

# UNIVERSIDAD DE GRANADA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

---

DEPARTAMENTOS DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FISICOQUÍMICA

## **SÍNTESIS Y APLICACIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* DE NUEVOS COLORANTES ORGÁNICOS**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

presentada por

**MARÍA DEL PILAR HERRERO FONCUBIERTA**

para optar al título de

DOCTOR EN QUÍMICA

con mención de DOCTOR INTERNACIONAL

GRANADA, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María del Pilar Herrero Foncubierta  
ISBN: 978-84-1117-158-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71856>



El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en los grupos de investigación “Materiales Orgánicos Funcionales” FQM-367 y “Fotoquímica y Fotobiología” FQM-247 de los Departamentos de Química Orgánica y Fisicoquímica, respectivamente, de la Universidad de Granada y en el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. La Tesis Doctoral ha sido financiada por los proyectos “Role of an ornithine rhamnolipid pigment in GBS virulence” y “CTQ2014-56370-R, A Multiplex Imaging Platform for Cellular Metabolic Profiling. Application to Cancer Diagnostics and Cytotoxic Amyloid Oligomers”.



## **AGRADECIMIENTOS**

---

En primer lugar, me gustaría agradecer a los Drs. Juan Manuel Cuerva Carvajal y Araceli González Campaña el haber confiado en mí hace unos años y haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación en el que me he sentido como en casa. Especialmente a Juanma, gracias porque siempre que he necesitado tu ayuda me la has dado y he aprendido mucho de ti.

En segundo lugar, agradecer a mis directores de tesis, Ángel Orte Gutiérrez, Delia Miguel Álvarez y Javier Rodríguez Granger todo lo que me han enseñado durante estos años. He tenido mucha suerte de contar con vosotros. Ángel te agradezco tu paciencia al explicarme muchas cosas nuevas para mí y hacer que me pareciesen más fáciles. Delia gracias por poder haber contado contigo siempre, eres una gran persona y te deseo lo mejor. Javier gracias por los buenos ratos que hemos pasado en el hospital, tus charlas, tus bromas.

Además, me gustaría agradecer al resto de profesores de los departamentos en los que he trabajado los buenos momentos que hemos pasado. Entre ellos, a Justi por sus canturreos y bromas, a José Manuel, porque me has ayudado tantas veces con las células, el microscopio etc. que no sé cómo agradeceréte. A Luis y a Ramón porque gracias a la beca Visiting Scholar que les concedieron, he podido vivir una gran experiencia.

También, por supuesto, dar las gracias a todos mis compañeros de ambos grupos de investigación, que son muchos. Gracias a Raquel, Pablo, Ana, Sandra, Alba, Sara, Karina, Mari, Rafa, Vicente, Migue, Irene, Carlos, Rubén, Silvia, Lucía, Arthur, Carmen, Álvaro, Javi, Laura y Consuelo, por todos los ratos que hemos pasado juntos. Cada uno de vosotros sois personas con algo especial y espero que alcancéis todos los objetivos que os propongáis.

En especial hay personas que nunca voy a olvidar. Karina, te voy a echar mucho de menos, gracias por estar siempre a mi lado y poder hablar contigo y aburrirte con mi vida siempre que lo he necesitado. Sé que, aunque estemos lejos, siempre podremos contar la una con la otra. Vicente, empezamos casi a la vez esta etapa y hemos ido aprendiendo y compartiendo muchos momentos juntos. Sabes que te tengo mucho cariño y siempre voy a estar cuando me necesites. Migue, que voy a hacer sin nuestras meriendas, paseos, carreras (bueno esto último no lo voy a echar tanto de menos), me acordaré siempre de ti. Gracias por ser un apoyo tan grande para mí durante estos años. Pablo, te agradezco todos los buenos ratos que me has hecho pasar siempre con nuestras tonterías y por ser mi compañero de cada congreso y aguantarme. Raquel, a ti te debo mucho! Te agradezco que me ayudases tanto. Eres una gran persona. Mari, gracias por tu alegría, tu positividad y tus ganas, no cambies nunca. Agradecer a Rubén y Sandra por ser las personas que me ayudaron en mis inicios en todo lo que necesitaba, a Ana, por nuestros momentos de cotilleos en el lab, a Lucía por su cariño, a Carlos por nuestras charlas durante la estancia, a Rafa por sus sabías que, a Silvia por su alegría y a Alba e Irene por los consejos sobre la tesis que me han dado. Del grupo de farmacia quiero agradecer especialmente a Carmen lo que me has ayudado con los equipos, protocolos etc. y a Javier y Álvaro por su cariño.

Tampoco me olvido de mis compañeros de la estancia, que sin ser ni siquiera del mismo grupo de investigación, me acogieron y cuidaron desde que llegue. A Jorge, Alberto, David y Arnau, os echo de menos.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, sin vosotros no hubiese llegado a donde estoy. Os agradezco vuestra dedicación durante tantos años, vuestros consejos y vuestro amor y alegría. A pesar de muchos obstáculos en mi vida, no he podido ser más feliz y todo gracias a teneros cerca, tanto a vosotros como a mis hermanas, Marta y Teresa, a mis abuelos y familiares. En el lugar donde estéis vosotros, es donde siempre estará mi hogar. Os quiero mucho.

A mis amigas incondicionales, Ana e Inma, os agradezco poder contar con vosotras siempre, estemos donde estemos. A Ana Belén, ya que gracias a ti empezó esto y por supuesto no sé cómo voy a agradecerte todos los consejos que me has dado a la hora de escribir la Tesis.

Y claro, como ibas a faltar tú, tú quién eres también mi familia. Te conocí ya hace un tiempo y poco a poco fuiste demostrándome con hechos que ibas a ser una constante en mi vida. Gracias por apoyarme en mi decisión de poner distancia de por medio si así yo iba a ser feliz con lo que hacía y hacer que esto haya sido posible. Por supuesto, gracias por aguantarme porque no todo este tiempo separados ha sido fácil, pero siempre, aun estando lejos, te he sentido conmigo. Por eso y por todo lo que nos queda por vivir, muchas gracias Pedro, he tenido mucha suerte de que te cruzases en mi camino.

Finalmente, quiero agradecer a una persona que ya no está conmigo porque gracias a ti tuve claro que me dedicaría a utilizar la química, mi pasión, para intentar mejorar la vida de los demás.



*A mis padres*



## RESUMEN

---

Un gran número de enfermedades están ocasionadas o se ven favorecidas por fallos en los procesos fisiológicos a nivel celular que pueden tener lugar por la aparición de patógenos en el organismo o bien por el desajuste de determinados parámetros químicos y bioquímicos. En este sentido, es crucial conocer de forma exhaustiva el mecanismo de acción de estos patógenos para así poder desarrollar nuevas medidas preventivas o tratamientos de mayor eficacia, o bien, buscar nuevas herramientas que permitan conocer en mayor profundidad la fisiopatología de dichas enfermedades y así favorecer un diagnóstico precoz.

Es por ello que la presente Tesis Doctoral titulada *Síntesis y aplicaciones in vivo e in vitro de nuevos colorantes orgánicos* se divide en dos bloques claramente diferenciados teniendo como objetivo común el diseño y síntesis de nuevos colorantes orgánicos con aplicaciones de relevancia biomédica.

Por un lado, el bloque A se centra en el estudio del mecanismo de acción de un pigmento  $\beta$ -hemolítico denominado Granadaeno generado por bacterias estreptococo del grupo B (EGB). Para ello se han sintetizado colorantes análogos al Granadaeno que presentan un número menor de dobles enlaces en su estructura y distintos grupos en los extremos terminales y posteriormente se han realizado estudios de la actividad hemolítica de los mismos. Una vez sintetizados y probada su actividad, se han podido establecer relaciones estructura-actividad de los análogos sintéticos del Granadaeno determinando qué combinación de grupos terminales y número de dobles enlaces favorecen una mejor permeabilización de la membrana de las células infectadas y por lo tanto una mayor actividad hemolítica. Tras ello se ha realizado una búsqueda de una nueva posible vacuna preventiva más efectiva utilizando como diana uno de los principales factores de virulencia de EGB, la  $\beta$ -hemolisina y/o el pigmento. La importancia de este estudio radica en que la infección por este tipo de bacterias a día de hoy aún sigue

siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en neonatos a nivel mundial.

Por otro lado, el bloque B engloba la síntesis de diferentes sondas y sensores fluorescentes diseñados como posibles herramientas que permitan tener una visión más profunda de la fisiopatología de enfermedades a nivel celular. Para ello se han desarrollado sondas con diferentes funciones: el marcaje de orgánulos celulares y la detección a nivel celular de la variación de varios analitos, incluyendo el pH, los biotioles e iones fosfato, los cuales están implicados directamente en multitud de dolencias como las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Una vez sintetizadas se han empleado para la realización de un marcaje óptimo de mitocondrias o lisosomas en células en función del grupo lateral anclado a su estructura, para la detección de manera fiable de variaciones de pH y para la detección y cuantificación de biotioles e iones fosfato en el interior celular. Todas estas aplicaciones han sido evaluadas a través de la microscopía de fluorescencia, una técnica muy potente, no invasiva y altamente sensible. La importancia de este estudio se debe a que el diseño de herramientas que permitan el descubrimiento de aspectos de la fisiopatología de distintas enfermedades es cada vez más necesario para la búsqueda de nuevas herramientas de detección precoz.

Finalmente, como conclusión global se han sintetizado y caracterizado una gran cantidad de colorantes orgánicos, sugiriendo además una aplicación biomédica para cada uno de ellos.

## SUMMARY

---

A large number of diseases are caused or favoured by failures in physiological processes at the cellular level that can occur due to the presence of pathogens in the body or because of the mismatch of certain chemical and biochemical parameters. In this sense, it is crucial to know in detail the mechanism of action of these pathogens in order to develop new, more effective preventive measurements or treatments. Moreover, this knowledge would set the basis for the search of new tools that allow a better understanding of the physiopathology of these diseases thus favouring their early diagnosis.

For this reason, the present Doctoral Thesis entitled *Synthesis and in vivo and in vitro applications of new organic dyes* is divided into two clearly differentiated parts, having as a common objective the design and synthesis of new organic dyes with relevant biomedical applications.

Part A focuses on the study of the mechanism of action of a  $\beta$ -hemolytic pigment called Granadaene which is generated by Group B Streptococcus (GBS). To this end, different analogues to Granadaene that present a smaller number of double bonds in their structures and different groups at the terminal ends have been synthesized and subsequent hemolytic activity studies have been carried out. Once synthesized and their activity tested, we have been able to establish structure-activity relationships of the synthetic analogues of Granadaene by determining which combination of terminal groups and number of double bonds causes greater membrane permeabilization of infection cells and thus greater hemolytic activity. After that, a search for a new and more effective preventive vaccine has been carried out using one of the main virulence factors of GBS,  $\beta$ -hemolysin and/or pigment as a target. The importance of this study is that this bacterial infection is one of the main causes of morbi- mortality in neonates worldwide.

Part B includes the synthesis of different fluorescent probes and sensors designed as possible tools that allow to gain deeper insights into the physiopathology of different diseases at cellular level. To this end, probes with different applications have been developed: the labelling of different cells organelles and the detection at the cellular level of the variation of several analytes, including pH, biothiols and phosphate ions, which are directly involved in a multitude of diseases such as neurodegenerative diseases and cancer. Once synthesized, they have been used to perform an optimal mitochondrial and lysosomal labelling in cells depending on the lateral group present in the structures, to detect reliable variations in pH and to quantify both biothiols and phosphate ions inside cells. All these applications have been evaluated through fluorescence microscopy, a very powerful, non-invasive and highly sensitive technique. The importance of this study lies in the need of understanding the physiopathology of different diseases to pave the way for developing new tools for early diagnostic.

Finally, as a global conclusion, a large number of organic dyes has been synthesized and a biomedical application has also been verified for each one of them.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

### BLOQUE A

**APCI:** Ionización química a presión atmosférica

**ATCC:** Cepa bacteriana de las siglas en inglés American type collection culture

**BHT:** Butilhidroxitolueno

**CAMP:** Factor de Christie Atkins Munch

**CRM<sub>197</sub>:** Mutante no tóxico de la toxina diftérica

**C3:** Complemento 3

**C5a:** Fragmento pequeño del complemento 5

**DIBAL-H:** Hidruro de diisobutilaluminio

**DMP:** Dess-Martin periodinano

**DMSO-*d*<sub>6</sub>:** Dimetil sulfóxido deuterado

**DTS:** Solución estabilizadora (DMSO + TFA (0.1 %) + almidón (20 %))

**EGB:** Bacteria estreptococo del grupo B o *Streptococcus agalactiae*

**EI:** Ionización por impacto electrónico

**ENCP:** Enfermedad neonatal de comienzo precoz

**ENCT:** Enfermedad neonatal de comienzo tardío

**ESI:** Ionización por electrospray

**FbsA:** Proteína de unión a fibrinógeno A

**GBS:** Bacteria estreptococo del grupo B o *Streptococcus agalactiae*

**HWE:** Reacción Horner-Wadsworth-Emmons

**HRMS:** Espectrómetro de masas de alta resolución

**Lmb:** Proteína de unión a la laminina

**MALDI-TOF:** Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones acoplado

**NBS:** *N*-bromosuccinimida

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PAI:** Profilaxis antibiótica intraparto

**PC:** Polisácarido capsular

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**rt:** Temperatura ambiente

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**ScpB:** Proteína unicelular B

**TBS:** *tert*-butildimetilsilano

**TFA:** Ácido trifluoroacético

**THF:** Tetrahidrofurano

**THP:** Tetrahidropirano

**TT:** Toxoide tetánico

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VM:** Vesícula de membrana

## **BLOQUE B**

**A:** Anfifilicidad

**ABC:** Área bajo la curva

**Abs:** Absorción

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ALLO-7 o APC-Cy7:** Sensor tándem formado por alocicocianina o APC y una indotricarbocianina o Cy7

**AMPK:** Enzima quinasa activada por monofosfato de adenosina

**APCI:** Ionización química a presión atmosférica

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosina 5´trifosfato

**BCECF:** 2´,7´-Bis-(2-carboxietil)-5-(6)carboxifluoresceína

**BluR:** Sensor tándem formado por cumarina y verde malaquita o MG

**BODIPYs:** Borodipirrometanos o 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos

**Carboxi-SNARF-1:** Carboxi-seminaftorodafluor-1 o 5´-(6´)-carboxi-10-dimetilamino-3-hidroxi-espiro-[7H-benzo[c]xanteno-7,1´-3´H-isobenzofurano]-3´-ona

**CBN:** Número de dobles enlaces conjugados

**CHO-k1:** Línea celular de ovario de hámster chino

**CIB:** Centro de Investigaciones Biológicas

**cp Venus173:** Proteína fluorescente aceptora

**CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**CT:** Compuesto tándem

**CT-X:** Xanteno para síntesis del compuesto tándem propuesto

**DEPT:** Mejora sin distorsión por transferencia de polarización

**DiOC<sub>6</sub>:** Yoduro de 3,3´-dihexiloxacarbocianina

**DMAP:** Dimetilaminopiridina

**DMEM:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

**DNBS:** 2,4-dinitrobenzenosulfonil

**ECFP:** Proteína fluorescente de cian mejorada

**Em:** Emisión

**ER-BZT:** Sonda formada por 1,8-naftalimida y un grupo *p*-tolueno sulfonilo

**ESI:** Ionización por electrospray

**ESPT:** Reacción de transferencia protónica en estado excitado

**Ex:** Excitación

**FA:** Formaldehído

**FAT:** Proteínas activadoras del fluorógeno

**FBS:** Suero fetal bovino

**FHA1:** Dominio presente en el sensor FLIM-FRET

**FLIM:** Microscopía de tiempos de vida de fluorescencia

**FLIM-FRET:** Microscopía de tiempos de vida de fluorescencia utilizada para medir la transferencia de energía de resonancia de Förster

**FRET:** Transferencia de energía de resonancia de Förster

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**GG:** Granada Green o 9-[1-(4-*tert*-butil-2-metoxifenil)]-6-hidroxi-3*H*-xanten-3-ona

**GG-DNBS:** Granada Green sustituido con 2,4-dinitrobenzenosulfonilo

**GSH:** Glutación

**HEPES:** Buffer 4-(2-hidroxietil)-1-ácidopiperazineetanosulfónico

**HepG2:** Línea celular de carcinoma hepatocelular humano

**HMBC:** Espectroscopía de correlación heteronuclear a enlaces múltiples

**HRMS:** Espectrómetro de masas de alta resolución

**HSQC:** Espectroscopía de correlación heteronuclear de un único cuanto

**IAPP:** Polipéptido amiloide

**IR:** Infrarrojo

**IRF:** Función de respuesta del instrumento

**logP:** Logaritmo del coeficiente de reparto

**LT:** LysoTracker Deep Red

**MC3T3-E1:** Línea celular de preosteoblastos

**MDA-MB-231:** Línea celular de cáncer de mama

**MT:** MitoTracker Deep Red

**Mito-pH-1:** Sonda formada por hidroxipireno y trifenilfosfonio

**MG:** Verde malaquita

**MLE:** Estimación por máxima similitud

**MOM:** Grupo metoximetilo

**MPA-QD:** Quantum Dots recubiertos con ácido mercaptopropiónico

**mTq2FP:** Proteína fluorescente dadora m-Turquesa2

**NMM:** *N*-metil maleimida

**NBM:** Sonda de Nile Blue combinada con un grupo morfolina

**PBS:** Buffer compuesto por una solución salina tamponada con fosfato

**pK<sub>a</sub>:** Logaritmo negativo de la constante de equilibrio

**PET:** Tomografía por emisión de positrones

**PE-Cy5:** Sensor tándem formado por ficoeritrina o PE y una indotricarbocianina o Cy5

**PE-Cy7:** Sensor tándem formado por ficoeritrina o PE y una indotricarbocianina o Cy7

**Pi:** Fosfato

**PIPES:** Buffer de piperazina-*N,N'*-bis(2-ácido etanosulfónico)

**PY:** Pironina (rodamina)

**QD:** Quantum dots

**QSAR:** Relación cuantitativa estructura-actividad

**$\tau$ :** Tiempo de vida de luminiscencia o fluorescencia o tiempo de decaimiento

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SiR-Hoechst:** Sonda formada por bisbencimida y una rodamina sililada

**SPT:** Técnica de contaje de fotones individuales (dominio de tiempo)

**Sulfo-Cy5:** Sensor formado por pentametina con un grupo ácido sulfónico

**TG:** Tokyo Green

**TG-I:** Tokyo Green I

**TG-II:** Tokyo Green II

**TM:** Tokyo Magenta

**TMDHS:** 2,7-*N,N,N',N'*-tetrametil-10-hidro-9-sililantraceno (rodamina sililada)

**TOTIN:** Sensor tándem formado por heterodímero de naranja de tiazol o TO y tiazol indolenina o TIN

**TPP:** Trifenilfosfonio

**TPP-1:** Sonda formada por naftalimida, cloruro de bencilo y trifenilfosfonio

**TRIS:** Buffer de tris(hidroximetil)aminometano

**T2AMPKAR:** Sensor FLIM-FRET capaz de detectar actividad de AMPK

**UPR:** Respuesta de proteína desplegada

**URF:** Unidades relativas de fluorescencia

**UV-VIS:** Ultravioleta-visible

**W/L:** Relación entre la anchura de la mayor región aromática planar del fluoróforo y su longitud

**Z:** Carga eléctrica de la molécula

**2-Me-TM:** 2-metilTokyo Magenta, 7-hidroxi-5,5-dimetil-10-(o-tolil)dibenzo[*b,e*]silin-3-5*H*-ona

**661W:** Línea celular de células fotorreptoras

**$\alpha$ -MEM:** Medio de cultivo esencial mínimo alfa



# ÍNDICE

---

<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	35
<b>BLOQUE A</b> .....	39
<b>INTRODUCCIÓN BLOQUE A</b> .....	41
1. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	43
1.1. Manifestaciones clínicas de la infección por <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	44
1.2. Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	45
1.3. Estrategias de prevención de la infección por EGB .....	47
1.4. Factores de virulencia .....	48
1.4.1. Adherencia de EGB a las células huésped.....	48
1.4.1.a) Proteínas de la superficie de EGB.....	49
1.4.1.b) Pili.....	49
1.4.2. Invasión de EGB.....	50
1.4.2.a) Factor de CAMP.....	50
1.4.2.b) $\beta$ -hemolisina/citolisina.....	50
1.4.3. Factores que favorecen la evasión inmunológica.....	52
1.4.3.a) Polisacárido capsular.....	53
2. Estrategia de prevención de la infección por EGB alternativa: vacunación.....	53
2.1. Vacunas polisacáridas .....	54
2.2. Vacunas conjugadas polisacáridas-proteína.....	54
2.3. Vacunas proteicas.....	55

2.4. Vacunas futuras .....	56
<b>CAPÍTULO I. COLORANTES SINTÉTICOS ANÁLOGOS DEL GRANADAENO.....</b>	<b>57</b>
I.1. ANTECEDENTES.....	59
I.1.1. Polienos presentes en bacterias.....	59
I.1.1.1. Mecanismos que favorecen la permeabilización de membranas.....	61
I.1.2. Granadaeno.....	63
I.1.2.1. Aspectos estructurales del Granadaeno.....	64
I.1.2.2. Actividad hemolítica/citolítica del pigmento.....	67
I.1.2.2. a) Mecanismos que promueven la muerte celular.....	69
I.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	70
I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	71
I.3.1. Síntesis, caracterización y estudios de actividad hemolítica de análogos sintéticos del Granadaeno.....	71
I.3.2. Estudios de actividad hemolítica en el <i>Seattle Children's Hospital</i> .....	95
I.3.3. Estudios de relación estructura-actividad.....	102
I.4. CONCLUSIONS.....	106
<b>PARTE EXPERIMENTAL BLOQUE A.....</b>	<b>109</b>
PE. BLOQUE A. CAPÍTULO I. COLORANTES SINTÉTICOS ANÁLOGOS DEL GRANADAENO.....	111
1. Síntesis: Aspectos generales.....	111
2. Síntesis de los colorantes análogos sintéticos del Granadaeno...	112

---

3. Síntesis de los fosfonatos necesarios para realizar las reacciones de HWE.....	144
4. Estudios de actividad hemolíticos.....	145
4.1. En placas de agar-sangre .....	145
4.2. En glóbulos rojos humanos .....	147
5. Instrumentación para las medidas de luz polarizada .....	148
6. Estimación de la longitud de los derivados.....	148
<b>REFERENCIAS BLOQUE A.....</b>	<b>149</b>
<b>BLOQUE B.....</b>	<b>159</b>
<b>INTRODUCCIÓN BLOQUE B.....</b>	<b>161</b>
1. Retos biomédicos actuales .....	163
1.1. Enfermedades neurodegenerativas.....	163
1.1.1. Alzheimer.....	164
1.1.2. Parkinson.....	165
1.2. Cáncer .....	166
2. Herramientas de detección.....	167
3. Microscopía de fluorescencia.....	168
4. Sondas y sensores fluorescentes con aplicación biomédica .....	170
<b>CAPÍTULO II SONDAS FLUORESCENTES DIRIGIDAS A DISTINTOS ORGÁNULOS CELULARES.....</b>	<b>175</b>
II.1. ANTECEDENTES.....	177
II.1.1. Estrategias de administración dirigidas a distintos orgánulos celulares .....	177

II.1.1.1. Colorantes dirigidos a la membrana plasmática....	180
II.1.1.2. Colorantes dirigidos a las mitocondrias.....	182
II.1.1.3. Colorantes dirigidos a los lisosomas.....	186
II.1.1.4. Colorantes dirigidos al retículo endoplasmático....	189
II.1.1.5. Colorantes dirigidos al núcleo.....	192
II.1.2. Alternativa a la utilización de colorantes con restos cargados .....	195
II.1.3. Sondas fluorescentes con estructura xanténica .....	195
II.1.3.1. Fluoresceína.....	196
II.1.3.2. Derivados halogenados.....	198
II.1.3.3. Derivados Tokyo Green.....	199
II.1.3.4. Derivados Pennsylvania Greens.....	201
II.1.3.5. 9-alkilxantenos.....	202
II.1.4. Sondas fluorescentes con estructura de acridona .....	202
II.1.4.1. Acridonas sustituidas.....	203
II.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	204
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	205
II.3.1. Síntesis y caracterización de derivados xanténicos y acridonas.....	205
II.3.1.1. Síntesis de los derivados xanténicos 24-29.....	206
II.3.1.2. Síntesis de las acridonas 30-37.....	209
II.3.2. Medidas fotofísicas .....	210
II.3.3. Medidas de localización celular mediante microscopía confocal de fluorescencia en células MDA-MB-231.....	229
II.3.4. Medidas de acumulación de colorantes en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar .....	238

---

II.4. CONCLUSIONS.....	242
<b>CAPÍTULO III. SENSORES DE pH ESPECÍFICOS PARA FLIM.....</b>	<b>243</b>
III.1. ANTECEDENTES.....	245
III.1.1. Sensores de pH .....	246
III.1.1.1. Sensores de pH intracelular.....	247
III.1.1.1. a) Derivados de la fluoresceína: BCECF....	247
III.1.1.1. b) Benzo [c] xanteno carboxi-SNARF-1.....	248
III.1.1.1. c) Derivados de cianinas.....	249
III.1.1.1. d) Quantum Dots.....	250
III.1.1.2. Sensores de pH intramitocodrial.....	252
III.1.2. Técnicas de medida de pH celular con sensores luminiscentes .....	254
III.1.2.1. Métodos ratiométricos.....	255
III.1.2.2. Microscopía de tiempos de vida de fluorescencia...	257
III.1.2.3. Sensores intracelulares para FLIM-FRET.....	263
III.1.3. Sensores tándem.....	269
III.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	271
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	272
III.3.1. Síntesis y caracterización del sensor de pH específico para FLIM.....	272
III.3.2. Medidas fotofísicas .....	279
III.4. CONCLUSIONS.....	283
<b>CAPÍTULO IV. SENSORES FLUORESCENTES CON LONGITUDES DE ONDA DE EMISIÓN EN EL MAGENTA.....</b>	<b>285</b>

IV.1. ANTECEDENTES.....	287
IV.1.1.Sensores fluorogénicos.....	287
IV.1.2. Sensores FLIM basados en reacciones en el estado excitado .....	290
IV.1.2.1. Reacciones de transferencia protónica en el estado excitado.....	291
IV.1.2.2. Sensor FLIM para la detección de acetatos por ESPT .....	293
IV.1.2.3. Sensor Granada Green (GG) para la detección de aniones fosfato por ESPT.....	296
IV.1.2.4. Sonda dual para la detección de biotioles y fosfato .....	299
IV.1.3. Sensores con emisión en el magenta.....	302
IV.1.3.1. BODIPYs.....	302
IV.1.3.2. Cianinas.....	305
IV.1.3.3. Colorantes sililados.....	306
IV.1.3.3. a) Rodaminas sililadas.....	307
IV.1.3.3. b) Derivados xanténicos sililados.....	308
IV.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	310
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	312
IV.3.1. Síntesis y caracterización del sensor dual con emisión en el magenta .....	312
IV.3.2. Medidas fotofísicas.....	313
IV.3.3. Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células HepG2 y MC3T3-E1 .....	318
IV.3.3. Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células fotorreceptoras 661W .....	325

---

IV.4. CONCLUSIONS .....	327
<b>PARTE EXPERIMENTAL BLOQUE B.....</b>	<b>329</b>
PE. BLOQUE B. CAPÍTULO II. SONDAS FLUORESCENTES DIRIGIDOS A DISTINTOS ORGÁNULOS CELULARES.....	331
1. Síntesis: Aspectos generales.....	331
2. Síntesis de los xantenos 24-29.....	332
3. Síntesis de las acridonas 30-37.....	335
4. Instrumentación para la caracterización fotofísica.....	345
5. Cálculo del coeficiente de reparto log P.....	348
6. Instrumentación para medidas de localización celular mediante microscopía de fluorescencia.....	348
7. Cultivo celular.....	353
8. Experimentos con microscopía de fluorescencia.....	353
9. Análisis de imágenes.....	354
10. Medidas de acumulación de colorantes en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar .....	356
PE. BLOQUE B. CAPÍTULO III. SENSORES DE PH ESPECÍFICOS PARA FLIM CON TIEMPOS DE VIDA LARGOS.....	358
1. Síntesis: Aspectos generales.....	358
2. Síntesis de los compuestos 38 y 39.....	358
3. Instrumentación para la caracterización fotofísica.....	365
PE. BLOQUE B. CAPÍTULO IV. SENSORES FLUORESCENTES CON LONGITUDES DE ONDA DE EMISIÓN EN EL MAGENTA.....	367
1. Síntesis: Aspectos generales.....	367
2. Síntesis de los compuestos 40 y 41.....	367
3. Instrumentación para la caracterización fotofísica.....	369

## Índice

---

4. Instrumentación para microscopía FLIM.....	370
5. Cultivo celular.....	372
6. Experimentos con microscopía FLIM.....	372
7. Análisis de imágenes.....	373
<b>REFERENCIAS BLOQUE B.....</b>	<b>375</b>
<b>GENERAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>395</b>
<b>ANEXOS</b>	

# **OBJETIVOS GENERALES**



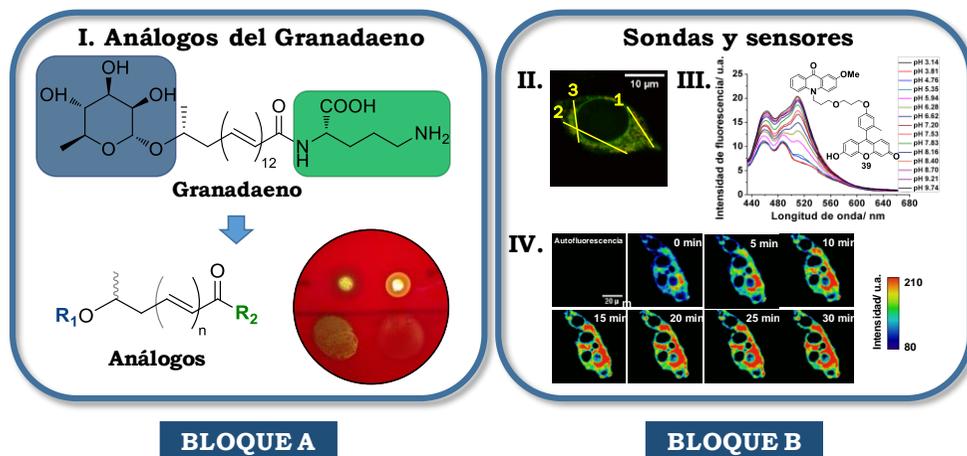
## OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral se subdividen en dos grupos en función de los dos bloques que constituyen la memoria.

Dentro del primer bloque A, que consta de un único capítulo titulado *I. Colorantes sintéticos análogos del Granadaeno*, los objetivos principales son llevar a cabo la síntesis y caracterización de colorantes análogos al pigmento Granadaeno con un número menor de dobles enlaces y distintos grupos terminales en ambos extremos para estudiar su actividad hemolítica en placas de agar-sangre. Así, sería posible establecer qué elementos estructurales favorecen la presencia o ausencia de actividad hemolítica, aportando nueva información del posible mecanismo de acción del pigmento que promueve la permeabilización de la membrana y, por tanto, la lisis de las células. Finalmente, en función de los resultados obtenidos en los estudios de hemólisis, el fin último es seleccionar uno de los análogos e iniciar un estudio de su empleo como posible vacuna preventiva contra la infección por estreptococo del grupo B (EGB).

El segundo bloque B, que consta de tres capítulos titulados respectivamente *II. Sondas fluorescentes dirigidas a distintos orgánulos celulares*, *III. Sensores de pH específicos para FLIM* y *IV. Sensores fluorescentes con longitudes de onda de emisión en el magenta*, presenta como objetivo general la síntesis, caracterización y empleo de diferentes colorantes fluorescentes con diversas aplicaciones de interés en el campo biomédico. Como primer objetivo se plantea sintetizar y caracterizar distintos tipos de sondas y sensores fluorescentes con grupos laterales neutros. Posteriormente, estudiar mediante técnicas de microscopía de fluorescencia sus aplicaciones como posibles herramientas versátiles para analizar a nivel celular desajustes en parámetros y analitos característicos en diferentes enfermedades. En concreto, en esta Tesis Doctoral se plantea diseñar sondas capaces de realizar un marcaje adecuado de determinados orgánulos y compartimentos celulares y sensores capaces de detectar variaciones de valores de pH intracelular e intramitocondrial, así como sensores útiles para

medir concentraciones de biotioles y aniones fosfato de forma dual y simultánea en el interior celular.



# **BLOQUE A**



**INTRODUCCIÓN**

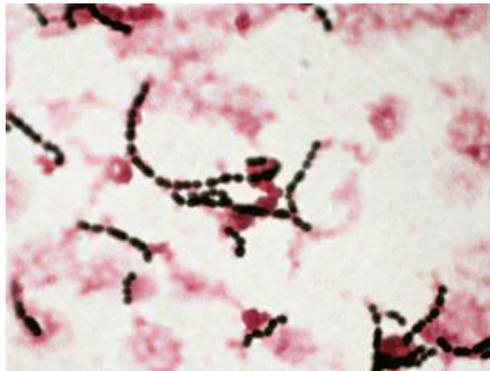
**BLOQUE A**



## INTRODUCCIÓN BLOQUE A

### 1. *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* o también conocido como estreptococo del grupo B (EGB) es una bacteria gram-positiva, anaerobia facultativa, catalasa y oxidasa negativa. Produce  $\beta$ -hemólisis cuando crece en medios que contienen sangre, observándose en forma de cadenas de longitud variable, mediante tinción de gram<sup>[1]</sup>, como se puede ver en la **Figura A.1**.



**Figura A.1.** Imagen de estreptococo del grupo B mediante tinción de gram.

Pertenece al grupo B dentro de la clasificación serológica de Lancefield<sup>[2]</sup> que desarrolló en base a los antígenos polisacáridos presentes en este tipo de bacterias. EGB, a su vez, posee una cápsula formada por distintos polisacáridos que permiten clasificarlos en serotipos, de los cuales actualmente se conocen 10 (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII<sup>[3],[4]</sup> y IX<sup>[5]</sup>). A lo largo del tiempo, la distribución de los serotipos ha ido variando, de manera que está muy influenciada por factores como la edad, la demografía o la etnia. En la actualidad, los de mayor prevalencia son Ia, Ib, II, III y VI<sup>[6]</sup>.

Se trata de una bacteria comensal, presente en la microbiota del tracto gastrointestinal de adultos y tracto genital de embarazadas. Aunque no ocasiona sintomatología en adultos sanos, puede colonizar de forma invasiva el tracto vaginal y/o rectal de manera transitoria, intermitente o crónica, convirtiéndose en un patógeno en adultos inmunodeprimidos, mujeres embarazadas y neonatos<sup>[1]</sup>.

### **1.1 Manifestaciones clínicas de la infección por *Streptococcus agalactiae***

En pacientes adultos con diabetes, inmunodeprimidos por enfermedades como el cáncer, VIH y cirrosis, entre otras, o en adultos mayores de 65 años<sup>[7],[8]</sup>, la infección se presenta en forma de bacteriemia de origen desconocido<sup>[9]</sup>, meningitis<sup>[10]</sup>, endocarditis<sup>[11]</sup> o bien, con menos frecuencia, como infección de tejidos blandos, usualmente la piel y las articulaciones<sup>[12],[13]</sup>. Respecto al porcentaje de incidencia en este sector de la población, no han sido muchos los estudios realizados, conociéndose que en Estados Unidos ha ido en aumento desde 7.3 casos en 2007<sup>[14]</sup> a 10.9 casos en 2016<sup>[15]</sup> de adultos infectados por cada 100000 personas, alcanzándose valores de 25 casos por cada 100000 en mayores de 65 años<sup>[16]</sup>.

En mujeres embarazadas se estima que, según el área geográfica, entre un 10 y un 30 % están colonizadas por EGB<sup>[17],[18]</sup>, lo que puede producirles infección de las vías urinarias, corioamnionitis, bacteriemia y endometritis postparto<sup>[19],[20],[21]</sup>. La tasa de incidencia a nivel mundial, según los estudios más recientes, varía entre 0.23 y 0.38 casos por cada 1000 mujeres embarazadas<sup>[16],[22]</sup>. De manera que dicha colonización de EGB durante el embarazo es un factor de riesgo que propicia la transmisión a los recién nacidos, lo cual es en la actualidad una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad neonatal<sup>[6],[23]</sup>. A grandes rasgos, puede ocasionar nacimientos prematuros, abortos espontáneos, muerte o daños fetales e infecciones<sup>[24],[25],[26]</sup>, considerándose, por ello, un problema de salud a nivel mundial.

En los neonatos, en función de en qué momento se pone de manifiesto la enfermedad ocasionada por la transmisión de EGB, se clasifica en Enfermedad Neonatal de Comienzo Precoz (ENCP) o Enfermedad Neonatal de Comienzo Tardío (ENCT)<sup>[27]</sup>.

La Enfermedad Neonatal de Comienzo Precoz (ENCP) se caracteriza porque la infección afecta al recién nacido durante las primeras horas de vida o los primeros 7 días. Se produce por transmisión de EGB en el periodo intrauterino por rotura de membranas ovulares o a través del canal del parto

(transmisión vertical)<sup>[28]</sup>, debido a la aspiración intraútero del líquido amniótico infectado u otras causas. El principal factor de riesgo, por tanto, para contraer ENCP, es la previa colonización materna por EGB<sup>[29]</sup>. La clínica que presentan los recién nacidos infectados es bacteriemia sin foco conocido, dificultad respiratoria, neumonía, meningitis (con menos frecuencia) y shock séptico en el peor de los casos<sup>[30],[31]</sup>. Presenta una tasa de incidencia y mortalidad variable en función de la zona geográfica, estimándose un valor de 0.49 casos por cada 1000 nacidos vivos<sup>[16]</sup> y una mortalidad que, en los países desarrollados ronda el 5 % pero puede llegar a alcanzar el 27 % en continentes como África<sup>[16]</sup>.

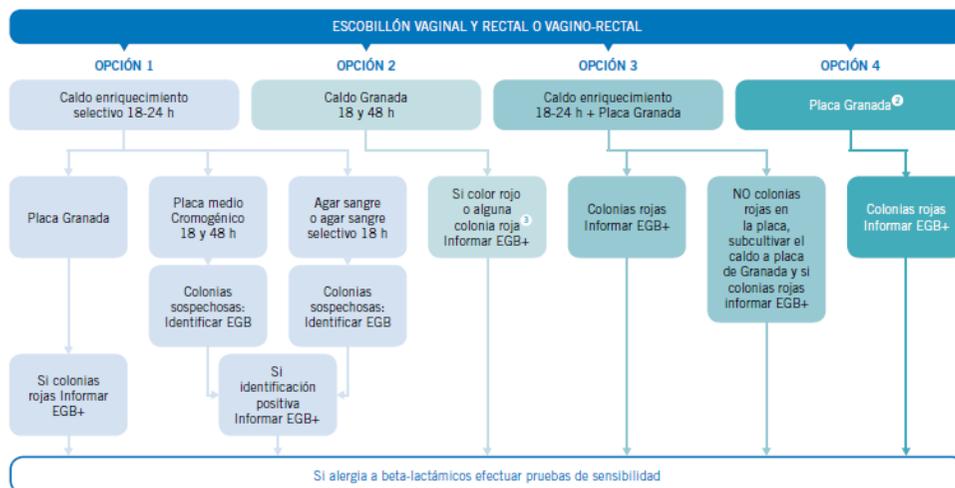
La Enfermedad Neonatal de Comienzo Tardío (ENCT), se caracteriza por aparición de síntomas a partir del séptimo día hasta los 90 días de vida. Se produce por la transmisión de dicha bacteria tras el parto, ya sea a través de la madre o fuentes nosocomiales<sup>[32]</sup>, leche materna o manejo del neonato inadecuado de los cuidadores, siendo el principal factor de riesgo la prematuridad<sup>[33]</sup>. Se presenta en forma de bacteriemia sin foco, infecciones urinarias, neumonía o infección del torrente sanguíneo que deriva en meningitis<sup>[28],[34]</sup>. En cuanto a las tasas de incidencia y mortalidad, aunque la incidencia estimada de ENCT es algo inferior que en ENCP, de 0.32 casos por cada 1000 nacidos vivos<sup>[16]</sup>, la tasa de mortalidad es superior, del 7 % a nivel mundial<sup>[16]</sup>.

## **1.2 Identificación de *Streptococcus agalactiae***

La identificación de esta bacteria se lleva a cabo utilizando distintas metodologías. Centrándonos en mujeres gestantes, desde hace años para evitar la transmisión de EGB a recién nacidos se han establecido protocolos de actuación a nivel nacional e internacional, que se han ido actualizando y mejorando para el control total de la enfermedad<sup>[35],[36],[37]</sup>. A día de hoy, la detección de la colonización por EGB se lleva a cabo en el tercer trimestre del embarazo, en torno a la semana 35-37. Para ello se toma una muestra de exudado vaginal (del tercio externo de la vagina) y anorrectal de la paciente<sup>[17]</sup>. A continuación, la muestra debe enviarse al laboratorio en un medio de transporte adecuado, manteniéndola en frío a unos 4 °C. Una vez allí, la

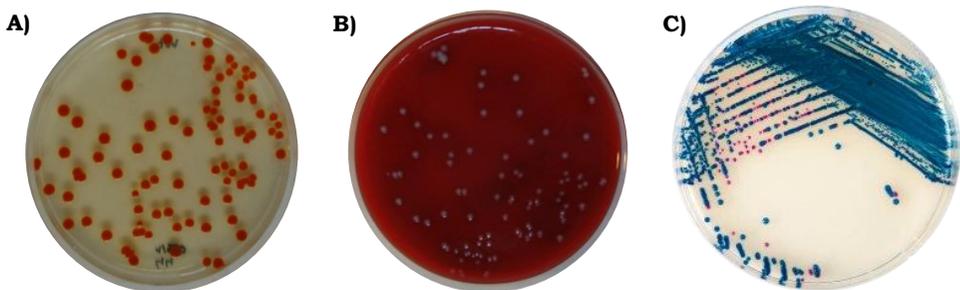
muestra se procesa mediante cultivos microbiológicos en distintos medios de cultivo<sup>[37]</sup>, o bien de forma directa y rápida mediante técnicas de biología molecular, como es la PCR<sup>[38]</sup>. En lo que respecta a los procedimientos microbiológicos están aceptadas distintas posibilidades de identificación, a elección, en función de la infraestructura del laboratorio, los cuales se describen a continuación<sup>[37]</sup>.

1. Inocular la muestra en medio líquido enriquecido para EGB (Todd Hewitt con colistina y nalidixico o gentamicina y nalidixico) e incubar en anaerobiosis de 18-24 horas. Después subcultivar en una placa de medio Granada<sup>[39]</sup>, en placa de agar-sangre o en una placa de medio cromogénico.
2. Inocular la muestra directamente en medio Granada<sup>[39],[40]</sup> e incubar en aerobiosis 18 horas. Si no hay indicios de EGB, se reincuba 24 horas más para asegurarse de que el resultado es negativo.
3. Inocular la muestra en medio líquido enriquecido para EGB y sembrar en una placa de agar-Granada.
4. Sembrar directamente en placas de medio Granada e incubar en anaerobiosis durante 48 horas.



**Figura A.2.** Opciones de cultivo en la identificación de EGB de muestras vagino-rectales de mujeres embarazadas<sup>[37]</sup>.

De forma general, la presencia de estreptococo del grupo B se pone de manifiesto mediante la formación de colonias con coloración anaranjada-rojiza cuando crece en medio Granada, como puede verse en la **Figura A.3 A)**. Por el contrario, en ausencia de este tipo de colonias anaranjadas, se determina que el resultado es la ausencia de EGB. En cambio, en el procedimiento 1, si se subcultiva la muestra en placas agar-sangre o de medio cromogénico el resultado es positivo para EGB si aparecen colonias blanquecinas con presencia de  $\beta$ -hemolisis (**Figura A.3 B)**) que serían identificadas mediante tecnología MALDI-TOF<sup>[41]</sup> o colonias teñidas de distintos colores según el medio cromogénico empleado, respectivamente (**Figura A.3 C)**).



**Figura A.3.** Detección de EGB. **A)** Placa de agar-Granada inoculada por una muestra vaginal de una paciente embarazada colonizada por EGB, **B)** Placa de agar-sangre de una paciente colonizada por EGB y **C)** Placa de agar-medio cromogénico de una paciente colonizada por EGB.

### 1.3 Estrategias de prevención de la infección por EGB

Una vez confirmada la presencia de la bacteria, como puede verse en la **Figura A.3**, u obtener resultados positivos mediante técnicas de biología molecular, la medida de prevención que se aplica desde hace años es la profilaxis antibiótica intraparto (PAI)<sup>[42],[43]</sup>. Esta consiste en una administración intravenosa de antibióticos durante al menos 4 horas antes de dar a luz, utilizando usualmente penicilina o ampicilina<sup>[17]</sup>. Sin embargo, esta medida es eficaz para prevenir la ENCP en un 80 % de los casos<sup>[44]</sup>, pero no la ENCT<sup>[45]</sup>. Además, cabe destacar que cada vez son más numerosos los casos en los que las pacientes presentan sensibilidad a este tipo de antibióticos beta-lactámicos, haciéndose necesario el uso de otros

antibióticos alternativos como la clindamicina o eritromicina cuya eficacia es inferior, o la cefazolina<sup>[42]</sup>, que ofrece una eficacia muy similar a la penicilina y ampicilina<sup>[46]</sup>. A su vez, ha aumentado la incidencia de aparición de cepas de EGB resistentes a ciertos antibióticos como la eritromicina y clindamicina<sup>[47]</sup>. Por todo ello, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de medidas alternativas que permitan prevenir la infección por EGB tanto en los casos de ENCP como en los de ENCT.

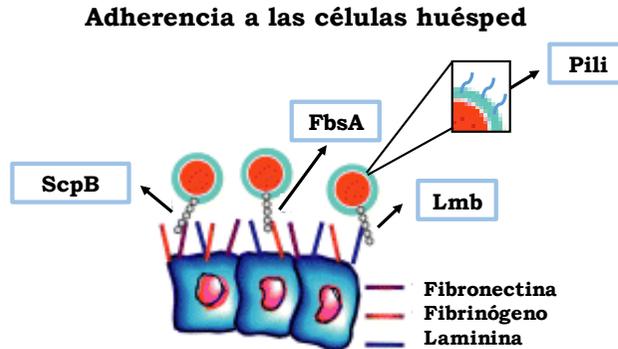
#### **1.4 Factores de virulencia**

En cuanto a los factores de virulencia de EGB se han identificado muchos<sup>[48]</sup>, los cuales están directamente relacionados con la patogenicidad de la bacteria que provoca la enfermedad. En este sentido, un conocimiento exhaustivo de ellos puede favorecer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas alternativas, como la vacunación, para prevenir dicha infección bacteriana.

A continuación, se describen los factores de virulencia más relevantes entre los que destacan la capacidad de adherencia e invasión de EGB a las células huésped y la evasión de la respuesta inmunológica.

##### **1.4.1 Adherencia de EGB a las células huésped**

En primer lugar, la correcta adherencia de EGB en la superficie de las células huésped, ya sean células epiteliales vaginales, epiteliales o endoteliales de pulmón o endoteliales microvasculares, es un factor de virulencia de gran importancia a la hora de facilitar la adhesión del microorganismo de forma invasiva<sup>[48]</sup>. Como se muestra en la **Figura A.4** tanto las proteínas de la superficie de EGB como los pili son estructuras que favorecen dicha adhesión a las células huésped.



**Figura A.4.** La adherencia de EGB a las células huésped promovida por proteínas de superficie y los pili como factor de virulencia. Figura adaptada desde<sup>[49]</sup> con permiso de Molecular Microbiology.

#### 1.4.1.a) Proteínas de la superficie de EGB

EGB establece una primera interacción entre proteínas de su superficie como son la FbsA<sup>[50]</sup>, ScpB<sup>[51]</sup>, y Lmb<sup>[52]</sup> con moléculas de la matriz extracelular, fibrinógeno, fibronectina y laminina, respectivamente. A continuación, la unión se hace efectiva ya que las moléculas de la matriz extracelular están unidas a las proteínas integrinas de la superficie de las células huésped<sup>[53]</sup>. Además de esta interacción existen otras estructuras, como los pili, que facilitan su adhesión y se describen a continuación.

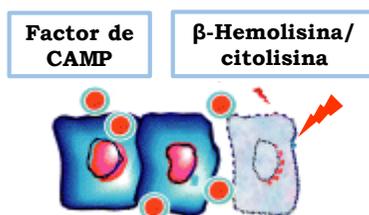
#### 1.4.1.b) Pili

Los pili son apéndices filamentosos de pequeño tamaño que se expresan en la superficie celular del estreptococo del grupo B<sup>[54]</sup>. Son estructuras que favorecen la adhesión, colonización e invasión de bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas, incluida EGB<sup>[55],[56]</sup>. En esta bacteria en concreto se han identificado dos loci genómicos distintos denominados *Pilus Islands* 1 y 2<sup>[57]</sup>, que son los que albergan los genes que codifican las proteínas necesarias para la formación de estas estructuras<sup>[58]</sup>.

### 1.4.2 Invasión de EGB

El estreptococo del grupo B codifica dos toxinas, el factor de Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) y la  $\beta$ -hemolisina/citolisina, las cuales, al permeabilizar las membranas de las células, favorecen la entrada del patógeno en las células huésped y la diseminación sistémica como puede verse en la **Figura A.5**<sup>[59]</sup>.

#### Invasión de las células huésped



**Figura A.5.** Invasión de EGB favorecida por toxinas que permeabilizan las membranas plasmáticas celulares como factor de virulencia. Figura adaptada desde<sup>[49]</sup> con permiso de Molecular Microbiology.

#### 1.4.2.a) Factor de CAMP

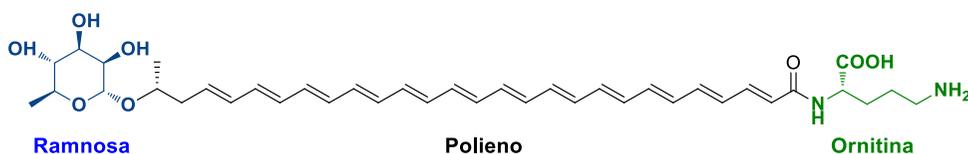
El factor de CAMP es una proteína secretada por *Streptococcus agalactiae* que provoca la lisis celular al dañar la membrana de forma directa o por formación de poros discretos en las células diana. Se conoce que puede actuar a través de dos mecanismos de acción<sup>[60]</sup>, uno alterando la estructura de la membrana por hidrólisis enzimática de los fosfolípidos y otro, formando canales a través de la membrana, previo anclaje de la proteína con los receptores de membrana, denominados glicosilfosfatidilinositoles<sup>[61]</sup>. Esto favorece el paso de moléculas pequeñas como iones y metabolitos e impide el paso de moléculas de mayor tamaño, aumentando la presión osmótica intracelular y ocasionando la muerte celular.

#### 1.4.2.b) $\beta$ -hemolisina/citolisina

La  $\beta$ -hemolisina de EGB es una toxina con actividad hemolítica y citolítica que induce la permeabilización de las membranas de las células

huésped, lo cual favorece la penetración de EGB, de forma que provoca la lisis de las células infectadas por este patógeno<sup>[48],[62],[63],[64]</sup>. Se trata de una molécula que es codificada por el gen *cyIE*<sup>[65]</sup>, cuya naturaleza bioquímica ha sido una incógnita hasta hace unos años debido a la dificultad que supone su purificación<sup>[66]</sup>.

En un principio se postuló que podía tratarse de una proteína que requería contacto directo para inducir la lisis celular<sup>[67]</sup>. Años más tarde, determinados estudios sugirieron que dicha hemolisina mostraba cierta conexión con un pigmento de color naranja-rojizo que también está presente en EGB<sup>[68]</sup>. La estructura de dicho pigmento pudo ser elucidada por primera vez en 2006 gracias a una colaboración llevada a cabo entre el *Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves*, el *Centro de Instrumentación Científica* y nuestro grupo de investigación en *Química Orgánica de la Universidad de Granada*. Su purificación y elucidación fueron bastante complejos, de forma que mediante el uso de técnicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, se llegó a la conclusión de que el pigmento purificado, se trataba de un ramnopolieno ornitina al que se denominó Granadaeno<sup>[69]</sup> y no un caroteno como indicaron en estudios previos<sup>[70]</sup>.



**Figura A.6.** Estructura del Granadaeno.

A continuación, tras conocer su estructura se continuó indagando en la relación existente entre la hemolisina y el pigmento. Para ello se realizaron estudios que determinaron que el Granadaeno presentaba tanto actividad hemolítica como actividad citolítica<sup>[71]</sup>. Basándose en estos resultados y en que los genes que codifican la actividad de la hemolisina<sup>[72]</sup> son coincidentes con los que codifican enzimas involucradas en la síntesis de polienos<sup>[73]</sup>

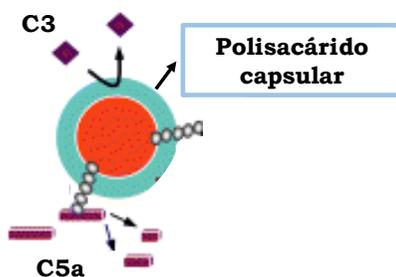
recientemente se ha postulado que la  $\beta$ -hemolisina y el Granadaeno son moléculas idénticas<sup>[71]</sup> o al menos que están muy relacionadas<sup>[68]</sup>.

En cuanto a su mecanismo de acción existe cierta controversia en el modo en el que tiene lugar la permeabilización de las membranas plasmáticas de las células huésped afectadas y su posterior lisis celular. Por un lado se conoce que esto podría ser debido a la formación de poros transmembrana<sup>[48]</sup> y por otro, como indicaron estudios recientes, a la inserción del pigmento atravesando la bicapa de fosfolípidos favoreciendo el flujo de iones<sup>[74]</sup>.

### 1.4.3 Factores que favorecen la evasión inmunológica

Una vez los neonatos se infectan por EGB, el organismo, en condiciones normales, genera una respuesta inmunológica con la finalidad de eliminar la infección. Esta respuesta se caracteriza por un bloqueo del contagio por la bacteria mediante generación de anticuerpos específicos contra la misma y actuación de células del sistema inmune, como macrófagos y neutrófilos, capaces de eliminar el agente patógeno mediante fagocitosis. Sin embargo, en muchas ocasiones, los recién nacidos presentan una importante deficiencia de anticuerpos especialmente los nacidos de forma prematura. A su vez, EGB presenta factores como la constitución de su cápsula por polisacáridos capsulares los cuales, como se muestra de forma esquemática en la **Figura A.7**, impiden una adecuada respuesta inmune del organismo, por lo que la suma de ambos factores promueve la evasión inmunológica<sup>[53]</sup>.

#### Evasión inmunológica



**Figura A.7.** Evasión inmunológica como factor de virulencia promovida por el polisacárido capsular. Figura adaptada desde<sup>[49]</sup> con permiso de Molecular Microbiology.

### 1.4.3.a) Polisacárido capsular

El polisacárido capsular (PC) es uno de los factores que posee la bacteria que evade los mecanismos de defensa de las células ante un patógeno<sup>[75]</sup>. Se trata de un componente clave de la cápsula que envuelve EGB, el cual puede adquirir diferentes estructuras dando lugar a 10 serotipos distintos. Estos serotipos se diferencian en variaciones en la disposición de 4 monosacáridos (glucosa, galactosa, *N*-acetilglucosamina y ácido siálico) y se asemejan en que todos ellos contienen un grupo ácido siálico terminal unido a galactosa con un enlace  $\alpha$  2→3. En este sentido, en condiciones normales el sistema inmune reconoce los microorganismos y facilita su fagocitosis mediante un sistema de reacciones enzimáticas denominado complemento. Sin embargo, hay estudios que muestran que dicha molécula de ácido siálico promueve la actividad antifagocítica impidiendo la deposición del complemento 3 (C3) en la superficie celular, lo que provoca una menor producción de C5a<sup>[76]</sup> ocasionando la reducción de la movilización de neutrófilos y provocando, por tanto, una respuesta inmune deficiente<sup>[53]</sup> (**Figura A.7**).

## 2. Estrategia de prevención de la infección por EGB alternativa: vacunación

Como se ha mencionado previamente, la estrategia de prevención que se aplica para evitar la enfermedad neonatal por EGB, hasta día de hoy, es la administración intravenosa de antibióticos horas antes del parto. Sin embargo, hay casos en los que esta medida no es viable, como en adultos infectados, mujeres embarazadas en las que la PAI está contraindicada o neonatos con ENCT para los que no hay ninguna medida similar que se les puede aplicar<sup>[44],[77]</sup>. Asimismo, a ello se le suma la gran variedad de factores de virulencia que inducen la patogenicidad de esta bacteria convirtiéndose en posibles dianas contra las que actuar.

De ahí que, desde hace años, se haya optado por el desarrollo de una vacuna como estrategia alternativa. Dichas vacunas podrían ser útiles como prevención de la infección invasiva por EGB<sup>[78]</sup>, ofreciendo protección mediante la generación de anticuerpos frente a un antígeno adecuado, solución que sería aplicable a todo tipo de pacientes<sup>[79]</sup>. Como consecuencia

de la importancia de este asunto, en 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó como prioritario el desarrollo de una vacuna contra estreptococo del grupo B<sup>[80]</sup>.

A continuación, se describen algunas de las propuestas que se han desarrollado hasta el momento<sup>[44],[79]</sup>.

## **2.1 Vacunas polisacáridas**

Las vacunas polisacáridas son el primer tipo de vacuna que se propuso como estrategia alternativa para prevenir la infección neonatal por EGB. Como su nombre indica, están constituidas por uno de los serotipos del polisacárido capsular purificado que funciona como antígeno. Su diseño es similar al de una vacuna tradicional, que consiste en aislar, inactivar e inyectar el agente causante de la enfermedad<sup>[81]</sup>, en este caso PC, con la finalidad de inducir la producción de anticuerpos específicos contra dicho PC, como método de inmunización contra EGB<sup>[82]</sup>.

Su planteamiento se basó en estudios realizados por Lancefield ya en los años 30, en los que obtuvo indicios de que los ratones con los que experimentó quedaban protegidos frente a infecciones de estreptococo del grupo B mediante el uso de anticuerpos monoclonales de PC obtenidos de suero de conejo<sup>[83]</sup>.

Asimismo, se han realizado ensayos clínicos en fase I utilizando este tipo de vacunas tanto en adultos sanos como en mujeres embarazadas. En ellos se utilizaron los polisacáridos purificados de tipo Ia, II o III y se determinó que las vacunas fueron seguras y bien toleradas. Sin embargo la respuesta inmune que proporcionaron podría ser mejorada<sup>[79],[84]</sup>.

## **2.2 Vacunas conjugadas polisacáridas-proteína**

Las siguientes vacunas en desarrollo fueron las constituidas por una combinación entre un polisacárido capsular purificado y proteínas inmunógenas, con la finalidad de intentar incrementar la respuesta inmune<sup>[79]</sup>. Algunos de los ejemplos de este tipo de vacunas son la conjugación monovalente de uno o varios de los serotipos de PC (Ia, Ib, II, III

y V) con la proteína de toxoide tetánico (TT)<sup>[85],[86]</sup> o bien con la proteína mutante no tóxica de la toxina diftérica (CRM<sub>197</sub>)<sup>[87]</sup>.

Ensayos clínicos realizados en mujeres embarazadas en fase I y II utilizando una vacuna contra el serotipo III conjugada con toxoide tetánico en el tercer trimestre de embarazo, dieron lugar a resultados muy buenos. Las vacunas fueron seguras y bien toleradas y proporcionaron una respuesta inmune 4 semanas después de la inmunización la cual se mantuvo hasta los dos meses después del parto. Además, se observó una cantidad importante de anticuerpos frente a EGB en recién nacidos tras analizar los cordones umbilicales, los cuales fueron adquiridos mediante transferencia transplacentaria<sup>[88]</sup>.

Sin embargo, el inconveniente principal que surge tanto en el caso de las vacunas de polisacáridos como en las vacunas conjugadas, es que cada vacuna está diseñada y es específica para un serotipo de EGB. Así, al existir cepas que según factores como la zona geográfica expresan uno u otro serotipo de PC, una misma vacuna no es efectiva a nivel mundial. Para ello sería necesario el diseño de vacunas multivalentes, que contengan todos los serotipos de PC o al menos los de mayor prevalencia. En este sentido uno de los ejemplos de vacuna multivalente más efectiva hasta la fecha es la vacuna trivalente glicoconjugada que genera respuesta inmune frente a los serotipos Ia, Ib y III. Esta fue probada en un ensayo clínico en 2016 en el que se obtuvieron buenos resultados de tolerancia y se comprobó la aparición de anticuerpos a los 30 días de la inmunización que seguían presentes 91 días después del parto<sup>[89]</sup>.

### **2.3 Vacunas proteicas**

Las vacunas proteicas contra estreptococo del grupo B están constituidas por antígenos proteicos de EGB que han sido identificados de forma inversa como importantes dianas de vacunación<sup>[79]</sup>. Se trata de un enfoque diferente a los mencionados previamente, independiente de la variedad de serotipos del polisacárido capsular. Este tipo de diseño, basado en la vacunología inversa, se abordó por primera vez en el año 2000<sup>[90]</sup> y ha sido de gran utilidad para el diseño de vacunas en la última década, como la

vacuna contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*<sup>[91],[92]</sup>, la cual ha sido comercializada por el laboratorio Novartis, con el nombre de Bexsero<sup>[93]</sup>.

En el caso concreto de EGB, tres de los antígenos identificados son componentes estructurales de los pili, los cuales como ya se ha mencionado previamente están implicados en la adhesión efectiva de esta bacteria<sup>[54]</sup>. De forma que una vacuna basada en ellos puede ser una buena opción, aplicable a todas las cepas de EGB sin distinción del serotipo que exprese. En relación a ello, ya han sido realizados ensayos utilizando este tipo de vacuna con unos porcentajes de protección del 94 % frente a cepas de EE.UU. e Italia<sup>[94]</sup>.

## 2.4 Vacunas futuras

A pesar de los avances llevados a cabo en estos últimos años, la mayoría de los estudios como posibles vacunas contra EGB no han llegado a la última fase. Uno de los motivos es la dificultad de la realización de este tipo de ensayos en mujeres embarazadas debido al rechazo que supone la vacunación en ese estado. Otro de los motivos es la baja incidencia de la enfermedad en neonatos en la actualidad, por lo que en muchas ocasiones no se tienen suficientes casos para realizar un estudio en profundidad<sup>[79]</sup>.

En este sentido, la perspectiva futura es seguir realizando ensayos de vacunas que han apuntado a una mayor efectividad, como son las vacunas multivalentes y proteicas y, a su vez, debido a la amplia gama de factores de virulencia que presenta EGB, diseñar nuevas vacunas contra dichos factores como dianas<sup>[95]</sup>.

Un claro ejemplo es el estudio de vacunas utilizando como diana la  $\beta$ -hemolisina responsable de la lisis total de las células, lo cual no se ha planteado hasta el momento probablemente por el escaso conocimiento de su naturaleza y de su mecanismo de acción. En cambio, una vacuna de este tipo podría solventar varios problemas que surgen del uso de las vacunas descritas previamente. Entre las ventajas que presentaría es que sería independiente de la variabilidad serotípica del PC y que estaría dirigida a uno de los factores de patogenicidad más importantes de EGB, la  $\beta$ -hemolisina/citolisina.

# **CAPÍTULO I.**

Colorantes sintéticos  
análogos del Granadaeno



## I. COLORANTES SINTÉTICOS ANÁLOGOS DEL GRANADAENO

### I.1. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado en la *Introducción del Bloque A*, los estudios sobre el desarrollo de vacunas para la prevención de la infección neonatal de estreptococo del grupo B son numerosos. La mayoría de estas vacunas se han diseñado contra los distintos serotipos del polisacárido capsular<sup>[84],[85],[86],[87],[89]</sup> o contra los pili<sup>[94]</sup>. Sin embargo, EGB presenta una gran variedad de factores de virulencia que podrían ser utilizados como dianas en el desarrollo de nuevas vacunas de mayor efectividad, independientes de la variabilidad de los serotipos del PC<sup>[95]</sup>.

Entre ellos la  $\beta$ -hemolisina/citolisina, responsable de la lisis total de las células infectadas por EGB, podría ser una buena candidata ya que se trata de uno de los principales factores de patogenicidad de dicha bacteria. Sin embargo, hasta hoy día no se ha diseñado ninguna vacuna utilizando este factor de virulencia como diana. Esto es debido al desconocimiento de su naturaleza y su mecanismo de acción al detalle como consecuencia de su difícil purificación<sup>[66]</sup>. Como ya se ha descrito, hay indicios que sugieren la existencia de una conexión entre dicha hemolisina y el pigmento denominado Granadaeno también presente en EGB. Existen estudios recientes en los que se ha demostrado que el Granadaeno muestra tanto la actividad hemolítica como la actividad citolítica propias de la hemolisina y que han determinado que el polieno y la hemolisina son moléculas idénticas<sup>[71]</sup> o al menos muy relacionadas<sup>[68]</sup>.

En este sentido, como se verá a continuación, son numerosos los ejemplos de polienos que están presentes en bacterias los cuales, al igual que el Granadaeno, son los responsables de la lisis celular inducida por la permeabilización de las membranas plasmáticas.

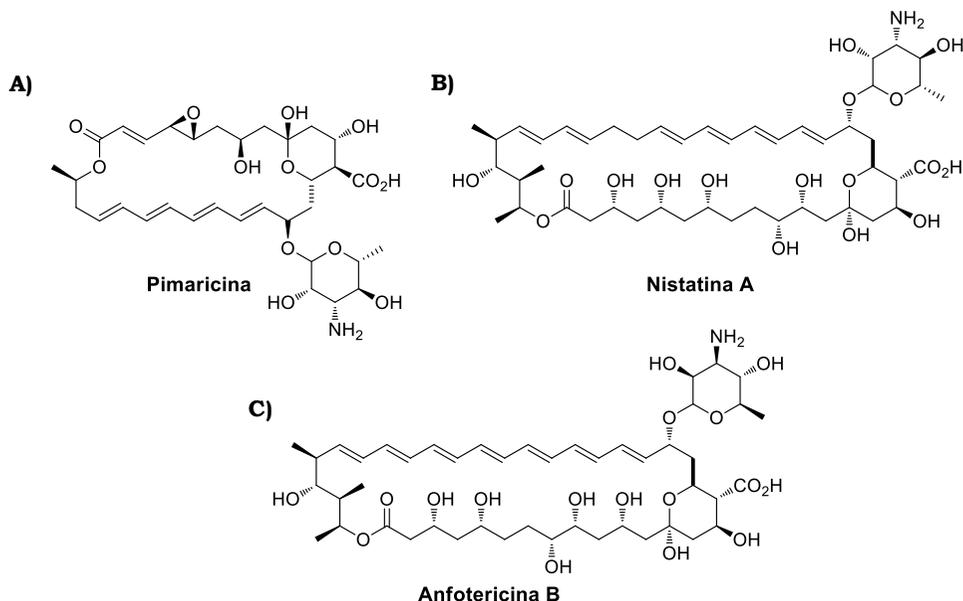
#### I.1.1. Polienos presentes en bacterias

En la actualidad se conocen una gran variedad de productos naturales, entre ellos los polienos, que están presentes en diferentes tipos de bacterias

y han sido estudiados en mayor profundidad tras su aislamiento de distintas especies de *Streptomyces* spp. En general dichas cadenas poliénicas forman parte de estructuras más complejas como los polienos macrólidos, manumicinas y disorazoles entre otros, o bien se encuentran en forma lineal como la Xantomonadina I o la Linearmicina A<sup>[96]</sup>.

En relación a ello, los polienos macrólidos son el grupo de mayor importancia, y está constituido por numerosos compuestos. En cuanto a su estructura general están formados por lactonas macrocíclicas con una cadena poliénica de entre 3 y 7 dobles enlaces conjugados con configuración *trans*, una subunidad de poliol con varios grupos hidroxilo y un azúcar, usualmente la *D*-micosamina<sup>[97]</sup>. Se trata de moléculas con carácter anfipático ya que están formadas por una parte hidrofóbica (la cadena poliénica) y una parte hidrofílica (la cadena de poliol y la *D*-micosamina). A su vez, se clasifican en función del número de dobles enlaces conjugados en trienos, tetraenos, pentaenos, hexaenos y heptaenos, siendo preferentemente los de mayor longitud los que son capaces de inducir la permeabilización de membranas plasmáticas celulares<sup>[98]</sup>.

En relación a su aplicación, algunos de los compuestos pertenecientes a esta familia como la Pimaricina, Nistatina A y Anfotericina B, cuyas estructuras se muestran en la **Figura I.1**, se emplean como medicamentos antimicóticos desde hace décadas por su alta eficacia contra un amplio espectro de hongos<sup>[99]</sup>. Dicha actividad antifúngica está relacionada con la capacidad que tienen estos polienos de ocasionar la permeabilización de las membranas plasmáticas de las células fúngicas conllevando a la lisis celular de las mismas<sup>[100]</sup>. Sin embargo, presentan inconvenientes como su elevada toxicidad y su difícil administración ya que son muy insolubles en medio acuoso<sup>[101],[102]</sup>.



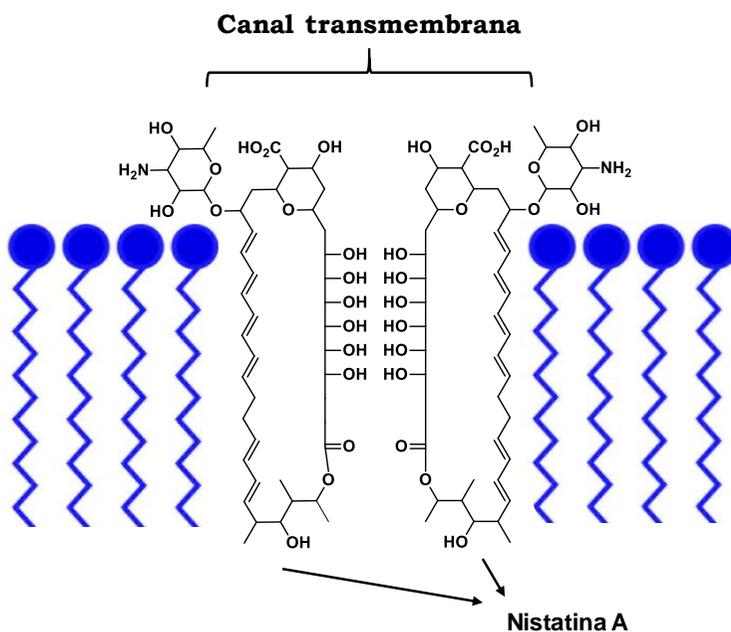
**Figura I.1.** Estructura de polienos macrólidos. **A)** Pimaricina, **B)** Nistatina A y **C)** Anfotericina B.

### I.1.1.1. Mecanismos que favorecen la permeabilización de membranas

Desde hace décadas son numerosos los estudios que han indicado que la manera en la que los polienos favorecen la permeabilización de las membranas es mediante la formación de canales. Sin embargo, sigue existiendo cierta controversia en si la formación de los mismos se debe únicamente a la naturaleza anfipática de los polienos macrólidos o es necesario a la hora de desestabilizar la membrana su interacción con esteroides, principalmente ergosterol. A su vez, autores como Gray *et al.*<sup>[103]</sup> y Anderson *et al.*<sup>[104]</sup> indican que la actividad fungicida puede deberse únicamente a la simple interacción de polienos como la anfotericina B con el ergosterol presente en la bicapa lipídica de las células fúngicas<sup>[98]</sup>,<sup>[105]</sup>,<sup>[106]</sup>,<sup>[107]</sup>, sin necesidad de formación de canales transmembrana, siendo suficiente para provocar la lisis celular.

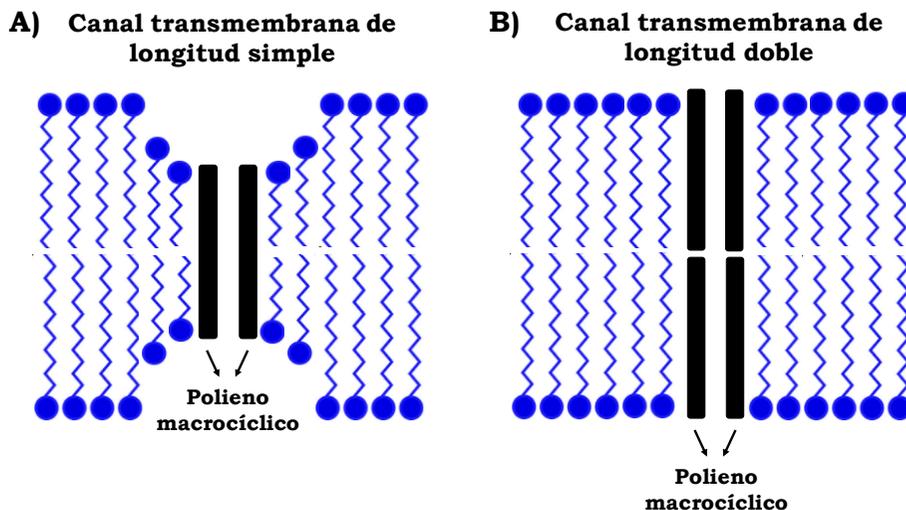
En este sentido, independientemente de si existe o no interacción con dichos ergosteroides, el mecanismo de formación de poros se basa en que los polienos macrólidos son capaces de atravesar la bicapa lipídica de la

membrana plasmática gracias a su carácter anfipático originando la formación de canales. Como puede verse en la **Figura I.2**, la parte hidrofóbica de la molécula, es decir, la cadena poliénica queda orientada hacia los lípidos que constituyen la membrana mientras que la cadena hidrofílica o cadena de poli-ol se dispone en sentido contrario hacia el interior del canal formado<sup>[98]</sup>.



**Figura I.2.** Canal transmembrana formado por inserción del polieno macrocíclico Nistatina A.

Esto puede tener lugar de dos formas, o bien el polieno induce el adelgazamiento de la membrana lipídica haciendo posible el atravesarla en su totalidad originando canales de longitud simple (**Figura I.3 A**) o es necesario la unión de dos medios poros sin necesidad de cambios conformacionales de la membrana dando lugar a canales de longitud doble (**Figura I.3 B**)<sup>[98]</sup>. En bibliografía se pueden encontrar ejemplos de ambos tipos de canales formados por Nistatina A<sup>[108]</sup> o Anfotericina B<sup>[109]</sup>, entre otros.

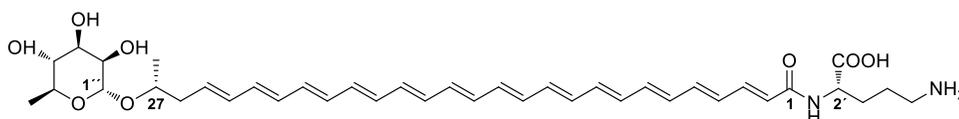


**Figura I.3.** Tipos de canales formados por un polieno macrólido de estructura concreta. **A)** Canal de longitud simple y **B)** Canal de longitud doble.

De esta manera tiene lugar un transporte descontrolado de cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  a través de los canales ocasionando la permeabilización de la membrana y produciendo la lisis de las células fúngicas infectadas<sup>[100],[102]</sup>.

### I.1.2. Granadaeno

El Granadaeno, como se muestra en la **Figura I.4**, a diferencia de los polienos macrólidos, es un polieno lineal constituido por una cadena larga de 12 dobles enlaces conjugados a lo que debe su aspecto rojizo, aparentemente todos ellos con estereoquímica *trans* (*E*), un azúcar, *L*-ramnosa, en uno de los extremos y un aminoácido, *L*-ornitina, en el extremo opuesto<sup>[69]</sup>.



**Figura I.4.** Estructura del pigmento Granadaeno.

Su peso es de 676-Da y su espectro de absorción se caracteriza por tres picos a 455, 485 y 525 nm a pH ácido (similar al de un caroteno) y un único pico a 420 nm a pH básico<sup>[69]</sup>.

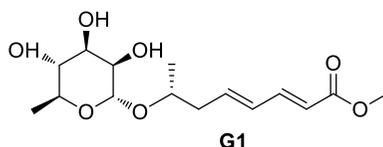
Su estructura fue elucidada en el año 2006 tras purificarlo mediante un proceso complicado que se dividió en varios pasos. En primer lugar, se incubó a 36 °C una cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 en matraces de tipo erlenmeyers con un medio de cultivo específico denominado medio Granada<sup>[39]</sup>. Se mantuvieron en agitación durante aproximadamente 2-3 días. Una vez transcurrido el tiempo, el medio adquirió coloración rojiza y se procedió a la recuperación del pellet bacteriano por centrifugación. Tras retirar el sobrenadante se extrajo el pigmento con hidróxido potásico 0.1 M. A continuación, se añadió una disolución de metanol-HCl 1 M al extracto obteniéndose un precipitado de color rojo que posteriormente se lavó con dimetilsulfóxido y se disolvió en una mezcla de dimetilsulfóxido y ácido trifluoroacético al 0.1 % (DMSO-TFA). Con motivo de su elevado grado de insolubilidad no fue posible disolverlo en otros disolventes orgánicos. Después se precipitó de nuevo en un matraz abierto en un desecador y se volvió a redisolverse con la finalidad de pasarlo por cromatografía en columna de gel-filtración y analizarlo finalmente mediante técnicas espectroscópicas como RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, experimentos bidimensionales (COSY y HSQC), espectroscopía UV-visible y espectrometría de masas<sup>[69]</sup>.

#### **I.1.2.1. Aspectos estructurales del Granadaeno**

Una vez purificado el Granadaeno y propuesta su estructura, aún quedaban algunos aspectos estructurales relevantes por elucidar. Entre ellos, se desconocía la configuración absoluta del carbono C-27, la estereoquímica del carbono anomérico 1'' y la naturaleza del enlace que mantenía unida la *L*-ornitina al resto de la estructura.

En este sentido, lo adecuado sería sintetizar la estructura del Granadaeno natural tanto para determinar su estructura de forma inequívoca como para poder estudiar su mecanismo de acción. Sin embargo, debido a su difícil manejo ya que es un compuesto muy insoluble, hidrofóbico e inestable por el elevado número de dobles enlaces presentes en su estructura, a día de hoy ningún grupo de investigación ha sido capaz de sintetizarlo.

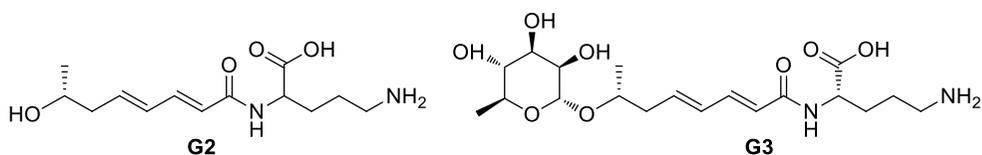
En su lugar, en el año 2012 nuestro grupo de investigación propuso la síntesis de análogos con estructuras similares, que sirvieran de ayuda para aclarar dichos aspectos estructurales. Para ello, primero se intentó elucidar la configuración absoluta del carbono C-27 y la estereoquímica del carbono anomérico 1'' mediante la síntesis del derivado G1 el cual aparece en la **Figura I.5**<sup>[110],[111]</sup>.



**Figura I.5.** Análogo sintético del Granadaeno G1.

Este análogo, como se puede ver presenta únicamente dos dobles enlaces y un entorno químico similar a la estructura del Granadaeno natural. Se sintetizó utilizando como material de partida el (3*R*)-hidroxibutanoato de metilo enantioméricamente puro y, una vez preparado, se analizó mediante espectroscopía de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Luego, tras comparación de los datos espectroscópicos de dicho derivado y el Granadaeno original, se observó la similitud de las señales entre ambos llegando a la conclusión de que la configuración absoluta del carbono C-27 es *R* y confirmando la presencia de *L*-ramnosa con el carbono anomérico 1'' con configuración  $\alpha$ <sup>[111]</sup>.

A continuación, se sintetizaron otros dos derivados del Granadaeno (**Figura I.6**) con el objetivo de determinar la naturaleza de la unión de la *L*-ornitina con el resto de la estructura y corroborar, mediante comparación de datos espectroscópicos de nuevo, cada uno de los aspectos estructurales descubiertos.



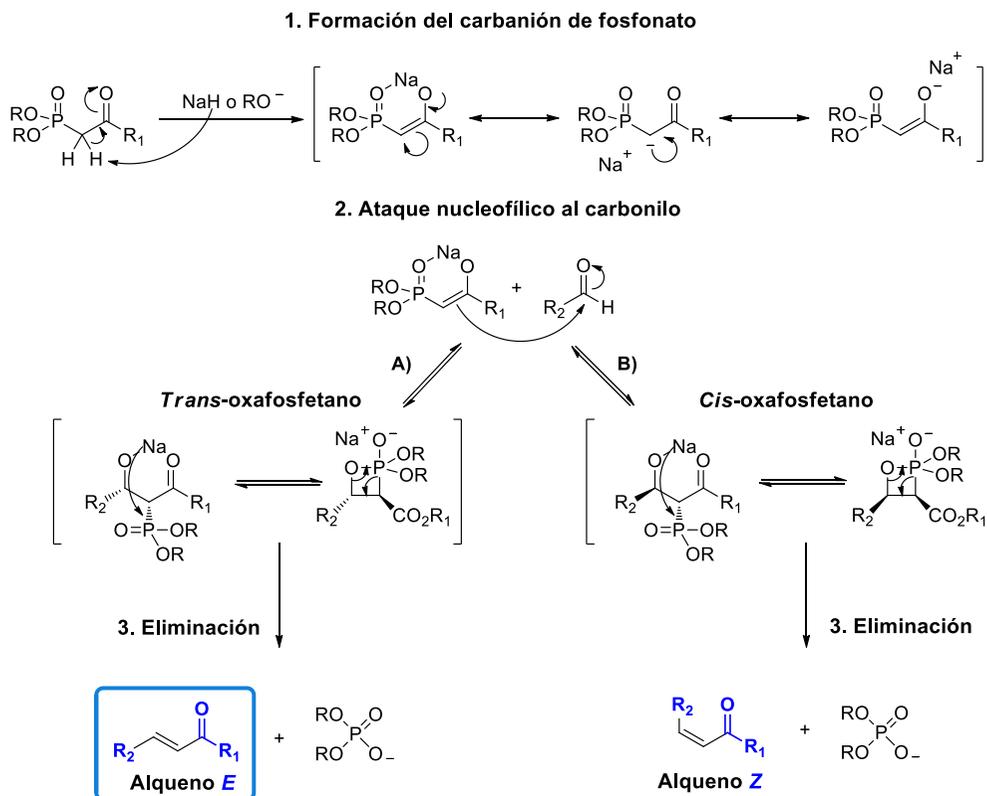
**Figura I.6.** Análogos sintéticos del Granadaeno G2 y G3.

Así, con ayuda de G2, se confirmó la presencia del aminoácido *L*-ornitina en la estructura del Granadaeno original y que esta se mantiene unida al resto de la molécula mediante un grupo amino situado en posición 2'. A su vez, G3 sirvió para corroborar cada uno de los aspectos estructurales debido a la coincidencia de las señales de RMN entre esta estructura y el pigmento natural<sup>[111]</sup>.

Hasta el momento los únicos análogos del Granadaeno que se han sintetizado son los mostrados anteriormente, los cuales se prepararon mediante reacciones de olefinación de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)<sup>[112],[113],[114]</sup>. A pesar de existir variedad de metodologías para sintetizar polienos<sup>[96]</sup>, se eligió este tipo debido a que los dobles enlaces formados en este caso preferentemente son esteroisómeros *E* y, por tanto, al utilizar esta estrategia, los análogos sintéticos son lo más parecidos estructuralmente al Granadaeno natural.

La reacción de HWE, se emplea habitualmente en química orgánica para la formación de dobles enlaces con estereoquímica *E* (*trans*-olefinas). Consiste en el acoplamiento aldehídos o cetonas con carbaniones de fosfonatos obteniéndose como producto final ésteres  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados en los que tiene lugar la formación de un nuevo doble enlace con estereoquímica preferentemente *E*, que está favorecido termodinámicamente<sup>[115]</sup>.

El mecanismo de reacción, como puede verse en la **Figura I.7**, consiste en 3 pasos. En primer lugar, se obtiene el carbanión de fosfonato a través de la desprotección del mismo con una base, usualmente hidruro sódico o un alcóxido. A continuación, tiene lugar la adición nucleofílica del carbanión al aldehído o cetona de interés y posteriormente la eliminación de dietil fosfato, obteniéndose preferentemente el alqueno con estereoquímica *E* proveniente del intermedio *trans*-oxafosfetano el cual está cinéticamente favorecido<sup>[116]</sup>.



**Figura I.7.** Mecanismo de reacción de la olefinación de HWE.

Así, utilizando como estrategia sintética una secuencia iterativa de reacciones de HWE pueden sintetizarse polienos con un número variable de dobles enlaces presentes en la estructura.

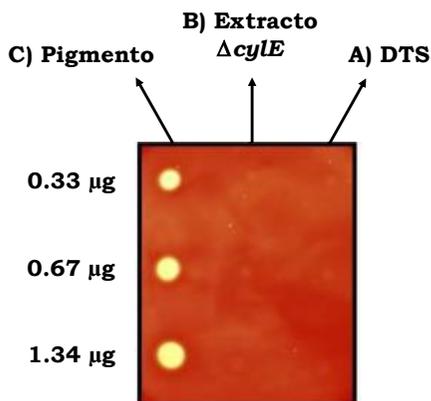
### I.1.2.2. Actividad hemolítica/citolítica del pigmento

Tras conocer los aspectos estructurales del Granadaeno, en el año 2013 se evaluaron en profundidad las actividades hemolítica y citolítica que caracterizan a este pigmento presente en EGB<sup>[71]</sup>.

Por un lado, para estudiar la actividad hemolítica del pigmento inicialmente se probó en placas de agar-sangre el polieno disuelto en una mezcla de DMSO-TFA al 0.1 % en las que los resultados fueron negativos.

A continuación, como se muestra en la **Figura I.8**, se probó el pigmento purificado de una cepa hemolítica (EGB WT), disuelto en una mezcla conocida

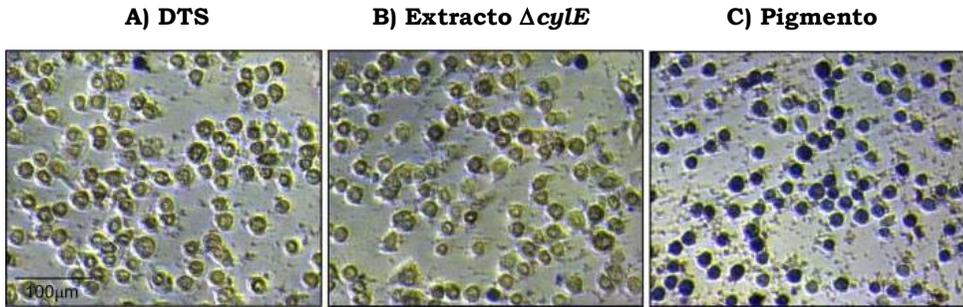
como solución estabilizadora o DTS compuesta por DMSO, TFA al 0.1 % y almidón al 20% (una molécula capaz de estabilizar las cadenas poliénicas<sup>[62]</sup>). A su vez, se utilizaron como controles negativos DTS y un extracto obtenido de una cepa no hemolítica (*EGB $\Delta$ cyLE*).



**Figura I.8.** Ensayo de actividad hemolítica en placas de agar-sangre. **A)** DTS, **B)** Extracto obtenido de una cepa no hemolítica *EGB $\Delta$ cyLE* y **C)** Pigmento purificado de la cepa WT *EGB* disuelto en DTS probado a diferentes cantidades (0.33, 0.67 y 1.34  $\mu$ g). Figura adaptada desde<sup>[71]</sup> (Whidbey *et al.* 2013) con permiso de Creative Commons BY-NC-SA/3.0/.

Tras ello, únicamente se observó la presencia de hemólisis en la superficie de las placas de agar-sangre donde se había depositado el pigmento disuelto en DTS, determinando que el Granadaeno favorece la lisis de los hematíes<sup>[71]</sup>.

Por otro lado, para corroborar su actividad citolítica, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello se incubaron células endoteliales humanas en diferentes condiciones. Como se observa en la **Figura I.9**, la primera con únicamente DTS, la segunda con pigmento purificado de una cepa no hemolítica (*EGB $\Delta$ cyLE*) ambas como controles negativos y la tercera con el pigmento purificado de una cepa hemolítica (*EGB* WT) disuelto en DTS. A su vez se añadió azul de tripano como marcador de células muertas.



**Figura I.9.** Ensayo de viabilidad celular utilizando como marcador de células muertas azul de tripano. **A)** DTS, **B)** Extracto obtenido de una cepa no hemolítica *EGBΔcylE* y **C)** Pigmento purificado de la cepa WT *EGB* disuelto en DTS a una concentración 2.5 μM. Figura adaptada desde<sup>[71]</sup> (Whidbey *et al.* 2013) con permiso de Creative Commons BY-NC-SA/3.0/.

A simple vista puede apreciarse cómo las células teñidas con este marcador son mucho más numerosas en el caso de la tercera condición. Además, tras calcular los porcentajes de células muertas en cada uno de los casos y compararlos pudo comprobarse que, de las tres condiciones, el pigmento Granadaeno es el único que tiene propiedades citotóxicas<sup>[71]</sup>.

#### **I.1.2.2.a) Mecanismos que promueven la muerte celular**

Una vez se confirmó que la muerte celular se efectuaba, se procedió a realizar el estudio del mecanismo de acción del Granadaeno. En relación a ello, se conoce que esta ruptura está promovida por la permeabilización de las membranas plasmáticas de las células infectadas por *EGB*. Sin embargo, el modo en el que tiene lugar dicha permeabilización no está establecido. Por un lado, hay indicios de que esto podría ser debido a la formación de poros o canales transmembrana similares a los que se originan en el caso de los polienos macrólidos, fomentada o no por la interacción con lípidos de membrana, como se ha explicado anteriormente. Por otro, la permeabilización podría tener lugar como consecuencia de la aparición de defectos pequeños en las membranas posiblemente ocasionados por la inserción del pigmento en la bicapa de fosfolípidos. Esto es debido a la naturaleza del Granadaeno, el cual al estar constituido por una cadena poliénica hidrofóbica con una longitud total similar al grosor de la bicapa lipídica que constituye la

membrana, es capaz de atravesarla. Así, la parte poliénica queda a la altura de la parte lipídica apolar de la bicapa y los extremos hidrofílicos a la altura de los grupos fosfatos polares.

Tras varios experimentos realizados tanto con membranas reales como artificiales se comprobó que el Granadaeno provoca la ruptura celular porque induce la aparición de defectos similares a los que genera el péptido Gramicina A<sup>[117]</sup>. Este mecanismo favorece el flujo de iones K<sup>+</sup> lo que conlleva a la posterior lisis osmótica de glóbulos rojos. A su vez, en células como los macrófagos humanos induce la muerte celular programada conocida como piroptosis<sup>[74]</sup>.

## **I.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Como se ha comentado en la *Introducción* de este bloque, el contagio de recién nacidos por bacterias gram-positivas del grupo B provoca daños que, en ocasiones, pueden desencadenar en la muerte del neonato<sup>[17],[118]</sup>. Considerando la importancia del Granadaeno dentro del conjunto de bacterias estreptococo del grupo B (EGB) y conociendo que la presencia de actividad hemolítica de la bacteria podría deberse o se debe a esta molécula, sería interesante estudiar qué aspectos estructurales favorecen dicha actividad.

Como se ha mencionado en los *Antecedentes* existen ejemplos de polienos con cuatro o más dobles enlaces que son capaces de inducir la permeabilización de la membrana. En este sentido, la hipótesis que se plantea en este capítulo es que análogos del Granadaeno con un número menor de dobles enlaces también podrían realizar dicha función. Por tanto, en esta Tesis Doctoral se propone la síntesis de derivados del Granadaeno, con distinto número de alquenos en su estructura, así como diferentes grupos funcionales en sus extremos. Esta estrategia sería una alternativa de gran utilidad para estudiar en mayor profundidad el mecanismo de acción de dicho pigmento de forma indirecta. Una vez conocidos qué aspectos estructurales favorecen un aumento de la actividad hemolítica, se tendrá un mayor conocimiento de la forma en la que este pigmento y sus análogos inducen la permeabilización de las membranas celulares provocando la lisis celular. A

su vez, esto podría favorecer el desarrollo de una nueva vacuna contra la infección por EGB utilizando como diana el pigmento Granadaeno.

Por ello los objetivos que se plantean en este capítulo son los siguientes:

1. Sintetizar y caracterizar colorantes análogos al Granadaeno con un menor número de dobles enlaces (0, 1, 4, 5, 7 y 9) y diferentes sustituyentes en las posiciones terminales.
2. Realizar estudios hemolíticos de cada uno de los análogos sintetizados con la finalidad de conocer su actividad hemolítica en placas de agar-sangre.
3. Comparar la actividad hemolítica de dichos análogos con la del pigmento Granadaeno natural presente en cepas de bacterias de EGB.
4. Realizar estudios de estructura-actividad, en los que se relacione la actividad hemolítica tanto con el número de dobles enlaces como con los diferentes grupos funcionales introducidos en los extremos de cada uno de los análogos, determinando así qué factores estructurales favorecen la ruptura de hematíes.
5. Desarrollar una posible vacuna preventiva contra la infección de EGB utilizando un análogo no hemolítico con estructura similar al Granadaeno natural.

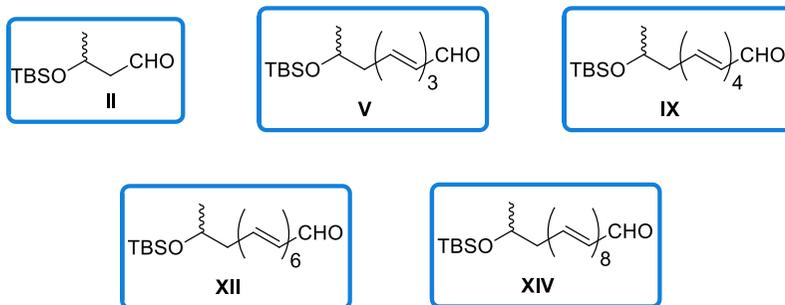
## **I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **I.3.1. Síntesis, caracterización y estudios de actividad hemolítica de análogos sintéticos del Granadaeno**

En primer lugar, tal y como se ha planteado en el primer objetivo se llevó a cabo la síntesis de compuestos análogos al Granadaeno con diferente número de dobles enlaces y distintos grupos terminales.

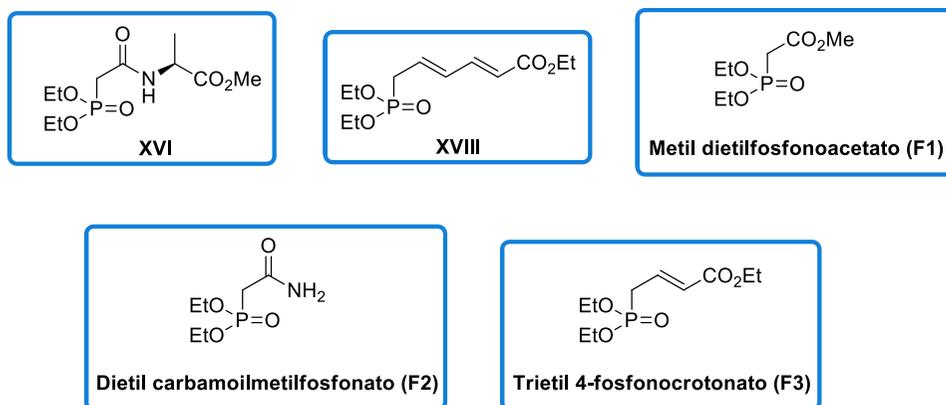
El paso clave de la metodología fue la formación de dobles enlaces preferentemente *E* para lo que se empleó la reacción de olefinación de HWE entre distintos aldehídos y fosfonatos.

Por un lado, los aldehídos utilizados **II**, **V**, **IX**, **XII** y **XIV** para la obtención de los diferentes análogos se muestran en la **Figura I.10**.



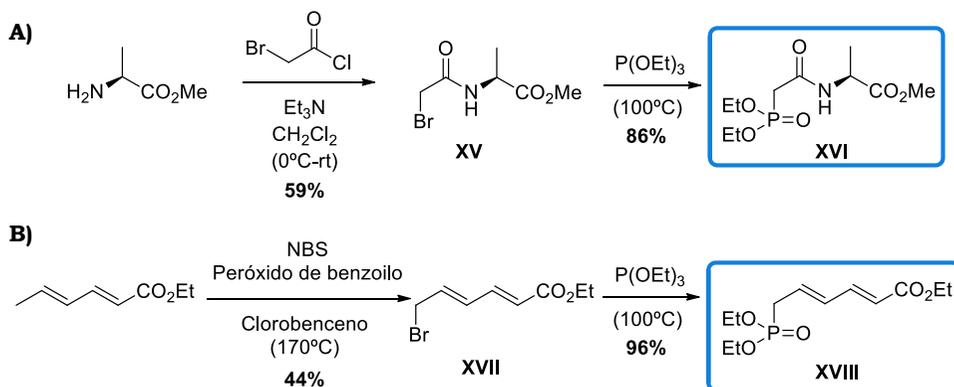
**Figura I.10.** Aldehdos utilizados en las síntesis: **II**, **V**, **IX** y **XII** y **XIV**.

Por otro, los cinco fosfonatos utilizados en este trabajo aparecen en la **Figura I.11**, dos de ellos **XVI** y **XVIII** fueron sintetizados y los otros tres se adquirieron comercialmente (**F1**, **F2** y **F3**).



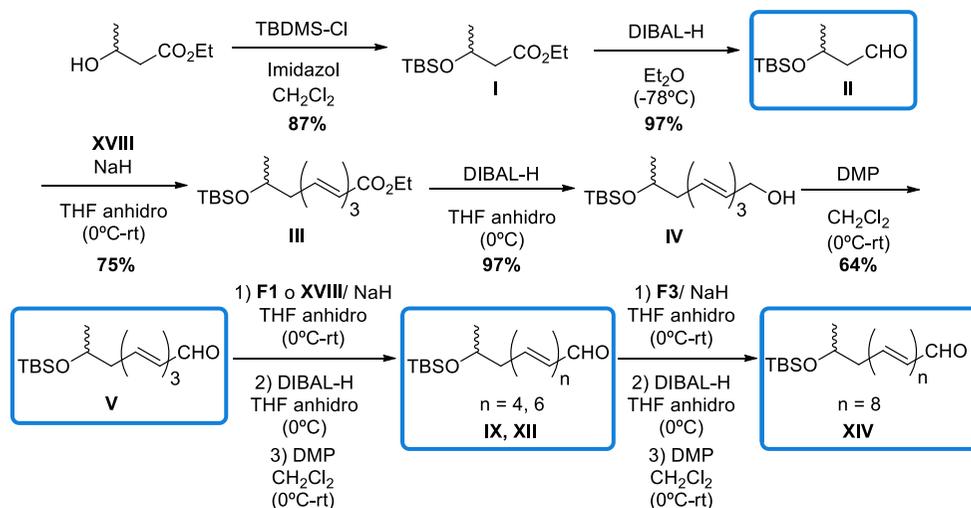
**Figura I.11.** Fosfonatos utilizados en las síntesis: **XVI**, **XVIII**, Metil dietilfosfonoacetato (**F1**), Dietil carbamoilmetilfosfonato (**F2**) y Trietil 4-fosfonocrotonato (**F3**).

Ambos fosfonatos **XVI** y **XVIII** se sintetizaron en dos etapas. Una primera etapa que consistió en la obtención de los precursores bromados **XV** y **XVII**. En el primer caso se añadió cloruro de bromoacetilo a la *L*-alanina mientras que para sintetizar **XVII** se llevó a cabo una halogenación con *N*-bromosuccinimida (NBS). Un segundo paso común a las dos síntesis consistió en la adición de trietilfosfito, generándose **XVI** con un rendimiento del 86 % y **XVIII** con un rendimiento del 96 % (**Figura I.12**).



**Figura I.12.** Síntesis de los fosfonatos **A) XVI** y **B) XVIII**.

Una vez preparados los fosfonatos, **XVIII**, **F1** y **F3** se emplearon en la obtención de los diferentes aldehídos precursores de los polienos (**Figura I.10**), tal y como se muestra de forma general en el **Esquema I.1**. En primer lugar, se llevó a cabo la protección del grupo hidroxilo del precursor 3-hidroxiбутаноato de metilo racémico, seguida de una posterior transformación del grupo éster en el aldehído **II** mediante una reacción de reducción. Posteriormente se llevó a cabo el proceso clave en la metodología empleada, la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), del aldehído **II** con el fosfonato **XVIII**, generándose el éster precursor **III**, que presentó 3 dobles enlaces conjugados. La posterior reducción a alcohol seguida de una oxidación controlada con el periodinano de Dess Martín (DMP) condujo al aldehído **V** con un rendimiento del 64 %. Ambos aldehídos **II** y **V** se emplearon como productos de partida para la obtención de los análogos con mayor número de enlaces, repitiéndose los pasos de HWE, reducción y oxidación hasta la obtención de cada uno de los aldehídos finales **IX**, **XII** y **XIV**, enmarcados en color azul en el **Esquema I.1**.

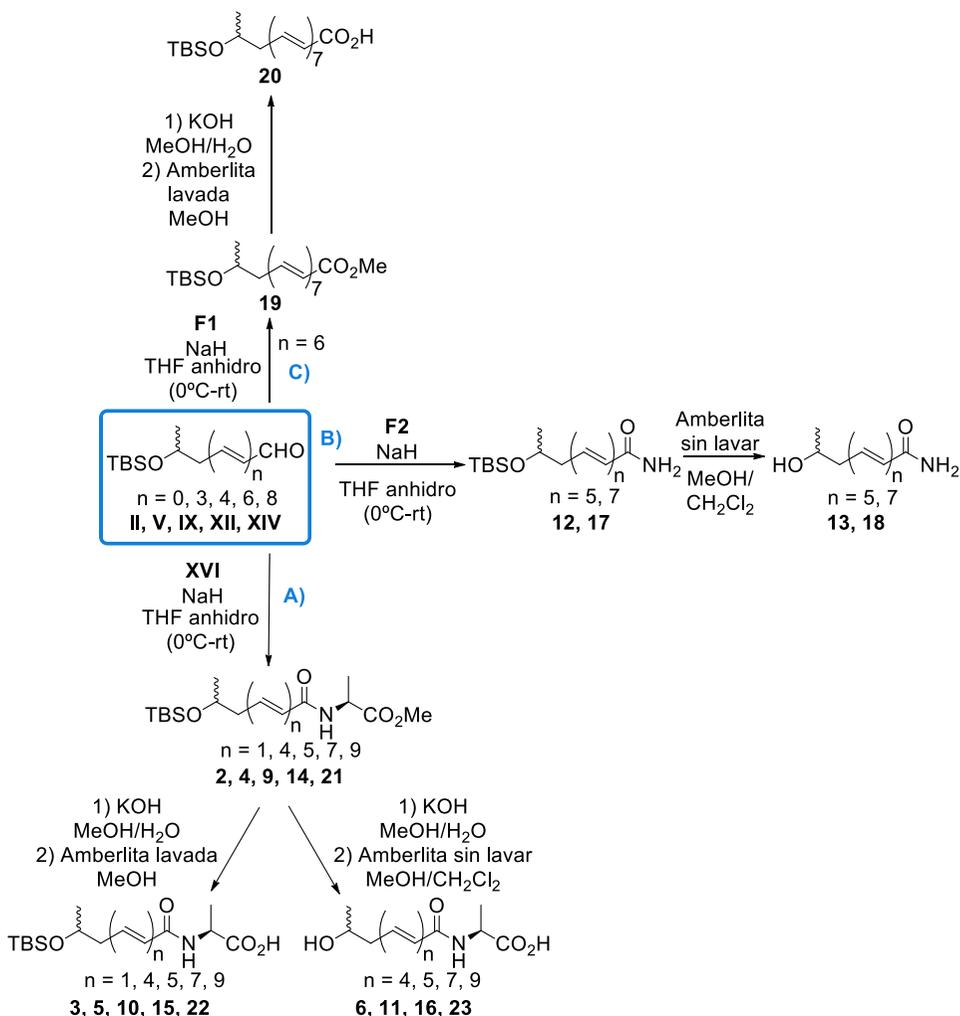


**Esquema I.1.** Esquema general para la obtención de los aldehídos precusores con un número de dobles enlaces determinado.

Tras obtener los aldehídos **II**, **V**, **IX**, **XII** y **XIV**, estos fueron funcionalizados mediante reacciones HWE con los fosfonatos adecuados para la obtención del análogo en cuestión. En el **Esquema I.2** se muestra una visión global de las diferentes rutas que se llevaron a cabo para acceder a todos los compuestos sintetizados.

En este sentido, a partir de los aldehídos recuadrados en azul, a través de la ruta **A)** se sintetizaron un total de 14 análogos, con distintos sustituyentes en las posiciones terminales y 1, 4, 5, 7 y 9 dobles enlaces. La estructura común a los primeros derivados sintetizados por esta ruta **2**, **4**, **9**, **14** y **21**, presenta en un extremo un grupo alcohol protegido con TBS y en el otro un resto aminoácido *L*-alanina, variando entre análogos el número de dobles enlaces. A partir de estos sustratos se llevaron a cabo dos modificaciones. La primera consistió en la transformación del grupo éster presente en la *L*-alanina en ácido mediante el tratamiento con KOH 2 M, seguido de neutralización con amberlita lavada con diclorometano y metanol, obteniéndose los colorantes **3**, **5**, **10**, **15** y **22** con un extremo con un grupo OH protegido y en el otro con un ácido carboxílico. La segunda estrategia consistió en la saponificación con KOH 2 M seguida de la neutralización con amberlita sin lavar. Ésta presenta un mayor carácter ácido lo que favorece

que se libere el grupo TBS y permite acceder a colorantes **6**, **11**, **16** y **23** con un grupo hidroxilo libre.



**Esquema I.2.** Rutas sintéticas empleadas para la obtención de colorantes análogos al Granadaeno, **A)**, **B)** y **C)**.

En este sentido, a partir de los aldehídos recuadrados en azul, a través de la ruta **A)** se sintetizaron un total de 14 análogos, con distintos sustituyentes en las posiciones terminales y 1, 4, 5, 7 y 9 dobles enlaces. La estructura común a los primeros derivados sintetizados por esta ruta **2**, **4**, **9**, **14** y **21**, presenta en un extremo un grupo alcohol protegido con TBS y en el

otro un resto aminoácido *L*-alanina, variando entre análogos el número de dobles enlaces. A partir de estos sustratos se llevaron a cabo dos modificaciones. La primera consistió en la transformación del grupo éster presente en la *L*-alanina en ácido mediante el tratamiento con KOH 2 M, seguido de neutralización con amberlita lavada con diclorometano y metanol, obteniéndose los colorantes **3**, **5**, **10**, **15** y **22** con un extremo con un grupo OH protegido y en el otro con un ácido carboxílico. La segunda estrategia consistió en la saponificación con KOH 2 M seguida de la neutralización con amberlita sin lavar. Ésta presenta un mayor carácter ácido lo que favorece que se libere el grupo TBS y permite acceder a colorantes **6**, **11**, **16** y **23** con un grupo hidroxilo libre.

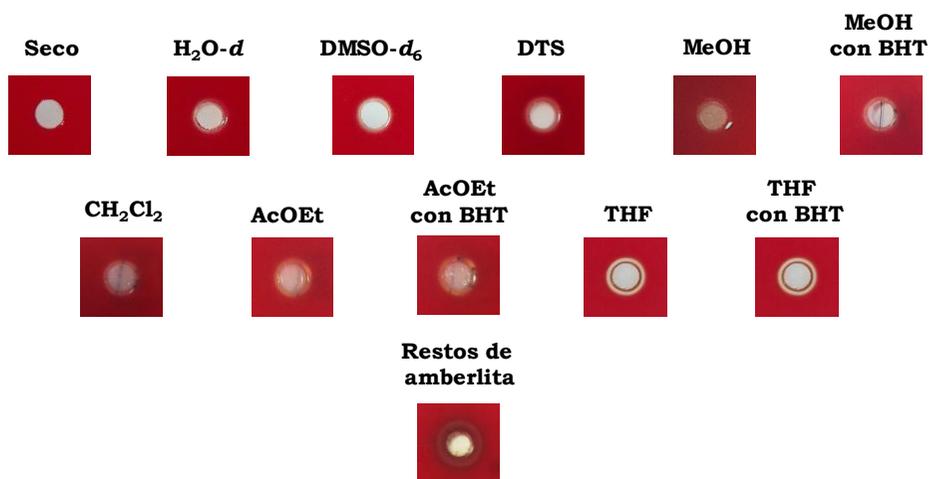
En segundo lugar, a través de la ruta **B)** se sintetizaron los análogos que presentan un grupo amida en un extremo y en el otro un grupo hidroxilo, que a su vez se obtuvo libre o protegido con TBS siguiendo la misma estrategia que en la ruta anterior. En este caso se partió de los aldehídos **IX** y **XII** con 4 o 6 dobles enlaces para la preparación de un total de 4 análogos **12**, **13**, **17** y **18** con 5 y 7 dobles enlaces respectivamente.

Por último, la ruta **C)** se siguió para conseguir 2 análogos **19** y **20**, ambos de 7 dobles enlaces y con un extremo protegido como TBS, y grupos ácido o éster en su estructura.

A continuación, se muestran cada uno de los análogos preparados, un total de 23, que se fueron sintetizando y caracterizando en función de los resultados de actividad hemolítica que se iban obteniendo con la finalidad de ir estableciendo relaciones estructura-actividad.

Antes de sintetizar y probar cada uno de los análogos, se comprobó la hemólisis que producían distintos disolventes y restos de amberlita empleados en la síntesis, purificación y caracterización de los compuestos (**Figura I.13**). En el primer caso, para, de ser hemolíticos, reducir su uso en el manejo de las muestras en los pasos previos al análisis de su respuesta hemolítica y en el caso de la amberlita porque, debido a su carácter ácido, podría provocar hemólisis<sup>[119]</sup> y por ello la presencia de amberlita en las muestras finales podría dar lugar a falsos positivos. Al analizar dicho

experimento, las condiciones que no mostraron hemólisis fueron el pocillo seco (en ausencia de disolventes), el  $\text{H}_2\text{O}-d$ , el  $\text{DMSO}-d_6$ , el MeOH y el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La solución estabilizadora, sin embargo, mostró cierta actividad, debido probablemente a la presencia de TFA en la mezcla. Los disolventes que sí resultaron hemolíticos fueron el AcOEt y el THF y todos aquellos que contenían BHT (MeOH con BHT, AcOEt con BHT y THF con BHT), siendo los disolventes que contenían BHT aún más hemolíticos. Además, los restos de amberlita obtenidos al lavarla varias veces con metanol y diclorometano durante alrededor de 1 hora, presentaron bastante actividad, como se muestra en la **Figura I.13**.



**Figura I.13.** Imágenes de pocillos de placas agar-sangre en distintas condiciones: Pocillo seco,  $\text{H}_2\text{O}-d$ ,  $\text{DMSO}-d_6$ , solución estabilizadora, MeOH, MeOH con BHT,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, AcOEt con BHT, THF, THF con BHT y restos de amberlita que se usa para neutralizar en las reacciones de saponificación. Se añadieron  $70 \mu\text{L}$  de cada disolvente en cada uno de los pocillos.

Considerando estos factores se tomaron las siguientes medidas para medir la actividad hemolítica de los compuestos:

1. Se descartó el uso de disolventes con BHT, ya que, aun siendo un inhibidor de radicales libres y poder servir para evitar la descomposición de los análogos, su uso no estaba recomendado porque podía dar lugar a falsos positivos.

2. Los análogos con número superior de dobles enlaces (de 4 a 9) se conservaron en diclorometano y/o metanol, evitando el uso de otros disolventes.

3. Al presentar la amberlita actividad hemolítica y conocer que su estructura se caracteriza por dos señales en torno a 7.51 (d) y 7.94 (d) en RMN de  $^1\text{H}$ , se comprobó la ausencia de estas señales en todos los derivados sintetizados ya purificados, como paso previo a la medida de actividad hemolítica.

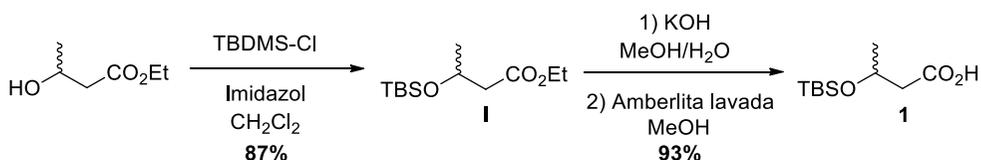
Así pues, la actividad hemolítica se evaluó en el *Servicio de Microbiología en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada*. Se estudió en placas de agar-sangre en pocillo y en superficie, añadiendo los productos disueltos, por un lado, en DMSO- $d_6$  y por otro, en solución estabilizadora (DTS) compuesta por DMSO- $d_6$ , TFA al 0.1 % y almidón al 20 %. El DMSO- $d_6$ , se seleccionó como control negativo ya que es un disolvente no hemolítico y, por tanto, la actividad hemolítica observable iba a deberse únicamente al colorante que se estuviese empleando. Además, presenta otra ventaja y es que al ser un disolvente muy polar solubilizó en su totalidad la gran mayoría de los análogos. Asimismo, la justificación de emplear disolventes deuterados fue el de tener la posibilidad de comprobar mediante RMN de  $^1\text{H}$  la pureza de los compuestos justo antes de estudiar su respuesta hemolítica, para descartar cualquier tipo de impureza o descomposición. A su vez, la solución estabilizadora (DTS) se utilizó ya que el almidón que contiene es capaz de estabilizar las cadenas poliénicas<sup>[71],[62]</sup>, posibilitando quizás una mejor difusión.

Se realizaron al menos 3 réplicas y los resultados se analizaron por 3 personas diferentes con el fin de evitar un resultado sesgado o marcado por la subjetividad. (La metodología empleada está descrita en detalle en *Parte Experimental del Bloque A, Capítulo I, 3. Estudios de actividad hemolítica*).

Una vez estudiada la actividad hemolítica que provocaban ciertos disolventes, también se probó si los grupos que se iban a introducir en los extremos favorecían por sí solos la hemólisis. En este sentido, los grupos que se seleccionaron en un principio con motivo de simplificar los extremos del

Granadaeno original fueron la *L*-alanina en lugar de la *L*-ornitina y un grupo *tert*-butildimetilsilano (TBS) en sustitución de la ramnosa terminal. Por un lado, la *L*-alanina se seleccionó para evitar la reacción de formación de una lactama intramolecular en la *L*-ornitina, como describen Paradas *et al.*<sup>[111]</sup>. Por otro, la elección del grupo TBS como protector del hidroxilo se llevó a cabo después de comprobar que, al utilizar otros grupos protectores como el tetrahidropirano (THP), la posterior desprotección se hacía difícil en algunos casos.

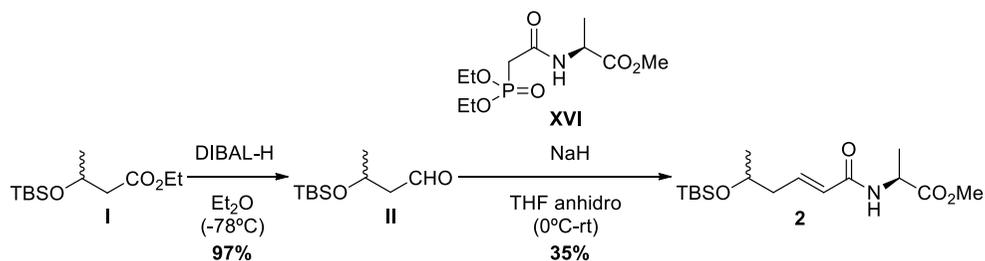
Tras elegirlos primero se probó la *L*-alanina comercial en placas de agar-sangre descartando que produjese hemólisis (**Tabla I.1**). Luego se sintetizó **1**, como estructura modelo más sencilla sin ningún doble enlace con el fin de determinar si el grupo TBS o el ácido terminal daban lugar a la lisis de los hematíes. Para ello, como se muestra en el **Esquema I.3** se protegió con TBS el grupo hidroxilo del producto comercial 3-hidroxi-butanoato de metilo y posteriormente se realizó la saponificación con KOH del éster etílico terminal neutralizando con amberlita lavada con el fin de evitar que su carácter ácido produjese la desprotección del OH del extremo opuesto.



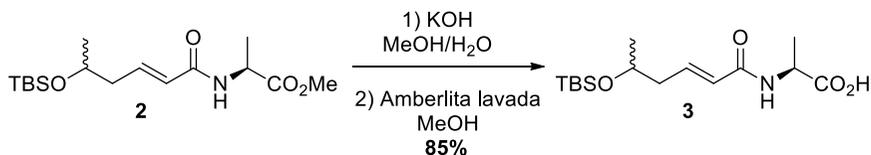
**Esquema I.3.** Síntesis de la estructura modelo más sencilla **1**.

Tras comprobar que ninguno de los compuestos mostró actividad hemolítica (**Tabla I.1**), se procedió a la síntesis del resto de análogos. Así, en primer lugar, se decidió sintetizar análogos que presentasen 1 doble enlace y ambos extremos simplificados.

Para llevar a cabo la síntesis de **2**, como se puede ver en el **Esquema I.4**, se partió del precursor **I** y tras dos etapas, una reducción con DIBAL-H para la obtención del aldehído **II** y posterior reacción de HWE con el fosfonato **XVI** previamente desprotonado con NaH, obteniéndose **2** con un rendimiento del 35 % a partir del precursor **II**.

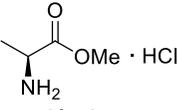
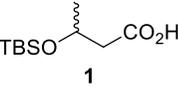
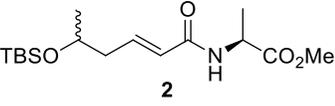
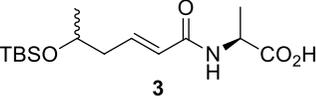
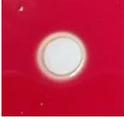


Tras la síntesis, se probó su actividad hemolítica, observándose que no apareció un halo de hemólisis alrededor del pocillo en las placas de agar-sangre precipitando además una pequeña cantidad casi inapreciable en el pocillo, por lo que se determinó que no era hemolítico. Tras ello, se propuso la síntesis de un compuesto más hidrófilo para evitar su precipitación en placa. Así se sintetizó el análogo **3**, que se obtuvo tras una reacción de saponificación del éster metílico de la *L*-alanina generándose el correspondiente ácido carboxílico.



La introducción del ácido favoreció la solubilidad y no se observó precipitado en placa. Sin embargo, tampoco se observó actividad hemolítica (**Tabla I.1**).

**Tabla I.1.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de la *L*-Alanina y los análogos **1**, **2** y **3**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron la *L*-alanina y los análogos **1**, **2** y **3** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-*d*<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70  $\mu$ L de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

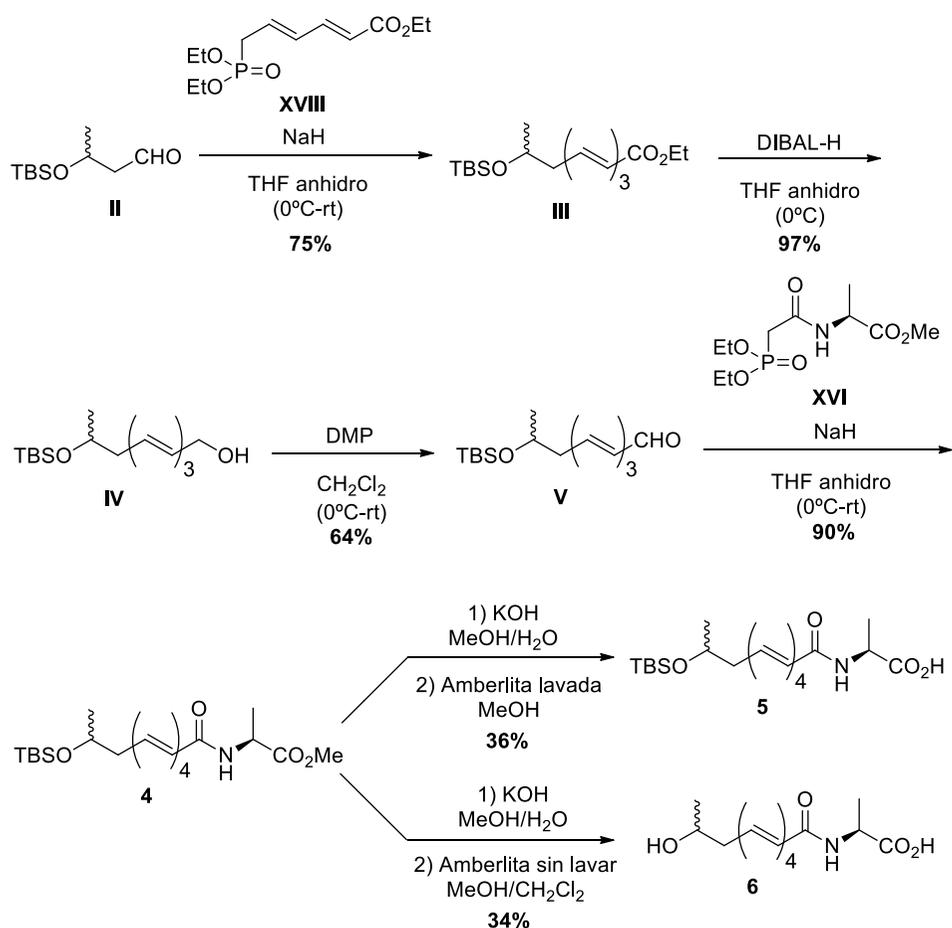
Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	En DTS
 <b>Alanina</b>	No		-
 <b>1</b>	No		
 <b>2</b>	No*		
 <b>3</b>	No		

\* El compuesto precipitó en el pocillo.

A continuación, y con el objetivo de favorecer la permeabilización de las membranas celulares como se describe en los *Antecedentes*, se propuso un aumento del número de dobles enlaces. Primero se prepararon los análogos de 4 y 5 dobles enlaces y luego se fueron aumentando de dos en dos obteniendo los de 7 y 9 alquenos conjugados.

En este sentido, los siguientes análogos sintetizados fueron **4**, **5** y **6**, con grupos éster y ácido terminales de forma análoga a los compuestos **2** y **3** y además también se desprotegió el grupo TBS en el caso del análogo **6**, para estudiar qué efecto tenía en la actividad hemolítica un aumento de la polaridad de ese extremo. Dicha desprotección se intentó mediante varias estrategias, que incluyen el uso de CsF, Bu<sub>4</sub>NF, NEt<sub>3</sub>·3HF y amberlita, siendo esta última con la única que se obtuvieron los compuestos con el grupo OH

desprotegido y con rendimientos aceptables, como puede observarse en el **Esquema I.6**.



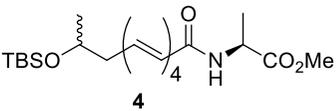
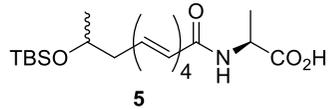
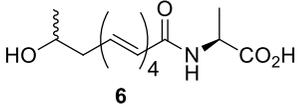
**Esquema I.6.** Síntesis de los derivados **4**, **5** y **6**.

En este caso se partió del aldehído **II** obtenido previamente y tras una reacción de HWE con el fosfonato **XVIII** se obtuvo el éster **III** con 3 dobles enlaces en su estructura. Posteriores reacciones de reducción utilizando DIBAL-H y oxidación con el reactivo de Dess Martin, dieron lugar al aldehído **V**, precursor de los análogos **4**, **5** y **6**. Una vez obtenido **V** se hizo reaccionar con el fosfonato **XVI** generando el análogo **4** con un grupo TBS en uno de los extremos y un grupo *L*-alanina en el extremo opuesto. A continuación, dicho análogo sirvió para obtener los derivados **5** y **6** empleando condiciones de

reacción similares, a excepción de que en el caso de **6** se neutralizó con amberlita sin lavar con la finalidad de obtener el grupo hidroxilo desprotegido.

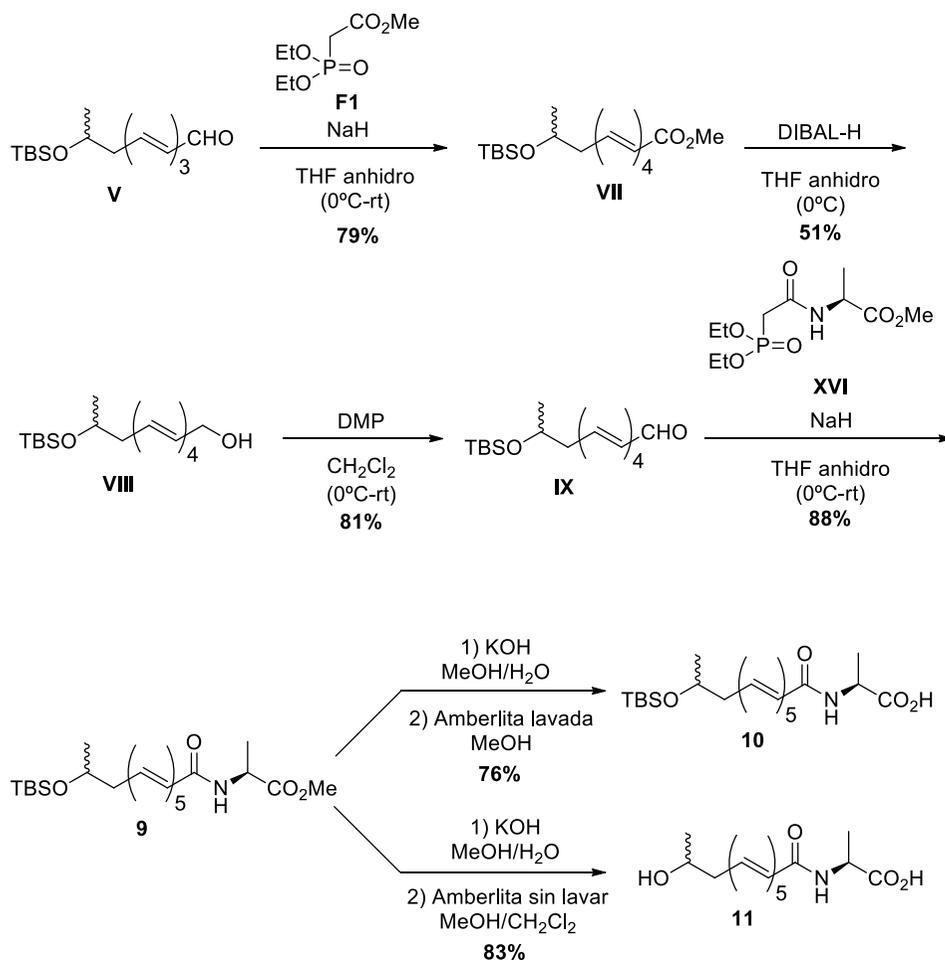
Respecto a la actividad hemolítica, ni el compuesto **4** ni el **6** fueron hemolíticos. Sin embargo, el análogo **5** presentó un halo de hemólisis importante, como puede verse en la **Tabla I.2** considerándose el primer análogo hemolítico de los sintetizados hasta el momento.

**Tabla I.2.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de los análogos **4**, **5** y **6**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron los análogos **4**, **5** y **6** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-*d*<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70  $\mu$ L de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	En DTS
 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>	No*		
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	Sí		
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	No		

\* El compuesto precipitó en el pocillo.

Posteriormente, se sintetizaron los derivados **9**, **10** y **11** con 5 dobles enlaces y estructuras análogas a los anteriores (**Esquema I.7**). En este caso se hizo reaccionar el aldehído **V**, preparado previamente, con el fosfonato comercial **F1** para la obtención del aldehído **IX** tras una reacción de reducción y otra de oxidación. Una vez obtenido **IX** se procedió a sintetizar los derivados **9**, **10** y **11** siguiendo la misma metodología que la empleada para preparar **4**, **5** y **6**.

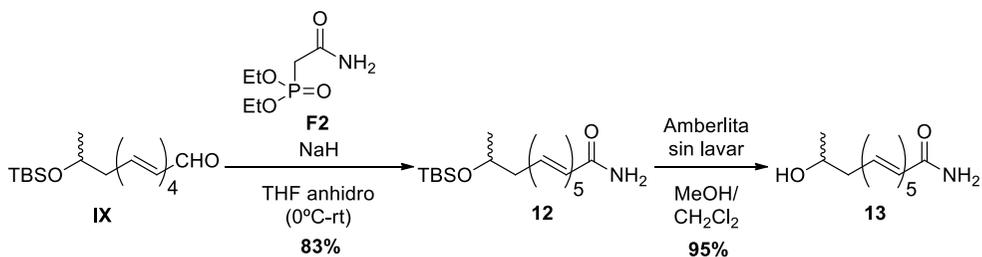


**Esquema I.7.** Síntesis de los derivados **9**, **10** y **11**.

De nuevo, el análogo con un extremo protegido con el grupo TBS y la *L*-alanina con el ácido carboxílico terminal en el otro (**10**) fue el único que presentó actividad hemolítica (**Tabla I.3**).

Tras analizar los resultados obtenidos hasta el momento parecía ser que tanto la presencia de TBS como de la *L*-alanina con un ácido carboxílico favorecían la actividad hemolítica. Es por ello que se decidió modificar el extremo donde estaba presente la *L*-alanina con el resto ácido introduciendo en su lugar grupos como la amida de polaridad similar al ácido. Respecto al otro extremo, se mantuvo la doble funcionalidad, sintetizándose los derivados

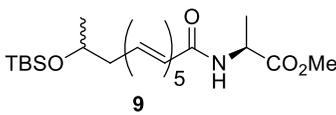
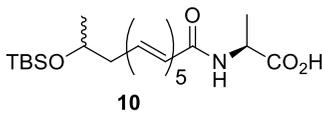
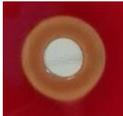
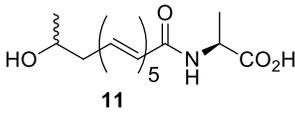
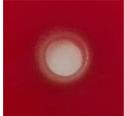
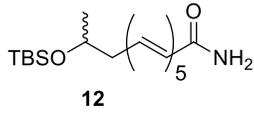
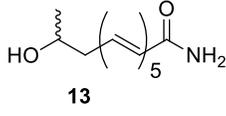
**12** y **13**, con el grupo hidroxilo tanto libre como protegido con TBS. En el **Esquema I.8** se describe la síntesis, en la que a partir del aldehído **IX** se realizó una reacción de HWE con el fosfonato comercial **F2** obteniendo el derivado **12** con un rendimiento del 83 %. A continuación, se trató **12** con amberlita sin lavar y debido a su carácter ácido pudo prepararse el análogo **13** con el grupo hidroxilo libre con un rendimiento del 95 % a partir de **12**.



**Esquema I.8.** Síntesis de los análogos **12** y **13**.

Sin embargo, al analizar las placas agar-sangre correspondientes, se observó que ni **12** ni **13** presentaron actividad hemolítica, luego grupos polares como la amida terminal no parecen tener influencia en dicha actividad.

