluoróforo" que tiene color o luminiscencia, un receptor que es responsable de unir al analito con los elementos del quimiosensor, y un espaciador o "linker" que conecta y modula la interacción entre el receptor y el elemento fluorescente (**Figura 7**).

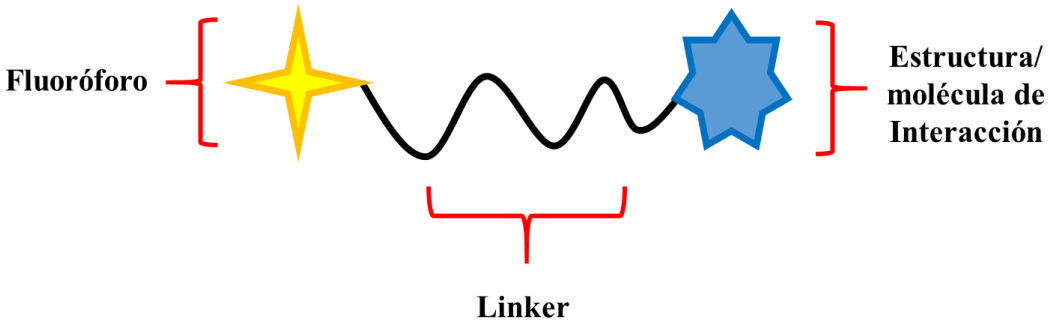


Figura 7. Estructura general de las sondas celulares fluorescentes.

El espaciador juega un papel importante en las sondas celulares, pues separa el fluoróforo de la biomolécula, esta separación reduce la probabilidad de inhibición de la fluorescencia observado en la conjugación fluoróforo-biomolécula. Por otra parte, las cabocianinas como: perclorato DiD, DiR y DiI son los fluoróforos comerciales más utilizados para la obtención de bioimágenes fluorescentes de la célula. Así como también derivados de estiril lactonas, sondas CellMask^{TM} y derivados de BODIPY. Sin embargo, hasta el día de hoy siguen siendo muy escasas las sondas celulares derivadas de BOSCHIBAs. Y finalmente, la estructura de interacción puede estar

constituida por proteínas, antígenos o componentes estructurales del sistema a analizar con de fin de que haya una buena interacción sonda-analito.

Hoy en día, existen diversas sondas celulares fluorescentes que permiten la observación de los componentes internos de la célula mediante microscopía confocal de fluorescencia (**Figura 8**), varios compuestos han sido desarrollados por diversos grupos de investigación cuyo propósito ha sido la observación selectiva de algún organelo de la célula o parte de ella, por ejemplo: el **α-cianostilbeno** utilizado para la observación de mitocondrias y el nucléolo [65], los colorantes comerciales **AIELyso-1** y **NILE-Red** para la observación de liposomas [66] [67]. En el grupo de investigación Jiménez-Muñoz se han desarrollado sondas celulares derivadas de BOSCHIBAs y TINSCHIBAs (derivados de estaño) que tienen una excelente tinción fluorescente del citoplasma o nucleolos.

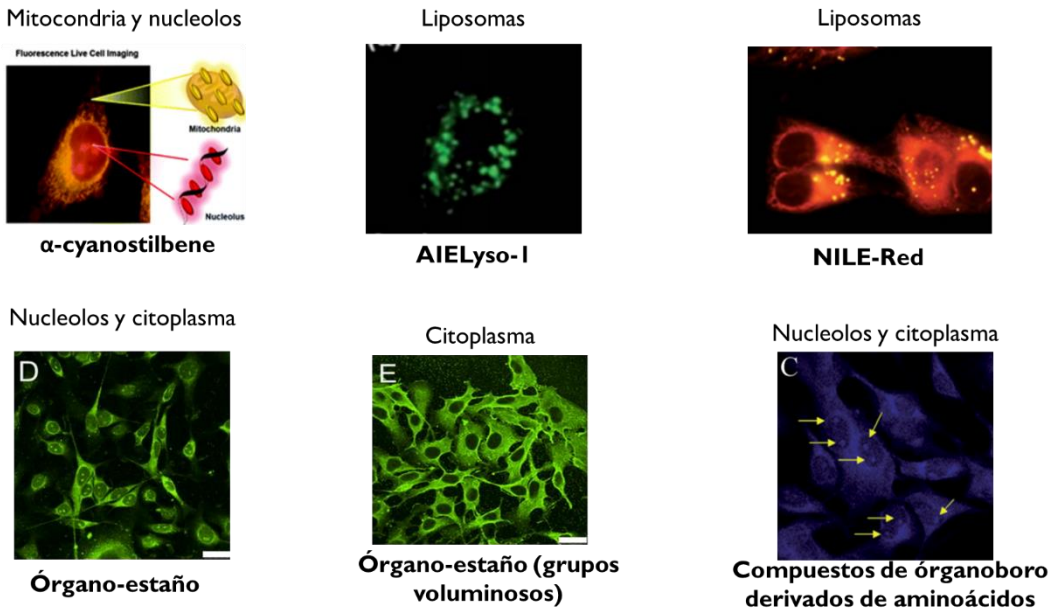


Figura 8. Algunas sondas celulares utilizadas para el marcaje selectivo de un componente celular.

2.4.1 La célula: membrana celular

En este sentido, la membrana celular es una estructura laminar formada por una bicapa de lípidos, estos lípidos contienen una cabeza hidrofílica (fosfato) y cola hidrofóbica (cadena saturada) [68]. La membrana celular es un contenedor del citosol y los organelos de la célula. Los principales componentes de esta bicapa son fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), proteínas integrales, proteínas

periféricas, glúcidos y colesterol. Hablando de este último componente, el colesterol es uno de los principales componentes de la membrana plasmática que comprende entre el 35-40% de la composición total [69]. Las funciones principales del colesterol en la membrana son tres: función estructural, regulación de la fluidez y la formación de microdominios (balsas lipídicas) (**Figura 9**).

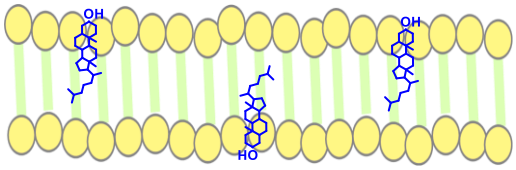


Figura 9. El colesterol es uno de los principales componentes estructurales de la célula, la parte hidrofóbica se inserta entre la bicapa, mientras que la parte polar se encuentra en la superficie externa e interna.

Por otra parte, la membrana celular puede interaccionar de tres maneras con componentes externos a ella, las cuales son: interacciones covalentes [70] [71], interacciones electroestáticas e interacciones hidrofóbicas [72] [73] [74] [75]. No obstante, las dos primeras interacciones resultan tener un efecto potencialmente tóxico, ya que impide el trasporte de nutrientes hacia el interior de la célula así como la inhibición de procesos bioquímicos de gran importancia. Por su parte, las interacciones hidrofóbicas tienen muchas ventajas debido a que no interfieren en los procesos biológicos de la célula puesto que estos tienden a ser inertes. Además, se ha de demostrado que su interacción es rápida y esta va desapareciendo gradualmente con el tiempo, debido a sus propiedades intrínsecas (**Figura 10**). Es por ello, por lo que el uso de componentes estructurales de la membrana celular como los fosfolípidos, cadenas lipídicas y colesterol han presentado excelentes ventajas para el desarrollo de sondas fluorescentes para la tinción selectiva de la membrana.

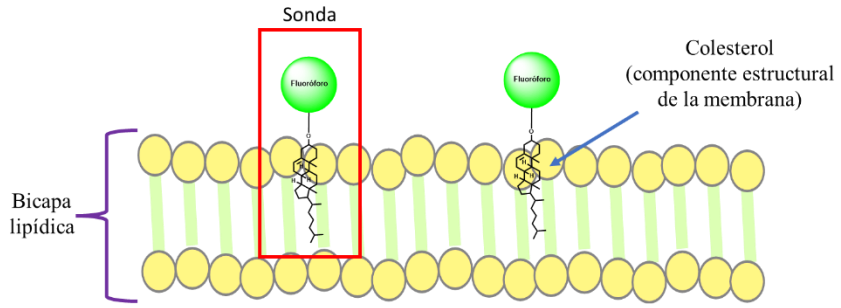
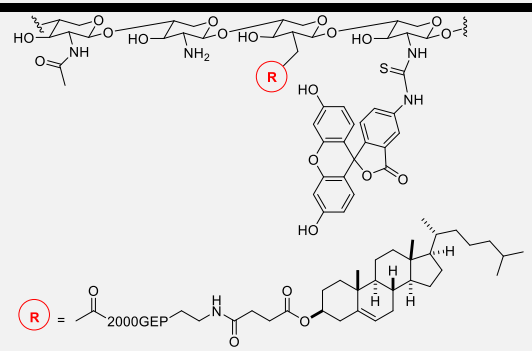
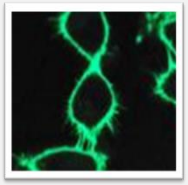
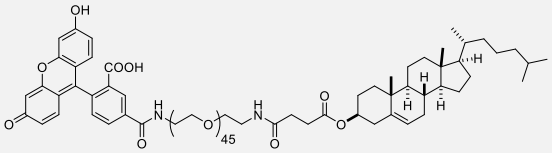
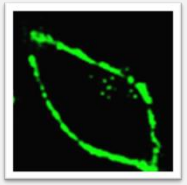
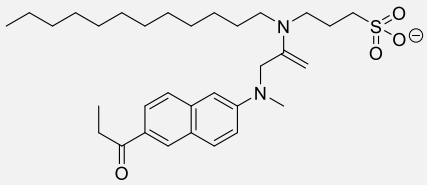
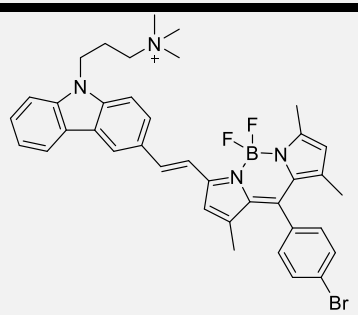
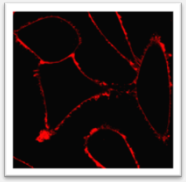
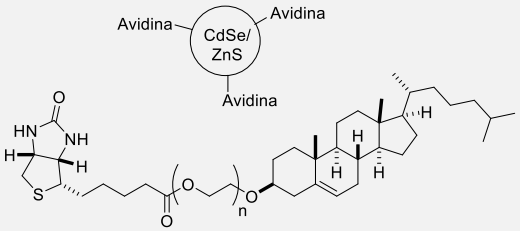
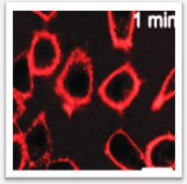
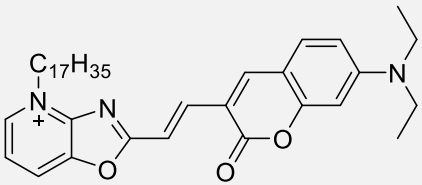
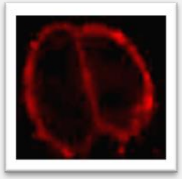


Figura 10. Descripción gráfica de la interacción membrana celular-sonda fluorescente derivada del colesterol.

En este sentido, varios grupos de investigación han hecho uso del colesterol o cadenas lipídicas para el desarrollo de sondas celulares con el fin de obtener una alta selectividad y compatibilidad con la membrana celular. A continuación se describen algunas sondas celulares representativas que han sido desarrolladas por diversos grupos de investigación (**Tabla 4**).

Tabla 4. Sondas representativas para el marcaje selectivo de la membrana celular.

Estructura	Bioimagen	Descripción	Ref.
 Glicol-Chitosán-Colesterol-FITC		Sonda compuesta por colesterol, quitosano e isocianato de fluoresceína (FITC). Marcaje selectivo de la membrana celular con elevados tiempos de retención. La sonda sufre alteraciones cuando se almacena durante largos periodos de tiempo. Costos elevados de síntesis. Altamente citotóxicos para la célula.	[76]
		Sonda compuesta por colesterol, polietilenglicol y FITC. Adhesión en 10 min y una unión de membrana tan firme que podría durar al menos 1 h, posteriormente se internaliza. Síntesis costosa y métodos de purificación complicados. Altamente citotóxicos en concentraciones a 50 µM.	[77]
		Sonda derivada de Laurdan (tinte fluorescente comercial) que rediseñaron introduciendo un grupo de anclaje de membrana basado en una cadena de sulfonato y dodecilo con carga negativa. Mejoran la selectividad de marcaje. Síntesis bajo condiciones estrictas (atmósfera inerte, solventes anhidros). Altamente citotóxicas.	[78]

Continuación de la **Tabla 4**…			
		Sonda bipolar derivada de BODIPY con excelente fotoestabilidad y tiempo de retención en la membrana por 30 min. Síntesis con condiciones estrictas y uso de disolventes tóxicos. Esta sonda presenta una citotoxicidad baja. Por otra parte, esta sonda no presenta fluorescencia en agua pero sí en un ambiente lipofílico convirtiéndola en un excelente candidato para el seguimiento de membrana.	[79]
		Sonda constituida por dos partes independientes; la primera contiene un componente de anclaje para la membrana, y la segunda, constituida por puntos cuánticos (componente emisor de fluorescencia). Se requieren dos etapas para el marcaje de la membrana, tiempos de retención bajos (10 min).	[80]
		Sonda de membrana celular fluorescente diseñada a partir de la unidad bioactiva de oxazolo-piridina. Presenta propiedades solvatocrómicas y grandes desplazamientos Stokes. Presenta alta viabilidad celular (>94%) y una retención prolongada (horas) sobre membrana. No obstante, la síntesis de la sonda involucra condiciones de reacción estrictas y el uso de disolventes tóxicos.	[81]

Las sondas fluorescentes para el marcaje de la membrana celular anteriormente descritas presentan buenas propiedades fotofísicas para la obtención de bioimágenes fluorescentes mediante microscopía confocal. Sin embargo, el uso de grandes polímeros en las sondas suele ser citotóxicas para la célula, también la funcionalización con grupos polares o la incorporación de cadenas cargadas para mejorar la solubilidad en sistemas acuosos de las sondas llegan a incrementar los costos debido al uso de catalizadores, al empleo de métodos de síntesis convencionales y/o al uso de fluoróforos comerciales (costos elevados). Incluso, se ha demostrado que algunas sondas suelen tener un almacenamiento muy específico y drástico para evitar la degradación o modificación de la sonda. En este sentido, el empleo de las BOSCHIBAs como fluoróforo unidos al colesterol podrían ser buenos candidatos para ser utilizados como sondas para la tinción de la membrana celular, debido a bajos costos de síntesis, altamente estables en condiciones normarles y baja citotoxicidad, no obstante, hasta el momento no se ha reportado alguna sonda derivada de los BOSCHIBAs que marquen selectivamente la membrana celular. Además se pretende utilizar la línea celular MCF-7 debido a que expresa niveles considerables de receptor de estrógenos (RE) alfa, lo que ofrece un valioso sistema modelo para el estudio del cáncer de mama positivo para RE.

CAPITULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El desarrollo de materiales fluorescentes derivados de bases de Schiff provenientes del ácido 4-aminobenzoico e hidroxialdehídos sustituidos podrían presentar diversas propiedades fotoluminiscentes útiles para la aplicación como: sensores, materiales optoelectrónicos y tintes celulares fluorescentes. Adicionalmente, la combinación de bases de Schiff con el ácido difenilborínico generaría materiales fotoluminiscentes que podrían exhibir propiedades fluorescentes comparables con fluoróforos reportados en la literatura (BODIPYs, dioxaborinos), mismos que al ser unidos al colesterol se obtendrían sondas celulares fluorescentes para la tinción selectiva de la membrana celular.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis de una serie de bases de Schiff y nuevos compuestos fluorescentes de boro derivados del colesterol, evaluar sus propiedades como sensor de pH, temperatura y viscosidad; y emplearlos como tintes fluorescentes en celulares *in vitro*.

3.2.1 Objetivos particulares

- Sintetizar bases de Schiff a partir del ácido 4-aminobenzoico y aldehídos-*p*-sustituidos bajo el concepto de “química verde” implementando herramientas como el ultrasonido, mecanoquímica y microondas.
- Sintetizar derivados de organoboro a partir de bases de Schiff provenientes del 2-hidroxialdehídos-*p*-sustituidos y el ácido 4-aminobenzoico.
- Sintetizar sondas celulares fluorescentes de organoboro derivados del colesterol para la tinción de la membrana plasmática en células HeLa.
- Elucidar estructuralmente los compuestos obtenidos mediante espectroscopía de RMN de ^{1}H, ^{13}C, ^{11}B y espectrometría de masas.
- Determinar las propiedades fotofísicas de los compuestos obtenidos mediante UV-Vis y fluorometría.

- Evaluar la respuesta fotoluminiscente de los derivados de bases de Schiff y organoboro bajo estímulos externos como: pH, presión, viscosidad y temperatura.
- Evaluar el efecto citotóxico de las bases de Schiff y sondas derivadas de organoboro en células MCF-7 y HeLa.
- Obtener bioimágenes por microscopía confocal de fluorescencia *in vitro* de las bases de Schiff y sondas derivadas de organoboro en células B16F10 y HeLa.

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y equipo

El material necesario para el desarrollo del proyecto se encuentra localizado en el laboratorio de materiales III de la FCQ-UANL. La caracterización de los nuevos compuestos de boro y sus aplicaciones se realizaron en diferentes equipos localizados en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FCQ-UANL) y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). En la **Tabla 5** se desglosan los equipos de análisis y su respectiva ubicación.

***Tabla 5**. Equipos de espectroscopía y espectrometría así como su respectiva ubicación.*

Análisis/Equipo	**Ubicación**
Ultravioleta visible (UV-Vis)	FCQ-UANL
Fluorometría	FCQ-UANL
Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	CINVESTAN-IPN
Resonancia magnética nuclear (^{1}H, ^{13}C, ^{11}B)	Facultad de Medicina-UANL Facultad de Química-BUAP
Difracción de rayos X	FCQ-UANL
Espectroscopía XPS, SEM	FCQ-UANL
Microscopía confocal	Facultad de Biología-UANL

Cabe mencionar que los reactivos utilizados en este proyecto fueron adquiridos por la casa comercial ALDRICH® (ver **Tabla 6**).

Tabla 6. Tabla de reactivos.

Reactivo	**Número de referencia del producto**
Ácido 4-aminobenzoico	A9878-100G, ≥99%
2-Hidroxi-1-naftaldehído	H45353-100G, grado técnico
4-(Dietilamino)salicilaldehído	225681-25G, 98%
3,5-Di-*t*-butil-2-hidroxibenzaldehído	140414-25G, 99%
2-Hidroxi-4-Metoxibenzaldehído	160695-25G, 98%
4-Dietilaminobelzaldehído	D86256-100G, 99%
p-Anisaldehído	A88107-100G, 98%

Continuación **Tabla 6**…	
Colesterol	C8503-25G, ≥92.5%
2-Aminoetil difenilborinato	D9754-10G, 97%

4.2 Disposición de residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos de acuerdo con el plan de gestión integral de residuos peligrosos establecido en la Universidad Autónoma de Nuevo León como se indica en la **Tabla 7**.

Tabla 7. *Clasificación de residuos peligrosos y contenedor en el cual se depositaron.*

Tipo	Disposición
Soluciones salinas, sales ácidos y bases.	Colector A
Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.	Colector B
Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenados.	Colector C
Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos halogenados.	Colector D
Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.	Colector E
Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.	Colector E
Sales de metales preciosos.	Colector F
Combinaciones orgánicas sólidas.	Colector G

4.3 Caracterización

4.3.1 Resonancia magnética nuclear de ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B

Los espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B se realizaron en cloroformo deuterado ($CDCl_3$), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6) o acetona deuterada (acetona-d6) como disolvente, se utilizó el desplazamiento químico del disolvente de anclaje (looked) como referencia para los núcleos analizados, este es un método predeterminado en el software del equipo y una convención propuesta por la IUPAC (NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts) [82]; en un espectrómetro Bruker Advance DPX-400 y un espectrómetro Bruker 500. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, mientras que las constantes de

acoplamiento se denotan con letra *J* y están dadas en Hz. En el caso de la multiplicidad en un espectro de RMN de ^{1}H se denotan con las siguientes letras: simple (s), doble (d), triple (t), cuádruple (c), quintuple (q), multiple (m), ancha (a).

4.3.2 Caracterización fotofísica

Los espectros de absorción, emisión y excitación se obtuvieron usando $CHCl_3$ o MeOH grado HPLC como disolventes, los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro PerkinElmer Lamda 365 de doble haz realizando barridos entre la región de 700 a 210 nm con una velocidad de barrido de 600 nm/min a 20 °C, mientras que los espectros de emisión y excitación se realizaron en un espectrofotómetro Horiba Scientific Fluorolog-3, con un ancho de rendija de excitación de 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm y tiempo de integración de 1 seg.

4.3.3 Caracterización por difracción de rayos-X de monocristal

Las estructuras de rayos-X se registraron en un Bruker SMART APEX II con un detector de área CCD o Bruker D8 Quest con un detector Photon 100 CMOS a 100K equipados con un enfriador de la serie Oxford Cryosystems 700, un monocromador de grafito y un tubo sellado de enfoque fino Mo Kα (λ = 0.71073 Å). Los datos de intensidad se procesaron en el programa Bruker Apex, las correcciones de absorción se aplicaron utilizando SADABS. Las posiciones atómicas iniciales se localizaron por métodos directos usando XS o XT, y las estructuras de los compuestos fueron refinadas por el método de mínimos cuadrados usando SHELXL.

4.3.4 Ensayo de viabilidad celular en células MCF-7

En este estudio se utilizaron células MCF-7 (cáncer de mama) para evaluar los efectos citotóxicos de los compuestos. Las células se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco con una mezcla de nutrientes F-12 (GIBCO DMEM/F12) y suero bovino fetal (SBF) al 10% y 1X antibiótico-antimicótico (todo de ThermoFisher Scientific) a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2. Para los ensayos, las células se sembraron a razón de $1x10^3$ células por pozo en 100 µL de medio en placas de 96 pozos. Posteriormente se dejaron reposar por una noche antes de los tratamientos adicionales. Se añadieron los compuestos en DMSO (Sigma Aldrich®) en concentraciones crecientes (0,62, 1.25, 5 y 10 $\mu g\text{-}ml^{-1}$), y los cultivos se incubaron durante 20 min. Se incluyó un grupo control de vehículo con solo DMSO. La

viabilidad se determinó por medio del ensayo espectroscópico con rojo neutro y las placas se leyeron a 540 nm.

4.3.5 Bioimágenes fluorescentes in vitro

Se sembraron líneas celulares de hepatocitos de hígado murino BpRc1 (ATCC CRL-2217™) y cáncer de mama humano MCF-7 (ATCC CRL-HTB-22™) en placas de 12 pozos a una razón de $1x10^{-5}$ células por pozo en 2 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen Life Technologies) con 10% de FBS, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B contenidos en cajas estériles de 75 cm^2 para cultivo celular (GIBCO). Se incubaron en condiciones estándar (37 °C en un ambiente 5% de CO_2 y 95% humedad) utilizando una incubadora Thermo Scientific modelo 3403. Veinticuatro horas después las células se expusieron al compuesto en concentraciones de 5 y 10 µg/ml en DMSO. Se usaron como controles células no tratadas con el compuesto y tratadas solo con DMSO durante 30 min y finalmente se lavaron con PBS (buffer de fosfatos). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron usando un microcospio confocal de laser (Olympues IX70).

4.4 Métodos

*4.4.1 Síntesis de las bases de Schiff **3** y **4***

*4.4.1.1 Síntesis especifica de la base de Schiff **3***

4.4.1.1.1 Calentamiento convencional (reflujo)

En un matraz provisto de una barra de agitación, se pesan el ácido 4-aminobenzoico (2.0 mmol) y el aldehído **31** (2.0 mmol). La mezcla se disuelve en 10 ml de MeOH. Se adapta un condensador al matraz de reacción y se coloca en una manta de calentamiento. La mezcla de reacción se agita vigorosamente y con calentamiento por 1.5 h. Se evapora cerca del 50% de disolvente a presión reducida. Los sólidos obtenidos se filtran y se lavan con MeOH y hexano frio. El compuesto **33** se recristaliza en una mezcla MeOH/$CHCl_3$ (3/7).

4.4.1.1.2 Síntesis por ultrasonido

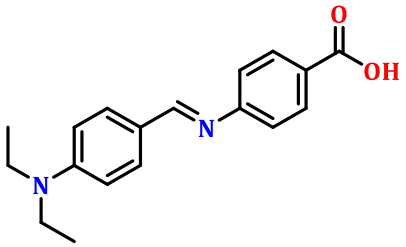
En un matraz bola de 100 ml se pesan el ácido 4-aminobenzoico (2.0 mmol) y el aldehído **31** (2.0 mmol). La mezcla se disuelve en 10 ml de MeOH. El matraz de reacción se coloca en un baño ultrasónico y es irradiado con ultrasonido a una

frecuencia de 40 kHz por 30 min observando la formación de sólidos. Los sólidos obtenidos se filtran y se lavan con MeOH y hexano frio. Para la reacción sin disolvente, los reactivos se mezclan en un matraz y es llevado directamente al baño ultrasónico.

4.4.1.1.3 Síntesis por mecanosíntesis

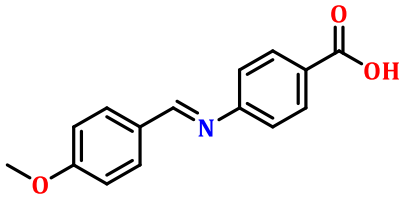
En un vial de acero inoxidable de 20 ml de capacidad previsto de un balín de acero (10 mm Ø) se mezclan el ácido 4-aminobenzoico (2.0 mmol) y el aldehído **31** (2.0 mmol). El vial se coloca en un molino vibracional a una frecuencia de 25 Hz por 30 min. El polvo resúltate se recristaliza en una mezcla MeOH/$CHCl_3$.

*Caracterización espectroscópica de RMN de ^1H y ^{13}C de la base de Schiff **3***



^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.12 (t, 6 H, $^3J(^1H, ^1H)$ = 8.0 Hz, CH_3-CH_2), 3.42 (q, 4 H, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, CH_3-CH_2-), 6.74 (d, 2 H, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, H-3/H-5), 7.23 (d, 2 H, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, H-9/H-13), 7.73 (d, H 2, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, H-2/H-6), 7.93 (d, 2 H, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, H-10/H-12), 8.39 (s, 1 H, N=C-*H*), 12.74 (sa, 1 H, O-*H*). ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 12.41 (*C*H_3-CH_2-), 43.86 (CH_3-*C*H_2), 110.86 (C-2), 122.70 (C-6), 131.06 (C-1), 150.20 (C-3), 130.57 (C-10), 120.91 (C-9), 126.76 (C-11), 156.46 (C-8), 161.21 (C-7), 167.14 (C-14). UV-Visible: 368 nm (THF; 1x10^{-3}M). MS (DIP 70 eV) for $C_{18}H_{20}N_2O_2$ (f. w: 296.37 g/mol): [M^+] 296 *m/z* (52%), [M^+]-15: 281 *m/z* (100%), [M^+]-45: 251 *m/z* (14%), [M^+]-61: 235 *m/z* (16%), [M^+]-175: 121 *m/z* (4%), [M^+]-73: 223 *m/z* (2%), [M^+]-89: 207 *m/z* (4%), [M^+]-117: 179 *m/z* (4%), [M^+]-134: 162 *m/z* (1%), [M^+]-148: 148 *m/z* (6%), [M^+]-190: 106 *m/z* (4%), [M^+]-205: 91 *m/z* (3%), [M^+]-219: 77 *m/z* (6%), [M^+]-231: 65 *m/z* (8%), [M^+]-254: 42 *m/z* (1%). TOF-MS: $[M+H]^+$. Calcd. for $C_{18}H_{21}N_2O_2$: 297.1597 a.m.u.; *found*: 297.1595 a.m.u. (error = 0.8566 ppm). M. p. 243 °C (Lit.42 241-242°).

