

Tesis Doctoral

Diheteroariletenos fluorescentes como sondas para microscopía de fluorescencia

Gillanders, Florencia

2016-05-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gillanders, Florencia. (2016-05-18). Diheteroariletenos fluorescentes como sondas para microscopía de fluorescencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gillanders, Florencia. "Diheteroariletenos fluorescentes como sondas para microscopía de fluorescencia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-05-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

Diheteroariletenos fluorescentes como sondas para microscopía de fluorescencia

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Orgánica

Florencia Gillanders

Director de tesis: Dr. Thomas Jovin

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Oscar Varela

Lugar de trabajo: Instituto Max Planck para Química Biofísica, Göttingen, Alemania y
Centro de Investigaciones en Bionanociencias, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Buenos Aires, Marzo 2016

Fecha de Defensa: 18 de Mayo 2016

Resumen

Las técnicas modernas de microscopía de fluorescencia requieren sondas cuyos comportamientos fotoquímicos, combinados con las características ópticas del equipamiento, permitan resolver estructuras de dimensiones menores al límite impuesto por la difracción natural de la luz. Además de ser brillantes, estables, pequeñas y compatibles con el medio biológico, las sondas ideales fluorescen y se tornan oscuras de manera controlada y conocida. En esta tesis se diseñaron nuevas sondas basadas en los diheteroariletenos oxidados (DHAOs) como plataforma de fluorescencia controlada.

Los DHAOs son compuestos fotocromicos que presentan dos isómeros fotoestables, uno fluorescente y uno oscuro, alcanzados por irradiación con luz ultravioleta y visible respectivamente. Las propiedades espectroscópicas de los DHAOs se optimizaron estudiando el efecto de sustituyentes dadores y aceptores de electrones sobre las mismas. La demandante caracterización espectrofotométrica de los DHAOs se abordó con un espectrofotómetro y fotomodulador de construcción propia, el cual permitió automatizar las mediciones y explorar sistemáticamente diferentes condiciones de fotoconversión. Se descubrió que al aumentar el carácter dador de electrones del sustituyente, se estabiliza particularmente el estado excitado del isómero fluorescente, resultando en un aumento del desplazamiento de Stokes y un pronunciado solvatocromismo del fluoróforo. El solvatocromismo se utilizó para estudiar el cambio de polaridad del entorno de monómeros de α -sinucleína durante su agregación.

A fin de conservar la fluorescencia fotomodulable de los DHAOs en agua, se exploraron diversas estrategias de solubilización con modificaciones covalentes y no-covalentes. La inclusión en cavidades de ciclodextrina, la adsorción a albúmina, y la funcionalización con grupos hidrofílicos sirvieron para solubilizar efectivamente a los DHAOs en medios acuosos. Las propiedades de fluorescencia y fotoconversión se retuvieron exitosamente dentro de la cavidad de las proteínas de unión de ácidos grasos y mediante la conjugación a entidades protéicas de mayor tamaño, indicando la preferencia de los DHAOs a un entorno protegido del agua. Anticuerpos secundarios conjugados a DHAOs se utilizaron para marcar β -tubulina en neuronas, y se lograron fotoconvertir selectivamente distintas áreas de las muestras en un microscopio que incorpora un arreglo programable para generar patrones espaciales de excitación.

El particular comportamiento fotoquímico de los diheteroariletenos permitió desarrollar una estrategia para aumentar la resolución microscópica combinando DHAOs con fotocrómicos no-fluorescentes. Utilizando el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de Förster, se postulan sondas que requieren de múltiples estímulos para la activación de la emisión, disminuyendo el volumen de activación por debajo del límite de difracción de la luz y aumentando la resolución axial. La aplicación de las sondas sintetizadas y la propuesta de nuevas estrategias relacionadas con los DHAOs denotan el potencial que tienen los mismos en la búsqueda de mayor resolución en la microscopía de fluorescencia.

Abstract

Fluorescent diheteroarylethenes as probes for fluorescence microscopy

Modern fluorescence microscopy techniques require probes whose photochemical behaviour, combined with the optical characteristics of the microscope, enable the resolution of structures smaller than the natural diffraction limit of light. In addition to being bright, stable, small and compatible with the biological environment, the ideal probe's fluorescence is activated and deactivated in a controlled and predictable manner. New probes were designed using oxidized diheteroarylethenes (ODHAs) as a platform for controlled fluorescence and are presented in this thesis.

ODHAs are photochromic compounds with two photostable isomers, one fluorescent and one dark, which are formed upon irradiation with ultraviolet and visible light, respectively. In order to optimize their spectroscopic and photochemical properties, the ODHAs were modified with electron-donating and -withdrawing substituents. The demanding spectroscopic characterization of the photochromes was tackled with a custom built spectrophotometer and photoconverter, which enabled automatization of the measurements and the systematic exploration of varying photoconversion conditions. By increasing the electron-donating character of the substituents, the excited state of the fluorescent isomer is particularly stabilized, resulting in an increase in the Stokes shift and pronounced solvatochromism of the fluorophore. The solvatochromic ODHA was used to probe the changes in local polarity around monomers of the amyloid protein α -synuclein during their aggregation.

Diverse solubilization strategies involving both covalent and non-covalent modifications were employed with the aim of conserving the photoswitchable fluorescence of ODHAs in water. Inclusion in cyclodextrin cavities, adsorption onto albumin, and functionalization with hydrophilic groups all served to effectively solubilize the ODHAs in aqueous solutions. The fluorescence and photoconversion properties were conserved inside the cavities of fatty acid binding proteins and by conjugation to larger protein entities, indicating the preference of the ODHAs for surroundings devoid of water. Secondary antibodies conjugated to ODHAs were used to immunostain β -tubulin in fixed neurons, and different areas of the sample were selectively photoconverted using structured illumination with a structured illumination (programmable array) microscope.

A new strategy for increasing microscopic resolution was developed, harnessing the unique photochemical behaviour of diheteroarylethenes by combining ODHAs with non-fluorescent photochromes. The proposed probes require multiple stimuli for activation of the Förster resonance energy transfer-modulated emission, reducing the activation volume below the diffraction limit and increasing axial resolution. The application of the synthesized probes and the description of novel strategies related to ODHAs denote their potential in the search for increased resolution in fluorescence microscopy.

Índice general

Abreviaturas	xi
1 Introducción	1
1.1 Fotocromismo	1
1.2 Diheteroarilenos	4
1.3 Diheteroarilenos fluorescentes	12
1.4 Microscopia de fluorescencia	16
1.5 Objetivo de tesis	21
2 Optimización fotoquímica de diheteroarilenos	23
2.1 Elección de sustituyentes	23
2.2 Síntesis	25
2.3 Espectroscopía y caracterización	30
2.4 Análisis del efecto sustituyente	38
2.5 Análisis de solvatocromismo	42
2.6 Conclusión parcial de la optimización con sustituyentes	54
3 Espectrófotometro y fotomodulador	57
3.1 Motivación	57
3.2 Diseño	58
3.3 Elección de detector DCA	63
3.4 Componentes y construcción	65
3.5 Detalle de cuentas/correcciones	68
3.6 Programación en LabView y programa	75
3.7 Mejoras y extensiones	85
3.8 Interfaz gráfica	87
3.9 Conclusión parcial y evaluación del equipo	94

4	Solubilización de diheteroariletenos oxidados	97
4.1	Solubilidad de controles	97
4.2	Inclusión en cavidad de ciclodextrina	101
4.3	Modificación covalente con glucosa	105
4.4	Adsorción a albúmina	112
4.5	Inclusión en proteínas de unión de ácidos grasos	114
4.6	Conjugación covalente a proteínas	117
4.7	Conclusión parcial de solubilización	130
5	Fluoróforo de activación multiple	133
5.1	Concepto de excitación con múltiples fotones	133
5.2	Síntesis y caracterización de DHA-DHAO	143
5.3	Simulando el DHA-DHAO	148
5.4	Propuesta teórica	155
5.5	Experimento básico de microscopía	169
5.6	Conclusión de la estrategia de activación múltiple	172
6	Aplicaciones de diheteroariletenos fluorescentes	173
6.1	Fotoconversión en seco	174
6.2	Agregación de α -Sinucleína	180
6.3	Microscopía de arreglo programable con DHAOs	186
6.4	Conclusión parcial de aplicaciones	190
7	Conclusiones	195
7.1	Acerca del efecto sustituyente y la solvatocromicidad	196
7.2	Acerca de la solubilización de DHAOs en agua	197
7.3	Acerca del concepto de múltiples activaciones	199
7.4	Acerca de las aplicaciones biológicas	200
7.5	Reflexiones generales	202

Agradecimientos	203
A Síntesis y Caracterización	207
A.1 Síntesis	207
A.2 Espectros de RMN	225
A.3 Caracterización espectrofotométrica	255
B Simulación DHA-DHAO	257
B.1 Programa	257
B.2 Simulaciones	264
Índice de figuras	267
Índice de esquemas	273
Índice de tablas	277
Bibliografía	279

Abreviaturas

#A	isómero abierto
#AP	isómero abierto antiparalelo
#C	isómero cerrado
#P	isómero abierto paralelo
A	aceptor de FRET
AB	anticuerpo secundario
ACN	acetonitrilo
AcO	acetato
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
BSA	albúmina de suero bovino
CCD	cromatografía en capa delgada
CD	ciclodextrina
CG	cromatografía gaseosa
CLSM	microscopía de barrido confocal
D	donor de FRET
dba	dibenzilidenacetona
DCA	dispositivo de carga acoplada
DCM	diclorometano
DHA	diheteroarileno
DHAO	diheteroarileno oxidado
DMD	arreglo de micro-espejos digitales
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EFE	estado fotoestacionario
EtOH	etanol
FABP	proteína de unión de ácidos grasos
FMOC	fluorenilmetiloxycarbonilo
FRET	transferencia de energía de resonancia de Förster

FWHM	ancho a mitad de altura
HMBC	espectroscopía de correlación de múltiples enlaces heteronuclear
HOMO	orbital molecular ocupado de mayor energía
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	espectroscopía de coherencia cuántica simple heteronuclear
IC	intersección cónica
IR	infrarrojo
LUMO	orbital molecular desocupado de menor energía
MeOH	metanol
NA	apertura numérica
n-BuLi	<i>n</i> -butil litio
NIR	infrarrojo cercano
NSOM	microscopio de barrido óptico de campo cercano
PALM	microscopía de localización fotoactivada
PAM	microscopio de arreglo programable
PF	proteína fluorescente
PMMA	polimetilmetilacrilato
PVA	polivinilacetato
PSF	función de dispersión de un punto
QD	quantum dot
RMN	resonancia magnética nuclear
SA	acidez del solvente
SB	basicidad del solvente
SdP	dipolaridad del solvente
SP	polarizabilidad del solvente
SSIM	microscopía de iluminación saturada estructurada
STED	microscopía de depleción estimulada de la emisión
STORM	microscopía de reconstrucción óptica estocástica
TBTA	tris-(benziltriazolil)-metilamina
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
THF	tetrahidrofurano
THT	tioflavina-T
TIRF	microscopía de reflexión total interna de la fluorescencia
TMS	trimetilsilano
UV	ultravioleta

Introducción

En el año 2014 se otorgó el premio Nobel de Química a tres científicos quienes desafiaron los límites de resolución impuestos por el proceso de difracción en la microscopía óptica. Los descubrimientos de Betzig, Hell y Moerner en las últimas décadas han fomentado el desarrollo de un sinfín de métodos de «super-resolución» con un inmenso impacto en campos desde la biología celular hasta la ingeniería de materiales. La posibilidad de localizar estructuras celulares con precisión nanométrica ha permitido elucidar mecanismos de translocación de material biológico dentro de la célula, y la capacidad de fabricar materiales organizando nano-estructuras ópticamente ha permitido explorar el comportamiento individual de dispositivos moleculares. De todas las técnicas ópticas, la microscopía de fluorescencia es actualmente la técnica más utilizada para la localización de objetos a nivel micro- y submicro-métrico.

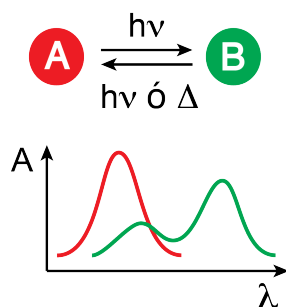
Mientras se lograron enormes avances en términos de vencer la barrera de resolución de la microscopía de fluorescencia con métodos físicos, el consenso general en los últimos años es que es necesario trasladar el enfoque al aspecto químico.^{1;2} Controlando las propiedades fotoquímicas de los compuestos fluorescentes se puede aprovechar al máximo la teoría asociada con cada método físico, además de generar nuevos métodos que exploten esas propiedades.

Fue con esa intención que se ideó este proyecto de tesis: aprovechar las propiedades teóricas de los métodos de super-resolución mediante la creación y optimización de fluoróforos fotocromicos sintéticos.

1.1 Fotocromismo

1.1.1 Fotocromismo

Cuando una dada molécula A sufre una reacción de isomerización al absorber un fotón, y el isómero formado B tiene un espectro de absorción diferente de A (Esquema 1.1), se dice que la molécula es fotocromica - es decir, cambia de color (*cromo*) por efecto de la luz (*foto*).³



Esquema 1.1: Fotocromismo de una dada molécula A.

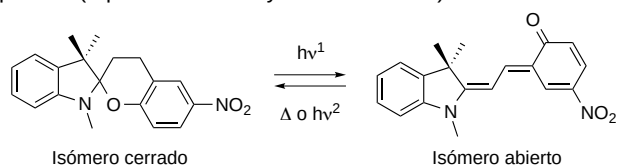
Si el isómero B no es térmicamente estable, puede sufrir espontáneamente una isomerización exotérmica al isómero A, lo que constituye un proceso termocrómico (fotocromismo tipo T). Si, al contrario, el isómero B es térmicamente estable, se puede dar un proceso fotoquímico en la dirección contraria, generándose nuevamente A mediante la absorción de luz por parte de B (fotocromismo tipo P). Naturalmente el proceso fotoquímico de isomerización de B compete con el proceso térmico, y la preferencia por alguno de estos caminos está determinada por la estructura de los isómeros y la naturaleza de la isomerización, además de la temperatura. Mientras la reversibilidad térmica es favorable para algunas aplicaciones, no es siempre el caso. La isomerización térmica es conveniente cuando, por ejemplo, se quiere activar el sistema con luz, detectar la señal, y luego que el sistema vuelva a las condiciones iniciales espontáneamente, sin más interferencias externas. Por otro lado, si el objetivo es activar y desactivar el sistema a tiempos no coincidentes con aquellos de la cinética térmica, es preferible despreocuparse de la reversión térmica con compuestos que solamente reviertan fotoquímicamente.

El comportamiento fotoquímico de los compuestos fotocromicos se puede describir en términos de los siguientes parámetros: rendimiento cuántico de fotoisomerización o fotoconversión; fotoestabilidad o resistencia a fatiga; grado de fotoconversión en el estado fotoestacionario. Se explicarán estos parámetros y su importancia en detalle en la Sección 1.2.

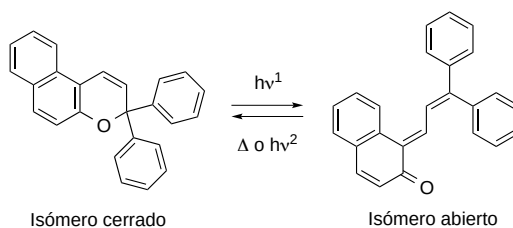
1.1.2 Compuestos fotocromicos

El fenómeno del fotocromismo no es explotado únicamente por el hombre; existen diversos sistemas biológicos fotocromicos. Las proteínas retinales que cada ser viviente de la tierra lleva en el ojo tienen como componente fundamental rodopsinas: bases de Schiff que sufren una isomerización Z-E al absorber luz visible (o ultravioleta en el caso de algunos animales).⁴ Las plantas regulan sus ritmos circadianos con la ayuda de los fitocromos: una isomerización E-Z del tetrapirrol desencadena una señal bioquímica.⁵ Estos sistemas optimizados por la

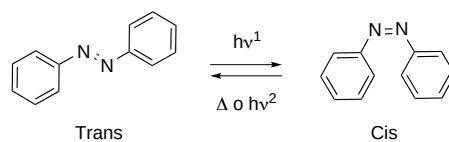
Espiropiranos (ruptura de enlace y electrociclación)



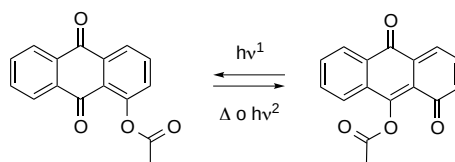
Cromenos (electrociclación)



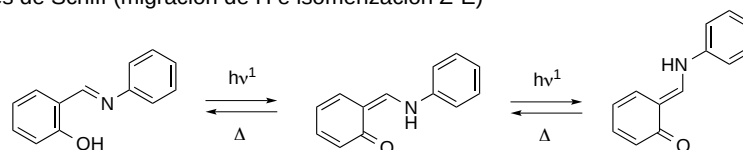
Azobenzenos (isomerización E-Z)



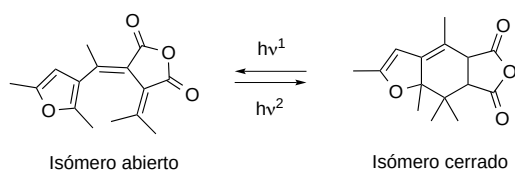
Quinonas policíclicas (migración de grupo funcional)



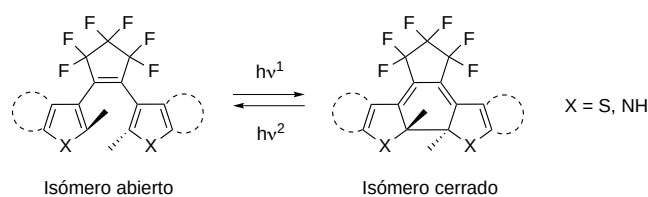
Bases de Schiff (migración de H e isomerización Z-E)



Fulgidas (electrociclación)



Diheteroariltenos (electrociclación)



Esquema 1.2: Familias de compuestos fotocromicos.

naturaleza pierden sus propiedades fotoquímicas si se separan los cromóforos del entorno proteico, y por ende se utilizan compuestos distintos para aplicaciones sintéticas. Algunas de estas familias de compuestos fotocromicos se pueden apreciar en el Esquema 1.2, donde se aclara el tipo de isomerización presentada por cada familia.

Las principales isomerizaciones fotoquímicas son: isomerizaciones E-Z de dobles enlaces; reordenamientos electrocíclicos; disociación de enlaces; migración de protones o grupos funcionales. Al tratarse en general de modificaciones sustanciales en la estructura de la molécula, las isomerizaciones conllevan otros cambios en las propiedades físico-químicas: polaridad, índice de refracción, flexibilidad conformacional y dimensiones, potenciales de óxido-reducción, etc. Las diversas propiedades que se adquieran o pierdan durante el proceso fotoquímico se pueden aprovechar para diversas aplicaciones. Por ejemplo, un cambio de conformación puede producir un cambio mecánico macroscópico de un cristal;⁶ un cambio en la conjugación a lo largo de la molécula fotocromica puede modificar la conductancia de un interruptor molecular.⁷

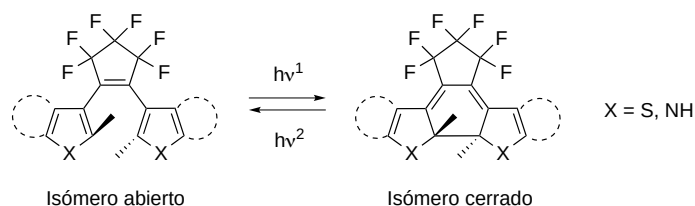
Es interesante destacar la reversibilidad térmica de todas las familias de compuestos excepto las fulgidas y los diheteroariletenos, quienes únicamente revierten fotoquímicamente. Los isómeros formados tienen una energía mayor debido a mayores impedimentos estéricos o sistemas conjugados menos favorables, y revierten al isómero más estable con el tiempo.

1.2 Diheteroariletenos

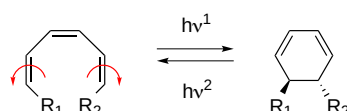
1.2.1 Estructura y fotocromismo

Los precursores de los compuestos alrededor de los cuales está basada esta tesis son los derivados de diheteroariletenos (DHAs), descubiertos por el Prof. Masahiro Irie de la Universidad de Rikkyo en Japón. A lo largo de casi tres décadas se dedicó a explorar extensamente las propiedades de estos compuestos, y la vasta mayoría de las citas en esta tesis corresponden a trabajos realizados por su grupo.

La estructura básica y el fotocromismo de los DHAs se puede observar en el Esquema 1.3. El mecanismo de isomerización es idéntico a la electrociclación concertada del 1,3,5-hexatrieno (Esquema 1.4), la cual cumple con las reglas de Woodward y Hoffman que, basadas en la simetría de los orbitales p, determinan los caminos de reacción permitidos para reacciones electrocíclicas térmicas y fotoquímicas. De acuerdo a aquellas reglas, la reacción fotoquímica de electrociclación involucrando 6 electrones procede por un mecanismo



Esquema 1.3: Estructura básica de un diheteroarilteno.

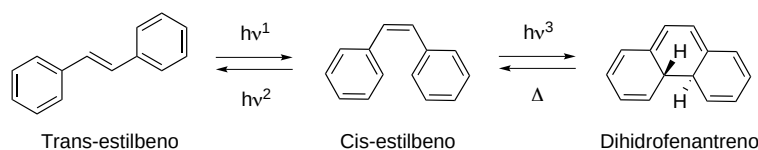


Esquema 1.4: Reacción fotoquímica de electrociclación del 1,3,5-hexatrieno disustituido.

conrotatorio, quedando los sustituyentes en posiciones 1 y 6 del trieno en caras opuestas del anillo generado.

El isómero abierto del DHA puede absorber luz ultravioleta (UV, < 400 nm) para isomerizar a la forma cerrada, que presenta absorción en el rango visible gracias a la extendida conjugación del sistema π . Si se irradia el isómero cerrado con luz visible, se produce la fotoreversión a la forma abierta. Ambos isómeros del DHA son térmicamente estables bajo condiciones normales de presión y temperatura y únicamente se interconvierten con la luz, a diferencia de su precursor estructural estilbeno (1,2-difenileno, Esquema 1.5), que sufre una electrociclación idéntica pero fotorevierte al isómero abierto a temperatura ambiente. La relativa estabilidad térmica de los DHAs en comparación con el estilbeno se debe a que la estabilización por aromaticidad del *cis*-estilbeno disminuye la energía de este isómero y favorece la fotoreversión del isómero cerrado.⁸ Si se reemplaza el grupo fenilo por un tienilo, benzotienilo o tiazol, la falta de aromaticidad en el isómero abierto equipara las energías de los dos fotoisómeros y resulta en mayor estabilidad térmica de ambos isómeros.

Adicionalmente, el doble enlace del etileno forma parte de un ciclo en el DHA, no así en el estilbeno. Se incorporó esta modificación con tal de maximizar el rendimiento de la reacción de fotociclación, prohibiendo la isomerización del doble enlace a la forma *trans*,



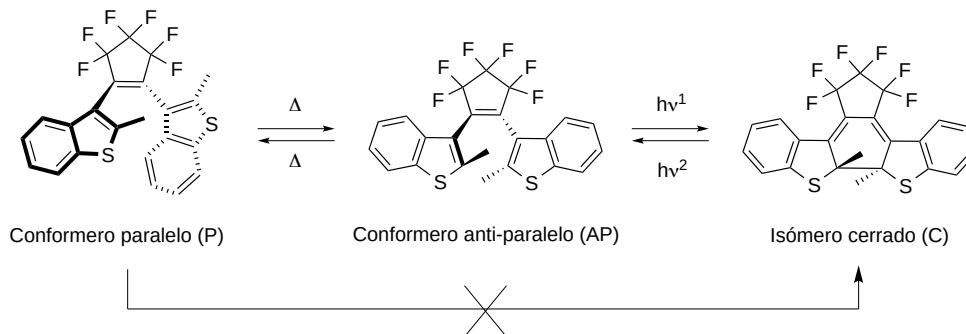
Esquema 1.5: Isomerizaciones fotoquímicas del estilbeno.

tal como ocurre con el estilbено. El uso de ciclos de 5 carbonos se debe a que existe una relación de compromiso de estabilidad energética entre la mayor flexibilidad del sistema con ciclos grandes al momento de producirse la fotociclación,⁹ y la mayor planaridad del isómero cerrado con ciclos pequeños que favorece una mayor conjugación del sistema π .¹⁰ Los DHAs con anillos ciclopenteno sustituidos con átomos de flúor son los más utilizados ya que las sustituciones aumentan la resistencia a fatiga del DHA.¹¹ DHAs con esta estructura básica pueden sufrir cientos de ciclos de fotoconversión con mínima fotodegradación.

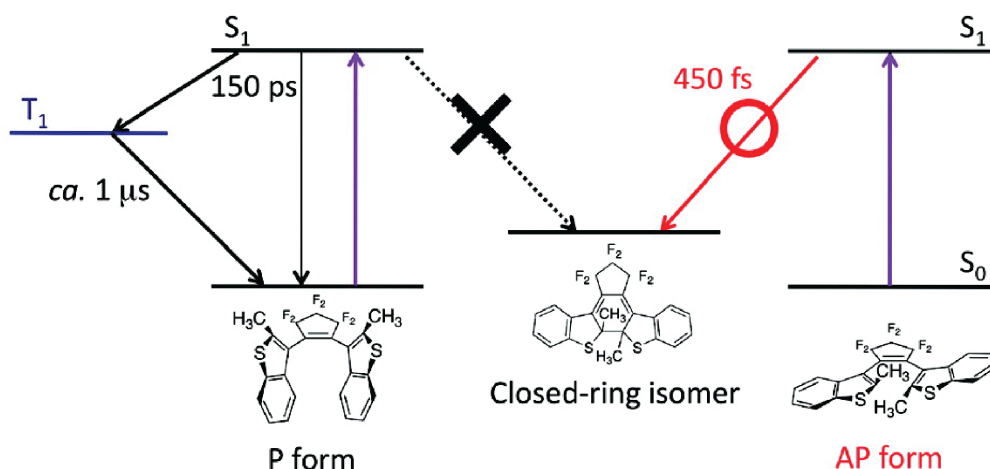
El isómero abierto del DHA presenta un equilibrio conformacional entre dos conformaciones denominadas paralela y anti-paralela, ejemplificado en el Esquema 1.6 con un DHA con grupos benzotiofeno (**1**). Debido a la condición de Woodward y Hoffman de que la reacción fotoquímica procede por un mecanismo conrotatorio, es estéricamente imposible que el conformero paralelo **1P** sufra una reacción de electrociclación fotoquímica. La isomerización ocurre por ende a partir del conformero anti-paralelo **1AP**, y en consecuencia el rendimiento de la reacción fotoquímica está limitado por el porcentaje de ese conformero presente en el equilibrio. El isómero cerrado tiene una cierta quiralidad, ya que los dos carbonos del centro reactivo tienen una estereoquímica definida, y por ende se pueden formar dos enantiómeros según la disposición del conformero AP.

1.2.2 Fotoquímica

Para comprender el efecto de modificaciones estructurales sobre la fotoquímica de los diariletenos es necesario entender el complejo sistema energético de los mismos. Ishibashi *et al.* utilizaron espectroscopía de absorción del transiente en los femtosegundos¹² para distinguir tres especies transientes al excitar el isómero abierto del DHA **1** (Esquema 1.7). Se confirmó que el estado excitado del conformero anti-paralelo rápidamente isomeriza a la forma cerrada con un tiempo de vida de 450 fs. El estado excitado del conformero paralelo, ya que no puede



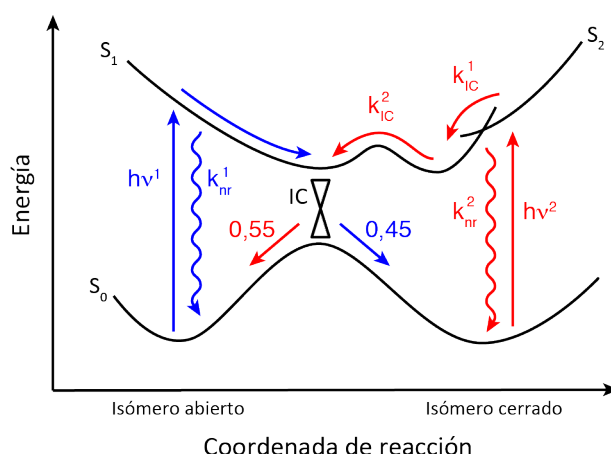
Esquema 1.6: Conformeros e isomerización de **1**.



Esquema 1.7: Procesos fotofísicos y fotoquímicos del DHA 1. Reimpreso con permiso de Ishibashi *et al.*¹² Copyright 2016 American Chemical Society.

sufrir la reacción de fotoisomerización, tiene un tiempo de vida mayor de 150 ps. Desde este estado decae o bien al triplete, o bien emite fluorescencia para volver al estado fundamental. El rendimiento cuántico de fluorescencia del isómero abierto es del 1,2%.

En el Esquema 1.8 se representan los niveles energéticos correspondientes al fotocromismo del DHA 1.¹³ En azul se aprecian los procesos relacionados con la fotociclación del confórmero 1AP, y en rojo aquellos relacionados con la fotoreversión del isómero 1C. Ambas isomerizaciones ocurren a través de una intersección cónica (IC), donde la probabilidad de decaer al isómero abierto es del 55% y al isómero cerrado 45% (estas probabilidades varían según la estructura del DHA).



Esquema 1.8: Niveles energéticos correspondientes a los isómeros de 1. Adaptado con permiso de Ishibashi *et al.*¹³ y Uno *et al.*¹⁴ Copyright 2016 American Chemical Society.

El proceso de fotociclación (azul) comienza con la excitación del isómero **1AP** (recordar que el conformero **1P** no tiene posibilidad de isomerizar, solamente decae no-radiativamente o emite fluorescencia). Desde ahí hay dos caminos posibles: decaimiento no-radiativo (k_{nr}^1), o relajación hasta la IC. Se estimó que al llegar a la IC se procede al isómero cerrado con un 45% probabilidad, mientras que se relaja al mismo conformero de partida con un 55% probabilidad. En total, se produce la fotociclación de este compuesto con un rendimiento cuántico de 0,31¹⁵ (recordar también que este valor está limitado aproximadamente a 0,65, debido a la fracción de isómero abierto en conformación paralela).

La excitación del isómero cerrado **1C** con luz visible lleva al sistema a un estado S_2 , del cual pasa rápidamente (100 fs) al estado S_1 a través de otra intersección cónica (k_{IC}^1 ; no se entrará en detalle en este proceso). Luego, es necesario superar una barrera de activación para llegar a la IC, y el proceso está caracterizado por k_{IC}^2 . Esto significa que el proceso depende fuertemente de la temperatura, mientras que el proceso de fotociclación es independiente de kT .¹³ Desde el IC, decae a uno de los dos isómeros con las mismas probabilidades de arriba. A pesar de la barrera de activación, el rendimiento cuántico es de 0.28,¹⁵ no mucho menor que el rendimiento de ciclación.

En la Figura 1.1 se observa el espectro de absorción del DHA **1**. El isómero abierto absorbe mayormente en el UV lejano, mientras que el isómero cerrado **1C** presenta dos nuevos máximos a 352 nm y a 523 nm. Es importante notar que **1C** también absorbe en el UV, donde es necesario excitar el isómero abierto para lograr la fotoconversión. Esto significa que al generarse **1C** durante la fotociclación, este va a absorber una fracción de la luz y también va a fotorevertir a la forma abierta. Debido a esta superposición de espectros de absorción, al irradiar un tiempo infinito con luz UV, no se logra nunca un 100% de isómero cerrado, sino

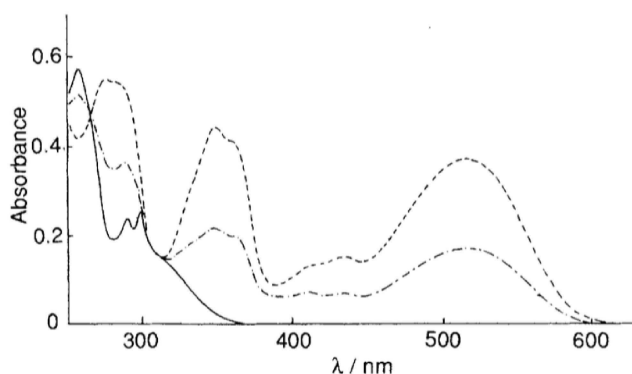


Figura 1.1: Espectro de absorción de **1**: isómero abierto (línea continua), estado fotoestacionario (línea punto-rayada), isómero cerrado (línea rayada). Adaptado con permiso de Hanazawa *et al.*¹⁰ Copyright 2016 Royal Society of Chemistry.

que se llega a un equilibrio fotoestacionario entre las dos especies, isómeros abierto (A) y cerrado (C). El grado de fotoconversión al isómero cerrado en el estado fotoestacionario (EFE) se define $\alpha_{EFE} = C_C/C_T$, donde C_C es la concentración del isómero cerrado en el equilibrio y C_T es la concentración total del DHA.

1.2.3 Modificación de las propiedades fotoquímicas

Inspirados en el fotocromismo reversible y la resistencia a fatiga durante cientos de ciclos de fotoconversión, varios grupos se dedicaron a investigar las propiedades de los DHAs durante casi dos décadas en búsqueda de controlar y modificar sus propiedades fotoquímicas. Los descubrimientos más relevantes a este proyecto se describen a continuación.

Rendimiento cuántico de fotociclación

Uno de los factores limitantes para lograr un mayor rendimiento cuántico de la reacción de fotociclación es la proporción de isómero abierto paralelo que no puede sufrir una isomerización. Se propusieron varias estrategias para retener el DHA abierto en su forma anti-paralela: inclusión en la cavidad de ciclodextrina, restringiendo el movimiento de la molécula;¹⁶ inclusión en una cadena polimérica extendida que favorece la conformación anti-paralela;¹⁷ sustituyentes voluminosos en posiciones 2 y 2' para impedir estéricamente la formación del conformero paralelo.^{18;19} También se puede controlar la estabilidad del isómero paralelo, vía puentes de hidrógeno o puentes disulfuro intramoleculares,²⁰ o influenciar el equilibrio entre los dos conformeros secuestrando el conformero paralelo con sacáridos²¹ o iones metálicos.²²

Rendimiento cuántico de fotoreversión

La eficiencia de fotoreversión se puede disminuir ubicando sustituyentes donores de electrones en los extremos 6 y 6' del DHA, ya que la inyección de electrones al sistema conjugado π estabiliza el isómero cerrado.²³ Si los sustituyentes se introducen en 2 y 2', su ubicación más cercana al centro reactivo aumenta el efecto que tienen sobre la fotoquímica: electro-atractores aumentan el rendimiento de cicloreversión al doble mientras que electro-donores lo disminuyen en un orden de magnitud.²⁴ Estas sustituciones tienen más impacto en los niveles energéticos del isómero cerrado, por ende no se aprecian grandes cambios en la eficiencia de fotociclación ya sea con atractores o donores de electrones.

El rendimiento de fotoreversión también es dependiente de la temperatura y de la longitud de onda de irradiación debido a la existencia de una barrera de activación que tiene que superar el isómero cerrado excitado para llegar a la IC (Esquema 1.8). A mayor temperatura se supera más fácilmente esta barrera, y aumenta el rendimiento.¹³ La longitud de onda de irradiación correlaciona de la misma manera con el tamaño de la barrera energética:²⁵ longitudes de onda menores proporcionan más energía vibracional, facilitando la formación del isómero abierto.

Rendimiento cuántico de fotodegradación

El isómero cerrado del DHA sufre una reacción irreversible de fotodegradación bajo irradiación con UV que modifica el centro reactivo, generando un producto no fotocromático. Se ha demostrado recientemente que grupos atractores de electrones ayudan a disminuir el rendimiento de la fotodegradación,²⁶ así como también el anillo de carbonos¹¹ o azufres²⁶ perfluorados. También se ha demostrado la capacidad de reducir la fotodegradación induciendo la fotociclación a partir del estado triplete con un sensibilizador orgánico.²⁶

1.2.4 Solubilización

Para muchas aplicaciones en microscopía celular, y en particular para el estudio de procesos en tiempo real, es necesario que las sondas fluorescentes sean compatibles con el medio biológico. Esto significa que deben ser solubilizadas en agua y conservar ahí las propiedades fotoquímicas correspondientes. Algunas moléculas orgánicas pequeñas pueden presentar ciertos desafíos a superar: decaimiento del estado excitado por interacción con moléculas de solvente polar; grandes estructuras hidrofóbicas; requerimientos de pH o condiciones redox incompatibles con el medio celular. Los DHAs son conocidos por su pobre solubilidad en agua, debido a la hidrofobicidad de la estructura heteroarílica. Dentro de las estrategias utilizadas para su solubilización hay métodos covalentes y no-covalentes, y se describen brevemente a continuación.

La inclusión en ciclodextrina de DHAs no solo tiene la propiedad de favorecer el isómero abierto anti-paralelo,²⁷ sino que además la estructura tipo barril de la ciclodextrina proporciona un ambiente hidrofóbico en su interior para proteger al DHA del entorno acuoso, y residuos hidrofílicos en el exterior para una interacción favorable con el solvente. DHAs de distintas estructuras se lograron solubilizar de esta manera en agua,¹⁶ confirmándose por RMN que de hecho el isómero abierto anti-paralelo se encontraba incluido en la cavidad y que se conservaban las propiedades de fotoconversión. Otros cavitandos también se han utilizado con resultados parecidos.²⁸ También se logró solubilizar un DHA pequeño por adsorción a la

superficie de la albúmina humana,²⁹ con la particularidad de que la quiralidad de la albúmina se transfirió a la fotoconversión del cromóforo.