**Tabla I.3.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de los análogos **9-13**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron los análogos **9-13** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-*d*<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70  $\mu$ L de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

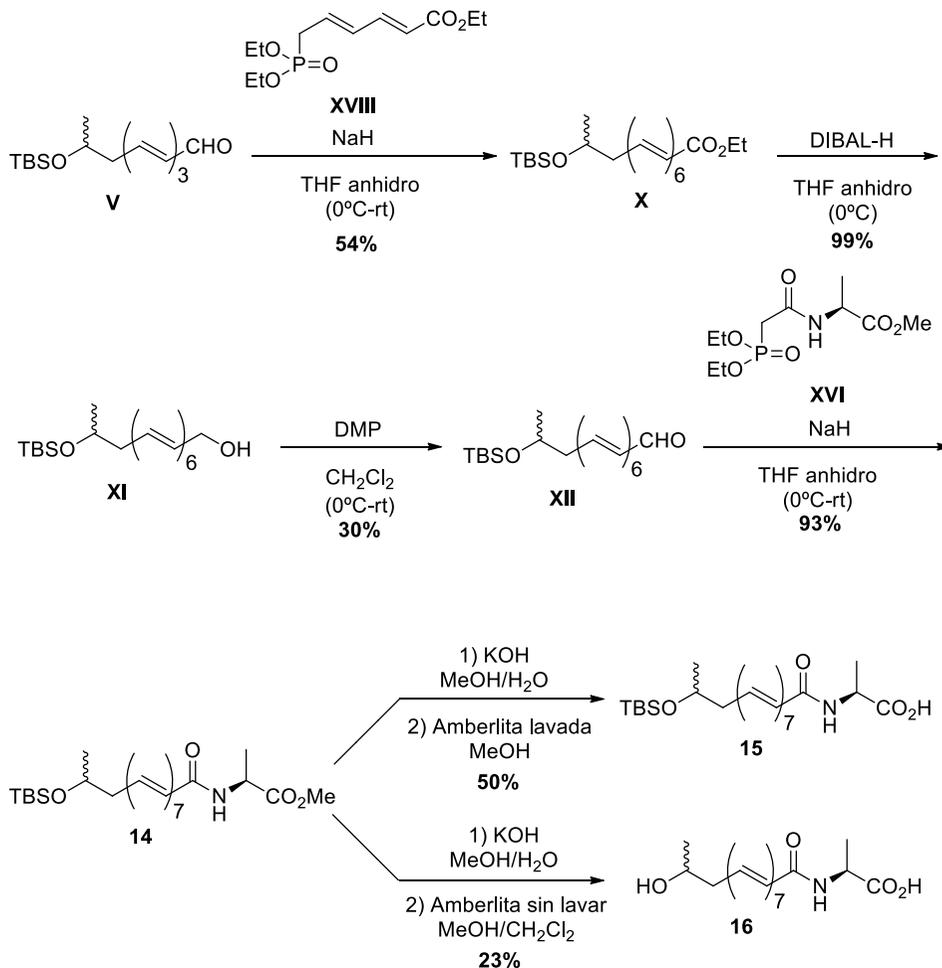
Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	En DTS
 <p><b>9</b></p>	No*		
 <p><b>10</b></p>	Sí		
 <p><b>11</b></p>	No		
 <p><b>12</b></p>	No*		
 <p><b>13</b></p>	No		

\* El compuesto precipitó en el pocillo.

El siguiente paso consistió en aumentar a 7 el número de dobles enlaces, de forma que se sintetizaron los análogos **14**, **15**, **16**, **17** y **18**.

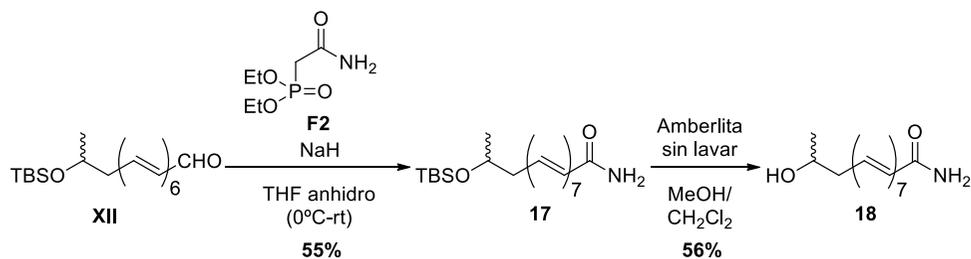
Primero se obtuvieron **14**, **15** y **16** partiendo del aldehído de 3 dobles enlaces **V**, utilizado en síntesis anteriores. Se hizo reaccionar dicho aldehído con el fosfonato **XVIII** mediante una reacción de HWE con la finalidad de obtener el éster **X** con 6 dobles enlaces en su estructura. Luego mediante reacciones sucesivas de reducción y oxidación se obtuvo el aldehído **XII** que, mediante reacción con el fosfonato **XVI**, dio lugar al derivado **14** de estructura similar a **2**, **4** y **9**. Una vez obtenido, de la misma forma que se

sintetizaron los análogos de 4 dobles enlaces **5** y **6** o los análogos de 5 dobles enlaces **10** y **11**, se prepararon los derivados **15** y **16**, como se puede ver en el **Esquema I.9**.



**Esquema I.9.** Síntesis de los análogos **14**, **15** y **16**.

Para comprobar que el grupo amida no favorecía la hemólisis en compuestos con mayor número de dobles enlaces, se procedió a sintetizar los análogos **17** y **18**. A partir del aldehído **XII** siguiendo la misma metodología que se empleó para preparar los análogos **12** y **13** se obtuvieron los derivados **17** y **18** con rendimientos de 55 y 56 % respectivamente (**Esquema I.10**).

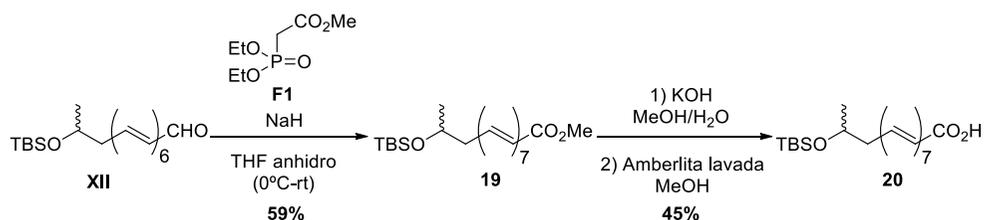


**Esquema I.10.** Síntesis de los colorantes **17** y **18**.

Como puede observarse en la

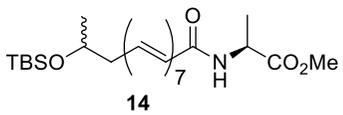
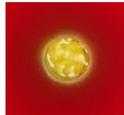
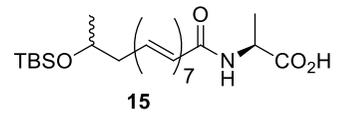
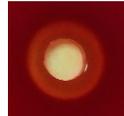
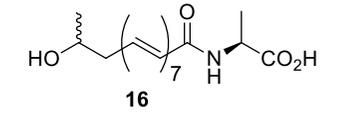
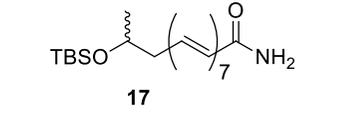
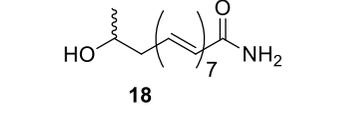
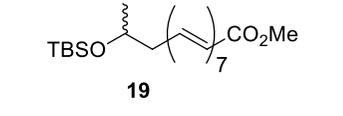
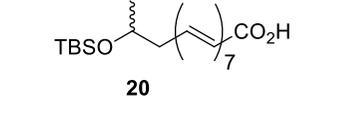
**Tabla I.4**, el único que mostró una importante actividad hemolítica, lo que se dedujo de la presencia de un gran halo de hemólisis alrededor del pocillo fue el análogo **15**. Hay que destacar que de nuevo presenta un grupo TBS en uno de los extremos y la *L*-alanina con un ácido carboxílico terminal en el otro, corroborando las deducciones que se habían planteado hasta el momento: la presencia del grupo TBS y la *L*-alanina con el ácido carboxílico favorecían la hemólisis.

Con el fin de comprobar si la presencia del aminoácido era imprescindible de cara a la actividad hemolítica se propuso la síntesis de los derivados **19** y **20**. En este caso, la *L*-alanina del extremo terminal, se sustituyó por un éster metílico realizando una reacción de HWE a partir del aldehído **XII** con el fosfonato comercial **F1**. Una vez obtenido el derivado **19** se saponificó el éster terminal, neutralizando con amberlita lavada para obtener **20** con un ácido carboxílico terminal, ambos presentando en el otro extremo el grupo TBS (**Esquema I.11**).



**Esquema I.11.** Síntesis de los derivados **19** y **20**.

**Tabla I.4.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de los análogos **14-20**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron los análogos **14-20** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-*d*<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70 μL de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

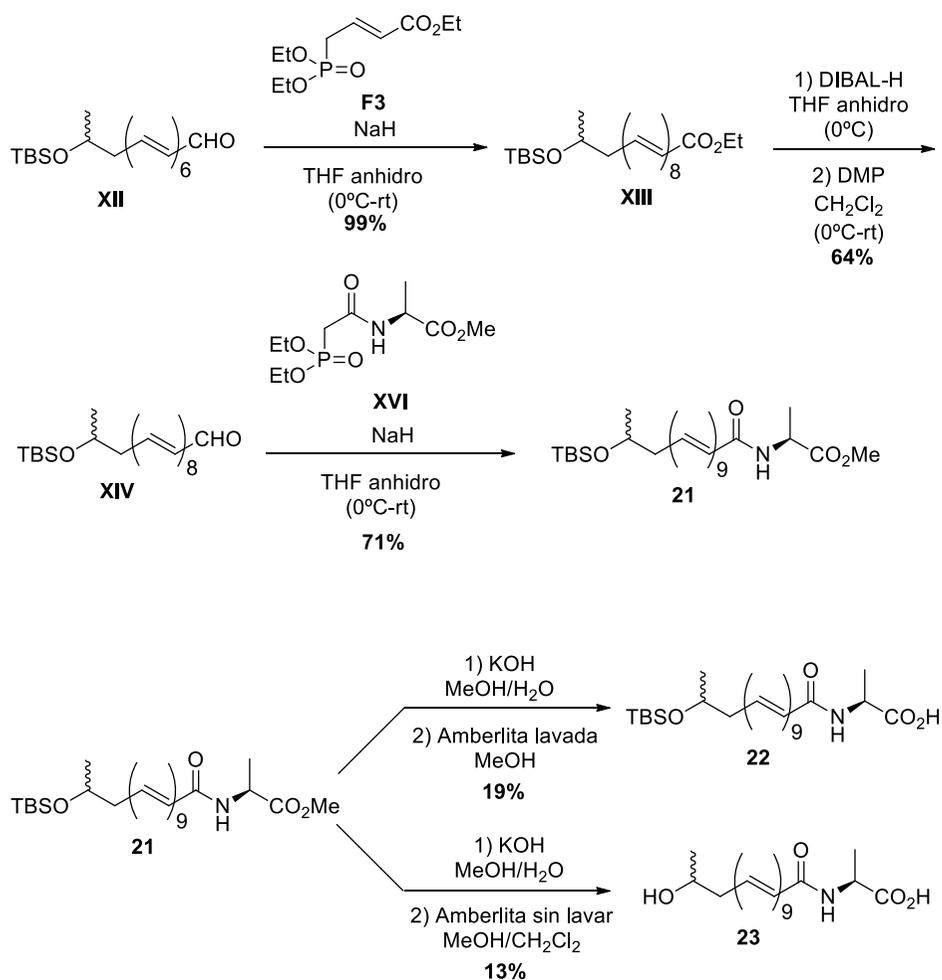
Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	En DTS
 <p><b>14</b></p>	No*		-
 <p><b>15</b></p>	Sí		
 <p><b>16</b></p>	No		
 <p><b>17</b></p>	No*		-
 <p><b>18</b></p>	No		
 <p><b>19</b></p>	No*		-
 <p><b>20</b></p>	Sí		

\* El compuesto precipitó en el pocillo.

Tras su síntesis, se procedió al estudio de actividad, determinando que el análogo **19** precipitó en el pocillo, luego no se consideró hemolítico. El

derivado **20**, por el contrario, si mostró actividad hemolítica, aunque en menor cantidad que los análogos **5**, **10** y **15**. Estos resultados mostraron que aunque no la condiciona, la presencia de la *L*-alanina favorece el aumento de la capacidad hemolítica, siendo el ácido carboxílico terminal necesario para ello.

Finalmente, considerando los factores con influencia en la hemólisis observados hasta el momento, se sintetizaron los análogos **21**, **22** y **23** con bastante mayor dificultad debido a la presencia de 9 dobles enlaces consecutivos en su estructura como se muestra en el **Esquema I.12**.

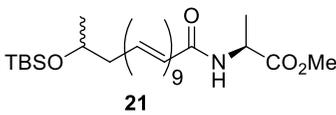
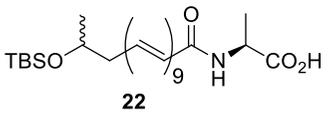
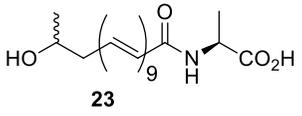


**Esquema I.12.** Síntesis de los análogos **21**, **22** y **23**.

Para ello, se partió del aldehído de 6 dobles enlaces **XII** y mediante reacción de HWE con el fosfonato comercial **F3** se obtuvo el éster de 8 dobles enlaces **XIII**. Una vez sintetizado se procedió a obtener el aldehído **XIV** necesario para sintetizar los análogos de 9 dobles enlaces **21**, **22** y **23** siguiendo la misma estrategia que en casos anteriores. Mediante la reacción de HWE entre el aldehído **XIV** y el fosfonato **XVI** se obtuvo el análogo **21** con un grupo TBS en un extremo y la *L*-alanina con éster metílico en el extremo opuesto. A continuación, utilizando la misma metodología que en los casos anteriores se prepararon los derivados **22** y **23** con la diferencia de que los rendimientos con los que se obtuvieron fueron bastante inferiores, de 19 y 13 % respectivamente.

El análogo **21**, con grupos TBS y éster en los extremos, se consideró no hemolítico ya que precipitó casi en su totalidad, tanto en pocillo como en la superficie de las placas de agar-sangre como se muestra en la **Tabla I.5**, confirmando la necesidad de un grupo más polar que el éster para evitar la precipitación. Sin embargo, los análogos **22** y **23**, sí presentaron actividad. El halo observado en el pocillo corroboró la hipótesis de que la hemólisis se ve favorecida por la *L*-alanina con un resto ácido y un grupo hidroxilo protegido con TBS. El compuesto **22**, pese a ser hemolítico, presentó un menor grado de hemólisis que en los casos anteriores. Esto puede justificarse por una peor difusión a través de la placa de agar-sangre del compuesto, debido a la presencia de un mayor número de dobles enlaces que provoca la precipitación parcial del mismo. Así pues y con el fin de evaluar si el aumento de dobles enlaces posee un mayor o menor efecto que el grupo TBS en la capacidad de provocar la ruptura de hematíes, se sintetizó el derivado **23**. Hay que destacar que el análogo **23** con un grupo OH libre también mostró actividad, a diferencia de los análogos anteriores **6**, **11** y **16**, con la misma estructura, pero con menor número de dobles enlaces. Aunque dicha actividad fue muy sutil debido a que en esta ocasión también precipitó parte del compuesto.

**Tabla I.5.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de los análogos **21**, **22** y **23**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron los análogos **20**, **21** y **23** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-*d*<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70  $\mu$ L de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	En DTS
 <p><b>21</b></p>	No*		-
 <p><b>22</b></p>	Sí*		
 <p><b>23</b></p>	Sí*		

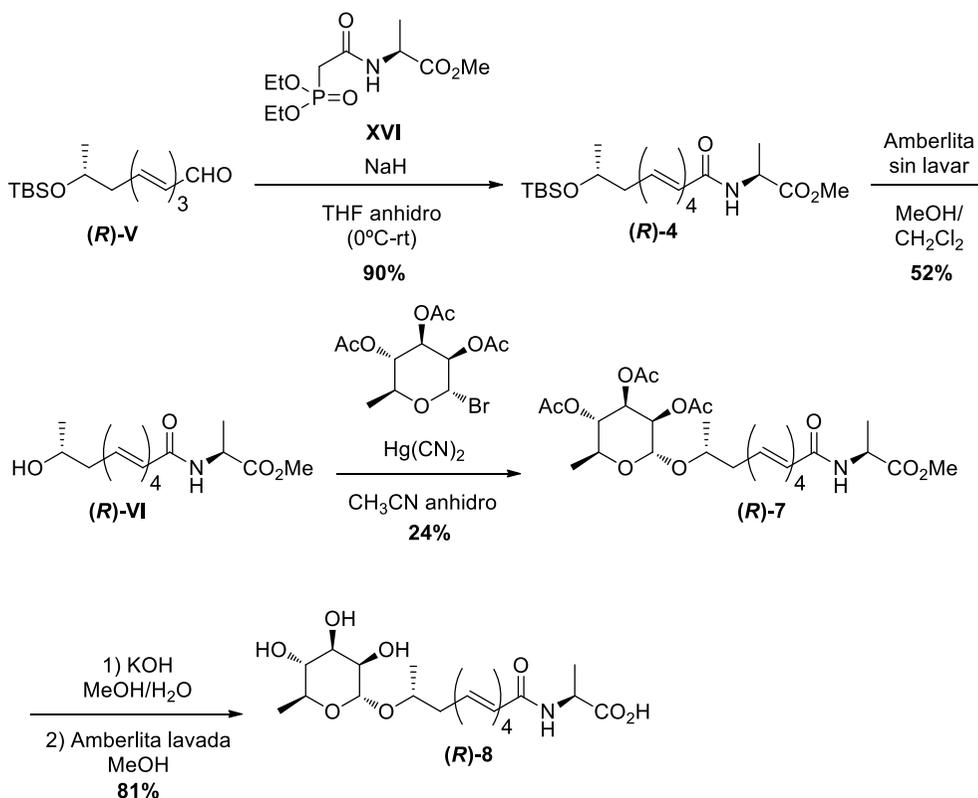
\* El compuesto precipitó en el pocillo.

Además, se sintetizó el análogo con 9 dobles enlaces, similar a **12** y **17**, con TBS en uno de los extremos y un grupo amida en el otro, el cual no aparece en la tabla ya que no pudo ser caracterizado debido a su elevada precipitación incluso en DMSO-*d*<sub>6</sub>. A pesar de esto, también se probó en placas agar-sangre, pero, precipitó en su totalidad en el pocillo y superficie y se consideró no hemolítico, porque no apareció halo de hemólisis debido a la mala difusión a lo largo de la placa.

Como puede observarse en todas las tablas mostradas hasta ahora, todos los compuestos mencionados hasta el momento se sintetizaron de forma racémica en el carbono C-27. Sin embargo, como última aproximación al Granadaeno natural, con el fin de mantener la funcionalidad y estereoquímica que presenta dicho pigmento, se decidió preparar derivados que presentasen en su estructura una ramnosa como azúcar y emplear el (3*R*)-hidroxibutanoato de metilo, obteniéndose así el enantiómero con la misma configuración que la que presenta el Granadaeno purificado de cepas

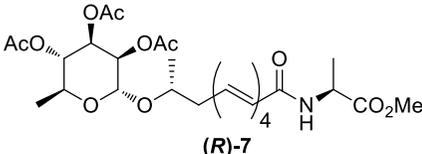
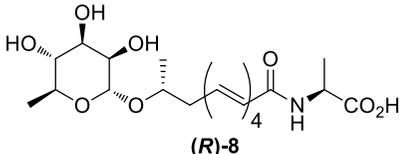
de *Streptococcus agalactiae*. En este sentido, los análogos que se sintetizaron fueron **(R)-7** y **(R)-8** (Tabla I.6Tabla I.2), con 4 dobles enlaces en su estructura.

Una vez obtenido el aldehído de 3 dobles enlaces **(R)-V** con configuración *R*, como se puede ver en el **Esquema I.13**, se procedió a llevar a cabo una reacción de HWE con el fosfonato **XVI** dando lugar al análogo **(R)-4**, al que posteriormente se le desprotegió el grupo hidroxilo con amberlita sin lavar con la finalidad de poner introducir en ese extremo el azúcar ramnosa. Tras ello se sustituyó el grupo hidroxilo de **(R)-VI** por la ramnosa acetilada utilizando cianuro de mercurio, obteniéndose **(R)-7** con un rendimiento moderado. Finalmente se preparó el derivado **(R)-8** saponificando el éster metílico de la *L*-alanina terminal quedando ésta sustituida por un resto de ácido carboxílico.



Una vez sintetizados los compuestos **(R)-7** y **(R)-8**, teniendo en uno de los extremos ramnosa en lugar del grupo TBS y en el otro extremo la *L*-alanina con el éster metílico (**(R)-7**) o el ácido carboxílico terminal (**(R)-8**), se comprobó la actividad hemolítica de cada uno de ellos. Ambos resultaron ser no hemolíticos, volviendo a demostrar la importancia de la presencia de un número mayor de dobles enlaces, o bien la combinación de 4 o un número superior de dobles enlaces con un grupo TBS apolar en uno de los extremos y un grupo polar la *L*-alanina con un resto ácido en el extremo opuesto.

**Tabla I.6.** Resultados de los ensayos de actividad hemolítica de los análogos **(R)-7** y **(R)-8**. Imágenes representativas de los pocillos de las placas de agar-sangre en las que se analizaron los análogos **(R)-7** y **(R)-8** a una concentración de 0.02M disueltos en **DMSO-d<sub>6</sub>** o **DTS**. Se añadieron en cada pocillo 70 µL de la disolución 0.02M de cada uno de ellos.

Análogos	Actividad hemolítica	En DMSO-d <sub>6</sub>	En DTS
 <p><b>(R)-7</b></p>	No*		
 <p><b>(R)-8</b></p>	No		

\* El compuesto precipitó en el pocillo.

De todos los resultados anteriores se puede concluir que los análogos que presentaron mayor actividad hemolítica fueron los compuestos **5**, **10**, **15** y **22**. En este punto, para poder atribuir de forma más rotunda la hemólisis a la combinación de 4 o más dobles enlaces con la presencia de los grupos terminales TBS y *L*-alanina con un resto ácido, se realizaron unas pruebas de actividad adicionales en el *Seattle Children's Hospital (EE.UU.)*.

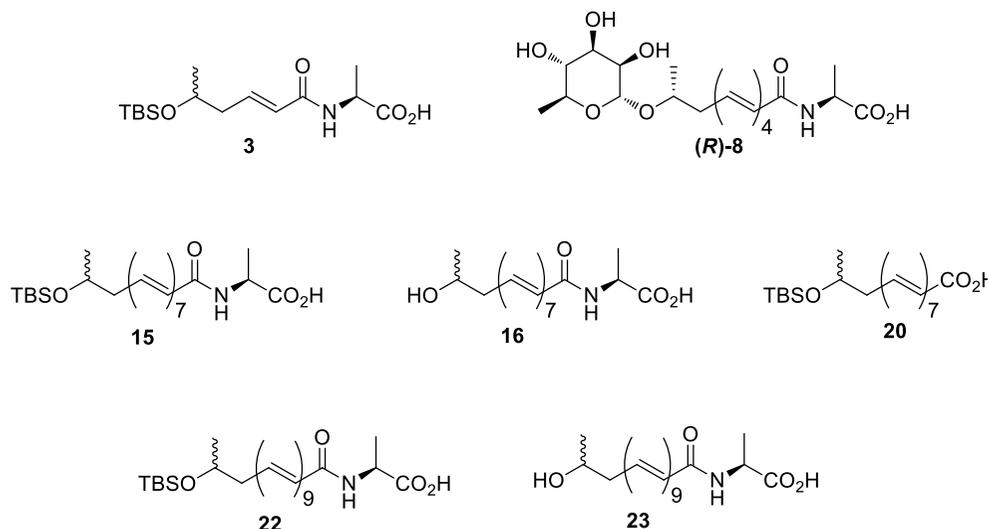
A su vez, una vez obtenidas estas conclusiones, hay que destacar que, a partir de 7 dobles enlaces conjugados, debido a la fotosensibilidad de los

productos, las reacciones se llevaron a cabo en matraces opacos o con los matraces cubiertos con papel de aluminio. Asimismo, la purificación de los productos se realizó mediante cromatografía flash cubriendo las columnas con dicho papel aislándolas, en la medida de lo posible, de la luz. En cuanto a la conservación de los productos, todos aquellos que presentan 4 dobles enlaces o más, se guardaron en disolución para evitar reacciones de polimerización y en atmósfera de argón para inhibir la formación de radicales libres. Además, todos ellos se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar su posible deterioro antes de la realización de las pruebas de actividad.

### **I.3.2. Estudios de actividad hemolítica en el *Seattle Children's Hospital***

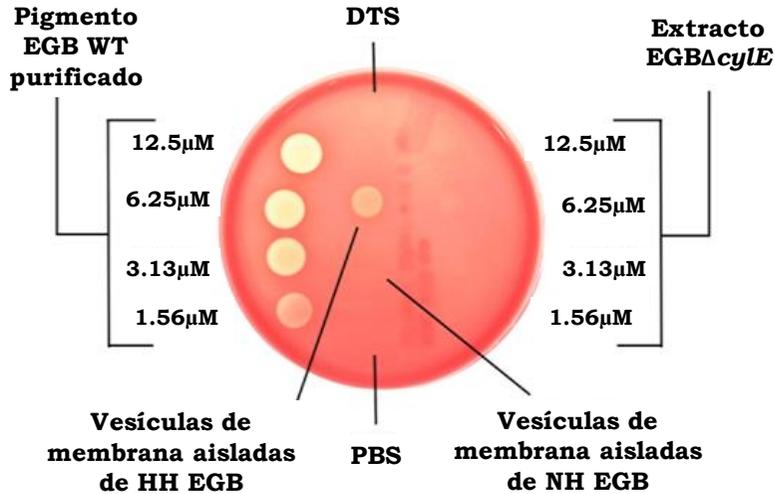
Una vez se sintetizaron en el *Departamento Química Orgánica de la Universidad de Granada* y se probaron todos los análogos en placas de agar-sangre en el *Hospital Virgen de las Nieves en Granada*, se seleccionaron los que resultaron de mayor interés y se enviaron al *Seattle Children's Hospital en Seattle*, institución con la que se ha colaborado a lo largo de este proyecto para llevar a cabo un estudio en mayor profundidad. De todos los compuestos sintetizados se escogieron los análogos **3**, **(R)-8**, **15**, **16**, **20**, **22** y **23**, para hacer un estudio comparativo simplificado de diferentes estructuras, incluyendo derivados hemolíticos y no hemolíticos (**Figura I.14**).

El análogo **3** se seleccionó debido a que, pese a presentar en los extremos un grupo TBS y otro ácido, fue el único de todos los sintetizados con esa estructura que no mostró actividad hemolítica. El análogo **(R)-8**, se escogió por ser el que más similitud presentaba con el Granadaeno natural, ya que incluye un resto de ramnosa en uno de los extremos de la molécula y la configuración absoluta del C-27 es (R). Los análogos **15**, **20** y **22** porque fueron los únicos análogos, con un número superior de dobles enlaces, que mostraron claramente actividad hemolítica. Asimismo, los análogos **16** y **23** porque, aun siendo similares a **15** y **22**, mostraron una actividad hemolítica muy distinta, debido a la presencia de un grupo hidroxilo libre en lugar de protegido como TBS.



**Figura I.14.** Análogos seleccionados enviados a *Seattle Children's Hospital*. **3**, **(R)-8**, **15**, **16**, **20**, **22** y **23**.

Para poder llevar a cabo un estudio comparativo, en primer lugar, la estudiante de doctorado *Blair Armistead* (*Departamento de Salud Global, Universidad de Washington*) realizó en Seattle la purificación y prueba de la actividad hemolítica y citolítica del pigmento Granadaeno aislado de bacterias de EGB. En ese caso, como puede verse en la **Figura I.17** **Figura I.15 A**), se probaron el pigmento purificado, proveniente de una cepa EGB WT (zona izquierda de la placa) y el pigmento extraído de una cepa no hemolítica *EGBΔcylE* (zona derecha de la placa), ambos disueltos en DTS en placas de agar-sangre en superficie a diferentes concentraciones (12.5, 6.25, 3.13 y 1.56  $\mu\text{M}$ ). Se observó, por un lado, que el pigmento obtenido de EGB WT presentó actividad hemolítica, apareciendo un halo de hemólisis que disminuyó al disminuir la concentración. Por otro lado, el pigmento extraído de la cepa no hemolítica no mostró ninguna actividad.

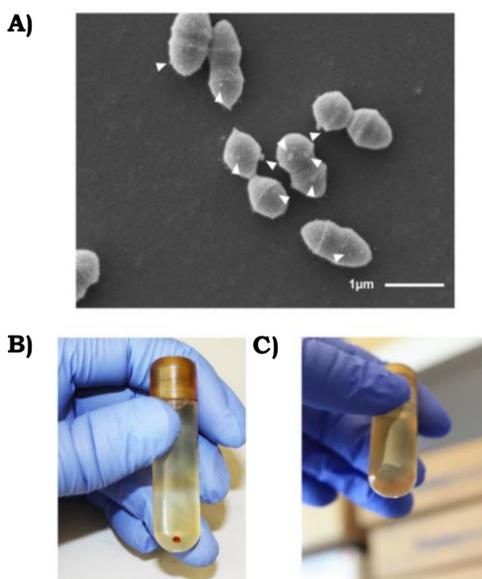


**Figura I.15.** Pruebas de la actividad hemolítica del Granadaeno natural en placas agar-sangre. Placa de agar-sangre en la que se probó el pigmento Granadaeno purificado de EGB WT (zona izquierda de la placa) y el pigmento extraído de *EGBΔcyLE* (zona derecha de la placa), disueltos en **DTS** a unas concentraciones de 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56  $\mu\text{M}$ . A su vez, se probaron las vesículas de membrana (VM) de la cepa hiperhemolítica (HH EGB, *EGBΔcovR*) y VM obtenidas del EGB no hemolítico (NH EGB, *EGBΔcovRΔcyLE*), a la izquierda y derecha de la placa, respectivamente. Como controles se probaron DTS y PBS. En todos los casos se añadieron 10  $\mu\text{L}$  en superficie.

El siguiente objetivo se centró en el estudio de la localización del pigmento en las células bacterianas. Con el fin de establecer si existían diferencias en la localización del Granadaeno en cepas hemolíticas y no hemolíticas, al igual que si existían diferencias en magnitud de la actividad hemolítica, se estudiaron en profundidad dos cepas de EGB. La primera fue *EGBΔcovR*, cepa que sobreexpresa el pigmento hemolítico y carece del represor de hemolisina *CovR* / S y la segunda fue su cepa isogénica no hemolítica, *EGBΔcovRΔcyLE*, que carece del gen *cyLE*, el cual es necesario para la producción del pigmento.

Una vez seleccionadas las cepas, se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM). En ambos casos se apreciaron en las células bacterianas unas estructuras esféricas a las que se les conoce como vesículas de membrana (VM), similares a las previamente descritas por Surve *et al.*<sup>[120]</sup>. Dichas VM que se visualizaron en la superficie de las células bacterianas,

aparecen señaladas con puntas de flecha en la **Figura I.16 A)**. Posteriormente, con el fin de indagar si el pigmento estaba o no presente en esas VM, ambas cepas se ultracentrifugaron. La primera de ellas, *EGB $\Delta$ *covR**, dio lugar a un pequeño sedimento rojo-anaranjado (**Figura I.16 B)**) sugiriendo la presencia del pigmento en esta cepa. Por el contrario, en el caso de la cepa *EGB $\Delta$ *covR* $\Delta$ *cytE**, como puede verse en la **Figura I.16 C)**, tras la centrifugación no se observó ningún sedimento en el tubo de centrifuga.



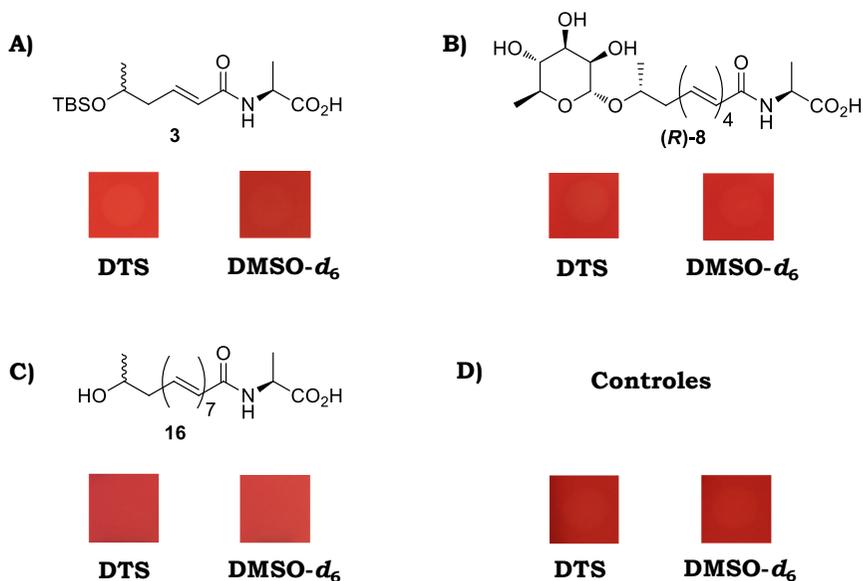
**Figura I.16. A)** Imagen SEM de vesículas de membrana en la superficie de células bacterianas de una cepa hiperhemolítica de EGB, **B)** Sedimento obtenido por ultracentrifugación de cepa HH EGB, *EGB $\Delta$ *covR** y **C)** Sedimento obtenido por ultracentrifugación de cepa NH EGB, *EGB $\Delta$ *covR* $\Delta$ *cytE**.

Tras esa primera observación cualitativa, el contenido de cada tubo de centrifuga se resuspendió en PBS y se sonicó, analizándose posteriormente la actividad hemolítica de cada uno de ellos en placas de agar-sangre.

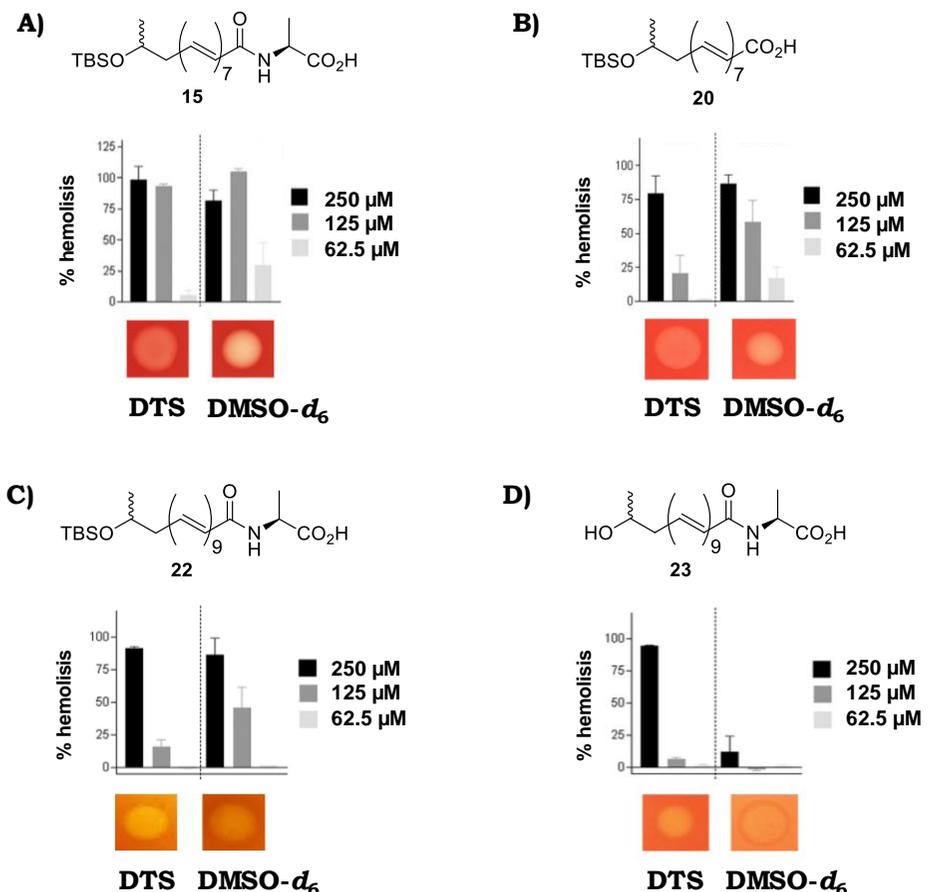
En la placa de agar-sangre (**Figura I.15 A)**) también se estudió la actividad hemolítica de dichas vesículas de membrana (VM) aisladas de una cepa hiperhemolítica (HH EGB, *EGB $\Delta$ *covR**) y de una cepa no hemolítica (NH EGB, *EGB $\Delta$ *covR* $\Delta$ *cytE**). En general se determinó que las VM de la cepa *EGB $\Delta$ *covR** eran hemolíticas, apareciendo un halo de hemólisis en la placa similar al

mostrado por el Granadaeno purificado de EGB WT. Sin embargo, en el caso de la cepa *EGBΔcovRΔcylE* no se observó ninguna actividad hemolítica, corroborando que el pigmento hemolítico Granadaeno se encontraba en la cepa hiperhemolítica y no en la cepa no hemolítica.

Una vez analizada la hemólisis provocada por distintas cepas del pigmento Granadaeno, se probaron en superficie de placas agar-sangre la batería de análogos sintetizados que se enviaron al *Seattle's Children Hospital* (**Figura I.17** y **Figura I.18**). Tras añadir 5  $\mu$ L de disolución 0.02 M de cada uno de ellos en la superficie de las placas de agar-sangre y seguir el mismo protocolo que se llevó a cabo en el *Servicio de Microbiología, en el Hospital Virgen de las Nieves*, se corroboró que los compuestos **3**, **(R)-8** y **16** no eran hemolíticos mientras que los derivados **15**, **20**, **22** y **23** sí presentaron actividad, confirmando los resultados previamente obtenidos en Granada.



**Figura I.17.** Imágenes de los resultados de las pruebas de actividad hemolítica en placas de agar-sangre de los análogos **A) 3**, **B) (R)-8** y **C) 16**. Se añadieron 5  $\mu$ L de disolución 0.02M, de cada compuesto disuelto por un lado en DTS y por otro, en DMSO- $d_6$ . **D)** Condiciones control de DTS y DMSO- $d_6$ .



**Figura I.18.** Imágenes de los resultados de las pruebas de actividad hemolítica en superficie en placas de agar-sangre en las que se probaron los análogos **A) 15**, **B) 20**, **C) 22** y **D) 23**. Se añadieron 5 μL de disolución 0.02M de cada compuesto disuelto por un lado en DTS y por otro, en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Representación gráfica del porcentaje de hemólisis en DTS y DMSO-*d*<sub>6</sub> en glóbulos rojos humanos añadiendo 5 μL de disolución a 250, 125 y 62.5 μM. Las barras de error muestran la desviación media estándar de 3 experimentos diferentes.

A su vez, los derivados que mostraron actividad hemolítica, se probaron en glóbulos rojos humanos y se cuantificó el porcentaje de hemólisis en estos casos mediante medidas de la hemoglobina liberada.

Como se observa en la **Figura I.18**, en general, el porcentaje de hemólisis aumenta con la concentración del análogo. También se analizó la posible interferencia de los distintos disolventes empleados (DTS y DMSO-*d*<sub>6</sub>), no observándose diferencias significativas en el porcentaje de hemólisis entre

disolventes exceptuando el caso del análogo **23**. Dicho compuesto mostró un mayor porcentaje de hemólisis en solución estabilizadora que en DMSO- $d_6$ , tanto a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  como 125  $\mu\text{M}$ , lo que sugirió que el almidón presente en DTS, puede ser imprescindible para estabilizar las cadenas más largas de polieno no protegidas. Así pues, la presencia de almidón evitó la precipitación parcial del producto, que sí se observó cuando se empleó el análogo disuelto en DMSO- $d_6$ , de manera que el producto disuelto en DTS presentó una aparente mayor actividad hemolítica debido a que por la ausencia de precipitado la concentración que se probó fue realmente la que se planteó desde un principio. Estas diferencias en el porcentaje de hemólisis entre disolventes se analizaron con una prueba *t de Student* bilateral para dos muestras desapareadas.

Una vez analizado el sesgo debido al disolvente se analizaron los resultados obtenidos para cada compuesto. Así, el análogo que ocasionó mayor hemólisis fue nuevamente **15**, que presenta 7 dobles enlaces en su estructura, un extremo hidrofóbico con un grupo TBS y un extremo polar con el aminoácido *L*-alanina con un ácido carboxílico terminal. Cabe destacar que, aunque el análogo **3** presenta los mismos grupos funcionales, pero con menor número de dobles enlaces, no mostró ninguna actividad, lo que sugirió que la longitud del polieno era un factor determinante en la presencia o ausencia de actividad hemolítica. En este sentido, se compararon los resultados obtenidos para los compuestos **15** y **22**, de estructura de nuevo idéntica con la única diferencia del número de dobles enlaces. En este caso, a pesar de lo que cabría esperar por el aumento de número de dobles enlaces en **22**, el análogo **15** siguió siendo el más hemolítico. Esto parece indicar que, a partir de un determinado número de dobles enlaces, el polieno no fue estable y precipitó en gran medida, por lo que la actividad hemolítica que se observó no es la actividad real. También se estudió la influencia del aminoácido *L*-alanina, comparando el porcentaje obtenido en los compuestos **15** y **20**, ambos con una estructura similar, cuya única diferencia es la ausencia del aminoácido *L*-alanina en uno de los extremos terminales de **20**. Al presentar **15** una hemólisis superior, esto sugirió que la presencia de dicho aminoácido de carácter hidrofílico, parece favorecer un aumento de la

actividad hemolítica en este tipo de análogos, tal y como se había observado previamente.

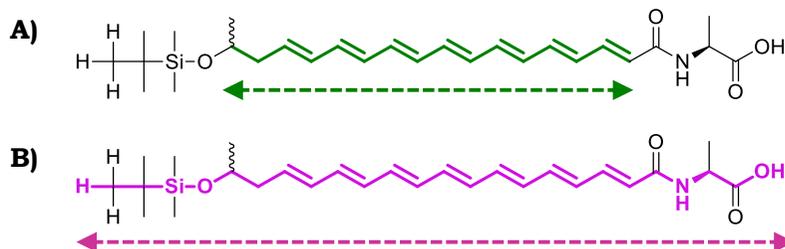
Tras todos estos experimentos podemos concluir que, por un lado, al comparar la actividad hemolítica del Granadaeno natural con la de los análogos sintetizados se observó que la hemólisis provocada por el Granadaeno fue en todos los casos superior a la mostrada por el resto de análogos, incluso a concentraciones muy inferiores. Por otro lado, se corroboró que tanto la longitud de la cadena del polieno como la naturaleza de los grupos situados a ambos extremos de la molécula son factores determinantes de la actividad hemolítica, viéndose favorecida por la presencia del grupo TBS en uno de los extremos y la *L*-alanina con un resto ácido en el extremo opuesto.

### **I.3.3. Estudios de relación estructura-actividad**

Tras la síntesis de los colorantes análogos al Granadaeno y posterior estudio de sus actividades hemolíticas tanto en el *Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves* como en el *Seattle's Children Hospital*, el último paso fue establecer de forma global, recopilando todos los resultados, qué factores estructurales favorecían un aumento de la ruptura de los hematíes.

Como se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos demostraron que la actividad hemolítica dependió drásticamente de la estructura de los análogos estudiados, de manera que tanto la longitud de la cadena como el carácter hidrofílico o hidrofóbico de los grupos presentes en ambos extremos de las moléculas, son los principales causantes de la presencia o ausencia de actividad. Asimismo, de todos los análogos estudiados, únicamente resultaron ser hemolíticos los compuestos **5**, **10**, **15**, **20**, **22** y **23**, y, exceptuando el análogo **23**, todos presentaron una estructura similar, caracterizada por la presencia de un grupo hidrofóbico (TBS) en uno de sus extremos y un grupo hidrofílico, (*L*-alanina con un ácido carboxílico terminal) en el extremo opuesto. La única diferencia por tanto entre estos derivados fue el número de dobles enlaces, que variaba de 4 a 9 y, por tanto, la longitud de la cadena de los mismos. Por ello se decidió estimar de forma

aproximada con ayuda del programa Mercury, la longitud de la cadena poliénica y la longitud de toda la estructura de la uno de los derivados como se puede observar en la **Figura I.19**.



**Figura I.19.** Ejemplo de la estimación de las longitudes de la cadena y longitud total del análogo **15**. **A)** Longitud de la cadena poliénica medida desde el carbono análogo al C-27 del Granadaeno hasta el último carbono del doble enlace terminal de la cadena y **B)** Longitud total calculada desde un hidrógeno terminal del grupo *tert*-butilo del TBS hasta el hidrógeno del extremo opuesto.

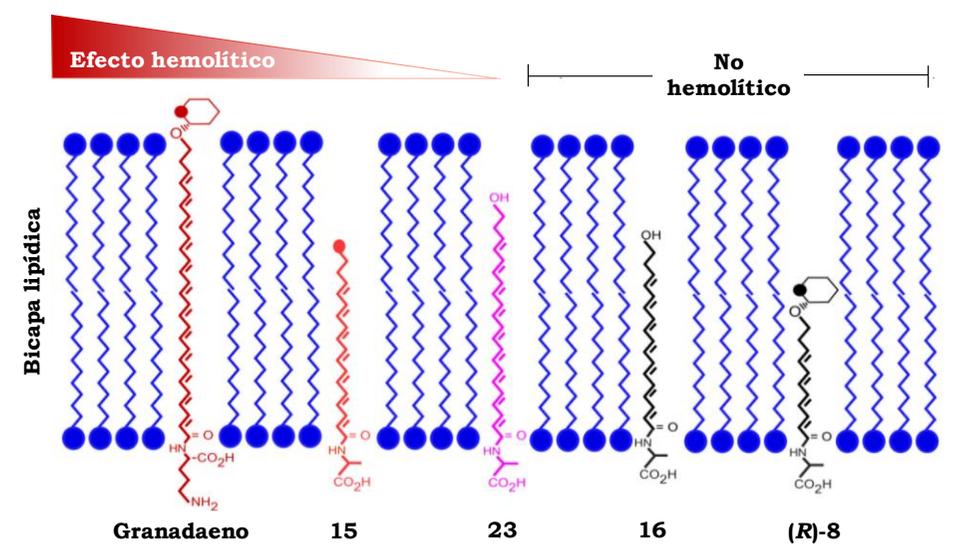
En este sentido los valores, como se muestra en la **Tabla I.7**, aumentan conforme aumenta el número de dobles enlaces. Los polienos con 9 dobles enlaces, mostraron actividad tanto con (**22**) como sin (**23**) el grupo hidrofóbico TBS, hecho que no ocurrió en el caso de análogos con un número inferior de dobles enlaces (**6**, **11** y **16**). Esto confirma por tanto que el aumento de longitud de la cadena poliénica induce una mayor hemólisis. A pesar de estos resultados, como ya se ha comentado, es cierto que ninguno de los análogos sintéticos mostró mayor hemólisis que el Granadaeno natural, lo cual puede deberse a que la longitud de la cadena del Granadaeno, de en torno a 29.59 Å, es superior a la longitud calculada de la cadena de los otros análogos probados y presenta en los extremos grupos diferentes, lo que podría ocasionar una mayor ruptura de los glóbulos rojos.

**Tabla I.7.** Cálculo de los valores de la longitud de la cadena poliénica y cadena total de cada uno de los análogos. En color rojo aparecen los derivados hemolíticos.

Análogo	Longitud Cadena (Å)	Longitud Total (Å)	Análogo	Longitud Cadena (Å)	Longitud Total (Å)
<b>1</b>	1.53	7.90	<b>13</b>	12.89	17.11
<b>2</b>	3.57	14.89	<b>14</b>	17.92	24.69
<b>3</b>	3.63	14.48	<b>15</b>	17.88	23.96
<b>4</b>	10.68	18.32	<b>16</b>	17.72	23.97
<b>5</b>	10.70	18.52	<b>17</b>	17.70	22.47
<b>6</b>	10.53	16.82	<b>18</b>	17.72	21.91
<b>(R)-7</b>	10.82	17.31	<b>19</b>	17.74	21.60
<b>(R)-8</b>	10.76	16.74	<b>20</b>	17.74	20.76
<b>9</b>	13.21	20.13	<b>21</b>	22.63	29.36
<b>10</b>	13.17	19.45	<b>22</b>	22.60	28.56
<b>11</b>	12.93	19.33	<b>23</b>	22.43	28.61
<b>12</b>	12.92	17.98			

En la **Figura I.20**, se plantea una justificación a este fenómeno. Así, como ya se mencionó en los *Antecedentes* del capítulo, la molécula de Granadaeno, pigmento insoluble de elevada longitud, puede abarcar el grosor de la membrana plasmática en su totalidad (30-40 Å). A su vez, debido a la naturaleza hidrofílica de los dos grupos presentes en sus extremos, la ramnosa y la *L*-ornitina, su inserción en la membrana celular debe ser muy estable, lo que favorece la ruptura y lisis de los hematíes. Esto, sin embargo, no ocurre en el caso de los análogos sintetizados ya que todos ellos presentan una longitud inferior (**Tabla I.7**), lo cual podría explicar la actividad hemolítica atenuada del resto de análogos en comparación con el Granadaeno. Sin embargo, la longitud de la cadena no puede ser un factor

único y determinante en la hemólisis ya que, como se puede ver en dicha figura, análogos como **15** y similares, ocasionaron hemólisis a pesar de no tener una longitud igual al pigmento. Esto puede deberse a que, aun con una longitud de cadena menor, la naturaleza de los grupos funcionales favorece la inserción estable en la membrana. De esta forma, el grupo hidrofóbico TBS queda a la altura de la parte lipídica, apolar de la bicapa mientras que la *L*-alanina, hidrofílica, en el exterior, en la parte polar, generando así una inserción muy estable. Esto no ocurre con análogos como **23** cuya actividad hemolítica, a pesar de tener una cadena más larga que **15**, fue inferior. Este hecho puede justificarse considerando que, en este caso, en lugar de TBS, ese extremo quedó desprotegido con un OH, grupo que es hidrofílico y queda a la altura de la parte apolar de la bicapa, como puede verse en la **Figura I.20**, lo que desestabilizaría dicha inserción, además de por su solubilidad inferior como ya se ha comentado en apartados previos.



**Figura I.20.** Comparación del comportamiento del pigmento Granadaeno y distintos análogos sintéticos, al atravesar la bicapa lipídica de las células y relación con la actividad hemolítica que presentan.

Así pues, de este análisis podemos concluir que hay varios factores determinantes en la actividad hemolítica que presentan los análogos, por un lado, el número de dobles enlaces y por tanto la longitud de la cadena (a

mayor longitud, mayor hemólisis) y por otro, la naturaleza de los grupos en los extremos que son los responsables de que la inserción de los colorantes en la bicapa lipídica de la membrana celular sea más o menos estable (a mayor estabilidad, mayor hemólisis).

## I.4. CONCLUSIONS

The conclusions of this chapter are:

- We have developed a synthetic strategy based in HWE reaction to access to twenty-three Granadaene analogues, containing 0, 1, 4, 5, 7 and 9 conjugated double bonds. Isolation and storage conditions have also been optimized and all of the analogues have been fully characterized despite the instability observed when increasing the number of alkenes.
- Hemolytic activity of all analogues has been studied in blood-agar plates, determining that the hemolytic analogues are **5**, **10**, **15**, **20**, **22** y **23** and that none of them is more hemolytic than natural Granadaene. Besides, analogues **3**, **(R)-8**, **15**, **16**, **20**, **22** and **23**, have been exhaustively studied in *Seattle's Children Hospital (Seattle, U.S.A.)* where our results have been corroborated.
- The hemolytic activity is strongly influenced by both the length of the polyene chain and the nature of the terminal groups. Therefore, it was suggested that the longer the chain the more stable was the insertion in the lipid membrane of the cells, according to the nature of the groups at the ends, and greater would be the hemolytic activity.
- The hemolytic activity of synthetic analogues corroborated the mechanism for hemolysis that natural Granadaene presents. This supports the idea that Granadaene and  $\beta$ -hemolysine are the same molecules.
- Granadaene pigment showed hemolytic activity only in hemolytic strains like WT GBS and GBS $\Delta$ *covR*. Also, it is present inside GBS bacteria and in the membrane vesicles in bacteria surface.
- One of these analogues was selected as the best candidate for its use as a possible vaccine against GBS infection like a therapeutic

alternative. It has been tested in mice and it has shown signs of being effective against GBS. Although these are preliminary results, they are prone to patented.



**PARTE**

**EXPERIMENTAL**

**BLOQUE A**



## PARTE EXPERIMENTAL BLOQUE A

### PE.BLOQUE A.CAPÍTULO I. COLORANTES ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL GRANADAENO

#### 1. Síntesis: Aspectos generales

Todos los reactivos y disolventes comercialmente accesibles empleados en las reacciones, extracciones y cromatografías se utilizaron sin purificación adicional. Todas las reacciones se realizaron en recipientes de vidrio y las reacciones de HWE se llevaron a cabo en THF recién destilado sobre sodio, en presencia de benzofenona y en atmósfera de argón. El análisis de cromatografía en capa fina se realizó con placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 (230-240  $\mu\text{m}$ ) con un indicador F254. Las manchas se visualizaron con luz UV.

Los espectros de RMN se hicieron a temperatura ambiente, empleando una frecuencia de 600, 500 y 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  y de 151, 126 y 101 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ , en ambos casos indicando los desplazamientos químicos en ppm. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se hicieron en disolventes deuterados, DMSO- $d_6$ +TFA- $d_4$ , Metanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), Cloroformo- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ), empleando como referencia los desplazamientos químicos de protones que aparecen a 2.5, 3.31 y 7.26 ppm. De cada espectro se dan los valores de multiplicidad de cada señal siendo s (singlete), d (doblete), t (triplete), c, (cuartete), q (quintuplete), sex (sextuplete), hept (heptuplete), m (multiplete), dd (doble doblete), dt (doble triplete), dc (doble cuartete), td (triple doblete), ddd (doble doblete de dobletes), ddt (doble doblete de tripletes) y sa (singlete ancho), los valores de constantes de acoplamiento ( $J$  en Hz) y las respectivas integrales. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  se hicieron con los mismos disolventes cuyos desplazamientos químicos aparecen a 39.52, 49.0 y 77.16 ppm. Las multiplicidades de los carbonos fueron asignadas con ayuda de los espectros DEPT. Las señales de los isómeros minoritarios se indican entre paréntesis y el resto corresponden a los isómeros mayoritarios. Los espectros de masas se llevaron a cabo por ionización por electroespray (ESI), ionización por impacto electrónico (EI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

## **2. Síntesis de los colorantes análogos sintéticos del Granadaeno**

En primer lugar, debido a que para sintetizar los diferentes análogos con número de dobles enlaces variable se han utilizado protocolos de reacción comunes, a continuación, se van a describir los procedimientos generales de cada uno de los tipos.

### **Procedimiento general para las reacciones de HWE (PG-I-1)**

Sobre una disolución del fosfonato **F2** y **F3** (2.4 eq.) o **XVI**, **XVIII** y **F1** (2.5 eq.) en THF anhidro (30-150 mL) se añadió NaH al 60 % (2.5 eq.) a 0 °C. Tras 10 minutos en agitación se añadió el aldehído correspondiente (1 eq.) gota a gota lentamente a lo largo de 10 minutos. Posteriormente se dejó la reacción en agitación durante tiempos variables entre 30 minutos y 1 hora y media a temperatura ambiente. Tras comprobar la finalización de la reacción por TLC se añadió una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se evaporó el THF a presión reducida. Esta fase acuosa se extrajo con acetato de etilo y se lavó con NH<sub>4</sub>Cl y salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo.

### **Procedimiento general para las reacciones de reducción de éster a alcohol con DIBAL-H (PG-I-2)**

En primer lugar, el éster correspondiente (1 eq.) se disolvió en THF anhidro a 0 °C. Posteriormente se añadió una disolución de DIBAL-H 1 M en THF (2.5 eq.). Tras la adición se dejó la mezcla agitando a esa misma temperatura durante 1-2 horas. Al finalizar el tiempo, la reacción se hidrolizó con agua, se extrajo con acetato de etilo y se lavó con HCl (10 %) y salmuera. A continuación, se secó la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo.

### **Procedimiento general para las reacciones de oxidación con Periodano de Dess-Martin o DMP (PG-I-3)**

El alcohol obtenido mediante el PG-I-2 (1 eq.) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C. A esta disolución se adicionó posteriormente DMP (1.5 eq.), dejando la

mezcla en agitación a temperatura ambiente durante de 1-2 horas. Tras comprobar la ausencia de alcohol por TLC la reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con una solución saturada 1:1 de NaHCO<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> al 10 %. A continuación, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato.

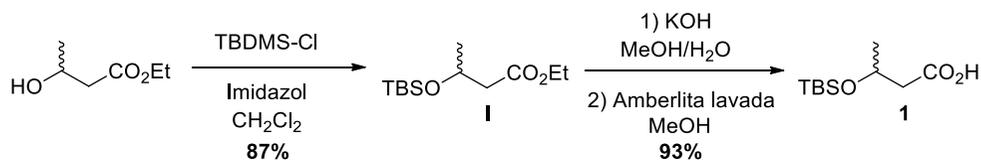
#### Procedimiento general para saponificación de ésteres (PG-I-4)

El éster correspondiente (1eq.) se disolvió en metanol y se adicionó una disolución de KOH 2 M en metanol (8-12 eq.). A su vez se añadieron unas 3-5 gotas de agua y se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 4-6 horas. Al transcurrir el tiempo la mezcla se neutralizó mediante la adición de amberlita 15 (aproximadamente 70-110 mg previamente lavada con una mezcla de metanol-diclorometano y filtrada). Finalmente, el crudo se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de diclorometano-metanol.

#### Procedimiento general para la desprotección del grupo TBS (PG-I-5)

Para la desprotección del grupo TBS, el análogo correspondiente (1eq.) se disolvió en una mezcla de metanol/ diclorometano en una proporción 9:2 y se adicionó amberlita 15 (sin lavar previamente). A continuación, el crudo se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de diclorometano-metanol.

#### Síntesis del compuesto 1



#### Síntesis de I

Se partió del producto comercial 3-hidroxibutanoato racémico (2.52 g, 19 mmol) que se disolvió en diclorometano. Luego se adicionó cloruro de *tert*-butildimetilsilano (4.31 g, 29 mmol) e imidazol (2.60 g, 38 mmol) y la mezcla se dejó en agitación durante 1 hora y media. Una vez transcurrido el tiempo

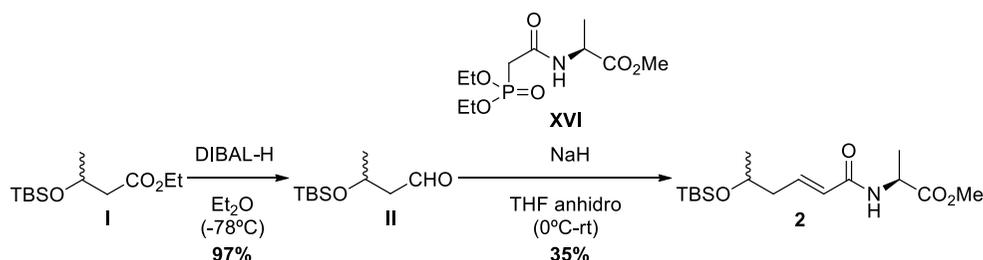
se evaporó el diclorometano a presión reducida y se extrajo la mezcla con acetato de etilo, haciendo 3 lavados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Tras ello la fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo 95:5 como eluyente, obteniéndose 4.07 g de un aceite transparente con un rendimiento del 87 %. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron descritos previamente por Fortunati *et al.*<sup>[121]</sup>.

### Compuesto 1

Una vez sintetizado y purificado **I** (109 mg, 0.443 mmol) se disolvió en metanol y se añadió hidróxido potásico (1.77 mL, 3.54 mmol) y unas gotas de agua. Tras añadirlo se dejó la mezcla en agitación durante 2 horas y se neutralizó con amberlita previamente lavada. La amberlita se lavó con metanol y diclorometano durante 1 hora y luego se filtró y se dejó secar para poder utilizarla posteriormente. Tras la neutralización se purificó el crudo mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de diclorometano-metanol 95:5 como eluyente, obteniéndose 90 mg de un aceite amarillo con un rendimiento 93 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  4.32 – 4.23 (m, 1H), 2.53 – 2.42 (m, 2H), 1.22 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.06 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  177.5 (C), 65.8 (CH), 44.6 ( $\text{CH}_2$ ), 25.9 ( $\text{CH}_3$ ), 23.8 ( $\text{CH}_3$ ), 18.1 (C), -4.4 ( $\text{CH}_3$ ), -5.0 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{SiNa}$ : 241.1230, obtenida: 241.1229.

### Síntesis del compuesto 2



## Síntesis de II

Sobre una disolución de **I** (4.02 g, 16 mmol) en dietiléter (30 mL) a  $-78$  °C se adicionó DIBAL-H 1 M en THF (18 mL, 18 mmol), dejándolo en agitación durante 20 minutos a dicha temperatura. Luego, la mezcla de reacción se hidrolizó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con HCl (10 %) y salmuera. A continuación, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo 9:1 como eluyente, obteniéndose 3.19 g de un aceite transparente con un rendimiento del 97 %.

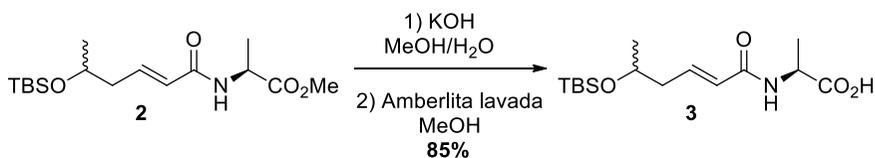
Los datos espectroscópicos de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  coincidieron con los descritos previamente por Fortunati *et al.*<sup>[121]</sup>.

## Compuesto 2

Siguiendo el procedimiento PG-I-1 se hizo reaccionar el aldehído **II** (474 mg, 2.35 mmol) con el fosfonato **XVI** (1.58 g, 5.63 mmol) obteniendo 271 mg de **1**, un aceite transparente con un rendimiento del 35 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  6.82 (dt,  $J = 15.2, 7.5$  Hz, 1H), 6.15 – 6.04 (m, 1H), 5.83 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 4.68 (t,  $J = 7.2$ , 1H), 3.95 – 3.87 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.39 – 2.22 (m, 2H), 1.43 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.15 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  173.8 (C), 165.2 (C), 142.2 (CH), 125.3 (CH), 67.8 (CH), 52.6 (CH<sub>3</sub>), 48.1 (CH), 42.6 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.7 (CH<sub>3</sub>), 18.2 (C),  $-4.42$  (CH<sub>3</sub>),  $-4.44$  (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd.  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{NO}_4\text{Si}$ : 330.2095, obtenida: 330.2087.

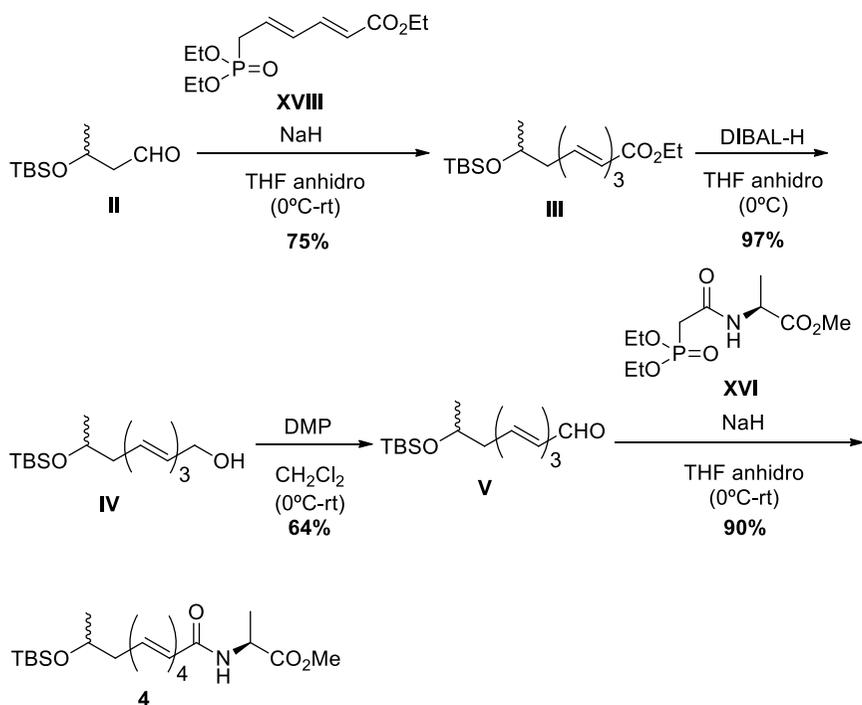
## Síntesis del compuesto 3



Seguendo el procedimiento PG-I-4 se saponificó el análogo **2** (128 mg, 0.373 mmol), dando lugar a la obtención de **3** (105 mg), como aceite marrón claro con un rendimiento del 85 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-d)** δ 9.76 – 9.25 (m, 1H), 6.82 (dt, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 1H), 6.57 – 6.36 (m, 1H), 5.82 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 4.73 – 4.51 (m, 1H), 3.95 – 3.86 (m, 1H), 2.38 – 2.21 (m, 2H), 1.46 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-d)** δ 175.9 (C), 166.2 (C), 143.1 (CH), 124.9 (CH), 67.8 (CH), 48.5 (CH), 42.6 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (CH<sub>3</sub>), 18.2 (C), –4.4 (CH<sub>3</sub>), –4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub>Si: 316.1938, obtenida: 316.1933.

### Síntesis del compuesto 4



### Síntesis de III

A partir del aldehído **II** (3.50 g, 17 mmol) y el fosfonato **XVIII** (11.96 g, 43 mmol) se sintetizó el éster **III** (4.22 g) mediante el procedimiento PG-I-1,

con un rendimiento del 75 %. Los datos espectroscópicos de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  coincidieron con los descritos por Wang y colaboradores<sup>[122]</sup>.

### Síntesis de IV

El precursor **IV** se preparó mediante el procedimiento PG-I-2 tras la reducción con DIBAL-H del éster **III** (7.49 g, 23 mmol). El rendimiento de la reacción fue de un 97 % obteniéndose 6.30 g de un aceite de color amarillo claro.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)** 6.70 (dd,  $J = 15.2, 10.6$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.48 (dd,  $J = 14.8, 11.2$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.35 – 6.18 (m, 2H), 6.16 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 6.14 – 6.03 (m, 2H), 5.82 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 5.79 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.70 (dt,  $J = 14.9, 7.5$  Hz, 1H), 5.50 (dt,  $J = 10.8, 7.8$  Hz, 1H, isómero minoritario), 4.21 – 4.15 (m, 2H), 3.90 – 3.78 (m, 1H), 2.40 – 2.27 (m, 2H, isómero minoritario), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 1.13 (d,  $J = 5.2$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.11 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  133.6 (CH), 132.4 (CH), 132.3 (CH), 132.0 (CH, isómero minoritario), 131.96 (CH, isómero minoritario), 131.93 (CH), 131.91 (CH, isómero minoritario), 131.4 (CH), 130.1 (CH), 130.0 (CH, isómero minoritario), 129.6 (CH), 128.9 (CH), 68.7 (CH), 68.6 (CH, isómero minoritario), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 63.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.71 (CH<sub>3</sub>), 23.70 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.30 (C), 18.29 (C, isómero minoritario), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}]^+$  calcd. C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>Si: 282.2015, obtenida: 282.2026.

### Síntesis de V

El alcohol **IV** (2.29 g, 8.09 mmol) se oxidó mediante el PG-I-3 con DMP (5.15 g, 12 mmol) dando lugar a 1.46 g de un aceite amarillo **V** con un rendimiento del 64 %.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  9.56 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, isómero minoritario), 9.54 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.11 (dd,  $J = 15.3, 11.1$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 14.9, 11.4$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.64 (dd,  $J = 14.9, 10.6$  Hz, 1H), 6.42 (dd,  $J = 14.9, 11.2$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.34 (dd,  $J = 14.9, 11.2$

Hz, 1H), 6.26 – 6.08 (m, 2H), 6.02 (dt,  $J = 15.1, 7.4$  Hz, 1H), 5.82 (dt,  $J = 11.1, 8.1$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.71 (ddd,  $J = 14.7, 11.2, 6.0$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.19 (dd,  $J = 16.8, 1.7$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.07 (dd,  $J = 10.0, 1.6$  Hz, 1H, isómero minoritario), 3.89 (sex,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 2.47 – 2.32 (m, 2H, isómero minoritario), 2.31 – 2.14 (m, 2H), 1.15 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.13 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.86 (s, 9H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  193.6 (CH), 152.4 (CH), 152.2 (CH, isómero minoritario), 143.1 (CH), 139.0 (CH), 138.1 (CH, isómero minoritario), 137.1 (CH, isómero minoritario), 135.7 (CH, isómero minoritario), 132.8 (CH, isómero minoritario), 131.8 (CH), 131.3 (CH, isómero minoritario), 131.0 (CH), 130.1 (CH, isómero minoritario), 129.5 (CH, isómero minoritario), 128.3 (CH), 68.3 (CH), 68.2 (CH, isómero minoritario), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.9 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), –4.3 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), –4.4 (CH<sub>3</sub>), –4.6 (CH<sub>3</sub>), –4.7 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>SiNa: 303.1750, obtenida: 303.1752.

#### Compuesto 4

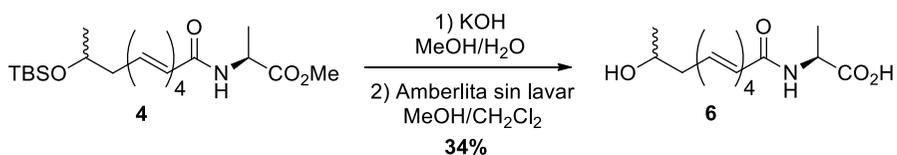
Se hizo reaccionar **V** (635 mg, 2.26 mmol) con el fosfonato **XVI** (1.53 g, 5.43 mmol) siguiendo el procedimiento PG-I-1, obteniéndose 826.7 mg del análogo **4** con un rendimiento del 90 % en forma de un aceite amarillo claro.

**$^1\text{H}$  RMN (600 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.28 – 7.20 (m, 1H), 6.98 – 6.92 (m, 1H, isómero minoritario), 6.64 – 6.55 (m, 1H, isómero minoritario), 6.51 (dd,  $J = 14.8, 11.0$  Hz, 1H), 6.32 (dd,  $J = 14.9, 10.7$  Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J = 15.0, 11.5$  Hz, 1H), 6.19 – 6.15 (m, 1H), 6.15 – 6.05 (m, 1H), 5.94 (t,  $J = 11.3$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.85 (dd,  $J = 15.0, 10.4$  Hz, 1H), 5.78 (dt,  $J = 15.2, 7.6$  Hz, 1H), 5.58 (dt,  $J = 10.8, 8.1$  Hz, 1H, isómero minoritario), 4.67 (q,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 3.86 – 3.79 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.39 – 2.27 (m, 2H, isómero minoritario), 2.26 – 2.16 (m, 2H), 1.41 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 1.11 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.10 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.85 (s, 9H), 0.02 (s, 3H, isómero minoritario), 0.01 (s, 3H), 0.00 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (151 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  173.8 (C), 173.8 (C, isómero minoritario), 165.7 (C), 165.6



minoritario), 134.5 (CH), 133.9 (CH), 133.7 (CH, isómero minoritario), 132.6 (CH, isómero minoritario), 131.8 (CH), 131.7 (CH, isómero minoritario), 131.1 (CH), 131.0 (CH, isómero minoritario), 124.74 (CH), 124.71 (CH, isómero minoritario), 68.5 (CH, isómero minoritario), 68.4 (CH), 52.2 (CH, isómero minoritario), 52.0 (CH), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.3 (CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.4 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 19.2 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.9 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>SiNa: 416.2227, obtenida: 416.2230.

### Síntesis del compuesto 6



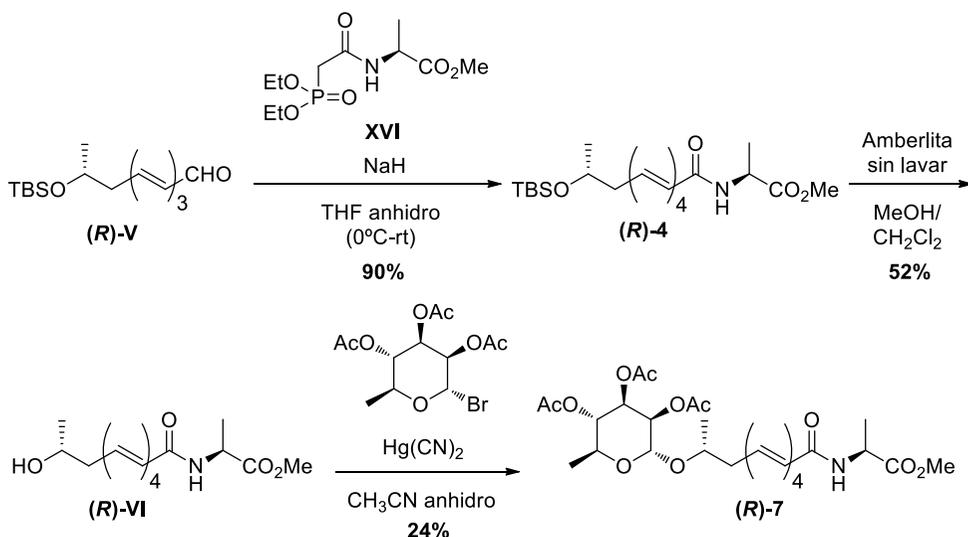
A su vez, a partir de **4** (53 mg, 0.130 mmol) se sintetizó el análogo **6** (12.5 mg) mediante el PG-I-5 y una posterior purificación con TLC preparativa. Se obtuvo con un rendimiento del 34 % en forma de un aceite amarillo claro.

**<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.28 – 7.23 (m, 1H, isómero minoritario), 7.22 – 7.17 (m, 1H), 6.73 (dd, *J* = 14.3, 11.5 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.66 (dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.59 (dd, *J* = 14.8, 10.9 Hz, 1H), 6.44 – 6.32 (m, 2H), 6.27 (dd, *J* = 15.0, 10.9 Hz, 1H), 6.20 (dd, *J* = 15.1, 10.6 Hz, 1H), 6.07 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 5.91 – 5.83 (m, 1H), 5.77 – 5.72 (m, 1H, isómero minoritario) 5.65 – 5.59 (m, 1H), 4.39 – 4.31 (m, 1H), 4.28 – 4.23 (m, 1H, isómero minoritario), 3.80 (hept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.44 – 2.33 (m, 2H, isómero minoritario), 2.32 – 2.21 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.33 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.17 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 168.3 (C), 162.8 (C), 142.1 (CH), 142.0 (CH, isómero minoritario), 141.14 (CH), 141.07 (CH, isómero minoritario), 137.9 (CH), 134.7 (CH), 133.8 (CH), 133.6 (CH, isómero minoritario), 132.9 (CH, isómero minoritario), 131.7 (CH), 131.43 (CH, isómero minoritario), 131.38 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH), 128.1 (CH, isómero

minoritario), 124.5 (CH, isómero minoritario), 124.1 (CH), 68.5 (CH, isómero minoritario), 68.4 (CH), 51.2 (CH), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.6 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M-H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>: 278.1392, obtenida: 278.1392.

### Síntesis de los compuestos (*R*)-7 y (*R*)-8



La metodología sintética para la preparación del derivado (*R*)-V, así como sus precursores previos (*R*)-I, (*R*)-II, (*R*)-III y (*R*)-4 y (*R*)-IV, fue análoga a la descrita para los compuestos racémicos I, II, III, IV, V y 4 pero empleando como sustrato de partida (*R*)-3-hidroxibutanoato.

### Síntesis (*R*)-VI

Se disolvió (*R*)-4 (292 mg, 0.716 mmol) en una mezcla diclorometano/metanol y mediante el procedimiento PG-I-5 se obtuvieron 109.6 mg (52 %) del compuesto (*R*)-VI como aceite amarillo claro.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7.25 – 7.19 (m, 1H, isómero minoritario), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 6.74 (dd, *J* = 14.7, 11.3 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.68 (dd, *J* = 14.8, 11.0 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.64 – 6.58 (m, 1H), 6.45 – 6.37 (m, 1H), 6.36 – 6.31 (m, 1H), 6.30 – 6.17 (m, 2H), 6.05 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.04 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 5.87 (dt, *J* = 15.0, 7.5

Hz, 1H), 5.58 (dt,  $J = 11.0, 7.9$  Hz, 1H, isómero minoritario), 4.50 (c,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 3.83–3.76 (m, 1H), 3.73 (s, 3H, isómero minoritario), 3.72 (s, 3H), 2.46 – 2.34 (m, 2H, isómero minoritario), 2.33 – 2.20 (m, 2H), 1.40 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.40 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 1.17 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.16 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta$  174.8 (C), 168.6 (C), 168.5 (C, isómero minoritario), 142.6 (CH), 142.5 (CH, isómero minoritario), 141.5 (CH), 141.4 (CH, isómero minoritario), 138.0 (CH), 134.8 (CH), 133.8 (CH), 133.5 (CH, isómero minoritario), 133.0 (CH, isómero minoritario), 131.8 (CH, isómero minoritario), 131.6 (CH), 131.4 (CH, isómero minoritario), 131.3 (CH, isómero minoritario), 130.8 (CH), 123.7 (CH, isómero minoritario), 123.4 (CH), 68.5 (CH, isómero minoritario), 68.3 (CH), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 49.6 (CH), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 17.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>Na: 316.1519, obtenida: 316.1507.  $\alpha_{\text{D}} = -5.29$ .

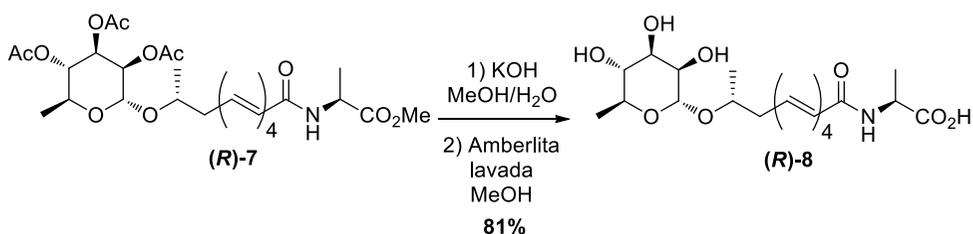
### Compuesto (*R*)-7

Se disolvió (*R*)-VI (114 mg, 0.389 mmol) en acetonitrilo anhidro (2 mL) y se añadió Hg(CN)<sub>2</sub> (98 mg, 0.388 mmol). Tras ello se adicionó a la mezcla bromoramnosa (206 mg, 0.583 mmol) y se dejó en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una disolución KBr 1 M, una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua. A continuación, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo 7:3 como eluyente, obteniéndose 52.4 mg de (*R*)-7 un aceite marrón con un rendimiento del 24 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.32 – 7.22 (m, 1H), 6.99 (dd,  $J = 14.6, 11.6$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.63 (td,  $J = 14.9, 11.3$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.53 (dd,  $J = 14.8, 10.9$  Hz, 1H), 6.38 – 6.29 (m, 1H), 6.29 – 6.14 (m, 2H), 6.13 – 6.07 (m, 1H), 5.88 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.86 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 5.78 (dt,  $J = 15.0, 7.6$  Hz, 1H), 5.59 (dt,  $J = 10.5, 7.7$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.25 (ddd,  $J = 10.9, 7.6, 3.5$  Hz, 1H), 5.16 (dd,  $J = 3.9, 1.9$  Hz, 1H), 5.03 (td,  $J = 10.0, 4.0$  Hz, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.68 (dt,

$J = 6.7, 6.0$  Hz, 1H), 3.95 – 3.85 (m, 1H), 3.84 – 3.77 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.57 – 2.49 (m, 2H, isómero minoritario), 2.43 – 2.35 (m, 1H), 2.34 – 2.26 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.03 (s, 3H, isómero minoritario), 2.00 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H, isómero minoritario), 1.76 – 1.67 (sa, 1H), 1.40 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.17 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.16 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, isómero minoritario).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Cloroformo- $d$ )**  $\delta$  173.8 (C), 170.4 (C), 170.14 (C), 170.07 (C, isómero minoritario), 165.6 (C), 141.6 (CH), 141.5 (CH, isómero minoritario), 140.2 (CH, isómero minoritario), 140.1 (CH), 136.4 (CH), 133.2 (CH), 133.0 (CH), 132.8 (CH, isómero minoritario), 131.6 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH), 130.8 (CH, isómero minoritario), 130.2 (CH, isómero minoritario), 130.1 (CH, isómero minoritario), 129.8 (CH), 122.9 (CH, isómero minoritario), 122.6 (CH), 95.3 (CH, isómero minoritario), 95.2 (CH), 73.3 (CH, isómero minoritario), 72.9 (CH), 71.28 (CH), 71.26 (CH, isómero minoritario), 70.6 (CH), 69.33 (CH, isómero minoritario), 69.30 (CH), 66.7 (CH, isómero minoritario), 66.6 (CH), 52.6 (CH<sub>3</sub>), 48.2 (CH), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 35.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 20.95 (CH<sub>3</sub>), 20.88 (CH<sub>3</sub>), 20.86 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 19.1 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 19.0 (CH<sub>3</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>), 17.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>11</sub>: 566.2595, obtenida: 566.2607.  $\alpha_{\text{D}} = -36.61$ .

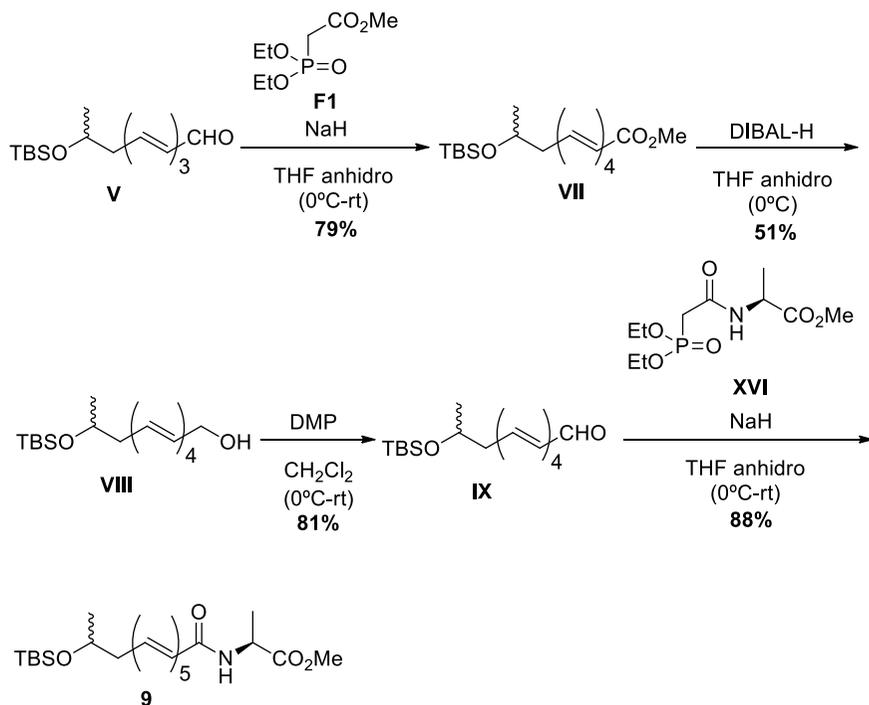
### Síntesis del compuesto (R)-8



Una vez obtenido **(R)-7** (27 mg, 0.048 mmol) se sometió a una reacción de saponificación siguiendo el procedimiento PG-I-5, obteniéndose 16.4 mg de **(R)-8** un aceite marrón claro con un rendimiento del 81 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.21 (dd,  $J = 15.1, 11.0$  Hz, 1H, isómero minoritario), 7.18 (dd,  $J = 15.1, 11.0$  Hz, 1H), 7.11 – 7.03 (m, 1H, isómero

minoritario), 6.81 – 6.74 (m, 1H, isómero minoritario), 6.73 – 6.62 (m, 1H), 6.59 (dd,  $J = 14.8, 10.9$  Hz, 1H), 6.44 – 6.32 (m, 2H), 6.27 (dd,  $J = 14.9, 10.9$  Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J = 15.2, 10.6$  Hz, 1H), 6.15 – 6.09 (m, 1H, isómero minoritario), 6.07 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H), 6.02 (t,  $J = 11.3$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.86 (dt,  $J = 14.8, 7.2$  Hz, 1H), 5.63 (dt,  $J = 10.5, 7.7$  Hz, 1H, isómero minoritario), 4.80 (s, 1H), 4.34 (c,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.83 (dt,  $J = 12.4, 7.0$  Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.68 – 3.61 (m, 1H), 3.37 (t,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 2.55 – 2.46 (m, 2H, isómero minoritario), 2.45 – 2.28 (m, 2H), 1.38 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.23 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 1.16 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.15 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  179.4 (C), 168.0 (C), 167.9 (C, isómero minoritario), 141.7 (CH), 141.6 (CH, isómero minoritario), 140.9 (CH), 140.8 (CH, isómero minoritario), 137.6 (CH), 134.3 (CH), 134.03 (CH, isómero minoritario), 133.99 (CH), 133.8 (CH, isómero minoritario), 132.6 (CH, isómero minoritario), 131.9 (CH), 131.8 (CH isómero minoritario), 131.63 (CH, isómero minoritario), 131.58 (CH, isómero minoritario), 131.3 (CH, isómero minoritario), 131.1 (CH), 124.9 (CH, isómero minoritario), 124.5 (CH), 99.3 (CH), 99.1 (CH, isómero minoritario), 74.0 (CH), 73.4 (CH), 73.3 (CH, isómero minoritario), 72.84 (CH), 72.81 (CH, isómero minoritario), 72.4 (CH), 70.10 (CH), 70.06 (CH, isómero minoritario), 51.6 (CH), 42.9 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 19.22 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 19.19 (CH<sub>3</sub>), 19.17 (CH<sub>3</sub>), 19.07 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 17.9 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub>Na: 448.1941, obtenida: 448.1932.  $\alpha_{\text{D}} = -16.38$ .

**Síntesis del compuesto 9**

**Síntesis de VII**

Utilizando el procedimiento PG-I-1, a partir del aldehído **V** (343 mg, 1.22 mmol) y el fosfonato **F1** (643 g, 3.06 mmol) se obtuvieron 326.3 mg del éster **VII**, un aceite amarillo claro, con un rendimiento del 79 %.

$^1\text{H RMN (500 MHz, Cloroformo-}d$ )  $\delta$  7.32 (dd,  $J = 15.3, 11.3$  Hz, 1H), 7.03 – 6.96 (m, 1H, isómero minoritario), 6.71 – 6.63 (m, 1H, isómero minoritario), 6.57 (dd,  $J = 14.8, 11.0$  Hz, 1H), 6.38 (dd,  $J = 14.9, 10.7$  Hz, 1H), 6.29 (dd,  $J = 14.7, 11.4$  Hz, 1H), 6.20 (dd,  $J = 15.1, 11.0$  Hz, 1H), 6.17 – 6.08 (m, 1H), 5.90 – 5.80 (m, 2H), 5.66 – 5.60 (m, 1H, isómero minoritario), 3.89 – 3.82 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.30 – 2.19 (m, 2H), 1.13 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).  $^{13}\text{C RMN (126 MHz, Cloroformo-}d$ )  $\delta$  167.7 (C), 144.9 (CH), 144.8 (CH, isómero minoritario), 141.24 (CH), 141.18 (CH), 137.7 (CH, isómero minoritario), 135.1 (CH), 132.9 (CH, isómero minoritario), 132.4 (CH), 130.1 (CH), 129.8 (CH, isómero minoritario), 129.4 (CH), 119.9 (CH), 68.6 (CH), 51.6 (CH<sub>3</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>),

-4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>SiNa: 359.2012, obtenida: 359.2007.

### Síntesis de VIII

El precursor **VIII** se preparó mediante el procedimiento PG-I-2 tras la reducción con DIBAL-H (6.72 mL, 6.72 mmol) del éster **VII** (904 mg, 2.69 mmol). El rendimiento de la reacción fue de un 51 % obteniéndose 421 mg de un aceite de color amarillo claro.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 6.67 (dd, *J* = 14.6, 11.2 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.50 (dd, *J* = 15.3, 11.1 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.35 – 6.27 (m, 2H), 6.22 (s, 1H), 6.21 – 6.12 (m, 2H), 6.09 (ddd, *J* = 15.0, 10.4, 1.3 Hz, 1H), 5.83 (dt, *J* = 14.6, 5.9 Hz, 1H), 5.71 (dt, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 1H), 5.54 – 5.47 (m, 1H, isómero minoritario), 4.19 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.88 – 3.79 (m, 1H), 2.40 – 2.30 (m, 2H, isómero minoritario), 2.29 – 2.16 (m, 2H), 1.12 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 133.8 (CH), 133.7 (CH), 132.7 (CH, isómero minoritario), 132.6 (CH), 132.4 (CH), 132.2 (CH, isómero minoritario), 131.9 (CH), 131.8 (CH), 131.4 (CH), 130.9 (CH), 130.3 (CH, isómero minoritario), 130.1 (CH, isómero minoritario), 129.6 (CH, isómero minoritario), 129.2 (CH, isómero minoritario), 68.8 (CH), 68.7 (CH, isómero minoritario), 63.6 (CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M]<sup>+</sup> calcd. C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>Si: 308.5300, obtenida: 308.5311.

### Síntesis de IX

El alcohol **VIII** (66 mg, 0.214 mmol) se oxidó mediante el PG-I-3 con DMP (136 mg, 0.321 mmol) dando lugar a 53 mg de un aceite amarillo **IX** con un rendimiento del 81 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 9.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, isómero minoritario), 9.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 15.3, 11.0 Hz, 1H), 6.78 – 6.55 (m, 1H), 6.48 – 6.37 (m, 2H), 6.36 – 6.30 (m, 1H, isómero minoritario), 6.24 (dd, *J* = 14.9, 11.0 Hz, 1H), 6.20 – 6.10 (m, 2H), 6.02 (dt, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 1H, isómero minoritario), 5.90 (dt, *J* = 15.1, 7.6 Hz, 1H), 5.72 – 5.65 (m,

1H, isómero minoritario), 3.91 – 3.82 (m, 1H), 2.45 – 2.33 (m, 2H, isómero minoritario), 2.31 – 2.22 (m, 2H), 1.13 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  193.7 (C, isómero minoritario), 193.6 (C), 152.4 (CH, isómero minoritario), 152.1 (CH), 143.1 (CH), 143.1 (CH, isómero minoritario), 139.2 (CH), 139.0 (CH, isómero minoritario), 136.4 (CH), 134.4 (CH, isómero minoritario), 133.2 (CH, isómero minoritario), 132.3 (CH), 131.9 (CH, isómero minoritario), 131.7 (CH, isómero minoritario), 131.0 (CH, isómero minoritario), 130.8 (CH), 129.9 (CH), 129.4 (CH), 128.3 (CH, isómero minoritario), 68.5 (CH), 68.3 (CH, isómero minoritario), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.84 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.80 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), 18.2 (C, isómero minoritario), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>SiNa: 329.1907, obtenida: 329.1919.

### Compuesto 9

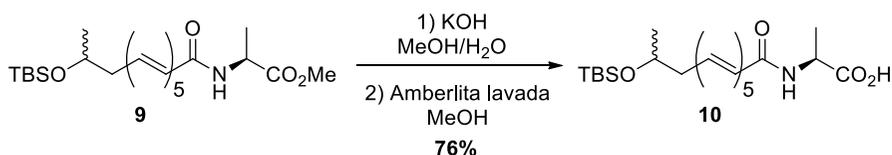
Siguiendo el procedimiento PG-I-4 se saponificó **IX** (152 mg, 0.496 mmol), dando lugar a la obtención de **9** (190 mg), como aceite amarillo con un rendimiento del 88 %.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta$  7.27 – 7.15 (m, 1H), 6.62 (dt,  $J = 14.9$ , 10.2 Hz, 1H), 6.53 – 6.22 (m, 5H), 6.21 – 6.10 (m, 1H), 6.04 (dd,  $J = 14.9$  Hz, 4.5 Hz, 1H), 5.81 (ddt,  $J = 19.4$ , 15.1, 7.5 Hz, 1H), 5.64 – 5.52 (m, 1H, isómero minoritario), 4.48 (c,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.96 – 3.85 (m, 1H), 3.73 (s, 3H, isómero minoritario), 3.72 (s, 3H), 2.40 – 2.32 (m, 2H, isómero minoritario), 2.27 – 2.21 (m, 2H), 1.40 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

**$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta$  174.8 (C), 168.61 (C), 168.58 (C, isómero minoritario), 142.6 (CH), 142.5 (CH, isómero minoritario), 141.5 (CH), 141.4 (CH, isómero minoritario), 138.2 (CH), 138.0 (CH, isómero minoritario), 136.6 (CH), 135.3 (CH, isómero minoritario), 134.3 (CH), 134.0 (CH), 133.8 (CH, isómero minoritario), 133.3 (CH, isómero minoritario), 132.8 (CH), 132.2 (CH), 131.6 (CH, isómero minoritario), 131.5 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH), 130.8 (CH, isómero minoritario), 123.44 (CH), 123.38 (CH, isómero minoritario), 69.93 (CH), 69.87 (CH, isómero minoritario), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 49.6 (CH), 44.3

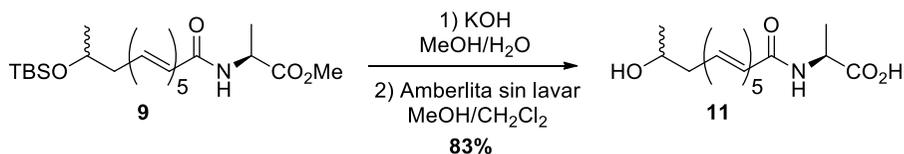
(CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (C), 17.5 (CH<sub>3</sub>), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>SiNa: 456.2540, obtenida: 456.2540.

### Síntesis del compuesto 10



Siguiendo el procedimiento PG-I-4, el análogo **9** (19.1 mg, 0.044 mmol) se sometió a una reacción de saponificación y se obtuvo 14 mg del derivado **10**, un sólido amarillo con un rendimiento del 76 %.

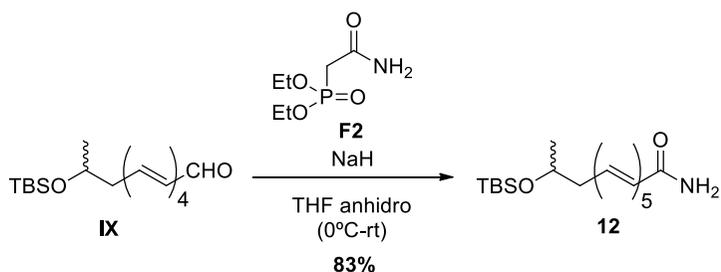
**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.72 (dd, *J* = 14.7, 12.2 Hz, 1H, isómero minoritario), 7.25 – 7.17 (m, 1H), 6.88 – 6.80 (m, 1H, isómero minoritario), 6.70 – 6.56 (m, 1H), 6.55 – 6.21 (m, 5H), 6.22 – 6.02 (m, 2H), 5.88 – 5.71 (m, 1H), 5.64 – 5.53 (m, 1H, isómero minoritario), 4.39 (m, 1H), 3.95 – 3.87 (m, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 2H, isómero minoritario), 2.27 – 2.21 (m, 2H), 1.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 168.4 (C), 142.2 (CH), 141.22 (CH), 138.32 (CH, isómero minoritario), 138.1 (CH, isómero minoritario), 137.9 (CH), 137.6 (CH, isómero minoritario), 136.8 (CH), 136.7 (CH, isómero minoritario), 136.5 (CH, isómero minoritario), 135.2 (CH, isómero minoritario), 134.3 (CH), 134.2 (CH, isómero minoritario), 134.0 (CH), 133.8 (CH), 132.8 (CH, isómero minoritario), 132.2 (CH), 131.6 (CH isómero minoritario), 131.0 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH), 128.1 (CH), 127.2 (CH, isómero minoritario), 70.0 (CH), 69.9 (CH, isómero minoritario), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.3 (CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (C), 18.3 (CH<sub>3</sub>), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>SiNa: 442.2384, obtenida: 442.2376.

**Síntesis del compuesto 11**

A partir de **9** (16.3 mg, 0.038 mmol) se sintetizó el análogo **11** (9.5 mg) mediante el PG-I-5 con posterior purificación mediante TLC preparativa, aislándose el producto en forma de aceite amarillo claro con un rendimiento del 83 %.

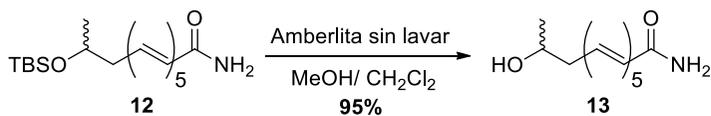
**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.71 (dd,  $J = 14.7, 12.2$  Hz, 1H, isómero minoritario), 7.27 – 7.16 (m, 1H), 6.89 – 6.80 (m, 1H, isómero minoritario), 6.74 – 6.54 (m, 1H), 6.54 – 6.14 (m, 5H), 6.14 – 6.04 (m, 2H), 5.90 – 5.78 (m, 1H), 5.64 – 5.54 (m, 1H isómero minoritario), 4.43 – 4.35 (m, 1H), 3.84 – 3.76 (m, 1H), 2.44 – 2.34 (m, 2H, isómero minoritario), 2.34 – 2.18 (m, 2H), 1.40 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 1.16 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  178.3 (C), 168.4 (C), 142.2 (CH), 142.1 (CH, isómero minoritario), 141.2 (CH), 141.1 (CH, isómero minoritario), 138.28 (CH), 138.25 (CH, isómero minoritario), 138.02 (CH, isómero minoritario), 137.97 (CH, isómero minoritario), 137.9 (CH, isómero minoritario), 137.5 (CH, isómero minoritario), 136.8 (CH), 136.5 (CH, isómero minoritario), 134.7 (CH, isómero minoritario), 134.03 (CH), 134.02 (CH, isómero minoritario), 133.9 (CH), 133.8 (CH, isómero minoritario), 132.8 (CH, isómero minoritario), 132.24 (CH, isómero minoritario), 132.22 (CH, isómero minoritario), 131.7 (CH, isómero minoritario), 131.4 (CH, isómero minoritario), 131.1 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH, isómero minoritario), 128.6 (CH, isómero minoritario), 128.1 (CH), 127.3 (CH), 124.9 (CH), 124.1 (CH, isómero minoritario), 124.0 (CH, isómero minoritario), 68.5 (CH, isómero minoritario), 68.4 (CH), 50.7 (CH), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.7 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.3 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>Na: 328.1519, obtenida: 328.1524.

## Síntesis del compuesto **12**



A partir del aldehído **IX** (51.9 mg, 0.169 mmol) y el fosfonato **F2** (79.3 mg, 0.406 mmol) se sintetizaron 48.7 mg del análogo **12** (aceite amarillo) mediante el procedimiento PG-I-1, con un rendimiento del 83 %.

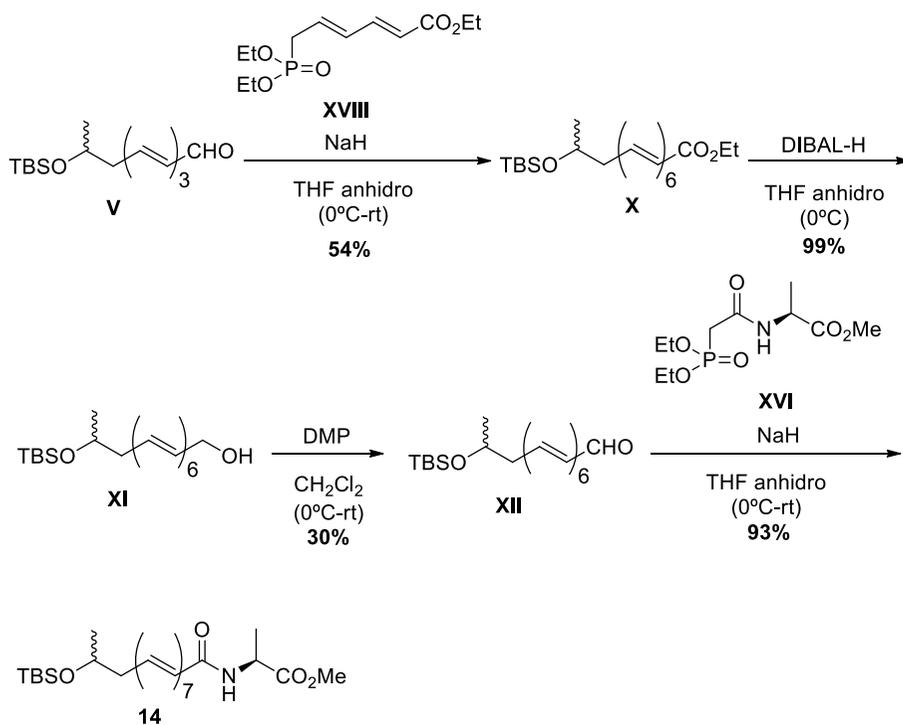
**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.73 (dd,  $J = 14.8, 12.1$  Hz, 1H, isómero minoritario), 7.26 (td,  $J = 13.7, 13.0, 2.4$  Hz, 1H), 6.99 (dd,  $J = 14.6, 11.7$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.81 (c,  $J = 13.5$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.60 – 6.50 (m, 1H), 6.40 (dd,  $J = 14.8, 10.8$  Hz, 1H), 6.36 – 6.07 (m, 5H), 6.07 – 6.01 (m, 1H, isómero minoritario), 5.89 (dt,  $J = 15.0, 4.3$  Hz, 1H), 5.85 – 5.72 (m, 1H), 3.89 – 3.80 (m, 1H), 2.30 – 2.17 (m, 2H), 1.12 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 3H, isómero minoritario), 0.03 (s, 3H), 0.02 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  168.5 (C), 142.4 (CH), 142.3 (CH, isómero minoritario), 140.6 (CH), 140.4 (CH, isómero minoritario), 137.3 (CH), 137.2 (CH, isómero minoritario), 135.8 (CH), 134.8 (CH, isómero minoritario), 133.9 (CH), 132.6 (CH), 132.4 (CH, isómero minoritario), 131.9 (CH, isómero minoritario), 131.4 (CH), 131.0 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH, isómero minoritario), 130.7 (CH), 130.20 (CH, isómero minoritario), 130.16 (CH, isómero minoritario), 129.5 (CH), 129.3 (CH, isómero minoritario), 127.0 (CH, isómero minoritario), 122.0 (CH), 121.9 (CH, isómero minoritario), 68.64 (CH), 68.56 (CH, isómero minoritario), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 25.98 (CH<sub>3</sub>), 25.95 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.27 (C), 18.26 (C, isómero minoritario), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[M+Na]^+$  calcd. C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>2</sub>SiNa: 370.2172, obtenida: 370.2171.

**Síntesis del compuesto 13**

El análogo **12** (13.9 mg, 0.040 mmol) se sometió a una reacción de desprotección del TBS siguiendo el procedimiento PG-I-5 y se obtuvo 8.8 mg de **13** un sólido amarillo con un rendimiento del 95 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.72 (ddd, *J* = 14.9, 11.9, 1.1 Hz, 1H, isómero minoritario), 7.28 – 7.15 (m, 1H), 7.12 (dd, *J* = 14.7, 11.7 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.85 (dd, *J* = 14.5, 11.8 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.72 – 6.56 (m, 1H), 6.55 – 6.06 (m, 6H), 6.02 (dd, *J* = 15.1, 4.5 Hz, 1H), 5.89 – 5.77 (m, 1H), 5.64 – 5.53 (m, 1H, isómero minoritario), 3.84 – 3.74 (m, 1H), 2.44 – 2.34 (m, 2H, isómero minoritario), 2.34 – 2.18 (m, 2H), 1.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 171.3 (C), 142.93 (CH), 142.85 (CH, isómero minoritario), 141.5 (CH), 141.3 (CH, isómero minoritario), 138.4 (CH, isómero minoritario), 138.2 (CH), 137.8 (CH, isómero minoritario), 137.5 (CH, isómero minoritario), 136.8 (CH, isómero minoritario), 136.6 (CH), 134.0 (CH), 133.8 (CH, isómero minoritario), 132.8 (CH, isómero minoritario), 132.2 (CH), 131.6 (CH, isómero minoritario), 130.9 (CH), 130.8 (CH, isómero minoritario), 128.1 (CH), 127.4 (CH, isómero minoritario), 127.1 (CH), 124.5 (CH, isómero minoritario), 123.6 (CH), 68.5 (CH, isómero minoritario), 68.4 (CH), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>Na: 256.1308, obtenida: 256.1298.

### Síntesis del compuesto 14



### Síntesis de X

Mediante el procedimiento PG-I-1, a partir del aldehído **V** (2.76 g, 9.84 mmol) y el fosfonato **XVIII** (6.52 g, 24 mmol) se obtuvieron 2.15 g del éster **X**, un sólido amarillo, con un rendimiento del 54 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 7.31 (dd, *J* = 15.3, 11.0 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 14.8, 11.0 Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 14.9, 10.7 Hz, 1H), 6.40 – 6.23 (m, 5H), 6.22 – 6.18 (m, 1H), 6.18 – 6.05 (m, 1H), 5.85 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 5.76 (dt, *J* = 15.1, 7.6 Hz, 1H), 5.58 – 5.51 (m, 1H, isómero minoritario), 4.20 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.89 – 3.77 (m, 1H), 2.42 – 2.31 (m, 2H, isómero minoritario), 2.29 – 2.14 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 167.29 (C), 167.27 (C, isómero minoritario), 144.54 (CH), 144.50 (CH, isómero minoritario), 140.9 (CH), 140.8 (CH, isómero minoritario), 137.5 (CH), 137.4 (CH, isómero minoritario), 136.0 (CH), 135.99 (CH, isómero

minoritario), 135.1 (CH), 133.4 (CH), 132.8 (CH, isómero minoritario), 132.7 (CH), 132.5 (CH, isómero minoritario), 132.0 (CH), 131.9 (CH, isómero minoritario), 131.6 (CH), 131.0 (CH), 130.5 (CH, isómero minoritario), 130.4 (CH, isómero minoritario), 130.3 (CH, isómero minoritario), 130.0 (CH, isómero minoritario), 129.9 (CH), 120.6 (CH, isómero minoritario), 120.5 (CH), 68.7 (CH), 68.6 (CH, isómero minoritario), 60.4 (CH<sub>2</sub>), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), 14.5 (CH<sub>3</sub>), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>SiNa: 425.2482, obtenida: 425.2486.

### Síntesis de XI

El precursor **XI** se preparó mediante el procedimiento PG-I-2 tras la reducción con DIBAL-H (14 mL, 14 mmol) del éster **X** (2.15 g, 5.34 mmol). El rendimiento de la reacción fue de un 99 % obteniéndose 1.97 g de un aceite de color amarillo.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 6.72 (dd, *J* = 14.8, 11.2 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.49 (dd, *J* = 14.8, 11.2 Hz, 1H), 6.35 – 6.23 (m, 2H), 6.21 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 10.9, 4.4 Hz, 1H), 6.08 – 6.03 (m, 1H), 5.88 – 5.77 (m, 2H), 5.71 (dt, 14.9, 7.5 Hz, 2H), 5.51 (dt, *J* = 10.9, 7.8 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.91 – 3.77 (m, 1H), 2.39 – 2.27 (m, 2H, isómero minoritario), 2.26 – 2.15 (m, 2H), 1.14 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 133.7 (CH), 132.5 (CH), 132.3 (CH), 132.0 (CH, isómero minoritario), 131.98 (CH), 131.94 (CH, isómero minoritario), 131.4 (CH), 130.04 (CH), 130.01 (CH, isómero minoritario), 129.6 (CH, isómero minoritario), 129.0 (CH, isómero minoritario), 68.74 (CH), 68.68 (CH, isómero minoritario), 63.7 (CH<sub>2</sub>), 63.6 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub> isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). No se pudo obtener un espectro de masas adecuado debido a la inestabilidad de este compuesto.

## Síntesis de XII

El alcohol **XI** (1.33 g, 3.69 mmol) se oxidó mediante el PG-I-3 con DMP (2.35 g, 5.54 mmol) dando lugar a 397 mg de un aceite amarillo **XII** con un rendimiento del 30 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  9.63 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, isómero minoritario), 9.56 (dd,  $J = 8.0, 2.2$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 15.1, 11.3$  Hz, 1H), 6.71 (dd,  $J = 14.7, 11.2$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J = 14.7, 11.0$  Hz, 1H), 6.50 – 6.39 (m, 2H), 6.37 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 6.34 – 6.26 (m, 2H), 6.25 – 6.15 (m, 1H), 6.16 – 6.10 (m, 2H), 5.79 (dt,  $J = 15.1, 7.6$  Hz, 1H), 5.62 – 5.54 (m, 1H, isómero minoritario), 3.85 (dt,  $J = 12.0, 5.9$  Hz, 1H), 2.43 – 2.31 (m, 2H, isómero minoritario), 2.31 – 2.21 (m, 2H), 1.15 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.13 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  193.6 (CH), 152.0 (CH), 143.0 (CH), 139.2 (CH), 137.1 (CH), 135.8 (CH), 134.0 (CH), 132.7 (CH), 131.8 (CH), 131.3 (CH), 130.90 (CH, isómero minoritario), 130.87 (CH), 129.7 (CH), 68.7 (CH), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub> isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>SiNa: 381.2220, obtenida 381.2229.

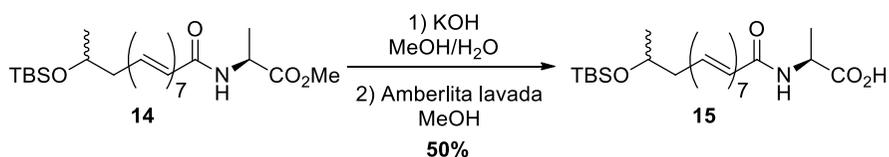
## Compuesto 14

Siguiendo el procedimiento PG-I-1 se hizo reaccionar el aldehído **XII** (76 mg, 0.212 mmol) con el fosfonato **XVI** (155 mg, 0.551 mmol) dando lugar a la obtención 96.3 mg de **14**, un aceite naranja claro con un rendimiento del 93 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta$  7.22 (dd,  $J = 15.1, 11.3$  Hz, 2H), 7.21 (dd,  $J = 15.1, 11.2$  Hz, 2H, isómero minoritario), 6.65 (dd,  $J = 14.8, 11.0$  Hz, 2H), 6.50 (dd,  $J = 14.7, 10.6$  Hz, 1H), 6.46 – 6.29 (m, 4H), 6.28 – 6.22 (m, 1H), 6.19 – 6.08 (m, 1H), 6.04 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H), 5.84 (dt,  $J = 15.4, 7.5$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.75 (dt,  $J = 15.2, 7.6$  Hz, 1H), 5.46 (dd,  $J = 5.9, 1.9$  Hz, 1H), 5.42 (dd,  $J = 5.9, 1.9$  Hz, 1H, isómero minoritario), 4.48 (c,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.02 – 3.93 (m, 1H, isómero minoritario), 3.94 – 3.85 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.40 – 2.32 (m, 2H, isómero minoritario), 2.27 – 2.19 (m, 2H), 1.40 (d,  $J$

= 7.3 Hz, 3H), 1.15 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.14 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  174.8 (C), 168.6 (C), 142.6 (CH), 142.5 (CH, isómero minoritario), 141.50 (CH), 141.46 (CH, isómero minoritario), 138.3 (CH), 138.0 (CH, isómero minoritario), 136.8 (CH), 136.7 (CH, isómero minoritario), 135.9 (CH), 135.3 (CH), 134.2 (CH), 133.7 (CH), 133.6 (CH), 133.4 (CH), 133.3 (CH, isómero minoritario), 133.2 (CH), 132.6 (CH), 123.6 (CH, isómero minoritario), 123.5 (CH), 70.0 (CH), 69.9 (CH, isómero minoritario), 52.7 (CH<sub>3</sub>), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.3 (CH<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (C), 17.5 (CH<sub>3</sub>), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub>SiNa: 508.2853, obtenida: 508.2869.

### Síntesis del compuesto 15

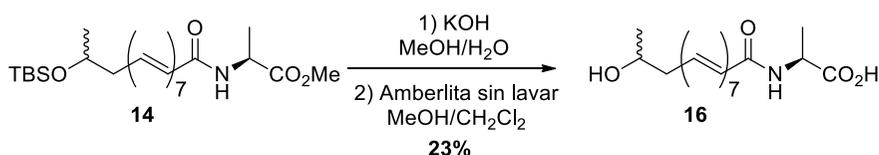


Seguendo el procedimiento PG-I-4, el análogo **14** (46 mg, 0.095 mmol) se sometió a una reacción de saponificación y se obtuvo 22.7 mg de **15**, un aceite naranja intenso con un rendimiento del 50 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.21 (ddd,  $J = 15.0, 11.3, 6.2$  Hz, 1H), 6.72 (dd, 14.9, 11.3, 1H, isómero minoritario), 6.70 – 6.64 (m, 1H), 6.60 (dd,  $J = 14.9, 11.0$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J = 14.8, 10.4$  Hz, 1H, isómero minoritario), 6.43 – 6.32 (m, 4H), 6.26 (dd,  $J = 14.9, 10.9$  Hz, 2H), 6.16 (dd,  $J = 15.4, 10.6$  Hz, 2H), 6.09 (d,  $J = 15.0$  Hz, 2H, isómero minoritario), 6.06 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 5.83 (dt,  $J = 15.1, 7.5$  Hz, 1H), 5.75 (dt,  $J = 14.8, 7.5$  Hz, 1H, isómero minoritario), 5.65 – 5.58 (m, 1H), 4.4 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.95 – 3.86 (m, 1H), 2.24 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.4 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.16 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.14 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  168.5 (C), 168.4 (C, isómero minoritario), 142.2 (CH), 142.1 (CH, isómero minoritario), 141.25 (CH), 141.21 (CH, isómero minoritario), 137.9 (CH), 135.2 (CH), 133.8 (CH), 133.4 (CH, isómero minoritario), 133.1 (CH, isómero

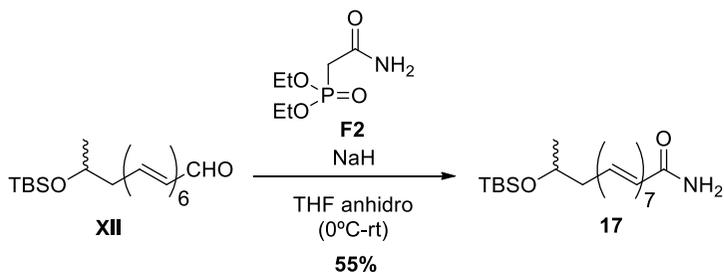
minoritario), 132.1 (CH, isómero minoritario), 131.6 (CH), 131.3 (CH, isómero minoritario), 130.8 (CH), 124.2 (CH, isómero minoritario), 123.9 (CH), 69.9 (CH), 69.8 (CH, isómero minoritario), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.3 (CH<sub>3</sub>), 24.08 (CH<sub>3</sub>), 24.07 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.9 (C), 18.4 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.2 (CH<sub>3</sub>), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>SiNa: 494.2697, obtenida: 494.2706.

### Síntesis del compuesto 16



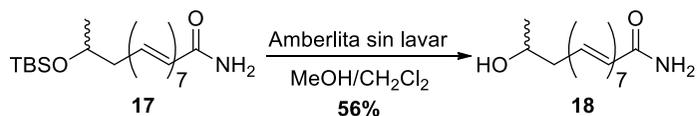
A partir de **14** (90 mg, 0.185 mmol) se sintetizaron 14.9 mg del análogo **16** mediante el PG-I-5 con posterior purificación tras la realización de una TLC preparativa, obteniéndose con un rendimiento del 23 % en forma de un aceite amarillo.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.24 – 7.08 (m, 2H), 6.78 – 6.54 (m, 2H), 6.47 – 6.29 (m, 3H), 6.28 – 6.13 (m, 3H), 6.07 (dd, *J* = 14.9, 6.2 Hz, 2H), 5.86 (dt, *J* = 14.9, 7.4 Hz, 1H), 5.65 – 5.52 (m, 1H, isómero minoritario), 4.39 – 4.26 (m, 1H), 3.87 – 3.70 (m, 1H), 3.62 – 3.5 (m, 1H, isómero minoritario), 2.43 – 2.28 (m, 2H, isómero minoritario), 2.25 – 2.12 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.11 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). Debido a las propiedades inusuales de este tipo de compuestos en relación a la solubilidad, no se pudo obtener un espectro de **<sup>13</sup>C RMN**, incluso utilizando tiempos de adquisición largos. **HRMS (ESI):** [M-H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub>: 356.1867, obtenida: 356.1866.

Síntesis del compuesto **17**

A partir del aldehído **XII** (52 mg, 0.145 mmol) y el fosfonato **F2** (68 mg, 0.348 mmol) se sintetizaron 32 mg del análogo **17** (aceite amarillo) mediante el procedimiento PG-I-1, con un rendimiento del 55 %.

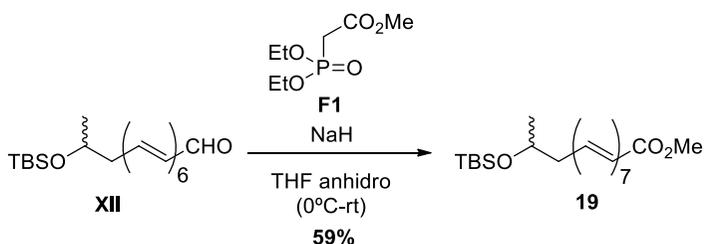
**<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.32 – 7.24 (m, 1H), 6.56 (dd,  $J = 15.0$ , 10.8 Hz, 2H), 6.37 (dd,  $J = 15.1$ , 10.7 Hz, 2H), 6.33 – 6.23 (m, 2H), 6.23 – 6.16 (m, 2H), 6.12 (dd,  $J = 14.9$ , 10.0 Hz, 2H), 5.93 – 5.79 (m, 2H), 5.79 – 5.70 (m, 1H), 5.53 (sa, 2H), 3.84 (q,  $J = 7.2$ , 6.6 Hz, 1H), 2.40 – 2.30 (m, 2H, isómero minoritario), 2.29 – 2.19 (m, 2H), 1.13 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (151 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  168.3 (C), 142.7 (CH), 142.6 (CH, isómero minoritario), 140.8 (CH), 140.7 (CH, isómero minoritario), 137.3 (CH), 135.9 (CH), 135.1 (CH), 134.9 (CH), 134.6 (CH), 133.1 (CH), 132.8 (CH), 132.4 (CH), 132.0 (CH, isómero minoritario), 131.2 (CH), 130.2 (CH), 129.3 (CH), 121.6 (CH), 68.7 (CH, isómero minoritario), 68.6 (CH), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>2</sub>SiNa: 422.2485, obtenida: 422.2498.

Síntesis del compuesto **18**

El análogo **17** (19.6 mg, 0.049 mmol) se sometió a una reacción de desprotección del TBS siguiendo el procedimiento PG-I-5 y se obtuvieron 7.9 mg de **18** un aceite amarillo con un rendimiento del 56 %.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.78 – 7.66 (m, 1H, isómero minoritario), 7.58 – 7.48 (m, 1H, isómero minoritario), 7.28 – 7.13 (m, 1H), 6.61 (dd,  $J$  = 15.2, 10.9 Hz, 2H), 6.55 – 6.12 (m, 8H), 6.07 – 5.96 (m, 2H), 5.87 (dt,  $J$  = 15.1, 7.8 Hz, 1H), 3.85 – 3.72 (m, 1H), 2.41 – 2.16 (m, 2H), 1.16 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  171.3 (C), 142.9 (CH), 141.4 (CH), 138.0 (CH), 134.8 (CH), 133.8 (CH), 131.6 (CH), 130.8 (CH), 123.6 (CH), 68.4 (CH), 43.6 (CH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 23.1 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (APCI):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub>: 286.1801, obtenida: 286.1802.

### Síntesis del compuesto 19

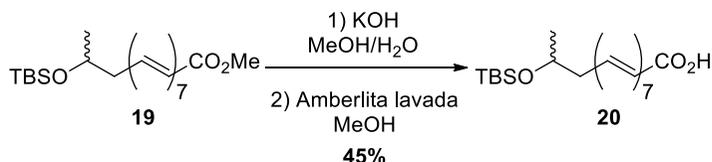


Siguiendo el procedimiento PG-I-1 se hizo reaccionar el aldehído **XII** (78 mg, 0.218 mmol) con el fosfonato **F1** (114 mg, 0.544 mmol) dando lugar a la obtención 53.1 mg de **19**, un aceite amarillo intenso con un rendimiento del 59 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Cloroformo- $d$ )**  $\delta$  7.52 – 7.46 (m, 2H, isómero minoritario), 7.32 (ddd,  $J$  = 15.3, 11.4, 4.0 Hz, 2H), 7.04 – 6.94 (m, 2H, isómero minoritario), 6.70 – 6.63 (m, 1H, isómero minoritario), 6.57 (dd,  $J$  = 14.8, 11.0 Hz, 2H), 6.38 (dd,  $J$  = 14.9, 10.7 Hz, 2H), 6.29 (dd,  $J$  = 14.9, 11.4 Hz, 2H), 6.20 (dd,  $J$  = 14.9, 11.4 Hz, 2H), 6.13 (dd,  $J$  = 14.9, 10.7 Hz, 2H), 5.91 – 5.79 (m, 2H), 5.63 (c,  $J$  = 9.1, 8.6 Hz, 1H, isómero minoritario), 3.91 – 3.81 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.44 – 2.31 (m, 2H, isómero minoritario), 2.29 – 2.18 (m, 2H), 1.15 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Cloroformo- $d$ )**  $\delta$  167.7 (C), 144.9 (CH), 144.8 (CH, isómero minoritario), 141.2 (CH), 141.1 (CH, isómero minoritario), 137.7 (CH), 135.1 (CH), 132.9 (CH, isómero minoritario), 132.3 (CH), 132.1 (CH, isómero minoritario), 131.9 (CH, isómero minoritario), 130.1 (CH), 130.0 (CH, isómero minoritario), 129.8 (CH, isómero

minoritario), 129.4 (CH), 120.2 (CH, isómero minoritario), 119.8 (CH), 68.6 (CH), 68.5 (CH, isómero minoritario), 51.63 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 51.61 (CH<sub>3</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.00 (CH<sub>3</sub>), 23.80 (CH<sub>3</sub>), 23.79 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>Si: 415.2663, obtenida: 415.2671.

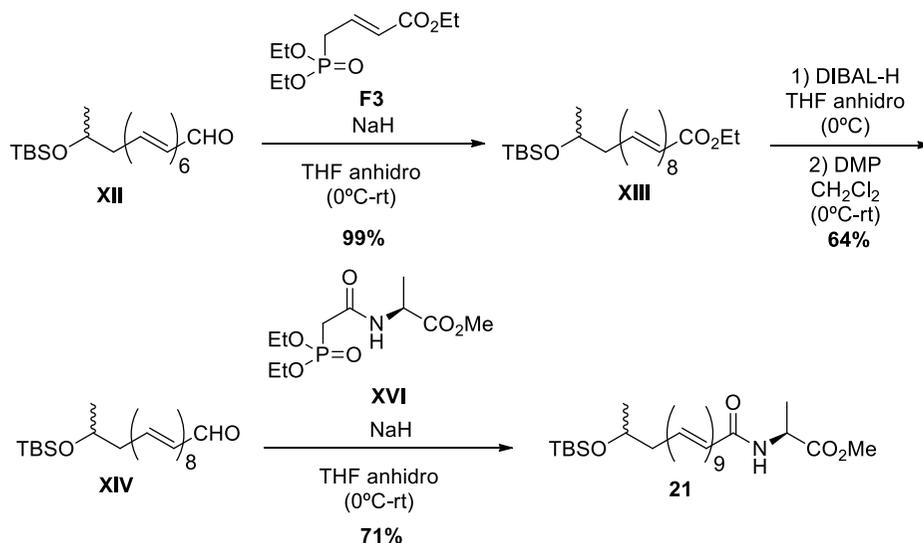
### Síntesis del compuesto 20



Mediante el procedimiento PG-I-4, el análogo **19** (46 mg, 0.111 mmol) se sometió a una reacción de saponificación y se obtuvo 20 mg de **20**, un aceite amarillo claro con un rendimiento del 45 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.22 (ddd, *J* = 15.3, 11.3, 4.6 Hz, 2H), 6.76 – 6.64 (m, 2H, isómero minoritario), 6.60 (dd, *J* = 14.8, 10.9 Hz, 1H), 6.44 – 6.32 (m, 4H), 6.26 (dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, 1H), 6.17 (dd, *J* = 15.3, 10.7 Hz, 2H), 5.87 (d, *J* = 15.3 Hz, 2H), 5.83 (dd, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 1H), 5.65 – 5.58 (m, 1H, isómero minoritario), 3.91 (dc, *J* = 12.1, 5.9 Hz, 1H), 2.43 – 2.28 (m, 2H, isómero minoritario), 2.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 172.7 (C), 144.5 (CH), 144.3 (CH, isómero minoritario), 141.1 (CH), 141.0 (CH, isómero minoritario), 137.8 (CH), 135.1 (CH), 134.2 (CH, isómero minoritario), 133.9 (CH), 133.5 (CH, isómero minoritario), 133.0 (CH, isómero minoritario), 132.0 (CH, isómero minoritario), 131.7 (CH), 131.6 (CH, isómero minoritario), 131.3 (CH, isómero minoritario), 131.1 (CH), 124.3 (CH, isómero minoritario), 69.9 (CH), 69.8 (CH, isómero minoritario), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.3 (CH<sub>3</sub>), 23.13 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 24.08 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M-H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub>Si: 399.2355, obtenida: 399.2361.

### Síntesis del compuesto 21



### Síntesis de XIII

Siguiendo el procedimiento PG-I-1, a partir del aldehído **XII** (320 mg, 0.892 mmol) y el fosfonato **F3** (491 g, 1.96 mmol) se obtuvieron 400 mg del éster **XIII**, un sólido naranja intenso, con un rendimiento del 99 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.83 – 7.73 (m, 1H, isómero minoritario), 7.39 – 7.19 (m, 1H), 6.93 – 6.65 (m, 3H, isómero minoritario), 6.63 – 6.52 (m, 1H), 6.46 – 6.01 (m, 9H), 5.85 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H), 5.81 – 5.70 (m, 1H), 5.62 – 5.50 (m, 2H, isómero minoritario), 4.23 – 4.16 (m, 2H), 4.11 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H, isómero minoritario), 3.99 – 3.96 (m, 1H, isómero minoritario), 3.84 (hept,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 2.41 – 2.30 (m, 2H, isómero minoritario), 2.30–2.17 (m, 2H), 1.29 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.24 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.14 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  167.3 (C), 144.6 (CH), 144.5 (CH, isómero minoritario), 140.9 (CH), 140.8 (CH, isómero minoritario), 137.6 (CH), 137.5 (CH), 135.9 (CH), 135.6 (CH, isómero minoritario), 134.0 (CH), 132.77 (CH, isómero minoritario), 132.74 (CH), 132.6 (CH), 132.5 (CH, isómero minoritario), 131.3 (CH), 131.1 (CH, isómero minoritario), 130.7 (CH), 130.5 (CH, isómero

minoritario), 129.6 (CH), 120.6 (CH, isómero minoritario), 120.5 (CH), 68.7 (CH, isómero minoritario), 68.6 (CH), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 60.3 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 43.4 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.00 (CH<sub>3</sub>), 25.96 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 23.77 (CH<sub>3</sub>), 23.75 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.3 (C), 14.5 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI)** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>SiNa: 477.2795, obtenida: 477.2790.

#### Síntesis de XIV

En primer lugar, se redujo **XIII** (400 mg, 0.880 mmol) mediante el procedimiento PG-I-2 y posteriormente debido a la inestabilidad del compuesto generado se oxidó directamente utilizando el PG-I-3. Se obtuvo el aldehído **XIV** (117 mg) un aceite naranja-rojizo con un con un rendimiento del 64 %.

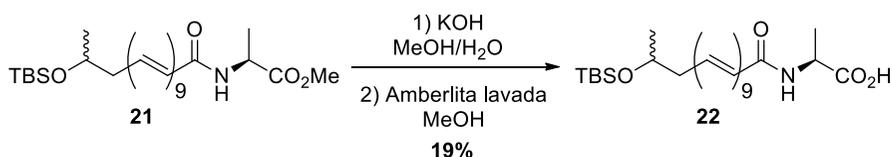
**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 9.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 15.1, 11.3 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 15.1, 11.3 Hz, 1H), 6.54 (t, *J* = 12.8 Hz, 1H), 6.49 – 6.39 (m, 2H), 6.40 – 6.04 (m, 9H), 5.75 (dt, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 1H), 5.59 (dd, *J* = 6.1, 1.9 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 6.1, 1.9 Hz, 1H, isómero minoritario), 4.00 – 3.91 (m, 1H), 3.89 – 3.81 (m, 1H, isómero minoritario), 2.34 – 2.30 (m, 2H, isómero minoritario), 2.30 – 2.16 (m, 2H), 1.14 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 3H, isómero minoritario), 0.06 (s, 3H, isómero minoritario), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 193.6 (CH), 151.94 (CH), 151.91 (CH, isómero minoritario), 142.93 (CH), 142.90 (CH, isómero minoritario), 139.2 (CH), 139.1 (CH, isómero minoritario), 137.1 (CH), 137.0 (CH, isómero minoritario), 135.9 (CH), 135.8 (CH, isómero minoritario), 135.1 (CH), 134.6 (CH), 133.15 (CH), 133.13 (CH, isómero minoritario), 132.8 (CH), 132.5 (CH), 132.4 (CH), 132.3 (CH), 131.7 (CH, isómero minoritario), 131.6 (CH), 131.2 (CH), 130.9 (CH), 130.4 (CH, isómero minoritario), 130.0 (CH, isómero minoritario), 129.9 (CH), 68.73 (CH), 68.67 (CH, isómero minoritario), 43.5 (CH<sub>2</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 26.0 (CH<sub>3</sub>), 25.8 (CH<sub>3</sub> isómero minoritario), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 23.5 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.3 (C), -4.4 (CH<sub>3</sub>), -4.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (EI):** [M]<sup>+</sup> calcd. C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>Si: 410.2641, obtenida: 410.2644.

## Compuesto 21

Siguiendo el procedimiento PG-I-1 se hizo reaccionar el aldehído **XIV** (87 mg, 0.212 mmol) con el fosfonato **XVI** (149 mg, 0.530 mmol) dando lugar a la obtención 81 mg de **21**, un sólido naranja-rojizo con un rendimiento del 71 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.38 – 7.17 (m, 2H, isómero minoritario), 6.66 – 6.50 (m, 1H), 6.46 – 6.16 (m, 13H), 6.15 – 6.01 (m, 3H), 5.88 (d,  $J = 14.9$  Hz, 2H), 5.80 – 5.68 (m, 2H, isómero minoritario), 4.70 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.40 – 2.29 (m, 1H, isómero minoritario), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 1.44 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.14 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, isómero minoritario), 1.12 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).  
**<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  173.7 (C), 165.4 (C), 141.5 (CH), 141.4 (CH, isómero minoritario), 140.1 (CH), 140.0 (CH, isómero minoritario), 136.9 (CH), 136.8 (CH, isómero minoritario), 135.6 (CH), 135.5 (CH, isómero minoritario), 134.8 (CH), 134.4 (CH, isómero minoritario), 134.3 (CH), 134.2 (CH, isómero minoritario), 134.1 (CH), 133.91 (CH, isómero minoritario), 133.89 (CH), 133.1 (CH, isómero minoritario), 133.0 (CH), 132.8 (CH), 132.7 (CH, isómero minoritario), 132.7 (CH), 132.6 (CH, isómero minoritario), 132.5 (CH), 132.1 (CH), 131.2 (CH), 130.5 (CH, isómero minoritario), 130.4 (CH, isómero minoritario), 130.00 (CH), 129.96 (CH, isómero minoritario), 129.2 (CH), 129.1 (CH, isómero minoritario), 127.9 (CH), 122.5 (CH), 122.4 (CH, isómero minoritario), 68.6 (CH), 68.5 (CH, isómero minoritario), 52.49 (CH<sub>3</sub>), 48.1 (CH), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub>, isómero minoritario), 25.9 (CH<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>3</sub>), 23.6 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.7 (CH<sub>3</sub>), 18.6 (CH<sub>3</sub>, isómero minoritario), 18.1 (C), -4.5 (CH<sub>3</sub>), -4.7 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (APCI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>4</sub>Si: 538.3351, obtenida: 538.3347.

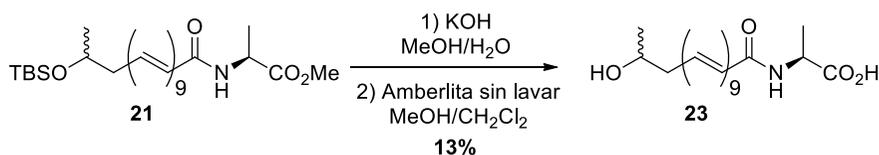
## Síntesis del compuesto 22



Siguiendo el procedimiento PG-I-4, el análogo **21** (33 mg, 0.061 mmol) se sometió a una reacción de saponificación y se obtuvieron 6 mg de **22**, un sólido naranja-rojizo con un rendimiento del 19 %.

