



SENSORES MOLECULARES FLUORESCENTES

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Biotecnología

Facultad Ciencias de la Salud

ANA DE LA IGLESIA PAZÓ

Curso Académico 2016-17

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE BIO-ORGÁNICA
“ANTONIO GONZÁLEZ”**

Dr. Romen Carrillo Fumero, coordinador del Grupo de Investigación Química Supramolecular y Sistemas Moleculares, adscrito a las Titulaciones de Máster en Biomedicina y Máster en Biotecnología;

CERTIFICO

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “Sensores Moleculares Fluorescentes” ha sido realizado bajo mi supervisión por D^a Ana de la Iglesia Pazó, matriculada en el Máster en Biotecnología, durante el curso académico 2016-2017.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, doy mi consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.

Para que conste, firmo el presente certificado en La Laguna a 2 de septiembre de 2017.



Dr. Romen Carrillo Fumero

RESUMEN

El panorama actual de técnicas disponibles para detectar sustancias implicadas en enfermedades requiere de un nuevo enfoque, que permita la monitorización de las moléculas en el medio biológico donde habitan. Es esencial abrir la puerta a métodos que reconozcan específicamente a estas especies, que son de vital importancia para conocer el estado de salud de las células en los organismos, y es necesario lograrlo a un bajo coste.

Los sensores fluorescentes permiten detectar estas moléculas sin interferir en los procesos celulares. En el presente trabajo se ha partido de dos biomarcadores con gran influencia sobre la salud humana, el H₂S y las hidracinas y se han sintetizado químicamente en el laboratorio dos sensores que emiten fluorescencia en presencia de ambas moléculas, respectivamente, además de ser evaluados para su posible aplicación en células. En las pruebas para el sensor de H₂S se ha comprobado que ocurre un proceso distinto al esperado, pero que también aporta fluorescencia. El sensor de hidracina, se comporta de la manera esperada, aunque será necesario realizar algunos cambios sobre su estructura química para optimizar el sensor para su uso en sistemas biológicos.

ABSTRACT

The current scenario of techniques for the detection of substances involved in different diseases requires a new approach, in order to allow monitoring the molecules in their own biological environment. It is essential to pave the way to some methods which are able to recognize specifically those species, being vital as they are to determine the health status of the cells in the organisms. And low cost procedures are compulsory.

Fluorescent sensors allow to detect compounds without interfering in the cellular processes. This work focused on two biomarkers with a great influence in human health: H₂S and hydrazine. Two sensors have been synthesized in the lab, which become fluorescent upon activation by the above-mentioned compounds. Their hypothetical use in cells have been also evaluated. By testing the H₂S sensor, it was clear that the actual photochemical process was different from what was expected, although it also drove to a fluorescent output. Otherwise, the hydrazine sensor undergoes the expected chemical transformation, although it will be necessary to implement some changes on its structure in order to adapt it for an optimal use in biological systems.

ÍNDICE

A.	Introducción.....	1
A.1.	Técnicas de detección de compuestos en seres vivos	1
	Detección de H ₂ S	3
	Detección de hidracinas	6
B.	Hipótesis y Objetivos	8
C.	Material y Métodos.....	9
C.1.1.	Disolventes y reactivos	9
C.1.2.	Técnicas y equipos	9
C.1.2.1.	Resonancia Magnética Nuclear	9
C.1.2.2.	Espectrofotometría Ultravioleta	10
C.1.2.3.	Técnicas cromatográficas	10
C.1.2.3.1.	Cromatografía en capa fina (CCF)	10
C.1.2.3.2.	Cromatografía en columna (CC)	10
C.1.3.	Síntesis química	11
D.	Resultados y Discusión.....	14
	Aproximaciones hacia un Sensor Fluorescente para H ₂ S	14
	Aproximaciones hacia un Sensor Fluorescente para NH ₂ NH ₂	20
E.	Conclusiones.....	24
F.	Bibliografía.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS*

CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
AIE	Emisión Inducida por Agregación
°C	Grados Celsius
Hz	Hertzio(s)
λ [nm]	Longitud de onda en nanómetros
®	Marca Registrada
Mhz	Megahertzio(s)
MeOH	Metanol
mM	milimolar
nm	Nanómetro(s)
ppm	Parte(s) por millón
¹ H	Protón de Hidrógeno
¹ H NMR	Resonancia Magnética Nuclear de protón
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
ESIPT	Tranferencia de Protón Intramolecular en el Estado Excitado

*Las abreviaturas de un solo uso están especificadas a lo largo de la memoria.

A. Introducción

A.1. Técnicas de detección de compuestos en seres vivos

Numerosas enfermedades muestran su existencia mediante el exceso de un cierto compuesto o la disminución de los niveles de algún metabolito. Por lo tanto, el hecho de poder analizar y detectar un único compuesto dentro de la compleja mezcla que es el interior de la célula, es tremendamente importante. Ante esto, aparece la posibilidad de hacerlo de una forma eficiente, económica y no invasiva, utilizando sensores fluorescentes moleculares. Estos sensores se pueden diseñar para permanecer inactivos, sin fluorescencia, hasta entrar en contacto con la molécula que queremos detectar, es entonces cuando se transforma en un compuesto fluorescente.

Detectar cambios microscópicos a nivel celular y/o molecular que pueden ser origen de una enfermedad permite identificarla antes de que ésta se desarrolle, contribuyendo a la mejora del diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico de enfermedades, acercándonos a la consecución de la medicina personalizada.

Actualmente, se emplean para este fin técnicas englobadas en la Medicina Nuclear, que utilizan sondas radiactivas, como por ejemplo Rayos X (con radiación de tipo electromagnética), TAC (Tomografía Axial Computerizada), SPECT (Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales) o PET (Tomografía por Emisión de Positrones). Sin embargo, éstas poseen una baja resolución espacial,¹ resultando muy complejo identificar estructuras.

Por ello, ha surgido la investigación centrada en sondas no radiactivas, con un mayor potencial para el estudio pre-clínico, mayor sencillez y menor coste.² Éste es el caso de las sondas de fluorescencia, basadas en la emisión de fotones en forma de luz por parte de una sustancia al absorber energía. Estas técnicas presentan una alta resolución temporal y gran sensibilidad, además de ofrecer muchas posibilidades a la hora de reconocer un único analito.

También las técnicas de detección de este tipo de sondas, como son el microscopio confocal, el multifotón y el de epifluorescencia tienen un amplio y consolidado uso.

De hecho, recientes estudios³ indican su empleo para determinar enzimas, esteroides, vitaminas y demás sustancias orgánicas y bioquímicas, siendo esencial su

desarrollo en el campo de la bioquímica, análisis de productos alimentarios, análisis de fármacos, muestras clínicas y productos naturales.

El punto de partida en el diseño de estos sensores es que tengan una interacción bioortogonal con el metabolito que se quiera analizar, sin interferir en las reacciones químicas propias de las células, tejidos y organismos, y generando sólo productos inertes o sin toxicidad. De hecho, el descubrimiento de una reacción sólida que llegue a un encuentro entre bioortogonalidad y quimioselectividad para detectar especies químicas es un reto considerable, pero tremendamente fructífero, ya que en el entorno biológico puede ser utilizado para el desarrollo de una amplia variedad de sondas basadas en dicho mecanismo.⁴

A la complejidad de encontrar este tipo de reacciones se suma la de encontrar sondas que proporcionen información útil, para lo que deben cumplir los siguientes criterios:¹

- Alta afinidad y especificidad por el analito (o diana biológica) con el que interactúan, para poder conseguir una imagen molecular de buena calidad.
- Atravesar las barreras que supone el medio celular, cumpliendo los criterios de biocompatibilidad, sensibilidad y facilidad de transporte.
- Tener una respuesta reconocida por sistemas de detección sensibles y rápidos para obtener una imagen con buena resolución.

Por otra parte, las sondas de fluorescencia acoplan en su estructura el grupo funcional que reacciona selectivamente frente al analito con un fluoróforo, son estructuras *fluorogénicas*.⁵ De esta forma tenemos un pro-fluoróforo bloqueado con un grupo protector que en contacto con el analito libera al fluoróforo, la molécula que dotada de fluorescencia.