La modificación covalente de DHAs con sustituyentes hidrofílicos es otra técnica exitosa de solubilización. Polyakova et al. solubilizaron un ditienileteno en agua modificándolo con grupos sulfito, con la desventaja de una ruta sintética larga.³⁰ En el 2013 se publicaron casi simultáneamente trabajos de dos grupos que derivatizaron DHAs con sacáridos: Tong et al. modificaron su cromóforo con glucosa mediante una reacción tipo click;³¹ y Shoji et al. con cadenas de polietilenglicol e inositol.³² Ambos lograron una alta solubilidad de sus compuestos en soluciones acuosas en relativamente pocos pasos de síntesis. La capacidad de las unidades de sacáridos de solubilizar a sus moléculas dependen de la distancia entre el sacárido y el centro heteroarílico: al aumentar el número de unidades de fenilo entre el DHA y el sacárido, la solubilidad disminuye exponencialmente.³³

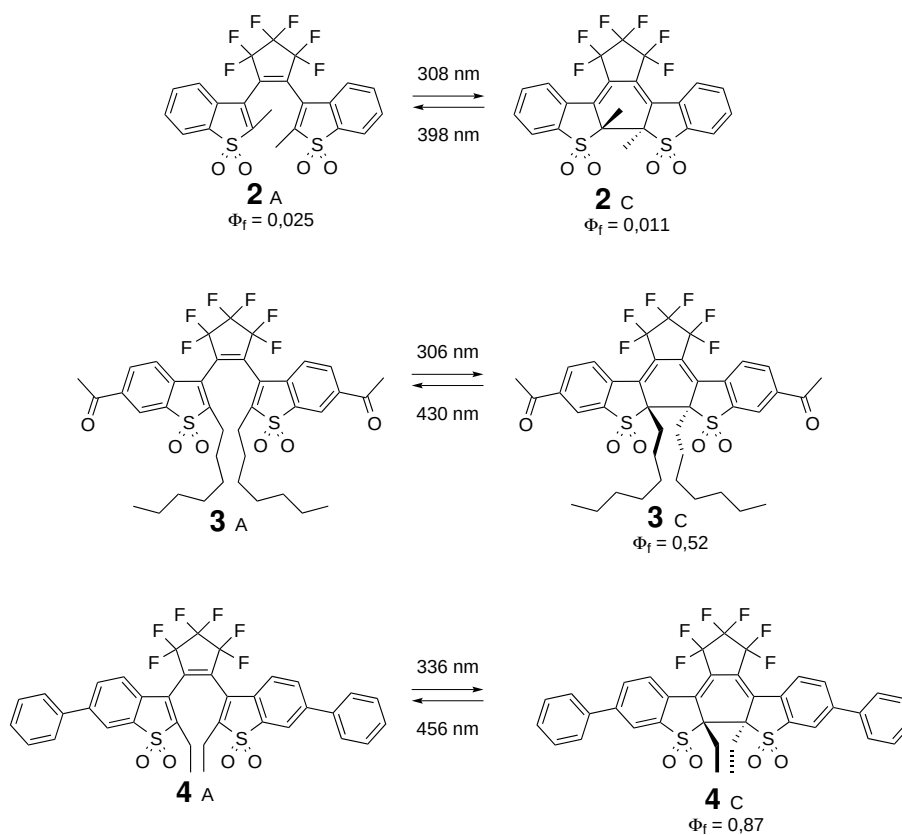
Al modificar algunos DHAs con cadenas de polietilenglicol de distintos largos, las moléculas no permanecen libres en solución sino que se agregan para formar ensamblados supramoleculares o estructuras tipo membrana.^{34;35} Los residuos hidrofílicos se acomodan en el exterior del ensamblado y los centros de reacción prefieren el entorno hidrofóbico en el interior. Mientras a bajas temperaturas los ensamblados son solubles, al aumentar la temperatura³⁶ o al isomerizar³⁵ se tornan turbias las soluciones, indicando un cambio en la solubilidad poco apto para aplicaciones celulares. Grupos alquílicos o arílicos en serie unidos a los diariletenos favorecen la formación de ensamblados supramoleculares tipo fibrilares o cristalinos que o se desarmen o cambian de conformación macroscópica al fotoconvertir el fotocromóforo.³⁷ Los agregados conservan la fotoquímica de los diariletenos pero no son aptos como sondas para microscopía.

Las nanopartículas también se han usado como plataforma de solubilización de DHAs. Nanopartículas de polímeros biocompatibles³⁸ y nanopartículas de sílica³⁹ se pueden dopar o conjugar con DHAs, transfiriéndolos efectivamente a soluciones acuosas mientras se conservan sus propiedades. Distintos grupos recubrieron nanopartículas con capas de polímeros, tal de generar entre las capas un espacio hidrofóbico adecuado para el cromóforo. Se solubilizaron de esta manera DHAs con nanopartículas de NaYF₄ dopadas con lantánidos,⁴⁰ y con nanopartículas semi-conductoras tipo core-shell.⁴¹ Existen muchos ejemplos de nanopartículas con distintos cromóforos o fluoróforos, y cada uno tiene una combinación única de las propiedades de las nanopartículas con la fotoquímica de los DHAs, lo cual hace muy versátil este tipo de plataformas.

1.3 Diheteroariletenos fluorescentes

1.3.1 Estructura, espectros y origen de fluorescencia

El isómero abierto del DHA básico **1** de la Sección 1.2 tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) de 0,012. En el año 2005 el grupo de Yang, Ahn y Kim descubrieron que al oxidar los sulfuros resultaba fluorescente también el isómero cerrado **2C**⁴² con $\Phi_f = 0,011$ (Esquema 1.9). En el 2008 el mismo grupo logró aumentar la fluorescencia de la especie cerrada sintetizando **3** con sustituyentes voluminosos en las posiciones 2 y 2' y grupos acetilo en posiciones 6 y 6', con Φ_f de **3C** de 0,52.⁴³ La fluorescencia del isómero abierto **3A** se volvió irrelevante y se comenzó a hablar de un DHA fluorescente solamente en la forma cerrada. Luego, en el 2011, el grupo de Irie consiguió un valor de Φ_f de 0,87 con grupos etilo en posiciones 2 y 2' y fenilos en 6 y 6' (**4C**).¹⁴ A raíz de estos trabajos surgió el interés en los diheteroariletenos oxidados (DHAOs) como potenciales fluoróforos foto-modulables para aplicaciones en microscopía de super-resolución y dispositivos de memoria óptica.



Esquema 1.9: Estructura básica de un DHA oxidado.

En la Figura 1.2 se pueden apreciar las diferencias entre los espectros de absorción y emisión de **1** y **4**, en representación de los DHAOs. Mientras el isómero abierto de **1** es fluorescente (Figura 1.2B) al excitar a 315 nm y emite alrededor de 436 nm,¹⁰ el isómero cerrado de **4** es la especie fluorescente, emitiendo a 550 nm al excitar con 488 nm.¹⁴ La fluorescencia de **4C** viene acompañada de un corrimiento en los máximos de absorción y emisión: el isómero abierto absorbe a longitudes de onda mayores al oxidar el DHA, a pesar de que sigue absorbiendo únicamente en el UV; la banda de absorción a 530 nm de **1C** parece correrse hacia el azul y **4C** absorbe a 450 nm; el máximo de emisión para **4C** está corrido al rojo respecto al del isómero abierto de **1**. Además, hay un aumento notable del grado de fotoconversión, que llega al 99% para **4**. ¿A qué se deben estos cambios?

Cálculos teóricos realizados por Jeong *et al.*¹⁵ (Esquema 1.10) revelan las diferencias entre los niveles HOMO y LUMO de **1C** y **2C** y ayudan a interpretar los cambios espectrales. La densidad electrónica del HOMO de **1C** está distribuida homogéneamente sobre la molécula; en particular, hay densidad electrónica concentrada sobre los sulfuros, de signo opuesto a las nubes localizadas en átomos adyacentes, generando nodos entre estos átomos. En el HOMO de **2C** la presencia de los átomos de oxígeno abstrae la densidad electrónica de los sulfuros, reduciendo así el impacto de los nodos y estabilizando el HOMO. A la vez, el LUMO tanto de **1** como de **2** no presenta particular concentración de densidad electrónica sobre los sulfuros, entonces la presencia de oxígenos no modifica especialmente la energía de estos niveles. Al disminuir la energía del HOMO y mantenerse la energía del LUMO, se corre la banda de absorción del isómero cerrado hacia el azul.

El corrimiento de aproximadamente 50 nm de la banda de absorción del isómero abierto de **1** a **4** hacia el rojo correlaciona con la extensión de la conjugación del sistema π . Por otro lado, el

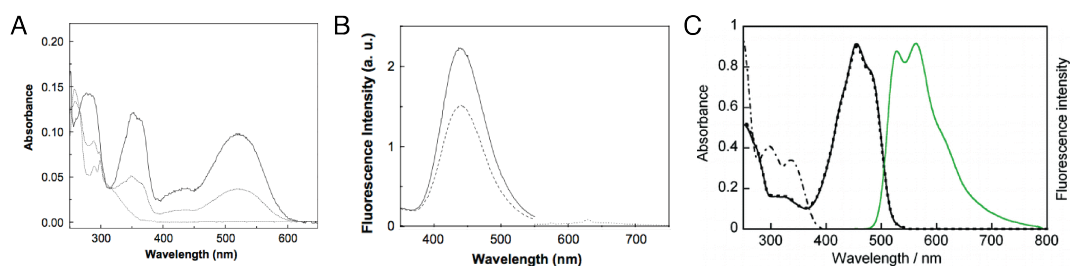
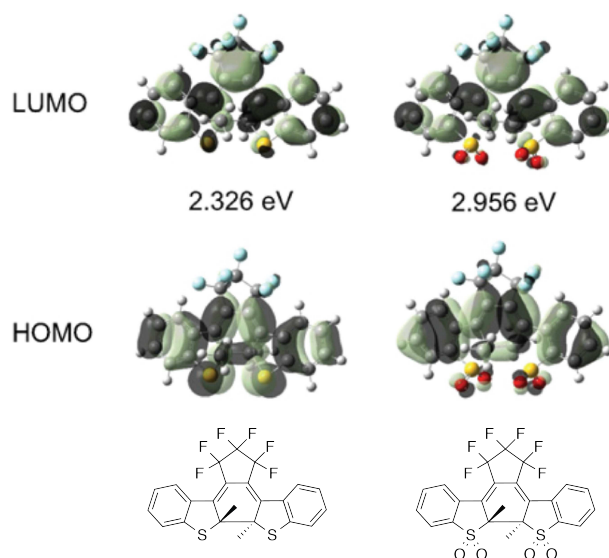


Figura 1.2: A) Absorción de **1**: isómero abierto (línea punteada), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea continua). B) Emisión de **1**: isómero abierto (línea sólida), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea punteada). C) Absorción de **4**: isómero abierto (línea punto-rama), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea continua) y emisión del estado fotoestacionario (línea verde). Adaptado con permiso de Jeong *et al.*¹⁵ (A, B) y Uno *et al.*¹⁴ (C). Copyright 2016 Elsevier y Copyright 2016 American Chemical Society.



Esquema 1.10: HOMO (abajo), LUMO (arriba) y la diferencia energética entre los dos orbitales para **1** (derecha) y **2** (izquierda). Adaptado con permiso de Jeong *et al.*¹⁵ Copyright 2016 Elsevier.

corrimiento de la fluorescencia hacia el rojo se relaciona con la longitud de onda de excitación: el isómero abierto de **1** se excitaba a 315 nm, mientras que el **4C** se excita a 450 nm.

1.3.2 Fotoquímica

Hasta el momento no se han caracterizado en tanta profundidad a los DHAOs como a los no-oxidados, y no hay estudios computacionales disponibles en la literatura como para sacar conclusiones sólidas respecto de las superficies de energía potencial involucradas en su comportamiento fotoquímico. No obstante, sobre la base de los diagramas de energía de los DHAs detallados en la Sección 1.2 se pueden ofrecer hipótesis razonables para explicar los datos experimentales.

Una vez excitado el isómero cerrado de, por ejemplo, el compuesto **4**, la energía en exceso debe ser liberada de alguna manera, y hay solo tres caminos por los cuales se logra esto: decaimiento no-radiativo, emisión de luz, o el camino hacia la IC y consecuentemente la reacción de fotoreversión. Por ende, el aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia de **4C** debe ser balanceado por una disminución en la constante de alguno de los otros procesos; ciertamente, mientras el $\Phi_{C \rightarrow A}$ de **1C** es de 0,28,¹⁵ el $\Phi_{C \rightarrow A}$ de **4C** es casi tres órdenes de magnitud menor (0,0004).¹⁴ Hay una diferencia considerable entre el $\Phi_{C \rightarrow A}$ de **4C** y el de **2C** (igual a 0,061), y esto se debe a la estabilización extra que le proporcionan los dos grupos fenilo y su correspondiente extensión del sistema π al isómero cerrado.

Los rendimientos cuánticos de fotociclación de los DHAOs son parecidos a los de **1**: $\Phi_{A \rightarrow C} = 0,31$ para **1**; 0,22 para **2**; 0,40 para **3**; 0,42 para **4**. Esto indica que la diferencia energética entre los isómeros abiertos fundamental y excitado no se ve afectada por la oxidación de los sulfuros.

Con estos datos se puede explicar el aumento en el grado de fotoconversión indicado en la Sección 1.3.1: $\alpha_{EFE} = 0,43$ para **1** mientras $\alpha_{EFE} = 0,99$ para **4**. A pesar de que el coeficiente de absorción molar de **4C** es apreciable a la longitud de onda de fotociclación, el $\Phi_{C \rightarrow A}$ es órdenes de magnitud menor que el $\Phi_{A \rightarrow C}$, y la reacción de fotoreversión simplemente no es suficientemente eficiente como para competir con la fotociclación.

1.3.3 Efecto de sustituyentes

En búsqueda de mejorar las propiedades fotoquímicas de los DHAOs, Jeong *et al.* publicaron el primer efecto de sustituyentes en el 2008.⁴⁴ La molécula **3** presentó longitudes de onda de absorción y emisión corridas al rojo respecto de **2** gracias a los grupos heptilo en las posiciones 2 y 2' y grupos acetilo en 6 y 6'. En el 2011, Uno *et al.* ofrecieron un estudio más detallado del efecto de los sustituyentes en 6 y 6', en particular con grupos fenilo y tienilo funcionalizados.¹⁴ Al extender la conjugación del sistema π con grupos fenilo, la longitud de onda de absorción de todos los isómeros, pero particularmente el isómero cerrado, se corrió hacia el rojo. Los rendimientos cuánticos de fotoreversión disminuyeron y el rendimiento cuántico de fluorescencia aumentó. Grupos tienilo tuvieron un mayor efecto sobre el corrimiento de las bandas de absorción, pero el rendimiento cuántico no fue tan alto y los rendimientos de fotoconversión disminuyeron. Adicionalmente, los DHAOs funcionalizados con grupos tienilo presentaron fotodegradación comparable con otros fluoróforos comerciales como la rodamina o la fluoresceína, y mucho mayor que con grupos fenilo.

En el 2012 el mismo grupo publicó un trabajo donde estudiaban el efecto de sustituyentes alquílicos en 2 y 2'.⁴⁵ Al aumentar el largo de la cadena alquílica de metilo a *n*-butilo, los máximos de absorción y rendimientos cuánticos de fotoconversión no sufren grandes modificaciones, pero sí aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia desde 0,64 para metilo a 0,87 para etilo, y luego se mantiene para *n*-propilo y *n*-butilo. Sospechando que el sustituyente en posición 2 y 2' tenía algún efecto sobre el entorno de los sulfóxidos, se midieron las propiedades fotoquímicas en solventes de diferente polaridad. Se observó que el tiempo de vida media de fluorescencia no era tan susceptible a la polaridad del solvente con el grupo etilo (3,2 ns en hexano y 2,7 en acetonitrilo)) pero sí lo era con metilo (2,7 ns en hexano y 0,55 en acetonitrilo). Además, el aumento de la constante de decaimiento no radiativo era mucho menor para etilo ($2,4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ en hexano y $1,1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ en acetonitrilo)

que para metilo ($5,7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ en hexano y $1,5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ en acetonitrilo). Se postuló que los sustituyentes en 2 y 2' defienden a los grupos sulfóxidos de interacciones desfavorables entre estos grupos y las moléculas del solvente. Sin esta protección, la constante de decaimiento no radiativo es mayor cuanto más polar el solvente debido a la eficiente desactivación del estado excitado por interacciones intermoleculares. Se adoptó el modelo energético de la Sección 1.2 para arribar a estas conclusiones, asumiendo que el perfil energético general para DHAs y DHAOs es similar.

Recientemente se publicó la modificación de un DHAO fluorescente donde se reemplazó el ciclo perfluorado por dos grupos ciano sobre el etileno.⁴⁶ El espectro de absorción del isómero abierto se extiende hasta 460 nm (aunque con coeficientes de absorción molar menores a $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a partir de $\sim 430 \text{ nm}$), haciendo posible la fotociclación con luz visible en lugar de UV.

No se encuentran trabajos de solubilización de estos compuestos en la literatura, ni tampoco trabajos aplicados donde los DHAOs se utilicen como sondas para sistemas biológicos. No obstante, las propiedades fotoquímicas de estos compuestos son de interés como futuras sondas para microscopía de fluorescencia de super-resolución.^{47;48;49} A continuación se detallan los fundamentos de la microscopía de fluorescencia, y los requisitos de fluoróforos y limitaciones de los DHAOs para este tipo de aplicaciones.

1.4 Microscopia de fluorescencia

1.4.1 Fundamentos y técnicas convencionales

La microscopía de fluorescencia es una técnica que permite observar y localizar estructuras sub-micrométricas con un máximo de versatilidad y un mínimo de daño irreversible a la muestra. La capacidad de marcar independientemente diferentes partes de una célula con anticuerpos o sondas sintéticas y luego visualizar los marcadores con una alta relación señal-ruido ha permitido a biólogos y bioquímicos estudiar procesos intracelulares con un nivel de detalle sin precedentes. El microscopio tradicional mas común es el de epifluorescencia, que utiliza iluminación de campo amplio para excitar la muestra. La fluorescencia se colecta nuevamente a través del objetivo y la imagen que se obtiene está formada por puntos de luz, provenientes de cada fluoróforo, limitados por difracción.

Al atravesar una lente perfecta con una apertura circular, el patrón de difracción de luz que se forma en el foco se denomina el patrón de Airy⁵⁰ y se muestra en la Figura 1.3. Consta de un disco central brillante y anillos concéntricos de menor intensidad. El disco central del patrón

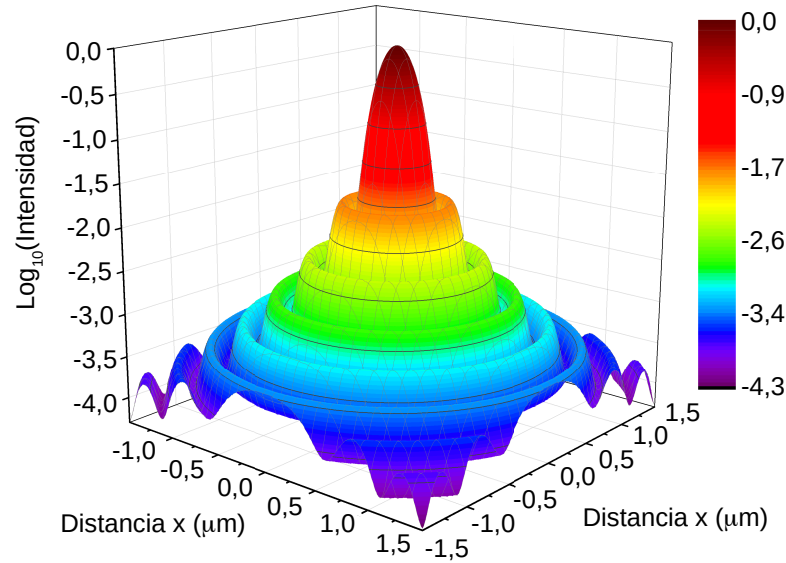


Figura 1.3: Intensidad del patrón de Airy en escala logarítmica.

se llama el disco de Airy, y sus dimensiones están determinadas por la longitud de onda del haz de incidencia y el diámetro de la apertura circular. En 1835, Abbe describió este límite de difracción de la luz⁵¹ como:

$$d = \frac{\lambda}{2\eta \sin \theta} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.1)$$

donde d es la mínima distancia de resolución de dos puntos, λ es la longitud de onda, η es el índice de refracción del medio, θ es el ángulo de incidencia del haz y NA es la apertura numérica del objetivo. Para un haz verde de 500 nm y una $NA = 1$, el límite de Abbe es aproximadamente 250 nm lateralmente (en los ejes x e y) y alrededor del doble axialmente (eje z , paralelo a la dirección de luz incidente). El límite de Abbe significa que una molécula fluorescente con un diámetro aproximado de 2 nm va a aparecer como un punto de diámetro 200 nm en la imagen. Claramente, la pérdida de información debido a la falta de resolución es muy grande.

La función de dispersión de un punto (PSF, del inglés) es el patrón de difracción que genera una fuente de luz puntual transmitida al plano de la imagen a través de un objetivo de alto NA . En el caso de usar una lente perfecta y una apertura circular, la PSF tiene la misma forma que el patrón de Airy. Si se utiliza el mismo objetivo para la iluminación de la muestra y la recolección de la imagen, la PSF equivale al patrón de iluminación de la muestra. La región central de la PSF (el disco de Airy) se puede aproximar a un perfil Gaussiano para facilitar el análisis estadístico de la imagen.

Una de las primeras mejoras en la resolución se consiguió con la invención del microscopio

de barrido confocal (CLSM⁵²). La luz recolectada por el objetivo es enfocada en una pequeña apertura, tal que se restringe la luz que pasa a través de esta apertura a aquella proveniente exactamente del punto focal,⁵³ reduciendo contribuciones de fuentes de luz fuera del plano y aumentando la resolución en un factor de aproximadamente 1,5. Aún así, no se pueden resolver proteínas y estructuras intracelulares individuales con esta técnica, y es necesario utilizar técnicas que logren una mayor resolución.

1.4.2 Técnicas de super-resolución

En las últimas décadas se desarrollaron varios microscopios que vencen el límite de difracción de Abbe. Se denomina al conjunto de estos métodos microscopías de fluorescencia de *super-resolución*. Estas técnicas se pueden dividir en tres clases principales: microscopía de campo cercano; microscopía de excitación con patrones espaciales; y microscopía de localización de moléculas individuales.

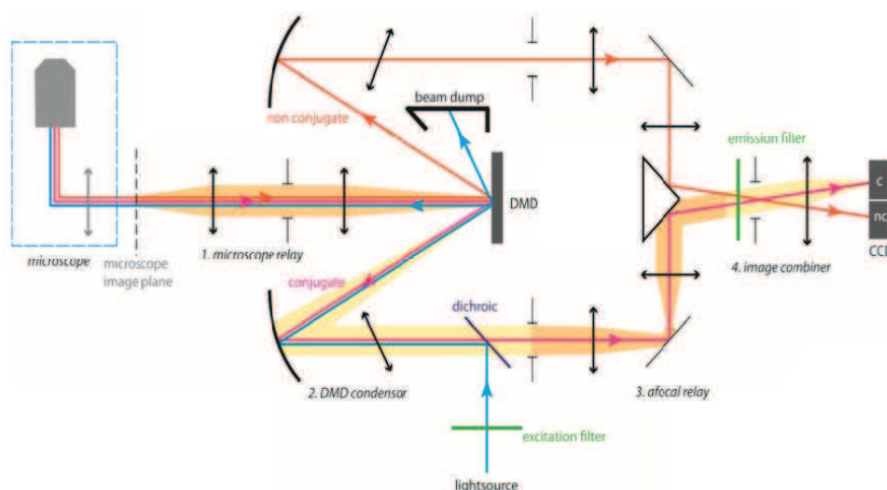
La microscopía de campo cercano mejora la resolución para superficies, usando o bien reflexión total interna (TIRF⁵⁴ - las siglas para cada técnica provienen de sus nombres en inglés) para minimizar señales que se encuentren fuera de foco, o bien iluminando la muestra desde distancias suficientemente cortas como para evitar totalmente la difracción (NSOM⁵⁵).

La microscopía de excitación con patrones espaciales se puede subdividir en dos técnicas: la microscopía por agotamiento estimulado de emisión (STED,⁵⁶) y la microscopía de iluminación saturada estructurada (SSIM⁵⁷). En la microscopía STED un punto de la muestra es iluminado por un haz de excitación, seguido rápidamente por un laser de agotamiento estimulado en forma de dona, forzando emisión concurrente y agotando la fluorescencia en ese área, permitiendo la detección de emisión únicamente desde un punto céntrico de tamaño menor al original. La técnica de STED ha logrado una resolución de ~ 30 nm,⁵⁸ que representa un aumento de resolución importante comparado con las técnicas de microscopía tradicionales. En SSIM se ilumina la muestra con un patrón sinusoidal de intensidad de fase variable,⁵⁷ que permite extraer información espacial con frecuencias mayores a las normalmente observables. Si además se satura el estado excitado del fluoróforo aumentando la intensidad en el máximo de la señal sinusoidal, se obtiene una respuesta no-lineal de la emisión del fluoróforo. En combinación, se aumenta la resolución más de 2 veces en comparación con el límite de Abbe, hasta una resolución lateral de 50 nm.⁵⁹

Por último, la microscopía de localización de moléculas individuales se basa en la excitación al azar de moléculas individuales en una muestra, de tal manera de lograr una determinación precisa de la localización de los emisores.⁴⁸ La clave para la precisión de esta técnica es minimizar el error de cada determinación, acumulando un gran número de fotones de

cada punto que aparece en la imagen (cada punto corresponde idealmente a una molécula). Teóricamente una resolución de 1-2 nm es posible recolectando 10.000 fotones de cada molécula, pero para lograr esto el fluoróforo debe ser lo suficientemente estable como para sufrir 10.000 ciclos excitación-emisión antes de fotodegradarse. En la microscopía de localización fotoactivada (PALM^{60;61}) se utilizan mutantes de proteínas fluorescentes (PF) como la GFP^{49;62;63} (PF verde) fotoactivables,^{64;65;66} reversiblemente fotomodulables^{67;68} o cuya emisión cambia de longitud de onda^{69;70} tras una activación. Las transformaciones fotoquímicas son en general isomerizaciones cis-trans del cromóforo dentro del barril tipo beta de la proteína, que modifican los puentes de hidrógeno formados entre el cromóforo y el barril y modulan las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los fluoróforos. Las fotoconversiones ocurren al irradiar con luz UV o visible de energía adecuada. Tanto PFs como moléculas pequeñas orgánicas^{49;71} y quantum dots (QDs) «parpadean» espontáneamente al ser irradiados (en el caso de los QDs⁷² y las PFs⁶²) o bien en condiciones adecuadas de pH y en presencia de agentes reductores (por ejemplo los derivados de cianinas⁷³). El parpadeo se observa gracias a la transición $S_1 \rightarrow T_1$, que lleva el sistema a un estado triplete oscuro y con mayor tiempo de vida media, regulando así el tiempo que lleva encendido (t_{on}) y apagado (t_{off}) el fluoróforo. Este fenómeno se utiliza en la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM⁷⁴), capaz de localizar fluoróforos multicolor con una resolución de ~ 25 nm.^{72;75}

En el laboratorio del Dr. Thomas Jovin se viene desarrollando hace más de una década el microscopio de arreglo programable^{76;77} (PAM, Esquema 1.11). Este microscopio utiliza un arreglo de micro-espejos digitales (DMD) que está situado antes del objetivo. El haz de luz es reflejado del DMD e impacta a la muestra con un patrón dado por el arreglo de los



Esquema 1.11: Diseño óptico del microscopio de arreglo programable de 3ra generación. Reimpreso con permiso de De Beule *et al.*⁷⁶ Copyright 2016 SPIE.

espejos. La fluorescencia de las moléculas localizadas en los espacios luminosos del patrón pasan nuevamente por el DMD, y la luz se divide en dos: luz conjugada, que incide sobre los espejos «encendidos», y luz no-conjugada, que incide sobre espejos «apagados». Mediante iluminación estructurada de la muestra, la luz proveniente del foco se recupera de las imágenes conjugadas y no-conjugadas, cuya diferencia rinde una imagen con resolución axial similar a un sistema confocal de barrido, pero en este caso con iluminación de campo amplio. Como consecuencia, el PAM permite una velocidad de adquisición muy superior ($10\text{-}100\times$) a la de microscopía confocal y se obtienen imágenes de mayor intensidad debido a que se evita la saturación que limita la máxima irradiancia posible en sistemas de barrido y al bajo ruido de lectura y la alta sensibilidad y linealidad que caracterizan a las cámaras digitales emCCD y sCMOS. Además, la capacidad de iluminación estructurada programable permite excitar únicamente las áreas de la muestra que interesan, y limitar así la fotodegradación de regiones que no son de interés, o que están sobrepobladas de fluoróforos. Con fluoróforos adecuados y rutinas de iluminación programadas se pueden idear métodos que lleven la resolución de este microscopio mucho más allá de la resolución confocal.

1.4.3 Requisitos de fluoróforos

La microscopía de fluorescencia tiene la necesidad inherente de que haya en la muestra una molécula que emita luz. Los fluoróforos pueden ser moléculas orgánicas pequeñas, nanopartículas metálicas, semi-conductoras o poliméricas, o proteínas fluorescentes. Para obtener una imagen nítida con técnicas convencionales de microscopía, idealmente los fluoróforos tienen que ser brillantes y estables frente a la luz: es decir, grandes coeficientes de absorción molar ϵ , altos rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_f y bajas constantes de fotodegradación. Para su aplicación en muestras biológicas vivas, deben ser compatibles con el medio acuoso, resistentes a la oxidación u otras reacciones que pueden tener lugar en el medio celular, y es preferente que se puedan excitar dentro del rango de luz visible o en el infrarrojo (sistemas de dos fotones), para provocar el menor daño posible a la célula. En el caso de muestra biológicas fijas (permeabilizadas y montadas con un medio acuoso tipo gel o polimérico) los fluoróforos deben ser compatibles con el medio de montaje. Para aplicaciones de super-resolución y localización de moléculas individuales, el tamaño también importa: las dimensiones de la partícula fluorescente no deben ser mayores a la resolución deseada y/o las dimensiones de la estructura a observar.

Uno de los desafíos más importantes para la super-resolución,⁷⁸ y uno de los requisitos esenciales de técnicas como PALM, STORM, y otras técnicas de localización de moléculas individuales, es que el fluoróforo se pueda encender y apagar de forma controlada, o al azar con parámetros conocidos. Cuando en la muestra hay dos fluoróforos situados a una distancia

menor del límite de difracción el uno del otro, es necesario poder encender selectivamente uno primero, coleccionar suficientes fotones para su localización, y luego recién apagar este y encender el segundo fluoróforo. La relación de moléculas encendidas a apagadas, caracterizado por las constantes k_{on} y k_{off} , se puede controlar variando la intensidad de luz de fotoactivación o la composición del medio (si es que la fluorescencia depende de alguna propiedad del medio, ej. agentes reductores u oxidantes). Controlar la relación k_{on}/k_{off} de fluoróforos estables es clave para conseguir mayor resolución en la microscopía de super-resolución.

1.4.4 Limitaciones de diheteroariletenos y desafíos

En consonancia con los requisitos de los fluoróforos para aplicaciones en microscopía de super-resolución se puede definir entonces cuales son los factores limitantes de los DHAOs como sondas para estas técnicas. Se enumeran a siguiente los correspondientes desafíos:

1. Los DHAOs se excitan efectivamente en el rango visible, pero la fotociclación para activarlos a la forma cerrada requiere de excitación en el UV. Esto es un problema para aplicaciones celulares, en particular aquellas que requieran seguimiento en tiempo de real de muestras vivas.
2. La solubilidad de los DHAs y DHAOs en soluciones acuosas no es apropiada para aplicaciones con células vivas. Los cromóforos deben ser solubles en agua, o bien el blanco celular que se quiera marcar debe participar en su solubilización.
3. Sería favorable conservar en agua el alto rendimiento cuántico de fluorescencia de los DHAOs.
4. ¿Se pueden explotar las propiedades fotoquímicas de los DHAs para diseñar sistemas con comportamiento específicamente apropiado para aprovechar las capacidades de las distintas técnicas de super-resolución?

1.5 Objetivo de tesis

Los objetivos de esta tesis son: la optimización de las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los DHAOs para la microscopía de fluorescencia; el desarrollo de nuevos fluoróforos que permitan conseguir mayor resolución mediante el aprovechamiento de su fotoconversión; y la utilización de las sondas generadas en aplicaciones celulares. El trabajo realizado se divide en cinco capítulos:

Capítulo 2: Estudio del efecto sustituyente sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímica de los DHAOs.

Capítulo 3: Diseño y construcción de un espectrofotómetro de absorción y emisión con capacidades de irradiación automático.

Capítulo 4: Técnicas de solubilización de DHAOs.

Capítulo 5: Síntesis y planteo teórico de un nuevo fluoróforo para mayor resolución basado en los DHAs.

Capítulo 6: Sondas basadas en DHAOs y sus aplicaciones en agregación de sinucleína y microscopía celular con el PAM.

La tesis finaliza con las conclusiones del trabajo realizado, un apéndice con los detalles del trabajo de síntesis y un segundo apéndice con el programa para las simulaciones de los fluoróforos diseñados.

Optimización fotoquímica de diheteroariletenos

En la Sección 1.4.3 se enumeraron los requisitos que deben cumplir los diheteroariletenos oxidados (DHAOs) para servir como sondas para la microscopía de super-resolución. Idealmente, tanto la activación como la desactivación de la fluorescencia se debería poder llevar a cabo con luz visible, para reducir el daño a las células, y también los rendimientos cuánticos de fotoconversión deberían ser lo más altos posibles, para reducir los tiempos de exposición de las muestras a la luz, o para poder trabajar con intensidades menores.

Afortunadamente, existe una abundante cantidad de literatura sobre los efectos de sustituyentes sobre la fotoquímica de los diheteroariletenos (no oxidados), y se postuló que el efecto en los DHAOs sería comparable. En la Sección 1.2.3 se describieron los efectos de sustituyentes de distinta naturaleza en posiciones 2 y 2',^{18;19;24} y 6 y 6'²³ sobre las propiedades fotoquímicas. Aunque el efecto sobre las propiedades de los diheteroariletenos es mucho mayor al modificar las posiciones 2 y 2', los DHAOs requieren que los sustituyentes en esas posiciones sean capaces de 'proteger' a las sulfonas de la interacción desfavorable con moléculas del solvente,⁴⁵ y era conveniente estudiar entonces las posiciones 6 y 6'. El estudio de Uno *et al.*¹⁴ exploró mayormente el efecto de unidades fenilo y tienilo con poco énfasis en grupos funcionales en esos anillos.

2.1 Elección de sustituyentes

Dados estos antecedentes, se decidió estudiar el efecto de grupos funcionales en *para* de anillos fenilo en posiciones 6 y 6'. Para modificar sustancialmente los rendimientos cuánticos de fotoconversión o las longitudes de onda de absorción, había que modificar sustancialmente los niveles energéticos de los isómeros del DHAO, y se planteó que esto se podría lograr a través

de la incorporación de grupos funcionales dadores o atractores de electrones. Se seleccionaron entonces grupos funcionales con un rango de capacidad electro-donora, descrito por la constante de Hammett σ' .

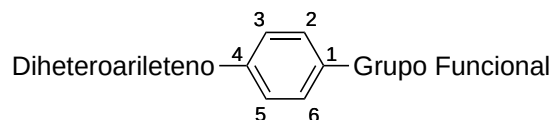
2.1.1 Constante de Hammett

La ecuación de Hammett⁷⁹ relaciona las constantes de equilibrio de la reacción de ionización del ácido benzóico con la reacción de ionización de ácidos benzóicos *meta* y *para* sustituidos. Se puede derivar de esta relación conclusiones acerca de la influencia del sustituyente en la acidez del compuesto. La diferencia entre las constantes de equilibrio del ácido benzóico sustituido y no-sustituido se relaciona con la naturaleza del sustituyente y de la reacción según la Ecuación 2.1:

$$\log K = \log K^0 + \sigma \rho \quad (2.1)$$

donde K es la constante de equilibrio con el sustituyente; K^0 es la constante de equilibrio sin sustituyentes; σ es la constante de Hammett del sustituyente y depende únicamente de la naturaleza del mismo; y ρ es una constante de reacción, dependiente únicamente de la reacción, la temperatura y el medio. La constante σ refleja el grado de estabilización del benzoato por efecto de resonancia o inducción de electrones; es decir, representa el carácter dador o aceptor de electrones del sustituyente. Se independiza así esta propiedad de la naturaleza de la reacción, y se pueden usar los mismos valores de σ para evaluar diferentes reacciones. La constante de reacción ρ para la ionización del ácido benzóico se define como 1, y conociéndose los valores de σ para una gama de sustituyentes se pueden derivar los valores de ρ para otras reacciones. ρ representa la susceptibilidad de la reacción al cambio de un sustituyente en comparación con la ionización del ácido benzóico.

Mientras Hammett⁷⁹ y Taft *et al.*⁸⁰ han compilado listas extensas de valores de σ para una gran variedad de grupos funcionales, cuando se trata de grupos no incluidos en estas listas se puede recurrir al uso de parámetros que reemplacen el σ de Hammett. En particular, cuando se quiere evaluar el carácter electro-donor o -atractor de un sustituyente, se puede reemplazar σ por un σ' derivado de señales de RMN de átomos adyacentes, ya que el desplazamiento químico de un átomo en un espectro de RMN refleja su entorno electrónico. Se pueden utilizar espectros de ^1H , ^{13}C , ^{19}F , o cualquier otro núcleo conveniente según el caso.^{81;82} Debido a la disponibilidad de espectros de RMN de ^{13}C se eligió utilizar estos para derivar un σ' . Como se definió en la Sección 2.1, la estructura de un sustituyente representativo (Esquema 2.1) es un fenilo sustituido, y su equivalente no-sustituido sería un benceno. Se definió entonces la nueva constante de Hammett, σ' , utilizando los valores de desplazamiento químico (δ) de los carbonos del benceno, y del carbono 4 (C4) del fenilo sustituido, en posición *para* al



Esquema 2.1: Estructura general de un sustituyente.

sustituyente (Ecuación 2.2).

$$\sigma' = \frac{\delta \text{ de } ^{13}\text{C del C4 del sustituyente}}{\delta \text{ de } ^{13}\text{C del benceno}} \quad (2.2)$$

Un valor de $\sigma' > 1$ implica un desplazamiento hacia campos magnéticos más fuertes para el C4 debido a menor densidad electrónica en ese carbono, e indica un carácter atractor de electrones del sustituyente. Así mismo, un valor de $\sigma' < 1$ indica que el sustituyente tiene más bien carácter electro-dador.

2.1.2 Grupos funcionales

Además de seleccionar los grupos por su carácter electro-dador o -atractor, se buscaron grupos funcionales que podrían ser fácilmente modificados para incorporar otras funcionalidades, o bien que se consiguieran precursores comerciales con otras funcionalidades incluídas. En la Tabla 2.1 se detallan los grupos funcionales seleccionados, la razón de selección, y sus respectivas constantes de Hammett. El valor de σ' se calculó según Ecuación 2.2 y los valores de desplazamiento químico se obtuvieron de la Base de Datos Espectrales para Compuestos Orgánicos⁸³ y de literatura relevante.⁸⁴

2.2 Síntesis

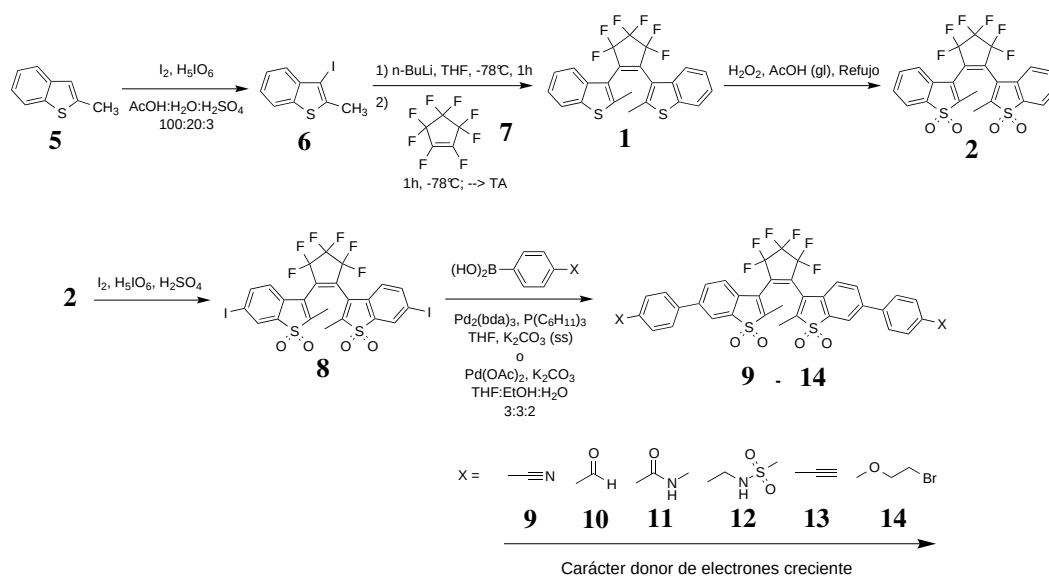
Se agradece el apoyo especial de la Dra Luciana Giordano durante esta etapa de síntesis de los DHAOs.