**$^1\text{H RMN}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ +0.1% TFA- $d$ )**  $\delta$  8.34 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.09 (dd,  $J$  = 14.9, 11.3 Hz, 2H), 6.68 (t,  $J$  = 13.1 Hz, 2H), 6.58 – 6.20 (m, 9H), 6.09 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H), 5.78 – 5.69 (m, 2H), 4.31 – 4.24 (m, 1H), 4.23 – 4.18 (m, 1H, isómero minoritario), 3.89 – 3.81 (m, 1H), 2.33 – 2.27 (m, 1H), 1.28 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 3H), 1.09 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H, isómero minoritario), 1.08 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.02 (s, 6H), 0.01 (s, 3H). Debido a las propiedades inusuales de este tipo de compuestos en relación a la solubilidad, no se pudo obtener un espectro de  **$^{13}\text{C RMN}$** , incluso utilizando tiempos de adquisición largos. **HRMS (ESI):**  $[\text{M-H}]^+$  calcd.  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{NO}_4\text{Si}$ : 522.3045, obtenida: 522.3050.

### Síntesis del compuesto **23**



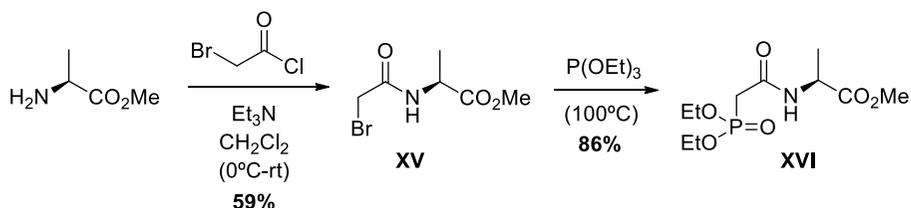
A partir de **21** (81 mg, 0.151 mmol) se sintetizaron 8.1 mg del análogo **23** mediante el PG-I-5 con posterior purificación mediante TLC preparativa, obteniéndose con un rendimiento del 13 % en forma de un sólido naranja-intenso.

**$^1\text{H RMN}$  (600 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.75 – 7.66 (m, 1H, isómero minoritario), 7.21 – 7.15 (m, 1H, isómero minoritario), 7.18 (dd,  $J$  = 15.0, 11.2 Hz, 1H), 6.86 – 6.75 (m, 2H, isómero minoritario), 6.62 (dd,  $J$  = 14.8, 11.0 Hz, 2H), 6.43 (dd,  $J$  = 14.5, 10.7 Hz, 2H), 6.47 (dd,  $J$  = 15.6, 10.9 Hz, 2H), 6.40 – 6.24 (m, 2H), 6.21 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H), 6.19 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, isómero minoritario), 6.14 (dd,  $J$  = 15.2, 10.0 Hz, 1H), 6.10 – 6.03 (m, 2H), 6.04 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1H), 5.78 (dt,  $J$  = 14.8, 7.3 Hz, 2H), 4.48 – 4.41 (m, 1H, isómero minoritario), 4.32 – 4.26 (m, 1H), 3.78 – 3.72 (m, 1H), 2.38 – 2.28 (m, 2H, isómero minoritario), 2.29 – 2.15 (m, 2H), 1.36 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.34 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.11 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).  **$^{13}\text{C RMN}$  (151 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$

183.8 (C), 170.9 (C), 140.8 (CH), 137.8 (CH), 136.4 (CH), 135.5 (CH), 134.16 (CH), 134.13 (CH, isómero minoritario), 133.5 (CH), 133.2 (CH), 133.1 (CH), 132.6 (CH), 132.5 (CH, isómero minoritario), 131.4 (CH), 124.8 (CH), 68.5 (CH), 43.7 (CH), 23.0 (CH<sub>2</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 17.5 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M-H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub>: 408.2180, obtenida: 408.2198.

### 3. Síntesis de los fosfonatos necesarios para realizar las reacciones de HWE

#### Síntesis del fosfonato **XVI**



#### Síntesis de **XV**

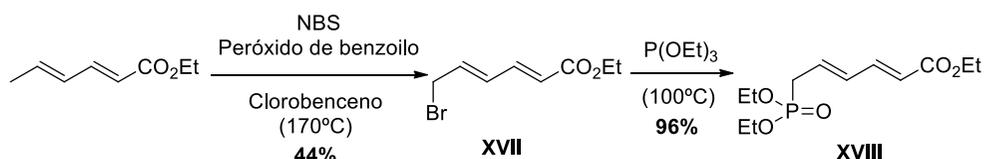
En primer lugar, la *L*-alanina (1.50 g, 10.7 mmol) se disolvió en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y a continuación se adicionó trietilamina (3.26 g, 32.2 mmol) y cloruro de bromoacetilo (2.54 g, 16.1 mmol) a 0 °C. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y se extrajo con acetato de etilo. Para ello se lavó varias veces con HCl (10 %), una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera. A continuación, se secó la fase orgánica sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando una mezcla de hexano/acetato de etilo 7:3. El producto purificado **XV** (1.42 g) de aspecto un aceite amarillo claro se obtuvo con un 59 % de rendimiento. El datos espectroscópicos coincidieron con los publicados previamente por Sivasubramanian y colaboradores<sup>[123]</sup>.

#### Fosfonato **XVI**

Partiendo de **XV** (990 mg, 4.42 mmol) se añadió trietilfosfito (808 mg, 4.86 mmol) a una temperatura de 100 °C y se dejó a continuación en agitación 12 horas. Tras ello se obtuvo sin purificación adicional 1.07 g del fosfonato **XVI** (aceite marrón) con un rendimiento del 86 %.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.23-7.17 (m, 1H), 4.54 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.14 (q,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 3.72 (s, 3H), 2.89 (s, 1H), 2.84 (s, 1H), 1.40 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.32 (td,  $J = 7.1, 1.6$  Hz, 6H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  173.0 (C), 163.8 (C), 62.91 (dd,  $J = 11.0, 6.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 52.5 ( $\text{CH}_3$ ), 48.5 ( $\text{CH}_2$ ), 35.8 ( $\text{CH}_2$ ), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ), 18.1 ( $\text{CH}_3$ ), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3$ ). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd.  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NPO}_6\text{Na}$ : 304.0920, obtenida: 304.0928.

### Síntesis del fosfonato XVIII



### Síntesis de XVII

Se disolvió sorbiato de etilo (18.41 g, 131 mmol) en 140 mL clorobenceno y se añadió peróxido de benzoilo (1.59 g, 6.55 mmol). Tras pasar 5 minutos se añadió *N*-bromosuccinimida (NBS) (28.06 g, 158 mmol) dando lugar a **XVII** (12.65 g), un aceite amarillo claro con un rendimiento del 44 %. Los datos espectroscópicos coincidieron con los descritos previamente<sup>[124]</sup>.

### Fosfonato XVIII

Partiendo de **XVII** (10.90 g, 49.8 mmol) se añadió trietilfosfito (9.10 g, 54.7 mmol) a una temperatura de 100 °C y se dejó a continuación en agitación 12 horas. Tras ello se obtuvo sin purificación adicional 13.23 g del fosfonato **XVIII** (aceite amarillo oscuro) con un rendimiento del 96 %. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos previamente<sup>[124]</sup>.

## 4. Estudios de actividad hemolíticos

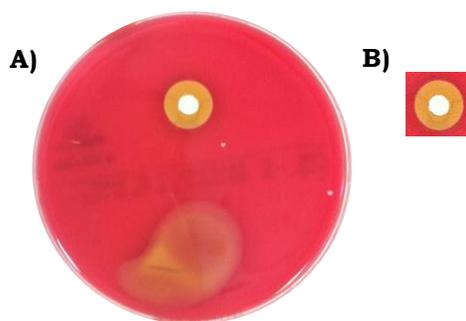
### 4.1 En placas de agar-sangre

Para realizar los estudios de actividad hemolítica en placas de agar-sangre se siguió el protocolo que se describe a continuación:

1. Se prepararon disoluciones de concentración 0.02M de cada uno de los productos tanto en dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ) como en una

mezcla de DMSO- $d_6$  que contiene almidón al 20 % y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %, a lo que se conoce como solución estabilizadora (DTS).

2. Posteriormente se probaron en las placas de agar-sangre de dos maneras, depositándolo en pocillo y en forma de gota en la superficie, como se puede ver en la **Figura PE.A.I.1 A)**.



**Figura PE.A.I.1. A)** Ejemplo de placa de agar-sangre con análogo **15** disuelto en DMSO- $d_6$  a 0.02 M en pocillo (parte superior de la placa) y en superficie (parte inferior de la placa). En este caso se usaron 70  $\mu$ L del análogo a 0.02 M en cada forma de deposición y **B)** Halo de inhibición o halo de hemólisis.

Cada uno de ellos se probaron vertiendo dos cantidades de 70 y 5  $\mu$ L de la disolución del derivado a 0.02 M. A su vez, en cada ensayo se utilizaron placas adicionales en las que se probaron como controles negativos 3 condiciones, un pocillo sin adicionar nada, otro pocillo con DMSO- $d_6$  y otro con H<sub>2</sub>O- $d$ . Como control positivo se probó la disolución de DTS, la cual presentó una leve actividad hemolítica ocasionada por el carácter ácido del TFA.

3. Tras preparar todas las placas de agar-sangre con los respectivos derivados a analizar y las condiciones control, se introdujeron en la incubadora a 37 °C dejando las tapas abiertas durante aproximadamente 10 minutos, con la finalidad de que se evaporasen los restos de DMSO- $d_6$  y se secasen.

4. Se cerraron las tapas y se mantuvieron en incubación en aerobiosis 24 horas, realizando controles a distintos tiempos para observar los cambios que se iban produciendo.

5. Al transcurrir las 24 horas se recogieron las placas de la incubadora y se analizaron los resultados en ese momento por dos o tres personas para evitar unos resultados sesgados por la subjetividad.

Por un lado, se determinó de forma cualitativa que los análogos que presentaban actividad hemolítica eran los que mostraron un halo de hemólisis alrededor de los pocillos de las placas de agar-sangre donde fueron añadidos, como se muestra en la **Figura PE.A.I.1 B)**. Del mismo modo, al probarlos en forma de gota en la superficie ocasionaban la pérdida del color rojizo de la placa, propio de los hematíes, por una adecuada penetración y ruptura de los mismos. Por el contrario, se consideraron colorantes análogos no hemolíticos a los que no provocaban dichos cambios en las placas.

Por otro lado, también se midieron los diámetros de los halos de inhibición que originaron cada uno de los análogos disueltos en DMSO- $d_6$  y de las condiciones control, los cuales se muestran en *Anexos, Capítulo I. Estudios de actividad hemolítica*. Al compararlos se pudo ver que, a mayor diámetro, mayor fue la hemólisis.

6. Tras la interpretación de los resultados se tomaron imágenes con una cámara digital de cada uno de los pocillos, las cuales se muestran a lo largo del *Capítulo I*.

## **4.2 En glóbulos rojos humanos**

Este tipo de estudio únicamente se hizo en Seattle, en el *Seattle Children's Hospital*. Para ello, incubaron cada uno de los análogos por separado con glóbulos rojos humanos durante 1 hora a 37 °C a distintas concentraciones, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M y 62.5  $\mu$ M. Al transcurrir el tiempo cuantificaron la liberación de hemoglobina en sobrenadantes celulares para determinar el porcentaje de hemólisis respecto al tampón Tritón X-100 (0.1%) y PBS, los cuales se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Para realizar dicha cuantificación centrifugaron las muestras tras la incubación y realizaron medidas de absorbancia de los sobrenadantes de manera que al comparar los valores de absorbancia obtenidos con los de los controles pueden calcular y representar los porcentajes de hemólisis que se muestran en la **Figura I.18** del *Capítulo I*.

## 5. Instrumentación para las medidas de luz polarizada

El grado de la desviación de la luz polarizada ( $\alpha_D$ ) de los diferentes precursores y análogos sintetizados enantioméricamente puros con estereoquímica *R*, se realizaron con un polarímetro PerkinElmer modelo 341.

Para realizar las medidas se prepararon disoluciones de cada uno de los compuestos en cloroformo a una concentración conocida en un rango de  $4.25 \cdot 10^{-3}$  a 0.01 g/mL. Una vez preparadas se introdujo alrededor de 1 mL de cada disolución en el portamuestras y se realizaron 3 medidas a partir de las cuales se calculó un valor medio ( $\bar{x}$ ). A continuación  $\alpha_D$  se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación PE.B.I.1} \quad [\alpha_D] = \frac{\bar{x}}{l \cdot [\text{compuesto}]}$$

Donde  $\bar{x}$  es el promedio de los valores de desviación de la luz obtenidos con el polarímetro,  $l$  es el diámetro de la celda de 1 dm, en la cual se introduce la muestra y  $[\text{compuesto}]$  es la concentración del compuesto en g/mL.

## 6. Estimación de la longitud de los derivados

Para poder obtener valores estimados de la longitud de los derivados, en primer lugar, se dibujó la estructura de cada uno de ellos en el programa ChemBioDraw Ultra y se guardaron como archivos .cdx. A continuación, se abrieron cada uno de los archivos de las diferentes estructuras en el programa ChemBio3D Ultra y se utilizó una herramienta para minimizar la energía de la estructura. Luego, tras guardar los respectivos archivos, se abrieron en el programa Mercury en el cual pudo realizarse la estimación de la longitud tanto de la cadena poliénica como del compuesto de extremo a extremo. La longitud de la cadena poliénica se midió desde el carbono que presenta un grupo metilo hasta el último carbono del doble enlace terminal de la cadena. Por otra lado, la longitud total del compuesto se estimó desde el hidrógeno terminal del grupo *terc*-butilo del TBS o bien el hidrógeno del grupo OH, hasta el hidrógeno del extremo opuesto, como se puede ver en la **Figura I.19** del Capítulo I

**REFERENCIAS**

**BLOQUE A**



**REFERENCIAS BLOQUE A**

1. Jorgensen, J.H., et al., *Manual of clinical microbiology*. 11th edition. ed. 2015. 2 volumes.
2. Lancefield, R.C., *A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci*. J Exp Med, 1933. **57**(4): p. 571-95.
3. Cieslewicz, M.J., et al., *Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides*. Infection and Immunity, 2005. **73**(5): p. 3096-103.
4. Kong, F., et al., *Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(1): p. 216-26.
5. Slotved, H.C., et al., *Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(9): p. 2929-36.
6. Furfaro, L.L., B.J. Chang, and M.S. Payne, *Perinatal Streptococcus agalactiae Epidemiology and Surveillance Targets*. Clinical Microbiology Reviews, 2018. **31**(4).
7. Farley, M.M., *Group B streptococcal disease in nonpregnant adults*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**(4): p. 556-61.
8. Edwards, M.S. and C.J. Baker, *Group B streptococcal infections in elderly adults*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(6): p. 839-47.
9. Wang, T.K., et al., *Streptococcus agalactiae (Lancefield group B) bacteraemia in nonpregnant adults*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2002. **21**(2): p. 140-2.
10. Li, L.Q., S. Cheema, and N. Goel, *Group B streptococcal meningitis in a previously healthy man*. BMJ Case Reports, 2016. **2016**.
11. Fujita, H., et al., *Severe infective endocarditis in a healthy adult due to Streptococcus agalactiae*. International Journal of Infectious Diseases, 2015. **38**: p. 43-5.
12. Sendi, P., L. Johansson, and A. Norrby-Teglund, *Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections*. Infection, 2008. **36**(2): p. 100-11.
13. Nolla, J.M., et al., *Group B streptococcus (Streptococcus agalactiae) pyogenic arthritis in nonpregnant adults*. Medicine (Baltimore), 2003. **82**(2): p. 119-28.
14. Skoff, Tami H., et al., *Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990–2007*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **49**(1): p. 85-92.
15. Francois Watkins, L.K., et al., *Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Infections Among Nonpregnant Adults in the United States, 2008-2016*. JAMA Internal Medicine, 2019. **179**(4): p. 479.
16. Raabe, V.N. and A.L. Shane, *Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae)*. Microbiology Spectrum, 2019. **7**(2).
17. Verani, J.R., L. McGee, and S.J. Schrag, *Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010*. Morbidity and Mortality Weekly Report-Recommendations and Reports, 2010. **59**(RR-10): p. 1-36.
18. Barcaite, E., et al., *Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries*. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 2008. **87**(3): p. 260-71.
19. Yancey, M.K., et al., *Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization*. Obstetrics & Gynecology, 1994. **84**(5): p. 816-9.
20. Krohn, M.A., S.L. Hillier, and C.J. Baker, *Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization*. Journal of Infectious Diseases, 1999. **179**(6): p. 1410-5.

21. Tita, A.T. and W.W. Andrews, *Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis*. Clinics in Perinatology, 2010. **37**(2): p. 339-54.
22. Hall, J., et al., *Maternal Disease With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(suppl\_2): p. S112-S124.
23. Seale, A.C., et al., *Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(suppl\_2): p. S200-S219.
24. Eickhoff, T.C., et al., *Neonatal Sepsis and Other Infections Due to Group B Beta-Hemolytic Streptococci*. New England Journal of Medicine, 1964. **271**: p. 1221-8.
25. Lazarus, J.M., D.P. Sellers, and W.M. Marine, *Meningitis Due to the Group B Beta-Hemolytic Streptococcus*. New England Journal of Medicine, 1965. **272**: p. 146-7.
26. Vornhagen, J., K.M. Adams Waldorf, and L. Rajagopal, *Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies*. Trends in Microbiology, 2017. **25**(11): p. 919-931.
27. Remington, J.S., *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. 2011, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xiv, 1260 p.
28. Madrid, L., et al., *Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(suppl\_2): p. S160-S172.
29. Oddie, S. and N.D. Embleton, *Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study*. BMJ, 2002. **325**(7359): p. 308.
30. Cowgill, K., et al., *Report from the CDC. Awareness of perinatal group B streptococcal infection among women of childbearing age in the United States, 1999 and 2002*. Journal of Women's Health, 2003. **12**(6): p. 527-32.
31. Schrag, S.J., et al., *Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014*. Pediatrics, 2016. **138**(6).
32. Aber, R.C., et al., *Nosocomial transmission of group B streptococci*. Pediatrics, 1976. **58**(3): p. 346-53.
33. Lin, F.Y., et al., *Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease*. Journal of Infectious Diseases, 2003. **188**(2): p. 267-71.
34. Berardi, A., et al., *Group B streptococcus late-onset disease: 2003-2010*. Pediatrics, 2013. **131**(2): p. e361-8.
35. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective*. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report-Recommendations and Reports, 1996. **45**(RR-7): p. 1-24.
36. de la Rosa, M., *Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2003. **21**(8): p. 417-423.
37. Alós Cortés, J.I., et al., *Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2013. **31**(3): p. 159-172.
38. Ke, D., et al., *Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(3): p. 324-31.
39. de la Rosa, M., et al., *New Granada Medium for detection and identification of group B streptococci*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(4): p. 1019-21.

40. Rosa-Fraile, M., et al., *Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(8): p. 2674-2677.
41. Cherkaoui, A., et al., *Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification of Beta-Hemolytic Streptococci*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(8): p. 3004-3005.
42. Schrag, S.J. and J.R. Verani, *Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine*. Vaccine, 2013. **31 Suppl 4**: p. D20-6.
43. Franciosi, R.A., J.D. Knostman, and R.A. Zimmerman, *Group B streptococcal neonatal and infant infections*. Journal of Pediatrics, 1973. **82**(4): p. 707-18.
44. Puertas-Prieto, A., et al., *Streptococcus agalactiae: prevention and vaccine development*. Revista Espanola De Quimioterapia, 2017. **30**(5): p. 312-318.
45. Jordan, H.T., et al., *Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis*. Pediatric Infectious Disease Journal, 2008. **27**(12): p. 1057-64.
46. Allegaert, K., et al., *Cefazolin pharmacokinetics in maternal plasma and amniotic fluid during pregnancy*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2009. **200**(2): p. 170.e1-170.e7.
47. Teatero, S., et al., *Serotype Distribution, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Recovered from Colonized Pregnant Women*. Journal of Clinical Microbiology, 2017. **55**(2): p. 412-422.
48. Rajagopal, L., *Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors*. Future Microbiology, 2009. **4**(2): p. 201-221.
49. Doran, K.S. and V. Nizet, *Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy*. Molecular Microbiology, 2004. **54**(1): p. 23-31.
50. Schubert, A., et al., *The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of Streptococcus agalactiae to human epithelial cells*. Infection and Immunity, 2004. **72**(11): p. 6197-205.
51. Beckmann, C., et al., *Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding*. Infection and Immunity, 2002. **70**(6): p. 2869-76.
52. Spellerberg, B., et al., *Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of Streptococcus agalactiae to human laminin*. Infection and Immunity, 1999. **67**(2): p. 871-8.
53. Maisey, H.C., K.S. Doran, and V. Nizet, *Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2008. **10**: p. e27.
54. Lauer, P., et al., *Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus*. Science, 2005. **309**(5731): p. 105.
55. Dramsi, S., et al., *Assembly and role of pili in group B streptococci*. Molecular Microbiology, 2006. **60**(6): p. 1401-13.
56. Maisey, H.C., et al., *Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells*. Journal of Bacteriology, 2007. **189**(4): p. 1464-7.
57. Rosini, R., et al., *Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in Streptococcus agalactiae*. Molecular Microbiology, 2006. **61**(1): p. 126-41.
58. Jiang, S., et al., *Regulation and Function of Pilus Island 1 in Group B Streptococcus*. Journal of Bacteriology, 2012. **194**(10): p. 2479-2490.
59. Gonzalez, M.R., et al., *Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story?* Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **65**(3): p. 493-507.

60. Lang, S. and M. Palmer, *Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 38167-73.
61. Lang, S., et al., *Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins*. Medical Microbiology and Immunology, 2007. **196**(1): p. 1-10.
62. Marchlewicz, B.A. and J.L. Duncan, *Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B Streptococcus sp.* Infection and Immunity, 1981. **34**(3): p. 787-94.
63. Nizet, V., et al., *Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells*. Infection and Immunity, 1996. **64**(9): p. 3818-3826.
64. Ratner, A.J., et al., *Group B Streptococcus Interactions with Human Meningeal Cells and Astrocytes In Vitro*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42660.
65. Pritzlaff, C.A., et al., *Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus*. Molecular Microbiology, 2001. **39**(2): p. 236-248.
66. Nizet, V., *Streptococcal  $\beta$ -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis*. Trends in Microbiology, 2002. **10**(12): p. 575-580.
67. Platt, M.W., *In-Vivo Hemolytic-Activity of Group-B Streptococcus Is Dependent on Erythrocyte Bacteria Contact and Independent of a Carrier Molecule*. Current Microbiology, 1995. **31**(1): p. 5-9.
68. Rosa-Fraile, M., S. Dramsi, and B. Spellerberg, *Group B streptococcal haemolysin and pigment, a tale of twins*. Fems Microbiology Reviews, 2014. **38**(5): p. 932-946.
69. Rosa-Fraile, M., et al., *Granadaene: proposed structure of the group B Streptococcus polyenic pigment*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(9): p. 6367-70.
70. Merritt, K. and N.J. Jacobs, *Characterization and Incidence of Pigment Production by Human Clinical Group-B Streptococci*. Journal of Clinical Microbiology, 1978. **8**(1): p. 105-107.
71. Whidbey, C., et al., *A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta*. Journal of Experimental Medicine, 2013. **210**(6): p. 1265-81.
72. Spellerberg, B., et al., *Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of Streptococcus agalactiae by ISS1 transposition*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(10): p. 3212-9.
73. Goel, A.K., et al., *Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(13): p. 3539-48.
74. Whidbey, C., et al., *A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury*. EMBO Molecular Medicine, 2015. **7**(4): p. 488-505.
75. Avci, F.Y. and D.L. Kasper, *How Bacterial Carbohydrates Influence the Adaptive Immune System*. Annual Review of Immunology, 2010. **28**(1): p. 107-130.
76. Takahashi, S., et al., *Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci*. Infection and Immunity, 1999. **67**(4): p. 1866-70.
77. Melin, P. and A. Efstratiou, *Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries*. Vaccine, 2013. **31 Suppl 4**: p. D31-42.
78. Munoz, F.M. and P. Ferrieri, *Group B Streptococcus vaccination in pregnancy: moving toward a global maternal immunization program*. Vaccine, 2013. **31 Suppl 4**: p. D46-51.
79. Nuccitelli, A., C.D. Rinaudo, and D. Maione, *Group B Streptococcus vaccine: state of the art*. Therapeutic Advances in Vaccines, 2015. **3**(3): p. 76-90.

80. Giersing, B.K., et al., *Report from the World Health Organization's Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 7-9th Sep 2015*. Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2865-2869.
81. Seib, K.L., X. Zhao, and R. Rappuoli, *Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. **18 Suppl 5**: p. 109-16.
82. Baker, C.J. and D.L. Kasper, *Group B streptococcal vaccines*. Clinical Infectious Diseases, 1985. **7**(4): p. 458-67.
83. Lancefield, R.C., *Two Serological Types of Group B Hemolytic Streptococci with Related, but Not Identical, Type-Specific Substances*. Journal of Experimental Medicine, 1938. **67**(1): p. 25-40.
84. Baker, C.J., et al., *Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus*. New England Journal of Medicine, 1988. **319**(18): p. 1180-5.
85. Baker, C.J., et al., *Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib*. Journal of Infectious Diseases, 1999. **179**(1): p. 142-50.
86. Baker, C.J., et al., *Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B Streptococcus in healthy women*. Journal of Infectious Diseases, 2000. **182**(4): p. 1129-1138.
87. Baker, C.J., et al., *Immune response of healthy women to 2 different group B streptococcal type V capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines*. Journal of Infectious Diseases, 2004. **189**(6): p. 1103-12.
88. Baker, C.J., M.A. Rench, and P. McInnes, *Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine*. Vaccine, 2003. **21**(24): p. 3468-72.
89. Donders, G.G.G., et al., *Maternal Immunization With an Investigational Trivalent Group B Streptococcal Vaccine A Randomized Controlled Trial*. Obstetrics & Gynecology, 2016. **127**(2): p. 213-221.
90. Rappuoli, R., *Reverse vaccinology*. Current Opinion in Microbiology, 2000. **3**(5): p. 445-50.
91. Pizza, M., et al., *Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1816-20.
92. Giuliani, M.M., et al., *A universal vaccine for serogroup B meningococcus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(29): p. 10834-9.
93. Watson, P.S. and D.P.J. Turner, *Clinical experience with the meningococcal B vaccine, Bexsero® : Prospects for reducing the burden of meningococcal serogroup B disease*. Vaccine, 2016. **34**(7): p. 875-880.
94. Margarit, I., et al., *Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm*. Journal of Infectious Diseases, 2009. **199**(1): p. 108-15.
95. Song, J.Y., et al., *Progress toward a group B streptococcal vaccine*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2018: p. 1-13.
96. Thirsk, C. and A. Whiting, *Polyene natural products*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 2002(8): p. 999-1023.
97. Rychnovsky, S.D., *Oxo Polyene Macrolide Antibiotics*. Chemical Reviews, 1995. **95**(6): p. 2021-2040.
98. Kristanc, L., et al., *The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2019. **1861**(2): p. 418-430.
99. Padmanabhan, S., *Chapter 38. Pharmacogenomics of Antifungal Agents*, in *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, S. Padmanabhan, Editor. 2014. p. 879-900.

100. Yang, T.-S., et al., *Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2013. **1828**(8): p. 1794-1801.
101. Laniado-Laborín, R. and M.N. Cabrales-Vargas, *Amphotericin B: side effects and toxicity*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2009. **26**(4): p. 223-227.
102. Dowd, F.J., B. Johnson, and A. Mariotti, *34 - Antifungal and Antiviral Agents*, in *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*. 2017, Elsevier: Riverport Lane. p. 488-503.
103. Gray, K.C., et al., *Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012. **109**(7): p. 2234-2239.
104. Anderson, T.M., et al., *Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge*. *Nature Chemical Biology*, 2014. **10**(5): p. 400-U121.
105. V. Cotero, B., S. Rebolledo-Antúnez, and I. Ortega-Blake, *On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1998. **1375**(1-2): p. 43-51.
106. Baginski, M., H. Resat, and E. Borowski, *Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2002. **1567**: p. 63-78.
107. Mouri, R., et al., *Complex Formation of Amphotericin B in Sterol-Containing Membranes As Evidenced by Surface Plasmon Resonance†*. *Biochemistry*, 2008. **47**(30): p. 7807-7815.
108. Kleinberg, M.E. and A. Finkelstein, *Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes*. *Journal of Membrane Biology*, 1984. **80**(3): p. 257-69.
109. Matsuoka, S., et al., *Dominant Formation of a Single-Length Channel by Amphotericin B in Dimyristoylphosphatidylcholine Membrane Evidenced by <sup>13</sup>C-<sup>31</sup>P Rotational Echo Double Resonance†*. *Biochemistry*, 2005. **44**(2): p. 704-710.
110. Paradas, M., *Desarrollo de nuevas reacciones de pinacolización y de adición a grupos carbonilo mediadas y/o catalizadas por titanoceno(iii). Aproximación a la síntesis de granadaeno.*, in *Departamento de Química Orgánica*. 2011, Granada: Granada.
111. Paradas, M., et al., *Clarifying the structure of granadaene: total synthesis of related analogue [2]-granadaene and confirmation of its absolute stereochemistry*. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2012. **20**(22): p. 6655-61.
112. Horner, L., et al., *Phosphororganische Verbindungen, XX. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien*. *Chemische Berichte*, 1959. **92**(10): p. 2499-2505.
113. Wadsworth, W.S. and W.D. Emmons, *The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 1961. **83**(7): p. 1733-1738.
114. Maryanoff, B.E. and A.B. Reitz, *The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects*. *Chemical Reviews*, 1989. **89**(4): p. 863-927.
115. Clayden, J., *Organic chemistry*. 2001, Oxford ; New York: Oxford University Press. 1508 p.
116. Kürti, L. and B. Czako, *Strategic applications of named reactions in organic synthesis : background and detailed mechanisms*. 2005, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. lii, 758 p.
117. Ashrafuzzaman, M., O.S. Andersen, and R.N. McElhaney, *The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2008. **1778**(12): p. 2814-2822.

118. Verani, J.R., et al., *Early-onset group B streptococcal disease in the United States: potential for further reduction*. *Obstetrics & Gynecology*, 2014. **123**(4): p. 828-37.
119. Ivanov, I.T., *Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1999. **1415**(2): p. 349-360.
120. Surve, M.V., et al., *Membrane Vesicles of Group B Streptococcus Disrupt Feto-Maternal Barrier Leading to Preterm Birth*. *PLoS Pathogens*, 2016. **12**(9): p. e1005816.
121. Fortunati, T., et al., *Chemoenzymatic preparation of musky macrolactones*. *Tetrahedron*, 2015. **71**(16): p. 2357-2362.
122. Wang, G., Z. Huang, and E.-i. Negishi, *Highly stereoselective and efficient synthesis of  $\omega$ -heterofunctional di- and trienoic esters for Horner–Wadsworth–Emmons reaction via alkyne hydrozirconation and Pd-catalyzed alkenylation*. *Tetrahedron Letters*, 2009. **50**(26): p. 3220-3223.
123. Sivasubramanian, K., et al., *Value of zeolites in asymmetric induction during photocyclization of pyridones, cyclohexadienones and naphthalenones*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007. **5**(10): p. 1569-1576.
124. Li, X.-W., et al., *Bio-Inspired Formal Synthesis of Hirsutellones A-C Featuring an Electrophilic Cyclization Triggered by Remote Lewis Acid-Activation*. *Chemistry - A European Journal*, 2013. **19**(48): p. 16389-16393.



# **BLOQUE B**



**INTRODUCCIÓN**

**BLOQUE B**



## INTRODUCCIÓN BLOQUE B

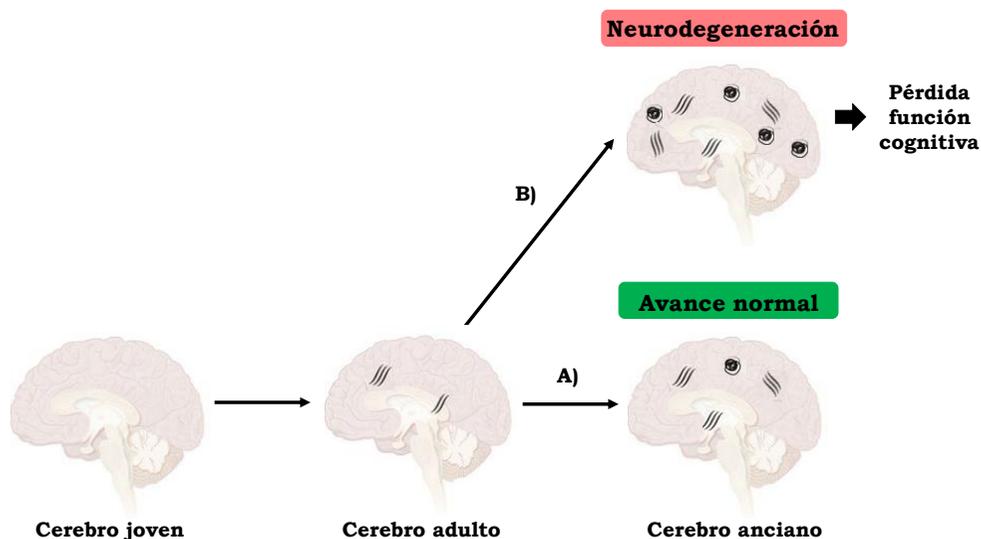
### 1. Retos biomédicos actuales

En la actualidad aún siguen siendo muchas las enfermedades que no tienen cura o son tratadas con fármacos muy agresivos que generan importantes efectos adversos en la salud humana y pueden ocasionar otras complicaciones a lo largo del proceso de curación. Algunos ejemplos incluyen enfermedades neurodegenerativas<sup>[125]</sup> como el Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple o Esclerosis Lateral Amiotrófica, además de enfermedades como el cáncer<sup>[126]</sup>.

Ambos grupos de enfermedades están muy presentes y siguen ocasionando un gran número de muertes en los últimos años. En este sentido, se han realizado estudios en los que se ha estimado que el número de casos de personas que padecen Alzheimer ha aumentado exponencialmente desde 1990 hasta 2016 en un 117 %, ocasionando dicha enfermedad 2.4 millones de muertes solo en ese último año<sup>[127]</sup>. En el caso del cáncer, se ha datado un aumento de 17.5 millones de casos en 2015<sup>[128]</sup> a 18.1 millones en 2018 a nivel mundial y un número de muertes de 9.6 millones ese mismo año<sup>[129]</sup>.

#### 1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas están ocasionadas por la degeneración de las neuronas y el daño de los tejidos neurales con el paso de los años, produciendo la pérdida progresiva de la función cognitiva de forma irreparable y la muerte en fases terminales<sup>[130]</sup>. En algunas de estas enfermedades, a diferencia de un cerebro no afectado, dicha degeneración tiene como causa principal fallos en plegamientos proteicos que derivan en una acumulación y agregación de proteínas en el cerebro, que pueden resultar patógenas, como puede observarse en la **Figura B.1 B)**<sup>[131],[132],[133]</sup>. Este tipo de neurodegeneración se da preferentemente en personas de edad avanzada, siendo los tipos más comunes la enfermedad del Alzheimer y el Parkinson<sup>[134]</sup>, cuyo factor de riesgo principal es el aumento de la edad<sup>[135]</sup>.



**Figura B.1.** A) Avance normal de un cerebro no afectado a lo largo de los años y B) Neurodegeneración de un cerebro por aparición de acumulación y agregación patógena de proteínas.

### 1.1.1. Alzheimer

El Alzheimer se caracteriza por manifestaciones patológicas que incluyen la deposición extracelular de placas fibrilares, compuestas fundamentalmente del péptido  $\beta$ -amiloide, fragmentos de la proteína precursora de polipéptido amiloide (IAPP) y la aparición de depósitos intraneuronales denominados ovillos neurofibrilares. Estos están formados por proteínas tau hiperfosforiladas, provocando la pérdida sináptica y neuronal. A nivel celular el estrés oxidativo y el deterioro mitocondrial están directamente relacionados con la patología de la enfermedad<sup>[136]</sup>. Asimismo, los primeros síntomas que padecen las personas que lo sufren son las pérdidas de memoria a corto plazo y afecciones del lenguaje, la orientación y el comportamiento con el paso del tiempo<sup>[137]</sup>.

En función de la edad a la que aparecen los síntomas puede establecerse una clasificación en Alzheimer de inicio temprano, el cual es muy poco usual y está ocasionado por mutaciones genéticas, o bien, Alzheimer de inicio tardío, que se padece en torno a los 65 años, suponiendo el 95% de los casos, y está influenciado por multitud de factores<sup>[138]</sup>. Asimismo, cabe destacar que

es la principal causa de demencia a nivel mundial, suponiendo un porcentaje del 60-80 % de casos<sup>[139]</sup> y su principal factor de riesgo es la edad<sup>[140]</sup>, aunque tener antecedentes de diabetes, tabaquismo, obesidad, hipertensión o enfermedades cerebrovasculares aumentan a su vez el riesgo de padecerla<sup>[141],[142]</sup>.

En cuanto a su tratamiento, a día de hoy esta enfermedad es incurable y solo existen fármacos para paliar los síntomas como donepezil, rivastigmina, galantamina (que son inhibidores de la acetilcolinesterasa) y memantina (un antagonista del receptor de *N*-metil-*D*-aspartato)<sup>[143]</sup>.

### **1.1.2. Parkinson**

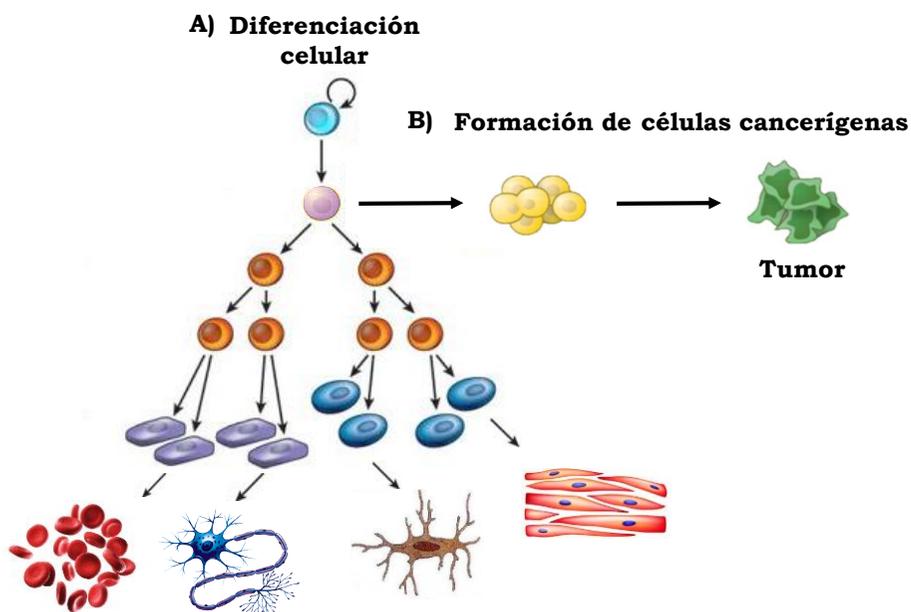
El Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la aparición de depósitos anormales de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, pérdida de neuronas secretoras de dopamina situadas en la sustancia negra y muerte neuronal en otras zonas del cerebro. A nivel celular los procesos patológicos que ocasionan la muerte neural en esta enfermedad son el estrés oxidativo, fallos en el sistema de ubiquitinación proteosomal, causante del plegamiento incorrecto de proteínas<sup>[144]</sup>, formación de agregados citoplasmáticos denominados cuerpos de Lewy y una función mitocondrial y lisosomal alterada<sup>[145]</sup>. Los síntomas de la enfermedad son temblores en reposo, problemas motores como lentitud en el movimiento y falta de equilibrio<sup>[145]</sup>.

Igualmente, se puede establecer una clasificación en función de la edad de aparición, pudiendo diferenciarse en Parkinson juvenil cuando se da en personas de edad inferior a los 21 años y que se asocia con una mutación en el gen Parkin. El Parkinson de inicio temprano que tiene lugar entre los 21-50 años y el Parkinson de inicio tardío cuando se diagnostica en mayores de 60 años<sup>[146]</sup>. De nuevo, el principal factor de riesgo es la edad<sup>[147]</sup>.

En cuanto a su tratamiento, también es una enfermedad que no tiene cura y los fármacos suministrados para tratarla son principalmente medicamentos como levodopa (precursor metabólico de la dopamina)<sup>[148]</sup>.

## 1.2. Cáncer

El cáncer es una familia de enfermedades, cuya característica común consiste en la aparición de células tumorales que se forman como consecuencia de la proliferación descontrolada de células normales mediante un proceso denominado carcinogénesis (**Figura B.2 B**)<sup>[149]</sup>. Dichas células de morfología y metabolismo alterados, a diferencia de las células normales, sobreviven preferentemente en ambientes ácidos<sup>[150]</sup>, con falta de oxígeno<sup>[151]</sup>, con nutrientes determinados dando lugar a la formación de tumores y, en ocasiones, a la diseminación por el cuerpo produciendo metástasis<sup>[152]</sup>. En este sentido, los procesos fisiológicos relacionados con la aparición de dicha patología son muy numerosos e incluyen la presencia de mutaciones en el ADN promovidas por proto-oncogenes<sup>[153]</sup>, errores en la actividad de la enzima telomerasa<sup>[154]</sup>, desregularización en los procesos de señalización propios de la división celular<sup>[155]</sup>, procesos metabólicos llevados a cabo por las mitocondrias alterados<sup>[156]</sup> y evasión de mecanismos de muerte por apoptosis<sup>[157]</sup>, entre otros<sup>[149]</sup>.



**Figura B.2.** A) Proceso de diferenciación de células normales y B) Proliferación descontrolada dando lugar a la formación de células cancerígenas con progresión a tumores.

Existen multitud de tipos de cáncer como el cáncer de mama<sup>[158]</sup>, cáncer de colón<sup>[159]</sup>, cáncer de pulmón<sup>[160]</sup>, leucemias<sup>[161]</sup> etc. y cada uno de ellos da lugar a síntomas determinados. Es una enfermedad multifactorial en la que la genética, factores ambientales, padecer obesidad, infecciones o ser fumador suponen factores de riesgo que favorecen su aparición<sup>[162]</sup>.

En cuanto a su tratamiento es una enfermedad que tiene cura en ciertos casos, pero a pesar de ello los tratamientos son bastante agresivos. Debido a la gran variabilidad, son muy distintos en función del tipo de cáncer siendo lo más habitual la combinación de cirugía, para extirpar las células malignas, con quimioterapia<sup>[163]</sup> o radioterapia<sup>[164]</sup>. Asimismo, cada vez son más los tratamientos alternativos que se están desarrollando, siendo uno de los mejores ejemplos la inmunoterapia<sup>[165]</sup>.

## **2. Herramientas de detección**

Una característica común en el diagnóstico de estas enfermedades es que este suele hacerse en etapas tardías, cuando ya ha tenido lugar la aparición de determinados síntomas como consecuencia del avance de la enfermedad. En relación a ello, para hacer el diagnóstico son varias las herramientas de detección utilizadas a lo largo de los años, las cuales se mencionan brevemente a continuación.

Por un lado, estas enfermedades se diagnostican mediante el estudio detallado de los síntomas del paciente y su historial. Además, se realiza el análisis de imágenes estructurales del cerebro en el caso de las enfermedades neurodegenerativas y/u otras partes del cuerpo según a qué zona haya afectado el cáncer. Estas imágenes se obtienen preferentemente mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o tomografía por emisión de positrones (PET)<sup>[139],[166]</sup>.

Por otro lado, de forma más reciente se han empleado los denominados diagnósticos moleculares que ofrecen la posibilidad de poder diagnosticar la enfermedad en etapas más tempranas. Estos consisten en la realización de estudios de algunos biomarcadores implicados en los procesos fisiológicos que desencadenan la enfermedad, los cuales se encuentran alterados y

pueden medirse en muestras de plasma o líquido cefalorraquídeo<sup>[130],[141],[167]</sup>. En el caso concreto del cáncer estas moléculas se denominan biomarcadores tumorales<sup>[168]</sup>.

Sin embargo, aún son insuficientes las herramientas de diagnóstico precoz. Es por ello que cada vez es más necesario el desarrollo de un número mayor de estrategias para una detección temprana, lo cual es de vital importancia para poder suministrar tratamientos en los inicios de la enfermedad, evitando su progresión, intentando aumentar la tasa de supervivencia y reduciendo la mortalidad<sup>[130],[169]</sup>.

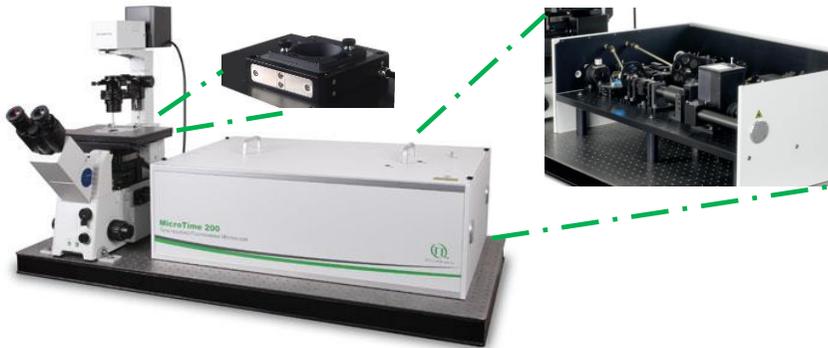
### **3. Microscopía de fluorescencia**

Teniendo en cuenta los aspectos mencionados en el apartado anterior, es evidente que la búsqueda de nuevas herramientas que ofrezcan un conocimiento en mayor profundidad de la fisiopatología de la enfermedad a nivel celular y molecular es un campo de investigación muy activo.

Así, desde hace años se ha empleado la microscopía de fluorescencia para la obtención de imágenes de los procesos fisiológicos que ocurren en el interior celular. La microscopía de fluorescencia se basa en la detección de la fluorescencia emitida por compuestos fluorescentes que previamente son excitados por luz. Dicha emisión fluorescente se puede caracterizar por la intensidad de fluorescencia y por la cinética de emisión de fotones a la que se le asocia un tiempo de vida ( $\tau$ )<sup>[170]</sup>. Se trata de una técnica no invasiva, con gran sensibilidad y buena selectividad, que ha evolucionado mucho en las últimas décadas.

El primer microscopio de fluorescencia se inventó en 1904 por Köhler y fue de gran utilidad ya que permitió la visualización de fenómenos nunca antes vistos como la autofluorescencia propia de bacterias que habían sido sometidas a luz UV<sup>[171]</sup>. Poco después se comenzaron a añadir fluoróforos a las muestras con el fin de visualizarlas mejor y, años más tarde, en la década de 1940, se desarrollaron anticuerpos etiquetados con moléculas fluorescentes<sup>[172]</sup>, que en los 70 supusieron un avance gracias a la revelación de forma clara de zonas específicas de las células<sup>[173]</sup>. En 1962 Shimomura

descubrió la proteína fluorescente verde (GFP), como una proteína complementaria de la proteína quimioluminiscente de la especie de medusa *Aequorea Victoria*<sup>[174]</sup>. La GFP, con emisión en la zona del verde, supuso un antes y un después en la ciencia debido a su amplio uso por sus buenas cualidades para generar un fluoróforo interno altamente visible que se usa como marcador de la expresión génica y localizador de proteínas en organismos vivos<sup>[175],[176]</sup>. Tanto es así que en 2008 fue concedido el Premio Nobel a los Dres. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien por el descubrimiento de dicha proteína, sus mecanismos de expresión y el desarrollo de sus variantes<sup>[177]</sup>. Además, a lo largo de los años han mejorado mucho los elementos ópticos, las fuentes de excitación láser<sup>[178]</sup>, los detectores y los ordenadores para el tratamiento de imágenes<sup>[179]</sup>. Esto ha permitido la fabricación de microscopios de fluorescencia de mayor calidad como el que aparece en la **Figura B.3**.



**Figura B.3.** Imagen de un microscopio de fluorescencia MicroTime200 (PicoQuant).

Sin embargo, conforme se fue avanzando en la utilización de metodologías basadas en la microscopía de fluorescencia, surgieron ciertos problemas o limitaciones, entre los que destacan la escasa resolución con las que se obtenían las imágenes<sup>[180]</sup> y la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de la sonda utilizada<sup>[181]</sup>.

Por un lado, para mejorar la resolución se pensaron diferentes estrategias: recolectar más luz aumentando el ángulo de captación, emplear una luz de excitación variable en función de la posición y usar procesos de

fluorescencia que involucren dos o más fotones<sup>[180]</sup>. En este sentido, en 1957 Minsky patentó el fundamento de la técnica de microscopía confocal. Años más tarde se fueron desarrollando otras técnicas para aumentar la resolución como la microscopía de dos fotones<sup>[182]</sup> y las técnicas de microscopía de súper resolución<sup>[183],[184],[185]</sup>. La importancia de esta última familia de técnicas se reconoció en el año 2014 con la concesión del Premio Nobel a Eric Betzig, Stefan W. Hell y Willian E. Moerner por el desarrollo de las herramientas que dieron lugar a la microscopía de fluorescencia de súper resolución<sup>[186]</sup>.

Por otro lado, para evitar medidas poco fiables debido a la dependencia de la intensidad con la concentración del fluoróforo surgieron técnicas que utilizan para la reconstrucción de imágenes tanto valores de intensidad como de tiempos de vida. Entre ellas destaca la microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM)<sup>[181],[187]</sup> en la que nos centraremos en los capítulos próximos.

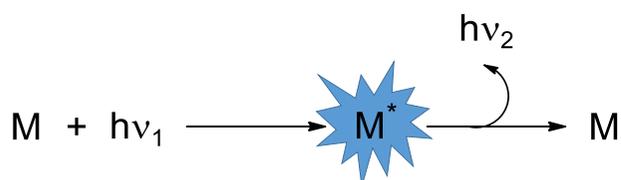
#### **4. Sondas y sensores fluorescentes con aplicación biomédica**

Como se ha mencionado previamente con ayuda de las técnicas de microscopía de fluorescencia, se han investigado diferentes procesos que tienen lugar en el interior celular, lo cual ha sido posible mediante el uso de sondas y sensores fluorescentes. En relación a ello, ya son algunos los ejemplos de estos colorantes que han aportado información novedosa de la fisiopatología presente en diferentes enfermedades como la sonda diseñada por Xu y colaboradores, capaz de detectar agregados de proteína  $\beta$ -amiloide<sup>[188]</sup> o colorantes que han mejorado la detección temprana de determinadas enfermedades como una sonda fluorescente utilizada para la detección de melanoma<sup>[189]</sup> u otros tipos de cáncer<sup>[190]</sup>.

En general se pueden emplear sondas fluorescentes para la localización de orgánulos y subestructuras celulares en los cuales ocurren los procesos fisiológicos de interés y/o para la localización de otros procesos tales como actividad enzimática<sup>[191]</sup>. Cuando las propiedades fotofísicas de los compuestos fluorescentes se ven modificadas en respuesta a la presencia de ciertas especies químicas de manera selectiva, pueden emplearse estas modificaciones para detectar y cuantificar analitos concretos. Si además el

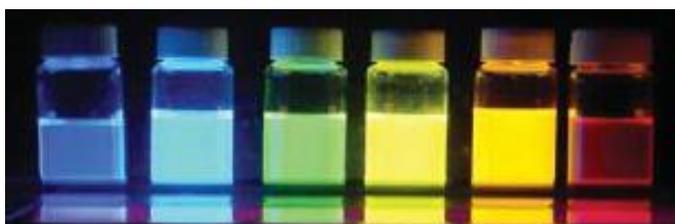
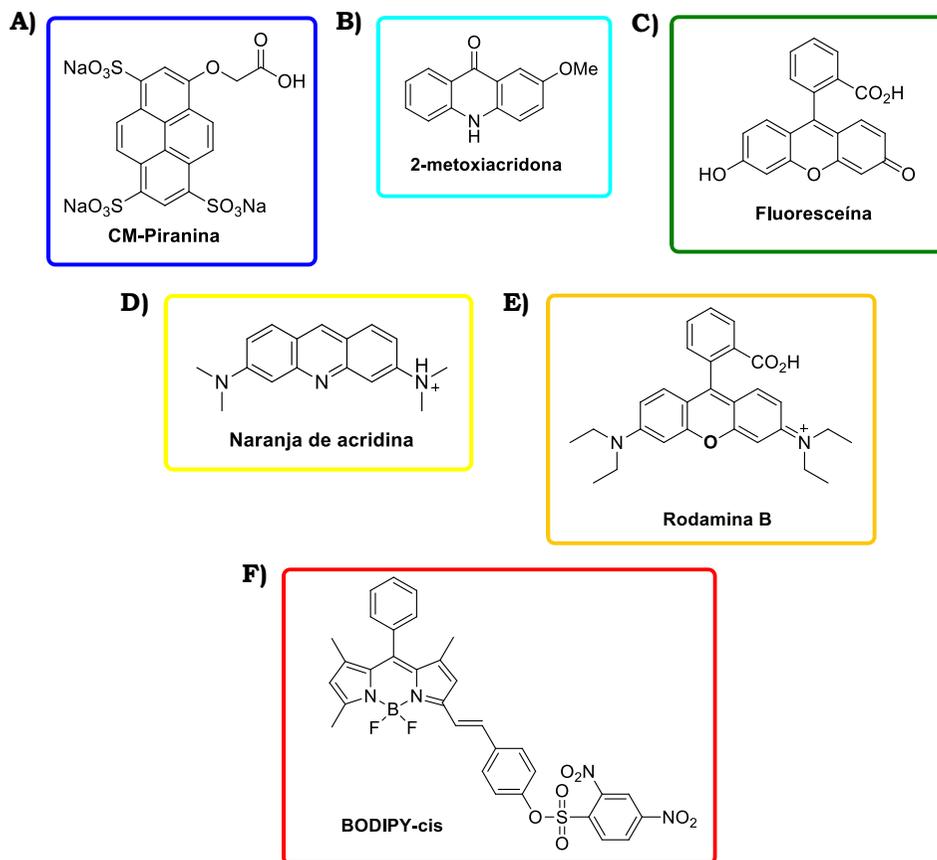
cambio en las propiedades tiene una dependencia con la concentración del analito puede emplearse esta información para la cuantificación de los mismos, dando lugar a los denominados sensores fluorescentes<sup>[192]</sup>.

Tanto las sondas como los sensores fluorescentes están constituidos principalmente por fluoróforos que son moléculas que absorben luz en una longitud de onda determinada y se desactivan posteriormente mediante la emisión de radiación en la región espectral del UV-VIS<sup>[193]</sup>, como se observa en la **Figura B.4**.



**Figura B.4.** Proceso de emisión de fluorescencia de un fluoróforo M.

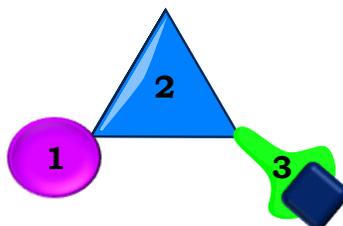
Algunos de los fluoróforos más empleados en el ámbito de la biomedicina son derivados del pireno, derivados xanténicos como la fluoresceína, acridonas, acridinas, rodaminas, cianinas, BODIPYs (4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos) y muchos de sus derivados<sup>[194],[195],[196],[197]</sup>. Algunas de las estructuras químicas de estos fluoróforos comunes se muestran en la **Figura B.5**. En ella puede verse como en función de la estructura de cada uno de los fluoróforos estos emiten a diferentes longitudes de onda y, por tanto, presentan distintos colores en disolución, tal y como se muestra en la fotografía.



**Figura B.5.** Ejemplos de fluoróforos con aplicaciones biomédicas. **A)** CM-Pirarinina. **B)** 2-metoxiacridona. **C)** Fluoresceína. **D)** Naranja de acridina. **E)** Rodamina B y **F)** BODIPY-cis.

A su vez, en función de su uso, las sondas y los sensores fluorescentes también pueden estar constituidos además de por fluoróforos, por otros grupos químicos que permiten dirigirlos a distintos orgánulos y compartimentos celulares (grupos orientadores) o aumentar la especificidad

de la respuesta (restos de reconocimiento de determinados analitos)<sup>[198]</sup>, como se muestra en la **Figura B.6**.



**Figura B.6.** Ejemplo esquemático de la estructura de una sonda o sensor fluorescente siendo 1 el grupo orientador, 2 el fluoróforo y 3 el resto de reconocimiento del analito en cuestión.

Asimismo, en cuanto a sus propiedades, las sondas y los sensores con un diseño óptimo deben poseer longitudes de onda de excitación acordes con su uso, ser fotoestables y no presentar grandes interferencias con la autofluorescencia propia de las células. Además, deben tener un alto coeficiente de absorción molar y elevado rendimiento cuántico, con la finalidad de utilizar la mínima concentración y evitar problemas de toxicidad, y deben presentar grupos funcionales muy selectivos que permitan el reconocimiento del analito diana<sup>[199]</sup>.



# **CAPÍTULO II**

Sondas fluorescentes  
dirigidas a distintos  
orgánulos celulares



## II. SONDAS FLUORESCENTES DIRIGIDAS A DISTINTOS ORGÁNULOS CELULARES

### II.1. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado en la introducción de este bloque, en la actualidad, se ha intensificado la búsqueda de nuevas herramientas que permitan tener una visión más profunda de los procesos fisiológicos que ocasionan ciertas patologías que desencadenan o favorecen el avance de enfermedades neurodegenerativas<sup>[130]</sup> como el Parkinson, el Alzheimer<sup>[200],[139]</sup> o enfermedades como el cáncer<sup>[168]</sup>. Muchos de estos procesos fisiológicos tienen lugar en los orgánulos presentes en las células. Cada uno de ellos desempeña importantes funciones a nivel celular y actúan correctamente en los microentornos adecuados.

Es por ello que, con la finalidad de indagar en la actividad de dichos orgánulos, desde hace años se han sintetizado una gran variedad de sondas fluorescentes con aplicación biomédica<sup>[192]</sup>. Estas sondas, utilizadas para la realización del marcaje de diferentes orgánulos celulares, están constituidas principalmente por tres grupos: grupos orientadores, fluoróforos y unidades de reconocimiento<sup>[198]</sup>. Asimismo, una vez conocido el lugar donde se dirigen dichas sondas en el interior celular, podrían ser utilizadas para la detección y análisis de ciertos parámetros de interés (lo cual se describe en los *Capítulos III y IV* de esta Tesis Doctoral), o bien, como transportadores de fármacos de forma específica a los distintos orgánulos o compartimentos de las células<sup>[201],[202],[203],[204],[205]</sup>.

En definitiva, con la finalidad de conocer a qué orgánulo o compartimento celular se dirige cada colorante, se establecieron las que denominaremos estrategias de administración dirigidas a distintos orgánulos celulares, las cuales se explican a continuación.

#### II.1.1. Estrategias de administración dirigidas a distintos orgánulos celulares

Hace años se descubrió que la interacción entre las sondas fluorescentes y las diferentes partes de las células se veía influenciada principalmente por

la naturaleza fisicoquímica de dichas sondas<sup>[206]</sup>. De manera que desde los años 20 del siglo pasado ya hubo indicios de que, por ejemplo, compuestos que eran bases débiles se acumulaban preferentemente en lisosomas y que compuestos catiónicos tenían especial afinidad por las mitocondrias<sup>[207]</sup>.

Partiendo de este hecho, se estableció una estrategia para predecir dónde se localizan y acumulan cada uno de los colorantes en el interior celular, en función de su naturaleza fisicoquímica. La estrategia consiste en la construcción de modelos basados en las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Para la construcción de dichos modelos se utilizaron parámetros fisicoquímicos que se consideraron clave para determinar si un colorante se dirige a un orgánulo u otro. Algunos de estos parámetros se describen a continuación<sup>[206]</sup>:

- El grado de lipofilia o hidrofilia de la molécula, medido en función del logaritmo del coeficiente de partición P (log P) entre dos disolventes inmiscibles, normalmente agua-octanol (**Ecuación II.1**). En ese caso, el parámetro describe cómo se distribuye la molécula entre ambos disolventes<sup>[208],[209]</sup>, siendo valores positivos característicos de especies lipófilas, con mayor solubilidad en octanol, y los negativos de especies hidrófilas, con mayor solubilidad en agua.

$$\text{Ecuación II.1} \quad \log P_{\text{octanol/agua}} = \frac{[\text{Soluta en octanol}]}{[\text{Soluta en agua}]}$$

- La anfifilicidad (A). Se trata de una propiedad que poseen ciertas moléculas derivada de su estructura ya que están constituidas por una parte lipófila y otra hidrófila.

- La carga eléctrica de la molécula (Z).

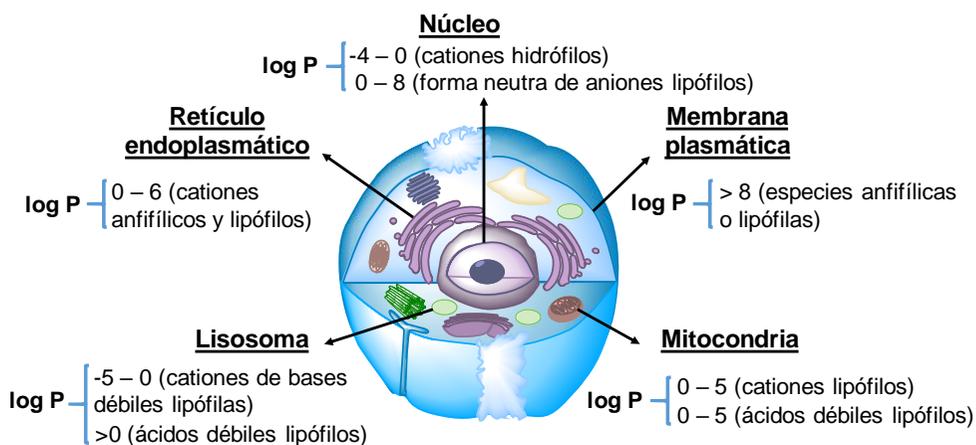
- La fuerza ácido-base medida a través del pK<sub>a</sub> calculado mediante el logaritmo de la inversa de la constante de equilibrio de desprotonación. En

un equilibrio ácido-base dicho parámetro nos indica un valor de pH en el que existe en el medio la misma concentración de especie ácida que de básica.

- El número de dobles enlaces conjugados (CBN, por sus siglas en inglés *Number of Conjugated Bonds*).

- La relación entre la anchura (W) y la longitud (L) de la mayor región aromática planar del fluoróforo.

Cabe destacar que utilizando únicamente el log P puede predecirse con cierta precisión la localización del colorante (**Figura II.1**), aunque se determina de forma más precisa utilizando varios parámetros simultáneamente.

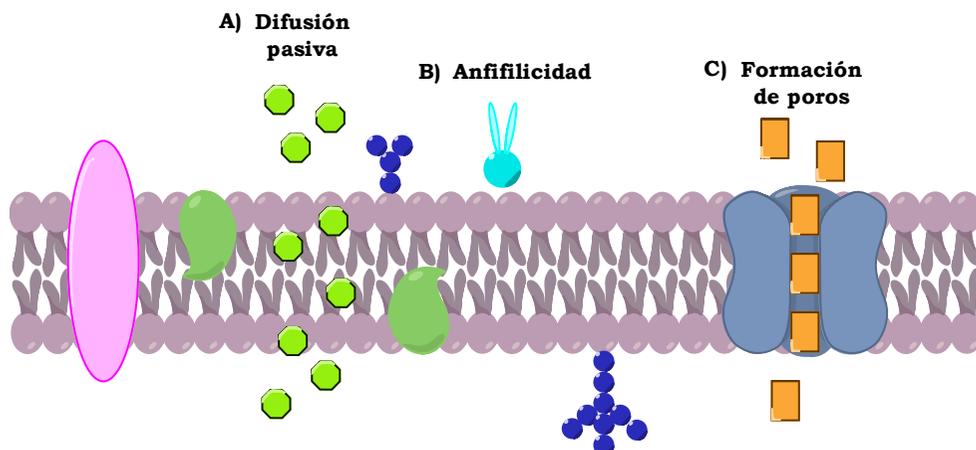


**Figura II.1.** Localización del colorante según su valor del log P.

A continuación, teniendo en cuenta los modelos de QSAR, se van a mencionar el tipo de colorantes que se localiza preferentemente en la membrana plasmática<sup>[210]</sup>, mitocondrias<sup>[211],[212]</sup>, lisosomas<sup>[213]</sup>, retículo endoplasmático<sup>[214]</sup> o núcleo celular<sup>[215]</sup>, como las partes más importantes y representativas del interior celular.

En este sentido, cada una de las sondas utilizadas para realizar el marcaje de distintos orgánulos debe atravesar la membrana plasmática de la célula, cuya superficie es hidrófila y el interior hidrofóbico. Existen tres mecanismos que posibilitan el paso de estas moléculas: la difusión pasiva,

que consiste en el paso de moléculas de pequeño tamaño en función del gradiente de concentración (**Figura II.2 A**), la anfifilicidad de la molécula, que por su estructura similar a la bicapa es capaz de atravesarla (**Figura II.2 B**) y la entrada por formación de poros en la membrana plasmática (**Figura II.2 C**)<sup>[206]</sup>.



**Figura II.2.** Estructura de la membrana plasmática y mecanismos posibles para poder atravesarla. **A)** Mediante difusión pasiva, **B)** Moléculas anfifílicas y **C)** Mediante formación de poros transmembrana.

### II.1.1.1. Colorantes dirigidos a la membrana plasmática

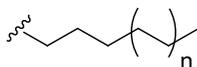
La membrana plasmática es la barrera externa de las células, la cual está formada por una bicapa lipídica y diversas proteínas de membrana que están ancladas a una parte de la bicapa o bien la atraviesan en su totalidad. Sus principales funciones son permitir el transporte de solutos y nutrientes, participar en vías de señalización, favorecer la interacción celular y participar en los procesos de producción de energía en forma de ATP<sup>[216]</sup>.

Existen colorantes que, en lugar de atravesar la membrana, quedan atrapados en la bicapa lipídica o bien por afinidad con la misma o por interacciones entre el colorante y las proteínas de membrana. Este hecho ha permitido su uso como colorantes orientadores a este compartimento celular. Sin embargo, este tipo de colorantes no son muy selectivos ya que, debido a que el resto de membranas que existen en el interior celular poseen la misma

naturaleza que la membrana plasmática, su acumulación se lleva a cabo de forma inespecífica en los orgánulos membranosos por invaginación.

Según los modelos de QSAR, las especies con carácter anfifílico o lipofílico muy marcado con valores de  $A > 8$  y  $\log P > 8$  son las que se acumulan en este compartimento celular<sup>[206]</sup>.

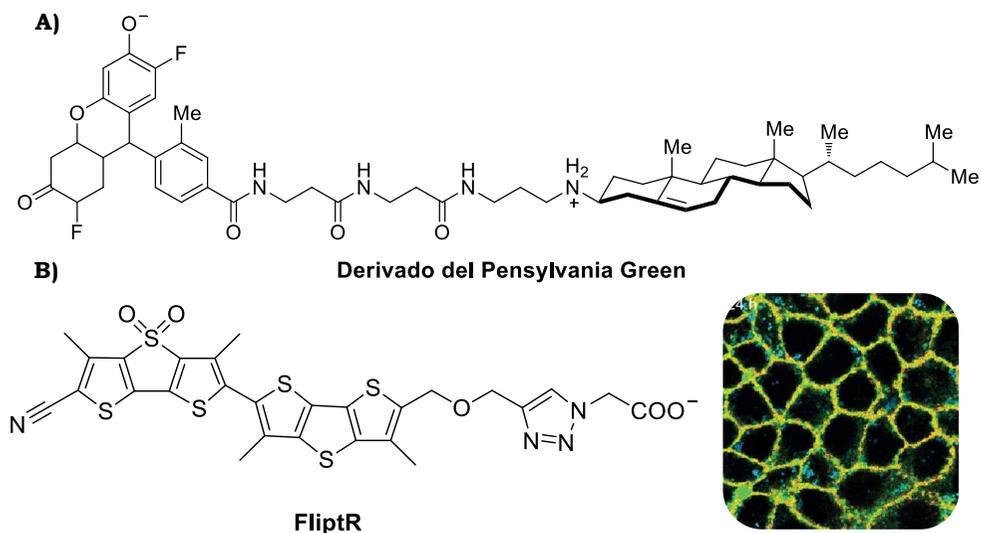
En relación a ello, un grupo que orienta las sondas a la membrana plasmática, como se observa en la **Figura II.3**, son cadenas alifáticas lipófilas de longitud larga ya que, debido a su carácter apolar, tienen gran afinidad por medios lipófilos, quedando atrapados en el interior de la bicapa de fosfolípidos. A su vez otro método para diseñar este tipo de sondas es la introducción de estructuras capaces de interactuar con receptores de membrana<sup>[191]</sup>.



**Cadenas alifáticas**

**Figura II.3.** Grupo orientador a la membrana plasmática.

En bibliografía se encuentran algunos ejemplos de este tipo de sondas<sup>[217],[218]</sup>, entre los cuales los más recientes son un derivado del Pennsylvania Green constituido por *N*-alquil-3 $\beta$ -coesterolamina como grupo orientador a la membrana<sup>[219]</sup> y la sonda denominada FliptR constituida por dos grupos ditienotiofeno como fluoróforo y un grupo 1,2,3-triazol como orientador a la membrana<sup>[220]</sup> (**Figura II.4**). En ambos trabajos determinaron que estas sondas se introducían en la membrana plasmática pero no de forma específica, marcando a su vez endosomas.



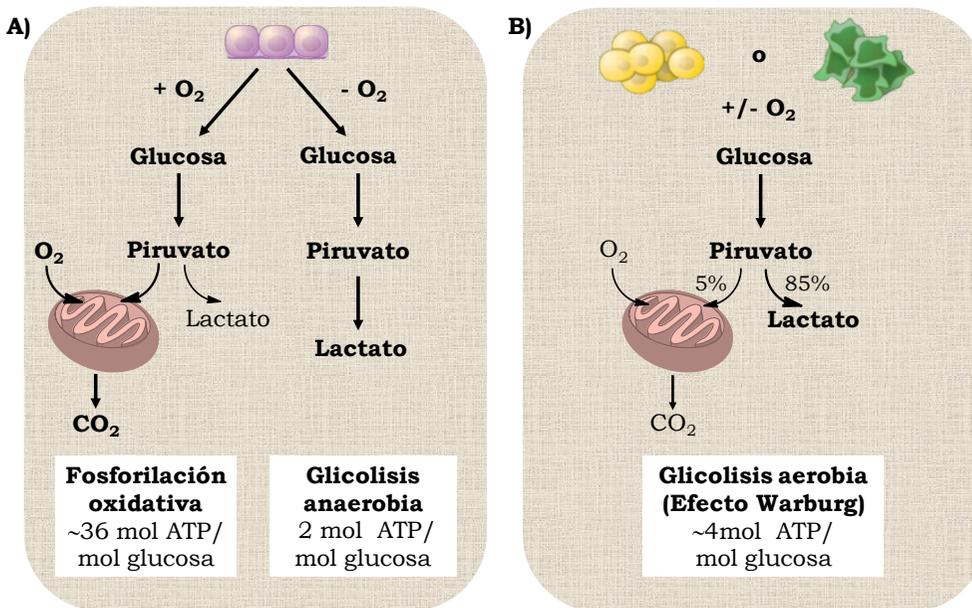
**Figura II.4.** Algunos ejemplos de marcadores de membrana. **A)** Derivado del Pennsylvania Green y **B)** FliptR.

### II.1.1.2. Colorantes dirigidos a las mitocondrias

Las mitocondrias son pequeños orgánulos que constan principalmente de dos membranas, una externa y otra interna separadas mediante un espacio intermembrana y la matriz intramitocondrial. Este orgánulo, junto con la membrana plasmática, constituye una de las zonas principales de las células donde tienen lugar las reacciones metabólicas que generan una fuente de energía en forma de ATP<sup>[216]</sup>. Las mitocondrias están implicadas en distintos procesos como la síntesis de proteínas útiles en procesos de crecimiento y división celular, la regulación de la apoptosis celular<sup>[221]</sup>, o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>[222]</sup>. Además, juegan un papel crucial ya que los principales procesos del metabolismo energético celular tienen lugar en este orgánulo, el cual puede verse afectado por diferentes procesos fisiológicos y patológicos.

Un ejemplo de la afeción funcional que pueden sufrir las mitocondrias lo encontramos en las diferentes vías metabólicas en células normales y células tumorales. Las células eucariotas normales, por un lado, en presencia de oxígeno metabolizan la glucosa en piruvato mediante un proceso denominado glucólisis aerobia. Tras el posterior proceso de fosforilación

oxidativa se genera dióxido de carbono, una producción mínima de lactato y cantidad suficiente de ATP, en concreto 36 ATP por oxidación completa de una molécula de glucosa. Por otro lado, en ausencia de oxígeno tiene lugar una glucólisis anaerobia en la que se obtienen cantidades de lactato más elevadas, como puede observarse en la **Figura II.5 A)**. En cambio, en células tumorales, las cuales proliferan sin control, el metabolismo celular funciona incorrectamente cambiando por completo (**Figura II.5 B)**). Así, independientemente de la cantidad de oxígeno presente en el medio, tiene lugar una glucólisis denominada aerobia, en la que, tras inhibición del proceso de fosforilación oxidativa, se producen cantidades elevadas de lactato, acidificándose el medio y generando una cantidad insuficiente de ATP, lo cual se denomina efecto Warburg<sup>[156]</sup>.

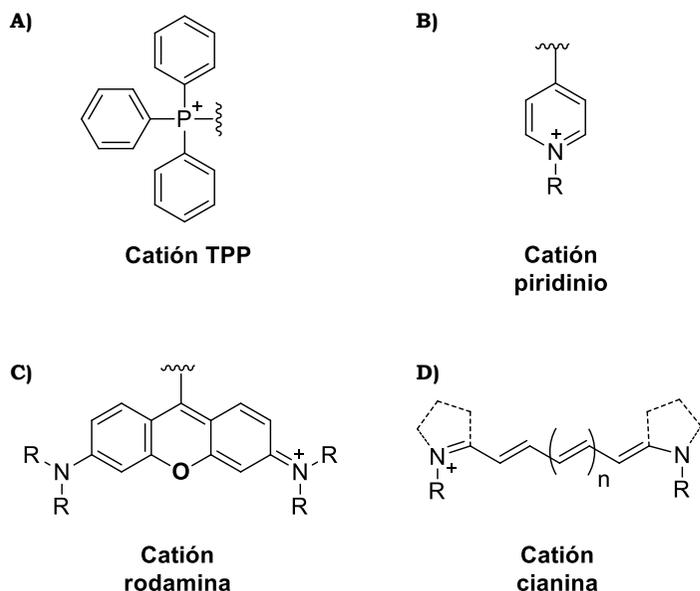


**Figura II.5.** Procesos de metabolismo celular en el interior mitocondrial<sup>[156]</sup>. **A)** En células normales y **B)** En células tumorales.

Debido a la gran importancia de este orgánulo, la búsqueda de distintos colorantes que se localicen en mitocondrias y sean capaces de detectar diferentes parámetros o bien de dirigir fármacos a mitocondrias que presenten un funcionamiento incorrecto es de gran interés. En este sentido,

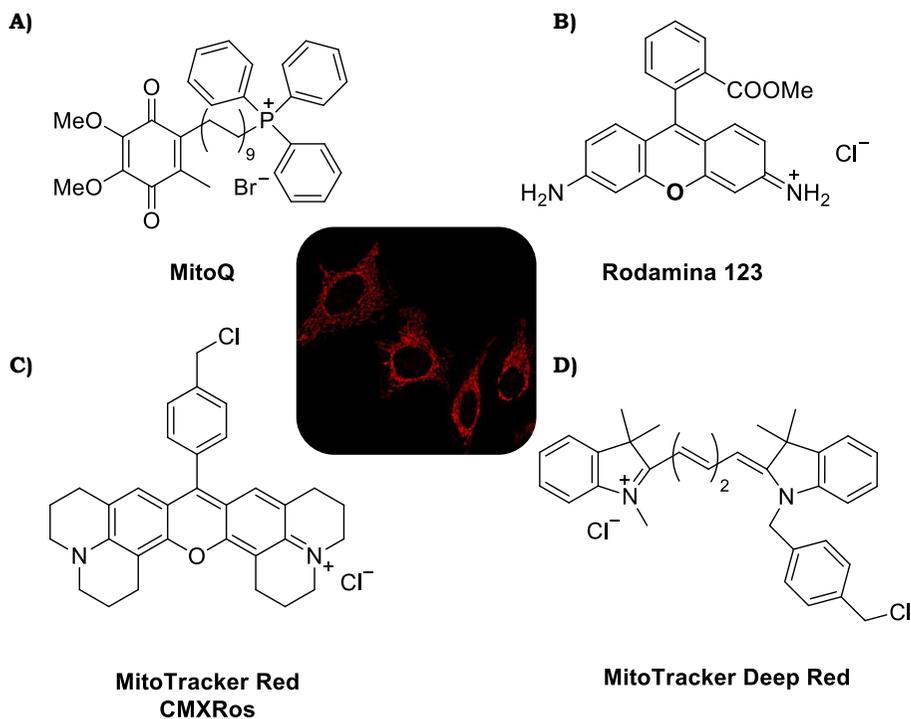
según los modelos QSAR, en función de cómo se incorporen a las mitocondrias existen dos tipos de colorantes: los catiónicos lipófilos o los ácidos débiles lipófilos. Los cationes lipófilos se caracterizan por poseer valores de lipofilidad, medida mediante el log P, entre 0 y 5, estar cargados ( $Z > 0$ ) y presentar un  $pK_a > 12$  o mantenerse en su forma catiónica. Por su parte, los ácidos débiles, a diferencia de los cationes lipofílicos, presentan un  $pK_a$  en torno a  $7 \pm 3$  y deben ser aniónicos (con  $Z < 0$ )<sup>[206]</sup>. Sin embargo, a pesar de ser aniones, atraviesan la membrana fácilmente por su carácter lipófilo y quedan atrapados en el interior.

Hay que considerar que la membrana mitocondrial presenta un potencial eléctrico negativo generado como consecuencia del gradiente de protones existente entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. En este sentido, los colorantes que atraviesan preferentemente las membranas mitocondriales y se localizan en la matriz mitocondrial son compuestos que contienen restos catiónicos lipofílicos. Su lipofilidad hace que sean muy solubles en lípidos, lo que facilita su paso a través de la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática y de la membrana mitocondrial externa mientras que su naturaleza catiónica facilita que sean impulsados por el potencial de membrana a la matriz mitocondrial, cargada negativamente<sup>[223],[224]</sup>. En este sentido, los grupos orientadores a las mitocondrias más empleados, como se muestra en la **Figura II.6 A)** y **B)**, son los cationes de trifenilfosfonio (TPP) y piridinio y los fluoróforos utilizados con más asiduidad, las rodaminas y cianinas (**Figura II.6 C)** y **D)**)<sup>[198],[204]</sup>. De todos ellos, los cationes TPP han sido los más ampliamente estudiados durante años como grupos orientadores a mitocondrias<sup>[204],[225]</sup>.



**Figura II.6.** Restos catiónicos y fluoróforos que favorecen la localización de sondas fluorescentes en mitocondrias. **A)** Catión TPP, **B)** Catión piridinio, **C)** Catión rodamina y **D)** Catión cianina.

Dentro de la multitud de ejemplos de colorantes catiónicos que se localizan en las mitocondrias<sup>[192],[198],[204],[191],[226],[227]</sup>, algunos de los más empleados son la mitoquinona Mito Q, sintetizada mediante la combinación de coenzima Q y un resto catiónico TPP unidos mediante una cadena alquímica<sup>[228]</sup>, la rodamina 123<sup>[229]</sup> y los colorantes comerciales MitoTracker como el MitoTracker Red CMXRos con esqueleto de rodamina<sup>[230]</sup> o el MitoTracker Deep Red cuyo fluoróforo es la cianina (**Figura II.7**)<sup>[227]</sup>. La característica común de todos ellos es que poseen carga positiva deslocalizada y un  $pK_a$  superior a 8.2. Otro de los colorantes que se utilizan para marcar mitocondrias habitualmente es la fluoresceína en forma de su ácido débil<sup>[206]</sup>.



**Figura II.7.** Algunos ejemplos de marcadores mitocondriales. **A)** MitoQ, **B)** Rodamina 123, **C)** MitoTracker Red CMXRos y **D)** MitoTracker Deep Red.

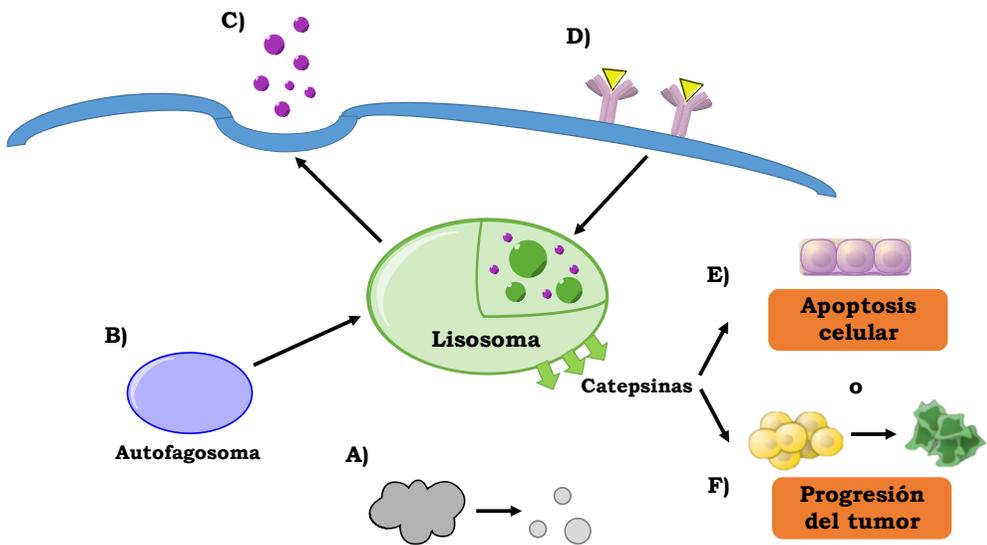
Asimismo, algunas de las propiedades fisicoquímicas que caracterizan a los colorantes comerciales MitoTracker Red CMXRos<sup>[230]</sup> y MitoTracker Deep Red son su naturaleza lipófila, con valores medidos de log P de en torno a 1 y su emisión en la zona espectral del rojo, lo que evita interferencias de la autofluorescencia celular y es útil para hacer estudios de etiquetado multicolor. El MitoTracker Red CMXRos se excita a 578 nm y emite a 599 nm y el MitoTracker Deep Red se caracteriza por una longitud de onda de excitación de 644 nm y de emisión de 665 nm<sup>[227]</sup>.

### II.1.1.3. Colorantes dirigidos a los lisosomas

Los lisosomas son orgánulos celulares ácidos que están constituidos por alrededor de 50 enzimas hidrolasas y proteínas de membrana que funcionan de forma óptima a pH de alrededor de 5<sup>[216]</sup>. Están implicados en procesos fisiológicos como la descomposición de macromoléculas, autofagia, endocitosis, exocitosis, mantenimiento de la membrana plasmática, procesos

de señalización<sup>[231],[232]</sup> y la apoptosis celular<sup>[233]</sup>, convirtiéndose en el orgánulo encargado de la degradación intracelular.

Asimismo, estos orgánulos sufren ciertas alteraciones que afectan a su función como pueden ser aumentos en la expresión de enzimas lisosomales o permeabilización de las membranas lisosomales, lo cual produce una alcalinización del interior lisosomal por fuga de protones e hidrolasas al exterior del orgánulo. En células normales el aumento de la cantidad de enzimas hidrolasas lisosomales denominadas catepsinas y su expulsión al espacio extracelular, conlleva a la apoptosis celular. En cambio, en el caso de células malignas, la liberación al espacio extracelular de dichas catepsinas promueve una proliferación más rápida, dando lugar a la progresión de tumores y por tanto a la aparición de distintos tipos de cáncer<sup>[234]</sup>(**Figura II.8**).



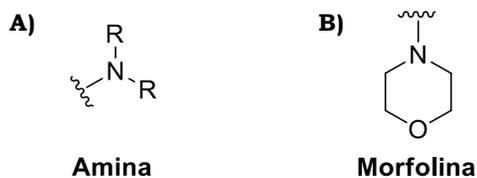
**Figura II.8.** Procesos fisiológicos en los que juegan un papel importante los lisosomas<sup>[235]</sup>. **A)** Descomposición de macromoléculas, **B)** Autofagia, **C)** Exocitosis, **D)** Señalización celular, **E)** Apoptosis celular de células normales y **F)** Proliferación de células tumorales.

De nuevo la búsqueda de sondas que se orienten a los lisosomas es importante con la finalidad de conocer en mayor profundidad el mecanismo que rige este tipo de procesos y poder evitarlos con la administración dirigida

de fármacos. Según los modelos QSAR, en función de cómo se incorporen a los lisosomas existen dos tipos de colorantes: las bases débiles lipófilas que coexisten en equilibrio con sus formas catiónicas o los ácidos débiles lipófilos. Las formas catiónicas de las bases débiles se caracterizan por poseer valores de  $\log P$  entre -5 y 0, un  $pK_a$  entre 6 y 10 y una  $Z > 0$ . Los ácidos débiles se caracterizan por tener un valor de  $\log P$  superior a 0, un  $pK_a$  de  $7 \pm 3$  y una carga  $Z < 0$ [206].

Por un lado, las bases débiles lipófilas se incorporan a los lisosomas a través de un proceso denominado atrapamiento lisosomal. En él, los compuestos básicos atraviesan fácilmente tanto la membrana plasmática como la membrana lisosomal debido a su carácter lipófilo. Una vez en el interior del lisosoma, dichas bases se protonan como consecuencia de la acidez del medio convirtiéndose en especies catiónicas hidrofílicas que se quedan atrapadas en el interior[236],[237].

En este sentido, los grupos directores a los lisosomas más empleados son las aminas y la morfolina, como se muestra en la **Figura II.9**[198].

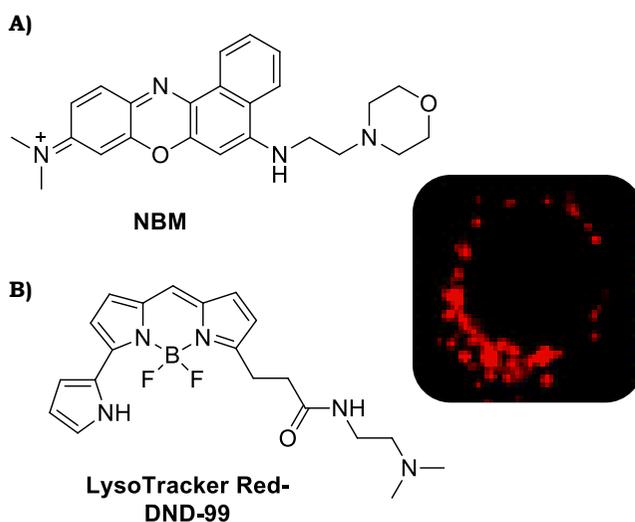


**Figura II.9.** Bases débiles que favorecen la localización lisosomal. **A)** Aminas y **B)** Morfolina.

Por otro lado, los ácidos débiles lipófilos quedan retenidos por precipitación. Primero, al ser ácidos lipófilos, al igual que las bases anteriores, son permeables y atraviesan las membranas fácilmente. Luego, una vez en el interior lisosomal, al tener baja solubilidad acuosa precipitan y quedan atrapados[213].

Del mismo modo que en el caso de colorantes dirigidos a mitocondrias, existen gran variedad de sondas orientadoras a estos orgánulos ácidos[192],[198],[227],[238]. Algunos ejemplos de sondas utilizadas se muestran en

la **Figura II.10**, y son la formada mediante una combinación del fluoróforo Nile Blue y el grupo director a lisosomas 2-morfolinoetilamina conocida como NBM<sup>[192]</sup> y la familia de colorantes comerciales LysoTracker, como el LysoTracker Red DND-99 con una amina en su estructura como grupo director<sup>[230]</sup> y LysoTracker Deep Red cuya estructura se encuentra bajo patente. Ambos colorantes de la familia LysoTracker presentan naturaleza lipófila con valores medidos de log P de en torno a 2.1. El LysoTracker Red DND-99 se excita a 576 nm y emite a 590 nm<sup>[230]</sup>. El LysoTracker Deep Red tiene una excitación y emisión desplazada hacia el infrarrojo cercano de 647 y 668 nm.



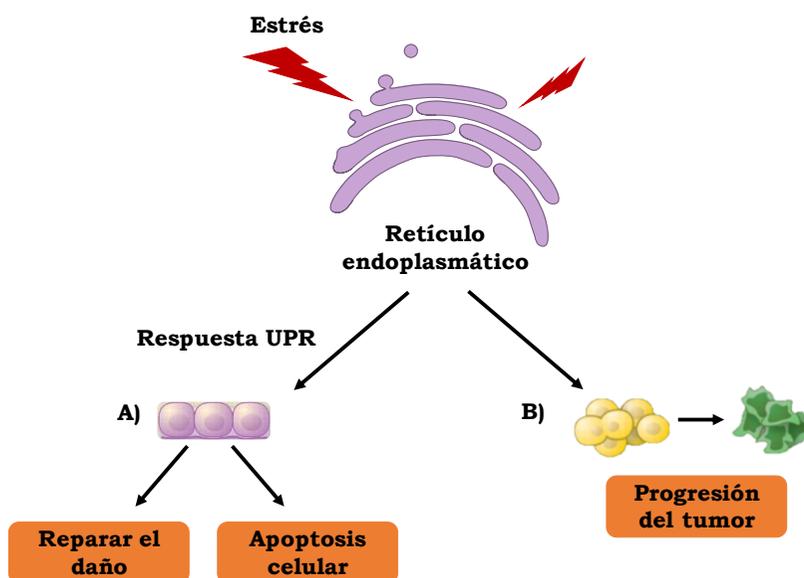
**Figura II.10.** Bases débiles que actúan como colorantes orientadores a lisosomas. **A)** NBM y **B)** LysoTracker Red DND-99.

#### II.1.1.4. Colorantes dirigidos al retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático es un orgánulo membranoso que se divide en dos compartimentos, el retículo endoplasmático liso y el rugoso. Algunas de las funciones de las que se encarga a nivel celular el retículo endoplasmático liso son la síntesis y metabolismo de lípidos<sup>[239]</sup> y el almacenamiento de iones de calcio<sup>[240],[241]</sup>. Por su parte en el retículo endoplasmático rugoso se lleva a cabo la síntesis, el transporte y el plegamiento de proteínas<sup>[242],[243]</sup>.

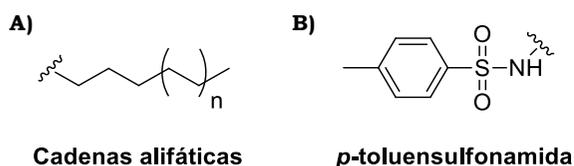
Al igual que los orgánulos anteriores, el retículo endoplasmático puede verse afectado por determinadas alteraciones, las cuales conllevan a un funcionamiento inadecuado del mismo. En ocasiones se producen alteraciones de la cantidad de nutrientes en la síntesis y plegamiento de proteínas y en el almacenamiento del calcio, lo que activa una respuesta de estrés del retículo. En este sentido, la principal causa del estrés es la acumulación de proteínas con un plegamiento inadecuado, ocasionando una reducción en la traducción de proteínas y alteraciones en el transporte de las mismas<sup>[244],[245]</sup>.

En células normales, como aparece en la **Figura II.11**, dicho fenómeno induce la aparición de la denominada respuesta de proteína desplegada (UPR, de sus siglas en inglés *Unfolded Protein Response*), la cual intenta reparar el daño deteniendo la traducción de proteínas y activando la producción de enzimas chaperonas encargadas del plegamiento de las proteínas. De no ser posible, provoca la muerte de la célula por apoptosis<sup>[246]</sup>. En cambio, en las células tumorales el estrés promueve la proliferación de esas células y por tanto la progresión de tumores<sup>[244]</sup>.



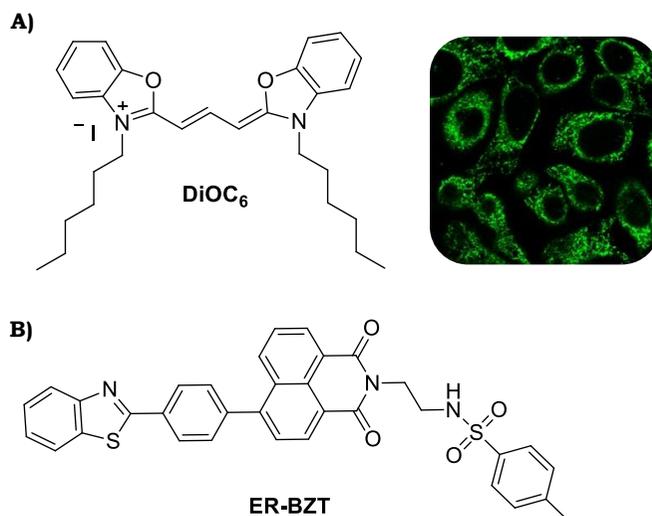
**Figura II.11.** Respuesta del retículo endoplasmático ante una situación de estrés del retículo. **A)** En células normales y **B)** En células tumorales.

Los modelos de QSAR predicen que en el retículo endoplasmático principalmente se localizarán pequeñas moléculas anfifílicas y lipófilas con valores de  $\log P$  de entre 0 y 6 y  $Z > 0$ <sup>[206]</sup>. El carácter anfifílico permite el paso a través de la bicapa lipídica de la membrana del retículo endoplasmático y el carácter lipófilo permite la captación de la sonda por difusión pasiva a través de dicha membrana<sup>[214]</sup>. Al hilo de ello, las cadenas alifáticas largas y la *p*-toluensulfonamida se han establecido como buenos grupos directores al retículo endoplasmático, los cuales se muestran en la **Figura II.12**<sup>[198]</sup>.



**Figura II.12.** Grupos directores que favorecen la localización en el retículo endoplasmático. **A)** Cadenas alifáticas largas y **B)** *p*-toluensulfonamida.

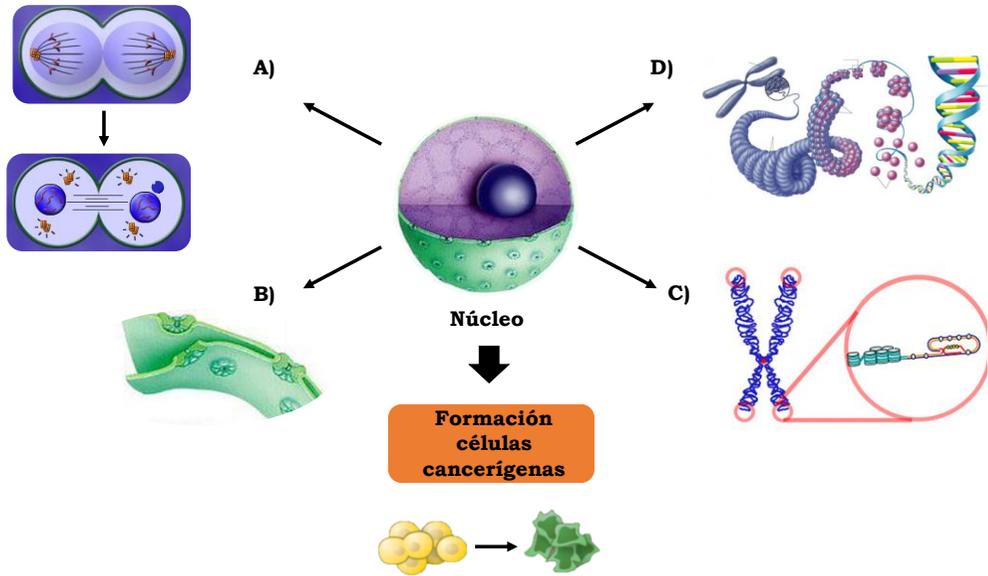
Un ejemplo de este tipo de colorantes ampliamente utilizado desde hace años es el yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>), cuya estructura se muestra en la **Figura II.13 A)**<sup>[198],[247]</sup>. A su vez, otro colorante estudiado más recientemente es el denominado ER-BZT constituido por 1,8-naftalimida como fluoróforo, *p*-toluensulfonamida como grupo director y una subunidad específica para medir iones superóxido en este orgánulo (**Figura II.13 B)**). Se trata de una sonda de gran interés ya que la medida de iones superóxido es muy útil a causa de su implicación en la respuesta de estrés generada por el retículo endoplasmático<sup>[248]</sup>. Entre las propiedades fotofísicas de DiOC<sub>6</sub> destaca que se utiliza en la región espectral del verde, excitándose a 484 nm y emitiendo a 501 nm. Una de las desventajas de dicha sonda es su alta toxicidad. Por otro lado, ER-BZT es un colorante que emite a 450 nm y responde linealmente a la concentración de iones superóxido en el medio en un rango de 0.1-15  $\mu\text{M}$ .



**Figura II.13.** Colorantes lipófilos dirigidos al retículo endoplasmático. **A)** DiOC<sub>6</sub> y **B)** ER-BZT.

### II.1.1.5. Colorantes dirigidos al núcleo

El núcleo es el compartimento celular de mayor importancia en las células eucariotas ya que contiene la mayor parte de la información genética celular en forma de ADN y ARN. Está constituido por una envoltura nuclear formada por dos membranas con poros en su superficie separadas entre sí por un espacio intermembrana, la matriz nuclear y el nucléolo. Está implicado en procesos de regulación génica<sup>[216]</sup> de manera que cualquier fallo puede desencadenar multitud de patologías, incluidas la proliferación descontrolada de las células e inhibición de los mecanismos de apoptosis y por tanto la formación de células cancerígenas. Algunos de estos posibles fallos son alteraciones en la forma del núcleo que entre otras razones sucede por una división celular inadecuada<sup>[249]</sup> (**Figura II.14 A**), alteraciones en la envoltura nuclear<sup>[250]</sup> (**Figura II.14 B**), errores en la actividad telomerasa evitando el acortamiento progresivo de los telómeros<sup>[154]</sup> (**Figura II.14 C**) o mutaciones en el ADN<sup>[251]</sup> (**Figura II.14 D**).



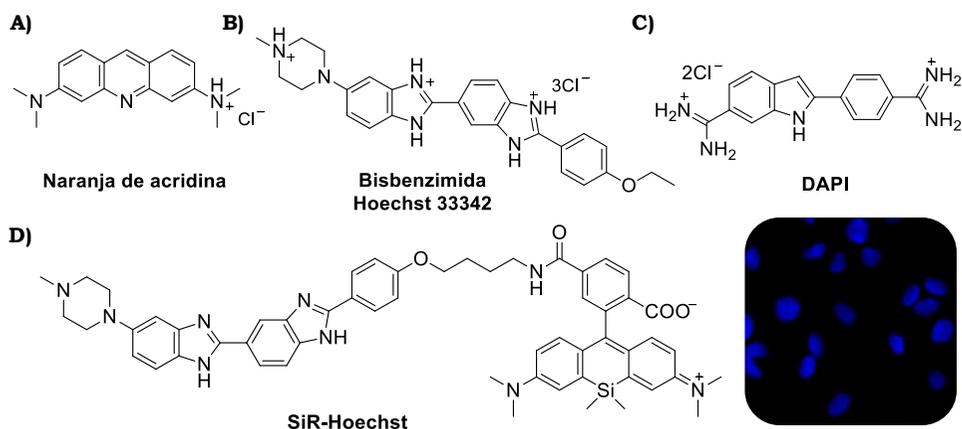
**Figura II.14.** Alteraciones en el núcleo que producen células cancerígenas. **A)** En la forma del núcleo, **B)** En la envoltura nuclear, **C)** Errores en la actividad telomerasa y **D)** Mutaciones en el ADN.

Según los modelos QSAR, existen dos tipos de colorantes que pueden marcar el núcleo celular: los catiónicos moderadamente hidrófilos o los aniones lipófilos. Los cationes hidrófilos se caracterizan por poseer valores de lipofilidad, medida mediante el  $\log P$  entre  $-4$  y  $0$ , estar cargados positivamente ( $Z > 0$ ) y presentar un  $pK_a > 10$  o mantenerse en su forma catiónica. Por su parte, los aniones lipófilos, a diferencia de los cationes, presentan un  $\log P$  (de la forma neutra) de  $0$  a  $8$  y una carga  $Z < 0$ <sup>[206],[215]</sup>.

En un principio, debido a la carga negativa de los grupos fosfatos del ADN, se pensó que preferentemente los colorantes que atraviesan la membrana nuclear y se acumulan en el núcleo etiquetando esta macromolécula, deberían ser compuestos que contuvieran restos catiónicos. Sin embargo, la presencia de estos cationes con un carácter moderadamente hidrófilo, dificulta su paso a través de la envoltura nuclear. En realidad, tiene lugar un equilibrio entre la base libre moderadamente lipófila y el catión hidrófilo, de manera que la base atraviesa fácilmente la membrana nuclear y, una vez en el interior, el equilibrio se desplaza hacia la forma catiónica con

carga positiva y se ve favorecida la interacción entre las cargas del colorante y las de los grupos fosfatos del ADN<sup>[215]</sup>.

En este sentido, a lo largo de los años han sido muchos los colorantes utilizados para marcaje del núcleo de las células<sup>[192],[198],[215],[227]</sup>. Algunos de los colorantes catiónicos más empleados desde hace años son el naranja de acridina (**Figura II.15 A**), bisbenzimidaz de Hoechst (denominadas con un número según los sustituyentes), cuya estructura se muestra en la **Figura II.15 B**) y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se muestra en la **Figura II.15 C**), cada uno de ellos con log P de -0.2, -4.5 y -2.8, respectivamente. Sin embargo, tanto la bisbenzimidaz de Hoechst como el colorante DAPI, a la hora de ser utilizados se excitan en la región del UV a longitudes de onda de en torno a 350 nm, lo cual puede provocar daño celular a lo largo del tiempo<sup>[192],[227]</sup>(**Figura II.15**).



**Figura II.15.** Colorantes dirigidos al núcleo. **A)** Naranja de acridina, **B)** Bisbenzimidazida Hoechst 33342, **C)** DAPI y **D)** SiR-Hoechst.

Debido a la posibilidad de generar daño celular, una alternativa propuesta es la síntesis de sondas mediante la combinación de los colorantes tipo Hoechst con otras estructuras capaces de desplazar la emisión al infrarrojo cercano y mejorar algunas de sus propiedades. Un ejemplo es la sonda que se muestra en la **Figura II.15 D**) denominada SiR-Hoechst, la cual está formada por la combinación de la bisbenzimidaz de Hoechst 33342 anterior y una rodamina siliada. Esta modificación permite su uso en la

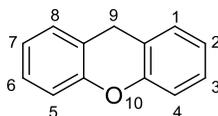
región del IR cercano como consecuencia de un cambio de sus propiedades fotofísicas. SiR-Hoechst se excita a 652 nm y tiene un máximo de emisión a 672 nm, posee un rendimiento cuántico algo inferior de 0.17 y un coeficiente de extinción molar superior de 100000<sup>[252]</sup>.

### II.1.2. Alternativa a la utilización de colorantes con restos cargados

Como se ha visto a lo largo de los *Antecedentes*, la mayoría de los colorantes utilizados para el marcaje de diferentes orgánulos y compartimentos celulares son compuestos cargados, con restos catiónicos o aniónicos. En cambio, la síntesis de dichos compuestos orgánicos cargados puede ser compleja ya que su purificación y aislamiento pueden resultar muy tediosos al presentar especial afinidad por medios acuosos. Además, los colorantes catiónicos utilizados para marcar orgánulos como mitocondrias pueden ocasionar una reducción del potencial de membrana de las mismas. Asimismo, las aminas catiónicas empleadas para marcar lisosomas suelen ser estructuras tóxicas para la célula ya que provocan la alcalinización del microambiente de los lisosomas y por tanto pueden influir en la actividad lisosomal<sup>[198]</sup>. Así pues, una alternativa podría ser la utilización de restos neutros como grupos directores, utilizando fluoróforos comunes con buenas propiedades fotofísicas como los xantenos y las acridonas.

### II.1.3. Sondas fluorescentes con estructura xanténica

Los xantenos son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos, constituidos por tres anillos aromáticos fusionados con un oxígeno en posición 10, como se observa en la **Figura II.16**, que forman el esqueleto base de muchas sondas fluorescentes<sup>[253]</sup>.



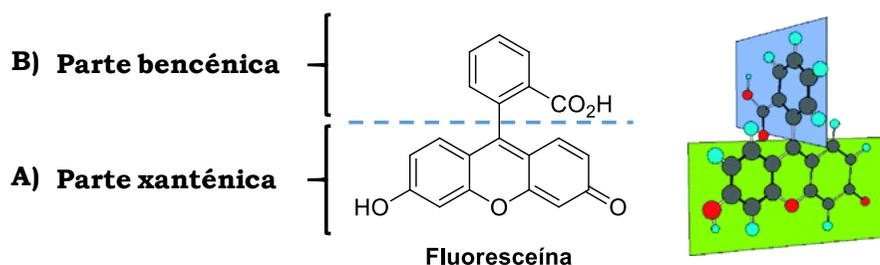
**Figura II.16.** Estructura de 9H-xanteno.

Existe una gran variedad de colorantes fluorescentes basados en la estructura xanténica. La fluoresceína, que fue descubierta en el siglo XIX<sup>[254]</sup>,

es la sonda fluorescente con esqueleto xanténico más utilizada hasta el momento debido a sus óptimas propiedades fotofísicas. Además, se han sintetizado muchos derivados con diversas modificaciones estructurales con objeto de mejorar sus propiedades, lo que ha hecho que la familia de derivados de la fluoresceína sea una de las más ricas y extensas.

### II.1.3.1. Fluoresceína

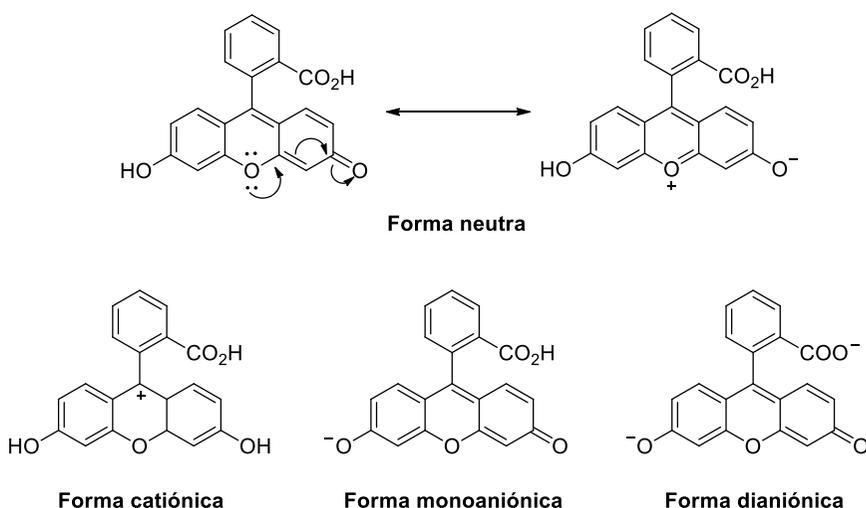
Este colorante fue sintetizado por primera vez por Von Bayer en 1871 mediante condensación de resorcinol con anhídrido ftálico catalizado por cloruro de zinc<sup>[255]</sup>. Está constituido por una parte xanténica (6-hidroxi-3H-xanten-3-ona) y una bencénica que se sitúan en posición ortogonal entre sí, como se muestra en la **Figura II.17**.



**Figura II.17.** Partes de la fluoresceína y disposición ortogonal. **A)** Parte xanténica y **B)** Parte bencénica.

La fluoresceína presenta su máximo de absorción en la región del verde del espectro, en torno a 490 nm, y un máximo de emisión a 514 nm. Posee un rendimiento cuántico muy elevado, alrededor de 0.92 a pH superior a 8, un coeficiente de absortividad molar de  $90000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , un  $\text{pK}_a$  en torno a 6.5 y es muy soluble en agua<sup>[256]</sup>. Además, se caracteriza por un tiempo de vida corto de entre 3-4 ns que varía en función del pH<sup>[257]</sup>. A pesar de sus numerosas cualidades, se trata de un colorante que es sensible a variaciones de pH<sup>[258]</sup>. En disolución acuosa, en función del valor del pH del medio, se puede encontrar en una de sus cuatro formas prototrópicas que se muestran en la **Figura II.18**, su forma catiónica, neutra, monoaniónica o dianiónica<sup>[259]</sup>, cada una de ellas con propiedades fotofísicas muy distintas. En el intervalo de pH alrededor del fisiológico,

entre 6 y 10, existe un equilibrio entre la forma monoaniónica y dianiónica<sup>[257]</sup>.



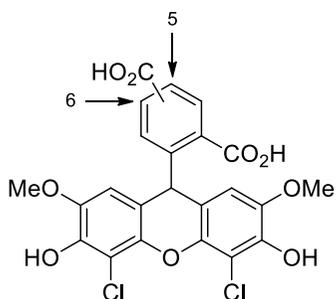
**Figura II.18.** Formas prototrópicas de la fluoresceína.

Entre sus principales inconvenientes se encuentran su rápida pérdida de intensidad de fluorescencia a lo que se denomina fotoblanqueo<sup>[260]</sup> y que su permeabilidad a través de las membranas celulares es limitada<sup>[256]</sup>.

En lo que respecta a sus aplicaciones, la fluoresceína se ha utilizado principalmente como sonda fluorescente<sup>[197]</sup> y como compuesto de etiquetado fluorescente de ADN<sup>[261]</sup>, en la detección de la hibridación de ADN<sup>[262],[263]</sup>. Es por ello que, debido a su interesante uso, se han ido sintetizando gran variedad de derivados de este compuesto a lo largo de los años con la finalidad de mejorar sus propiedades y buscar nuevas aplicaciones. A continuación, se van a mencionar algunos de los derivados más representativos, como los derivados halogenados, los Tokyo Green, los Pennsylvania Green, los Tokyo Magenta o los alquilxantenos. Debido a la amplia utilización de estos fluoróforos, sus aplicaciones son muy diversas<sup>[197]</sup>. Se han utilizado para detectar iones metálicos<sup>[264],[265]</sup>, óxido nítrico<sup>[266]</sup>, oxígeno<sup>[267],[268]</sup> y tioles<sup>[269]</sup>, así como para marcar orgánulos celulares<sup>[270]</sup>.

### II.1.3.2. Derivados halogenados

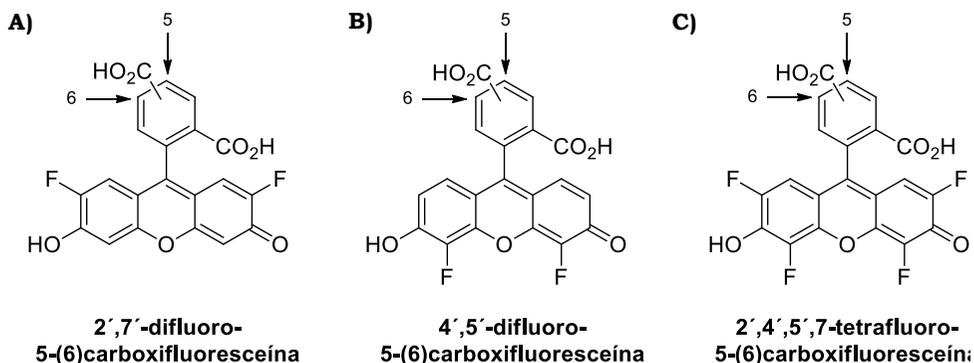
Una de las primeras estrategias para la síntesis de derivados de la fluoresceína fue la incorporación de halógenos en la estructura. En este sentido, en 1982 fue patentada por Khanna y Ullman la síntesis del primer derivado halogenado denominado 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-5-(6)carboxifluoresceína. Dicha síntesis fue modificada décadas más tarde por Tsybulsky, mejorando el rendimiento de un 4 a un 40 %. A su vez, en comparación con la fluoresceína original, se determinó que este colorante halogenado posee un máximo de absorbancia a 525 nm y un máximo de emisión a 550 nm, consiguiéndose un considerable desplazamiento hacia el rojo<sup>[271]</sup>. En cuanto a sus aplicaciones ha sido utilizado como marcador fluorescente en la secuenciación del ADN<sup>[272]</sup> y sonda para la detección de ARNm<sup>[273]</sup>, entre otras.



**4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-  
5-(6)carboxifluoresceína**

**Figura II.19.** Derivado clorado de la fluoresceína.

Años más tarde, en 1997, se sintetizaron fluoresceínas fluoradas denominadas colorantes Oregon Green. Dicha síntesis se llevó a cabo mediante la reacción de los respectivos fluororesorcinoles con anhídrido ftálico dando lugar a derivados como el 2',7'-difluoro-5-(6)carboxifluoresceína, el 4',5'-difluoro-5-(6)carboxifluoresceína o el 2',4',5',7'-5-(6)carboxitetrafluorofluoresceína (**Figura II.20**), entre otros<sup>[256]</sup>.



**Figura II.20.** Algunos derivados halogenados de la fluoresceína.

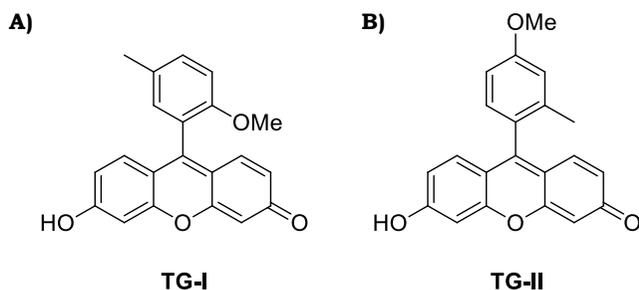
Las propiedades fotofísicas de este tipo de derivados xanténicos variaron en gran medida en función del número y posición de los átomos de flúor en la estructura. Por tanto, se analizó la influencia de la incorporación de flúor en las propiedades de estos compuestos, determinando que principalmente ocasionan una disminución del  $pK_a$  de las moléculas, mejorando la fluorescencia a pH bajo y aumentando su resistencia a la fotodecoloración<sup>[256]</sup>.

Por otro lado, uno de los derivados fluorados más estudiados a lo largo de los años es la 2',7'-difluorofluoresceína, la cual se ha comercializado a través del nombre registrado Oregon Green 488<sup>[274]</sup>. Este colorante presenta un máximo de absorción a 490 nm y un máximo de emisión a 514 nm, un  $pK_a$  de 4.8 y un rendimiento cuántico muy elevado de 0.97 a pH 9<sup>[219],[275]</sup>.

### II.1.3.3. Derivados Tokyo Green

En 2005, Urano *et al.* obtuvieron varios derivados de la fluoresceína, denominados Tokyo Green, reemplazando el grupo carboxílico del anillo aromático presente en la posición 9 por grupos metoxilo y metilo. Estos colorantes se sintetizaron mediante un acoplamiento de Grignard entre bromuros de arilo sustituidos y xantonas, obteniéndose un único isómero con rendimientos elevados. En este sentido, de todos los derivados sintetizados, los que resaltaron por sus propiedades fotofísicas similares a las de la fluoresceína fueron el 2-metoxi-5-metil Tokyo Green (TG-I) y el 2-metil-4-metoxi Tokyo Green (TG-II), cuyas estructuras aparecen en la **Figura II.21**

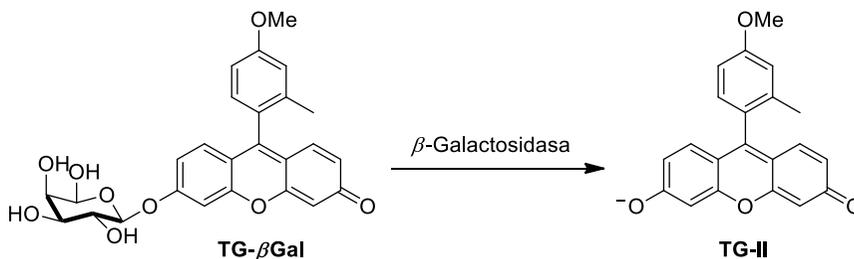
**A)** y **B)**. Por su parte TG-I, se caracterizó por presentar un máximo de excitación a 494 nm, un máximo de emisión a 514 nm y un rendimiento cuántico de 0.50 a pH 13. TG-II presentó una longitud de onda máxima de excitación de 492 nm, una longitud de onda máxima de emisión de 509 nm y un rendimiento cuántico de 0.84 a pH 13<sup>[276]</sup>.



**Figura II.21.** Derivados de la fluoresceína Tokyo Green. **A)** TG-I y **B)** TG-II.

El estudio de las propiedades fotofísicas de estos fluoróforos, en los que se había sustituido el ácido carboxílico de la parte bencénica, corroboró que las cualidades de estos colorantes no se deben a este grupo sino que su única función es mantener ambas partes de la fluoresceína en posición ortogonal<sup>[276]</sup>.

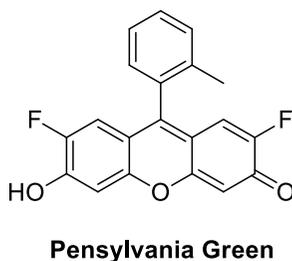
Por otro lado, en cuanto a sus aplicaciones, se desarrolló una sonda fluorescente denominada TG- $\beta$ Gal utilizando el TG-II con el fin de detectar  $\beta$ -galactosidasa, uno de los marcadores de expresión génica más utilizados. A continuación, en la **Figura II.22** se muestra la reacción del TG- $\beta$ Gal no fluorescente con la  $\beta$ -Galactosidasa presente en el medio que produce su detección mediante la liberación del compuesto TG-II altamente fluorescente<sup>[276]</sup>.



**Figura II.22.** Detección de β-Galactosidasa con el derivado TG-βGal.

#### II.1.3.4. Derivados Pennsylvania Green

En 2006 Mottram *et al.* sintetizaron nuevos derivados mediante la combinación de las secciones bencílicas de los Tokyo Green con la fluoración del xanteno propia del Oregon Green. A estos nuevos compuestos los denominaron derivados Pennsylvania Green<sup>[219]</sup>. En la **Figura II.23**, puede verse la estructura más sencilla de la familia de los derivados Pennsylvania Green cuyas propiedades fotofísicas son similares a la de sus precursores. El Pennsylvania Green se caracterizó por presentar un máximo de absorción a 494 nm y un máximo de emisión a 514 nm y un rendimiento cuántico de 0.91 medido a pH neutro<sup>[277]</sup>.

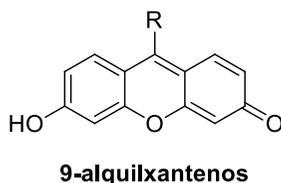


**Figura II.23.** Derivado de la fluoresceína Pennsylvania Green.

En relación a su aplicación, se hizo un estudio de su efectividad como marcador de la membrana plasmática celular de uno de los derivados del Pennsylvania Green mostrado previamente en la *Apartado II.1.1.1.*<sup>[219]</sup>.

### II.1.3.5. 9-alquilxantenos

En 2012 se sintetizaron derivados de la fluoresceína en los que la parte bencénica fue sustituida por un cadena alquílica dando lugar a los denominados 9-alquilxantenos<sup>[278]</sup>.

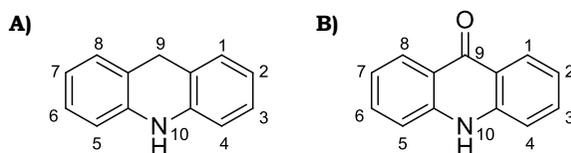


**Figura II.24.** Derivados 9-alquilxantenos.

Se han sintetizado gran variedad de derivados de este tipo siendo el más sencillo el que presenta un grupo metilo en posición 9. Asimismo, otros restos alquílicos que se incorporaron fueron el etilo, butilo e isopropilo entre otros, todos ellos con propiedades fotofísicas muy variables. En general sus formas aniónicas presentaron máximos de excitación en torno a 480-490 nm y máximos de emisión de 500-515 nm<sup>[279]</sup>.

### II.1.4. Sondas fluorescentes con estructura de acridona

Las acridonas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos derivados de las acridinas. Como se puede ver en la **Figura II.25 B)**, el esqueleto de las acridonas está constituido por tres anillos aromáticos fusionados formando un sistema cromofórico tricíclico con geometría plana. En el anillo central presenta un grupo carbonilo en posición 9, el cual como se observa en la **Figura II.25 A)** está ausente en las acridinas y un nitrógeno en posición 10, por lo que al esqueleto base se le nombra como *10H*-acridin-9-ona<sup>[253]</sup>.

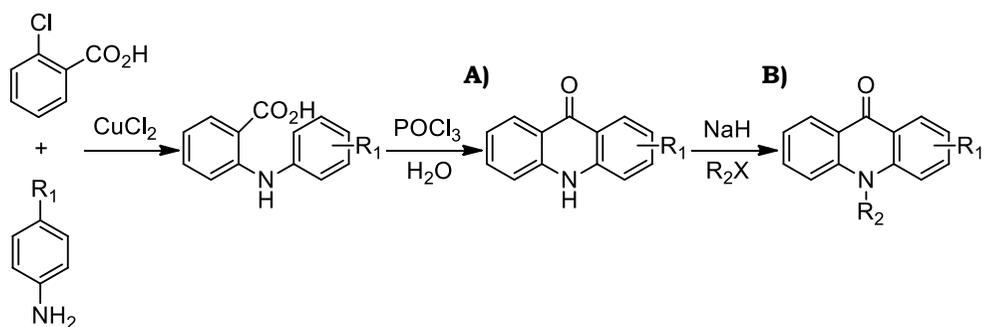


**Figura II.25. A)** Estructura de las acridinas y **B)** Estructura de las acridonas.

A lo largo de los años, se han sintetizado multitud de derivados de las acridonas, como se verá a continuación, obtenidos a través de la introducción de uno o varios sustituyentes en los anillos aromáticos de la estructura o bien en el nitrógeno situado en posición 10.

#### II.1.4.1. Acridonas sustituidas

Existen en bibliografía distintas acridonas sustituidas las cuales, en función de sus sustituyentes, presentan propiedades fotofísicas variadas<sup>[194]</sup>. Generalmente, como se observa en el **Esquema II.1**, se preparan mediante la realización de la condensación de Goldberg en la que se produce un acoplamiento del ácido 2-clorobenzoico con la correspondiente anilina sustituida en presencia de  $\text{CuCl}_2$ , seguido de un cierre del anillo central en condiciones ácidas, generándose la estructura base de la acridona sustituida en determinadas posiciones de los anillos bencénicos<sup>[280]</sup>. A su vez, en el caso de los derivados sustituidos en el nitrógeno tras este procedimiento es necesario llevar a cabo una reacción de alquilación. Esto puede llevarse a cabo mediante tratamiento de la acridona con agentes básicos fuertes como el hidruro sódico<sup>[281]</sup>.



**Esquema II.1.** Esquema sintético de derivados de acridonas<sup>[194]</sup>. **A)** Sustituidas en posiciones bencénicas y **B)** Sustituidas en el N en posición 10.

Se trata de fluoróforos cuyas propiedades fotofísicas más destacadas son la presencia de tiempos de vida largos, superiores a 10 ns, que son independientes a variaciones de pH y su alta resistencia a la fotodecoloración. A su vez, presentan máximos de absorción en torno a 390-410 nm y una emisión de fluorescencia en el rango de 420-500 nm<sup>[194]</sup>. Sin embargo, a pesar

de conocer ciertas propiedades de este tipo de derivados son pocos los estudios fotofísicos realizados en solución hasta el momento<sup>[282]</sup>.

En cuanto a sus aplicaciones hasta la fecha los derivados de las acridonas, debido a su naturaleza planar, heterocíclica e hidrofílica, interactúan muy bien con ciertas dianas moleculares lo que ha derivado en su uso para la detección de secuencias de ADN<sup>[283]</sup> y como fármacos con actividad antiproliferativa y antitumoral<sup>[284],[285],[286]</sup> o actividad antimicrobiana<sup>[287]</sup>.

## II.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se puede ver en los *Antecedentes*, la gran mayoría de sondas fluorescentes que permiten localizar distintos orgánulos celulares presentan restos cargados, lo que dificulta su obtención y además su uso presenta otras desventajas relacionadas con la modificación de alguna de las propiedades de dichos orgánulos. Por ello, la síntesis de nuevos derivados xanténicos y acridonas con restos neutros, capaces de marcar e incorporarse en diferentes orgánulos celulares, sería de gran utilidad. A su vez, dichos compuestos en el futuro, podrían ser utilizados como transportadores de fármacos de forma específica a los distintos orgánulos de las células.

Basados en esta hipótesis, los objetivos que se plantean en este capítulo son los siguientes:

1. Sintetizar y caracterizar diferentes derivados xanténicos con restos neutros que son sensibles a cambios de pH en el medio.
2. Sintetizar y caracterizar una variedad de acridonas con restos neutros que se caracterizan por presentar tiempos de vida largos.
3. Realizar las medidas fotofísicas de los compuestos sintetizados: espectros de absorción, excitación y emisión y cálculo de rendimientos cuánticos y valores de tiempo de vida.
4. Estudiar su localización en distintos orgánulos mediante microscopía confocal de fluorescencia.

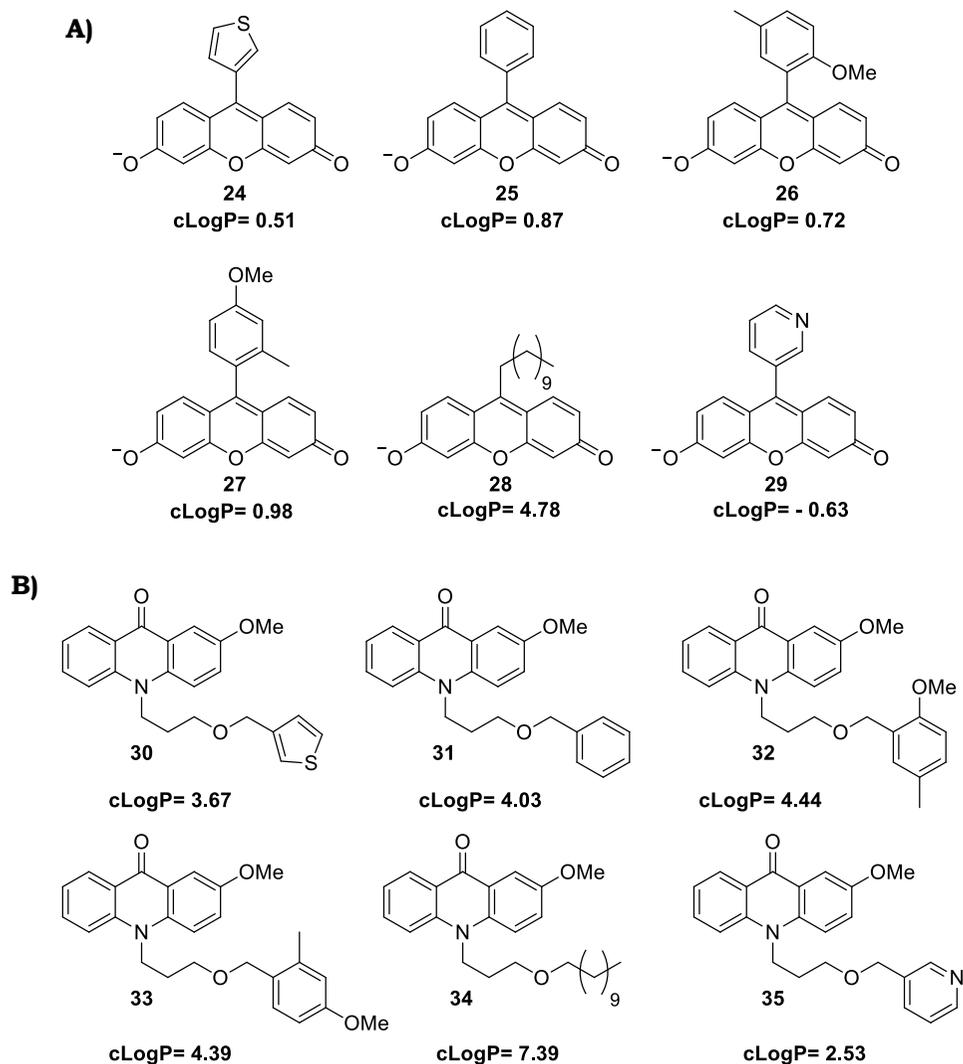
## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. Síntesis y caracterización de derivados xanténicos y acridonas

La selección de este tipo de derivados xanténicos y acridonas como posibles marcadores y transportadores de fármacos a orgánulos celulares, se debe a varias razones como se ha mencionado previamente en los *Antecedentes*. Entre ellas, debido a sus óptimas propiedades fotofísicas, a la experiencia previa que posee el grupo de investigación en la obtención de este tipo de estructuras y a su amplio uso como sondas fluorescentes.

En este sentido, se diseñaron distintas sondas equivalentes para ambas familias de colorantes con los mismos restos neutros en su estructura. Los restos que se incorporaron fueron: el 3-tiofeno, un resto heteroarómico que aporta lipofilia, un grupo bencilo que se seleccionó como referencia, grupos bencilos sustituidos (4-metilanol y 3-metilanol) debido a sus buenas propiedades fluorescentes, una cadena de hidrocarbonada lipofila de 11 carbonos porque podría dirigirse a la membrana plasmática tal y como está descrito<sup>[191]</sup> y la 3-piridina, un resto heteroarómico con clogP que podrían indicar su orientación a lisosomas. A su vez, estos fueron seleccionados porque al diseñar las distintas posibles sondas y calcular de forma aproximada su grado de lipofilia mediante el parámetro clogP, los valores fueron bastante diferentes (**Figura II.26 A) y B)**) lo que sugirió que cada una de ellas podría servir para marcar distintos orgánulos. La manera de obtención de este parámetro se encuentra de forma desarrollada en la *Parte Experimental del Bloque B. Capítulo II*. Según el criterio de los modelos QSAR<sup>[206]</sup> mostrados en los *Antecedentes* se pensó que probablemente todos derivados xanténicos excepto el **29** se dirigirían a mitocondrias o al núcleo celular. Esto es debido a que son ácidos débiles que presentan valores de clogP entre 0 y 5 y valores de pK<sub>a</sub> en torno a 7 ± 3. En cambio, **29** al caracterizarse por un clog P negativo debido a su mayor solubilidad en agua gracias al grupo piridina, se determinó que podría orientarse a lisosomas. Por su parte todas las acridonas excepto **34**, por sus valores de clog P, se pensó que podrían dirigirse al núcleo celular ya que son compuestos neutros que poseen valores de grado de lipofilia entre 0 y 5. La acridona **34** con un valor

de clogP en torno a 8 y debido a su posible carácter anfílico con una cadena apolar de 11 carbonos se determinó que podría dirigirse a la membrana plasmática.

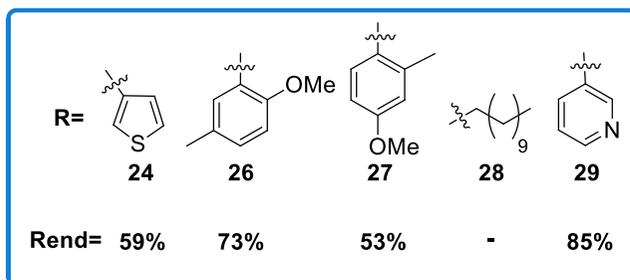
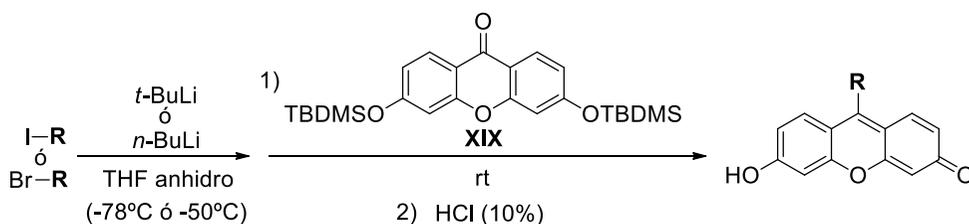


**Figura II.26.** Valores de clogP calculado de las diferentes sondas diseñadas. **A)** Derivados xanténicos de **24-29** y **B)** Acridonas sustituidas de **30-35**.