Existen varios “colorantes” fluorescentes que se utilizan como plataformas base para desencadenar reacciones que emiten fluorescencia, con diferentes estructuras y colores de emisión.⁶ Un buen fluoróforo se caracteriza por:^{3,4,7}

- Gran desplazamiento de Stokes. Para ello sus espectros de excitación y emisión deben ser estrechos y bien separados. Esto evita el fenómeno de autoabsorción, que anula la fluorescencia.
- Elevada profundidad de penetración. Este fenómeno aumenta a menor absorción y dispersión de la luz. A su vez, éstas disminuyen al aumentar la longitud

de onda. Por ello, las investigaciones se centran en buscar sustancias cuyo espectro de absorción y emisión esté en el rango del infrarrojo cercano (NIR, *Near Infra-Red*), en torno a los 700-900nm, ya que la penetración en longitudes de onda de la luz visible (<700nm) es muy baja (del orden de milímetros), llegando sólo a tejidos superficiales o siendo absorbida en parte por la hemoglobina y la mioglobina, agua o lípidos, lo que dificulta la cuantificación.

- Elevada eficiencia cuántica (siendo 1 el valor máximo), que hace referencia a la relación entre la energía emitida respecto a la absorbida por la molécula.
- Elevado coeficiente de extinción molar, que es la capacidad para absorber la mayor cantidad de energía al ser excitado a la mayor longitud de onda. Esto proporciona a la sonda una mayor intensidad de fluorescencia y facilidad de detección.
- Estabilidad y resistencia a la fotooxidación, generada por la formación de radicales libres que deterioran al fluoróforo.

El ambiente químico en el que se encuentran los sensores también afecta a su capacidad fluorescente. La fluorescencia disminuye con el aumento de temperatura o con la disminución de viscosidad del disolvente. El pH también afecta a esta propiedad, siendo distinta la intensidad de emisión para las sustancias en su forma ionizada y no ionizada, y también se modifica en presencia de sustituyentes ácidos y básicos de los anillos aromáticos.^{3, 7} Por tanto, conseguir desarrollar sondas con un fluoróforo que mantenga estas propiedades cuando se libera en el medio celular es un importante desafío.

En base a todo esto, nos propusimos desarrollar dos nuevos sensores fluorescentes, con el fin de una posterior aplicación en células. Los metabolitos escogidos fueron sulfuro de hidrógeno (H_2S) e hidracina (NH_2NH_2), debido a las razones que se exponen a continuación.

I Detección de H_2S

El sulfuro de hidrógeno H_2S es una molécula sobre la que se ha producido un reciente conocimiento sobre sus numerosas funciones en la salud y fisiología humanas, como su reconocimiento como gasotransmisor, que la han convertido en una molécula de señalización biológica clave.⁸

El H₂S es una molécula que forma parte de las especies reactivas del azufre (*Reactive Sulfur Species*, RSS). Estas sustancias nos resultan muy interesantes en los sistemas biológicos, ya que participan en procesos de señalización basados en la reducción-oxidación que intervienen en la salud y enfermedades humanas, como por ejemplo el control de la homeostasis redox intracelular,⁹ y tienen capacidad para oxidarse inhibiendo posteriormente la actividad de ciertas proteínas y enzimas.

También se ha demostrado su implicación en procesos de neurotransmisión,^{9, 10} regulación de la presión sanguínea, angiogénesis y procesos inflamatorios, además de su funcionamiento como inmunomodulador o agente anti-apoptosis.⁹ Además tiene un gran potencial farmacológico, dado que numerosas investigaciones afirman que puede proteger o prevenir contra el daño por isquemia o reperfusión.¹¹ Diversas enfermedades de los sistemas neuronal, circulatorio, gastrointestinal y endocrino también se ven afectadas por la incorrecta regulación de los niveles endógenos de H₂S, incluyendo en concreto algunas como el Alzheimer, el síndrome de Down, la diabetes y la cirrosis.¹²

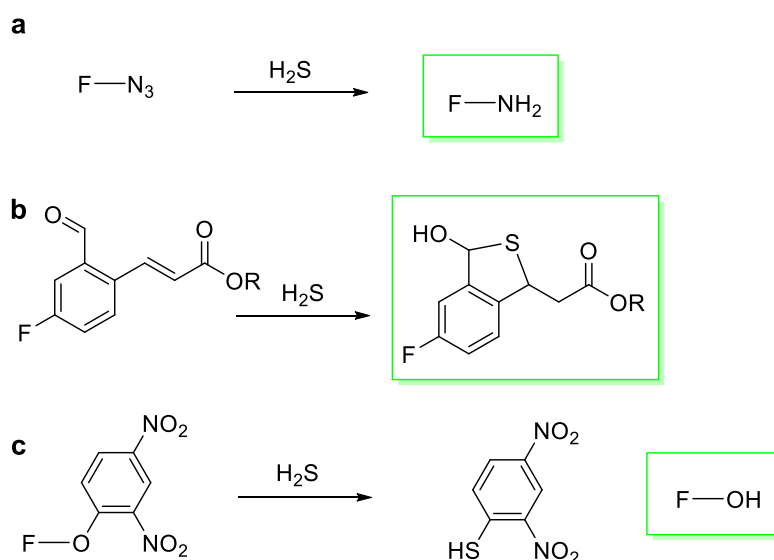
Las propiedades químicas del sulfuro de hidrógeno le permiten interactuar con distintas moléculas presentes en las células. El H₂S es un ácido débil, que se ioniza en solución acuosa, donde se encuentran en equilibrio las especies H₂S/HS⁻/S²⁻. Además, HS⁻ es un nucleófilo que puede reaccionar con electrófilos, por ejemplo, con las especies reactivas de azufre, oxígeno y nitrógeno (*Reactive Sulfur Oxygen and Nitrogen Species*, RSONS), presentes en las células. Los estados protonados y su versatilidad para donar y aceptar electrones aportan propiedades redox (para participar en reacciones de reducción-oxidación), así como propiedades de ligando a metales que le permiten interactuar con centros metálicos o hemoproteínas, mediante unión de enlace o reacciones redox,¹³ alterando las funciones de enzimas o procesos de transcripción sensibles a este tipo de reacciones.

Han sido descritas numerosas técnicas analíticas para la detección y cuantificación de moléculas gaseosas similares al H₂S, entre ellas la cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC), análisis electroquímicos, los detectores de quimioluminiscencia o de colorimetría.⁸ Sin embargo, su aplicación para esta molécula es cuestionable ya que se desconocen muchos de sus mecanismos en medio biológico, y por otra parte, sus propiedades físicas no permiten que estas técnicas sean eficaces.

Además, estos métodos tradicionales suelen requerir la destrucción posterior de los tejidos o lisados celulares, que hacen variar considerablemente las estimaciones de concentración de H_2S y requieren grandes equipos para realizar la cuantificación, por lo que no pueden utilizarse *in vivo*.⁵ También es muy importante realizar las medidas en el lugar de la célula o del tejido donde el H_2S actúa y se sintetiza, ya que las medidas en plasma o suero no son buenos marcadores de su formación ni actividad fisiológica.¹⁴

Debido a la complejidad que supone la detección de H_2S en concreto, las sondas fluorescentes son una alternativa a las técnicas mencionadas.

Para detectar el sulfuro de hidrógeno con sensores fluorescentes, se aprovecha tradicionalmente su poder reductor, que es capaz de transformar azidas en aminas (Esquema 1a),^{5, 15} o bien su poder nucleofílico (Esquema 1b,c).¹⁶ Dentro de esta última característica, cabe destacar la eficiente y selectiva reacción de H_2S con el 2,4-dinitrofenilo, liberando el alcohol correspondiente (Esquema 1c). Esta última reacción es la que aprovecharemos para este trabajo.