2.2.1 Ruta sintética

La síntesis de los DHAOs se detalla en el Esquema 2.2. La síntesis comienza con cuatro pasos iniciales de reacción para sintetizar el DHA oxidado e iodado **8**, el precursor en común de todos los productos finales, y se incorporan luego los diversos sustituyentes mediante reacciones de

Tabla 2.1: Selección de grupos funcionales.

Grupo Funcional	σ'	Criterio de selección:
	1.04	Electro-atractor extremo
	1.05	Reacciona con aminas
	1.02	Derivados comerciales disponibles
	1.00	Grupo amino protegido
	1.00	Derivados comerciales disponibles; modificación por reacción Click
	0.95	Derivados comerciales disponibles; susceptible a sustitución nucleofílica

**Esquema 2.2:** Síntesis de DHAOs con sustituyentes dadores y atractores de electrones.

acoplamiento de Suzuki. Se estudió el efecto sustituyente sobre el diheteroarileno con grupos metilo en los carbonos reactivos, a pesar de haberse publicado durante el año de comienzo de la tesis que el grupo etilo aumentaba el Φ_f ,¹⁴ porque esta ruta sintética ya estaba desarrollada en el grupo de trabajo, y el efecto del sustituyente se esperaba que fuera el mismo para ambos metilo y etilo.

Precursores

Se comenzó por la iodación oxidativa del reactivo comercial 2-metilbenzotiofeno (**5**) en medio ácido para favorecer la reacción del heterociclo levemente desactivado. La conmutación del I(0) y I(VII) es acelerada por el medio ácido, y la sustitución electrofílica se da sobre la posición 3 para generar **6**. La reacción es cuantitativa, perdiéndose un porcentaje mínimo de producto durante la neutralización del exceso de iodo y la extracción del producto. Seguidamente se construye el centro reactivo del diheteroarileno mediante una reacción organolítica para dar **1**. La posición 3 de **6** es activada con *n*-butillitio y reacciona con el carbono vinílico del perfluorociclopenteno **7**. Dos ataques electrofílicos resultan en la formación de **1**, cuya presencia es detectada fácilmente por cromatografía en capa delgada (CCD) gracias a su fotocromicidad: al iluminar una mancha incolora de **1** con luz ultravioleta (UV), esta se torna violeta, y el color permanece una vez apagada la luz.

Una vez generado el diheteroarileno **1**, este se oxida con agua oxigenada en medio ácido de manera cuantitativa. Algo de producto precipita en el medio de reacción y se induce la precipitación del total del producto enfriando la solución. El precipitado es coloidal y se filtra con dificultad, reduciéndose así el rendimiento al 80% aproximadamente. Se pueden neutralizar las aguas madres y extraer con diclorometano (DCM) para obtener un rendimiento un poco mayor si la filtración fue poco efectiva. Al igual que **1**, la formación de **2** se detecta fácilmente por CCD, ya que el mismo es fotocromico y además es fluorescente en la forma cerrada: al iluminar con luz UV, no solamente se torna rosa la mancha de producto sino que además fluoresce.

A siguiente se iodaron las posiciones 6 y 6' del DHAO **2**, nuevamente mediante una iodación oxidativa, en condiciones más fuertes que aquellas usadas para la iodación de **5** debido a que los heterociclos de **2** están fuertemente desactivados por el anillo fluorado. Si la neutralización y extracción son efectivas, se obtiene el producto cuantitativamente. La presencia de los ioduros torna amarillo el isómero cerrado del producto, y este se identifica rápidamente por CCD.

Caracterización de **8** por RMN

Al caracterizar el producto **8** por resonancia magnética nuclear (RMN) se observan señales provenientes de las tres estructuras: el isómero cerrado (C), y los dos confórmeros paralelo (P)

y anti-paralelo (AP) del isómero abierto. En la Figura 2.1 se pueden apreciar las estructuras de los isómeros y las señales de RMN de ^1H correspondientes a los distintos isómeros.

El compuesto **8** tiene 3 pares de H aromáticos equivalentes en las posiciones 4 y 4', 5 y 5', 7 y 7'. Es llamativo entonces que en la Figura 2.1B, correspondiente a la región aromática de una muestra de **8** previo a la exposición de luz, haya 6 señales; de izquierda a derecha (s = singulete, d = doblete): s, s, d ($J = 8$ Hz), d ($J = 8$ Hz), d ($J = 8$ Hz), d ($J = 8$ Hz). Las señales se pueden agrupar de a pares (s, s), (d, d) y (d, d) y corresponden a los dos conformémeros del isómero abierto. Al ser más compacta la estructura del conformémero P, los dos heterociclos se encuentran cuasi-superpuestos, y esto resulta en un apantallamiento de los protones relativo al conformémero AP. Dentro de cada par de señales, aquella que se encuentra a δ mayor corresponde al conformémero AP, y la que se encuentra a δ menor corresponde al conformémero P. En la Figura 2.1D se aprecia el mismo efecto para las señales de los metilos en posición 2: nuevamente la señal a mayor δ corresponde al conformémero AP. Integrando los dos picos correspondientes a los conformémeros AP y P se puede conocer el porcentaje de **8** que corresponde a cada conformémero, que en este caso es 49% AP, 51% P.

Al irradiar la muestra con luz UV, se produce la fotociclación del isómero abierto al isómero cerrado hasta llegar a un estado fotoestacionario. Los espectros de RMN de la región aromática y de los metilos se aprecian en las Figuras 2.1C y E. Es notorio que surjan únicamente tres señales nuevas en la región aromática y una correspondiente a los metilos: el isómero cerrado tiene un solo conformémero, por ende hay una sola señal por cada H equivalente. Al integrar

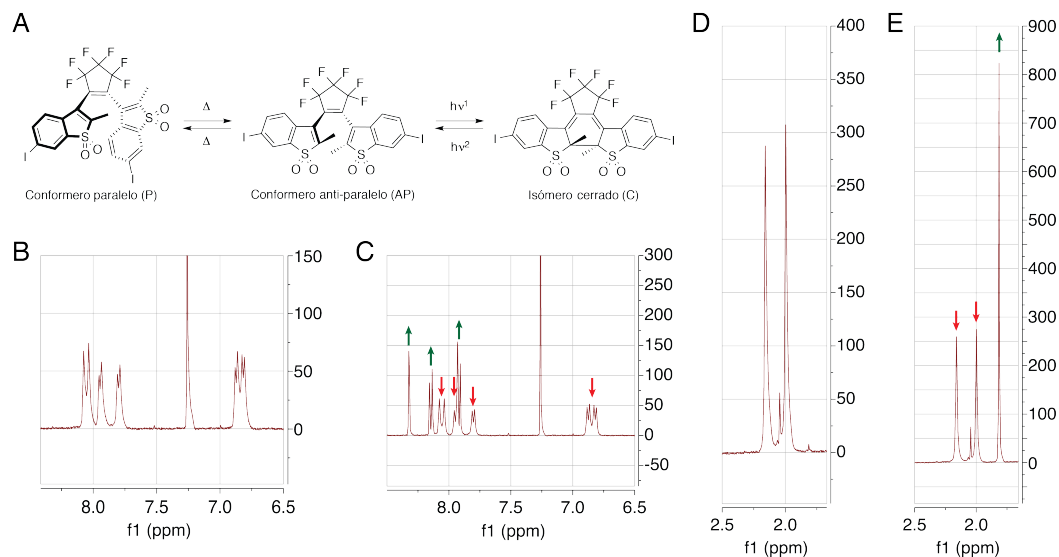


Figura 2.1: A) Estructura de los isómeros de **8**. Señales de RMN de la forma abierta (B y D) y del estado fotoestacionario (C y E). Flechas verdes indican señales del isómero cerrado que aumentan; flechas rojas indican señales de la forma abierta que disminuyen.

ahora por la totalidad de los protones, cada señal del isómero cerrado es más intensa que las que corresponden a los conformeros abiertos.

Incorporación de sustituyentes por acoplamiento de Suzuki

Los grupos fenilo con sustituyentes en *para* se incorporaron mediante acoplamientos de Suzuki del precursor **8** con ácidos borónicos correspondientes (Esquema 2.2). El mecanismo de reacción comienza con la adición oxidativa de un sistema aromático halogenado a un centro de paladio, seguida por la transmetalación de un segundo sistema aromático de boro a paladio, y por último una eliminación reductiva para generar el acoplamiento de los dos sistemas arílicos. Al igual que en todas las reacciones organometálicas, la naturaleza del ligando del catalizador de paladio tiene una gran influencia sobre la velocidad de reacción. Ligandos como la trifenilfosfina (PPh₃) o la dibenzilidenacetona (dba) son los más utilizados.

Las condiciones de reacción para el acoplamiento se tomaron inicialmente del protocolo detallado por Uno *et al.*¹⁴, donde se utilizaba el catalizador Pd(bda)₃ con PPh₃ como ligando, en una mezcla de tetrahidrofurano (THF) y una solución saturada de K₂CO₃. Con estas mismas condiciones, los rendimientos de reacción fueron poco satisfactorios (40-70%), y los tiempos de reacción largos (hasta 24 hs). Además, se detectaban por CCD grandes cantidades de un producto de descomposición no identificado que no se lograba eluir de la línea de base.

Luego de una búsqueda bibliográfica para encontrar condiciones de reacción aptas para ácidos borónicos con sustituyentes de distinta naturaleza electrónica, se evaluaron las condiciones descritas por Qiu *et al.*⁸⁵ en el 2011 para acoplamientos de Suzuki con PdCl₂ y sin ligando. Los autores describen rendimientos del 98-99% para el acoplamiento de bromuros de fenilo con arilos con grupos en *para* desde fluor hasta metoxi. Se ajustaron las condiciones sutilmente desde 50% etanol en agua descrito por los autores a 30% etanol y 40% THF en agua, para adecuar el medio a la (in)solubilidad del compuesto **8** en solventes polares. Los resultados fueron notorios: los tiempos de reacción fueron de 30 minutos con rendimientos del 60-90% - una mejora considerable respecto a los rendimientos anteriores. Entre las diferencias más importantes de los dos métodos, el segundo método utiliza una muy reducida cantidad de catalizador de paladio, y una elevada cantidad de base (ver Tabla 2.2). Se estimó que tanto el mejor acceso al centro metálico del catalizador por falta de ligandos voluminosos, el medio monofásico de reacción, y el carácter más básico del medio aportaron a las mejoras observadas. La base interfiere en la transmetalación, formándose el ácido bórico, y también en la formación del complejo de paladio. Es probable que en los acoplamientos de Suzuki realizados la mayor basicidad haya favorecido más de uno de estos procesos, aumentándose la velocidad y rendimiento de la reacción. Se adoptaron estas condiciones de reacción para todos los acoplamientos Suzuki posteriores.

Tabla 2.2: Comparación de condiciones de reacción para los acoplamientos de Suzuki.

Reactivo	Condiciones adaptadas de Uno <i>et al.</i> ¹⁴	Condiciones adaptadas de Qiu <i>et al.</i> ⁸⁵
Compuesto 8	1 eq	1 eq
Ácido Borónico	4 eq	4 eq
THF	7 mL	4 mL
Etanol	-	3 mL
H ₂ O	-	2 mL
Catalizador	Pd ₂ (bda) ₃ , 0,2 eq	PdCl ₂ , 0,005 eq
Ligando	PPh ₃ , 0,5 eq	-
K ₂ CO ₃	0,4 eq	2 eq

La purificación de todos los compuestos de acoplamientos Suzuki se realizó mediante cromatografía en columna, y se pudieron observar claramente los compuestos mientras eluían gracias a su color amarillo-naranja. Los productos de reacción eran mezclas del precursor **8** y los productos mono- y di-sustituídos. Los rendimientos informados en el Apéndice A corresponden únicamente al producto di-sustituído. Ya que los productos, al igual que el precursor, eran coloridos, cualquier efecto en los niveles energéticos que modifiquen la absorción o fluorescencia del compuesto se podían ver a simple vista: de hecho, el color de los productos **9** a **13** era amarillo, mientras que el producto **14** con un sustituyente electro-dador, era fuertemente naranja. Se estudiaron a siguiente las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los compuestos sintetizados.

2.3 Espectroscopía y caracterización

Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas a determinar para los compuestos sintetizados (y cualquier compuesto fotocromático o fluorescente) son:

- Espectros de absorción y emisión (y excitación, cuando corresponde) para ambos isómeros
- Rendimiento cuántico de fluorescencia para el isómero cerrado, Φ_f
- Grado de fotoconversión en el estado fotoestacionario, α_{EFE}
- Cinética de fotociclación y fotoreversión, con sus rendimientos cuánticos respectivos, $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$

- Fatiga durante ciclos de fotoconversión
- Resistencia a la fatiga bajo irradiación con luz UV
- Constantes cinéticas de decaimiento del estado excitado: radiativo (k_r), no-radiativo (k_{nr}), fotoreversión ($k_{C \rightarrow A}$) y fotodegradación (k_d , si es posible) asociadas al estado excitado del isómero cerrado

Para facilitar la interpretación de los resultados, a continuación se describen brevemente los métodos utilizados para determinar estos valores, y luego se presentan los resultados de la caracterización de los compuestos descritos en la Sección 2.2.

2.3.1 Técnicas de caracterización

Espectros de absorción y emisión

Los espectros de absorción se midieron con un espectrofotómetro comercial (Varian) o con un espectrofotómetro de construcción propia (ver Capítulo 3), en el rango del UV a IR-cercano (aproximadamente 250 nm a 1000 nm). Las soluciones fueron siempre diluídas, con concentraciones de alrededor de 10 μM , para evitar efectos de re-absorción de la fluorescencia. Los espectros de emisión se midieron excitando la muestra en el máximo de absorción (del isómero cerrado) y midiendo la fluorescencia a partir de una longitud de onda conveniente dados los parámetros de medición del equipo (ancho de rendijas de excitación y emisión). Normalmente los espectros barren desde los 450 nm hasta los 750 nm. Los coeficientes de absortividad molar, ϵ , de los compuestos puros se calcularon realizando curvas de calibración con soluciones de concentración conocida (masas conocidas de DHAO y volúmenes conocidos de solvente). La pureza de los compuestos se verificó con espectros de RMN (ver A). Los espectros de absorción de los isómeros abiertos se obtuvieron fotorevirtiéndolos con luz de 445 nm, mientras que los espectros de los isómeros cerrados se obtuvieron ó bien de la separación de los isómeros por HPLC con un detector de arreglo de diodos, ó bien se calcularon mediante el procedimiento detallado más abajo.

Rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_f

El rendimiento cuántico de fluorescencia se puede determinar de forma absoluta o relativa. Determinaciones absolutas se pueden realizar ópticamente con una esfera integradora, por calorimetría, actinometría o espectroscopía fotoacústica.⁸⁶ La desventaja de estas técnicas

es que requieren de equipamiento especializado. Las determinaciones relativas se pueden realizar en un fluorímetro y solamente se requiere un fluoróforo estándar para deducir el Φ_f del compuesto incógnita por comparación. Se miden los espectros de absorción y de emisión del compuesto incógnita y el fluoróforo y se calcula el Φ_f con la Ecuación 2.3:

$$\Phi_f^X = \Phi_f^{ref} \left(\frac{\eta_X}{\eta_{ref}} \right)^2 \left(\frac{I_X}{A_X} \div \frac{I_{ref}}{A_{ref}} \right) \quad (2.3)$$

donde *ref* indica el fluoróforo estándar, η es el índice de refracción, I es la integral de la banda de emisión y A es la absorbancia.

Los requisitos del fluoróforo estándar son: que su Φ_f haya sido constatado por diferentes fuentes; y que se pueda excitar con la misma longitud de onda que el compuesto de interés. No es necesario que las soluciones sean de la misma concentración, pero sí es necesario que los valores de A no superen 0,1-0,2 para evitar efectos de filtro interno que reducen la intensidad de la luz de excitación, y la dispersión y reabsorción de la emisión. Por supuesto que además, el espectrofotómetro de absorción y el fluorímetro que se utilizan para medir los espectros deben estar correctamente calibrados de antemano. Se utilizó un estándar de fluoresceína en etanol excitado a 445 nm.

Grado de fotoconversión en el estado fotoestacionario, α_{EFE}

Al irradiar una muestra con luz UV durante un tiempo prolongado, se establece un estado fotoestacionario en el cual la composición de la muestra en términos de porcentaje relativo de isómeros es constante. La Ecuación 2.4 describe α_{EFE} en términos de $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ y los coeficientes de absortividad molar de las especies a la longitud de irradiación λ , ϵ_X^λ . ϵ_X^λ se determina por medio de la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) midiendo los espectros de absorción de la especie X a distintas concentraciones. Para la fotoreversión aplica la misma ecuación, pero con los procesos contrarios ($C \rightarrow A$ en vez de $A \rightarrow C$). En este caso, ya que el isómero abierto no absorbe en el visible donde se irradiaba al isómero cerrado, es posible llegar a un 100% de fotoreversión.

$$\text{Grado de fotoconversión} = \alpha_{EFE} = \frac{\epsilon_A^\lambda \Phi_{A \rightarrow C}}{\epsilon_A^\lambda \Phi_{A \rightarrow C} + \epsilon_C^\lambda \Phi_{C \rightarrow A}} \quad (2.4)$$

Rendimientos cuánticos de fotociclación y fotoreversión, $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$, y constantes cinéticas $k_{A \rightarrow C}$ y $k_{C \rightarrow A}$

El rendimiento cuántico de una reacción dada se puede medir como el número de reacciones ocurridas (moles de producto obtenido) dividido por el número de fotones absorbidos en un

dado tiempo. Así, se puede medir la absorbancia de la solución en función del tiempo t de irradiación y conociendo la potencia de luz se puede calcular el $\Phi_{reacción}$:

$$\Phi_{reacción} = \frac{\text{moles de producto formado}}{\text{moles de fotones absorbidos}} = \frac{(C_t^P - C_{t=0}^P)/V}{\Phi_e t / (E_{fotón} N_A)} \quad (2.5)$$

donde C_t^P es la concentración del producto a tiempo t , V es el volúmen de la solución, Φ_e es el flujo radiante, $E_{fotón}$ es la energía de un fotón y N_A el número de Avogadro. La concentración del producto se puede calcular mediante Lambert-Beer a partir de la absorbancia, y el flujo radiante se calcula conociendo la intensidad de la luz (irradiancia). Prácticamente, se miden los espectros de absorción y emisión de la muestra, luego se la irradia durante un tiempo conocido con una fuente de luz de potencia conocida, se miden nuevamente los espectros, y se repite hasta llegar al EFE de la muestra. La potencia de la luz de irradiación se mide previamente con un potenciómetro, y los espectros se miden como se describe arriba. La ventaja de usar el espectrofotometro de construcción propia para estas medidas es la automatización del experimento, que se describe en detalle en el Capítulo 3.

En el caso de los DHAs, el cálculo del rendimiento se complica porque a la vez que se forma el producto de ciclación, inevitablemente se forma también el producto de fotoreversión. Si se conocen los espectros de absorción de ambos isómeros por separado, se calcula exactamente el α_{EFE} y los rendimientos se calculan directamente (ver abajo). Si la fotoreversión es muy ineficiente en comparación con la fotociclación, se puede aproximar $\alpha_{EFE} = 1$ y calcular $\Phi_{C \rightarrow A}$ directamente usando la Ecuación 2.14. Pero cuando no se conocen de antemano las propiedades de la molécula, o la fotoreversión no es despreciable frente a la fotociclación, la estimación de los $\Phi_{reacción}$ por esta vía es muy inexacta. Es necesario recurrir a un cálculo iterativo de α_{EFE} , $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$, y también ϵ_C^λ , ya que no se obtiene el isómero cerrado de forma pura por irradiación del isómero abierto.

Se miden primero el espectro de absorción del isómero abierto y del estado fotoestacionario, y la absorbancia en los máximos de absorción de los dos isómeros (abierto y cerrado) durante la fotociclación y la fotoreversión. Se obtendrán curvas que se pueden ajustar con un fiteo monoexponencial:

$$y = y_0 + A e^{-R_0 t} \quad (2.6)$$

De los fiteos monoexponenciales se calcula un valor inicial aproximado de α_{EFE} :

$$\alpha_{EFE}^0 = \frac{R_0^{A \rightarrow C}}{R_0^{A \rightarrow C} + R_0^{C \rightarrow A}} \quad (2.7)$$

La variación de los isómeros en el tiempo t , asumiendo que no interfiere la absorción del

isómero cerrado en la fotociclación, se describen como:

$$\text{Fotociclación: } \frac{d(C_A)}{dt} = -k_{A \rightarrow C} C_A t \quad (2.8)$$

$$\text{Fotoreversión: } \frac{d(C_C)}{dt} = -k_{C \rightarrow A} C_C t \quad (2.9)$$

donde C_X es la concentración de la especie X y $k_{reacción}$ es la constante de reacción correspondiente. Las constantes de velocidad de las reacciones se definen como:

$$k_{A \rightarrow C} = k_{ex}^A \Phi_{A \rightarrow C} \quad (2.10)$$

$$k_{C \rightarrow A} = k_{ex}^C \Phi_{C \rightarrow A} \quad (2.11)$$

donde k_{ex}^X es la constante de excitación de la especie X y se define como:

$$k_{ex}^X = \sigma_\lambda^X \Psi_\lambda \quad \sigma_\lambda^X = \epsilon_\lambda^X \frac{10^3 \ln 10}{N_A} \quad \Psi_\lambda = 5 \times 10^{15} \lambda I_0 \quad (2.12)$$

donde σ_λ^X es la sección transversal de absorción molar de la especie X a longitud de onda λ , N_A es el número de Avogadro, Ψ_λ es el flujo de fotones de longitud de onda λ , y I_0 es la irradiancia en W/cm^2 . Integrando las Ecuaciones 2.8 y 2.9 y reemplazando las constantes de reacción con las definiciones en Ecuaciones 2.10, 2.11 y 2.12 se obtiene:

$$\text{Fotociclación: } R_0^{A \rightarrow C} t = 2,303 \times 10^{-3} I_0 \epsilon_A \Phi_{A \rightarrow C} \frac{C_T}{C_C^{EFE}} t \quad (2.13)$$

$$\text{Fotoreversión: } R_0^{C \rightarrow A} t = 2,303 \times 10^{-3} I_0 \epsilon_C \Phi_{C \rightarrow A} t \quad (2.14)$$

ϵ_C^λ es el parámetro clave en estas ecuaciones. Si se conoce ϵ_C^λ , los rendimientos cuánticos salen directamente de estas ecuaciones. Sin embargo, ϵ_C^λ no se conoce de forma absoluta si se tienen únicamente medidas en solución (no se consigue aislar la especie cerrada por irradiación del isómero abierto). Un valor inicial de ϵ_C se aproxima conociendo la absorbancia total en el estado fotoestacionario (A_T^{EFE}):

$$A_T^{EFE} = A_A^{EFE} + A_C^{EFE} = C_A^{EFE} \epsilon_A l + C_C^{EFE} \epsilon_C l = C_A^{EFE} \epsilon_A l + (C_T - C_A^{EFE}) \epsilon_C l \quad (2.15)$$

Reemplazando $C_A^{EFE} = C_T(1 - \alpha_{EFE})$, derivado de $\alpha_{EFE} = C_C/C_T$, se despeja:

$$\epsilon_C = \frac{A_T^{EFE} - C_T(1 - \alpha_{EFE}) \epsilon_A l}{C_T \alpha_{EFE} l} \quad (2.16)$$

A partir de las Ecuaciones 2.13, 2.14 y 2.16 se calculan valores iniciales de $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$. Reemplazando estos valores en las Ecuaciones 2.10 y 2.11 se obtienen valores de las constantes

de reacción, y con estos se calcula un nuevo valor de α_{EFE} según:

$$\alpha_{EFE} = \frac{k_{C \rightarrow A}}{k_{A \rightarrow C} + k_{C \rightarrow A}} \quad (2.17)$$

Con este nuevo valor de α_{EFE} se vuelve a calcular ϵ_C^λ según Ecuación 2.16 y se itera hasta que el valor de α_{EFE} no varíe apreciablemente.

Fatiga durante fotociclos y durante irradiación con UV constante, k_d

Una vez determinada la cinética de fotoconversión, se pueden realizar ciclos de isomerización donde se irradiía la muestra con luz UV un tiempo suficiente (conocido) para llegar al estado fotoestacionario, y luego se irradiía con luz visible el tiempo necesario para volver al isómero abierto, y se repiten estas irradiaciones midiendo entre cada una los espectros de absorción y fluorescencia. Los DHAs pueden sufrir hasta miles de ciclos con mínima fotodegradación,¹⁰ y una comparación cualitativa se puede hacer respecto a la fatiga durante fotociclos.

La constante de fotodegradación se puede calcular únicamente para el isómero cerrado, ya que cualquier estímulo lumínico que reciba el isómero abierto va a llevar a su fotoconversión. El experimento se lleva a cabo entonces desde el estado fotoestacionario, y se mide la absorbancia y fluorescencia durante un tiempo prolongado de irradiación UV. Se obtiene una curva mono-exponencial de la cual se puede obtener la k_d conociendo el ϵ_C^λ . Es importante notar que se asume que el producto de fotodegradación no absorbe a la longitud de onda de medición, lo cual vale siempre y cuando el porcentaje de degradación de la muestra es menor.

Constantes cinéticas de decaimiento radiativo k_r y no-radiativo k_{nr}

La constante cinética de fotociclación se calculó junto con el rendimiento cuántico de este proceso. Para comprender como compite y en que medida con los otros procesos de decaimiento del estado excitado del isómero cerrado, es necesario conocer las constantes relacionadas a los otros procesos de decaimiento: radiativo k_r , no-radiativo k_{nr} , y fotodegradación k_d . Las constantes se relacionan a través del tiempo de vida media del estado excitado del isómero cerrado, o tiempo de vida media de fluorescencia, τ_f :

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{C \rightarrow A} + k_d} \quad (2.18)$$

La constante de fotodegradación generalmente se puede despreciar para los DHAs frente a los demás procesos.¹⁰ τ_f se puede medir directamente como el tiempo de vida media de

fluorescencia con un espectrofotómetro de luz pulsada. $k_{C \rightarrow A}$ se conoce del cálculo del $\Phi_{C \rightarrow A}$, y k_r se puede conocer de la definición de $\Phi_{C \rightarrow A}$:

$$\Phi_{C \rightarrow A} = k_{C \rightarrow A} \tau_f \quad (2.19)$$

Conociendo así k_r y $k_{C \rightarrow A}$ (y k_d , si es significativa) se puede utilizar la Ecuación 2.18 para calcular k_{nr} .

2.3.2 Resultados de caracterización

Los espectros de absorción y de emisión de los compuestos **9** a **14** se presentan en la Figura 2.2. Los isómeros abiertos y cerrados se separaron por HPLC, lo que permitió una medición absoluta del espectro de absorbancia del isómero cerrado. A partir de los valores de absorbancia medidos y conociendo la concentración de las muestras se calcula el ϵ_X^λ de cada isómero. Los isómeros abiertos absorben todos por debajo de 400 nm (Figura 2.2A), mientras que los isómeros cerrados (Figura 2.2B) presentan una banda de absorción nueva alrededor de 440 nm. La diferencia de color del compuesto **14** comparado con los demás derivados se ve reflejado en un corrimiento sustancial de la banda de absorción del isómero cerrado, cuyo máximo (λ_{max}) se encuentra en 472 nm. Una diferencia de longitud de onda de más de 20 nm se puede distinguir fácilmente a simple vista. Los espectros de fluorescencia se observan en la Figura 2.2C, donde se aprecia claramente un corrimiento hacia el rojo del máximo de emisión (λ_{max}^{em}) a medida que pasamos del compuesto **9** al **14**. Los máximos de absorción y emisión se detallan en la Tabla 2.3, junto con los Φ_f y τ_f medidos.

En la Figura 2.3 se observa un ejemplo representativo de la cinética de conversión de todos los compuestos. La concentración del isómero cerrado de **9** aumenta durante irradiación con luz

Tabla 2.3: Propiedades espectroscópicas de los compuestos **9** - **14** en AcOEt.

Compuesto	Isómero abierto	Isómero cerrado			
	λ_{max} (nm), ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{max} (nm), ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{max}^{em} (nm)	Φ_f	τ_f (ns)
9	294, 17; 327, 12	436, 36	510	0,29	1,1
10	297, 32; 331, 22	441, 43	516	0,34	1,2
11	299, 17; 330, 12	441, 36	521	0,20	1,3
12	289, 18; 333, 15	446, 38	532	0,31	1,2
13	300, 17; 334, 12	451, 44	535	0,31	1,6
14	308, 14; 351, 12	472, 40	589	0,57	2,2

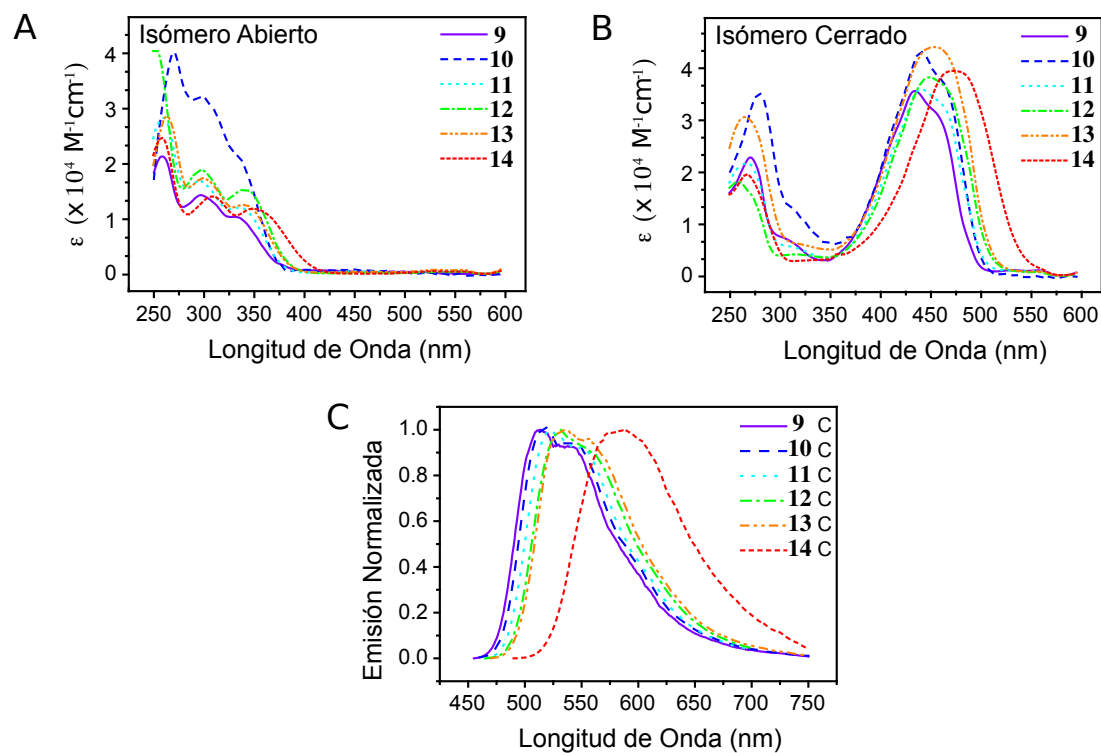


Figura 2.2: Espectros de absorción de los isómeros abiertos (A) y cerrados (B), y espectros de emisión normalizados (C) de los compuestos **9** a **14** excitados en sus respectivos máximos de absorción.

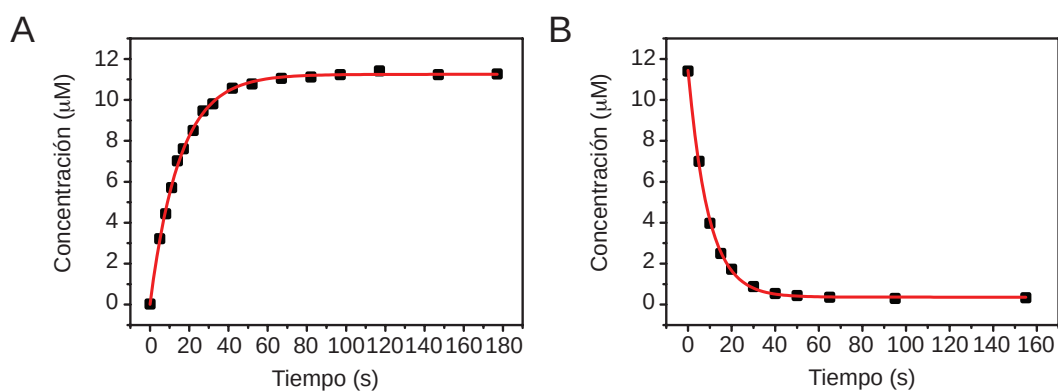


Figura 2.3: Curvas de concentración del isómero cerrado vs. tiempo de irradiación durante fotociclación (A) y fotoreversión (B).

UV (340 ± 10 nm, 1 mW/cm²) hasta llegar a un estado fotoestacionario, y disminuye con luz visible (445 ± 20 nm, 25 mW/cm²) hasta llegar a 100% isómero abierto. La fotociclación es muy rápida comparada con la fotoreversión, y con intensidades menores de luz se logra un 50% conversión en apenas unos pocos segundos. Las curvas se ajustaron con monoexponenciales y se derivaron de forma directa los $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ utilizando las ecuaciones descritas en la Sección 2.3.1. Los valores de los rendimientos de fotoconversión, además de los valores de las constantes k_r , k_{nr} , y $k_{C \rightarrow A}$, se informan en la Tabla 2.4.

La estabilidad de los compuestos frente a la fotoconversión se evaluó fotociclando los mismos con luz UV hasta llegar al estado fotoestacionario, seguida por luz visible hasta obtener 100% isómero abierto nuevamente. La Figura 2.4 muestra la intensidad de emisión a lo largo de varios ciclos para los compuestos **11**, **12** y **13**, donde se aprecia una fatiga mínima luego de 10 ciclos.

La fatiga bajo irradiación con luz UV también se evaluó, en particular para el compuesto **11**, bajo iguales condiciones de irradiación en 1,4-dioxano, AcOEt y metanol (Figura 2.5). Sorprendentemente la fatiga fue mucho mayor en 1,4-dioxano (casi 100% fotodegradación en 10 hs) que en AcOEt o metanol, donde el compuesto retuvo más del 50% de intensidad luego de un día de irradiación continua a potencias altas (~ 10 mW/cm² en 340 nm).

2.4 Análisis del efecto sustituyente

La correlación entre la naturaleza del sustituyente y las propiedades espectroscópicas o fotoquímicas se analizó con correlaciones de Hammett utilizando el parámetro σ' definido en la Sección 2.1.1. En el caso de que las variaciones en las propiedades se debieran únicamente al

Tabla 2.4: Propiedades fotoquímicas de los compuestos **9** - **14** en AcOEt.

Compuesto	$\Phi_{A \rightarrow C}$	$10^3 \Phi_{C \rightarrow A}$	k_f (ns ⁻¹)	k_{nr} (ns ⁻¹)	$k_{C \rightarrow A}$ (μs ⁻¹)
9	0,50	4,9	0,27	0,67	4,6
10	0,37	1,9	0,29	0,56	1,6
11	0,45	1,1	0,16	0,64	0,85
12	0,27	0,46	0,25	0,55	0,37
13	0,44	0,35	0,2	0,44	0,22
14	0,010	a	0,26	a	a

(a) denota valores muy bajos para medir.

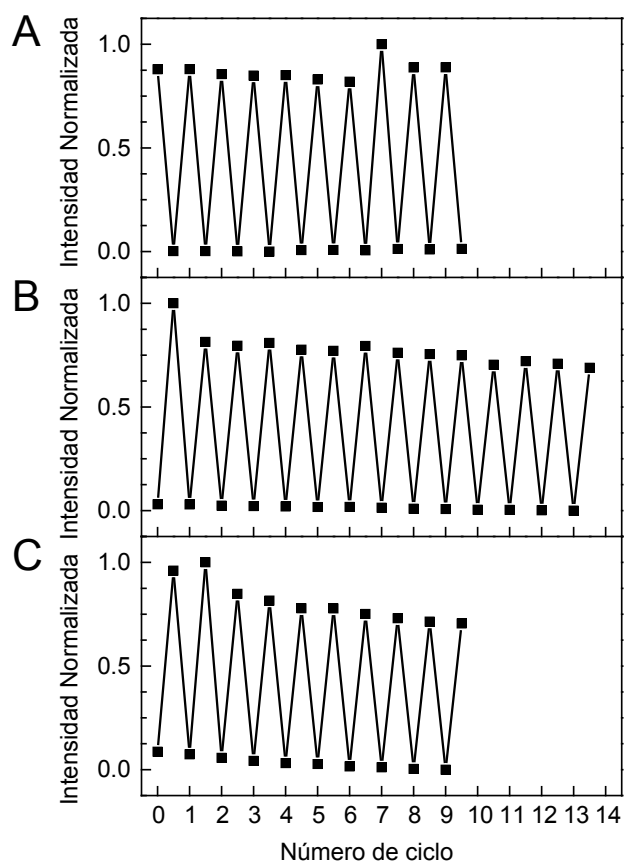


Figura 2.4: Intensidad de emisión normalizada durante ciclos de fotoconversión para compuestos **11**, **12** y **13**.

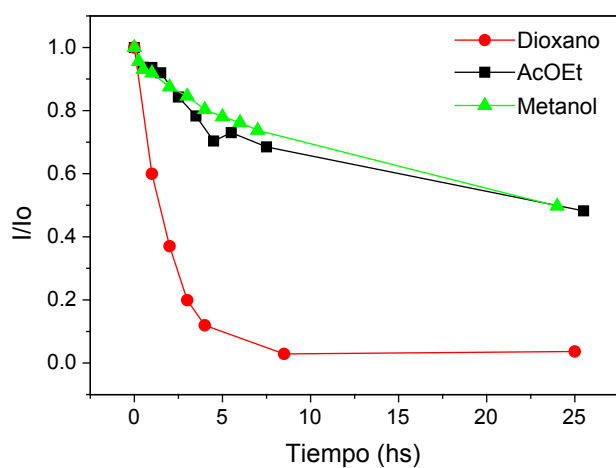


Figura 2.5: Variación de intensidad de emisión del compuesto **11** durante irradiación con luz UV (340 nm).

efecto del sustituyente sobre la densidad electrónica de la molécula, ya sea por efecto inductivo o por resonancia, se esperaría una relación lineal entre el parámetro σ' y las mismas. Se graficaron entonces los máximos de absorción del isómero cerrado, los máximos de emisión y los rendimientos cuánticos de fotociclación y de fotoreversión y se pueden apreciar en la Figura 2.6 con sus respectivos fiteos lineales.