### II.3.1.1. Síntesis de los derivados xanténicos 24-29

Una vez determinadas las estructuras objetivo, para la obtención de los derivados xanténicos, se siguió una estrategia sintética previamente descrita

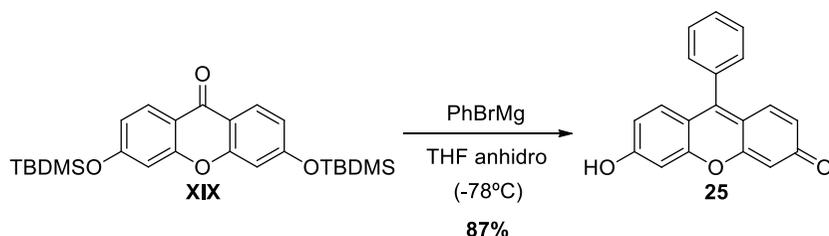
por nuestro grupo de investigación, que consiste en la adición nucleofílica del correspondiente compuesto organometálico sobre una xantona seguida de una reacción de deshidratación<sup>[288]</sup>. Como se observa en el **Esquema II.2**, todos los compuestos sintetizados tienen como precursor común la xantona **XIX**, que fue obtenida a partir de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona comercial. Para llevar a cabo la funcionalización de la misma con los diferentes sustituyentes se realizó la síntesis de precursores organolíticos generados por tratamiento de distintos haluros de arilo comerciales con *t*-BuLi a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (o bien *n*-BuLi a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el caso de derivado **29**). A continuación, una vez generado los organolíticos, se realizó la adición nucleofílica a la cetona **XIX** de cada uno de estos precursores, seguida de una reacción de deshidratación en medio ácido con HCl al 10 %, dando lugar a los diferentes derivados xanténicos **24**, **26**, **27**, **28** y **29**.



**Esquema II.2.** Esquema sintético general para la obtención de los diferentes derivados xanténicos **24-29** y valores de los rendimientos obtenidos en la síntesis de cada uno de ellos.

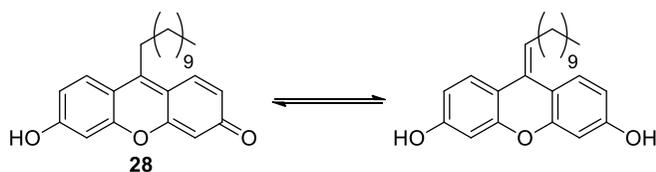
Únicamente en el caso del xanteno **25** al que se le incorporó como sustituyente un anillo bencénico se utilizó una estrategia sintética diferente, la cual se muestra en el **Esquema II.3**. En este caso se adicionó el bromuro

de fenil magnesio comercial a la cetona **XIX** a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  obteniéndose **25** con un rendimiento del 87 %.



**Esquema II.3.** Síntesis del derivado xanténico **25**.

Tras la síntesis de cada uno de los derivados, estos se caracterizaron a excepción de los xantenos **28** y **29**. En el caso del xanteno **28** al analizar los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de varias pruebas de la reacción y observar que las señales de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de una misma prueba variaban al repetirlo en distintas ocasiones, se llegó a la conclusión de que se obtenían dos especies tautoméricas en equilibrio, tal y como se muestra en el **Esquema II.4**.

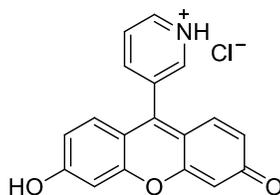


**Esquema II.4.** Especies tautoméricas obtenidas al sintetizar **28**.

Por tanto, no pudo caracterizarse y al no conocer la cantidad real del derivado **28** en la muestra, al existir una mezcla de tautómeros, tampoco pudo ser probada en células posteriormente.

En el caso del xanteno **29** tras analizar el RMN de  $^1\text{H}$  y un espectro de masas, se llegó a la conclusión de que se había obtenido la sal de piridinio (**Figura II.27**) la cual no fue posible caracterizar debido a su baja solubilidad en la mayoría de los disolventes deuterados. Únicamente se solubilizó en  $\text{DMSO-}d_6$ , pero aun así las señales no se obtuvieron bien definidas. Sin

embargo, esto no impidió que pudiesen caracterizarse sus propiedades de absorción y emisión y probarse dicha sonda en células.

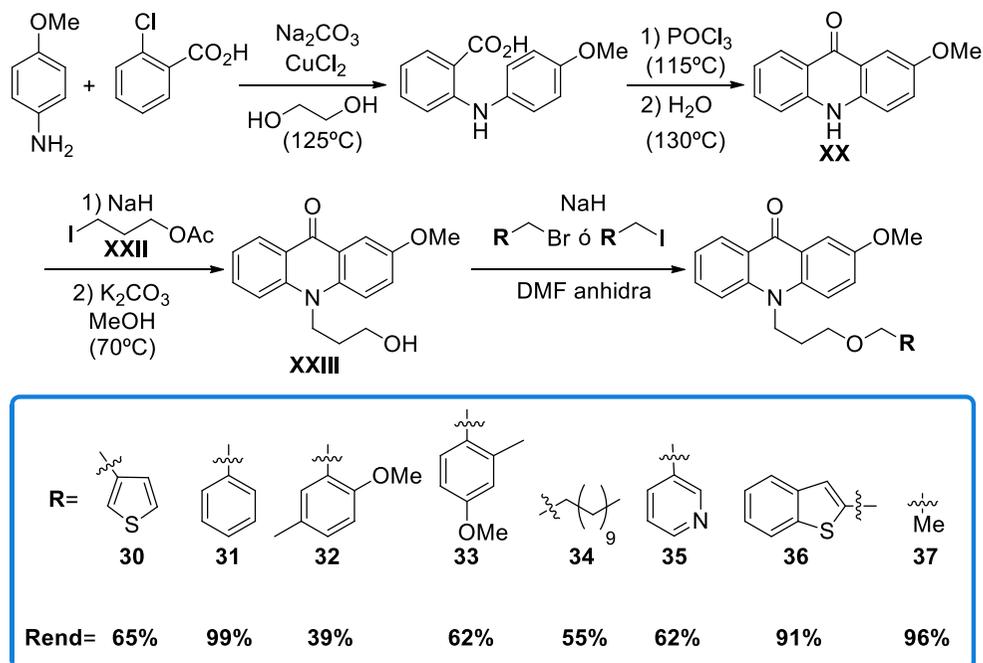


**Figura II.27.** Sal de piridinio de la estructura **29**.

### II.3.1.2. Síntesis de las acridonas 30-37

Por su parte, para la síntesis de las distintas acridonas la estrategia sintética consta de 4 pasos. Primero, se realizó un acoplamiento del ácido 2-clorobenzoico con 4-metoxianilina en presencia de  $\text{CuCl}_2$ . Tras ello, el producto de la reacción se trató con cloruro de fosforilo seguido de un tratamiento en medio acuoso en el que tiene lugar el cierre del anillo central, generándose la estructura base de la acridona **XX**. El nitrógeno de esta estructura posteriormente se alquiló mediante una reacción con el haluro de alquilo **XXII** tras desprotonar el N con hidruro sódico, que a su vez hidrolizó el grupo acetato obteniéndose directamente **XXIII**. Finalmente, la funcionalización de la acridona con distintos sustituyentes se llevó a cabo mediante reacciones de tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  con distintos haluros alquílicos o bencílicos, tal cual se muestra en el **Esquema II.5**.

En este caso, además de introducir todos los grupos funcionales anteriormente empleados en los xantenos, se sintetizaron una acridona con un 2-benzotiofeno (**36**) y otra con un grupo metilo (**37**). Estos compuestos están siendo utilizados para estudios cinéticos y de FLIM por otros miembros del grupo de investigación<sup>[282]</sup>.

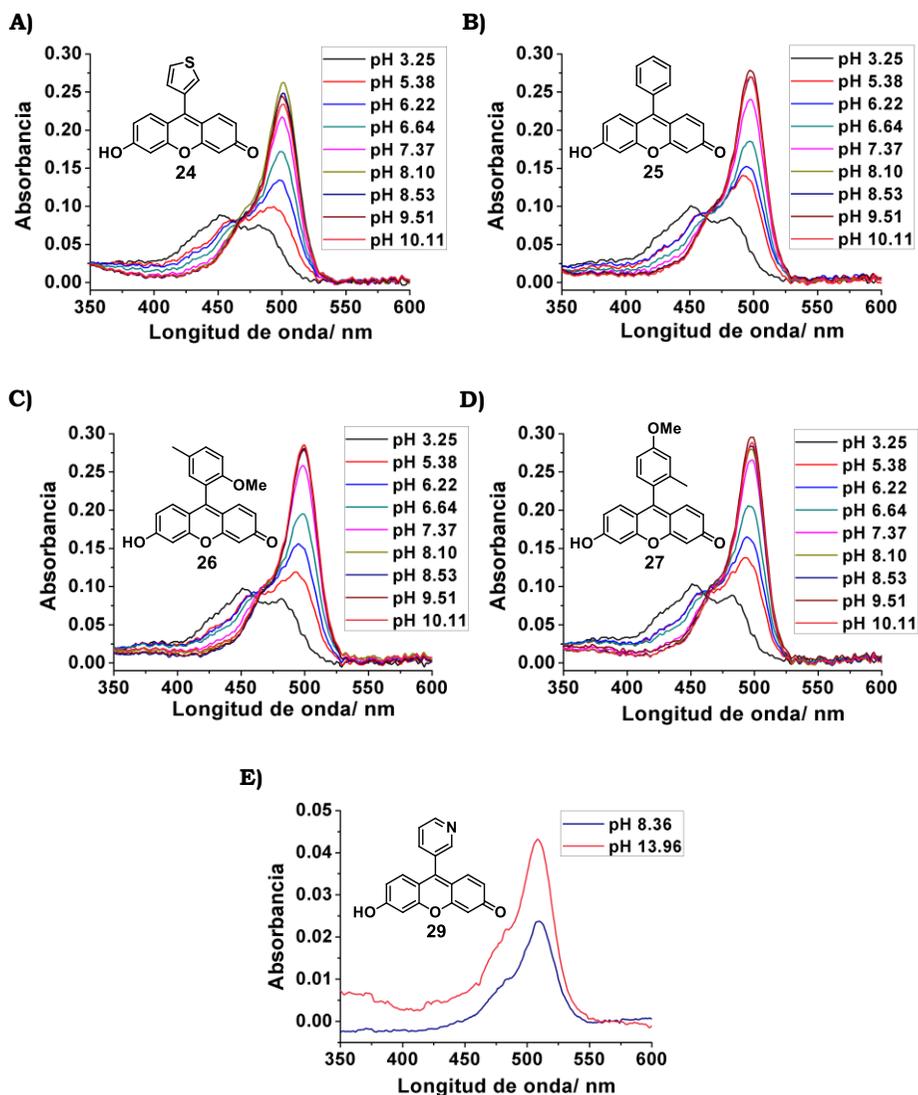


**Esquema II.5.** Esquema sintético general para la obtención de las diferentes acridonas propuestas **30-37** y valores de los rendimientos obtenidos en la síntesis de cada uno de ellos.

### II.3.2. Medidas fotofísicas

Una vez se sintetizaron los compuestos y se caracterizaron mediante RMN y espectrometría de masas, se determinaron sus propiedades fotofísicas. Para ello se midieron sus espectros tanto de absorción, excitación y emisión en disolución acuosa a diferentes valores de pH con el objetivo de estudiar los cambios ocasionados ante variaciones de dicho parámetro.

Por un lado, en el caso del estudio realizado de los derivados xanténicos **24-29**, la absorción se midió a concentraciones de  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M (excepto **29**, a  $3.2 \cdot 10^{-5}$  M) y las medidas de fluorescencia a  $1 \cdot 10^{-6}$  M (excepto **29**, que se midió a  $1.35 \cdot 10^{-5}$  M). Las concentraciones utilizadas para medir el xanteno **29** fueron superiores debido a que de lo contrario las señales eran muy bajas y los espectros obtenidos no eran aceptables. En la **Figura II.28** se muestran los espectros obtenidos de cada uno de los xantenos a nueve valores de pH dentro de un rango de 3-13, escogido en base a estudios previos<sup>[257],[275]</sup>.

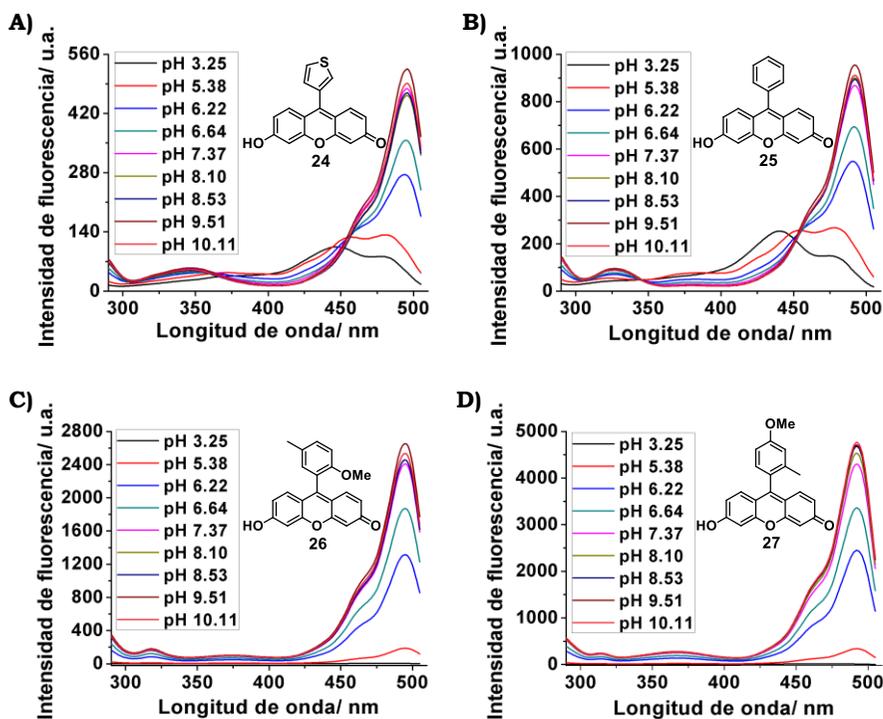


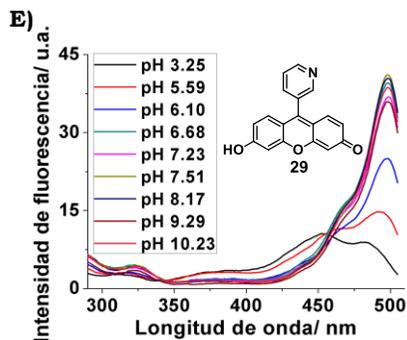
**Figura II.28.** Espectros de absorción de los distintos derivados xanténicos. **A), B), C) y D)** Representación gráfica de la absorción frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3-10 de cada uno de los derivados **24, 25, 26 y 27**, respectivamente. **E)** Representación gráfica de absorción frente a longitud de onda a pH 8.36 y 13.96 del derivado **29**.

En cuanto a los espectros de absorción de forma general se apreció que a valores de pH más ácidos existían dos máximos de absorción (en torno a 451 y 492 nm) correspondientes a la especie neutra y que conforme se incrementaron los valores de pH se observó un único máximo de absorción a

una longitud de onda en torno a 497-510 nm correspondiente a la especie aniónica (**Figura II.28**).

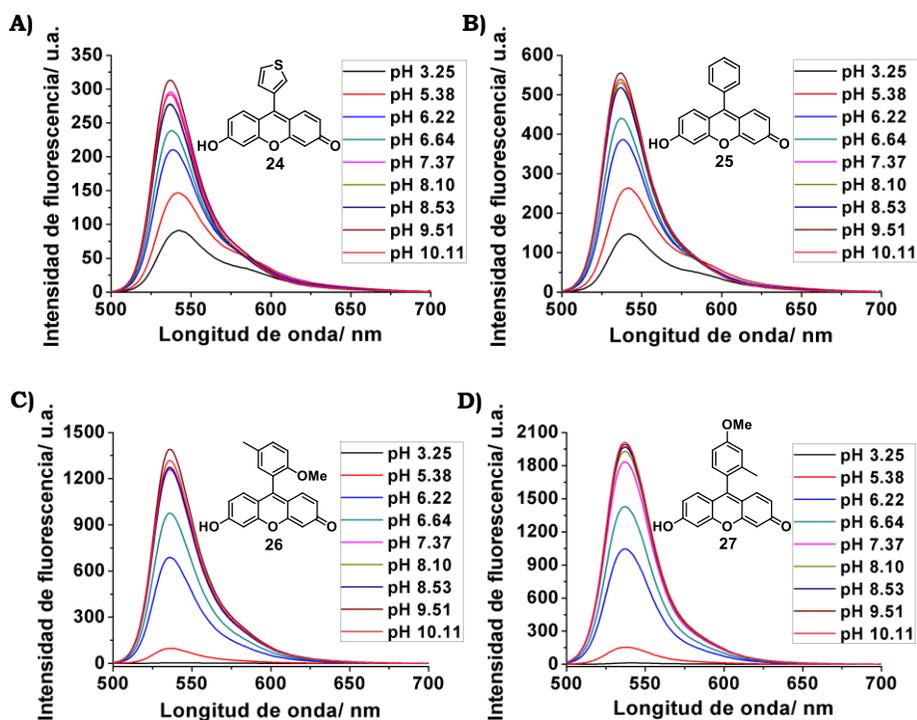
En el caso de los espectros de excitación de nuevo, al igual que en los espectros de absorción, exceptuando los derivados **26** y **27**, se apreciaron dos máximos a pH ácidos en torno a 450 y 490 nm y un único máximo a pH superiores que osciló entre 491 y 499 nm en función del compuesto y el pH del medio (**Figura II.29**). Los xantenos **26** y **27** mostraron un único máximo a 495 y 492 nm respectivamente en todo el rango de valores de pH y valores de fluorescencia muy bajos a pH ácidos lo que indicaría que se tratan de derivados OFF-ON cuya especie neutra es prácticamente no fluorescente. Solo se comenzó a apreciar la fluorescencia al desplazarse el equilibrio hacia la forma aniónica a pH de alrededor de 6. Cabe destacar que ambos xantenos fueron los únicos en los que la parte bencénica mantuvo la ortogonalidad con la parte xanténica debido a la restricción estérica existente lo que explicaría que al no haber posibilidad de extenderse la conjugación la especie neutra de **26** y **27** fuese no fluorescente<sup>[276]</sup>.

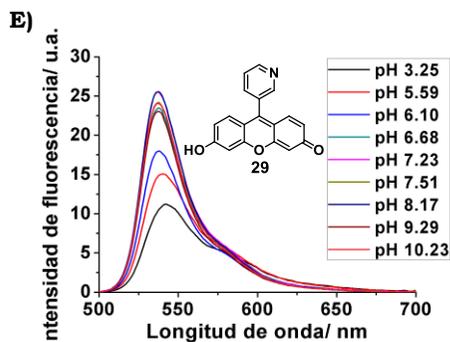




**Figura II.29.** Espectros de excitación característicos de los derivados xanténicos a  $\lambda_{em}$  515 nm. **A), B), C), D)** y **E)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3 a 10 de los derivados **24**, **25**, **26** y **27** y **29**, respectivamente.

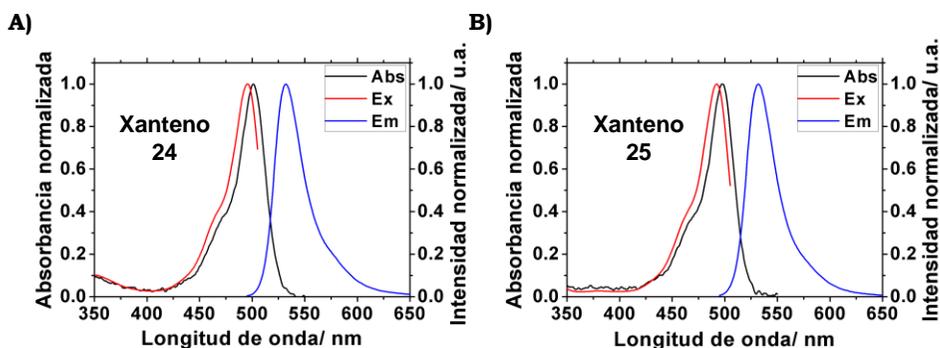
A su vez, al analizar los espectros de emisión, excitando a una longitud de onda cercana al máximo de absorción, 485 nm, se observó un máximo de emisión en torno a 536-542 nm, en función del derivado y del pH del medio, como se observa en la **Figura II.30**.

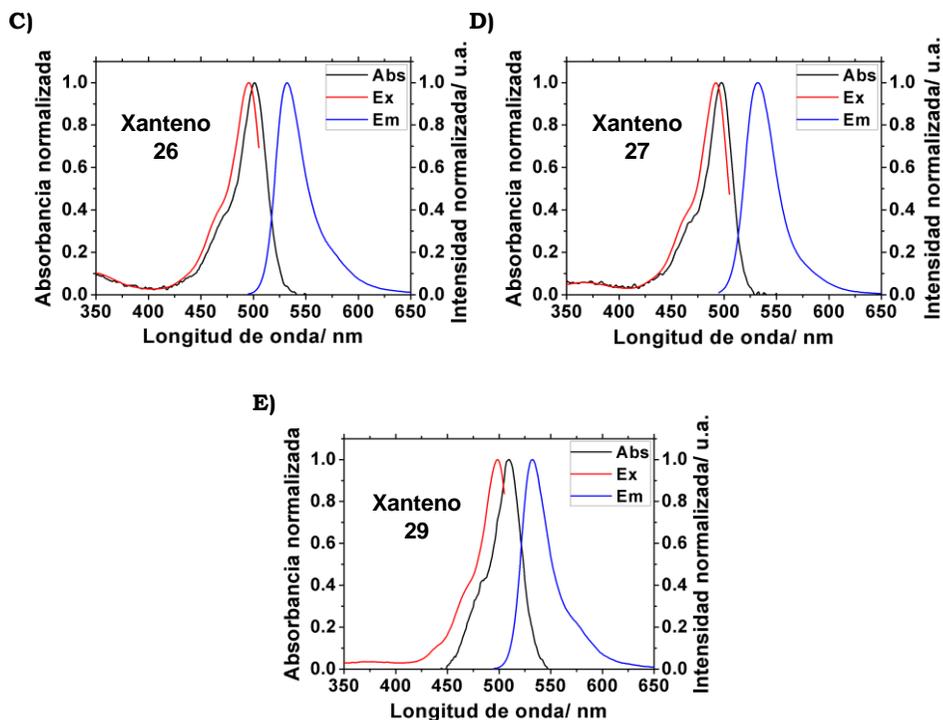




**Figura II.30.** Espectros de emisión corregidos de los derivados xanténicos a  $\lambda_{ex}$  = 485 nm. **A), B), C), D)** y **E)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3 a 10 de los derivados **24**, **25**, **26**, **27** y **29** respectivamente.

Además, se representaron los espectros normalizados de absorción, excitación y emisión a pH 8 de cada uno de los derivados xanténicos con la finalidad de observar si existían variaciones en cuanto a sus formas (**Figura II.31**). En este sentido se pudo ver que al hacer el estudio a pH básico solo se caracterizan por un máximo correspondiente a la especie aniónica con el grupo hidroxilo fenólico desprotonado. Asimismo, el desplazamiento que se observa entre los valores de absorción (en negro) y excitación (en rojo), sobre todo en el caso del xanteno **29**, se dedujo que podría deberse a que los espectros de excitación se obtienen a una  $\lambda_{em}$  de 515 nm inferior al máximo de emisión, lo que podría conllevar a que se recogió una cantidad de energía superior que no correspondería con el estado relajado del estado excitado.





**Figura II.31.** Espectros normalizados a pH 8. **A), B), C), D)** y **E)** Representación gráfica de la absorción normalizada en negro, la excitación normalizada a  $\lambda_{em}= 515$  nm en rojo y la emisión normalizada a  $\lambda_{ex}= 485$  nm en azul oscuro de los xantenos **24, 25, 26, 27** y **29**.

En general, el xanteno que mostró valores mayores de absorción, emisión y excitación fue **27** con un grupo 3-metilanisol en su estructura y el que presentó unos valores muy inferiores en comparación al resto fue el xanteno con un grupo 3-piridina **29**. La baja fluorescencia del xanteno **29** podría deberse a su baja solubilidad, o bien debido a una causa estructural. Los electrones del N de la piridina podrían atacar al anillo xanténico, rompiendo por tanto la conjugación quedando dos anillos bencénicos no conjugados que absorberían en la región espectral del UV, pero no en el visible.

A su vez, al analizar los espectros obtenidos en su conjunto, pudo verse que los xantenos disueltos en tampón TRIS a distintos pH mostraron una fuerte dependencia con este parámetro, de manera que a pH ácido los valores de absorción, excitación y emisión fueron muy inferiores a los obtenidos a pH neutros y básicos. Este hecho puede justificarse ya que los derivados

xanténicos presentan un grupo hidroxilo fenólico sensible a cambios de pH, el cual como ya se ha mencionado en los *Antecedentes*, de tal forma que existe un equilibrio entre las formas neutra y aniónica. Una vez determinada dicha dependencia se procedió a obtener los valores de  $pK_a$  de cada uno de los derivados. Para ello de todos los derivados xanténicos se representó la absorbancia frente a los valores de pH a diferentes longitudes de onda (a excepción del xanteno **29**, que no fue posible ya que la absorción de dicho compuesto solo se midió a dos valores de pH). Una vez representadas las curvas, las cuales pueden observarse en los *Anexos. Capítulo II. Cálculo del  $pK_a$* , para obtener el  $pK_a$  se realizó un ajuste no lineal por mínimos cuadrados<sup>[282]</sup> siguiendo la **Ecuación II.2**.

$$\text{Ecuación II.2} \quad A^\lambda = C_T^b \left( \epsilon_{HA}^\lambda \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}} + \epsilon_A^\lambda \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}} \right)$$

siendo  $A^\lambda$  la absorbancia a la longitud de onda  $\lambda$ ,  $C_T$  la concentración total del colorante,  $b$  el camino óptico de 0.1,  $pK_a$  la constante de acidez y  $\epsilon_{HA}$  y  $\epsilon_A$  los coeficientes de absorción molar de las especies protonada ( $HA$ ) y desprotonada ( $A$ ) dependientes de la longitud de onda.

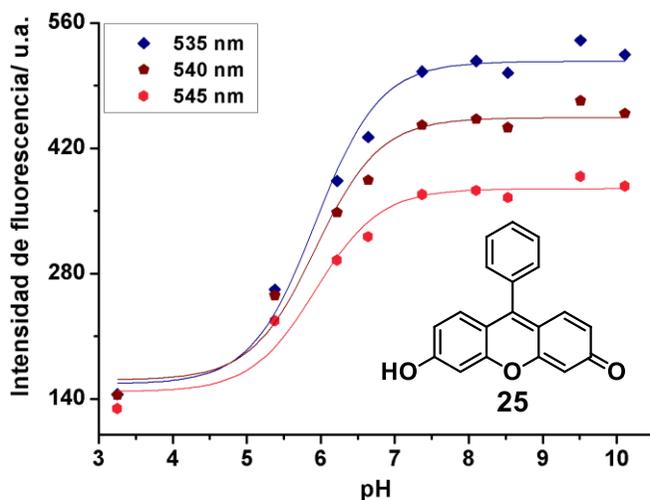
A su vez se realizó la representación de la intensidad de fluorescencia frente al pH a diferentes longitudes de onda y se obtuvieron diferentes curvas que fueron ajustadas a la **Ecuación II.3**, mediante un método de ajuste global no lineal por mínimos cuadrados<sup>[282]</sup>.

$$\text{Ecuación II.3} \quad I = f_{HA} \cdot \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a^*}} + f_A \cdot \frac{10^{-pK_a^*}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a^*}}$$

siendo  $I$  la intensidad de fluorescencia,  $pK_a$  la constante de acidez y  $f_{HA}$  y  $f_A$  son factores de proporcionalidad directamente relacionados con el rendimiento cuántico de las formas protonada ( $HA$ ) y desprotonada ( $A$ ).

En la **Figura II.32** se muestra un ejemplo de este tipo de ajuste para el xanteno **25**, el resto de curvas se pueden visualizar en los *Anexos, Capítulo II, Cálculo del pK<sub>a</sub>*.

En relación a los valores de pK<sub>a</sub> obtenidos todos fueron de en torno a 6, inferiores al pH fisiológico (**Tabla II.1**). Este hecho sirvió para asegurar que, al utilizar este tipo de sondas como marcadores fluorescentes en células, el equilibrio se encontraría desplazado hacia la forma aniónica, la cual posee un rendimiento cuántico mayor y por tanto su efectividad sería superior.

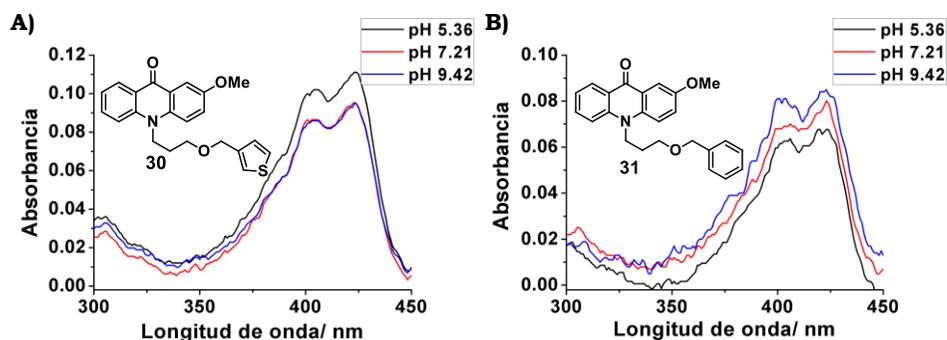


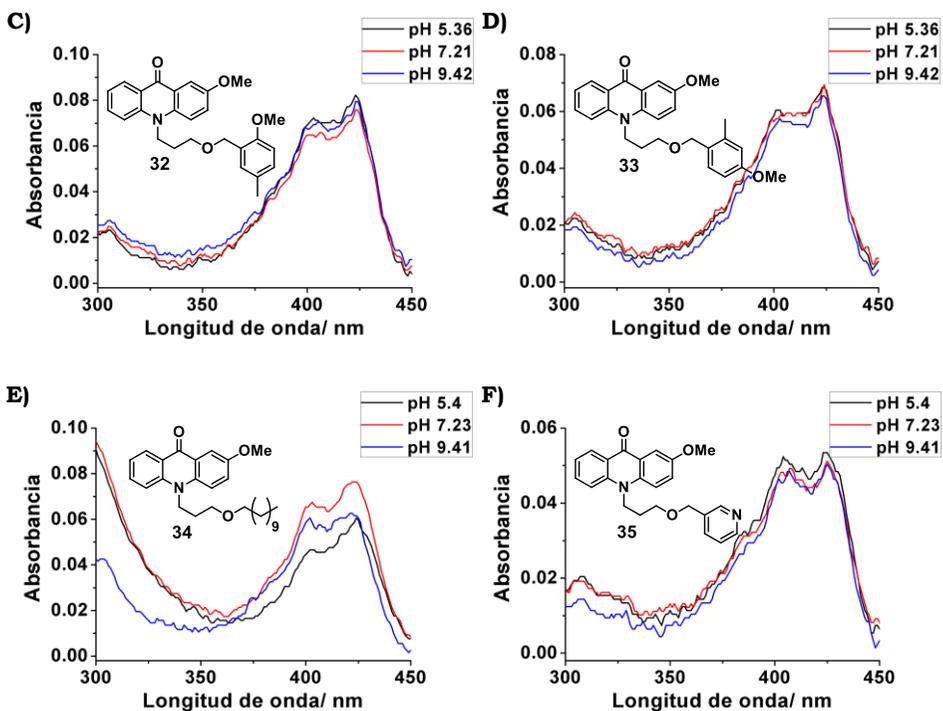
**Figura II.32.** Obtención del valor de pK<sub>a</sub> del xanteno **25**. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia (a  $\lambda_{ex}$ = 485 nm) frente al pH a  $\lambda_{em}$  de 535, 540 y 545 nm, y las correspondientes curvas de ajuste no lineal.

**Tabla II.1.** Valores de  $pK_a$  de los distintos derivados xanténicos **24**, **25**, **26**, **27** y **29** y sus respectivos errores estándar asociados.

Xantenos	$pK_a$ (A vs pH)	$pK_a$ (I vs pH)
<b>24</b>	$6.39 \pm 0.03$	$6.00 \pm 0.04$
<b>25</b>	$6.43 \pm 0.05$	$5.96 \pm 0.03$
<b>26</b>	$6.35 \pm 0.03$	$6.19 \pm 0.01$
<b>27</b>	$6.30 \pm 0.04$	$6.20 \pm 0.01$
<b>29</b>	-	$5.95 \pm 0.04$

Por otro lado, se muestran los espectros obtenidos de las acridonas sintetizadas de **30-35** que fueron las utilizadas en este capítulo. Para obtener los espectros de absorción estas medidas se hicieron a concentraciones de  $5 \cdot 10^{-5}$  M (excepto **34** y **35**, que se midieron a  $1 \cdot 10^{-4}$  M) y a  $1 \cdot 10^{-6}$  M en el caso de medidas de fluorescencia, a tres valores de pH en un rango de 5-9. Las concentraciones utilizadas para medir la absorción de las acridonas **34** y **35** fueron superiores debido a que de lo contrario no se obtenían espectros satisfactorios.

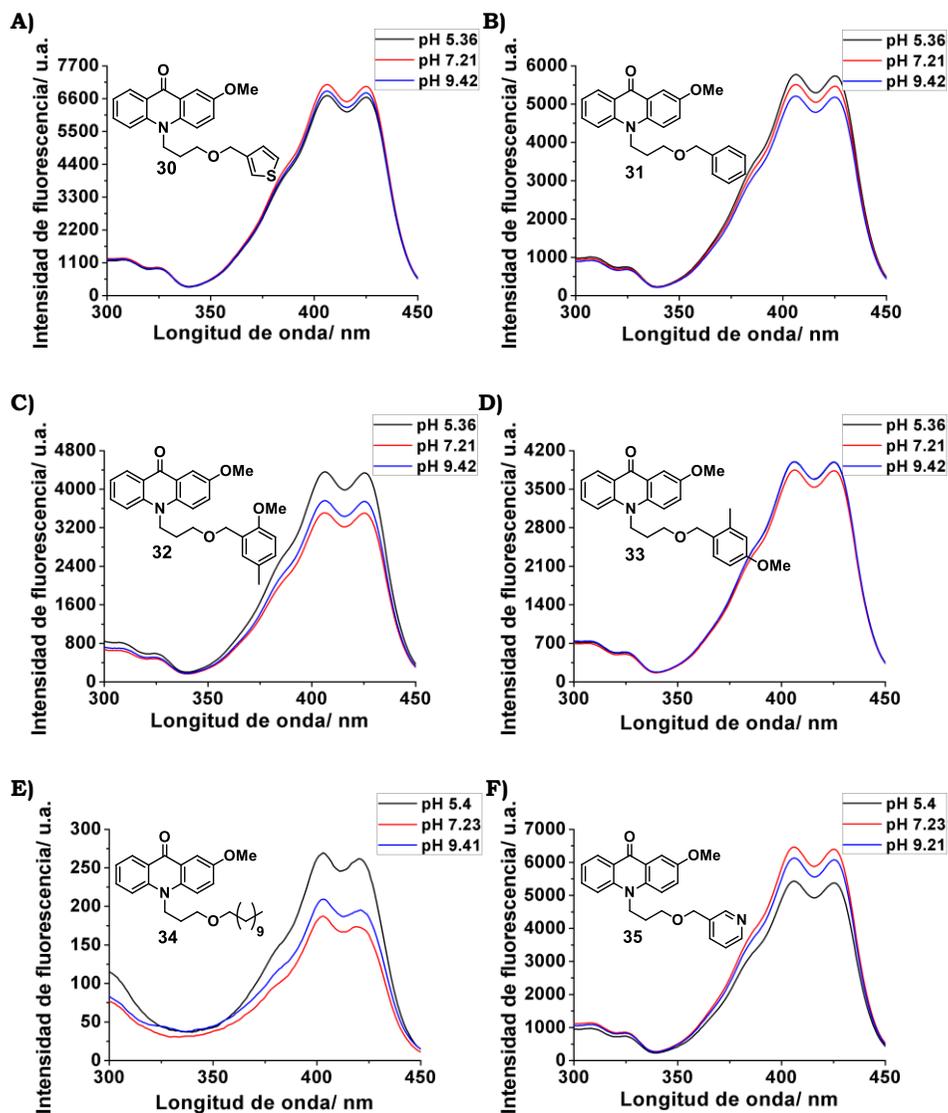




**Figura II.33.** Espectros de absorción de las distintas acridonas. **A), B), C), D), E)** y **F)** Representación gráfica de la absorción frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 5 a 9 de los derivados **30-35**.

En cuanto a los espectros de absorción pudo verse que en el rango de pH estudiado existían dos máximos de absorción a dos longitudes de onda, uno en torno a 406 y otra a 423 nm, como se muestra en la **Figura II.33**. Esto indicó la presencia de varias transiciones posibles desde niveles vibracionales diferentes.

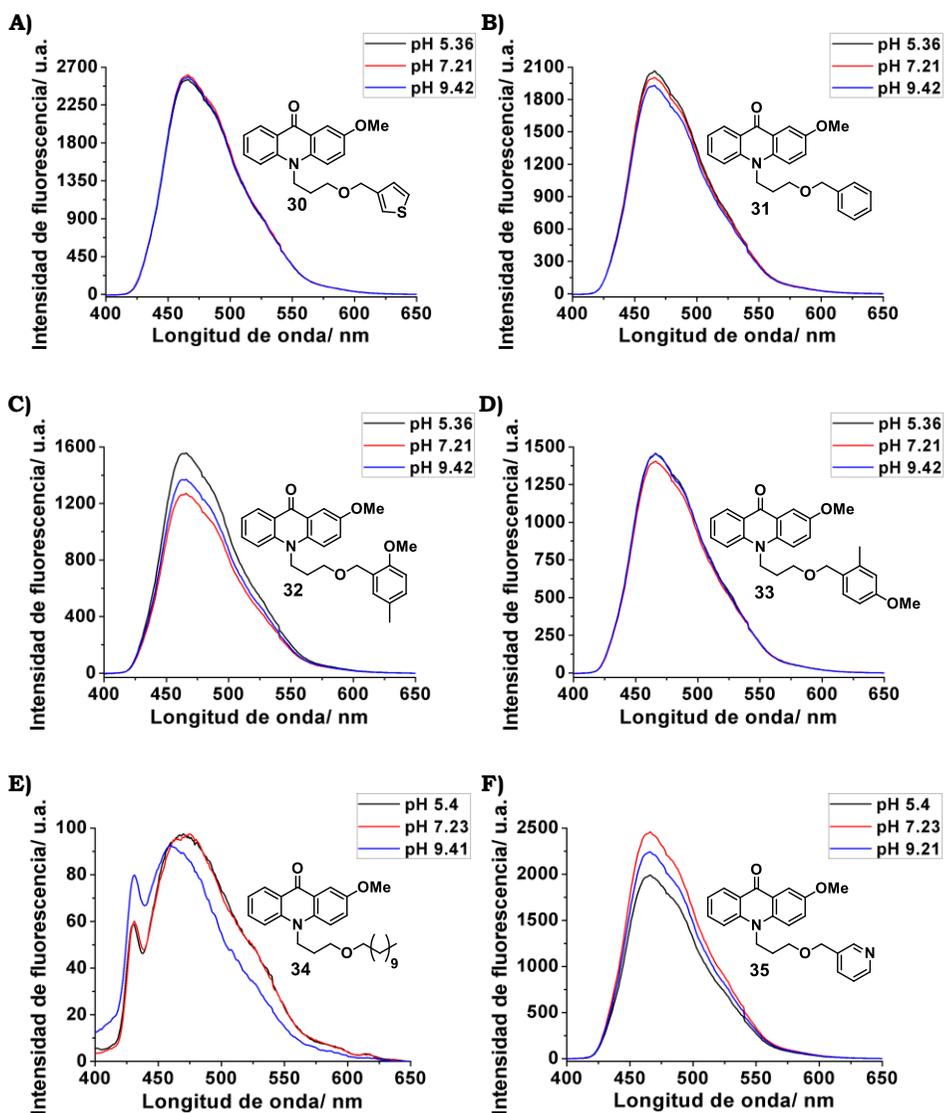
En el caso de los espectros de excitación de nuevo, al igual que en los espectros de absorción, se apreciaron dos máximos en torno a 406 y 423 nm como se muestra en la **Figura II.34**.



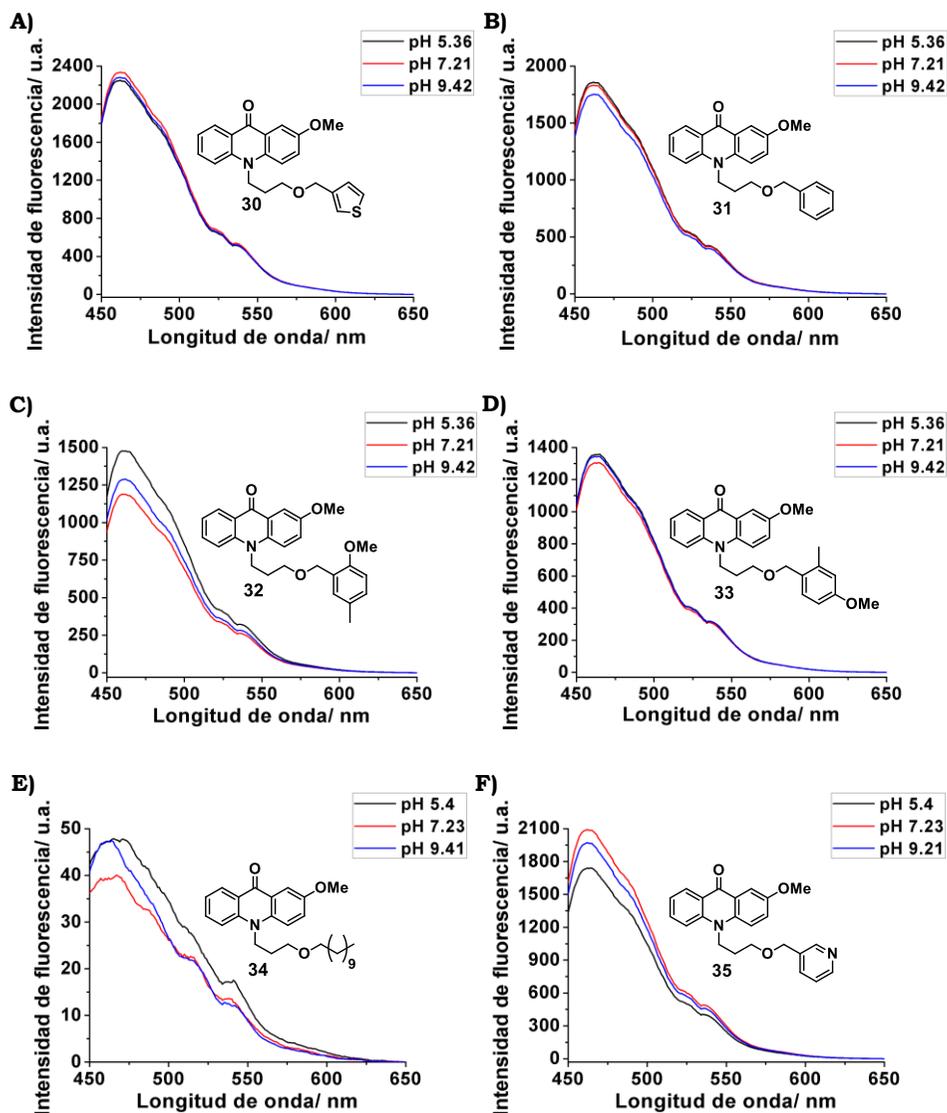
**Figura II.34.** Espectros de excitación de las distintas acridonas a  $\lambda_{em} = 465$  nm. **A), B), C), D), E)** y **F)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3 a 9 de los derivados **30-35**, respectivamente.

A su vez, al analizar los espectros de emisión, excitando a una longitud de onda cercana a los máximos de absorción, 375 nm y 440 nm, se observó un máximo de emisión en torno a 466 nm y 462 nm, respectivamente, como se muestra en la **Figura II.35** y **Figura II.36**. En el caso de los compuestos

**32**, **34** y **35** la intensidad y/o posición de los máximos se vieron un poco alteradas en función del pH.

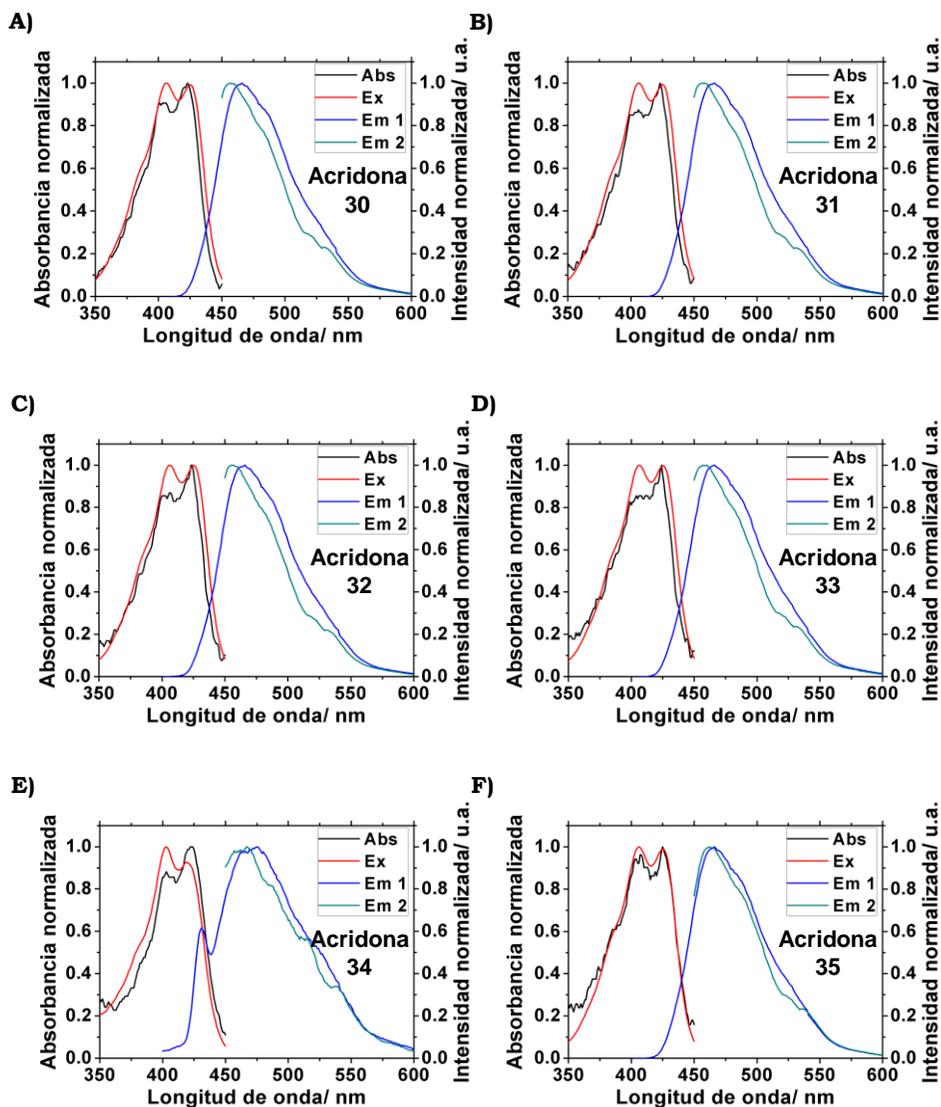


**Figura II.35.** Espectros de emisión corregidos de las distintas acridonas a  $\lambda_{exc} = 375$  nm. **A)**, **B)**, **C)**, **D)**, **E)** y **F)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 5 a 9 de los derivados **30-35**, respectivamente.



**Figura II.36.** Espectros de emisión corregidos de las distintas acridonas a  $\lambda_{exc} = 440$  nm. **A), B), C), D), E)** y **F)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 5 a 9 de los derivados **30-35**, respectivamente.

Además, al igual que en el caso de los derivados xanténicos, se representaron los espectros normalizados de absorción, excitación y emisión a pH 7 con la finalidad de compararlos (**Figura II.37**).



**Figura II.37.** Espectros normalizados a pH 7. **A), B), C), D), E)** y **F)** Representación gráfica de la absorción normalizada en negro, la excitación normalizada a  $\lambda_{em} = 465$  nm en rojo, la emisión normalizada a  $\lambda_{ex} = 375$  nm en azul oscuro (Em 1) y la emisión normalizada a  $\lambda_{ex} = 440$  nm en azul turquesa (Em 2) de las acridonas **30**, **31-35**.

Al analizar los espectros obtenidos en su conjunto, pudo verse que únicamente las acridonas **32**, **34** y **35** mostraron una débil dependencia a los cambios de pH. En general, la acridona que mostró valores mayores de absorción, excitación y emisión fue **30**, con un grupo tiofeno en su estructura.

En este caso, la acridona con un grupo la cadena hidrocarbonada **34** fue la que mostró unos valores muy inferiores en comparación al resto, en lo que respecta a valores de excitación y emisión. La baja fluorescencia de esta acridona podría deberse a que se encontrase formando micelas debido a la presencia de la cadena larga en su estructura, lo que ocasionaría un auto-quenching.

A continuación, para completar la caracterización fotofísica, se midieron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de cada una de las posibles sondas siguiendo el procedimiento descrito en la *Parte Experimental del Bloque B. Capítulo II. 4. Instrumentación para la caracterización fotofísica*. A continuación se muestran los valores de este parámetro en la **Tabla II.2** junto con el error estándar asociado.

**Tabla II.2.** Rendimientos cuánticos de los derivados xanténicos y acridonas con sus respectivos errores estándar.

<b>Xantenos</b>	<b>Rendimiento cuántico</b>	<b>Acridonas</b>	<b>Rendimiento cuántico</b>
<b>24</b>	0.14 ± 0.00	<b>30</b>	0.82 ± 0.01
<b>25</b>	0.21 ± 0.01	<b>31</b>	0.86 ± 0.02
<b>26</b>	0.56 ± 0.01	<b>32</b>	0.52 ± 0.07
<b>27</b>	0.84 ± 0.02	<b>33</b>	0.83 ± 0.04
<b>28</b>	-	<b>34</b>	0.06 ± 0.02
<b>29</b>	0.16 ± 0.02	<b>35</b>	0.86 ± 0.13

En ellos pudo verse que, en general los derivados que tienen rendimientos cuánticos más elevados son **27**, **30**, **31**, **33** y **35**, en torno al 0.80, lo que indicó que la mayor parte de la energía que absorben estos derivados se convirtió en emisión por fluorescencia. En el caso de los derivados **29** y **34**, con unos rendimientos cuánticos muy bajos, ocurrió lo contrario, la mayoría de la energía absorbida se supuso que la perdieron en otros procesos de desactivación y, debido a ello, apenas emitieron

fluorescencia. El valor de rendimiento tan bajo de la acridona **34** podría corroborar lo que se ha mencionado anteriormente, la posibilidad de que forme micelas y por tanto se desactive por auto-quenching.

Finalmente, se midieron los decaimientos de fluorescencia de cada uno de los compuestos sintetizados a las mismas concentraciones que las empleadas para las medidas de sus espectros. En el caso de los derivados xanténicos los decaimientos se obtuvieron a nueve valores de pH en un rango de 3 a 10. Se utilizó un láser de excitación a 485 nm y se realizaron las medidas a tres longitudes de onda de 510, 520 y 530 nm. Una vez obtenidos los decaimientos característicos de cada uno de los xantenos a dichas longitudes de onda, se llevó a cabo un ajuste global a una función de decaimiento bi-exponencial, teniendo en cuenta todas las medidas realizadas a los diferentes pH obteniéndose los valores de tiempos de vida que se muestran a continuación en la siguiente tabla.

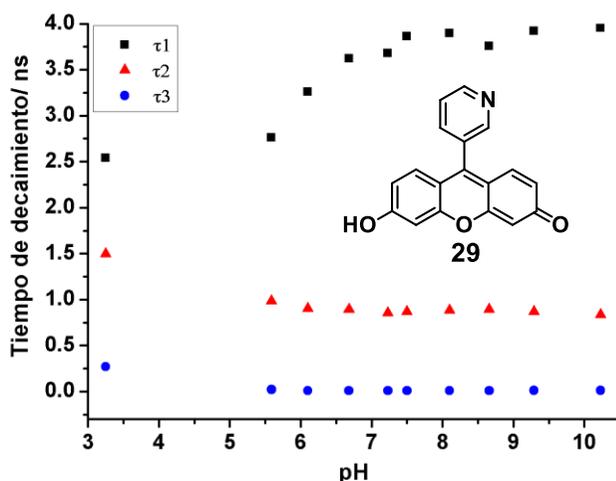
**Tabla II.3.** Tiempos de vida globales de cada uno de los xantenos sintetizados y sus respectivos errores estándar.

<b>Ajuste global</b>		
<b>Xantenos</b>	$\tau_1/ \text{ ns}$	$\tau_2/ \text{ ns}$
<b>24</b>	$2.01 \pm 0.02$	$0.75 \pm 0.00$
<b>25</b>	$2.82 \pm 0.03$	$0.97 \pm 0.01$
<b>26</b>	$2.47 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.00$
<b>27</b>	$3.75 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.00$

El ajuste realizado se hizo suponiendo la presencia de dos especies, la neutra y la aniónica, cambiando únicamente la proporción relativa entre ambas. Este ajuste se pudo hacer para los decaimientos obtenidos de todos los xantenos excepto **29**. En el estudio de los xantenos **24-27**, se corroboró la presencia de ambas especies al determinar los valores de los tiempos de vida, de modo que cada uno de los xantenos presentó 2 tiempos de vida, uno

superior de 2-4 ns correspondiente a la especie aniónica y otro más bajo correspondiente a la especie neutra. El hecho de que únicamente en el caso de los xantenos **26** y **27** los tiempos de vida de la especie neutra ( $\tau_2$ ) sean tan bajos corroboraría que se trata de una especie prácticamente no fluorescente.

Por su parte, al realizar las medidas de  $\tau$  del xanteno **29** que presenta un grupo 3-piridina en su estructura, se comprobó que estos valores mostraban cambios con el pH (**Figura II.38**), lo que indicó la posible presencia de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado y no permitió llevar a cabo un ajuste global. En concreto podría indicar la existencia de una transferencia intermolecular de un protón entre el grupo piridina y la parte xanténica, o bien la formación de un zwitterion neutro, siendo fluorescentes ambas especies obtenidas. Por tanto, este sistema foto-cinético requeriría un estudio en mayor profundidad.



**Figura II.38.** Representación de los valores de  $\tau$  de **29** frente a los valores de pH.

A continuación, los decaimientos propios de cada una de las acridonas se obtuvieron a tres valores de pH en un rango de 5 a 9. Se utilizó un láser de excitación a 440 nm y se realizaron las medidas a tres longitudes de onda de 465, 485 y 505 nm. Tras obtener los decaimientos característicos de cada una de las acridonas a dichas longitudes de onda, se ajustaron a cada uno

de los pH de forma individual ya que en este caso no se tuvo la certeza de la existencia de un número determinado de especies en el medio. Tras el ajuste se obtuvieron diferentes valores de tiempos de vida los cuales se muestran en la **Tabla II.4**, **Tabla II.5** y **Tabla II.6**.

**Tabla II.4.** Tiempos de vida a pH 5 de cada una de las acridonas sintetizadas y sus respectivos errores estándar.

<b>pH 5</b>		
<b>Acridonas</b>	<b><math>\tau_1/ \text{ ns}</math></b>	<b><math>\tau_2/ \text{ ns}</math></b>
<b>30</b>	17.54 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.16
<b>31</b>	17.59 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.16
<b>32</b>	17.18 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.17
<b>33</b>	18.04 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.15
<b>35</b>	17.88 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.12

**Tabla II.5.** Tiempos de vida a pH 7 de cada una de las acridonas sintetizadas y sus respectivos errores estándar.

<b>pH 7</b>		
<b>Acridonas</b>	<b><math>\tau_1/ \text{ ns}</math></b>	<b><math>\tau_2/ \text{ ns}</math></b>
<b>30</b>	17.53 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.15
<b>31</b>	17.63 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.16
<b>32</b>	17.17 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.16
<b>33</b>	18.08 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.14
<b>35</b>	17.94 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.15

**Tabla II.6.** Tiempos de vida a pH 9 de cada una de las acridonas sintetizadas y sus respectivos errores estándar.

<b>pH 9</b>		
<b>Acridonas</b>	<b><math>\tau_1/</math> ns</b>	<b><math>\tau_2/</math> ns</b>
<b>30</b>	$17.51 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.15$
<b>31</b>	$17.61 \pm 0.04$	$0.70 \pm 0.13$
<b>32</b>	$17.07 \pm 0.04$	$0.65 \pm 0.12$
<b>33</b>	$18.04 \pm 0.04$	$0.73 \pm 0.12$
<b>35</b>	$17.96 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.15$

Cada una de las acridonas presentó 2 tiempos de vida, aunque en un principio cabría esperar la obtención de un único valor de tiempo de vida largo de en torno a 14-18 ns. Sin embargo, también se obtuvo un valor muy bajo que podría corresponderse a la formación de un excímero en el estado excitado<sup>[282]</sup>.

Únicamente los decaimientos obtenidos de la acridona **34**, cuyos valores de tiempo de vida no están incluidos en las tablas anteriores, se ajustaron a una función tetraexponencial. Esto pareció corroborar la formación de micelas de este colorante lo que conllevaría a la coexistencia de varias especies en disolución a las cuales a cada una de ellas le correspondería un valor de  $\tau$ , los cuales se muestran en la **Tabla II.7**. El valor más elevado de en torno a 15 ns se correspondería con la especie monomérica, el siguiente valor de 3 ns con pequeñas micelas formadas, el valor de 1 ns a la formación de un posible excímero y el valor más bajo de 0.02 ns con la dispersión de la luz.

**Tabla II.7.** Tiempos de vida a pH 5, 7 y 9 de la acridona **34** y sus respectivos errores estándar.

<b>Acridona 34</b>				
<b>pH</b>	$\tau_1/ \text{ ns}$	$\tau_2/ \text{ ns}$	$\tau_3/ \text{ ns}$	$\tau_4/ \text{ ns}$
<b>5</b>	14.94 ± 0.21	3.71 ± 0.08	1.06 ± 0.03	0.02 ± 0.00
<b>7</b>	15.46 ± 0.29	3.23 ± 0.10	0.88 ± 0.02	0.01 ± 0.00
<b>9</b>	16.23 ± 0.14	3.86 ± 0.12	0.95 ± 0.02	0.00 ± 0.00

En definitiva, las acridonas, mostraron unos tiempos de vida mucho más largos de en torno a 14-18 ns frente a los 2-4 ns de los derivados xanténicos. Los valores de tiempos de vida superiores fueron los de los compuestos **27** y **33**, ambos con el grupo 3-metilanisol en su estructura, cuyos valores de rendimiento cuántico también fueron superiores al resto.

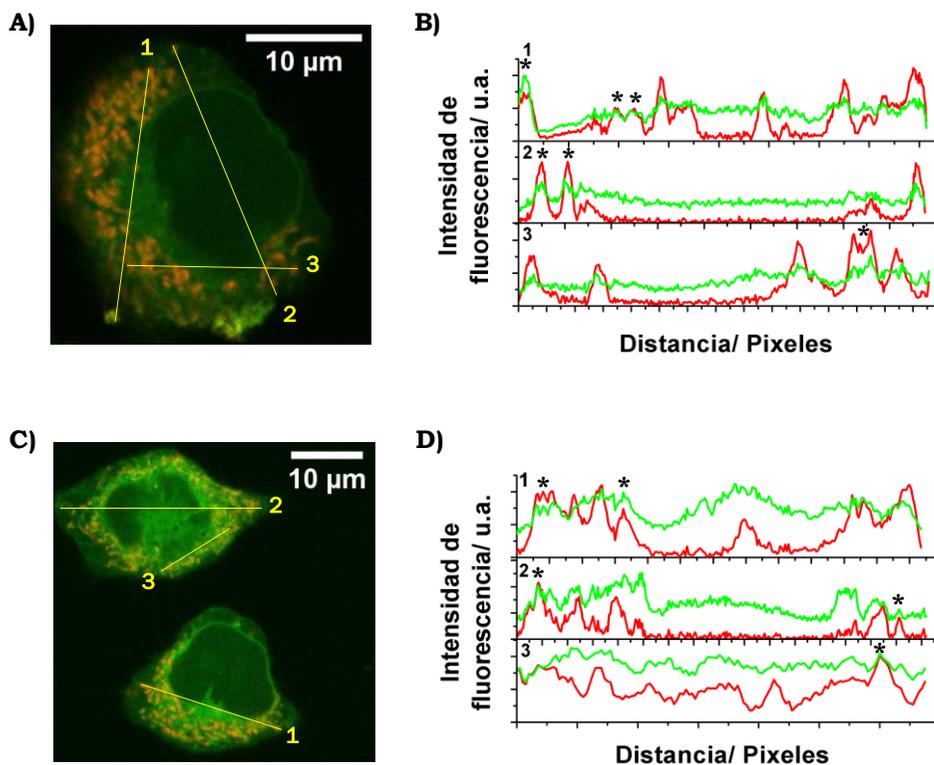
### **II.3.3. Medidas de localización celular mediante microscopía confocal de fluorescencia en células MDA-MB-231**

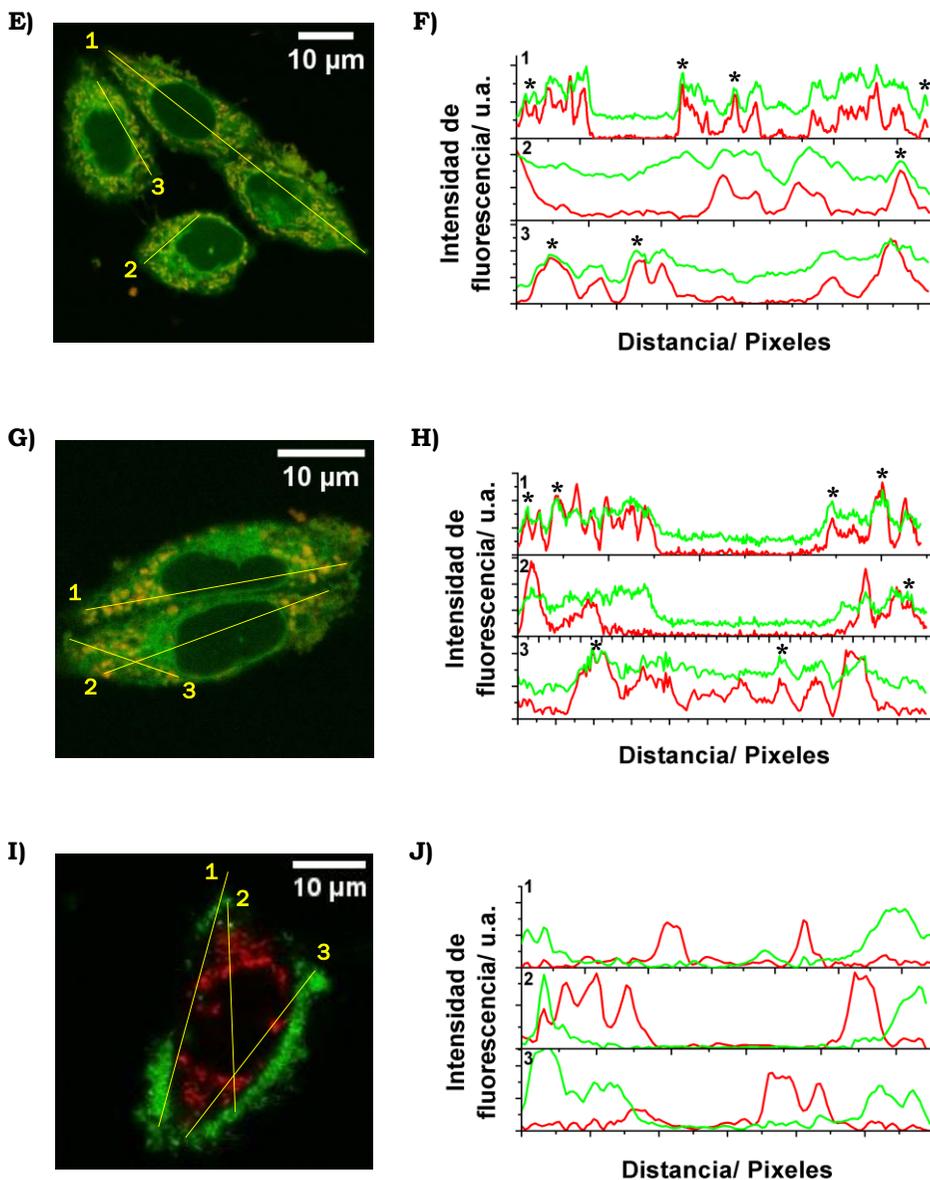
Una vez se caracterizaron cada uno de los derivados, la *Dra. María Dolores Girón (Dpto. Bioquímica, Universidad de Granada)* realizó un estudio de la viabilidad celular de cada uno de los compuestos. En él se determinó que ninguno de ellos presentaba citotoxicidad para las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que se iban a emplear, por lo que se decidió llevar a cabo un estudio de localización de los mismos en dichas células.

Para ello, primero se utilizó como referencia el marcador de mitocondrias, MitoTracker Deep Red (MT) y se probaron cada uno de los derivados en las células previamente incubadas con dicho marcador. Una vez incubadas, mediante microscopía confocal de fluorescencia se tomaron un gran número de imágenes con el fin de determinar qué compuestos se incorporaban en las mitocondrias de las células en mayor medida. Algunas de ellas pueden verse seguidamente y en los *Anexos. Capítulo II.*

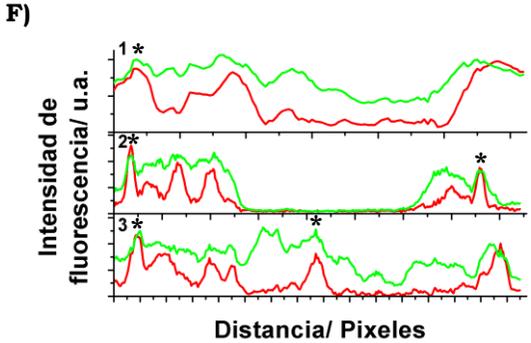
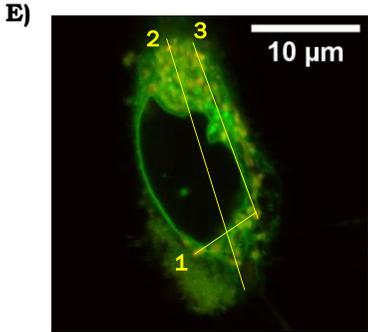
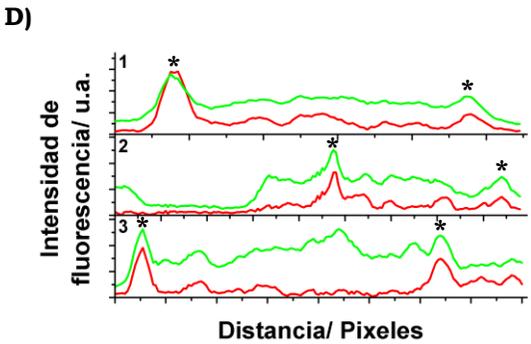
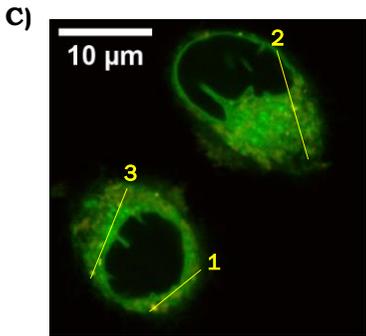
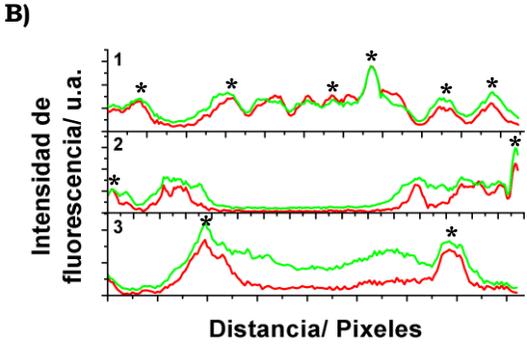
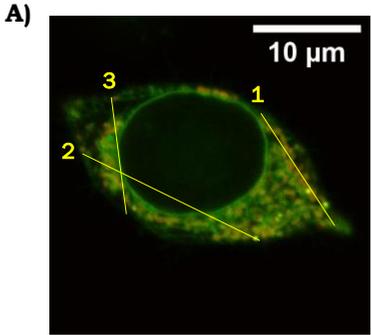
Una vez obtenidas las imágenes por microscopía confocal de fluorescencia, se seleccionó una imagen representativa para cada uno de los

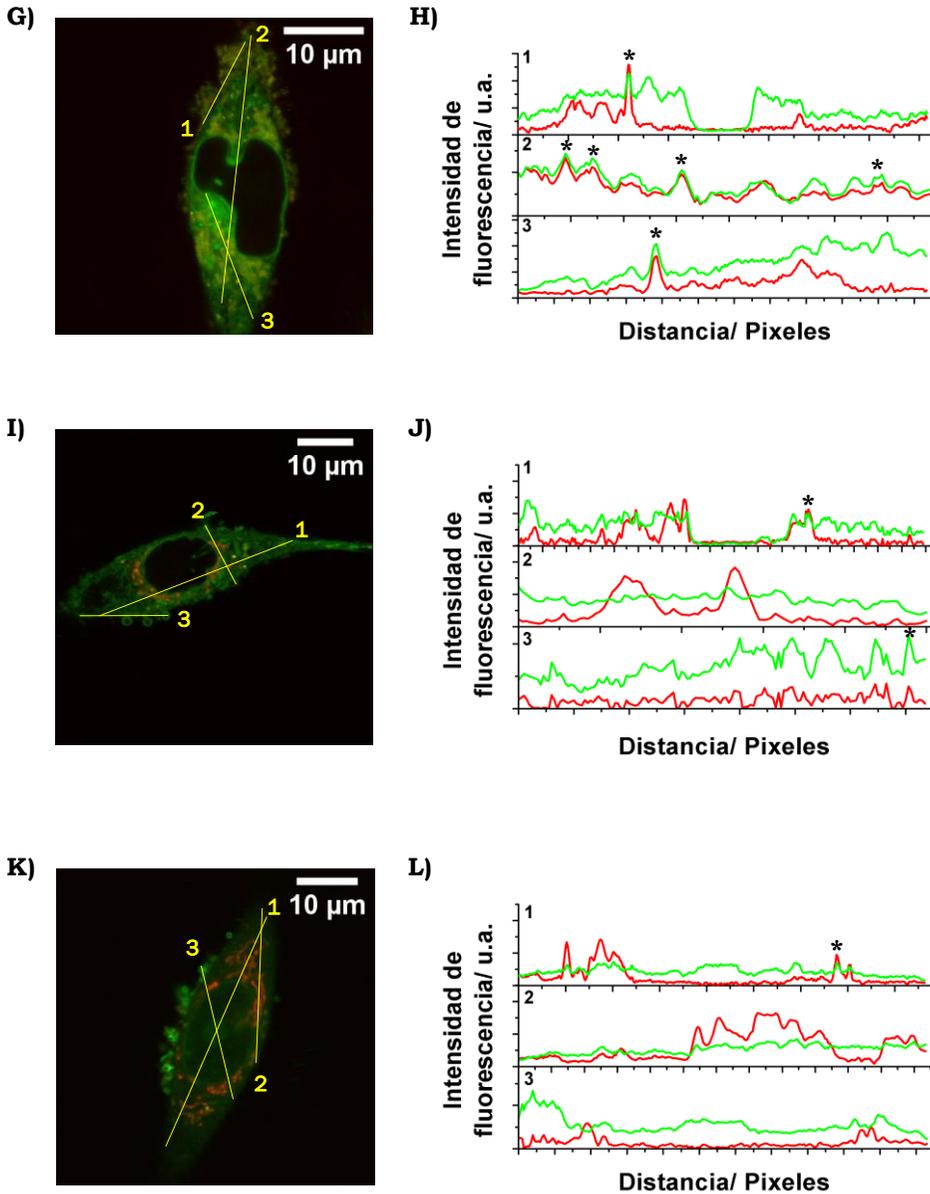
compuestos. Después, se representaron los perfiles de intensidad de fluorescencia en regiones lineales seleccionadas en cada una de estas imágenes. En estas representaciones, los datos que se muestran en verde se corresponden con la intensidad obtenida del compuesto de estudio y los datos que aparecen en rojo se corresponden con los obtenidos para el marcador mitocondrial, MT. Se determinó que las zonas donde coincidían los datos de intensidad del compuesto y del MT, fueron zonas donde ambos colorantes colocalizaron (zonas marcadas con asteriscos), lo que aportó información de que en esos lugares el compuesto de estudio se incorporó en las mitocondrias (**Figura II.39** y **Figura II.40**).





**Figura II.39.** Ejemplo representativo de imágenes de colocalización mitocondrial de los distintos derivados xanténicos probados a  $3 \cdot 10^{-7}$  M en células MDA-MB-231, utilizando como referencia MT. **A), C), E), G) e I)** Imágenes representativas de **24, 25, 26, 27 y 29**, respectivamente. **B), D), F), H) y J)** Perfiles de intensidad de fluorescencia frente a la distancia en pixeles. En el verde los xantenos **24, 25, 26, 27 y 29**, respectivamente y en el rojo el MT.





**Figura II.40.** Ejemplo representativo de imágenes de colocalización mitocondrial de los distintas acridonas probadas a  $3 \cdot 10^{-7}$  M en células MDA-MB-231, utilizando como referencia MT. **A), C), E), G), I) y K)** Imágenes representativas de **30, 31, 32, 33, 34** y **35**, respectivamente. **B), D), F), H), J) y L)** Perfiles de intensidad de fluorescencia frente a la distancia en píxeles. En el verde las acridonas **30, 31, 32, 33, 34** y **35**, respectivamente y en el rojo el MT.

De forma general, se observó que la incorporación de cada uno de ellos fue bastante rápida, de manera que nada más añadir los distintos fluoróforos, la emisión era perceptible. A su vez, al analizar las imágenes y perfiles de intensidad, comparando las zonas de colocación se pudo ver que los compuestos se localizaron en mayor o menor medida en mitocondrias. Esto tuvo lugar a excepción del xanteno **29** con un grupo 3-piridina en su estructura cuya localización fue nula en mitocondrias y las acridonas **34** (con una cadena hidrocarbonada) y **35** (con un grupo 3-piridina) cuya localización mitocondrial fue muy baja. Este hecho conllevó a la deducción de que podía deberse a que se incorporaran preferentemente en otros orgánulos celulares, lo que se apreció a simple vista en las imágenes de fluorescencia. Se pudo ver como **29** se acumuló en pequeñas estructuras esféricas, posiblemente lisosomas, presentes en el citoplasma celular y la gran mayoría fue expulsado a través de la membrana celular. Parte de la acridona **34** se incorporó en la membrana nuclear y en estructuras citoplasmáticas y la acridona **35** pudo verse cómo se incorporó preferentemente en compartimentos esféricos y en el nucléolo celular.

Asimismo, de forma general los xantenos (excepto **29**), a diferencia de las acridonas, se introdujeron en gran medida en el núcleo y el citoplasma celular, lo cual se pudo apreciar en los perfiles de intensidad en los que se observó que, al pasar los perfiles trazados por estas zonas de la célula, la intensidad del fluoróforo no era próxima a 0, sino que mostró valores superiores. Por el contrario, las acridonas con los mismos sustituyentes en su estructura no se introdujeron en el núcleo, quedando este de color negro en las imágenes y caracterizándose los valores de intensidad de esta zona por ser cercanos a 0. En cambio, la localización en estos casos tampoco fue específica en mitocondrias, ya que todas las acridonas se introdujeron además en gran medida en la membrana nuclear y en zonas que parecían corresponderse al retículo endoplasmático. De forma concreta, en el grupo de xantenos, los que mostraron una colocación superior fueron **26** (con un grupo 4-metilanisol) y **27** (con un grupo 3-metilanisol) y en las acridonas la **30** (con un grupo tiofeno en su estructura), siendo sin duda **30** el colorante que mostró una localización mitocondrial más elevada en mitocondrias.

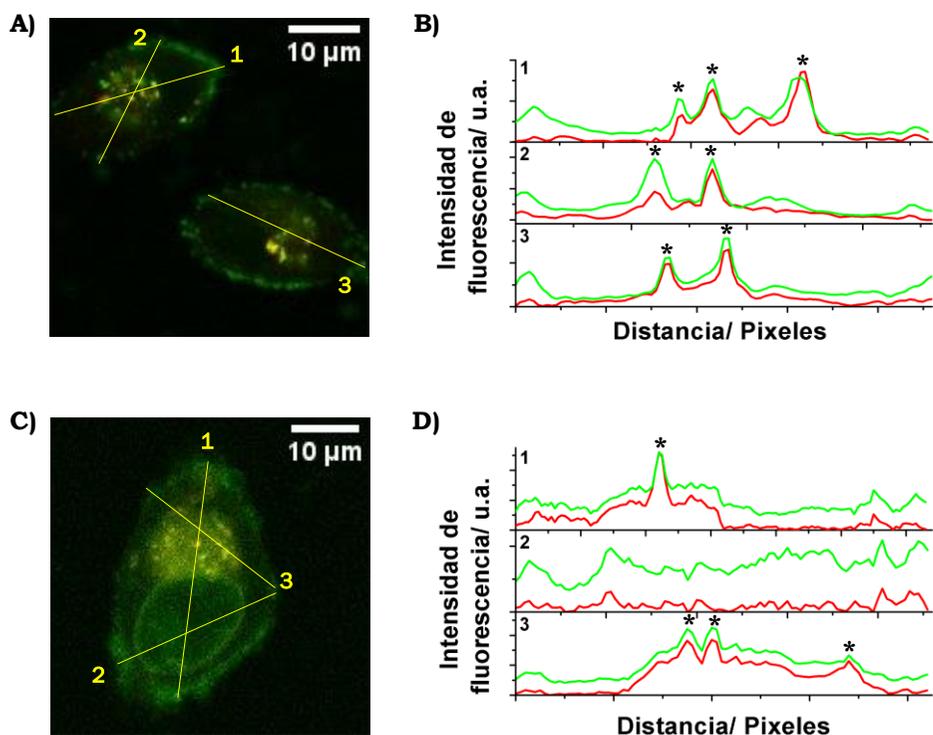
A continuación, para confirmar las medidas cualitativas previas, se calculó el grado de colocalización de las distintas sondas en mitocondriales. Esto se hizo con ayuda del programa ImageJ con el que determinaron los valores del coeficiente de Pearson (R) para 6 imágenes obtenidas de cada uno de los colorantes y se calculó el valor medio con su respectivo error estándar. Este coeficiente aportó información cuantitativa del grado de colocalización característico de cada derivado. Como se puede ver en la **Tabla II.8**, el compuesto que mostró un valor más elevado de R y, por ello, un mayor grado de colocalización, fue la acridona **30**, lo cual confirmó los resultados cualitativos obtenidos hasta el momento. Los derivados **24**, **25**, **26**, **27**, **31**, **32** y **33** también mostraron valores aceptables de R y, por el contrario, el xanteno **29** y las acridonas **34** y **35**, mostraron valores inferiores a 0.65, indicando una colocalización inferior. Así pues, las medidas cuantitativas corroboraron los resultados mostrados anteriormente.

**Tabla II.8.** Valores de los coeficientes de Pearson que indican el grado de colocalización de los compuestos con el MT y sus correspondientes errores estándar.

<b>Coefficientes de Pearson</b>			
<b>Xantenos</b>	<b>R</b>	<b>Acridonas</b>	<b>R</b>
<b>24</b>	0.67 ± 0.02	<b>30</b>	0.81 ± 0.02
<b>25</b>	0.69 ± 0.02	<b>31</b>	0.77 ± 0.01
<b>26</b>	0.74 ± 0.02	<b>32</b>	0.76 ± 0.03
<b>27</b>	0.72 ± 0.02	<b>33</b>	0.72 ± 0.02
<b>28</b>	-	<b>34</b>	0.64 ± 0.04
<b>29</b>	0.20 ± 0.03	<b>35</b>	0.63 ± 0.01

Tras obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de la colocalización en mitocondrias que mostraban cada uno de los fluoróforos mediante microscopía de fluorescencia, se procedió a estudiar dónde era posible que se incorporasen algunos de estos colorantes que colocalizaban en

menor medida en las mitocondrias. Este fue el caso de los derivados **29** y **35**, ambos con un resto piridina incorporado en la estructura. Para ello, al observar indicios de que estas estructuras podrían localizarse en estructuras esféricas que podrían ser lisosomas se realizó un estudio en el que se utilizó como referencia LysoTracker Deep Red (LT), un marcador comercial de lisosomas.



**Figura II.41.** Ejemplo representativo de imágenes de colocación lisosomal de los fluoróforos **29** y **35** probados a  $3 \cdot 10^{-7}$  M en células MDA-MB-231, utilizando como referencia LT. **A)** y **C)** Imágenes representativas de **29** y **35**, respectivamente. **C)** y **D)** Perfiles de intensidad de fluorescencia frente a la distancia en píxeles. En el verde el xanteno **29** y la acridona **35**, respectivamente y en el rojo el LT.

Se adquirieron imágenes de fluorescencia de dos colores, con excitación dual PIE, de los compuestos **29** y **35** en presencia de LT. De nuevo, una vez obtenidas las imágenes por microscopía confocal de fluorescencia, se seleccionó una imagen representativa para cada uno de los compuestos, las cuales se muestran en la **Figura II.41 A)** y **C)**. Después, se representaron los

perfiles de intensidad en cada canal en regiones lineales de interés seleccionadas en cada una de estas imágenes (**Figura II.41 B** y **D**).

Tras ello, al igual que en el estudio de colocalización en mitocondrias, se determinaron los valores del coeficiente de Pearson (R), para 5 imágenes obtenidas de cada uno de los colorantes y se calculó el valor medio y su respectivo error estándar, los cuales aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla II.9.** Valores de los coeficientes de Pearson que indican el grado de colocalización de los compuestos con el LT y sus correspondientes errores estándar.

<b>Coefficientes de Pearson</b>			
<b>Xanteno</b>	<b>R</b>	<b>Acridona</b>	<b>R</b>
<b>29</b>	0.72 ± 0.02	<b>35</b>	0.79 ± 0.03

Al analizar el conjunto de imágenes y valores de coeficientes de Pearson se llegó a la conclusión de que efectivamente ambos compuestos **29** y **35** se introducían preferentemente en lisosomas al obtener unos valores de R más elevados de 0.72 y 0.79 (**Tabla II.9**), respecto a los obtenidos previamente al estudiar su localización en mitocondrias, de 0.20 y 0.63 (**Tabla II.8**).

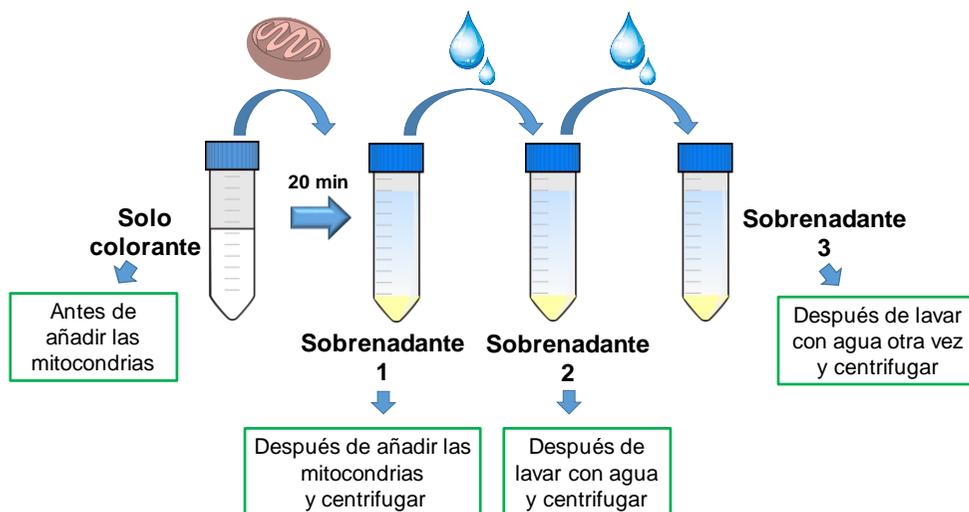
Teniendo en cuenta los modelos de QSAR los resultados obtenidos hasta el momento en el caso de los derivados xanténicos tendrían cierta concordancia con los valores mostrados anteriormente del grado de lipofilia (clogP) de cada una de las posibles sondas. Como se predijo únicamente los xantenos **24**, **25**, **26** y **27** con valores de clogP entre 0 y 5 y un pK<sub>a</sub> cercano a 7, se localizaron en mitocondrias y no lo hizo el xanteno **29** con un valor de clogP negativo, el cual se introdujo en lisosomas. Por su parte las acridonas con valores de clogP entre 0 y 5, a diferencia de lo que cabría esperar no se introdujeron en el núcleo y si se localizaron de forma bastante aceptable en mitocondrias. La única acridona con un clogP superior de en torno a 7 (**34**), como era de esperar se introdujo en otras estructuras como la membrana nuclear y estructuras citoplasmáticas. A su vez **35**, a pesar de no

caracterizarse por un  $\text{clogP}$  negativo se localizó en lisosomas existiendo cierta controversia con los modelos QSAR.

### II.3.4. Medidas de acumulación de colorantes en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar

Al finalizar el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia y obtener los valores de cuantificación de la colocación existente, se realizó un estudio con mitocondrias aisladas de hígados de ratas Wistar, para corroborar los resultados previamente mencionados, excluyendo los derivados **29**, **34** y **35**, que como se comprobó previamente, no mostraron buenos valores de localización mitocondrial.

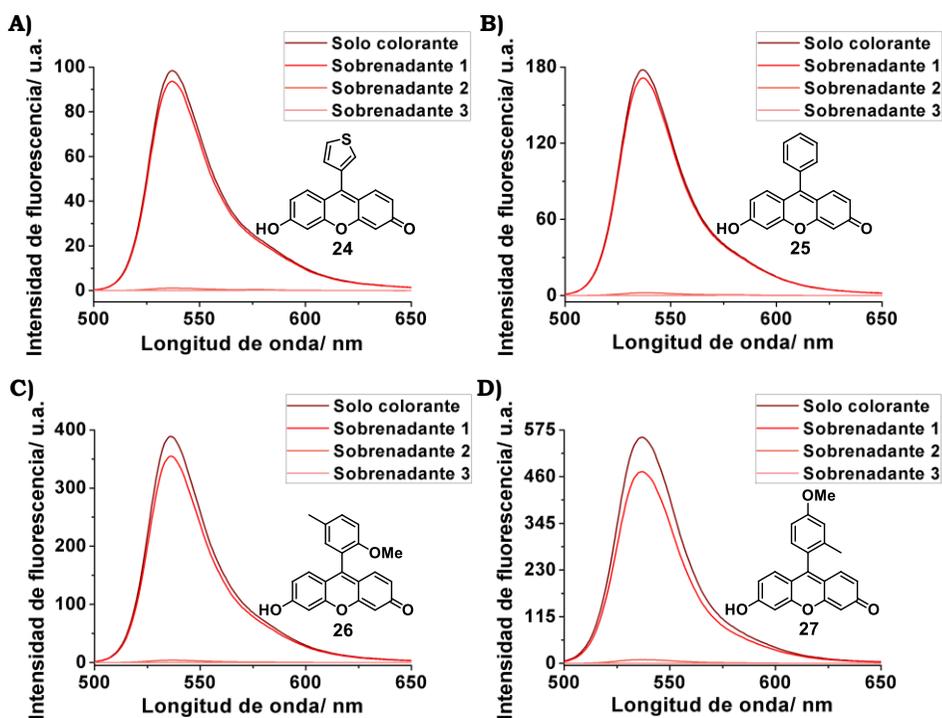
Para llevar a cabo el estudio se siguieron una serie de etapas las cuales se muestran en la **Figura II.42** y se describen con más detalle en la *Parte Experimental Bloque B. Capítulo II. 10. Medidas de acumulación en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar.*



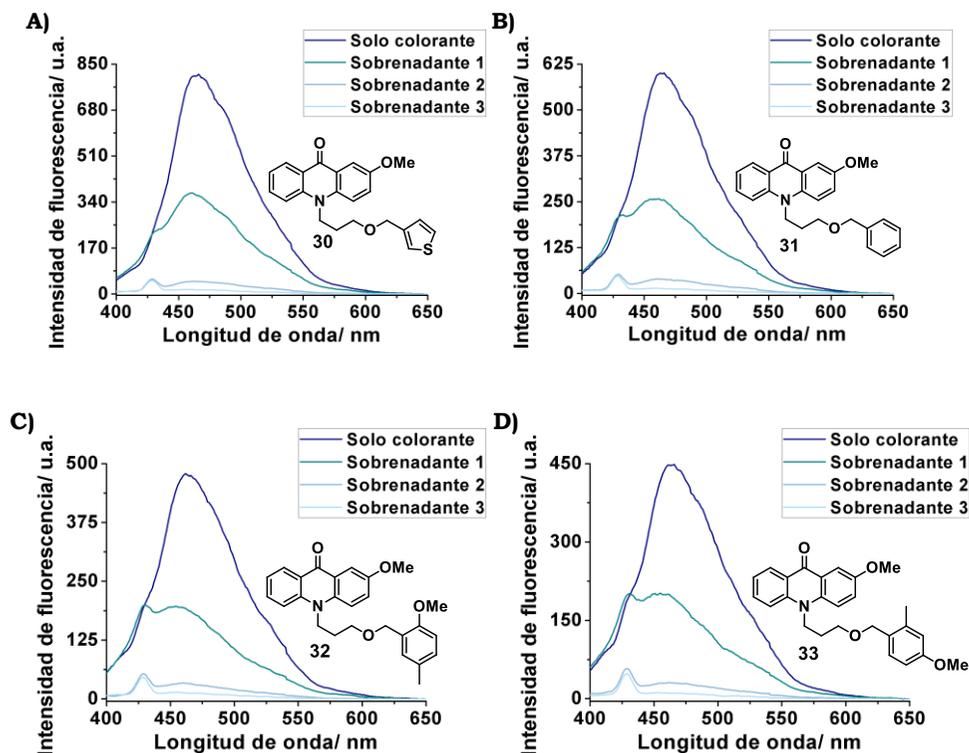
**Figura II.42.** Etapas para la realización de medidas de acumulación en mitocondrias aisladas de ratas Wistar.

Primero se midió la emisión de cada uno de los xantenos y acridonas utilizados a una concentración de  $3 \cdot 10^{-7}$  M disueltos en tampón HEPES-sacarosa. Esta concentración se decidió con la finalidad de usar la misma que la empleada en los ensayos con células MDA-MB-231, comentados

previamente. Tras hacer esta medida a los colorantes solos, estos se incubaron con las mitocondrias aisladas. A continuación, se centrifugaron para retirar el pellet y poder medir la emisión del sobrenadante al que se le numeró como 1. Luego el pellet con el que habían estado en contacto cada uno de los colorantes se lavaron con agua con la finalidad de romper la membrana externa mitocondrial y descubrir si los distintos xantenos y acridonas se expulsaban al exterior o continuaban retenidos en la membrana interna. Tras lavarlo se centrifugó y se volvió a medir la emisión por fluorescencia a lo que se denominó el sobrenadante 2. Como última etapa del ensayo se repitió el proceso de lavado con agua, en este punto para intentar romper la membrana interna mitocondrial y determinar si los compuestos se liberaban al sobrenadante número 3 cuya emisión también se midió.



**Figura II.43.** Medida de la acumulación de los derivados xanténicos en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar mediante espectros de emisión ( $\lambda_{ex} = 485$  nm) del colorante estudiado y los restos de colorante en los sobrenadantes 1, 2 y 3. **A), B), C)** y **D)** Representación de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda de **24-27**, respectivamente.

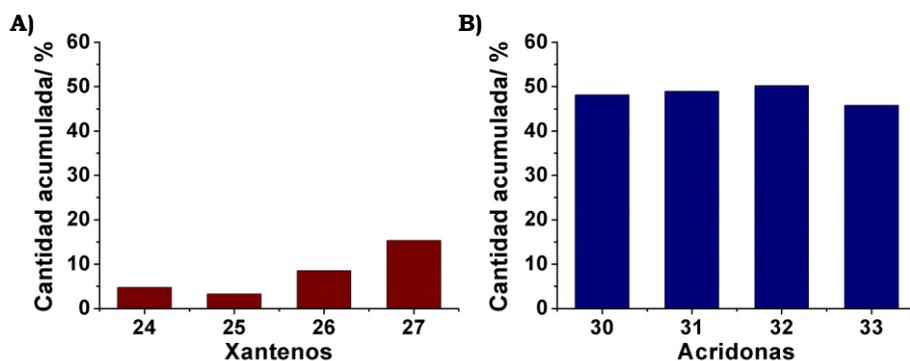


**Figura II.44.** Medidas de acumulación de las acridonas en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar mediante espectros de emisión de las acridonas ( $\lambda_{ex}= 375$  nm) del colorante estudiado y los restos de colorante en los sobrenadantes 1, 2 y 3. **A), B), C)** y **D)** Representación de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda de **30-33**, respectivamente.

Una vez obtenidos todos los espectros de emisión, los cuales se muestran en la **Figura II.43** y **Figura II.44**, en el caso de los xantenos no se observó una disminución muy pronunciada de la intensidad de fluorescencia medida del primer sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación (sobrenadante número 1) con respecto al colorante antes de incubarlo con las mitocondrias aisladas (condición solo colorante). Esto indicó que los derivados xanténicos no se introdujeron en gran medida en las mitocondrias con las que fueron incubados. De manera mucho más perceptible en las acridonas, la emisión del sobrenadante número 1 fue inferior a la de los colorantes antes de ser incubados con las mitocondrias. Este hecho indicó que cierta cantidad de las distintas acridonas se introdujo en las

mitocondrias al entrar en contacto con ellas, de manera que parte de la fluorescencia se perdió al disminuir la concentración de colorante en el sobrenadante número 1. Además, se determinó que al obtener valores de intensidad de fluorescencia muy cercanos a 0 para el resto de los sobrenadantes (sobrenadante número 2 y 3) tanto en los experimentos realizados con derivados xanténicos como con acridonas, estas cantidades de fluoróforos que se introdujeron en las mitocondrias no fueron liberadas de nuevo al medio. Esto puede justificarse porque con los posteriores shocks osmóticos, al lavar el pellet con agua, no se consiguieran romper las membranas externas e internas de las mitocondrias y por tanto no se pudiera liberar el colorante en cuestión.

Finalmente, se obtuvo una estimación de las cantidades porcentuales de cada colorante acumuladas en mitocondrias aisladas. Estos resultados se obtuvieron como la diferencia porcentual entre los valores de emisión de la condición solo colorante y emisión del sobrenadante 1. Estos resultados sirvieron para llegar a la conclusión de que los xantenos tienen menos afinidad por las mitocondrias que se aislaron de hígados de rata que las acridonas, las cuales presentaron unos porcentajes de acumulación más elevados de en torno al 50% (**Figura II.45**).



**Figura II.45.** Comparación de cantidad de compuesto incorporado en mitocondrias de hígado de rata Wistar. **A)** Representación de la cantidad en porcentaje de cada uno de los xantenos acumulados a  $\lambda_{ex}$ = 485 nm. **B)** Representación de la cantidad en porcentaje de cada una de las acridonas acumuladas a  $\lambda_{ex}$ = 375 nm..

En definitiva, se demostró que tanto los derivados xanténicos como las acridonas se acumulan en mitocondrias de hígado de rata, siendo dicha acumulación muy superior en el caso de las acridonas, con porcentajes de acumulación del 50%. A su vez, comprobó que cada uno de los colorantes incorporados en las mitocondrias se quedaron atrapados en el interior.

## II.4. CONCLUSIONS

The conclusions of this chapter are:

- Different non-charged groups have been successfully introduced in xanthene and acridone skeletons with acceptable yields, resulting in two families of fluorophores with a wide range of clogP values.
- All the synthesized dyes have been imaged in MDA-MB-231 cells, with different trackers of mitochondria and lysosomes. It has been demonstrated that many of these compounds with non-charged side groups present mitochondrial localization. In general, acridones showed better results as mitochondrial markers than xanthenes. The best compound for mitochondria staining is **30**, an acridone with a 3-thiophene ring in its structure. In contrast, the dyes with a 3-pyridine group in their structure, **29** and **35**, exhibit good behaviour as lysosome markers.
- In any case, the colocalization in the targeted organelles is not specific, so it will be necessary to improve the structures. Should novel, non-charged, carrier groups for controlled delivery in different cellular organelles be optimized, in the future, it will be possible to design more specific and efficient drugs by controlling its localization by choosing the appropriate side group.

# **CAPÍTULO III.**

Sensores de pH  
específicos para FLIM

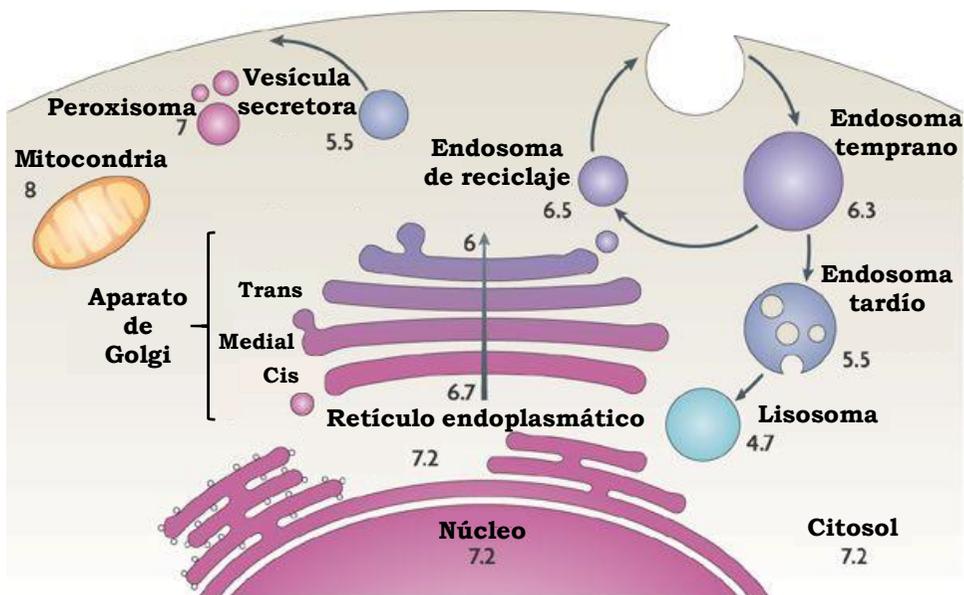


### III. SENSORES DE pH ESPECÍFICOS PARA FLIM

#### III.1. ANTECEDENTES

Como se ha comentado en la *Introducción del bloque B*, en enfermedades neurodegenerativas<sup>[289]</sup> o en enfermedades como el cáncer<sup>[290],[291]</sup>, existen alteraciones que sufren las células entre las que se encuentran valores anormales de pH intracelular e intramitocondrial, que se asocian con una función, metabolismo, crecimiento o división de las células inadecuado<sup>[292]</sup>.

El pH es una medida de la acidez o basicidad de un medio que viene determinada por la concentración de protones del mismo. En condiciones normales, como se observa en la **Figura III.1**, cada orgánulo y compartimento de la célula se caracteriza por un pH concreto. De forma que los valores de pH intracelular y extracelular son de 7.2 y 7.4, respectivamente<sup>[293]</sup> y, a su vez, cada uno de los orgánulos celulares también tiene un valor de pH que le caracteriza, como es el caso, por ejemplo, de los lisosomas en torno a 5, o el caso del interior de las mitocondrias en torno a 8<sup>[294]</sup>.



**Figura III.1.** Valores de pH característico de los diferentes orgánulos y compartimentos celulares. Figura adaptada desde<sup>[294]</sup> con permiso de Springer Nature.

Por un lado, el pH intracelular es un parámetro que está directamente implicado en procesos celulares y enzimáticos, entre los que destacan la transducción de señales<sup>[295]</sup>, el transporte de iones, la homeostasis<sup>[296]</sup>, la endocitosis<sup>[297]</sup>, la proliferación y la apoptosis de las células<sup>[298],[299]</sup>. Además, está relacionado con la resistencia a ciertos fármacos<sup>[300]</sup>. Por otro lado, el mantenimiento del pH intramitocondrial, es fundamental en funciones metabólicas, que tienen lugar en el interior mitocondrial, como la regulación de reacciones redox y la apoptosis de las células<sup>[301]</sup>, de manera que pequeños cambios del pH inducen la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ocasionan un mal funcionamiento de las mitocondrias<sup>[302]</sup>. En este capítulo nos centraremos en el desarrollo de sensores luminiscentes específicos para medir cuantitativamente las fluctuaciones de la concentración de protones que tienen lugar en el interior celular y mitocondrial.

### **III.1.1. Sensores de pH**

Debido a la importancia de este parámetro, desde hace años se ha invertido mucho tiempo en el desarrollo de multitud de indicadores de pH. Entre ellos, destacan los sensores fluorescentes que permitan obtener información visual y cuantitativa de las fluctuaciones de pH a tiempo real, y así, poder establecer una conexión entre estas variaciones y los procesos patológicos que las provocan<sup>[301],[195]</sup>.

En cuanto al diseño de estos sensores, están constituidos por fluoróforos que, según el pH del medio, se encuentran en su forma básica o ácida, ambas con propiedades espectrales diferentes. El análisis de esas propiedades se utiliza de forma indirecta para la estimación de valores de pH. A su vez, estos sensores deben poseer un  $pK_a$  cercano al pH del medio de estudio, en este caso, o bien en torno a 7, para el interior celular o en torno a 8, en las mitocondrias. Además, deben cumplir ciertos requisitos como son que muestren una elevada sensibilidad, buena selectividad y fotoestabilidad, que el tiempo de respuesta a variaciones de pH sea corto, trabajen dentro del rango de pH adecuado, su grado de toxicidad sea bajo y permitan realizar, si es posible, estudios a tiempo real, *in situ*<sup>[195]</sup>.

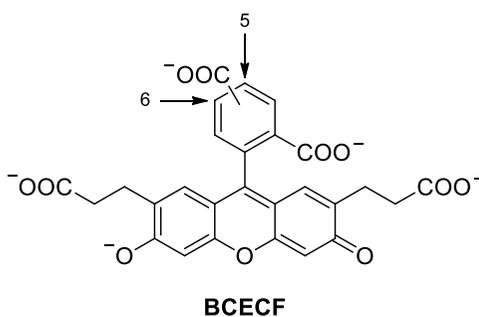
### III.1.1.1. Sensores de pH intracelular

A continuación, se van a mencionar algunos de los sensores luminiscentes de pH más utilizados para medir cambios de este parámetro en el interior celular<sup>[292]</sup>, hasta día de hoy.

#### III.1.1.1.a) Derivados de la fluoresceína BCECF

Desde hace años, uno de los sensores de pH intracelular de mayor uso es el derivado de la fluoresceína denominado 2',7'-Bis-(2-carboxietil)-5-(6)carboxifluoresceína conocido como BCECF. Tanto la fluoresceína como el BCECF son sensibles a cambios de pH y se diferencian estructuralmente en que el BCECF, como se puede ver en **Figura III.2**, está constituido por cuatro ácidos carboxílicos lo que le confiere una mayor facilidad de penetración y retención en células con respecto a la fluoresceína original<sup>[292]</sup>.

Dichos grupos funcionales junto con el grupo hidroxilo en posición 6, están desprotonados alrededor del pH neutro, de forma que la molécula se encuentra a esos valores de pH en sus formas tetra y pentaaniónica, ambas con propiedades fluorescentes diferentes<sup>[303]</sup>.



**Figura III.2.** Forma pentaaniónica del sensor de pH BCECF.

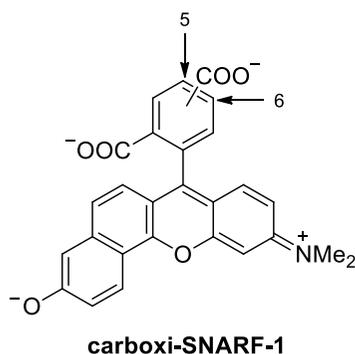
BCECF es un sensor ratiométrico (*metodología descrita con detalle en el apartado III.1.2.2*) que se emplea a dos longitudes de onda de excitación diferentes, usualmente 490/440 nm. En cuanto a sus propiedades fotofísicas, presenta un  $pK_a$  de 7 y funciona en un rango de detección de pH de 6.8 a 7.4. En medio básico se encuentra preferentemente la forma

pentaaniónica, la cual posee un máximo de absorción a 503 nm, un máximo de emisión a 528 nm y un rendimiento cuántico de 0.84<sup>[292],[227]</sup>.

Sin embargo, a pesar de haber sido un candidato perfecto para estudiar el pH intracelular durante años<sup>[304],[305],[306]</sup>, presenta una serie de inconvenientes. El principal es la fuerte dependencia de su  $pK_a$  con la fuerza iónica, que varía según el medio y hace que su uso en la determinación de valores de pH cuantitativos no sea muy fiable<sup>[303]</sup>. Además presenta una tasa de fuga elevada, al cabo de 10-20 minutos del 10 %<sup>[304]</sup> y pierde intensidad de fluorescencia tras una exposición prolongada a la luz de excitación (fotodecoloración). Por tanto, se ha hecho necesario el desarrollo de otros colorantes<sup>[292]</sup>.

### III.1.1.1.b) Benzo [c] xanteno carboxi-SNARF-1

El carboxi-seminaftorodafluor-1 o carboxi-SNARF-1 es el segundo colorante más empleado como sensor de pH. Este sensor, en función de la concentración de protones del medio, puede encontrarse en equilibrio entre su forma monoaniónica y dianiónica, la cual se muestra en la **Figura III.3**, ambas con propiedades fluorescentes diferentes<sup>[292],[307]</sup>.



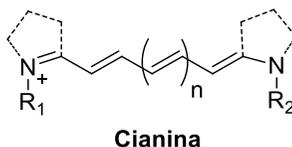
**Figura III.3.** Forma dianiónica del sensor de pH carboxi-SNARF-1.

En este caso se trata de un sensor ratiométrico con emisión dual a longitudes de onda 580/640 nm<sup>[227]</sup> ampliamente utilizado<sup>[308],[309],[310]</sup>. Presenta un  $pK_a$  de 7.5, lo que facilita su uso en un rango de pH de 7 a 8. En medio básico se encuentra preferentemente la forma dianiónica, la cual posee

un máximo de absorción a 583 nm y un máximo de emisión a 631 nm. Como ventaja, al ser un sensor que por sus propiedades puede ser excitado con longitudes de onda largas, cercanas al rojo, evita interferencias de la autofluorescencia celular. Por el contrario, como inconvenientes posee unos rendimientos cuánticos de fluorescencia bastante bajos, de 0.03 en el caso de la forma aniónica y de 0.09 en el de la dianiónica<sup>[292]</sup>, y sus propiedades fotofísicas se ven afectadas por determinadas temperaturas y ambientes celulares<sup>[311]</sup>.

#### III.1.1.1.c) Derivados de cianinas

Las cianinas son fluoróforos constituidos por una cadena de polimetina unida en sus extremos a dos átomos de nitrógeno cuaternario que pueden o no formar parte de un anillo heterocíclico, como se muestra en la **Figura III.4**. A su vez, dicha cadena está formada por un número de carbonos impar unidos entre sí mediante enlaces dobles o sencillos<sup>[312]</sup>.



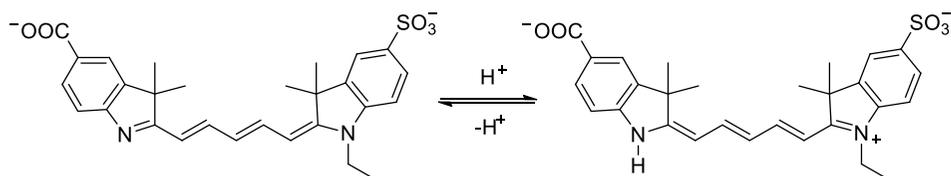
**Figura III.4.** Estructura catiónica de cianinas.

Según el número de grupos metino en la cadena, se denominan con diferentes prefijos como mono, penta o heptacianinas, de manera que sus propiedades varían en función de dicho número. De todos ellos, los derivados de cianina con estructura de indol sin alquilar en uno de los átomos de N son los capaces de medir fluctuaciones de pH debido a cambios en sus propiedades fluorescentes. Sus estructuras neutras no presentan fluorescencia, en cambio cuando uno de los átomos de N se protona son altamente fluorescentes<sup>[292]</sup>. Existen multitud de derivados de cianina que son sensibles a variaciones del pH<sup>[313],[314],[315],[316]</sup>.

En general, estos derivados se han empleado tanto para la medida de pH intracelular en un rango de 6.8 a 7.4, como para la medida de pH en

orgánulos con ambiente ácido en un rango de 4.5 a 6. Como principal ventaja emiten en la región del IR cercano lo que evita las interferencias propias de la autofluorescencia celular y favorecen la mayor penetración en tejidos. Además, poseen propiedades fotofísicas óptimas, lo que les convierte en una buena opción para analizar valores de pH<sup>[292]</sup>.

Un ejemplo de sensor de cianina es la pentametina conocida como sulfo-Cy5, cuya estructura aparece en la **Figura III.5**. Dicha estructura tiene incorporados un grupo de ácido sulfónico con la finalidad de mejorar su solubilidad en medios acuosos<sup>[317]</sup> y un ácido carboxílico a través del cual pueden enlazarse determinadas biomoléculas. Su funcionamiento se basa en que en función de la concentración de protones del medio el átomo de N del grupo indol puede protonarse, existiendo un equilibrio entre la forma dianiónica, no fluorescente y la forma monoaniónica que si lo es (**Figura III.5**). Se trata por ello de un compuesto sensible a la concentración de protones del medio que tiene un  $pK_a$  de en torno a 7.5, por lo que se utiliza en un rango de 6 a 9. Su forma fluorescente tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 645 nm y el máximo de emisión a una longitud de onda de emisión de 665 nm<sup>[314]</sup>.

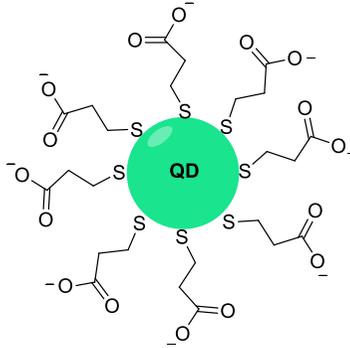


**Figura III.5.** Equilibrio entre la forma dianión-monoanión de la cianina sulfo-Cy5.

#### III.1.1.1.d) Quantum dots

Los Quantum dots (QD) son nanopartículas semiconductoras inorgánicas, de tamaño nanométrico, que se utilizan como marcadores fluorescentes debido a sus adecuadas propiedades fotoluminiscentes como elevados rendimientos cuánticos, tiempos de vida de fotoluminiscencia largos y resistencia a la fotodecoloración. Son nanoestructuras fotoestables que emiten fotoluminiscencia en el rango del visible al infrarrojo en función de su composición y su tamaño, siendo su principal inconveniente la baja

solubilidad en agua, la cual se solventa con recubrimientos orgánicos como los de tipo anfifílico que se muestra en la **Figura III.6** con ácido mercaptopropiónico<sup>[193],[318]</sup>.



**Figura III.6.** QD modificado con ácido mercaptopropiónico.

Sus aplicaciones han sido diversas, siendo en los últimos años su uso como sensores de pH una de las más importantes<sup>[319],[320],[321]</sup>. En este sentido, son capaces de medir variaciones de pH ya que, según la concentración de los protones del medio, los ligandos que se utilizan para recubrir los QD se protonan en un mayor o menor grado, cambiando las propiedades de transferencia electrónica hacia el núcleo semiconductor. Esto hace que la intensidad de luminiscencia de los QD varíe y sea dependiente de los valores de pH del medio, permitiendo el seguimiento de las variaciones de dicho parámetro<sup>[322]</sup>.

En cuanto a la cuantificación de los valores de pH medidos con estas nanopartículas, se han estimado a partir de cambios de valores de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda única<sup>[319],[320],[321]</sup> o bien empleando métodos ratiométricos<sup>[322],[323]</sup> o mediante la técnica de microscopía de tiempos de vida de fluorescencia conocida como FLIM (*las medidas mediante FLIM están descritas en mayor profundidad en el apartado III.1.2.3*). En este tercer caso, se planteó el diseño de sensores FLIM como consecuencia de sus elevados tiempos de vida de fotoluminiscencia. Como ventaja de este método, como se verá posteriormente, en lugar de estimar valores de pH en función de la intensidad se estiman a través de los tiempos de vida, independientes

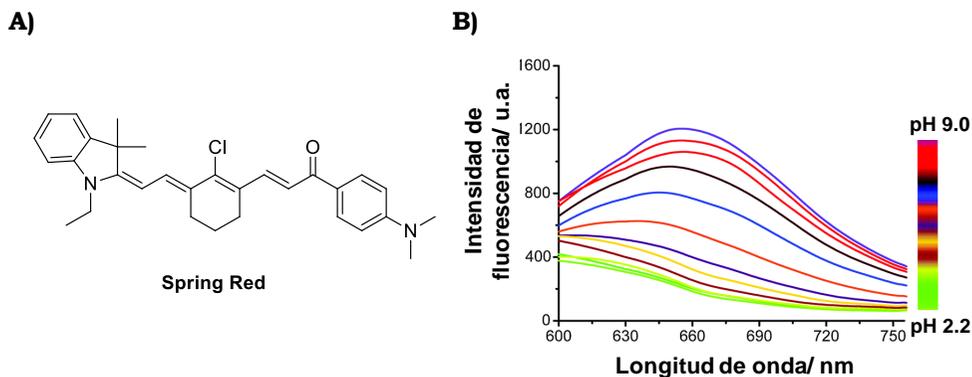
de la concentración de la especie emisora<sup>[324]</sup>. En relación a ello, *nuestro grupo de investigación* desarrolló el primer sensor basado en QD capaz de estimar valores de pH en función de los valores de tiempo de vida de fotoluminiscencia obtenidos. Se trata de un nanosensor de CdSe/ZnS recubierto con ácido mercaptopropiónico que se utilizó para medir variaciones de pH en un rango de 5.2 a 6.9<sup>[324],[325]</sup>.

### III.1.1.2. Sensores de pH intramitocondrial

En cuanto al análisis del pH en el interior de mitocondrias, algunos de los requisitos adicionales que deben tenerse en cuenta en el diseño de estos sensores son que su estructura sea específica y esté orientada a su incorporación en la matriz mitocondrial<sup>[326]</sup>.

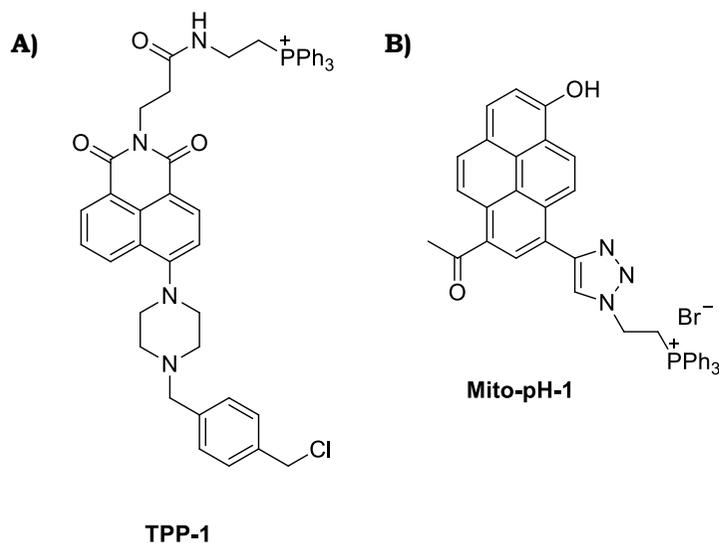
En una de las primeras aproximaciones, compuestos como el carboxi-SNARF-1, mencionado con anterioridad, fue utilizado como sensor de pH intramitocondrial<sup>[327]</sup>. Sin embargo, al cabo de los años se diseñaron sensores funcionalizados con grupos concretos en su estructura que permitiesen dirigirlos a mitocondrias con mayor especificidad.

En este sentido en 2014, Li *et al.*<sup>[328]</sup> sintetizaron un sensor fluorescente con emisión en la región espectral del IR cercano al que denominaron Spring Red. Éste posee un  $pK_a$  6.3 y está constituido por un grupo dimetilamino que hace que sea sensible a cambios de pH (**Figura III.7 A**). Como se observa en la **Figura III.7 B**), a mayores valores de pH, mayor es la intensidad de fluorescencia que emite. Además, con la finalidad de estudiar si la molécula se dirigía y acumulaba en mitocondrias también se llevó a cabo un estudio de localización mitocondrial en células HepG2 con ayuda del marcador de mitocondrias Mito Tracker Green, similar a los realizados en el *Capítulo II*.



**Figura III.7.** **A)** Estructura del sensor de pH intramitocondrial Spring Red y **B)** Espectros de emisión de Spring Red a diferentes valores de pH ( $\lambda_{ex}=530$  nm). Figura adaptada desde<sup>[328]</sup> con permiso de la Royal Society of Chemistry.

Una de las estrategias más empleadas para la dirección de sensores de pH a las mitocondrias es la incorporación en la estructura de grupos directores específicos a mitocondrias como pueden ser los cationes de trifenilfosfonio (TPP), los cuales ya se mencionaron en el *Capítulo II*. Algunos ejemplos de este tipo de sensores se pueden observar en la **Figura III.8**.



**Figura III.8.** Sensores de pH con un resto de TPP en su estructura. **A)** Sensor TPP-1 descrito en la referencia<sup>[329]</sup> y **B)** Sensor Mito-pH-1 descrito en la referencia<sup>[330]</sup>.

El primero, TPP-1, se trata de un sensor constituido por una naftalimida basada en piperizina que actúa como fluoróforo, cloruro de bencilo que induce la fijación mitocondrial y TPP que es el responsable de dirigir el sensor a mitocondrias<sup>[204]</sup> y poder medir el pH en el interior de este orgánulo. Éste fue utilizado para medir variaciones de pH a tiempo real asociadas con la acidificación mitocondrial utilizando microscopía confocal. Al disminuir el pH del medio, mayor era la intensidad de fluorescencia observada del sensor, parámetro por tanto que se utilizó para la estimación del pH. A su vez previamente, con el objetivo de asegurarse de que el sensor se acumulase en mitocondrias, se realizaron estudios de localización mitocondrial. Éste se llevó a cabo en células HeLa utilizando como marcador de mitocondrias Mito Tracker Red, determinándose que la colocalización era bastante buena, con valores del coeficiente de Pearson de 0.87<sup>[329]</sup>.

El segundo, Mito-pH-1, con un  $pK_a$  de 7.33, está constituido por hidroxipireno como fluoróforo y TPP para dirigir el sensor a mitocondrias y medir el pH en dicho orgánulo. Funciona a través de la protonación-desprotonación del hidroxilo fenólico dando lugar a dos especies en equilibrio. Su intensidad de fluorescencia varía a medida que el pH del medio aumenta y ese cambio se utilizó para cuantificar valores de pH del medio. En este caso también se realizaron estudios de localización mitocondrial. Estos se llevaron a cabo en células HeLa y fibroblastos NIT/3T3 utilizando como marcador de mitocondrias MitoTracker Red. En estos experimentos se llegó a la conclusión, al obtener unos valores de coeficientes de Pearson de 0.97 y 0.96 respectivamente, que la colocalización de Mito-pH-1 y el MitoTracker era aceptable en ambas líneas celulares.

### **III.1.2. Técnicas de medida de pH celular con sensores luminiscentes**

Para poder analizar los cambios de pH intracelular que pudieran estar relacionados con diferentes patologías empleando sensores luminiscentes de pH como los descritos en el apartado anterior, las técnicas de imagen de referencia empleadas a lo largo de los años se han basado en variantes de la microscopía de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia comprende una familia de técnicas no invasivas, con gran sensibilidad y buena selectividad, que permiten la detección de parámetros en células vivas a tiempo real. Mediante estas técnicas se obtienen imágenes de intensidad de fluorescencia las cuales dependen de la concentración del fluoróforo e indican dónde se encuentra éste en la muestra, permitiendo localizarlo en píxeles concretos de la imagen<sup>[181]</sup>. Sin embargo, esta dependencia de la intensidad emitida con la concentración de la sonda fluorescente supone una importante desventaja a la hora de cuantificar analitos.

Así pues, para desarrollar aplicaciones cuantitativas independientes de la concentración del fluoróforo, basadas en microscopía de fluorescencia para el interior celular, como alternativas han sido ampliamente utilizados los métodos ratiométricos y la microscopía FLIM.

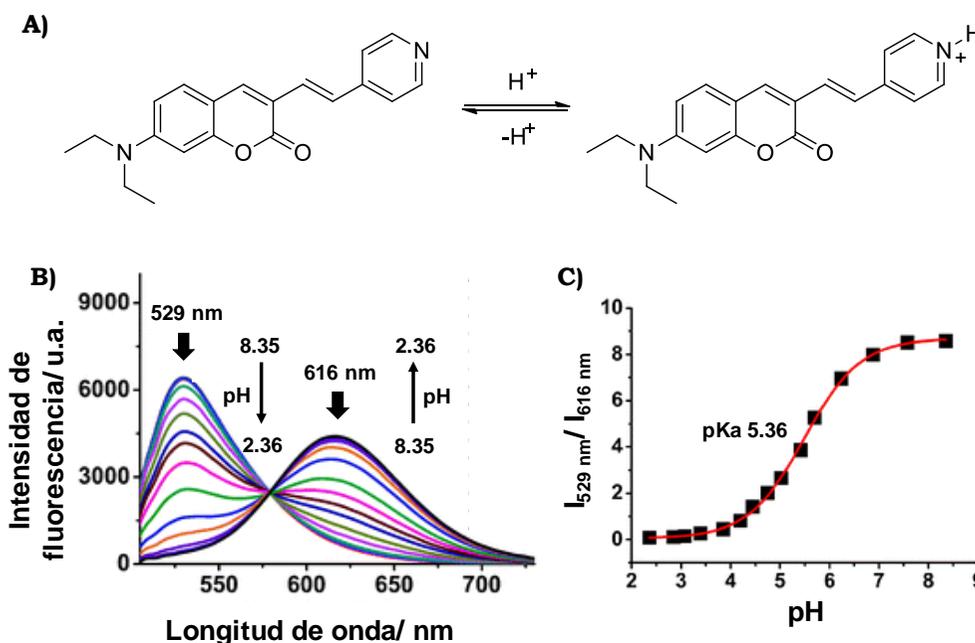
### **III.1.2.1. Métodos ratiométricos**

Los métodos ratiométricos surgieron hace años y se emplean para la cuantificación de determinados analitos mediante el uso de sensores con excitación o emisión dual. Estos sensores se caracterizan por la presencia de dos bandas de intensidad de fluorescencia, a dos longitudes de onda diferentes, que varían en presencia del analito. De manera que el cálculo del cociente de intensidades a esas dos longitudes de onda ofrece una medida indirecta de la cantidad de dicho analito en el medio<sup>[331]</sup>.

En relación a ello, existen gran variedad de sensores ratiométricos que se han utilizado, entre otras aplicaciones para medir en células concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$ <sup>[332]</sup>,  $\text{K}^+$ <sup>[333]</sup>,  $\text{F}^-$ <sup>[334]</sup>, glutatión<sup>[335]</sup> y valores de pH<sup>[227],[322],[336],[337],[338],[339],[340]</sup>.

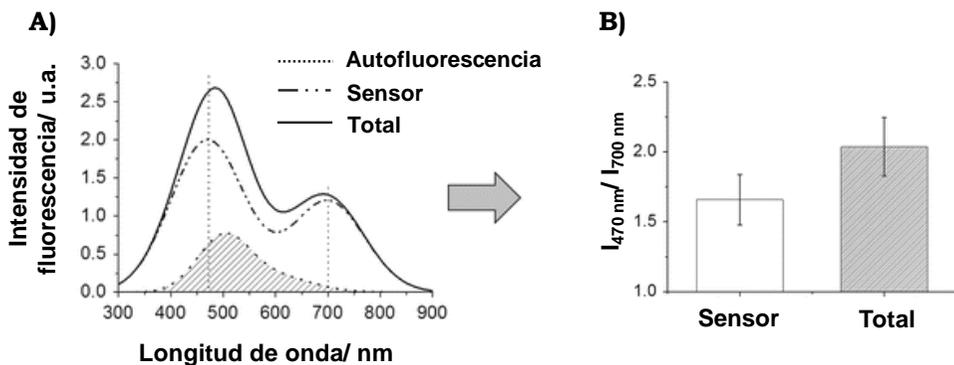
A continuación, se muestra un ejemplo de sensor de pH ratiométrico constituido por una amino-cumarina como fluoróforo. Esta molécula se encuentra en sus formas neutra o protonada en equilibrio en función de la concentración de protones del medio (**Figura III.9 A**).

Dicho sensor, como se puede ver en la **Figura III.9 B)**, se caracterizó por la presencia de dos bandas de emisión a dos longitudes de onda distintas, una a 529 nm y otra a 616 nm, correspondientes a la forma neutra y protonada respectivamente, las cuales variaron en función del pH. Tras comprobar los cambios en los valores de intensidad de fluorescencia a esas dos longitudes de onda en un rango de pH de 2.36 a 8.35, se calcularon los cocientes de intensidad  $I_{529\text{nm}}/I_{616\text{nm}}$ . A continuación, con la finalidad de obtener una curva de calibrado para el uso de dicho sensor para cuantificar valores de pH se representaron los cocientes de intensidades frente a valores de pH. A su vez, como se observa en la **Figura III.9 C)**, se determinó mediante un ajuste no lineal de la curva de calibrado el valor del  $pK_a$ , de 5.36, mediante el que concluyeron que dicho sensor era útil para medir valores de pH en un rango de 4 a 6.5<sup>[336]</sup>.



**Figura III.9.** Ejemplo de sensor de pH ratiométrico. **A)** Equilibrio ácido-base del sensor de pH ratiométrico basado en amino-cumarina, **B)** Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia a diferentes valores de pH del medio, entre 2.36 y 8.35 ( $\lambda_{ex}=495\text{ nm}$ ) y **C)** Obtención de la curva de calibrado y estimación del  $pK_a$  mediante la representación gráfica del cociente de intensidades de fluorescencia a 529 y 616 nm frente a valores de pH. Figura adaptada desde<sup>[336]</sup> con permiso de la Royal Society of Chemistry.

Sin embargo, estos métodos ratiométricos también tienen ciertos inconvenientes como son la influencia de la autofluorescencia celular en la señal de medida principalmente a longitudes de onda inferiores a 550 nm, la cual puede afectar a la señal real del sensor, como se puede ver en la **Figura III.10**. Además hay que considerar la falta de robustez asociada a la hora de medir varios parámetros a la vez, haciéndose necesario el uso de dos canales por cada parámetro detectado para poder reconstruir las imágenes adquiridas<sup>[341]</sup>.



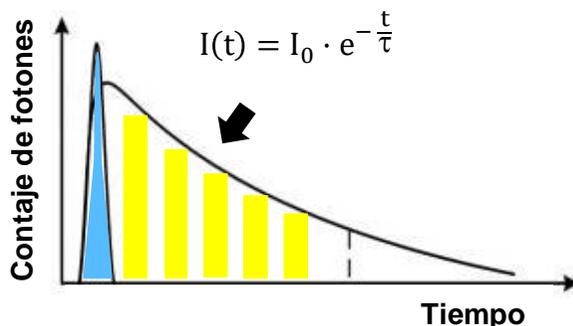
**Figura III.10.** Influencia de la autofluorescencia celular en métodos ratiométricos. **A)** Espectros de emisión de fluorescencia simulados para la autofluorescencia propia de la célula, el sensor y la suma total de ambos y **B)** Cálculo del cociente de intensidades a 470 y 700 nm donde se muestra el error sistemático en la señal total. Figura adaptada desde<sup>[341]</sup>.

Con el fin de evitar los inconvenientes mencionados, existe la posibilidad de utilizar técnicas alternativas como es la microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM), una variante de la microscopía de fluorescencia clásica, en la cual nos centraremos a continuación.

### III.1.2.2. Microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM)

La microscopía FLIM surge en 1989 de la combinación de la microscopía de fluorescencia convencional con la técnica de fluorimetría resuelta en el tiempo<sup>[187]</sup>. Es una técnica que consiste en la reconstrucción de imágenes multidimensionales a partir de la medida de la cinética del proceso emisor de un determinado fluoróforo, mediante la cual se accede a los valores de tiempo de vida de luminiscencia de éste.

Cuando un fluoróforo pasa al estado excitado, mediante la excitación por un pulso de luz, se desactiva mediante una cinética de decaimiento exponencial, que se muestra en la **Figura III.11**, a partir del cual se obtienen los valores de tiempo de vida de luminiscencia, que en fluoróforos convencionales suelen ser del orden de nanosegundos<sup>[341]</sup>.



**Figura III.11.** Cinética de desactivación del fluoróforo (decaimiento exponencial) tras la excitación por un pulso de luz (en azul).

El tiempo de vida de luminiscencia o tiempo de decaimiento ( $\tau$ ) es un parámetro cinético que puede interpretarse aproximadamente como el tiempo promedio en el que un fluoróforo permanece en el estado excitado antes de desactivarse mediante la emisión de un fotón y pasar al estado fundamental<sup>[342]</sup>. Se define cinéticamente, como se muestra en la **Ecuación III.1**, mediante la inversa de la suma de todas las constantes cinéticas de los procesos implicados en la desactivación.

$$\text{Ecuación III.1} \quad \tau = \frac{1}{k}$$

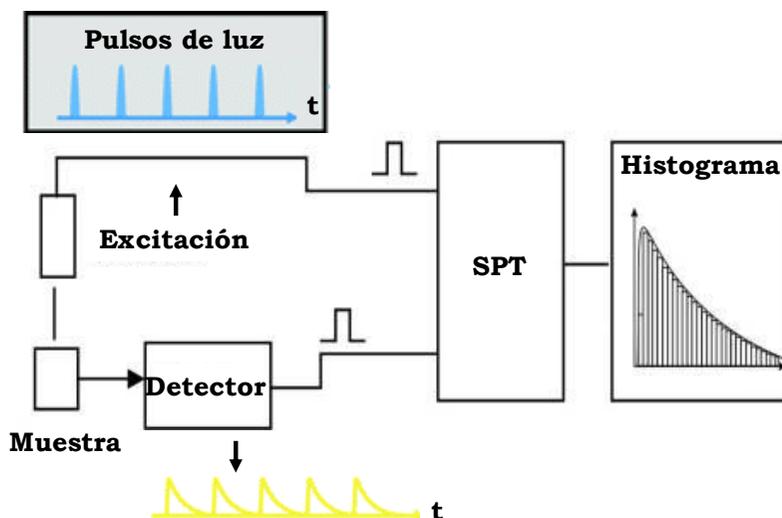
siendo  $k$  la suma de todas las constantes de velocidad de los procesos implicados en la desactivación del fluoróforo. Habitualmente  $k$  engloba la constante de velocidad de los procesos de desactivación por fluorescencia,  $k_F$  y la constante de velocidad de los procesos no radiativos,  $k_{NR}$ , quedando la expresión de  $\tau$  como se muestra en la **Ecuación III.2**.

**Ecuación III.2**

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{NR}}$$

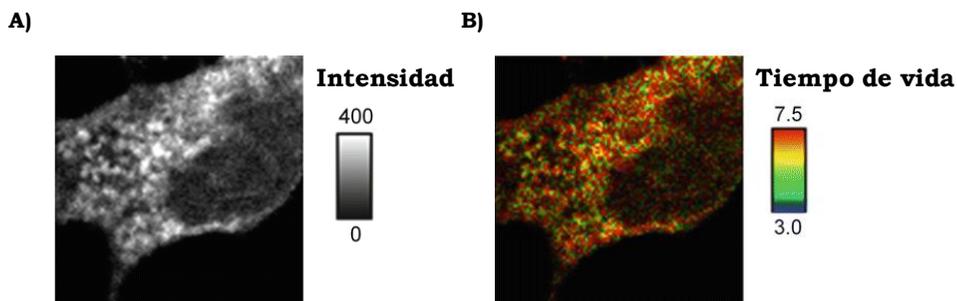
Para realizar la medida experimental de los tiempos de vida de luminiscencia se utilizan las técnicas de fluorimetría con resolución temporal. Existen tradicionalmente dos variantes de estas técnicas, cuyo fundamento es muy diferente. Por un lado, se encuentran las técnicas de fase-modulación (dominio de frecuencia), y por otro, las técnicas de conteo de fotones individuales (SPT, por *single photon timing*, en el dominio de tiempo)<sup>[343],[344]</sup>. Considerando que en esta Tesis Doctoral solo se han utilizado técnicas que trabajan en el dominio de tiempo, es en este método en el que nos centraremos a continuación.