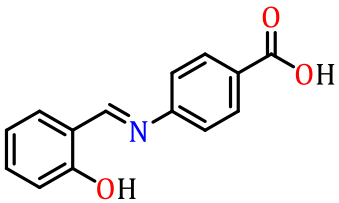
*4.4.1.2 Síntesis especifica de la base de Schiff **4***



La base de Schiff **4** fue obtenida de manera similar al compuesto **3** a través de los métodos de síntesis descritos y empleando el aldehído **2**. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 3.84 (s, 6 H, CH_3O), 7.08 (d, 2 H, $^{3}J(^{1}H, ^{1}H)$ = 8.0 Hz, H-9/H-13), 7.90 (d, 2 H, $^{3}J(^{1}H, ^{1}H)$ = 8.0 Hz, H-1/H-5), 7.96 (d, 2 H, $^{3}J(^{1}H, ^{1}H)$ = 8.0 Hz, H-10/H-12) 7.28 (d, 2 H, $^{3}J(^{1}H, ^{1}H)$ = 8.0 Hz, H-2/H-4), 8.54 (s, *H*-N=C, 1 H, H-7), ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 55.50 (O-CH_3), 114.40 (C-9/C-13), 121.03 (C-2/C-4) 127.58 (C-6), 128.65 (C-11), 130.64 (C-1/C-5), 130.90 (C-10/C-12) 155.81 (C-3), 161.53 (C-8), 162.33 (C-7), 167.13 (C-14). UV-Visible: 280 nm ($CHCl_3$ 1x10^{-3} M)**.** MS (DIP 70 eV) for $C_{15}H_{13}NO_3$ (f. w: 256.28 g/mol): [M^+] 256.09 *m/z* (34.21%), [M^+]-118.03: 138.06 *m/z* (100%), [M^+]-105.02: 151.07 *m/z* (39.47%), [M^+]-117.04: 139.06 *m/z* (10.52%), [M^+]-147.03: 109.06 *m/z* (18.42%). TOF-MS: $[M+H]^+$. Calcd. for $C_{15}H_{14}NO_3$: 256.0968 a.m.u.; *found*: 256.0973 a.m.u. (error = 1.8746 ppm). M. p. 199 °C.

*4.4.2 Síntesis de la base de Schiff **SB-H**, **SB-OMe**, **SB-NEt**, **SB-tBu** y **SB-Nap***

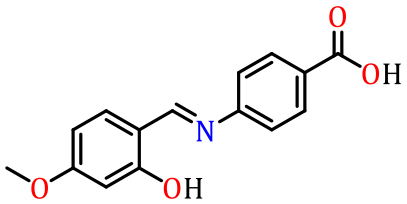
*4.4.2.1 Síntesis especifica de la base de Schiff **SB-H***



En un matraz bola de 100 ml provisto de una barra de agitación se adicionó el hidroxibenzaldehido **A-1** (2.0 mmol), seguido de 40 ml de metanol (grado técnico). Posteriormente, se adicionó el ácido 4-Amino-benzoico (274.28 mg, 2 mmol), la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente o ultrasonido hasta observar el consumo total de las materias primas. Finalmente, el precipitado de reacción se filtró y se hicieron lavados con hexano para obtener como producto un sólido de color amarillo claro. Rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 266-268 °C. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 7.01 (m, 2H), 7.46 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8 Hz,

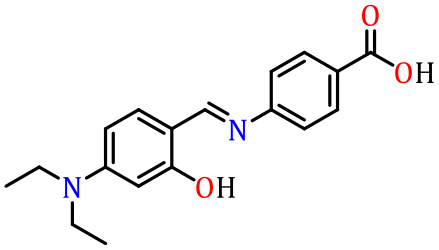
2H), 7.65 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.97 (s, 1H), 12. 91 (a, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 116, 120.6, 122.5, 135.5, 158.0, 162.2, 169.4

*4.4.2.2 Síntesis especifica de la base de Schiff **SB-OMe***



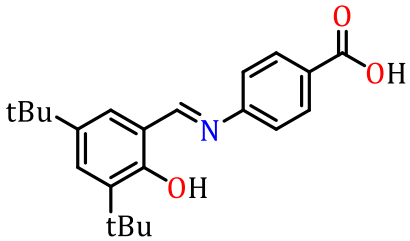
La base de Schiff **SB-OMe** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **SB-H**, empleando el aldehído **A-2**. Sólido amarillo. Rendimiento químico del 92%. Punto de fusión 281-283 °C. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 3.88 (s, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.58 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.54 (d , J = 8 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.88 (s, 1H), 13.36 (a, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ:

*4.4.2.3 Síntesis especifica de la base de Schiff **SB-NEt***



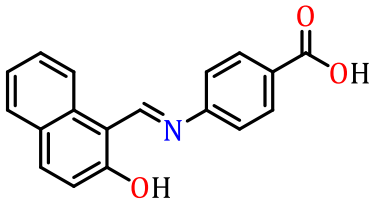
La base de Schiff **SB-NEt** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **SB-H**, empleando el aldehído **A-3**. Sólido amarillo. Rendimiento químico del 80%. Punto de fusión 237-240 °C. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 1.20 (t, J = 8 Hz, 6H), 3.49 (c, J = 8 Hz, 4H), 6.15 (d, J = 4 Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 4, 8 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.71 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 13, 45.2, 98.03, 105.10, 110.01, 121.82, 128.13, 131.98, 132.47, 135.64, 153.38, 154.41, 163.95, 167.33.

*4.4.2.4 Síntesis especifica de la base de Schiff **SB-H***



La base de Schiff **SB-tBu** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **SB-H**, empleando el aldehído **A-4**. Sólido anaranjado. Rendimiento químico del 85%. Punto de fusión 260-262 °C. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 1.34 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 7.54 (d, J = 8 Hz, 4H), 8.13 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.99 (s, 1H), 13.60 (a, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 29.83, 31.78, 119.49, 122.36, 128.86, 129.36, 129.49, 132.02, 137.44, 153.51, 159.29, 167.20, 167.52.

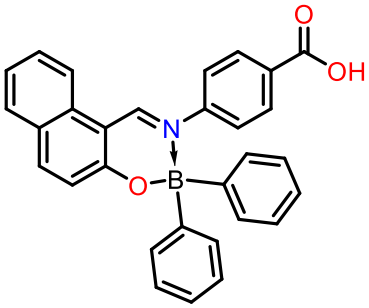
*4.4.2.5 Síntesis especifica de la base de Schiff **SB-H***



La base de Schiff **SB-Nap** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **SB-H**, empleando el aldehído **A-5**. Sólido amarillo. Rendimiento químico del 83%. Punto de fusión 310-312 °C. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 7.10 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.58 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.15(d, J = 8 Hz, 2H), 8.48 (d, J = 8 Hz, 1H), 9.79 (s, 1H), 15.38 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 109.31, 120.12, 120.74, 121.23. 123.79, 127.61, 128.22, 129.19.131.18, 133.48, 136.91, 157.83, 165.40, 166.19.

*4.4.3 Síntesis de las BOSCHIBAs **BSB-OMe**, B**SB-NEt**, **BSB-tBu** y **BSB-Nap***

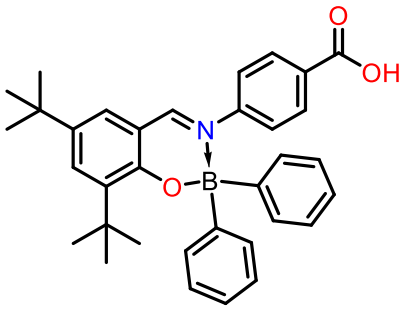
*4.4.3.1 Síntesis especifica de la BOSCHIBA **BSB-Nap***



Preparación del ácido difenilborínico. En un matraz Erlenmeyer de 25 ml se adicionó el 2-aminoetil difenilborinato (270.11 mg, 1.2 mmol), seguido de 5 ml de metanol. Posteriormente, se adicionó 0.5 ml de HCl al 35.0 % y se agitó la mezcla de reacción por un instante. En seguida, se adicionó agua hasta observar una emulsión (aprox. 10 ml de agua). Finalmente, se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (10 ml x 3), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida, como producto se obtiene un aceite transparente.

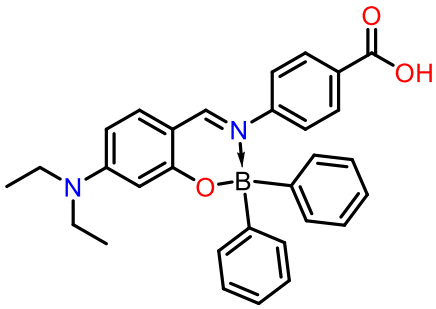
Síntesis de BOSCHIBA BSB-Nap. En un matraz bola de 100 ml provisto de una barra de agitación se agregó 1 mmol de la base de Schiff **SB-Nap**, seguido de 25 ml de metanol. Posteriormente, se adicionó el ácido difenilborínico (preparado previamente) disuelto en 5 ml de metanol. La reacción se deja agitando por 1 hora, al término de la reacción, se evapora el metanol a presión reducida. El crudo de reacción se re-disuelve en acetato de etilo y se adiciona hexano hasta observar la precipitación del compuesto. La mezcla se filtró y se hicieron lavados con hexano para obtener como producto un sólido de color amarillo. rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 378-380 °C (descomposición). **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 7.12 (m, 7H), 7.41 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.49 (t, J = 8 Hz, 6H), 7.59 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 8 Hz, 1H), 9.55 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 113.11, 121.46, 121.97, 125.34, 126.08, 127.09, 127.62, 128.66, 130.04, 130.23, 130.39, 130.81, 133.61, 134.74, 141.52, 150.62, 160.85, 166.01,166.81. **RMN ^{11}B** (128 MHz, acetone-d_6) δ: 5.87.

4.4.3.2 Síntesis especifica de la BOSCHIBA ***BSB-tBu***



La BOSCHIBA **BSB-tBu** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **BSB-Nap**, empleando la base de Schiff **SB-tBu**. Sólido anaranjado. Rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 118-124 °C (cambio de apariencia a rojo). **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 1.30 (s, 9H), 1.35b(s, 9H), 7.12 (m, 6H), 7.38 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8 Hz, 4H), 7.52 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.88(d, J = 8 Hz, 2H), 9.00 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 29.98, 30.48, 34.82, 35.62, 113.87, 119.30, 125.66, 127.05, 127.57, 128.24, 130.66, 130.85, 134.69, 135.01, 139.84, 141.45, 150.10, 160.07. **RMN ^{11}B** (128 MHz, acetone-d_6) δ: 6.61.

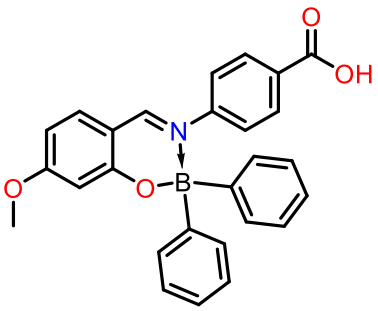
4.4.3.3 Síntesis especifica de la BOSCHIBA ***BSB-NEt***



La BOSCHIBA **BSB-NEt** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **BSB-Nap**, empleando la base de Schiff **SB-NEt**. Sólido verde claro. Rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 118-124 °C. **^{1}H NMR** (400 MHz, Acetona-d_6) δ 8.54 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.41 (dt, *J* = 8.6, 4.4 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.19 – 7.01 (m, 1H), 6.33 (dd, *J* = 4.0, 8.0, 1H), 6.02 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H). **^{13}C NMR** (101 MHz, Acetona-d_6) δ 166.96, 165.64, 160.57, 157.52, 151.18, 135.99,

134.72, 130.72, 129.07, 127.47, 126.63, 125.26, 110.97, 106.61, 98.69, 45.52, 29.90, 13.05. **^{11}B NMR** (160 MHz, $CDCl_3$) δ 9.87.

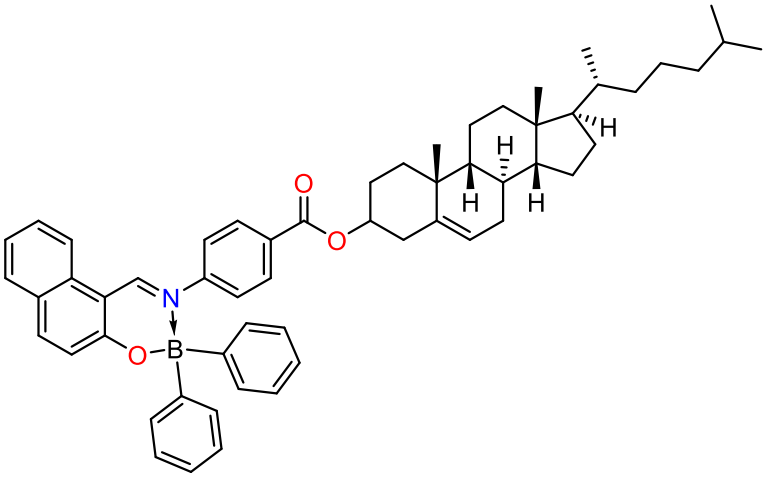
4.4.3.4 Síntesis especifica de la BOSCHIBA ***BSB-OMe***



La BOSCHIBA **BSB-OMe** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **BSB-Nap**, empleando la base de Schiff **SB-OMe**. Sólido verde claro. Rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 118-124 °C. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.81 (s, 3H), 6.40 (dd, *J* = 2.3, 8.7 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.12-7.22 (m, 9H), 7.42 (m, 5H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 55.91, 102.17, 110.08, 112.60, 124.79, 126.66, 127.23, 128.08, 130.93, 133.77, 134.08, 134.86, 150.14, 161.37, 165.80, 169.66. **^{11}B NMR** (160 MHz, $CDCl_3$) δ 10.15.

4.4.4 Síntesis de las sondas celulares fluorescentes ***col-BSB-Nap****,* ***col-BSB-NEt*** *y* ***col-BSB-OMe***

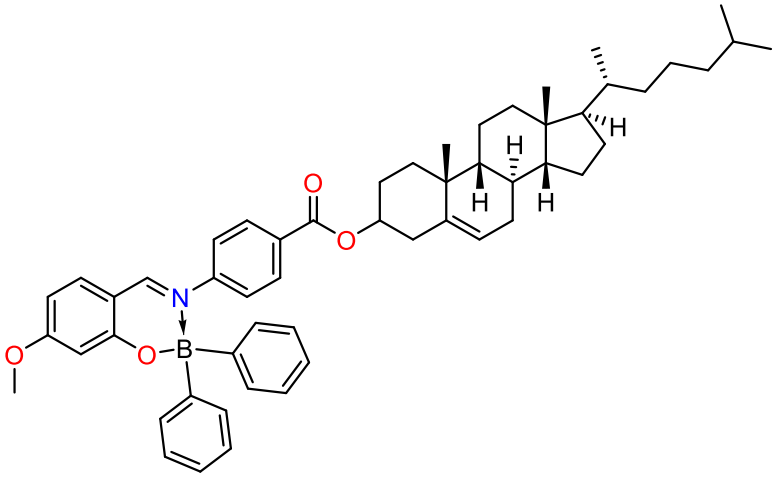
4.4.4.1 Síntesis de la sonda celular fluorescente ***col-BSB-Nap***



En un matraz bola de 100 ml provisto de una barra de agitación se disolvió el colesterol (464 mg, 1.2 mmol), junto con la DCC (247.6 mg, 1.2 mmol) en 15 ml de

CH_2Cl_2. Posteriormente, el matraz se colocó en un baño de hielo y se adicionó gota a gota la BOSCHIBA **BSB-Nap** (455.32 mg, 1.0 mmol) disuelto en 10 ml de CH_2Cl_2. El matraz de reacción se dejó agitando en el baño de hielo y se monitorio por cromatografía en capa fina hasta observar el consumo total de las materias primas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida hasta obtener un sólido color amarillo. El crudo de reacción se disolvió en poco CH_2Cl_2 y se adicionó un exceso de hexano, la mezcla resultante se dejó evaporar lentamente hasta observar la formación de sólidos que fueron separados mediante filtración y lavados con hexano frio. Sólido amarillo Rendimiento químico del 30%. **RMN ^{1}H** (400 MHz, acetone-d_6) δ: 0.68 (s, 3H), 0.86-2.03 (m, 40H, pertenecientes al colesterol), 2.42 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.81 (d, J = 8 Hz), 5.40 (s, 1H), 7.14-7.22 (m, 9H), 7.37 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8 Hz, 4H), 7.54 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 8 Hz, 3H), 7.93 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (100 MHz, acetone-d_6) δ: 11.83, 18.69, 19.33, 21.01, 22.54, 22.81, 23.80, 24.26, 27.79, 27.99, 28.21, 29.68, 31.82, 31.89, 35.77, 36.15, 36.59, 36.95, 38.11, 39.49, 39.69, 42.28, 49.98, 56.09, 56.65, 74.96, 111.54, 119.19, 121.45, 122.89, 124.46, 124.51, 126.52, 127.02, 127.64, 129.20, 129.59, 129.98, 130.17, 132.25, 133.68, 139.45, 140.97, 149.41, 157.58, 164.90, 166.76. **RMN ^{11}B** (128 MHz, acetone-d_6) δ: 8.18

4.4.4.2 Síntesis de la sonda celular fluorescente ***col-BSB-OMe***



La sonda **col-BSB-OMe** fue obtenida de manera similar al procedimiento descrito para **col-BSB-Nap**, emplea4ndo la bas4e de Schiff **BSB-OMe**. Sólido verde claro. Rendimiento químico del 90%. Punto de fusión 118-124 °C. **RMN ^{1}H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.68 (s, 3H), 0.86-2.03 (m, 40H, pertenecientes al colesterol), 2.42 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3,54 (m, 1H), 5.40 (s, 1H), 6.40 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* =

2.2 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.23 – 7.12 (m, 7H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.43 – 7.40 (m, 4H), δ 8.21 (s, 1H). **RMN ^{13}C** (120 MHz, $CDCl_3$) δ: 11.83, 18.69, 19.33, 21.01, 22.54, 22.81, 23.80, 24.26, 27.79, 27.99, 28.21, 29.68, 31.82, 31.89, 35.77, 36.15, 36.59, 36.95, 38.11, 39.49, 39.69, 42.28, 49.98, 55.91, 56.09, 56.65, 74.96, 102.04, 109.82, 112.46, 122.89, 124.69,126.50, 127.07, 127.15, 133.61, 133.89, 135.96, 139.45, 147.51, 161.17, 165.53, 169.37. **RMN ^{11}B** (160 MHz, $CDCl_3$) δ: 10.18

CAPITULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

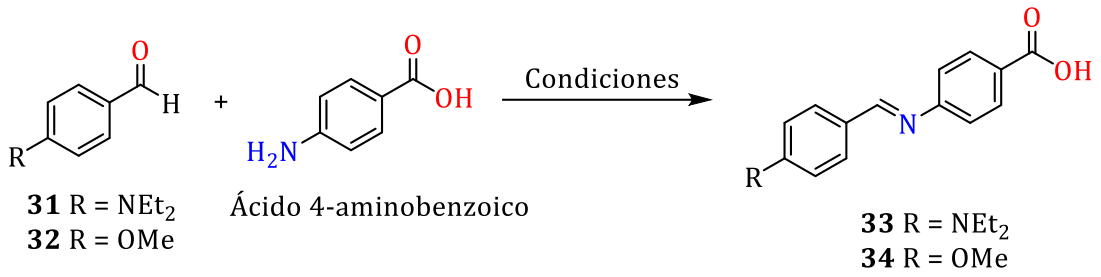
5.1 Bases de Schiff con propiedades fluorescentes

Aunque las bases de Schiff parecen ser estructuras de gran valor sintético en la química orgánica, su aplicación no se ve limitada en esta área. Hoy en día, existe una gran cantidad de reportes que describen estas moléculas como sensores fluorescentes, y solo una fracción menciona una clara aplicación en la microscopía fluorescente para la visualización celular. Sin embargo, la síntesis de las bases de Schiff se realizan de una manera convencional mediante la suministración de energía a través de inducción térmica cuyo procedimiento eleva los costos de síntesis, además de generar un mayor impacto ambiental.

La química verde, también conocida como química sostenible, ha revolucionado la forma diseñar productos y procesos químicos para reducir o eliminar sustancias nocivas. La implementación de herramientas como el ultrasonido, la mecanoquímica y la irradiación de microondas han probado ser buenas herramientas para este fin, sin embargo, es muy escasa la aplicación de estas en la síntesis de bases de Schiff.

Es por ello por lo que en esta sección nuestra intención está basada en la utilización de tecnologías verdes para la obtención de bases de Schiff, usando principalmente el ultrasonido y la mecanoquímica, que desde un punto de vista estrictamente ecológico debería reducir el impacto ambiental debido a la naturaleza de estos procesos, así como la obtención de otros beneficios como: reducir costos de síntesis, incremento de la selectividad, reducir los tiempos de reacción, e incluso ser potencialmente escalable a nivel industrial.

Para llevar a cabo este proyecto, se utilizaron una serie de derivados del benzaldehído (**1** y **2**) y el ácido 4-aminobenzoico, en principio se sometieron a reacción bajo condiciones convencionales (temperatura ambiente y reflujo) (**Esquema 3**), dando como resultado los productos de condensación **3** y **4** que fueron caracterizados mediante espectroscopía de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, y masas. En la **Tabla 8** se resume algunas propiedades físicas de los productos, así como el correspondiente rendimiento químico para cada método.



Esquema 3. Esquema general de síntesis para las bases de Schiff.

Tabla 8. Propiedades físicas y rendimiento químico de los productos **3** y **4** por síntesis convencional.

Ensayo	Apariencia física	Método de síntesis	Disolvente	Tiempo (min)	Rendimiento químico (%)	p.f. (°C)
-NEt_2 (**3**)		Reflujo	MeOH	1.5	94	243
		t.a.		8	79	
-OMe (**4**)		Reflujo	MeOH	1.5	88	199
		t.a.		8	78	

Teniendo como referencia los resultados previos, en cuanto a diseño de síntesis, proseguimos con la implementación de herramientas “verdes” con el propósito de mejorar la síntesis en términos sustentables, en este sentido, el uso de la mecanoquímica y el ultrasonido nos permitiría tener una aproximación.

Las condiciones de reacción que se plantearon fueron el uso del ultrasonido con disolvente y sin disolvente, así como el uso de la mecanoquímica. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 9**.

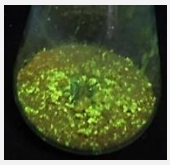
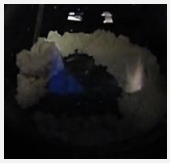
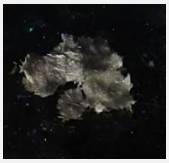
Tabla 9. Rendimiento químico de las bases de Schiff **3** y **4** por diferentes métodos sintéticos.

Método	Rendimiento químico (%)		Tiempo (h)
	Comp. 3	Comp. 4	
t.a.	79	78	8
Reflujo	94	88	1.5
Mecanoquímica	82	88	30 min
Ultrasonido (con disolvente)	96	92	30 min
Ultrasonido (libre de disolvente)	43	26	1

Como se puede observar en la **Tabla 9**, el mejor método sintético en cuanto a rendimiento químico es mediante ultrasonido con disolvente, seguido del método por reflujo. Por otra parte, en los métodos donde no se emplea disolvente se llegan a obtener rendimientos mayores al 80% como se observa en el método por mecanosíntesis. De la misma forma, el método con ultrasonido y libre de disolvente se obtiene rendimientos del 43% y 26% para **3** y **4**, respectivamente. Aunque los rendimientos químicos por este último método son relativamente bajos, los resultados permiten una aproximación hacia el empleo del ultrasonido sin disolvente como método sintético para esta clase de compuestos [83]. Además, el empleo de métodos como la mecanoquímica y ultrasonido generan otros beneficios como la reducción de costos de producción debido al menor consumo energético comparado con el método a reflujo.

A menudo es común encontrase con fenómenos interesantes durante el desarrollo de un protocolo sintético, y este caso no es la excepción, cabe resaltar que el método sintético tiene influencia en las propiedades fluorescentes del compuesto **3**, debido a que en los métodos donde se emplearon herramientas como el ultrasonido y la mecanoquímica el producto mostro fluorescencia bajo lampara UV a 365 nm, a diferencia del método convencional (**Tabla 10**).

Tabla 10. Imágenes de los compuestos **3** y **4** por diferentes métodos sintéticos bajo lampara de UV y luz de día.

		Reflujo	Ultrasonido libre de disolvente	Ultrasonido con disolvente	Mecanosíntesis
33	Luz de día				
	365 nm				
34	Luz de día				
	365 nm				

La observación de fluorescencia por ciertos métodos sintéticos puede explicarse al tamaño de partícula, puesto que la fluorescencia en algunos casos está en función de ella [84] [85] [86]. En este acontecimiento, la implementación de ondas sonoras (ultrasonido) a sólidos conduce a la fragmentación de macroestructuras a nanoestructuras; lo mismo sucede durante el proceso de molienda por mecanosíntesis. La absorción no uniforme de la radiación de excitación y/o reabsorción de la radiación emitida son factores que también pueden influir en el rendimiento de fluorescencia con respecto al tamaño de partícula. No obstante, la formación de agregados por interacciones tipo π–π también puede ser factor determinante en la observación del fenómeno de fluorescencia.

5.1.1 Caracterización por difracción de rayos-X de monocristal

La obtención de cristales adecuados de los compuestos **3** y **4** permitió realizar el análisis por difracción de rayos-X de monocristal. Los parámetros y recopilación de los datos más relevantes se muestran resumidos en la **Tabla 11**.

Tabla 11. *Datos obtenidos por difracción de rayos-X de monocristal de los compuestos **3** y **4**.*

	Comp. 3	**Comp. 4**
Formula empírica	$C_{18}H_{20}N_2O_2$	$C_{15}H_{13}NO_3$
Peso molecular	296.36	255.26
Temperatura (K)	99.99	100.15
Longitud de onda	MoKα (λ = 0.71073)	MoKα (λ = 0.71073)
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	*P-1*	$P2_1/c$
a, Å	8.0487(7)	3.8262(6)
b, Å	14.0919(12)	15.078(2)
c, Å	15.0169(13)	21.190(3)
α	111.429(2)	90
β	101.274(3)	92.423(2)
γ	94.147(3)	90
V,Å^3	1535.5(2)	1221.4(3)
Z	4	4
$\rho_{calc,mg.cm}^{-3}$	1.282	1.388
μ, mm^{-1}	0.084	0.097
2θ rango para la recopilación de datos	6.002 to 52.742	3.316 to 56.622
No. de reflns colectado	15564	11643
No. de indep reflns	6253	3025
[R_{int}, R_{sigma}]	0.0206, 0.0255	0.0228, 0.0174
Goodness of fit	1.042	1.050
*R*1, w*R*2 (I>2σ(I))	0.0526, 0.1365	0.0438,0.1197
*R*1, w*R*2	0.0596, 0.1434	0.0478, 0.1250
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e Å^{-3})	0.67, -0.34	0.42, -0.21

En estado sólido, las estructuras de los compuestos **3** y **4** cristalizan en los sistemas triclínico y monoclínico con grupos espaciales *P*-1 y $P2_1$/c, respectivamente. Por otro lado, el grupo azometino se encuentra en el mismo plano que el anillo aromático sustituido con R, que muestra una longitud de enlace C8-N1 de 1.268 (2) Å para **3** y

1.277 (15) Å para **4**, consistente con lo reportado en la literatura. Además, los análisis de difracción de rayos-X de los compuestos **3** y **4** muestran que no se trata de un sistema completamente plano, esto debido a que los anillos aromáticos están posicionados con un ángulo diedro de 28.8° y 52.9° respectivamente, entre planos medios de los anillos aromáticos (**Figura 11** y **Figura 12**).