Esquema 1. Reacciones para detección de H_2S . a. Reducción de azidas a aminas, b. Adición de Michael, c. Reducción del dinitrofenilo

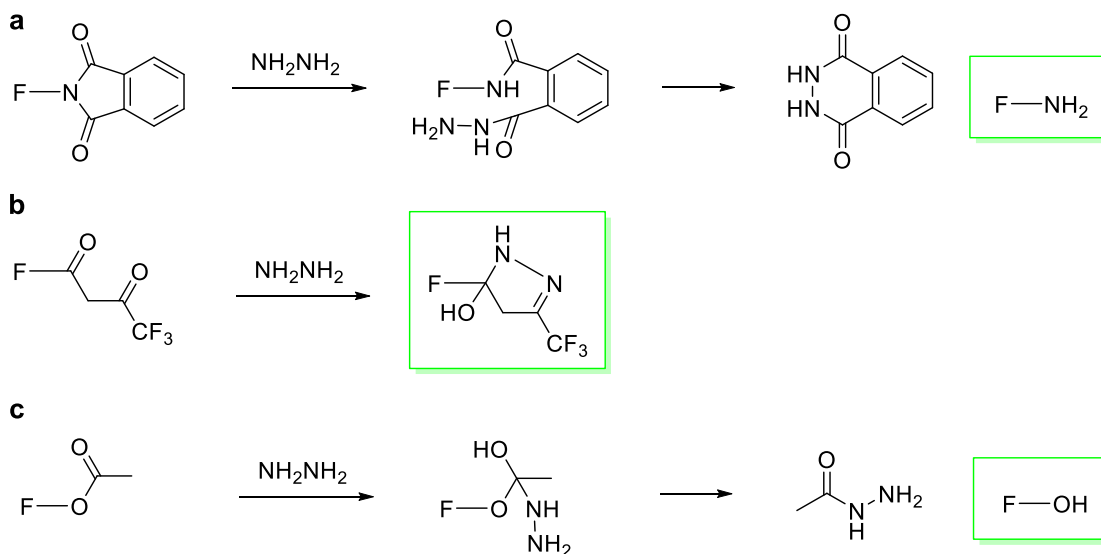
I Detección de hidracinas

La hidracina es un compuesto utilizado por ser muy inflamable y detonante, por ello no nos sorprende que sea también altamente tóxico. De hecho, la OMS (Organización Mundial de la Salud) fija el nivel máximo autorizado en tan sólo 0.01 ppm.¹⁷ Sin embargo, la hidracina posee multitud de aplicaciones interesantes que van desde la industria farmacéutica hasta su utilidad en generación de energía y nuevos materiales,¹⁷ pero sobre todo en la industria química. No solamente eso, sino que incluso se sospecha que la hidracina puede surgir como producto de degradación de algunos fármacos como la isoniazida, un antituberculoso bastante importante si tenemos en cuenta que la OMS incluso la ha incluido en su lista de medicamentos esenciales para un sistema sanitario básico.

Por estos motivos nos pareció interesante intentar crear un sensor fluorescente para detectar dicho compuesto.

Los métodos descritos para la detección de hidrazinas se apoyan naturalmente en técnicas analíticas como la cromatografía, la quimioluminiscencia, la electroquímica, o la volumetría.¹⁸ Sin embargo el estudio mediante sondas supone numerosas ventajas frente a estas técnicas convencionales, como se ha mencionado previamente en este trabajo.

Existen varios precedentes de sensores fluorescentes de hidracina. Como se observa en el Esquema 2, normalmente se aprovecha la tendencia de la hidracina a atacar nucleofílicamente a carbonilos, como por ejemplo imidas (Esquema 2a), cetonas (Esquema 2b) o ésteres aromáticos (Esquema 2c)¹⁸ para desencadenar la fluorescencia. En nuestro caso escogeremos esta última opción, ya que es la más sencilla desde el punto de vista sintético.



Esquema 2. Reacciones para detección de hidracina mediante ataque nucleofílico de a. Imidas, b. Cetonas, c. Ésteres aromáticos.

B. Hipótesis y Objetivos

Las hipótesis en las que hemos basado el trabajo experimental de este Trabajo de Fin de Máster son:

-En el primer caso, utilizaremos un fluoróforo recientemente descrito, donde un hidroxilo se antoja fundamental para la fluorescencia, con lo que suponemos que protegiéndolo, dicha fluorescencia se extinguirá. Además protegeremos dicho OH, con 2,4-nitrofenilo, que es bien sabido que reacciona con sulfuro de hidrógeno, liberando el alcohol, y por lo tanto generando fluorescencia.

-En el segundo caso, crearemos un fluoróforo totalmente nuevo, donde nuevamente un grupo OH es vital para la fluorescencia. En este caso protegeremos dicho grupo con acetato, que se sabe reacciona con la hidracina para liberar el alcohol, y así emitir fluorescencia.

Los objetivos planteados son:

-Se pretende diseñar y elaborar un sensor fluorescente para detectar sulfuro de hidrógeno.

-Se pretende también diseñar y elaborar un sensor fluorescente para detectar hidracina.

-Determinar si existe emisión en los sensores en ausencia de estímulo.

-Medir las propiedades fotoquímicas de los fluoróforos.

-En caso de éxito, hacer medidas en células vivas.

C. Material y Métodos

C.1.1. Disolventes y reactivos

En cuanto a la síntesis química realizada en el laboratorio del Instituto Universitario de Bioorgánica, los reactivos se utilizaron en su forma comercial sin previa purificación, excepto cuando las condiciones de extrema sequedad eran necesarias. Los disolventes se purificaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía,¹⁹ y se emplearon anhidros tras destilación, bajo atmósfera inerte y con un agente desecante adecuado. Tanto el THF como el Et₂O se secaron sobre sodio metálico y se destilaron, utilizando como indicador de humedad benzofenona. El diclorometano (CH₂Cl₂), libre de metanol, se secó y se destiló sobre hidruro cálcico. El DMSO se secó y se destiló sobre hidruro de calcio, almacenándose sobre un tamiz molecular de 4Å. Los reactivos fueron suministrados por la compañía Sigma-Aldrich (Barcelona, España).

C.1.2. Técnicas y equipos

C.1.2.1. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H se realizaron con todos los compuestos purificados. Los espectros fueron realizados en espectrómetros de alta resolución en fase líquida BRUKER®, disponibles en el servicio del IUBO, equipados con gradientes de campo magnético en el eje z y a temperatura ambiente. El modelo utilizado fue: Bruker Avance 500 (500 MHz para ¹H).

Los desplazamientos químicos se indican en unidades ppm (partes por millón) mediante la asignación de TMS en el espectro de ¹H RMN como 0.00 ppm (entre los más usados como el cloroformo a 7.26 ppm y DMSO a 2.50 ppm). Se calcularon los desplazamientos químicos (δ) con respecto al desplazamiento del cloroformo (CHCl₃), y se expresaron en partes por millón (ppm) en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) expresadas en hertzios (Hz).

En cuanto a la multiplicidad de las señales de los espectros de ¹H RMN, los resultados fueron recogidos como la multiplicidad de las señales con las abreviaturas: 's' singlete, 'd' doblete, 't' triplete, 'q' cuádruplete, 'dd' doble doblete, 'm' multiplete y 'br' señal ancha.

C.1.2.2. Espectroscopía de Fluorescencia

Los espectros de emisión y absorción se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55, situado en el Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Microsoft Excel.

C.1.2.3. Técnicas cromatográficas

C.1.2.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La técnica, también conocida como CCF o TLC, del inglés *Thin-Layer Chromatography*, se utiliza para realizar un seguimiento de las reacciones y para determinar el tipo de sistema a utilizar en la cromatografía en columna.

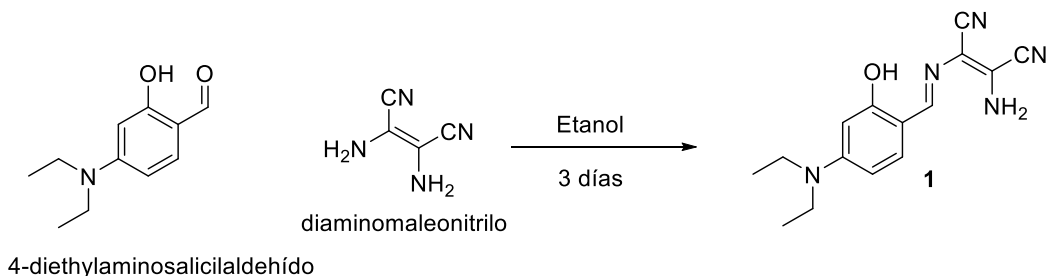
Para ello se empleó placas tipo 60 F254 de la casa MERCK, microcapilares de vidrio con capacidad aproximada de 2 μ L de elaboración propia y una cámara de revelado de CCF. Utilizándose para el revelado varios procedimientos según la situación:

- Exposición a la luz ultravioleta de 254 nm.
- Pulverización con disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en EtOH y calentamiento a 200°C.
- Pulverización con una disolución al 5% de ninhidrina en EtOH y calentamiento a 200°C.
- Impregnación de la placa con I₂.
- Pulverización con el reactivo de Brady.