El método SPT, como se muestra en la **Figura III.12**, consiste en el lanzamiento de pulsos de luz cortos para excitar al fluoróforo en cuestión, detectando a continuación el tiempo que tarda en emitir un fotón dicho fluoróforo respecto al pulso de excitación al que se ha sometido previamente. Este procedimiento se repite numerosas veces obteniendo finalmente una distribución de tiempos promedio de llegada de fotones. Dicha distribución se corresponde con el decaimiento de emisión de luminiscencia, a partir del cual se obtiene el valor de tiempo de vida como se ha mencionado anteriormente<sup>[345]</sup>. Una vez recogido el decaimiento, éste se ajusta a una función mono- o multiexponencial, teniendo en cuenta la convolución con el perfil temporal del pulso de excitación (IRF, por *instrument response function*), obteniéndose, tras el ajuste, los valores de los tiempos de vida de luminiscencia,  $\tau$ .



**Figura III.12.** Metodología de conteo de fotones individuales (SPT) Figura adaptada desde<sup>[346]</sup>.

La unión de esta técnica de fluorimetría con resolución temporal con la microscopía de fluorescencia da lugar a la microscopía FLIM. En ella, en cada escaneo de la muestra se recoge un decaimiento de luminiscencia en cada uno de los píxeles de la imagen. De manera que, a través de esos decaimientos se obtiene una imagen que contiene información de tiempos de vida de luminiscencia en todos los píxeles. Como se muestra en la **Figura III.13**, las imágenes que se adquieren son multidimensionales, es decir contienen información intrínseca tanto del tiempo de vida en cada uno de los píxeles (**Figura III.13 B**) como de la intensidad total recogida (**Figura III.13 A**), que se corresponde con el número de fotones totales que componen el decaimiento.



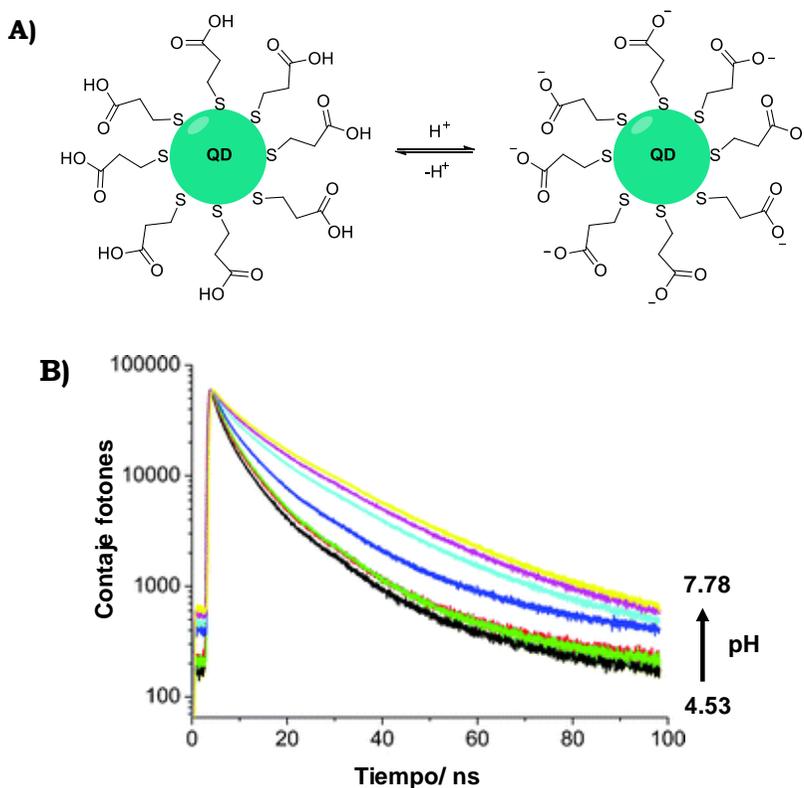
**Figura III.13.** Imágenes multidimensionales FLIM. **A)** Imagen de intensidad y **B)** Imagen de tiempo de vida de fluorescencia, representado en una escala de colores arbitraria. Figura adaptada desde<sup>[341]</sup>.

La principal ventaja que supone esta técnica es que el parámetro cinético que se obtiene al analizar dichas imágenes ( $\tau$ ) es independiente de la concentración del fluoróforo, aunque pueden depender del entorno celular<sup>[181]</sup>. Cambios en el pH o la presencia de determinados analitos en las células pueden producir modificaciones en el tiempo de vida del fluoróforo, lo que hace que esta técnica se convierta en una herramienta idónea para el estudio de diversos procesos que suceden en sistemas biológicos<sup>[347]</sup>.

Es por ello que se han diseñado sensores específicos para FLIM cuyas aplicaciones son la detección y cuantificación de parámetros como el pH<sup>[324]</sup>, la viscosidad<sup>[348]</sup>, estimar la concentración intracelular de diferentes analitos, como iones fosfato<sup>[349]</sup> (como se verá en el *Capítulo IV*),  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[350]</sup>,  $\text{Cl}^{-}$ <sup>[351]</sup> o  $\text{Zn}^{2+}$ <sup>[352]</sup>. Además, se ha empleado para realizar estudios de tejidos, los cuales han permitido detectar células cancerígenas de un melanoma según la profundidad de las capas de la piel<sup>[353]</sup>.

Anteriormente ya se comentó brevemente un ejemplo de sensor de pH empleado en microscopía FLIM basado en nanopartículas de QD recubiertas con ácido mercaptopropiónico (MPA-QD) (**Figura III.14 A**). Tras haber profundizado ahora en el fundamento de la microscopía FLIM, se describe a continuación el funcionamiento de dicho sensor. Los conjugados MPA-QD se seleccionaron ya que al medir en disolución su cinética de decaimiento a diferentes pH, como se observa en la **Figura III.14 B**), se comprobó que los

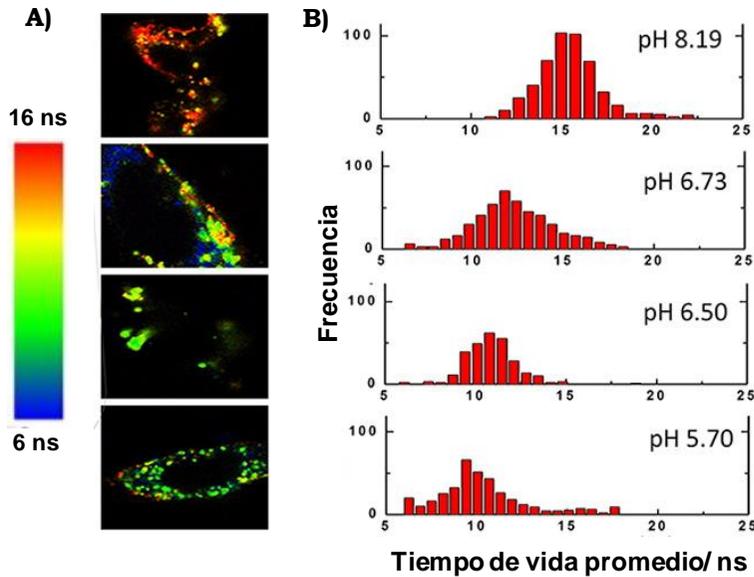
valores de tiempo de vida variaban. Por tanto, este parámetro podría ser utilizado para la cuantificación del pH del interior celular<sup>[325]</sup>.



**Figura III.14. A)** Equilibrio entre la forma neutra y protonada del sensor de pH MPA-QD y **B)** Decaimientos de luminiscencia de las nanopartículas MPA-QD en suspensión acuosa a diferentes pH. Figura adaptada desde<sup>[325]</sup> con permiso de la Royal Society of Chemistry.

Una vez comprobado ese fenómeno, las nanopartículas se incubaron en la línea celular de ovario de hámster chino CHO-k1 variando el pH de 4.70 a 8.2 exponiendo las células al ionóforo de intercambio  $H^+/K^+$  nigericina. Tras este proceso las muestras se midieron mediante microscopía FLIM obteniéndose las imágenes de tiempo de vida que se muestran en la **Figura III.15**. En ellas se observan distintos valores de tiempo de vida según el pH del medio. A su vez, se obtuvieron los histogramas de distribución de tiempos de vida mediante los cuales el análisis de esos cambios tiene un carácter más cuantitativo. Todo ello indicó una adecuada respuesta de los nanosensores a

cambios de pH intracelular medida mediante el parámetro cinético de tiempo de vida<sup>[324]</sup>.

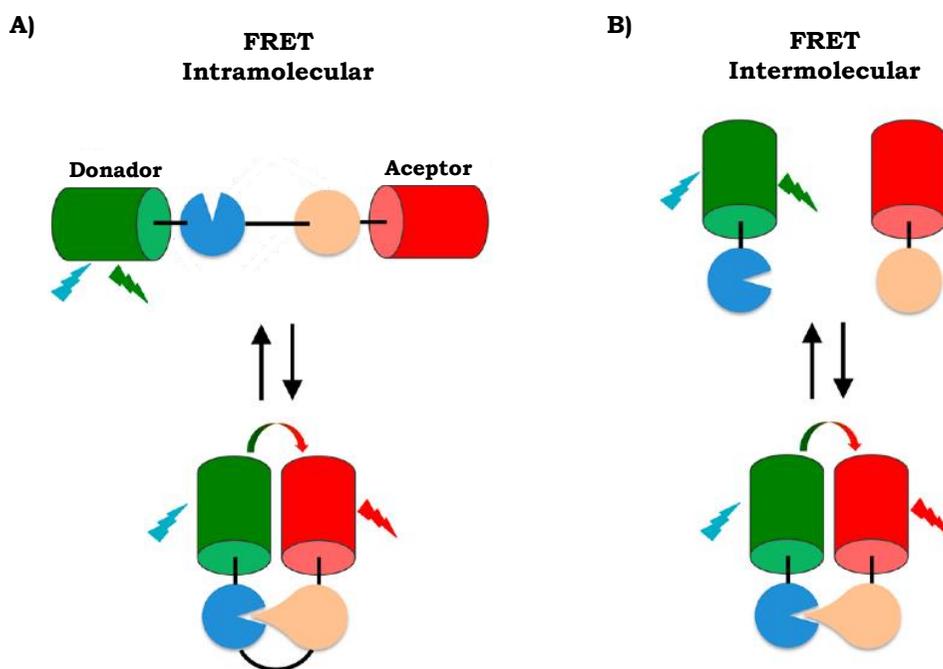


**Figura III.15. A)** Imágenes FLIM de células CHO-k1 incubadas con MPA-QD a diferentes pH. La escala de colores arbitraria representa tiempos de vida de luminiscencia entre 6 y 16 ns y **B)** Histogramas de distribución de tiempos de vida de luminiscencia promedio, obtenido de las imágenes de A), a distintos pH. Figura adaptada desde<sup>[324]</sup>. Derechos de autor (2013) American Chemical Society.

### III.1.2.3. Sensores intracelulares para FLIM-FRET

La presencia de cualquier proceso adicional que produzca alteraciones en la cinética de desactivación de los fluoróforos es susceptible de producir cambios en el valor del tiempo de vida de luminiscencia. Así, otro de los factores que también produce variaciones importantes en el tiempo de vida de luminiscencia de fluoróforos es la transferencia resonante de energía de Förster (FRET, por *Förster resonance energy transfer*). La disminución del tiempo de vida de luminiscencia de un fluoróforo que sufre un proceso de FRET puede visualizarse espacialmente usando microscopía FLIM, que puede emplearse para medir cuantitativamente este fenómeno<sup>[354],[355]</sup>. Esto da lugar al diseño de sensores intracelulares basados en FLIM-FRET, los cuales constituyen un grupo importante de aplicaciones de la microscopía FLIM.

La transferencia de energía por FRET es un fenómeno físico conocido desde 1948<sup>[356],[357]</sup>, que tiene lugar entre una molécula donante de energía y otra aceptora, ya sea, como se observa en la **Figura III.16**, de forma intramolecular (ambas especies constituyen la misma molécula) o intermolecular (moléculas independientes cercanas, pero sin colisionar)<sup>[358]</sup>. El fenómeno FRET consiste en, tras previa excitación del fluoróforo donador, la transferencia de su energía de excitación de forma no radiativa a la molécula aceptora mediante un acoplamiento resonante de los dipolos de transición. La molécula donadora se desactiva, volviendo al estado fundamental tras la cesión de energía, mientras que la molécula aceptora pasa al estado excitado. De ser fluorescente, la molécula aceptora podría relajarse posteriormente emitiendo fluorescencia.



**Figura III.16.** Fenómeno FRET. **A)** Intramolecular y **B)** Intermolecular. Figura adaptada desde<sup>[358]</sup>.

Como consecuencia de este fenómeno de transferencia de energía se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, el rendimiento

cuántico y el tiempo de vida de la especie donadora, a causa del nuevo proceso de desactivación no radiativo<sup>[341]</sup>. En este sentido, la ecuación del tiempo de vida de fluorescencia de la especie donadora en ausencia del aceptor ( $\tau_D$ ) (**Ecuación III.3**) queda modificada en presencia del mismo ( $\tau_{D,A}$ ) (**Ecuación III.4**).

$$\text{Ecuación III.3} \quad \tau_D = \frac{1}{k_F + k_{NR}}$$

$$\text{Ecuación III.4} \quad \tau_{D,A} = \frac{1}{k_{ET} + k_F + k_{NR}}$$

siendo  $k_F$  la velocidad de desactivación fluorescente del dador en ausencia del aceptor,  $k_{NR}$  la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos no radiativos que desactivan el estado excitado excepto la transferencia de energía y  $k_{ET}$  la constante cinética de la transferencia de energía.

Una vez conocidos ambos valores de tiempos de vida, estos pueden utilizarse para calcular la eficiencia del proceso de transferencia ( $E$ ), definido como el tanto por uno de moléculas de dador que se desactivan mediante FRET (**Ecuación III.5**).

$$\text{Ecuación III.5} \quad E = 1 - \frac{\tau_{D,A}}{\tau_D}$$

Como se observa en la ecuación anterior, existe una relación entre el tiempo de vida del dador y la eficacia del proceso de FRET. Además, la eficacia de éste dependerá de otra serie de factores que se describen a continuación<sup>[193]</sup>:

1. La transferencia de energía tiene lugar a través de un acoplamiento resonante dipolo-dipolo. Por tanto, la eficacia del proceso de FRET dependerá de la orientación relativa de los dipolos de transición del dador y el aceptor.

2. Para que se produzca debe existir una superposición espectral entre la emisión del donador y la absorción del aceptor.

3. La transferencia es dependiente de la distancia de separación entre las especies donante y aceptora ( $r$ ), de manera que cuanto más próximas se encuentren mayor es la eficiencia ( $E$ ) del proceso. Para parejas dador-aceptor utilizadas convencionalmente, el proceso de FRET es efectivo cuando la separación entre ambos está en el intervalo de 10-100 Å. Quizás el aspecto más relevante es que la eficacia de FRET, accesible experimentalmente mediante la medida de los tiempos de vida, se relaciona con la distancia  $r$  a través de la **Ecuación III.6**<sup>[359]</sup>. Esta dependencia hace que el fenómeno de FRET pueda emplearse como una “regla”, que permite medir distancias a nivel molecular.

$$\text{Ecuación III.6} \quad E = \frac{R_0^6}{[R_0^6 + r^6]}$$

En esta ecuación,  $R_0$  es la distancia de Förster, característica para cada pareja de moléculas donadora y aceptora, que representa la distancia a la cual la probabilidad de transferencia de energía es del 50 %.

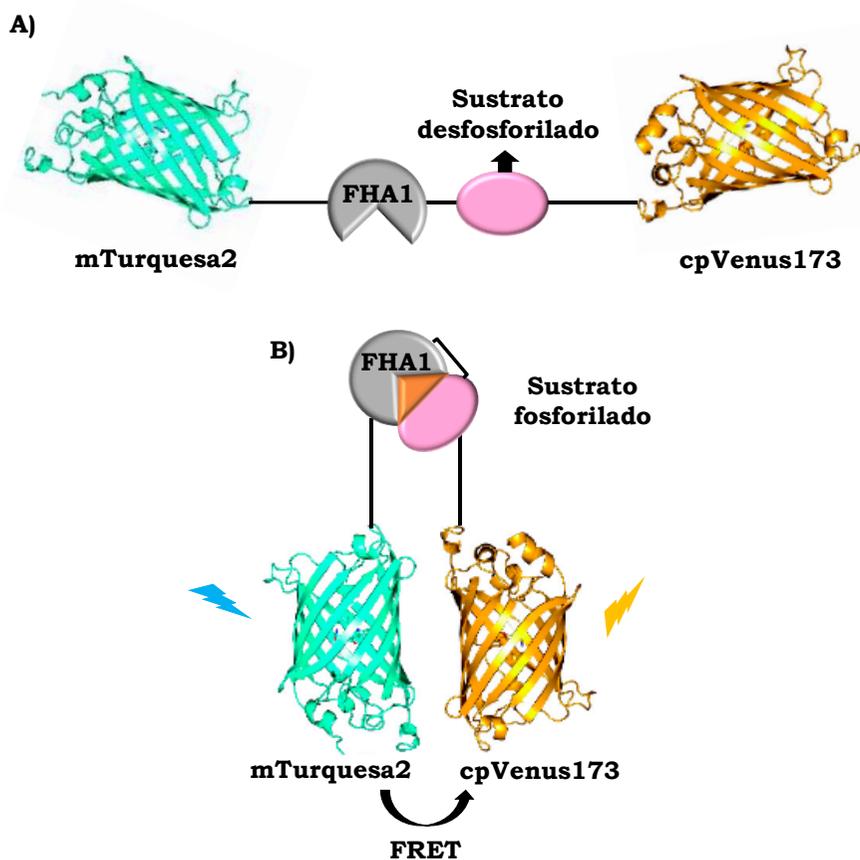
En cuanto a la utilidad de este fenómeno, la dependencia de  $E$  con  $r$  permite que la FRET se emplee ampliamente para investigar procesos biológicos que producen cambios en la proximidad entre moléculas<sup>[360],[361]</sup>. FRET, por tanto, se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para estudiar interacciones entre biomoléculas, para determinar la separación existente entre etiquetas fluorescentes presentes en macromoléculas y para monitorizar los cambios conformacionales de macromoléculas a tiempo real<sup>[362]</sup>.

Por otro lado, debido a que el proceso de FRET tiene influencia en el tiempo de vida de fluorescencia de la molécula donadora, reduciéndolo, este proceso puede ser estudiado mediante microscopía FLIM. De ahí surge la aplicación FLIM-FRET mediante la cual se analizan determinados procesos obteniendo tanto información estructural, en cuanto a medida de distancias,

como información espacial dada por la microscopía. Por tanto, se han diseñado sensores FLIM-FRET que se utilizan para obtener información de la proximidad de las moléculas de estudio y de los procesos celulares en los que participan<sup>[363]</sup>. Algunos ejemplos de estudios en los que se ha utilizado la metodología FLIM-FRET son la localización de interacciones entre proteínas en células normales<sup>[364],[365]</sup> y tumorales<sup>[366]</sup>, la detección de interacciones de proteínas en mitocondrias<sup>[367]</sup>, la caracterización de placas de proteínas  $\beta$ -amiloides<sup>[368]</sup>, entre otros.

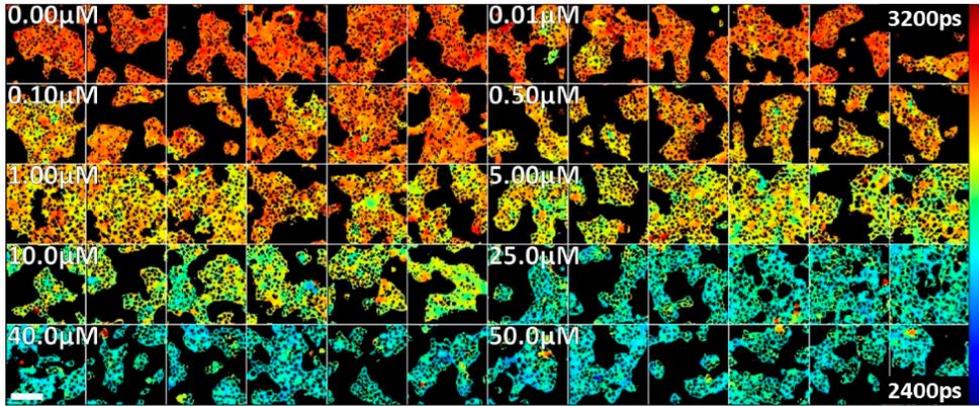
Una vez conocido el fundamento y la utilidad de este fenómeno, algunas de las estrategias más comunes para el diseño de sensores FLIM-FRET son el empleo de pares de proteínas fluorescentes<sup>[363],[369],[370],[371],[372]</sup> y sensores tipo tándem.

A continuación, se muestra un ejemplo de un sensor FLIM-FRET específico para la detección de actividad de quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK). El interés de dicho sensor radica en su capacidad de detectar la actividad de AMPK, implicada en procesos energéticos celulares inhibiendo los que suponen un gasto energético elevado y activando el suministro de energía. El sensor, denominado T2AMPKAR (por *mTurquoise2 AMPK Activity Reporter*), está constituido por la proteína fluorescente mTurquesa2 (mTq2FP) como especie donante y cpVenus173 como especie aceptora, ambas unidas mediante un péptido sustrato de AMPK y un dominio denominado FHA1 (*de sus siglas en inglés Forkhead Associated 1*), como se muestra en la **Figura III.17 A**). En este sentido, la detección de actividad de AMPK fue posible ya que se produce un cambio de conformación del sensor en el que se acorta la distancia entre el par donante/aceptor ocasionado por la fosforilación de una treonina del sustrato y posterior unión del sustrato al dominio FHA1 (**Figura III.17 B**)), lo cual produce un aumento del fenómeno de FRET<sup>[372]</sup>. El sensor es una modificación mejorada de uno anteriormente propuesto por Tsou *et al.* en el que se emplearon la proteína fluorescente de cian mejorada (ECFP) y la proteína fluorescente cp Venus173 como par FRET<sup>[373]</sup>.



**Figura III.17.** Estructura modelo de T2AMPKAR, ejemplo de sensor FLIM-FRET.

Al aumentar la transferencia energética, como se ha visto en apartados previos, disminuye el tiempo de vida, luego a través de esos valores se obtuvo una medida indirecta de la actividad de la enzima AMPK presente en cultivos celulares y en esferoides tumorales (**Figura III.18**)<sup>[372]</sup>. Como puede verse, el tiempo de vida disminuyó (colores azulados) a medida que aumentó la cantidad del activador de AMPK en el medio, indicando una mayor eficacia de FRET y, por tanto, una mayor actividad de fosforilación.



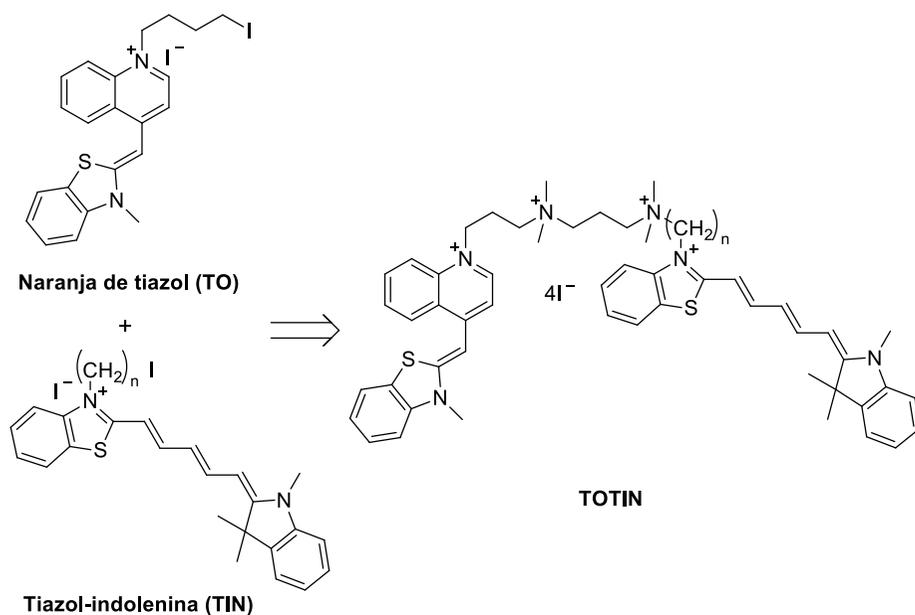
**Figura III.18.** Imágenes FLIM del sensor T2AMPKAR en cultivos de esferoides tumorales, respondiendo a diferentes concentraciones del activador 991 de AMPK. La escala de colores arbitraria representa tiempos de vida de luminiscencia entre 2400 y 3200 ps. Figura adaptada desde<sup>[372]</sup> (Chennell *et al.* 2016) con permiso de Creative Commons CC-BY 4.0.

### III.1.3. Sensores tándem

Como se ha mencionado previamente, otra alternativa en el empleo de la FRET como fundamento en el diseño de fluóforos y sensores son los sensores tándem. Estos están constituidos por una combinación de dos moléculas, una donante y otra aceptora, unidas entre ellas por un espaciador o cable molecular. Entre ambas moléculas, si se dan las condiciones óptimas, tiene lugar una transferencia energética. Tras la excitación de la especie dadora, la energía es emitida a través de la especie aceptora, generando unos desplazamientos de Stokes grandes que hacen que este tipo de sensores sean muy útiles en microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Sus principales ventajas son que emiten a una longitud de onda más larga que la molécula donante original y por tanto la diferencia entre la excitación y los máximos de emisión o desplazamientos de Stokes son superiores. Sin embargo también poseen algún inconveniente como es su rápida degradación debido a una exposición prolongada de luz<sup>[374]</sup>. A continuación, se muestran algunos ejemplos de sensores tándem que han sido utilizados en diferentes campos de aplicación.

Un primer ejemplo de fluoróforo tándem es el denominado TOTIN formado por heterodímeros de cianina. Éste está constituido por el par

donante/aceptor naranja de tiazol (TO) y tiazol-indolenina (TIN), unidos mediante una cadena de polimetilenos con grupos aminos cuaternarios, como se puede ver en la **Figura III.19**. TOTIN presenta longitudes de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 650 nm, lo que demuestra su gran desplazamiento de Stokes<sup>[375]</sup>. En cuanto a su aplicación, este compuesto mostró una elevada afinidad con ADN de doble cadena y se utilizó para la detección de diferentes fragmentos de ADN<sup>[376]</sup>.



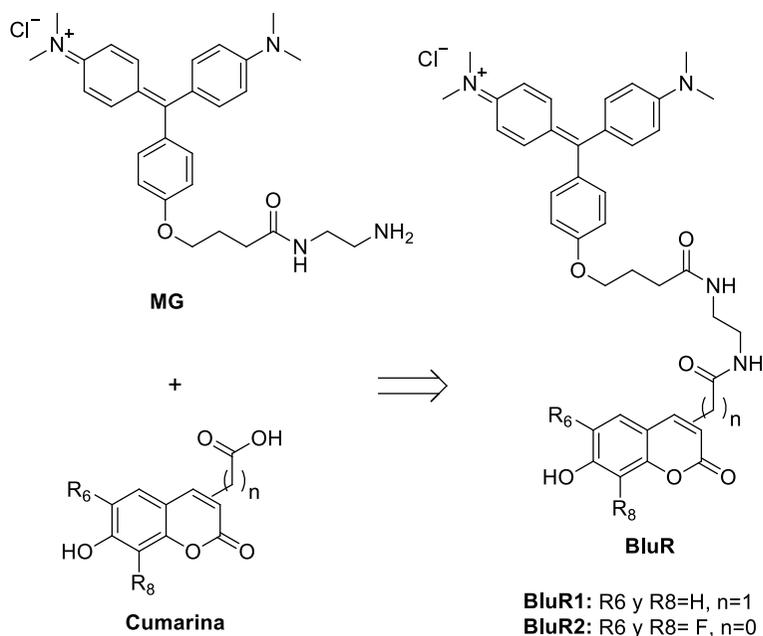
**Figura III.19.** Estructura del sensor tándem TOTIN.

Otro ejemplo de sensor tándem es el denominado ALLO-7 o APC-Cy7, formado por la combinación de una molécula donante denominada alofococianina (APC) y una molécula aceptora denominada indotricarbocianina (Cy7). Su estructura no se muestra ya que en el artículo original no se reportó por estar protegida. ALLO-7 presenta una longitud de onda de excitación en torno a 650 nm y una emisión a 785 nm, lo que supone un desplazamiento de Stokes de 135 nm<sup>[377]</sup>.

Este sensor, al igual que otros como son PE-Cy5 o PE-Cy7, son ampliamente utilizados desde hace décadas en citometría de flujo con la

finalidad de detectar distintos parámetros en el interior celular de forma simultánea<sup>[374],[378],[379]</sup> y en otras aplicaciones de inmunofluorescencia<sup>[380]</sup>.

Como último ejemplo se muestra una clase de sensor tándem diseñado recientemente denominado BluR. Se trata de un sensor constituido por la cumarina como especie donante combinada con un colorante fluorogénico como especie aceptora conocido como verde malaquita (MG), como se puede ver en la **Figura III.20**<sup>[381]</sup>. Debido a la capacidad que posee MG de unirse a determinadas proteínas activadoras del fluorógeno (FAP), estos sensores se utilizan para etiquetar proteínas FAP de forma selectiva<sup>[381]</sup>.



**Figura III.20.** Estructura del sensor tándem BluR.

## III.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la relación directa existente entre los cambios de pH que se producen a nivel celular con la presencia de determinados desajustes fisiológicos que pueden estar relacionados con enfermedades, la síntesis de un sensor fluorescente que permita informar y cuantificar los cambios de pH que sufren las células de forma más precisa que los sensores convencionales supondría un gran avance. En el capítulo anterior se comprobó que los

derivados xanténicos estudiados se ven muy afectados por cambios en el pH del medio y, por otro lado, que las acridonas presentan tiempos de vida largos. En este sentido, un diseño óptimo para un sensor de pH que pueda ser empleado en microscopía FLIM sería un sensor tipo tándem mediante la combinación de ambas estructuras unidas con un espaciador. A su vez, dicho espaciador debía ser corto con motivo de favorecer la transferencia de energía mediante el fenómeno de FRET.

Basados en esta hipótesis, los objetivos que se plantean son los siguientes:

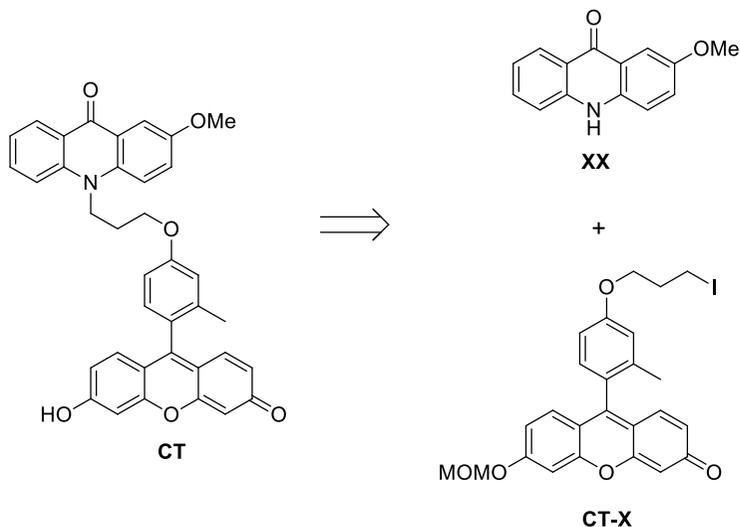
5. Sintetizar y caracterizar, mediante RMN y espectrometría de masas, un sensor de pH intracelular cuya estructura esté constituida por la unión de una acridona y un xanteno mediante un espaciador corto.
6. Realizar una caracterización fotofísica completa del producto sintetizado.
7. Estudiar su aplicación como sensor de pH intracelular mediante microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM).

### III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1. Síntesis y caracterización del sensor de pH específico para FLIM

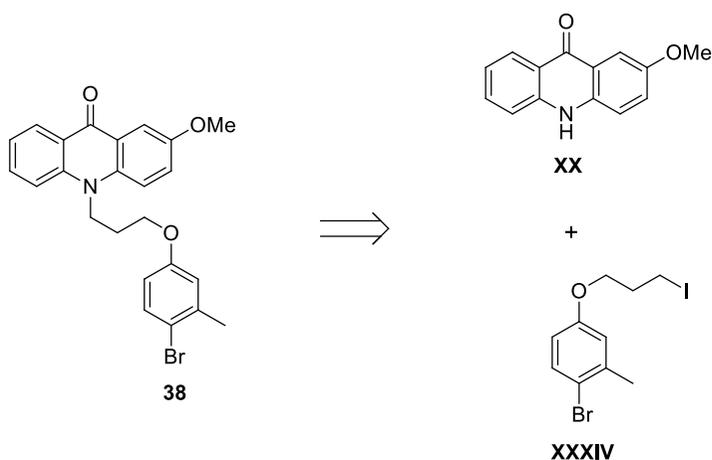
En primer lugar, este sensor se sintetizó durante la estancia realizada en el *Grupo de Investigación del Dr. Ramón Ríos*, en la *Universidad de Southampton*, llevada a cabo con la finalidad de poder optar a la *Mención Internacional*.

Como se ha mencionado, el compuesto tándem (**CT**) propuesto como posible sensor de pH intracelular, está constituido por el esqueleto básico de la acridona **XX** y el xanteno **CT-X**, unidos mediante un espaciador corto de tres carbonos, como se puede ver en el **Esquema III.1**.



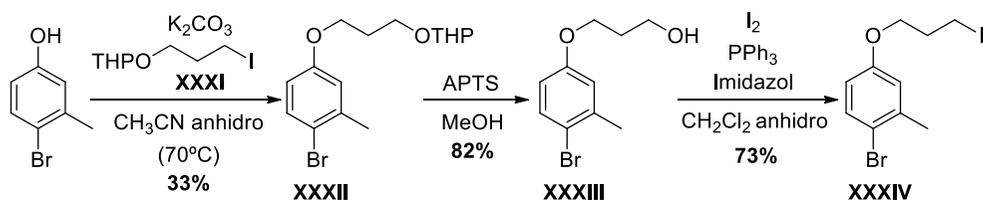
**Esquema III.1.** Retrosíntesis del compuesto tándem (**CT**) a partir de la acridona **XX** y el xanteno **CT-X**.

La síntesis planteada consistía en la alquilación del nitrógeno del esqueleto de la acridona **XX** mediante previa desprotección con hidruro sódico, con la incorporación del haluro alquílico **CT-X**. Sin embargo, debido a la posible dificultad de la síntesis del xanteno **CT-X**, se propuso primero la obtención de un compuesto tándem con estructura similar, pero algo más sencilla (**38**).



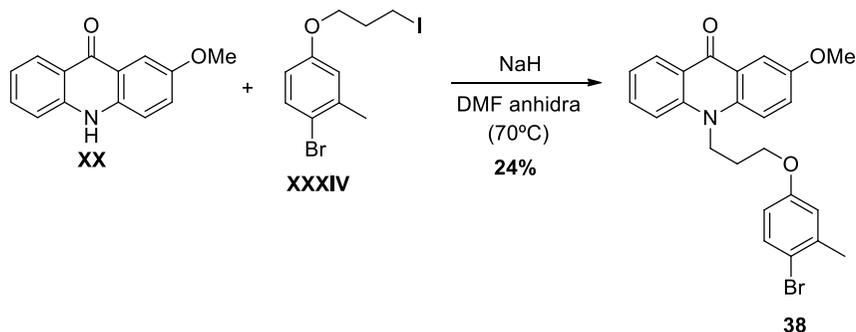
**Esquema III.2.** Retrosíntesis del compuesto **38** a partir de la acridona **XX** y el precursor **XXXIV**.

Este compuesto fue preparado, como se muestra en el **Esquema III.2**, a partir de la acridona **XX** y el precursor **XXXIV**, que simuló la parte xanténica, con el fin de optimizar las condiciones de la reacción de alquilación. En este sentido, primero se llevó a cabo la síntesis del yododerivado **XXXIV** mediante una ruta sintética de tres etapas (**Esquema III.3**). Una primera inserción de la cadena **XXXI** al producto comercial 4-bromo-3-metilfenol mediante una reacción de sustitución nucleofílica generó el compuesto **XXXII**. La posterior desprotección del grupo THP con ácido *p*-toluensulfónico (APTS) y la sustitución del alcohol primario por yodo dieron lugar al derivado **XXXIV**.



**Esquema III.3.** Obtención del yododerivado **XXXIV**.

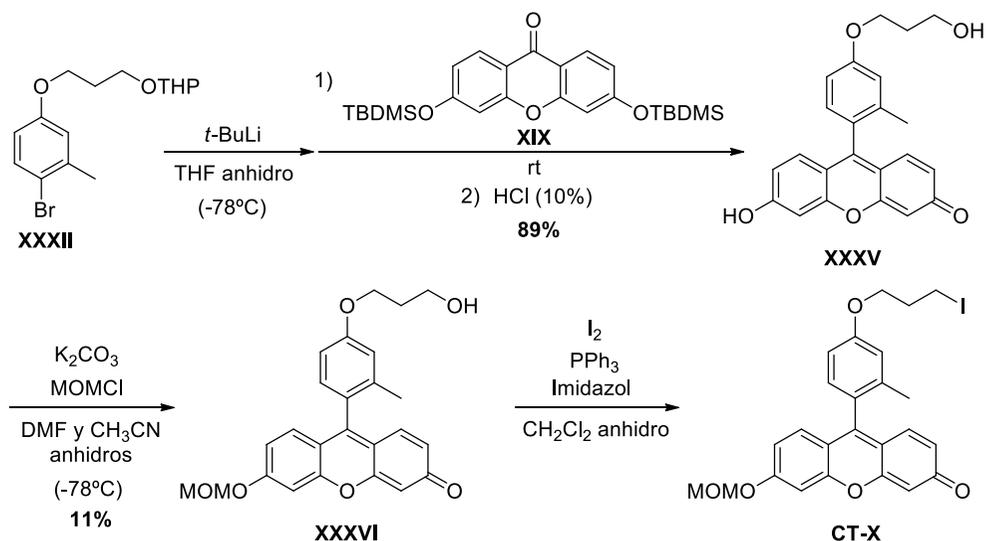
Una vez obtenido, se realizó la alquilación de la acridona **XX**, anteriormente descrita en el *Capítulo II*, con previa desprotección de la misma con hidruro sódico, como se puede ver en el **Esquema III.4**. Tras finalizar la reacción y purificar el producto se obtuvo el compuesto **38** con un rendimiento del 24 %.



**Esquema III.4.** Esquema sintético general para la obtención de **38**.

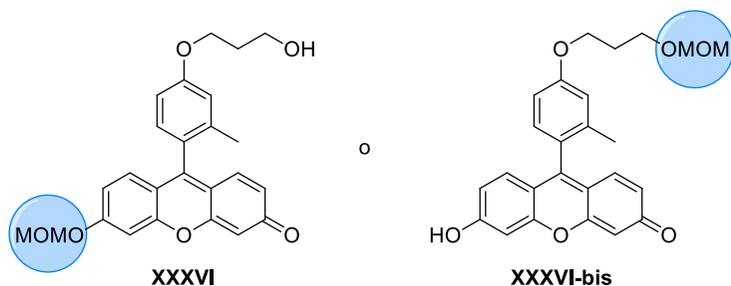
Una vez comprobada la viabilidad de la ruta sintética utilizada para obtener el compuesto **38**, se procedió a sintetizar el compuesto tándem **CT**.

Para ello, como se observa en el **Esquema III.5**, se planteó previamente la síntesis de la estructura xanténica **CT-X** constituida por tres pasos de reacción. En primer lugar, se llevaría a cabo la adición nucleofílica del organolítico obtenido tras la reacción del precursor **XXXII** con *t*-BuLi sobre la cetona **XIX**. Seguidamente se protegería el grupo hidroxilo del anillo aromático con cloruro de MOM (**XXXVI**) y, como último paso, se realizaría el intercambio del hidroxilo primario por yodo.



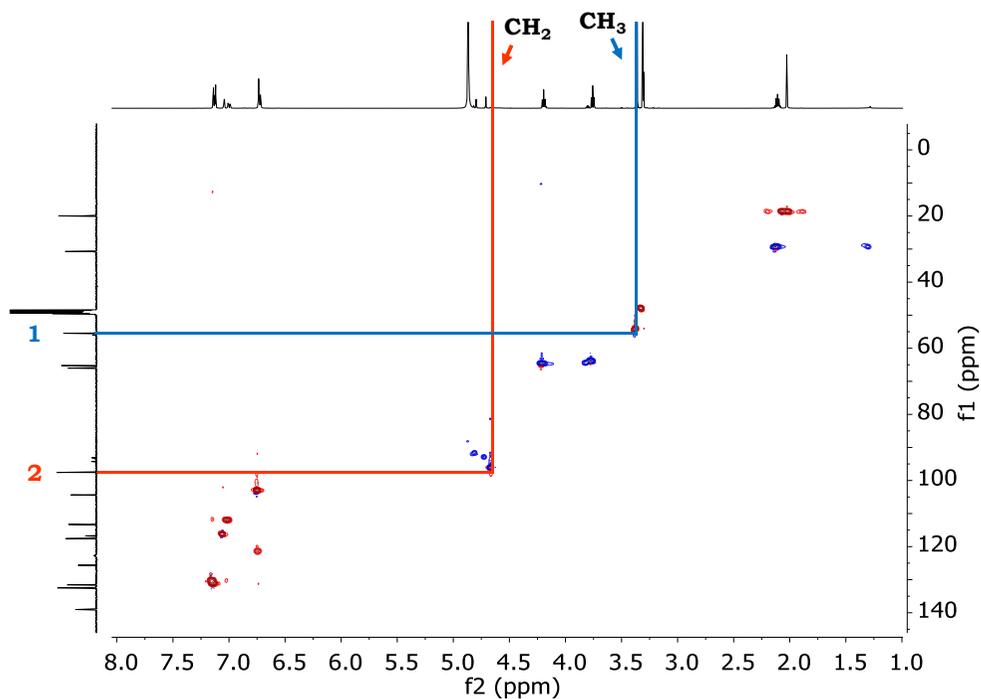
**Esquema III.5.** Esquema sintético para la obtención del precursor xanténico **CT-X**.

La síntesis del compuesto **XXXV** se llevó a cabo de manera eficiente, sin embargo, esta ruta sintética no pudo finalizarse ya que no se pudo obtener el precursor **CT-X**. En este punto se planteó la posibilidad de que el hidroxilo alquílico presente en **XXXV**, a pesar de ser a priori menos nucleófilo que el aromático, hubiera reaccionado con el cloruro de MOM obteniéndose el precursor **XXXVI-bis** cuya estructura se puede ver en la **Figura III.21**. Esto justificaría que no se obtuviese el derivado con yodo.



**Figura III.21.** Posibles estructuras planteadas del precursor **XXXVI**.

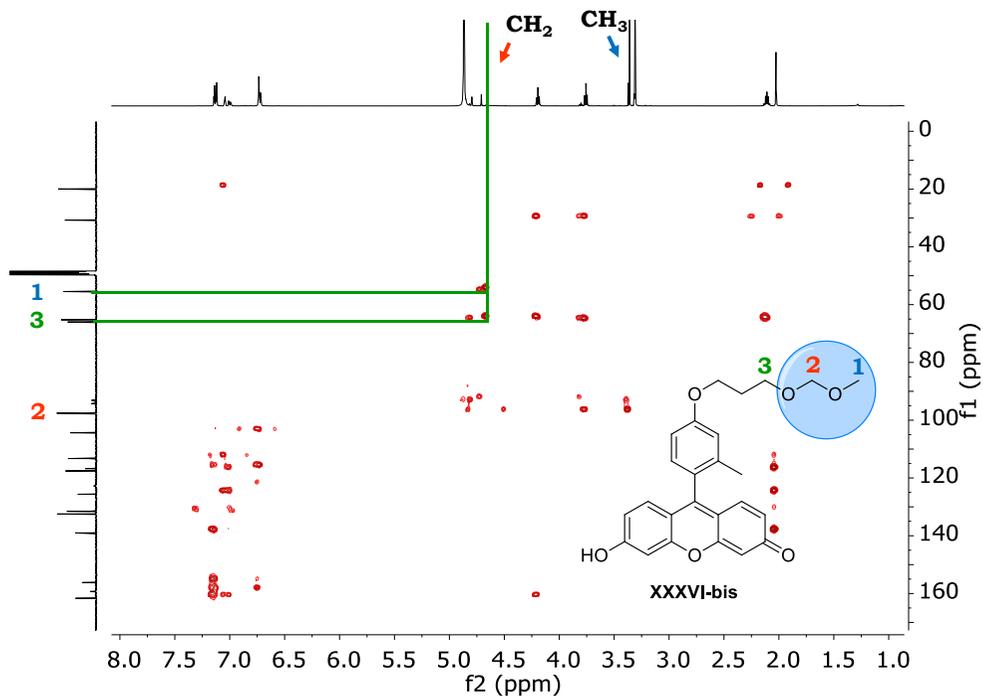
Para comprobar dónde se había llevado a cabo la reacción se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  de los precursores **XXXV** y el producto obtenido en la reacción (**XXXVI** o **XXXVI-bis**). A su vez se analizaron los espectros de RMN bidimensionales HSQC (**Figura III.22**) y HMBC (**Figura III.23**) del producto alquilado con cloruro de MOM.



**Figura III.22.** Espectro bidimensional de HSQC del producto obtenido en tras la alquilación de XXXV con cloruro de MOM.

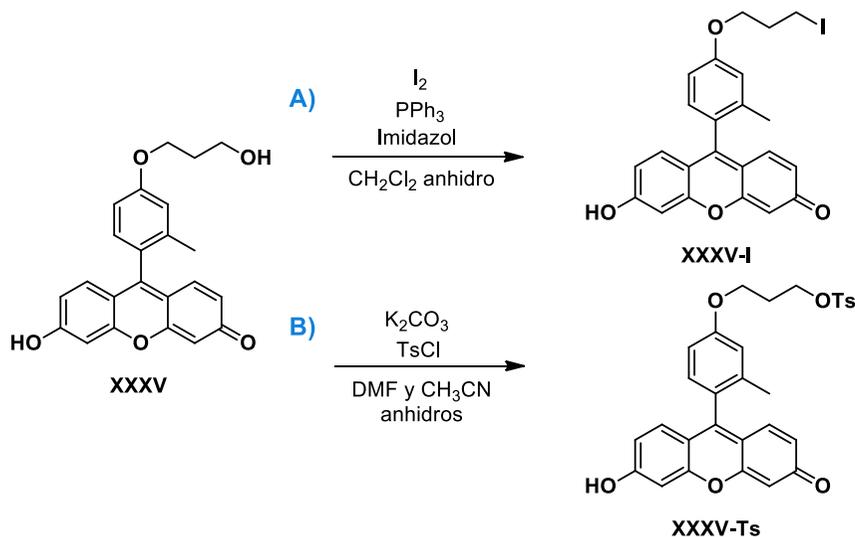
Primero se localizaron las señales de los protones del  $\text{CH}_3$ - y  $-\text{CH}_2-$  del grupo MOM en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del producto de reacción de **XXXV** con MOMCl, las cuales aparecen a 3.36 y 4.65 ppm, respectivamente. A continuación, con ayuda del espectro de HSQC que se muestra en la **Figura III.22**, se determinó que el carbono en el que se encontraban los protones del  $\text{CH}_3$ - aparece a 55.47 ppm (C-1) y los del  $-\text{CH}_2-$  aparece a 97.56 ppm (C-2).

Tras asignar estos grupos, se llevó a cabo el análisis del HMBC que se muestra en la **Figura III.23**. Con este experimento se determinaron los carbonos que se encuentran a más de un enlace de distancia respecto a un determinado protón. Analizando los protones del  $-\text{CH}_2-$  del MOM se observó que los carbonos que daban señal en el espectro se situaban en la zona de los carbonos alifáticos, a 55.47 (C-1) y 65.26 pm (C-3), y no en la zona de los aromáticos, confirmándose por tanto la estructura **XXXVI-bis**.



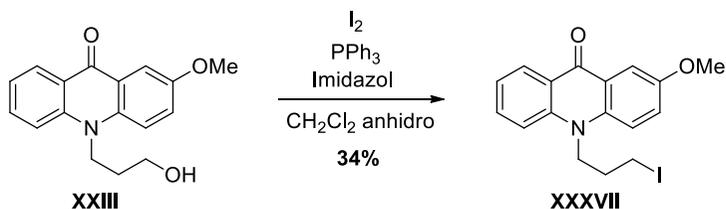
**Figura III.23.** Espectro bidimensional de HMBC de **XXXVI-bis**.

Tras comprobar que la yodación del alcohol primario era inviable al encontrarse éste protegido como OMOM, con la finalidad de poder sintetizar el compuesto **CT**, se intentaron diferentes alternativas como yodar o tosilar directamente el alcohol primario presente en **XXXV** (**Esquema III.6 A) y B)**.



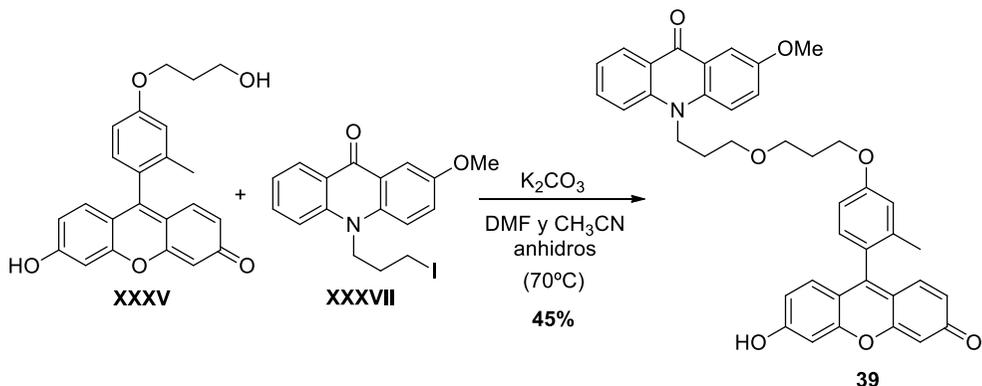
**Esquema III.6.** Alternativas para obtener **CT**. **A)** Reacción de yodación directa del alcohol primario de **XXXV** y **B)** Reacción de tosiliación del alcohol primario de **XXXV**.

En cambio, en ninguno de los casos se obtuvieron los productos de sustitución. A la vista de la reactividad como nucleófilo que había presentado el alcohol primario frente al cloruro de MOM la siguiente alternativa fue llevar a cabo la alquilación directa del xanteno **XXXV** utilizándolo como especie nucleófila y la acridona **XXXVII** como especie electrófila, la cual fue sintetizada previamente siguiendo el **Esquema III.7**. Para ello a partir del precursor **XXIII** descrito en el capítulo anterior, se realizó la sustitución del grupo hidroxilo de la cadena por iodo con la finalidad de incorporar un buen grupo saliente en la acridona **XXXVII**.



**Esquema III.7.** Síntesis de la acridona **XXXVII**.

Una vez sintetizada **XXXVII** para realizar dicha alquilación se llevó a cabo una reacción de eterificación de Williamson entre el iodoalcano presente en **XXXVII** y el alcohol primario del xanteno **XXXV**, previamente desprotonado con carbonato potásico, dando lugar al compuesto **39** con un rendimiento del 45 % (**Esquema III.8**).



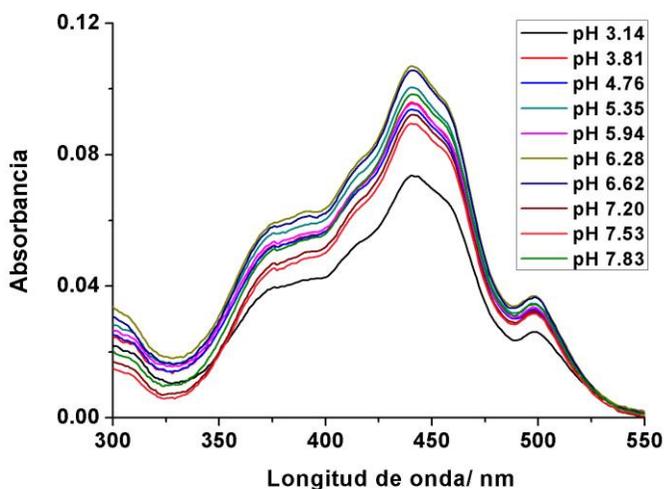
**Esquema III.8.** Esquema sintético para la obtención de **39**.

En resumen, en lugar de obtener el compuesto tándem **CT**, se obtuvo un análogo al planteado con un espaciador de seis carbonos (**39**).

### III.3.2. Medidas fotofísicas

Una vez se sintetizó el posible sensor de pH **39** y se caracterizó mediante RMN y espectrometría de masas, se determinaron sus características espectroscópicas. Para ello se midieron sus espectros tanto de absorción como de emisión en disolución acuosa a una concentración de  $1.5 \cdot 10^{-5}$  M a diferentes pH, con el objetivo de estudiar los cambios ocasionados en las medidas fotofísicas ante variaciones de dicho parámetro.

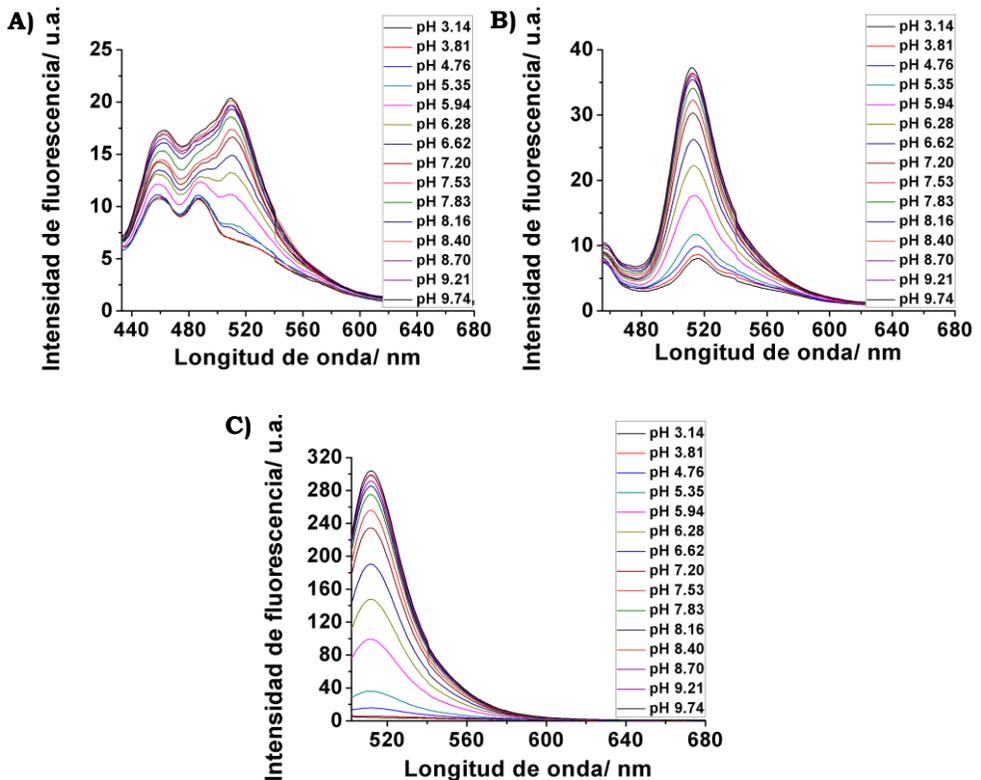
En cuanto al espectro de absorción pudo verse que existían dos máximos de absorción (en torno a 443 y 499 nm), lo que sugirió la absorción por separado tanto por parte de la acridona, especie dadora del par FRET, como del xanteno, especie aceptora, ambas presentes en el sensor tándem (**Figura III.24**).



**Figura III.24.** Espectro de absorción de **39**. Representación gráfica de absorción frente a la longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3-8.

Asimismo, como se muestra en la **Figura III.25**, al analizar los espectros de emisión que se obtuvieron excitando a longitudes de onda de 420, 440 y 490 nm, se observaron diferentes máximos de emisión. Al excitar a 420 nm, a pH ácidos solo se distinguió un máximo de emisión en torno a 458 nm, sin embargo, a medida que aumentó el pH apareció una nueva banda a 510 nm. En principio estos resultados indicaron que excitando el sensor tándem a longitudes de onda de excitación propias de la acridona (de en torno a 420 nm), además del pico de emisión de la misma, también se observó la emisión propia del xanteno, corroborándose la existencia de una transferencia de energía entre el par FRET. A su vez, a pH ácidos solo se distinguió la banda de emisión de la acridona, en cambio al disminuir la concentración de protones del medio, el hidroxilo de la parte xanténica se desprotonó y por ello se apreció una nueva banda correspondiente a la emisión del xanteno. En el

resto de gráficas obtenidas tras excitar el compuesto a una longitud de onda de 440 nm o bien de 490 nm, se distinguió un solo máximo de emisión en torno a 510-515 nm correspondiente a la emisión únicamente de la parte xanténica.

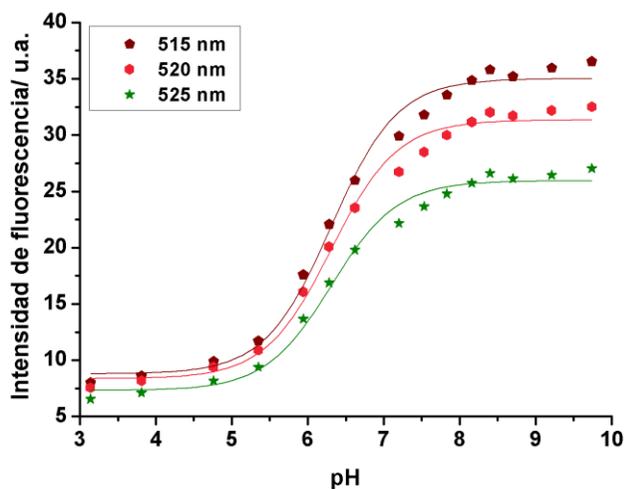


**Figura III.25.** Espectros de emisión sin corregir de **39** a distintas  $\lambda_{ex}$ . Representación gráfica de intensidad de fluorescencia frente a longitud de onda a diferentes pH en un rango de 3-10. **A)**  $\lambda_{ex}=420$  nm, **B)**  $\lambda_{ex}=440$  nm y **C)**  $\lambda_{ex}=490$  nm.

Al analizar los espectros obtenidos pudo verse que el comportamiento de **39** disuelto en tampón acetato (a pH ácidos) o TRIS (a pH básicos), mostraron dependencia con el pH, de manera que a pH ácido los valores de absorción y emisión fueron inferiores a los obtenidos a pH neutros y básicos. Este hecho puede justificarse ya que el sensor tándem está constituido por una parte xanténica la cual como se ha mencionado en el *Capítulo II*, presenta un grupo hidroxilo fenólico sensible a cambios de pH. Una vez determinada dicha

dependencia se procedió a obtener los valores de  $pK_a$  de **39**. Para ello al igual que el cálculo de  $pK_a$  realizados en el *Capítulo II* se representó la intensidad de fluorescencia obtenida a una longitud de onda de excitación de 420, 440 y 490 nm frente a los valores de pH a diferentes longitudes de onda. Una vez representadas las curvas, las cuales pueden observarse en los *Anexos. Capítulo III. Cálculo del  $pK_a$* , para obtener el  $pK_a$  se realizó un ajuste no lineal por mínimos cuadrados siguiendo la **Ecuación II.3** que se muestra en el *Capítulo II* en el apartado II.3.2. *Medidas fotofísicas*.

En la **Figura III.26** se observa un ejemplo de este tipo de ajuste, el resto de curvas se pueden visualizar en los *Anexos. Capítulo III. Cálculo de  $pK_a$* .



**Figura III.26.** Obtención del valor de  $pK_a$  del sensor **39**. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia (a  $\lambda_{exc}$  = 440 nm) frente al pH a  $\lambda_{em}$  de 515, 520 y 525 nm, y las correspondientes curvas de ajuste no lineal.

**Tabla III.1.** Valores de  $pK_a$  de **39** y sus respectivos errores estándar asociado.

Sensor pH	$pK_a$ (I vs pH) $\lambda_{exc}$ 420 nm	$pK_a$ (I vs pH) $\lambda_{exc}$ 440 nm	$pK_a$ (I vs pH) $\lambda_{exc}$ 490 nm
<b>39</b>	$6.53 \pm 0.03$	$6.32 \pm 0.02$	$6.48 \pm 0.02$

En relación a los valores de  $pK_a$  obtenidos del sensor tándem **39**, todos fueron en torno a 6 (**Tabla III.1**) lo cual fue un indicio de que este sensor podría utilizarse para realizar medidas en el interior celular a pH fisiológico.

### III.4. CONCLUSIONS

The conclusions of this chapter are:

- A new tandem probe composed by the combination of a xanthene and an acridone (**39**) has been synthesized and characterized. A six-carbon spacer has been used as the linker between both skeletons.
- The compound **39** emission spectra have showed the FRET phenomenon clearly. When the acridone is excited, the peak of the xanthene is also observed, and they have showed the expected dependence with the pH. Moreover, its  $pK_a$  value has been calculated which has indicated that **39** is a sensor that can be used in values close to neutral pH.
- In the near future, it will be possible to study whether this compound could be used as suitable intracellular pH sensor for FLIM microscopy, using  $\tau$  values as reporters of the intracellular pH. For this, it will be necessary to do experiments in different cell lines, controllably producing pH alterations, and also with cell lines exhibiting altered metabolism, such as cancer cells. Likewise, the performance of this pH sensing methodology should be compared with well-accepted fluorescent pH sensors.



# **CAPÍTULO IV.**

Sensores Fluorescentes  
con Longitudes de Onda  
de Emisión en el Magenta



## IV. SENSORES FLUORESCENTES CON LONGITUDES DE ONDA DE EMISIÓN EN EL MAGENTA

### IV.1. ANTECEDENTES

Como se ha podido ver a lo largo del *Bloque B*, el uso de sondas y sensores fluorescentes ha sido muy extendido desde hace años, de manera que existe una gran variedad de diseños en función de la utilidad que se les quiera dar<sup>[382]</sup>.

Centrándonos en el ámbito biomédico, la gran parte, si no todos los sensores mostrados hasta el momento, se han utilizado para medir un único parámetro o analito a nivel celular. Sin embargo, en la mayoría de los procesos fisiológicos que tienen lugar en las células o las fisiopatologías de enfermedades, están implicados multitud de parámetros<sup>[136],[144],[145],[156],[157]</sup>. Es por ello que cada vez es mayor la necesidad de sintetizar sensores con diseños mejorados que permitan realizar estudios más complejos en los que son varios los parámetros implicados.

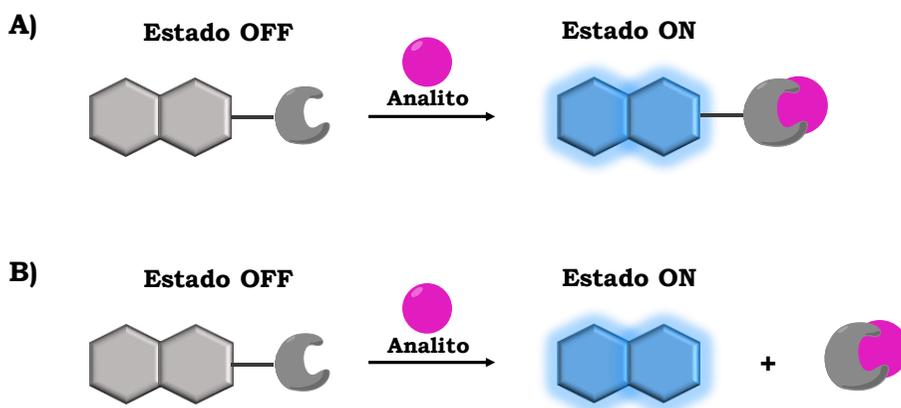
En relación a ello, como ya se ha mencionado en el *Capítulo III*, para la cuantificación intracelular de dichos parámetros y analitos se han utilizado varias metodologías. Éstas incluyen la medida de los mismos de forma indirecta a través de las variaciones de intensidad del sensor, mediante el uso de métodos ratiométricos o bien la microscopía FLIM. De modo que, teniendo en cuenta que de todos ellos la microscopía FLIM es la que presenta mayores ventajas<sup>[383]</sup>, se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para realizar estudios de estados celulares normales y disfuncionales en los que influyen un gran número de parámetros.

A continuación, se muestran una serie de estrategias complementarias a las mencionadas hasta el momento a lo largo del *Bloque B* para el diseño de distintos tipos de sensores.

#### IV.1.1. Sensores fluorogénicos

En primer lugar, una de las metodologías ampliamente utilizada es el uso de sensores fluorogénicos. Estos sensores son moléculas que no son fluorescentes, están desactivadas, pero que al reaccionar con analitos

concretos del medio se activan y emiten fluorescencia, posibilitando la detección de dichos analitos a través de cambios en la intensidad de fluorescencia. Como se puede ver en la **Figura IV.1**, esto puede ocurrir principalmente de dos maneras. En ambos casos los fluoróforos que constituyen los sensores en un principio están desactivados (estado OFF) ya que en su estructura tienen incorporado un grupo que quenchea su fluorescencia. En cambio, en presencia de determinados parámetros y analitos del medio, el fluoróforo se activa (estado ON) emitiendo fluorescencia como consecuencia de: **Figura IV.1 A)** que el analito se une al grupo que quenchaba la fluorescencia lo que induce un cambio en las propiedades del fluoróforo o bien **Figura IV.1 B)** que en presencia del analito el grupo que quenchaba la fluorescencia se libera permitiendo la activación del fluoróforo<sup>[384]</sup>.



**Figura IV.1.** Enfoques para el diseño de sensores fluorogénicos. **A)** Activación de la fluorescencia inducida por la unión del analito al grupo que quenchaba la fluorescencia lo que ocasiona un cambio en sus propiedades y **B)** Activación de la fluorescencia inducida por la interacción del analito con el grupo que quenchaba la fluorescencia y su liberación posterior.

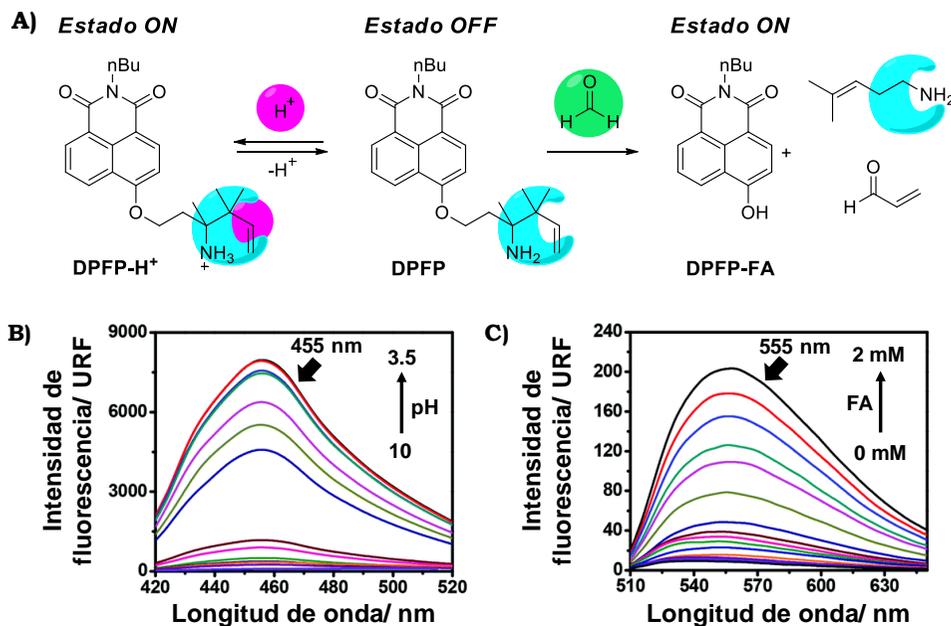
A estos sensores se les denomina comúnmente OFF/ON y, en función de su estructura, presentan distintas propiedades y se emplean para medir distintos parámetros y analitos en el interior celular. Este tipo de sensores han sido utilizadas a lo largo de los años para detectar cambios de pH y cantidades de formaldehído como parámetros por separado<sup>[314],[385],[386]</sup> o de

manera dual<sup>[387]</sup> y para la detección de diferentes analitos como cationes trivalentes como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$ <sup>[388]</sup>, tioles<sup>[389]</sup>, óxido nítrico<sup>[390],[391]</sup> y enzimas<sup>[392]</sup>, entre otros.

A continuación, se muestra un ejemplo interesante de un sensor fluorógeno denominado DPFP (del inglés, *dual-function probe for imaging FA and pH*), el cual es capaz de detectar de forma dual cambios de pH del medio y cantidades de formaldehído (**Figura IV.2**). Ambos son importantes indicadores biológicos de los organismos vivos. Como ya se ha mostrado en el *Capítulo III* el pH intracelular está implicado en multitud de procesos y valores anormales de este parámetro suponen un indicio de una disfunción a nivel celular<sup>[292]</sup>. Por su parte, el formaldehído (FA) es considerado una sustancia que puede favorecer a la aparición de distintos tipos de cáncer<sup>[393]</sup>, luego valores elevados de FA podrían indicar la presencia de células y tejidos dañados.

Debido al interés que suponía un diseño capaz de medir ambos parámetros a la vez se sintetizó la sonda DPFP constituida por un esqueleto de 1,8-naftalimida como fluoróforo. Como se muestra en la **Figura IV.2 A)**, éste en un principio se encuentra desactivado por la presencia de un grupo homoalilamino. Este grupo es sensible a la cantidad de protones en el medio, de manera que al protonarse el N cambia sus propiedades dando lugar a DPFP- $\text{H}^+$  que emite fluorescencia. Además, el DPFP es sensible a la cantidad de formaldehído ya que en presencia del mismo sufre una reacción de  $\beta$ -eliminación liberando el compuesto DPFP-FA fluorescente<sup>[387]</sup>.

En la **Figura IV.2 B) y C)** a su vez pueden observarse los espectros de emisión de fluorescencia de la sonda DPFP a diferentes pH y a diferentes concentraciones de FA, donde se observa el aumento de la intensidad de fluorescencia a mayor cantidad de protones en el medio y a mayores cantidades de FA<sup>[387]</sup>.



**Figura IV.2.** Ejemplo de sensor fluorogénico. **A)** Esquema de detección dual de pH y FA de BPPF. **B)** Cambios de la intensidad de fluorescencia de BPPF a  $5 \cdot 10^{-6}$  M a 455 nm en función de modificaciones de valores de pH del medio de 10 a 3.5 ( $\lambda_{exc} = 365$  nm). **C)** Cambios de la intensidad de fluorescencia de BPPF a  $5 \cdot 10^{-6}$  M a 555 nm en función de modificaciones de la concentración de FA adicionado de 0 a 2 mM ( $\lambda_{exc} = 455$  nm). Figura adaptada desde<sup>[387]</sup> con permiso de la Royal Society of Chemistry.

#### IV.1.2. Sensores FLIM basados en reacciones en el estado excitado

En el capítulo anterior ya se han descrito diferentes tipos de sensores fluorescentes específicamente diseñados para microscopía FLIM, como por ejemplo los sensores basados en FRET. No obstante, otra de las estrategias interesantes para el diseño de sensores FLIM es la modulación del tiempo de vida de fluorescencia del sensor por medio de una reacción de transferencia protónica en estado excitado (ESPT, del inglés *excited-state proton transfer*). Algunos ejemplos que recoge la bibliografía son derivados xanténicos que se utilizan como sensores de acetato<sup>[394]</sup>, de fosfato en el interior celular<sup>[349],[288]</sup> y un sensor dual que es capaz de detectar tanto concentraciones intracelulares de biotioles como de fosfato<sup>[389]</sup>.

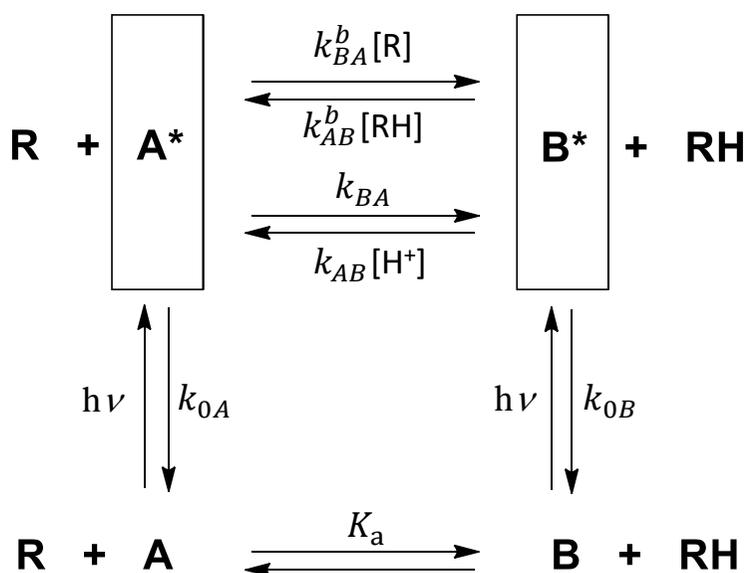
Al ser este tipo de sensores los que constituyen el fundamento de este capítulo, esta estrategia se desarrollará en mayor profundidad a continuación.

#### **IV.1.2.1. Reacciones de transferencia protónica en el estado excitado**

Las reacciones ESPT consisten en reacciones de protonación y desprotonación muy rápidas, que pueden competir cinéticamente con la emisión de fluorescencia y demás procesos que suceden a una molécula tras la activación radiativa, alterando sus propiedades luminiscentes<sup>[257]</sup>. Estas reacciones han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los años. Fue Weber, en 1931, quién observó por primera vez que, al hacer valoraciones ácido-base de determinadas moléculas orgánicas y calcular sus curvas de calibrado, la zona de inflexión de la curva variaba en función de si los datos se medían por absorción o emisión<sup>[395]</sup>. Años más tarde, Förster indagó en este fenómeno y estableció un método de medida del  $pK_a$  en el estado excitado basado en el  $pK_a$  del estado fundamental y las diferencias energéticas entre absorción y emisión, al que denominó ciclo de Förster<sup>[396]</sup>.

Algunos aspectos importantes que se han ido descubriendo que presentan los fluoróforos que sufren este tipo de reacciones es que muestran grandes desplazamientos de Stokes y altos rendimientos cuánticos<sup>[397]</sup>. En ocasiones, para favorecer que la transferencia protónica pueda competir cinéticamente con los procesos de desactivación por emisión, la ESPT puede estar mediada mediante un par dador/aceptor protónico presente en medio acuoso o en medios tamponados<sup>[398]</sup>. En este último caso, como se muestra en el **Esquema IV.1**, la cinética de este tipo de reacciones es compleja. Por un lado, tiene lugar la interconversión entre la especie ácida (**A**) y básica (**B**) de acuerdo a su equilibrio en el estado fundamental. Por otro, puede ocurrir que exista una interconversión entre ambas especies ácida (**A\***) y básica (**B\***) una vez excitadas tras ser sometidas a radiación, a la que se le denomina ESPT, siendo las constantes cinéticas propias de dicho proceso  $k_{BA}$  y  $k_{AB}$ . En este segundo caso, en presencia de pares dador (**RH**)/aceptor (**R**) de protones, la reacción ESPT puede acelerarse, definida por constantes de velocidad  $k^b_{BA}$  y  $k^b_{AB}$ , compitiendo con la desactivación de las especies **A\*** y **B\***

que se produce para regresar al estado fundamental, con constantes de velocidad  $k_{0A}$  y  $k_{0B}$ . La cinética de la transferencia mediada por otras especies es intrínsecamente de segundo orden, por lo que su velocidad dependerá de las concentraciones de **RH** y **R**. Por tanto, el proceso de desactivación que tiene lugar con emisión de fluorescencia se ve influenciado por la ESPT. La presencia de esta reacción ocasiona una disminución del tiempo en el que las especies del compuesto permanecen en el estado excitado, estableciéndose una relación entre la cantidad de dador/aceptor del medio que promueve la ESPT con los tiempos de decaimiento de fluorescencia ( $\tau$ )<sup>[275],[399]</sup>.



**Esquema IV.1.** Modelo cinético de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado promovida por un par dador/aceptor de protones adecuado.

Una familia de colorantes de la que se ha hablado ampliamente en el *Capítulo II*, los derivados xanténicos, entre ellos la fluoresceína, pueden sufrir reacciones de ESPT mediadas por un donador/aceptor protónico<sup>[257]</sup>. Rozwadowski en 1961 estudió el comportamiento de las formas prototrópicas de la fluoresceína mediante la realización de espectros de emisión a distintos pH, determinando la existencia de 4 especies: catiónica, neutra, mono- y dianiónica; las cuales pueden verse en el *Capítulo II. Apartado II.1.3.1*. Además, estudió la variación del tiempo de vida de fluorescencia variando el

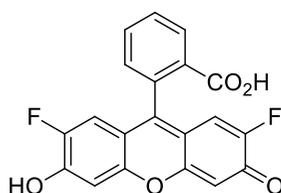
pH, descubriendo que existía una transición a pH 6.5 que propuso que se debía a la reacción de intercambio protónico entre las especies monoaniónica y dianiónica<sup>[400]</sup>. No obstante, fueron Álvarez Pez y colaboradores los primeros que demostraron que especies donadoras/aceptores protónicos como el tampón fosfato pueden servir como mediadores de la reacción ESPT entre las formas mono- y dianiónica de la fluoresceína<sup>[257]</sup>, siguiendo una cinética similar a la mostrada en el **Esquema IV.1**. En este grupo de investigación se han estudiado en profundidad las reacciones ESPT mediadas por donadores/aceptores protónicos en derivados xanténicos. A parte de en la fluoresceína, las especies del tampón fosfato pueden mediar la ESPT en otros derivados de fluoresceína como los Tokyo Green<sup>[399]</sup> o el Granada Green<sup>[288]</sup>. También se han estudiado otros mediadores como el ácido *N*-acetil aspártico que provoca la ESPT de la fluoresceína<sup>[401]</sup>, las especies del tampón acetato en Oregon Green 488<sup>[275]</sup> y en derivados del Pennsylvania Green<sup>[394]</sup>. Asimismo, se estudió que algunos donadores/aceptores protónicos son suficientemente efectivos para producir ESPT en colorantes xanténicos, mientras que otros como tampón HEPES o TRIS, no lo son<sup>[402]</sup>.

En este sentido, al sufrir ciertos derivados xanténicos reacciones de ESPT, sus valores de tiempo de decaimiento se ven influenciados por la concentración de los pares donadores/aceptores que median la ESPT. Por ello estos compuestos se han utilizado como sensores FLIM para la detección de analitos en el interior celular de forma indirecta mediante cambios en los valores de tiempo de decaimiento. Algunos ejemplos de estos xantenos que sufren ESPT y se han utilizado por ello como sensores FLIM se describen seguidamente.

#### **IV.1.2.2. Sensor FLIM para la detección de acetatos por ESPT**

La detección de iones acetato en células es crucial ya que es un metabolito relacionado directa o indirectamente con el metabolismo de las células cancerígenas en personas que padecen cáncer<sup>[403],[404],[405]</sup>. Dicho metabolito está implicado en la apoptosis de células tumorales<sup>[406]</sup> y su detección podría ser útil para ahondar en el mecanismo de muerte celular.

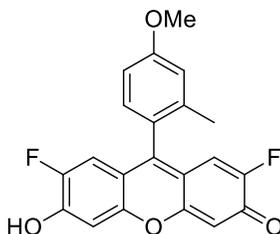
Para el desarrollo de sensores FLIM de acetato basados en ESPT, hay que tener en cuenta que las correspondientes especies ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e ion acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) pueden actuar como un par adecuado dador/aceptor de protones. En los trabajos de Orte y colaboradores se demostró en profundidad la ESPT mediada por las especies del tampón acetato en el derivado 2',7'-difluorofluoresceína (conocido como Oregon Green 488, cuya estructura aparece en la **Figura IV.3**), y se encontró la importancia de que el  $\text{pK}_a$  del colorante y el de la especie dadora/aceptora de protones sean próximos para favorecer la reacción. Así, el  $\text{pK}_a$  del Oregon Green de 4.69 estaba muy próximo al del ácido acético<sup>[275],[407],[408]</sup>.



**Oregon Green 488**

**Figura IV.3.** Estructura del Oregon Green 488.

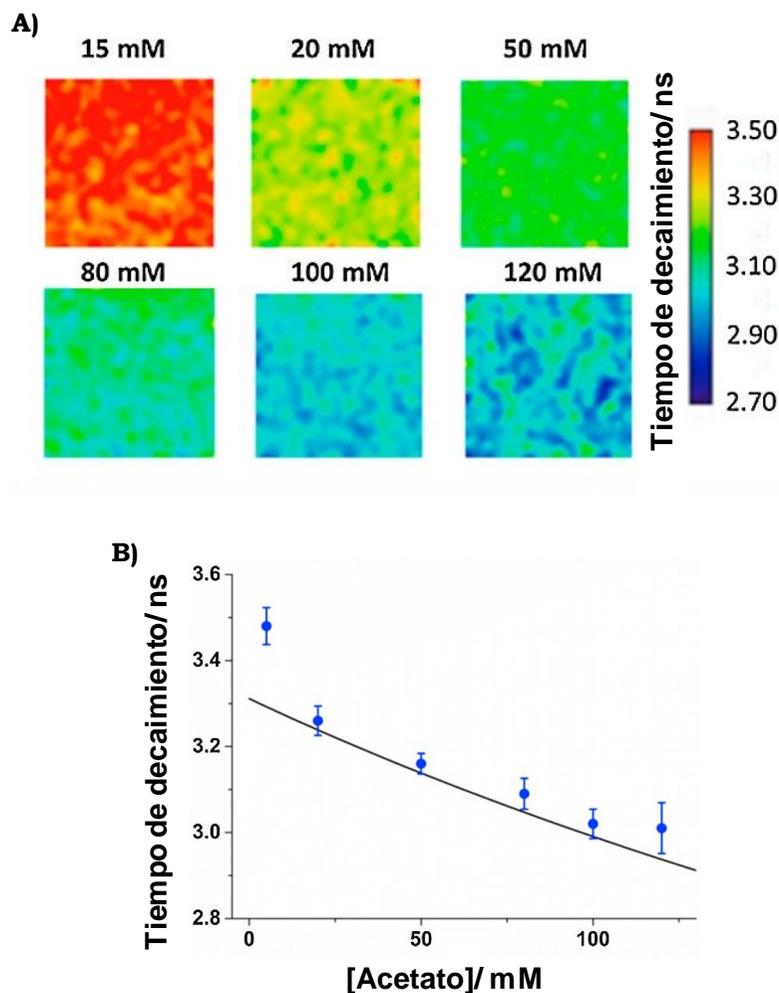
Sin embargo, el Oregon Green 488 no pudo funcionar adecuadamente como sensor FLIM, al tener tanto las especies ácida (monoaniónica) como básica (dianiónica) una fluorescencia notable, lo que resulta en decaimientos de fluorescencia bi-exponenciales. En este sentido, uno de los aspectos clave para el diseño de un sensor FLIM basado en ESPT es que una de las especies implicadas en la transferencia protónica no sea fluorescente. Esto da lugar, a decaimientos biexponenciales, pero con uno de los tiempos de decaimiento extremadamente bajo, con lo que puede descartarse en los ajustes FLIM. Con esta filosofía se diseñó un sensor con un  $\text{pK}_a$  adecuado para detectar acetato a través de reacciones ESPT, y cuya especie ácida fuera prácticamente no fluorescente. Se trata de un xanteno 2,7-difluorado, derivado de los Pensilvania Green<sup>[409]</sup> denominado 2,7-difluoro-6-hidroxi-9-(4-metoxi-2-metilfenil)-3*H*-xanten-3-ona cuya estructura se muestra en la **Figura IV.4**.



**2,7-difluoro-6-hidroxi-9-(4-metoxi-2-metilfenil)-3H-xanten-3-ona**

**Figura IV.4.** Estructura del sensor de acetato.

En cuanto a las propiedades fotofísicas de este sensor, absorbe y emite en la región verde del visible, en torno a los 500 nm y se encuentra en disolución, según el pH del medio, en sus dos formas prototrópicas, neutra y aniónica con rendimientos cuánticos de 0.02 y 0.65, respectivamente. El valor de  $pK_a$  del sensor es de 4.04, cercano al  $pK_a$  del ácido acético de 4.76<sup>[394]</sup>. La presencia de las especies del tampón acetato en disolución promueve la reacción ESPT entre las especies neutra y aniónica del sensor, provocando que el tiempo de vida de fluorescencia principal sufra modificaciones en presencia de diferentes concentraciones de tampón acetato. Esta respuesta a la cantidad de acetato se corroboró mediante microscopía FLIM en medio DMEM, como disolución compleja que simula el citoplasma. Las imágenes FLIM (**Figura IV.5**) mostraron una disminución en el tiempo de decaimiento de fluorescencia, desde alrededor de 3.5 ns a concentraciones bajas de tampón acetato hasta valores en torno a 2.7 ns a mayores concentraciones. Esta dependencia concuerda con la presencia de una reacción ESPT favorecida por tampón acetato, y con los valores de las constantes cinéticas resueltas en el trabajo<sup>[394]</sup>.



**Figura IV.5. A)** Imágenes FLIM del colorante xanténico en medio DMEM a diferentes concentraciones de tampón acetato a pH 4 ( $\lambda_{\text{exc}}=485$  nm). La escala de colores arbitraria indica el valor del tiempo de decaimiento en cada píxel. **B)** Cambios de los valores de tiempo de decaimiento de fluorescencia a diferentes concentraciones de acetato. La línea representa los valores teóricos según la cinética de la reacción ESPT resuelta en el trabajo. Figura adaptada desde<sup>[394]</sup> con permiso de Elsevier.

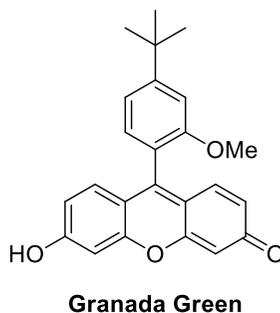
#### IV.1.2.3. Sensor Granada Green (GG) para la detección de aniones fosfato por ESPT

La detección de iones fosfato en células también es de gran importancia ya que están implicados en la mineralización ósea, transducción de señales y almacenamiento de energía en sistemas biológicos<sup>[410],[411]</sup>. En cambio, su

medida cuantitativa *in cellulo* ha sido bastante compleja. El método propuesto por Paredes *et al.* permitió estimar exitosamente concentraciones de fosfato en el interior de células vivas, mediante el uso de microscopía FLIM y el empleo de sensores fluorescentes xanténicos como los Tokyo Green (TG), que respondieron a las especies de fosfato por medio de una reacción ESPT<sup>[349]</sup>.

Para el desarrollo de sensores FLIM de fosfato basados en ESPT hay que tener en cuenta que las correspondientes especies presentes a pH neutro del tampón del medio,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , actúan como un par dador/aceptor de protones adecuado. En este caso, de nuevo se determinó que, para realizar medidas correctas de fosfato intracelular, una condición importante era que el  $\text{pK}_a$  del sensor tenía que ser cercano al pH fisiológico del medio, ya que de esa forma la dependencia de la concentración de fosfatos con el tiempo de vida de fluorescencia es mayor, aumentando la sensibilidad del sensor<sup>[349]</sup>.

En base a dicha metodología, uno de los sensores diseñados para detectar fosfatos a través de reacciones ESPT es el derivado xanténico denominado 9-[1-(4-*terc*-butil-2-metoxifenil)]-6-hidroxi-3*H*-xanten-3-ona o Granada Green (GG), cuya estructura se muestra en la **Figura IV.6**. La principal mejora de este sensor, frente a los desarrollados previamente con la estructura de TG, es que el GG presentaba un  $\text{pK}_a$  más cercano al pH fisiológico<sup>[399],[412]</sup>.

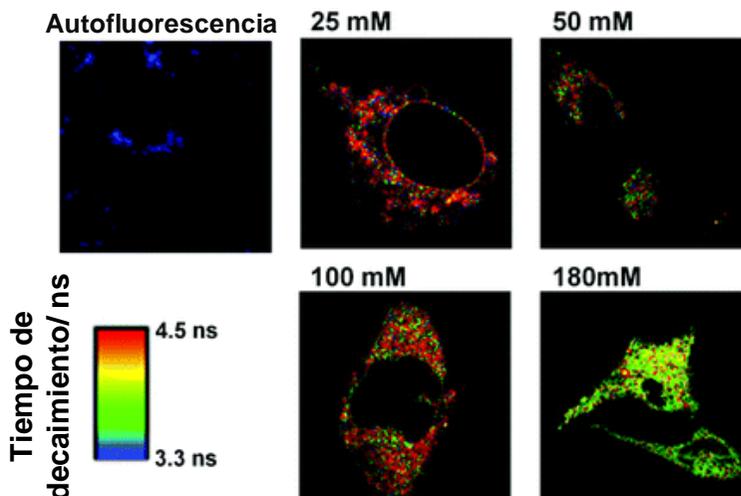


**Figura IV.6.** Estructura del Granada Green.

Algunas de las características del GG son que absorbe y emite en la región verde del visible, en torno a los 500 nm y tiene dos formas prototrópicas alrededor del pH fisiológico, neutra y aniónica, cuyos rendimientos cuánticos son de 0.10 y 0.97, respectivamente, y su valor de  $pK_a$  es de 7.26<sup>[288]</sup>. La presencia de una reacción ESPT mediada por las especies del tampón fosfato se evidenció por la dependencia del tiempo de decaimiento de fluorescencia principal del GG con las diferentes concentraciones de tampón fosfato.

En este caso también se comprobó que la reacción de ESPT entre las formas neutra y aniónica influye en la desactivación del GG excitado y ocasiona que el tiempo de decaimiento del sensor se vea influenciado tanto por cambios de pH como por la concentración de iones del tampón fosfato, tal y como ocurre en otros derivados xanténicos. Esto permitió la utilización de del GG como sensor de fosfatos en microscopía FLIM<sup>[257],[398]</sup>.

Para la caracterización del sensor, primero se estudió la respuesta del GG en medio DMEM mediante microscopía FLIM tras la adición de distintas concentraciones de fosfato, al igual que en el caso del sensor de acetato visto previamente. Una vez comprobada su adecuada respuesta, se estudió la variación de los valores de tiempo de vida a distintas concentraciones de fosfato en el interior celular, tras el análisis de imágenes tomadas con microscopía FLIM de la línea celular de preosteoblastos MC3T3-E1 (**Figura IV.7**). Este estudio permitió determinar la respuesta del sensor, confirmando que a mayor valor de tiempo de vida, menor fue la concentración de fosfato presente en el citoplasma celular<sup>[288]</sup>.



**Figura IV.7.** Imágenes FLIM del GG a una concentración de  $1 \cdot 10^{-7}$  M en células MC3T3-E1 a diferentes concentraciones de tampón fosfato a pH 7.35 ( $\lambda_{ex}$  = 485 nm). La escala de colores arbitraria indica el valor del tiempo de decaimiento en cada píxel. Figura adaptada desde<sup>[288]</sup> con permiso de la Royal Society of Chemistry.

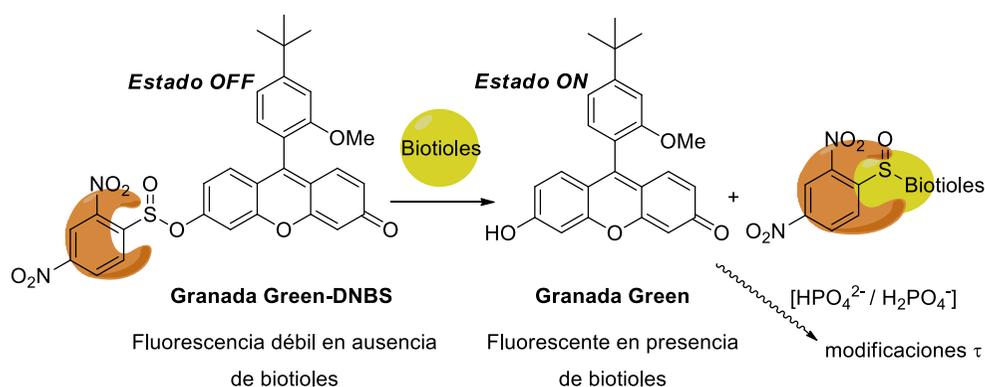
#### IV.1.2.4. Sonda dual para detección de biotioles y fosfatos

Una mejora con respecto a los sensores anteriores, llevada a cabo por nuestro grupo de investigación en 2015, es el diseño de un sensor dual que permitió la detección de dos analitos de forma simultánea, biotioles e iones fosfato<sup>[389]</sup>.

Dicha detección es relevante ya que, por un lado, la cantidad de biotioles es un marcador del estrés oxidativo que sufren las células<sup>[413]</sup> y por otro, la concentración intracelular de iones fosfatos es un marcador de la diferenciación de osteoblastos y de procesos de fosforilación<sup>[411]</sup>. La combinación de la información de ambos, es una herramienta útil para estudiar enfermedades como la obesidad y diabetes donde existe tanto un aumento del estrés oxidativo como alteraciones en el metabolismo óseo<sup>[414]</sup>.

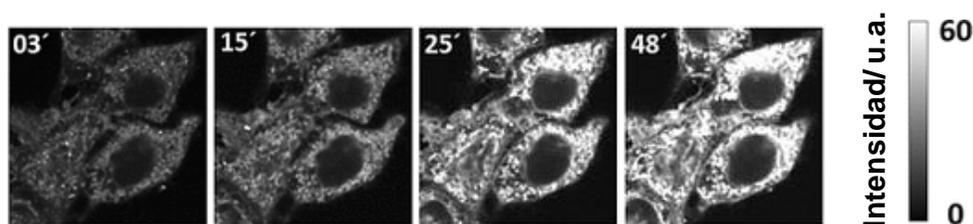
El sensor dual diseñado por Resa *et al.* se trata de un colorante fluorogénico OFF-ON cuyo esqueleto base es el GG al que se incluyó como sustituyente un grupo 2,4-dinitrobenzenosulfonilo (DNBS), dando lugar al 2,4-dinitrobenzenosulfonato de 9-[1-(4-*terc*-butil-2-metoxifenil)]-6-hidroxi-

3*H*-xanten-3-ona (GG-DNBS). Este compuesto no mostró fluorescencia, sin embargo, en presencia de biotioles en el medio se produjo una reacción de tiólisis liberándose un compuesto altamente fluorescente (GG) y permitiendo así la detección de biotioles del medio en función de las variaciones de intensidad de fluorescencia<sup>[269]</sup>. A su vez, el derivado xanténico, generado tras la reacción fluorogénica, sufrió reacciones de transferencia protónica en estado excitado mediadas por las especies del tampón fosfato, como las descritas previamente. Esto produjo cambios en el tiempo de vida de fluorescencia, lo que permitió el uso de estos valores como medida indirecta de la concentración de iones fosfato en el medio (**Esquema IV.2**)<sup>[389]</sup>.



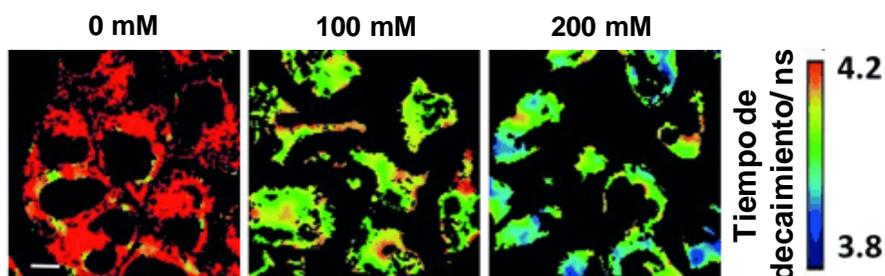
**Esquema IV.2.** Mecanismo de acción de la sonda fluorogénica dual constituida por GG-DNBS.

Esta detección dual se llevó a cabo en disolución y en células de cáncer de mama HeLa. En éstas, se evaluó en primer lugar la variación de los valores de intensidad de fluorescencia que tuvieron lugar al añadir el sensor no fluorescente (GG-DNBS). Para ello se tomaron varias imágenes de células mediante microscopía de fluorescencia a diferentes tiempos, como se muestra en la **Figura IV.8**. En ellas puede verse que la intensidad de fluorescencia aumenta conforme avanza el tiempo lo que indica una mayor liberación del compuesto GG altamente fluorescente debida a la reacción con los biotioles presentes en el medio.



**Figura IV.8.** Respuesta del GG-DNBS a biotioles intracelulares a lo largo del tiempo. Imágenes representativas de la reacción fluorogénica de GG-DNBS a una concentración de  $1 \cdot 10^{-7}$  M en presencia de biotioles en el interior de células HeLa ( $\lambda_{\text{exc}} = 485\text{nm}$ ). La escala de grises arbitraria indica el valor de intensidad en cada píxel. Figura adaptada desde<sup>[389]</sup> con permiso de John Wiley and Sons.

Tras ello y con el fin de comprobar la respuesta del sensor a concentraciones de iones fosfato, se incubaron las células con  $\alpha$ -toxina y se añadieron concentraciones conocidas de tampón fosfato con la finalidad de evaluar los cambios producidos en los valores de tiempo de vida de fluorescencia a causa de la reacción ESPT. Para ello, como se observa en la **Figura IV.9**, se tomaron distintas imágenes mediante microscopía FLIM, confirmándose la reducción en el tiempo de decaimiento de fluorescencia del colorante con una mayor cantidad de fosfato adicionado<sup>[389]</sup>.



**Figura IV.9.** Ejemplo representativo de imágenes FLIM de células HeLa a diferentes concentraciones de fosfato extracelular a pH 7.35 ( $\lambda_{\text{exc}} = 470\text{ nm}$ ). La escala de color arbitraria indica variaciones en el tiempo de decaimiento de fluorescencia. Figura adaptada desde<sup>[389]</sup> con permiso de John Wiley and Sons.

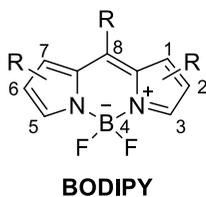
### IV.1.3. Sensores con emisión en el magenta

En imagen celular, una alternativa a los sensores de emisión en el verde, descritos previamente, es el uso de sensores de emisión en el magenta (600-650 nm)<sup>[415]</sup> o el IR cercano (700-900 nm)<sup>[416]</sup>. A estas longitudes de onda la autofluorescencia celular puede considerarse casi despreciable y además se facilita una mayor profundidad en los tejidos<sup>[417]</sup>. Esto supone ventajas apreciables a la hora de realizar aplicaciones cuantitativas.

En este sentido, algunas alternativas para desplazar la emisión a la zona del magenta es el uso de BODIPYs con determinadas posiciones sustituidas<sup>[418],[419]</sup>, de cianinas<sup>[420]</sup> o la inserción de átomos de silicio en la estructura de los colorantes dando lugar a derivados sililados<sup>[421],[422]</sup>. Esta última estrategia se ha llevado a cabo en una gran variedad de sondas en los últimos años, entre las que destacan las rodaminas<sup>[423]</sup> y los derivados xanténicos<sup>[424],[425],[426],[427]</sup>.

#### IV.1.3.1. BODIPYs

Los 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos o también conocidos como borodipirrometanos (BODIPYs) son fluoróforos cuya estructura general se puede observar en la **Figura IV.10**<sup>[428]</sup>, que han sido ampliamente utilizados como sensores fluorescentes<sup>[429]</sup>.



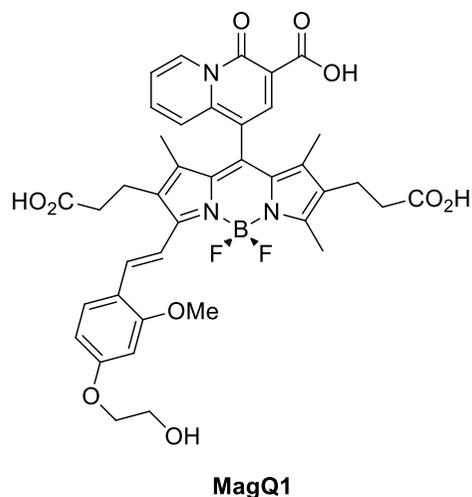
**Figura IV.10.** Estructura general de los BODIPYs.

Entre sus características destaca que su emisión puede modularse en función de sus sustituyentes. Normalmente los BODIPYs sustituidos en la posición 8 (posición *meso*-) y en las posiciones 2 y 3, absorben y emiten en la región del visible en torno a los 500 nm. A diferencia de los derivados xanténicos, los BODIPYs sustituidos suelen presentar características espectrales independientes del pH, poseen elevados rendimientos cuánticos,

un buen coeficiente de extinción molar y son fotoestables<sup>[430]</sup>. El principal inconveniente que presentan es que su solubilidad en agua es limitada y tienden a formar agregados, lo cual afecta a sus propiedades ópticas<sup>[431]</sup>. A pesar de ello, son ampliamente empleados debido a su potencial de funcionalización permitiendo la modulación de sus propiedades<sup>[432],[433]</sup>.

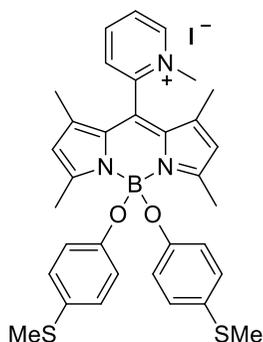
Así, en la bibliografía se describe una gran variedad de BODIPYs con emisión en el rojo<sup>[429]</sup>, con distintas aplicaciones tales como la detección selectiva de tioles en el interior celular<sup>[434]</sup>, de iones metálicos como el  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[435],[436],[437]</sup> o  $\text{Mg}^{2+}$ <sup>[431]</sup> o la detección de ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ )<sup>[438]</sup>, entre otras. A continuación, se mencionan algunos ejemplos concretos de estas últimas aplicaciones.

Por un lado, la detección de  $\text{Mg}^{2+}$ , uno de los cationes intracelulares más abundantes, es importante ya que este metal está implicado en diversos procesos fisiológicos como son la activación de enzimas<sup>[439]</sup>, homeostasis celular o el metabolismo energético<sup>[440]</sup>. Lin y colaboradores sintetizaron un sensor al que denominaron MagQ1, cuya estructura se muestra en la **Figura IV.11**, utilizando como fluoróforo un BODIPY con emisión en el rojo funcionalizado con un grupo alcoxiestirilo en posición 5 y un grupo ácido 4-oxo-4*H*-quinolizina-3-carboxílico en posición 8 capaz de reconocer este catión de forma selectiva. A su vez, para aumentar la solubilidad en agua se funcionalizó el BODIPY con grupos carboxipropionilos en posiciones 2 y 6. Una vez sintetizado, estudiaron sus propiedades fotofísicas en disolución y en células HeLa. Los máximos de absorción y de emisión del sensor se encontraban en la región roja del espectro, a 600 y 635 nm respectivamente, medidas en tampón de piperazina-*N,N'*-bis(2-ácido etanosulfónico) (PIPES). Su fluorescencia se vio incrementada en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que permitió su detección sin apenas mostrar interferencias con otros iones presentes en células. Además, el empleo de este sensor posibilitó la obtención de imágenes de  $\text{Mg}^{2+}$  endógeno en células HeLa vivas<sup>[431]</sup>.



**Figura IV.11.** BODIPY que permite la detección de iones  $Mg^{2+}$ .

Por otro lado, la detección del HClO también resulta muy interesante ya que está implicado en muchos procesos patológicos que derivan en enfermedades como la neurodegeneración<sup>[441]</sup> y el cáncer<sup>[442]</sup>. En este sentido, Jin *et al.* diseñaron y sintetizaron un sensor basado en un BODIPY modificado, cuya estructura se muestra en la **Figura IV.12**. Dicho sensor está constituido por un BODIPY como fluoróforo sustituido en posición 8 por una sal de piridinio para aumentar su solubilidad en agua, 4 grupos metilo en posiciones 2, 3, 5 y 6 y dos grupos metilmercaptofenoxi en el átomo de boro. Una vez sintetizado, estudiaron sus propiedades fotofísicas en disolución y en células HeLa. Este compuesto presentó un máximo de absorción a 524 nm y de emisión de 562 nm, ambos determinados en tampón PBS. Su fluorescencia se vio incrementada en presencia de HClO y fue capaz de responder a distintas concentraciones de HClO en células HeLa vivas<sup>[438]</sup>.

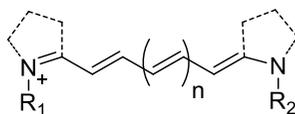


**BODIPY-HClO**

**Figura IV.12.** BODIPY que permite la detección de HClO.

#### IV.1.3.2. Cianinas

Las cianinas, como ya se mencionó en el *Capítulo III*, son fluoróforos constituidos por una cadena de polimetina unida en sus extremos a dos átomos de nitrógeno cuaternario que pueden o no formar parte de un anillo heterocíclico, como se muestra en la **Figura IV.13**<sup>[312]</sup>. Las que poseen una cadena de polimetina más corta (monometina y trimetina) poseen longitudes de onda de excitación y emisión en la zona del azul o verde. En cambio conforme se va aumentando el número de dobles enlaces tiene lugar un desplazamiento de la emisión a la zona del rojo<sup>[443]</sup>.

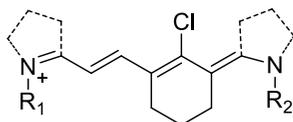


**Cianina**

**Figura IV.13.** Estructura general de las cianinas.

Los principales inconvenientes de este tipo de fluoróforos son sus limitados rendimientos cuánticos en disolución acuosa, la tendencia a la agregación en disolución, restringiendo sus posibles aplicaciones, su fotosensibilidad y su isomerización cis-trans<sup>[421]</sup>. Sin embargo, para intentar mejorar dichas propiedades en muchos de los casos se han seguido diferentes estrategias. Una de ellas es la incorporación en la cadena de un anillo de ciclohexenilo, como se muestra en la **Figura IV.14**, lo que favorece una

mejora de los rendimientos cuánticos y la estabilidad de este tipo de cianinas<sup>[444]</sup>. La polifluoración es otra de las estrategias utilizadas para mejorar las propiedades de esta familia de fluoróforos<sup>[445]</sup>, así como la incorporación de grupos sulfonatos para mejorar la solubilidad en agua, evitando la formación de agregados y favoreciendo la fotoestabilidad<sup>[317],[446]</sup>.



**Cianina con ciclohexenilo**

**Figura IV.14.** Estructura general de las cianinas con ciclohexenilo incorporado.

Las aplicaciones de las cianinas son numerosas debido a la gran variedad de estructuras existentes<sup>[421]</sup>, incluyendo la detección de iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[447]</sup>,  $\text{Zn}^{2+}$ <sup>[448]</sup>,  $\text{Hg}^{2+}$ <sup>[449],[450]</sup>, su uso para el etiquetado de biomoléculas<sup>[451]</sup>, marcaje de mitocondrias<sup>[227]</sup>, como se mencionó en el *Capítulo II. Apartado II.1.1.2*, la detección de especies reactivas de oxígeno<sup>[452],[453]</sup> y, como se mostró en el *Capítulo III. Apartado III.1.1.1.c)*, para estudiar cambios del pH del medio<sup>[315],[316]</sup>.

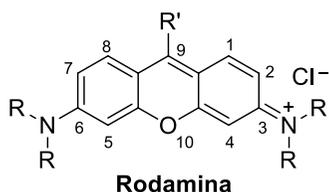
#### **IV.1.3.3. Colorantes sililados**

Los colorantes sililados son fluoróforos que presentan un átomo de silicio en su estructura el cual es incorporado con la finalidad de ocasionar un desplazamiento batocrómico de las longitudes de onda de absorción y emisión. Se caracterizan por ser bastante solubles en agua, tener un alto rendimiento cuántico y una alta absorptividad molar, por lo que su uso como sondas fluorescentes es muy habitual<sup>[426]</sup>.

A continuación, se van a mencionar algunos de los colorantes sililados más importantes como son las rodaminas sililadas y los derivados xanténicos sililados.

#### IV.1.3.3.a) Rodaminas sililadas

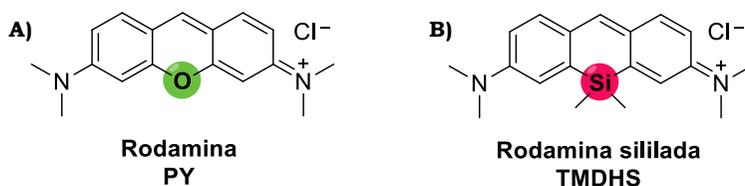
Las rodaminas son fluoróforos con esqueleto similar a los xantenos pero con átomos de nitrógeno en lugar de oxígeno en las posiciones 3 y 6 (**Figura IV.15**)<sup>[454]</sup>.



**Figura IV.15.**Estructura general de las rodaminas.

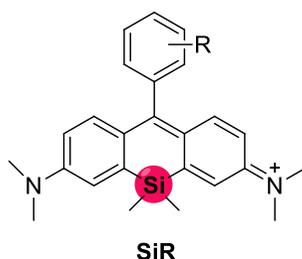
Son compuestos que se utilizan habitualmente como sondas fluorescentes y que presentan unas longitudes de onda de absorción y emisión inferiores a los 600 nm, en torno a 550 nm<sup>[423]</sup>.

Con el objetivo de poder utilizarlas en la región espectral del magenta se han propuesto diferentes estrategias como la extensión de la conjugación mediante la fusión de anillos heteroaromáticos<sup>[455]</sup>, la sustitución del carbono en posición C-9 del anillo por nitrógeno<sup>[456]</sup> o bien la incorporación de grupos aceptores de electrones como el ciano en dicho carbono<sup>[457]</sup>. Sintéticamente estas estrategias son muy complejas, por lo que se han buscado alternativas. Una de ellas es conseguir dicho desplazamiento batocrómico mediante la sustitución del oxígeno en posición 10, por un átomo de silicio, como se muestra en la **Figura IV.16**, dando lugar a rodaminas sililadas como la 2,7-*N,N,N',N'*-tetrametil-1-9-dimetil-10-hidro-9-sililantraceno (TMDHS), la cual mostró un desplazamiento espectral respecto a la pironina (PY) de 90 nm hacia el rojo<sup>[423]</sup>.



**Figura IV.16.** Estructura rodaminas. **A)** Sin sustituir (PY) y **B)** Sustituida con silicio (TMDHS).

Años más tarde Koide *et al.*<sup>[458]</sup> mostraron una serie de rodaminas sililadas con emisión tanto en el magenta como en el IR cercano, las cuales fueron obtenidas a partir de TMDHS. La diferencia entre ambas, es que el nuevo grupo de rodaminas que denominaron Si-rodamina (SiR), como se puede ver en la **Figura IV.17**, presenta un resto bencénico en el C-9 de la estructura de gran utilidad para introducir distintos sustituyentes y así variar sus propiedades fluorescentes<sup>[426]</sup>.



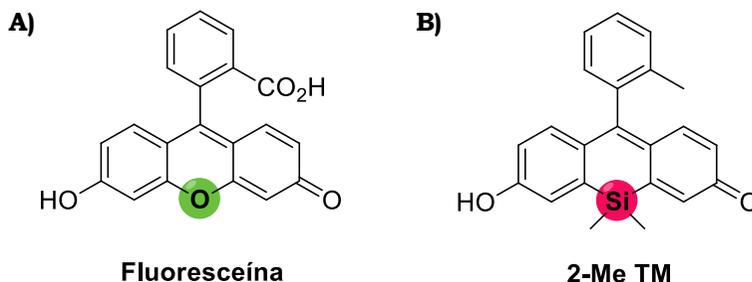
**Figura IV.17.** Estructura Si-rodaminas (SiR).

En general este tipo de fluoróforos sililados se han utilizado para detección de  $Zn^{2+}$ <sup>[458]</sup>, obtención de imágenes de células vivas<sup>[459]</sup>, marcaje mitocondrial<sup>[458]</sup>, marcaje del núcleo<sup>[252]</sup> (como se indicó en el *Capítulo II. Apartado II.1.1.5*), detección de óxido nítrico<sup>[390]</sup> y enzimas como la  $\gamma$ -glutamyltransferasa<sup>[460]</sup>.

#### IV.1.3.3.b) Derivados xanténicos sililados

En cuanto a los derivados xanténicos, en 2011 se sintetizó el primer grupo de xantenos con emisión en la zona del magenta denominados Tokyo Magenta (TM), entre los que destacó el 7-hidroxi-5,5-dimetil-10-(o-tolil)dibenzo[*b,e*]silin-3-5*H*-ona conocido como 2-metil-Tokyo Magenta (2-Me-308

TM)<sup>[424]</sup>. De nuevo, la estrategia que se utilizó para desplazar la emisión a esa zona fue sustituir el oxígeno en posición 10, por un átomo de silicio, como aparece en la **Figura IV.18**.

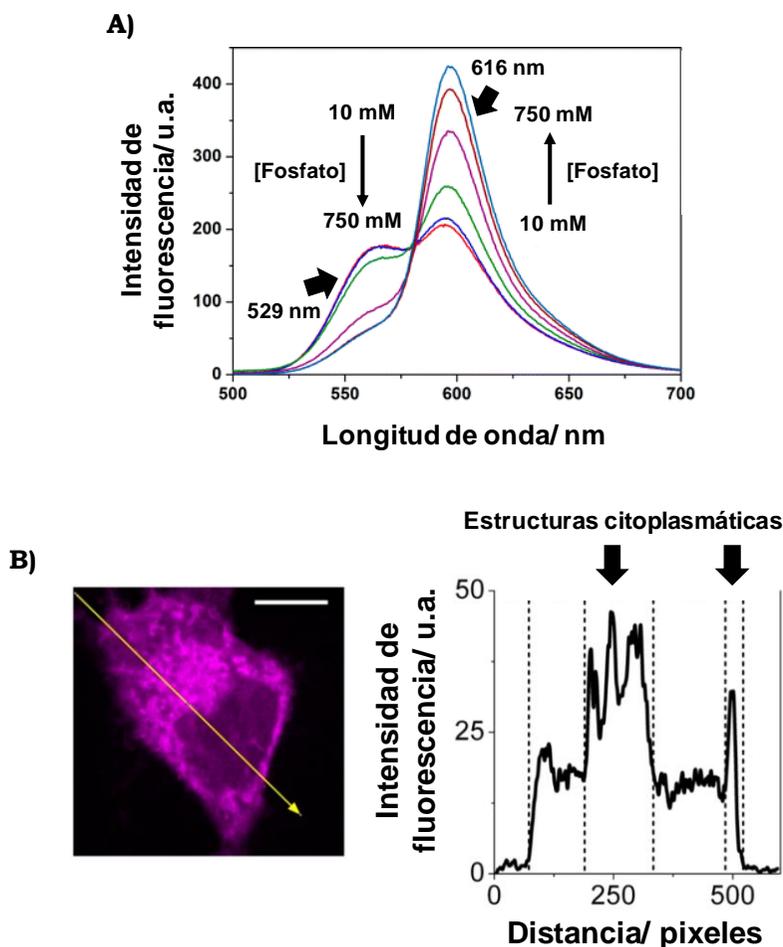


**Figura IV.18.** A) Estructura Fluoresceína. B) Estructura Tokyo Magenta.

El compuesto 2-Me-TM, una vez desprotonado el grupo hidroxilo, presentó una longitud de onda de absorción desplazada 110 nm con respecto la especie sin silicio 2-Me-TG. En cuanto a su aplicación, se corroboró la utilidad de un derivado de TM como sonda para la detección de  $\beta$ -galactosidasa<sup>[424]</sup>.

Debido a sus excelentes cualidades, nuestro grupo de investigación en 2015 propuso un estudio en mayor profundidad tanto de sus características fotofísicas como cinéticas, así como de su posible aplicabilidad<sup>[427]</sup>. En dicho estudio se observó que el derivado xanténico sililado 2-Me-TM también experimentaba una reacción ESPT en disolución de tampón fosfato. Para comprobarlo se realizaron los espectros de emisión de 2-Me-TM a diferentes concentraciones de tampón fosfato. Como se puede ver en la **Figura IV.19 A)**, en ellos se observó la presencia de dos especies al distinguirse dos máximos de emisión a 560 y 600 nm. Además, al variar la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida en presencia de diferentes cantidades de fosfato se corroboró la presencia de una reacción ESPT estimulada por las especies prototrópicas de este tampón. A su vez, se examinó su utilidad como sonda fluorescente en sistemas biológicos haciendo un estudio de la sonda en células HeLa 229. Tras el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia se determinó que podría servir para el marcaje

de determinadas estructuras citoplasmáticas, ya que se acumulaba preferentemente en ellas, como la que se puede ver en la **Figura IV.19 B)**<sup>[427]</sup>.

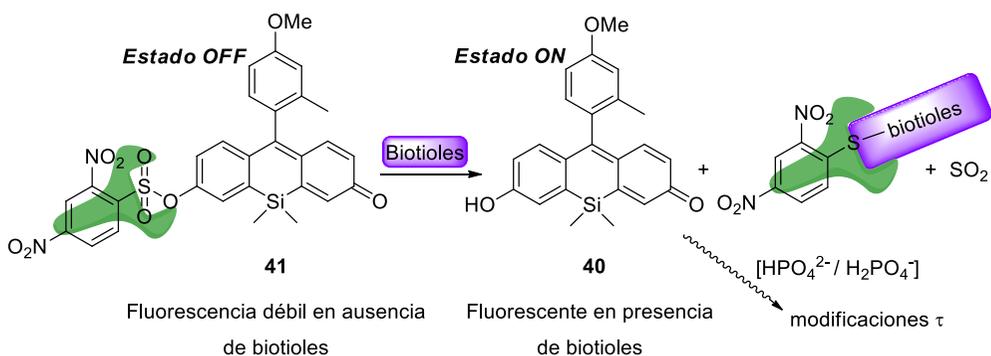


**Figura IV.19.** Ejemplo de sensor xanténico sililado (2Me-TM). **A)** Cambios de la intensidad de fluorescencia de 2-Me-TM medido a una concentración de  $5 \cdot 10^{-6}$  M a diferentes cantidades de tampón fosfato a pH 6.10 ( $\lambda_{\text{exc}} = 485$  nm). **B)** Imagen y perfil de intensidad de localización de 2Me-TM determinado a una concentración  $1 \cdot 10^{-7}$  M a ( $\lambda_{\text{exc}} = 530$  nm). Figura adaptada con permiso de<sup>[427]</sup>. Derechos de autor (2015) American Chemical Society.

## IV.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los antecedentes se ha descrito el interesante uso de reacciones fluorogénicas para preparar sondas fluorescentes duales, que reportan

información sobre dos analitos de interés, como la sonda GG-DNBS que responde a tioles y fosfatos. Sin embargo, a día de hoy, las sondas duales basadas en GG-DNBS presentan algunas desventajas. Por ejemplo, estas sondas están influenciadas por la autofluorescencia celular debido a su emisión espectral en el verde, lo que además dificultaría su posible aplicación en tejidos. Para solventar estos problemas, en este trabajo se propone la síntesis de sondas duales de tioles y fosfatos con emisión en el magenta, en un rango de longitudes de onda de 600-650 nm, evitando el solapamiento con la autofluorescencia de las células. El diseño se basa en una estructura xanténica en la que el átomo de oxígeno en posición 10 se ha sustituido por un átomo de silicio, produciendo un desplazamiento de la emisión hacia la zona del rojo ( $\lambda_{em} = 595 \text{ nm}$ )<sup>[424],[426]</sup>. Además, con el diseño propuesto también se favorece su incorporación rápida al interior celular debido a su bajo carácter hidrofílico<sup>[349]</sup>. Como se puede ver en el **Esquema IV.3**, la estrategia consiste en emplear un compuesto no fluorescente **41** (estado OFF) que, en presencia de btiotioles, por reacción de tiólisis libera un compuesto altamente fluorescente **40** (estado ON) permitiendo la detección de btiotioles, y actuando por tanto como sonda fluorogénica<sup>[269],[434]</sup>.



de fluorescencia, podría propiciar el empleo de la sonda como sensor dual de biotioles e iones fosfato de manera simultánea.

Basados en esta hipótesis, los objetivos que se plantean son los siguientes:

8. Sintetizar y caracterizar una sonda fluorogénica dual, para tioles y aniones fosfato, que presente longitud de onda de emisión en el magenta.
9. Caracterizar el comportamiento fotofísico del sensor sintetizado, mediante espectros de absorción, espectros de emisión y rendimientos cuánticos.
10. Estudiar su aplicación intracelular como sensor dual de detección de biotioles e iones fosfato mediante microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM).

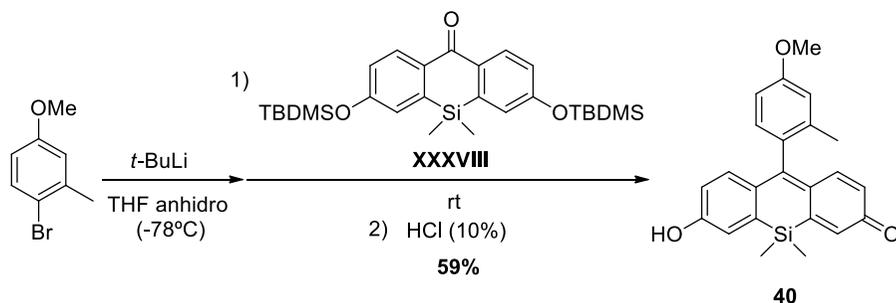
### **IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos, se procedió al diseño de una sonda dual de biotioles y aniones fosfato considerando que la detección debería llevarse a cabo de forma rápida, simultánea y a su vez independiente. Para ello, se diseñó un colorante OFF-ON, sustituido con un grupo 2,4-dinitrobenzenosulfonilo (DNBS) que es susceptible de sufrir una reacción de tiólisis<sup>[389]</sup> en presencia de biotioles en el medio liberando un colorante fluorescente. Los grupos tioles del medio pueden producir un ataque nucleofílico al anillo bencénico del DNBS, de manera que el colorante altamente fluorescente **40** se libera generándose como subproductos (2,4-dinitrofenil)biotiol y dióxido de azufre. Dicho colorante **40** puede sufrir una reacción ESTP en tampón fosfato, generando una respuesta a su vez a iones fosfato medida a través del tiempo de vida de fluorescencia (**Esquema IV.3**).

#### **IV.3.1. Síntesis y caracterización del sensor dual con emisión en el magenta**

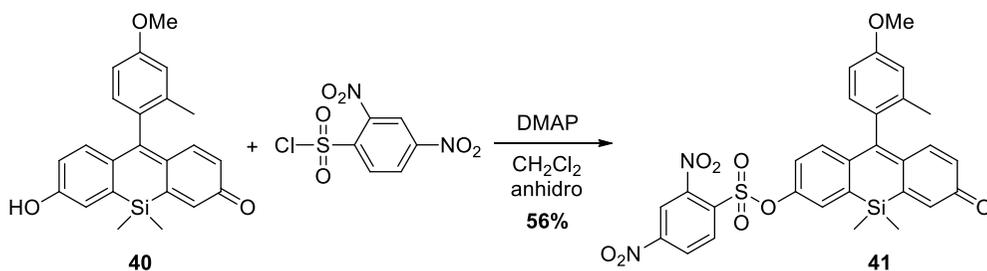
Para la preparación del sensor propuesto se siguió una estrategia sintética previamente descrita por nuestro grupo de investigación<sup>[389]</sup>. Como se observa en el **Esquema IV.4**, la metodología empleada consistió en la

formación de un compuesto organolítico mediante el tratamiento del producto comercial 4-bromo-3-metilanisol con *t*-BuLi, teniendo lugar un intercambio halógeno-litio. A continuación se adicionó la cetona **XXXVIII**, obtenida anteriormente por una metodología similar a la citada por Best *et al.*<sup>[462]</sup>, y se realizó la deshidratación por hidrólisis ácida obteniéndose el compuesto **40** con un rendimiento del 59 %.



**Esquema IV.4.** Síntesis del colorante **40**.

Posteriormente, se llevó a cabo la funcionalización del compuesto **40**, mediante la adición nucleofílica en presencia de base al cloruro de 2,4-dinitrobenzenosulfonilo dando lugar, tras la purificación por cromatografía en columna, al colorante **41** con un rendimiento del 56 % (**Esquema IV.5**).

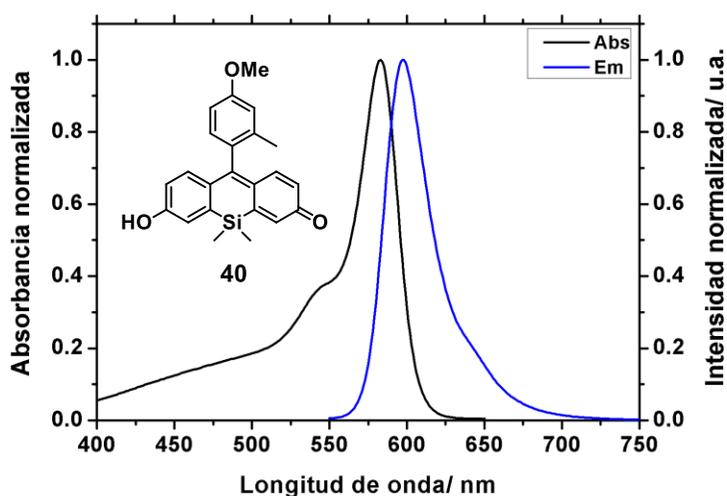


**Esquema IV.5.** Síntesis del colorante **41**.

### IV.3.2. Medidas fotofísicas

Tras la síntesis y caracterización mediante RMN de los compuestos **40** y **41**, se determinaron en primer lugar sus características espectroscópicas. Para ello se realizaron, de ambos compuestos, los espectros tanto de

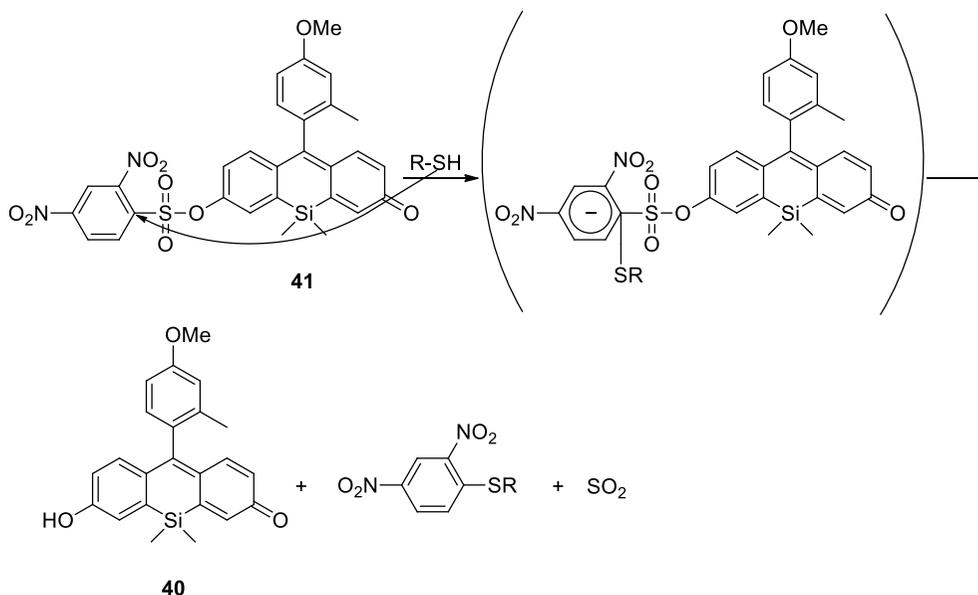
absorción como de emisión a pH 7.35, a concentraciones de  $7.55 \cdot 10^{-6}$  y  $1.87 \cdot 10^{-6}$  M, respectivamente. Así, el colorante **40**, como se muestra en la **Figura IV.20**, mostró un máximo de absorción a 583 nm, con una absorptividad molar de  $165300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , un máximo de emisión de 597 nm y un rendimiento cuántico de fluorescencia de  $0.44 \pm 0.03$ . Sin embargo, en el caso del compuesto **41** los valores de absorbancia y emisión se encontraron dentro de los valores de fondo, confirmándose el estado OFF del colorante en este compuesto.



**Figura IV.20.** Espectros normalizados de absorción (negro) y emisión (azul) de **40**.

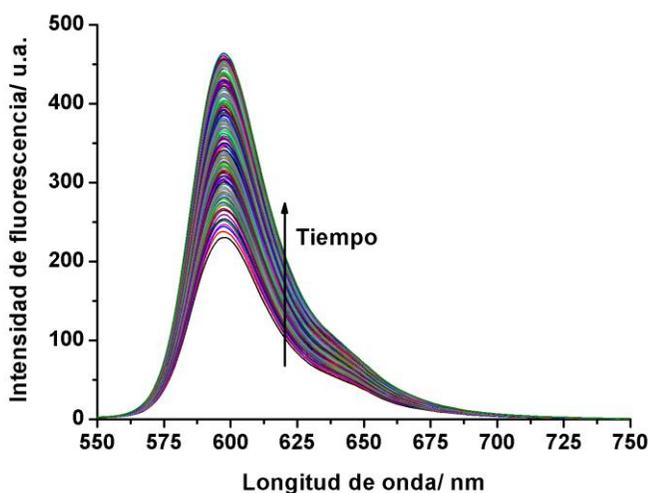
Una vez sintetizada la sonda fluorogénica y comprobada la ausencia de fluorescencia de **41**, el siguiente paso consistió en realizar un estudio en disolución de la cinética de la reacción fluorogénica mediada por btioteles antes de estudiar el comportamiento del sensor en el interior celular. Este estudio fue realizado por el *Dr. José Manuel Paredes (Departamento de Fisicoquímica, Universidad de Granada)*, el cual se llevó a cabo con la finalidad de comprobar que en presencia de btioteles como el glutatión (GSH), uno de los tioteles más abundantes en células vivas, se produce la reacción fluorogénica, observándose un aumento de la fluorescencia por la liberación

del colorante **40** altamente fluorescente, tras la ruptura de grupo DNBS presente en el colorante **41**, como se puede ver en el **Esquema IV.6**.



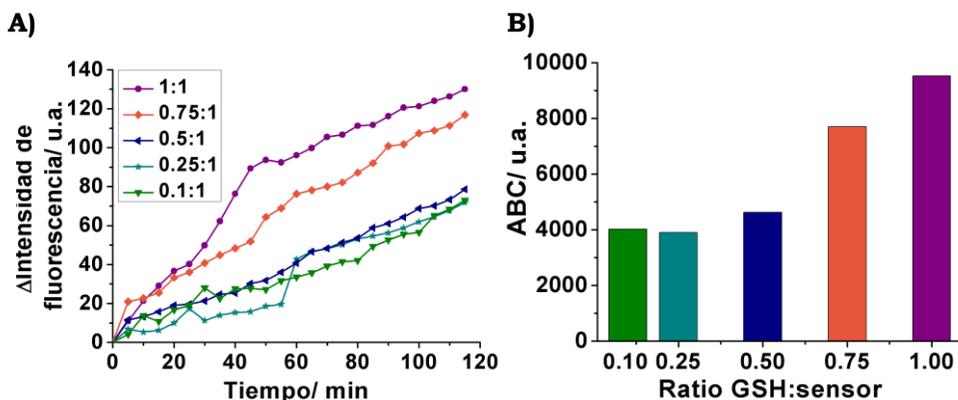
**Esquema IV.6.** Mecanismo de reacción de liberación de **40** por reacción con biotioles (R-SH).

Para realizar el experimento, se preparó una disolución de la sonda **41** a una concentración de  $6 \cdot 10^{-7}$  M en tampón de Krebs-Ringer, a partir de una disolución madre a  $6 \cdot 10^{-5}$  M en DMSO de dicha sonda. En una cubeta de 1.5 mL se añadió una proporción estequiométrica 1:1 de GSH y sensor y se realizaron espectros de emisión cada 5 minutos a lo largo de 395 minutos, a un pH de 7.3 (similar al pH intracelular). La evolución de estos se muestra en la **Figura IV.21**, donde se puede ver un aumento gradual de la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo. El espectro de emisión recogido corresponde totalmente con las características del colorante **40**, lo que corroboró la ruptura del grupo DNBS por reacción de tiólisis con GSH, liberando la sonda fluorescente **40**.