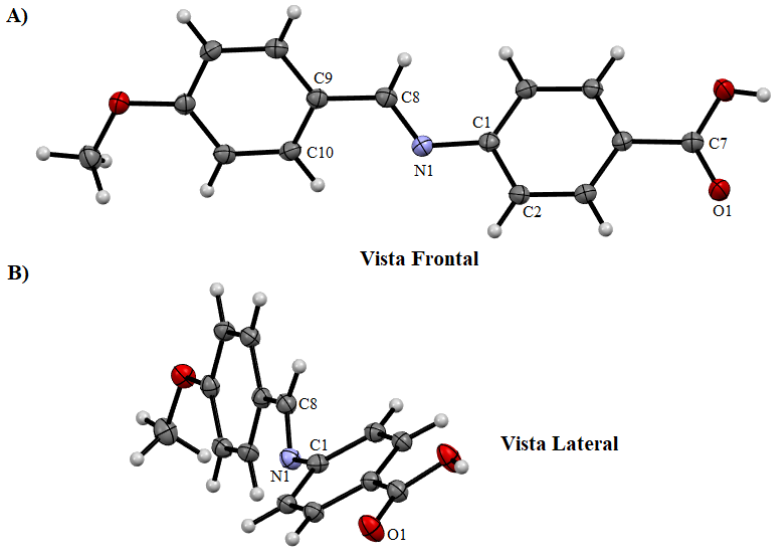


Figura 11. Vista frontal (A) y lateral (B) de compuesto **3**

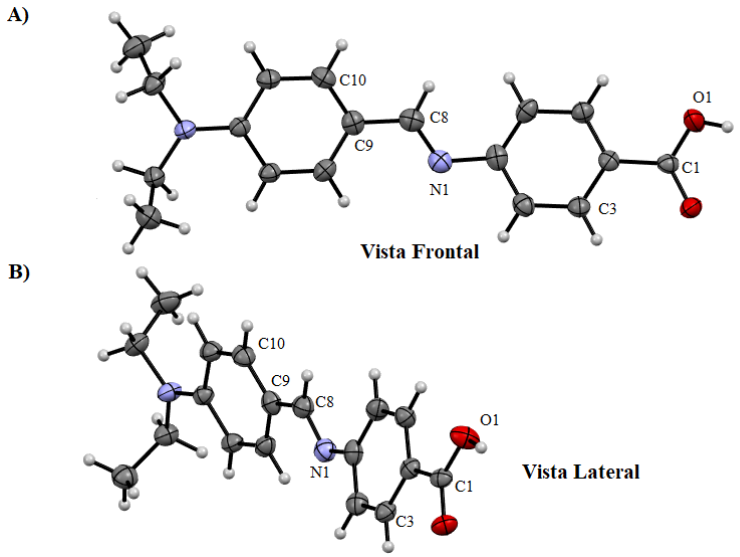


Figura 12. Vista frontal (A) y lateral (B) del compuesto **4**.

Por último, cabe mencionar que las estructuras cristalinas de **3** y **4** muestran la formación de un dímero entre los grupos carboxílico, unidos por puentes de hidrogeno (**Figura 13**). La formación de dímeros entre ácidos carboxílicos de esta clase de compuestos ha sido ampliamente observada con anterioridad por nuestro grupo de investigación donde los espectros de emisión de fluorescencia muestran un fuerte desplazamiento al rojo, ensanchamiento y menor estructura vibracional en comparación con la emisión monomérica [87].

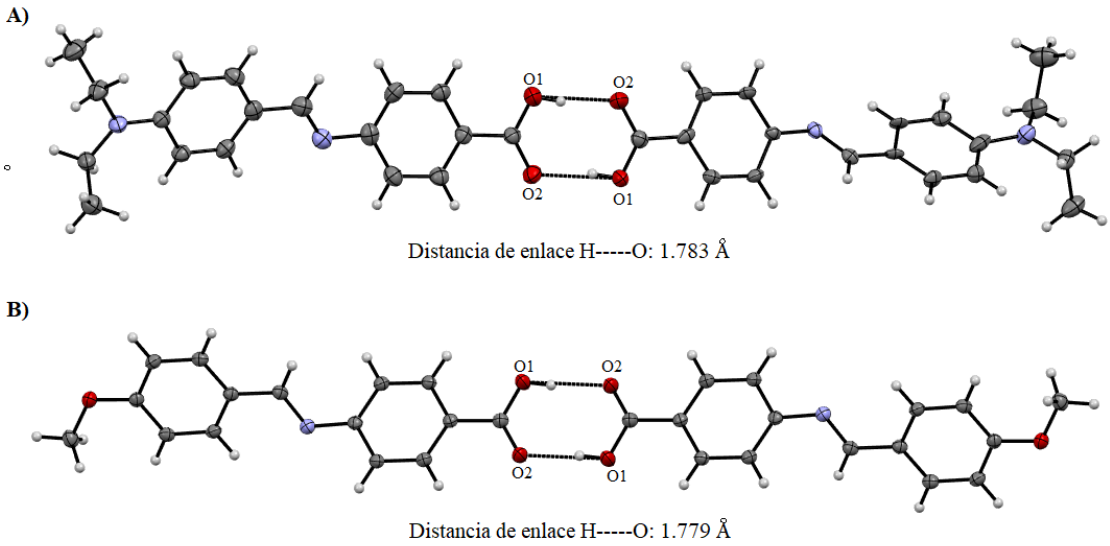


Figura 13. Formación de dímero de los compuestos **3** (arriba) y **4** (abajo) en estado sólido.

5.1.2 Caracterización fotofísica

Se realizaron estudios por espectroscopía de absorción y emisión de los compuestos. Los espectros de absorción del UV-Visible en disolución mostraron una banda de absorción a 368 nm y 270 nm para **3** y **4** respectivamente, mientras que en sus respetivos espectros de emisión mostraron una banda máxima a 401 nm para **3** (λ_{Ex} = 365 nm) y 391 nm para **4** (λ_{Ex} = 270 nm) (**Figura 14**).

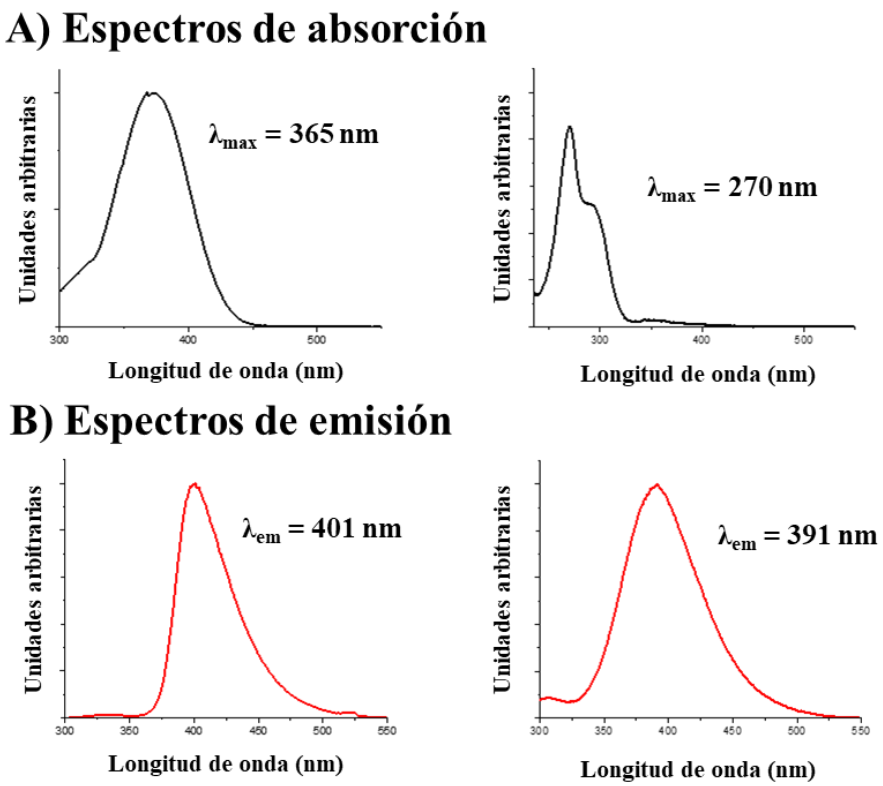


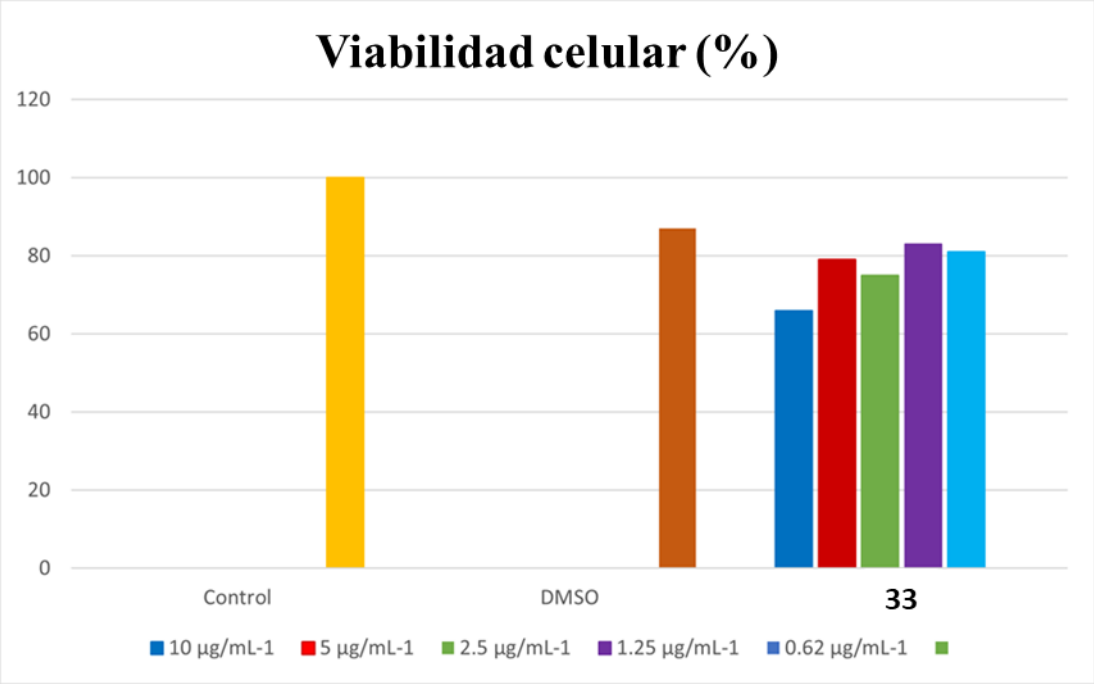
Figura 14. Espectros de absorción y emisión en MeOH de los compuestos **3** (izquierda) y **4** (derecha).

Previamente el compuesto **3** ha sido reportado por Tianyu Han *et al*. [88] [89]. En los estudios fotofísicos para **3**, Han reporta una λ_{abs} = 383 nm y una λ_{em} = 531 nm mientras que los resultados obtenidos en este trabajo corresponden a una λ_{abs} = 365 nm y una λ_{em} = 401 nm. Como se puede observar existe una discrepancia entre las longitudes de onda de emisión, no obstante, cabe mencionar que esto se debe a que el compuesto **3** presenta fluorescencia por agregación como lo reporta Han (λ_{em} = 531 nm) mientras que las mediciones realizaras para 3 en este trabajo se realizó en MeOH a una concentración de $1x10^{-3}$ M por lo que fenómenos de agregación son suprimidos. Por otra parte, la diferencia entre la longitud de onda de absorción de **3** y **4**, podría deberse a la capacidad electro-donadora de los grupos -OMe y $-NEt_2$, siendo mayor para el grupo dietil amino, de acuerdo con lo establecido por las constantes de Hammett [90]. Otro efecto que podría explicar la diferencia de la longitud de onda de absorción entre **3** y **4** es debido a la conformación estructural que presenta, como se observó con anterioridad, en los análisis por difracción de rayos-X del compuesto **3** se puede apreciar que los anillos aromáticos están en un ángulo diedro de 52.9° por lo que el sistema conjugado entre el enlace C=N y los anillos

aromáticos se ve afectado. La interrupción de la conjugación afecta el estado de transferencia intramolecular de carga evitando la emisión radiactiva en el rango del visible.

5.1.3 Viabilidad celular

Con el fin de aplicar la base de Schiff **3** para estudios celulares o el diagnóstico médico mediante imagenología de fluorescencia, se realizaron ensayos de viabilidad celular para evaluar su efecto citotóxico en un rango de concentración de 0.62-10 μg/ml. La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo espectroscópico con rojo neutro y las placas se leyeron a 540 nm, la absorbancia a 540 nm indica la cantidad de rojo neutro incorporado por las células por endocitosis, y es directamente proporcional a la viabilidad celular. Después de 20 min, en concentraciones de 0.62 y 1.25 μg/ml la viabilidad celular se reduce aproximadamente en un 18%, mientras que al incrementar la concentración a 2.5 y 5.0 μg/ml la diferencia de reducción de la viabilidad permanece en el mismo rango. Sin embargo, en concentraciones de 10μg/ml se reduce notablemente, pero manteniendo la viabilidad celular superior al 65% (**Gráfica 1**). Estos resultados no presentan una amenaza para la célula considerando los reportes previos por nuestro grupo de investigación cuyos complejos organometálicos que derivan del estaño o boro, incluyendo compuestos de rutenio, platino e iridio derivados de bases de Schiff reportados por otros grupos de investigación tienen una viabilidad celular menor al 60% (40.7±12.9 μM) [91].



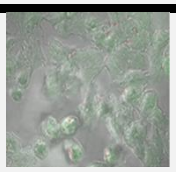
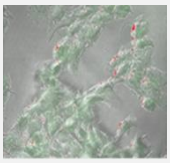
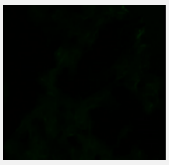
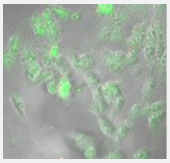
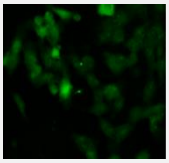
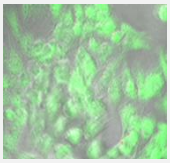
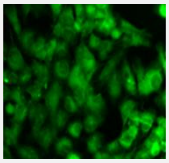
Gráfica 1. Efectos citotóxicos del compuesto **3** en células MCF-7 con diferentes concentraciones del compuesto durante 20 min. Como controles se usaron células tratadas con DMSO y células no tratadas. (Los datos representan media SD de tres experimentos independientes).

5.1.4 Tinción celular

En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha reportado una serie de BOSCHIBAS con la capacidad de marcar material celular para obtención de bioimágenes fluorescentes y una de las principales características de esas sondas celulares es la introducción de diversos sustituyentes con la intención de mejorar la interacción célula-compuesto y aumentar la biocompatibilidad.

Para determinar la capacidad del compuesto **3** como marcador celular fluorescente, el compuesto se evaluó en líneas celulares de hepatocitos y células MCF-7 a concentraciones de 5 y 10 µg/ml. Los análisis de bioimagen revelan que el compuesto **3** es capaz de teñir el citoplasma tanto en las células sanas y cancerígenas (**Tabla 12**). Aunque en las células MCF-7 predomina la tinción del citoplasma puede diferenciarse el núcleo de la célula en un tono oscuro (**Figura 15**). A la vez se realizó un control sin tratar las células con el fin de descartar la autofluorescencia o algún agente fluorescente, lo mismo se hizo con el disolvente empleado (DMSO).

Tabla 12. Bioimágenes fluorescentes en células hepáticas con el compuesto **3** (λ_{Ex} = 500 nm).

	Campo brillante	Campo oscuro
Células sin compuesto		
Células con DMSO		
5 µg-ml^{-1}		
10 µg-ml^{-1}		

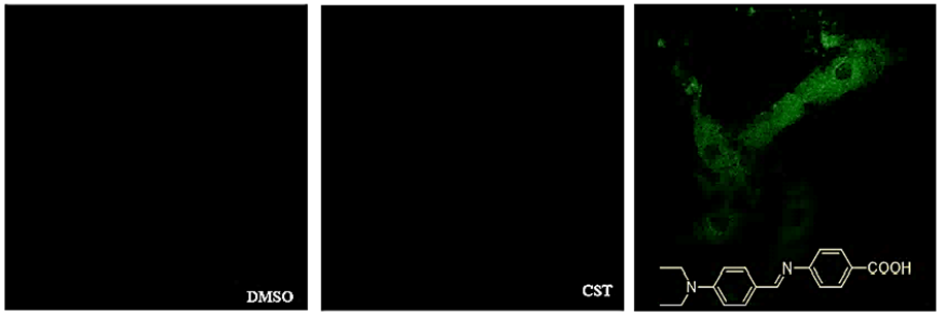
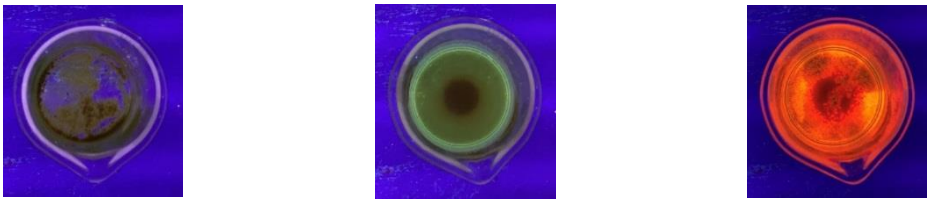


Figura 15. Bioimágenes fluorescentes en células MCF-7 tratadas con el disolvente control (DMSO)(izquierda), sin ningún tipo de autofluorescencia (centro) y células tratadas con el compuesto **3** (derecha).

5.1.5 Multifuncionalidad

Con el fin de evaluar la multifuncionalidad de la base de Schiff **3**, el compuesto se sometió a diferentes estímulos externos, primeramente se realizaron estudios de piezocromismo mediante la aplicación de presión, sin embargo, no se observaron cambios notables en la intensidad de fluorescencia. Del mismo modo, los estudios termocrómicos no evidenciaron cambio alguno.

No obstante, los estudios halocrómicos revelaron un cambio notorio tanto en la intensidad de la fluorescencia como en la longitud de onda de emisión, donde se observó una emisión de color naranja al adicionar gotas de $HCl_{conc.}$ en comparación con el compuesto en solución (emisión verde por agregación) (**Figura 16** y **Figura 17**).



Estado sólido | **3** + CH_3CN | **3** + CH_3CN +$HCl_{conc.}$

Figura 16. Imágenes de estudios halocrómicos en solución del compuesto **3**.

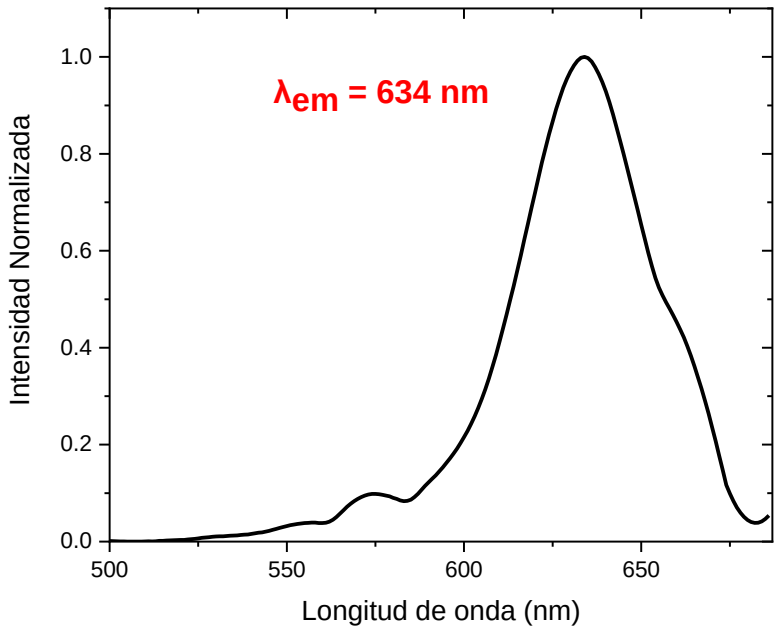


Figura 17. Espectro de emisión en estado sólido del complejo **3**-HCl. El espectro de emisión muestra un máximo de longitud de onda a 637 nm.

Este incremento de la intensidad de fluorescencia, así como el cambio de la longitud de onda de emisión podría deberse al complejo formado entre la base de Schiff **3** y el ácido clorhídrico (**Figura 18**). La propuesta de protonación preferentemente en el nitrógeno de la imina está basada en la disponibilidad del par de electrones libre debido a que en el grupo dietilamino el par electrones esta comprometido con el

sistema π-conjugado de anillo aromático. Además, se ha observado que el cambio de posición del grupo funcional ácido carboxílico a la posición *orto*- con respecto al nitrógeno de la imina genera un material con fluorescencia en la región del rojo [88].

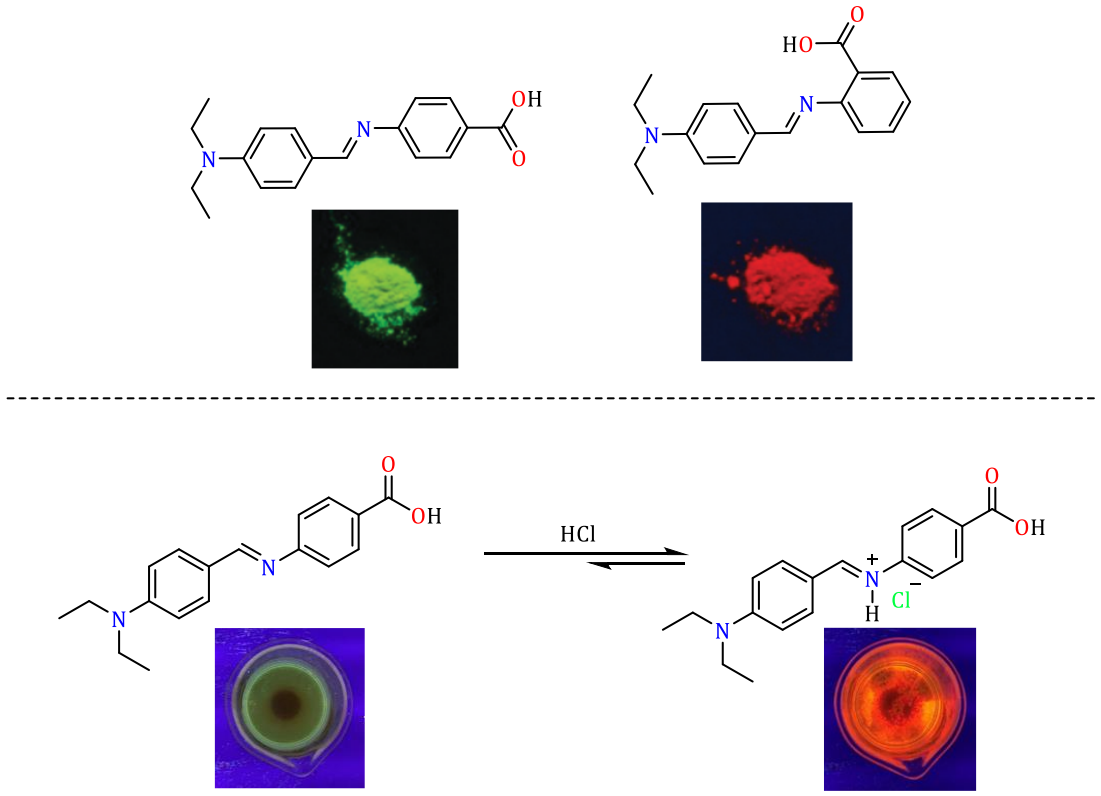


Figura 18. Estructura propuesta del complejo formado entre la base de Schiff **3** y el HCl que muestra nuevas propiedades fluorescentes.

Por otra parte, estudios de vaporcromismo con vapores ácidos mostraron resultados similares, sin embargo, al tratar previamente el compuesto **3** con vapores de HCl seguido del tratamiento con vapores de NH_3 se observó una extinción de la fluorescencia. Así mismo, el tratamiento con vapores de HCl y el subsecuente calentamiento se pierde la fluorescencia del compuesto **3** mismo que al ser tratado nuevamente con vapores ácidos recupera dicha emisión (**Figura 19**). Estos resultados nos permiten clasificar al compuesto **3** como un excelente sensor de pH además de ser un tinte celular fluorescente para citoplasma.

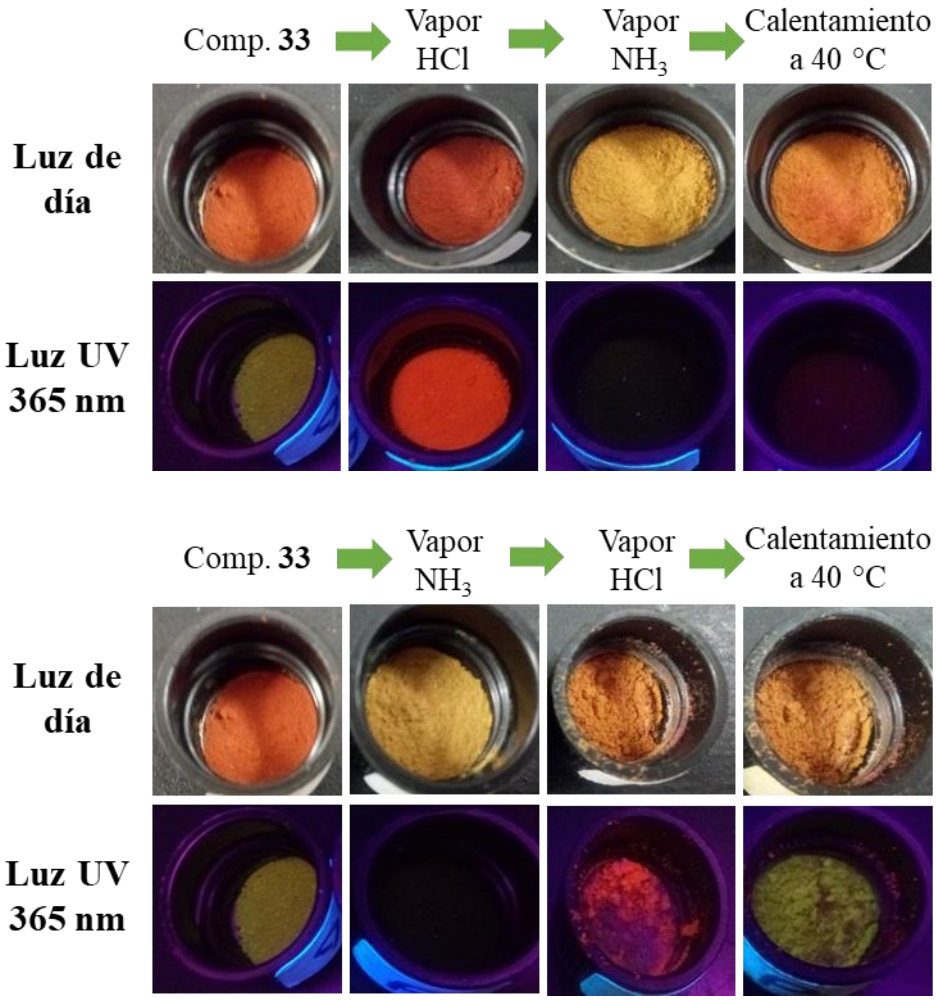
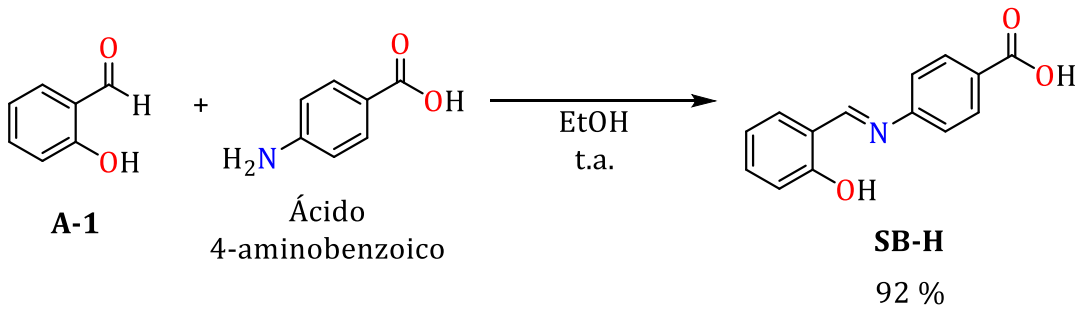


Figura 19. Imágenes del estudio de vaporcromismo del compuesto **33**, se muestra de procedimiento de tratamiento del compuesto con diferentes vapores (acido y básico) y calentamiento.