C.1.2.3.2. Cromatografía en columna (CC)

Se utilizó gel de sílice 60, de tipos G y H, de distintos tamizados (0.015 - 0.04, 0.03 - 0.08 y 0.2 - 0.5 nm) según el caso, suministradas por MERCK®. Para preparar las columnas se sigue el procedimiento general de introducir una capa de arena natural en la columna. Sobre ella se añade una mezcla homogénea de gel de sílice y eluyente a utilizar y se deja compactar por gravedad. Se estabiliza el flujo de eluyente durante 5 min, y finalmente se añade el producto a separar. El eluyente habitual es una mezcla de n-hexano:AcOEt en distintas proporciones, de tal forma que se adecue a la polaridad del producto de interés. También se ha utilizado una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH en distintas proporciones, siempre iguales o inferiores al 10 % en metanol.

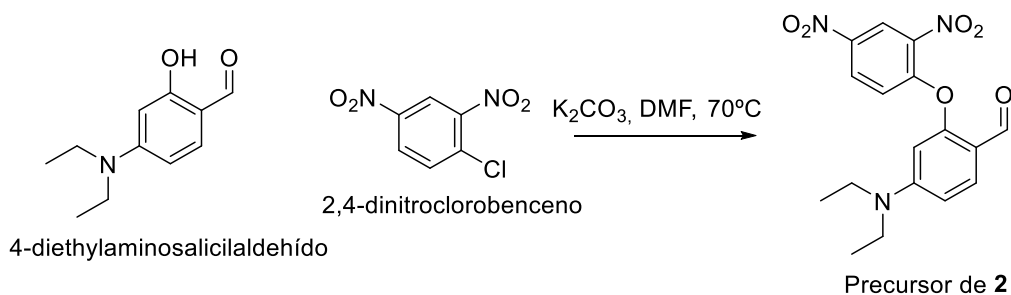
C.1.3. Síntesis química



Esquema 3. Síntesis química del fluoróforo **1**

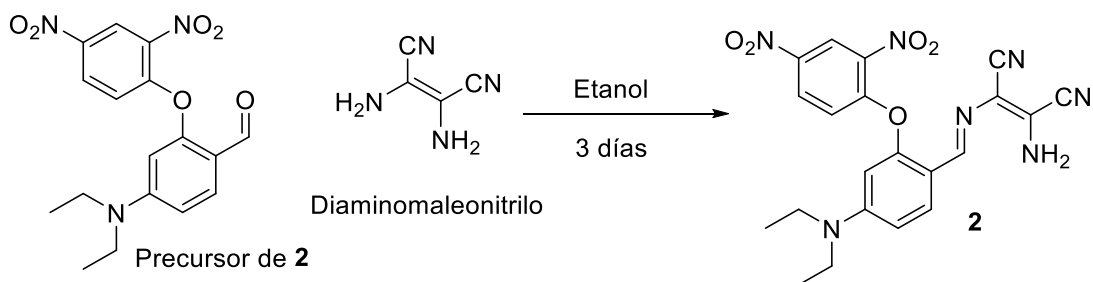
El procedimiento para síntesis del fluoróforo **1** (Esquema 3) es el siguiente: a 50 ml de etanol, se le añade 4-(dietilamino)-salicilaldehído (1.93 g, 10 mmol) y diaminomaleonitrilo (1.08 g, 10 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 3 días y tras ese tiempo se filtra el precipitado marrón que hay en suspensión. Se seca a vacío, para obtener **1** (2.31 g, 8.2 mmol, 82% yield).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, d_6 -DMSO): δ = 10.55(s, 1H), 8.35(s, 1H), 7.60 (d, 1H, J = 12.0 Hz), 7.33(s, 2H), 6.21 (dd, 1H, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 6.10 (d, 1H, J = 4 Hz), 3.39 (dd, 4H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 16.0 Hz), 1.12 (t, 6H).



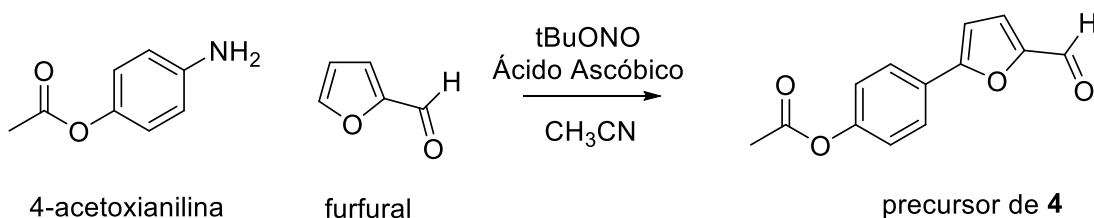
Esquema 4. Síntesis química del precursor de **2**

La síntesis del precursor de **2** (Esquema 4) se realiza disolviendo 4-(dietilamino)-salicilaldehído (195 mg, 1 mmol) y 2,4-dinitroclorobenceno (225 mg, 1.1 mmol) en N,N-dimetilaminoformamida (DMF, 5 ml), tras lo cual se añade carbonato potásico (276 mg, 2 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se añade agua fría (5 ml) y precipita un sólido amarillo, que se filtra y se seca a vacío, para obtener el precursor de **2**, que se usa en la siguiente reacción sin purificar.

Esquema 5. Síntesis química del sensor fluorescente para H₂S **2**

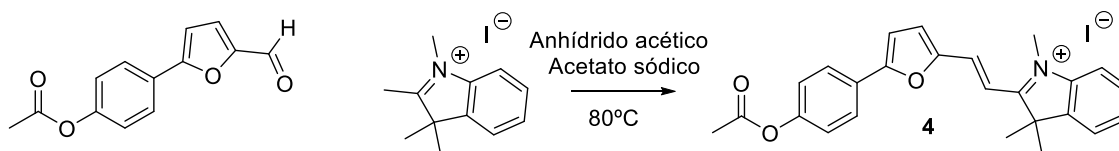
La síntesis del sensor **2** (Esquema 5), se realiza según el siguiente procedimiento: a 3 ml de etanol, se le añade el precursor de **2** (193 mg, 0.54 mmol) y diaminomaleonitrilo (58 mg, 0.54 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 3 días y tras ese tiempo se filtra el precipitado marrón que hay en suspensión. Se seca a vacío, para obtener **2** (203mg, 0.44mmol, 81% yield).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.75 (s, 1H), 8.86 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.28 (dd, J₁ = 2.8 Hz, J₂ = 9.2 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, J₁ = 2.5 Hz, J₂ = 8.9 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

Esquema 6. Síntesis química del precursor de **4**

La síntesis química del precursor de **4** (Esquema 6), sigue la siguiente metodología: a una disolución de 4-acetoxianilina (34.7 mg, 0.23 mmol) y furfural (0.04 ml, 0.46 mmol) en acetonitrilo (2.3 ml) bajo atmósfera de argón, se le añade tert-butilnitrito (0.05 ml, 0.35 mmol), y seguidamente ácido ascórbico (4 mg, 0.02 mmol). Se deja agitando durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, se añade gel de sílice, y se elimina el disolvente, para hacer una cabeza cromatográfica. Se purifica el compuesto por columna cromatográfica de sílice, obteniéndose el precursor de **4** (22.3 mg, 43%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.65$ (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 2.33 (s, 3H).



Esquema 7. Síntesis química del sensor fluorescente para hidracina **4**

Para la síntesis del sensor **4** (Esquema 7) se disuelve el precursor de **4** (20.1 mg, 0.09 mmol) y el yoduro de 1,2,3,3-tetrametil-3H-indolio (30.4 mg, 0.1 mmol) junto con acetato sódico (24.6 mg, 0.3 mmol) en anhídrido acético (2 ml) y se calienta a 80°C por 2 horas. Tras ese tiempo, se elimina el disolvente en un rotavapor, se redisuelve en diclorometano, se filtra y se concentra. Se purifica el compuesto por columna cromatográfica de sílice (DCM/MeOH 95:5), obteniéndose **4** (37.4 mg, 83%).

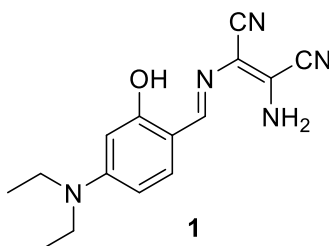
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.30$ (br, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.56-7.51 (m, 4H), 7.26-7.24 (m, 4H), 6.98 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.31 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 1.86 (s, 6H)

D. Resultados y Discusión

Con el fin de desarrollar estos sensores, se debe escoger un núcleo fluorescente (fluoróforo), que esté debidamente funcionalizado para apagar la fluorescencia hasta que el estímulo adecuado se encuentre presente. Obviamente se pueden escoger fluoróforos de sobra conocidos como la fluoresceína, pero nos pareció más interesante utilizar un fluoróforo nuevo, o bien uno descrito (lo más recientemente posible) y que presente propiedades muy interesantes. Comprensiblemente el trabajo experimental es más arduo para cualquiera de estas dos opciones, pero en caso de éxito, la recompensa es también mayor. Ambas aproximaciones fueron, de hecho, las escogidas en este trabajo.