**Figura IV.21.** Evolución temporal de los espectros de emisión de fluorescencia de una disolución a  $6 \cdot 10^{-7}$  M de **41** en presencia de una cantidad estequiométrica de GSH ( $\lambda_{\text{ex}}=530$  nm).

El siguiente objetivo se centró en estudiar la respuesta de **41** frente a diferentes concentraciones de GSH. Para ello se estudiaron las cinéticas de la reacción fluorogénica en disolución durante 2 horas a diferentes proporciones de GSH y sensor, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1 y 1:1, las cuales pueden verse en el *Anexo. Capítulo IV*. Una vez medidas se representó el incremento en la intensidad de fluorescencia obtenida en el máximo de emisión frente al tiempo (**Figura IV.22 A**). A continuación, para poder cuantificar dicha respuesta como se muestra en la **Figura IV.22 B**) se calculó y representó el área bajo la curva (ABC) de cada una de las curvas mostradas. Así pudo observarse cómo al aumentar la concentración de GSH, la cantidad de colorante **40** liberado aumentó.

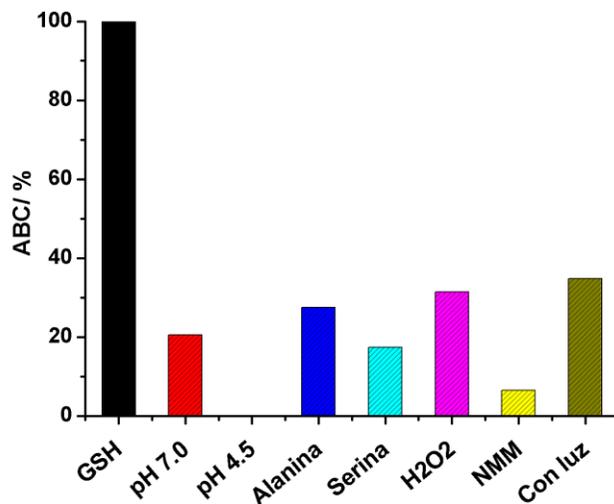


**Figura IV.22.** Respuesta de **41** a una concentración de  $6 \cdot 10^{-7}$  M frente a diferentes concentraciones de GSH. **A)** Representación del incremento de intensidad de fluorescencia  $I(t) - I(t=0 \text{ min})$  medidas en el máximo de emisión (597 nm) frente al tiempo, a las diferentes proporciones de GSH:sensor indicadas y **B)** Representación de los correspondientes valores de área bajo la curva (ABC).

Tomando como referencia el área bajo la curva (ABC) de la relación molar  $[\text{GSH}]:[\text{sensor}]=1$ , se comparó esta proporción estequiométrica con el resto de las probadas, 0.1, 0.25, 0.5 y 0.75, de manera que pudo observarse que al disminuir la proporción de GSH se produjo una disminución del área bajo la curva indicando una menor liberación del compuesto **40**. Cuando la relación molar se redujo a 0.75 disminuyó la señal aproximadamente un 19 % respecto a la relación de 1, mientras que cuando se disminuyó a 0.5 se redujo aún más, un 51 %, indicando una clara respuesta del proceso en ese rango de concentraciones.

Tras los resultados obtenidos con GSH, se procedió a realizar un estudio de otros factores interferentes que podrían influir en la ruptura del grupo DNBS y por tanto en la liberación de **40**. Para ello, se tomó como referencia el área bajo la curva mostrada anteriormente que se obtuvo al dejar la sonda **41** en presencia de glutatión en proporción 1:1. Así pues, se llevó a cabo un estudio de estabilidad de **41** en disolución en el que se midió la sonda en diferentes condiciones, que incluyen distintos pH, la presencia de aminoácidos (alanina y serina), oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un bloqueante de tioles como la *N*-metil maleimida (NMM) y la presencia de luz blanca (**Figura IV.23**).

Todas ellas en ausencia de tioles y a pH neutro a excepción de la condición de pH de 4.5.



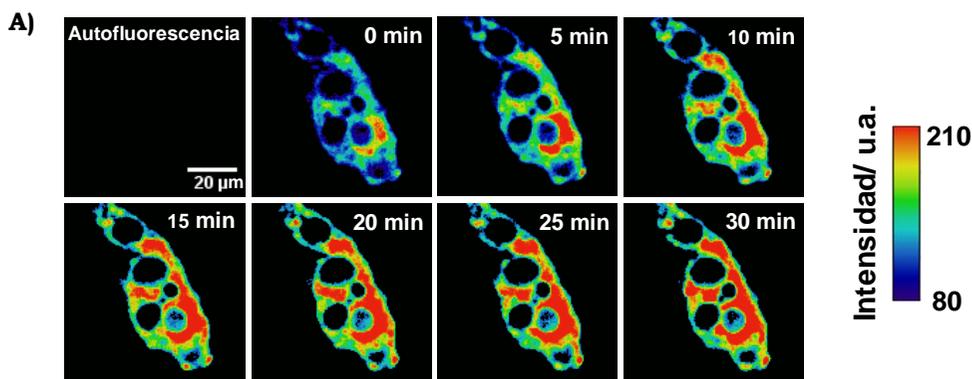
**Figura IV.23.** Estudio de estabilidad y selectividad de la reacción fluorogénica de una disolución a  $6 \cdot 10^{-7}$  M de **41**.

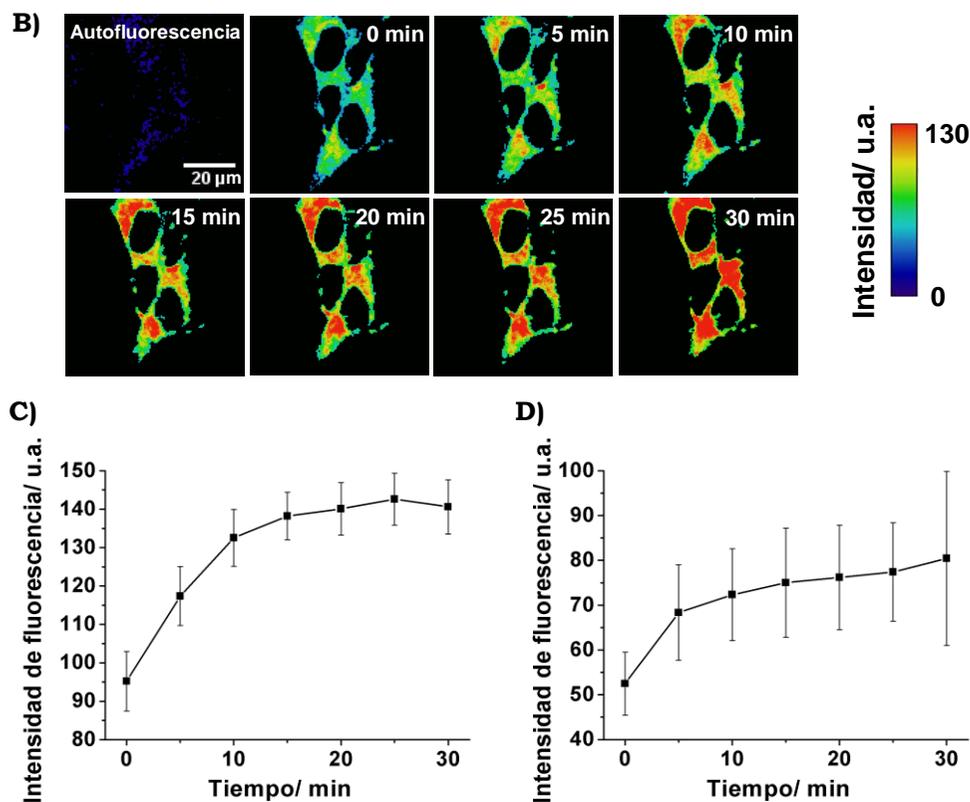
De forma global, como se puede ver en la **Figura IV.23**, se determinó que a pH ácido fue la única condición en la que la sonda se mantuvo totalmente estable. Sin embargo, en el resto de los casos, la fluorescencia aumentó en torno a un 20-30 % con respecto a la referencia, concluyendo que el compuesto **40** no se liberó únicamente en presencia de biotioles como el GSH, sino que, en otras condiciones, también se ve favorecida esta liberación. Aun así, los mejores resultados se obtuvieron con el GSH, con el que la liberación de **40** es total y tiene lugar de manera muy rápida en condiciones similares al interior celular (a pH neutro).

### **IV.3.3. Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células HepG2 y MC3T3-E1**

Una vez se comprobó el comportamiento de la sonda **41** en disolución, se pasó al estudio de la misma en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) y de preosteoblastos (MC3T3-E1). En primer lugar, se observó una incorporación rápida e inmediata al interior celular, a

pesar del aumento de volumen de la molécula **41** al incorporar el grupo DNBS en su estructura. Esto se observa en las imágenes de intensidad de la **Figura IV.24 A) y B)** en las que puede verse que en las condiciones de trabajo la autofluorescencia celular es prácticamente nula y con el tiempo, tras añadir la sonda, la intensidad de fluorescencia detectada va aumentando. Como se ha mencionado, el compuesto inicial **41** no es fluorescente, por lo que la fluorescencia observada corresponde al compuesto **40** liberado tras la reacción de tiólisis ocasionada por la presencia de biotioles en el medio. De modo que este sensor permitió llevar a cabo una medida cualitativa indirecta de la cantidad de biotioles presente en las células. Cuanto más rápida es la cinética de liberación y el valor de ABC, mayor es la cantidad de producto **40** liberado y, por tanto, mayor es la cantidad de biotioles en el interior celular. Además, puede verse como en el caso de las células HepG2 (**Figura IV.24 C)**), la intensidad total alcanzada al final de la reacción fluorogénica presenta valores más elevados, en torno a 140 u.a., en comparación con el caso de los preosteoblastos (**Figura IV.24 D)**), en los que llega a un valor máximo de 80 u.a. Estos datos apoyan la hipótesis de que la cantidad de biotioles es superior en la primera línea celular. Es importante anotar que las gráficas de intensidad frente a tiempo mostradas para ambos tipos de células son el resultado del promedio de más de 20 células diferentes en equilibrio homeostático y diferentes etapas fisiológicas, lo que justifica el elevado valor de algunas de las barras de error estándar en esos datos.

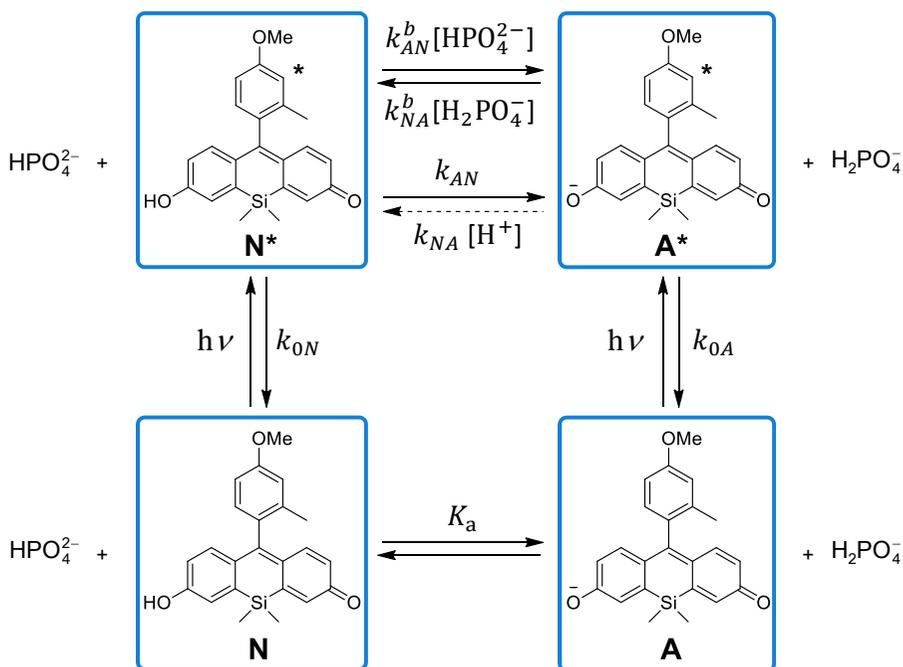




**Figura IV.24.** Reacción fluorogénica de **41** a  $6 \cdot 10^{-7}$  M en presencia de biotioles en el interior celular ( $\lambda_{ex} = 530\text{nm}$ ). **A)** Ejemplo representativo de imágenes de la evolución de la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo de células HepG2. **B)** Ejemplo representativo de imágenes de la evolución de la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo de células MC3T3-E1. **C)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia promedio frente al tiempo. El promedio se realizó sobre los píxeles que contenían citoplasma celular de 7 experimentos diferentes con células HepG2. **D)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia promedio frente al tiempo. El promedio se realizó sobre los píxeles que contenían citoplasma celular de 5 experimentos repetidos con células MC3T3-E1. Las barras de error en ambas gráficas representan los errores estándar.

Tras obtener información sobre la respuesta a biotioles en el interior celular, se pasó a evaluar la respuesta del sensor a la concentración intracelular de iones fosfato, tras la liberación fluorogénica de **40**. Dicha medida se hizo a través de los valores de los tiempos de decaimiento de fluorescencia los cuales sufren modificaciones por la presencia de reacciones ESPT mediadas por, en este caso, las especies prototrópicas del tampón fosfato<sup>[257],[463]</sup>. Como se ha comentado en los antecedentes, la presencia de

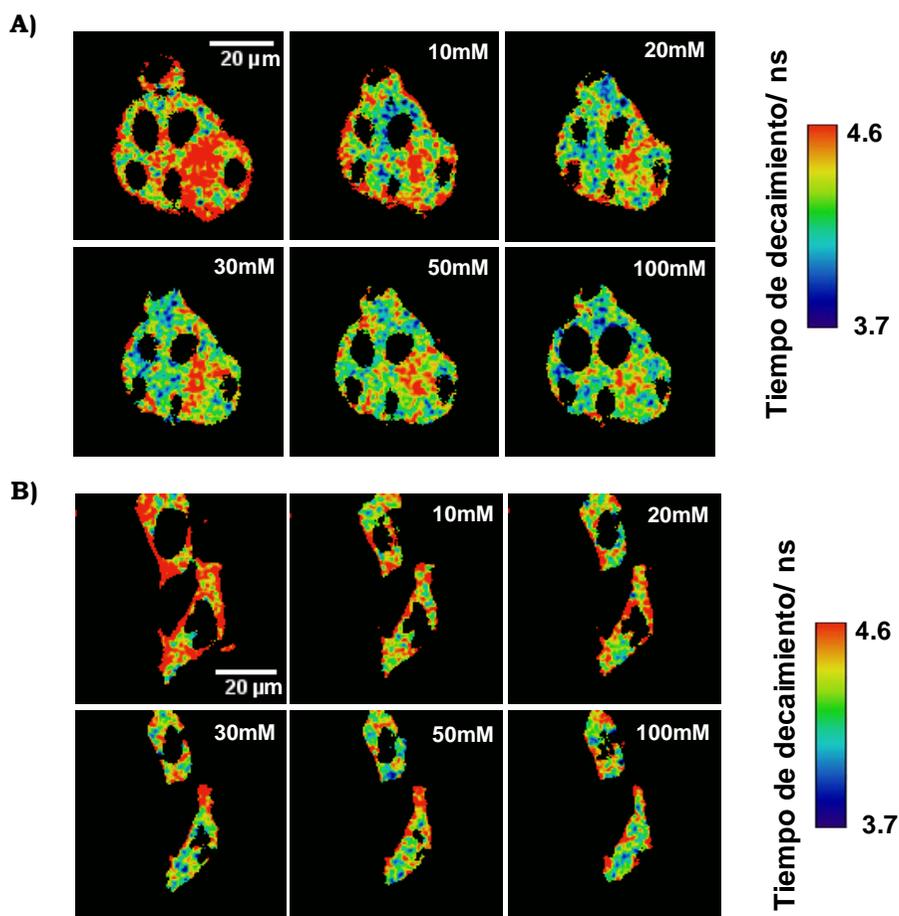
un par dador/aceptor de protones, como las especies  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  de la disolución tampón, favorece las reacciones ESPT. Así, se muestran en el **Esquema IV.7** las reacciones, según la teoría de las reacciones ESPT, en las que podría participar el colorante **40** en presencia de este par  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , tanto en el estado fundamental como en el estado excitado. En ambos casos debe tener lugar la interconversión entre las especies neutra (**N**) y aniónica (**A**), ocasionada por la transferencia de protones intermolecular promovida por la presencia del par dador/aceptor.

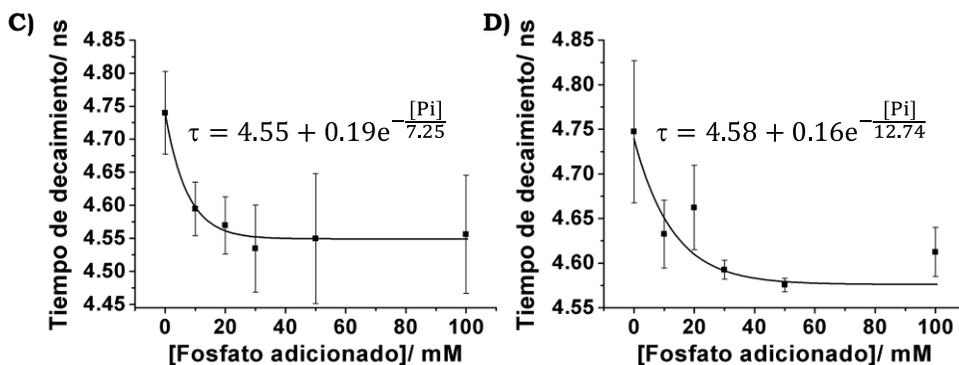


**Esquema IV.7.** Modelo cinético de la reacción de transferencia protónica en el estado excitado de **40** promovida por  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ .

Como ya se mencionó, la presencia de la reacción ESPT haría que los tiempos de decaimiento de fluorescencia de este colorante cambiaran en función de la concentración de fosfato del medio. Por ello, para asegurar que el sensor resultaba útil para medir, además de la concentración de biotioles, la concentración de iones fosfato intracelular a través de las variaciones del tiempo de vida del compuesto liberado **40**, se realizaron una serie de experimentos como el representado en la **Figura IV.25**.

En primer lugar, cada muestra analizada previamente se incubó 20 minutos con  $\alpha$ -toxina con el fin de permeabilizar la membrana celular. A continuación, se fueron añadiendo en el medio extracelular distintas concentraciones totales conocidas de iones fosfato (10, 20, 30, 50 y 100 mM). Como puede verse en la **Figura IV.25 A) y B)**, usando la escala de color arbitraria de 4.6 a 3.7 ns para representar el tiempo de decaimiento de fluorescencia, se observó una disminución del mismo conforme se aumentó la concentración de iones fosfato. Este mismo efecto se pudo ver en los experimentos restantes que se llevaron a cabo para el caso de la línea celular HepG2 (un total de 8 experimentos) y para los preosteoblastos (3 experimentos).





**Figura IV.25.** Respuesta a iones fosfato del compuesto **40** liberado medida a través de imágenes tomadas con microscopía FLIM ( $\lambda_{\text{exc}} = 530\text{nm}$ ). **A)** Ejemplo representativo de imágenes FLIM del colorante **40** liberado en células HepG2 en presencia de diferentes concentraciones de fosfato extracelular. **B)** Ejemplo representativo de imágenes FLIM del colorante **40** liberado en células MC3T3-E1 en presencia de diferentes concentraciones de fosfato extracelular. **C)** Representación gráfica del tiempo de decaimiento de fluorescencia promedio de **40** en función de las diferentes concentraciones de iones fosfato en células HepG2, y las correspondientes curvas de ajuste exponenciales. El promedio se realizó sobre los píxeles que contenían citoplasma celular de 8 experimentos repetidos. **D)** Representación gráfica del tiempo de decaimiento de fluorescencia promedio de **40** respecto a las diferentes concentraciones de iones fosfato en células MC3T3-E1, y las correspondientes curvas de ajuste exponenciales. El promedio se realizó sobre los píxeles que contenían citoplasma celular de 3 experimentos repetidos. Las barras de error en ambas gráficas representan los errores estándar.

Las curvas de la **Figura IV.25 C)** y **D)**, en las que se representa el tiempo de decaimiento de fluorescencia del colorante **40** liberado frente a las distintas concentraciones de fosfato, muestran la disminución de  $\tau$ , hasta alcanzar aproximadamente una concentración de fosfato de 30 mM. A concentraciones superiores no se produce una disminución adicional de  $\tau$ . En resumen, se ha determinado que dicha disminución de  $\tau$  se debe a que la presencia de iones fosfato en el medio extracelular hace que la reacción de transferencia protónica sea suficientemente más rápida que el propio proceso de desactivación por emisión de fluorescencia, dando lugar a la ESPT. Al depender esta disminución de  $\tau$  de la concentración de iones fosfato, el análisis de las imágenes FLIM nos permitiría determinar la cantidad de estos iones en el interior celular.

Para la cuantificación efectiva de las cantidades de fosfato intracelular (Pi), los datos de tiempo de decaimiento que se muestran en la **Figura IV.25 C) y D)** se utilizaron para realizar una calibración mediante un ajuste de una función exponencial (**Ecuación IV.1**).

$$\text{Ecuación IV.1} \quad \tau = \tau_0 + A_1 e^{-\frac{[Pi]}{[Pi]_0}}$$

En la **Figura IV.25 C) y D)** se muestran las ecuaciones obtenidas tras el ajuste exponencial para cada una de las líneas celulares HepG2 y MC3T3-E1. Una vez que la calibración de la respuesta del sensor frente a cambios conocidos de la concentración de fosfato quedó establecida, posteriormente, se procedió a realizar una estimación de la cantidad de iones fosfato intracelular basal tanto en células HepG2 como MC3T3-E1. Para ello, tras obtener las dos ecuaciones de ajuste de las gráficas **C) y D)** de la **Figura IV.25**, se despejó el parámetro de la concentración de fosfato (**Ecuación IV.2**).

$$\text{Ecuación IV.2} \quad [Pi] = [Pi]_0 \ln \frac{A_1}{\tau - \tau_0}$$

Así pues, tras analizar un total de 20 imágenes diferentes de cada una de las líneas celulares por separado, se obtuvieron 20 valores de  $\tau$  que fueron sustituidos en la **Ecuación IV.2**. De esta forma se calculó la concentración de fosfato basal para cada una de las imágenes tras haber añadido a las células el colorante **41** y luego se calculó la media de la concentración de fosfato en cada tipo de línea celular, siendo de  $1.9 \pm 1.1$  mM y  $4.2 \pm 2.1$  mM, para las células HepG2 y MC3T3-E1 respectivamente. Estos valores son relativamente cercanos a la concentración habitual de fosfato en el citoplasma celular, que se mantiene en torno a 10 mM en ausencia de elementos específicos anormales o procesos de señalización celular<sup>[464]</sup>.

Tras las medidas realizadas tanto en disolución como mediante microscopía FLIM en el interior celular, se puede concluir que los parámetros de intensidad y tiempo de decaimiento de fluorescencia responden adecuadamente a la cantidad de biotioles y de iones fosfato, respectivamente, en las distintas líneas celulares.

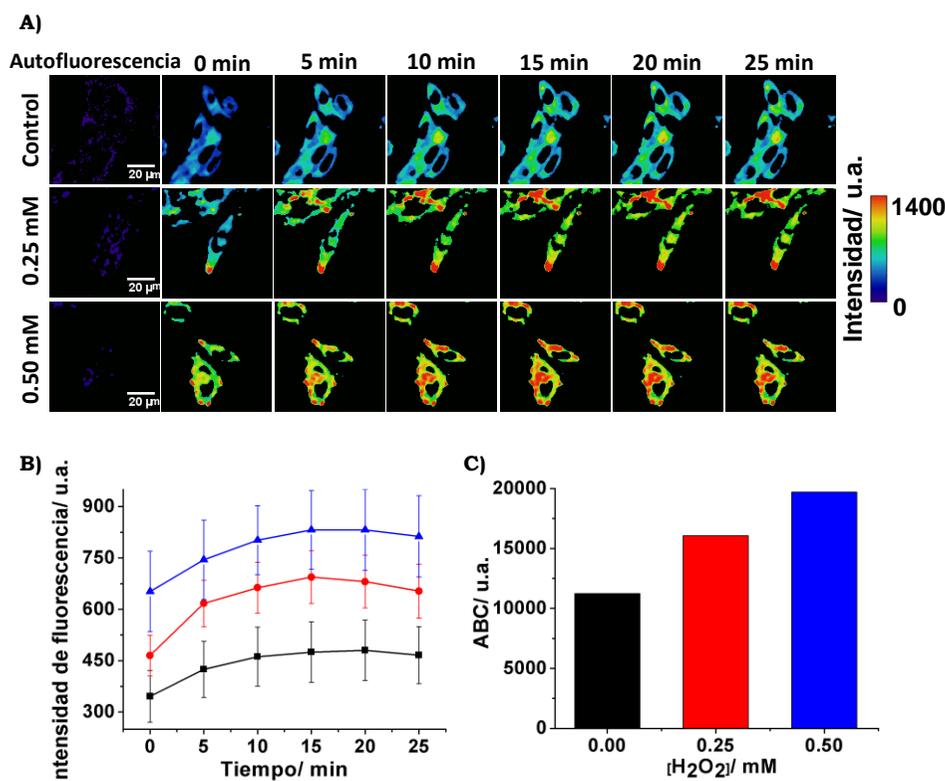
El resto de imágenes tomadas tanto de intensidad como de tiempos de decaimiento de fluorescencia de diferentes líneas celulares se encuentran en el *Anexo, Capítulo IV, en Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células HepG2 y MC3T3-E1*.

#### **IV.3.4. Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células fotorreceptoras 661W**

Finalmente, se probó la sonda **41** en la línea celular 661W, que se utiliza como modelo de células fotorreceptoras de retina de ratón. Cuando estas células se someten a situaciones de estrés oxidativo, estos procesos pueden causar graves daños como la pérdida de visión<sup>[465]</sup>. Esta situación de estrés oxidativo puede medirse de forma indirecta con la cantidad de biotioles generada en las células, ya que una mayor cantidad de biotioles sintetizado se traduce en células que han sido expuestas a un mayor estrés oxidativo y que, por tanto, presentan más especies reactivas de oxígeno (ROS) en su interior.

Por ello, primero estas células se sometieron a condiciones de estrés celular, incubándolas durante 12 horas con diferentes disoluciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en concentraciones crecientes de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM. Así pues, en estos casos, a mayor estrés oxidativo (mayores concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), las células generaron una mayor cantidad de biotioles como respuesta para evitar el daño. Este fenómeno se puede observar en la **Figura IV.26 A)**, donde las imágenes muestran que, en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las intensidades de fluorescencia a los diferentes tiempos, son muy inferiores a las obtenidas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cabe destacar que, en el caso de las concentraciones más elevadas, 0.75 y 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la mayoría de las células habían muerto, por lo que no pudieron ser analizadas y por tanto no se muestran en la **Figura IV.26**.

Además, en la **Figura IV.26 B)** y **C)** puede verse el aumento de intensidad de fluorescencia a mayor concentración de peróxido de hidrógeno (mayor valor de área bajo la curva) y, a su vez, un aumento de intensidad respecto al tiempo que se mantiene estable al alcanzar los 20-25 minutos. Por todo ello, se concluyó que la sonda **41** sintetizada tiene una aplicación directa como herramienta para conocer el nivel de estrés oxidativo de diferentes células, a través de la cuantificación de intensidad de fluorescencia directamente relacionada con la cantidad de biotioles generados.



**Figura IV.26. A)** Ejemplo representativo de imágenes de intensidad de fluorescencia de una disolución a  $6 \cdot 10^{-7}$  M de **41** en células 661W después de 12 h de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0, 0.25 y 0.50 mM ( $\lambda_{ex} = 530$  nm). **B)** Representación gráfica de la intensidad de emisión promedio frente al tiempo. El promedio se realizó sobre los píxeles de la imagen que contenían citoplasma celular de al menos 4 experimentos repetidos que contienen varias células. En negro se muestran los datos correspondientes a 0 mM, en rojo a 0.25 mM y en azul a 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **C)** Valores de área bajo la curva de las diferentes representaciones del panel B).

## IV.4. CONCLUSIONS

The conclusions of this chapter are:

- The dual probe **41** has been synthesized through a relatively simple synthetic route and with acceptable yields. According to our aims, it has been proven that its emission is shifted to the magenta spectral region.
- It has been demonstrated that this compound **41** reacts to biothiols like GSH, releasing the dye **40**. This fluorogenic reaction is sensitive to GSH and, to a lesser extent, to other external conditions (basic pH, alanine, serine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NMM and light).
- This probe has been tested in three different cell lines, HepG2, MC3T3-E1 and 661W. In HepG2 and MC3T3-E1, it has been demonstrated that compound **41** is capable of measuring two analytes (biothiols and phosphate ions) simultaneously in real-time. Likewise, this simultaneous detection is based on the measurement of two different parameters. The amount of biothiols could be inferred from the increase in the intensity due to the thiolysis reaction in **41**, causing the release of the highly fluorescent compound **40**. Moreover, the concentration of phosphate ions was obtained through the changes in  $\tau$  produced by the ESPT reaction promoted by the prototropic species of the phosphate buffer. Both intensity and  $\tau$  parameters have been simultaneously obtained from the FLIM images.
- An additional application of biological relevance of this probe has been tested with the 661W cell line. Compound **41** has proven to be efficient to indirectly report on cellular oxidative stress, through the quantification of the amount of biothiols produced by these cells.



**PARTE**  
**EXPERIMENTAL**  
**BLOQUE B**



## PARTE EXPERIMENTAL BLOQUE B

### PE.BLOQUE B.CAPÍTULO II. SONDAS FLUORESCENTES DIRIGIDAS A DISTINTOS ORGÁNULOS CELULARES

#### 1. Síntesis: Aspectos generales

Todos los reactivos y disolventes comercialmente accesibles empleados en las reacciones, extracciones y cromatografías se utilizaron sin purificación adicional. Todas las reacciones se realizaron en recipientes de vidrio y las reacciones de compuestos organolíticos se llevaron a cabo en tetrahidrofurano (THF) recién destilado sobre sodio, en presencia de benzofenona y en atmósfera de argón. El análisis de cromatografía en capa fina se realizó con placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 (230-240  $\mu\text{m}$ ) con un indicador F254. Las manchas se visualizaron con luz UV y/o mediante inmersión en ácido fosfomolibdico y posterior secado.

Los espectros de RMN se hicieron a temperatura ambiente, empleando una frecuencia de 600, 500 y 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  y de 151, 126 y 101 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ , en ambos casos indicando los desplazamientos químicos en ppm. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se hicieron en disolventes deuterados, DMSO- $d_6$ , Metanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y Cloroformo- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ), empleando como referencia los desplazamientos químicos de protones que aparecen a 2.5, 3.31 y 7.26 ppm. De cada espectro se dan los valores de multiplicidad de cada señal siendo s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), q, (quintuplete), m (multiplete), dd (doble doblete), dt (doble triplete), tt (triple triplete) y ddd (doble doblete de dobletes), los valores de constantes de acoplamiento ( $J$  en Hz) y las respectivas integrales. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  se hicieron con los mismos disolventes cuyos desplazamientos químicos aparecen a 39.52, 49.0 y 77.16 ppm. Las multiplicidades de los carbonos fueron asignadas con ayuda de los espectros DEPT. Por otro lado, los espectros de masas se llevaron a cabo por ionización por impacto electrónico (EI), ionización por electroespray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

## 2. Síntesis de los xantenos 24-29

Debido a que para sintetizar los diferentes derivados xanténicos se ha utilizado un protocolo de reacción común, éste se describe a continuación.

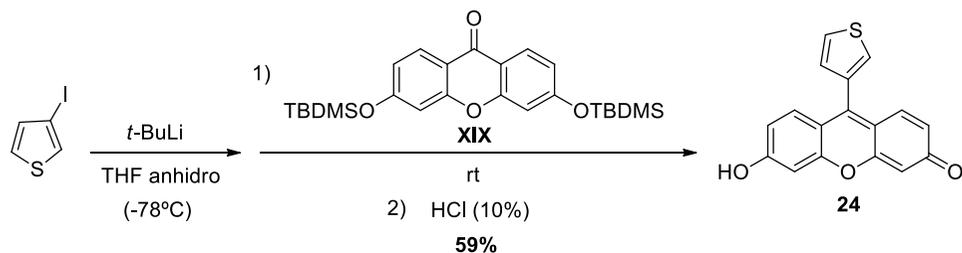
### Procedimiento general para acceder a los derivados xanténicos (PG-II-1)

En primer lugar, se disolvió en un tubo Schlenk el haluro de arilo correspondiente (1 eq.) en 2.5 mL de THF anhidro y se mantuvo bajo atmósfera de argón 10 minutos. Se enfrió a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  y al alcanzar dicha temperatura, se añadió una disolución de *tert*-butil litio 1.7 M en pentano (2 eq.) y se dejó agitando durante 30 minutos a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (solo en el caso del xanteno **29**, se enfrió la disolución del haloderivado a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se añadió una disolución de *n*-butil litio 2.5 M en hexano (2 eq.)). A continuación, se adicionó lentamente una disolución de la cetona **XIX**, previamente sintetizada (0.5 eq.) en 2.5 mL de THF destilado. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras ello, se añadió 1 mL de HCl diluido al 10 %. Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de diclorometano-metanol como eluyente. Tras ello se realizó una purificación adicional mediante TLC preparativa.

### Síntesis de XIX

Se preparó por un procedimiento previamente descrito por Teeuwen y colaboradores y los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los que se publicaron previamente<sup>[466]</sup>.

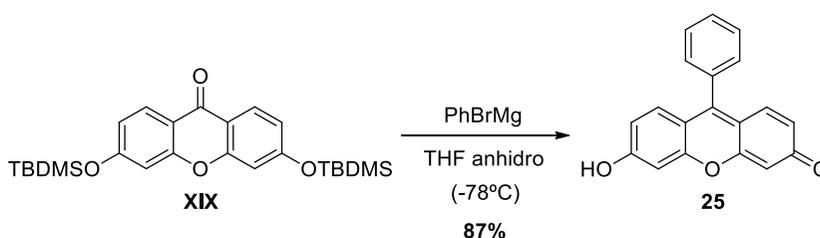
### Síntesis del compuesto 24



Siguiendo el procedimiento PG-II-1 partiendo del 3-iodotiofeno (118 mg, 0.560 mmol) y la cetona **XIX** (128 mg, 0.280 mmol) se obtuvieron 48 mg de **24**, un sólido naranja con un rendimiento del 59 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 7.92 – 7.88 (m, 2H), 7.32 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 9.3, 2H), 6.64 (m, 4H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 145.4 (C), 132.2 (C), 130.5 (CH), 129.3 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH). **HRMS (EI):** [M]<sup>+</sup> calcd. C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>S: 294.0351, obtenida: 294.0339.

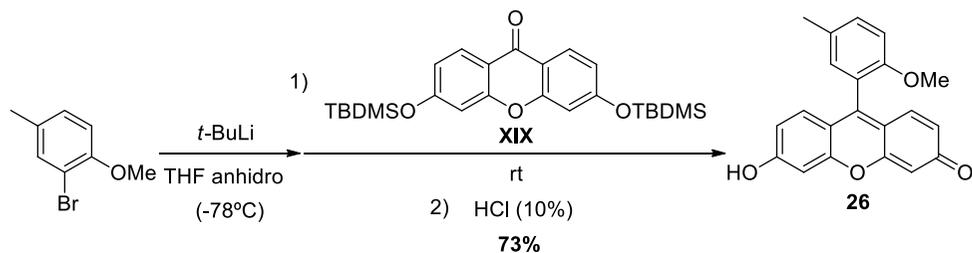
### Síntesis del compuesto 25



En un tubo Schlenk se disolvió **XIX** (90 mg, 0.197 mmol) en 4 mL THF anhidro y se mantuvo bajo atmósfera de argón durante 10 minutos. A continuación, se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$  y tras alcanzar dicha temperatura, se añadió una disolución de bromuro de fenil magnesio 1 M en THF (0.79 mL, 0.788 mmol) y se dejó agitando durante 30 minutos a  $-78^\circ\text{C}$ . Después, se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras ello, se añadió 1 mL de HCl diluido al 10 %. Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de 9.8:0.2 diclorometano-metanol como eluyente, obteniéndose 49.4 mg de **25**, un sólido rojizo con un rendimiento del 87 %. Los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN coincidieron con los publicados anteriormente por Yang *et al.*<sup>[467]</sup>. La masa obtenida se muestra a continuación.

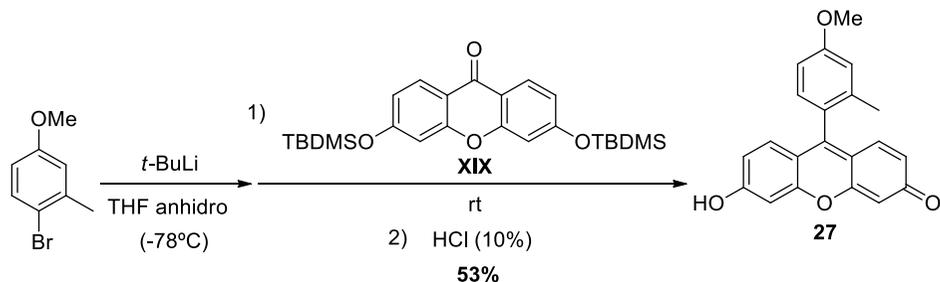
**HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>: 289.0865, obtenida: 289.0862.

### Síntesis del compuesto 26



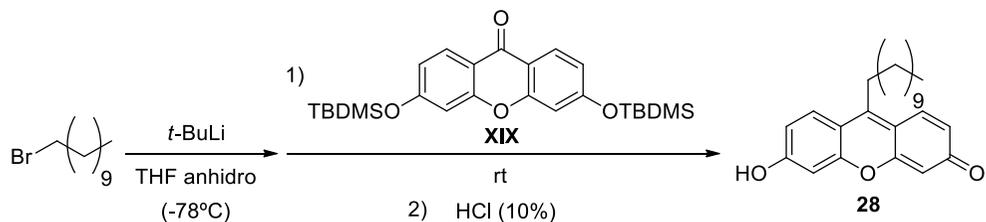
Mediante el PG-II-1 al reactivo comercial 2-bromo-4-metilanol (100 mg, 0.497 mmol), tras litiarlo, se le adicionó una disolución de la cetona **XIX** (114 mg, 0.249 mmol), obteniéndose 60.8 mg de **26**, un sólido rojo-anaranjado con un rendimiento del 73 %. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  coincidieron con los publicados anteriormente por Urano *et al.*<sup>[276]</sup>.

### Síntesis del compuesto 27



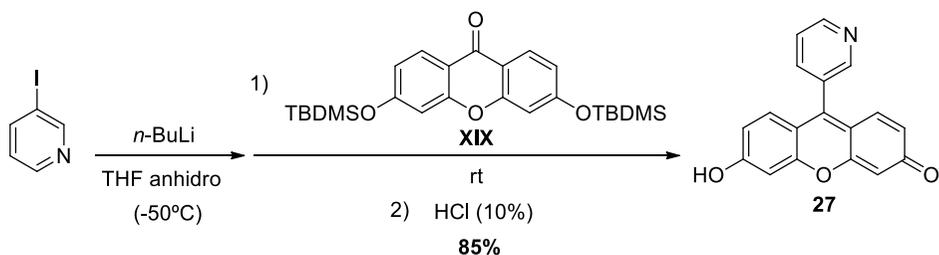
Siguiendo el procedimiento PG-II-1 a partir del 4-bromo-3-metilanol (100 mg, 0.497 mmol) y la cetona **XIX** (114 mg, 0.249 mmol) se obtuvieron 44 mg de **27**, un sólido rojo con un rendimiento del 53 %. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  coincidieron con los publicados anteriormente por Urano *et al.*<sup>[276]</sup>.

### Síntesis del compuesto 28



Mediante el procedimiento PG-II-1 se hizo reaccionar el derivado litiado del bromuro de undecano (100 mg, 0.425 mmol) con una disolución de la cetona **XIX** (97 mg, 0.213 mmol), obteniéndose dos especies en equilibrio tautomérico, por lo que no se pudo caracterizar mediante  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ .

### Síntesis del compuesto **29**



Siguiendo el procedimiento PG-II-1 primero tras obtener el derivado litiado de la 3-iodopiridina (100 mg, 0.490 mmol) se hizo reaccionar con una disolución de la cetona **XIX** (111 mg, 0.240 mmol), obteniéndose 59.5 mg de **29**, un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 85 %. No aparecen los datos espectroscópicos ni el espectro de masas ya que dicho producto no ha podido caracterizarse.

### 3. Síntesis de las acridonas 30-37

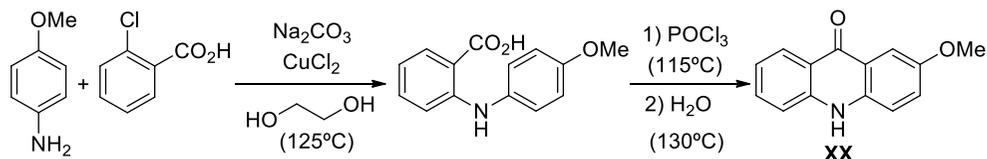
Para sintetizar las diferentes acridonas sustituidas también se ha utilizado un protocolo de reacción común, el cual se muestra a continuación.

#### Procedimiento general para acceder a las acridonas sustituidas en la cadena alquílica (PG-II-2)

En primer lugar, la acridona **XXIII** (1 eq.) se disolvió en 6 mL de DMF anhidra y se añadió NaH al 60 % (3 eq.) para desprotonar el hidroxilo de la cadena alquílica. A continuación, se adicionó el haloderivado correspondiente (2 eq.) y se dejó en agitación a temperatura ambiente entre 1.5 y 3 horas según el derivado, hasta que se observó la desaparición de la acridona de partida por TLC. Al transcurrir el tiempo, se neutralizaron los restos de NaH añadiendo unas gotas de agua y se realizó una extracción con acetato de etilo, lavando la fase orgánica con HCl (10 %) y salmuera, secándola posteriormente con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida,

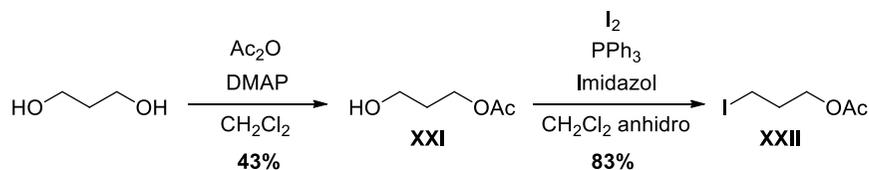
se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo como eluyente.

### Síntesis de **XX**



Se preparó por un procedimiento previamente descrito<sup>[194]</sup>. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los previamente publicados<sup>[468]</sup>.

### Síntesis de **XXI** y **XXII**



### Precursor **XXI**

Se disolvió 1,3-propanodiol (6.00 g, 80 mmol) en 200 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , añadiendo a continuación, DMAP (10.51 g, 90 mmol) y anhídrido acético gota a gota (8 mL, 90 mmol). La mezcla se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras transcurrir dicho tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en sílica gel y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de 6:4 hexano-acetato de etilo como eluyente, obteniéndose 4.01 g de **XXI**, un aceite incoloro con un rendimiento del 43 %. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los previamente publicados<sup>[469]</sup>.

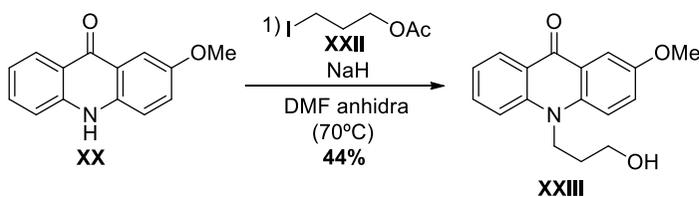
### Precursor **XXII**

A una disolución de  $\text{I}_2$  (12.92 g, 50 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (100 mL) de color marrón se añadió trifenilfosfina (12.92 g, 50 mmol) adquiriendo la disolución un color amarillo. Después se adicionó imidazol (7.63 g, 110

mmol), pasando la disolución a presentar color blanco. A continuación, se añadió el alcohol **XXI** (4.01 g, 30 mmol) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 1 hora. Tras ello se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en sílica gel y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 8:2 de hexano-acetato de etilo como eluyente, obteniéndose 6.43 g de **XXII**, un aceite amarillo con un rendimiento del 83 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  4.13 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.22 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.19-2.10 (m, 2H), 2.06 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  171.0 (C), 64.2 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 1.5 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (ESI):**  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>NaI: 250.9539, obtenida: 250.9535.

### Síntesis de **XXIII**



La acridona **XX** (338 mg, 1.50 mmol) se disolvió en 8 mL de DMF anhidra y se añadió NaH al 60 % (180 mg, 4.50 mmol), calentando la mezcla posteriormente a 70 °C. A continuación, tras dejarla en agitación durante 10 minutos, se adicionó el yoduro **XXII** (684 mg, 3.00 mmol), dejando la reacción a 70 °C durante 24 horas. Al transcurrir el tiempo la reacción se dejó a temperatura ambiente y se añadió de nuevo, la misma cantidad de NaH y yoduro **XXII**, dejándola otras 24 horas en agitación a 70 °C. Al finalizar, se neutralizó el exceso de NaH mediante la adición de agua, se diluyó la mezcla en acetato de etilo y se lavó 5 veces con HCl diluido al 10 % y posteriormente con salmuera. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida. El crudo se soportó en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 3:7 de hexano-acetato de etilo como eluyente. En estas condiciones de procesamiento de reacción el grupo acetato se hidrolizó directamente obteniéndose 185 mg de **XXIII**, un aceite amarillo-

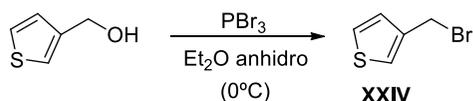
marrón al 44 %. Se recristalizó en hexano/diclorometano obteniendo el compuesto como un sólido amarillo-verdoso.

**<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.42 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 4H), 7.43 (dd, *J* = 9.4, 3.1 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 7.8, 6.4, 1.1 Hz, 1H), 4.62 – 4.55 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.11 – 2.04 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C RMN (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 179.1 (C), 156.1 (C), 142.7 (C), 138.1 (C), 135.3 (CH), 128.1 (CH), 126.2 (CH), 123.7 (C), 122.34 (CH), 122.28 (C), 118.6 (CH), 116.6 (CH), 106.9 (CH), 59.9 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 44.4 (CH<sub>2</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>).

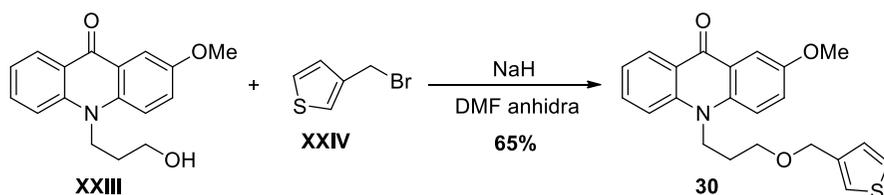
**HRMS (ESI):** *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>Na: 306.1100, obtenida: 306.1102.

### Síntesis de XXIV



El producto comercial 3-tiofenometanol (0.17 mL, 1.75 mmol) se disolvió en 3 mL de dietiléter anhidro a 0 °C y a continuación se añadió gota a gota tribromuro de fósforo (0.10 mL, 0.876 mmol). La mezcla se dejó a temperatura ambiente 30 minutos y al transcurrir el tiempo se adicionaron unas gotas de agua. A continuación, se extrajo con etanol, lavando con agua, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose 282 mg de un líquido grisáceo, utilizándose en la siguiente etapa sin purificación adicional. Los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN coincidieron con los previamente publicados<sup>[470]</sup>.

### Síntesis del compuesto 30

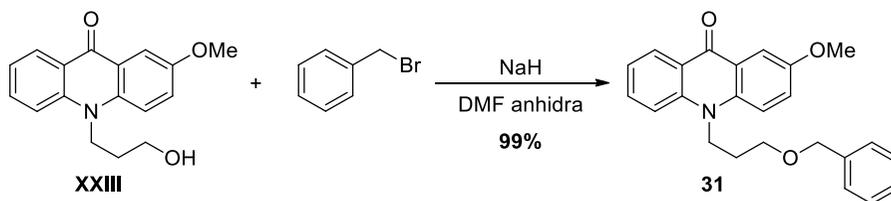


La acridona **XXIII** (58 mg, 0.205 mmol) se alquiló haciéndola reaccionar con el bromuro **XXIV** (43 mg, 0.246 mmol), mediante el procedimiento PG-II-

2, obteniéndose 51 mg de **30**, un aceite verdoso con un rendimiento del 65 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.63 – 7.54 (m, 3H), 7.40 (dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 3.0, 1.2 Hz, 1H), 7.20 (ddd, *J* = 13.5, 7.9, 2.9 Hz, 2H), 7.11 (dd, *J* = 4.9, 1.2 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.02 – 1.93 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 178.8 (C), 155.9 (C), 142.5 (C), 140.8 (C), 137.9 (C), 135.1 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.1 (CH), 125.9 (CH), 123.9 (CH), 123.5 (C), 122.2 (CH), 122.1 (C), 118.4 (CH), 116.4 (CH), 106.8 (CH), 69.3 (CH<sub>2</sub>), 68.0 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 44.4 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (APCI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>S: 380.1315, obtenida: 380.1323.

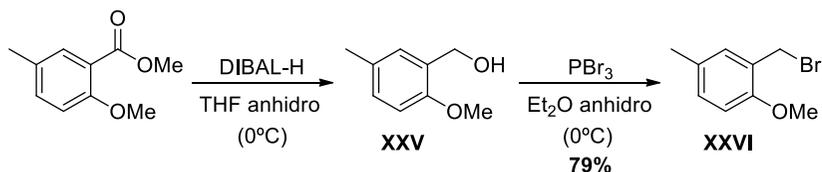
### Síntesis del compuesto 31



Mediante el procedimiento PG-II-2 a la acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) se le añadió bromuro de bencilo (0.03 mL, 0.212 mmol), obteniéndose 65.6 mg de **31**, un aceite amarillo intenso con un rendimiento del 99 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 8.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.99 – 7.97 (m, 1H), 7.66 (tt, *J* = 6.7, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (dt, *J* = 9.4, 1.6 Hz, 2H), 7.42 (dd, *J* = 4.5, 1.4 Hz, 4H), 7.38 – 7.34 (m, 1H), 7.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.62 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.24 – 2.15 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)** δ 177.4 (C), 154.4 (C), 141.4 (C), 138.2 (C), 136.8 (C), 133.6 (CH), 128.6 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 124.6 (CH), 123.2 (C), 121.7 (C), 120.9 (CH), 116.6 (CH), 114.6 (CH), 106.8 (CH), 73.3 (CH<sub>2</sub>), 67.1 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>: 374.1756, obtenida: 374.1749.

### Síntesis de **XXV** y **XXVI**

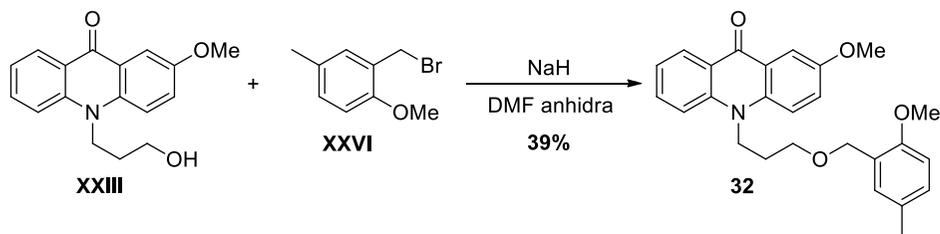


### Precursor **XXV**

El producto comercial 2-metoxi-5-metilbenzoato de metilo (300 mg, 1.66 mmol) se disolvió en 4 mL de THF anhidro y a continuación a 0 °C, se añadió DIBAL-H (4.16 mL, 4.16 mmol). Se dejó en agitación 1 hora y 45 minutos y al finalizar el tiempo, se disolvió en acetato de etilo y se lavó con HCl (10 %) y salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a presión reducida, obteniéndose 337 mg de **XXV**, un aceite marrón. Éste se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN coincidieron con los previamente publicados<sup>[471]</sup>. **Precursor XXVI**

Se disolvió **XXV** (105 mg, 0.690 mmol) en 3 mL de dietiléter anhidro y a continuación, se añadió a 0 °C, gota a gota, tribromuro de boro (0.03 mL, 0.345 mmol). La mezcla se dejó a temperatura ambiente 2 horas y media y al transcurrir el tiempo se neutralizó con unas gotas de agua. A continuación, se extrajo con dietiléter, lavando con agua, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida obteniéndose 117 mg de **XXVI**, un aceite amarillo claro, utilizándose en la siguiente etapa sin purificación adicional. Los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN coincidieron con los previamente publicado<sup>[472]</sup>.

### Síntesis del compuesto **32**



Siguiendo el procedimiento PG-II-2 se hizo reaccionar la acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) con el bromuro **XXVI** (46 mg, 0.212 mmol), obteniéndose 29 mg de **32**, un aceite marrón-verdoso con un rendimiento del 39 %.

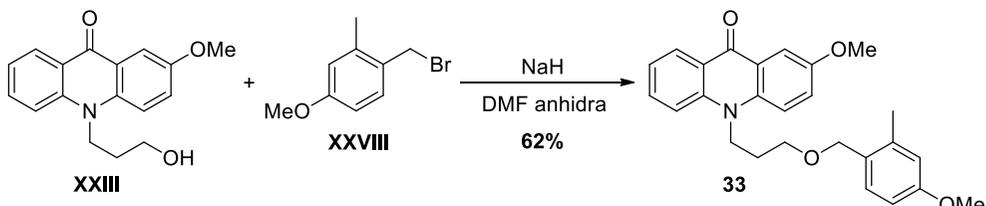
**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  8.41 (dd,  $J$  = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.81 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H), 7.78 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.70 (ddd,  $J$  = 8.8, 6.8, 1.7 Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J$  = 9.4, 3.1 Hz, 1H), 7.27 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 7.08 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.85 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 4.56 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.64 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.17 – 2.08 (m, 2H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  179.1 (C), 156.7 (C), 156.1 (C), 142.8 (C), 138.2 (C), 135.2 (CH), 131.0 (CH), 130.7 (C), 130.3 (CH), 128.1 (CH), 127.4 (C), 126.1 (CH), 123.7 (C), 122.3 (CH), 118.7 (CH), 116.7 (CH), 111.5 (CH), 106.9 (CH), 69.2 (CH<sub>2</sub>), 68.4 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 44.5 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub>: 418.2018, obtenida: 418.2015.

### Síntesis de **XXVII** y **XXVIII**



Se prepararon por un procedimiento previamente descrito en bibliografía, a excepción de que el 2-metil-4-metoxibenzaldehído se disolvió en metanol y no en etanol. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los previamente reportados<sup>[473]</sup>.

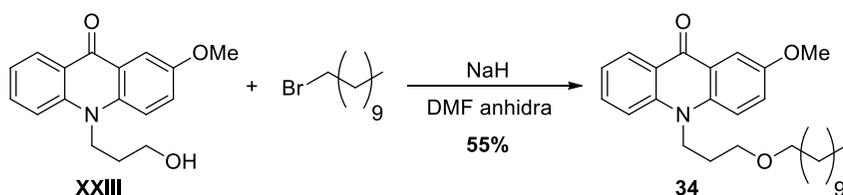
### Síntesis del compuesto **33**



Siguiendo el procedimiento general PG-II-2 se alquiló la acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) haciéndola reaccionar con el bromuro **XXVIII** (46 mg, 0.212 mmol), obteniéndose 45.9 mg de **33**, un aceite marrón-verdoso con un rendimiento del 62 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.20 – 7.12 (m, 3H), 6.72 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 4.38 (s, 2H), 4.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.50 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.99 – 1.90 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 178.8 (C), 160.9 (C), 155.8 (C), 142.4 (C), 139.7 (C), 137.8 (C), 135.0 (CH), 131.4 (CH), 129.7 (C), 128.0 (CH), 125.8 (CH), 123.6 (C), 122.2 (CH), 118.4 (CH), 117.0 (CH), 116.4 (CH), 111.6 (CH), 106.9 (CH), 72.3 (CH<sub>2</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (CH<sub>3</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>), 44.5 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub>: 418.2018, obtenida: 418.2017.

#### Síntesis del compuesto 34



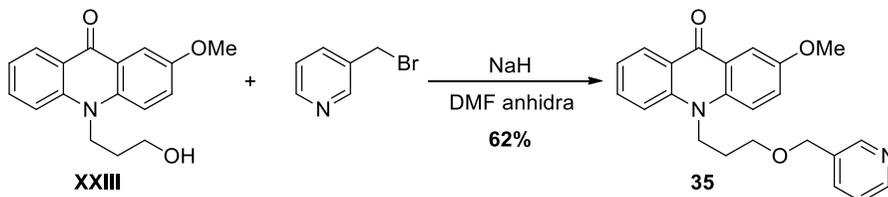
Siguiendo el procedimiento PG-II-2, a partir de la acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) y el bromuro de undecano (0.05 mL, 0.212 mmol) se obtuvieron 42.4 mg de **34**, un aceite amarillo con un rendimiento del 55 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.42 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.79 – 7.72 (m, 3H), 7.39 (dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz, 1H), 7.29 (ddd, *J* = 8.0, 6.4, 1.3 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.14 – 2.05 (m, 2H), 1.62 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.47 – 1.20 (m, 16H), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 179.0 (C), 156.1 (C), 142.8 (C), 138.2 (C), 135.2 (CH), 128.1 (CH), 126.1 (CH), 123.8 (C), 122.3 (CH), 118.7 (CH), 116.6 (CH), 106.9 (CH), 72.3 (CH<sub>2</sub>), 68.5 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 44.5 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH<sub>2</sub>), 30.80 (CH<sub>2</sub>), 30.76

(CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>3</sub>: 438.3008, obtenida: 438.3011.

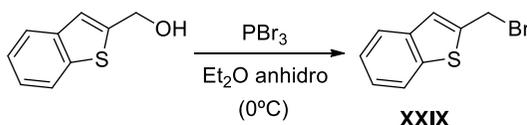
### Síntesis del compuesto 35



La acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) se hizo reaccionar con la 3-(bromometil)piridina (54 mg, 0.212 mmol) mediante el PG-II-2, dando lugar a 40.7 mg de **35**, un aceite amarillo-marrón con un rendimiento del 62 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.58 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.50 (dd, *J* = 5.0, 1.6 Hz, 1H), 8.41 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.87 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.74 – 7.70 (m, 2H), 7.47 (ddd, *J* = 7.9, 5.0, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 9.4, 3.1 Hz, 1H), 7.28 (ddd, *J* = 7.9, 6.6, 1.0 Hz, 1H), 4.58 (t, *J* = 9.2 Hz, 4H), 3.89 (s, 3H), 3.68 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.20 – 2.13 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 179.0 (C), 156.1 (C), 149.35 (CH), 149.33 (CH), 142.7 (C), 138.1 (C), 137.6 (CH), 136.3 (C), 135.2 (CH), 128.1 (CH), 126.1 (CH), 125.3 (CH), 123.7 (C), 122.4 (CH), 122.3 (C), 118.6 (CH), 116.6 (CH), 106.9 (CH), 71.4 (CH<sub>2</sub>), 68.7 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 44.4 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (ESI):** [M+Na]<sup>+</sup> calcd. C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na: 397.1528, obtenida: 397.1530.

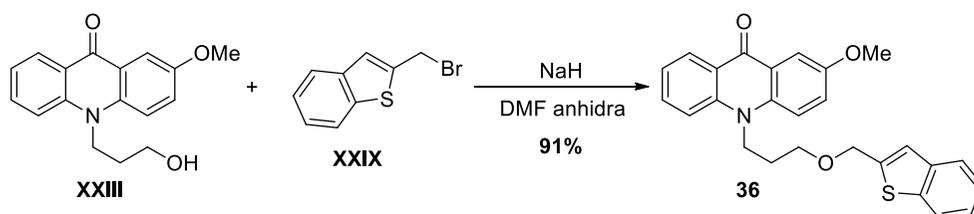
### Síntesis de XXIX



El producto comercial 2-(hidroximetil)benzo[*b*]tiofeno (100 mg, 0.609 mmol) se disolvió en 3 mL de dietiléter anhidro y se adicionó gota a gota a 0 °C tribromuro de fósforo (0.03 mL, 0.304 mmol). La mezcla se dejó a temperatura ambiente 1 hora y al transcurrir el tiempo se hidrolizó con unas gotas de agua. A continuación, se extrajo con dietiléter, lavando con agua, se

secó la fase orgánica con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a presión reducida obteniéndose 55 mg de **XXIX**, una espuma marrón, utilizándose en la siguiente etapa sin purificación adicional. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los publicados anteriormente<sup>[474]</sup>.

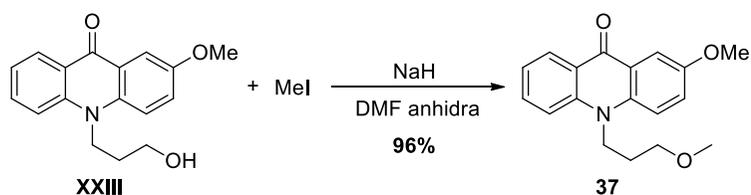
### Síntesis del compuesto 36



La acridona **XXIII** (50 mg, 0.176 mmol) se alquiló añadiendo el bromuro **XXIX** (48 mg, 0.212 mmol) siguiendo el PG-II-2, dando lugar a 69.2 mg de **36**, un aceite amarillo verdoso con un rendimiento del 91 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  8.60 (dd,  $J = 8.0, 1.7$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 7.85 (ddd,  $J = 7.4, 1.7, 0.7$  Hz, 1H), 7.77 – 7.75 (m, 1H), 7.69 (ddd,  $J = 8.5, 6.8, 1.5$  Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 2H), 7.39 – 7.32 (m, 3H), 7.27 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.25 – 7.24 (m, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.55 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.67 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 2.24 – 2.17 (m, 2H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  177.5 (C), 154.5 (C), 142.0 (C), 141.5 (C), 140.2 (C), 139.5 (C), 136.9 (C), 133.8 (CH), 128.0 (CH), 124.8 (CH), 124.60 (CH), 124.55 (CH), 123.7 (CH), 122.7 (CH), 122.6 (CH), 121.1 (CH), 116.7 (CH), 114.7 (CH), 106.9 (CH), 68.6 ( $\text{CH}_2$ ), 67.1 ( $\text{CH}_2$ ), 55.9 ( $\text{CH}_3$ ), 43.3 ( $\text{CH}_2$ ), 28.1 ( $\text{CH}_2$ ). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd.  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{S}$ : 430.1471, obtenida: 430.1456.

### Síntesis del compuesto 37



Mediante el procedimiento PG-II-2 la acridona **XXIII** (27 mg, 0.095 mmol) se alquiló tras adición de yodometano ( $7.12 \cdot 10^{-3}$  mL, 0.114 mmol), obteniéndose 27.2 mg de **37**, un aceite amarillo verdoso con un rendimiento del 96 %.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  8.36 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.68 – 7.62 (m, 2H), 7.34 (dd,  $J = 9.4, 2.6$  Hz, 1H), 7.24 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.46 – 4.41 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.47 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.07 – 1.99 (m, 2H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  178.9 (C), 156.0 (C), 142.6 (C), 138.0 (C), 135.2 (CH), 128.0 (CH), 126.1 (CH), 123.6 (C), 122.3 (CH), 122.2 (C), 118.5 (CH), 116.4 (CH), 106.9 (CH), 70.4 ( $\text{CH}_2$ ), 59.1 ( $\text{CH}_3$ ), 56.0 ( $\text{CH}_3$ ), 44.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.0 ( $\text{CH}_2$ ). **HRMS (ESI):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd.  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ : 298.1443, obtenida: 298.1441.

#### 4. Instrumentación para la caracterización fotofísica

Por un lado, los espectros de absorción se realizaron a temperatura ambiente en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EE.UU.). Por otro, los espectros de excitación y emisión de fluorescencia se obtuvieron con un espectrofluorímetro FP-8300 (Jasco, Tokyo, Japón). Los parámetros instrumentales empleados para la realización de dichos espectros se muestran a continuación en la **Tabla PE.B.II.IV.1**.

**Tabla PE.B.II.IV.1.** Parámetros empleados para llevar a cabo las medidas de emisión y excitación de xantenos y acridonas.

	<b>Xantenos</b>	<b>Acridonas</b>
<b><math>\lambda_{\text{excitación}}</math> (para espectros de emisión)</b>	485 nm	375 y 440 nm
<b><math>\lambda_{\text{emisión}}</math> (para espectros de excitación)</b>	515 nm	465 nm
<b>Apertura de rendija de excitación</b>	2.5 nm	2.5 nm
<b>Apertura de rendija de emisión</b>	2.5 nm	2.5 nm
<b>Velocidad de respuesta</b>	0.5 s	0.5 s
<b>Sensibilidad del detector</b>	Media	Alta
<b>Velocidad de escaneo</b>	1000 nm/min	1000 nm/min
<b>Intervalo de medida</b>	1 nm	1 nm

Así mismo, se realizaron medidas de tiempos de vida de fluorescencia con el FluoTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania). En el caso de los xantenos se recogieron decaimientos temporales de fluorescencia a tres longitudes de onda 510, 520 y 530 nm con excitación a 485 nm. Para las acridonas se empleó una excitación a 440 nm y se recogieron decaimientos de fluorescencia a las longitudes de onda de 465, 485 y 505 nm. Los tiempos de vida de fluorescencia se obtuvieron mediante ajuste por mínimos cuadrados y deconvolución iterativa con una función de respuesta instrumental (IRF) obtenida con una suspensión de LUDOX. El análisis se realizó con el programa FluoFit (PicoQuant).

Tanto las medidas de absorción, fluorescencia en estado estacionario y de tiempos de vida, se realizaron a distintos pH. Para ello, los productos se disolvieron en disoluciones de tampón TRIS preparadas al pH de estudio. Se prepararon dos disoluciones madre de tampón TRIS a 10 mM, una ácida

(78.8 mg de Trizma® HCl en 50 mL de agua MilliQ) y otra básica (60.6 mg de Trizma® base en 50 mL de agua MilliQ) y a continuación, se midió el pH de cada una de ellas con pHmetro. Posteriormente, se hicieron mezclas de ambas para obtener disoluciones tampón a los distintos pH de interés.

Los derivados xanténicos se midieron a pH en un rango de pH de 3 a 10, a una concentración de  $1 \cdot 10^{-6}$  M (excepto **29**, que se midió a  $1.35 \cdot 10^{-5}$  M) en el caso de las medidas de fluorescencia y tiempos de vida y a  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M (excepto **29**, a  $3.2 \cdot 10^{-5}$  M) en las medidas de absorción. Las acridonas se midieron a pH 5.36, 7.21 y 9.42, a una concentración de  $1 \cdot 10^{-6}$  M en el caso de medidas de fluorescencia y tiempos de vida y a  $5 \cdot 10^{-5}$  M (excepto en el caso de **34** y **35**, que se midieron a  $1 \cdot 10^{-4}$  M) en las medidas de absorción.

Por último, para concluir la caracterización fotofísica, los rendimientos cuánticos de fluorescencia se calcularon mediante el método de comparación con un estándar, siguiendo la siguiente ecuación<sup>[193]</sup>:

$$\text{Ecuación PE.B.II.1} \quad \phi = \phi_R \cdot \frac{I}{I_R} \cdot \frac{10^{(1-A_R)}}{10^{(1-A)}} \cdot \frac{n^2}{n_R^2}$$

Donde  $\phi$  es el rendimiento cuántico,  $I$  es la integral de la intensidad de fluorescencia,  $A$  es la absorbancia,  $n$  el índice de refracción del disolvente en el que se solubilizo cada derivado (se empleó el del agua cuyo  $n=1.33$ ), excepto en el caso de la referencia, cumarina 153 que se disolvió en ciclohexano cuyo índice de refracción es de 1.43. En todos los casos el subíndice  $R$  hace alusión a la referencia utilizada para calcular los rendimientos cuánticos.

Para obtener el valor de rendimiento cuántico para cada derivado, se hicieron gran variedad de medidas independientes, tanto de absorción como de emisión, a dos concentraciones. En el caso de los xantenos a  $1.5 \cdot 10^{-6}$  y  $2 \cdot 10^{-6}$  M, exceptuando el xanteno **29**, que se midió a  $1.09 \cdot 10^{-5}$  y  $1.35 \cdot 10^{-5}$  M. Todas las disoluciones se prepararon en tampón TRIS a pH 10.4 para asegurar que solo la forma desprotonada básica estaba presente. En el caso de las acridonas se midieron a  $1.5 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M, exceptuando la acridona

**30**, que se midió a  $1 \cdot 10^{-5}$  y  $0.8 \cdot 10^{-5}$  M. Todas ellas disueltas en tampón TRIS a pH 7.01.

Los estándares y longitudes de onda de excitación que se emplearon fueron:

- Para las medidas de rendimientos cuánticos de xantenos, la fluoresceína en NaOH 0.1 M, cuyo rendimiento cuántico es de 0.91<sup>[475]</sup>. Las dos longitudes de onda de excitación a las que se realizaron las medidas fueron 480 y 485 nm.

- Para las medidas de rendimientos cuánticos de acridonas, la cumarina 153 en ciclohexano, cuyo rendimiento cuántico es de 0.90<sup>[476]</sup>. Las tres longitudes de onda de excitación a las que se realizaron las medidas fueron 395, 400 y 410 nm.

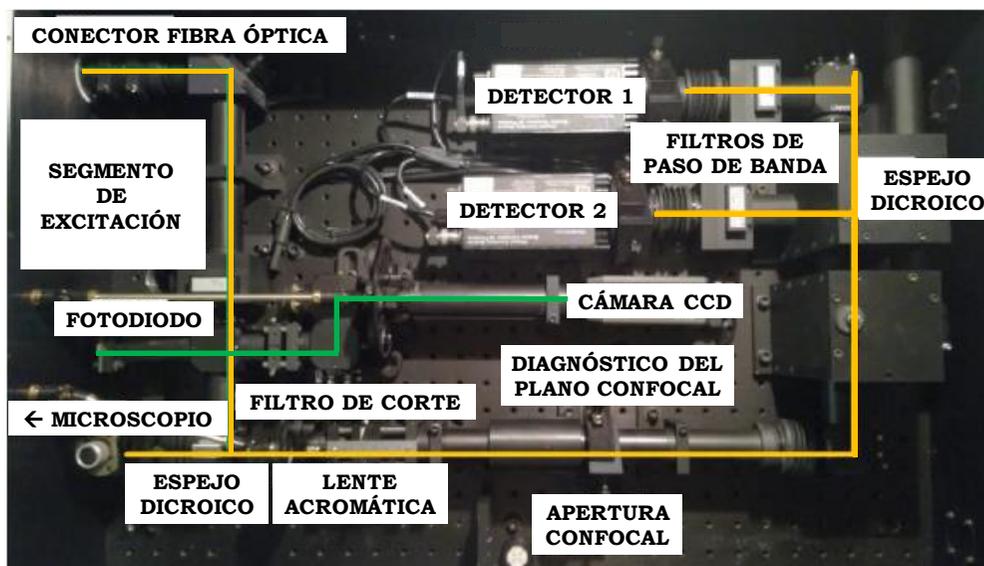
## **5. Cálculo del coeficiente de reparto log P**

El coeficiente de reparto o log P, como se ha comentado en el *Capítulo II*, es un parámetro que informa sobre el grado de lipofilia o hidrofilia de los compuestos medido a través de la distribución de la molécula entre dos disolventes, normalmente agua y octanol. Para poder obtener valores estimados de log P de los distintos derivados xanténicos y acridonas en primer lugar se dibujó la estructura de cada uno de ellos en el programa ChemBioDraw Ultra y se guardaron como archivos .cdx. A continuación, se abrieron cada uno de los archivos de las diferentes estructuras en el programa ChemBio3D Ultra y se utilizó una herramienta para minimizar la energía de la estructura. Una vez minimizada se calculó, entre las distintas propiedades posibles, el valor estimado del coeficiente de reparto, clog P.

## **6. Instrumentación para medidas de localización celular mediante microscopía de fluorescencia**

Las imágenes de localización celular de los compuestos fluorescentes se registraron en un microscopio de tiempos de vida de fluorescencia MicroTime200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania) constituido por varios elementos ópticos de los cuales se muestran los principales en la **Figura PE.B.IV.1**. Entre ellos un microscopio confocal invertido (IX-71, Olympus,

Tokyo, Japón) dotado con un objetivo de inmersión de aceite de  $100\times$  y 1.4 de apertura numérica.

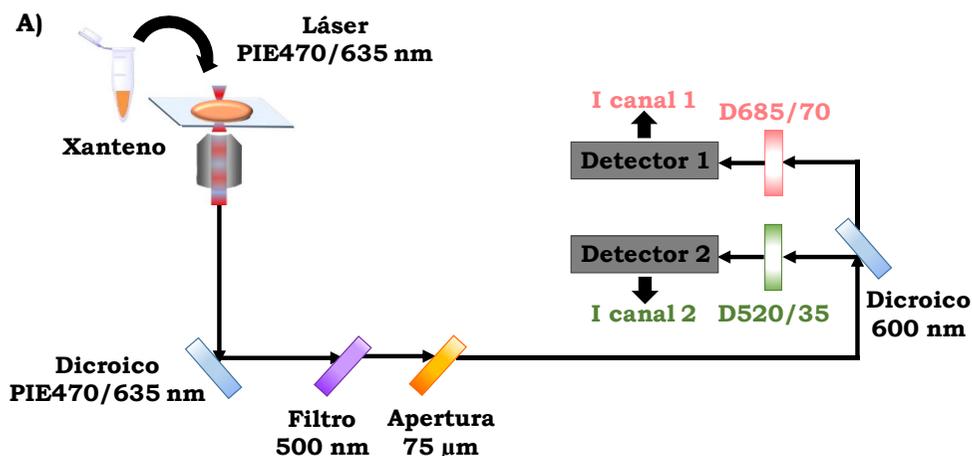


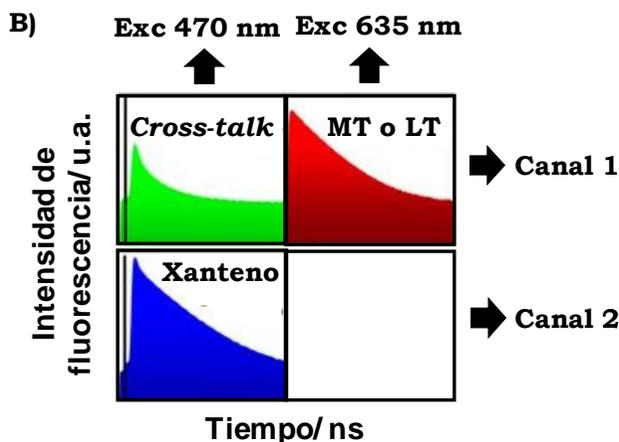
**Figura PE.B.IV.1.** Principales elementos ópticos del microscopio MicroTime200.

La configuración difirió en función de los derivados de estudio, derivados xanténicos o acridonas. Por ello, a continuación, se indican las dos configuraciones por separado. En ambos casos, se estudió la colocación de los compuestos preparados con un colorante específico de tinción de mitocondrias conocido como MitoTracker Deep Red (MT) y en derivados concretos como el xanteno **29** y la acridona **35** también se estudió la colocación con el marcador específico de lisosomas LysoTracker Deep Red (LT).

Para las medidas de localización celular de xantenos, y el estudio de su colocación con MT o LT como fuentes de excitación se emplearon dos láseres pulsados, uno a 470 nm (LDH-P-FA-470, PicoQuant) y otro a 635 nm (LDH-P-FA-635, PicoQuant), operados por un controlador Sepia II (PicoQuant) a una frecuencia de repetición de 20 MHz. Ambos se utilizaron con un régimen de excitación pulsada dual alternante (PIE 470/635 nm) en la que el láser de 635 nm se retardó 27 ns respecto al láser de 470 nm con la

finalidad de definir diferentes ventanas temporales para reconstruir cada imagen con los fotones propios de cada láser sin interferencias del otro (**Figura PE.B.II.2 B**). El haz de luz se dirigió a un espejo dicróico específico de doble banda para esta excitación pulsada alternante PIE 470/635 nm (ZRDC, Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) que manda los haces láser a la muestra a través del objetivo. A continuación, la emisión de fluorescencia se recogió por el mismo objetivo, se dirigió a un filtro de corte de 500 nm (AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Alemania) y se focalizó en la apertura confocal de 75  $\mu\text{m}$ . Tras ello, la radiación emitida se separó en dos canales mediante un dicróico de 600 nm (AHF, Chroma, Alemania). Por un lado, la radiación correspondiente al canal 1 (MT o LT) pasó a través de un filtro de paso de banda D685/70 (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) y por otro, la correspondiente al canal 2 (xanteno en cuestión) pasó por un filtro de paso de banda D520/35 (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.). Finalmente, cada una de ellas se dirigió al correspondiente detector de fotodiodo de avalancha numerados como 1 u 2 (SPCM-AQR14, PerkinElmer) a partir de los cuales se mandó la señal de detección de fotones a un módulo TimeHarp200 SPT (PicoQuant) (**Figura PE.B.II.2 A**).

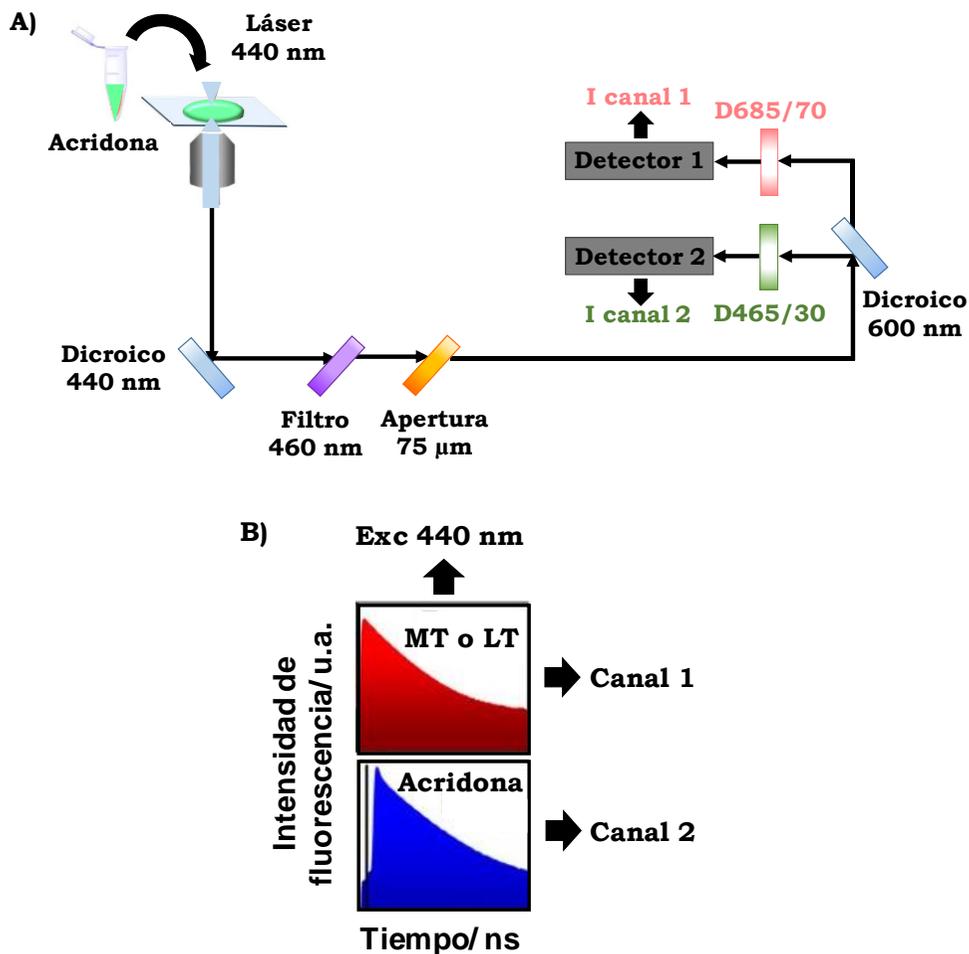




**Figura PE.B.II.2. A)** Configuración del microscopio MicroTime200 para realizar medidas de los xantenos y **B)** Ventanas temporales utilizadas para la reconstrucción de las imágenes en esta configuración del microscopio para xantenos.

Para las medidas de colocalización de acridonas, como fuentes de excitación se empleó un único láser pulsado a 440 nm (LDH-P-FA-440, PicoQuant), operado por un controlador Sepia II (PicoQuant) a una frecuencia de repetición de 10 MHz. Experimentos preliminares demostraron que este láser también produce excitación parcial del colorante MT o LT, de forma que con un solo láser se excitan ambos fluoróforos. En este caso no pudo establecerse un régimen de excitación dual PIE 440/635, que sería óptimo para esta combinación de colorantes, ya que actualmente el grupo de investigación no dispone de los láseres de 440 nm y 635 nm combinados en la misma salida de fibra óptica. El haz de luz de excitación se dirigió a un espejo dicróico 440 nm (ZRDC, Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) para su entrada en el microscopio, luego, la emisión de fluorescencia recogida se dirigió a un filtro de corte de 460 nm, (AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Alemania) y se focalizó en la apertura confocal de 75  $\mu\text{m}$ . Tras ello, la radiación emitida se separó en dos canales mediante un dicróico de 600 nm (AHF, Chroma, Alemania). Por un lado, la radiación correspondiente al canal 1 (MT o LT) pasó a través de un filtro de paso de banda D685/70 (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) y por otro, la correspondiente al canal 2 (acridona

en cuestión) pasó por un filtro de paso de banda D465/30 (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.). Finalmente, cada una de ellas se dirigió al correspondiente detector de fotiodo de avalancha numerados como 1 u 2 mencionados anteriormente, a partir de los cuales se mandó la señal de detección de fotones a un módulo TimeHarp200 SPT (**Figura PE.B.II.3 A**).



**Figura PE.B.II.3. A)** Configuración del microscopio MicroTime200 para realizar medidas de las acridonas y **B)** Canales utilizados para la reconstrucción de las imágenes de las acridonas.

En ambos casos, la toma de imágenes se realizó con el programa SymPhoTime 32 (PicoQuant), escaneando un área de interés de  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ ,

con una resolución de 512×512 píxel, llevando a cabo un barrido bidireccional, con un tiempo por píxel de 0.6 ms.

## 7. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), suministrada por el *banco de células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada*. Las células se cultivaron en medio de cultivo comercial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Se mantuvieron a 37 °C en incubador con un ambiente húmedo y una atmosfera con un 5.2 % de CO<sub>2</sub>.

Para los experimentos de microscopía FLIM se sembraron en cubreobjetos circulares (diámetro de 25 mm) en placas de seis pocillos con una densidad de  $2.3 \cdot 10^5$  células por pocillo.

## 8. Experimentos con microscopía de fluorescencia

En primer lugar, se hizo el estudio de localización celular de los distintos derivados en la línea celular MDA-MB-231, y en particular su colocalización con el marcador de mitocondrias en el rojo, MitoTracker Deep Red (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Solo para el caso del xanteno **29** y la acridona **35** se estudió su colocalización con el marcador de lisosomas en el rojo, LysoTracker Deep Red (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo el mismo protocolo.

Primero, para tener medidas de referencia de la autofluorescencia celular de esta línea celular y de los distintos derivados, se les retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces cada pocillo con solución tampón de fosfato salino 1x (PBS) a pH 7.4. Esta disolución se preparó por dilución con agua MilliQ de una disolución de PBS comercial 10x (Sigma Aldrich). A continuación, se colocó en el portamuestras el cubreobjetos en el que están las células adheridas y, se añadió 1 mL de tampón PBS. Tras ello, se colocó el portamuestras en el microscopio y se procedió a tomar medidas de la autofluorescencia celular manteniendo las células únicamente en el tampón. Luego, se eliminó la solución tampón y se añadió 1 mL de una disolución

$3 \cdot 10^{-7}$  M en PBS de cada uno de los compuestos, para obtener imágenes sin adición previa del marcador de mitocondrias (MT) o marcador de lisosomas (LT). Una vez tomadas dichas imágenes, se procedió a hacer el estudio de colocalización. Para ello, se les retiró el medio de cultivo, se añadieron 2 mL de medio de cultivo DMEM atemperado a 37 °C y se incubaron las células durante 20 minutos con MT o LT, según el estudio en cuestión. La incubación se llevó a cabo añadiendo 16  $\mu$ L de una disolución de MT 0.01 mM por cada mL del medio de cultivo (a excepción de los derivados **29** y **35**, que fueron incubados tanto con 16  $\mu$ L/mL como con 5  $\mu$ L/mL, debido a una alta intensidad de señal) o bien, en el caso de hacer estudios de colocalización lisosomal, se añadieron 16  $\mu$ L/mL de una disolución de LT 0.01 mM. Ambas disoluciones de MT y LT se prepararon a partir de las respectivas disoluciones comerciales de concentración 1 mM mediante dilución de 10  $\mu$ L de disolución comercial en 990  $\mu$ L de agua MilliQ. Tras ese tiempo de incubación se les retiró el medio de cultivo y se lavó una vez cada pocillo con PBS. A continuación, se colocó en el portamuestras el cubreobjetos en el que están las células adheridas y se añadió 1 mL de tampón PBS. Se tomaron imágenes del MT y a continuación, se eliminó la solución tampón y se añadió 1 mL de una disolución  $3 \cdot 10^{-7}$  M del compuesto en cuestión disuelto en PBS. Dicha disolución se preparó a partir de una disolución madre, que contenía el compuesto disuelto en etanol a una concentración de  $1 \cdot 10^{-4}$  M (a excepción del compuesto **29**, que tuvo que ser disuelto en DMSO). Finalmente, se recogieron en torno a 12 imágenes de colocalización en cada una de las 2 réplicas llevadas a cabo para cada derivado.

## 9. Análisis de imágenes

Las imágenes se analizaron con el programa SymPhoTime 32 (PicoQuant). Al ser imágenes de colocalización, cada una de ellas está compuestas por dos canales, el canal 1 correspondiente a la emisión en el rojo del MT o del LT<sup>[227]</sup> (según el estudio de colocalización realizado) y el canal 2 correspondiente a la emisión del xanteno o la acridona en cuestión.

Primero, se analizaron las imágenes correspondientes a la prueba en células MDA-MB-231 de los compuestos por separado, sin previa adición de

MT o LT. En el caso de las acridonas, al ser excitadas únicamente por un láser y dividirse la radiación en dos canales parte del compuesto interfiere en el canal 1, correspondiente al MT o LT. Por ello se determinó la proporción de fotones emitidos por la acridona que se detectan en el canal del MT (*cross-talk*), para lo que se calculó el correspondiente factor de corrección aplicable al análisis de imágenes posteriores. Para ello en el análisis se estableció como parámetro común la realización de un agrupamiento espacial de 4x4 píxeles. Se tomaron como regiones de interés aquellas donde estaban presentes las células, excluyendo la región del medio extracelular, y se midieron el número de fotones por píxel en los dos canales de detección, obteniéndose así el factor corrector del *cross-talk* desde el canal 2 de la acridona hasta el canal 1 del MT o LT. Para cada uno de los colorantes, se realizó el promedio de este factor entre aproximadamente 7-9 imágenes diferentes.

A continuación, se obtuvieron las imágenes de colocalización de los colorantes introducidos en las células con el marcador de mitocondrias, MT o bien el marcador de lisosomas, LT. En este análisis no se realizó ningún agrupamiento espacial, manteniendo la imagen con su resolución espacial original.

En el caso de los xantenos, en los que como ya se ha comentado se utilizó excitación dual alternante mediante el uso de dos láseres de excitación alternados en el tiempo, se analizaron de cada una de las imágenes ambos canales, el canal 1 y el canal 2, seleccionando la ventana temporal correspondiente a la excitación del láser de 635 nm correspondiente al MT o LT o del láser de 470 nm correspondiente al xanteno de estudio (**Figura PE.B.II.2 B**). Así, se obtuvieron las imágenes de intensidades del MT o LT o del colorante xanténico, para su posterior superposición y estudio de colocalización.

En el caso de las acridonas, el procedimiento de análisis que se siguió fue el mismo, a excepción de que en este caso no fue necesario seleccionar la ventana temporal en cada uno de los canales ya que tan solo se empleó un único láser de excitación (**Figura PE.B.II.3 B**).

Una vez obtenida la imagen definitiva del canal 1 y el canal 2 que contienen información tanto de intensidad como de tiempo de decaimiento, se procedió al análisis de estas con ayuda del programa ImageJ. En dicho programa se procedió a superponer las imágenes del canal 1 y 2 obteniendo así la imagen correspondiente de colocación con ayuda de un macro específico para las imágenes de los derivados xanténicos y otro para las acridonas. Únicamente en el segundo caso se aplicó el factor corrector calculado previamente el cual tuvo en cuenta el cross-talk. Una vez obtenidas las imágenes, se realizó el análisis de distintas regiones de las células, obteniendo con ayuda de un macro denominado RGB, diferentes perfiles de intensidad de emisión a lo largo de diferentes líneas en la imagen en los que se observan en rojo los valores correspondientes al canal 1 del MT o LT (según el estudio realizado) y en verde, los valores correspondientes al canal 2, a la fluorescencia propia del compuesto de estudio. De forma que, las zonas que se indican con asterisco son las correspondientes a regiones de las células donde se pudo observar colocación.

Para estimar de forma cuantitativa el grado de colocación entre el colorante a estudio y el MT o bien el LT (según el estudio), para cada una de las imágenes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson con ayuda del software ImageJ. Así mismo, cuanto mayor fue el valor obtenido, se determinó que mayor fue la colocación.

## **10. Medidas de acumulación de colorantes en mitocondrias aisladas de hígado de ratas Wistar**

En primer lugar, las mitocondrias aisladas de hígado de ratas, nos las proporcionaron el *grupo del profesor Rafael Salto, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada*. Dichas mitocondrias se aislaron de hígado de ratas Wistar. Para ello, el hígado se resuspendió en una proporción 1:10 en tampón 4-(2-hidroxietil)-1-ácidopiperazineetanosulfónico (HEPES) 20mM a pH 7.4, que contiene 250 mM de sacarosa. El hígado se homogeneizó utilizando un *potter* mecánico. El homogeneizado se centrifugó a 800 xg para precipitar los núcleos y células intactas, el precipitado se lavó con el mismo tampón y se

re-centrifugó de nuevo a la misma velocidad. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 9000 xg y el precipitado obtenido estaba enriquecido en mitocondrias. Las mitocondrias se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón HEPES-sacarosa, manteniéndolas en dicha disolución tampón a pH 7.4.

Una vez obtenidas las mitocondrias en suspensión, el protocolo que se siguió consistió en cuatro pasos. Primero, se preparó, en tubos de centrifuga de 15 mL, una disolución de cada uno de los colorantes a  $3 \cdot 10^{-7}$  M, disolviendo 15  $\mu$ L de los mismos a  $1 \cdot 10^{-4}$  M, en un volumen total de 5 mL de tampón HEPES con sacarosa a pH 7.4. Una vez preparadas, se midió la emisión por fluorescencia de cada uno de ellos en el espectrofluorímetro FP-8300, utilizando los parámetros mencionados anteriormente en la **Tabla PE.B.II.IV.1**. A continuación, se añadió a cada uno de los colorantes 20  $\mu$ L de suspensión mitocondrial y se dejó en incubación 20 minutos a temperatura ambiente. Al transcurrir el tiempo, se centrifugaron cada uno de los tubos a 10000 xg durante 10 minutos, de manera que, al finalizar, se retiró el sobrenadante (nombrado como sobrenadante 1) y se lavó el pellet dos veces con tampón, una vez retirado el sobrenadante. Después, se procedió a resuspender el pellet del fondo del tubo con 5 mL de agua, rompiendo la membrana externa de las mitocondrias por shock osmótico. De nuevo, se centrifugó la suspensión a 10000 xg durante 10 minutos. Tras ello, se retiró el sobrenadante (sobrenadante 2) y se lavó dos veces el pellet con tampón. Luego, se resuspendió el pellet con 5 mL de agua, con la finalidad de romper, esta vez, la membrana interna por shock osmótico. Se centrifugó una última vez a 10000 xg, 10 minutos y se retiró el último sobrenadante (sobrenadante 3).

Por último, tras finalizar el ensayo, se realizaron medidas de fluorescencia de cada uno de los sobrenadantes 1, 2 y 3 en el espectrofluorímetro FP-8300. Los parámetros que se emplearon fueron los mismos utilizados para la caracterización fotofísica, que se muestran en la **Tabla PE.B.II.IV.1**.

## PE.BLOQUE B.CAPÍTULO III. SENSORES DE pH ESPECÍFICOS PARA FLIM

### 1. Síntesis: Aspectos generales

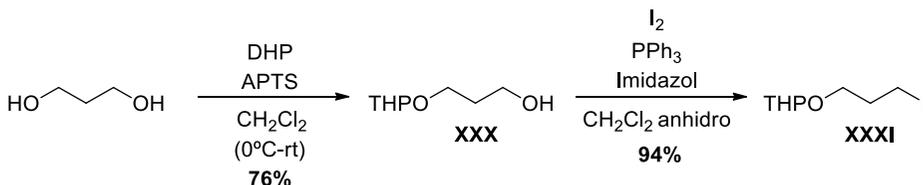
Las consideraciones generales respecto a reactivos, disolventes, purificación y caracterización son análogas a las descritas en la *P.E. Bloque B. Capítulo II. Apartado 1*. En este caso, los espectros de RMN se hicieron a temperatura ambiente, empleando una frecuencia de 400 y 500 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  y de 101 y 126 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ , en los disolventes deuterados, DMSO- $d_6$ , Metanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), Cloroformo- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ), empleando como referencia en los RMN de  $^1\text{H}$  los desplazamientos químicos de protones que aparecen a 2.5, 3.31 y 7.26 ppm, respectivamente y en los RMN de  $^{13}\text{C}$  39.52, 49.0 y 77.16 ppm, respectivamente.

### 2. Síntesis de los compuestos 38 y 39

Para sintetizar diferentes precursores necesarios en este capítulo se ha utilizado un procedimiento general de reacción el cual se describe a continuación.

#### Procedimiento general para intercambiar grupos hidroxilos por iodo (PG-III-1)

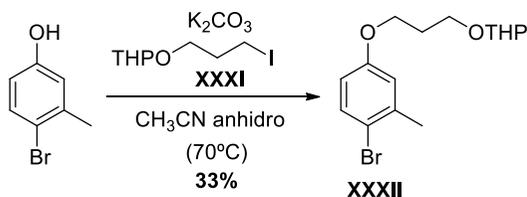
En primer lugar, el iodo (1.5 eq.) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (10-50 mL). A esa disolución de color marrón se añadió trifenilfosfina (1.5 eq.) adquiriendo la disolución un color amarillo. Posteriormente se adicionó imidazol (3.3 eq.) pasando la disolución a color blanco y el alcohol primario (1 eq.) para ser intercambiado por el iodo. Se dejó en agitación durante alrededor de 1 hora y 35 minutos, se soportó el crudo de reacción en sílica (**XXI** y **XXXIV**) o en celita (**XXXVII**) y se evaporó a presión reducida, purificándolo posteriormente mediante columna cromatográfica flash usando mezclas de hexano-acetato de etilo como eluyente.

**Síntesis de XXX y XXXI****Precursor XXX**

Se disolvió 1,3-propanodiol (3.26 g, 43 mmol) y dihidropirano (DHP) (1.30 mL, 14 mmol) en 70 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A continuación, se añadió ácido *p*-toluensulfónico (APTS) (27 mg, 0.143 mmol) a 0 °C y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras ese tiempo, se hidrolizó la reacción con trietilamina y se evaporó el crudo de reacción que se purificó posteriormente, mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 2:8 de hexano-acetato de etilo como eluyente. Se obtuvieron 1.73 g de **XXX**, un líquido incoloro con un rendimiento del 76 %. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  coincidieron con los publicados anteriormente<sup>[477]</sup>.

**Precursor XXXI**

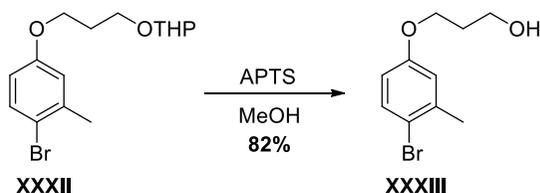
Siguiendo el procedimiento PG-III-1, a partir del alcohol primario **XXX** (1.73 g, 11 mmol) se obtuvieron 2.74 g de **XXXI**, un líquido amarillo con un rendimiento del 94 %. Los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  coincidieron con los publicados anteriormente<sup>[477]</sup>.

**Síntesis de XXXII**

El producto comercial 4-bromo-3-metilfenol (600 mg, 3.21 mmol) se disolvió en 12 mL  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro. Luego se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (664 mg, 4.81 mmol) y tras 5 minutos en agitación, se añadió **XXXI** (1.30 g, 4.81 mmol), dejándolo en agitación durante 24 horas a 70 °C. Al transcurrir el tiempo, se filtró el  $\text{K}_2\text{CO}_3$  con un filtro de pliegues, se soportó el crudo de reacción en

celita y se evaporó el disolvente a presión reducida. Posteriormente se llevó a cabo la purificación mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 9.5:0.5 de hexano-acetato de etilo como eluyente, obteniéndose 348 mg de **XXXII**, un líquido incoloro con un rendimiento del 33 %. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los publicados anteriormente<sup>[478]</sup>.

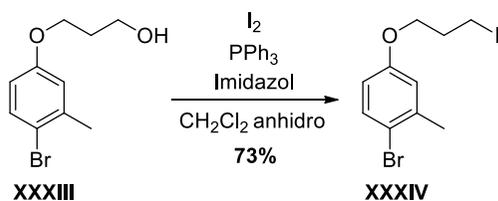
### Síntesis de **XXXIII**



A una disolución de **XXXII** (252 mg, 0.765 mmol) en metanol (6 mL) se añadió ácido *p*-toluensulfónico (437 mg, 2.30 mmol) dejándolo en agitación durante 12 horas. Al transcurrir el tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 8.5:1.5 de hexano-acetato de etilo como eluyente, obteniéndose 153 mg de **XXXIII**, un líquido incoloro con un rendimiento del 82 %.

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.39 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 6.62 (dd,  $J = 8.7, 3.1$  Hz, 1H), 4.08 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.86 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.03 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  158.1 (C), 139.0 (C), 133.0 (CH), 117.3 (CH), 115.8 (C), 113.6 (CH), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 32.09 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrO<sub>2</sub>: 246.0102, obtenida: 246.1663.

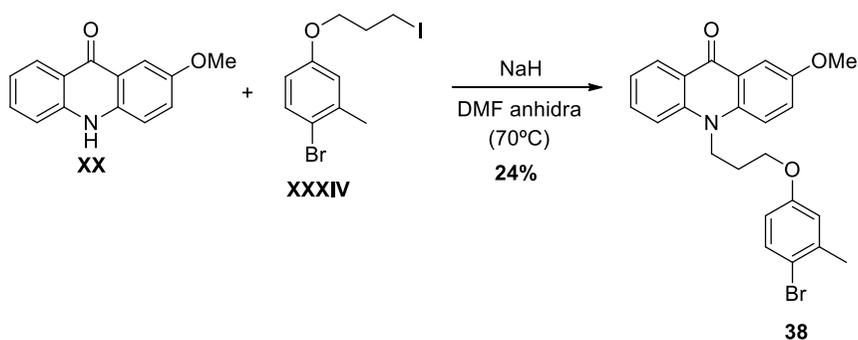
### Síntesis de **XXXIV**



Mediante el procedimiento PG-III-1 a partir de **XXXIII** (84 mg, 0.343 mmol), se obtuvieron 89 mg de **XXXIV**, un aceite incoloro con un rendimiento del 73 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  7.40 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.80 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 6.62 (dd,  $J$  = 8.7, 3.0 Hz, 1H), 4.00 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H), 3.36 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.30 – 2.21 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  158.0 (C), 139.0 (C), 133.0 (CH), 117.3 (CH), 115.8 (C), 113.7 (CH), 67.6 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>), 2.5 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>BrIO: 356.9110, obtenida: 356.9503.

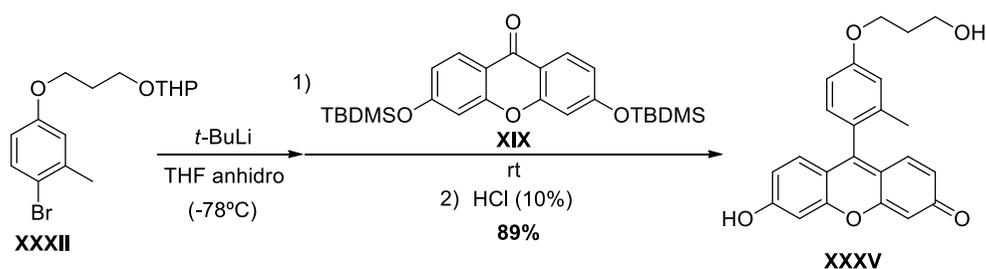
### Síntesis del compuesto 38



La acridona **XX** (20 mg, 0.089 mmol) se disolvió en 6 mL de DMF anhidra. A continuación, se añadió NaH al 60% (21 mg, 0.533 mmol) y se dejó en agitación durante 10 minutos. Después, se añadió **XXXIV** (126 mg, 0.355 mmol) y se dejó en agitación a 70 °C (a reflujo) durante 24 horas. Al transcurrir el tiempo, se añadieron unas gotas de agua para neutralizar los restos de NaH y se realizó una extracción con HCl (10 %)/ acetato de etilo. La fase orgánica se lavó 5 veces con HCl diluido al 10% y 2 veces con salmuera, secándola posteriormente con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash utilizando mezclas 6:4 de hexano-acetato de etilo como eluyente. Tras ello se realizó una purificación adicional mediante TLC preparativa, obteniéndose 12 mg de **38**, un aceite amarillo verdoso con un rendimiento del 24 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 8.43 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.81 – 7.76 (m, 2H), 7.73 (ddd, *J* = 8.8, 6.7, 1.7 Hz, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.29 (ddd, *J* = 7.9, 6.7, 1.0 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 4.70 – 4.63 (m, 2H), 4.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.33 – 2.26 (m, 2H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 179.2 (C), 159.4 (C), 156.2 (C), 142.8 (C), 140.0 (C), 138.3 (C), 135.4 (CH), 134.0 (CH), 128.2 (CH), 126.3 (CH), 123.9 (C), 122.5 (CH), 122.4 (C), 118.7 (CH), 118.2 (CH), 116.6 (CH), 116.5 (C), 114.9 (CH), 107.1 (CH), 66.2 (CH<sub>2</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 44.1 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH<sub>2</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>BrNO<sub>3</sub>: 453.0814, obtenida: 453.2956.

### Síntesis de **XXXV**

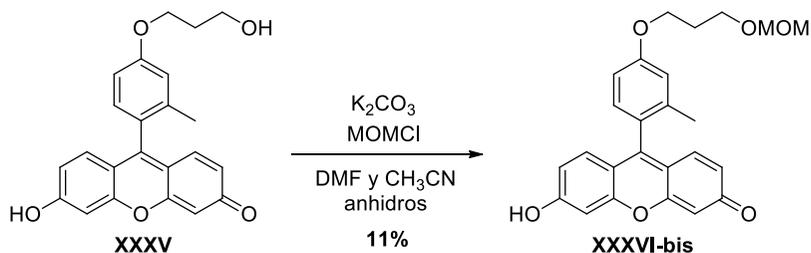


En un tubo Schlenk se disolvió **XXXII** (55 mg, 0.121 mmol) en 2 mL de THF anhidro y se mantuvo bajo atmósfera de argón 10 minutos. Se enfrió a -78 °C y al alcanzar dicha temperatura, se añadió una disolución de *tert*-butil litio 1.7 M en pentano (0.29 mL, 0.486 mmol) y se dejó agitando durante 30 minutos a -78 °C. A continuación, se adicionó lentamente una disolución de la cetona **XIX**, previamente sintetizada (80 mg, 0.243 mmol) en 2 mL de THF destilado. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras ello, se añadió 1 mL de HCl diluido al 10 % y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 9:1 de diclorometano-metanol como eluyente, obteniéndose 40 mg de **XXXV**, un sólido rojo-anaranjado con un rendimiento del 89 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.14 – 7.06 (m, 3H), 7.04 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz, 1H), 6.75 – 6.69 (m, 4H), 4.20 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 2H), 2.02 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (101**

**MHz, Metanol- $d_4$**   $\delta$  161.6 (C), 159.5 (C), 156.7 (C), 138.9 (C), 132.3 (CH), 131.4 (CH), 125.7 (C), 117.5 (CH), 115.8 (C), 113.3 (CH), 104.5 (CH), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>: 377.1335, obtenida: 377.2779.

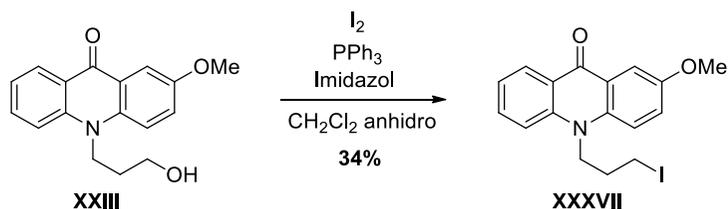
### Síntesis de **XXXVI**



El compuesto **XXXV** (53 mg, 0.141 mmol) se disolvió en una mezcla 1:1 de DMF y CH<sub>3</sub>CN anhidros y se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (97 mg, 0.704 mmol). La suspensión se agitó 5 minutos y posteriormente se añadió MOMCl (0.01 mL, 0.141 mmol), dejándolo a continuación 12 horas en agitación a temperatura ambiente. Tras ello, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 9.5:0.5 de diclorometano-metanol como eluyente, obteniéndose 10 mg de **XXXVI-bis**, un sólido naranja con un rendimiento del 11 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.15 – 7.11 (m, 3H), 7.04 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J$  = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 6.75 – 6.71 (m, 4H), 4.65 (s, 2H), 4.19 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.76 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.11 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, Metanol- $d_4$ )**  $\delta$  161.7 (C), 159.3 (C), 156.2 (C), 139.0 (C), 132.5 (CH), 131.5 (CH), 125.6 (C), 117.6 (CH), 116.8 (C), 113.3 (CH), 104.4 (CH), 97.6 (CH<sub>2</sub>), 94.3 (C), 93.1 (C), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 65.8 (C), 65.3 (CH<sub>2</sub>), 56.0 (C), 55.5 (CH<sub>3</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 20.0 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>: 421.1677, obtenida: 421.3557.

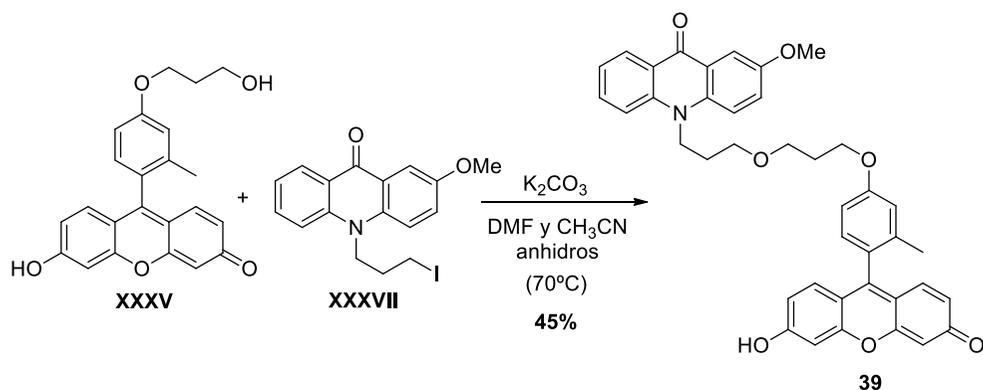
### Síntesis de XXXVII



A partir del alcohol primario **XXXIII** (97 mg, 0.342 mmol) mediante el procedimiento PG-III-1 se obtuvieron 46.3 mg de **XXXVII**, un aceite incoloro con un rendimiento del 34 %.

**$^1H$  RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  8.56 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 7.70 (ddd,  $J = 8.7, 6.9, 1.8$  Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J = 9.1, 7.8$  Hz, 2H), 7.35 (dd,  $J = 9.3, 3.2$  Hz, 1H), 7.31 – 7.23 (m, 1H), 4.49 – 4.43 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.35 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.41 – 2.32 (m, 2H).  **$^{13}C$  RMN (101 MHz, Cloroformo-*d*)**  $\delta$  177.4 (C), 154.6 (C), 141.3 (C), 136.6 (C), 133.9 (CH), 128.2 (CH), 124.8 (CH), 123.3 (C), 121.8 (C), 121.2 (CH), 116.2 (CH), 114.2 (CH), 107.1 (CH), 55.9 (CH<sub>3</sub>), 46.8 (CH<sub>2</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>), 1.6 (CH<sub>2</sub>). **HRMS (ESI):**  $[M+H]^+$  calcd. C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>I: 394.0304, obtenida: 394.0302.

### Síntesis del compuesto 39



El xanteno **XXXV** (11 mg, 0.029 mmol) se disolvió en una mezcla 1:1 de DMF y  $CH_3CN$  anhidros. A continuación, una vez disuelto se añadió  $K_2CO_3$  (20 mg, 0.146 mmol) y tras 5 minutos de agitación se adicionó el yoduro **XXXVII** (11 mg, 0.029 mmol), dejando la mezcla en agitación durante 24 h a  $70^\circ C$ . Al finalizar el tiempo se soportó el crudo de reacción en celita y se

purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 9.6:0.4 de diclorometano-metanol como eluyente. Finalmente se realizó una purificación adicional con TLC preparativa obteniéndose 8.6 mg de **39**, un sólido naranja intenso con un rendimiento del 45 %.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 8.35 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 9.2, 6.2 Hz, 2H), 7.81 – 7.77 (m, 1H), 7.76 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.02 – 6.97 (m, 3H), 6.92 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 9.8, 1.9 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.70 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.35 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.61 (c, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.30 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.92 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H).  
**<sup>13</sup>C RMN (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 184.0 (C), 175.8 (C), 163.1 (C), 159.4 (C), 158.4 (C), 154.0 (C), 153.9 (C), 149.2 (C), 141.0 (C), 137.4 (C), 136.3 (C), 133.9 (CH), 130.7 (CH), 130.4 (CH), 129.5 (CH), 129.4 (CH), 126.8 (CH), 124.1 (CH), 123.9 (C), 122.4 (C), 120.94 (CH), 120.88 (C), 117.8 (CH), 116.3 (CH), 115.6 (CH), 114.2 (C), 113.9 (CH), 112.2 (CH), 106.2 (CH), 104.7 (CH), 101.3 (CH), 66.1 (CH<sub>2</sub>), 64.7 (CH<sub>2</sub>), 57.3 (CH<sub>2</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>), 42.2 (CH<sub>2</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>), 19.4 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>40</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>7</sub>: 642.2480, obtenida: 642.4808.

### 3. Instrumentación para la caracterización fotofísica

Por un lado, los espectros de absorción se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Lambda 650 UV-Vis (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Por otro, los espectros de excitación y emisión de fluorescencia se obtuvieron con un espectrofluorímetro FP-8500 (Jasco, Tokyo, Japón). Los parámetros instrumentales empleados para la realización de dichos espectros se muestran a continuación en la **Tabla PE.B.IV.1**.

**Tabla PE.B.IV.1.** Parámetros empleados para llevar a cabo las medidas de emisión y excitación del sensor de pH 39.

<b>Sensor de pH 39</b>	
<b><math>\lambda_{\text{excitación}}</math> (para espectros de emisión)</b>	420, 440 y 490 nm
<b><math>\lambda_{\text{emisión}}</math> (para espectros de excitación)</b>	500 y 550 nm
<b>Apertura de rendija de excitación</b>	2.5 nm
<b>Apertura de rendija de emisión</b>	2.5 nm
<b>Velocidad de respuesta</b>	1 s
<b>Sensibilidad del detector</b>	Alta
<b>Velocidad de escaneo</b>	1000 nm/min
<b>Intervalo de medida</b>	1 nm

## PE.BLOQUE B.CAPÍTULO IV. SENSORES FLUORESCENTES CON LONGITUDES DE ONDA DE EMISIÓN EN EL MAGENTA

### 1. Síntesis: Aspectos generales

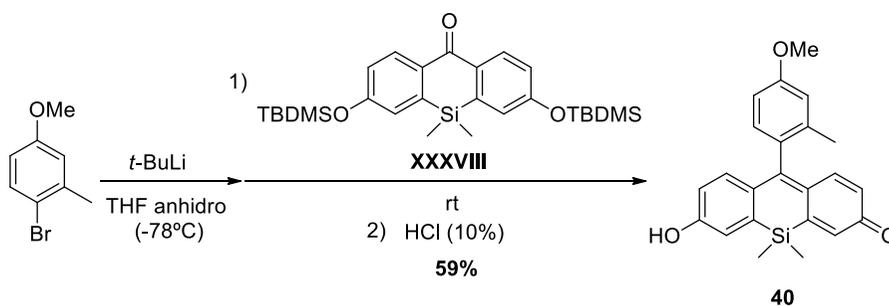
Las consideraciones generales respecto a reactivos, disolventes, purificación y caracterización son análogas a las descritas en la *P.E. Bloque B. Capítulo II. Apartado 1*. En este caso, los espectros de RMN se hicieron a temperatura ambiente, empleando una frecuencia de 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  y de 101MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ , en los disolventes deuterados, Metanol- $d_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y Acetona- $d_6$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ) empleando como referencia en RMN de  $^1\text{H}$  los desplazamientos químicos que aparecen a 3.31 y 2.05 ppm respectivamente y en RMN de  $^{13}\text{C}$  a 49.0 y 29.84 ppm respectivamente.

### 2. Síntesis de los compuestos 40 y 41

#### Síntesis de XXXVIII

Se preparó por un procedimiento previamente descrito. Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN coincidieron con los que se muestran en el artículo<sup>[462]</sup>.

#### Síntesis del compuesto 40

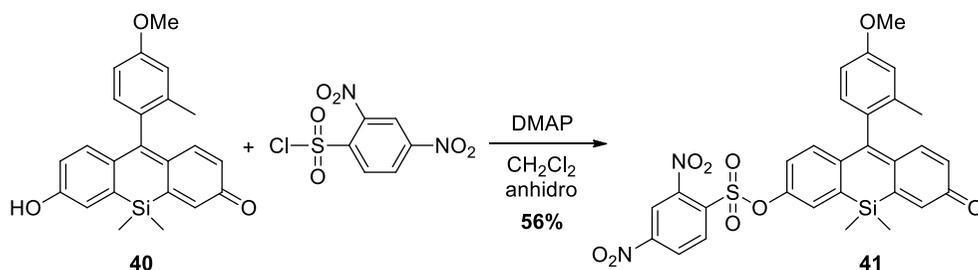


En un tubo Schlenk se disolvió el 4-bromo-3-metilanisol (100 mg, 0.497 mmol) en 2 mL de THF anhidro y se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$ . Al alcanzar dicha temperatura, se añadió una disolución de *tert*-butil litio 1.7 M en hexano (0.58 mL, 0.995 mmol) y se dejó agitando durante 30 minutos a  $-78^\circ\text{C}$ . A continuación, se adicionó lentamente una disolución de la cetona **XXXVIII**, previamente sintetizada mediante la metodología seguida por Best *et al.*<sup>[462]</sup>

(124 mg, 0.249 mmol) en 2 mL de THF anhidro. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras ello, se añadió 1 mL de HCl diluido al 10 %. Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida, se soportó el crudo de reacción en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash usando mezclas 9.8:0.2 de diclorometano-metanol como eluyente, obteniéndose 55 mg de **40**, un aceite de color rosa con un rendimiento del 59 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 7.02 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.95 – 6.90 (m, 2H), 6.46 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 0.49 (s, 3H), 0.48 (s, 3H). **<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)** δ 162.0 (C), 161.3 (C), 154.1 (C), 154.0 (C), 141.30 (CH), 141.26 (CH), 138.6 (C), 132.7 (C), 131.4 (CH), 129.7 (C), 122.7 (CH), 116.5 (CH), 112.3 (CH), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 19.9 (CH<sub>3</sub>), -1.3 (CH<sub>3</sub>), -1.6 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (APCI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>Si: 375.1411, obtenida: 375.1424.

### Síntesis del compuesto 41



A una disolución del compuesto **40** (49 mg, 0.131 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se añadió dimetilaminopiridina (DMAP) (24 mg, 0,196 mmol). Después se añadió el cloruro de 2,4-dinitrobenceno sulfonilo (42 mg, 0.157 mmol) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente 10 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida, el crudo se soportó en celita y se purificó mediante columna cromatográfica flash utilizando como eluyente mezclas 9.9:0.1 de diclorometano-metanol, obteniéndose 44.4 mg de **41**, un aceite amarillo-anaranjado con un rendimiento del 56 %.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)** δ 8.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.73 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* =

8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.07 – 6.96 (m, 4H), 6.94 (dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.18 (dd,  $J = 10.2, 2.2$  Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 0.49 (s, 3H), 0.47 (s, 3H).  **$^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, Acetona- $d_6$ )**  $\delta$  184.2 (C), 160.9 (C), 153.2 (C), 150.1 (C), 146.8 (C), 141.9 (C), 141.8 (C), 141.6 (CH), 138.4 (CH), 135.3 (CH), 134.8 (CH), 133.1 (C), 132.1 (C), 131.7 (C), 131.3 (CH), 129.2 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 124.5 (CH), 121.8 (CH), 116.6 (CH), 112.4 (CH), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 19.9 (CH<sub>3</sub>), -1.5 (CH<sub>3</sub>), -1.9 (CH<sub>3</sub>). **HRMS (ESI):** [M+H]<sup>+</sup> calcd. C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>SSi: 605.1050, obtenida: 605.1040.

### 3. Instrumentación para la caracterización fotofísica

Los espectros de absorción se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Lambda 650 UV-Vis (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Por otro lado, los espectros de emisión de fluorescencia y las medidas de intensidad de fluorescencia de **41** frente a glutatión (GSH), se obtuvieron con un espectrofluorímetro FP-8300 (Jasco, Tokyo, Japón). Los parámetros instrumentales empleados para la realización de las medidas cinéticas se muestran a continuación en la **Tabla PE.B.IV.1**.

**Tabla PE.B.IV.1.** Parámetros empleados para llevar a cabo las medidas cinéticas de la sonda dual **41**.

<b>Sonda dual 41</b>	
<b><math>\lambda</math>excitación (para espectros de emisión)</b>	580 nm
<b>Apertura de rendija de excitación</b>	2.5 nm
<b>Apertura de rendija de emisión</b>	2.5 nm
<b>Velocidad de respuesta</b>	0.5 s
<b>Sensibilidad del detector</b>	Alta
<b>Velocidad de escaneo</b>	1000 nm/min
<b>Intervalo de medida</b>	1 nm

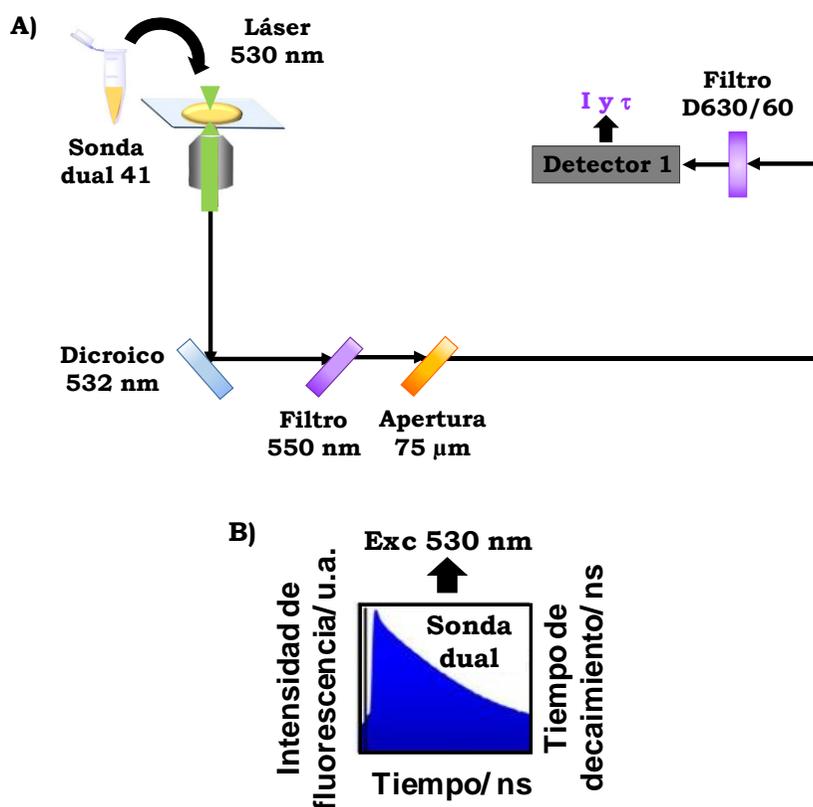
Los espectros tanto de absorción como de emisión se midieron a pH 7.35, a concentraciones de  $7.55 \cdot 10^{-6}$  y  $1.87 \cdot 10^{-6}$  M, respectivamente.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se calcularon siguiendo la siguiente expresión descrita previamente en la *Parte Experimental del Capítulo II, Apartado 4. Instrumentación para la caracterización fotofísica*<sup>[193]</sup>. Se obtuvieron haciendo un total de 12 medidas independientes a 2 concentraciones  $1.08 \cdot 10^{-6}$ ,  $1.33 \cdot 10^{-7}$  M a pH 7.35, tanto de la sonda como de la referencia, Rodamina 101, cuyo rendimiento cuántico es de 1<sup>[479]</sup>. Todas ellas a tres longitudes de onda de excitación, 530, 540 y 550 nm.

#### **4. Instrumentación para microscopía FLIM**

Las imágenes de intensidad y tiempos de vida de fluorescencia se registraron en el microscopio de tiempos de vida de fluorescencia MicroTime200 (PicoQuant) descrito en la parte experimental del *Capítulo III*.

Como fuente de excitación se empleó un láser pulsado a 530 nm (LDH-P-FA-530B, PicoQuant), operado por un controlador PDL-800 (PicoQuant) a una frecuencia de repetición de 20 MHz. El haz de luz se dirigió hacia la muestra tras reflejarse en un espejo dicróico de 532 nm (Z532RDC, Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.). A continuación, la emisión de fluorescencia se dirigió a un filtro de corte de 550 nm, (AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Alemania) y se focalizó en la apertura confocal de 75  $\mu\text{m}$ . Tras ello, la radiación emitida pasó a través de un filtro de paso de banda D630/60M (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) y se dirigió a un fotodiodo de avalancha (SPCM-AQR14, PerkinElmer) actuando como detector, el cual manda la señal de detección de fotones a un módulo TimeHarp200 SPT (PicoQuant, Berlín, Alemania) (Figura PE.B.IV.1 A)).



**Figura PE.B.IV.1.** A) Configuración del microscopio MicroTime200 para realizar medidas de la sonda dual 41 y B) Modelo de decaimiento de fluorescencia utilizado para la reconstrucción de imágenes de la sonda dual 41.

La toma de imágenes se realizó con el programa SymPhoTime 32 (PicoQuant), escaneando un área de interés de  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ , con una resolución de  $512 \times 512$  píxel, y un tiempo por píxel de 0.6 ms, llevando a cabo un barrido bidireccional.

## 5. Cultivo celular

Se han empleado tres líneas celulares: carcinoma hepatocelular humano HepG2 (ATCC no. HB-8065™), preosteoblastos MC3T3-E1 (ECACC 99072810) y células fotorreceptoras 661W. Las dos primeras fueron proporcionadas por el *centro de cultivo celular de la Universidad de Granada* y la tercera, células fotorreceptoras, en concreto, en este caso, células de cono de retina de ratón transformada a partir de tumores de retina, fueron proporcionadas por el *Dr. Enrique de la Rosa del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid*.

Tanto las células HepG2 como las 661W se cultivaron a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en medio de cultivo comercial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS), glutamina 2 mM + U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina. Las células MC3T3-E1 se cultivaron en medio esencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM) con ribonucleósidos, dextrirribonucleósidos, L-glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM, FBS al 10% (v/v), penicilina 100 U/mL y 0.1 mg de estreptomina.

Para los experimentos de microscopía FLIM cada una de las líneas celulares se sembraron en cubreobjetos circulares (diámetro de 25 mm) en placas de seis pocillos con una densidad de  $2.3 \cdot 10^5$  células por pocillo.

## 6. Experimentos con microscopía FLIM

En primer lugar, se hizo el estudio de las líneas celulares ricas en biotioles, HepG2 y MC3T3-E1 siguiendo la reacción fluorogénica de **41** con los biotioles presentes en el medio intracelular. Para ello, las células se mantuvieron en incubación a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  con un nivel de  $\text{CO}_2$  de 5.2 %. Transcurrido ese tiempo se les retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces cada pocillo con solución tampón Krebs-Ringer (118 mM NaCl, 5 mM KCl.

1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM HEPES a pH 7.4). A continuación, se colocó en el portamuestras el cubreobjetos en el que están las células adheridas y, se añadió 1 mL de tampón Krebs-Ringer. Tras ello, se colocó el portamuestras en el microscopio y se procedió a tomar medidas de la autofluorescencia celular manteniendo las células únicamente en el tampón. Una vez tomadas las imágenes se eliminó la solución tampón y se añadió 1 mL de una disolución  $6 \cdot 10^{-7}$  M del compuesto **41** en tampón Krebs-Ringer. Dicha disolución se preparó a partir de una disolución madre de la sonda **41** disuelta en DMSO a  $6 \cdot 10^{-5}$  M, que, a su vez, se preparó previamente a partir de una disolución madre a una concentración de  $6 \cdot 10^{-4}$  M. Finalmente, se recogieron 7 imágenes de intensidad tomadas con una diferencia de 5 minutos entre cada una de ellas.

Tras la reacción del compuesto **41** con los biotioles en estas líneas celulares, se analizó la variación de tiempos de vida de fluorescencia de **40** con diferentes concentraciones de iones fosfato en el medio. Para llevar a cabo el siguiente estudio, se incubaron las células durante 20 minutos con 1 µg/ml de α-toxina de *Staphylococcus Aureus*. Tras ese tiempo se añadieron distintas concentraciones de iones fosfato (10, 20, 30, 50, 100 mM) y se fueron recogiendo imágenes FLIM de una misma célula a las diferentes concentraciones. Para la preparación de las soluciones de tampón fosfato se mezclaron especies de fosfato individuales (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) hasta ajustar a un pH de 7.35.

En segundo lugar, en los experimentos con la línea celular 661W, se indujo estrés celular a estas células mediante la preincubación con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% diluido en agua, a distintas concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM durante 12 horas. Al transcurrir dicho tiempo, se siguió el mismo procedimiento empleado para la medida de biotioles en las líneas celulares HepG2 y MC3T3-E1, de manera que se llevó a cabo la toma de imágenes para cada concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 7. Análisis de imágenes

Las imágenes se analizaron con el programa SymPhoTime 32 (PicoQuant). Para ello, en el análisis se establecieron como parámetros

comunes la realización de un agrupamiento temporal de los fotones en el tiempo, de forma que la resolución temporal final fue de 116 ps por canal y un agrupamiento espacial de 4x4 píxeles, aumentando el número de fotones por píxel para la obtención de mejores decaimientos en cada imagen analizada. A continuación, para obtener las imágenes FLIM, se realizó un ajuste de una función bi-exponencial a los decaimientos de cada uno de los píxeles individuales, para lo que se utilizó una función de respuesta del instrumento (IRF) reconstruida a través de las imágenes con mayor número de fotones. Se fijó el tiempo de decaimiento corto a un valor de 1.5 ns para tener en cuenta la contribución de la autofluorescencia celular y el tiempo de vida largo fue un parámetro ajustable, cuyo valor dependió de la cantidad de fosfato en las células<sup>[349],[427]</sup>. A su vez, como criterio de optimización de los parámetros de ajuste se utilizó el criterio de máxima probabilidad (MLE), con la finalidad de obtener mejores ajustes de los decaimientos incluso en imágenes con número bajo de fotones.

Una vez obtenida la imagen definitiva de FLIM con el programa SymPhoTime, que contiene información tanto de intensidad como de tiempo de decaimiento, se procedió a la obtención de la intensidad promedio por píxel y distribución de tiempos de vida en regiones de interés con ayuda del programa ImageJ. De esta forma, para la selección de las regiones de forma automática se utilizó un macro que aplicó un valor mínimo de intensidad (*threshold*) para solo seleccionar píxeles con intensidad suficiente y se obtuvo el valor de intensidad promedio por píxel. De estos píxeles a su vez se obtuvo la distribución de tiempos de vida de imagen FLIM, en el que se excluyeron los núcleos de las células para evitar interferencias de una pequeña proporción de sonda que se introducía en ellos.

**REFERENCIAS**

**BLOQUE B**



## REFERENCIAS BLOQUE B

125. De Stefano, C., et al., *Handwriting analysis to support neurodegenerative diseases diagnosis: A review*. Pattern Recognition Letters, 2019. **121**: p. 37-45.
126. Chakraborty, S. and T. Rahman, *The difficulties in cancer treatment*. ecanermedicalscience, 2012. **6**: p. ed16.
127. Nichols, E., et al., *Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet Neurology, 2019. **18**(1): p. 88-106.
128. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015*. JAMA Oncology, 2017. **3**(4): p. 524.
129. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
130. Agrawal, M. and A. Biswas, *Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2015. **2**.
131. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nature Medicine, 2004. **10**(7): p. S10-S17.
132. Soto, C. and S. Pritzkow, *Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases*. Nature Neuroscience, 2018. **21**(10): p. 1332-1340.
133. Gandhi, J., et al., *Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: a review of pathogeneses, novel detection strategies, and potential therapeutics*. Reviews in the Neurosciences, 2019. **30**(4): p. 339-358.
134. de Lau, L.M.L. and M.M.B. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. The Lancet Neurology, 2006. **5**(6): p. 525-535.
135. Niccoli, T. and L. Partridge, *Ageing as a Risk Factor for Disease*. Current Biology, 2012. **22**(17): p. R741-R752.
136. Huang, W.-J., X.I.A. Zhang, and W.-W. Chen, *Role of oxidative stress in Alzheimer's disease*. Biomedical Reports, 2016. **4**(5): p. 519-522.
137. Lane, C.A., J. Hardy, and J.M. Schott, *Alzheimer's disease*. European Journal of Neurology, 2018. **25**(1): p. 59-70.
138. Mendiola-Precoma, J., et al., *Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease*. Biomed Research International, 2016.
139. Femminella, G., et al., *Imaging and Molecular Mechanisms of Alzheimer's Disease: A Review*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(12): p. 3702.
140. Xia, X., et al., *Aging and Alzheimer's disease: Comparison and associations from molecular to system level*. Aging Cell, 2018. **17**(5): p. e12802.
141. Reitz, C., C. Brayne, and R. Mayeux, *Epidemiology of Alzheimer disease*. Nature Reviews Neurology, 2011. **7**(3): p. 137-152.
142. Mayeux, R. and Y. Stern, *Epidemiology of Alzheimer Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(8): p. a006239-a006239.
143. Herrmann, N., et al., *Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease A Systematic Review*. Drugs, 2011. **71**(15): p. 2031-2065.
144. Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen, *ER stress and neurodegenerative diseases*. Cell Death and Differentiation, 2006. **13**(3): p. 385-392.
145. Hindle, J.V., *Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease*. Age and Ageing, 2010. **39**(2): p. 156-161.