Los parámetros de las regresiones lineales se describen en la Tabla 2.5. Las únicas correlaciones que tiene significancia estadística son las de los máximos de absorción y emisión. A menor σ' , o mayor carácter electro-dador, λ_{max} y λ_{max}^{em} se corren hacia longitudes de

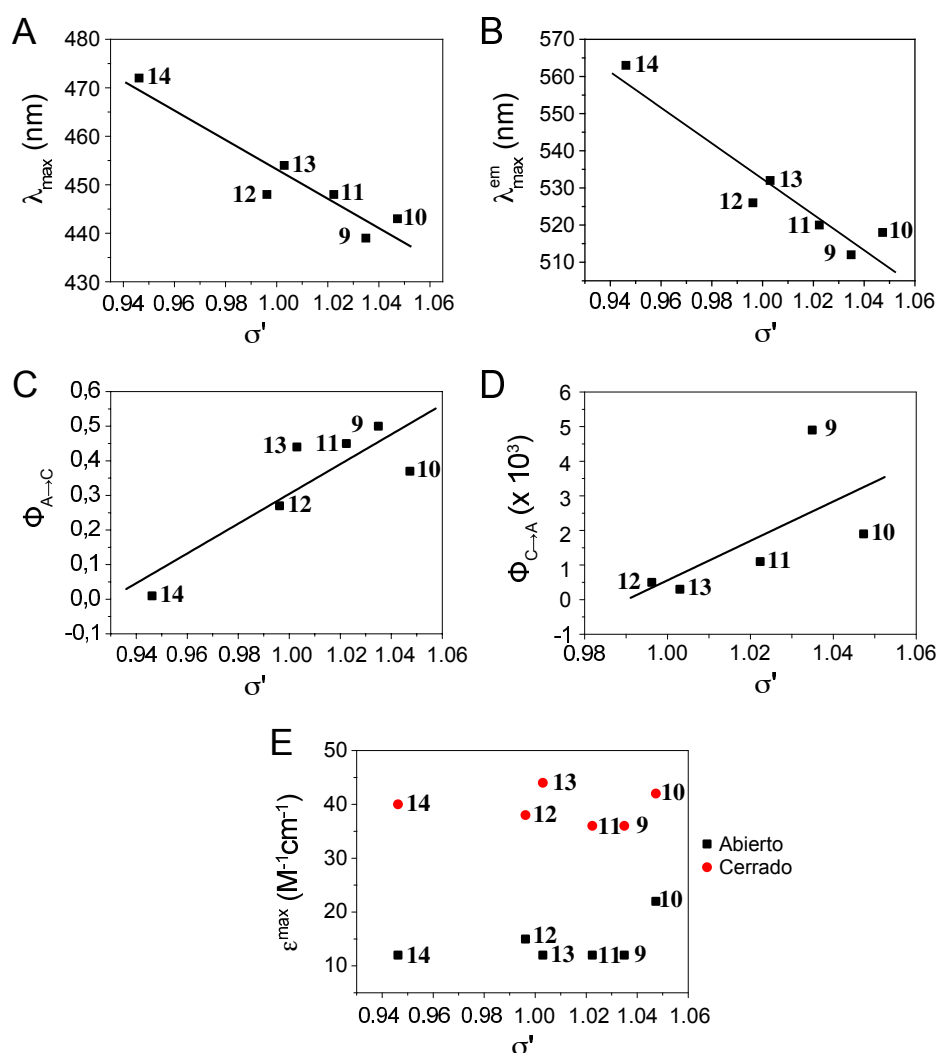


Figura 2.6: Correlaciones de Hammett con σ' y máximos de absorción (A), máximos de emisión (B), rendimientos cuánticos de fotociclación (C) y fotoreversión (D) y ϵ en el máximo de absorción para el isómero abierto y cerrado (E).

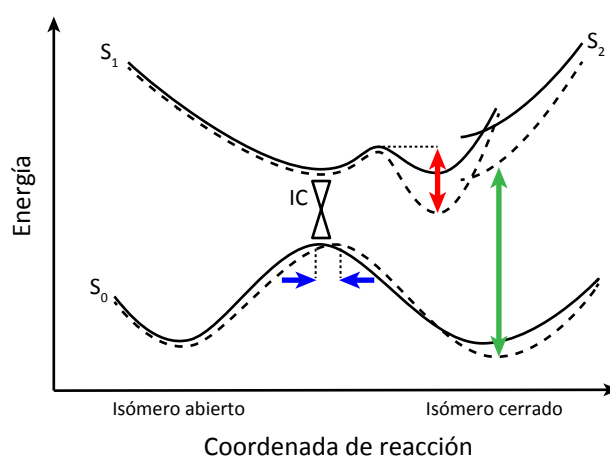
Tabla 2.5: Regresiones lineales ($y = a + bx$) de las correlaciones de Hammett.

Regresión	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	R^2
$\lambda_{\max}$	760 ± 60	$-(300 \pm 60)$	0,85
$\lambda_{\max}^{\text{em}}$	790 ± 60	$-(340 \pm 60)$	0,87
$\Phi_{A \rightarrow C}$	$-(4,0 \pm 1,3)$	$4,3 \pm 1,3$	0,67
$\Phi_{C \rightarrow A}$	$-(0,06 \pm 0,04)$	$0,06 \pm 0,04$	0,23

onda mayores, y, a pesar de no correlacionar bien, $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ disminuyen. Incluso $\Phi_{C \rightarrow A}$ disminuye tanto para el compuesto **14** que no se pudo medir este valor sin fotodegradación apreciable. En términos prácticos, los compuestos **9** a **13** son fotoreversibles y el **14** solo es fotoactivable. No correlacionan bien σ' y los coeficientes de absorción molar del isómero abierto ϵ_A o del cerrado ϵ_C , a pesar de que para DHAs no oxidados sí hay cierta correlación cualitativa con el carácter electro-dador ó -aceptor del sustituyente.²³

Las correlaciones entre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los derivados y la naturaleza del sustituyente se pueden interpretar en el contexto de las superficies de energía potencial de los DHAs introducida en la Sección 1.2.2. Se supone, para estos fines, una semejanza entre el perfil energético de los derivados sintetizados al de los DHAs no oxidados.⁴⁵ Los cambios cualitativos que se proponen se pueden apreciar en el Esquema 2.3.

Grupos dadores de electrones que inyectan densidad electrónica al centro reactivo



Esquema 2.3: Cambios cualitativos propuestos en la superficie de energía potencial de los DHAs. Superficies sin (línea continua) y con (línea punteada) sustituyentes dadores de electrones, indicando el aumento de longitud de onda de absorción y emisión (verde), aumento en energía de transición (rojo) y desplazamiento del IC (azul).

estabilizarían en mayor medida, en principio, al isómero cerrado que al abierto, al tener este un sistema π que se extiende a lo largo del DHA y rotación restringida alrededor del eteno. Además, la estabilización afectaría más al estado excitado del isómero cerrado relativo al estado fundamental, ya que la densidad electrónica en el LUMO está más desplazada todavía hacia el anillo perfluorado.¹⁵ Ambas estabilizaciones resultarían en longitudes de onda de absorción y emisión mayores, y espectros desplazados hacia el rojo (Figura 2.6A y B). Al estabilizar la conjugación, el sistema arílico se vuelve más plano y menos flexible, aumentando así el τ_f (Tabla 2.3) y disminuyendo sutilmente la k_{nr} (Tabla 2.4).

En tanto las tendencias observadas en las propiedades fotoquímicas, efectos similares se observaron para DHAs no oxidados. Guillaumont *et al.*⁸⁷ propusieron que la estabilización del estado excitado del isómero cerrado aumenta la energía de transición necesaria para llegar a la intersección cónica (IC), y por ende sustituyentes dadores de electrones desfavorecen la fotoreversión. En el caso de los derivados **9** a **14**, $\Phi_{C \rightarrow A}$ disminuye hasta ser prácticamente imposible de medir para **14**, y $k_{C \rightarrow A}$ disminuye más de un orden de magnitud de **9** a **13**. El camino de fotociclación, al contrario, no se ve afectado de una manera tan significativa, ya que la naturaleza del sustituyente en principio tiene menor efecto sobre los niveles energéticos involucrados. Sin embargo $\Phi_{A \rightarrow C}$ para el compuesto **14** disminuye de forma drástica, y este cambio es más difícil de explicar. Se puede postular un cambio en la superficie de energía potencial tal que la posición del IC se vea modificada, favoreciendo el decaimiento a la forma abierta. También es posible que aumente el decaimiento no-radiativo del estado excitado del isómero abierto. Para determinar la causa de este hecho es necesario contar con estudios teóricos que permitan profundizar el conocimiento de los niveles energéticos de los DHAOs.

2.5 Análisis de solvatocromismo

Al observar un efecto tan prominente del sustituyente dador de electrones, se hipotetizó que la naturaleza del solvente podría afectar también de manera sustancial las propiedades fotoquímicas. Se estudió entonces el posible solvatocromismo de los derivados **9** a **14** disolviendo los mismos en una serie de solventes de polaridad variada y midiendo nuevamente todas las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los mismos. Antes de presentar los resultados se describen las escalas y regresiones utilizadas para derivar conclusiones respecto del grado y la naturaleza del solvatocromismo observado.

2.5.1 Escala de solvatocromismo

Cuando las propiedades colorimétricas de una sustancia dependen de la identidad del solvente, se dice que la misma es solvatocrómica. Se denomina solvatocromismo positivo cuando el

espectro de absorción se desplaza hacia el rojo con mayor polaridad del solvente, y negativa cuando se desplaza hacia el azul. Para cuantificar el grado de solvatocromismo de una sustancia, se crearon escalas empíricas que asignan valores a los solventes según su polaridad y otras propiedades.

La escala de polaridad de energía de transición electrónica molar normalizada, E_T^N , desarrollada por Reichardt *et al.*⁸⁸ es definida utilizando la solvatocromicidad negativa de un colorante betaína como sonda para la polaridad. Se obtiene normalizando la energía necesaria para la transferencia de carga intramolecular $\pi \rightarrow \pi^*$ de menor frecuencia ($\tilde{\nu}_{max}$) de la betína en un solvente dado, por aquella en agua y en trimetilsilano (TMS), como extremos polar y no-polar respectivamente (Ecuación 2.20). El valor de E_T^N varía entre 0 (no-polar) y 1 (polar).

$$E_T(solvente) = hc\tilde{\nu}_{max}N_A \quad E_T^N = \frac{E_T(solvente) - E_T(TMS)}{E_T(agua) - E_T(TMS)} \quad (2.20)$$

Graficando un observable dado vs el valor de E_T^N para cada solvente utilizado, se pueden sacar conclusiones respecto del grado de efecto del solvente. Sin embargo, hay que recordar que la escala se creó en base a la respuesta de un colorante particular, y al cambiar el colorante se puede perder la capacidad predictiva de la misma. Para evaluar entonces las interacciones generales y específicas del colorante a analizar con el solvente, es necesario recurrir a otras parametrizaciones.

2.5.2 Efectos generales del solvente: ecuación de Lippert-Mataga

El modelo de Lippert-Mataga⁸⁹ asume que el fluoróforo es un dipolo en un medio continuo de constante dieléctrica uniforme. No tiene en cuenta interacciones químicas y por ende es una primera aproximación al efecto del solvente. La diferencia de energía entre el estado fundamental y el excitado de un fluoróforo (el corrimiento de Stokes) se puede aproximar como:

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon - 1} - \frac{\eta^2 - 1}{2\eta^2 + 1} \right) \frac{\mu_E - \mu_F}{a^3} + cte \quad (2.21)$$

donde $\bar{\nu}_A$ y $\bar{\nu}_F$ son los números de onda de absorción y fluorescencia, h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, ϵ es la constante dieléctrica del solvente, η es el índice de refracción del medio, a es el radio de la cavidad donde reside el fluoróforo y μ_E y μ_F son los momentos dipolares del estado excitado y fundamental, respectivamente. El término dentro de paréntesis se denomina polarizabilidad de orientación (Δf), y surge del análisis de los dos componentes: el primer factor depende de la constante dieléctrica y representa los cambios espectrales debidos a la reorientación de los dipolos del solvente y la redistribución de electrones en las moléculas del solvente; el segundo componente, dependiente del índice

de refracción, solo representa la redistribución de los electrones. Por ende, la ecuación de Lippert-Mataga predice que grandes corrimientos de Stokes solo se producirán cuando la reorientación del solvente es significativa. La linealidad de un gráfico de $\nu_A - \nu_F$ vs Δf para un fluoróforo dado es evidencia de la influencia dominante de efectos generales del solvente sobre los corrimientos espectrales.

2.5.3 Efectos específicos del solvente: formalismo de Catalán

El formalismo de Catalán divide las interacciones de un solvente en cuatro parámetros supuestamente independientes: la polarizabilidad (SP), la dipolaridad (SdP), acidez (SA) y basicidad (SB). Los valores de los parámetros para diversos solventes se derivaron estudiando colorantes susceptibles a cada uno de los cuatro parámetros en particular, y se encuentran tabulados.^{90;91} Una dada propiedad espectroscópica se puede fitear con la siguiente regresión lineal (Ecuación 2.22):

$$y = y_0 + a_{SP}SP + b_{SdP}SdP + c_A SA + d_B SB \quad (2.22)$$

donde y es el observable espectroscópico, SP, SdP, SA y SB los valores de referencia del solvente, y $a - d$ los coeficientes correspondientes. El peso de cada uno de los coeficientes representa la importancia de cada parámetro para esa sustancia. Al ajustar las observables y a esta regresión y desechar las regresiones que no tengan validez estadística ($p > 0,25$ y $R^2 < 0,8$), se obtienen valores de $a - d$ que se pueden comparar entre fluoróforos. Así, se puede analizar la importancia de cada parámetro del solvente al variar la naturaleza del sustituyente en cada uno de los derivados **9** a **14**.

2.5.4 Resultados

Dada la vasta cantidad de datos adquiridos y necesarios para el estudio de la solvatocromicidad en todos sus aspectos, se presenta primero la colección de datos, y luego se estudiarán sistemáticamente las propiedades y sus tendencias, para poder derivar conclusiones integradoras.

Se midieron las propiedades espectroscópicas de todos los derivados para una serie de solventes con polaridad variada, y los resultados se encuentran en las Tablas 2.6 (isómeros cerrados y propiedades relevantes) y 2.7 (absorción de isómeros abiertos). También se midieron los rendimientos de fotoconversión de los derivados **9** y **14** (Tabla 2.8). Las razones para la elección de estos dos derivados en particular se detallarán más adelante.

Tabla 2.6: Dependencia de las propiedades espectroscópicas de **9-14** con el solvente.

Solvente	E_T^N	9				10			
		$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$	$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$
Heptano	0,012	437, 18	501	0,04	2,5	433, 4	505	0,46	2,4
Dioxano	0,164	431, 34	512	0,50	2,1	443, 41	518	0,48	2,1
THF	0,207	437, 35	514	0,52	-	442, 32	521	0,35	-
AcOEt	0,228	436, 36	511	0,29	1,1	440, 43	516	0,3	1,2
DCM	0,309	435, 38	508	0,45	-	439, 41	516	0,48	-
ACN	0,460	433, 35	515	0,17	-	437, 33	517	0,16	-
Metanol	0,762	428, 39	515	0,12	0,7	441, 56	527	0,15	0,54

Solvente	E_T^N	11				12			
		$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$	$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$
Heptano	0,012	-	-	-	-	-	-	-	-
Dioxano	0,164	448, 33	520	0,73	2,1	448, 25	526	0,42	2,1
THF	0,207	447, 31	524	0,42	-	452, 23	535	0,33	-
AcOEt	0,228	444, 36	521	0,33	1,25	446, 38	532	0,31	1,3
DCM	0,309	439, 41	517	0,62	-	446, 30	524	0,45	-
ACN	0,460	440, 41	533	0,16	-	447, 25	535	0,18	-
Metanol	0,762	446, 29	521	0,22	0,8	445, 56	539	0,21	0,9

Solvente	E_T^N	13				14			
		$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$	$\lambda_{\max}(\text{nm}), \epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\max}^{\text{em}}(\text{nm})$	Φ_f	$\tau_f(\text{ns})$
Heptano	0,012	444, 29	513	0,64	2,2	455, 32	526	0,65	2,3
Dioxano	0,164	454, 37	532	0,74	2,1	472, 44	563	0,56	2,4
THF	0,207	444, 42	539	0,51	-	479, 38	585	0,57	2,2
AcOEt	0,228	451, 35	535	0,31	1,6	472, 40	589	0,57	2,2
DCM	0,309	444, 33	533	0,61	-	472, 39	573	0,64	2,3
ACN	0,460	450, 5	547	0,26	-	487, 36	614	0,27	2,5
Metanol	0,762	444, 44	545	0,32	1,2	473, 36	603	0,42	2,2

Tabla 2.7: Dependencia del máximo de absorberancia del isómero abierto de **9-14** con el solvente.

Solvente	$\lambda_{\max}$ (nm)					
	9	10	11	12	13	14
Heptano	292, 336	294, 335	-	-	299, 334	305, 343
Dioxano	292, 336	298, 334	292, 338	292, 335	297, 336	307, 347
THF	295, 332	306, 336	292, 334	302, 33	296, 336	312, 351
AcOEt	294, 327	297, 331	299, 330	289, 333	300, 334	308, 351
DCM	296, 331	304, 332	295, 332	296, 333	297, 336	311, 350
ACN	294, 331	298, 333	294, 334	283, 340	297, 339	314, 360
Metanol	297, 336	297, 332	290, 330	292, 332	297, 334	305, 348

Tabla 2.8: Rendimiento cuántico de fotoconversión para **9** y **14** en distintos solventes.

Solvente	9		14
	$\Phi_{A \rightarrow C}$	$10^3 \Phi_{C \rightarrow A}$	$10^3 \Phi_{A \rightarrow C}$
Heptano	0,37	6,2	310
Dioxano	0,51	2,6	100
THF	0,44	3,1	9,4
AcOEt	0,50	4,9	9,6
DCM	0,32	3,4	84
ACN	0,52	4,5	0,4
Metanol	0,34	3,1	1,2

El primer patrón que llama la atención, el máximo de emisión (Tabla 2.6), se grafica en la Figura 2.7: los espectros de emisión normalizados de **9** y **14** en el rango de solventes. Se grafica el compuesto **9** ya que sus espectros (y su falta de desplazamiento con la polaridad del solvente) son representativos de los espectros de todos los demás derivados, excepto **14**. Sorprendentemente, este último claramente presenta un solvatocromismo importante, y el desplazamiento de la emisión (526 nm en heptano a 614 nm en acetonitrilo, ($\Delta\lambda(\text{ACN} - \text{Heptano}) = 88 \text{ nm}$) se puede detectar fácilmente con el ojo desnudo (Figura 2.8). A modo de comparación, el colorante dietilamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il^{92,93} (dietilamino-NBD), que tiene un máximo de absorción similar al compuesto **14**, presenta un desplazamiento de Stokes de 60 nm (2288 cm^{-1}) en acetonitrilo y un solvatocromismo de 1,4-dioxano a acetonitrilo de 12 nm (416 cm^{-1}). Los valores correspondientes para **14** son 127 nm (4247 cm^{-1}), desplazamiento de Stokes, y 51 nm (1476 cm^{-1}), solvatocromismo. En comparación, la respuesta solvatocrómica de **14** es más que el doble que la de dietilamino-NBD, acompañado de un desplazamiento de Stokes mucho mayor. El compuesto **14** resulta así un fluoróforo solvatocrómico superior para el rango de absorción, sin tener en cuenta además su naturaleza fotoconvertible.

La misma tendencia del máximo de emisión se ve con otras propiedades: únicamente el

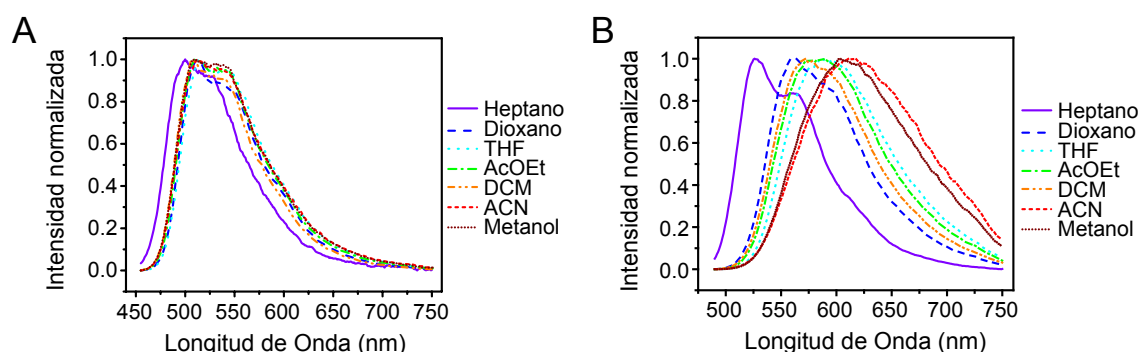


Figura 2.7: Espectros de emisión normalizados de **9** (A) y **14** (B) en distintos solventes.

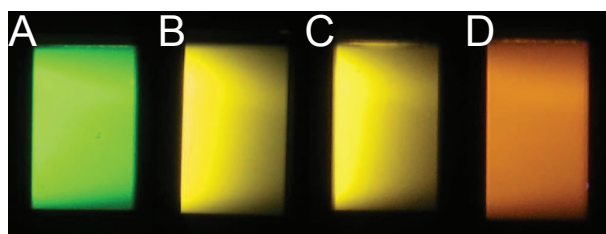


Figura 2.8: Fotografía de la fluorescencia de **14** en heptano (A), dioxano (B), acetato de etilo (C) y metanol (D).

compuesto **14** presenta un cambio significativo en las longitudes de onda de absorción del isómero cerrado ($\Delta\lambda_{max}(ACN - Heptano) = 32$ nm), y una falta de susceptibilidad del tiempo de vida media de fluorescencia, mientras el τ_f de **9-13** disminuye sustancialmente con polaridad creciente (Tabla 2.6). Mientras tanto, ni la longitud de onda de absorción del isómero abierto (Tabla 2.7) ni el rendimiento cuántico de fluorescencia (Tabla 2.6) parecen correlacionar con la naturaleza del solvente, para ninguno de los derivados.

Los rendimientos cuánticos de conversión $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ son independientes del solvente para **9** (Tabla 2.8), pero el $\Phi_{A \rightarrow C}$ de **14** disminuye drásticamente con la polaridad (recordar que $\Phi_{C \rightarrow A}$ es prácticamente imposible de medir para este compuesto). ¿A qué se debe este comportamiento tan particular del compuesto **14**? En una primera aproximación, se puede evaluar la correlación de las propiedades con el valor de E_T^N del solvente (Figura 2.9). Mientras la ν_{max}^{em} prácticamente no varía para el compuesto **9**, para el compuesto **14** se ve una marcada tendencia: cuanto más polar el solvente (E_T^N cercano a 1), menor el número de onda (mayor la longitud de onda) de la emisión. En el caso del τ_f es notable que el valor disminuya para todos los derivados con polaridad creciente del solvente, pero para el compuesto **14** el valor de τ_f es independiente de la naturaleza del solvente. La correlación con E_T^N es un buen indicativo que de hecho es un efecto de la polaridad del solvente y no únicamente interacciones específicas, y esta tendencia se puede analizar en más detalle con las ecuaciones de Lippert-Mataga y Catalán descriptas en las secciones previas.

Análisis con Lippert-Mataga

Para todos los compuestos, los desplazamientos de las bandas de absorción del isómero cerrado fueron menores que los de las bandas de emisión, lo cual indica que el estado excitado es más polar que el estado fundamental, y por ende es estabilizado por un solvente más polar. Como

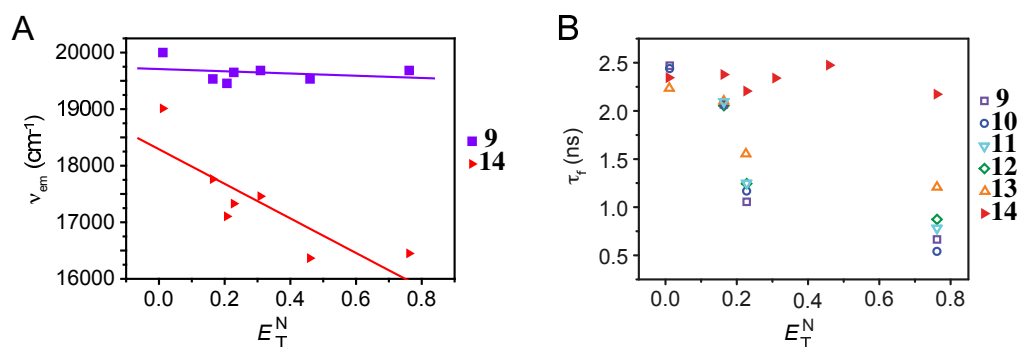


Figura 2.9: Número de onda del máximo de emisión (A) y tiempo de vida media de fluorescencia (B) vs. E_T^N para **9-14** en distintos solventes.

consecuencia, los desplazamientos de Stokes ($\Delta\nu = \nu_{abs} - \nu_{em}$) son mayores en solventes polares para todos los derivados, lo cual indica que el estado excitado tiene un momento dipolar mayor e interacciona fuertemente con solventes polares. Los desplazamientos de Stokes y la polarizabilidad de orientación de cada solvente se calcularon y graficaron (Tabla 2.9, Figura 2.10).

Los gráficos para cada derivado se pueden ajustar linealmente con la ecuación de Lippert-Mataga (Ecuación 2.21, Tabla 2.10), y se observa que a medida que aumenta el carácter donador de electrones del sustituyente (menor σ'), aumenta la sensibilidad del compuesto a cambios en Δf (Figura 2.11).

Se ha sugerido que DHAs no-oxidados con estructuras razonablemente parecidas a las de los compuestos sintetizados presentan separación de cargas entre el centro perfluorado (aceptor) y el grupo sustituyente (donor), lo que explica la respuesta ante la variación de polaridad del solvente.⁹⁴ Se puede asumir una polarización similar en los derivados **9-14**, tal que la densidad electrónica esté desplazada hacia el centro reactivo desde sustituyentes donores de electrones,

Tabla 2.9: Valores de Δf y $\Delta\nu$ para los derivados **9-14**.

Solvente	ϵ	η	Δf	$\Delta\nu$					
				9	10	11	12	13	14
Heptano	1,92	1,3855	5×10^{-5}	2923	3293	-	-	3029	2967
Dioxano	2,209	1,4175	0,022	3671	3268	3091	3310	3229	3424
THF	7,58	1,405	0,210	3428	3431	3287	3432	3970	3783
AcOEt	6,02	1,3719	0,200	3366	3347	3329	3625	3481	4209
DCM	9,08	1,4242	0,218	3303	3399	3437	3338	3761	3734
ACN	38,8	1,3442	0,306	3677	3541	3966	3680	3941	4247
Metanol	33,61	1,3288	0,309	3947	3700	3228	3919	4174	4558

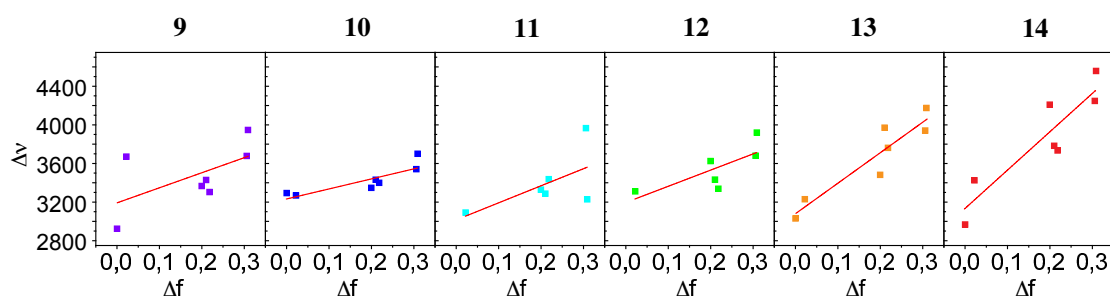
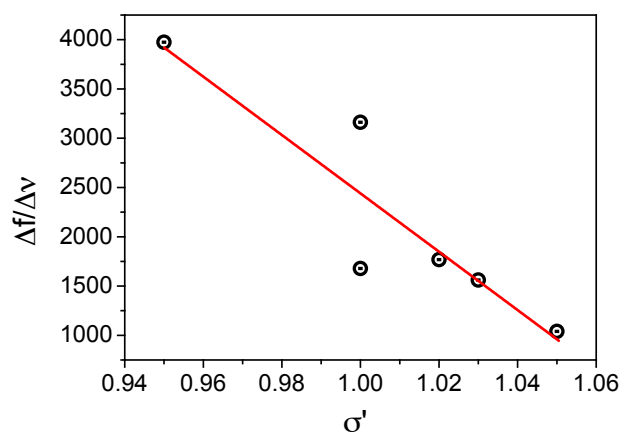


Figura 2.10: Gráficos de Lippert-Mataga para derivados **9-14** con sus respectivos ajustes lineales.

Tabla 2.10: Regresiones lineales de los gráficos de Lippert-Mataga.

Compuesto	σ'	Pendiente	Intersección
9	1,03	1561	3191
10	1,05	1040	3238
11	1,02	1769	3016
12	1,00	1679	3196
13	1,00	3162	3083
14	0,95	3975	3127

**Figura 2.11:** Ajustes de Lippert-Mataga vs. la constante de Hammett σ' para los derivados **9-14**.
Ajuste lineal: $y = 32100 - 29600x$

y es abstraída del centro por sustituyentes atractores de electrones. Así, el momento dipolar es mayor cuanto más donador es el carácter del grupo funcional, y solventes polares le proporcionan mayor estabilidad, explicando los desplazamientos de Stokes observados.

Análisis de Catalán

El análisis de Catalán de los máximos de absorbancia no cumplió con el requisito de bondad de ajuste y por ende no se consideró que las longitudes de onda de absorción dependieran de la naturaleza del solvente. Los datos de las regresiones para las demás propiedades se pueden apreciar en la Tabla 2.11. Los ajustes de los tiempos de vida media de fluorescencia se hicieron con un parámetro a la vez ya que regresiones multi-paramétricas no fueron posibles.

Aunque la acidez (SA) y basicidad (SB) del solvente parecieran tener efectos específicos sobre algunos de los compuestos (**10** responde a la acidez, mientras **11** y **14** responden sutilmente a la basicidad), no hay tendencias generales con estos parámetros. Sorprendentemente, tampoco existe una correlación entre la polarizabilidad (SP) y ninguna de las propiedades medidas.

Sin embargo, el máximo de emisión correlacionó fuertemente con la dipolaridad del solvente (SdP), lo que acuerda con el análisis de Lippert-Mataga. En la Figura 2.12A se puede apreciar esta correlación: a medida que aumenta el carácter donador de electrones (menor σ'), aumenta el (módulo del) parámetro de dipolaridad del solvente, b_{SdP} . Para un fluoróforo con un estado excitado polar, solventes con dipolos sustanciales van a favorecer la relajación del fluoróforo, estabilizando el estado excitado e induciendo un gran desplazamiento en el máximo de fluorescencia. En particular, el compuesto **14** tiene el mayor valor de b_{SdP} , ya que los grupos etoxibromo son eficientes donores de electrones y polarizan efectivamente al DHA.

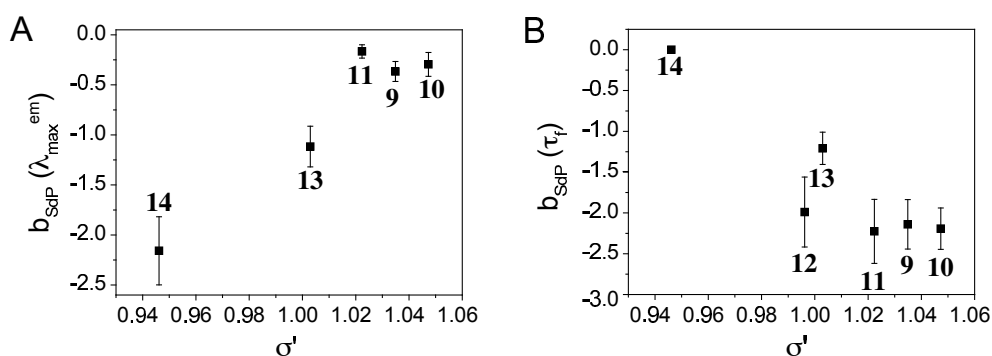


Figura 2.12: Correlación del parámetro de dipolaridad del solvente (b_{SdP}) con el máximo de emisión y el tiempo de vida media de fluorescencia para los derivados **9-14**.

Tabla 2.11: Parámetros ajustados de Catalán.

Longitud de onda del máximo de fluorescencia											
Comp.	R ²	y ₀	Δy ₀	a _{SP}	Δa _{SP}	b _{SdP}	Δb _{SdP}	c _{SA}	Δc _{SA}	d _{SB}	Δd _{SB}
9	0,83	19,95	0,08	-	-	-0,37	0,10	-	-	-0,44	0,17
10	0,96	20,76	0,50	-1,24	0,73	-0,30	0,12	-1,26	0,21	-0,91	0,19
11	0,95	20,29	0,26	-0,92	0,28	-0,17	0,07	-	-	-0,73	0,09
13	0,83	19,36	0,14	-	-	-1,12	0,20	-	-	-	-
14	0,91	19,13	0,26	-	-	-2,16	0,34	-	-	-1,36	0,58
Desplazamiento de Stokes											
Comp.	R ²	y ₀	Δy ₀	a _{SP}	Δa _{SP}	b _{SdP}	Δb _{SdP}	c _{SA}	Δc _{SA}	d _{SB}	Δd _{SB}
10	0,97	2,99	0,07	-	-	0,48	0,12	1,79	0,19	-	-
11	0,87	-5,71	2,24	8,93	3,18	2,54	0,57	-	-	2,55	0,98
14	0,93	4,90	0,72	-3,09	1,02	1,16	0,18	-	-	0,89	0,31
Rendimiento cuántico de fluorescencia											
Comp.	R ²	y ₀	Δy ₀	a _{SP}	Δa _{SP}	b _{SdP}	Δb _{SdP}	c _{SA}	Δc _{SA}	d _{SB}	Δd _{SB}
9	0,99	-1,92	0,09	3,03	0,14	-	-	-0,07	0,04	0,44	0,03
10	0,88	-0,99	0,32	2,39	0,46	-0,20	0,08	-	-	-0,32	0,14
13	0,99	-1,53	0,16	3,39	0,23	-0,63	0,04	0,59	0,07	-	-
Tiempo de vida media de fluorescencia											
Comp.	R ²	y ₀	Δy ₀	a _{SP}	Δa _{SP}	b _{SdP}	Δb _{SdP}	c _{SA}	Δc _{SA}	d _{SB}	Δd _{SB}
9	0,94	2,54	0,17	-	-	-2,14	0,30	-	-	-	-
10	0,96	2,55	0,14	-	-	-2,19	0,25	-	-	-	-
11	0,94	2,73	0,26	-	-	-2,23	0,39	-	-	-	-
12	0,91	2,60	0,28	-	-	-1,99	0,43	-	-	-	-
13	0,92	2,33	0,11	-	-	-1,21	0,20	-	-	-	-
11	1,00	-5,47	0,12	10,26	0,19	-	-	-	-	-	-
12	0,99	-4,76	0,35	9,22	0,52	-	-	-	-	-	-
Rendimiento cuántico de ciclación											
Comp.	R ²	y ₀	Δy ₀	a _{SP}	Δa _{SP}	b _{SdP}	Δb _{SdP}	c _{SA}	Δc _{SA}	d _{SB}	Δd _{SB}
14	0,98	0,327	0,015	-	-	-0,25	0,02	0,10	0,03	-0,30	0,03

Al analizar la tendencia en los tiempos de vida media de fluorescencia con la regresión de Catalán, se puede observar también que el único parámetro que correlaciona es la dipolaridad del solvente. Se grafica el coeficiente b_{SDP} vs. σ' en la Figura 2.12B, donde se ve claramente que el compuesto **14** tiene un comportamiento muy distinto al resto de los derivados. En este caso no se trata siquiera de una tendencia, sino más bien que el τ_f del compuesto **14** se destaca por su falta de susceptibilidad a la dipolaridad. Para explicar este fenómeno es necesario estudiar en paralelo los procesos fotoquímicos que ocurren desde el estado excitado del isómero cerrado.

El valor de $\Phi_{C \rightarrow A}$ para **14** es tan bajo que es prácticamente imposible medirlo. Se puede asumir entonces que la energía de transición necesaria para pasar al IC desde el estado excitado del isómero cerrado es demasiado alta como para que se venza esta barrera a temperatura ambiente. Si la energía de transición es muy alta incluso en solventes no-polares, la estabilización del estado excitado por solventes polares no va a afectar significativamente la disponibilidad de caminos de decaimiento. Así, los tiempos de vida media del estado excitado no varían al cambiar el solvente (Figura 2.12B).

En el caso de los demás derivados, los τ_f disminuyen dramáticamente con la polaridad, a pesar de que el valor de $\Phi_{C \rightarrow A}$ no cambie (Tabla 2.8). Al calcular las constantes de decaimiento correspondientes al estado excitado del isómero cerrado de **9** (Tabla 2.12), se concluye que el menor tiempo de vida resulta de un aumento en las constantes k_{nr} y $k_{C \rightarrow A}$. Para los derivados

Tabla 2.12: Constantes de decaimiento del estado excitado calculadas para **9** en distintos solventes.

Solvente	τ_f (ns ⁻¹)	k_f (ns ⁻¹)	k_{nr} (ns ⁻¹)	$k_{C \rightarrow A}$ (μs ⁻¹)
Heptano	2,5	0,016	0,38	2,5
Dioxano	2,1	0,24	0,24	1,2
AcOEt	1,1	0,26	0,64	4,5
Metanol	0,7	0,17	1,3	4,4

9-13, con grupos atractores de electrones o más bien neutros, el camino de fotoreversión es más accesible porque existe una barrera energética más baja, y cambios relativamente chicos en los niveles energéticos de los isómeros cerrados van a impactar en mayor medida los caminos de decaimiento favorables.

La última propiedad a analizar es el rendimiento cuántico de fotociclación, $\Phi_{A \rightarrow C}$: este no correlaciona con la polaridad del solvente para **9**, pero para **14** se observa una disminución de casi 1000 veces en solventes polares (Tabla 2.8). Se vio que los niveles energéticos de los isómeros abiertos no correlacionan la polaridad del solvente, y entonces esta tendencia es

más difícil de explicar. Una explicación sería que el solvente afecte el equilibrio entre los conformeros paralelo (P) y anti-paralelo (AP) de la forma abierta, lo que podría afectar el $\Phi_{A \rightarrow C}$ aparente. En la Figura 2.13 se puede apreciar que la relación P : AP varía sutilmente, aumentando la proporción de conformero P en metanol, pero este aumento no es suficiente como para explicar la disminución semejante en la $\Phi_{A \rightarrow C}$.