I Aproximaciones hacia un Sensor Fluorescente para H₂S

En el caso del sensor para sulfuro de hidrógeno exploramos la posibilidad de utilizar como fluoróforo **1** (Esquema 8), una molécula recientemente descrita:²⁰



Esquema 8. Estructura química del fluoróforo **1**

La razón para su elección se encuentra en que posee varias propiedades interesantes desde el punto de vista de su posible aplicación en sistemas vivos. En efecto:

-Emite en el rojo. Los fluoróforos rojos desempeñan un papel crucial en la fluorescencia de detección y bioimagen porque minimizan el daño provocado por la luz incidente en las células vivas. Además, permiten una penetración más profunda en el tejido y superar la interferencia con la fluorescencia intrínseca del tejido biológico.

-Posee emisión inducida por la agregación: Es decir, su fluorescencia aumenta cuando las moléculas del compuesto se agregan, en lugar de desactivarse, que es lo que suele suceder. Es un fenómeno que se llama emisión inducida por agregación (*Aggregation Induced Emission*, AIE), y es de especial importancia cuando analizamos

medios acuosos como las células, debido a que las moléculas orgánicas tienden a agregarse en agua, especialmente las moléculas aromáticas y/o muy conjugadas, por lo que los fluorescentes convencionales suelen perder potencia de emisión. Este efecto se observa en la Imagen 1.

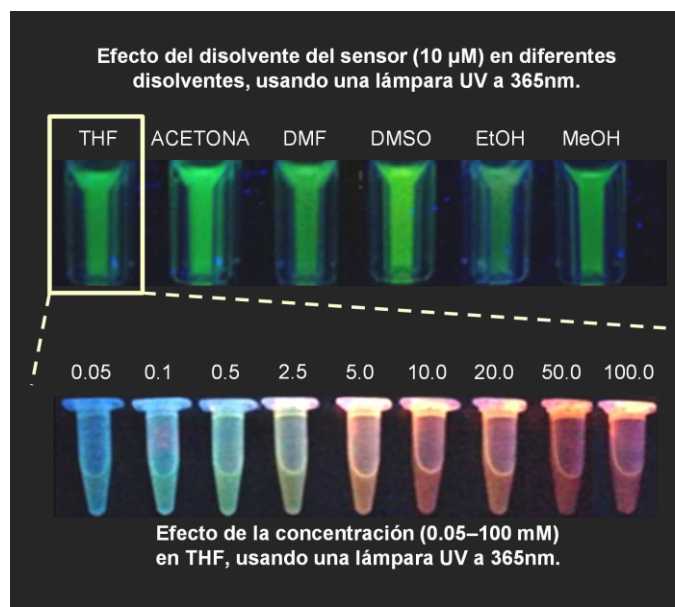


Imagen 1. Efectos de los disolventes y la concentración sobre la fluorescencia de **1**

La fluorescencia roja se logra uniendo una dietilamina (donante de electrones) y un grupo maleonitrilo (aceptor de electrones) al salicilaldehído. Además de la fluorescencia roja, **1** posee una banda de absorción apropiada ($\lambda_{\text{abs}} = 437$ nm en solución y 476 nm en estado sólido) para imágenes confocales, con un gran desplazamiento de Stokes, lo que reduce en gran medida el auto-apagado de la fluorescencia. En cuanto a la característica AIE, el patrón de empaquetamiento cristalino de **1** provoca que las interacciones intermoleculares π - π sean muy débiles, con una distancia entre anillos aromáticos de 4.01 Å (Imagen 2), lo cual evita la desintegración no radiante de electrones excitados y permite una buena emisión roja ($\lambda_{\text{em}} = 650$ nm, $\Phi_{\text{F}} = 24.3\%$) en el estado sólido.²⁰

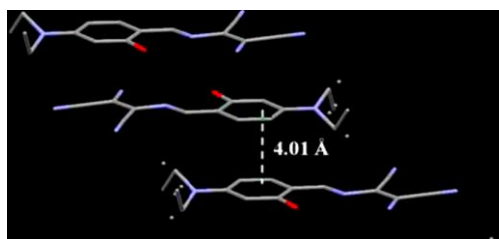


Imagen 2. Distancia entre los anillos aromáticos en la estructura cristalina del fluoróforo **1**

Por otro lado, cabe destacar que la fluorescencia está ligada al hidroxilo libre de **1**, a través de un fenómeno denominado ESIPT (*Excited-State Intramolecular Proton Transfer*). En concreto, es fundamental el enlace de hidrógeno establecen tanto el hidroxilo (R-OH) como el nitrógeno de la imina (R'C=NR). El ESIPT es un fenómeno complejo, pero en esencia es un proceso de foto-tautomerización extremadamente rápido. La característica principal de este proceso fotofísico reside en que, en estado fundamental, el enol (E₀) es más estable que el tautómero ceto (K); sin embargo, en estado excitado es justo al contrario. Por ello, el proceso fotofísico es un ciclo de cuatro etapas (Imagen 3), en el que el enol absorbe un fotón y llega al estado excitado, en el que se convierte en ceto (RR'C=O) por ser más estable, y emite un fotón, entonces vuelve al estado fundamental, donde el tautómero ceto se transforma de nuevo en enol, por ser el más estable en este estado.

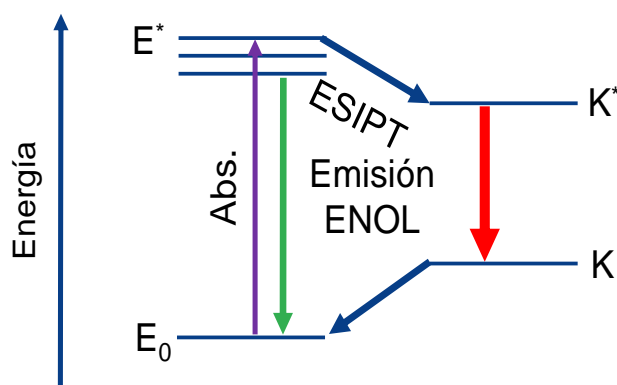
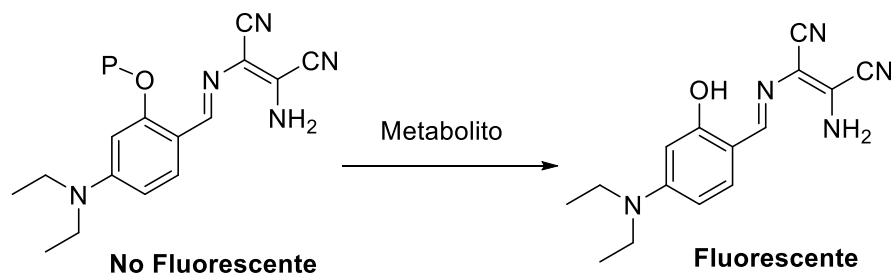


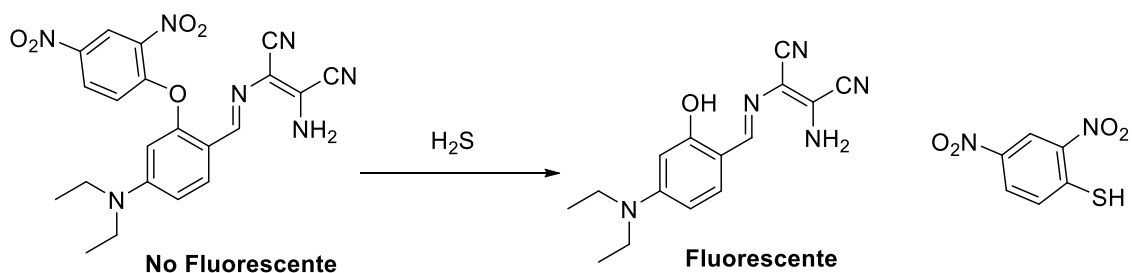
Imagen 3. Diagrama de niveles de energía en el mecanismo ESIPT

Por todo ello, es obvio que el oxígeno del hidroxilo es un punto ideal para anclar un grupo protector, lo cual provocará una extinción de la fluorescencia. Además, con el diseño adecuado, se puede lograr que dicho grupo sea eliminado por el compuesto que pretende ser analizado, con lo cual la presencia de dicho compuesto desencadenará la liberación del fluoróforo (Esquema 9), y por tanto se emitirá fluorescencia: en otras palabras, se obtendría un sensor fluorescente.