146. Rizek, P., N. Kumar, and M.S. Jog, *An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease*. Canadian Medical Association Journal, 2016. **188**(16): p. 1157-1165.
147. Rodriguez, M., et al., *Parkinson's disease as a result of aging*. Aging Cell, 2015. **14**(3): p. 293-308.
148. Poewe, W., et al., *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong*. Clinical Interventions in Aging, 2010. **5**: p. 229-238.
149. Catherine Sánchez, N., *Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer*. Revista Médica Clínica Las Condes, 2013. **24**(4): p. 553-562.
150. Kato, Y., et al., *Acidic extracellular microenvironment and cancer*. Cancer Cell International, 2013. **13**(1): p. 89.
151. Muz, B., et al., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy*. Hypoxia, 2015: p. 83.
152. Mitrus, I., et al., *Evolving models of tumor origin and progression*. Tumor Biology, 2012. **33**(4): p. 911-917.
153. Cline, M.J., *Keynote address: The role of proto-oncogenes in human cancer: Implications for diagnosis and treatment*. International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics, 1987. **13**(9): p. 1297-1301.
154. Jafri, M.A., et al., *Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies*. Genome Medicine, 2016. **8**(1).
155. Giancotti, F.G., *Deregulation of cell signaling in cancer*. Febs Letters, 2014. **588**(16): p. 2558-2570.
156. Heiden, M.G.V., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
157. Fernald, K. and M. Kurokawa, *Evading apoptosis in cancer*. Trends in Cell Biology, 2013. **23**(12): p. 620-633.
158. Davies, E.L., *Breast cancer*. Medicine, 2012. **40**(1): p. 5-9.
159. Czito, B.G. and C.G. Willett, *Chapter 48 - Colon Cancer*, in *Clinical Radiation Oncology (Third Edition)*, L.L. Gunderson and J.E. Tepper, Editors. 2012, Elsevier. p. 975-987.
160. Lemjabbar-Alaoui, H., et al., *Lung cancer: Biology and treatment options*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2015. **1856**(2): p. 189-210.
161. Burke, V.P. and J.M. Startzell, *The Leukemias*. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, 2008. **20**(4): p. 597-608.
162. WHO. *Cancer*. 2015; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
163. Caley, A. and R. Jones, *The principles of cancer treatment by chemotherapy*. Surgery (Oxford), 2012. **30**(4): p. 186-190.
164. Baskar, R., et al., *Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions*. International Journal of Medical Sciences, 2012. **9**(3): p. 193-199.
165. Rich, R.R., *77- Immunotherapy of Cancer*, in *Clinical Immunology: Principles and Practise (Fifth Edition)*, R.R. Rich, et al., Editors. 2018, Elsevier. p. 1033-1048.
166. Fass, L., *Imaging and cancer: A review*. Molecular Oncology, 2008. **2**(2): p. 115-152.
167. Karlawish, J., et al., *Alzheimer's disease: The next frontier—Special Report 2017*. Alzheimer's & Dementia, 2017. **13**(4): p. 374-380.
168. Singh, S., et al., *Tumor markers: A diagnostic tool*. National Journal of Maxillofacial Surgery, 2016. **7**(1): p. 17.
169. *Early detection: a long road ahead*. Nature Reviews Cancer, 2018. **18**(7): p. 401-401.

170. Suhling, K., P.M. French, and D. Phillips, *Time-resolved fluorescence microscopy*. Photochem Photobiol Sci, 2005. **4**(1): p. 13-22.
171. Ruedas-Rama M., A.-P.J., Crovetto L., Paredes J., Orte A., *FLIM Strategies for Intracellular Sensing*, in *Advanced Photon Counting*, W.M. Kapusta P., Erdmann R., Editor. 2015, Springer International Publishing: Cham, Switzerland. p. 191-223.
172. Coons, A.H., H.J. Creech, and R.N. Jones, *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1941. **47**(2): p. 200-202.
173. Lazarides, E. and K. Weber, *Actin Antibody: The Specific Visualization of Actin Filaments in Non-Muscle Cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974. **71**(6): p. 2268-2272.
174. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1962. **59**(3): p. 223-239.
175. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
176. Tsien, R.Y., *The Green Fluorescent Protein*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**(1): p. 509-544.
177. Garritz, A., Shimomura, Chalfie y Tsien: los señores de la proteína verde bioluminiscente de la medusa Aequorea victoria. Educación Química, 2009. **20**(1): p. 75-76.
178. Amos, W.B. and J.G. White, *How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research*. Biology of the Cell, 2003. **95**(6): p. 335-342.
179. Eisaman, M.D., et al., *Invited Review Article: Single-photon sources and detectors*. Review of Scientific Instruments, 2011. **82**(7): p. 071101.
180. Gustafsson, M.G.L., *Extended resolution fluorescence microscopy*. Current Opinion in Structural Biology, 1999. **9**(5): p. 627-628.
181. Becker, W., *Fluorescence lifetime imaging by multi-dimensional time correlated single photon counting*. Medical Photonics, 2015. **27**: p. 41-61.
182. Denk, W., J. Strickler, and W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. **248**(4951): p. 73-76.
183. Cox, S. and G.E. Jones, *Imaging cells at the nanoscale*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013. **45**(8): p. 1669-1678.
184. Han, R., et al., *Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology*. Journal of Genetics and Genomics, 2013. **40**(12): p. 583-595.
185. Schermelleh, L., et al., *Super-resolution microscopy demystified*. Nature Cell Biology, 2019. **21**(1): p. 72-84.
186. Arroyo-Pieck, A. and J. Peón, *Premio Nobel de Química 2014 Microscopía de fluorescencia con super-resolución*. Educación Química, 2015. **26**(1): p. 50-51.
187. Xue, F.W., T. Uchida, and S. Minami, *A Fluorescence Lifetime Distribution Measurement System Based on Phase-Resolved Detection Using an Image Dissector Tube*. Applied Spectroscopy, 1989. **43**(5): p. 840-845.
188. Xu, M.-m., et al., *Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid- $\beta$  aggregates*. Acta Pharmacologica Sinica, 2016. **37**(6): p. 719-730.
189. Zhan, C., et al., *A Fluorescent Probe for Early Detection of Melanoma and Its Metastasis by Specifically Imaging Tyrosinase Activity in a Mouse Model*. Analytical Chemistry, 2018. **90**(15): p. 8807-8815.
190. Hori, S.S., W.S. Tummers, and S.S. Gambhir, *On-target probes for early detection*. Nature Biomedical Engineering, 2017. **1**(4).
191. Xu, W., et al., *Discerning the Chemistry in Individual Organelles with Small-Molecule Fluorescent Probes*. Angewandte Chemie International Edition, 2016. **55**(44): p. 13658-13699.

192. Zhu, H., et al., *Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles*. Accounts of Chemical Research, 2016. **49**(10): p. 2115-2126.
193. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. 2006, New York: Springer. xxvi, 954 p.
194. Smith, J.A., R.M. West, and M. Allen, *Acridones and quinacridones: novel fluorophores for fluorescence lifetime studies*. Journal of Fluorescence, 2004. **14**(2): p. 151-71.
195. Wang, R., et al., *Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(9): p. 1004-1013.
196. Martynov, V.I., et al., *Synthetic Fluorophores for Visualizing Biomolecules in Living Systems*. Acta Naturae, 2016. **8**(4): p. 33-46.
197. Yan, F., et al., *Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **97**: p. 15-35.
198. Gao, P., et al., *Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging*. Chemical Science, 2019. **10**(24): p. 6035-6071.
199. Suzuki, Y. and K. Yokoyama, *Development of Functional Fluorescent Molecular Probes for the Detection of Biological Substances*. Biosensors, 2015. **5**(2): p. 337-363.
200. Lashley, T., et al., *Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects*. Disease Models & Mechanisms, 2018. **11**(5): p. dmm031781.
201. D'Souza, G.G.M., et al., *Approaches for targeting mitochondria in cancer therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2011. **1807**(6): p. 689-696.
202. Pathak, R.K., et al., *Mito-DCA: A Mitochondria Targeted Molecular Scaffold for Efficacious Delivery of Metabolic Modulator Dichloroacetate*. ACS Chemical Biology, 2014. **9**(5): p. 1178-1187.
203. Yang, K., et al., *Synthesis, mitochondrial localization of fluorescent derivatives of cinnamide as anticancer agents*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2019. **170**: p. 45-54.
204. Zielonka, J., et al., *Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications*. Chemical Reviews, 2017. **117**(15): p. 10043-10120.
205. Sharma, A., et al., *Lysosomal targeting strategies for design and delivery of bioactive for therapeutic interventions*. Journal of Drug Targeting, 2018. **26**(3): p. 208-221.
206. Horobin, R.W., *Where do dyes go inside living cells? Predicting uptake, intracellular localisation, and accumulation using QSAR models*. Coloration Technology, 2014. **130**(3): p. 155-173.
207. Sabin, F.R., *Studies on blood - The vitally stainable granules as a specific criterion for erythroblasts and the differentiation of the three strains of the white blood-cells as seen in the living chick's yolk-sac*. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 1921. **32**: p. 314-321.
208. Sangster, J., *Octanol-Water Partition-Coefficients of Simple Organic-Compounds*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1989. **18**(3): p. 1111-1229.
209. Klopman, G. and H. Zhu, *Recent methodologies for the estimation of N-octanol/ water partition coefficients and their use in the prediction of membrane transport properties of drugs*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2005. **5**(2): p. 127-133.
210. Horobin, R.W. and J.C. Stockert, *Uptake and localization mechanisms of fluorescent and colored lipid probes. 1. Physicochemistry of probe uptake and localization, and the use of QSAR models for selectivity prediction*. Biotechnic & Histochemistry, 2011. **86**(6): p. 379-393.

211. Rashid, F. and R.W. Horobin, *Interaction of Molecular Probes with Living Cells and Tissues .2. A Structure-Activity Analysis of Mitochondrial Staining by Cationic Probes, and a Discussion of the Synergistic Nature of Image-Based and Biochemical Approaches*. Histochemistry, 1990. **94**(3): p. 303-308.
212. Rashid, F. and R.W. Horobin, *Accumulation of Fluorescent Non-Cationic Probes in Mitochondria of Cultured-Cells - Observations, a Proposed Mechanism, and Some Implications*. Journal of Microscopy, 1991. **163**: p. 233-241.
213. Rashid, F., R.W. Horobin, and M.A. Williams, *Predicting the Behavior and Selectivity of Fluorescent-Probes for Lysosomes and Related Structures by Means of Structure-Activity Models*. Histochemical Journal, 1991. **23**(10): p. 450-459.
214. Colston, J., et al., *Why fluorescent probes for endoplasmic reticulum are selective: an experimental and QSAR-modelling study*. Biotechnic & Histochemistry, 2003. **78**(6): p. 323-332.
215. Horobin, R.W., J.C. Stockert, and F. Rashid-Doubell, *Fluorescent cationic probes for nuclei of living cells: why are they selective? A quantitative structure-activity relations analysis*. Histochemistry and Cell Biology, 2006. **126**(2): p. 165-175.
216. Karp, G. and J.G. Patton, *Cell and molecular biology : concepts and experiments*. 7th ed. 2013, Hoboken, NJ: John Wiley.
217. Loura, L.M.S. and J.P. Prates Ramalho, *Fluorescent membrane probes' behavior in lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations*. Biophysical Reviews, 2009. **1**(3): p. 141.
218. Cairo, C.W., J.A. Key, and C.M. Sadek, *Fluorescent small-molecule probes of biochemistry at the plasma membrane*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010. **14**(1): p. 57-63.
219. Mottram, L.F., et al., *The Pennsylvania Green Fluorophore: A Hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the Construction of Hydrophobic and pH-Insensitive Molecular Probes*. Organic Letters, 2006. **8**(4): p. 581-584.
220. Colom, A., et al., *A fluorescent membrane tension probe*. Nature Chemistry, 2018. **10**(11): p. 1118-1125.
221. Li, P., D. Nijhawan, and X. Wang, *Mitochondrial activation of apoptosis*. Cell, 2004. **116**(2 Suppl): p. S57-9, 2 p following S59.
222. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochemical Journal, 2009. **417**: p. 1-13.
223. Ross, Meredith F., et al., *Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells*. Biochemical Journal, 2006. **400**(1): p. 199-208.
224. Murphy, M.P., *Targeting lipophilic cations to mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2008. **1777**(7-8): p. 1028-1031.
225. Murphy, M.P. and R.A.J. Smith, *Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2007. **47**: p. 629-656.
226. Yousif, L.F., K.M. Stewart, and S.O. Kelley, *Targeting Mitochondria with Organelle-Specific Compounds: Strategies and Applications*. ChemBioChem, 2009. **10**(12): p. 1939-1950.
227. Spence, M.T.Z. and I.D. Johnson, *The molecular probes handbook : a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11th ed. 2010, Carlsbad, CA: Live Technologies Corporation. xiv, 1160 p.
228. Kalyanaraman, B., et al., *A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds*. Redox Biology, 2018. **14**: p. 316-327.
229. Johnson, L.V., M.L. Walsh, and L.B. Chen, *Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980. **77**(2): p. 990-994.

230. Zhitomirsky, B., H. Farber, and Y.G. Assaraf, *LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018. **22**(4): p. 2131-2141.
231. Settembre, C., et al., *Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013. **14**(5): p. 283-296.
232. Saftig, P. and J. Klumperman, *Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(9): p. 623-635.
233. Guicciardi, M.E., M. Leist, and G.J. Gores, *Lysosomes in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2881-2890.
234. Appelqvist, H., et al., *The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target*. Journal of Molecular Cell Biology, 2013. **5**(4): p. 214-226.
235. Kirkegaard, T. and M. Jaattela, *Lysosomal involvement in cell death and cancer*. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2009. **1793**(4): p. 746-754.
236. De Duve, C., et al., *Lysosomotropic agents*. Biochemical Pharmacology, 1974. **23**(18): p. 2495-2531.
237. Macintyre, A.C. and D.J. Cutler, *The Potential Role of Lysosomes in Tissue Distribution of Weak Bases*. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 1988. **9**(6): p. 513-526.
238. Chen, X., et al., *Lysosomal Targeting with Stable and Sensitive Fluorescent Probes (Superior LysoProbes): Applications for Lysosome Labeling and Tracking during Apoptosis*. Scientific Reports, 2015. **5**.
239. Fagone, P. and S. Jackowski, *Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**: p. S311-S316.
240. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-1058.
241. Schwarz, D.S. and M.D. Blower, *The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(1): p. 79-94.
242. Rapoport, T.A., *Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 663-669.
243. Braakman, I. and D.N. Hebert, *Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(5).
244. Martinon, F., *Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer*. Acta Oncologica, 2012. **51**(7): p. 822-830.
245. Yadav, R.K., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer*. Journal of Cancer Prevention, 2014. **19**(2): p. 75-88.
246. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. Nature Cell Biology, 2011. **13**(3): p. 184-190.
247. Sabnis, R.W., et al., *DiOC(6)(3): a useful dye for staining the endoplasmic reticulum*. Biotechnic & Histochemistry, 1997. **72**(5): p. 253-258.
248. Xiao, H.B., et al., *A new endoplasmic reticulum-targeted two-photon fluorescent probe for imaging of superoxide anion in diabetic mice*. Biosensors & Bioelectronics, 2017. **91**: p. 449-455.
249. Zink, D., A.H. Fischer, and J.A. Nickerson, *Nuclear structure in cancer cells*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(9): p. 677-687.
250. Alvarado-Kristensson, M. and C.A. Rossello, *The Biology of the Nuclear Envelope and Its Implications in Cancer Biology*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(10).
251. Griffiths, A.J.F., *An introduction to genetic analysis*. 7th ed. 2000, New York: W.H. Freeman. xvii, 860 p.

252. Lukinavicius, G., et al., *SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy*. Nature Communications, 2015. **6**.
253. Eicher, T., S. Hauptmann, and A. Speicher, *The chemistry of heterocycles : structure, reactions, syntheses, and applications*. 2nd, completely rev., and enl. ed. 2003, Weinheim: Wiley-VCH. xvi, 556 p.
254. Orndorff, W.R. and A.J. Hemmer, *Fluorescein and Some of Its Derivatives*. Journal of the American Chemical Society, 1927. **49**(5): p. 1272-1280.
255. Baeyer, A., *Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1871. **4**(2): p. 555-558.
256. Sun, W.-C., et al., *Synthesis of Fluorinated Fluoresceins*. The Journal of Organic Chemistry, 1997. **62**(19): p. 6469-6475.
257. Alvarez-Pez, J.M., et al., *Fluorescein excited-state proton exchange reactions: Nanosecond emission kinetics and correlation with steady-state fluorescence intensity*. The Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**(26): p. 6320-6332.
258. Sjöback, R., J. Nygren, and M. Kubista, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(6): p. L7-L21.
259. Zanker, V. and W. Peter, *Die prototropen Formen des Fluoresceins*. Chemische Berichte, 1958. **91**(3): p. 572-580.
260. Song, L., et al., *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. Biophysical Journal, 1995. **68**(6): p. 2588-2600.
261. Azadnia, A., R. Campbell, and M. Sharma, *The Scope of Dansyl vs Fluorescein Label in Fluorescence Postlabeling Assay for DNA Damage*. Analytical Biochemistry, 1994. **218**(2): p. 444-448.
262. Alvarez-Pez, J.M., et al., *Fluorescence detection of DNA hybridization in homogeneous media*. Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends, 1997: p. 253-254.
263. Talavera, E.M., et al., *Fluorescence energy transfer between fluorescein label and DNA intercalators to detect nucleic acids hybridization in homogeneous media*. Applied Spectroscopy, 2003. **57**(2): p. 208-215.
264. Hirano, T., et al., *Highly Zinc-Selective Fluorescent Sensor Molecules Suitable for Biological Applications*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(49): p. 12399-12400.
265. Gee, K.R., et al., *Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes*. Cell Calcium, 2000. **27**(2): p. 97-106.
266. Kojima, H., et al., *Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(13): p. 2446-2453.
267. Tanaka, K., et al., *Rational design of fluorescein-based fluorescence probes, mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(11): p. 2530-2536.
268. Setsukinai, K.-i., et al., *Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(5): p. 3170-3175.
269. Maeda, H., et al., *2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(19): p. 2922-5.
270. Grimm, J.B., et al., *Virginia Orange: A Versatile, Red-Shifted Fluorescein Scaffold for Single- and Dual-Input Fluorogenic Probes*. Bioconjugate Chemistry, 2015. **27**(2): p. 474-480.
271. Tsybulsky, D.A., et al., *4',5'-Dichloro-2',7'-dimethoxy-5(6)-carboxyfluorescein (JOE): Synthesis and Spectral Properties of Oligonucleotide Conjugates*. The Journal of Organic Chemistry, 2011. **77**(2): p. 977-984.
272. Kaiser, R.J., et al., *Specific-primer-directed DNA sequencing using automated fluorescence detection*. Nucleic Acids Research, 1989. **17**(15): p. 6087-6102.

273. Kato, K., *Description of the entire mRNA population by a 3' end cDNA fragment generated by class IIS restriction enzymes*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(18): p. 3685-3690.
274. Sabnis, R.W., *Chapter 109. Oregon Green 488 carboxylic acid*, in *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*. 2015, Wiley Online Library.
275. Orte, A., et al., *Absorption and emission study of 2',7'-difluorofluorescein and its excited-state buffer-mediated proton exchange reactions*. The Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(5): p. 734-747.
276. Urano, Y., et al., *Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(13): p. 4888-94.
277. Mottram, L.F., et al., *A Concise Synthesis of the Pennsylvania Green Fluorophore and Labeling of Intracellular Targets with O<sup>6</sup>-Benzylguanine Derivatives*. Organic Letters, 2007. **9**(19): p. 3741-3744.
278. Šebelj, P., et al., *Fluorescein Analogues as Photoremovable Protecting Groups Absorbing at ~520 nm*. The Journal of Organic Chemistry, 2013. **78**(5): p. 1833-1843.
279. Martínez-Peragón, Á., et al., *Synthesis and Photophysics of a New Family of Fluorescent 9-Alkyl-Substituted Xanthenones*. Chemistry - A European Journal, 2014. **20**(2): p. 447-455.
280. Acheson, R.M. and R.G. Bolton, *Synthesis of Some Acridines and 9-Acridones for Spectral Studies*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 1975(7): p. 650-653.
281. Krishnegowda, G., et al., *Synthesis and chemical characterization of 2-methoxy-N 10-substituted acridones needed to reverse vinblastine resistance in multidrug resistant (MDR) cancer cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002. **10**(7): p. 2367-2380.
282. Gonzalez-Garcia, M.C., et al., *Coupled Excited-State Dynamics in N-Substituted 2-Methoxy-9-Acridones*. Frontiers in Chemistry, 2019. **7**: p. 129.
283. Mihindukulasuriya, S.H., T.K. Morcone, and L.B. McGown, *Characterization of acridone dyes for use in four-decay detection in DNA sequencing*. Electrophoresis, 2003. **24**(1-2): p. 20-25.
284. Belmont, P., et al., *Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2007. **7**(2): p. 139-169.
285. Belmont, P. and I. Dorange, *Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2008. **18**(11): p. 1211-1224.
286. Gao, C., et al., *Synthesis and antiproliferative activity of 2,7-diamino 10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridone derivatives as potent telomeric G-quadruplex DNA ligands*. Bioorganic Chemistry, 2015. **60**: p. 30-36.
287. Wansi, J.D., et al., *Oriciopsis studies (Pygme's plant) part 1. Alkaloids from Oriciopsis glaberrima Engl. (Rutaceae)*. Phytochemistry, 2006. **67**(5): p. 475-480.
288. Martínez-Peragón, A., et al., *Rational design of a new fluorescent 'ON/OFF' xanthene dye for phosphate detection in live cells*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014. **12**(33): p. 6432-6439.
289. Davies, T.A., et al., *Non-age related differences in thrombin responses by platelets from male patients with advanced Alzheimer's disease*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **194**(1): p. 537-43.
290. Schindler, M., et al., *Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr)*. Biochemistry, 1996. **35**(9): p. 2811-7.
291. Izumi, H., et al., *Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy*. Cancer Treatment Reviews, 2003. **29**(6): p. 541-9.

292. Han, J. and K. Burgess, *Fluorescent indicators for intracellular pH*. Chemical Reviews, 2010. **110**(5): p. 2709-28.
293. Webb, B.A., et al., *Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2011. **11**(9): p. 671-7.
294. Casey, J.R., S. Grinstein, and J. Orlowski, *Sensors and regulators of intracellular pH*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(1): p. 50-61.
295. Golovina, V.A. and M.P. Blaustein, *Spatially and Functionally Distinct Ca<sup>2+</sup> Stores in Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum*. Science, 1997. **275**(5306): p. 1643-1648.
296. Speake, T. and A.C. Elliott, *Modulation of calcium signals by intracellular pH in isolated rat pancreatic acinar cells*. The Journal of Physiology, 1998. **506**(2): p. 415-430.
297. Zhou, K., et al., *Multicolored pH-tunable and activatable fluorescence nanoplatform responsive to physiologic pH stimuli*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(18): p. 7803-11.
298. Perez-Sala, D., D. Collado-Escobar, and F. Mollinedo, *Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(11): p. 6235-42.
299. Gottlieb, R.A., et al., *Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(2): p. 654-658.
300. Simon, S., D. Roy, and M. Schindler, *Intracellular pH and the control of multidrug resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(3): p. 1128-32.
301. Hou, J.T., et al., *Fluorescent bioimaging of pH: from design to applications*. Chemical Society Reviews, 2017. **46**(8): p. 2076-2090.
302. Niu, L.-Q., et al., *Fluorescence detection of intracellular pH changes in the mitochondria-associated process of mitophagy using a hemicyanine-based fluorescent probe*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019. **207**: p. 123-131.
303. Boens, N., et al., *Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF*. The Journal of Physical Chemistry A, 2006. **110**(30): p. 9334-43.
304. Rink, T.J., *Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes*. The Journal of Cell Biology, 1982. **95**(1): p. 189-196.
305. Paradiso, A.M., R.Y. Tsien, and T.E. Machen, *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in gastric glands as measured with a cytoplasmic-trapped, fluorescent pH indicator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. **81**(23): p. 7436-7440.
306. Liang, E., P.C. Liu, and S. Dinh, *Use of a pH-sensitive fluorescent probe for measuring intracellular pH of Caco-2 cells*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **338**(1-2): p. 104-109.
307. Żurawik, T.M., et al., *Revisiting Mitochondrial pH with an Improved Algorithm for Calibration of the Ratiometric 5(6)-carboxy-SNARF-1 Probe Reveals Anticooperative Reaction with H<sup>+</sup> Ions and Warrants Further Studies of Organellar pH*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161353.
308. Buckler, K.J. and R.D. Vaughanjones, *Application of a New Ph-Sensitive Fluoroprobe (Carboxy-Snarf-1) for Intracellular Ph Measurement in Small, Isolated Cells*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 1990. **417**(2): p. 234-239.
309. Vanerp, P.E.J., et al., *Ratiometric Measurement of Intracellular Ph in Cultured Human Keratinocytes Using Carboxy-Snarf-1 and Flow-Cytometry*. Cytometry Part A, 1991. **12**(2): p. 127-132.

310. Jin, J. and A.T. Jones, *The pH sensitive probe 5-(and-6)-carboxyl seminaphthorhodafluor is a substrate for the multidrug resistance-related protein MRP1*. International Journal of Cancer, 2009. **124**(1): p. 233-238.
311. Seksek, O., et al., *Snarf-1 as an Intracellular Ph Indicator in Laser Microspectrofluorometry - a Critical-Assessment*. Analytical Biochemistry, 1991. **193**(1): p. 49-54.
312. Shindy, H.A., *Basics, Mechanisms and Properties in the Chemistry of Cyanine Dyes: A Review Paper*. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2012. **9**(4): p. 352-360.
313. Mujumdar, R.B., et al., *Cyanine Dye Labeling Reagents - Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters*. Bioconjugate Chemistry, 1993. **4**(2): p. 105-111.
314. Briggs, M.S., et al., *A pH sensitive fluorescent cyanine dye for biological applications*. Chemical Communications, 2000(23): p. 2323-2324.
315. Tang, B., et al., *A dual near-infrared pH fluorescent probe and its application in imaging of HepG2 cells*. Chemical Communications, 2007(36): p. 3726-3728.
316. Tang, B., et al., *A Near-Infrared Neutral pH Fluorescent Probe for Monitoring Minor pH Changes: Imaging in Living HepG2 and HL-7702 Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(8): p. 3016-3023.
317. Mujumdar, S.R., et al., *Cyanine-labeling reagents: Sulfo benzindocyanine succinimidyl esters*. Bioconjugate Chemistry, 1996. **7**(3): p. 356-362.
318. Tomczak, N., R.R. Liu, and J.G. Vancso, *Polymer-coated quantum dots*. Nanoscale, 2013. **5**(24): p. 12018-12032.
319. Tomasulo, M., I. Yildiz, and F.M. Raymo, *pH-sensitive quantum dots*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(9): p. 3853-5.
320. Tomasulo, M., et al., *pH-Sensitive Ligand for Luminescent Quantum Dots*. Langmuir, 2006. **22**(24): p. 10284-10290.
321. Liu, Y.S., et al., *pH-sensitive photoluminescence of CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots in human ovarian cancer cells*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(7): p. 2872-2878.
322. Jin, T., et al., *A quantum dot-based ratiometric pH sensor*. Chemical Communications, 2010. **46**(14): p. 2408-2410.
323. Wang, X.J., et al., *Ratiometric pH-dot ANSors*. Analyst, 2010. **135**(7): p. 1585-1591.
324. Orte, A., J.M. Alvarez-Pez, and M. Ruedas-Rama, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for the Detection of Intracellular pH with Quantum Dot Nanosensors*. ACS Nano, 2013. **7**(7): p. 6387-6395.
325. Ruedas-Rama, M.J., et al., *Quantum dot photoluminescence lifetime-based pH nanosensor*. Chemical Communications, 2011. **47**(10): p. 2898.
326. Santo-Domingo, J. and N. Demarex, *The renaissance of mitochondrial pH*. The Journal of General Physiology, 2012. **139**(6): p. 415-423.
327. Balut, C., et al., *Measurement of cytosolic and mitochondrial pH in living cells during reversible metabolic inhibition*. Kidney International, 2008. **73**(2): p. 226-232.
328. Li, P., et al., *A near-infrared-emitting fluorescent probe for monitoring mitochondrial pH*. Chemical Communications, 2014. **50**(54): p. 7184-7187.
329. Lee, M.H., et al., *Mitochondria-Immobilized pH-Sensitive Off-On Fluorescent Probe*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(40): p. 14136-14142.
330. Cao, L.X., et al., *In vivo observation of the pH alternation in mitochondria for various external stimuli*. Chemical Communications, 2015. **51**(97): p. 17324-17327.
331. Lakowicz, J.R., *Chapter 19. Fluorescence Sensing*, in *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006, Springer: New York. p. 623-673.

332. Long, L., et al., *A ratiometric fluorescent probe for iron(III) and its application for detection of iron(III) in human blood serum*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **812**: p. 145-151.
333. Schwarze, T., J. Riemer, and H.-J. Holdt, *A Ratiometric Fluorescent Probe for K<sup>+</sup> in Water Based on a Phenylaza-18-Crown-6 Lariat Ether*. *Chemistry - A European Journal*, 2018. **24**(40): p. 10116-10121.
334. Wu, Y.-C., et al., *Colorimetric and ratiometric fluorescent sensor for F<sup>-</sup> based on benzimidazole-naphthalene conjugate: Reversible and reusable study & design of logic gate function*. *Dyes and Pigments*, 2017. **140**: p. 47-55.
335. Niu, L.-Y., et al., *BODIPY-Based Ratiometric Fluorescent Sensor for Highly Selective Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(46): p. 18928-18931.
336. Long, L.L., et al., *Amino-coumarin based fluorescence ratiometric sensors for acidic pH and their application for living cells imaging*. *RSC Advances*, 2013. **3**(30): p. 12204-12209.
337. Hu, J., et al., *A convenient ratiometric pH probe and its application for monitoring pH change in living cells*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **196**: p. 194-202.
338. Chao, J., et al., *A ratiometric pH probe for intracellular pH imaging*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. **221**: p. 427-433.
339. Li, Y., et al., *Hemicyanine-based High Resolution Ratiometric near-Infrared Fluorescent Probe for Monitoring pH Changes in Vivo*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(4): p. 2495-2503.
340. Niu, W., et al., *A ratiometric emission NIR-fluorescent probe for sensing and imaging pH changes in live cells*. *Dyes and Pigments*, 2018. **152**: p. 155-160.
341. Ruedas-Rama, M., et al., *FLIM Strategies for Intracellular Sensing*, in *Advanced Photon Counting*, W.M. Kapusta P., Erdmann R., Editor. 2015, Springer International Publishing: Cham, Switzerland. p. 191-223.
342. Lakowicz, J.R., *Chapter 1. Introduction to Fluorescence*, in *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006, Springer: New York. p. 1-26.
343. Berezin, M.Y. and S. Achilefu, *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*. *Chemical Reviews*, 2010. **110**(5): p. 2641-2684.
344. Becker, W., *Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications*. *Journal of Microscopy*, 2012. **247**(2): p. 119-136.
345. Gerritsen, H.C., et al., *Chapter 3 Time domain FLIM: Theory, instrumentation, and data analysis*, in *Fret and Flim Techniques*, T.W.J. Gadella, Editor. 2009, Elsevier Science: Amsterdam. p. 95-132.
346. Wei, L. and D. Ho, *Recent Advances in Fluorescence Lifetime Analytical Microsystems: Contact Optics and CMOS Time-Resolved Electronics*. *Sensors (Basel)*, 2017. **17**(12): p. 2800.
347. Borst, J.W. and A.J.W.G. Visser, *Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences*. *Measurement Science and Technology*, 2010. **21**(10).
348. Kuimova, M.K., et al., *Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(21): p. 6672-6673.
349. Paredes, J.M., et al., *Real-time phosphate sensing in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013. **117**(27): p. 8143-9.
350. Sagolla, K., H.G. Lohmannsroben, and C. Hille, *Time-resolved fluorescence microscopy for quantitative Ca<sup>2+</sup> imaging in living cells*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(26): p. 8525-8537.
351. Ruedas-Rama, M.J., et al., *A chloride ion nanosensor for time-resolved fluorimetry and fluorescence lifetime imaging*. *Analyst*, 2012. **137**(6): p. 1500.
352. Ripoll, C., et al., *Intracellular Zn<sup>2+</sup> detection with quantum dot-based FLIM nanosensors*. *Chemical Communications*, 2015. **51**(95): p. 16964-16967.

353. Anderson, K.I., et al., *Multiphoton Laser Tomography and Fluorescence Lifetime Imaging of Melanoma: Morphologic Features and Quantitative Data for Sensitive and Specific Non-Invasive Diagnostics*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70682.
354. Rahim, N.A., et al., *Methodological considerations for global analysis of cellular FLIM/FRET measurements*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(2): p. 026013.
355. Oliveira, A.F. and R. Yasuda, *An improved Ras sensor for highly sensitive and quantitative FRET-FLIM imaging*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52874.
356. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen Der Physik, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
357. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967. **58**(2): p. 719-26.
358. Bajar, B.T., et al., *A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs*. Sensors (Basel), 2016. **16**(9).
359. Orte, A., R.W. Clarke, and D. Klenerman, *Single-molecule fluorescence coincidence spectroscopy and its application to resonance energy transfer*. Chemphyschem, 2011. **12**(3): p. 491-9.
360. Shrestha, D., et al., *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(4): p. 6718-6756.
361. Moroz, P., et al., *Competition of Charge and Energy Transfer Processes in Donor-Acceptor Fluorescence Pairs: Calibrating the Spectroscopic Ruler*. ACS Nano, 2018. **12**(6): p. 5657-5665.
362. Truong, K. and M. Ikura, *The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo*. Current Opinion in Structural Biology, 2001. **11**(5): p. 573-578.
363. Wallrabe, H. and A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(1): p. 19-27.
364. Elangovan, M., R.N. Day, and A. Periasamy, *Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell*. Journal of Microscopy, 2002. **205**(1): p. 3-14.
365. Sun, Y., et al., *Förster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells*. Cytometry Part A, 2013. **83**(9): p. 780-793.
366. Rajoria, S., et al., *FLIM-FRET for Cancer Applications*. Current Molecular Imaging, 2015. **3**(2): p. 144-161.
367. Osterlund, E.J., Q. Liu, and D.W. Andrews, *The Use of FLIM-FRET for the Detection of Mitochondria-Associated Protein Interactions*. , in *Mitochondrial Medicine. Methods in Molecular Biology*, V. Weissig and M. Edeas, Editors. 2015, Humana Press: New York.
368. Bacskai, B.J., et al., *Fluorescence resonance energy transfer determinations using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy to characterize amyloid-beta plaques*. Journal of Biomedical Optics, 2003. **8**(3): p. 368-375.
369. Awais, M., et al., *A Genetically Encoded Fluorescent Indicator Capable of Discriminating Estrogen Agonists from Antagonists in Living Cells*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(8): p. 2181-2186.
370. Caron, N.S., et al., *Using FLIM-FRET to Measure Conformational Changes of Transglutaminase Type 2 in Live Cells*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44159.
371. Anderson, K.I., et al., *Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122513.

372. Chennell, G., et al., *Imaging of Metabolic Status in 3D Cultures with an Improved AMPK FRET Biosensor for FLIM*. Sensors (Basel), 2016. **16**(8): p. 1312.
373. Tsou, P., et al., *A Fluorescent Reporter of AMPK Activity and Cellular Energy Stress*. Cell Metabolism, 2011. **13**(4): p. 476-486.
374. Hulspas, R., et al., *Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates*. Cytometry Part A, 2009. **75A**(11): p. 966-972.
375. Benson, S.C., Z.X. Zeng, and A.N. Glazer, *Fluorescence Energy-Transfer Cyanine Heterodimers with High-Affinity for Double-Stranded DNA .1. Synthesis and Spectroscopic Properties*. Analytical Biochemistry, 1995. **231**(1): p. 247-255.
376. Zeng, Z.X., S.C. Benson, and A.N. Glazer, *Fluorescence Energy-Transfer Cyanine Heterodimers with High-Affinity for Double-Stranded DNA .2. Applications to Multiplex Restriction Fragment Sizing*. Analytical Biochemistry, 1995. **231**(1): p. 256-260.
377. Beavis, A.J. and K.J. Pennline, *ALLO-7: A new fluorescent tandem dye for use in flow cytometry*. Cytometry Part A, 1996. **24**(4): p. 390-394.
378. Gerstner, A.O.H., et al., *Near-infrared dyes for six-color immunophenotyping by laser scanning cytometry*. Cytometry Part A, 2002. **48**(3): p. 115-123.
379. Le Roy, C., et al., *Flow cytometry APC-tandem dyes are degraded through a cell-dependent mechanism*. Cytometry Part A, 2009. **75A**(10): p. 882-890.
380. Roederer, M., et al., *Cy7PE and Cy7APC: Bright new probes for immunofluorescence*. Cytometry Part A, 1996. **24**(3): p. 191-197.
381. Naganbabu, M., et al., *Multiexcitation Fluorogenic Labeling of Surface, Intracellular, and Total Protein Pools in Living Cells*. Bioconjugate Chemistry, 2016. **27**(6): p. 1525-1531.
382. New, E.J., *Harnessing the Potential of Small Molecule Intracellular Fluorescent Sensors*. ACS Sensors, 2016. **1**(4): p. 328-333.
383. Ruedas-Rama, M., et al., *FLIM Strategies for Intracellular Sensing*, in *Advanced Photon Counting*, W.M. Kapusta P., Erdmann R., Editor. 2015, Springer International Publishing: Cham, Switzerland. p. 191-223.
384. Nadler, A. and C. Schultz, *The Power of Fluorogenic Probes*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(9): p. 2408-2410.
385. Li, Z., et al., *Imaging of intracellular acidic compartments with a sensitive rhodamine based fluorogenic pH sensor*. Analyst, 2011. **136**(18): p. 3698-3706.
386. Liang, X.G., et al., *A Fluorogenic Probe for Ultrafast and Reversible Detection of Formaldehyde in Neurovascular Tissues*. Theranostics, 2017. **7**(8): p. 2305-2313.
387. Xie, Z.D., et al., *A dual functional fluorogenic probe for visualization of intracellular pH and formaldehyde with distinct fluorescence signals*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2018. **16**(25): p. 4628-4632.
388. Samanta, S., et al., *A new fluorogenic probe for solution and intra-cellular sensing of trivalent cations in model human cells*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **194**: p. 120-126.
389. Resa, S., et al., *New Dual Fluorescent Probe for Simultaneous Biothiol and Phosphate Bioimaging*. Chemistry, 2015. **21**(42): p. 14772-9.
390. Mao, Z.Q., et al., *Development of a Silicon-Rhodamine Based Near-Infrared Emissive Two-Photon Fluorescent Probe for Nitric Oxide*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(18): p. 9620-9624.
391. Weng, M.R., et al., *Deep-red fluorogenic probe for rapid detection of nitric oxide in Parkinson's disease models*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019. **283**: p. 769-775.
392. Zhang, J.J., et al., *Fluorogenic probes for disease-relevant enzymes*. Chemical Society Reviews, 2019. **48**(2): p. 683-722.

393. Swenberg, J.A., et al., *Formaldehyde Carcinogenicity Research: 30 Years and Counting for Mode of Action, Epidemiology, and Cancer Risk Assessment*. Toxicologic Pathology, 2013. **41**(2): p. 181-189.
394. Puente-Munoz, V., et al., *Efficient acetate sensor in biological media based on a selective Excited State Proton Transfer (ESPT) reaction*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017. **250**: p. 623-628.
395. Weber, K., *The close relationship of fluorescence obliteration to the inhibition of photochemical reactions*. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Abteilung B-Chemie Der Elementarprozesse Aufbau Der Materie, 1931. **15**(1): p. 18-44.
396. Forster, T., *\*Elektrolytische Dissoziation Angeregter Molekule*. Zeitschrift Fur Elektrochemie, 1950. **54**(1): p. 42-46.
397. Acuna, A.U., A. Costela, and J.M. Munoz, *A Proton-Transfer Laser*. The Journal of Physical Chemistry, 1986. **90**(13): p. 2807-2808.
398. Yguerabide, J., et al., *Steady-State Fluorescence Method for Evaluating Excited State Proton Reactions: Application to Fluorescein*. Photochemistry and Photobiology, 1994. **60**(5): p. 435-441.
399. Paredes, J.M., et al., *Tuned lifetime, at the ensemble and single molecule level, of a xanthenic fluorescent dye by means of a buffer-mediated excited-state proton exchange reaction*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(26): p. 5400-7.
400. Rozwadowski, M., *Effect of pH on the fluorescence of fluorescein solutions*. Acta Physica Polonica, 1961. **20**: p. 1005-1017.
401. Crovetto, L., et al., *Global compartmental analysis of the excited-state reaction between fluorescein and (+/-)-N-acetyl aspartic acid*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(19): p. 6082-6092.
402. Paredes, J.M., et al., *Similarity between the kinetic parameters of the buffer-mediated proton exchange reaction of a xanthenic derivative in its ground- and excited-state*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(2): p. 323-327.
403. Yoshimoto, M., et al., *Characterization of acetate metabolism in tumor cells in relation to cell proliferation: Acetate metabolism in tumor cells*. Nuclear Medicine and Biology, 2001. **28**(2): p. 117-122.
404. Comerford, Sarah A., et al., *Acetate Dependence of Tumors*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1591-1602.
405. Lakhter, A.J., et al., *Glucose-independent Acetate Metabolism Promotes Melanoma Cell Survival and Tumor Growth*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(42): p. 21869-21879.
406. Marques, C., et al., *Acetate-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D release*. Cell Death & Disease, 2013. **4**: p. e507.
407. Orte, A., et al., *2',7'-Difluorofluorescein Excited-State Proton Reactions: Correlation between Time-Resolved Emission and Steady-State Fluorescence Intensity*. The Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(12): p. 2840-2846.
408. Orte, A., et al., *Three-State 2',7'-Difluorofluorescein Excited-State Proton Transfer Reactions in Moderately Acidic and Very Acidic Media*. The Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(39): p. 8705-8718.
409. Mottram, L.F., et al., *The Pennsylvania Green Fluorophore: a hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-insensitive molecular probes*. Organic Letters, 2006. **8**(4): p. 581-4.
410. Beck, G.R., Jr., B. Zerler, and E. Moran, *Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(15): p. 8352-7.
411. Khoshniat, S., et al., *The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011. **68**(2): p. 205-18.

412. Crovetto, L., et al., *Photophysics of a xanthenic derivative dye useful as an "on/off" fluorescence probe*. The Journal of Physical Chemistry A, 2007. **111**(51): p. 13311-20.
413. Chen, X., et al., *Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(6): p. 2120.
414. Yokota, T., et al., *Systemic oxidative stress is associated with lower aerobic capacity and impaired skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2013. **36**(5): p. 1341-6.
415. Xiao, Y., et al., *A new class of long-wavelength fluorophores: strong red fluorescence, convenient synthesis and easy derivation*. Chemical Communications, 2005(2): p. 239-41.
416. Hong, G.S., A.L. Antaris, and H.J. Dai, *Near-infrared fluorophores for biomedical imaging*. Nature Biomedical Engineering, 2017. **1**(1).
417. Escobedo, J.O., et al., *NIR dyes for bioimaging applications*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010. **14**(1): p. 64-70.
418. Boens, N., et al., *Visible Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Conformationally Constrained, Annulated BODIPY Dyes*. The Journal of Physical Chemistry A, 2012. **116**(39): p. 9621-9631.
419. Orte, A., et al., *Effect of the substitution position (2, 3 or 8) on the spectroscopic and photophysical properties of BODIPY dyes with a phenyl, styryl or phenylethynyl group*. RSC Advances, 2016. **6**(105): p. 102899-102913.
420. Bouteiller, C., et al., *Novel water-soluble near-infrared cyanine dyes: Synthesis, spectral properties, and use in the preparation of internally quenched fluorescent probes*. Bioconjugate Chemistry, 2007. **18**(4): p. 1303-1317.
421. Yuan, L., et al., *Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(2): p. 622-661.
422. Ikeno, T., T. Nagano, and K. Hanaoka, *Silicon-substituted Xanthenes Dyes and Their Unique Photophysical Properties for Fluorescent Probes*. Chemistry An Asian Journal, 2017. **12**(13): p. 1435-1446.
423. Fu, M., et al., *A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom*. Chemical Communications, 2008(15): p. 1780-2.
424. Egawa, T., et al., *Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region*. Chemical Communications, 2011. **47**(14): p. 4162-4.
425. Hirabayashi, K., et al., *Analysis of Chemical Equilibrium of Silicon-Substituted Fluorescein and Its Application to Develop a Scaffold for Red Fluorescent Probes*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(17): p. 9061-9069.
426. Kushida, Y., T. Nagano, and K. Hanaoka, *Silicon-substituted xanthenes dyes and their applications in bioimaging*. Analyst, 2015. **140**(3): p. 685-95.
427. Crovetto, L., et al., *Photophysics of a Live-Cell-Marker, Red Silicon-Substituted Xanthenes Dye*. The Journal of Physical Chemistry A, 2015. **119**(44): p. 10854-62.
428. Loudet, A. and K. Burgess, *BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties*. Chemical Reviews, 2007. **107**(11): p. 4891-4932.
429. Ni, Y. and J. Wu, *Far-red and near infrared BODIPY dyes: synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014. **12**(23): p. 3774-91.
430. Karolin, J., et al., *Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (Bodipy) Derivatives in Liquids, Lipid-Membranes, and Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(17): p. 7801-7806.

431. Lin, Q. and D. Buccella, *Highly Selective, Red Emitting BODIPY-Based Fluorescent Indicators for Intracellular Mg(2+) Imaging*. Journal of Materials Chemistry B, 2018. **6**(44): p. 7247-7256.
432. Boens, N., B. Verbelen, and W. Dehaen, *Postfunctionalization of the BODIPY Core: Synthesis and Spectroscopy*. European Journal of Organic Chemistry, 2015(30): p. 6577-6595.
433. Ripoll, C., et al., *Synthesis and Spectroscopy of Benzylamine-Substituted BODIPYs for Bioimaging*. European Journal of Organic Chemistry, 2018(20-21): p. 2561-2571.
434. Shao, J., et al., *Styryl-BODIPY based red-emitting fluorescent OFF-ON molecular probe for specific detection of cysteine*. Biosens Bioelectron, 2011. **26**(6): p. 3012-7.
435. Peng, X., et al., *A selective fluorescent sensor for imaging Cd<sup>2+</sup> in living cells*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(6): p. 1500-1.
436. Cheng, T.Y., et al., *A Highly Sensitive and Selective OFF-ON Fluorescent Sensor for Cadmium in Aqueous Solution and Living Cell*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(48): p. 16160-+.
437. Maity, A., et al., *A water-soluble BODIPY based 'OFF/ON' fluorescent probe for the detection of Cd(2+) ions with high selectivity and sensitivity*. Dalton Transactions, 2019. **48**(6): p. 2108-2117.
438. Jin, Y., et al., *A water-soluble BODIPY-based fluorescent probe for rapid and selective detection of hypochlorous acid in living cells*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019. **219**: p. 569-575.
439. Cowan, J.A., *Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes*. Biometals, 2002. **15**(3): p. 225-235.
440. de Baaij, J.H.F., J.G.J. Hoenderop, and R.J.M. Bindels, *Magnesium in Man: Implications for Health and Disease*. Physiological Reviews, 2015. **95**(1): p. 1-46.
441. Yap, Y.W., M. Whiteman, and N.S. Cheung, *Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration?* Cellular Signalling, 2007. **19**(2): p. 219-28.
442. Gungor, N., et al., *Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid*. Mutagenesis, 2010. **25**(2): p. 149-154.
443. Mishra, A., et al., *Cyanines during the 1990s: A review*. Chemical Reviews, 2000. **100**(6): p. 1973-2011.
444. Peng, X.J., et al., *Heptamethine cyanine dyes with a large stokes shift and strong fluorescence: A paradigm for excited-state intramolecular charge transfer*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(12): p. 4170-4171.
445. Renikuntla, B.R., et al., *Improved photostability and fluorescence properties through polyfluorination of a cyanine dye*. Organic Letters, 2004. **6**(6): p. 909-912.
446. Song, F., et al., *Syntheses, spectral properties and photostabilities of novel water-soluble near-infrared cyanine dyes*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2004. **168**(1-2): p. 53-57.
447. Ozmen, B. and E.U. Akkaya, *Infrared fluorescence sensing of submicromolar calcium: pushing the limits of photoinduced electron transfer*. Tetrahedron Letters, 2000. **41**(47): p. 9185-9188.
448. Kiyose, K., et al., *Development of a ratiometric fluorescent zinc ion probe in near-infrared region, based on tricarbo-cyanine chromophore*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(20): p. 6548-6549.
449. Tang, B., et al., *A sensitive and selective near-infrared fluorescent probe for mercuric ions and its biological imaging applications*. ChemBioChem, 2008. **9**(7): p. 1159-1164.

450. Zhu, M., et al., *Visible near-infrared chemosensor for mercury ion*. Organic Letters, 2008. **10**(7): p. 1481-1484.
451. Patonay, G., et al., *Noncovalent labeling of biomolecules with red and near-infrared dyes*. Molecules, 2004. **9**(3): p. 40-49.
452. Sasaki, E., et al., *Highly sensitive near-infrared fluorescent probes for nitric oxide and their application to isolated organs*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(11): p. 3684-3685.
453. Li, P., et al., *A near-infrared fluorescent probe for lipid hydroperoxides in living cells*. Analyst, 2008. **133**(10): p. 1409-1415.
454. Drexhage, K.H., *Fluorescence Efficiency of Laser-Dyes*. Journal of Research of the National Bureau of Standards Section a-Physics and Chemistry, 1976. **80**(3): p. 421-428.
455. Liu, J.X., et al., *Rational design and synthesis of a novel class of highly fluorescent rhodamine dyes that have strong absorption at long wavelengths*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**(23): p. 4355-4359.
456. Kanitz, A. and H. Hartmann, *Preparation and characterization of bridged naphthoxazinium salts*. European Journal of Organic Chemistry, 1999(4): p. 923-930.
457. Shi, J., X.-P. Zhang, and D.C. Neckers, *Xanthenes: Flourene Derivatives II*. Tetrahedron Letters, 1993. **34**(38): p. 6013-6016.
458. Koide, Y., et al., *Evolution of Group 14 Rhodamines as Platforms for Near-Infrared Fluorescence Probes Utilizing Photoinduced Electron Transfer*. ACS Chemical Biology, 2011. **6**(6): p. 600-608.
459. Shen, S.X., et al., *Near-infrared probes based on fluorinated Si-rhodamine for live cell imaging*. RSC Advances, 2017. **7**(18): p. 10922-10927.
460. Iwatate, R.J., et al., *Silicon Rhodamine-Based Near-Infrared Fluorescent Probe for  $\gamma$ -Glutamyltransferase*. Bioconjugate Chemistry, 2018. **29**(2): p. 241-244.
461. Zhang, Q.M., et al., *Parathyroid hormone initiates dynamic NHERF1 phosphorylation cycling and conformational changes that regulate NPT2A-dependent phosphate transport*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(12): p. 4546-4571.
462. Best, Q.A., et al., *pH-dependent Si-fluorescein hypochlorous acid fluorescent probe: spirocycle ring-opening and excess hypochlorous acid-induced chlorination*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(36): p. 13365-70.
463. Boens, N., et al., *Identifiability of the model of the intermolecular excited-state proton exchange reaction in the presence of pH buffer*. The Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**(40): p. 8180-8189.
464. Bergwitz, C. and H. Juppner, *Phosphate sensing*. Advances in Chronic Kidney Disease, 2011. **18**(2): p. 132-44.
465. Reme, C.E., et al., *Light damage in the rat retina: effect of a radioprotective agent (WR-77913) on acute rod outer segment disk disruptions*. Photochemistry and Photobiology, 1991. **54**(1): p. 137-42.
466. Teeuwen, R.L., et al., *"Clickable" elastins: elastin-like polypeptides functionalized with azide or alkyne groups*. Chemical Communications, 2009(27): p. 4022-4.
467. Yang, Y., et al., *A convenient preparation of xanthene dyes*. The Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(17): p. 6907-12.
468. Pinter, A. and M. Klussmann, *Sulfonic Acid-Catalyzed Autoxidative Carbon-Carbon Coupling Reaction under Elevated Partial Pressure of Oxygen*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2012. **354**(4): p. 701-711.
469. Chen, C. and S.H. Hong, *Selective catalytic sp<sup>3</sup> C-O bond cleavage with C-N bond formation in 3-alkoxy-1-propanols*. Organic Letters, 2012. **14**(12): p. 2992-5.

470. Ruiz, J., E. Lete, and N. Sotomayor, *Intramolecular cyclisation of functionalised heteroaryllithiums. Synthesis of novel indolizinone-based compounds*. Tetrahedron, 2006. **62**(26): p. 6182-6189.
471. Huang, C., et al., *Pd-catalyzed modifiable silanol-directed aromatic C-H oxygenation*. Chemistry, 2012. **18**(32): p. 9789-92.
472. Gruter, G.J.M., O.S. Akkerman, and F. Bickelhaupt, *Nuclear Versus Side-Chain Bromination of Methyl-Substituted Anisoles by N-Bromosuccinimide*. Journal of Organic Chemistry, 1994. **59**(16): p. 4473-4481.
473. Sugiyama, T., et al., *PNA monomers fully compatible with standard Fmoc-based solid-phase synthesis of pseudocomplementary PNA*. Bioorganic & Medical Chemistry Letters, 2017. **27**(15): p. 3337-3341.
474. Staples, M.K., et al., *Tandem free-radical addition/substitution chemistry and its application to the preparation of novel AT(1) receptor antagonists*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2011. **9**(2): p. 473-479.
475. Porres, L., et al., *Absolute measurements of photoluminescence quantum yields of solutions using an integrating sphere*. Journal of Fluorescence, 2006. **16**(2): p. 267-72.
476. Jones, G., et al., *Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism*. The Journal of Physical Chemistry, 1985. **89**(2): p. 294-300.
477. Uetake, Y., T. Niwa, and M. Nakada, *Synthesis of cycloalkanone-fused cyclopropanes by Au(I)-catalyzed oxidative ene-yne cyclizations*. Tetrahedron Letters, 2014. **55**(50): p. 6847-6850.
478. Hohne, A., et al., *Organofluorosilanes as model compounds for <sup>18</sup>F-labeled silicon-based PET tracers and their hydrolytic stability: experimental data and theoretical calculations (PET = positron emission tomography)*. Chemistry, 2009. **15**(15): p. 3736-43.
479. Brouwer, A.M., *Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2011. **83**(12): p. 2213-2228.

# **GENERAL CONCLUSIONS**



## GENERAL CONCLUSIONS

- In the first part of the thesis, part A, twenty-three Granadaene analogues have been synthesized and characterized. Moreover, their hemolytic activity has also been tested in blood-agar plates. After analyzing the obtained results, it has been determined that the hemolytic activity is strongly influenced by both the length of the polyene chain and the nature of the terminal groups. So that, it was suggested that the longer the chain and the more stable the insertion in the lipid membrane of the cells were, according to the nature of the groups at the ends, greater would be the hemolytic activity.

- One of these analogues was selected as the best candidate for its use as a possible vaccine against GBS infection like a therapeutic alternative. This compound has been tested in mice and it has shown signs of being effective against GBS. These results, although preliminary, are promising and susceptible of being patentable.

- Along part B, fourteen fluorescent probes and sensors have been synthesized, characterized and tested in different applications, such as their use as fluorescent mitochondrial or lysosomal markers, pH sensors or dual sensors for the simultaneous detection of biothiols and phosphate ions. It has been proved how just simple modifications of the structure and functional groups in common dyes (acridone and xanthene based skeletons) allow the synthesis of different compounds that can be used for multiple applications.

- Each of these probes and sensors may be used as tools to provide more insights into cellular and physiological processes involved in different diseases. Moreover, some of the results in this Thesis open up a pathway for future biomedical applications such as drug carriers to different cell areas.



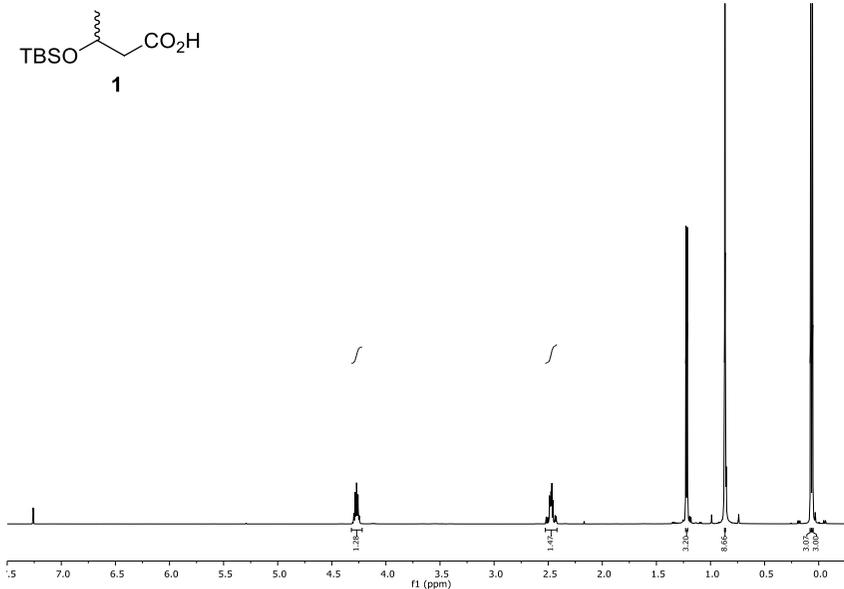
**ANEXOS**

# ANEXOS

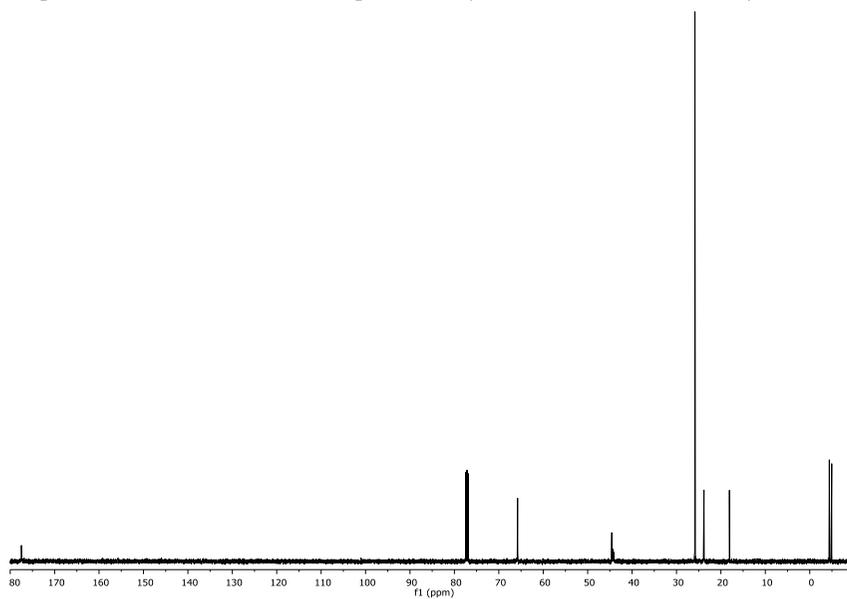
## ANEXO CAPÍTULO I.

### Caracterización química

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **1** (500 MHz, Cloroformo-*d*)

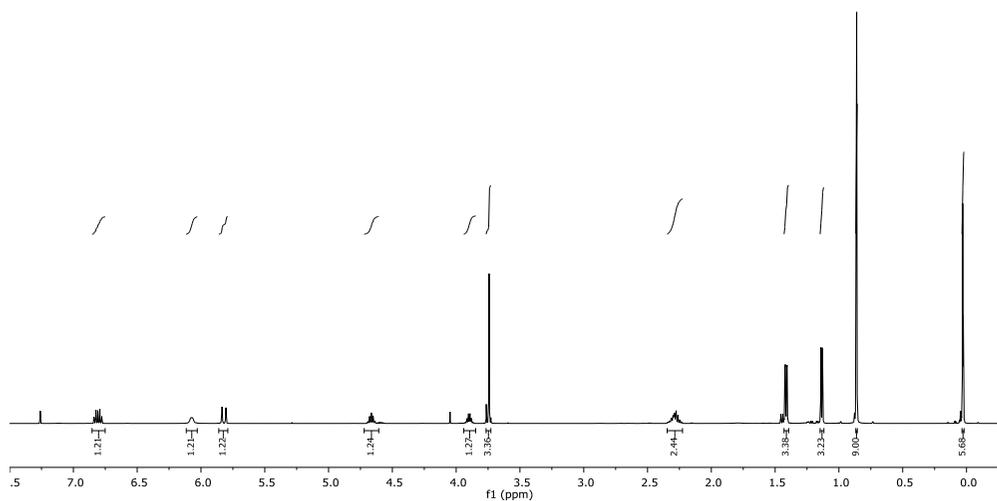
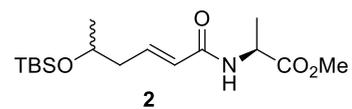


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **1** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

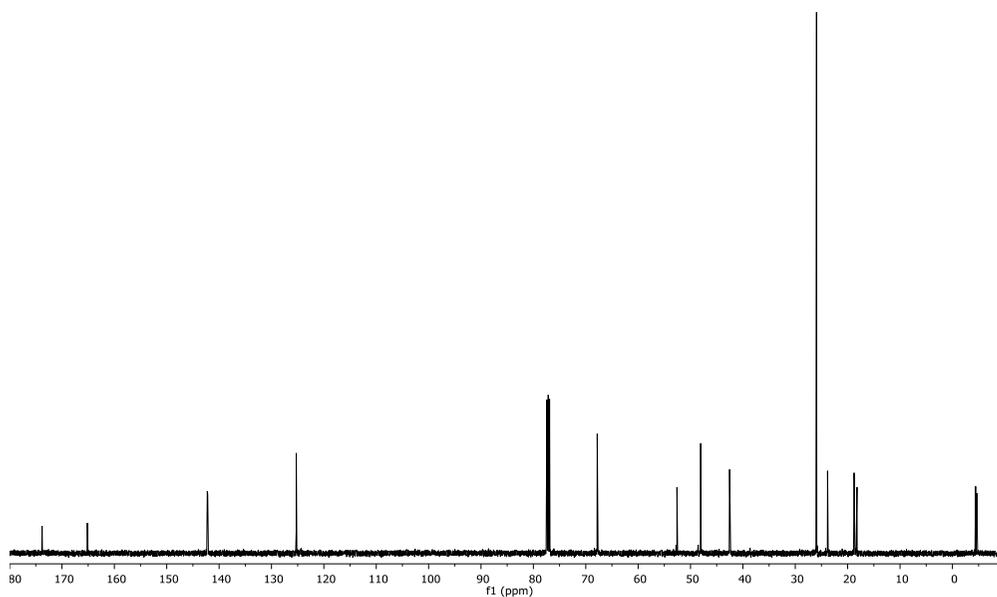


Síntesis y aplicaciones *in vivo* e *in vitro*  
de nuevos colorantes orgánicos

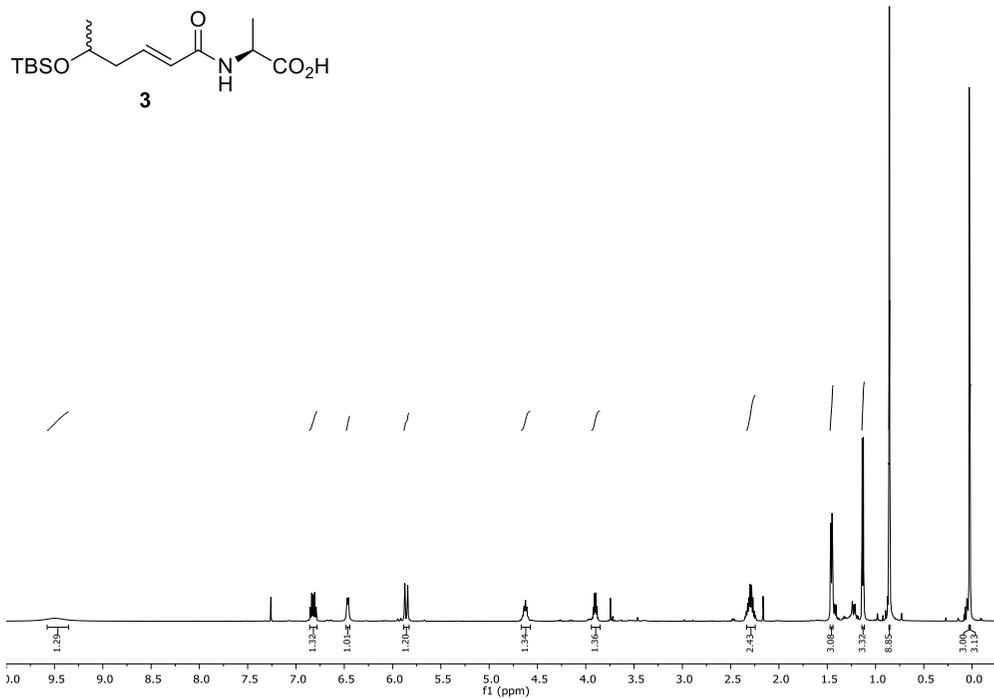
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **2** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



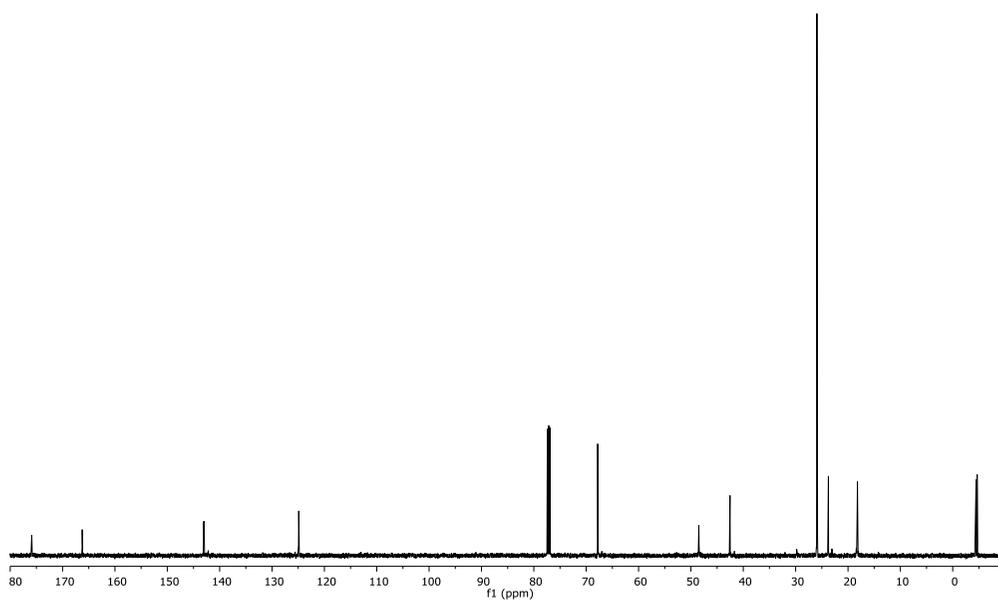
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **2** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **3** (500 MHz, Cloroformo-*d*)

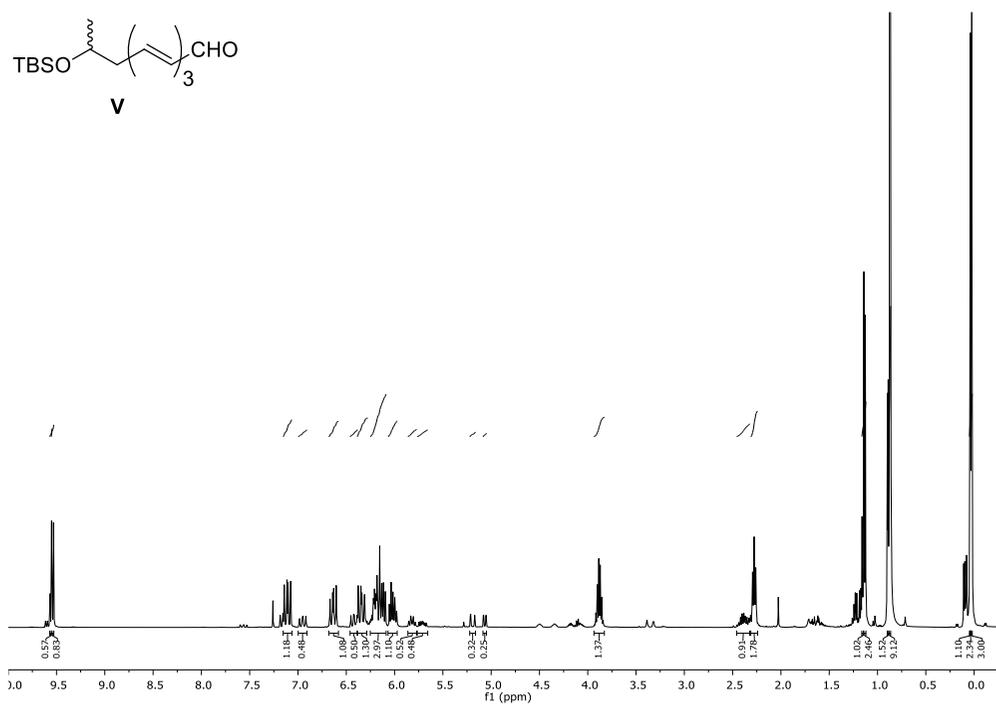
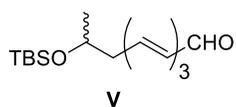


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **3** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

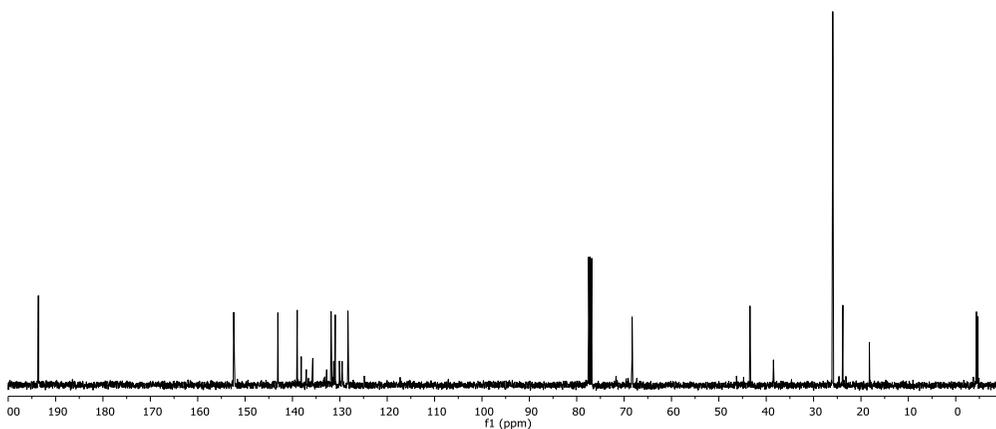




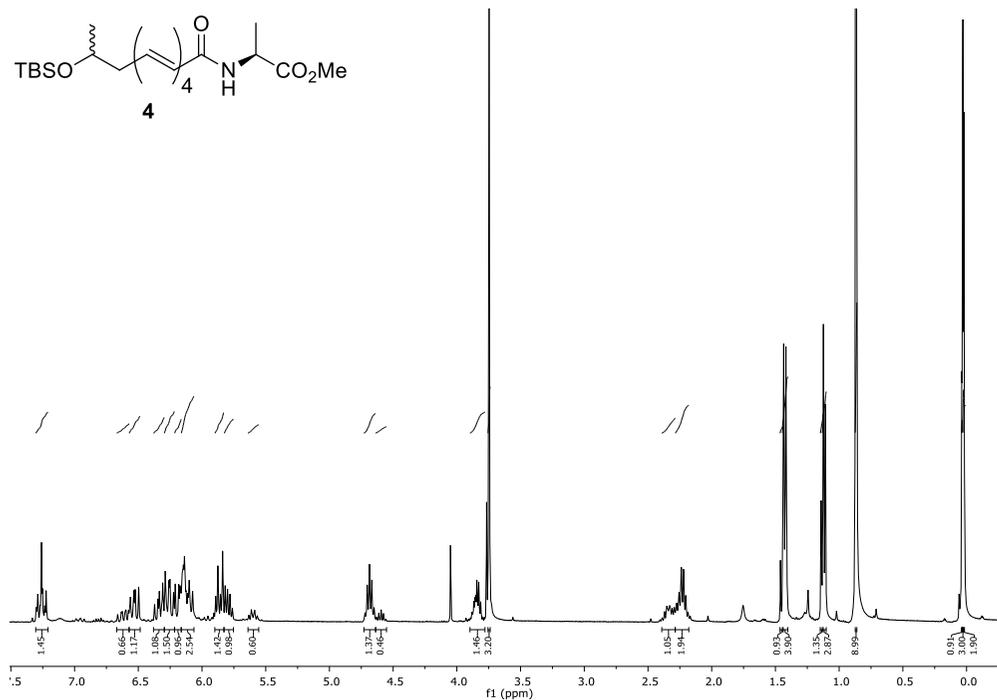
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **V** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



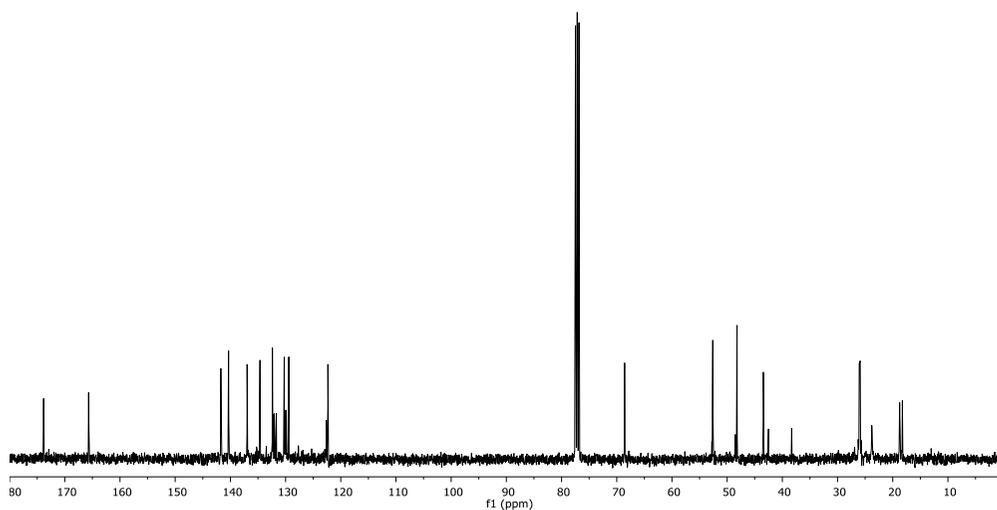
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **V** (101 MHz, Cloroformo-*d*)

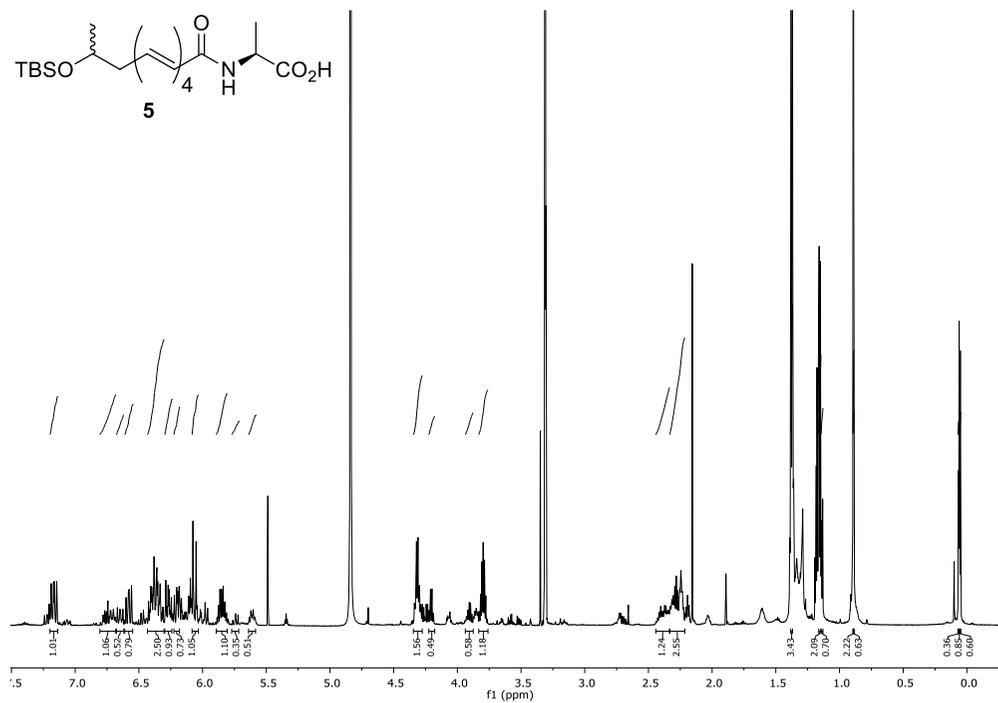
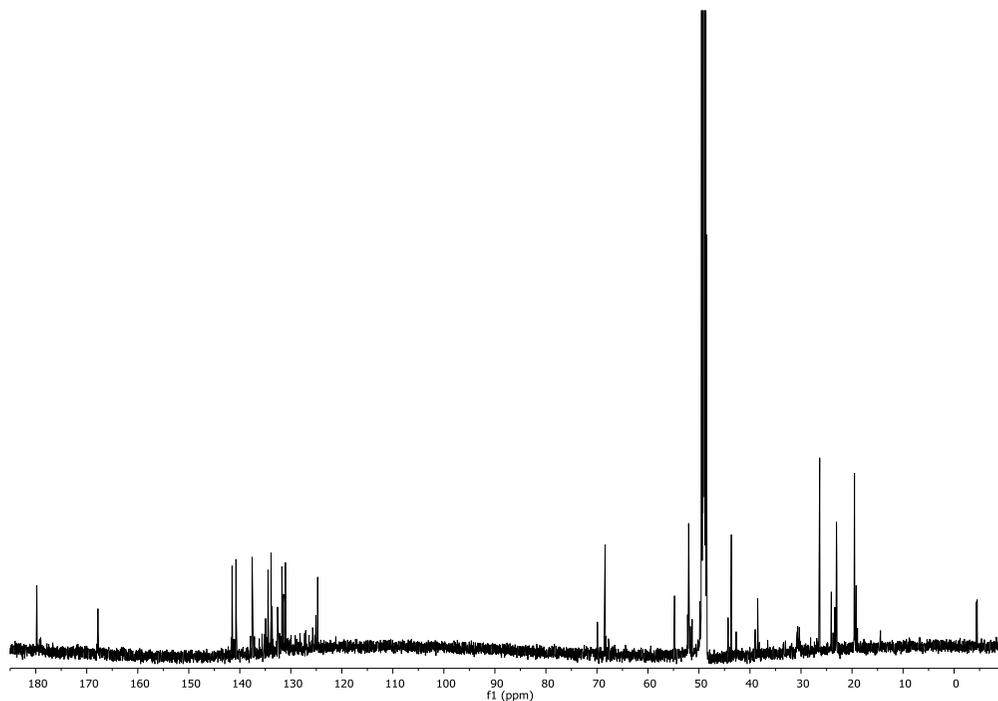


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **4** (600 MHz, Cloroformo-*d*)

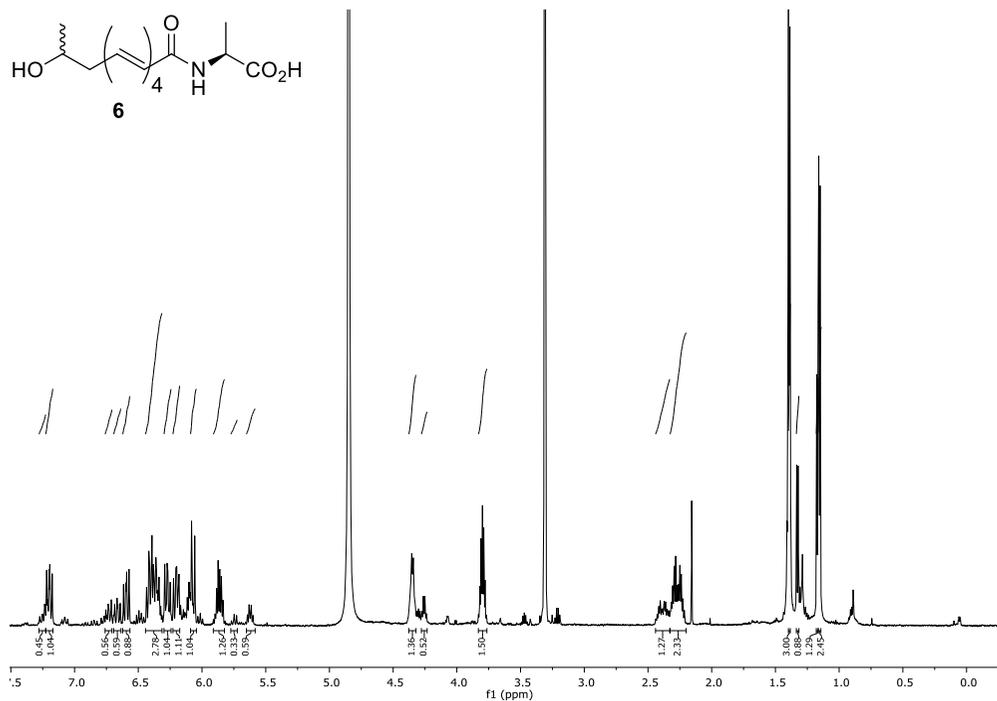


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **4** (151 MHz, Cloroformo-*d*)

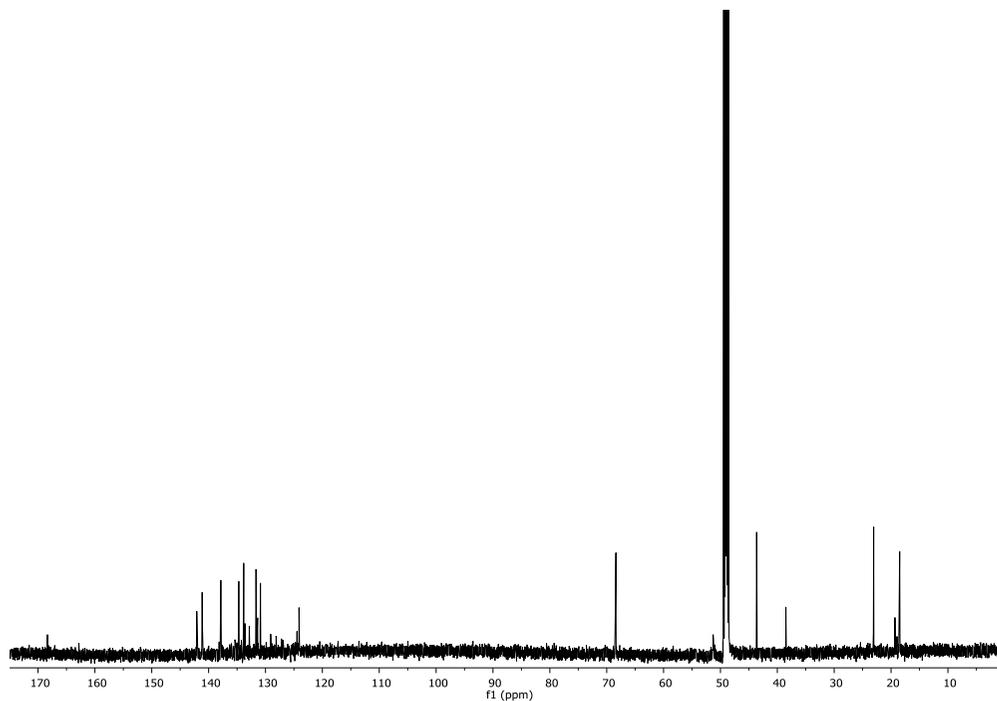


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **5** (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **5** (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

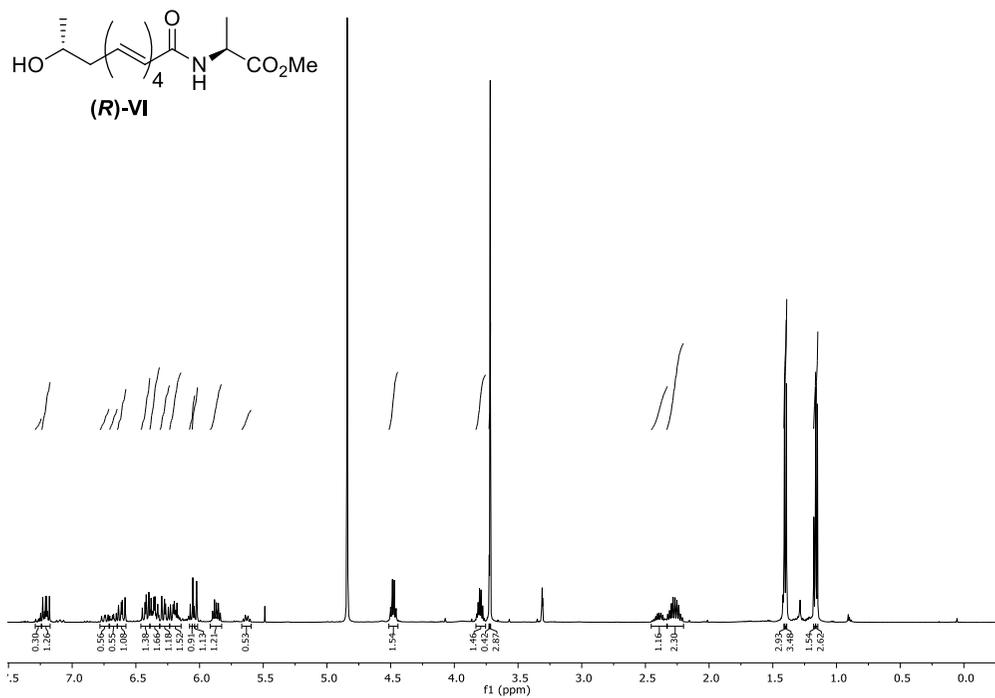
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **6** (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



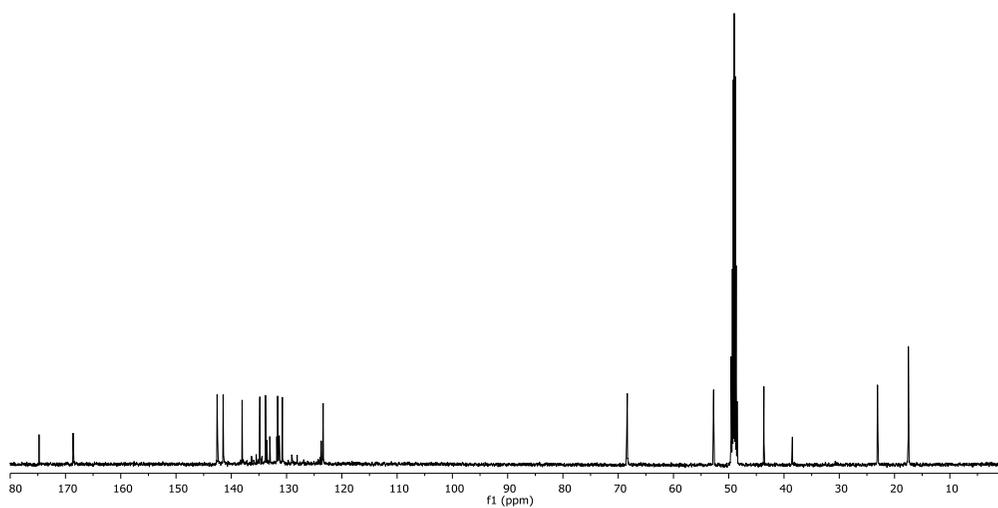
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **6** (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor (**R**)-**VI** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

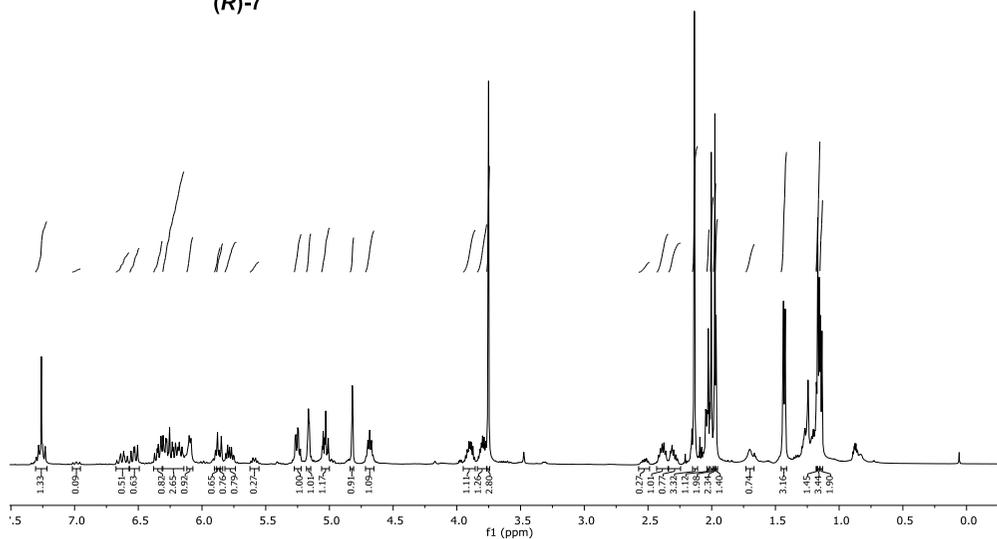
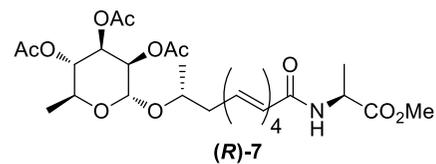


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor (**R**)-**VI** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

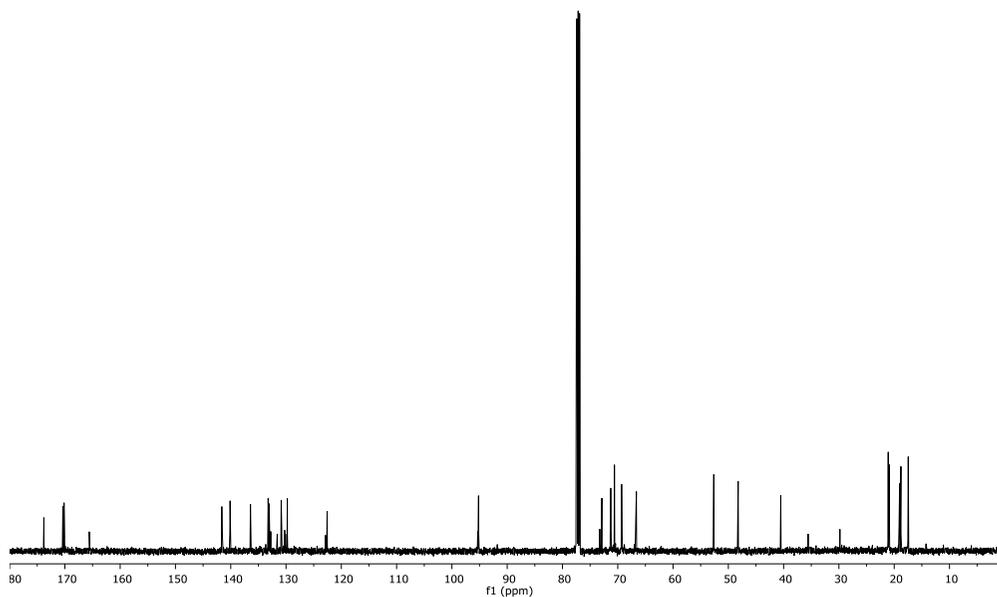


Síntesis y aplicaciones *in vivo* e *in vitro*  
de nuevos colorantes orgánicos

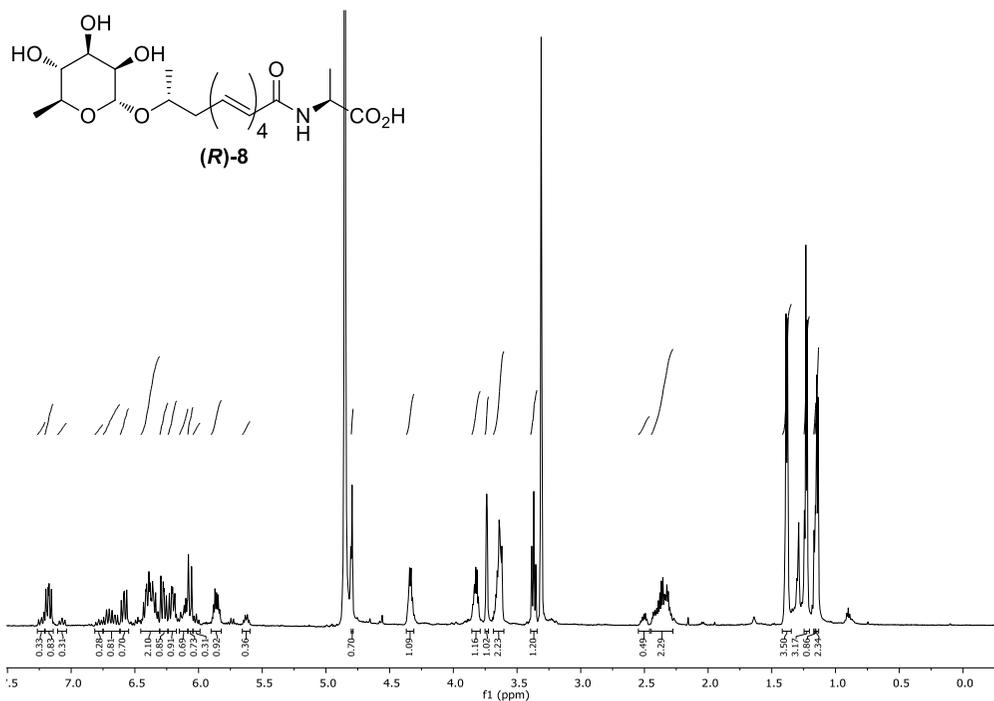
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **(R)-7** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



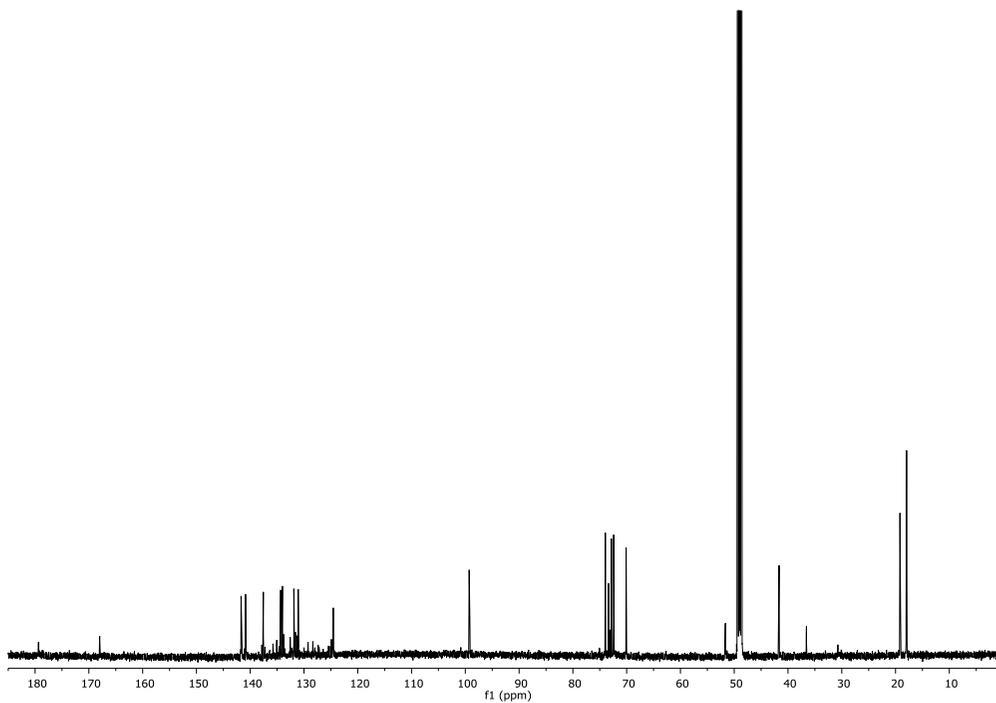
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **(R)-7** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



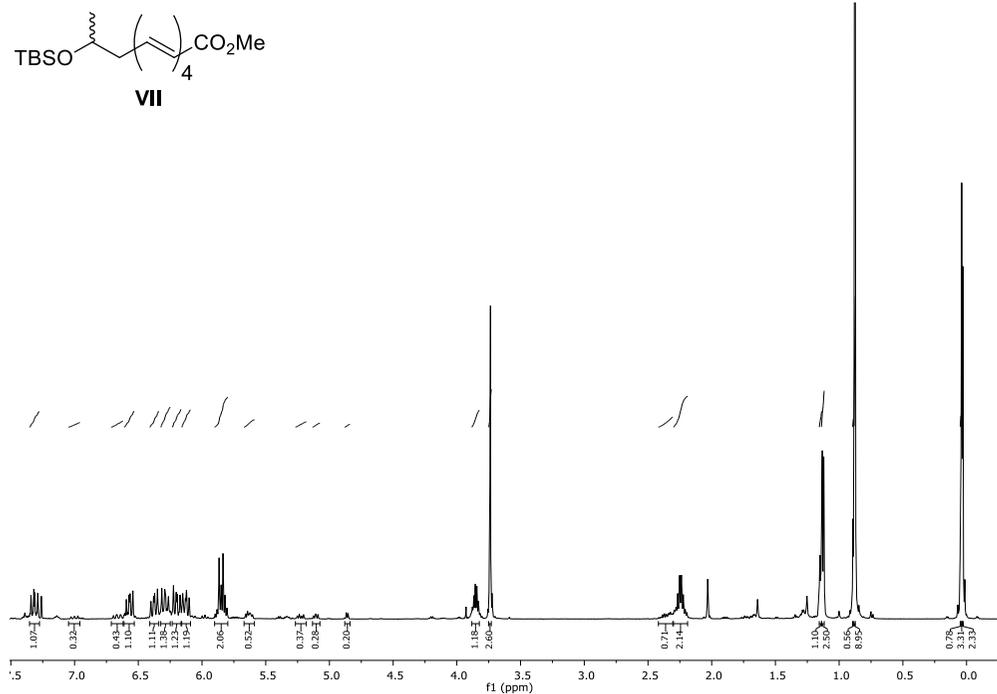
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **(R)-8** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



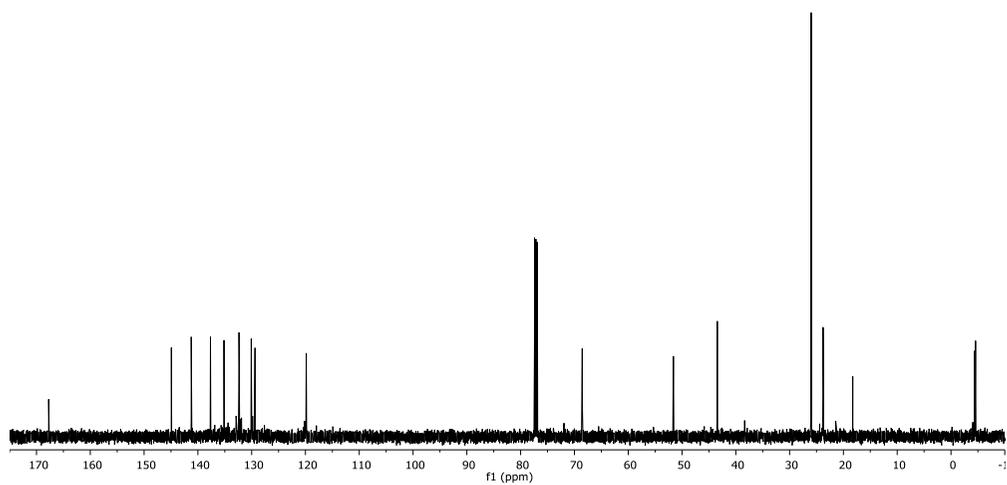
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **(R)-8** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



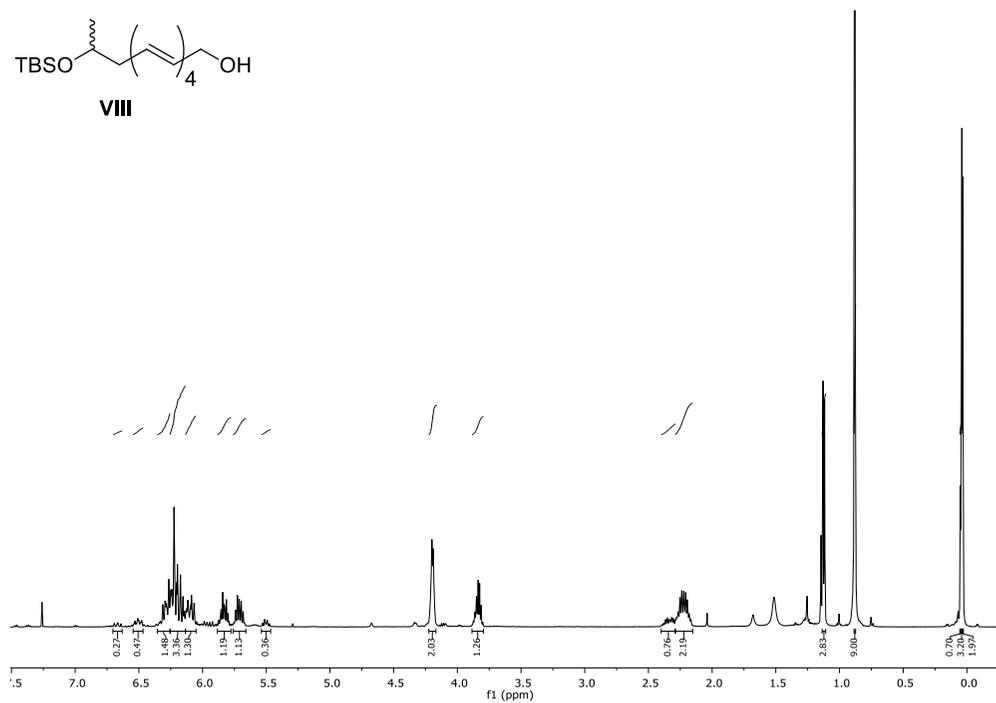
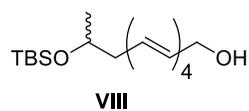
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **VII** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



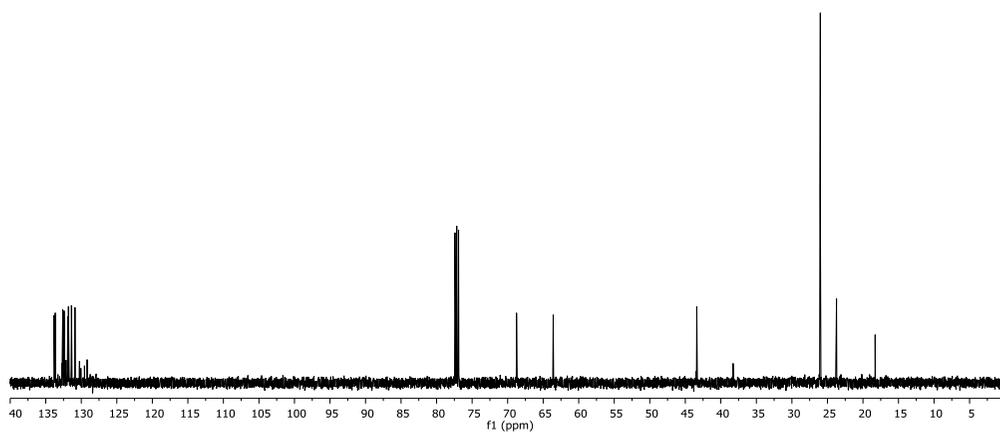
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **VII** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **VIII** (500 MHz, Cloroformo-*d*)

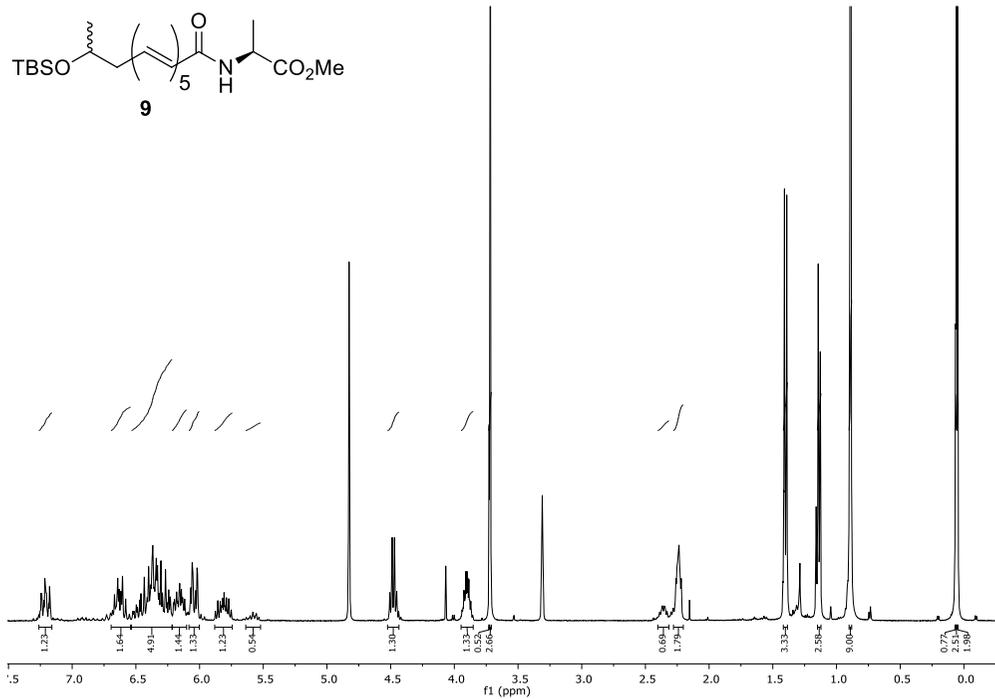


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **VIII** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

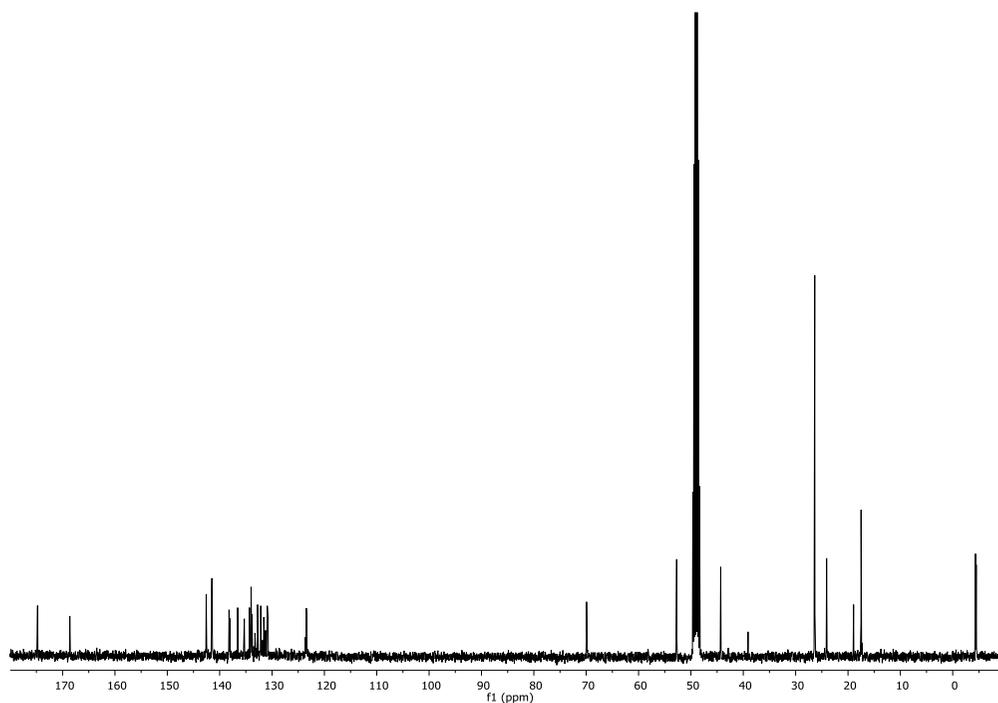




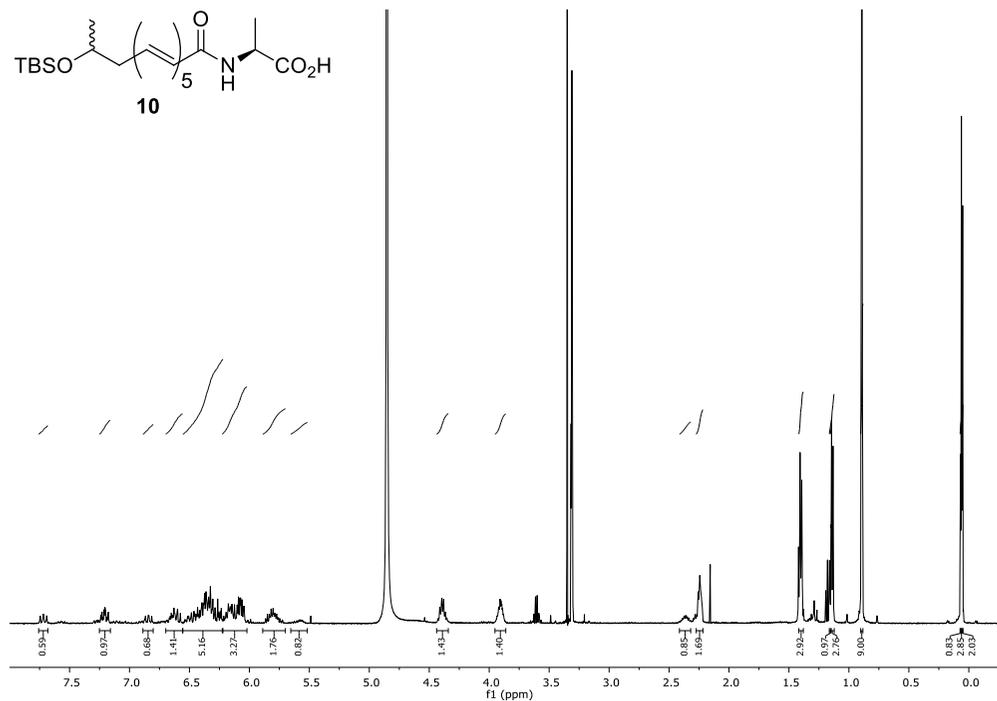
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **9** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



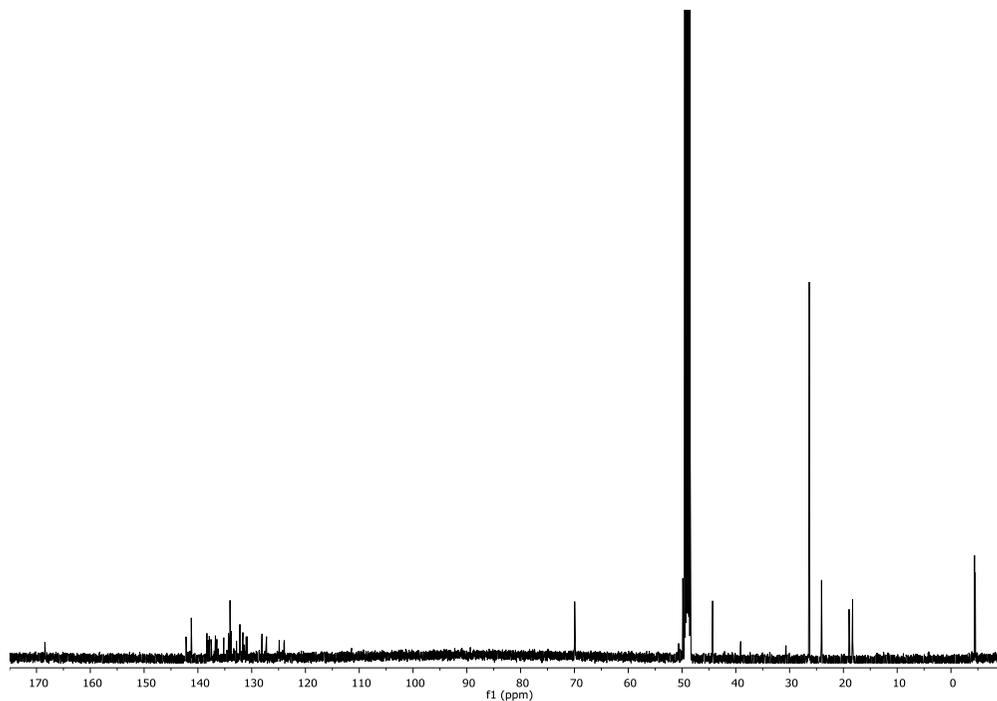
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **9** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



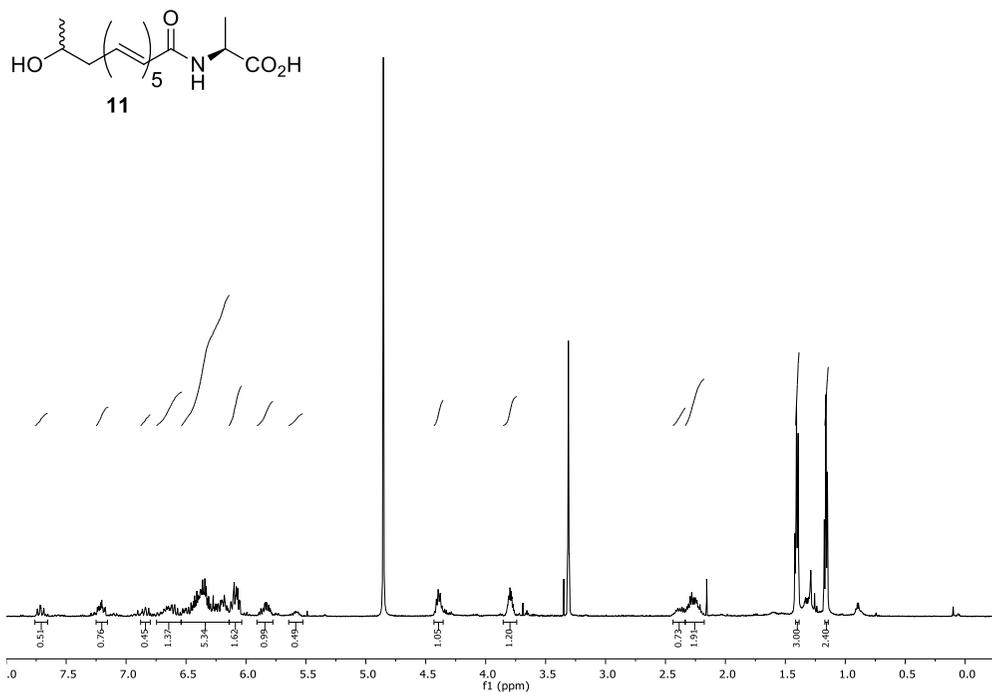
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **10** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



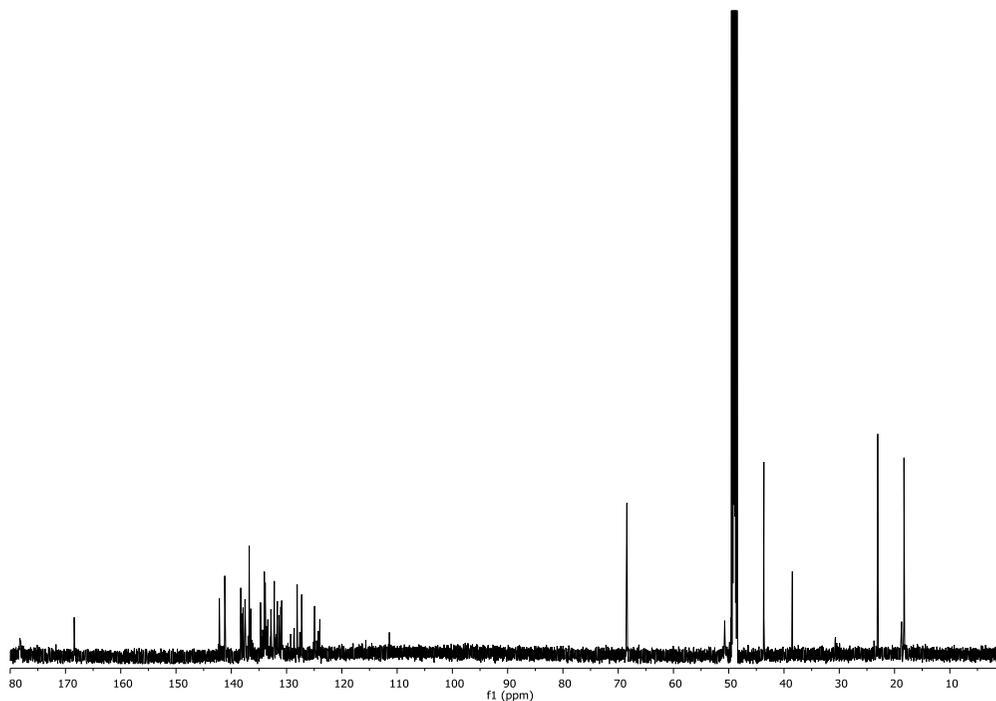
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **10** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



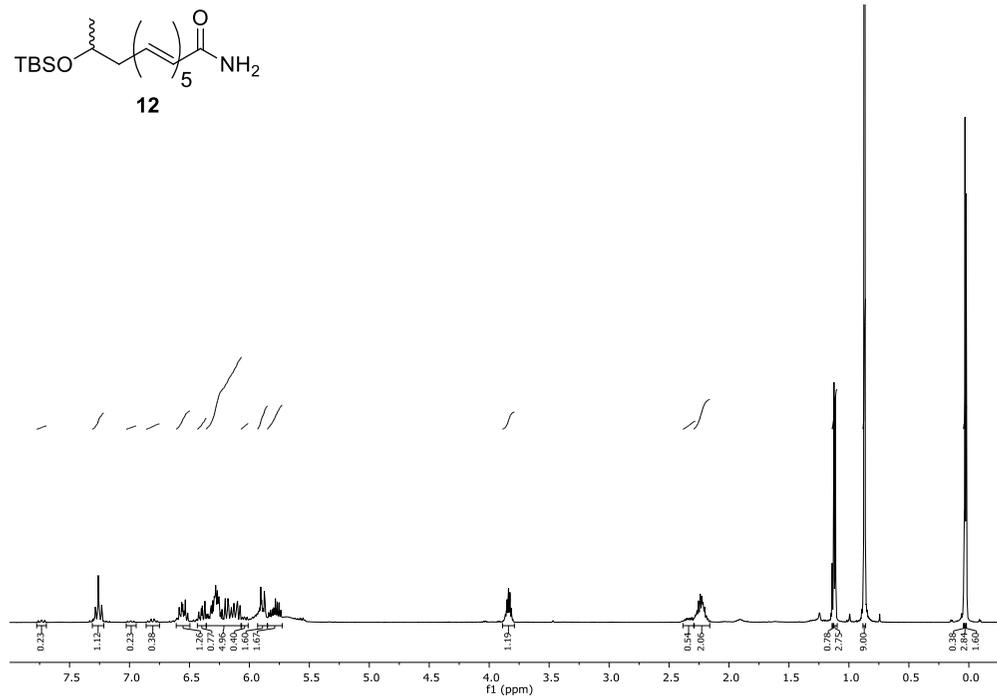
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **11** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



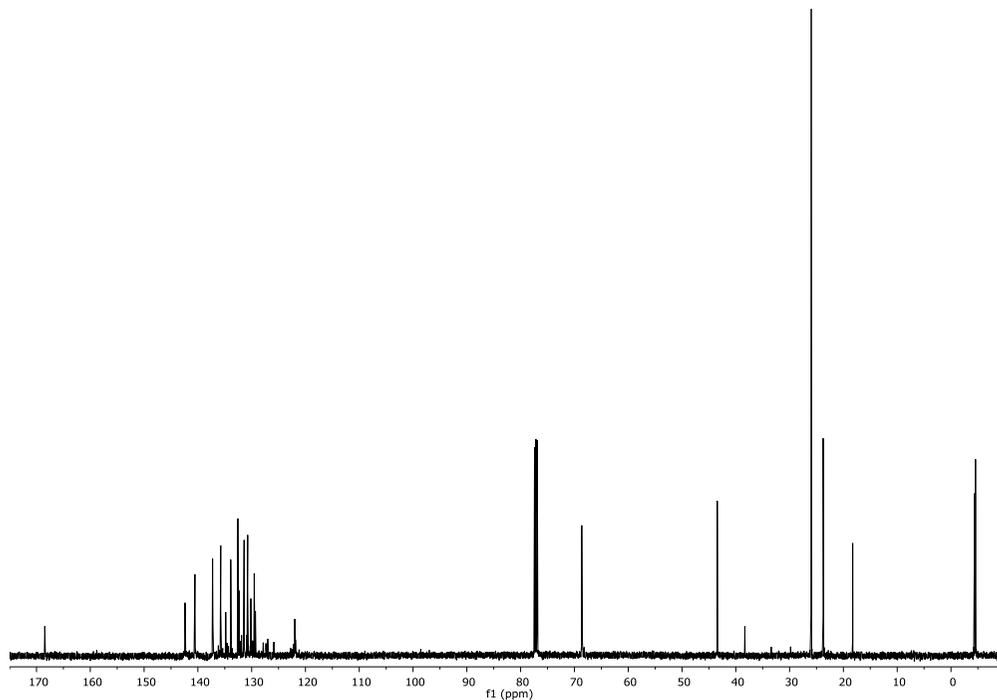
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **11** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



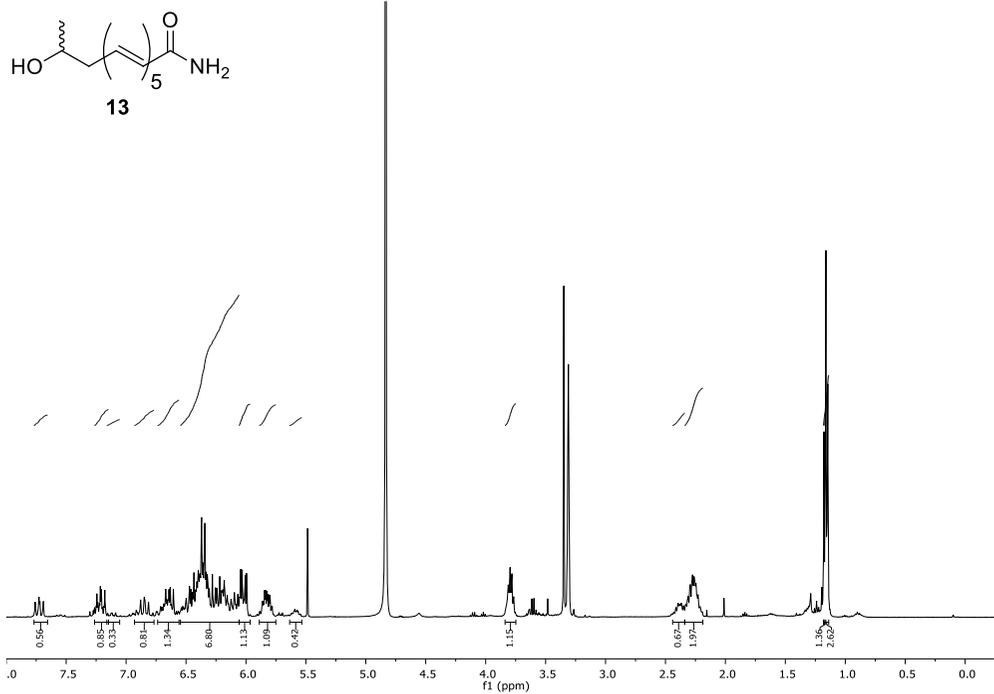
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **12** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



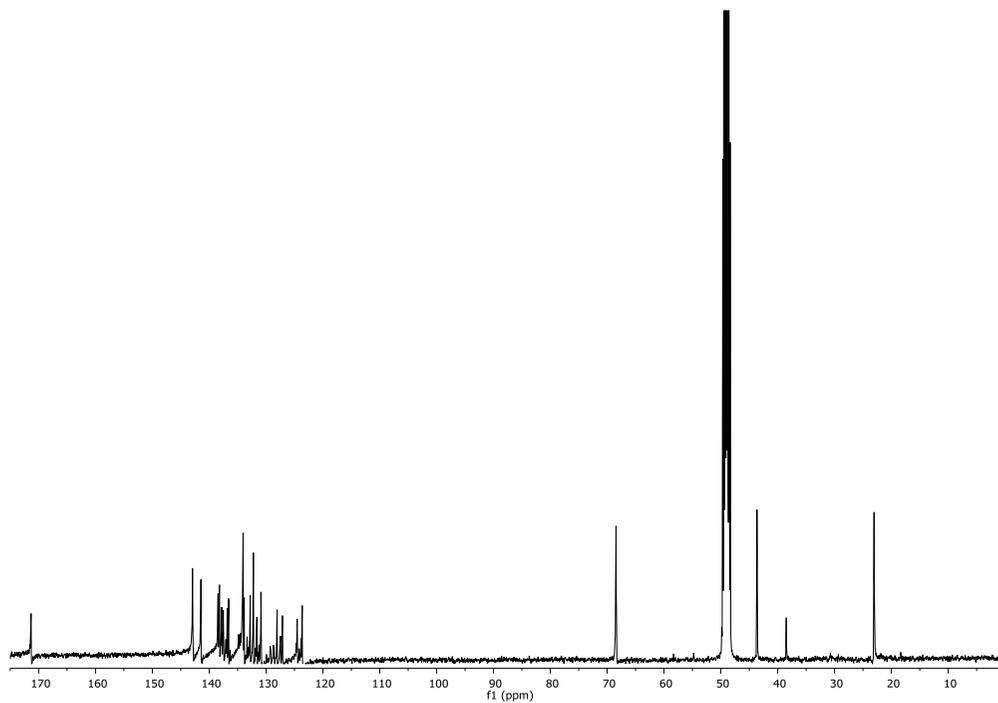
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **12** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **13** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **13** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

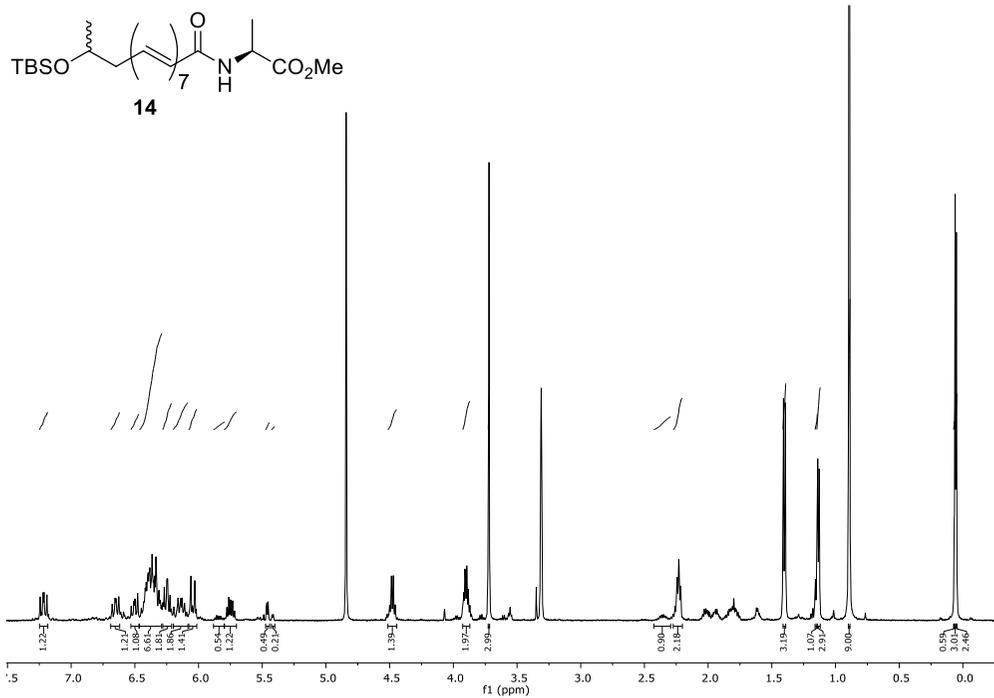




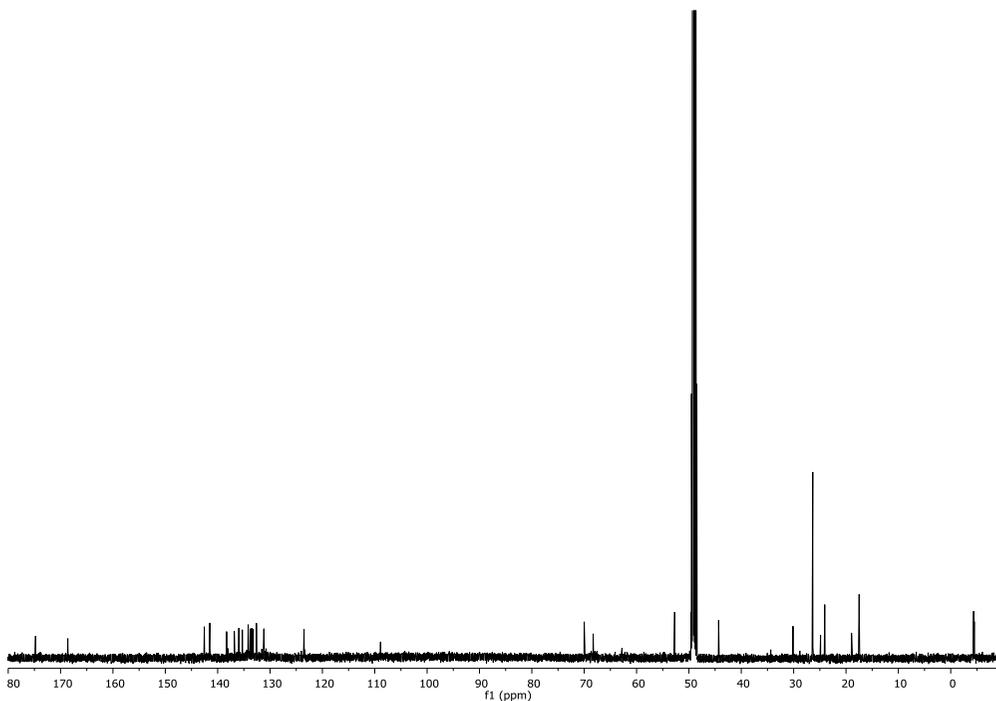




Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **14** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

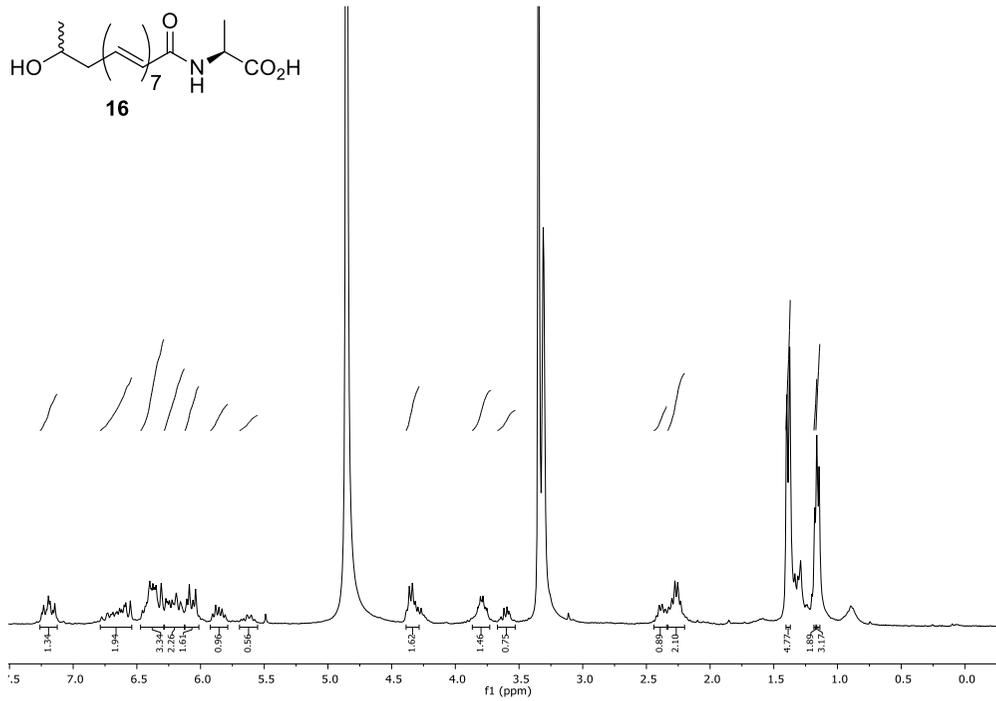


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **14** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