La regresión de Catalán para $\Phi_{A \rightarrow C}$ (Tabla 2.11) muestra que la disminución del rendimiento cuántico se correlaciona con un aumento en SdP y en SB, y en menor medida con SA. La correlación con SdP indica nuevamente que la molécula está polarizada y por ende es susceptible a cambios en la dipolaridad del medio. En particular, $\Phi_{A \rightarrow C}$ aumenta en DCM, un solvente considerablemente menos básico que AcOEt. Estos efectos específicos del solvente es probable que surjan gracias a interacciones específicas con los grupos sulfona, y es necesario un análisis más extenso para estudiar estas interacciones, el cual está fuera del alcance de esta tesis.

2.6 Conclusión parcial de la optimización con sustituyentes

En este capítulo se sintetizaron seis derivados de DHAOs con grupos sustituyentes de distinto carácter dador o atractor de electrones, buscando optimizar las propiedades fotoquímicas para su uso como fluoróforos fotomodulables en la microscopía de fluorescencia. Al aumentar

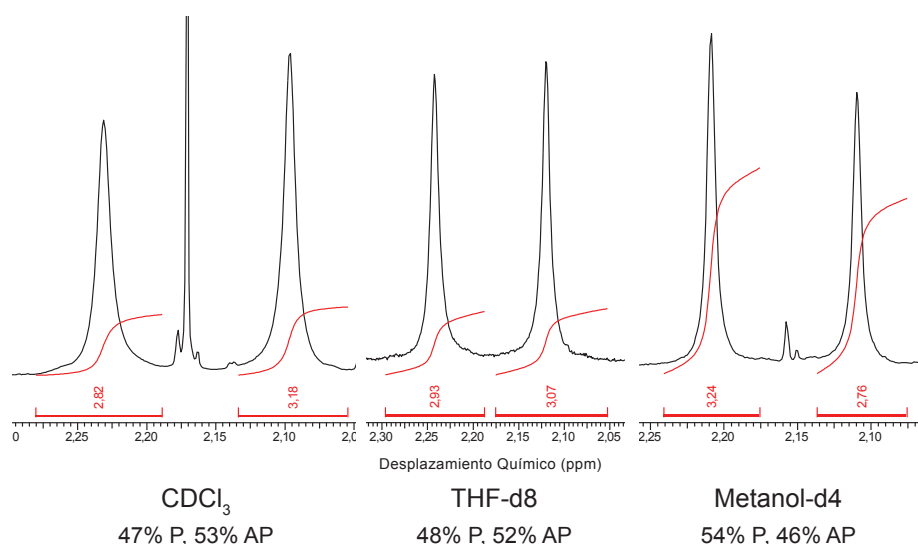


Figura 2.13: Espectros de RMN de los metilos del centro reactivo para el compuesto **14** en distintos solventes deuterados.

el carácter dador de electrones, las bandas de absorción y emisión se desplazaron hacia el rojo, uno de los requisitos para microscopía, pero no se logró aumentar significativamente el rendimiento cuántico de fluorescencia. El corrimiento de las bandas correlaciona con la constante de Hammett σ' y se debe a la estabilización del sistema π del isómero cerrado por los sustituyentes dadores de electrones. A la vez que se estabiliza el estado excitado del isómero cerrado, aumenta la energía de transición necesaria para la fotoreversión, y esto se tradujo en una disminución pronunciada del rendimiento cuántico de fotoreversión.

En cuanto al efecto del solvente, aunque los derivados **9-13** no presentaron un fuerte solvatocromismo, se vio que el tiempo de vida media de fluorescencia era afectado por la dipolaridad del solvente, debido a un aumento en las constantes de decaimiento no-radiativo y de fotoreversión. El compuesto **14** mostró solvatocromismo pronunciado, y constituye uno de los pocos fluoróforos orgánicos fotomodulables y solvatocrómicos.⁹⁵ Solventes polares estabilizan en gran medida al DHAO polarizado por el sustituyente etoxibromo. El análisis multiparamétrico de Catalán asignó la dipolaridad del solvente como el responsable principal del solvatocromismo, afectando las bandas de absorción y emisión y los rendimientos cuánticos de fotociclación.

En conclusión, la sustitución de DHAOs con grupos dadores de electrones permite desplazar las bandas de absorción y emisión hacia el rojo, pero a costo de la estabilización del estado excitado del isómero cerrado, lo cual lleva a disminuciones en los rendimientos cuánticos de fotoreversión. La elección de sustituyentes será un compromiso entre estas propiedades, y será distinto según la aplicación. Para técnicas que requieran de fotoconversión rápida con bajas intensidades relativas de luz, será conveniente elegir sustituyentes atractores de electrones a pesar de tener que fotoconvertir en el UV. Para técnicas que no tengan restricciones temporales o que requieran únicamente un fluoróforo fotoactivable, será más conveniente utilizar sustituyentes dadores de electrones, que permiten trabajar con longitudes de onda menos dañinas para células u organismos biológicos. Así mismo, la posibilidad de acoplar la fotomodulación con un fenómeno solvatocrómico habilita nuevas posibilidades, ya que se puede aprovechar una nueva dimensión en la medición.

El trabajo presentado en este capítulo se publicó en Enero del 2014 en la revista Photochemical and Photobiological Sciences del Royal Society of Chemistry.⁹⁶

Espectrofotometro y fotomodulador

En el segundo año de esta tesis se llevó a cabo un ambicioso proyecto físico y computacional con el objetivo de agilizar la medición de las propiedades espectrofotométricas y fotoquímicas de los diheteroariletenos desarrollados. El diseño, la construcción y la programación de un espectrofotómetro de absorción y emisión acoplado a un módulo de irradiación selectiva para la fotoconversión de los compuestos posibilitó la realización de experimentos de cinética fotoquímica y fotociclos de manera rápida y automatizada, permitiendo que el operador realice simultáneamente otras tareas, y aumentando la productividad. El proyecto combinó elementos de física óptica y programación orientada a objetos, además de la aplicación de conocimientos químicos al problema espectrofotométrico. En este capítulo se detallan las fases de diseño y construcción del equipo multifuncional.

3.1 Motivación

En el Capítulo 2 se describieron en detalle los parámetros que definen el comportamiento fotoquímico de los diheteroariletenos oxidados, y cómo se miden. En particular, se requiere la medición de los espectros de absorción y emisión durante fotociclación y fotoreversión. Con equipos comerciales estos experimentos se realizan de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Ubicar la cubeta con la muestra en un espectrofotómetro de absorción
2. Medir espectro de absorción
3. Trasladar la cubeta al fluorímetro
4. Medir espectro de emisión
5. Trasladar cubeta al sitio de irradiación UV ó visible

6. Irradiar durante un tiempo determinado la muestra
7. Volver al paso 1

Mientras los tiempos de irradiación pueden ser cortos (cuestión de segundos), los tiempos de medición, la manipulación de la muestra y los tiempos involucrados en iniciar las medidas o guardar los datos contribuyen sustancialmente a la duración del experimento. Así, se vuelven muy ineficientes las mediciones, además de requerir la presencia y concentración del operador durante todo el experimento. La manipulación de la muestra trae consigo también otras desventajas, como ser la evaporación del solvente de la muestra, ó contaminación de las paredes de la cubeta. Al finalizar un experimento, se deben procesar datos provenientes de los dos espectrofotómetros por separado, sumados a la información de la irradiación.

Con el objetivo de eliminar el error humano de las mediciones y hacer las mismas más eficientes, se propuso la construcción de un espectrofotómetro de absorción y emisión combinado, con capacidad de irradiación para experimentos de fotoconversión. Se contó con el apoyo particular del Dr. Anthony De Vries y el Dr. Thomas Jovin, además de los servicios de Mecánica, Electrónica y Tecnología Informática, y Óptica del Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen, y del Sr. Esteban Gillanders y el Dr. Francisco Balzarotti, para la realización de este proyecto.

3.2 Diseño

Al diseñar cualquier dispositivo es necesario empezar por un análisis de los requisitos que debe cumplir para poder realizar sus funciones. Se detallan a siguiente los requisitos de las medidas de absorbancia y emisión, y algunos detalles ópticos a tener en cuenta.

3.2.1 Absorbancia

La absorbancia A , de una muestra dada (Esquema 3.1) se calcula como:

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I_{mtra}}{I_0}\right) \quad (3.1)$$

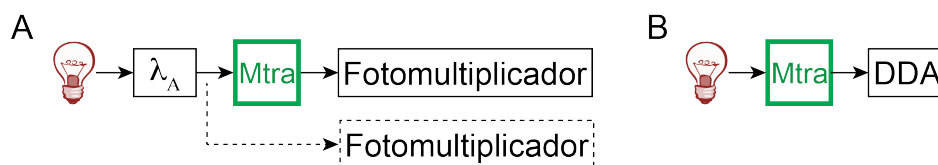


Esquema 3.1: Intensidades de luz antes y después de atravesar una muestra absorbente.

donde T es la transmitancia, definida por I_0 , la intensidad de luz antes de atravesar la muestra e I_{mtra} , la intensidad de luz después de atravesar la muestra. La intensidad de la luz debe ser baja, con tal de no modificar fotoquímicamente la muestra durante la medición. La concentración de la muestra debe ser baja para evitar efectos de dispersión o de reabsorción de la fluorescencia.

Un espectrofotómetro de absorción tiene, normalmente: una fuente de luz; un monocromador que selecciona la longitud de onda de incidencia λ_A ; y un fotomultiplicador para medir la señal lumínica (Esquema 3.2A).^{97;98;99} I_0 se puede medir o bien antes de colocar la muestra en el camino óptico, o bien simultáneamente, usando un segundo camino óptico en el cual se coloca una muestra de referencia. Si se puede despreciar la variación de la intensidad del haz en el tiempo, no es necesario contar con un segundo camino óptico, y se pueden medir secuencialmente I_0 e I_{mtra} . Los espectros de absorción se obtienen barriendo un rango de λ_A , una λ_A a la vez, y reconstruyendo el espectro a partir de los valores calculados de A . En principio, si la absorción de un fotón de una dada energía por una molécula no interfiere con la absorción de otro fotón de energía distinta (normalmente es el caso), es posible incidir simultáneamente en la muestra con varias λ_A y medir la absorbancia de todas a la vez, eliminando la necesidad de los monocromadores. El factor limitante es el uso del fotomultiplicador, que solo puede detectar la intensidad a una λ_A a la vez; sin embargo, los fotomultiplicadores son altamente sensibles y permiten detectar cambios mínimos en absorbancia.

A diferencia de los fotomultiplicadores, los detectores de arreglo permiten detectar varias λ_A simultáneamente.^{99;100} Actualmente se comercializan espectrofotómetros que utilizan dispositivos de carga acoplada¹⁰¹ (DCA, ver Sección 3.2.4), que permiten obtener información espectral instantánea y con relativamente alta sensibilidad. Se utilizan en particular en aplicaciones de campo, para análisis de rutina que no requieran alta precisión, o dentro del ámbito de la educación secundaria. Son particularmente útiles para sistemas de un solo camino óptico, porque pueden registrar rápidamente espectros enteros, minimizando el tiempo entre la medida del blanco y la muestra.⁹⁹ En pos de compactar el espectrofotómetro e incrementar la velocidad de medición, se sacrificó un mínimo de sensibilidad y se decidió trabajar con un detector de arreglo de diodos. Al remover el monocromador de la ecuación, el esquema para medir absorbancia se simplificó significativamente (Esquema 3.2B).

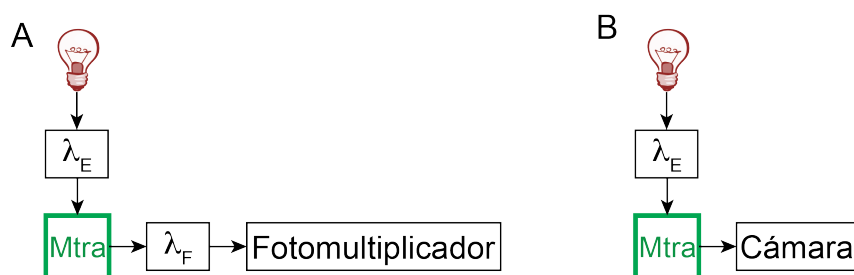


Esquema 3.2: Elementos de un espectrofotómetro de absorción comercial (A) y el formato elegido (B).

3.2.2 Excitación y Emisión

El espectrofotómetro de fluorescencia comercial está compuesto de básicamente los mismos elementos que el espectrofotómetro de absorción, con la excepción de que la emisión se colecta a 90° del haz de incidencia, y se incorpora un segundo monocromador con una longitud de onda (ajustable) distinta a la del primero (Esquema 3.3A).^{89;98;99} La longitud de onda del monocromador de excitación, λ_E , es necesariamente distinta (en general menor) a la del monocromador de fluorescencia, λ_F . La intensidad de fluorescencia generalmente es muy baja comparada con el haz de incidencia, y por ende hay una razón principal por la cual se ubica a 90° el monocromador de fluorescencia: el fotomultiplicador, altamente sensible, se saturaría a 180° con la señal de λ_E que lograría atravesar el monocromador de fluorescencia. Aprovechando que la fluorescencia se emite en todas las direcciones, se reduce la contribución de la luz de excitación ubicando en esta posición al monocromador.

En el caso de utilizar un espectrofluorímetro con un detector lineal DCA en reemplazo del segundo monocromador y fotomultiplicador (al igual que en el caso de absorbancia), se elimina, en principio, la necesidad de medir a 90° , ya que la información que se obtendrá es espectral. Pero hay dos razones por las cuales sigue siendo conveniente ubicar el haz de incidencia y espectrofotómetro a 90° : la λ_E muchas veces es muy próxima a la λ_F (debido a desplazamientos de Stokes pequeños de los fluoróforos), y se superpondrían los espectros; y la diferencia relativa de intensidades de excitación y emisión puede ser dañino para el DCA, porque se puede saturar el detector a λ_E mientras se acumula suficiente señal a λ_F . Por lo tanto, se optó por la disposición que figura en el Esquema 3.3B donde se conserva un primer monocromador de excitación pero el segundo se reemplaza directamente por el detector DCA a 90° .



Esquema 3.3: Elementos de un espectrofotómetro de fluorescencia comercial (A) y el formato elegido (B).

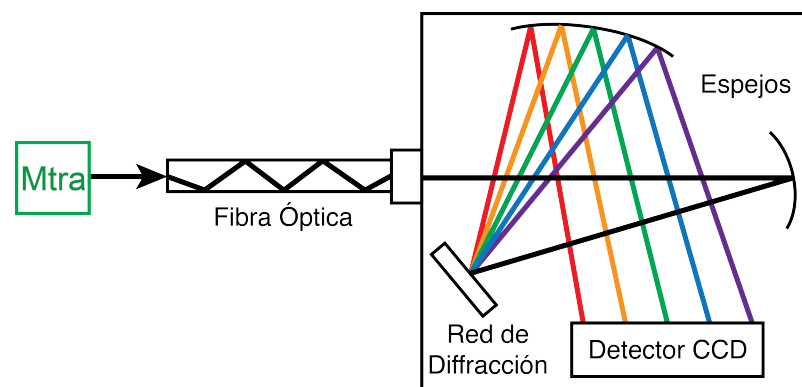
3.2.3 Fotoconversión

Para fotoconvertir eficientemente a una muestra con luz de longitud de onda λ_{FC} es necesario o bien irradiar todo el volumen de la muestra de manera homogénea, o bien irradiar un subvolumen de la misma y contar con una eficiente agitación, tal que todo el volumen resulte irradiado de forma pareja. Esto se definiría según los requisitos ópticos de las demás mediciones, en la próxima sección. En cuanto a la selección de λ_{FC} , una opción sería utilizar el mismo monocromador de excitación del camino de fluorescencia, aunque los monocromadores son poco eficientes en general y se pierde un porcentaje alto de la luz que incide. Una segunda opción sería inaugurar un nuevo camino óptico y utilizar filtros ópticos de paso de banda para seleccionar un ancho de banda fino centrado en λ_{FC} , e irradiar directamente a la muestra.

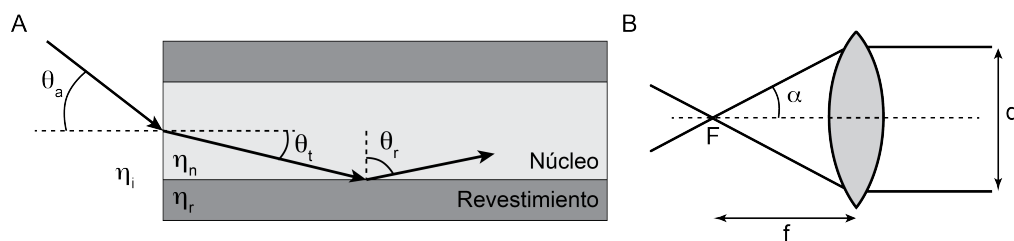
3.2.4 Elementos ópticos

Habiendo definido el uso de un detector DCA para la detección de la luz, se requiere coleccionar la luz transmitida y emitida por la muestra eficientemente y acoplarla a una fibra óptica, el formato de la entrada a los detectores DCA comerciales (Esquema 3.4). Es conveniente colocar la cabeza de la fibra óptica lo más cercano a la fuente de luz como sea posible, y además será necesario colimar la luz para maximizar su paso por la fibra.

El Esquema 3.5A muestra el extremo de una fibra óptica. Luz incide sobre la entrada de la fibra con un ángulo θ y es refractada al cambiar el índice de refracción del medio de η_i a η_n según la ley de Snell, $\sin\theta_t/\sin\theta = \eta_n/\eta_i$. Si θ es menor al ángulo de aceptación de la fibra, θ_a , la luz será reflejada totalmente dentro de la fibra óptica al ser θ_r mayor al ángulo crítico,



Esquema 3.4: Recolección de luz transmitida y emitida de una muestra por una fibra óptica y construcción de un espectrofotómetro con detector DCA.



Esquema 3.5: A) Fibra Óptica. B) Lente convergente.

dependiente de los índices de refracción de los materiales del núcleo y del revestimiento: $\theta_r = \arcsin(\eta_r/\eta_n)$. Si θ es mayor a θ_a , habrá pérdidas de luz dentro de la fibra.

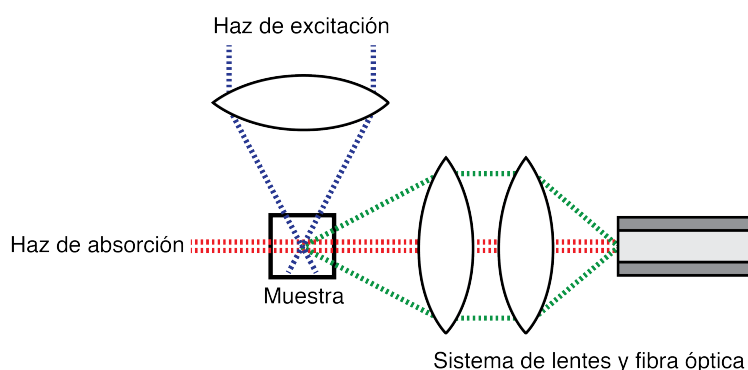
Para asegurar que la luz proveniente de una fuente dispersa (como es una muestra que emite) incida con ángulo menor a θ_a , es necesario acoplar la fibra a una lente convergente. La luz dispersa proveniente de un punto F se puede colimar con una lente que cumpla la relación:

$$\frac{1}{f} = (\eta - 1) \left[\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} + \frac{(\eta - 1)d}{\eta R_1 R_2} \right] \quad (3.2)$$

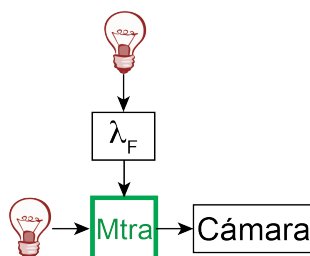
donde f es la distancia a F , η es el índice de refracción del material de la lente, d es el diámetro de la lente y R_1 y R_2 son los radios de curvatura de ambas caras de la lente. Una vez colimada, se puede colocar una segunda lente convergente en el paso óptico, de características tales que el punto focal sea a la entrada de la fibra óptica, y $\alpha < \theta_a$, tal que toda la luz colimada de la fuente dispersa sea transmitida por la fibra.

Para recolectar la mayor intensidad de luz emitida mientras se expone la muestra a la menor intensidad de luz posible, es ideal enfocar el haz de excitación. El punto focal de la lente usada para la excitación debe coincidir entonces con el punto focal de la lente utilizada para la colección de la luz (Esquema 3.6). A la vez, el haz de absorción es preferible que atraviese la muestra colimado, con tal de contar con un solo valor de l en la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon cl$). Si se alinea el haz de absorción con el punto focal, se logra maximizar también la colección de la luz transmitida por la muestra.

Una vez definidos los caminos ópticos para la absorción y la excitación, se puede incorporar la irradiación para la fotoconversión. Si se usa el monocromador de excitación, la irradiación va a estar enfocada en el punto focal de la lente de excitación, y habrá que contar con una agitación eficiente de la muestra para asegurar que se irradie toda la muestra de manera homogénea y para evitar la fotodegradación en el punto focal. Para iluminar la muestra homogéneamente, sería necesario ubicar una fuente sobre la cuarta cara de la muestra junto con un sistema de selección de longitud de onda de irradiación. Al contar con un sostén de cubetas con agitación magnética y enfriamiento por agua incorporado, se comenzó a trabajar en base al diseño que figura en el Esquema 3.7, utilizando la misma lámpara de excitación para la fotoconversión.



Esquema 3.6: Camino óptico de absorción, excitación y recolección de la luz.



Esquema 3.7: Diseño inicial del espectrofotómetro y fotomodulador.

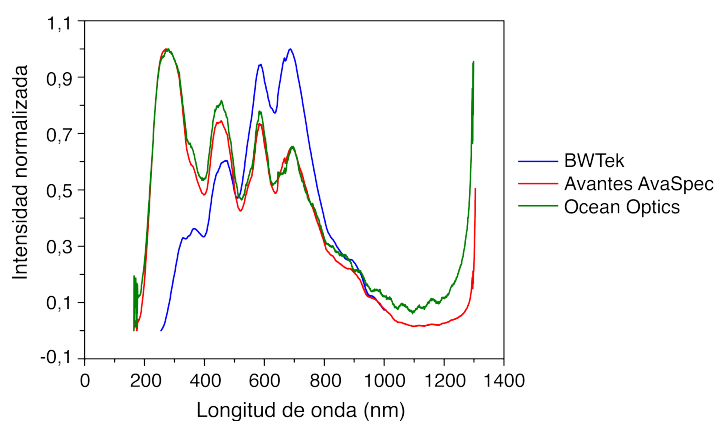
3.3 Elección de detector DCA

El espectrógrafo comercial DCA es un elemento esencial del equipo. Con el fin de adquirir el mejor espectrofotómetro disponible con los recursos disponibles, se compararon cuatro ejemplares disponibles comercialmente. La Tabla 3.1 detalla los espectrofotómetros testeados, las cualidades especialmente favorables, y un costo comparativo. Los cuatro espectrógrafos se evaluaron midiendo la respuesta de los mismos a una lámpara UV-visible-NIR. Al contar cada equipo con su correspondiente fibra óptica de características específicas, no se pudo evaluar la respuesta de cada espectrógrafo independientemente del colimador y la fibra usadas. Los espectros adquiridos con cada sistema espectrógrafo-fibra-colimador se muestran normalizados al máximo en la Figura 3.1. El sistema de BWTek no detectó efectivamente el UV por debajo de 300 nm. El Ocean Optics, en comparación con el Avantes AvaSpec, presentaba casi el mismo perfil de espectro, pero con mucho mayor ruido. Parecía haber un ganador en términos de señal:ruido, y sorprendentemente fue el espectrofotómetro de AvaSpec ULS2048, el que menor relación señal:ruido tenía especificado. Gracias a estas evaluaciones aproximadas sumado a los factores detallados en la Tabla 3.1, se decidió adquirir el espectrógrafo más económico, junto con su respectivo colimador, fibra y software.

La última columna de la Tabla 3.1 se refiere a la posibilidad de controlar el espectrógrafo

Tabla 3.1: Especificaciones de espectrógrafos comerciales testeados.

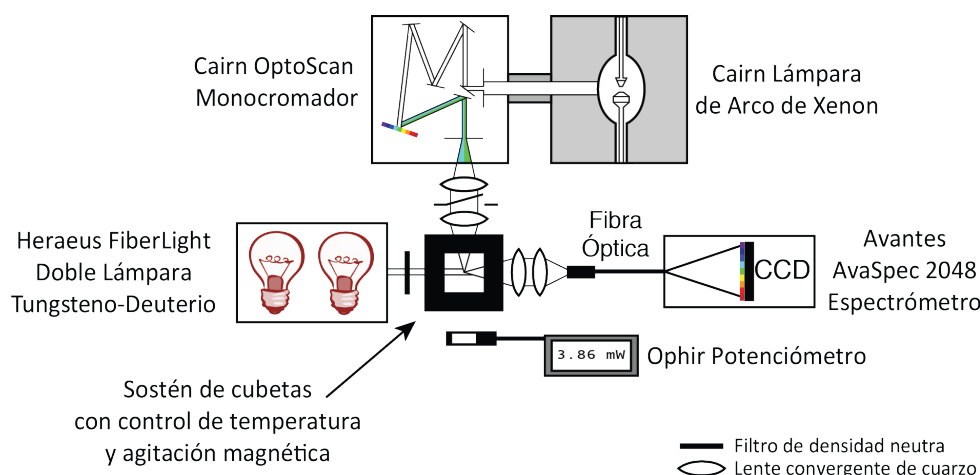
Marca y Nombre	Rango de λ (nm)	Abertura (μm)	Resolución (nm)	Tiempo de integración (ms)	Señal:Ruido	Costo relativo	Compatibilidad con LabView
BWTek ¹⁰² Exemplar LS	200-850	25	0,6	1	295:1	++	-
Avantes ¹⁰³ AvaSpec ULS2048	200-1100	50	2,3	1,11	200:1	+	+
Avantes ¹⁰³ AvaSpec ULS2048XL	200-1100	50	2,5	1,11	300:1	+++	+
Ocean Optics ¹⁰⁴ USB4000	200-900	50	2,25	3,8	300:1	++	+

**Figura 3.1:** Espectros adquiridos con los espectrofotómetros comerciales.

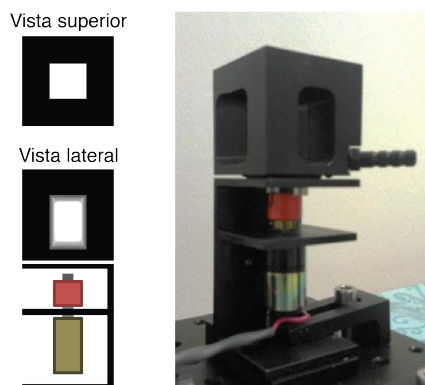
con LabView de National Instruments,¹⁰⁵ el programa elegido para controlar dispositivos, ampliamente utilizado en el ámbito académico. Se eligió el LabView por la facilidad de incorporar dispositivos de distintos orígenes a un mismo programa, y por el amplio conocimiento previo de los miembros del grupo en programación con este medio. Mientras se podía programar en principio cualquier espectrofotómetro con LabView, si el equipo ya venía con los elementos básicos programados en LabView, su incorporación en el programa final iba a ser más directo. Los espectrógrafos de Avantes tenían la ventaja de contar con todos los componentes de LabView armados, y el apoyo técnico del fabricante para su implementación.

3.4 Componentes y construcción

El Esquema 3.8 muestra los componentes y la construcción de la primera versión del aparato espectrómetro (absorbancia y fluorescencia) + fotomodulador diseñado. Se adquirió una lámpara doble de Tungsteno-Deuterio, marca Heraeus FiberLight, para obtener espectros de absorción en todo el rango UV-visible-infrarojo cercano.⁹⁹ Se encargó una placa controladora para prender y apagar las lámparas individualmente y controlar la apertura y cierre del obturador. Se colocó en frente de esta fuente un filtro de densidad neutra para reducir la potencia de incidencia del haz de absorción. La fuente de excitación era una lámpara potente de arco de Xenón, y tanto la caja de la lámpara como el monocromador de excitación OptoScan eran de Cairn Research. Luego del monocromador se colocaron un obturador y dos lentes convergentes para enfocar el haz de excitación en la muestra. Todas las lentes utilizadas eran de cuarzo para transmitir el UV. Para la fotoconversión, en esta primera versión, se utilizó el mismo camino de excitación. El sistema de detección, como se describió en la Sección 3.3, estaba compuesto de un colimador, una fibra óptica, y el espectrógrafo DCA de Avantes.



Esquema 3.8: Componentes del espectrofotómetro y fotomodulador, versión 1.



Esquema 3.9: Sostén de cubeta: vista superior, lateral, y fotografía.

El sostén de cubetas con control de temperatura por agua y agitación magnética (Esquema 3.9) se colocó tal que el punto focal del haz de excitación quedara en el centro de la porta cubetas. Un potenciómetro se ubicó del otro lado del sostén de cubetas para medir la intensidad de luz de irradiación.

Todos los elementos (exceptuando el monocromador y las cajas controladoras) se montaron sobre un riel en una mesa óptica y se ajustaron las alturas y ángulos de las lámparas y detectores tales de que todos los caminos ópticos estuvieran alineados correctamente. Se agradece particularmente al Servicio de Mecánica del Instituto Max Planck de Química Biofísica por su apoyo durante el montaje del equipo. El monocromador y la lámpara de arco de Xenón se calibraron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los obturadores, además de las lámparas, el monocromador y el espectrógrafo, fueron controlados con la computadora mediante programación con LabView, y los detalles se encuentran en la Sección 3.6. Se fabricó una caja de cartón para evitar filtraciones de luz, tanto de irradiación como de luz espúrea externa que podía interferir con las mediciones. En la Figura 3.2 se pueden apreciar fotografías del primer armado del equipo en su totalidad con algunos componentes señalados para orientar al lector.

Una vez armada la primera versión del espectrofotómetro, se puso este a prueba con una muestra de uno de los derivados sintetizados en el Capítulo 2. Los detalles de las mediciones y la programación se verá en detalle en la próxima Sección. Los primeros experimentos de fotoconversión demostraron la poca eficiencia que tenía el equipo en este formato: la intensidad de luz enfocada a la salida del monocromador era muy baja como para fotoconvertir rápidamente la muestra. Esto se debía a que la mayor parte de la luz que ingresaba al monocromador se perdía en el mismo, debido a la baja eficiencia de la red de difracción y al límite en las aberturas. Se decidió entonces adoptar la segunda opción para la fotoconversión: una segunda lámpara, ubicada sobre el cuarto costado del sostén de cubetas. El diseño de la



Figura 3.2: Fotografías del primer armado del espectrofotómetro y fotomodulador. Algunos componentes se señalan.

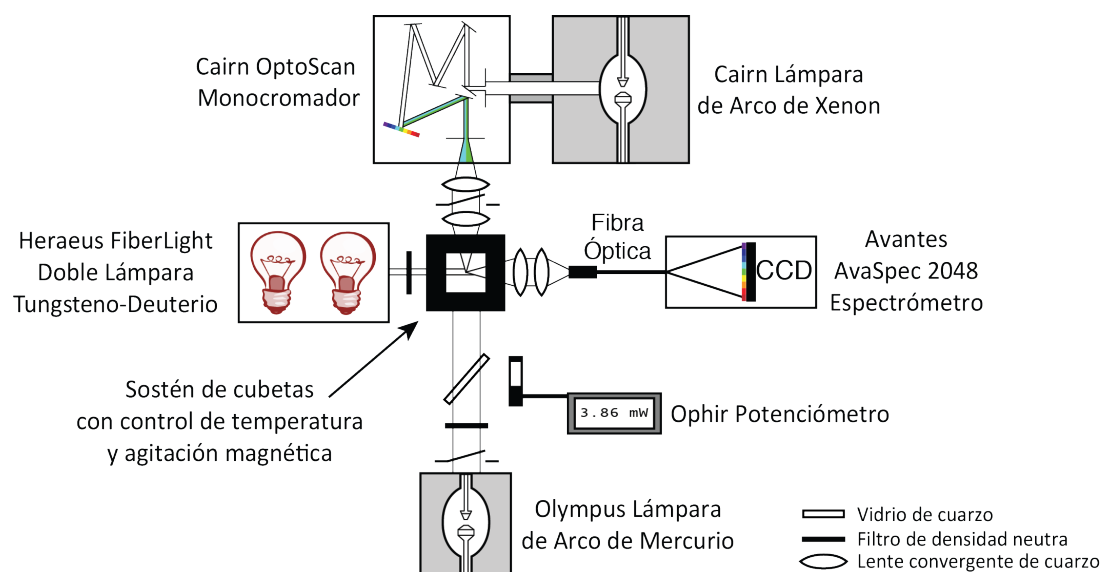
segunda versión se puede observar en el Esquema 3.10. Se incorporó una lámpara de arco de Mercurio, marca Olympus, un obturador, un filtro de densidad neutro removible para regular la intensidad de irradiación, y filtros de paso de banda de la longitud de onda apropiados para la fotoconversión. El potenciómetro se colocó a 45° del camino de irradiación, e incidía sobre el aproximadamente 5% de la intensidad del haz, desviado con un vidrio de cuarzo. Así, se logró mayor intensidad de irradiación durante la fotoconversión, y los experimentos se podían hacer en tiempos menores.

3.5 Detalle de cuentas/correcciones

La programación del equipo no se concentró únicamente en el control de las partes, sino también en el procesamiento y la presentación de la data a medida que se iba adquiriendo. En esta Sección se detallan las cuentas que fueron incorporadas a la programación, y las correcciones⁹⁹ necesarias para cada uno de los componentes.

3.5.1 Cálculo de absorción

La absorbancia de una muestra se calcula mediante la Ecuación 3.1, para lo cual es necesario medir la intensidad de referencia, I_0 , y la intensidad de la muestra, I_{mtra} . Al momento de hacer este cálculo, hay que tener en cuenta que el detector reporta una señal determinada en



Esquema 3.10: Componentes del espectrofotómetro y fotomodulador, versión 2.

la oscuridad, I_{oscuro} , debido a la luz espúrea. Estas cuentas, que no provienen de la referencia o de la muestra se deben restar a la señal antes de calcular la absorbancia (y la emisión). Es decir, la absorbancia de una muestra es:

$$A_{mtra} = -\log \left(\frac{I_{mtra} - I_{oscuro}}{I_0 - I_{oscuro}} \right) \quad (3.3)$$

Además, la absorbancia de una muestra viene dada por la absorbancia misma de la sustancia, del solvente, y de la cubeta. Por esto, se mide primero la absorbancia de un blanco, compuesto por la cubeta y el solvente a usar, y luego se resta este valor al valor de absorbancia total de la muestra. Se calcula la absorbancia real de una muestra como:

$$A_{mtra}^{real} = A_{mtra}^{obs} - A_{blanco} = -\log \left(\frac{I_{mtra} - I_{oscuro}}{I_0 - I_{oscuro}} \right) + \log \left(\frac{I_{blanco} - I_{oscuro}}{I_0 - I_{oscuro}} \right) \quad (3.4)$$

Es necesario entonces, para poder calcular la absorbancia de una muestra, registrar las siguientes intensidades: I_{oscuro} (lámpara apagada), I_0 (lámpara prendida, camino óptico libre), I_{blanco} (cubeta y solvente) e I_{mtra} (cubeta con muestra).

3.5.2 Corrección de no-linearidad de la DCA

Las intensidades que se detectan en la cámara DCA dependerán de la respuesta del detector para cada una de esas longitudes de onda, y esto se tiene que calibrar, para evitar que influyan variaciones propias del detector en los valores reportados. El detector se calibró según las instrucciones del espectrógrafo para corregir las desviaciones en intensidad en todo el rango de λ . Se tomaron espectros de la lámpara de absorción a distintos tiempos de integración del detector (Figura 3.3A) y se normalizaron a cuentas por segundo y luego respecto al máximo para cada λ . Las cuentas por segundo normalizadas se ajustaron a un polinomial de grado 7

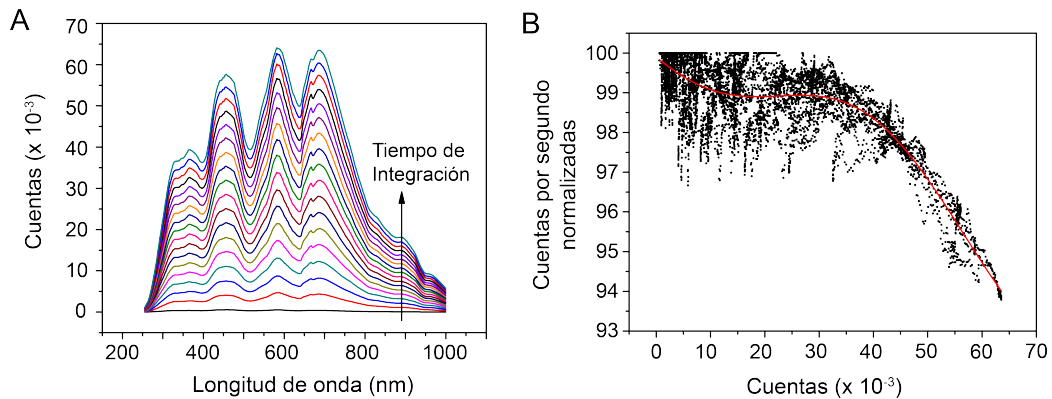


Figura 3.3: A) Espectros de la lámpara de absorción a distintos tiempos de integración del detector. B) Curva polinomial de calibración del detector.

(Figura 3.3B), y este polinomial se utilizó para corregir los valores de cuentas obtenidos para cada medida:

$$y = 99,9 - 1 \times 10^{-4}x + 3 \times 10^{-9}x^2 + 7 \times 10^{-14}x^3 - 1 \times 10^{-18}x^4 - 9 \times 10^{-23}x^5 + 2 \times 10^{-27}x^6 - 1 \times 10^{-32}x^7 \quad (3.5)$$

donde y es la intensidad corregida y x es la intensidad medida por el detector. Esta corrección se aplicó siempre, al tratarse de una corrección propia del detector.

3.5.3 Corrección por sensibilidad diferencial de la DCA

El detector DCA se debió calibrar por sensibilidad variada a cada λ . Para esta corrección se utilizaron fluoróforos estándar (BAM F002-F005, fluoróforos certificados de referencia^{106;107}). BAM provee cinco fluoróforos, pero se utilizaron solamente cuatro de estos, ya que el rango de excitación no se extendía hasta 280 nm, donde era necesario excitar al primer estándar. Se midieron los espectros de emisión de cada uno de los cuatro fluoróforos, excitados con una lámpara de mercurio con un filtro de paso de banda apropiado (Figura 3.4A), se normalizaron para eliminar contribuciones de la lámpara de excitación, y se compararon con los mismos espectros medidos en un espectrofotómetro previamente calibrado. Utilizando el software provisto por BAM, se calculó la curva de calibración para el detector para corregir la sensibilidad relativa del detector a cada λ (Figura 3.4B). El factor de corrección se aplicó para las medidas de emisión y excitación, al tratarse nuevamente de una corrección propia del detector, pero que no influye en el cálculo de absorbancia ya que este es un cociente.