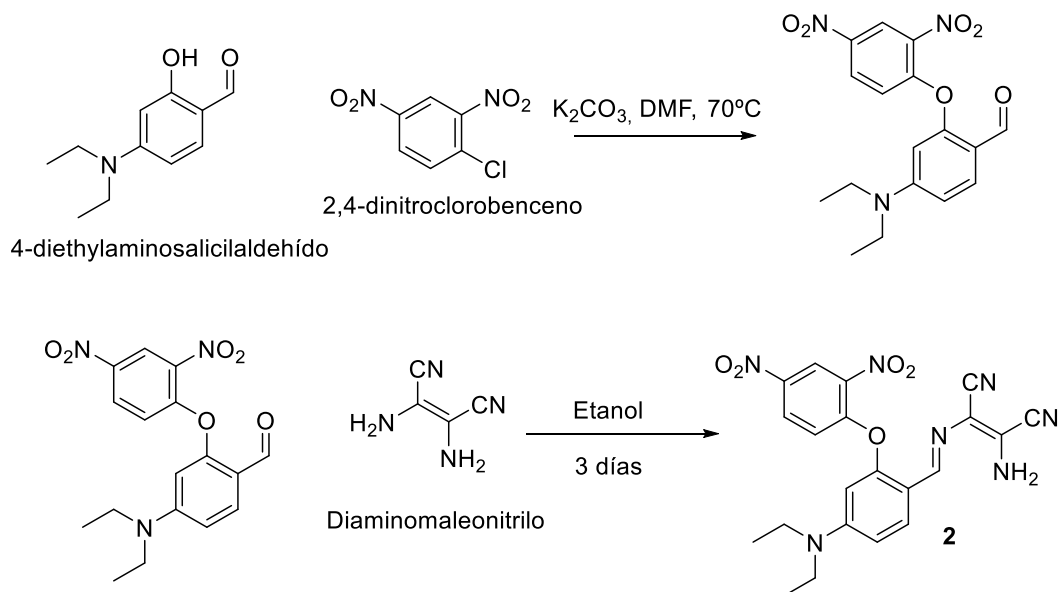


Esquema 9. Mecanismo ESIPT que da lugar a la activación de fluorescencia

Con este fin en mente, y con la idea de elaborar un sensor fluorescente para el H_2S , se eligió como grupo protector del hidroxilo el 2,4-dinitrofenilo. Este grupo es de sobra conocido por ser capaz de reaccionar químicamente con el sulfuro de hidrógeno en una reacción denominada sustitución nucleófila aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$). En resumen, el sulfuro de hidrógeno ataca al 2,4-dinitrofenilo y se queda anclado a él, provocando que salga liberado el hidroxilo (Esquema 10). Por tanto, parece una buena opción para proteger el hidroxilo con el objetivo de lograr un sensor fluorescente de sulfuro de hidrógeno.

Esquema 10. Reacción quimioselectiva para H_2S del sensor diseñado

La síntesis de este sensor (Esquema 11) se llevó a cabo partiendo del 4-diethylaminosalicilaldehído, que en medio básico se desprotona y reacciona con el 2,4-dinitro clorobenceno. Una vez que está protegido el hidroxilo, hacemos reaccionar el aldehído con el diaminomaleonitrilo, obteniéndose el producto final **2**.

Esquema 11. Síntesis química del sensor fluorescente para H₂S **2**

Las pruebas preliminares confirmaron que el compuesto obtenido (**2**) no es fluorescente. En efecto, disolviéndolo en una mezcla de DMSO/agua (1:9) a una concentración 1 mM, y exponiéndolo a dos longitudes de onda diferentes (254 nm y 365 nm), no se distingue una emisión apreciable, con lo cual se confirma que está protegido.

Además, se realizó el tratamiento con una solución acuosa de sulfuro de hidrógeno 10 mM, dando lugar a una solución fluorescente (Imagen 4). Sin embargo, la emisión que observamos es verde, cuando, como se dijo anteriormente, el fluoróforo es rojo. Este extraño fenómeno debía ser aclarado, ya que, a pesar de tener un sensor fluorescente para el sulfuro de hidrógeno, el fluoróforo liberado no era el esperado (lo llamaremos **X** a partir de ahora, al ser un compuesto desconocido).

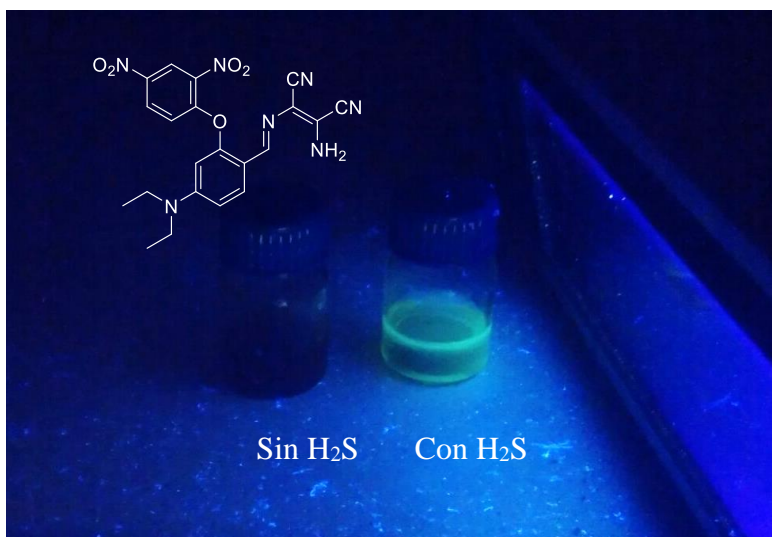
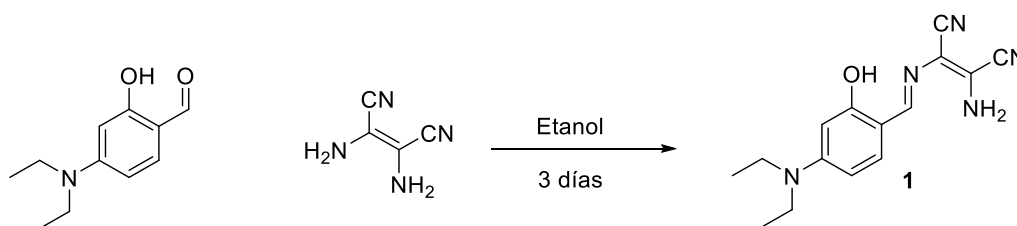


Imagen 4. Disoluciones del fluoróforo **X** obtenido, en DMSO/agua bajo luz UV en presencia y ausencia de H₂S

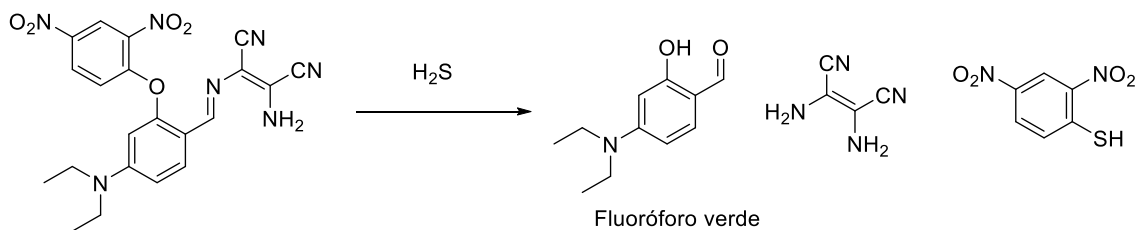
Con el fin de averiguar qué sucedía en esta reacción, se sintetizó el fluoróforo **1**, según el Esquema 12:



Esquema 12. Síntesis química del fluoróforo **1**

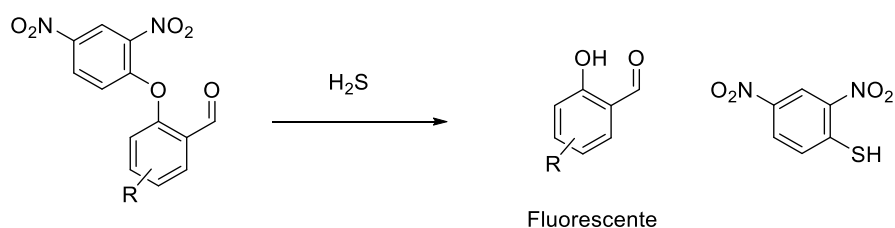
Cuando el fluoróforo **1** se puso en las mismas condiciones que el sensor, esto es, una disolución 1mM en DMSO/agua (1:9), se obtiene una disolución fluorescente rojo-anaranjado. Una vez que se añade una solución acuosa de sulfuro de hidrógeno 10 mM, inesperadamente cambia de color, nuevamente a verde. Esto quiere decir que el fluoróforo es inestable en presencia de H₂S y por lo tanto se transforma en otro compuesto, distinto al producto planteado según el Esquema 10.