5.2 Compuestos de boro luminiscentes: BOSCHIBAs

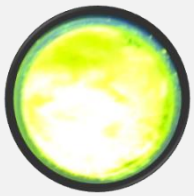
Para la síntesis de estos compuestos se inició con la síntesis de la base de Schiff **SB-H** a partir de la condensación entre el 2-hidroxi-benzaldeído **A-1** y ácido 4-aminobenzoico a temperatura ambiente dando como resultado un producto sólido amarillo con buenos rendimientos (**Esquema 4**), y que presenta fluorescencia bajo lámpara de luz UV a 365 nm (

Tabla *13*).



Esquema 4. Síntesis de SB-H a temperatura ambiente.

Tabla 13. Imágenes de SB-H bajo luz de día y bajo luz UV.

	Sólido con apariencia de laminas	Sólido en polvo	Filamentos cristalinos
Luz de día			
Luz UV (365 nm)			

El espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **SB-H** muestra señales características como la señal del protón del carbono imínico que se desplaza a 8.97 ppm, y la señal desplazada a 12.91 ppm correspondiente al protón de grupo hidroxilo, el desplazamiento a campos bajos de este protón es debido a la formación de un puente de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno y los pares electrónicos libres de la amina del grupo imínico formando de esta manera un ciclo de cinco miembros cinéticamente estable. Y finalmente los protones correspondientes al sistema aromático de los anillos del benceno que se encuentran entre la región de 7.0-8.2 ppm (**Figura 20**).

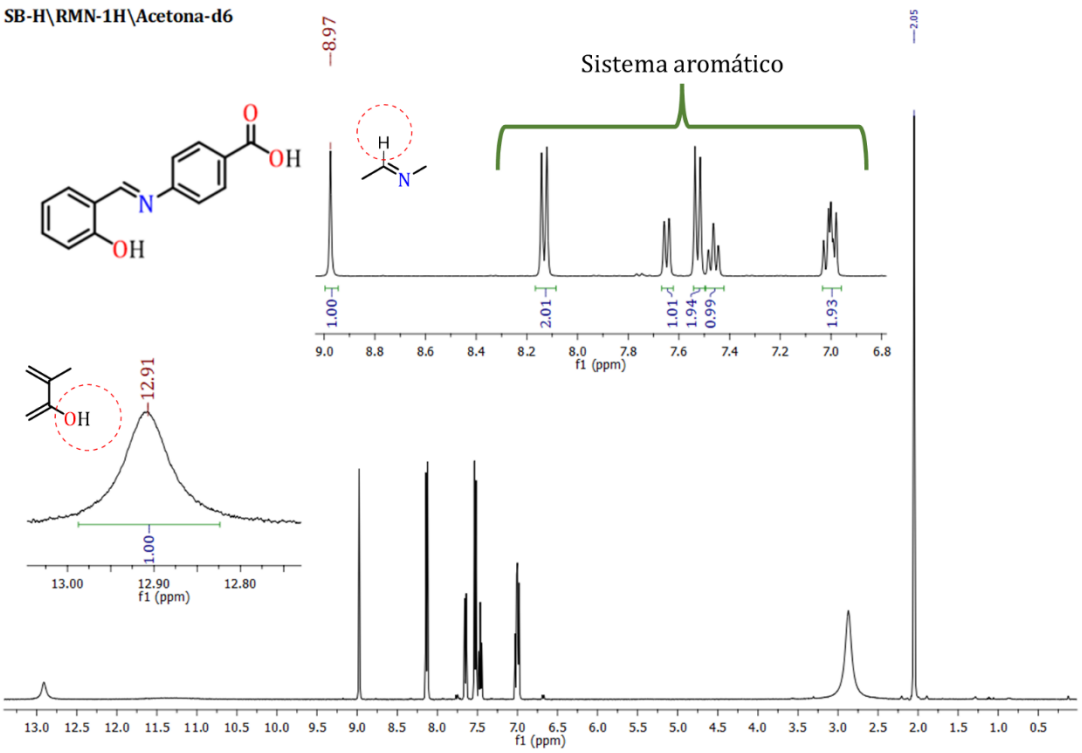
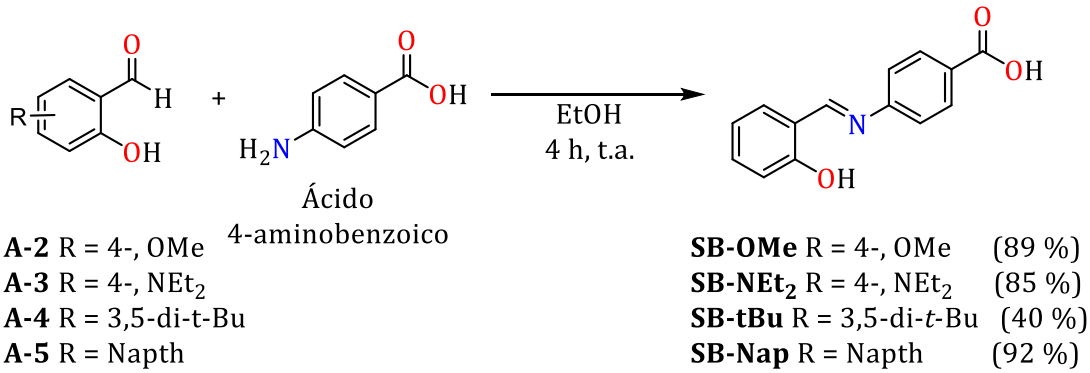


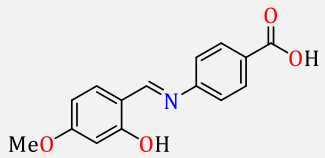
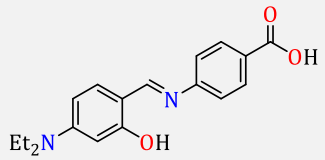
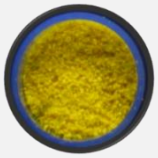
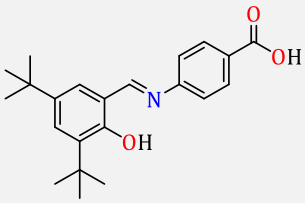
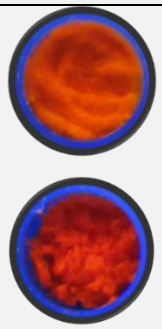
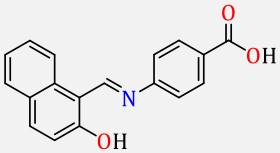
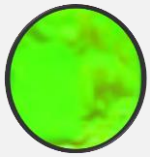
Figura 20. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto SB-H en acetona-d_6.

Posteriormente, se realizó las síntesis de bases de Schiff con sustituyentes diferentes entre los que destacan grupos electro-donadores y grupos susceptibles al cambio del pH, bajo las mismas condiciones de reacción usadas para la síntesis de **SB-H**. Los sustituyentes se encuentran posicionados sobre anillo aromático del aldehído con el fin de promover una transferencia de carga en un sistema D-π-A. La adición de los sustituyentes permitirá evaluar el efecto que ejercen en las propiedades ópticas del material. La ruta sintética se muestra en el **Esquema 5** mientras que en la **Tabla 14** se muestra la apariencia física de cada base de Schiff y su respuesta bajo luz UV.



Esquema 5. Síntesisi de las bases de Schiff con diferentes sustituyentes.

Tabla 14. Imágenes de las bases de Schiff **SB-OMe**, **SB-NEt**, **SB-tBu** y **SB-Nap** bajo luz de día y bajo luz UV.

Bases de Schiff	Luz de día	Luz UV (365 nm)
SB-OMe 		
SB-NEt2 		
SB-tBu 		
SB-Nap 		

Como se observa, las bases de Schiff **SB-NEt** y **SB-tBu** presentan una muy baja intensidad fluorescente, mientras que las bases de Schiff **SB-OMe** y **SB-Nap** muestran una intensidad alta en comparación con sus similares anteriores. Esto hace proponer que la adición de grupos funcionales que contengan varios pares de electrones libres que se introduzcan al sistema π o el incremento del sistema de conjugación π mejoran las propiedades fotofísicas de los compuestos. Por otra parte, los espectros de RMN de ^{1}H se muestran en la **Figura 21** donde se observa claramente el protón imínico como una señal simple entre la región de 8.0 y 10 ppm.

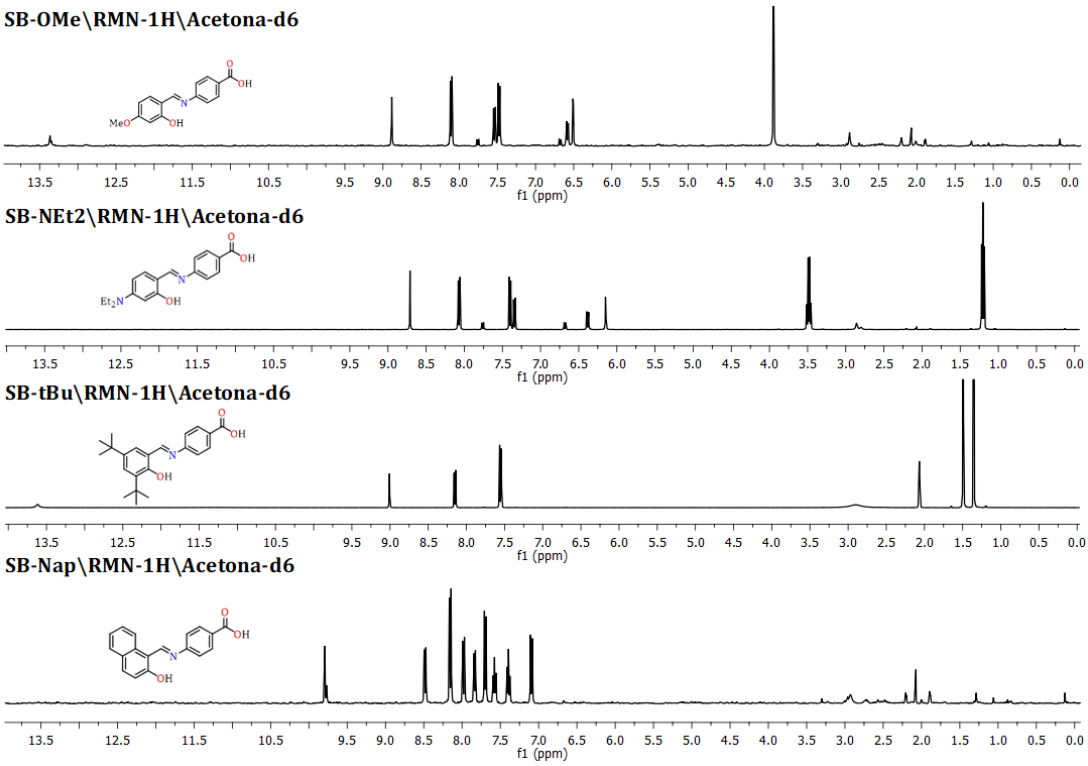


Figura 21. *Espectros de RMN de ^{1}H en acetona-d_6 de las bases de Schiff siintetizadas en este trabajo*

Con el propósito de dar un enfoque amigable con el medio ambiente para la obtención de las bases de Schiff y así mismo, con el objetivo de reducir costos de síntesis, se emplearon herramientas como el ultrasonido, microondas y mecanosíntesis para desarrollar un método sustentable y económico, los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 15**.

Tabla 15*. Síntesis de las bases de Schiff por diversos métodos.*

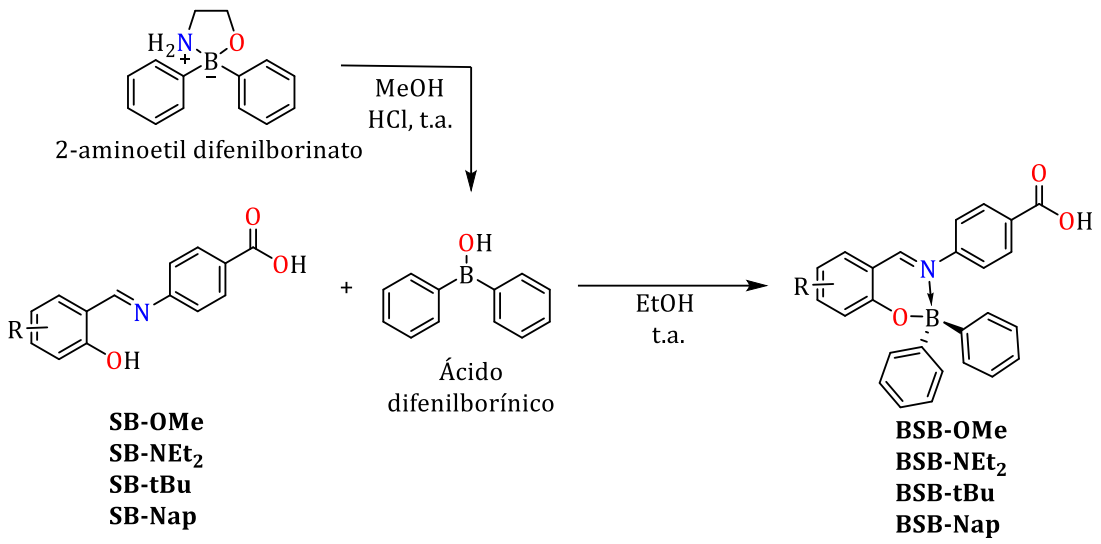
Método	SB-OMe	SB-Net$_2$	SB-tBu	SB-Nap
Temperatura ambiente[a]	80	56	48	82
Calentamiento convencional[b]	90	75	75	88
Ultrasonido[c]	90	71	47	80
Microondas[d]	94	85	75	95
Mecanoquímica[e]	78	35	NR	50

Tiempos de reacción; a = 8 h, b = 4 h, c = 1 h, d = 15 min (120 °C), c = 1 h

Como se observa en la **Tabla 15** la implementación de varias herramientas para la síntesis de las bases de Schiff permite conocer el mejor método sintético, en este caso el factor temperatura es indispensable para tener una síntesis más rápida e incluso mejorar los rendimientos químicos, el uso de las microondas parece cumplir con estos requerimientos y la aproximación a una síntesis eficaz, debido a los cortos tiempos de reacción y altos rendimientos químicos. No obstante, el uso de la mecanoquímica también puede ser un método verde muy prometedor para la síntesis de estos compuestos, sin embargo, el bajo rendimiento químico es un reto que vencer con el fin de lograr una síntesis libre de disolvente. Por otra parte, el empleo de ultrasonido solo parece reducir el tiempo de reacción por cuatro veces menos que el calentamiento convencional.

La siguiente etapa consistió en la síntesis de las BOSCHIBAs a partir de las bases de Schiff sintetizadas anteriormente. Para ello se empleó un derivado de boro con sustituyentes voluminosos con la finalidad de dar estabilidad a los complejos de organoboro en condiciones ambientales y presidir de tiempos prolongados de almacenaje.

Para este fin utilizamos el ácido difenilborínico que fue preparado *in situ* a partir del 2-aminoetil difenilborinato en condiciones ácidas. Las bases de Schiff se trataron con ácido difenilborínico en metanol y a temperatura ambiente hasta observar el consumo de las materias primas (**Esquema 6**), obteniendo los productos deseados con rendimientos químicos que van del 45 al 85%. No obstante, al colocar las reacciones en un baño ultrasónico se observó una disminución en los tiempos de reacción y excelentes rendimientos químicos (**Tabla 16**).



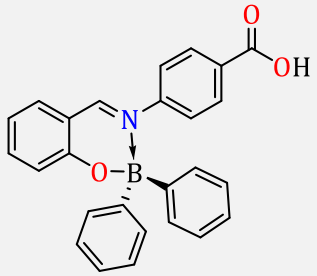
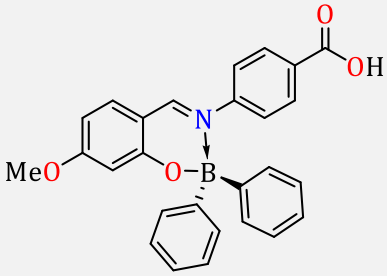
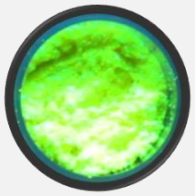
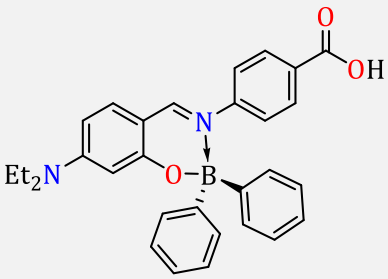
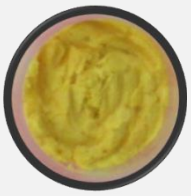
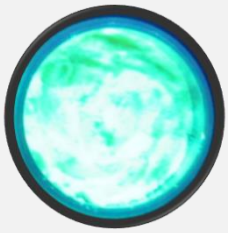
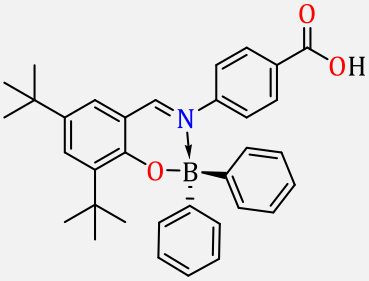
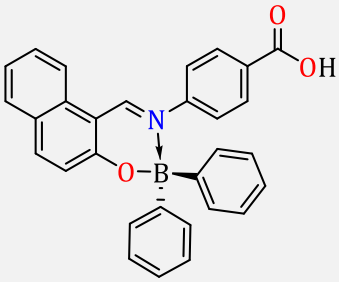
Esquema 6. Síntesis general de las BOSCHIBAs.

Tabla 16. Comparación de los rendimientos químicos para la síntesis de las BOSCHIBAs mediante ultrasonido y a temperatura ambiente.

	BSB-OMe	**BSB-NEt$_2$**	**BSB-tBu**	**BSB-Nap**
Temperatura ambiente	45 min (80%)	60 min (70%)	8 h (45%)	45 min (85%)
Ultrasonido	15 min (92%)	20 min (88%)	2 h (80%)	15 min (90%)

En la **Tabla 17** se muestran las BOSCHIBAs en estado sólido obtenidas en este trabajo, donde se puede apreciar que todas las BOSCHIBAs son fluorescentes bajo luz UV a 365 nm, estos resultados nos permiten conocer un poco sobre las características de las BOSCHIBAs, principalmente su uso potencial como fluoróforo debido a la emisión fluorescente que presentan.

Tabla 17. Las BOSCHIBAs en estado sólido bajo luz de día y bajo luz UV.

BOSCHIBAS	Luz de día	Luz UV (365 nm)
		
		
 TBU		
		
		

5.2.1 Propiedades fotofísicas de las BOSCHIBAs

En la **Figura 22** y **Figura 23** se pueden apreciar los espectros de absorción de las bases de Schiff (**SB**) y BOSCHIBAs (**BSB**), respectivamente. Los espectros de absorción para el caso de los compuestos **SB** se determinaron en MeOH a 20 °C mientras que para las BOSCHIBAs se utilizó $CHCl_3$ a la misma temperatura.

Los compuestos **SB** presentan diversas bandas de absorción, destacando la banda que se encuentran entre el rango de 325 a 460 nm de cada compuesto atribuido a la transicion π→π*, sin embargo, es de notar que el compuesto **SB-Nap** presenta dos bandas de absorción a 441 y 463 nm que podrían atribuirse a las transiciones π→π* o a la formación de un dímero en estado excitado por interacciones tipo π–π entre los anillos del naftilo.

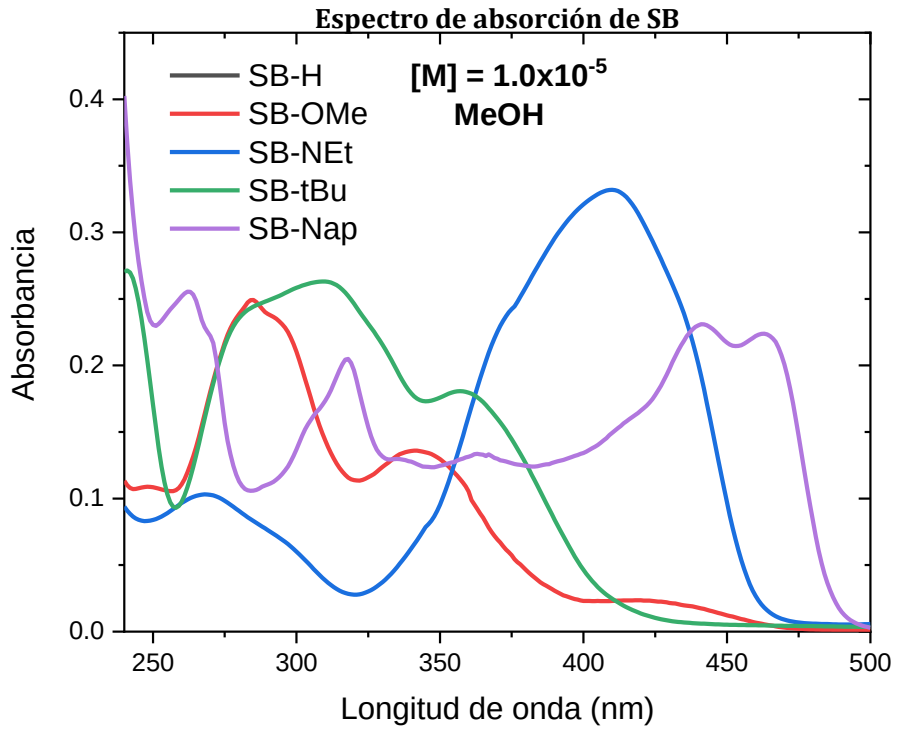


Figura 22. Espectros de absorcion de los compuestos SB en metanol.

Por otra parte, los espectros de absorción para los compuestos BSB se determinaron en $CHCl_3$ a 20 °C. En general los espectros de absorción de los compuestos BSB muestran una banda de absorción en el rango de UV entre la región de 310 y 350 nm

perteneciente a la transición π→π* del grupo azometino, mientras que en el rango del visible entre la región de 409 y 439 nm corresponden a las transiciones π→π* debido a la transferencia de carga intramolecular (TCI).

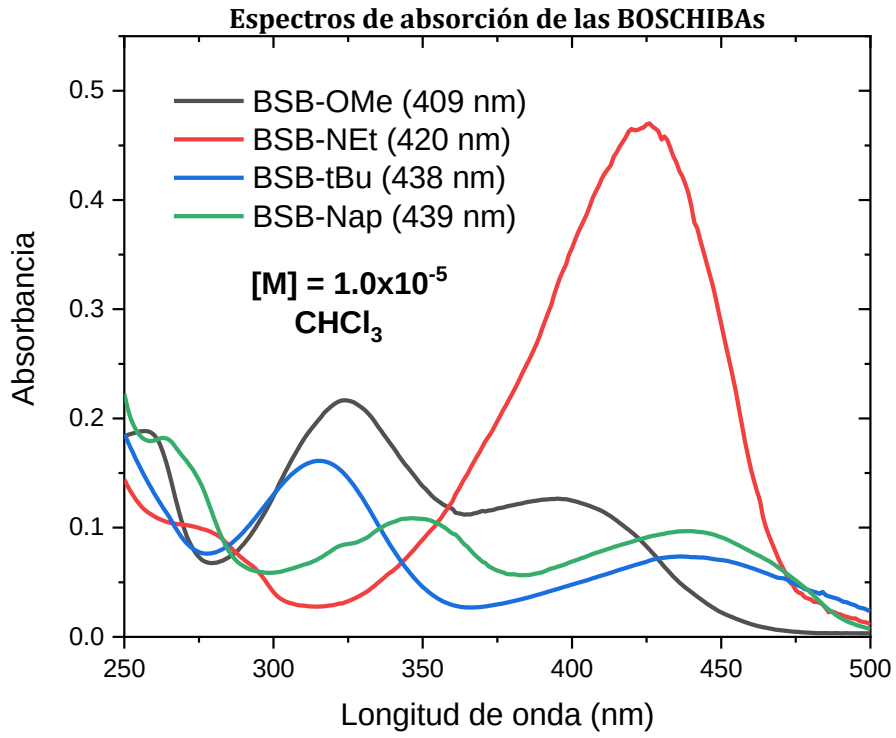


Figura 23. Espectros de absorcion de las BOSCHIBAs en cloroformo.

Aunque es muy común utilizar la λ_{max} de absorción de menor energía para obtener el respectivo espectro de emisión de un compuesto, no obstante, se optó por determinar los espectros de excitación de cada BOSCHIBA con el fin de obtener la longitud de onda óptima para determinar los máximos de emisión. En esta espectrofotometría se obtuvieron los espectros usando cloroformo como disolvente a 20 °C y el valor máximo de emisión se encontró mediante un escaneo de emisión siendo 513, 493, 574 y 545 nm para **BSB-OMe**, **BSB-NEt**, **BSB-tBu** y **BSB-Nap**, respectivamente. Los espectros de excitación se muestran apilados en la **Figura 24**.

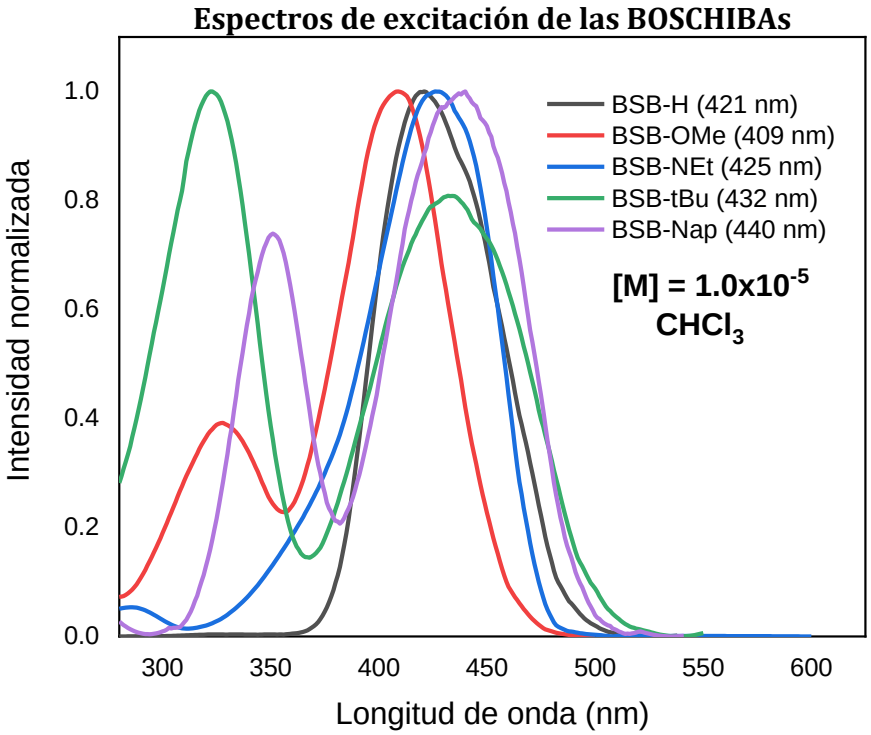


Figura 24. Espectros de excitación de las BOSCHIBAs en cloroformo.

Se puede observar que en la mayoría de las BOSCHIBAs la longitud excitación corresponde a la λ_{max} de absorción de cada compuesto, sin embargo, en el caso del compuesto BSB-H la longitud onda de excitación de mayor intensidad corresponde a 421 nm, algo que no se observa en su respectivo espectro de absorción pues esta tiene una única banda intensa a λ_{max} = 347 nm. Esto nos da evidencia de que es posible la existencia de dos estados excitados; uno correspondiente a una transición electrónica (347 nm), y la otra correspondiente a una transferencia de carga intramolecular en el estado excitado (421 nm).