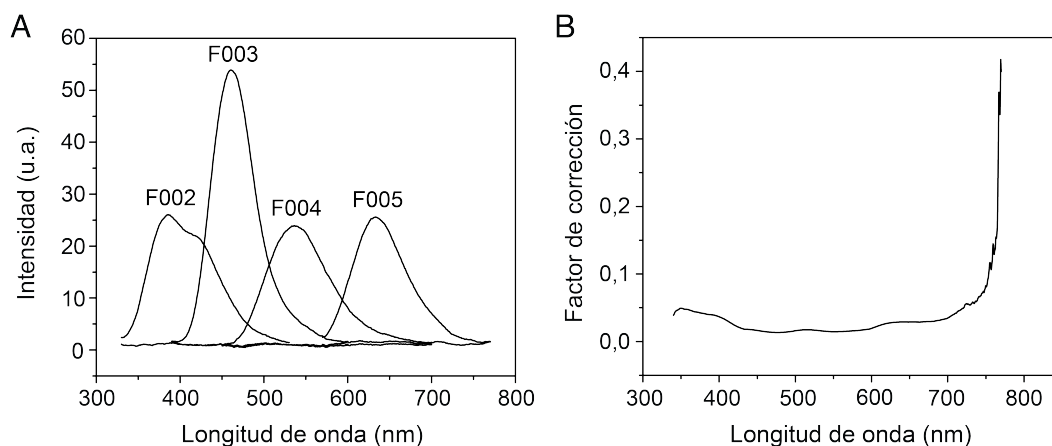


Figura 3.4: Espectros de emisión de los fluoróforos estándar BAM F002-F005.

3.5.4 Corrección de excitación

La última corrección necesaria para la utilización del espectrofotómetro era corregir los espectros de emisión o excitación por diferencias de intensidad en el espectro de la lámpara de excitación (lámpara de arco de Xenón). Al haber calibrado por completo el detector, se utilizó este para medir los espectros de excitación de los fluoróforos de referencia que se encuentran en la Tabla 3.2. Los espectros de excitación se midieron en un espectrofluorímetro de referencia, y en el espectrofotómetro construido usando la lámpara de excitación no-calibrada (Figura 3.5A). Se calculó a partir de estos espectros un factor de corrección dependiente de la longitud de onda (Figura 3.5B). Se puede apreciar que el factor de corrección es alto a bajas longitudes de onda, lo que refleja la poca intensidad de luz que hay disponible en esta parte del espectro. No es conveniente, por esta razón, excitar a longitudes de onda menores a 360 nm, para minimizar el error contribuido por la corrección. El factor de corrección se aplica siempre que se utilice la lámpara de excitación, es decir, para mediciones de emisión o excitación.

Tabla 3.2: Fluoróforos estándar y parámetros usados para obtener los espectros de excitación.

Fluoróforo	Rango de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
Cumarina 120	340-395	430
Fluoresceína	380-500	510
Rodamina 6G	475-540	550
Rodamina B	500-555	565

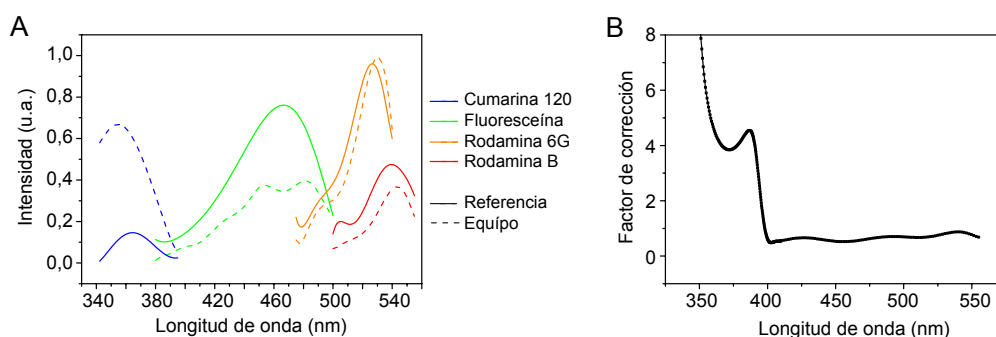


Figura 3.5: A) Espectros de excitación de los fluoróforos de referencia en el espectrofotómetro de referencia (línea continua) y el construido (línea punteada). B) Factor de corrección calculado.

3.5.5 Rango útil del espectrofotómetro

Dados los rangos de los factores de corrección derivados en las secciones previas, se definieron los rangos útiles del espectrofotómetro construido. El rango de absorción es de 200-1100 nm, el rango entero del espectrofotómetro, ya que la única corrección necesaria es la de linealidad del detector. La corrección de sensibilidad no influye en este caso, porque la absorbancia es un cociente de intensidades, y las fallas en sensibilidad se cancelan. En la práctica, el rango útil es menor debido a limitaciones de las soluciones y los materiales de medición. El rango de excitación para fluorescencia es de 340-555 nm, ya que es en este rango que se calibró la lámpara de excitación. Y la detección de emisión se puede realizar en el rango de 340 nm a 750 nm, el rango de calibración de la sensibilidad del detector.

3.5.6 Estabilidad de las lámparas

Las lámparas de Xenón, Mercurio y dual Tungsteno-Deuterio requieren un tiempo de calentamiento para que se establezca la intensidad de luz generada por las mismas. Los tiempos de estabilización se evaluaron midiendo espectros de las lámparas a distintos tiempos hasta llegar a una señal estable. En la Figura 3.6 se muestran las intensidades registradas a distintas longitudes de onda para las tres lámparas en el tiempo. La lámpara de Tungsteno-Deuterio presenta una desviación mayor a la desviación estándar después de 60 minutos (se ajustó cada longitud de onda con una recta), especialmente para longitudes de onda cortas, con lo cual conviene renovar el espectro de referencia de la lámpara cada hora. Las lámparas de Xenón y Mercurio ambas requieren un tiempo de estabilización, y hay que prenderlas aproximadamente 70 y 40 minutos, respectivamente, antes de su uso.

3.5.7 Señal oscura y promediado

Para mejorar la relación señal:ruido, se pueden eliminar las fuentes de ruido, aumentar la intensidad de la señal, o promediar los espectros para cancelar el ruido. En total ausencia de irradiación, el detector informa un número de cuentas «oscuras» que provienen del ruido electrónico de la cámara DCA. La Figura 3.7A muestra la diferencia entre las cuentas antes y después de habilitar la resta de las cuentas oscuras en el detector. Es importante la distinción entre estas cuentas oscuras y el espectro oscuro que se debe medir y restar a todas las medidas de absorbancia y emisión - las cuentas oscuras se restan automáticamente luego de habilitar esta función en el espectrofotómetro; el espectro oscuro tiene en cuenta la luz espúrea y se debe medir en las mismas condiciones que se miden los espectros de absorción o emisión.

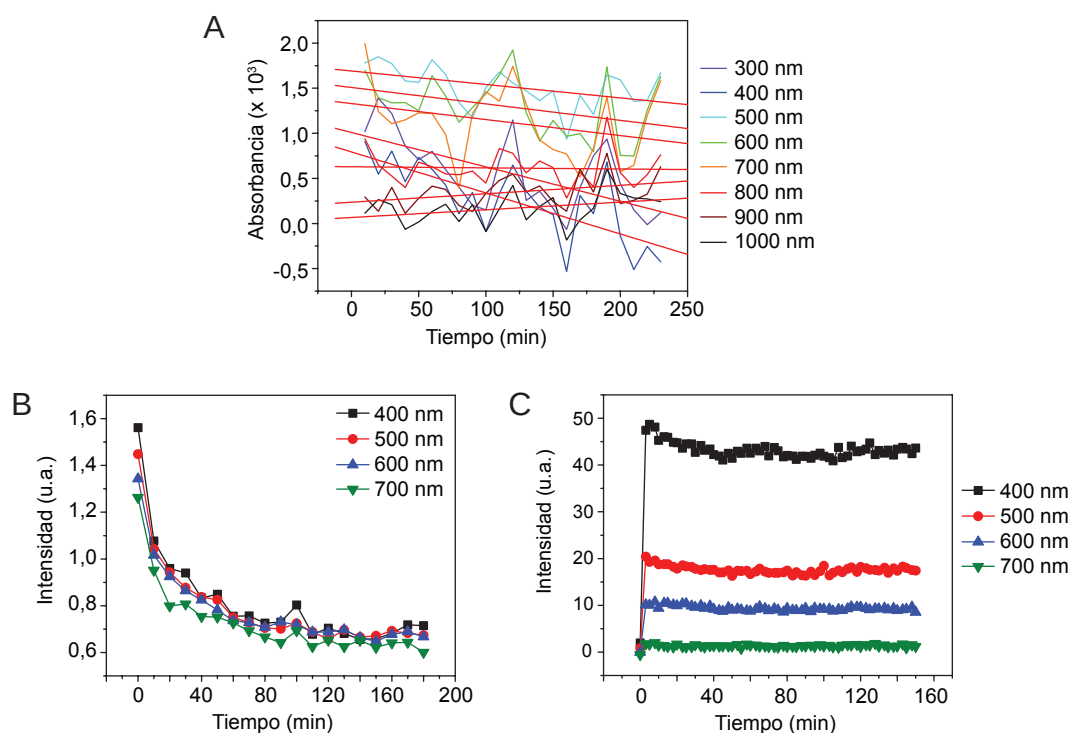


Figura 3.6: Estabilidad de las lámparas de Tungsteno-Deuterio (A), Xenón (B) y Mercurio (C) en el tiempo a distintas longitudes de onda.

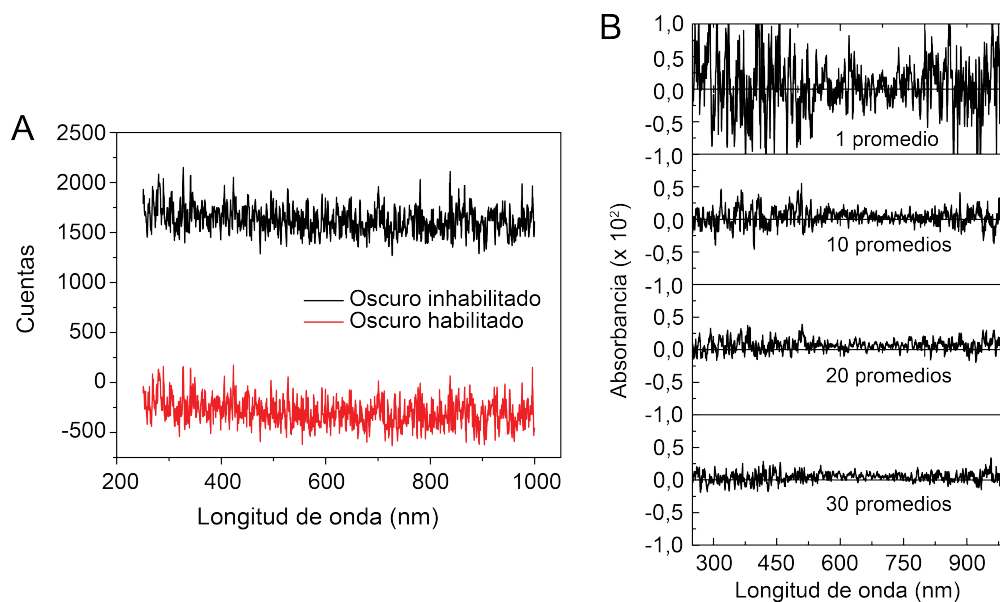


Figura 3.7: A) Intensidad de señal antes y después de restar la señal oscura. B) Ruido de absorbancia después de promediar la señal.

En el caso de absorción, no se puede aumentar la relación intensidad del haz de referencia/tiempo de integración de manera ilimitada porque se satura el detector. En el caso de emisión, no se puede aumentar la relación intensidad del haz de excitación/tiempo de integración sin tener en cuenta la degradación de la muestra o fenómenos de re-absorción de fluorescencia. Estos parámetros se optimizan para cada medición, intentando minimizar la exposición de la muestra a la luz mientras se optimiza la calidad de la señal.

El otro parámetro que afectará la calidad de la señal es el número de espectros que se promedien. El beneficio del promediado de espectros se puede observar en la Figura 3.7B, donde al aumentar el número de promedios disminuye el ruido. El error en la medida de absorbancia para 30 promedios de 750 ms de tiempo de integración es de $\pm 0,002$. En los extremos de longitudes de onda cortas y largas hay más ruido que en el centro del espectro, y esto se debe a la intensidad relativa de la lámpara en estos extremos. El número de promedios necesarios para reducir el ruido de un espectro es inversamente proporcional al tiempo de integración de la medición, ya que a mayores tiempos también se cancela el ruido azaroso, y proporcional a la intensidad de la señal.

3.5.8 Precisión temporal del obturador

En frente de la lámpara de mercurio hay un obturador que se abre y cierra durante el tiempo de irradiación especificado por el operador. Como las velocidades de fotoconversión son muy rápidas en algunos casos, y se busca optimizar además el uso del tiempo, estos tiempos de irradiación pueden ser muy cortos. El obturador requiere de una cierta cantidad de tiempo para abrir y cerrarse, y el error en este tiempo va a afectar la cantidad de luz que recibe la muestra. Para evaluar cuál era el mínimo tiempo que se podía irradiar la muestra sin un error

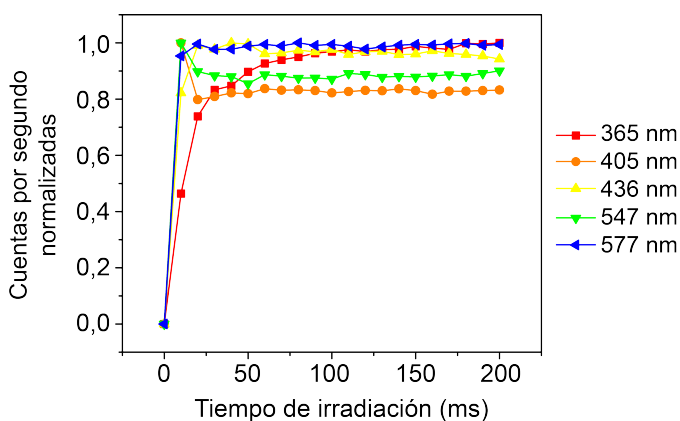


Figura 3.8: Cuentas por segundo normalizadas para distintos tiempos de irradiación.

considerable, se midieron las cuentas obtenidas por el detector durante distintos tiempos de irradiación (los tiempos de integración del detector fueron siempre mayores a los tiempos de apertura y cerrado del obturador) y se normalizaron a cuentas por segundo. De esta manera, si hay una desviación importante en el número de cuentas totales por segundo que se obtienen, significa que el tiempo de apertura/cerrado intrínseco del obturador está afectando a la medición. El gráfico muestra que el tiempo de irradiación no debe ser menor a 100 ms para evitar introducir un error por este mecanismo.

3.6 Programación en LabView y programa

La programación de todos los componentes del espectrofotómetro, la configuración de experimentos y el procesamiento de datos se realizó con LabView de National Instruments.¹⁰⁵ Se eligió este programa para la tarea debido a la experiencia que había en el grupo y la compatibilidad de los varios elementos del equipo. En esta Sección se detallarán los algoritmos correspondientes a cada experimento y su equivalente en el LabView, indicando en cada paso los elementos claves de la programación. No se hará incapié especial en la programación específica de cada componente, ya que lo esencial son los algoritmos y no necesariamente la marca o naturaleza de las partes. Aunque el programa entero de LabView cuenta con un gran número de sub-programas, se darán ejemplos únicamente con el programa principal o el sub-programa relevante en cada caso. A medida que se fueron incorporando más detalles para facilitar el uso o aumentar las funciones del programa, se complejizó el mismo. Por ende se recomienda solo concentrarse en las regiones marcadas en las Figuras incluídas en esta Sección, para facilitar la comprensión.

3.6.1 Absorción

En la Figura 3.9 se detallan los algoritmos usados para medir espectros relacionados con la absorbancia: oscuro, referencia, blanco y muestra. En todos los casos se debe abrir y cerrar el obturador de la lámpara de absorción, excepto en el caso del espectro oscuro. La medición de los espectros se hace con los parámetros seleccionados por el operador (tiempo de integración y número de espectros promediados, principalmente), y se grafican en el programa los espectros luego de cada medición. Para graficar los datos del blanco y la muestra, se procesan primero las intensidades para mostrar datos de absorbancia, fácilmente interpretados por el operador. La Figura 3.10 muestra las secciones del programa de LabView correspondientes al procesamiento de los datos de los espectros de referencia, blanco y muestra. El espectro oscuro se procesa de la misma manera que la referencia, donde la única corrección es por la

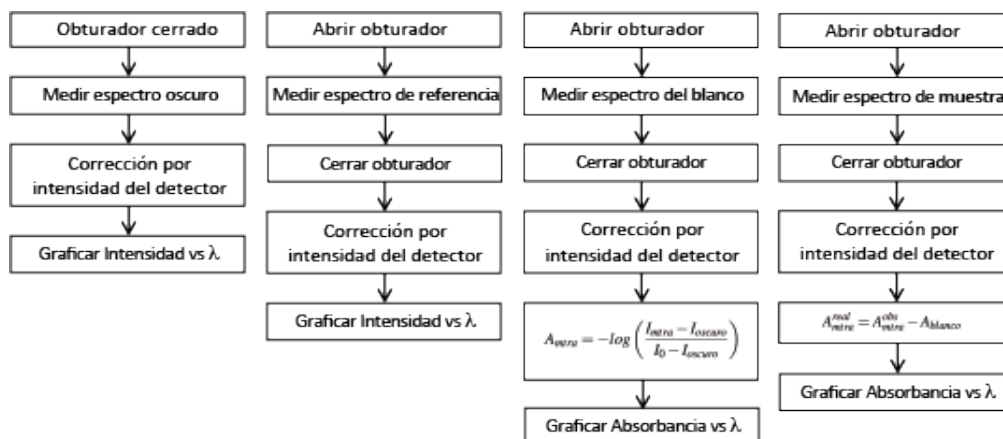


Figura 3.9: Algoritmos para medición de espectros de intensidad o absorbancia de (izquierda a derecha) oscuro, referencia, blanco y muestra.

linealidad del detector, mientras que ambos el blanco y la muestra incorporan los cálculos de absorbancia relacionados con ellos. La Figura 3.11 muestra el procedimiento completo para una medición de absorbancia. En la línea principal, de izquierda a derecha, se lee: preparar el espectrofotómetro AvaSpec para la medición; iniciar la medición; abrir y cerrar el obturador durante la medición; recolectar los datos del espectrofotómetro; procesar los datos y construir el gráfico.

3.6.2 Emisión

El algoritmo para la medición de emisión se puede apreciar en la Figura 3.12A. En este caso, es necesario configurar previamente el monocromador antes de abrir los obturadores y comenzar la medición. Luego, se aplican todas las correcciones necesarias antes de graficar los datos: las correcciones propias del detector, y aquella propia de la lámpara de excitación. Una vez definido el algoritmo, se programó en LabView el procesamiento de datos necesarios (Figura 3.12B), seleccionando solamente el rango de longitudes de onda que aplica para las mediciones de emisión, y todas las correcciones secuencialmente. La secuencia total de una medición de emisión se observa en la Figura 3.13 y de izquierda a derecha se registran los siguientes procesos: se mide un espectro oscuro con la configuración del espectro de emisión (este sub-programa incluye todos los pasos siguientes, excepto el procesamiento del gráfico); se prepara el espectrofotómetro para la medición; se prepara el monocromador con los parámetros necesarios para la medición; se abre el obturador; se mide el espectro; se abre y cierre el obturador interno del monocromador; se cierre el obturador externo; se recolectan los datos del espectrofotómetro; y se construye el gráfico de emisión. Los parámetros de emisión necesarios para configurar el espectrofotómetro y el monocromador son: tiempo de integración, número

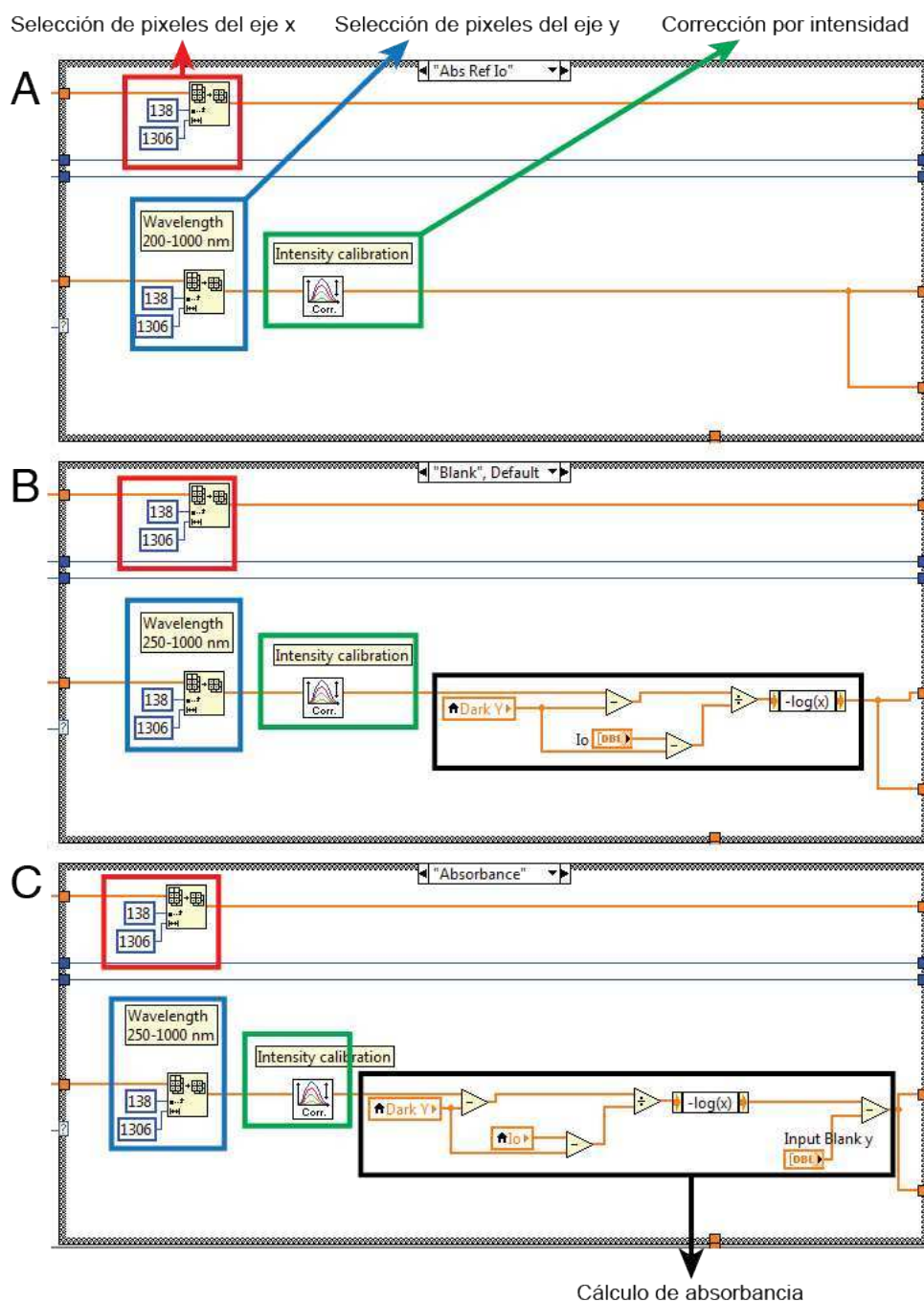


Figura 3.10: Programación en LabView para los espectros de A) oscuro y referencia, B) blanco y C) muestra.

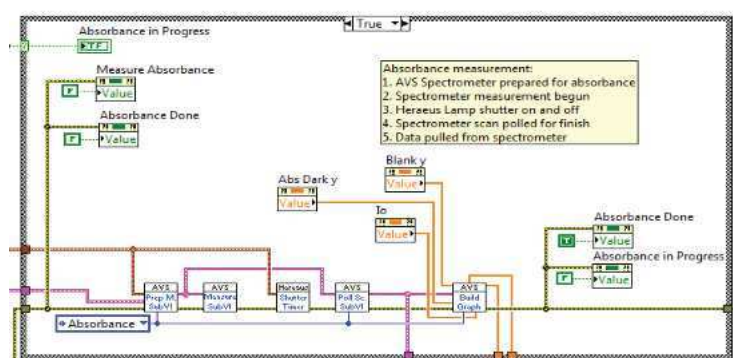


Figura 3.11: Programación en LabView para una medida completa de absorbancia.

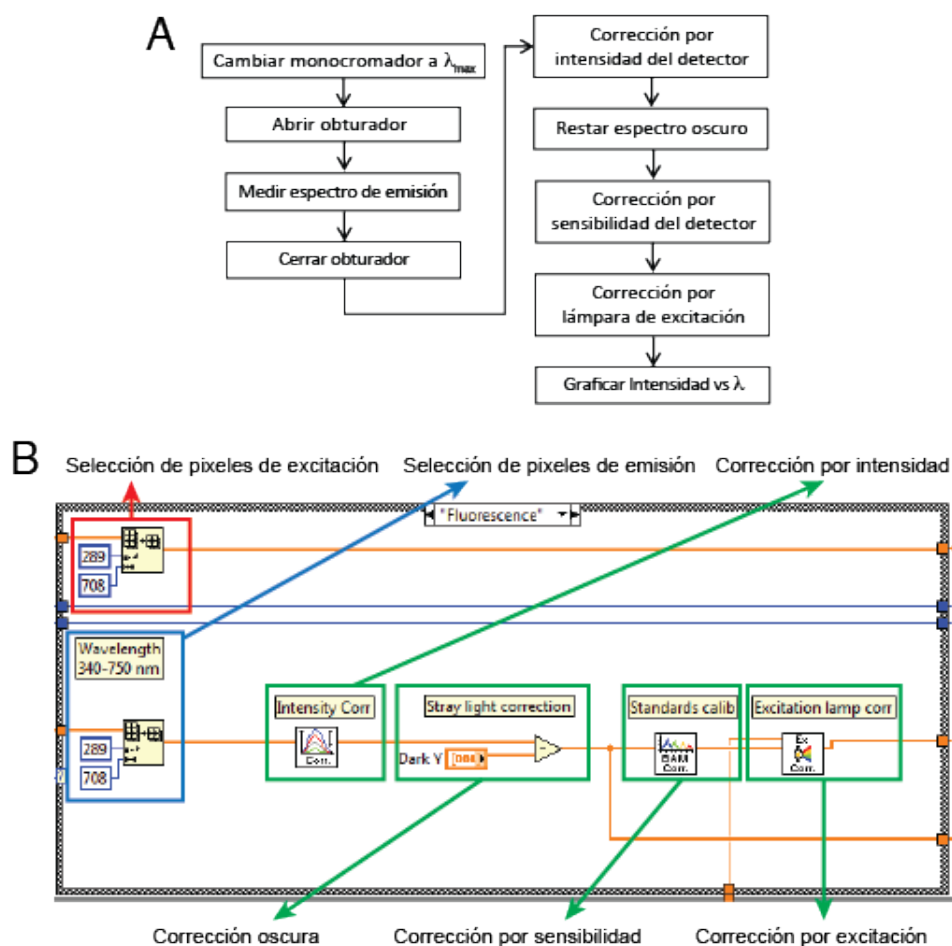


Figura 3.12: A) Algoritmos para medición de y B) programación con LabView para espectros de emisión.

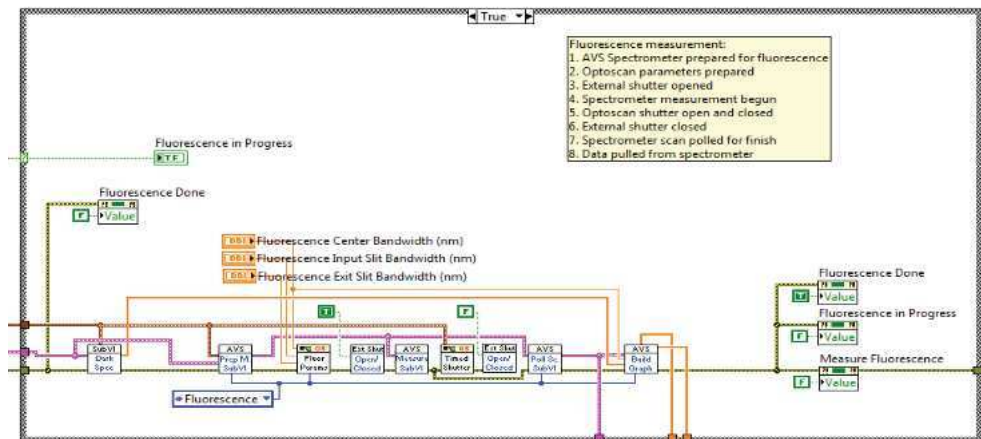


Figura 3.13: Programación en LabView para una medida completa de emisión.

de espectros promediados, longitudes de onda de excitación y el rango de emisión, y el ancho de rendija del monocromador (proporcional a la cantidad de luz que incide sobre la muestra).

3.6.3 Excitación

El espectro de excitación se reconstruye repitiendo un espectro de emisión, excitando en un rango de λ , y tomando el valor de la emisión en cada λ . Así, el algoritmo de emisión es una parte intrínseca de la medición de excitación, y por ende el procesamiento de los datos de emisión también. Se requieren definir todos los mismos parámetros en esta medición como en la de emisión. Se repite el espectro de emisión n veces (se programó una medición cada 1 nm) y se extraen los datos únicamente del λ de emisión de interés. Este procedimiento se puede observar en la Figura 3.14. Se observan en la parte inferior los mismos sub-programas involucrados en la medición de emisión. La diferencia más importante está en la caja central, donde se itera para cada λ en un rango de λ la medición de un espectro, y « λ to pixel» permite extraer el dato de emisión que se requiere para construir el gráfico de excitación. También es notorio que hasta que no se termine de medir la emisión en cada punto del rango, no se cierran los obturadores. Esto significa que durante la totalidad de la duración de la medición (n veces el tiempo de integración de una medición de emisión), se irradia constantemente a la muestra, por lo que conviene elegir tiempos de integración de muy cortos para evitar iluminar excesivamente a la muestra.

Espectros bidimensionales de excitación A diferencia de fluorímetros comerciales con fotomultiplicadores, la ventaja que tiene usar una cámara DCA para espectros de fluorescencia

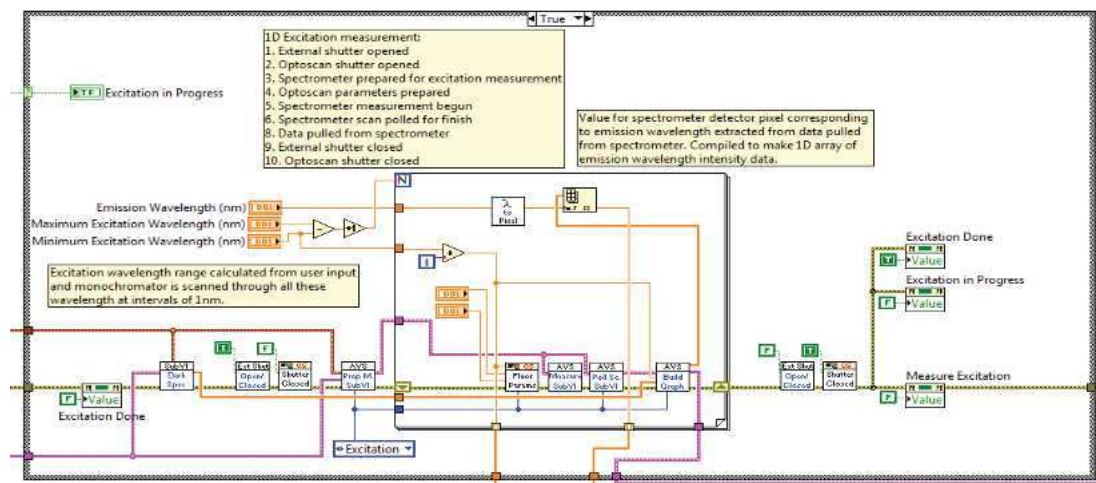


Figura 3.14: Programación en LabView para una medida completa de excitación.

es que se pueden obtener espectros de excitación en dos dimensiones en el mismo tiempo que se tarda obtener el espectro mono-dimensional. Durante el procesamiento de datos de excitación, se eligió una sola λ de emisión y se descartaron las demás; pero si no se descartan las demás λ , se puede reconstruir un espectro en dos dimensiones. La Figura 3.15 muestra el programa correspondiente del LabView, donde en vez del « λ to pixel», se coleccionan directamente los datos de la totalidad del espectro y se guardan todos los datos, para construir luego el gráfico en tres dimensiones: λ de excitación, λ de emisión, e intensidad de emisión.

3.6.4 Irradiación (fotoconversión)

Para fotoconvertir a una muestra con la lámpara de mercurio se requiere únicamente de colocar un filtro de paso de banda en el paso óptico, y abrir y cerrar el obturador en un tiempo determinado. La Figura 3.16A muestra el paso que se requiere en la programación: abrir y cerrar el obturador durante un tiempo «delay time», y luego el programa se asegura de que el obturador esté cerrado antes de indicarle al operador que la irradiación se concluyó. A pesar de que no era conveniente fotoconvertir una muestra con la lámpara de Xenón por la baja intensidad de luz, se conservó como opción dentro del programa, ya que con el monocromador era posible irradiar en un rango de λ mucho mayor a los filtros de paso de banda disponibles y con una precisión mucho mayor si era necesario. La Figura 3.16B indica los pasos de programación necesarios, donde: se configuran los parámetros en el monocromador; se prepara el monocromador; se asegura que esté cerrado el obturador del monocromador; se abren los obturadores externos; y luego se abre y cierran los obturadores del monocromador durante un tiempo determinado de irradiación.

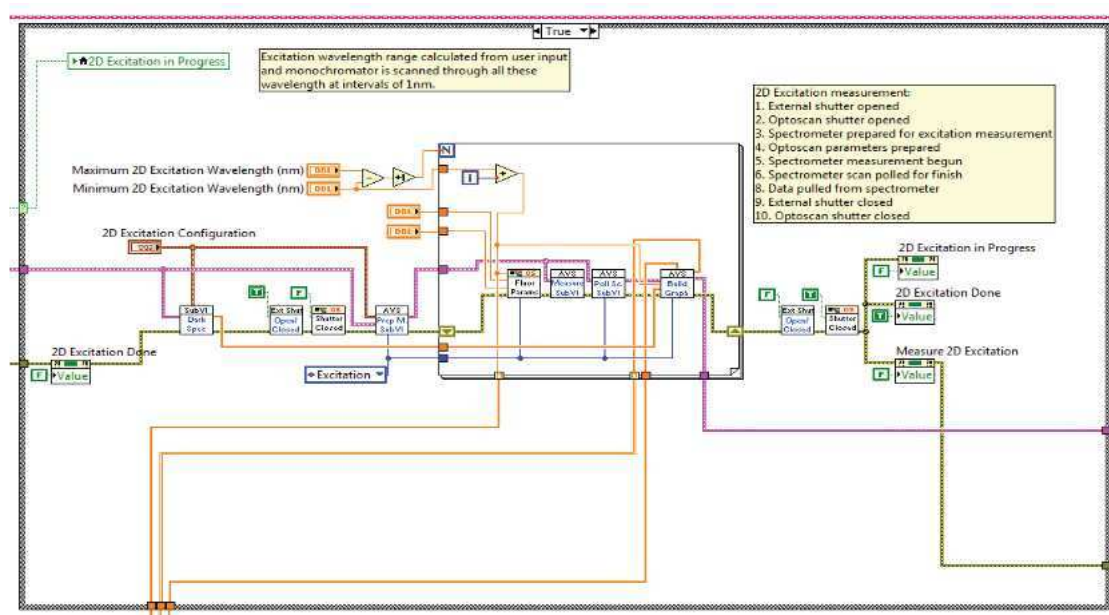


Figura 3.15: Programación en LabView para una medida completa de excitación bidimensional.

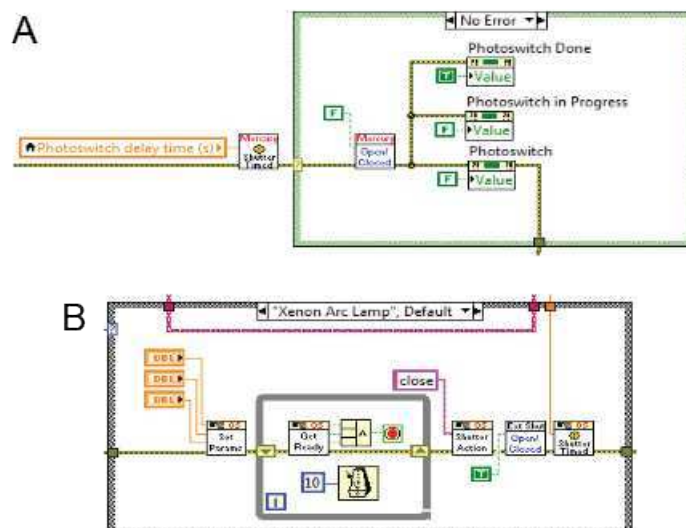


Figura 3.16: Programación en LabView para una irradiación con la lámpara de Mercurio (A) y la lámpara de Xenón y el monocromador (B).

3.6.5 Medición de intensidad de la lámpara de fotoconversión

En un procedimiento similar al de irradiación, se programó una opción para medir la intensidad de la luz de fotoconversión. Así, se configuró o bien el monocromador y la lámpara de Xenón, o bien la lámpara de Mercurio, y se programó la aparición de un diálogo que permitía al operador responder cuándo se terminó de medir (manualmente) la intensidad, e ingresar el valor de intensidad medido al programa (Figura 3.17). Al contar con un vidrio de cuarzo a 45° para desviar una proporción de la luz al potenciómetro, se calibró también el mismo usando los filtros de paso de banda más comúnmente utilizados y se incorporó esta tabla de calibración al programa. De esta manera el operador ingresa el valor medido y automáticamente se calcula y se informa el valor real de intensidad de irradiación.