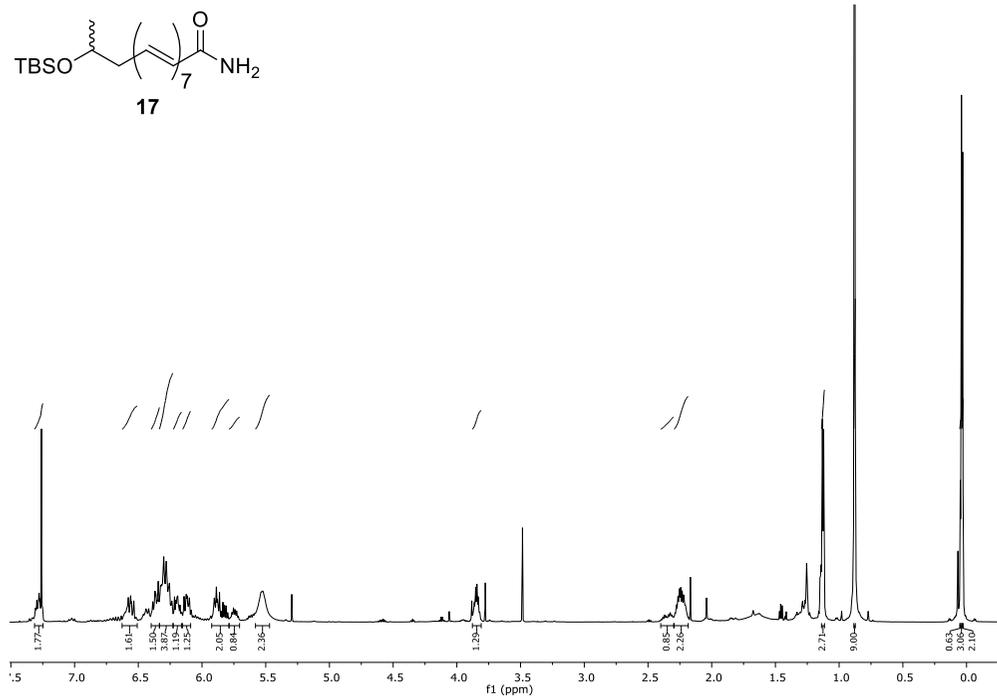




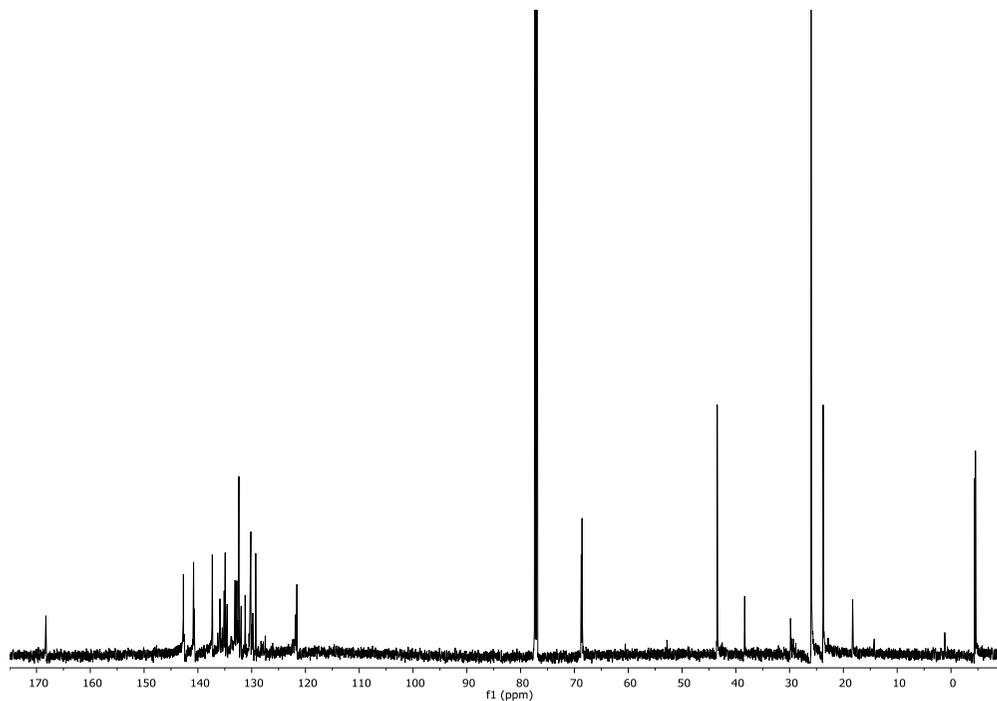
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **16** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



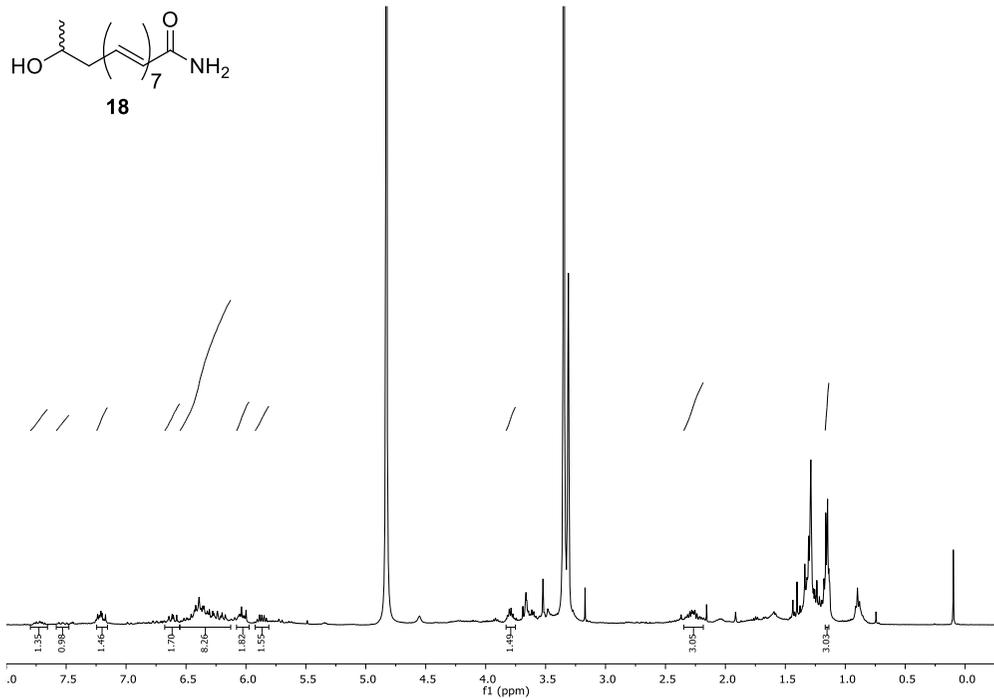
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **17** (600 MHz, Cloroformo-*d*)



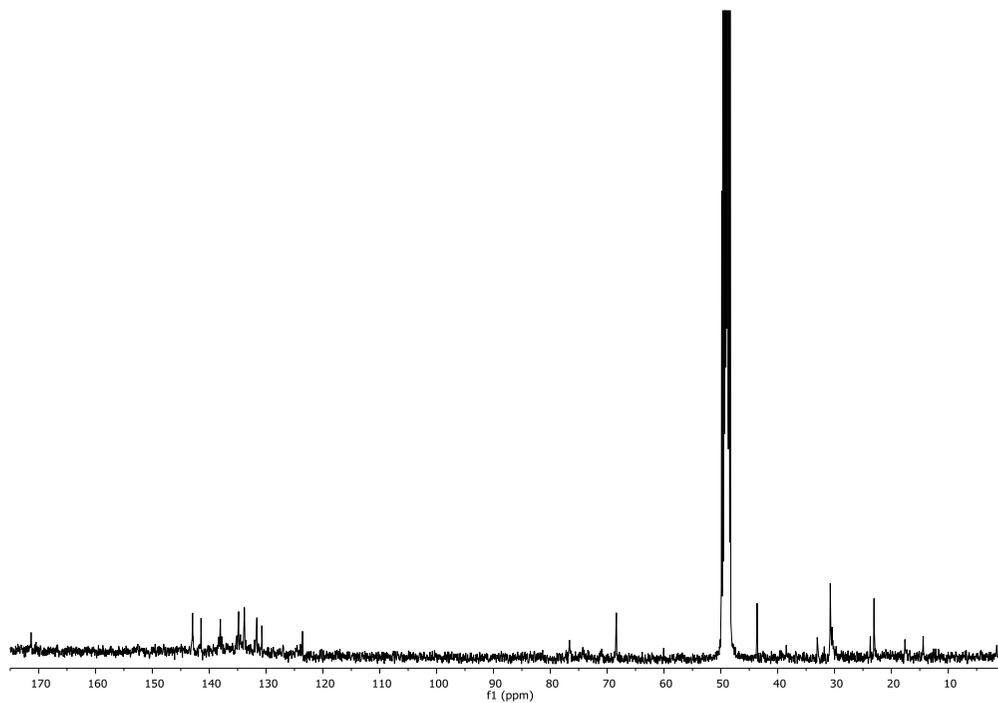
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **17** (151 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **18** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



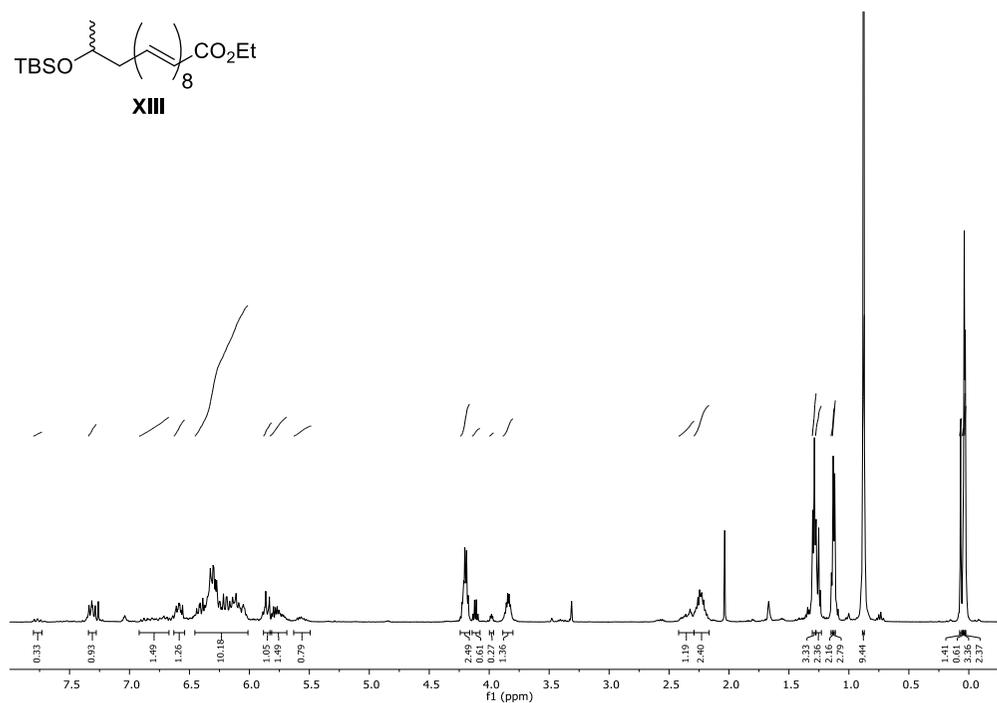
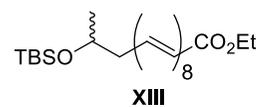
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **18** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



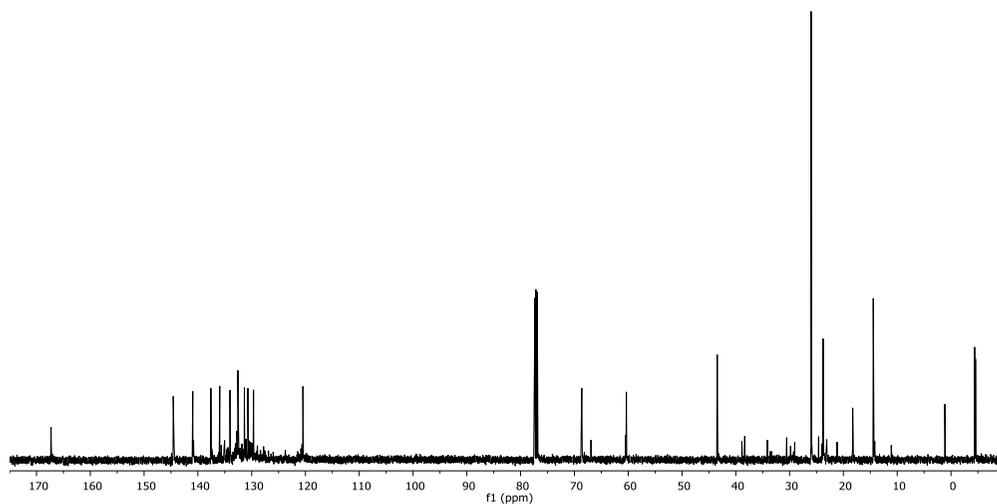




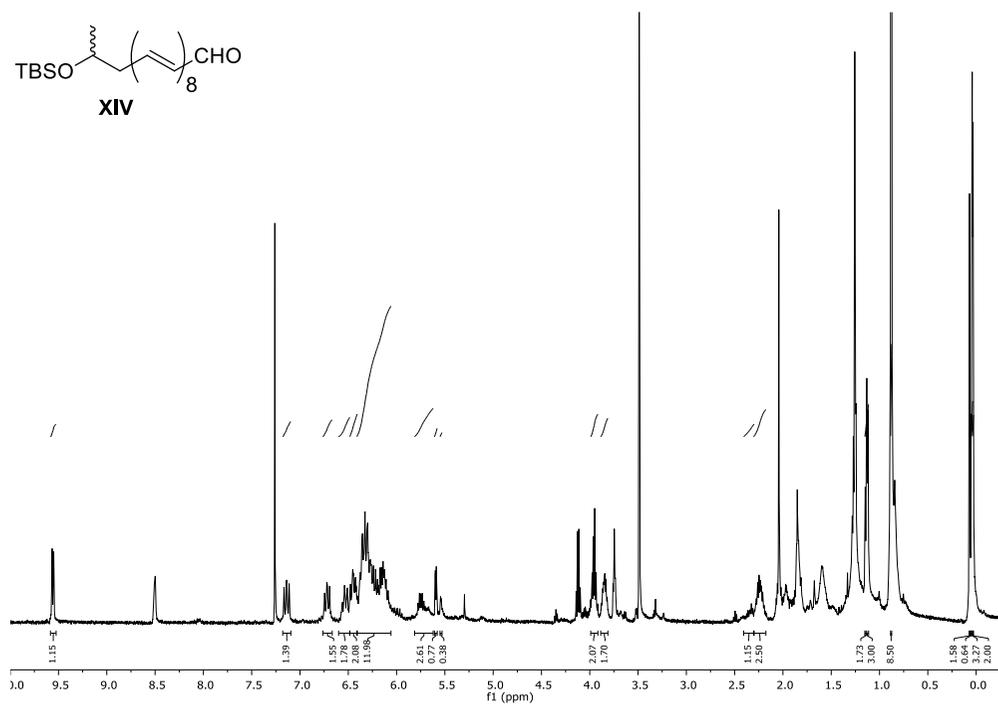
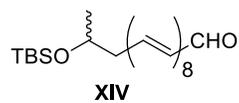
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XIII** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



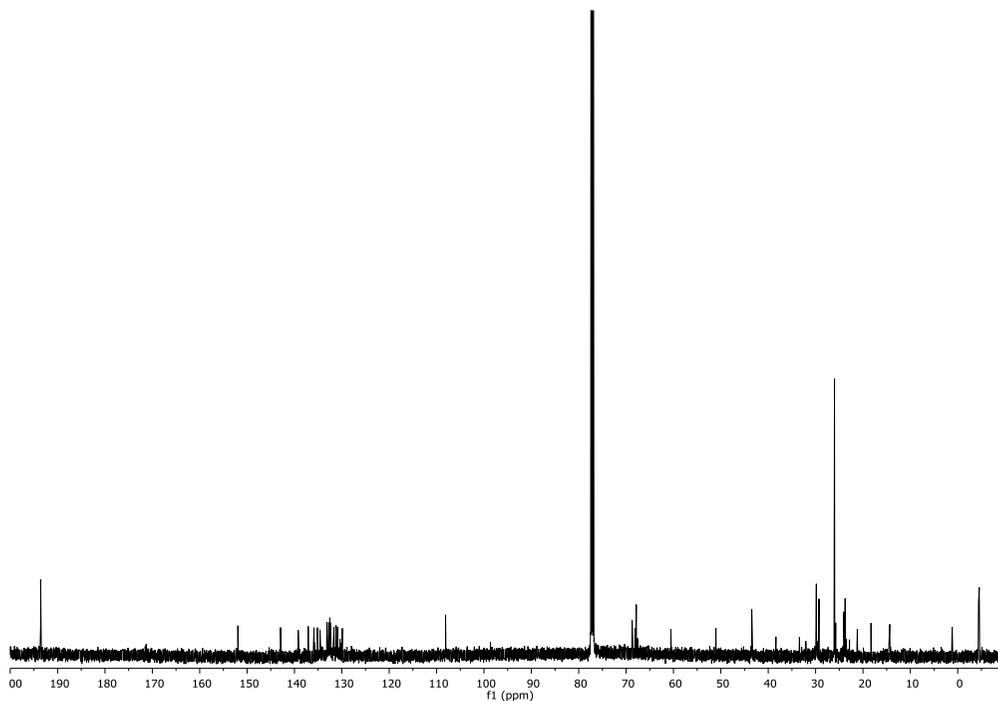
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XIII** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



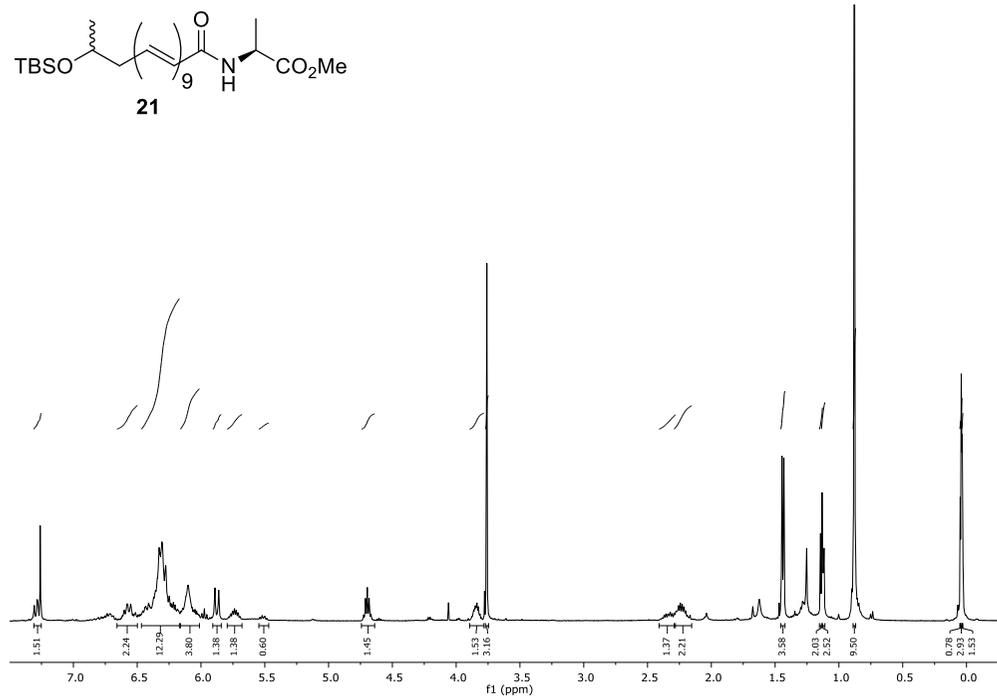
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XIV** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



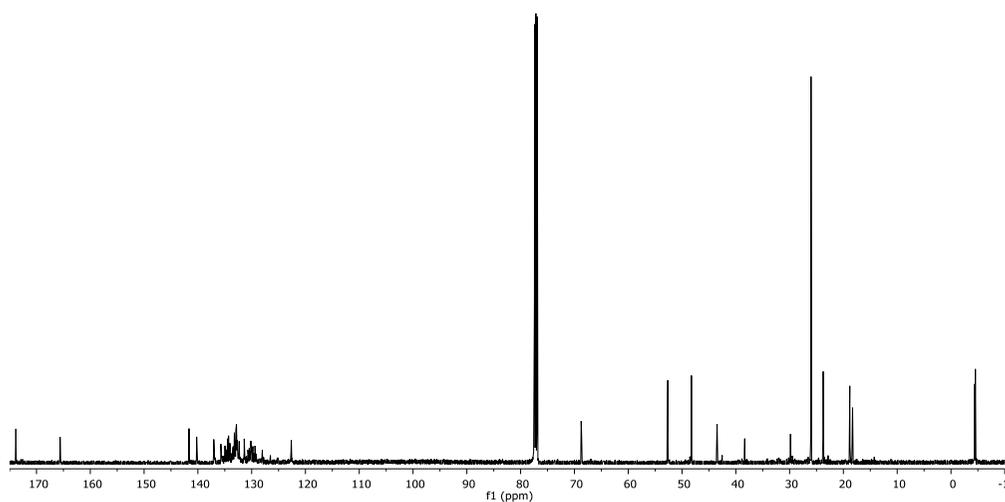
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XIV** (126 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **21** (500 MHz, Cloroformo-*d*)

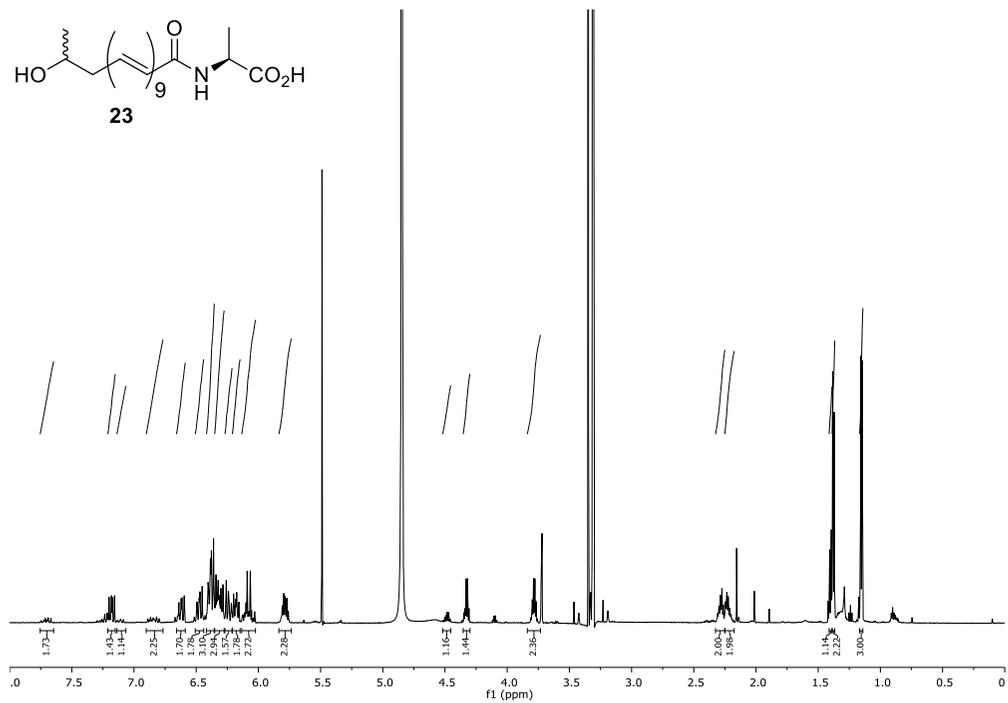


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **21** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

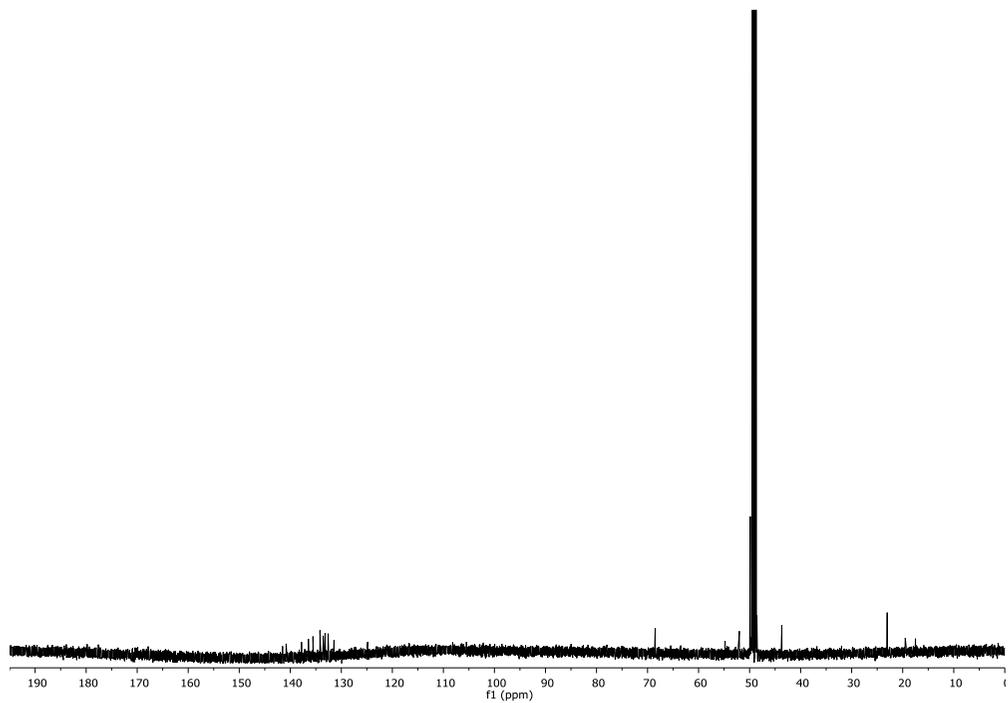




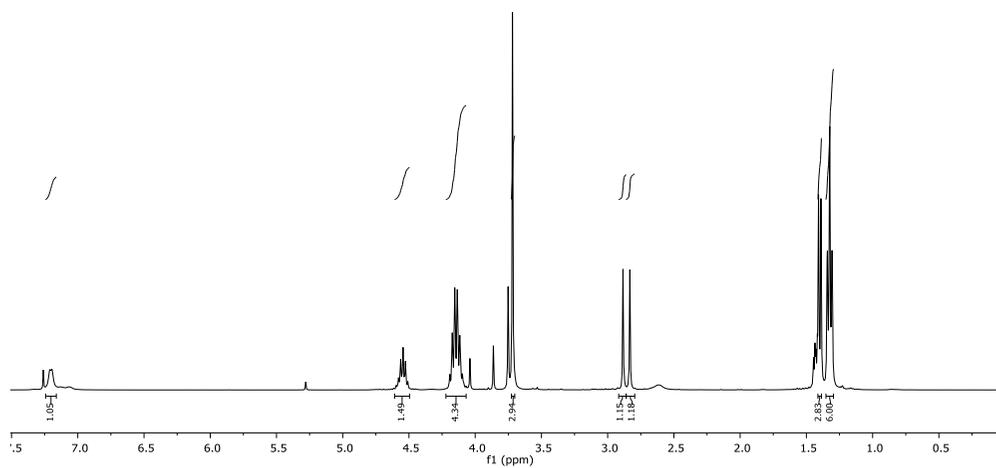
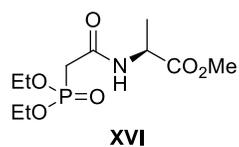
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **23** (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



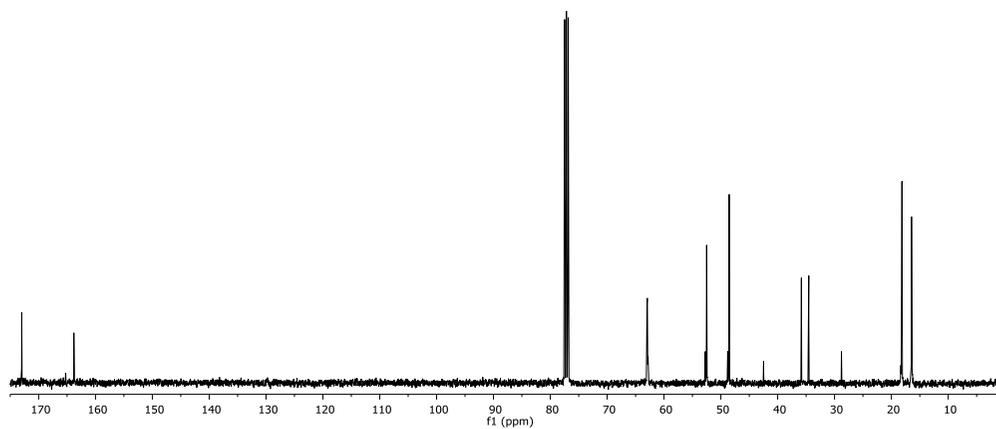
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **23** (156 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XVI** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XVI** (101 MHz, Cloroformo-*d*)



### **Estudios de actividad hemolítica**

**Tabla-anexo I.1.** Medida del diámetro del halo de hemólisis de las condiciones control.

<b>Controles</b>	<b>Diámetro del halo de hemólisis (cm)</b>
<b>Seco</b>	0.60
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	0.70
<b>H<sub>2</sub>O-<i>d</i></b>	0.70
<b>DTS</b>	0.80-0.85

**Tabla-anexo I.2.** Medida del diámetro del halo de hemólisis de los análogos del Granadaeno disueltos en DMSO-*d*<sub>6</sub>. En rojo aparece los productos considerados como hemolíticos.

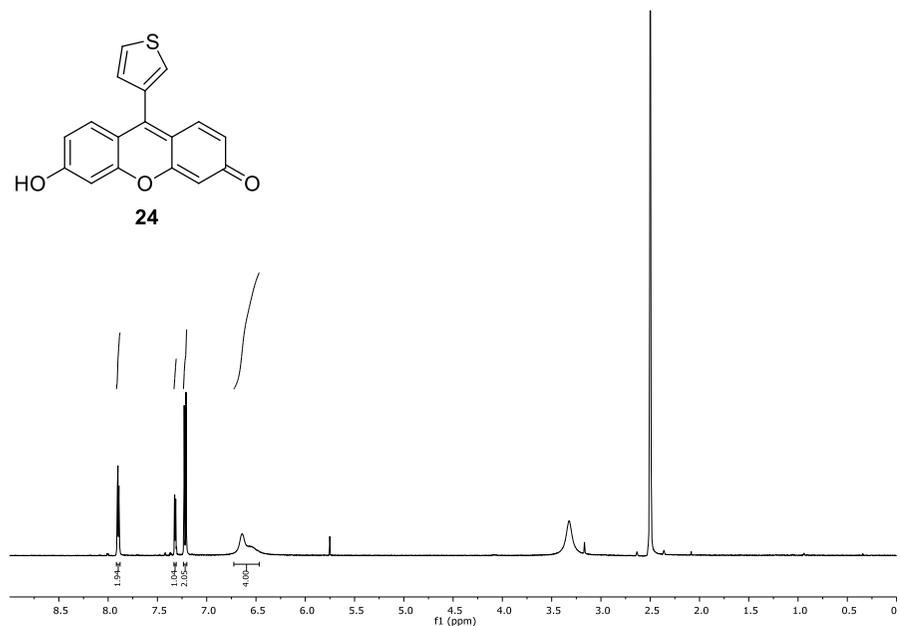
<b>Análogo</b>	<b>Diámetro del halo de hemólisis (cm)</b>	<b>Análogo</b>	<b>Diámetro del halo de hemólisis (cm)</b>
<b>1</b>	0.75	<b>13</b>	0.65
<b>2</b>	0.70	<b>14</b>	0.70
<b>3</b>	0.75	<b>15</b>	<b>1.20</b>
<b>4</b>	0.65	<b>16</b>	0.65
<b>5</b>	<b>1.20</b>	<b>17</b>	0.80
<b>6</b>	0.70	<b>18</b>	0.75
<b>(R)-7</b>	0.80	<b>19</b>	0.70
<b>(R)-8</b>	0.75	<b>20</b>	<b>1.0</b>
<b>9</b>	0.70	<b>21</b>	0.70
<b>10</b>	<b>1.20</b>	<b>22</b>	<b>0.95</b>
<b>11</b>	0.65	<b>23</b>	<b>0.75*</b>
<b>12</b>	0.80	-	-

\*El análogo **23** se consideró hemolítico, sin embargo, su grado de hemólisis en DMSO- $d_6$  se veía disminuido porque precipitaba en gran medida al probarlo en placa. Por ello el valor del diámetro calculado en este caso se corresponde con el de un análogo no hemolítico.

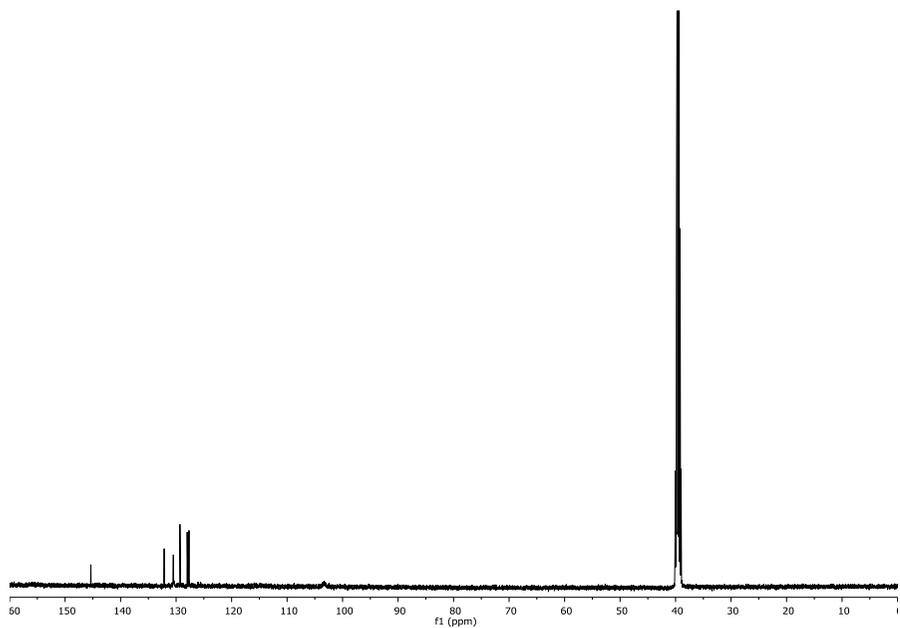
## ANEXO CAPÍTULO II.

### Caracterización química

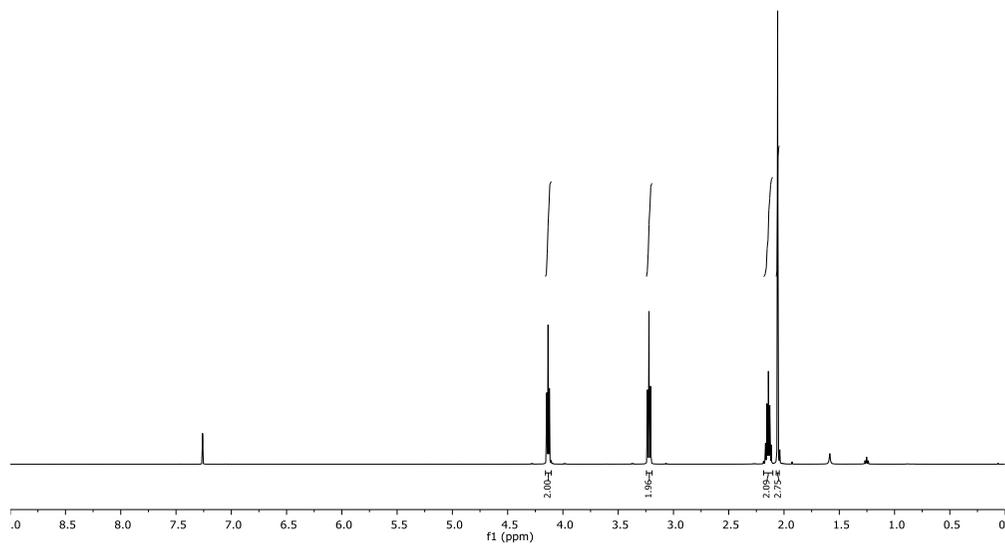
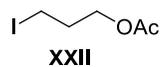
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del Compuesto **24** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



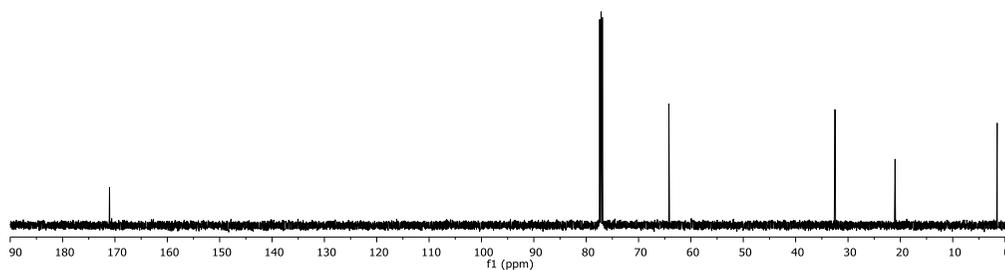
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **24** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



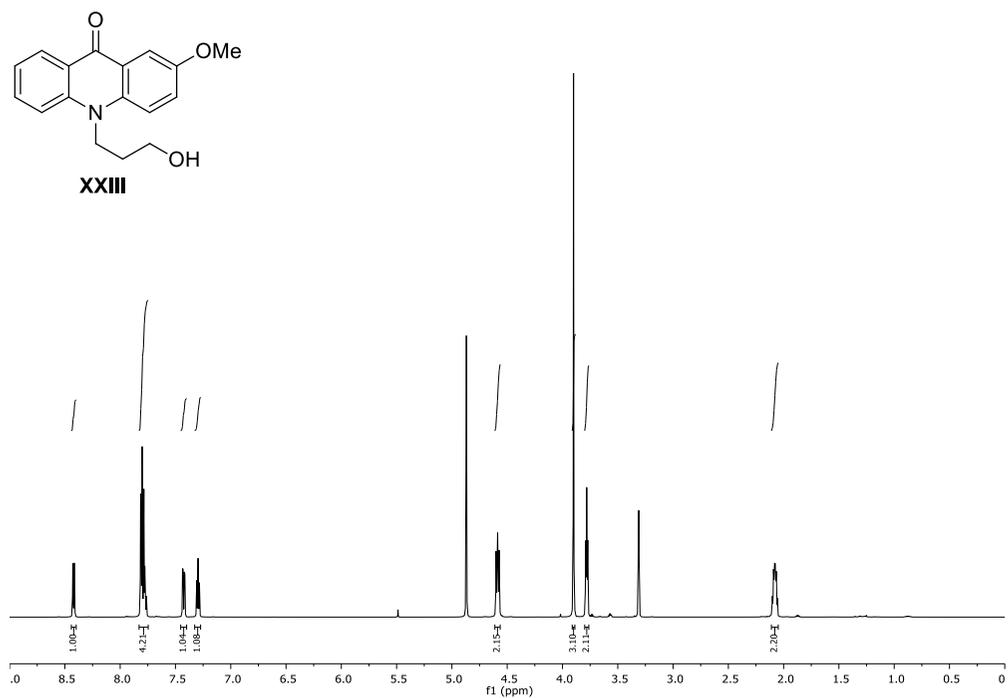
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXII** (500 MHz, Cloroformo-*d*)



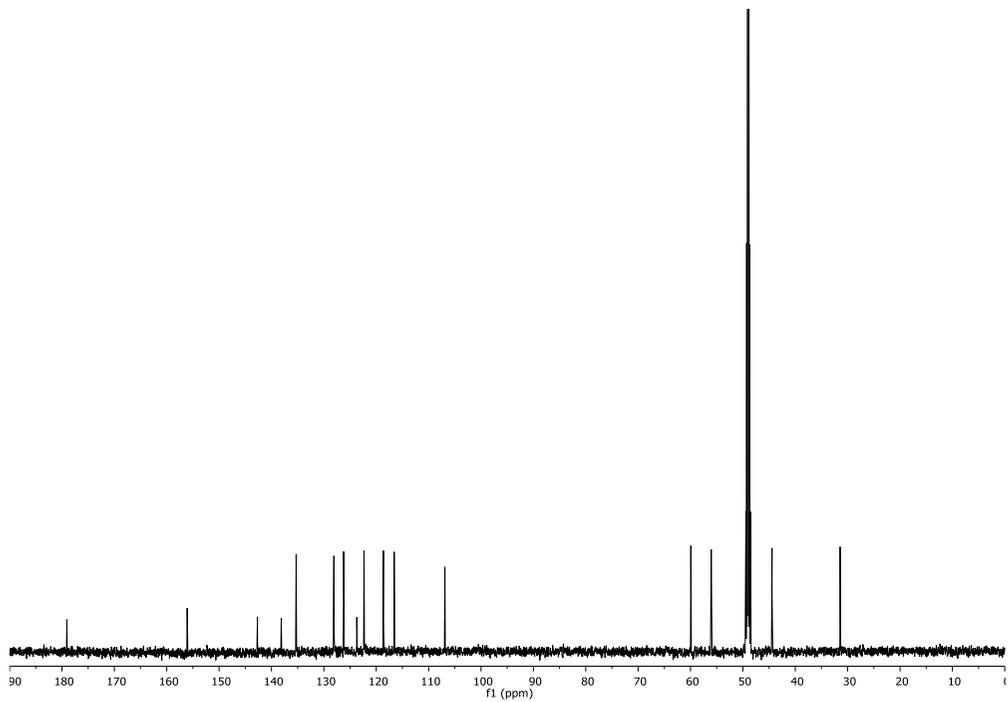
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXII** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

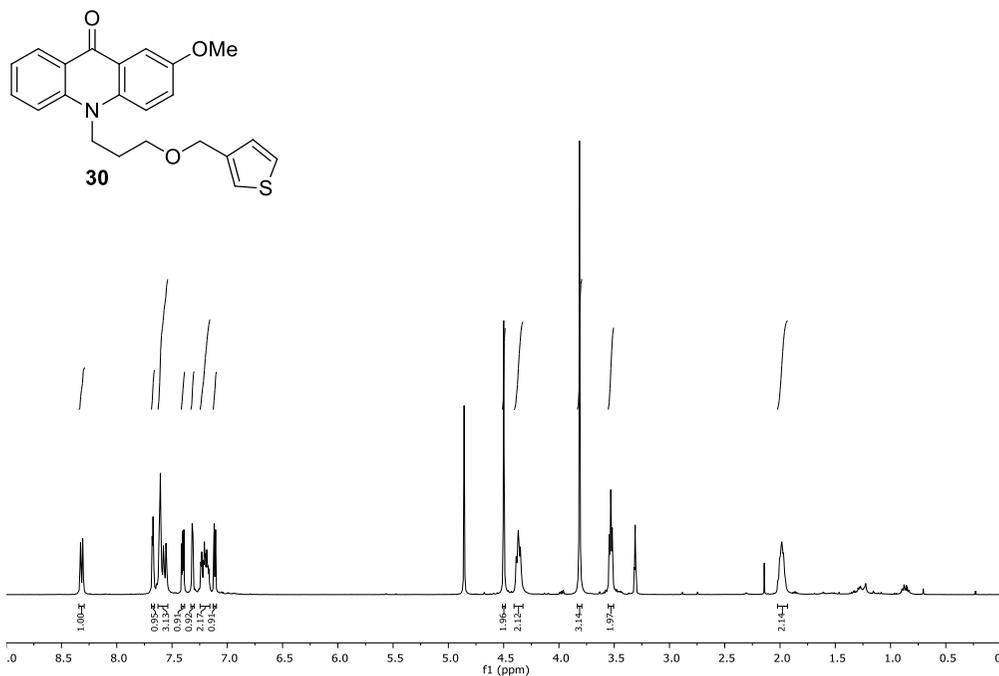
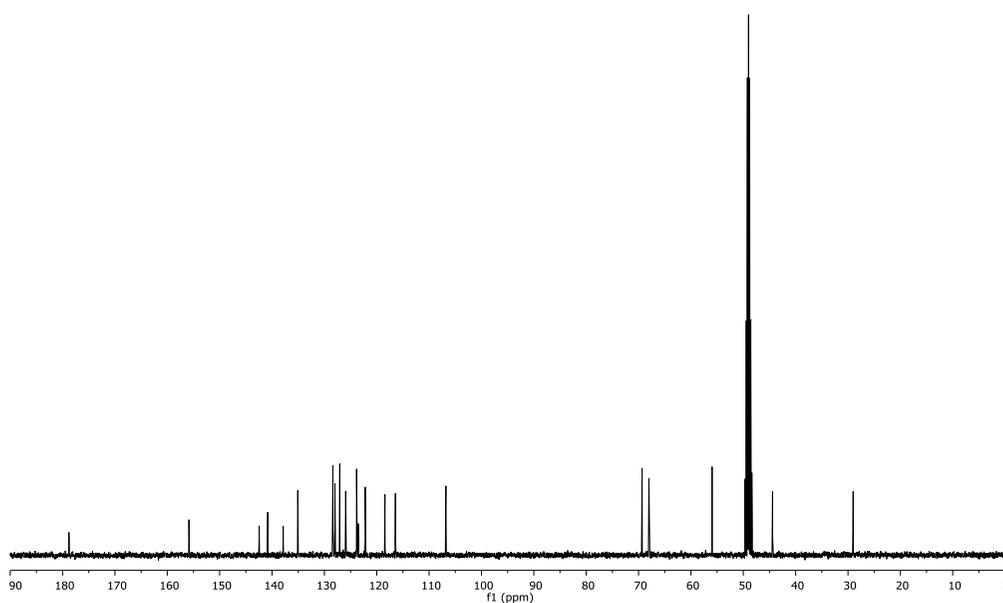


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXIII** (600 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

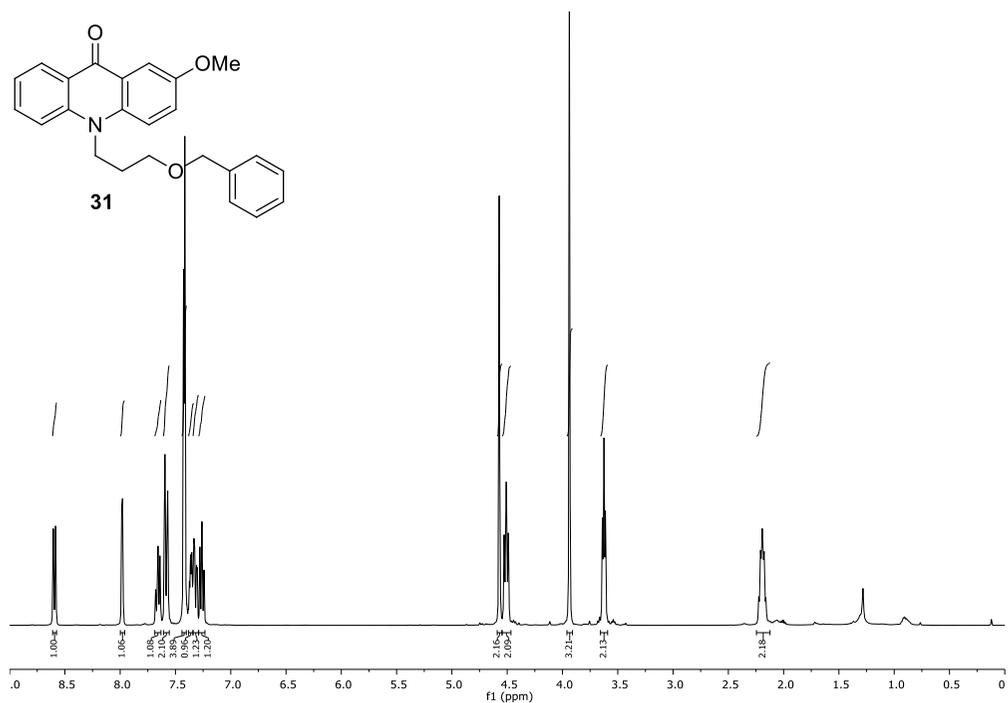


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXIII** (151 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

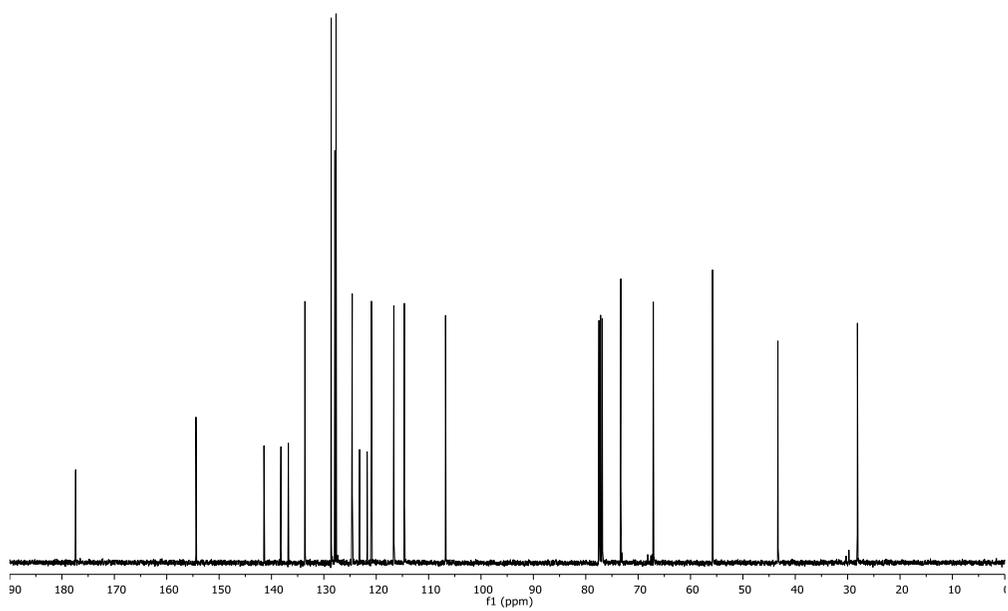


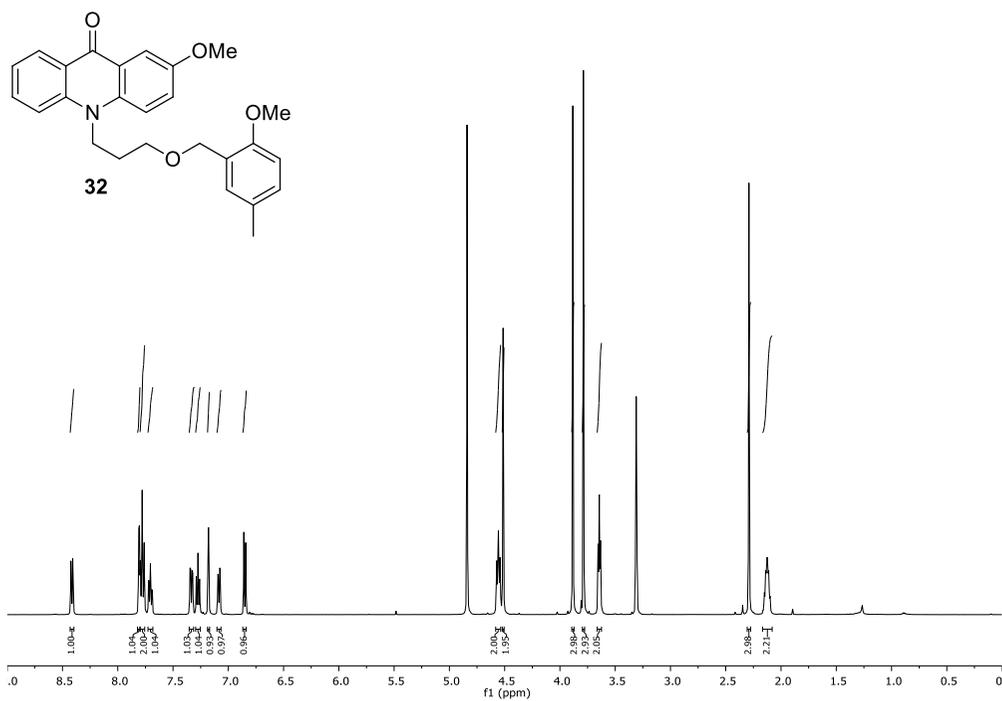
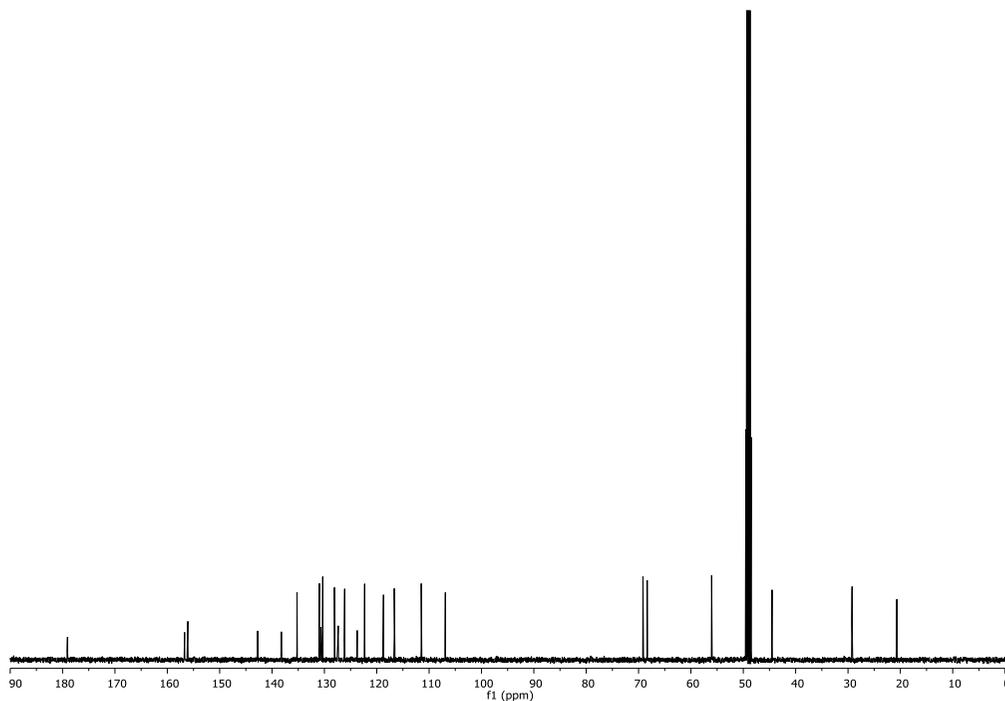
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **30** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **30** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **31** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



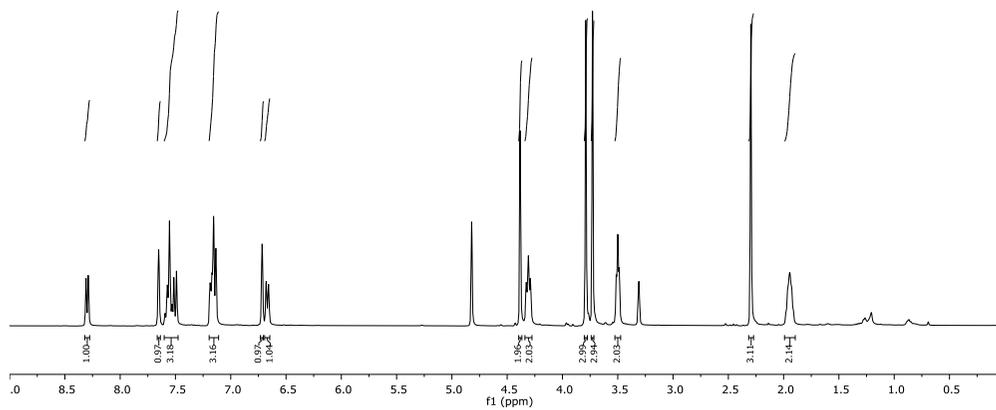
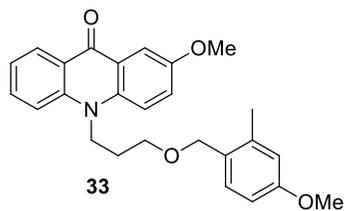
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **31** (101 MHz, Cloroformo-*d*)



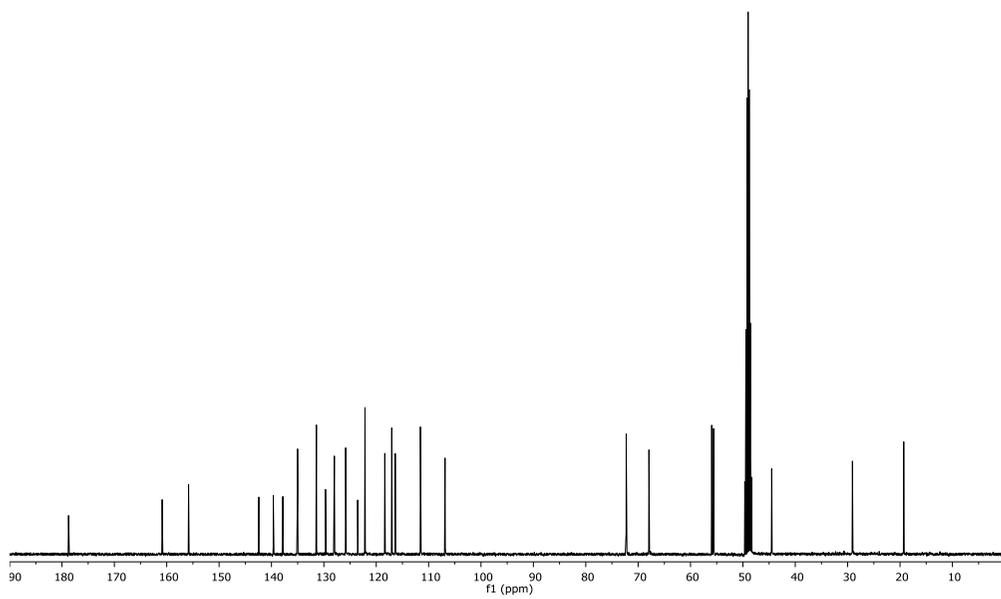
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **32** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **32** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

Síntesis y aplicaciones *in vivo* e *in vitro*  
de nuevos colorantes orgánicos

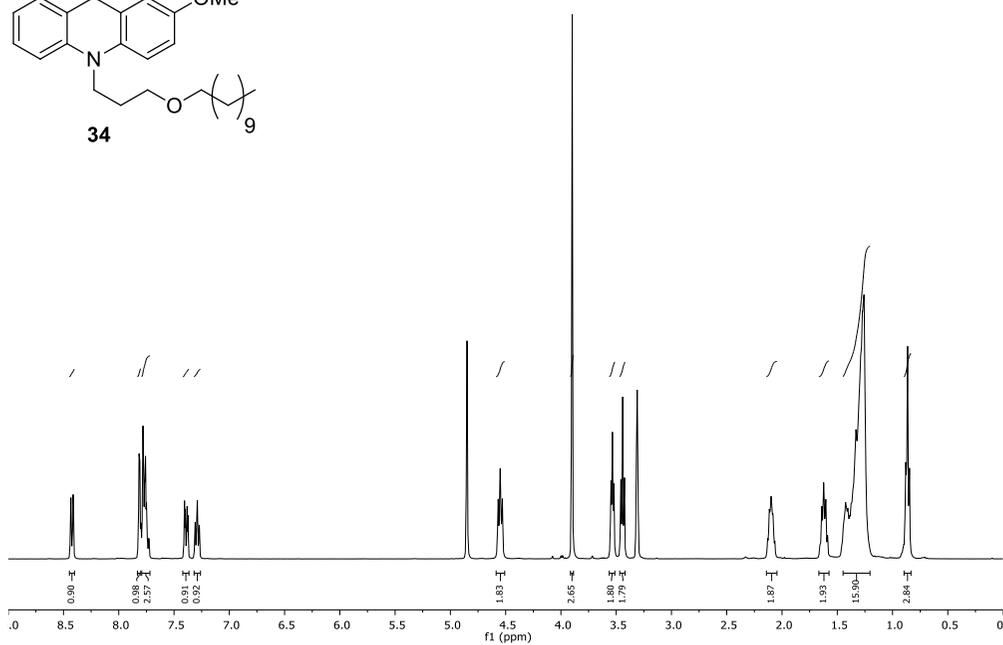
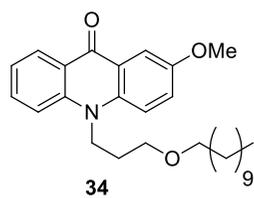
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **33** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



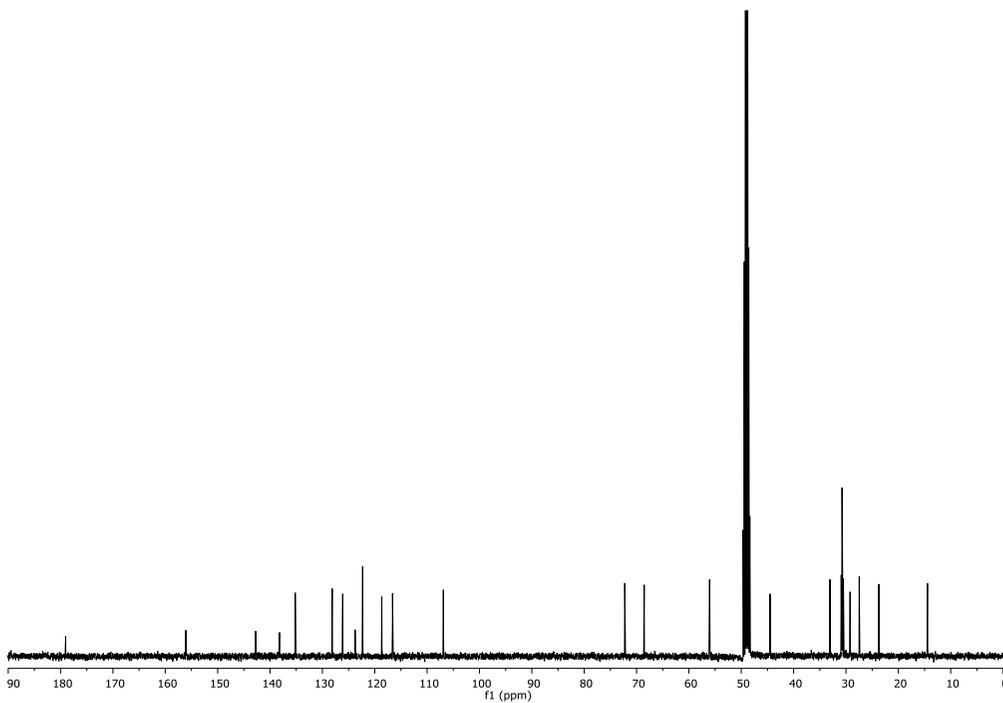
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **33** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



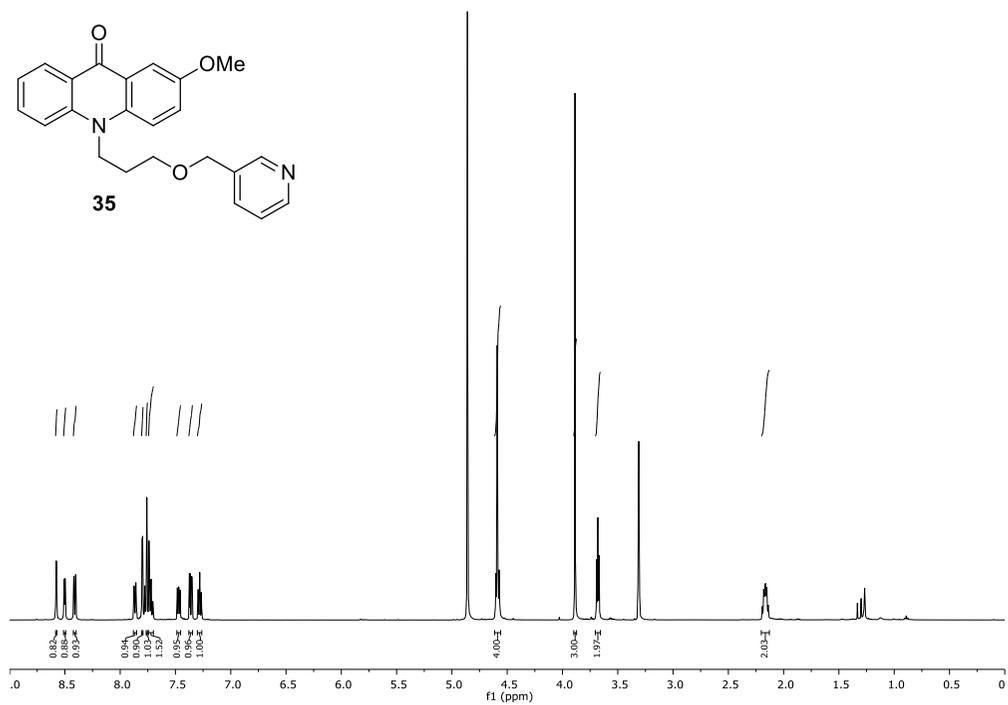
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **34** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



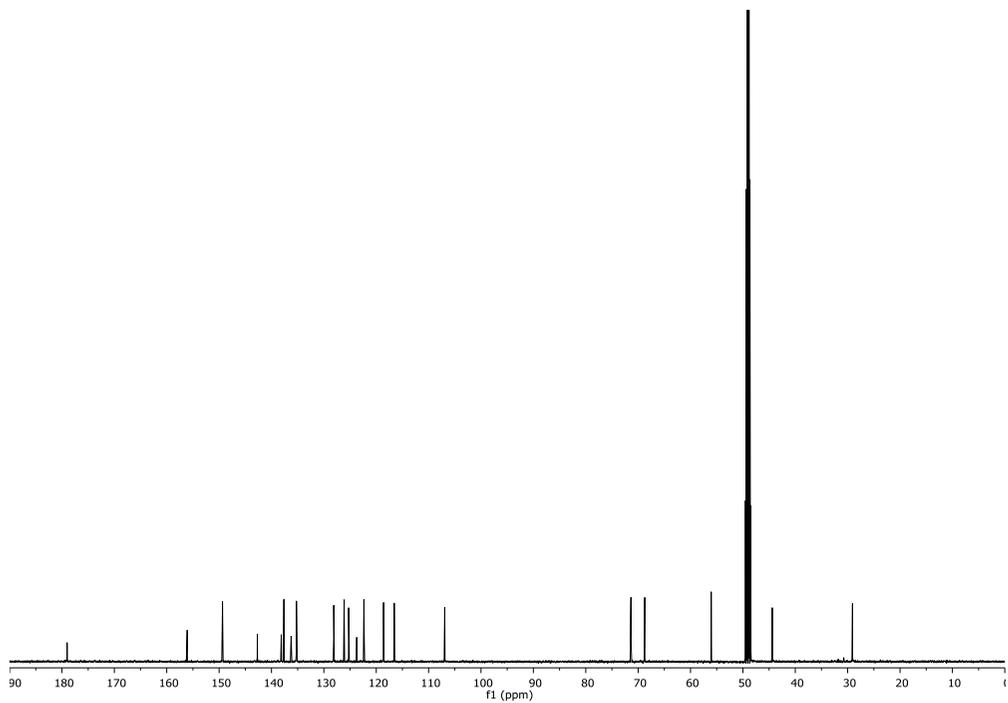
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **34** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

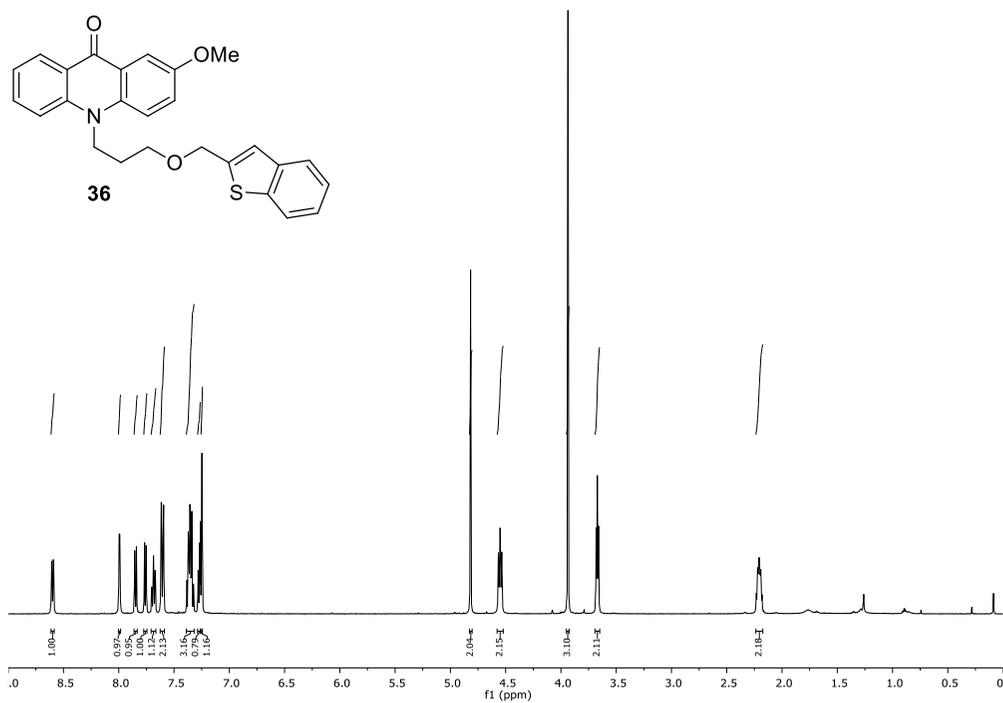
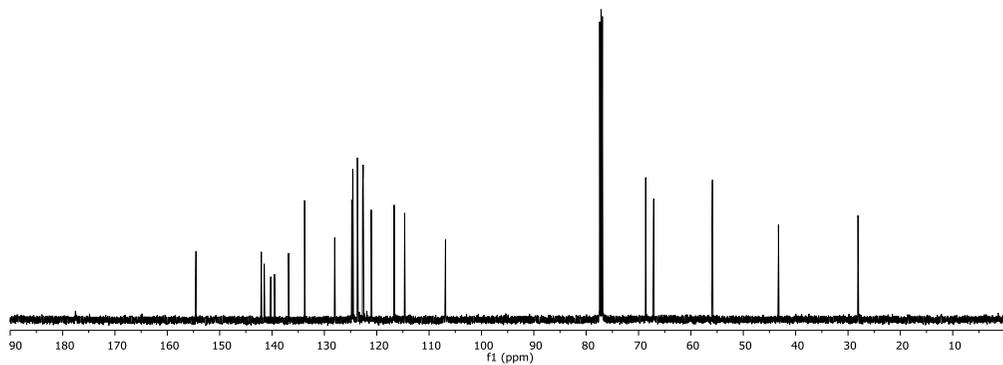


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **35** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



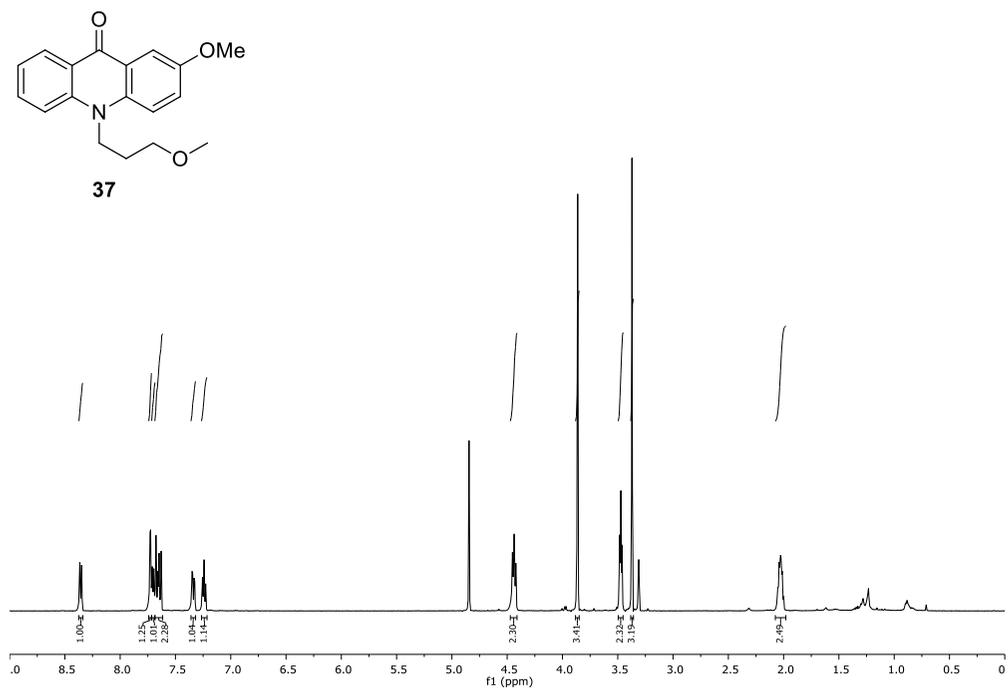
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **35** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



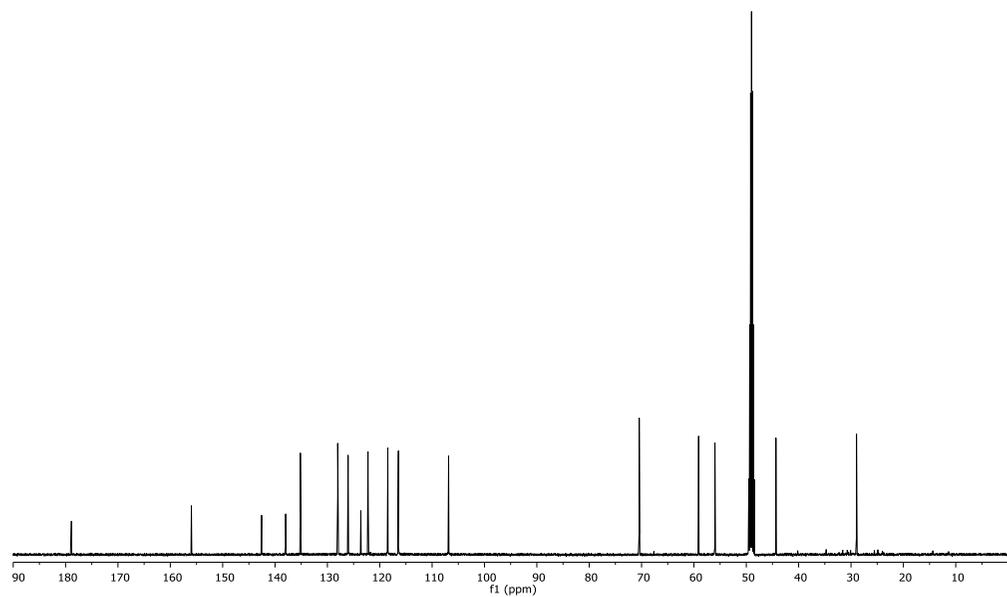
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **36** (500 MHz, Cloroformo-*d*)Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **36** (126 MHz, Cloroformo-*d*)

Síntesis y aplicaciones *in vivo* e *in vitro*  
de nuevos colorantes orgánicos

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **37** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

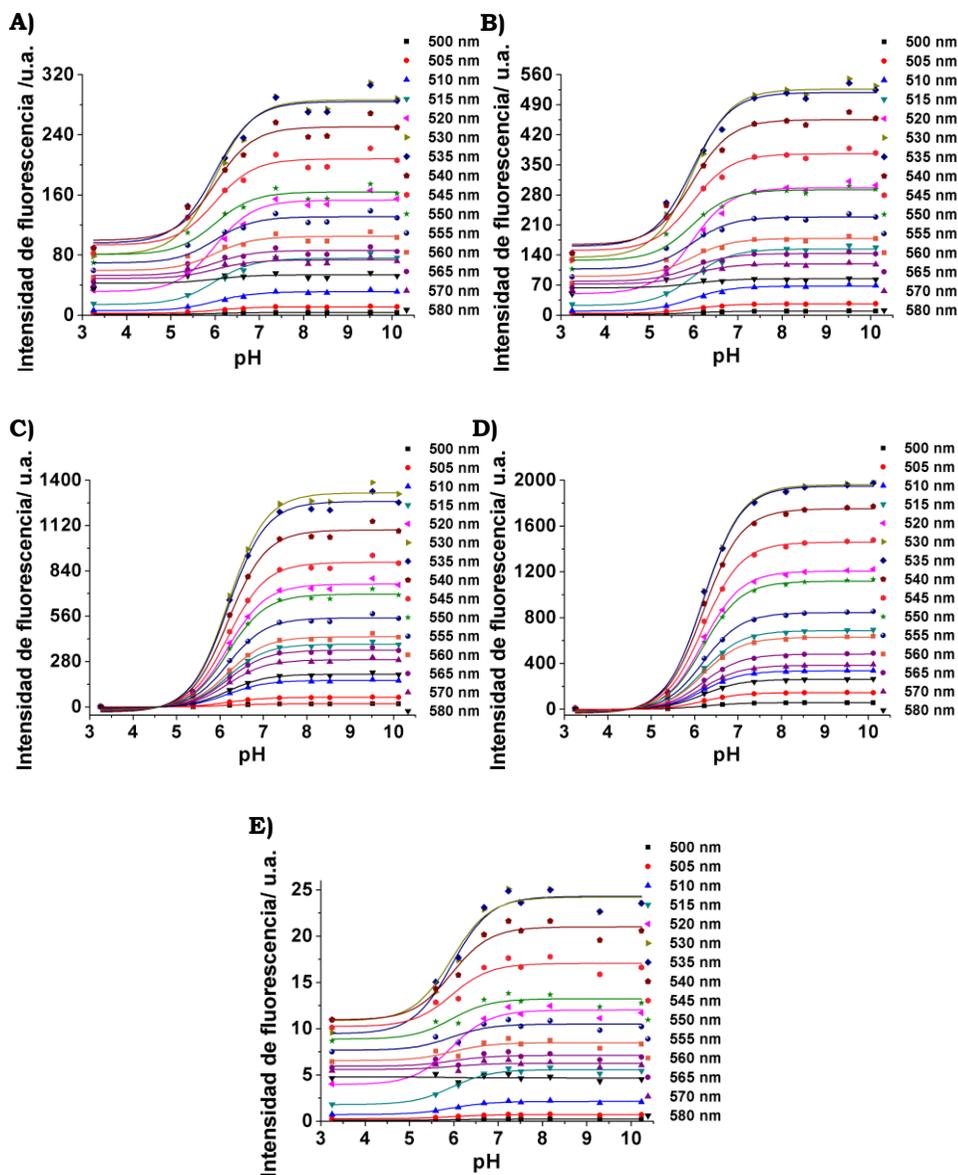


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **37** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



## Cálculo del $pK_a$ de los derivados xanténicos 24-29

### 1. Curvas de calibrado Intensidad de fluorescencia frente a pH

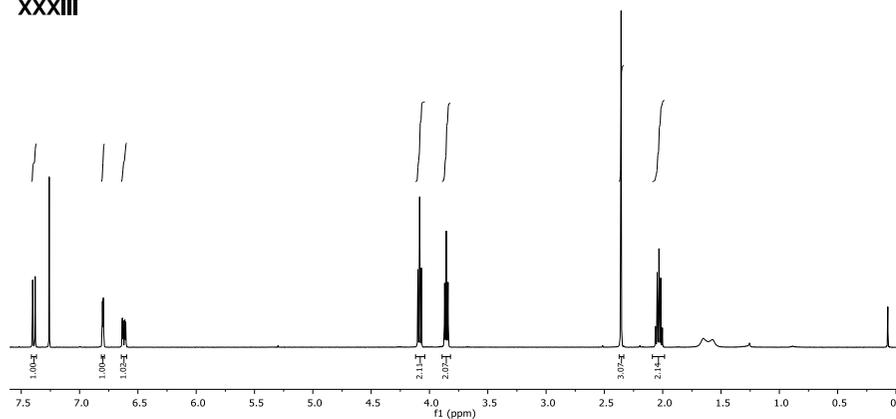
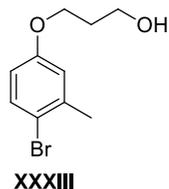


**Figura-anexo II.1.** Curvas de calibrado para la obtención del valor de  $pK_a$  de los derivados xanténicos del 24-29. Representación de la intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{exc}$  = 485 nm frente al pH a 15 longitudes de onda. **A) 24, B) 25, C) 26, D) 27 y E) 29.**

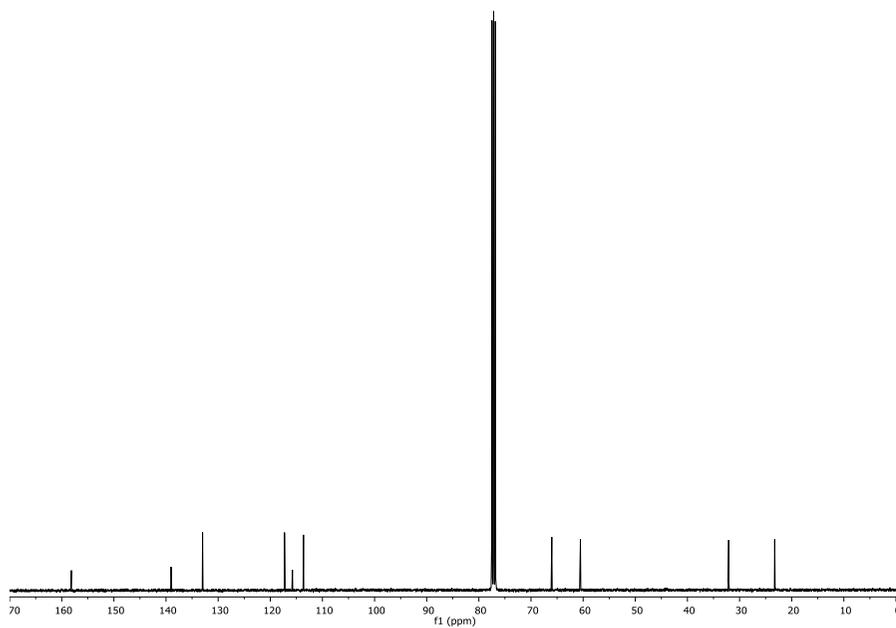
## ANEXO CAPÍTULO III.

### Caracterización química

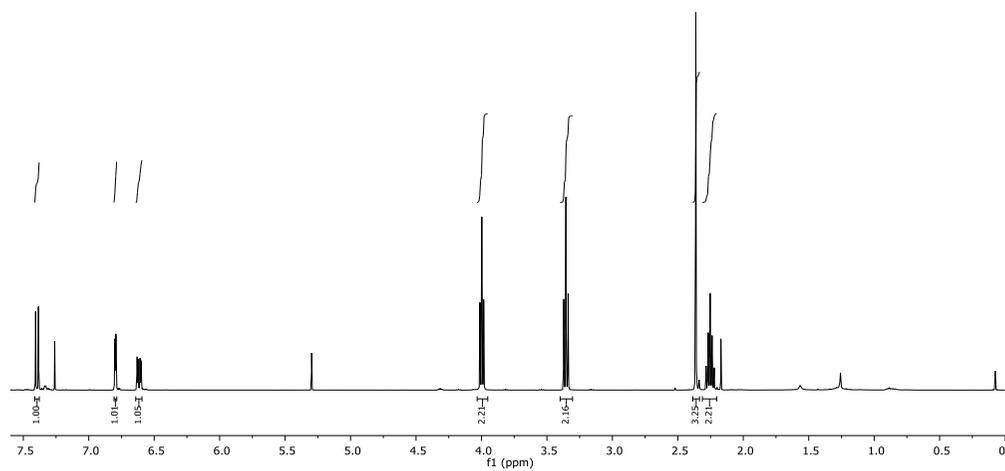
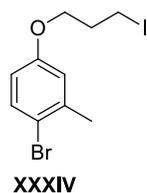
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXXIII** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



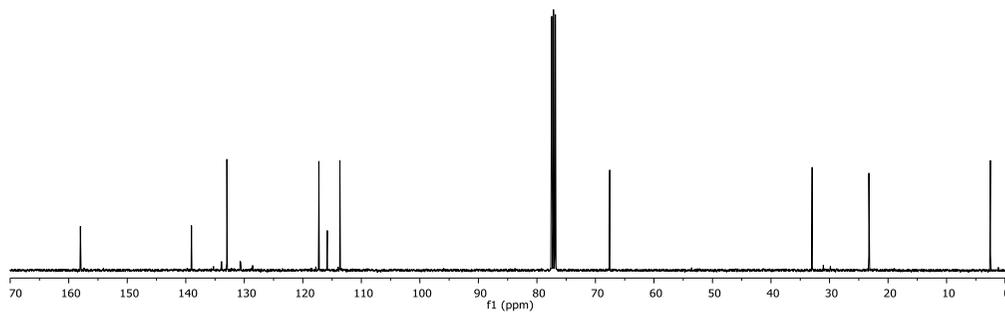
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXXIII** (101 MHz, Cloroformo-*d*)



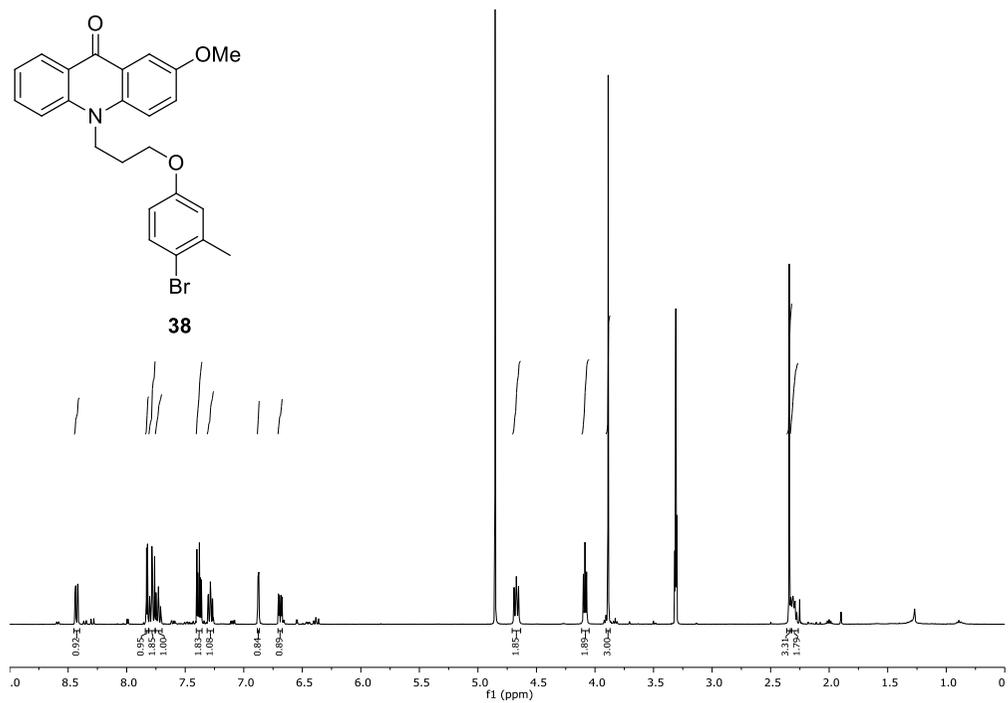
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXXIV** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



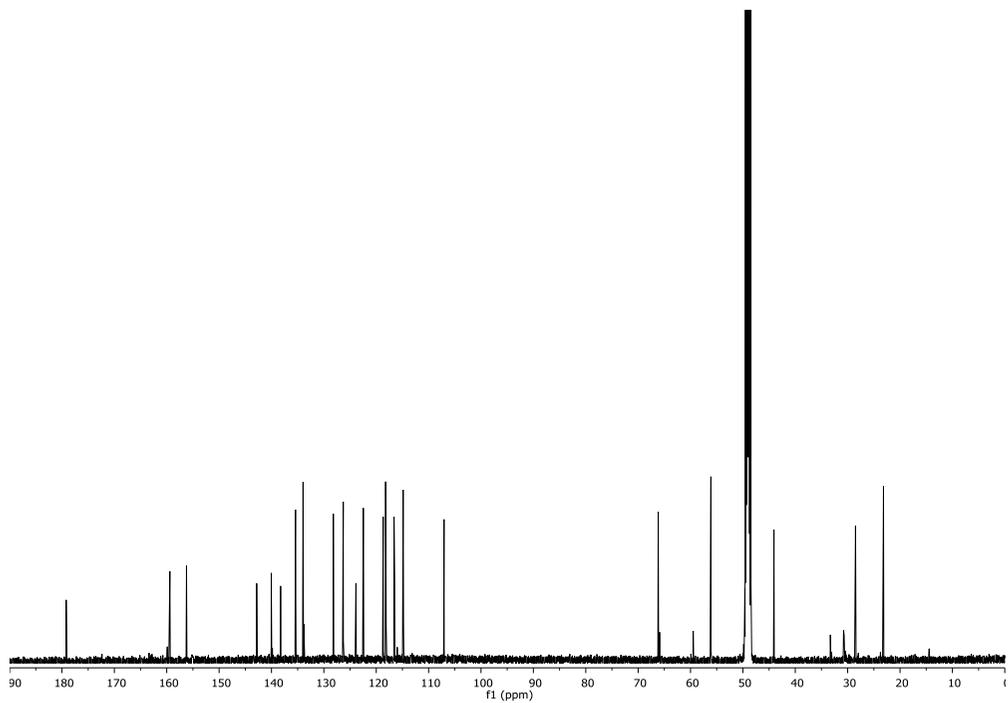
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXXIV** (101 MHz, Cloroformo-*d*)



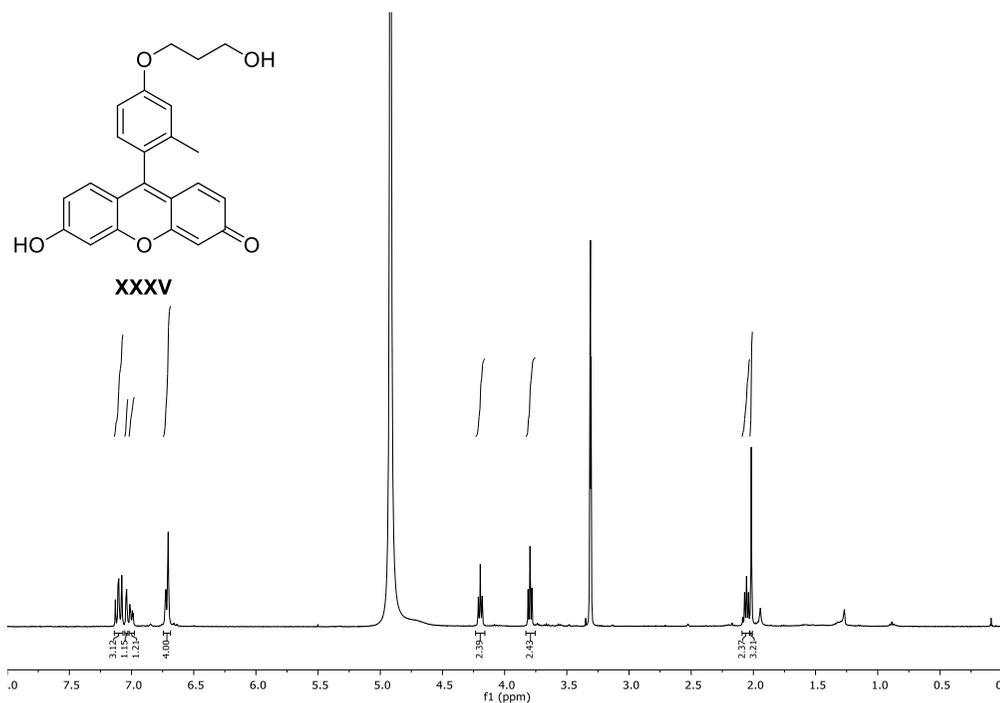
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **38** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



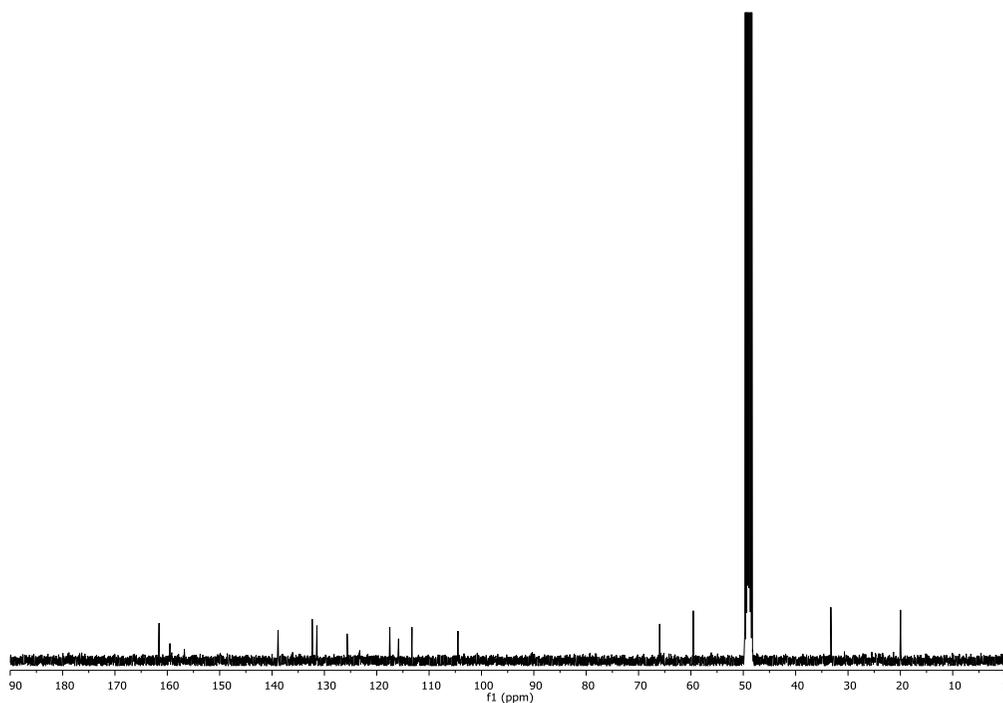
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **38** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



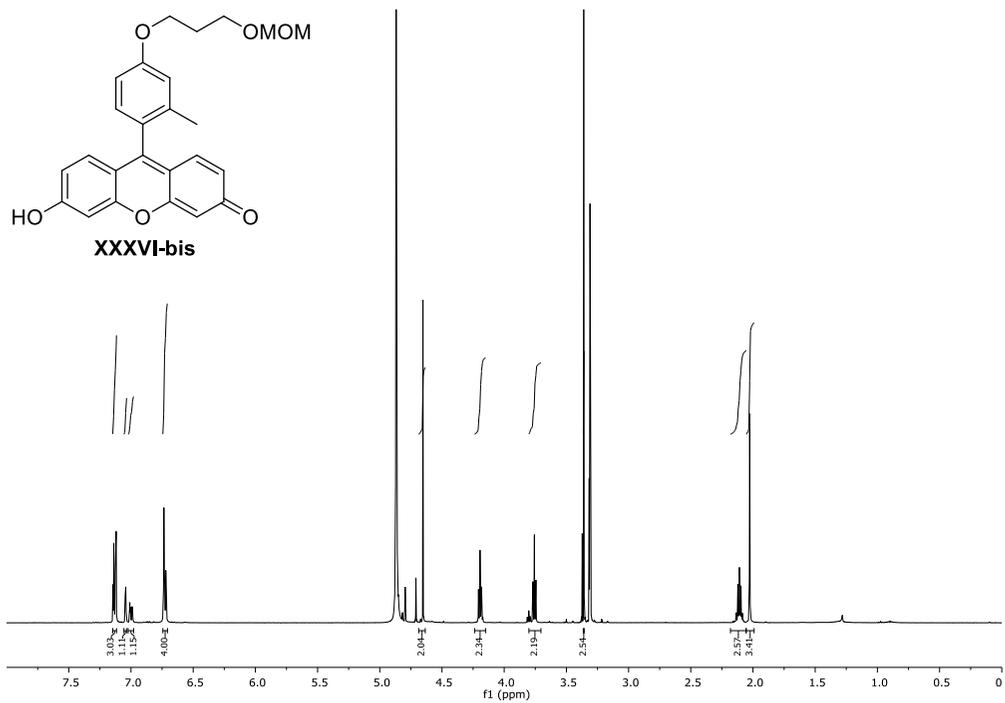
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXXV** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



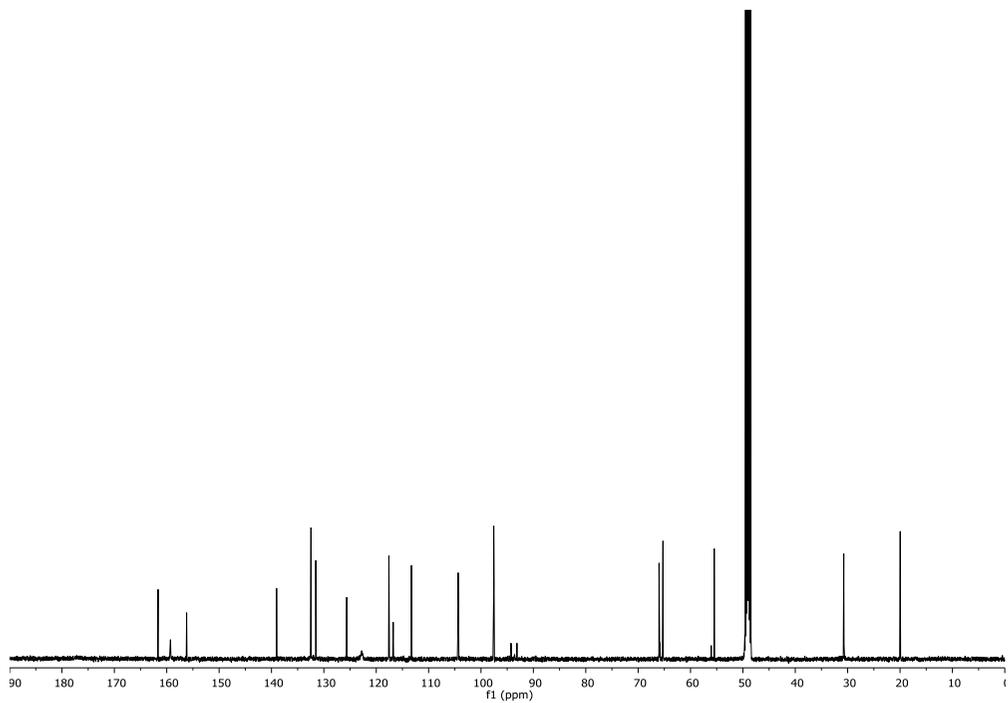
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXXV** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



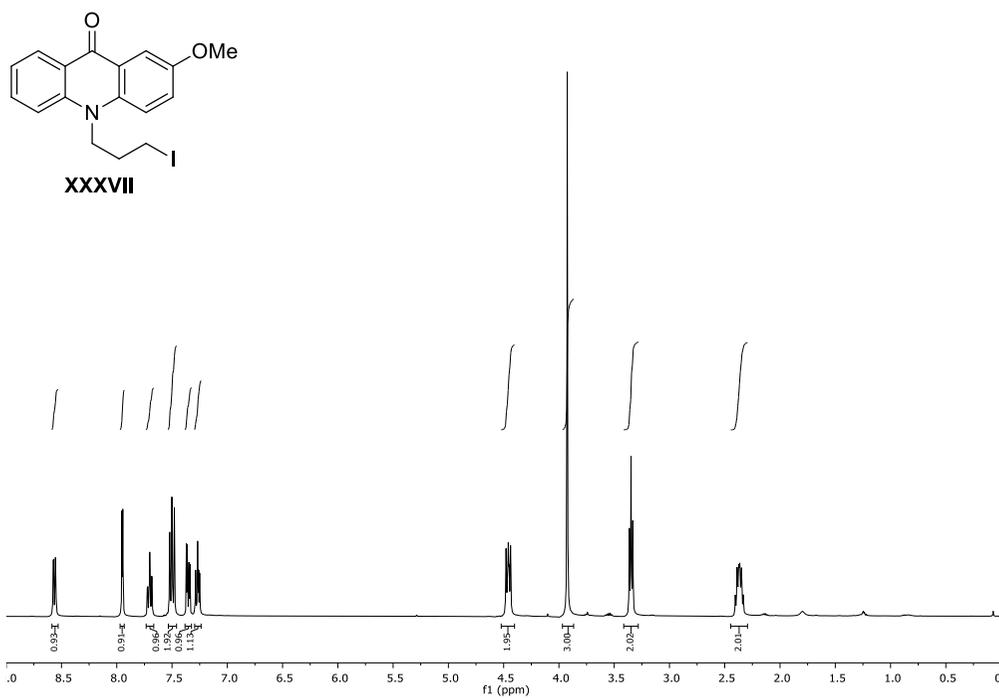
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXXVI-bis** (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



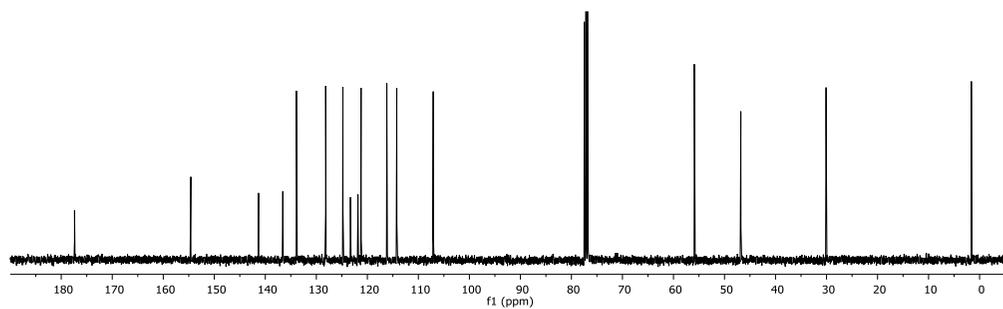
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXXVI-bis** (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



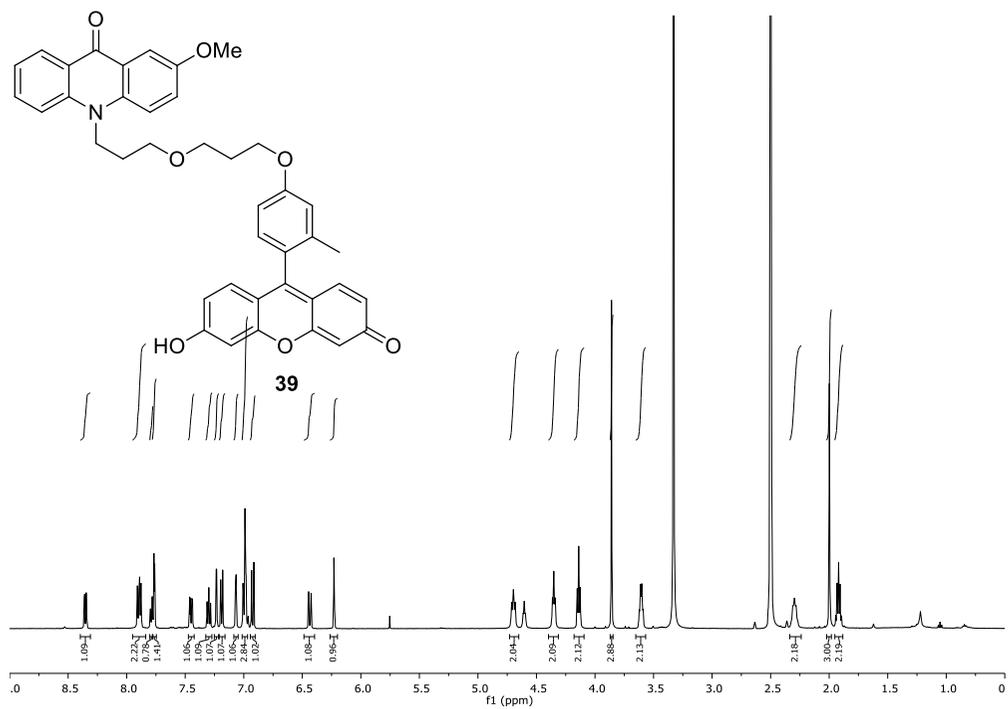
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del precursor **XXXVII** (400 MHz, Cloroformo-*d*)



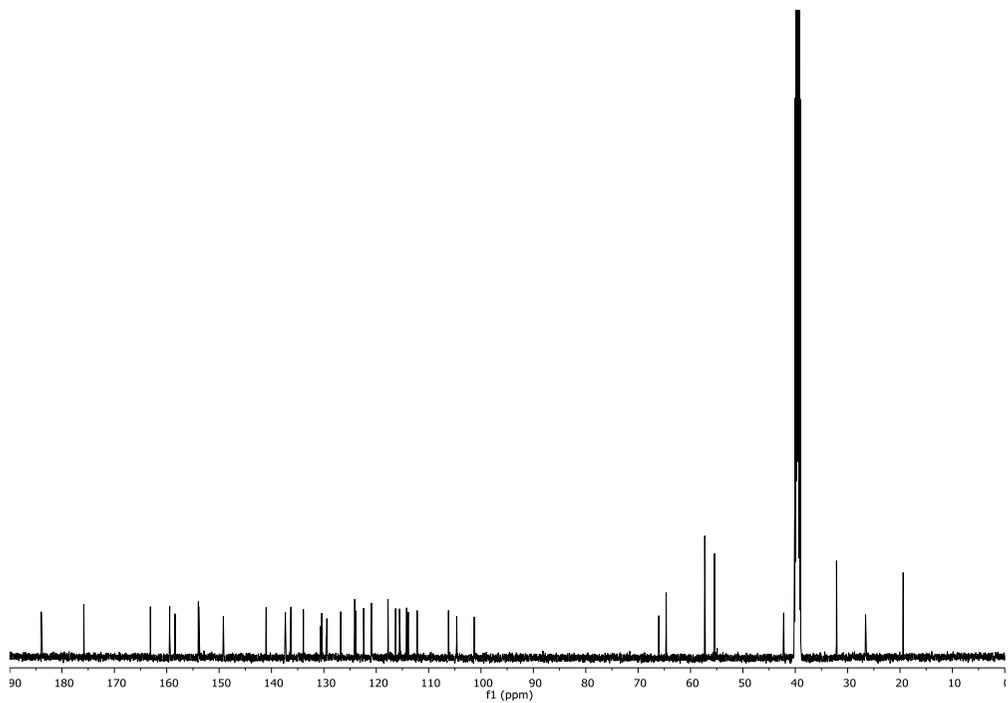
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del precursor **XXXVII** (101 MHz, Cloroformo-*d*)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del Compuesto **39** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

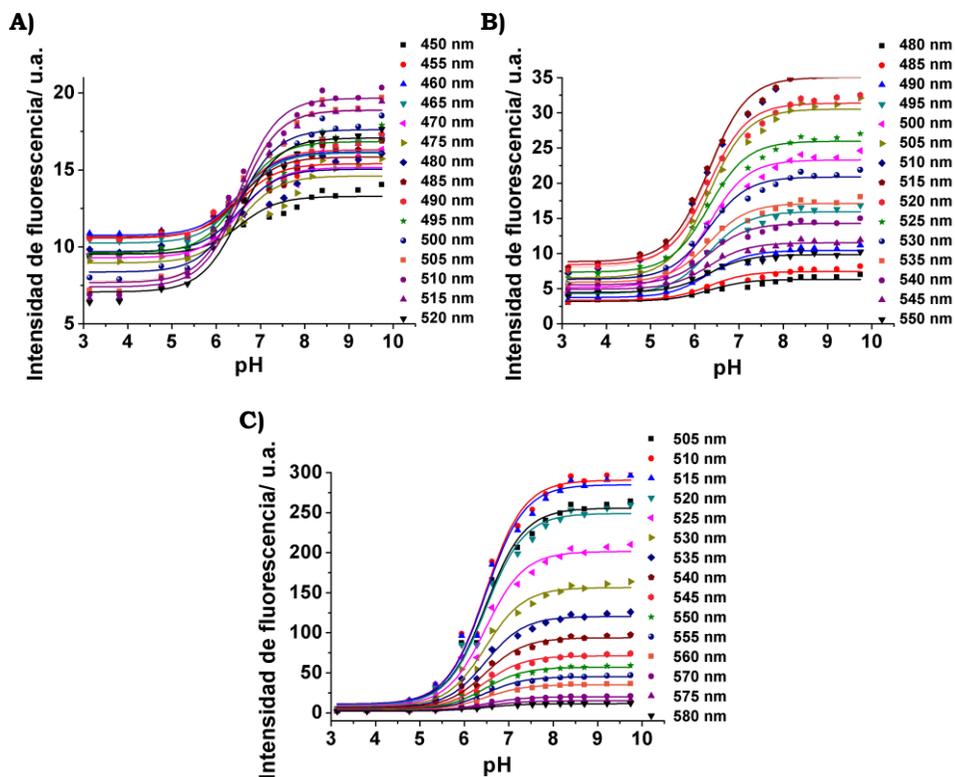


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **39** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



## Cálculo del $pK_a$ de 39

### 1. Curvas de calibrado de Intensidad de fluorescencia frente a pH

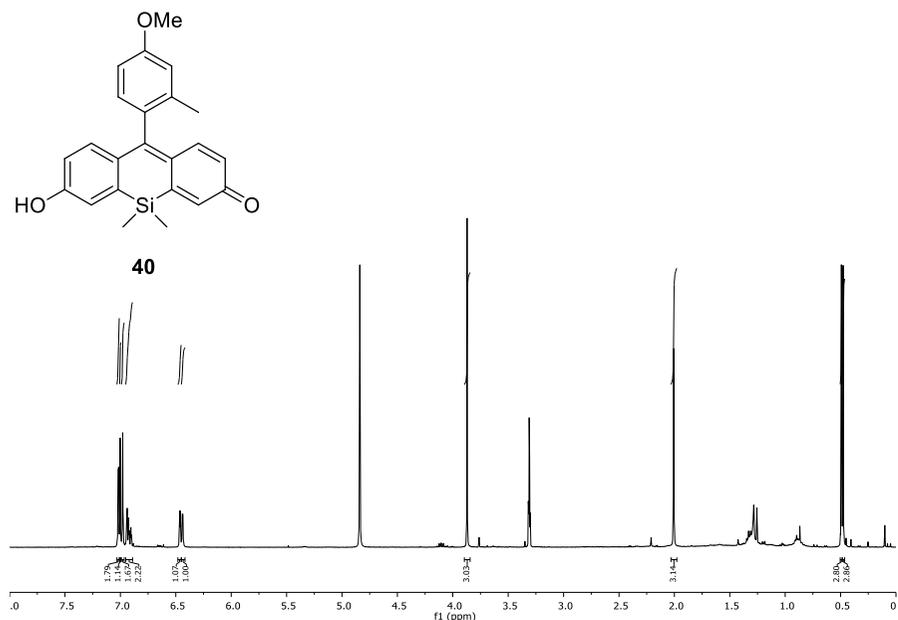


**Figura-anexo III.1.** Curvas de calibrado para la obtención del valor de  $pK_a$  del sensor **39**. Representación de la intensidad de fluorescencia frente al pH a 15 longitudes de onda. **A)**  $\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$ , **B)**  $\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$  y **C)**  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ .

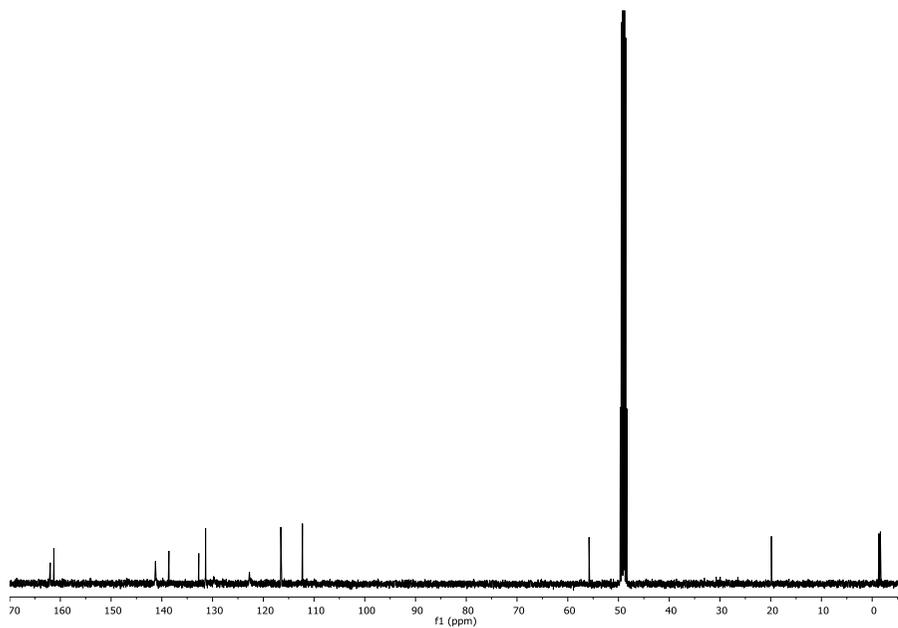
## ANEXO CAPÍTULO IV.

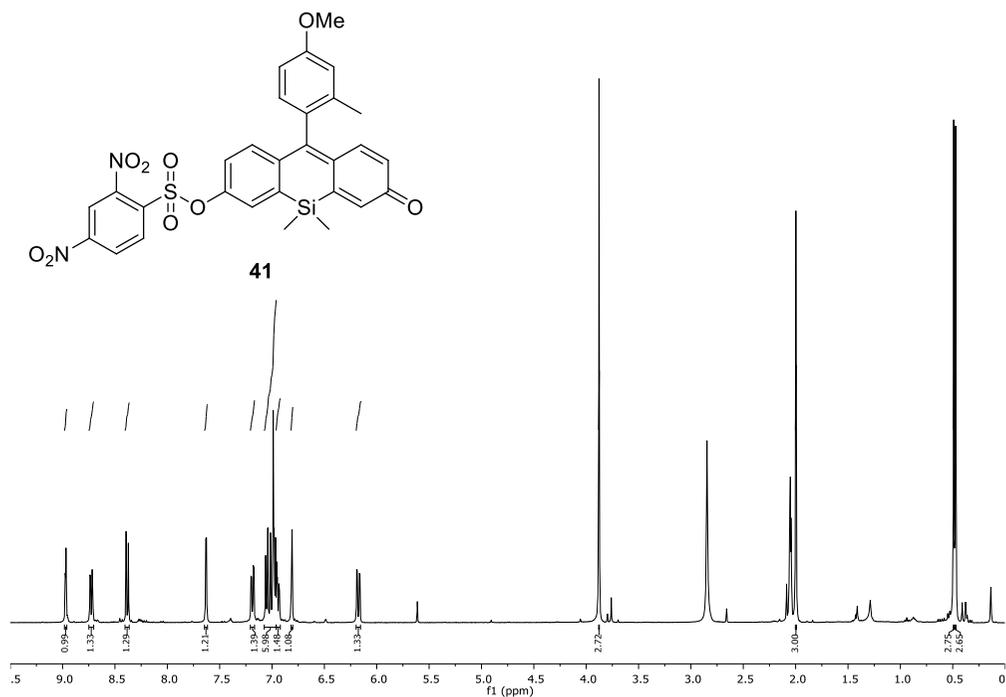
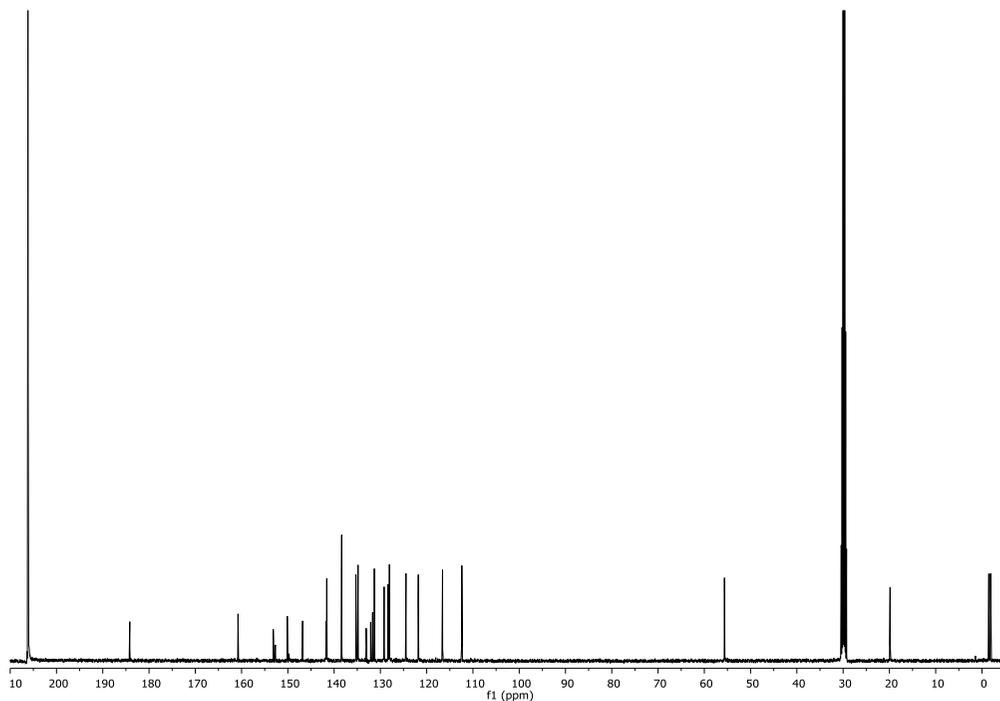
### Caracterización química

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del Compuesto **40** (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)

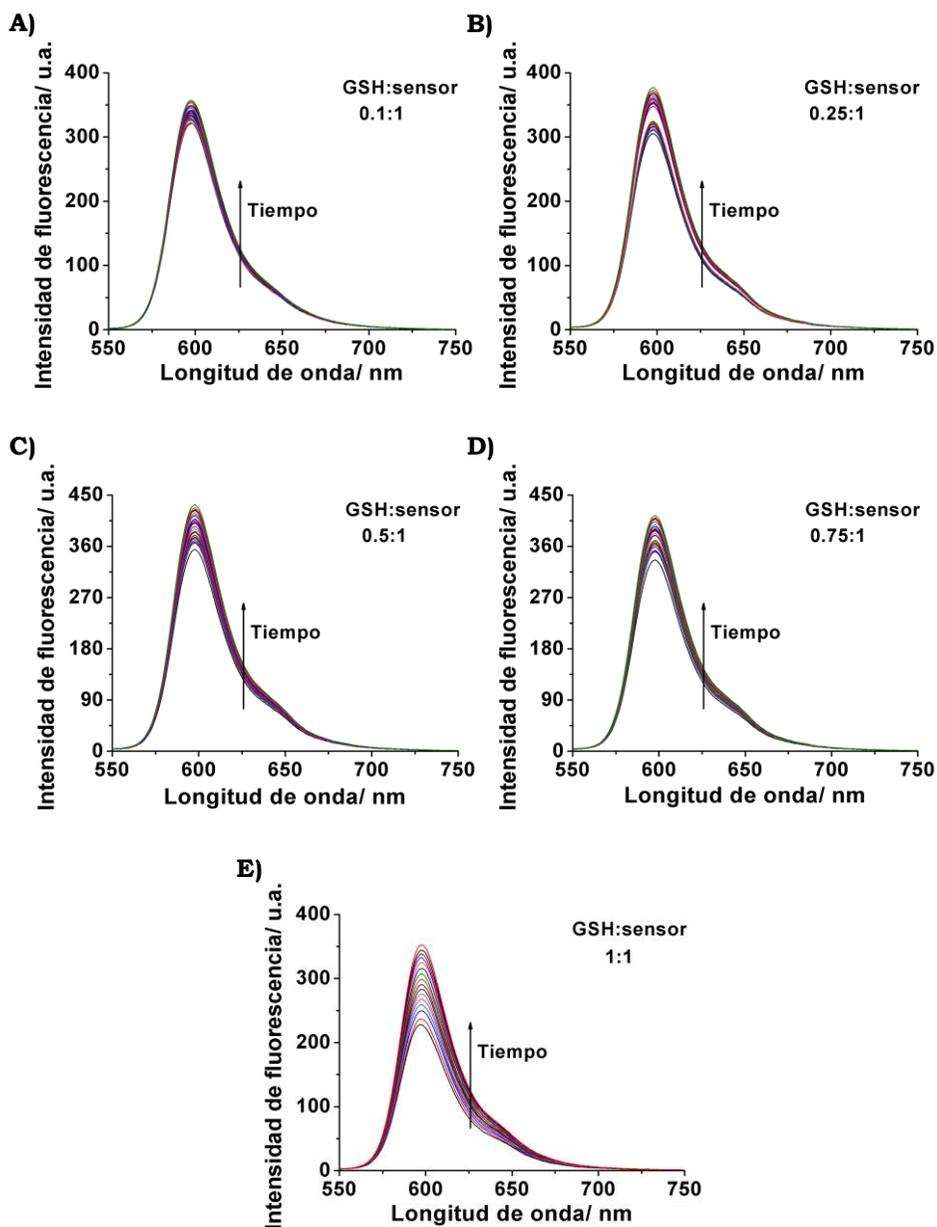


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **40** (101 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>)



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **41** (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **41** (101 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)

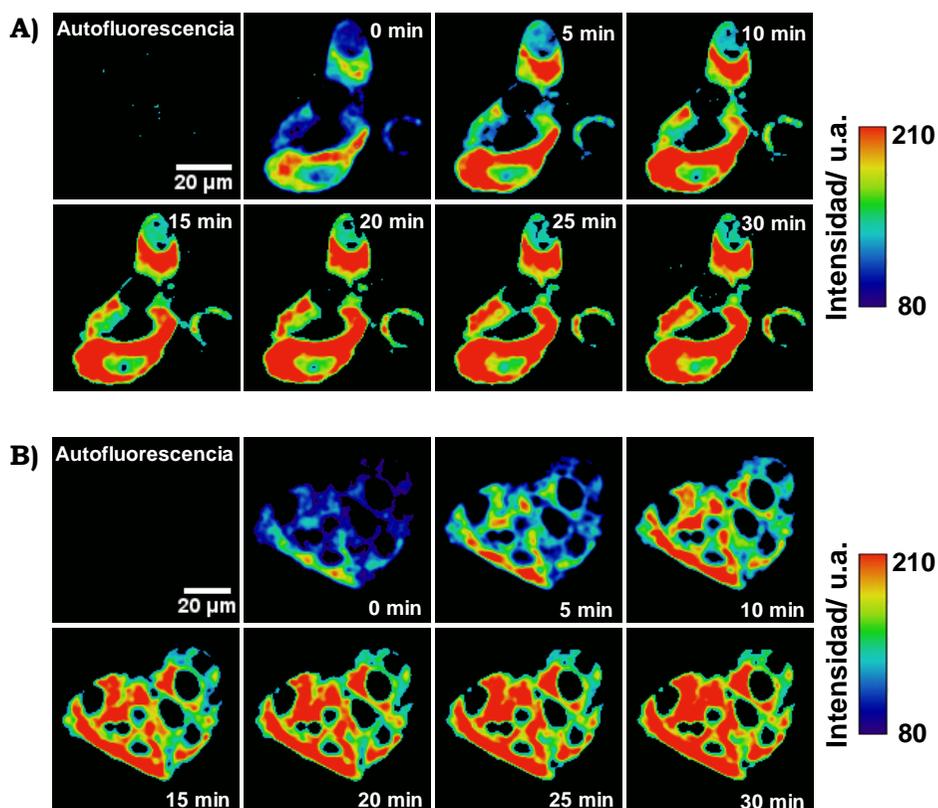
### Cinéticas de la reacción fluorogénica de **41** con GSH



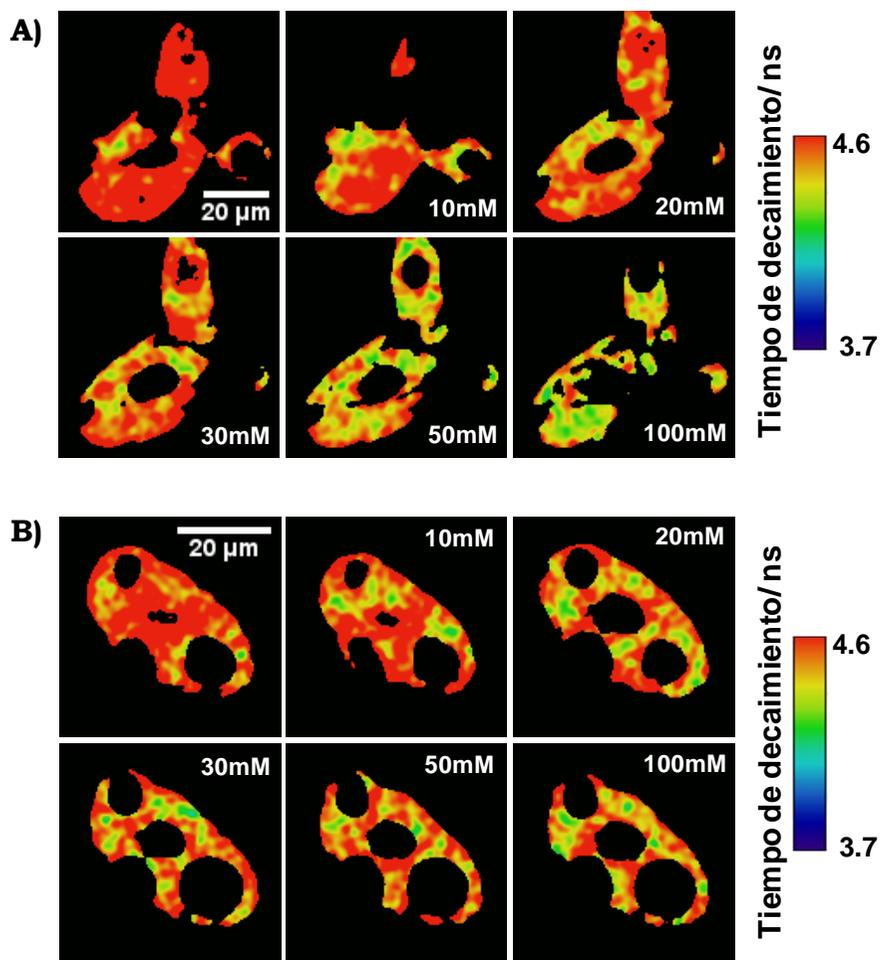
**Figura-anexo IV.1.** Cinéticas de la reacción fluorogénica de **41** en disolución durante 2 horas a diferentes proporciones estequiométricas de GSH y sensor. **A)** 0.1:1, **B)** 0.25:1, **C)** 0.5:1, **D)** 0.75:1 y **E)** 1:1

## Medidas de fluorescencia mediante microscopía FLIM en células HepG2 y MC3T3-E1

### 1. Línea celular HepG2

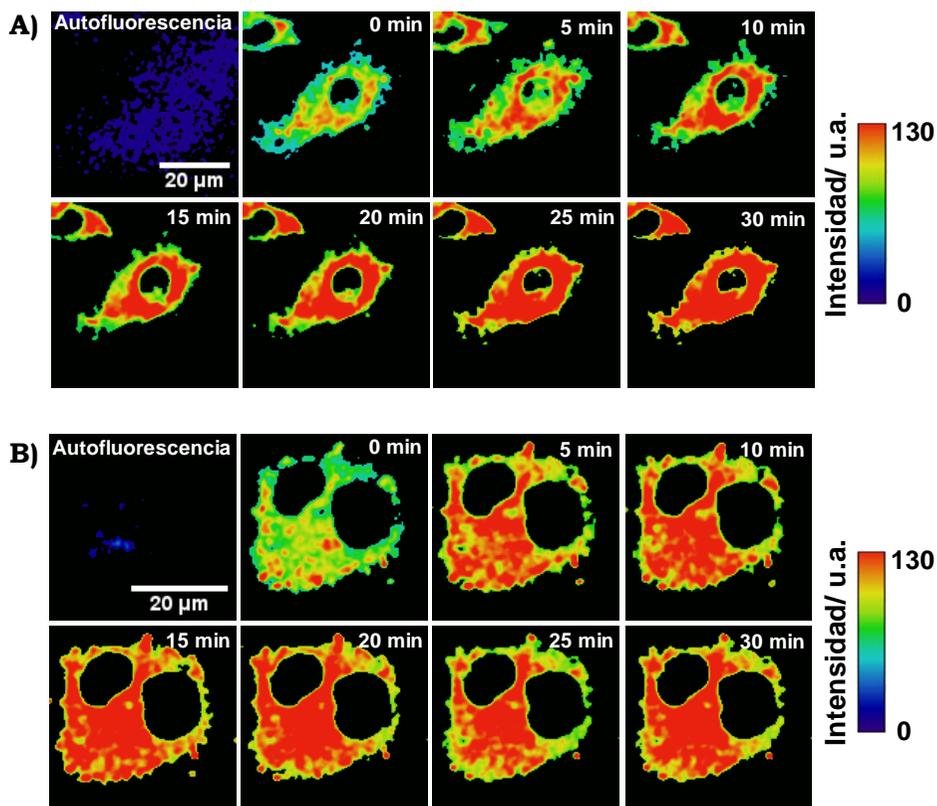


**Figura-anexo IV.2. A) y B)** Algunos ejemplos adicionales de imágenes FLIM que muestran la representación de la reacción fluorogénica de **41** ( $6 \cdot 10^{-7}$  M) en respuesta a biotioles intracelulares en células HepG2.

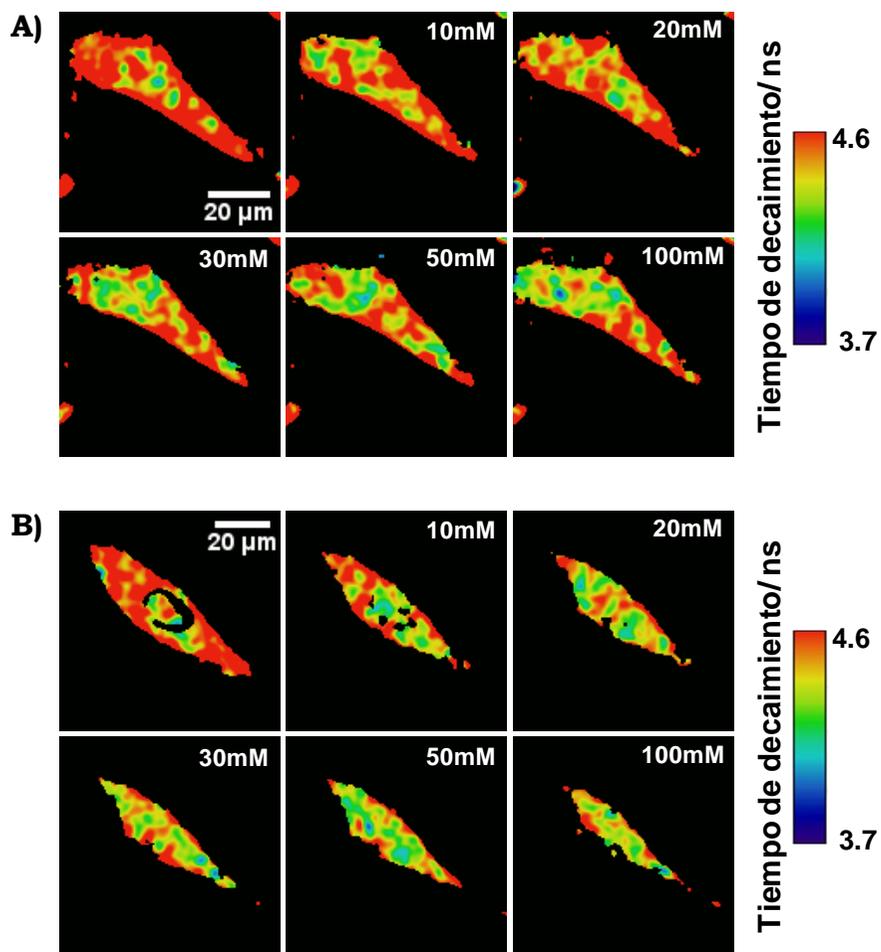


**Figura-anexo IV.3. A) y B)** Ejemplos adicionales de imágenes FLIM que muestran la respuesta del colorante **40** liberado frente a variación de cantidad de iones fosfato en células HepG2.

## 2. Línea celular MC3T3-E1



**Figura-anexo IV.4. A) y B)** Ejemplos adicionales de imágenes FLIM que muestran la representación de la reacción fluorogénica de **41** ( $6 \cdot 10^{-7}$  M) en respuesta a biotinas intracelulares en células MC3T3-E1.



**Figura-anexo IV.5.** Otros ejemplos de imágenes FLIM que muestran la respuesta del colorante **40** liberado frente a variación de cantidad de iones fosfato en células MC3T3-E1.