Para el caso de la espectrofotometría de emisión, los espectros de emisión se determinaron en $CHCl_3$ a 20 °C usando la λ_{max} de excitación correspondiente a cada compuesto, los espectros obtenidos se muestran en la **Figura 25** en función de la intensidad, mientras que en la **Figura 26** se muestran normalizados los espectros. De forma general, todos los compuestos muestran una emisión entre la región de 493 a 572 nm con diferente intensidad relativa, donde se aprecia que la intensidad de emisión del compuesto BSB-NEt es superior al sulfato de quinina por 3 veces más en altura, mientras que los compuestos BSB-OMe, BSB-tBu, y BSB-Nap tiene una baja

intensidad de emisión comparados con la referencia. Por otra parte, se puede notar que de acuerdo con el sustituyente contenido en el anillo aromático, en el fragmento correspondiente del aldehído, tiene un efecto en el desplazamiento de las bandas de emisión, de acuerdo a las constantes de Hammet el grupo -NEt_2 tiene el mayor efecto electrodonador en la posición *para*- seguido del grupo -OMe y posteriormente los grupos alquílicos, por lo que se puede sugerir que un grupo con mayor poder electrodonativo en este tipo de estructura tiende a desplazamientos hipsocrómicos.

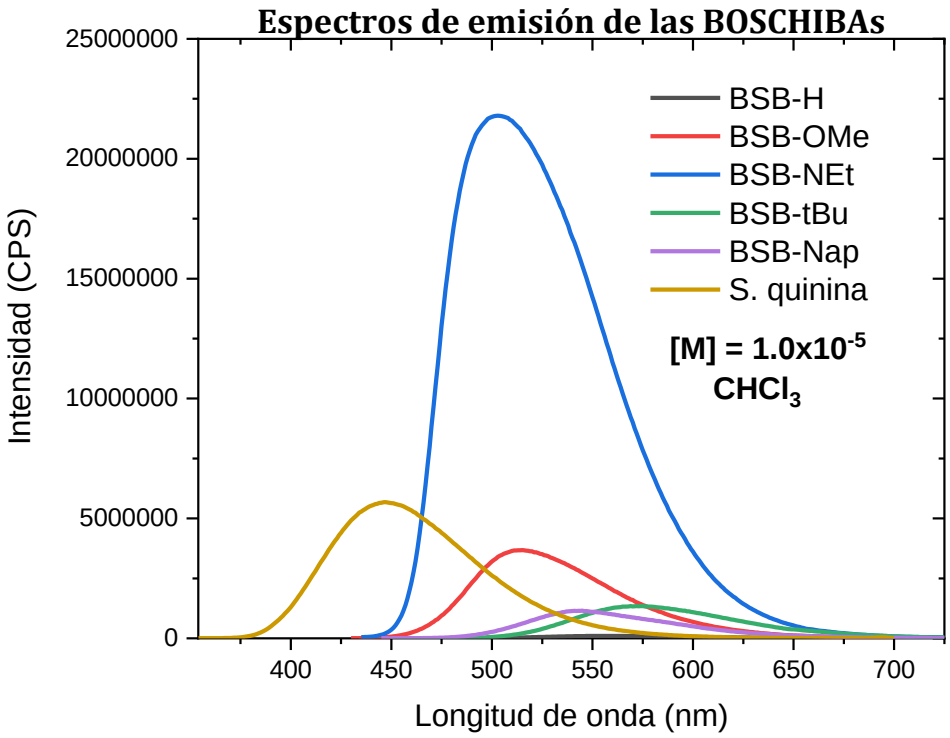


Figura 25. *Espectros de emisión de las BOSCHIBAs en cloroformo comparado con el sulfato de quinina en H_2SO_4 0.1 M.*

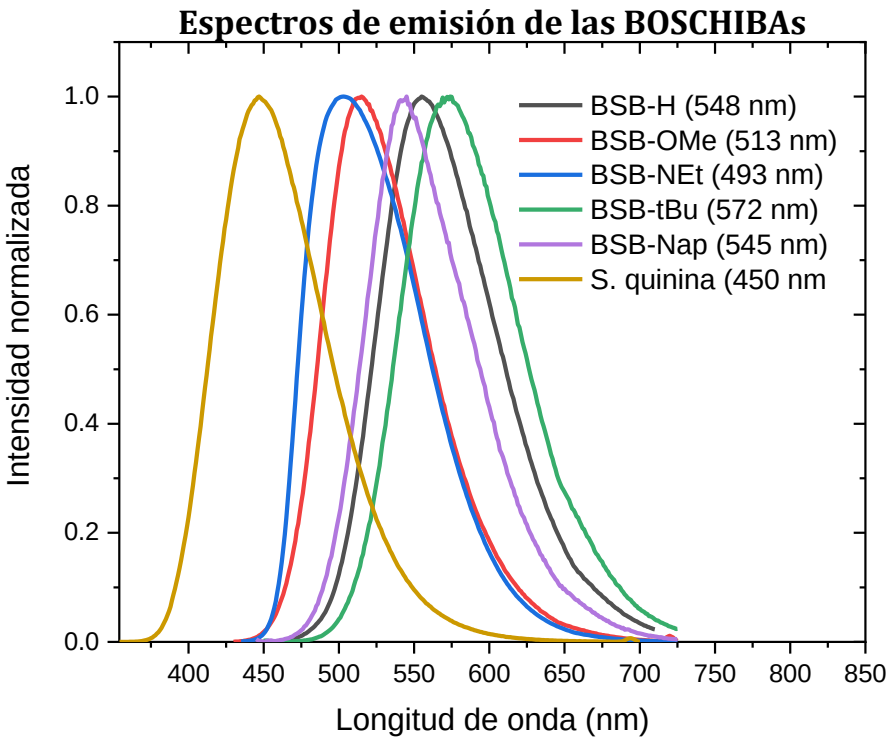


Figura 26. Espectros de emisión de las BOSCHIBAs normalizado.

Los resultados de los cálculos del coeficiente de extinción molar, el desplazamiento Stokes, la energía del primer estado excitado y rendimiento cuántico de cada compuesto se resumen en la **Tabla 18**. Para los cálculos se utilizaron las ecuaciones 1, 3, 4 y 5.

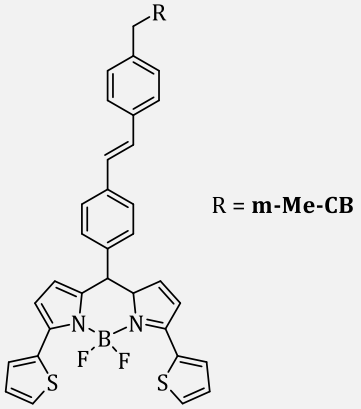
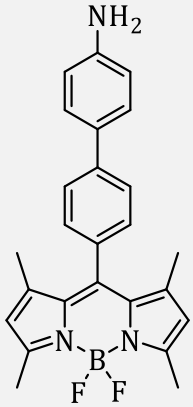
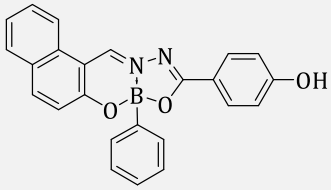
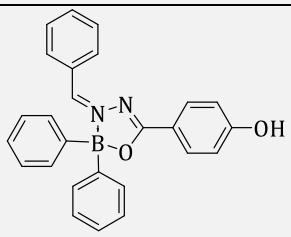
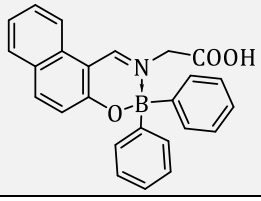
Tabla 18. Datos y valores fotofísicos más relevantes de las BOSCHIBAs.

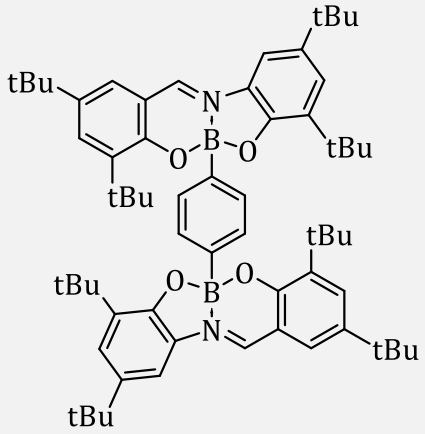
	λ_{Abs} [nm]	λ_{Em} [nm]	ε [10^4 M^{-1} cm^{-1}]	$\Delta\nu$ [cm^{-1}]	E_g [eV]	Φ
BSB-OMe	409	513	0.411	4956.7	3.031	0.27
	340		1.948	9918.6	3.647	
BSB-NEt	420	493	5.037	3525.5	2.952	0.55
BSB-tBu	438	574	0.666	5409.4	2.831	0.07
	316		1.633		3.923	
BSB-Nap	439	545	1.106	4430.4	2.824	0.07
	347		1.243	10469.8	3.573	
	263		2.195	19674.2	4.713	
Sulfato de quinina Φ = 0.54 (0.1 M H_2SO_4) [92]						

Como se observa en la **Tabla 18**, las BOSCHIBAs **BSB-NEt** y **BSB-Nap** presentan los coeficientes de extinción molar más altos en la banda de menor energía, comúnmente estos valores son atribuidos al efecto de transferencia de carga intramolecular, además estos compuestos presentan largos desplazamientos Stokes. Es importante tener en cuenta que largos desplazamientos Stokes son más adecuados para aplicaciones reales en imagenología debido a que pueden mejorar la sensibilidad al disminuir el auto-apagado y la autofluorescencia que surge de la minina superposición espectral entre los espectros de absorción y emisión. Finalmente, las BOSCHIBAs **BSB-NEt** y **BSB-OMe** sustituidas con grupos electro donadores presentan un rendimiento cuántico alto, no obstante, la BOSCHIBA **BSB-NEt** presenta el mayor rendimiento cuántico (Φ = 0.55) donde su valor es comparable con el sulfato de quinina (Φ = 0.54), este valor permite que la **BSB-NEt** pueda ser candidato en aplicaciones en optoelectrónica principalmente en el desarrollo de OLEDs.

En la **Tabla 19** se comparan las BOSCHIBAs **BSB-NEt** y **BSB-OMe** con otros compuestos derivados de boro sintetizados por el grupo Jiménez-Muñoz y otros grupos de investigación.

Tabla 19. Comparación del rendimiento cuántico de compuestos de boro.

Compuesto	Φ	Ref.
 BODOPY-carborano	0.46	[93]
	0.18	[94]
	0.01	[95]
	0.02	[96]
	0.03	[97]

Continuación de **Tabla 19**…		
	<0.01	[98]
BSB-NEt	0.55	Este trabajo
BSB-OMe	0.27	Este trabajo

Las BOSCHIBAs

5.2.2 Materiales multi-respuesta

Con el fin de evaluar la multifuncionalidad de las BOSCHIBAs aplicando diferentes estímulos y observar su respuesta en las características fluorescentes, estas se sometieron a estrés mecánico, temperatura y viscosidad.

5.2.2.1 Ensayos de mecanocrómicos

Con la ayuda de un mortero de ágata las BOSCHIBAs **BSB-OMe**, **BSB-NEt** y **BSB-tBu** y sus precursores sintéticos fueron sometidos a una molienda durante 5 min, los resultados de los estudios cualitativos se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Imágenes de los ensayos de mecanocrómicos de las bases de Schiff.

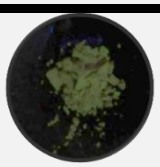
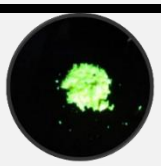
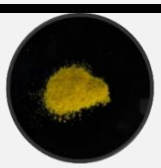
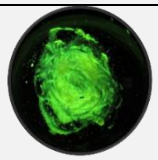
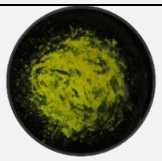
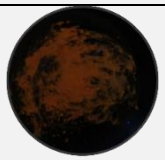
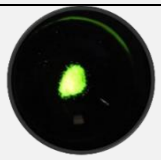
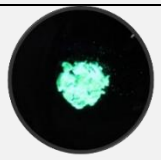
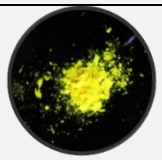
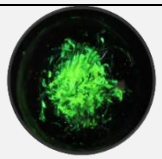
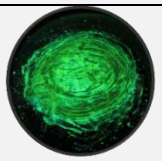
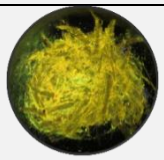
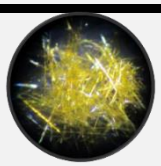
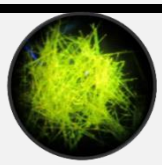
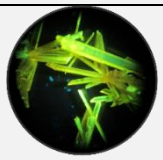
Molienda	**SB-H**	**SB-OME**	**SB-NEt**	**SB-tBu**
Antes				
Después				

Tabla 21. Imágenes de los ensayos de mecanocrómicos de las BOSCHIBAs.

BOSCHIBAs			
Molienda	**BSB-OME**	**BSB-NEt**	**BSB-tBu**
Antes			
Después			

La selección de estas BOSCHIBAs y sus precursores para los estudios mecanocrómicos se hizo en base a los grados de liberta de sus respectivas estructuras, esto con el fin de determinar si un posible cambio conformacional en la estructura pudiera afectar su fluorescencia. En este sentido, se puede observar que en la **Tabla 20** las bases de Schiff no sufren algún cambio notorio en la intensidad de fluorescencia y si acaso solo una muy ligera disminución de ella, por lo que un cambio conformacional en su estructura puede ser insignificante en la intensidad. Por otra parte, las BOSCHIBAs seleccionadas en estado normal presentan una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a sus precursores esto debido a su estructura rígida adjudicada por la coordinación del átomo de boro pero al igual que sus precursores después de la aplicación de fuerza mecánica la intensidad no se ve afectada. Cabe mencionar que la base de Schiff **SB-H** solo presenta fluorescencia en estado cristalino (**Tabla 22**).

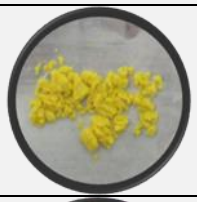
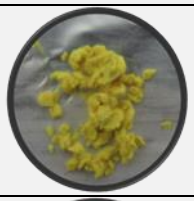
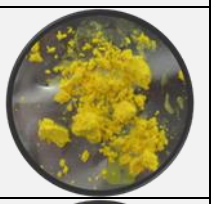
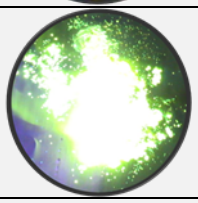
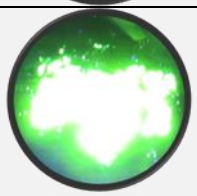
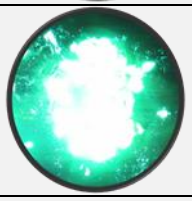
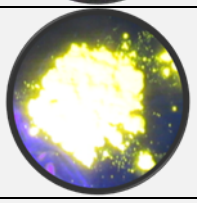
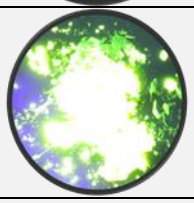
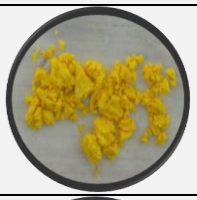
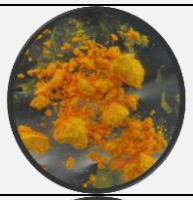
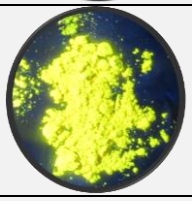
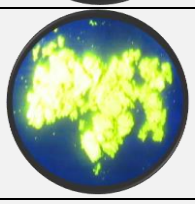
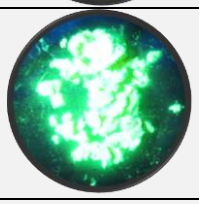
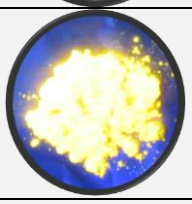
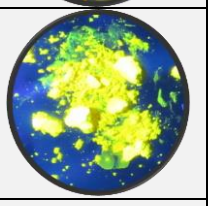
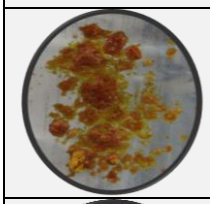
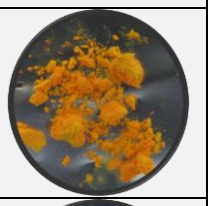
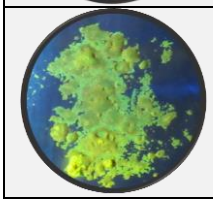
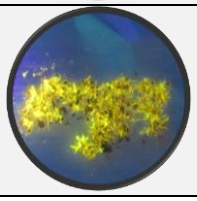
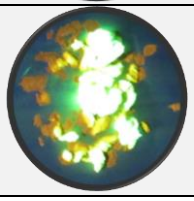
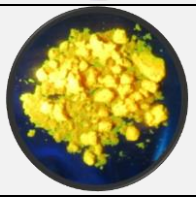
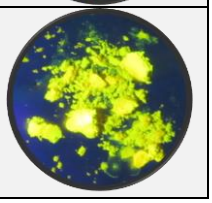
Tabla 22. *Solidos cristalinos de la base de Schiff* ***SB-H*** *y* ***BSB-Nap****.*

Compuesto	Luz de día	Luz UV (365 nm)
BS-H		
BSB-Nap		

5.2.2.2 Ensayos de termocrómicos

El siguiente estudio consistió en someter las BOSCHIBAs en una escala de temperatura, los resultados observados de manera cualitativa se presentan en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Imágenes de los estudios termocrómicos de las BOSCHIBAs.

BSB-H	**BSB-OMe**	**BSB-NEt**	**BSB-tBu**	**BSB-Nap**
Temperatura a 25 °C				
				
				
Temperatura a 120 °C				
				
				
Temperatura a 240 °C				
				
				

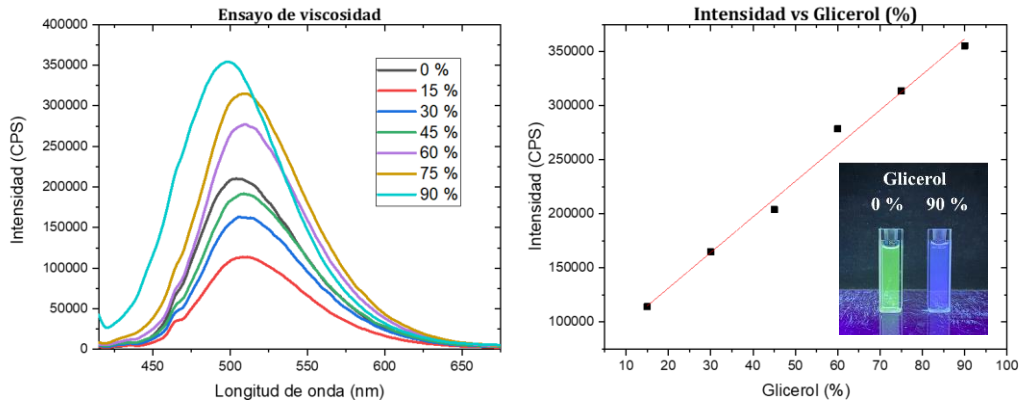
En los ensayos termocrómicos se puede observar que al incrementar la temperatura las BOSCHIBAs tienden a perder la intensidad de fluorescencia, lamentablemente esta ya no es reversible. La posible causa de este fenómeno puede deberse a la apariencia que va tomando el compuesto a elevadas temperaturas puesto que un cambio de coloración pudiera estar afectando la emisión así como algún cambio estructural.

5.2.2.3 Ensayos de viscosidad

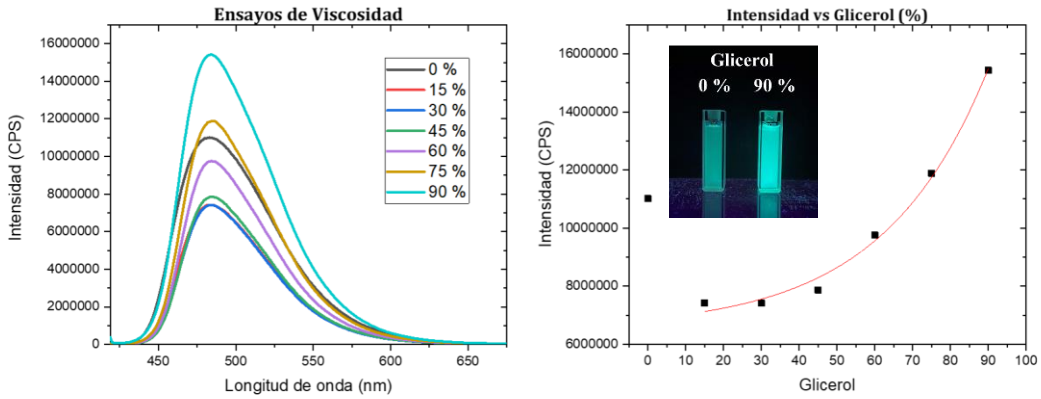
Para los ensayos de viscosidad se utilizó una mezcla homogénea de metanol-glicerol a diferentes proporciones que van del 0% hasta 90% de glicerol en aumentos del 10%. Los resultados obtenidos para cada BOSCHIBA se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Estudios de viscosidad de las diferentes BOSCHIBAs en mezclas metanol-glicerol.

BSB-OMe

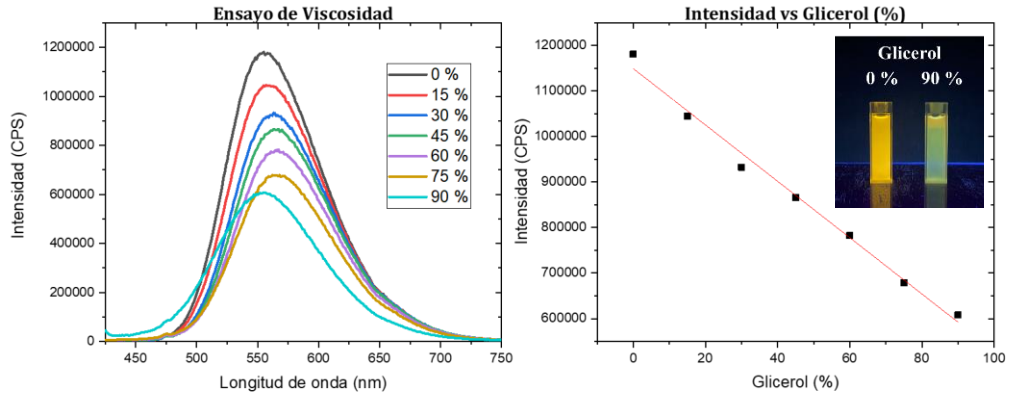


BSB-NEt

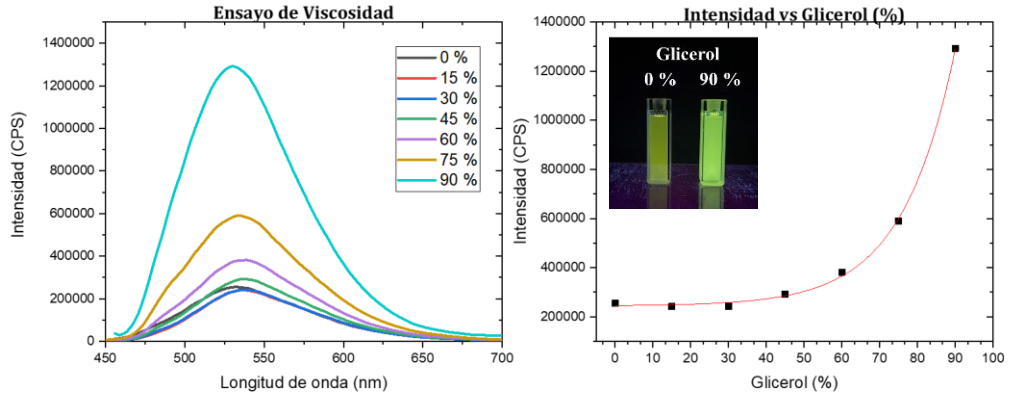


Continuación de la **Tabla 24**…

BSB-tBu



BSB-Nap



Como se puede apreciar las BOSCHIBAs **BSB-OMe**, **BSB-NEt** y **BSB-Nap** tienden a incrementar su intensidad de fluorescencia conforme incrementa la viscosidad del medio, no obstante, cabe resaltar que en la mayoría de los casos al 10% de glicerol pierden de manera drástica su intensidad de emisión. Los compuestos **BSB-NEt** y **BSB-Nap** tienden a un incremento de manera exponencial, para **BSB-NEt** el incremento de su intensidad es de 1.5 veces más al 90% de glicerol mientras que para **BSB-Nap** incrementa 5 veces su intensidad de emisión al 90% de glicerol. La **BSB-OMe** tiende a un incremento de manera lineal con 1.5 veces de aumento al 90% de glicerol usando una longitud de onda de excitación de 409 nm pero cuando se excita a 340 nm se observa el incremento de intensidad de una banda de emisión a 398 nm por lo que se puede concluir que **BSB-OMe** tiene un efecto hipsocrómico en disolventes polares. Por otra parte, la **BSB-tBu** tiende a perder su intensidad de

emisión de manera lineal conforme incrementa la viscosidad del medio. La causa del incremento de intensidad de fluorescencia podría deberse a la disminución rotacional sobre el enlace σ C=N-C y en consecuencia se generaría un sistema plano entre anillos aromáticos, permitiendo una adecuada transferencia de carga intramolecular a través del sistema D-π-A (**Figura 27**). Estos resultados permiten clasificar a las BOSCHIBAs como rotores moleculares debido a la sensibilidad del medio viscoso.

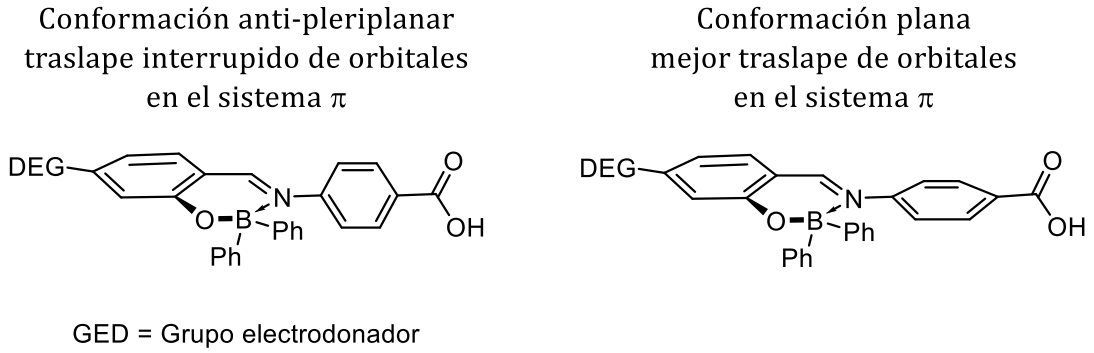
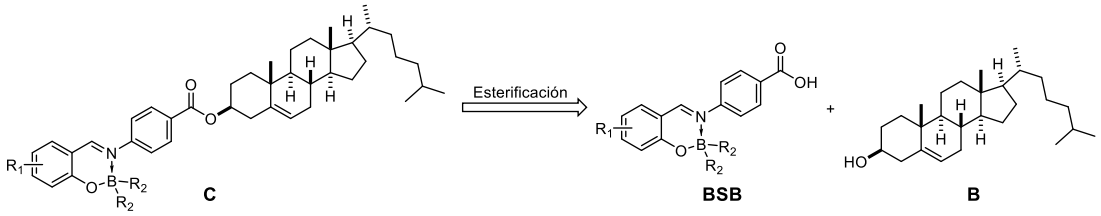


Figura 27. Dos de las posibles conformaciones de la estructura general de las BOSCHIBAs

5.3 Síntesis de sondas celulares a partir de compuestos de organoboro: una aproximación hacia el marcaje selectivo de la membrana plasmática

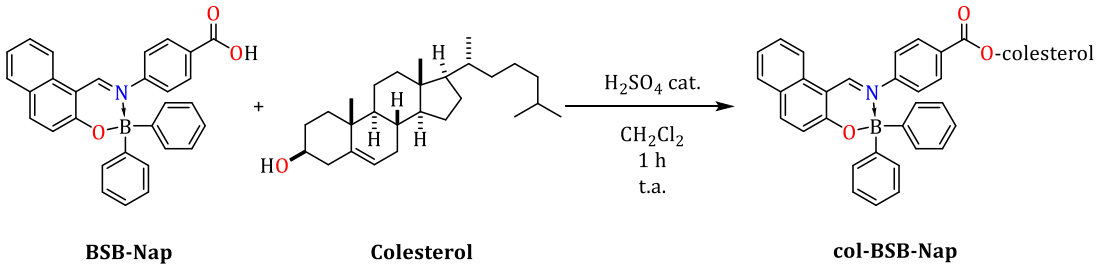
Para la obtención de la estructura molecular de las sondas celulares fluorescentes se puede observar que la estructura de la sonda celular fluorescente **C**, está formada a expensas de un enlace de tipo éster entre la BOSCHIBA **A** y la molécula del colesterol **A**; Así que, la esterificación de la BOSCHIBA con el colesterol es la reacción clave en esta síntesis (**Esquema 7**).