3.6.6 Experimentos de cinética de fotoconversión

Una vez definida cada medición y la programación necesaria para cada una, se construyeron las secuencias más complejas necesarias para realizar experimentos de cinética de fotoconversión y de fotociclos. En un experimento de fotoconversión, el algoritmo es simple: medir espectro de absorción, medir espectro de emisión, irradiar la muestra un tiempo determinado, repetir hasta llegar al estado fotoestacionario. La determinación de cuando se llegó al estado fotoestacionario, aunque se podría llegar a programar con cuidado y algunas precauciones, se dejó a criterio del operador, y se concentró en la generación de un eficiente programa de medición e irradiación, con tiempos determinados por el operador. Así, en la Figura 3.18 se aprecia el esquema complejo de un experimento de cinética de fotoconversión. Se trata nuevamente de una iteración: una medición de espectros repetidas veces con los tiempos seleccionados de irradiación, y por ende se obtienen en cada experimento $n + 1$ espectros de absorción y $n + 1$ espectros de emisión para un experimento de n irradiaciones (+1 para los espectros iniciales/finales). Se incluye en este esquema: la posibilidad de tomar un nuevo espectro de referencia, si el experimento fue muy largo y hay que tener en cuenta la variación de la intensidad de la lámpara de absorción; y además la orden de guardar los datos entre cada

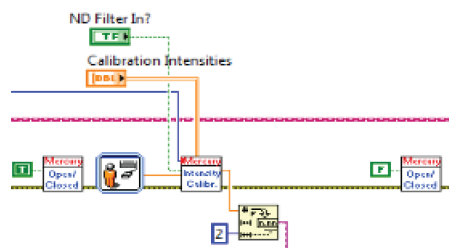


Figura 3.17: Programación en LabView para una medición de la intensidad de irradiación.

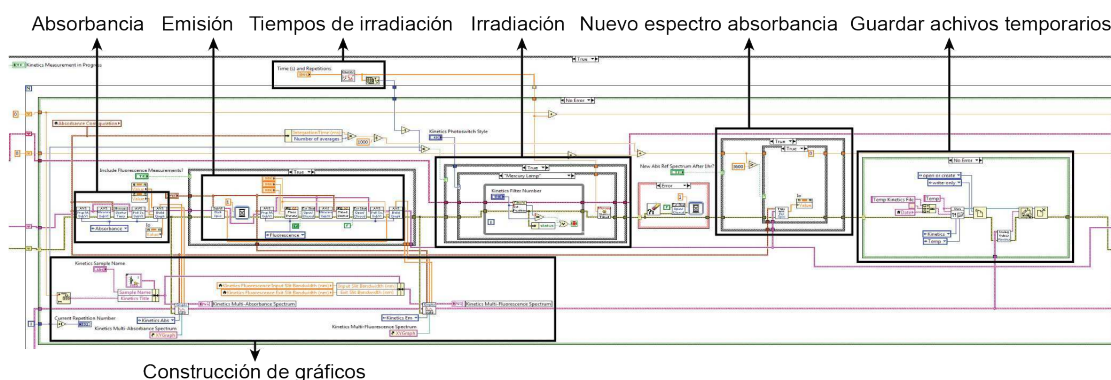


Figura 3.18: Programación en LabView para experimentos de cinética de fotoconversión.

irradiación, para asegurarse de no perder datos en el caso de que falle el programa. Tanto para los experimentos de cinética de fotoconversión, como para los fotociclos (ver próxima sección), se mantuvo la posibilidad de irradiar con la lámpara de Mercurio y la lámpara de Xenón con el monocromador.

3.6.7 Experimentos de fotociclos

Al igual que los experimentos de cinética de fotoconversión, los fotociclos están compuestos por mediciones de absorción y emisión e irradiaciones. La Figura 3.19 muestra la programación relevante para una irradiación de fotociclación, y el experimento se encuentra dentro de un ciclo de iteración alternado, donde por cada ciclo que se requiere, se realiza un experimento de fotociclación seguido por uno de fotoreversión, cada uno con sus parámetros relevantes. Con la segunda versión del equipo, luego de cada irradiación se indicaba al operador que cambiara el filtro de irradiación, para poder seguir con el próximo experimento de fotoconversión en dirección opuesta. Al introducir el sistema de filtros automático (ver Sección 3.7) se logró hacer fotociclos repetidos sin la necesidad de la intervención o presencia del operador.

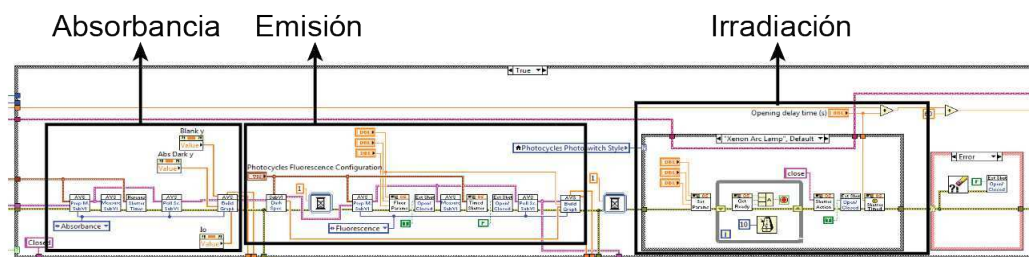


Figura 3.19: Programación en LabView para experimentos de fotociclos.

3.6.8 Guardado de datos

Una función esencial del espectrofotómetro consistía en poder guardar los datos de manera rápida y conveniente para su uso. Para esto se inauguraron tres bases de datos (Figura 3.20) para: datos de absorbancia (todos), emisión, excitación, irradiación e intensidad; datos de experimentos de cinética de fotoconversión; y datos de experimentos de fotociclos. Estas tres bases de datos se actualizaban después de cada medida con los datos correspondientes, y, como se explicó arriba, entre cada medición durante los experimentos de cinética y fotociclos. La posibilidad de programar el guardado de datos permitió decidir en que orden cuales datos se guardaban, según el tipo de experimento. En la Figura 3.21 se muestra un ejemplo del programa para guardar datos de fotociclos. Para estos experimentos, era conveniente contar al final con un archivo de texto, fácilmente importable en Excel, donde figuraban todos los espectros de absorción juntos y luego los de emisión, para facilitar el armado de los gráficos y el procesamiento posterior de los datos. Además, era conveniente guardar solamente una

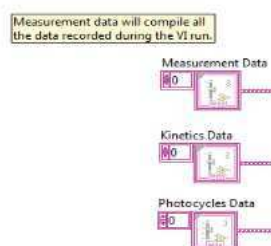


Figura 3.20: Bases de datos para guardar las mediciones.

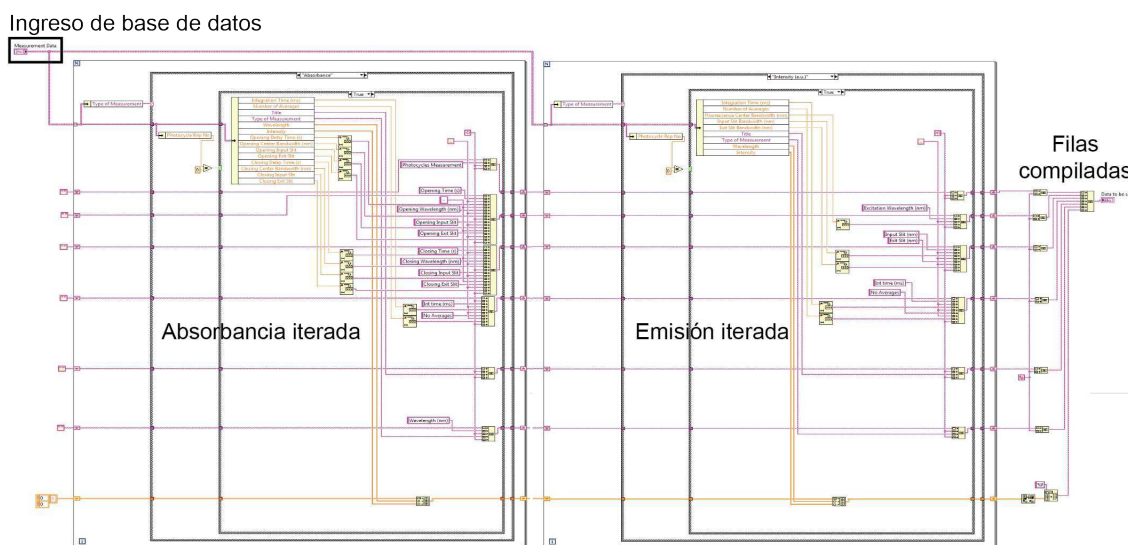


Figura 3.21: Programación en LabView para el guardado de datos de fotociclos.

vez el rango de longitudes de onda del espectro, y luego contar con todos los datos de un mismo tipo juntos (en términos de archivo de Excel, por ejemplo, que figuraran todas las columnas de absorbancia juntas y una sola de longitud de onda). Todo esto fue posible con el programa, y los archivos que se obtenían se adecuaron a todos los requisitos del procesamiento de datos: orden de datos, información sobre los parámetros de las medidas, nombres de los experimentos, número de fotociclos o tiempos de irradiación durante los experimentos de cinética. De esta manera se ahorró tiempo de procesamiento, otro dato importante al momento de comparar con la forma convencional de hacer estos experimentos con espectrofotómetros comerciales. Se incluyó también una opción de reseteo de las bases de datos, para que el operador pudiera borrar los datos del experimento previo antes de arrancar uno nuevo, y que los archivos guardados sean más manejables.

3.7 Mejoras y extensiones

Sistema de filtros automáticos La más importante mejora del equipo fue la incorporación de una rueda de filtros al camino óptico de irradiación. La rueda de filtros fue diseñada por el Dr. De Vries y el Dr. Jovin, y consiste de una rueda con espacios para seis filtros que se fijan en sus posiciones con imanes, y se puede controlar la posición de esta rueda de manera automática, e incluso con reconocimiento de los filtros mediante un sistema de reconocimiento por infrarrojo. La rueda se incorporó al equipo y al programa, y permitió automatizar todavía más las mediciones, al eliminar por completo la necesidad de intervención manual del operador. Las tareas del operador se redujeron a: colocar y remover la cubeta con la muestra; ubicar los filtros de paso de banda en la rueda de filtros; registrar la potencia de la luz de irradiación. Todas las demás operaciones se automatizaron por completo, permitiendo al operador ahora hacer experimentos largos de fotociclos de manera totalmente no-presencial. El diseño final del equipo de espectrofotometría y fotomodulación se puede observar en la Figura 3.22. La programación de la rueda de filtros se adoptó enteramente de sus desarrolladores, y se incorporó la opción correspondiente en cada uno de los programas de LabView (Figura 3.23). Se mantuvo un registro de los filtros de paso de banda que se ubicaron en cada una de las posiciones de la rueda de filtros, y así se podía seleccionar apropiadamente cada filtro para cada experimento.

Guardado temporal de datos Se programó además un guardado de datos automático temporario, que se auto-actualizaba con cada medición o cada cinco segundos de tiempo muerto del programa (Figura 3.24). De esta manera, siempre estaban los datos guardados de todas las mediciones y se podía recurrir a ellos si es que se presentaba alguna falla en el equipo.

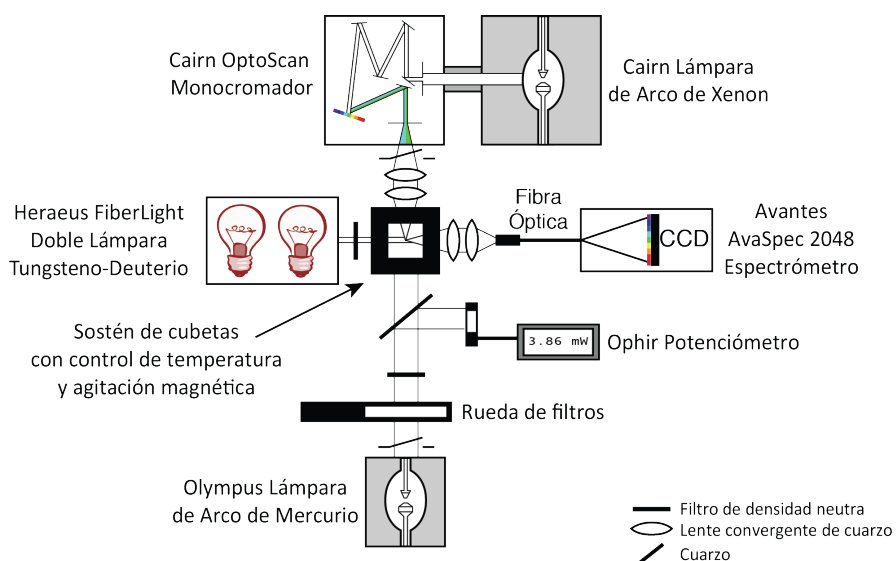


Figura 3.22: Diseño final del espectrofotómetro y fotomodulador.

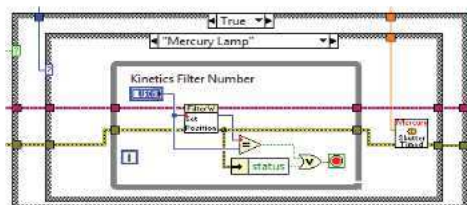


Figura 3.23: Programación en LabView de la rueda de filtros para fotoconversiones.

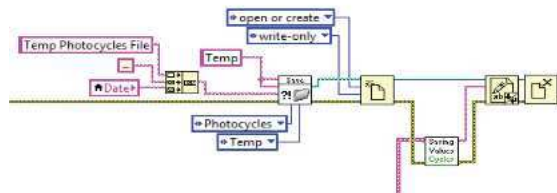
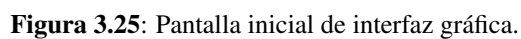


Figura 3.24: Programación en LabView para el guardado de datos temporario de fotociclos.

Satisfaciendo demandas específicas de fluoróforos El programa se modificó para adecuarlo para distintos experimentos. En particular, se amplió para poder hacer más de un espectro de emisión en los experimentos de cinética de fotoconversión y de fotociclos, para un sistema de nanopartículas inorgánicas con un recubrimiento que contenía diheteariletenos fluorescentes. Así, se adquirieron un espectro de absorción, y dos espectros de emisión, entre cada irradiación, para obtener la evolución de la emisión a distintas longitudes de onda durante la fotoconversión. La naturaleza «modular» del programa facilitó así su modificación y reprogramación a conveniencia del operador.

3.8 Interfaz gráfica

El espectrofotómetro y fotomodulador y el programa que lo controlaba no fue utilizado únicamente en esta tesis, sino también por varias otras personas con requerimientos distintos en sus experimentos. Era necesario entonces generar una interfaz gráfica que sea fácil de usar y que permitiera cierta flexibilidad. Se muestran a continuación fotografías de la interfaz desarrollada para el diseño final del programa.



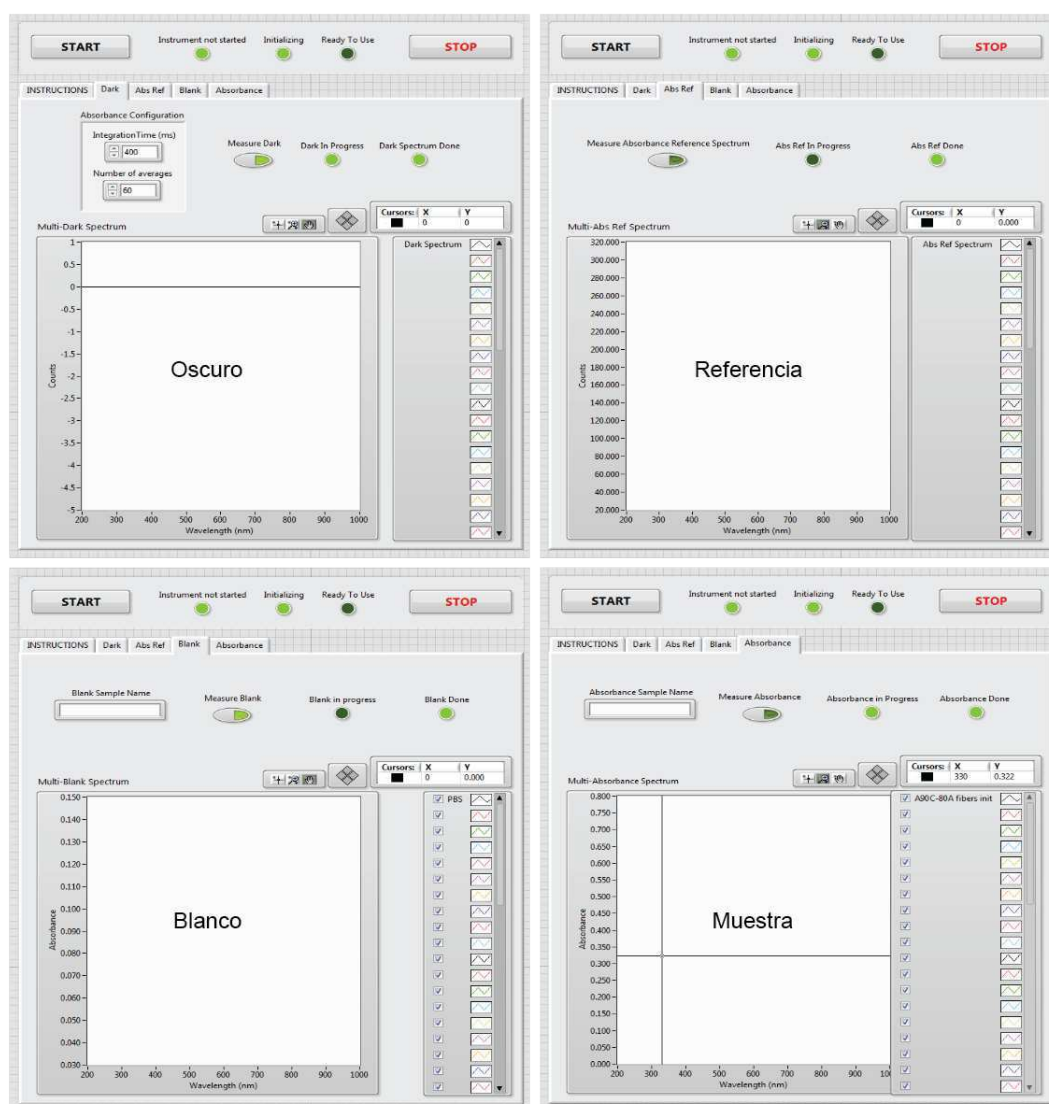


Figura 3.26: Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de absorbancia: oscuro, referencia, blanco y muestra.

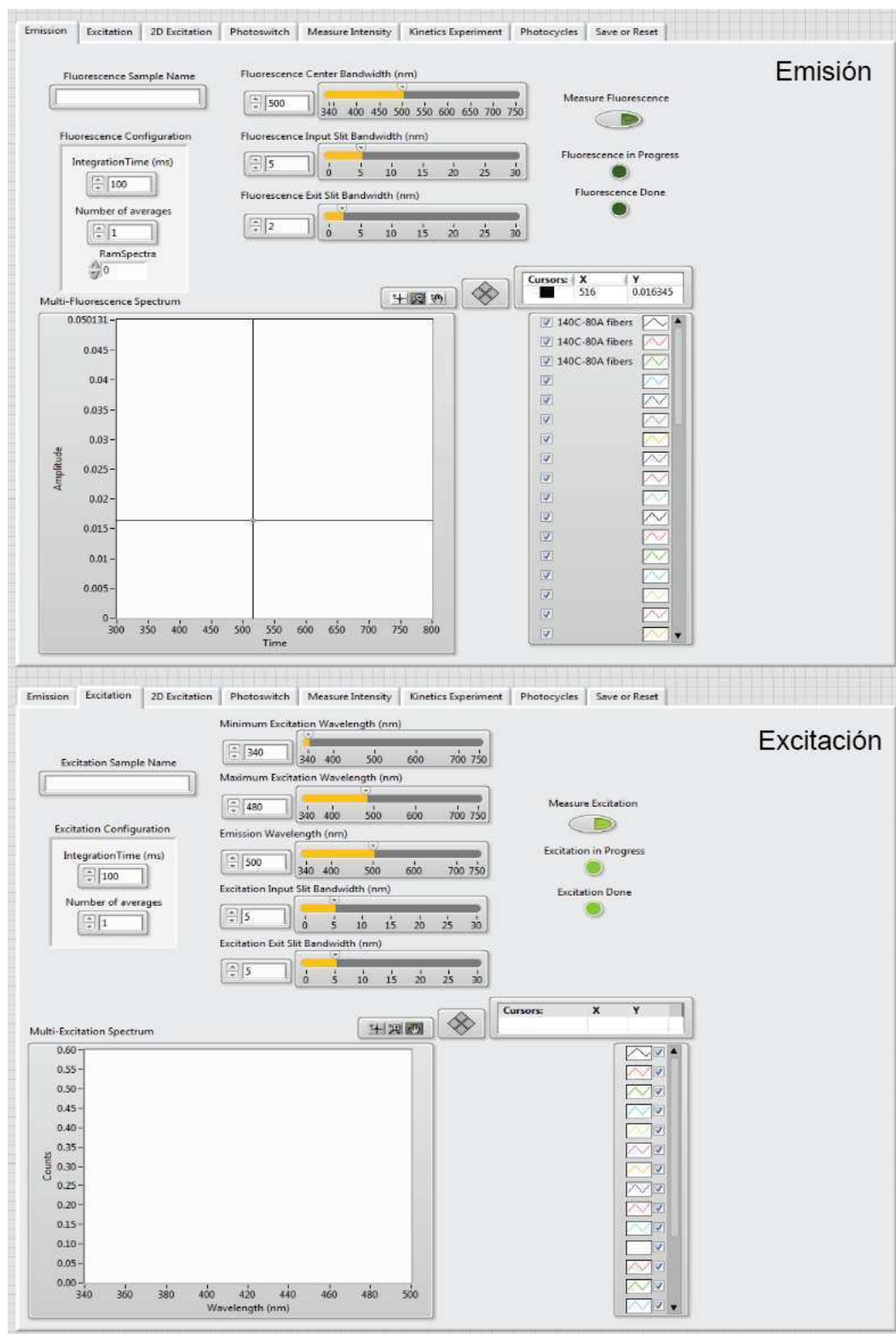


Figura 3.27: Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de emisión y excitación.

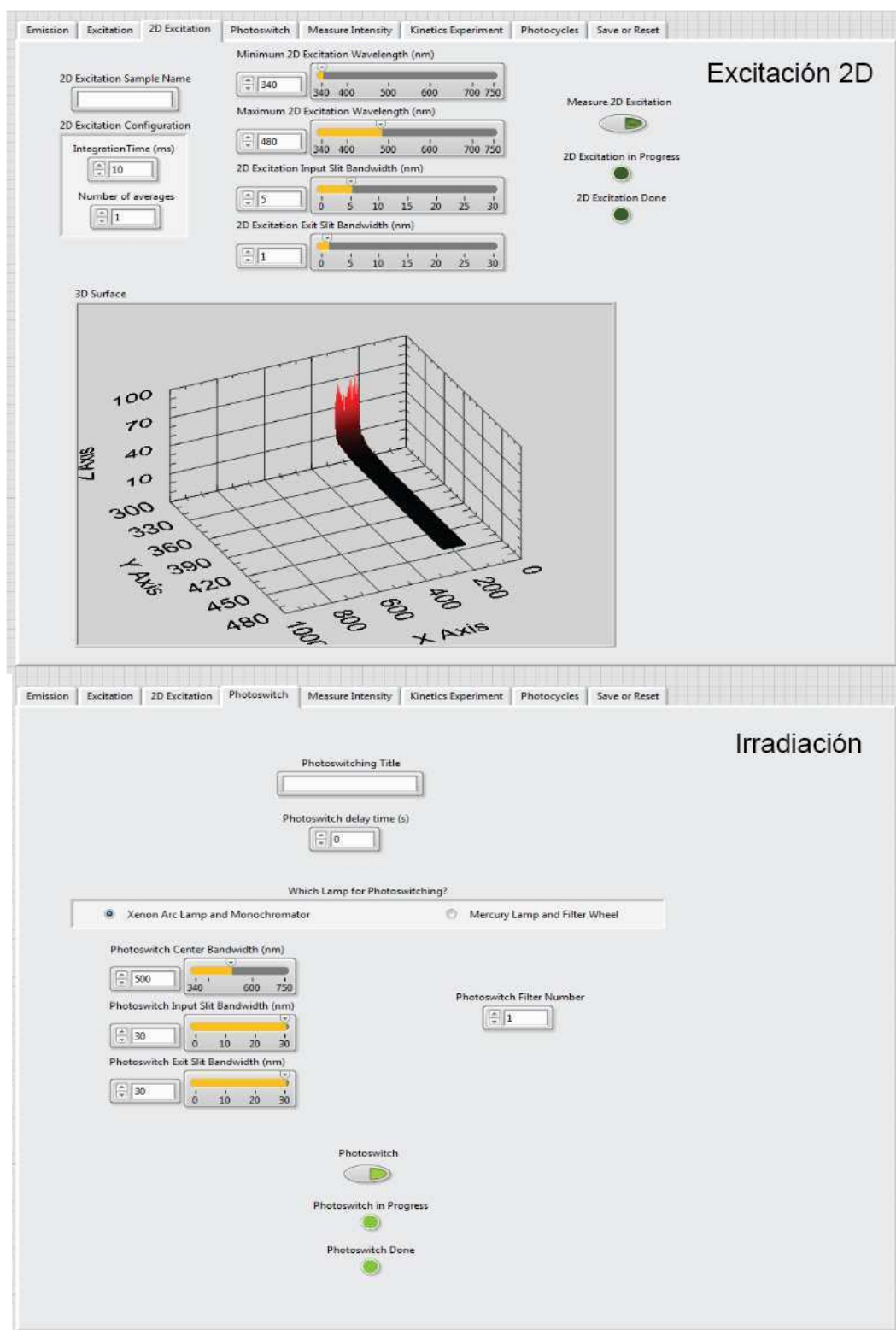


Figura 3.28: Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de excitación bidimensional e irradiación.

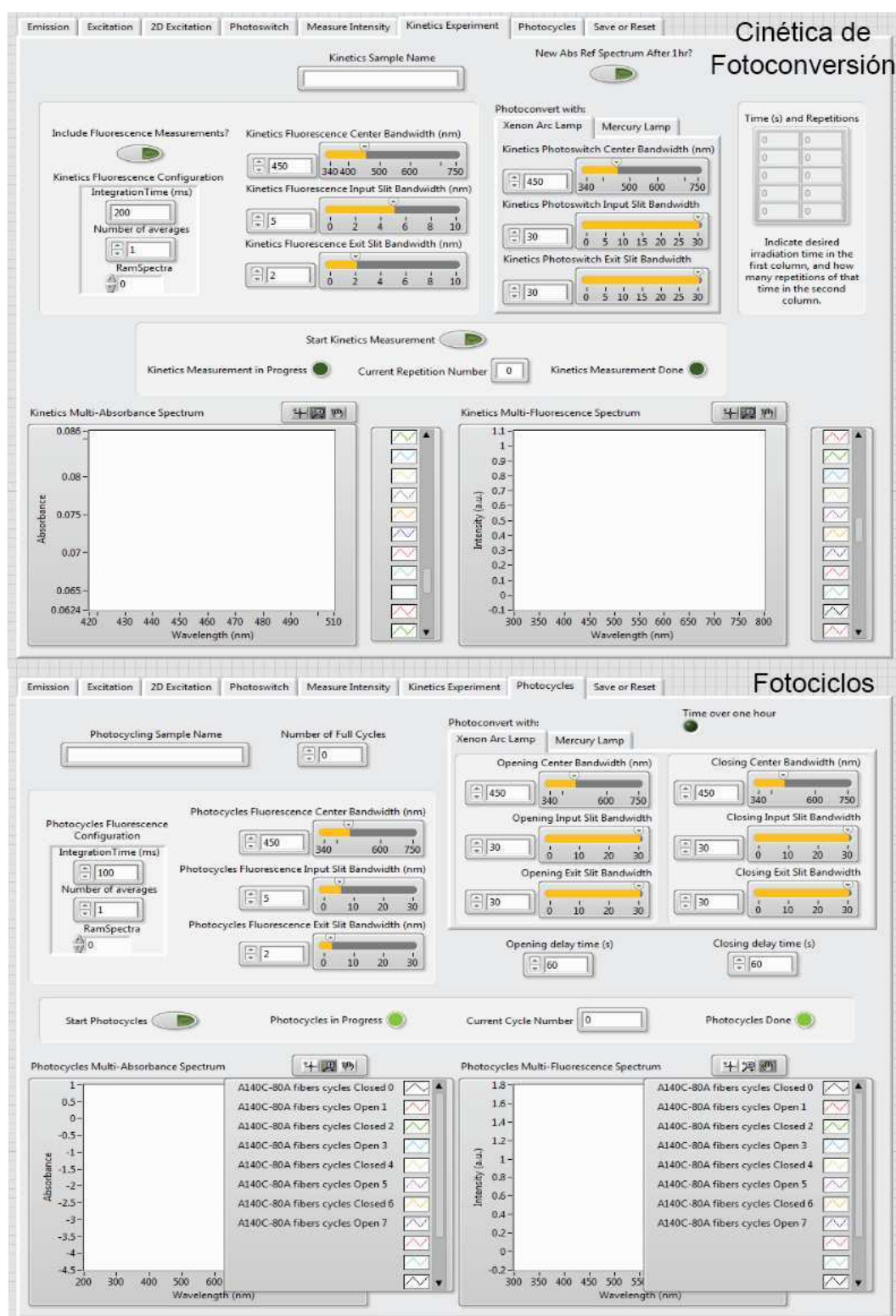


Figura 3.29: Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de cinética de fotoconversión y fotociclos.

Emission
Excitation
2D Excitation
Photoswitch
Measure Intensity
Kinetics Experiment
Photocycles
Save or Reset

A dialog box will appear when the "Prepare for Intensity Measurement" button is pressed. The monochromator will be configured with the bandwidth and slits as previously set by the user and time will be given for the user to set the power meter manually to the desired setting. The user should record the intensity readout in the given space in the dialog box (in mW) and press OK. The intensity recording will now be saved together with the wavelength and slit information under the Intensity Recording Title, and will be saved together with the BAEE data, and all together at the end of the KINETICS data. For this reason it is important to clearly indicate at which moment the intensity recording corresponds to. A clear title is recommended.

Intensity Recording Title
 (For example "Before UV" or "After PC Closing")

Which Lamp for Intensity Measurement?

☒ Xenon Arc Lamp and Monochromator ☐ Mercury Lamp and Filter Wheel

Intensity Center Bandwidth (nm)
 450 340 600 750

Intensity Input Slit Bandwidth
 30 0 10 20 30

Intensity Exit Slit Bandwidth
 30 0 10 20 30

Intensity Filter Number
 1

ND Filter In? ☒

Calibration Intensities

0	3030	2821
0	468	145
	3527	3032
	3606	3306
	3924	3098
	2730	2013

Filters 1-6 from top to bottom.
Left column: Without ND filter
Right column: With ND filter

Prepare for Intensity Measurement ☒

Intensity Measurement In Progress ☐

Intensity Recorded ☐

Intensidad de irradiación

Emission
Excitation
2D Excitation
Photoswitch
Measure Intensity
Kinetics Experiment
Photocycles
Save or Reset

Guardado y reseteado de datos

User Name

Date

What to save?

☒ All but 2D Excitation
☐ 2D Excitation
☐ Kinetics Experiment
☐ Photocycles

General File Name?

2D Excitation Spectra File Name?

Kinetics File Name

Photocycles File Name

Save Dark? ☒

Save Abs Ref Io? ☒

SAVE VALUES

RESET DATA - CAREFUL NOT TO PRESS BY ACCIDENT!!!

Reset BAEE Data ☒ Reset Kinetics Data ☒ Reset Photocycles Data ☒

Figura 3.30: Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de intensidad de irradiación y guardado y reseteado de datos.

3.9 Conclusión parcial y evaluación del equipo

El espectrofotómetro y fotomodulador se utilizó, a partir de su terminación, para la adquisición de todos los espectros y experimentos de fotoconversión durante el resto de la tesis. Una vez aplicadas todas las correcciones, y optimizados los parámetros para cada medición, se adquirieron espectros en igual o menor tiempo que con los espectrofotómetros comerciales. La Tabla 3.3 muestra los tiempos relativos aproximados de medición. Como se ve, para un experimento típico de fotociclación (20 repeticiones de 5 segundos de irradiación, más espectros) el experimento en el equipo construido dura 3 veces menos tiempo.

La posibilidad de indicarle la secuencia de tiempos de irradiación para experimentos de fotoconversión fue particularmente importante: al comenzar una fotoconversión los tiempos de irradiación son necesariamente cortos para poder graficar correctamente el inicio de la curva, mientras que los tiempos hacia el final cuando se llega al estado fotoestacionario son más largos. Se pierde eficiencia irradiando con intervalos constantemente cortos, y se pierde resolución de la cinética irradiando siempre con intervalos muy largos. El tiempo mínimo de irradiación con el equipo era de 100 ms (sin un error significativo), 5 veces menor al tiempo de irradiación confiable de la lámpara de marca Lumatec que se utilizaba previamente. No solo se podía definir entonces con más resolución la primera etapa de la cinética, sino que además se podía programar con tal de irradiar hacia el final con tiempos mayores para reducir el tiempo de medida. La diferencia en la cantidad de los puntos de la curva de cinética medidos se ve en

Tabla 3.3: Tiempo aproximado de actividades durante experimentos de absorción, emisión y fotoconversión en espectrofotómetros comerciales y el equipo construido.

Actividad	Parámetro	Comercial	Diseñado
Absorbancia	Tiempo de integración (ms)	-	400
Absorbancia	Número de promedios	-	60
Absorbancia	Tiempo total (s)	30	24
Emisión	Tiempo de integración (ms)	-	250
Emisión	Número de promedios	-	10
Emisión	Tiempo total (s)	30	2,5
Irradiación	Tiempo de irradiación t	$t + 2$ seg	t
Traslado de cubeta	Tiempo (s)	3	0
Iniciado de medición	Tiempo (s)	3	0
Típico experimento de fotociclación	Tiempo total (min)	35	10,5

la Figura 3.31. Naturalmente, al contar con más puntos en la curva, la precisión de la constante cinética derivada es mayor gracias a un mejor ajuste de los datos.

Las ventajas del equipo construido son:

- Experimentos más cortos
- Datos más exactos y con más precisión
- Operador es libre durante la duración del experimento
- Flexibilidad de programación
- Libre de error humano de manipulación de la cubeta entre mediciones

La desventaja principal en comparación con espectrofotómetros comerciales de absorción y fluorescencia separados es:

- Menor sensibilidad de fluorescencia

Para las muestras de diheteroariltenos oxidados en particular, pero también en general para cualquier experimento de fotoquímica que requiera un seguimiento espectral de la muestra, el uso del equipo armado de espectrofotometría y fotomodulación es altamente conveniente. El equipo no solamente se utilizó para evaluar el desempeño de las sondas desarrolladas en esta tesis, sino también para nanopartículas fotomodulables y otros colorantes y fluoróforos para los cuales se requería este tipo de información. El tiempo invertido en el desarrollo de este equipo fue devuelto con intereses al momento de realizar decenas de experimentos de fotoconversión en los Capítulos 4 y 6, que no hubieran sido factibles sin la automatización que ofreció el espectrofotómetro y fotomodulador construido.

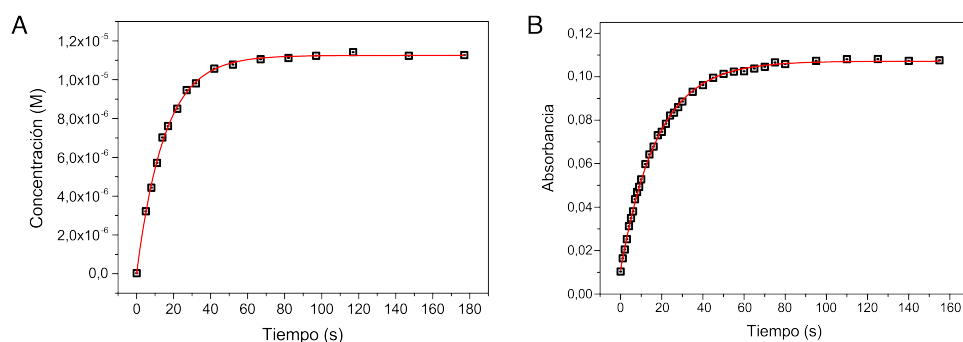


Figura 3.31: Curvas de fotociclación del compuesto **9** en AcOEt medidas con un espectrofotómetro comercial (A) y el espectrofotómetro construido (B).

Solubilización de diheteroariletenos oxidados

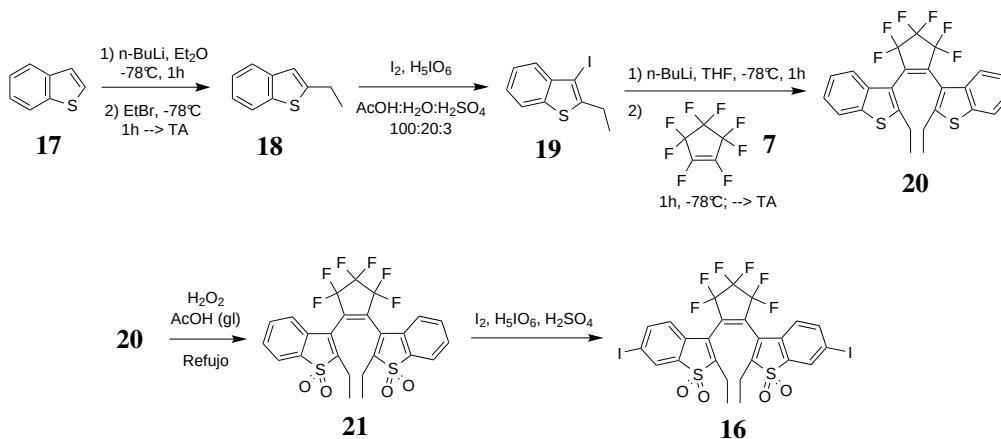
La microscopía de fluorescencia de muestras biológicas requiere de sondas fluorescentes compatibles con el medio celular, entre otros requerimientos. Al momento de marcar el blanco con las mismas, las sondas deben ser o bien transportadas a la superficie de la célula para su difusión en la membrana celular, o bien solubles en el medio acuoso para su incorporación directa. En la Sección 1.2.4 se introdujeron las estrategias principales de solubilización que se han aplicado a los diheteroariletenos no-oxidados. Estas incluyen su inclusión en cavidades de ciclodextrina,²⁷ adsorción a albúmina humana,²⁹ unión a nanopartículas solubles en agua^{38;39;41} y modificación covalente con grupos hidrofílicos.^{30;31} En este capítulo se describe el trabajo realizado con el objetivo de solubilizar los diheteroariletenos oxidados (DHAOs) en medios acuosos, con diversas estrategias covalentes y no-covalentes, novedosas e inspiradas en la literatura. Se exploraron las siguientes alternativas: inclusión en cavidades de ciclodextrina y proteínas de unión de ácidos grasos, adsorción a albúmina, modificación covalente con grupos hidrofílicos, y conjugación a proteínas. Se dedicará una sección para cada estrategia, comenzando por la evaluación de los diheteroariletenos oxidados sin modificaciones especiales como control para la comparación posterior de las técnicas.