Para averiguar cuál era realmente el compuesto resultante (especie X), llevamos a cabo la reacción química del fluoróforo **1** con sulfuro de hidrógeno (Esquema 13) y posteriormente purificamos el producto. Sorprendentemente, el resultado que obtenemos es el compuesto de partida, 4-diethylaminosalicilaldehído, que es fluorescente de color verde.



Esquema 13. Reacción del sensor fluorescente con H_2S obtenida experimentalmente

Este resultado inesperado, a pesar de no ser lo que buscábamos, abre la puerta al diseño de un sensor fluorescente, selectivo para sulfuro de hidrógeno, que se base directamente en salicilaldehídos como estructura fluorófora.

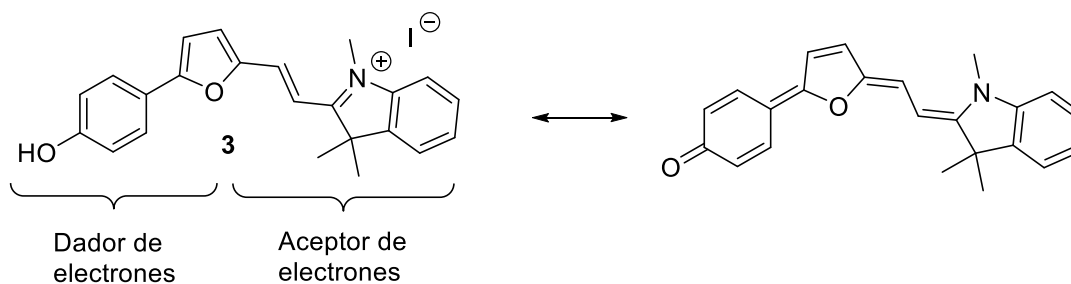


Esquema 14. Posible sensor fluorescente para H_2S basado en salicilaldehído

I Aproximaciones hacia un Sensor Fluorescente para NH_2NH_2

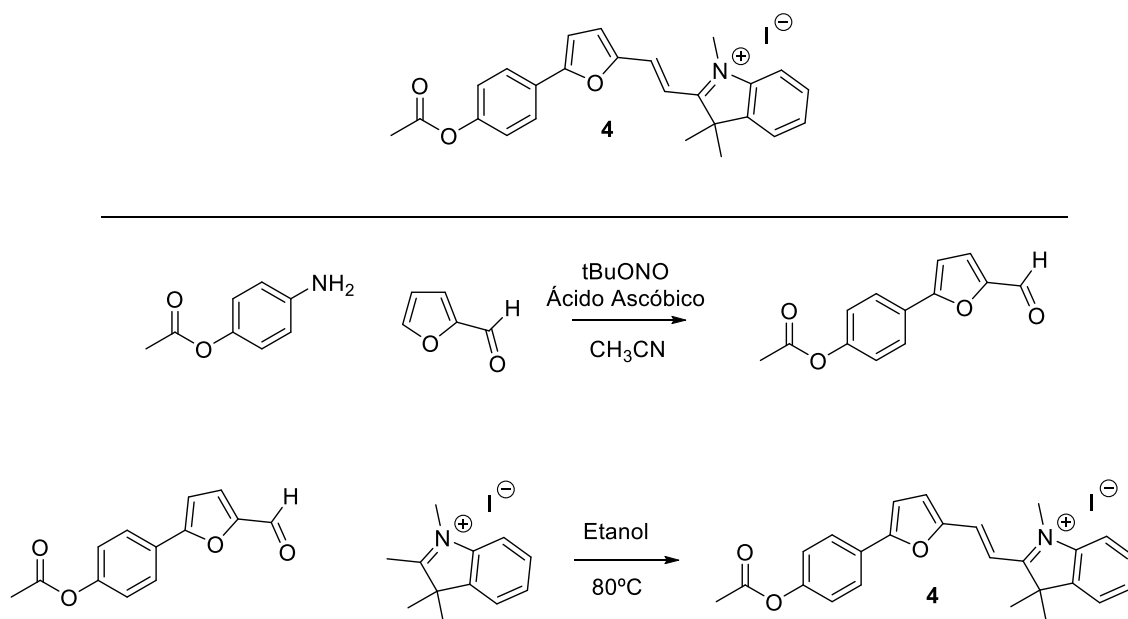
Con el fin de crear un sensor fluorescente para hidracina, se optó por diseñar y elaborar un fluoróforo totalmente nuevo, lo cual conlleva más dificultades y riesgo, pero a la vez resulta más interesante que utilizar los conocidos hasta el momento. Este sensor está basado en las hemicianinas, unos fluoróforos con conocidas propiedades muy interesantes para esta aplicación, ya que son biocompatibles y causan muy baja toxicidad en sistemas vivos.²¹

Como fluoróforo, se ha diseñado el compuesto **3**, que posee una región dadora de electrones y una región pobre, lo cual permite una circulación de los electrones en ese sentido, que provoca la emisión (Esquema 15).

Esquema 15. Mecanismo de activación de fluorescencia del fluoróforo **3**

Igual que en el caso anterior, el hidroxilo es fundamental para la fluorescencia, porque si estuviese protegido, el desplazamiento de cargas no sería posible y se extinguiría todo el proceso de emisión. Por ello, una buena idea para un sensor fluorescente es proteger el hidroxilo del fluoróforo **3** con un grupo que sea desprotegido en presencia del metabolito que se desea analizar. En nuestro caso, nos pareció óptimo proteger el hidroxilo en forma de acetato, no sólo porque es químicamente sencillo, sino porque hay varios precedentes en los que se utilizan fluoróforos protegidos con acetato como sensores.¹⁷ Cabe destacar, que dichos precedentes han sido testados en células vivas, sin que la presencia de esterases suponga ningún problema, como se podría pensar a priori.

Con todo esto, el diseño final del sensor **4** sería el que aparece en el Esquema 16. Su síntesis química parte de compuestos comerciales y utiliza reacciones desarrolladas en nuestro propio laboratorio.



Esquema 16. Estructura y síntesis química del sensor fluorescente diseñado **4**

Una vez obtenido el compuesto se hicieron las pertinentes pruebas en el espectrofluorímetro. El sensor **4** fue disuelto en 3 ml de DMSO/agua (1:9) en una concentración de 1 mM, y se midió su espectro de absorción y de emisión. Como se ve en la Imagen 5, el sensor **4** tiene una emisión apenas detectable (curva marrón). Sin embargo, tras añadir 0.1 ml de una disolución 100 mM de hidracina en agua, hay un cambio de color, y se genera una emisión detectable. Se comprobó que su longitud de onda máxima de emisión era 476 nm para una longitud de excitación óptima de 358 nm.