Esquema 7. Plan retrosintético para la obtención de las sondas celulares derivadas de BOSCHIBAs.

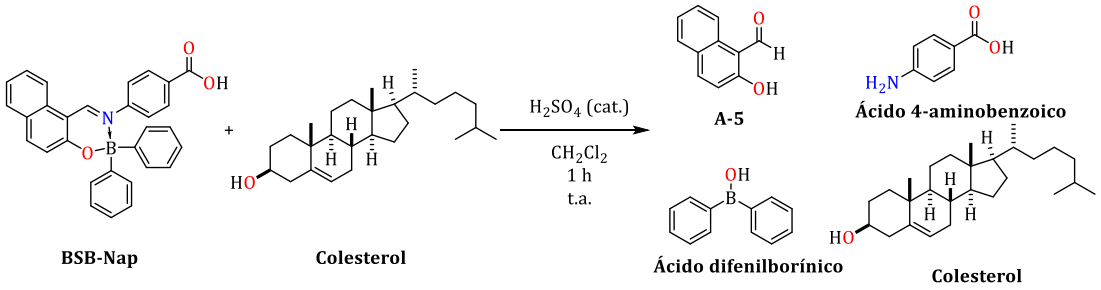
Empleando las BOSCHIBAs anteriormente sintetizadas, se procedió con la reacción de esterificación para la unión con el colesterol. En primera instancia, se hizo reaccionar la BOSCHIBA **BSB-Nap** con el colesterol utilizando las condiciones

clásicas para una esterificación, donde se involucra el uso de un catalizador ácido para promover la reacción (**Esquema 8**).



Esquema 8. Reacción de esterificación entre la BOSCHIBA **BSB-Nap** y colesterol.

Sin embargo, bajo estas condiciones de reacción solo se observó la hidrólisis de la BOSCHIBA **BSB-Nap** a sus correspondientes materias primas iniciales. Esto se confirmó después de obtener el espectro de RMN de ^{1}H del crudo de reacción aislado de la fase orgánica, donde se observaron señales características del 2-hidroxi-naftaldehído y el protón alfa al grupo hidroxilo del colesterol, además se observó que la integral de las señales correspondía a una relación 3:1 respectivamente, por lo que se concluyó que se trataba de dos sistemas diferentes (**Figura 28**). Por consiguiente, las condiciones utilizadas anteriormente no son las adecuadas para la unión entre el colesterol y la BOSCHIBA debido a la presencia de grupos susceptibles a condiciones ácidas como el grupo imina e incluso el complejo de boro-base de Schiff



Esquema 9. Componentes obtenidos en la reacción de esterifación.

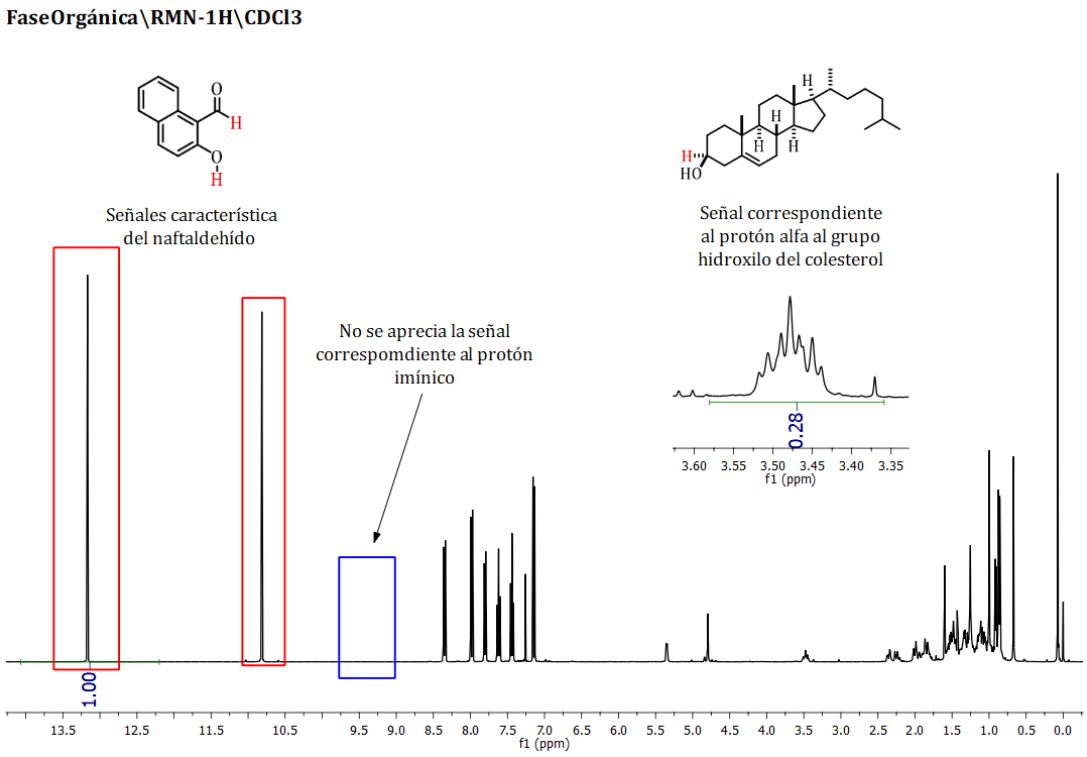
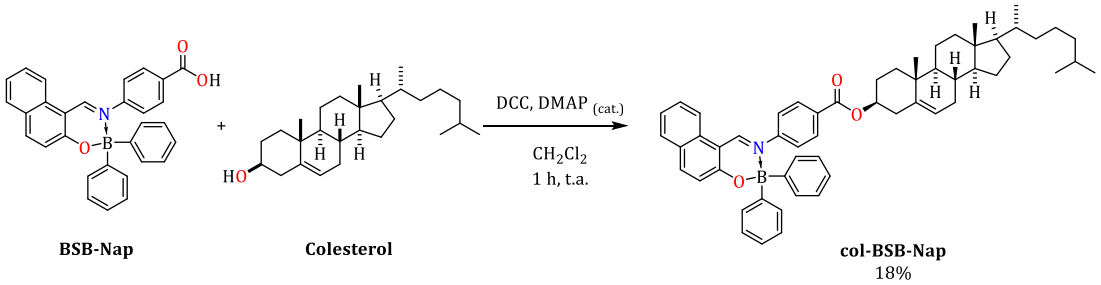


Figura 28. Espectro de RMN ^{1}H en $CDCl_3$ del concentrado de la fase orgánica obtenida en la reacción.

Debido a que las BOSCHIBAs **BSB-OMe**, **BSB-NEt**, **BSB-tBu**, y **BSB-H** comparten las mismas características en cuanto a reactividad, la incorporación del colesterol bajo estas condiciones presentará resultados similares, por lo que se optó usar otro método de síntesis para las sondas.

La DCC es un compuesto orgánico muy utilizado para acoplar aminoácidos en la síntesis de péptidos. Así mismo se ha comprobado que el empleo de este reactivo en reacciones de esterificación entre alcoholes y ácidos carboxílicos generan ésteres en excelentes rendimientos. Teniendo confianza en uso de la DCC, la BOSCHIBA **BSB-Nap** fue tratada con el colesterol, la DCC y la DMAP en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente (**Esquema 10**), después del consumo total de la materia prima, el producto mayoritario se aisló y fue analizado mediante espectroscopía de RMN de ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B. Y tal como se había previsto, la sonda celular fluorescente **col-BSB-Nap** fue obtenida, sin embargo, en bajos rendimientos debido a la formación de subproductos. En primera instancia se prefirió la purificación por recristalización, no obstante, después de 4 recristalizaciones en mezclas CH_2Cl_2/hexano se había perdido más del 50% del producto esto debido a su solubilidad, pero en cada proceso el producto de

interés se observaba libre de impurezas. Por otro lado se eligió la cromatografía en columna, pero debido a la naturaleza de la sílice el producto fue hidrolizado y la mayor parte retenida consiguiendo solo un 12% de rendimiento, por lo que esta estrategia de purificación se descartó, además el uso excesivo de disolventes generaría un mayor costo de síntesis y a la vez un mayor impacto ambiental.



Esquema 10. Síntesis del compuesto **col-BSB-Nap** a través de una esterificación con DCC.

La síntesis de compuesto **col-BSB-Nap** se logró confirmar mediante los análisis de espectroscopía de RMN ^{1}H, ^{13}C, ^{11}B, donde se puede observar el patrón de señales correspondientes al colesterol entre la región de 0.6 y 2.1 ppm en el espectro de RMN de ^{1}H. Así como la señal desplazada en 4.8 ppm correspondiente al átomo de hidrógeno unido al carbono alfa al oxígeno. Además de observarse las señales entre 7-9 ppm correspondientes al fragmento de la BOSCHIBA **BSB-Nap**, donde se destaca la presencia del átomo de hidrógeno del grupo imino a 8.98 ppm (**Figura 29**).

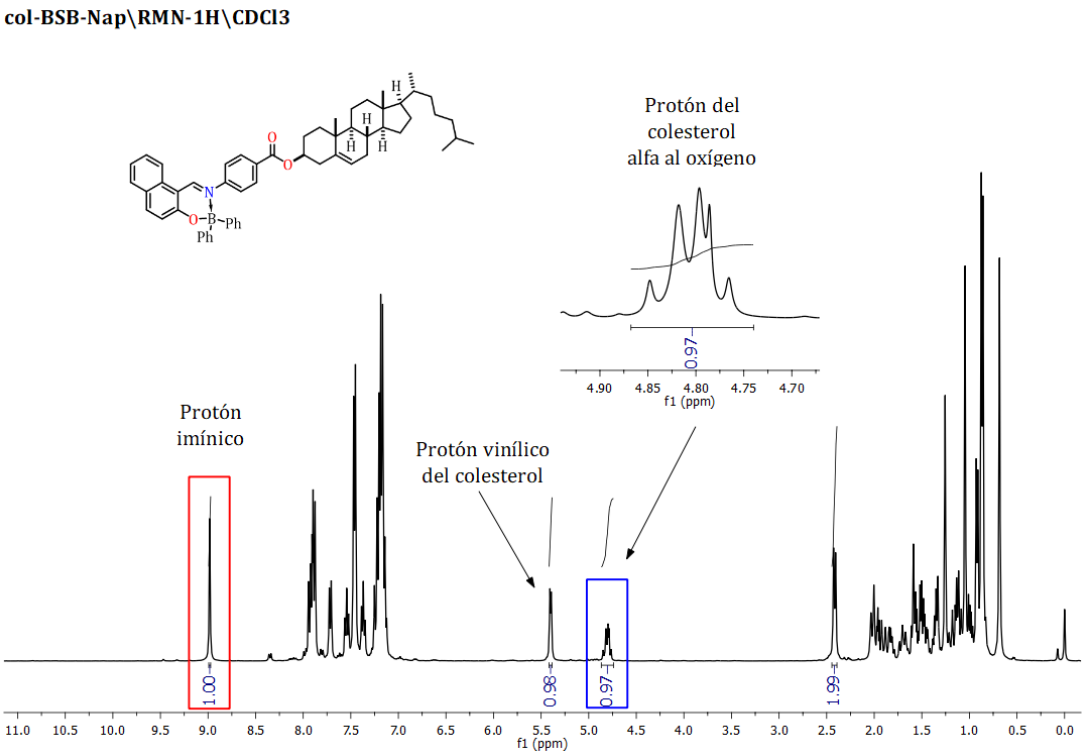


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **col-BSB-Nap** en $CDCl_3$.

Por otra parte, en el espectro de RMN de ^{13}C entre la región de 10 y 75 ppm se observan las señales correspondientes de los carbonos del fragmento del colesterol, destacando el carbono unido al oxigeno desplazado a 74.95 ppm, así como las señales del fragmento de la BOSCHIBA **BSB-Nap** que están entre el rango de 110-170 ppm, observando la presencia del carbono imínico a 157.58 ppm y el carbono del carbonilo a 164.90 ppm (establecido por el espectro de RMN 2D HMBC) (**Figura 30**). Y finalmente, el espectro de RMN de ^{11}B muestra una señal desplazada a 8.84 ppm correspondiente al átomo de boro tetra coordinado (**Figura 31**).

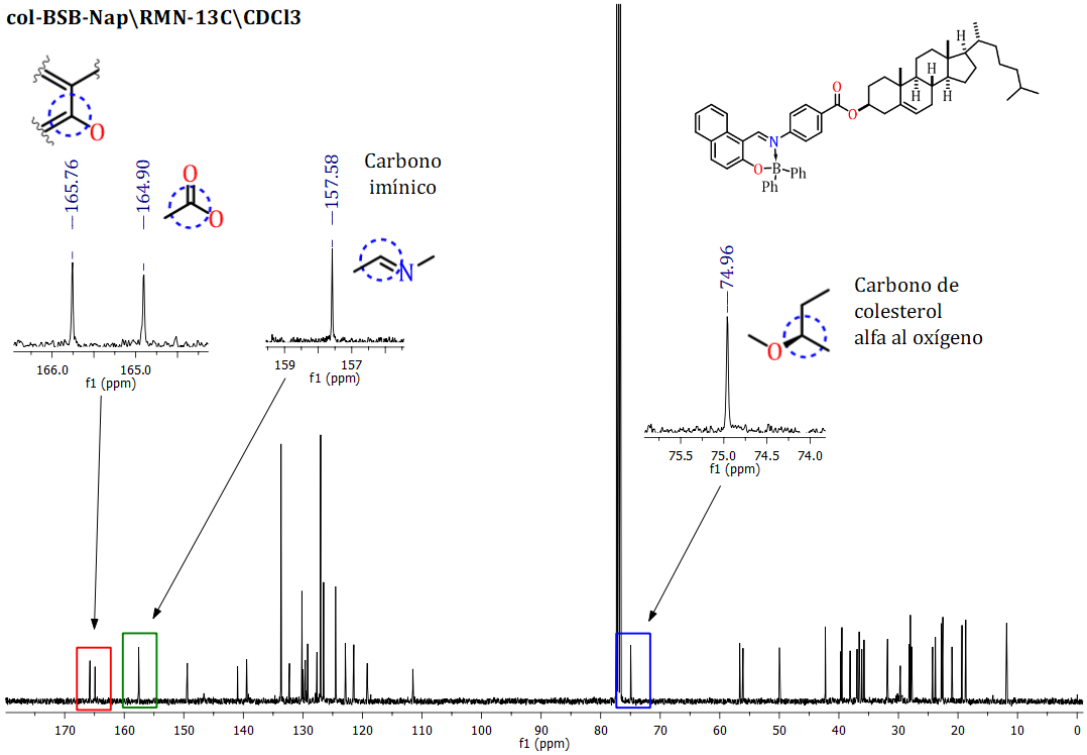


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **col-BSB-Nap** en $CDCl_3$.

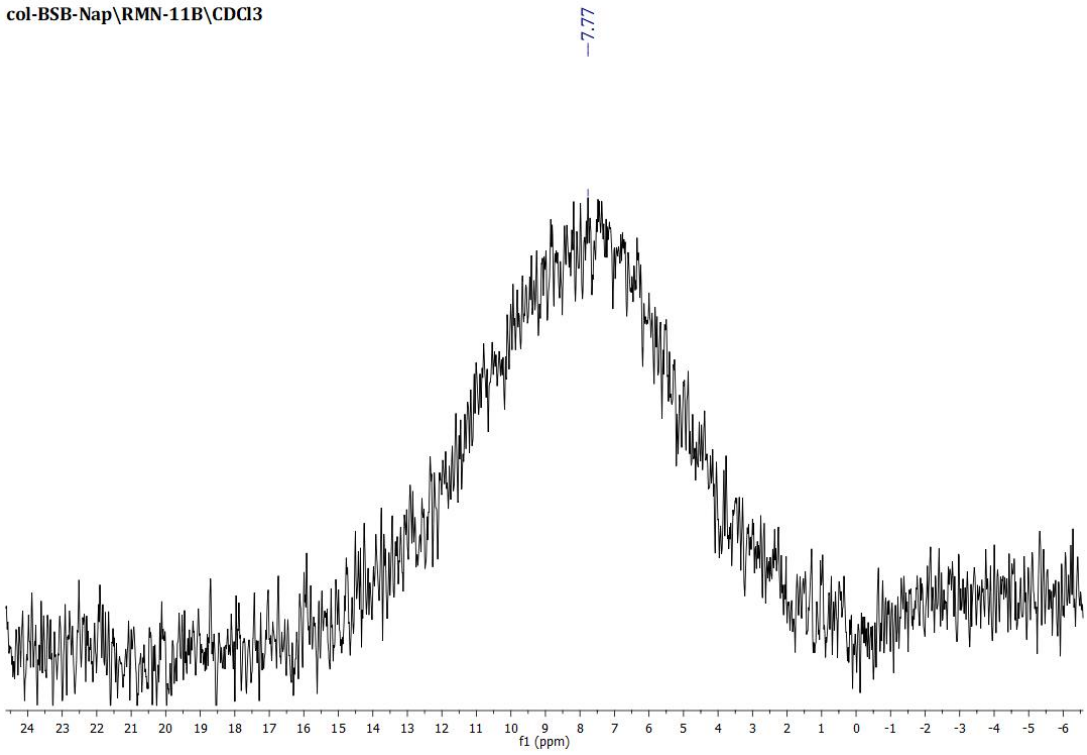


Figura 31. Espectro de RMN de ^{11}B del compuesto **col-BSB-Nap** en $CDCl_3$.

El siguiente paso fue encontrar las condiciones más adecuadas para dicha reacción. De esta manera la implementación del mejor protocolo resultante permitiría acceder a las correspondientes sondas celulares con las diferentes BOSCHIBAs. Para ello se varió temperatura y cantidad de disolvente (**Tabla 25**).

Tabla 25. Optimización de las condiciones de reacción para la síntesis de **col-BSB-Nap.**

Ensayo	Temperatura	CH_2Cl_2 (ml)	R. químico (%)
1	t.a.	10	46
2	0 °C	10	51
3	0 °C	30	73
4	t.a.	30	55
5	0 °C	50	78
6	0 °C	50	80*

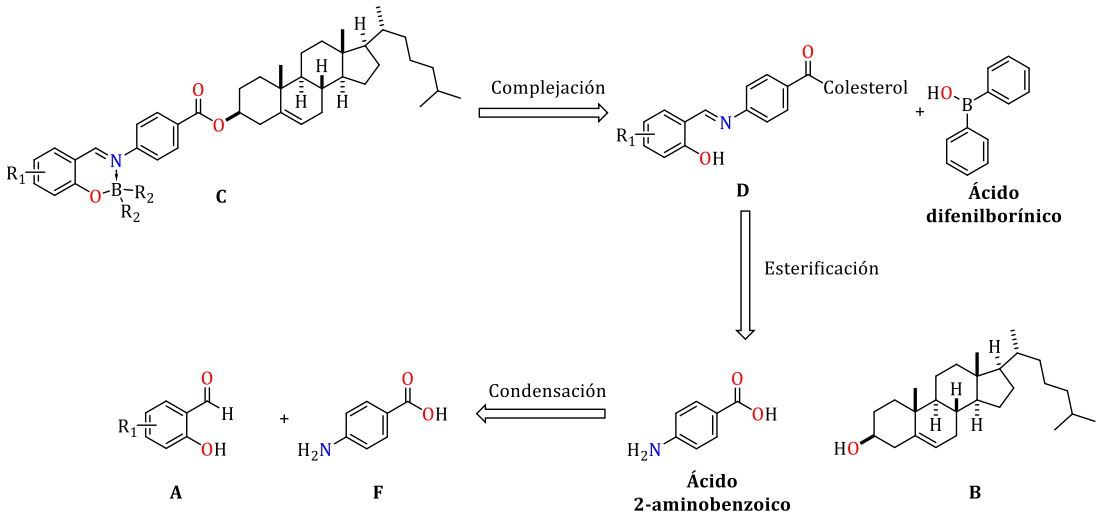
*reacción sin DMAP

Como se observa en la **Tabla 25**, al incrementar la cantidad de disolvente se ve una mejora en el rendimiento químico siendo 50 ml la cantidad de disolvente adecuada (ensayo 5), por otra parte, la temperatura de reacción jugó un papel importante debido a que a bajas temperaturas se observó notablemente la disminución de subproductos. Por otra parte, la omisión del catalizador DMAP condujo a resultados similares al ensayo 5, por lo que la DMAP es prescindible de la reacción.

Aunque con la estrategia sintética anteriormente desarrollada nos permitiría obtener las sondas celulares con las diversas BOSCHIBAs, se tuvo que descartar. Dado que al implementar el protocolo para la obtención de **col-BSB-Nap** utilizando las BOSCHIBAs restantes (**BSB-OMe**, **BSB-NEt**, **BSB-tBu**) condujo a la formacon de subproductos y rendimientos químicos muy bajos.

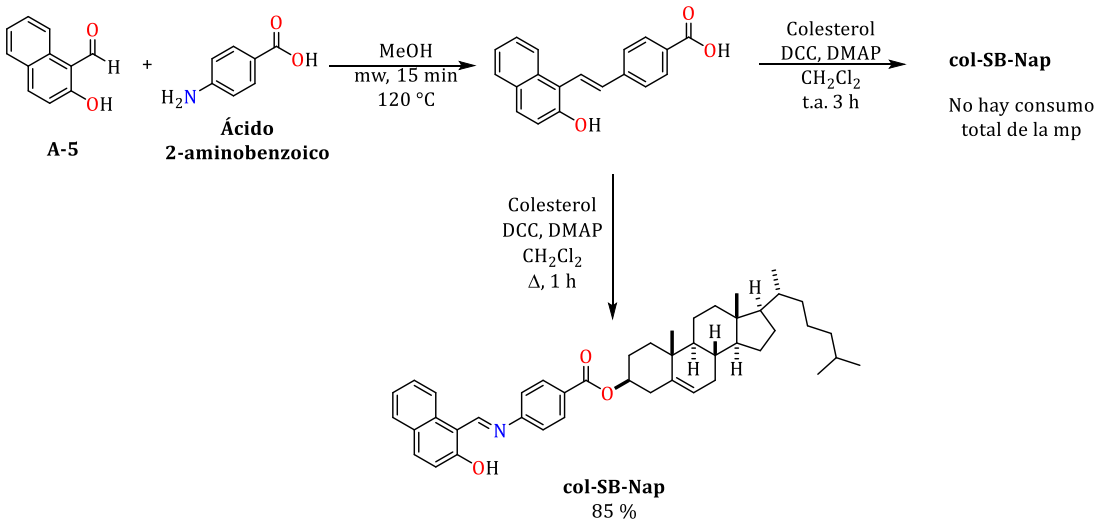
Buscando la manera de incorporar el colesterol sin comprometer el grupo funcional imina así como evitar la formación de subproductos, mejorara el rendimiento químico y evitar el uso excesivo de disolvente, se diseñó una nueva ruta sintética en el cual el colesterol sería incorporado en una etapa media de la ruta. En esta segunda estrategia, se propuso iniciar con la preparación de las bases de Schiff seguido de la

incorporación de colesterol mediante una esterificación con DCC, para finalmente incorporar el ácido difenilborínico **(Esquema 11)**.



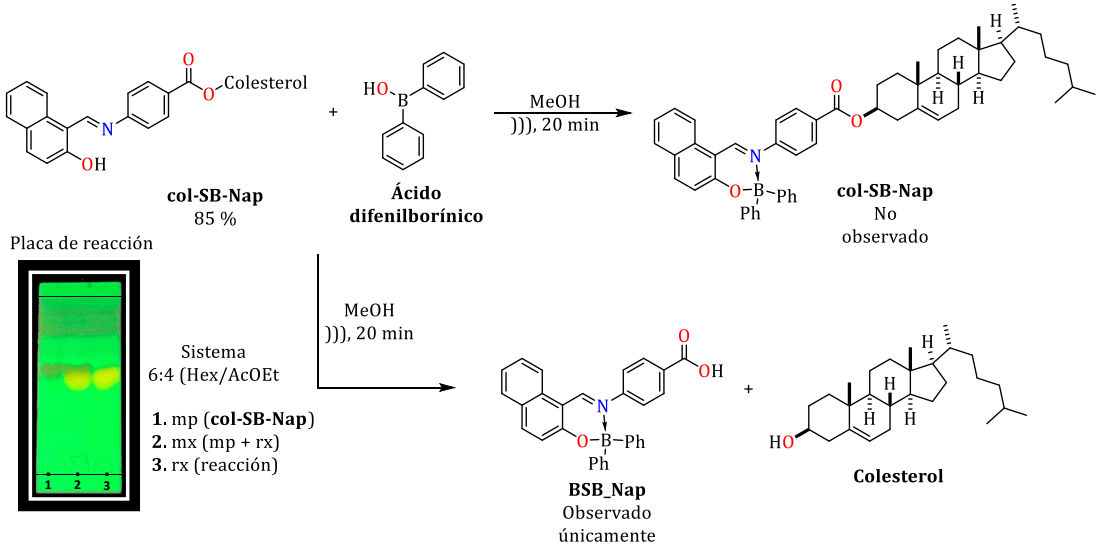
Esquema 11. Nuevo plan sintético para la obtención de las sondas.

La ejecución del nuevo plan sintético comenzó con la reacción de condensación entre el ácido 4-aminobenzoico y el 2-hidroxinaftaldehído **A-5** para dar como producto la base de Schiff **SB-Nap** (los datos espectroscópicos se describen en el capítulo cuatro). Posteriormente se realizó la reacción de esterificación empleando DCC, DMAP y CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, sin embargo, la reacción no se completaba en su totalidad bajo estas condiciones, no obstante esto se resolvió colocando la reacción a reflujo. El compuesto **col-SB-Nap** se obtuvo en un rendimiento del 85% utilizando como método de purificación la recristalización (**Esquema 12**).



Esquema 12. Síntesis del compuesto **col-SB-Nap**.

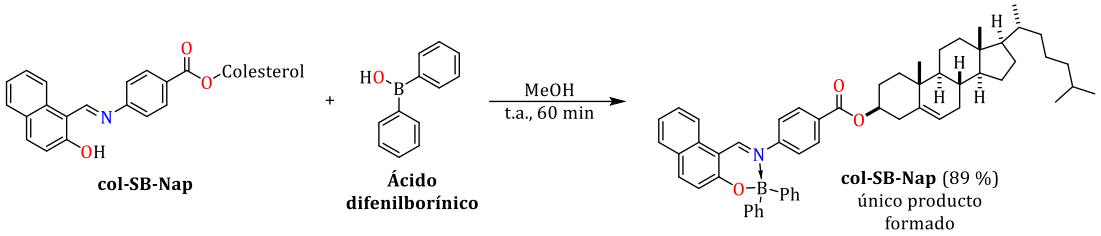
El último paso de la estrategia sintética consistió en llevar a cabo la reacción complejación, por lo cual, el compuesto **col-SB-Nap** se hizo reaccionar con el ácido difenilborínico en un baño ultrasónico. La elección de estas condiciones de reacción fue debido a que la síntesis de las BOSCHIBAs entre las bases de Schiff y el ácido difenilborínico se obtenían de manera eficiente. Desafortunadamente, la ejecución de este protocolo en esta reacción condujo a la hidrólisis de compuesto **col-SB-Nap** a la respectiva base de Shiff **SB-Nap** y el colesterol, no obstante, la base de Schiff generada en el medio de reacción reaccionó con el ácido difenilborínico obteniendo así la BOSCHIBA **BSB-Nap** (**Esquema 13**).



Esquema 13. Reacción entre **col-SB-Nap** y el ácido difenilborínico usando ultrasonido.

La posible causa de la hidrólisis del compuesto **col-SB-Nap** a sus respectivos precursores pudo deberse a las pequeñas cantidades de HCl remanente durante la preparación del ácido difenilborínico ya que este es obtenido a través de condiciones ácidas, por otra parte, se ha reportado que reacciones que bajo condiciones ácidas y el empleo de ultrasonido se promueve las reacciones de hidrólisis de manera eficaz.

Teniendo en mente este resultado inesperado, se eligió repetir la reacción bajo las mismas condiciones a excepción de emplear el ultrasonido, y durante una agitación vigorosa a temperatura ambiente por 1 h se observó la una formación de compuesto **col-BSB-Nap** (**Esquema 14**).



Esquema 14. Síntesis del compuesto col-BSB-Nap a partir del compuesto **col-SB-Nap**.

Bajo este último plan sintético se logró acceder a la sonda celular derivada de la BOSCHIBAs **BSB-OMe** con buenos rendimientos químicos (65%), así como la disminución de subproductos, bajo uso de disolventes y técnicas de purificación sencillas. No obstante, la obtención de las sondas derivadas de las BOSCHIBAs **BSB-tBu** y **BSB-NEt** se sigue optimizando, debido a que durante la incorporación del colesterol y la posterior purificación por recristalización se mantienen residuos de colesterol y subproductos. En la **Tabla 26** se muestran los rendimientos químicos obtenidos en cada etapa de la síntesis para la obtención de las sondas **BSB-OMe** y **BSB-Nap**, además se muestra el rendimiento global, que en el mayor de los casos supera el 60%, esto nos indica el buen aprovechamiento de las materias primas para la obtención de un material con una potencial aplicación en la tinción de la membrana plasmática.

Tabla 26. Rendimiento químico obtenido en cada paso de la síntesis de las sondas y su respectivo rendimiento químico global.

XX =	SB-XX	col-SB-XX	col-BSB-XX	Global (%)
OMe	94	85	81	64.7
Nap	95	87	89	73.6

5.3.1Caracterización fotofísica col-BSB-OMe, col-BSB-NEt y col-BSB-Nap

Una vez obtenidas las sondas celulares **col-BSB-OMe** y **col-BSB-Nap** se le realizaron estudios fotofísicos, los espectros de absorción y emisión se obtuvieron en cloroformo a una concentración de $1x10^{-5}$ M y se muestran en la **Figura 32**.

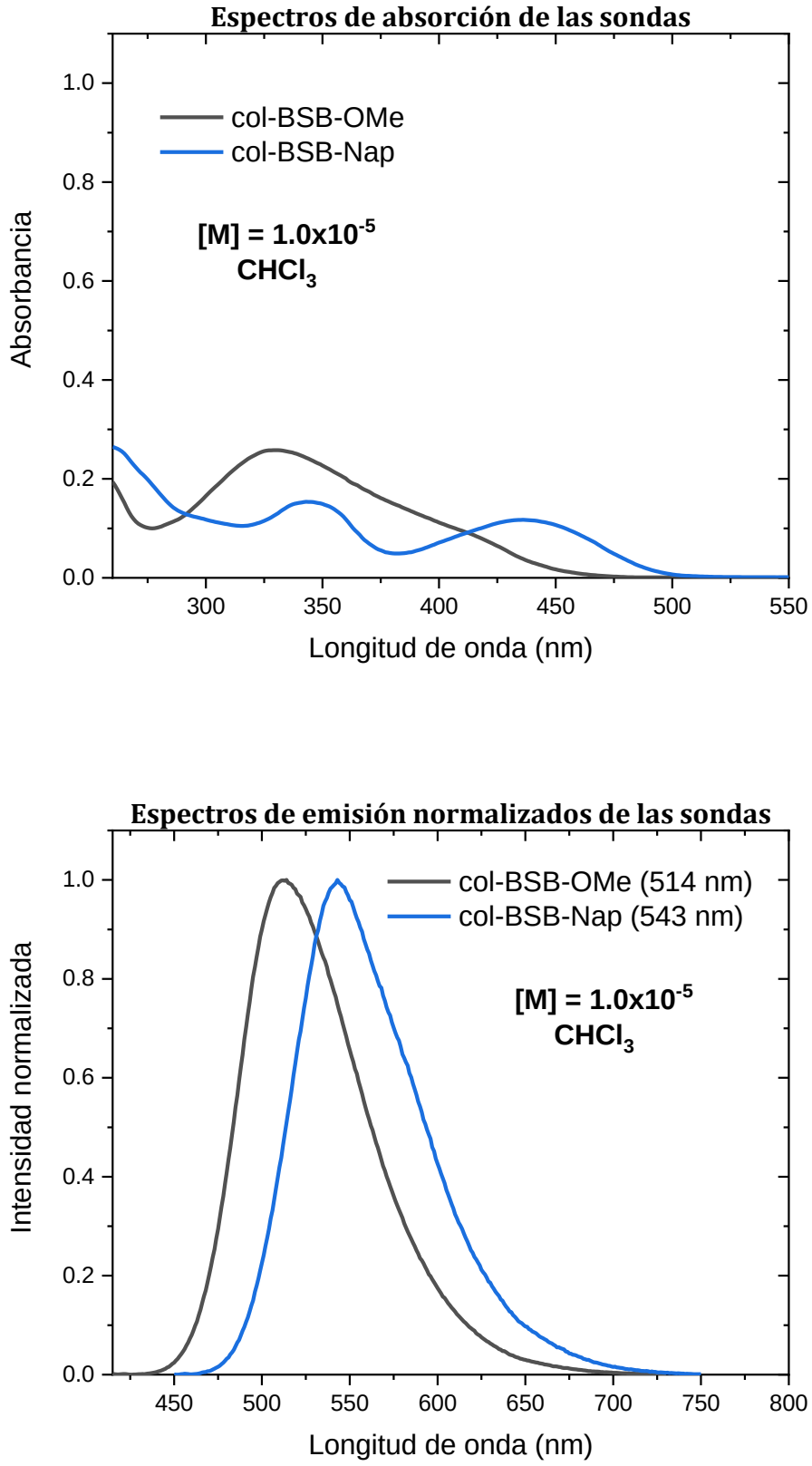


Figura 32. Espectros de absorción (arriba) y espectros de emisión (abajo) de los compuestos **BSB-OMe** y **BSB-Nap**.

Si los espectros de absorción y emisión de los compuestos **col-BSB-OMe** y **col-BSB-Nap** se comparan con sus respetivos fluoróforos (BOSCHIBAs), se puede apreciar que no hay un cambio significativo tanto en la λ_{max} de absorción como en la longitud de onda de emisión, por lo que, la incorporación del colesterol a las BOSCHIBAs no afecta a estas propiedades fotofísicas, esto debido a que la estructura del colesterol se encuentra separada del sistema conjugado de la BOSCHIBA por un enlace de tipo éster, no obstante, el rendimiento cuántico de estas sondas comparado con su respectiva BOSCHIBAs se ve afectado, por ejemplo, para el caso de **col-BSB-Nap** se observa un incremento del 57% mientras que para **BSB-OMe** se observa una disminución del 22%.

En la **Tabla 27** se muestran los valores de λ_{max} de absorción, de emisión, el coeficiente de extinción molar, el desplazamiento Stokes así como su respectivo rendimiento cuántico de **BSB-OMe** y **BSB-Nap**. Nótese que los compuestos presentan un gran desplazamiento Stokes, los valores grandes en este tipo de compuestos (sondas) tienen un beneficio, ya que esto permite que la longitud de onda de excitación no se traslape con la de emisión y ocasione una confusión durante el desarrollo de estudios de bioimagen.

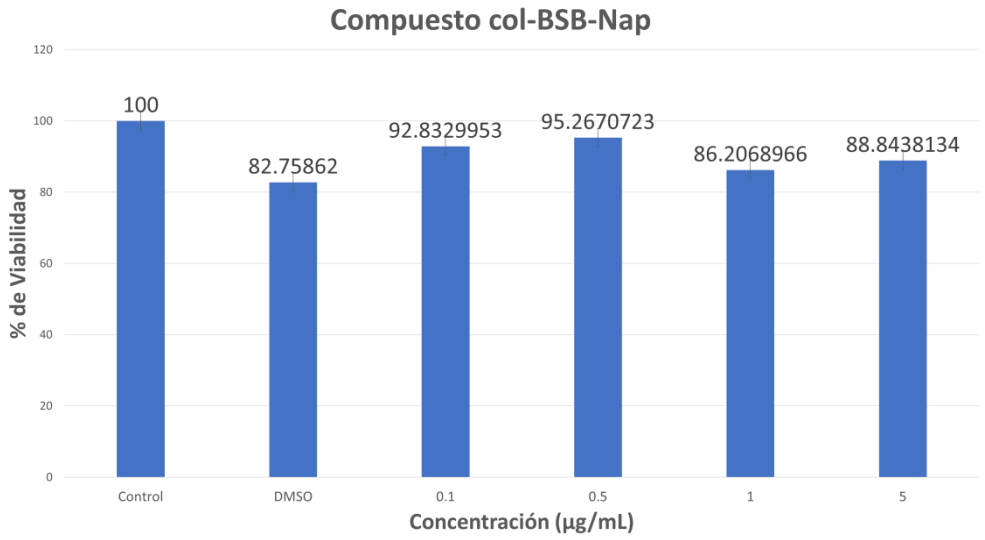
Tabla 27. Datos y valores fotofísicos mas relevantes de los compuestos **BSB-OMe**, y **BSB-Nap.**

	λ_{Abs} [nm]	λ_{Em} [nm]	ε [10^4 M^{-1} cm^{-1}]	$\Delta\nu$ [nm]	Φ
Col-BSB-OMe	409 330	514	1.005 2.439	105 184	0.21
Col-BSB-Nap	436 343	543	1.204 1.571	107 200	0.11

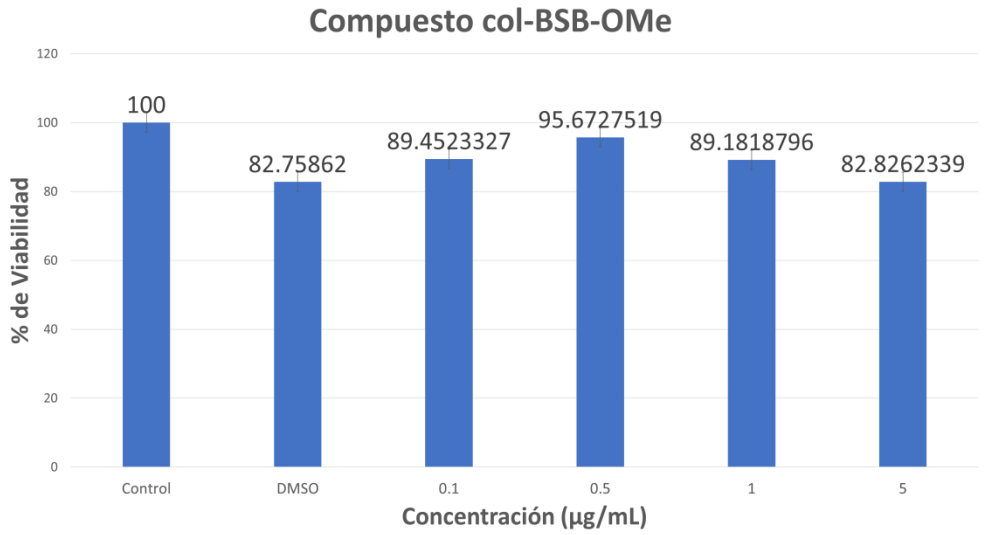
5.3.2 Ensayos de citotoxicidad de col-BSB-OMe y col-BSB-Nap

Los estudios de citotoxicidad celular para los compuestos **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** se realizaron conforme a la metodología descrita en el capítulo cuatro en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml en DMSO, utilizando la línea celular

B16F10. Los resultados obtenidos se muestran en la **Gráfica 2** y la **Gráfica 3** para cada sonda.



Gráfica 2. Resultados de los estudios de citotoxicidad del compuesto col-BSB-Nap en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml en DMSO.



Gráfica 3. Resultados de los estudios de citotoxicidad del compuesto col-BSB-OMe en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/ml en DMSO.

Como se pude observar en la **Gráfica 2** y **Gráfica 3** las sondas celulares no presentan una citotoxicidad alta, puesto que la viabilidad celular de los compuestos **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** superan el 86% y 82% de viabilidad en concentraciones de 5.0 µg/ml, respetivamente. Mientras que en concentraciones de 0.5 µg/ml llegan a superar el 95% de viabilidad. Estos resultados evidencian que las

sondas **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** tienen una alta compatibilidad con las células y esto es debido a que en su estructura contiene la molécula del colesterol que es un componente estructural de la membrana, lo que le permite a la célula reconocerla con facilidad sin causar efectos adversos. Además, estos resultados comprueban lo ya demostrado por nuestro grupo de investigación donde se hace mención que los compuestos fluorescentes derivados de boro presentan baja citotoxicidad e incluso nula. Adicionalmente, los resultados citotóxicos para estas sondas nos sirven como referencia para predecir los resultados de las sondas faltantes (**col-BSB-NEt** y **col-BSB-tBu**) esperando resultados similares.

5.3.3 Bioimágenes de col-BSB-OMe y col-BSB-Nap

Con el fin de evaluar la capacidad de tinción fluorescente por los compuestos **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** se llevaron a cabo las pruebas de bioimagen en células B16F10. La metodología utilizada se describe en el **capítulo 1**. Sin embargo, por el momento se ha utilizado un microscopio convencional para la obtención de las bioimágenes. Los resultados se muestran en la **Figura 33** y **Figura 34** para **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe**, respectivamente.

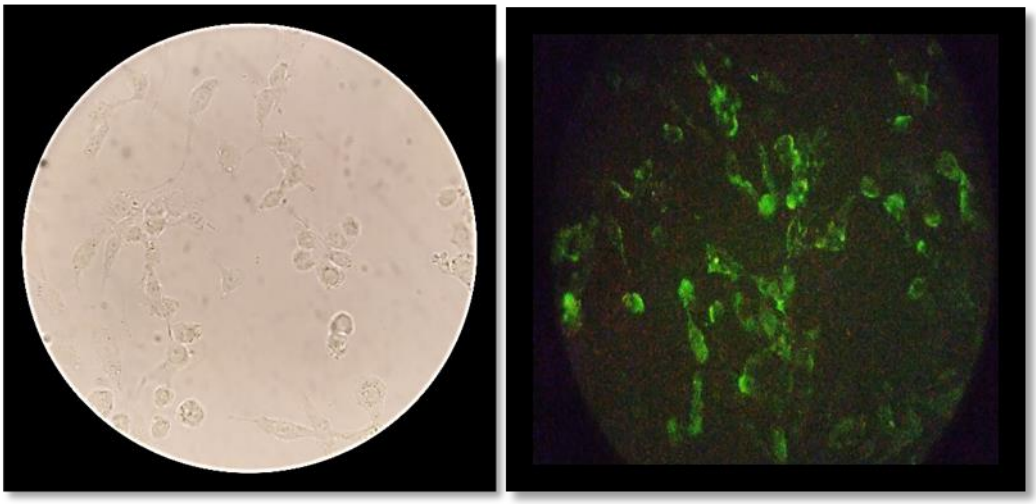


Figura 33. Bioimágenes fluorescentes en células B16F10 con el compuesto **col-BSB-Nap**, campo brillante (derecha) y campo oscuro (izquierda).

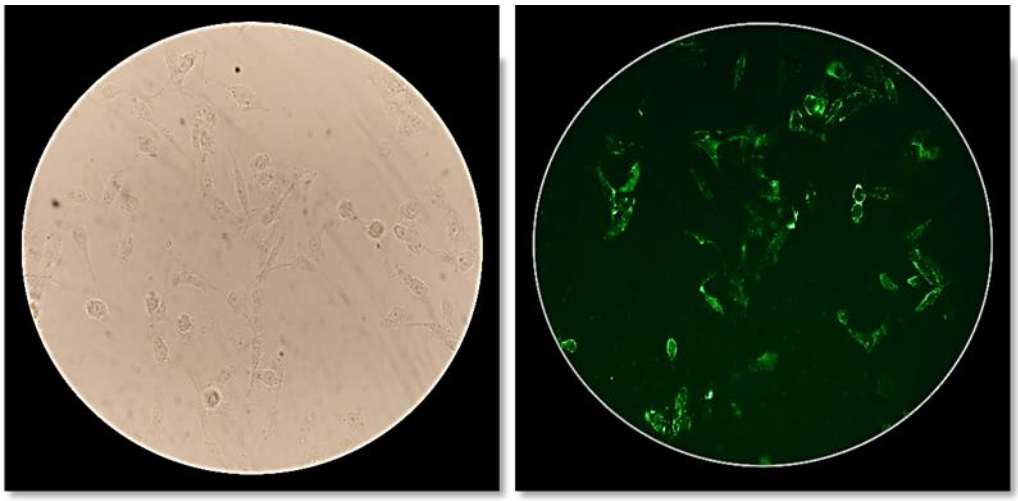


Figura 34. Bioimágenes fluorescentes en células B16F10 con el compuesto **col-BSB-OMe**, campo brillante (derecha) y campo oscuro (izquierda).

Los análisis de bioimagen de los compuestos **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** revelan, en primera instancia, la capacidad de teñir el citoplasma de las células B16F10. No obstante, aunque no se aprecia con claridad la tinción de las células con el compuesto **col-BSB-Nap**, el compuesto **col-BSB-OMe** nos permite tener una pre-evaluación de las demás sondas para su posterior aplicación como tinte celular fluorescente. Cabe mencionar que debido al uso de un microscopio convencional para la obtención de las bioimágenes, solo se puede apreciar una tinción general de las células, no obstante, la microscopia confocal cuenta con un “pinhole” que elimina la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, solo la luz del plano focal puede ser detectada produciendo imágenes con más detalle y de esta manera obtener imágenes bidimensionales o en su caso tridimensionales.

6. CONCLUSIONES

Dos bases de Schiff (**3** y **4**) con diferentes grupos electro-donantes se sintetizaron usando métodos verdes: irradiación ultrasónica y mecanosíntesis, este último se determinó como el mejor método sintético para la síntesis de **3** con un rendimiento químico del 88% en 1 h. No obstante, solo la base de Schiff **3** mostró fluorescencia visible. En particular, el compuesto **3** aislado de la mecanosíntesis y sonosíntesis muestran fluorescencia en estado sólido debido al tamaño de partícula mientras que por calentamiento convencional no muestra esta propiedad. El compuesto **3** muestra una buena viabilidad celular a una concentración de 5 $\mu g\ ml^{-1}$ (necesaria para una buena tinción celular), por lo que presenta una baja citotoxicidad. Además, la base de Schiff **3** tiene una aplicación potencial para bioimágenes fluorescentes *in vitro* en líneas celulares de hepatocitos y MCF-7 por microscopía confocal fluorescente, observando principalmente el citoplasma. Adicionalmente, la base de Schiff **3** muestra propiedades halocrómicas por lo que lo convierte en un excelente sensor de pH ácido.

Por otra parte, se sintetizaron 4 BOSCHIBAs con diferentes grupos electrodonadores (OMe, NEt_2, t-Bu y Naft), las cuales fueron caracterizadas mediante RMN de ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B. Las BOSCHIBAs fueron sintetizadas mediante diversos métodos verdes como la mecanoquímica, ultrasonido y microondas, siendo la irradiación con microondas en combinación con ultrasonido el mejor protocolo sintético para su obtención en solo dos etapas, con un bajo costo energético, cortos tiempos de reacción y altos rendimientos químicos. En cuanto a características fotofísicas, las BOSCHIBAs **BSB-OMe** y **BSB-NEt** presentan los mejores rendimientos cuánticos que incluso llegan a ser comparables con algunos derivados de BODIPYs y dioxaborinos. Aunque las BOSCHIBAs no presentan propiedades mecanocrómicas, si evidencian propiedades termocrómicas no reversibles esto debido a la pérdida de fluorescencia a temperaturas mayores a 240 °C. Adicionalmente, las BOSCHIBAs presentan sensibilidad a la viscosidad del medio siendo el compuesto **BSB-Nap** el que presenta el mayor incremento de su intensidad de fluorescencia por 5 veces más en una solución de 10% metanol-90% glicerol, mientras que **BSB-OMe** y **BSB-NEt** incrementan por 1.5 veces más su intensidad de fluorescencia, no obstante, el compuesto BSB-tBu presenta una reducción notable de su intensidad de fluorescencia conforme se incrementa la viscosidad del medio.

Basándose en estos resultados, se puede determinar que las BOSCHIBAs **BSB-OMe**, **BSB-NEt**, **BSB-tBu** y **BSB-Nap** son excelentes candidatos para ser usados como fluoróforos en diversos materiales, así mismo, se pueden considerar como materiales multi-respuesta debido a la sensibilidad que presenta a estímulos externos, no obstante, las BOSCHIBAs **BSB-OMe** y **BSB-NEt** son compuestos con una potencial aplicación para el desarrollo de dispositivos electrónicos (OLEDs) debido al rendimiento cuántico que presentan siendo 0.27 y 0.55, respectivamente.

Hasta este momento se han desarrollado 2 nuevas sondas celulares fluorescentes derivadas del colesterol utilizando como fluoróforo las BOSCHIBAs **BSB-OMe** y **BSB-Nap** mediante metodologías sintéticas sencillas y técnicas de purificación prácticas. La obtención de las sondas se confirmó mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^{1}H, ^{13}C y ^{11}B. No obstante, la producción de una manera eficiente de la sonda celular **col-BSB-NEt** y **col-BSB-tBu** sigue siendo un reto, esto a causa de su alta solubilidad en disolventes no polares por lo que su purificación se dificulta. Evidentemente, las propiedades fotofísicas de las sondas celulares no se ven afectadas con respecto al fluoróforo empleado, ya que no hay variación notable en cuanto al desplazamiento e intensidad de las bandas de absorción y emisión. Por otra parte, las sondas **col-BSB-Nap** y **col-BSB-OMe** presentan una muy baja citotoxicidad determinando una alta compatibilidad celular, esta característica es atribuida a su principal componente; el colesterol.

7. REFERENCIAS

[1] Nature, «"Materials chemistry definition",» [En línea]. Available: https://www.nature.com/subjects/materials-chemistry. [Último acceso: Enero 2020].

[2] L. V. Interrante, «"Material Chemistry-A New Subdiscipline?",» *MRS Bulletin,* vol. 4, January 1992.

[3] H. R. Allcock, de *Introduction to Materials Chemistry,* 2 ed., WILEY-VCH, 2019, pp. 111-295.

[4] F. Flory, L. Escoubas y G. Berginc, «Optical properties of nanostructured materials: a review,» *J. of Nanophotonics,* vol. 5, nº 1, p. 052502, 2011.

[5] S. W. Thomas, G. D. Joly y T. M. Swager, «Chemical Sensors Based on Amplifying Fluorescent Conjugated Polymers,» *Chem. Rev.,* vol. 107, nº 4, pp. 1339-1386, 2007.

[6] N. A. M. Pereira y T. M. V. D. Pinho e Melo, «Recent Developments in the Synthesis of Dipyrromethanes. A Review,» *Organic Preparations and Procedures* , vol. 46, pp. 183-213, 2014.

[7] Z. Cheng, E. Kuru, A. Sachdeva y M. Vendrell, «Fluorescent amino acids as versatile building blocks for chemical biology,» *Nature Reviews Chemistry,* vol. 4, pp. 275-290, 2020.

[8] A. Rammohan, . J. Satyanarayana Reddy, G. Sravya, C. Narasimha Rao y G. V. Zyryanov, «Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review,» *Environmental chemistry letters* , vol. 18, nº 2, pp. 433-458, 2020.

[9] M. Somashekar y A. Chetana, «A Review on Anthracene and Its Derivatives,» *Journal of Chemistry,* vol. 5, nº 3, pp. 45-52, 2016.

[10] D. Udhayakumari y V. Inbaraj, «A Review on Schiff Base Fluorescent Chemosensors for Cell Imaging Applications,» *J. Fluoresc,* vol. 30, pp. 1203-1223, 2020.

[11] J. Berrones-Reyes, B. M. Muñoz-Flores, A. Gómez-Treviño, M. A. Treto-Suárez, D. Páez-Hernández, E. Schott, X. Zarate y V. M. Jiménez-Pérez, «Novel fluorescent Schiff bases as Al3+ sensors with high selectivity and sensitivity, and their bioimaging applications,» *Mater. Chem. Phys.,* vol. 233, nº 15, pp. 89-101, 2019.

[12] F. Kolcu, D. Erdener y I. Kaya, «A Schiff base based on triphenylamine and thiophene moieties as a fluorescent sensor for Cr (III) ions: Synthesis, characterization and fluorescent applications,» *Inorg. Chim. Acta,* vol. 509, nº

6, p. 119676, 2020.

[13] K. Zhang, T. -T. Chen, C. -C. Feng, Y. -J. Shen, Z. -R. Yang y C. Zhu, «Luminescent Sm(III) complex bearing dynamic imine bonds as a multi-responsive fluorescent sensor for F− and PO43− anions together with Zn2+ cation in water samples,» *Analytica Chim. Acta,* vol. 1118, nº 29, pp. 52-62, 2020.

[14] O. V. Kharissova, . B. . I. Kharisov, C. M. Oliva González, Y. Peña Méndez y I. López, «Greener synthesis of chemical compounds and materials,» *Royal Society Open Science,* vol. 6, nº 11, p. 191378, 2019.

[15] A. U. Acuña y F. Amat-Guerri, «Early History of Solution Fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes,» de *Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems,* Springer, 2007, pp. 3-20.

[16] O. Shimomura, F. H. Johnson y Y. Saiga, «Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea,» *Journal of Cellular and Comparative Physiology,* vol. 59, nº 3, pp. 223-239, 1962.

[17] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, 2006.

[18] J. R. Lakowicz., «Fluorophores,» de *Principles of Fluorescence Spectroscopy,* Boston, MA., Springer, 1999, pp. 63-93.

[19] H. Schiff, «Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen,» *Justus Liebigs Annalen der Chemie,* vol. 131, nº 1, pp. 118-119, 1864.

[20] K. C. Gupta y A. K. Sutar, «Catalytic Activities of Schiff Base Transition Metal Complexes,» *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 252, nº 12-14, pp. 1420-1450, 2008.

[21] P. Fang, W. Xia, y. Zhou, Z. Ai, W. Yin, M. Xia, J. Yu, R. -A. Chi y Q. Yue, «Ion-imprinted mesoporous silica/magnetic graphene oxide composites functionalized with Schiff-base for selective Cu(II) capture and simultaneously being transformed as a robust heterogeneous catalyst,» *Chemical Engineering Journal,* vol. 385, p. 123847, 2020.

[22] N. Deshwar Kushwaha, B. Kushwaha, R. Karpoormath, M. Cleopus Mahlalela y S. Raosaheb Shinde, «One-Pot, Multicomponent, Diastereoselective, Green Synthesis of 3,4-Dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine Analogues,» *J. Org. Chem.* , vol. 85, nº 12, pp. 8221-8229, 2020.

[23] J. Ru Hwu, A. Roy, A. Panja, W. -C. Huang, Y. -C. Hu, K. -T. Tan, C. -C. Lin, K. -C. Hwang, M. -H. Hsu y S. -C. Tsay, «Domino Reaction for the Synthesis of Polysubstituted Pyrroles and Lamellarin R,» *J. Org. Chem.,* vol. 85, nº 15, pp. 9835-9843, 2020.

[24] S. Di Bella, «Lewis acidic zinc(ii) salen-type Schiff-base complexes: sensing properties and responsive nanostructures,» *Dalton Trans.*, vol. 50, pp. 6050-6063, 2021.

[25] S. K. Panja, «J-type aggregation and thermochromic behavior of a schiff base in solution: Role of keto-enol tautomerization,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 229, p. 117860, 2020.