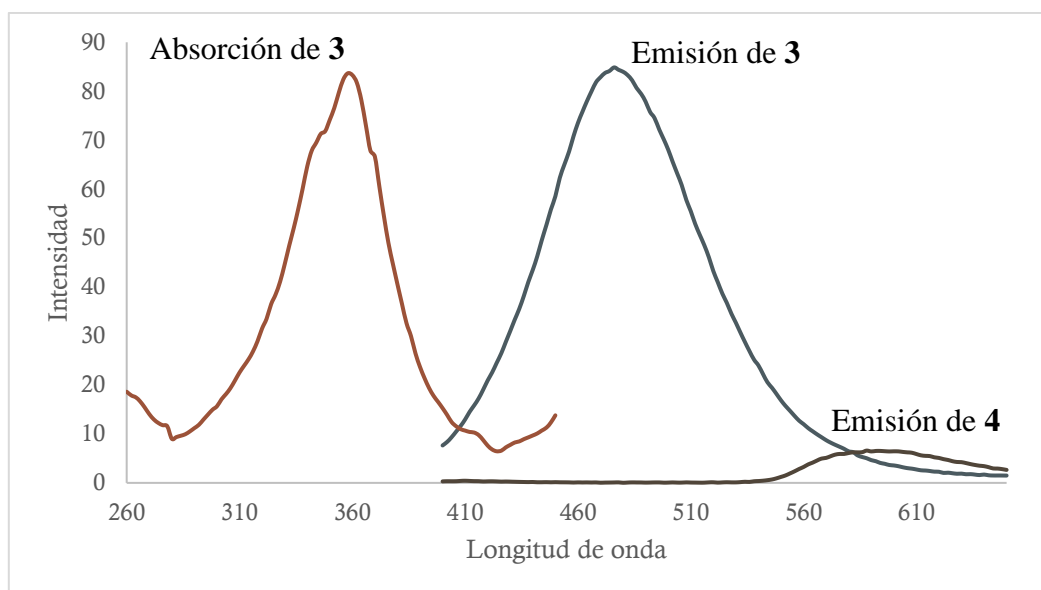
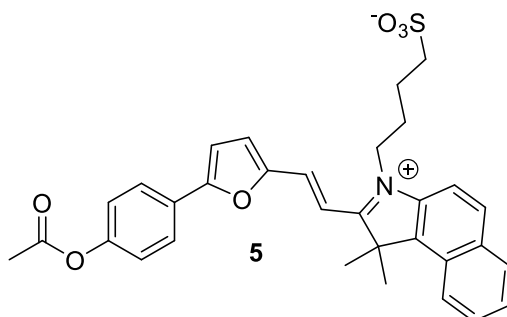


Imagen 5. Espectros de absorción y emisión del sensor 4

Muchos de los parámetros fotofísicos obtenidos son excelentes, como es el caso del desplazamiento de Stokes, que resulta ser bastante grande (118nm). En efecto, se aprecia claramente que las curvas de absorción y emisión de **3**, apenas se solapan, lo que evita la auto-absorción. Además, tanto **3** como **4** poseen una gran estabilidad química, y no sufren daños ni por oxidación con el aire a temperatura ambiente, ni por irradiación con luz, durante un tiempo moderado. Sin embargo, la baja longitud de onda de excitación de **3** le resta aplicabilidad en sistemas biológicos. Con este fin, se está actualmente sintetizando el compuesto **5** (Esquema 17), que presenta una mayor conjugación, y por tanto se prevé que posea una mayor longitud de onda de excitación (y de emisión). Además será más soluble en agua, gracias al grupo sulfonilo (SO_3^-), lo cual evitará la extinción de la fluorescencia por agregación en medios acuosos.



Esquema 17. Estructura química del posible sensor fluorescente para hidracina **5**

E. Conclusiones

Se han diseñado, sintetizado y evaluado dos sensores fluorescentes para dos metabolitos de creciente interés, el sulfuro de hidrógeno y la hidracina. Para ello, se ha utilizado o bien un fluoróforo completamente novedoso o bien uno recientemente descrito, lo cual supone un trabajo más arduo y arriesgado.

El sensor de sulfuro de hidrógeno demostró ser inestable en las condiciones del ensayo y se descompuso, curiosamente a otro fluoróforo, lo cual abre la puerta a un nuevo tipo de sensores para sulfuro de hidrógeno.

El sensor de hidracina, demostró ser efectivo, con unas constantes químico-físicas excelentes, pero con una longitud de excitación muy baja como para ser aplicado en sistemas biológicos.

En este último caso, debido a las prometedoras propiedades físicas, se ha diseñado un sensor similar, con una mayor conjugación y solubilidad en agua, con el fin de ser aplicado en células.

Este trabajo de fin de master supone una excelente toma de contacto con el mundo de la investigación real, en el que los experimentos conllevan en muchos casos frustraciones, tanto mayores cuanto más ambicioso sea el proyecto; pero más importante, al mismo tiempo surgen enfoques alternativos y optimizados, que nos acercan cada vez más a nuestra meta.

Trabajos Futuros:

- Desarrollar un sensor fluorescente para el sulfuro de hidrógeno basado en el salicilaldehído.
- Concluir la síntesis del sensor de hidracina **5**, y comprobar que posee una longitud de excitación y emisión adecuadas.
- Analizar el sensor **5** con microscopía confocal en células con y sin hidracina. Y más importante: con y sin el fármaco isoniazida, que se supone, genera hidracina (y con suerte, determinar en qué orgánulos tiene lugar la digestión de dicho fármaco).

F. Bibliografía

- 1 Desco, M.; Vaquero, J. J. *Imagen Molecular*, 2017.
<http://www.colvema.org/pdf/6876imgmol.pdf> (visitado el 10 Marzo de 2017).
- 2 Huang, Z.; Ding, S.; Yu, D.; Huang, F.; Feng, G. Aldehyde group assisted thiolysis of dinitrophenyl ether: a new promising approach for efficient hydrogen sulfide probes. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9185-9187.
- 3 Espectroscopía de fluorescencia molecular. Página Web de la Universidad de Granada
<http://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/SEMINARIO%203.PDF> (visitado el 20 de Marzo de 2017).
- 4 Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973-984.
- 5 Lippert, A. R.; New, E. J.; Chang, C. J. Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10078-10080.
- 6 Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590-659.
- 7 Díez Guerra, F. J. Técnicas de microscopía óptica. *Arbor* **2004**, *177*, 225-258.
- 8 Hartle, M. D.; Pluth, M. D. A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6108-6117.
- 9 Filipovic, M. R. Persulfidation (S-sulfhydration) and H₂S. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2015**, *230*, 29-59.
- 10 Chen, C.; Xin, H.; Zhu, Y. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol. Sin.* **2007**, *28*, 1709-1716.
- 11 Calvert, J. W.; Elston, M.; Nicholson, C. K.; Gundewar, S.; Jha, S.; Elrod, J. W.; Ramachandran, A.; Lefer, D. J. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation* **2010**, *122*, 11-19.
- 12 Yang, G.; Wu, L.; Jiang, B.; Yang, W.; Qi, J.; Cao, K.; Meng, Q.; Mustafa, A. K.; Mu, W.; Zhang, S.; Snyder, S. H.; Wang, R. H₂S as a physiologic

- vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* **2008**, *322*, 587-590.
- 13 Moore, P. K.; Whiteman, M. *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*; Springer International Publishing: 2015.
- 14 Li, L.; Rose, P.; Moore, P. K. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 169-187.
- 15 Yu, F.; Li, P.; Song, P.; Wang, B.; Zhao, J.; Han, K. An ICT-based strategy to a colorimetric and ratiometric fluorescence probe for hydrogen sulfide in living cells. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2852-2854.
- 16 Liu, C.; Pan, J.; Li, S.; Zhao, Y.; Wu, L. Y.; Berkman, C. E.; Whorton, A. R.; Xian, M. Capture and Visualization of Hydrogen Sulfide by a Fluorescent Probe. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10327-10329.
- 17 Hu, C.; Sun, W.; Cao, J.; Gao, P.; Wang, J.; Fan, J.; Song, F.; Sun, S.; Peng, X. A Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe for Hydrazine and Its in Vivo Applications. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4022-4025.
- 18 Zhang, J.; Ning, L.; Liu, J.; Wang, J.; Yu, B.; Liu, X.; Yao, X.; Zhang, Z.; Zhang, H. Naked-Eye and Near-Infrared Fluorescence Probe for Hydrazine and Its Applications in In Vitro and In Vivo Bioimaging. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9101-9107.
- 19 Armarego, W. L. F.; Chai, C. *Purification of Laboratory Chemicals*; Butterworth-Heinemann: Boston, 2013.
- 20 Peng, L.; Xu, S.; Zheng, X.; Cheng, X.; Zhang, R.; Liu, J.; Liu, B.; Tong, A. Rational Design of a Red-Emissive Fluorophore with AIE and ESIPT Characteristics and Its Application in Light-Up Sensing of Esterase. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3162-3168.
- 21 Wen Sun; Shigang Guo; Chong Hu; Jiangli Fan; Xiaojun Peng Recent Development of Chemosensors Based on Cyanine Platforms. *Chem. rev.* **2016**, *116*, 7768-7817.