[26] P. Yadav, A. K. Singh, C. Upadhyay y V. P. Singh, «Photoluminescence behaviour of a stimuli responsive Schiff base: Aggregation induced emission and piezochromism,» *Dyes and Pigments*, vol. 160, pp. 731-739, 2019.

[27] C. Hamciuc, M. Homocianu y E. Hamciuc, «Azomethines containing 1,3,4-oxadiazole ring: Synthesis, photophysical properties, halochromism and metal ions sensing responses,» *Journal of Molecular Liquids*, vol. 336, p. 116268, 2021.

[28] H. Xiao, K. Chen, D. Cui, N. Jiang, G. Yin, J. Wang y R. Wang, «Two novel aggregation-induced emission active coumarin-based Schiff bases and their applications in cell imaging,» *New J. Chem.*, vol. 38, pp. 2386-2393, 2014.

[29] T. Han, X. Gu, . J. . W. Y. Lam, . A. C. S. Leung, R. . T. K. Kwok, T. Han, B. Tong, J. Shi, . Y. Dong y B. Zhong Tang, «Diaminomaleonitrile-based Schiff bases: aggregation-enhanced emission, red fluorescence, mechanochromism and bioimaging applications,» *J. Mater. Chem. C*, vol. 4, pp. 10430-10434, 2016.

[30] X. Gan, G. Liu, M. Chu, W. Xi, Z. Ren, . X. Zhang, Y. Tian y H. Zhou , «Intermolecular interactions boost aggregation induced emission in carbazole Schiff base derivatives,» *Org. Biomol. Chem.*, vol. 15, pp. 256-264, 2017.

[31] X. Zhang, J. Shi, G. Shen , F. Gou, J. Cheng, X. Zhou y H. Xiang , «Non-conjugated fluorescent molecular cages of salicylaldehyde-based tri-Schiff bases: AIE, enantiomers, mechanochromism, anion hosts/probes, and cell imaging properties,» *Mater. Chem. Front.*, vol. 1, pp. 1041-1050, 2017.

[32] Q. Weng, J. Yi, X. Chen, D. Luo, . Y. Wang, W. Sun, J. Kang y . Z. Han, «Controllable Synthesis and Biological Application of Schiff Bases from d-Glucosamine and Terephthalaldehyde,» *ACS Omega*, vol. 5, nº 38, pp. 24864-24870, 2020.

[33] M. M. Corona-López, V. . M. Jiménez Pérez, R. Chan-Navarro, M. Ibarra-Rodríguez, H. R. Dias, A. Chávez-Reyes y B. M. Munoz-Flores, «Synthesis, characterization, photophysical properties of new fluorescent boron Schiff bases (BOSCHIBAs) and their application as cytoplasm staining dyes in vitro,» *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 12, nº 1, pp. 64-73, 2017.

[34] Y. Cao, J. K. Nagle, M. O. Wolf y B. O. Patrick, «Tunable Luminescence of Bithiophene-Based Flexible Lewis Pairs,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, nº 15,

pp. 4888-4891, 2015.

[35] J. C. Collings, S. -Y. Poon, C. Le Droumaguet, M. Charlot, C. Katan, L. -O. Pålsson, A. Beeby , J. A. Mosely , H. Martin Kaiser, D. Kaufmann, W. -Y. Wong, M. Blanchard-Desce y T. B. Marder, «The Synthesis and One- and Two-Photon Optical Properties of Dipolar, Quadrupolar and Octupolar Donor–Acceptor Molecules Containing Dimesitylboryl Groups,» *Chemistry A European Journal,* vol. 15, nº 1, pp. 198-208, 2008.

[36] C. C. Vidyasagar, B. M. Muñoz Flores, V. M. Jiménez-Pérez y P. M. Gurubasavaraj, «Recent advances in boron-based schiff base derivatives for organic light-emitting diodes,» *Materialstoday Chemistry,* vol. 11, pp. 133-155, 2019.

[37] C. C. Jiménez, A. Enríquez-Cabrera, O. González-Antonio, J. Ordóñez-Hernández, P. G. Lacroix, P. Labra-Vázquez, N. Farfán y R. Santillan, «State of the Art of Boron and Tin Complexes in Second- and Third-Order Nonlinear Optics,» *Inorganics,* vol. 6, nº 4, p. 131, 2018.

[38] V. Lakshmi y M. Ravikanth, «Boron-dipyrromethene based multi-anionic sensor and a specific cationic sensor for Fe3+,» *J. Mater. Chem. C,* vol. 2, pp. 5576-5586, 2014.

[39] J. A. Lara-Cerón, V. M. Jiménez-Pérez, L. Xochicale-Santana, M. E. Ochoa, A. Chavez-Reyes y B. M. Muñoz-Flores, «Boron Schiff bases derived from α-amino acids as nucleoli/cytoplasm cell-staining fluorescent probes: In vitro,» *RSC Advances,* vol. 10, nº 53, pp. 31748-31757, 2020.

[40] Z. Guoqing , C. Jianbin , S. J. Payne, S. E. Kooi, J. N. Demas y s. L. CasFraser, «Multi-Emissive Difluoroboron Dibenzoylmethane Polylactide Exhibiting Intense Fluorescence and Oxygen-Sensitive Room-Temperature Phosphorescence,» *J. Am. Chem. Soc.,* vol. 129, nº 50, p. 15728, 2007.

[41] S. Mukherjee y P. Thilagar, «Stimuli and shape responsive 'boron-containing' luminescent organic materials,» *J. Mater. Chem. C,* vol. 4, pp. 2647-2662, 2016.

[42] F. A. Carey, Organic Chemistry, Sixth ed., New York, NY: McGraw-Hill, 2006.

[43] A. O. Gerasov, K. . V. Zyabrev, M. . P. Shandura y Y. P. Kovtun, «The structural criteria of hydrolytic stability in series of dioxaborine polymethine dyes,» *Dyes and Pigments,* vol. 89, nº 1, pp. 76-85, 2011.

[44] C. Duan, Y. Zhou, G. -G. Shan, Y. Chen, W. Zhao, D. Yuan, L. Zeng, X. Huang y G. Niu, «Bright solid-state red-emissive BODIPYs: facile synthesis and their high-contrast mechanochromic properties,» *J. Mater. Chem. C,* vol. 7, pp. 3471-3478, 2019.

[45] Y. Zhang, . K. -H. Song, S. Tang, L. Ravelo, J. Cusido, C. Sun, H. F. Zhang y F. M. Raymo, «Far-Red Photoactivatable BODIPYs for the Super-Resolution Imaging of Live Cells,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, nº 40, p. 12741–12745, 2018.

[46] A. Tabero, F. García-Garrido, A. Prieto-Castañeda, E. Palao, A. . R. Agarrabeitia, I. García-Moreno, A. Villanueva, S. de la Moya y M. J. Ortiz, «BODIPYs revealing lipid droplets as valuable targets for photodynamic theragnosis,» *Chem. Commun.*, vol. 56, pp. 940-943, 2020.

[47] A. Vyšniauskas, B. Cornell, P. S. Sherin, K. Maleckaitė, M. Kubánková, M. A. Izquierdo, T. Truc Vu, Y. . A. Volkova, E. M. Budynina, C. Molteni y M. . K. Kuimova, «Cyclopropyl Substituents Transform the Viscosity-Sensitive BODIPY Molecular Rotor into a Temperature Sensor,» *ACS Sens.*, vol. 6, nº 6, p. 2158–2167, 2021.

[48] P. Ashokkumar, . A. Hoskere Ashoka, M. Collot, . A. Das y A. S. Klymchenko, «A fluorogenic BODIPY molecular rotor as an apoptosis marker,» *Chem. Commun.*, vol. 55, pp. 6902-6905, 2019.

[49] J. -Y. Zhu, . C. -X. Li, . P. -Z. Chen, Z. Ma, B. Zou, L. -Y. Niu, G. Cui y Q. -Z. Yang, «A polymorphic fluorescent material with strong solid state emission and multi-stimuli-responsive properties,» *Mater. Chem. Front.*, vol. 4, pp. 176-181, 2020.

[50] V. Polishchuk, A. Kulinich, E. Rusanov y M. Shandura, «Highly Fluorescent Dianionic Polymethines with a 1,3,2-Dioxaborine Core,» *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 86, nº 7, pp. 5227-5233, 2021.

[51] A. Hoskere Ashoka, P. Ashokkumar, Y. P. Kovtun y A. S. Klymchenko, «Solvatochromic Near-Infrared Probe for Polarity Mapping of,» *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 10, pp. 2414-2421, 2019.

[52] H. Gao, D. Xu, Y. Wang, C. Zhang, Y. Yang, X. Liu, A. Han y Y. Wang, «Aggregation-induced emission and mechanofluorochromism of tetraphenylbutadiene modified β-ketoiminate boron complexes,» *Dyes and Pigments*, vol. 150, pp. 165-173, 2018.

[53] M. Rajeshirke, A. B. Tathe y . N. Sekar, «Viscosity sensitive fluorescent coumarin-carbazole chalcones and their BF2 complexes containing carboxylic acid – Synthesis and solvatochromism,» *Journal of Molecular Liquids*, vol. 264, pp. 358-366, 2018.

[54] M. Ibarra-Rodríguez, B. M. Muñoz-Flores, . H. V. Rasika Dias, M. Sánchez, . A. Gomez-Treviño, R. Santillan, N. Farfán y V. M. Jiménez-Pérez, «Fluorescent Molecular Rotors of Organoboron Compounds from Schiff Bases: Synthesis, Viscosity, Reversible Thermochromism, Cytotoxicity, and Bioimaging Cells,» *J. Org. Chem.*, vol. 82, nº 5, p. 2375–2385, 2017.

[55] M. Ibarra-Rodríguez, B. M. Muñoz-Flores, A. Gómez-Treviño, R. Chan-Navarro, J. C. Berrones-Reyes, A. Chávez-Reyes, H. V. Rasika Dias, M. Sánchez Vázquez y V. M. Jiménez-Pérez, «Organoboron Schiff bases as cell-staining fluorescent probes: Synthesis, Chemio-photophysical characterization, DFT, and X-ray structures,» *Applied Organometallic Chemistry,* vol. 33, nº 4, p. e4718, 2019.

[56] J. A. Lara-Cerón, . V. M. Jiménez Pérez, L. Xochicale-Santana, . M. E. Ochoa, . A. Chávez-Reyes y B. . M. Muñoz-Flores, «Boron Schiff bases derived from α-amino acids as nucleoli/cytoplasm cell-staining fluorescent probes in vitro,» *RSC advances,* vol. 10, nº 53, pp. 31748-31757, 2020.

[57] B. A. Jee, J. -H. Choi, H. Rhee, S. Yoon, S. M. Kwon, H. J. Nahm, J. E. Yoo, Y. Jeon, G. H. Choi, H. G. Woo y Y. Nyun Park, «Dynamics of Genomic, Epigenomic, and Transcriptomic Aberrations during Stepwise Hepatocarcinogenesis,» *Cancer Res* , vol. 79, nº 21, p. 5500–5512, 2019.

[58] R. Luque y R. S. Varma, «The green synthesis and environmental applications of nanomaterials,» de *Sustainable Preparation of Metal Nanoparticles: Methods and Applications*, Royal Society of Chemistry, 2012, pp. 108-423.

[59] S. Kilaru, M. Schuster, W. Ma y G. Steinberg, «Fluorescent markers of various organelles in the wheat pathogen Zymoseptoria tritici,» *Fungal Genetics and Biology,* vol. 105, pp. 16-27, 2017.

[60] X. Wang, H. Chang, J. Xie, B. Zhao, B. Liu, S. Xu, W. Pei, N. Ren, L. Huang y W. Huang, «Recent developments in lanthanide-based luminescent probes,» *Coordination Chemistry Reviews,* Vols. %1 de %2273-274, pp. 201-212, 2014.

[61] K. Z., V. Gabrisova y L. Kucerova, «Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment,» *Biomed Pharmacother.,* vol. 68, nº 8, pp. 911-916, 2014.

[62] T. Miyata, T. Yoshimatsu, T. So, T. Oyama, H. Uramoto, T. Osaki, R. Nakanishi y F. Tanaka, «Cancer stem cell markers in lung cancer,» *Personalized Medicine Universe,* vol. 4, pp. 40-45, 2015.

[63] F. C. Braga, A. N. Prasad, R. da Silva Gomes, V. A. do Nascimento, S. L. Oliveira, A. R. Caires, D. P. de Lima y A. Beatriz, «Design, synthesis and fluorescence analysis of potential fluorescent markers based on cardanol and glycerol,» *Dyes and Pigments,* vol. 141, pp. 235-244, 2017.

[64] J. Karpenko, Y. Niko, V. P. Yakubovskyi, A. O. Gerasov, D. Bonnet, . Y. P. Kovtun y A. . S. Klymchenko, «Push–pull dioxaborine as fluorescent molecular rotor: far-red fluorogenic probe for ligand–receptor interactions,» *J. Mater. Chem. C,* vol. 4, pp. 3002-3009, 2016.

[65] C. Y. Y. Yu, W. Zhang, R. T. K. Kwok, C. . W. T. Leung, J. W. Y. Lam y B. Zhong Tang, «A photostable AIEgen for nucleolus and mitochondria imaging

with organelle-specific emission,» *J. Mater. Chem. B,* vol. 4, pp. 2614-2619, 2016.

[66] M. Gao, Q. Hu, G. Feng, B. Zhong Tang y B. Liu, «A fluorescent light-up probe with "AIE + ESIPT" characteristics for specific detection of lysosomal esterase,» *J. Mater. Chem. B,* vol. 2, pp. 3438-3442, 2014.

[67] E. Wang, . E. Zhao, Y. Hong, J. W. Y. Lam y B. Zhong Tang, «A highly selective AIE fluorogen for lipid droplet imaging in live cells and green algae,» *J. Mater. Chem. B,* vol. 2, pp. 2013-2019, 2014.

[68] D. L. Nelson y M. M. Cox, Principios de Bioquímica-Lehninger, New York: Omega, 2014.

[69] S. Kilaru, M. Schuster, W. Ma y G. Steinberg, «Fluorescent markers of various organelles in the wheat pathogen Zymoseptoria tritici,» *Fungal Genetics and Biology,* vol. 105, pp. 16-27, 2017.

[70] S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi y P. Marchetti, «Multilayer Nanoencapsulation. New Approach for Immune Protection of Human Pancreatic Islets,» *Nano Lett.* , vol. 6, nº 9, p. 1933–1939, 2006.

[71] D. L. Elbert, C. B. Herbert y J. A. Hubbell, «Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces,» *Langmuir* , vol. 15, nº 16, p. 5355–5362, 1999.

[72] Y. Teramura y H. Iwata, «Cell surface modification with polymers for biomedical studies,» *Soft Matter,* vol. 6, pp. 1081-1091, 2010.

[73] A. S. Klymchenko y R. Kreder, «Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells,» *Chemistry & Biology,* vol. 21, nº 1, pp. 97-113, 2014.

[74] D. Yun Lee, J. Hee Nam y Y. Byun, «Functional and histological evaluation of transplanted pancreatic islets immunoprotected by PEGylation and cyclosporine for 1 year,» *Biomaterials,* vol. 28, nº 11, pp. 1957-1966, 2007.

[75] C. L. Stabler, X. -L. Sun, W. Cui, J. T. Wilson, C. A. Haller y E. L. Chaikof, «Surface Re-engineering of Pancreatic Islets with Recombinant azido-Thrombomodulin,» *Bioconjugate Chem.* , vol. 18, nº 6, p. 1713–1715, 2007.

[76] H. Y. Wang, X. W. Hua, H. R. Jia, P. Liu, G. Ning, Z. Chen y F. G. Wu, «Imaging plasma membranes without cellular internalization: multisite membrane anchoring reagents based on glycol chitosan derivatives,» *J. Mater. Chem. B,* vol. 3, pp. 6165-6173, 2015.

[77] X. Chen, X. Zhang, H. -Y. Wang, . Z. Chen y F. -G. Wu, «Subcellular Fate of a Fluorescent Cholesterol-Poly(ethylene glycol) Conjugate: An Excellent Plasma Membrane Imaging Reagent,» *Langmuir,* vol. 32, nº 39, p. 10126–10135, 2016.

[78] D. I. Danylchuk, E. Sezgin, . P. Chabert y A. S. Klymchenko, «Redesigning Solvatochromic Probe Laurdan for Imaging Lipid Order Selectively in Cell Plasma Membranes,» *Anal. Chem.*, vol. 92, nº 21, p. 14798–14805, 2020.

[79] X. Zhang, C. Wang, L. Jin, Z. Han y Y. Xiao, «Photostable Bipolar Fluorescent Probe for Video Tracking Plasma Membranes Related Cellular Processes,» *ACS Appl. Mater. Interfaces,* vol. 6, nº 15, p. 12372–12379, 2014.

[80] W. Hong-Yin, H. Xian-Wu, J. Hao-Ran, L. Peidang, G. Ning, C. Zhan y W. Fu-Gen, «Enhanced cell membrane enrichment and subsequent cellular internalization of quantum dots via cell surface engineering: illuminating plasma membranes with quantum dots,» *J. Mater. Chem. B,* vol. 4, pp. 834-843, 2016.

[81] Y. -N. Wang, B. Xu, L. -H. Qiu, Y. -J. Xu, R. Sun y J. -F. Ge, «A series of novel cell membrane fluorescent probes based on oxazolopyridine unit,» *Dyes and Pigments,* vol. 185, p. 108883, 2021.

[82] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow y P. Granger, «NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts: IUPAC Recommendations 2001,» *Solid State Nuclear Magnetic Resonance,* vol. 22, nº 4, pp. 458-483, 2002.

[83] R. Moorthy Appa, J. Lakshmidevi, S. Siva Prasad, B. Muralidhar, B. Ramesh Naidu, M. Narasimhulu y K. Venkateswarlu, «First sonochemical, simple and solvent-free synthesis of chiral tert-butanesulfinimines using silica supported p-toluenesulfonic acid,» *Synthetic Communications,* vol. 49, nº 1, pp. 56-64, 2019.

[84] E. R. Wilson, L. M. Parker, A. Orth, N. Nunn, M. Torelli, O. Shenderova, B. C. Gibson y P. Reineck, «The effect of particle size on nanodiamond fluorescence and colloidal properties in biological media,» *Nanotechnology,* vol. 30, nº 38, p. 385704, 2019.

[85] P. K. Sharma, M. H. Jilavi, R. Nass y H. Schmidt, «Tailoring the particle size from μm→nm scale by using a surface modifier and their size effect on the fluorescence properties of europium doped yttria,» *Journal of Luminescence,* vol. 82, nº 3, pp. 187-193, 1999.

[86] T. Nakamura y S. Hayashi, «Enhancement of Dye Fluorescence by Gold Nanoparticles: Analysis of Particle Size Dependence,» *Japanese Journal of Applied Physics,* vol. 44, p. 6833, 2005.

[87] J. A. Lara Cerón, *Síntesis de compuestos organoboro y su aplicación como rotor molecular,* 2020.

[88] . H. Liangyu, D. Yuai , X. Zhenzhen , Y. Jing , D. Yuping y H. Tianyu , «Stimuli-responsive fluorophores with aggregationinduced emission: implication for dual-channel,» *J. Mater. Chem. C,* vol. 4, nº 23, pp. 5334-5341,

2016.

[89] . H. Tianyu , W. Wei , Y. Jing , D. Yuai , . L. Yaping, H. Liangyu y D. Yuping , «Solvent-assistant self-assembly of an AIE+TICT fluorescent Schiff base,» *Talanta,* vol. 150, pp. 104-112, 2016.

[90] C. Hansch, A. Leo y R. W. Taft, «A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters,» *Chem. Rev.,* vol. 91, nº 2, pp. 165-195, 1991.

[91] C. Liu, . X. Liu, X. Ge, Q. Wang, L. Zhang, W. Shang, . Y. Zhang, X. A. Yuan, L. Tian, Z. Liu y J. You , «Fluorescent iridium(iii) coumarin-salicylaldehyde Schiff base compounds as lysosome-targeted antitumor agents,» *Dalton Trans.,* vol. 49, pp. 5988-5998, 2020.

[92] D. F. Eaton, «Reference materials for fluorescence measurement,» *Pure Appl. Chem.,* vol. 60, nº 7, pp. 1107-1114, 1988.

[93] . B. Chiara, C. Mahdi , J. Cabrera-González, M. Blangetti, C. Lombardi, A. Deagostino, C. Viñas, N. Gaztelumendi, C. Nogués, R. Nuñez y C. Prandi, «Carborane-BODIPY Dyads: New Photoluminescent Materials,» *Chem. Eur. J.* , vol. 24, pp. 15622-15630, 2018.

[94] N. Gupta, . S. Imam Reja, V. Bhalla, . M. Gupta, G. Kaur y M. Kumar, «A bodipy based fluorescent probe for evaluating and identifying cancer, normal and apoptotic C6 cells on the basis of changes in intracellular viscosity,» *J. Mater. Chem.,* vol. 4, nº 11, pp. 1968-1977, 2016.

[95] M. Ibarra-Rodríguez, B. M. Muñoz-Flores, A. Gómez-Treviño, R. Chan-Navarro, J. C. Berrones-Reyes, A. Chávez-Reyes, H. V. Rasika Dias, M. Sánchez Vázquez y . V. . M. Jiménez-Pérez, «Organoboron Schiff bases as cell-staining fluorescent probes:Synthesis, Chemio-photophysical characterization, DFT, and X-ray structures,» *Applied organometallic chemistry,* vol. 33, p. e4718, 2019.

[96] A. A. Molina-Paredes, . V. M. Jiménez-Pérez, J. A. Lara-Cerón, I. Moggio, E. Arias, R. Santillán, M. Sánchez, A. Saucedo-Yañez y B. M. Muñoz-Flores, «Fluorescent boron Schiff bases dyes for staining silk fibroin: Green synthesis, structural characterization, DFT, and photophysical properties,» *Appl Organometal Chem.,* vol. 33, p. e4609, 2019.

[97] J. A. Lara-Cerón, V. M. Jimenez Pérez, L. Xochicale-Santana, M. E. Ochoa, A. Chávez-Reyes y B. M. Muñoz-Flores, «Boron Schiff bases derived from a-amino acids as nucleoli/cytoplasm cell-staining fluorescent probes in vitro,» *RSC Advances,* vol. 10, p. 31748, 2020.

[98] M. Ibarra-Rodriguez, . B. M. Muñoz-Flores, . H. V. Rasika Dias, M. Sanchez, A. Gómez-Treviño, . R. Santillan, N. Farfan y V. M. Jimenez-Perez, «Fluorescent molecular rotors (FMRs) of organoboron compounds from Schiff

bases: Synthesis, viscosity, reversible thermochromism, cytotoxicity and bioimaging cells,» *J. Org. Chem.*, vol. 82, nº 5, pp. 2375-2385, 2017.

[99] A. T. Rhys Williams, S. . A. Winfield y J. N. Miller , «Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer,» *Analyst*, vol. 108, pp. 1067-1071, 1983.

[100] J. Ribas Gispert, de *Coordination chemistry*, WILEY-VCH, 209, p. 483.

[101] B. Cohen, C. E. Crespo-Hernándeza y B. Kohler, «Strickler–Berg analysis of excited singlet state dynamics in DNA and RNA nucleosides,» *Faraday Discuss.*, vol. 127, pp. 137-147, 2004.

[102] F. P. Scharer, Dye Laser, Topics in Applied Physics, Berlin-Heidelberg: Spinger-Verlag, 1990.

[103] D. A. Skoog, F. J. Holler y T. A. Nieman, Principles of instrumental analysis, Belmont Calif: Brooks/Cole, 1998.

[104] S. . E. Braslavsky, «Glossary of terms used in photochemistry,» *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, nº 3, pp. 293-465, 2007.

[105] B. Valeur y M. . N. Berberan-Santos, «Structural Effects on Fluorescence Emission,» de *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY-VCH, 2012, pp. 75-107.

[106] N. I. Nijegorodov y W. S. Downey, «The Influence of Planarity and Rigidity on the Absorption and Fluorescence Parameters and Intersystem Crossing Rate Constant in Aromatic Molecules,» *J. Phys. Chem.*, vol. 98, nº 22, pp. 5639-5643, 1994.

[107] F. T. Gemeda , «A Review on Effect of Solvents on Fluorescent Spectra,» *Chemical Science International Journal*, vol. 18, nº 3, pp. 1-12, 2017.

[108] E. J. Bowen y J. Sahu, «The Effect of Temperature on Fluorescence of Solutions,» *J. Phys. Chem.*, vol. 63, nº 1, pp. 4-7, 1959.

[109] M. Voicescu, S. Ionescu y F. Gatea, «Effect of pH on the fluorescence characteristics of some flavones probes,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 123, pp. 303-308, 2014.

[110] J. A. Miller y C. A. Baumann, «The Effect of Oxygen on the Fluorescence of Certain Hydrocarbons,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 65, nº 8, pp. 1540-1546, 1943.

8. ANEXOS

Anexo A

Coeficiente de extinción molar (ε)

Ley de Lambert-Beer (**(Ecuación *1*)**.

$$\boldsymbol{A = \varepsilon \ell c} \quad \textbf{(Ecuación 1)}$$

Donde **A** es la absorbancia, **ε** la absortividad molar (L/mol*cm), $\boldsymbol{\ell}$ longitud de celda de la muestra (cm) y **c** la concentración (mol/L).

Rendimiento cuántico (Φ). Es la relación que hay entre los fotones absorbidos y emitidos de una especie, siendo 1 el valor máximo (**(Ecuación 2)**

$$\Phi = \frac{fotones\ absorbidos}{fotones\ emitidos} \quad \textbf{(Ecuación 2)}$$

El rendimiento cuántico se puede determinar utilizando dos métodos: el método absoluto y el método relativo. Las mediciones absolutas se logran utilizando una esfera integradora. A diferencia de las mediciones relativas estas se logran utilizando el método comparativo, aquí el Φ de una muestra se calcula comparando su intensidad de fluorescencia con otra muestra de Φ conocido (referencia). El método relativo utiliza espectrómetros convencionales y requiere el conocimiento de la absorbancia tanto de la referencia como de la muestra. En el método relativo es muy común utilizar la ecuación desarrollada por Williams (**(Ecuación 3**) [99].

$$\Phi_x = \Phi_R \frac{\lambda_R}{\lambda_x} \frac{E_x}{E_R} \frac{n_x^2}{n_R^2} \quad \textbf{(Ecuación 3)}$$

Donde Φ_R es el rendimiento cuántico de la referencia, λ_R y λ_x son las absorbancias de la referencia y muestra desconocida, respectivamente; E_R y E_x corresponden a la intensidad de emisión y n corresponde a los índices de refracción de los disolventes utilizados en las mediciones espectroscópicas.

Desplazamiento de Stokes. Es el resultado de la diferencia entre las posiciones de banda máxima de los espectros de absorción y emisión de la misma transición electrónica (**(Ecuación 4**) [100].

$$\Delta\bar{v} = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1 * \lambda_2} \quad \textbf{(Ecuación 4)}$$

Donde λ_2 y λ_1 corresponden a las longitudes de onda de emisión y absorción respectivamente.

Así como también el cálculo del **tiempo de vida media** (**(Ecuación 5**) y la **energía del primer estado de transición** (**(Ecuación 6**) [101].

$$\Gamma\ (s^{-1}) \cong 2.88x10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{V})d\bar{V}}{\int \frac{F(\bar{V})d\bar{V}}{V^3}} \int \frac{\varepsilon(\bar{V})d\bar{V}}{\bar{V}} \quad \textbf{(Ecuación 5)}$$

Donde $\varepsilon(\bar{V})$ es el coeficiente de absorción molar, $F(\bar{V})$ corresponde a la distribución energética de los espectros de fluorescencia normalizados y *n* corresponde al coeficiente de refracción del disolvente [102].

$$E_1 - E_2 = hv \qquad \Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad \textbf{(Ecuación 6)}$$

Donde *h* es la constante de Planck, *v* es la frecuencia, *c* la constante de la velocidad de la luz, λ la longitud de onda y E_2 *y* E_1 son las energías del estado final e inicial, respectivament