4.1 Solubilidad de controles

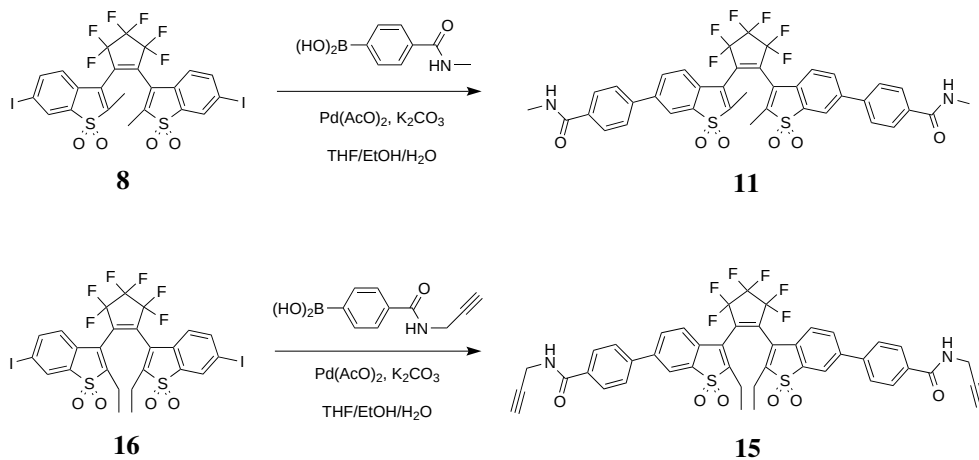
Mientras es ampliamente aceptado que los diheteroariletenos son poco solubles en agua, no hay ningún trabajo donde se haya estudiado hasta que punto son o no compatibles con soluciones acuosas. Se investigó este fenómeno utilizando dos DHAOs como referencias de solubilidad: el compuesto **11** sintetizado en el Capítulo 2, y el compuesto **15**, parecido en estructura pero con grupos etilo en el centro reactivo y un sustituyente alquino terminal, que será utilizado más adelante en la Sección 4.3 para la modificación covalente de los DHAOs. El grupo de

Irie demostró que el rendimiento cuántico de fluorescencia de los DHAOs con grupos etilo aumenta considerablemente, y postuló que esto se debe a una cierta «protección» a los grupos sulfona del solvente polar.⁴⁵ Por ende se estudió el efecto del solvente sobre DHAOs con grupos metilo y etilo en todas las técnicas a modo de comparación. En el Esquema 4.1 se detalla la ruta sintética del precursor **16**, y en el Esquema 4.2 se observa la síntesis de los dos DHAOs control.

Los pasos involucrados en la síntesis del precursor **16** son idénticos a aquellos detallados en el Esquema 2.2 en el Capítulo 2, con la excepción de que se debe partir del 2-etilbenzotiofeno (**18**) en vez del 2-metilbenzotiofeno. Este compuesto se sintetiza a partir de benzotiofeno (**17**) mediante una alquilación con *n*-butilitio.¹⁰⁸ Se agradece al Grupo de Síntesis del Instituto Max Planck de Química Biofísica por haber facilitado este precursor. Luego los DHAOs controles



Esquema 4.1: Síntesis de DHAO con grupos etilo en los carbonos reactivos.



Esquema 4.2: Síntesis de DHAO controles.

11 y **15** se obtuvieron mediante reacciones de Suzuki. Se purificaron por cromatografía en columna y se caracterizaron al igual que todos los compuestos del Capítulo 2 utilizando el espectrofotómetro construido en el Capítulo 3.

Las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los dos compuestos se evaluaron en soluciones de distinta proporción metanol:agua e igual concentración del DHAO. Las propiedades de los DHAOs en metanol se conservan a pesar de la alta polaridad del solvente (ver Capítulo 2. Al aumentar la proporción de agua por encima de 50% v/v, se observó turbidez en las solución, debido a la insolubilidad del DHAO. Por ende, todas las mezclas se agitaron durante cinco segundos y luego se centrifugaron para precipitar el DHAO insoluble, y se realizaron los ensayos únicamente con el sobrenadante. Las fracciones molares de metanol (x_M) y de agua (x_W) de cada mezcla se calcularon corrigiendo el volumen total de la solución por los efectos de la mezcla, usando la corrección por densidad de Mikhail y Kimel¹⁰⁹ a temperatura ambiente. Esta corrección cobró una importancia significativa para mezclas de fracción intermedia de metanol, ya que al mezclar 500 μL de metanol y 500 μL de agua, el volumen total no es de 1000 μL , sino de 966 μL , una diferencia del 3,4%. Con tal de minimizar errores, se prepararon soluciones madre de ambos **11** y **15** de concentración definida, y se prepararon cada una de las mezclas en el mismo momento, agregando los componentes en el mismo orden. Los resultados de las mediciones de longitud de onda de absorbancia máxima de la forma cerrada (λ_{max}^{abs}), absorbancia máxima de la forma cerrada (normalizada al valor en metanol puro), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) y rendimientos cuánticos de fotociclación ($\Phi_{A\rightarrow C}$) y fotoreversión ($\Phi_{C\rightarrow A}$) se muestran en la Figura 4.1. Los errores graficados se calcularon teniendo en cuenta errores en las preparaciones de las soluciones y errores del ajuste de datos.

La solubilidad de ambos compuestos se puede apreciar fácilmente en la Figura 4.1A. Soluciones de 10 μM de ambos compuestos son totalmente solubles en 100% metanol. La solubilidad de **11** disminuye sistemáticamente a medida que aumenta la proporción de agua, mientras que **15** retiene su solubilidad en fracciones crecientes de agua. A $x_M = 0,25 - 0,3$ (~50% volumen de agua) se observa una disminución significativa en la absorbancia del sobrenadante para ambos compuestos. Esta disminución en la solubilidad a $x_M = 0,25 - 0,3$ viene acompañada por un desplazamiento leve de la λ_{max}^{abs} como se puede apreciar en la Figura 4.1B, y un corrimiento similar en la longitud de onda máxima de emisión. El mismo quiebre en propiedades fotoquímicas a $x_M = 0,25 - 0,3$ se puede apreciar en las Figuras 4.1C, D y E con los valores de Φ_f , $\Phi_{A\rightarrow C}$ y $\Phi_{C\rightarrow A}$. Todas estas propiedades conservan su valor de 100% metanol hasta $x_M = 0,3$ sin una variación apreciable, pero a mayores fracciones de agua los rendimientos disminuyen (como es el caso para **11**) o no se pueden determinar debido a la insolubilidad.

Sorprendentemente, más allá de presentar un mayor Φ_f , no hay grandes diferencias entre el

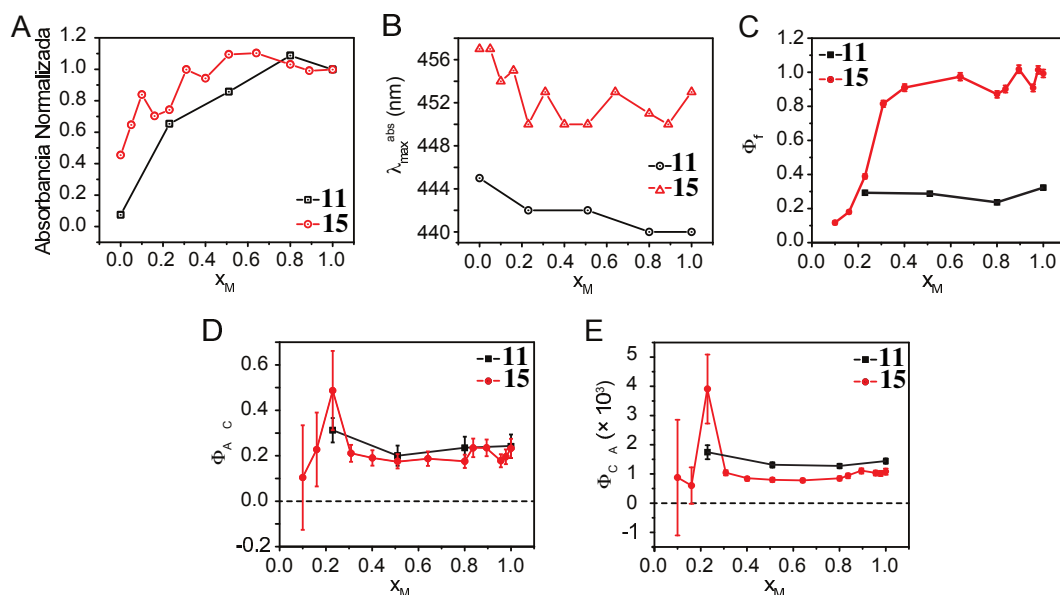


Figura 4.1: Variación de absorbancia máxima del isómero cerrado (A) y longitud de onda del máximo de absorción (B) de la forma cerrada, rendimiento cuántico de fluorescencia (C) y rendimientos cuánticos de fotociclación (D) y fotoreversión (E) de **11** y **15** en mezclas metanol:agua.

comportamiento de DHAO con grupos metilo (**11**) o con grupos etilo (**15**), aparentemente contrario a la hipótesis de Takagi *et al.*⁴⁵ El compuesto **15** no conserva sus propiedades en mayor grado que el compuesto **11** en mezclas con alta proporción de agua. Por otro lado, tanto la solubilidad como las propiedades espectrofotométricas y fotoquímicas presentan un cambio abrupto a $x_M = 0,3$. Intuitivamente se esperaba un cambio más gradual en las propiedades con un aumento en la proporción de agua; ¿qué está pasando a $x_M = 0,3$?

Bakó *et al.*¹¹⁰ y Dougan *et al.*¹¹¹ publicaron extensos trabajos de simulación de dinámica molecular y estudios de difracción de neutrones explorando la estructura molecular de soluciones mezclas de metanol:agua. Ambos coinciden en que la organización de las moléculas de metanol y agua en las mezclas sufre un cambio dramático a $x_M = 0,25 - 0,27$. La red de interacciones intermoleculares que caracteriza una solución de metanol pura (Figura 4.2d) se ve interrumpida por el agregado de moléculas de agua, que son capaces de formar un mayor número de enlaces de hidrógeno. A x_M altas, no parecería haber una red de enlaces de hidrógeno que atraviese la solución, y las moléculas de agua forman «charcos» discretos. A medida que aumenta la concentración de agua, ni el agua ni el metanol dominan la estructura global de la solución, sino que las redes de enlaces de hidrógeno se infiltran (Figura 4.2b y c) y se extienden sobre moléculas de ambos solventes. Por debajo de $x_M = 0,25 - 0,27$ se postula¹¹⁰ que la estructura de la solución es dominada por las moléculas de agua (Figura 4.2a), y el metanol se encuentra en «charcos» discretos. Coincidentalmente, los cambios en

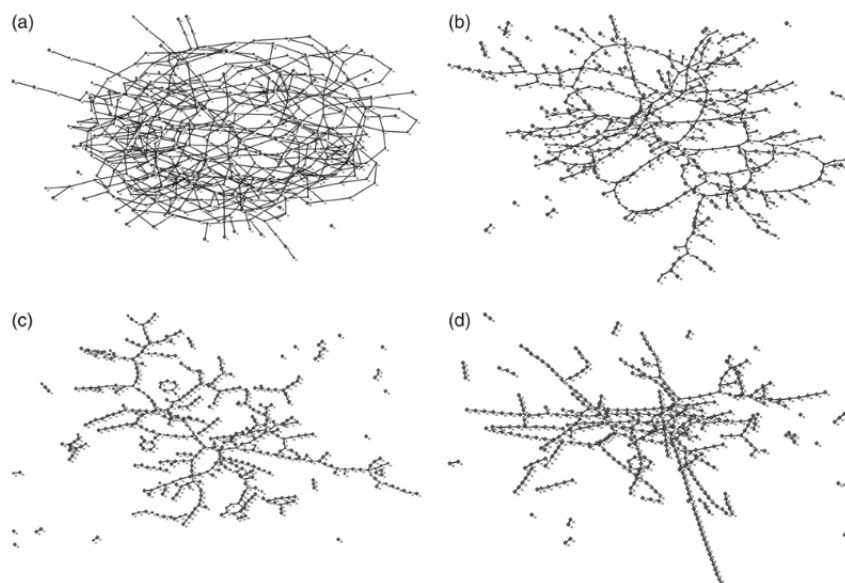


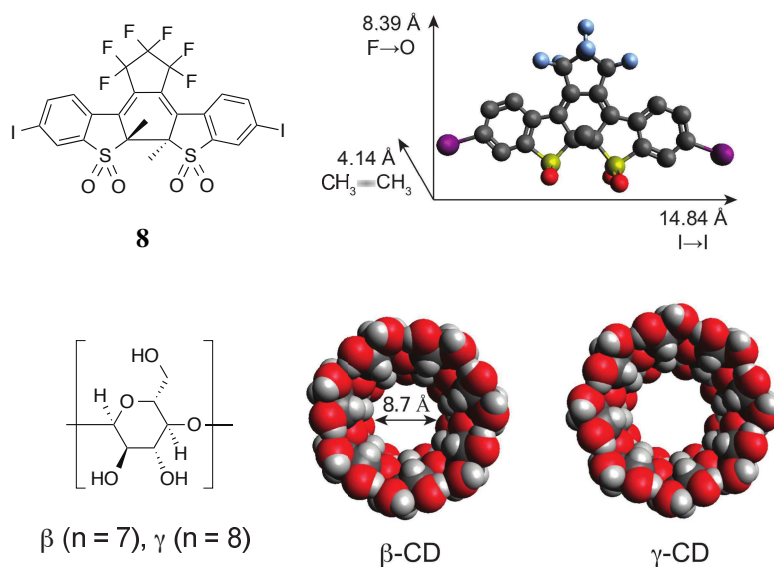
Figura 4.2: Topología de la red de enlaces de hidrógeno de configuraciones típicas en mezclas de metanol:agua de $x_M = 0,1$ (a), $0,5$ (b), $0,75$ (c), $1,0$ (d). Reproducido de Bakó *et al.*¹¹⁰ con permiso de las PCCP Owner Societies.

las propiedades espectroscópicas de los DHAOs son observados a $x_M = 0,3$. Los resultados sugieren que la modificación en las propiedades de los DHAOs se debe a una interacción desfavorable específica con el agua, y solamente es evidente a fracciones molares altas de agua, cuando las moléculas de agua dominan la estructura del solvente.

4.2 Inclusión en cavidad de ciclodextrina

Las ciclodextrinas han sido usadas extensamente como vehículo de transporte de drogas hidrofóbicas a la membrana celular, entre otras aplicaciones biológicas,¹¹² debido a su estructura tipo barril inclinado que forma una cavidad de tamaño justo para moléculas pequeñas y su solubilidad en agua. El tamaño de los DHAOs es aproximadamente compatible con las cavidades de las β - y γ -ciclodextrinas, cuyas dimensiones aproximadas se muestran en el Esquema 4.3.

Se evaluó la efectividad de las ciclodextrinas para la solubilización y conservación de las propiedades fotoquímicas del DHAO pequeño **8**. Para la preparación de mezclas del compuesto **8** con concentraciones de β - y γ -ciclodextrina apropiadas para la efectiva solubilización, se utilizó la ecuación de Rao y Stella.¹¹³ Los autores proponen el siguiente equilibrio de



Esquema 4.3: Estructura y dimensiones aproximadas del compuesto **8** y β- y γ-ciclodextrina.

asociación de una molécula M y una ciclodextrina CD :



donde K es la constante de equilibrio de inclusión de una molécula dada en la cavidad de la ciclodextrina. La solubilidad de la sustancia M en presencia de ciclodextrina se define:

$$S_t = S_0 + \frac{KS_0}{1 + KS_0} [C_{CD}] \quad (4.2)$$

donde S_t es la solubilidad total, S_0 es la solubilidad sin ciclodextrina, y C_{CD} es la concentración de ciclodextrina. Para que una cantidad M_t moles de M sean solubles en un volumen V de solución, se debe cumplir:

$$\frac{S_0 V}{M_t} + \frac{KS_0}{1 + KS_0} \frac{CD_t}{M_t} \geq 1 \quad (4.3)$$

donde CD_t es la cantidad de ciclodextrina en moles necesaria para solubilizar M_t . El primer término, $S_0 V / M_t$, es mucho menor que 1 para sustancias poco solubles en agua. El segundo término se denomina número de utilidad, U_{CD} , y se define:

$$U_{CD} = \frac{KS_0}{1 + KS_0} \frac{CD_t}{M_t} = \frac{KS_0}{1 + KS_0} \frac{m_{CD}}{m_M} \frac{Mr_M}{Mr_{CD}} \quad (4.4)$$

donde m es la masa y Mr la masa molecular. La solubilización de M por la ciclodextrina es eficiente cuando U_{CD} es mayor o igual a 1. Valores de K comunes para drogas solubilizadas

por ciclodextrina son del orden de $10^2 - 10^4 \text{ M}^{-1}$. Utilizando esta ecuación y los parámetros conocidos, se aproximaron los equivalentes de ciclodextrina necesarios para la solubilización del DHAO en agua (Figura 4.3). La concentración deseada de DHAO solubilizado se definió como $10 \mu\text{g/mL}$ ($12,8 \mu\text{M}$). Se calcularon los equivalentes necesarios para la solubilización de **8** en 10 y 30% v/v metanol en agua (menores al límite de 50% v/v, $x_M = 0,3$), y se aproximaron las solubilidades de **8** como $2 \mu\text{M}$ y $0,2 \mu\text{M}$ respectivamente, tomando como guía la solubilidad del compuesto **11** determinado en la Sección 4.1. El número de equivalentes de β - y γ -ciclodextrina necesarios en 30% metanol son por lo menos 10, y en 10% por lo menos 100. Se prepararon entonces soluciones de combinaciones de solvente, ciclodextrina y **8** en estado fotoestacionario variados teniendo en cuenta estos cálculos, se centrifugaron para remover DHAO insoluble y se midieron las propiedades espectroscópicas de los sobrenadantes.

La Figura 4.4 muestra los espectros de absorción y emisión de las distintas mezclas preparadas. El DHAO, inicialmente en estado fotoestacionario para favorecer su inclusión, fue fotorevertido con luz visible y luego irradiado con luz UV para fotociclar nuevamente. En la fila superior se observan los espectros relacionados con las soluciones de β -ciclodextrina. A pesar de observarse un poco de fotoreversión en todas las mezclas, la única donde se observó emisión y fotociclación era la solución con 30% metanol en agua y 100 equivalentes de β -ciclodextrina - 10 veces superior al número estimado con la ecuación de Rao y Stella.

Cálculos para Beta-CD

U_{CD}	1
MW DHA	784
MW Beta-CD	1134

Para MeOH:Agua 30:70

Concentración DHA (M)	1,00E-05
Solubilidad (M)	2,00E-06

Equivalentes de CD	m DHA (mg)	m CD (mg)	K (M^{-1})
1	0,01	0,01	5,00E+10
2	0,01	0,03	5,00E+05
5	0,01	0,07	1,25E+05
10	0,01	0,14	5,56E+04
100	0,01	1,45	5,05E+03

Para MeOH:Agua 10:90

Concentración DHA (M)	1,00E-05
Solubilidad (M)	2,00E-07

Equivalentes de CD	m DHA (mg)	m CD (mg)	K (M^{-1})
2	0,01	0,03	5,00E+06
10	0,01	0,14	5,56E+05
100	0,01	1,45	5,05E+04
500	0,01	7,23	1,00E+04

Cálculos para Gamma-CD

U_{CD}	1
MW DHA	784
MW Gamma-CD	1297

Para MeOH:Agua 30:70

Concentración DHA (M)	1,00E-05
Solubilidad (M)	2,00E-06

Equivalentes de CD	m DHA (mg)	m CD (mg)	K (M^{-1})
1	0,01	0,02	5,00E+10
2	0,01	0,03	5,00E+05
5	0,01	0,08	1,25E+05
10	0,01	0,17	5,56E+04
100	0,01	1,65	5,05E+03

Para MeOH:Agua 10:90

Concentración DHA (M)	1,00E-05
Solubilidad (M)	2,00E-07

Equivalentes de CD	m DHA (mg)	m CD (mg)	K (M^{-1})
2	0,01	0,03	5,00E+06
10	0,01	0,17	5,56E+05
100	0,01	1,65	5,05E+04
500	0,01	8,27	1,00E+04

Figura 4.3: Planilla de Excel usada para definir los equivalentes de ciclodextrina necesarios para la solubilización de **8**. Equivalentes que resultarían en una constante de inclusión del orden de 1000 M^{-1} se resaltan en verde.

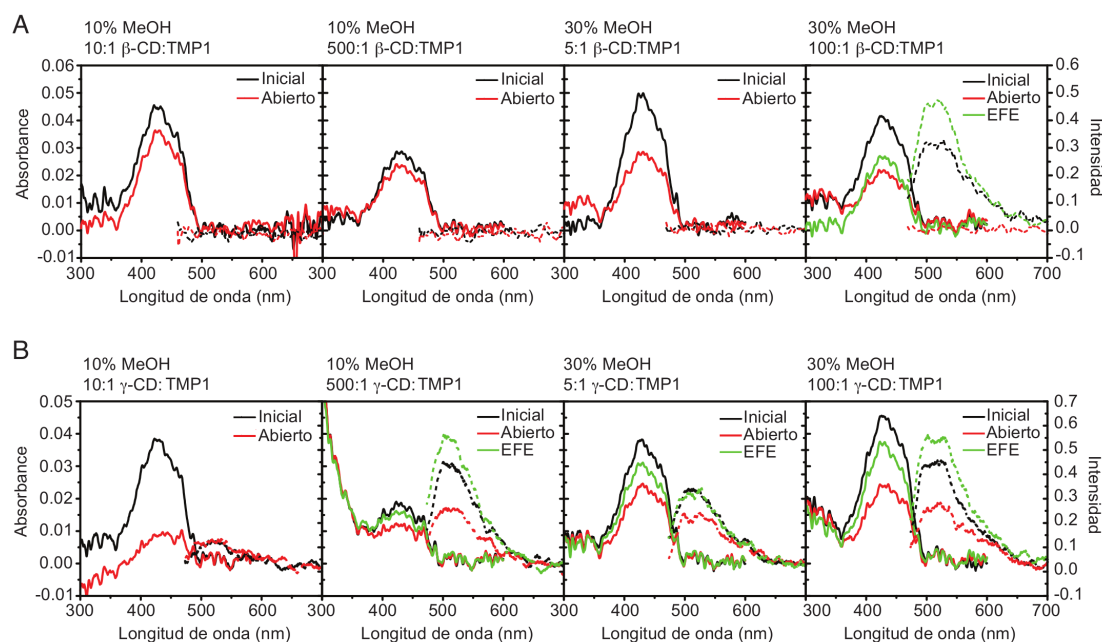
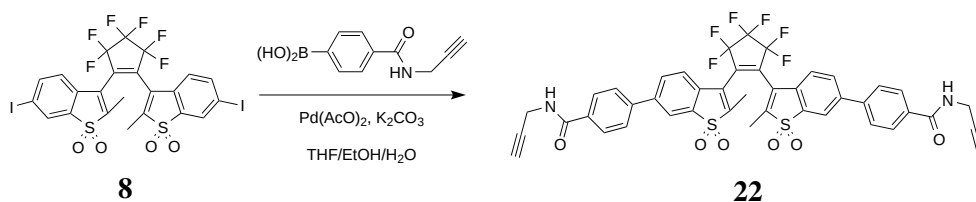


Figura 4.4: Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) para soluciones de **8** en 10% y 30% v/v metanol en agua con distintos equivalentes de β - (arriba) y γ -ciclodextrina (abajo).

Los resultados para la γ -ciclodextrina (Figura 4.4, fila inferior) fueron mas prometedores: fotoconversión fue posible con emisión incluso en 10% metanol en agua con 500 equivalentes de γ -ciclodextrina. Con proporciones mayores de metanol (30%), 5 equivalentes son suficientes para retener las propiedades. La diferencia de solubilidad entre β - y γ -ciclodextrina se debe al mayor tamaño de la cavidad del segundo, que hospeda más fácilmente al DHAO.

Es llamativo el aumento de la emisión luego de un ciclo de fotoconversión: la emisión inicial (Figura 4.4, línea punteada negra) es menor que la emisión luego de un ciclo de fotoreversión y fotociclación (Figura 4.4, línea punteada verde), aún cuando la absorbancia es menor que el valor inicial. Esto indica posiblemente un reacomodamiento del DHAO dentro de la cavidad de la ciclodextrina, inducida por la diferencia en flexibilidad de los isómeros abiertos y cerrados, que lleva a un mejor ajuste del DHAO y mayor protección del solvente. No se puede deducir de estos experimentos la naturaleza de los complejos ciclodextrina:DHAO - teóricamente ambos complejos 1:1 y 2:1 son razonables, y probables dados los equivalentes de ciclodextrina involucrados.

Una vez establecidos los equivalentes necesarios para solubilizar el DHAO pequeño **8**, se reprodujo el experimento con el compuesto **22**, el equivalente de **15** pero con grupos metilo en los carbonos reactivos (Esquema 4.4). El DHAO **22** es considerablemente mas grande que **8**, gracias a los dos anillos arilamida en cada extremo. Los espectros de absorción y



Esquema 4.4: Síntesis del compuesto 22.

emisión antes y después de irradiación con luz UV y visible se pueden observar en la Figura 4.5. No se observaron cambios en la absorbancia o la emisión que corresponderían con fotociclación o fotoreversión al irradiar, incluso con más de 500 equivalentes de γ -ciclodextrina en 25% metanol en agua. Evidentemente la cavidad de la ciclodextrina no es suficientemente grande como para acomodar un DHAO extendido. Para el DHAO pequeño, una proporción sustancial de solvente orgánico es necesario para solubilizar y conservar sus propiedades con pocos equivalentes de ciclodextrina, mientras que concentraciones mayores de agua requieren cientos de equivalentes, los cuales están limitados por la solubilidad de la ciclodextrina misma. Por ende, la solubilización de DHAOs por ciclodextrinas no es una opción viable para concentraciones altas de agua o DHAOs voluminosos.

4.3 Modificación covalente con glucosa

Los grupos de Pu³¹ e Irie³² solubilizaron diheteroariltenos no-oxidados con mono-sacaridos con éxito, y se aplicó la misma estrategia a los DHAOs buscando solubilizar y conservar las propiedades de los mismos en agua. Se utilizaron reacciones tipo «click» entre alquinos y

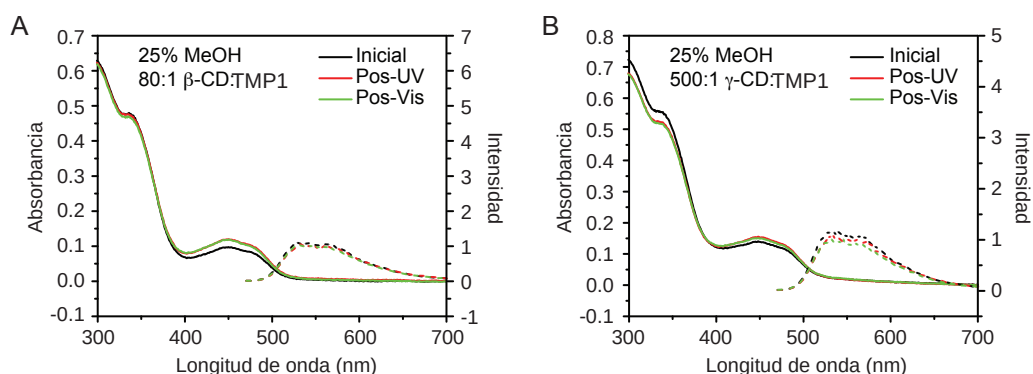
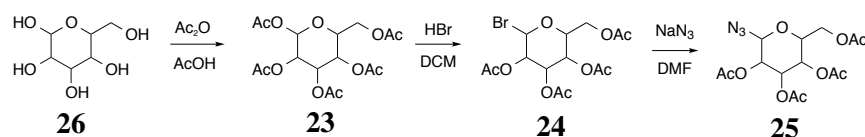


Figura 4.5: Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) para soluciones de 22 en 25% v/v metanol en agua con β - (A) y γ -ciclodextrina (B).

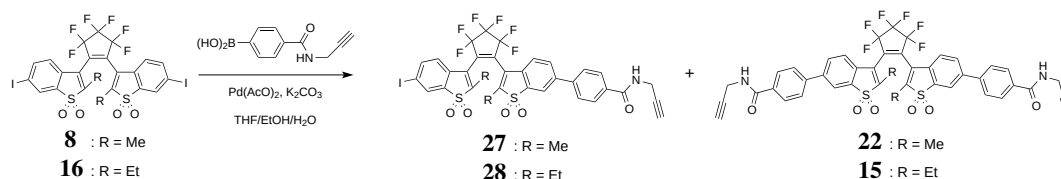
azidas para la unión de las unidades de glucosa a la estructura central del DHAO, para lo cual se funcionalizaron glucosas con azida (Esquema 4.5). Se protegieron primero todos los alcoholes de la glucosa con grupos acetilo (**23**), y luego se realizó una serie de sustituciones nucleofílicas sobre el carbono 6 para reemplazar el acetilo con bromo (**24**) y luego con azida (**25**).

Se generaron tres DHAOs con glucosa para comparar derivados con grupos metilo y etilo en los carbonos reactivos y con una y dos unidades de glucosa. Las rutas sintéticas correspondientes a los precursores y a las reacciones “click” se pueden observar en los Esquemas 4.6 y 4.7. Los precursores **27**, **28** y **15** se generaron con reacciones Suzuki, descritas en detalle en el Capítulo 2. Luego se realizaron reacciones organocúpricas previamente comprobadas¹¹⁴ con los alquinos terminales y la azido-glucosa en una mezcla de THF y metanol, usando el ligando tris-(benziltriazolil)-metilamina (TBTA) para generar los DHAOs **29**, **30** y **31** con monosacáridos protegidos con grupos acetilo (Esquema 4.7).

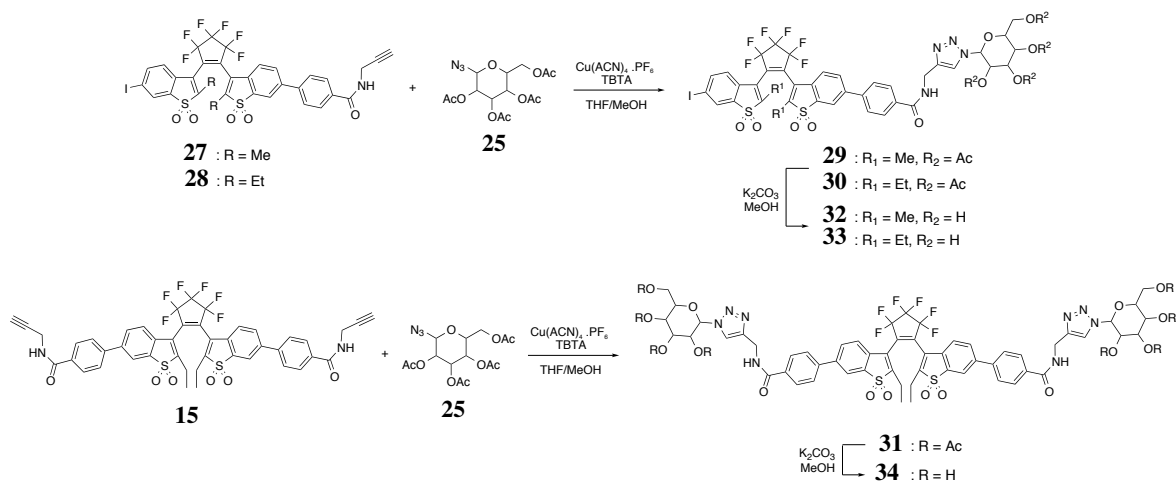
La desprotección se realizó en una primera instancia en metanol con 10 mM NaOH durante 24 horas, siguiendo el protocolo de Tong *et al.*³¹ para los diheteroariletenos no-oxidados. Sin embargo, los DHAOs resultaron muy inestables en estas condiciones, degradándose en menos de 5 minutos, perdiendo la fluorescencia y fotoconvertibilidad normal. Las condiciones se modificaron para evitar esta descomposición: cantidades catalíticas de K₂CO₃ en metanol durante menos de 15 minutos fueron suficientes para desproteger totalmente las glucosas. La susceptibilidad a las condiciones básicas parecería provenir directamente de las sulfonas, ya que Tong *et al.*³¹ no tuvieron la misma experiencia. La desprotección de los alcoholes del azúcar se comprobó mediante espectros de RMN, que se pueden observar en la Figura 4.6 para los compuestos **29** y **32**. Se utilizaron espectros bidimensionales HSQC y HMBC para asignar inequívocamente las señales correspondientes a los protones del anillo sacárido (ver



Esquema 4.5: Síntesis de azido-glucosa.



Esquema 4.6: Síntesis de precursores con grupos alquino terminales.



Esquema 4.7: Síntesis de derivados de DHAOs con glucosa.

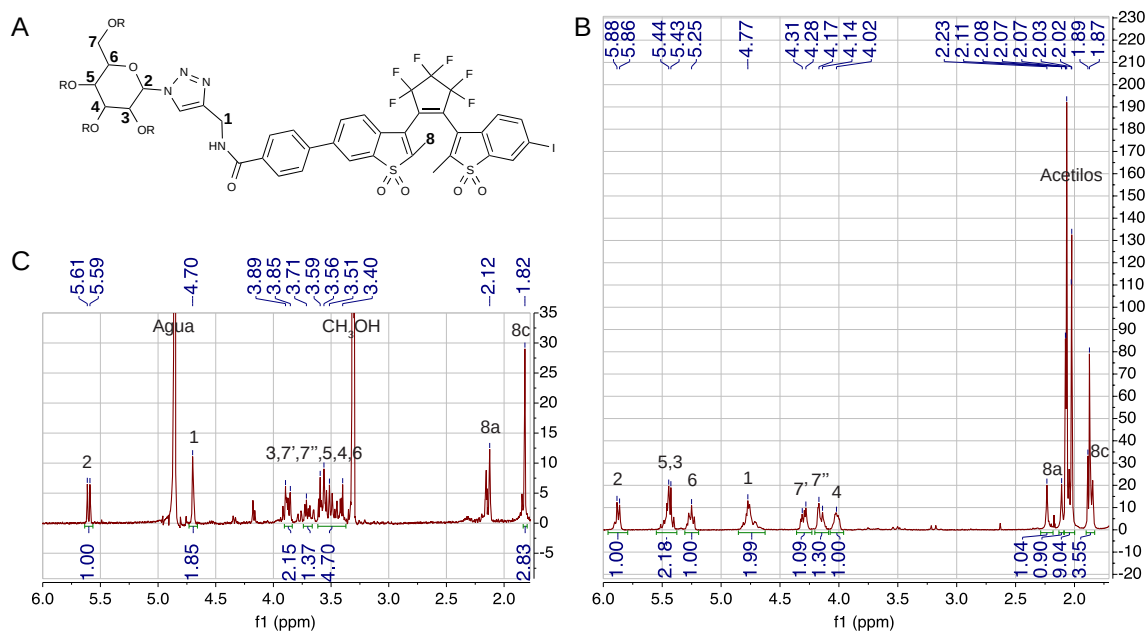


Figura 4.6: A) Numeración del compuesto **32**. Espectros de ^1H RMN ($\delta = 1,7 - 6,0$) para **29** en CDCl_3 (B) y **32** en CD_3OD (C).

el Apéndice A). Se observa que estas señales bien definidas en el derivado acetilado colapsan en el producto final, y desaparecen las señales correspondientes a los grupos acetilo a bajos ppm. Además, en el espectro HMBC (Apéndice A) las señales de los protones del anillo de la glucosa perciben los carbonos de los carbonilos adyacentes en el compuesto **29** pero estas señales desaparecen al desproteger los alcoholes. Sumado a la mayor solubilidad en solventes polares del derivado desprotegido, se confirma la desprotección cuantitativa del azúcar.

Los tres derivados se evaluaron de igual manera que los controles en la Sección 4.1, midiendo las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas en mezclas de metanol:agua. Los resultados se observan en la Figura 4.7. Al igual que para los DHAOs control **11** y **15**, la longitud de onda de absorción máxima se corre hacia el rojo y la absorbancia máxima disminuye drásticamente en soluciones de $x_M < 0,3$ para todos los derivados con glucosa (Figura 4.7A y B). Sin embargo, al igual que para **15**, la solubilidad de los derivados con etilo **33** y **34** es algo mayor que para el derivado metilado **32**, e incluso la solución de **34** no presentó turbidez en agua pura. La mayor solubilidad de **34** en altas fracciones de agua se refleja también en los errores menores en las determinaciones de Φ_f , $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ (Figura 4.7C, D y E).

Es llamativo que el Φ_f del precursor **15** es mayor que ese de **34**, ya que la derivatización con unidades glucosa no modifica el sistema aromático del DHAO. Coincidentalmente los Φ_f de **33** y **34** son idénticos en metanol puro (Figura 4.7C), sin embargo a $x_M = 0,9$ **33** sufre una caída en el valor de Φ_f mientras **34** lo conserva hasta $x_M = 0,3$. A esta fracción de metanol

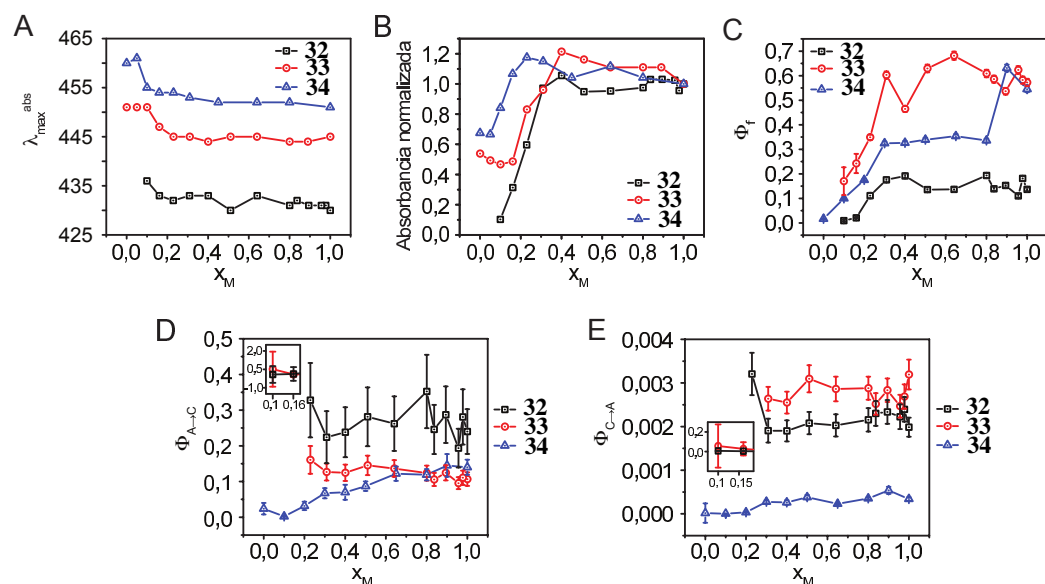


Figura 4.7: Variación de absorbancia máxima (A) y longitud de onda del máximo de absorción (B) de la forma cerrada, rendimiento cuántico de fluorescencia (C) y rendimientos cuánticos de fotociclación (D) y fotoreversión (E) de **32**, **33** y **34** en mezclas metanol:agua.

se observa el mismo fenómeno que con la absorción: a proporciones menores de metanol el rendimiento cuántico disminuye drásticamente. En cuanto a $\Phi_{A \rightarrow C}$ y $\Phi_{C \rightarrow A}$ (Figura 4.7D y E), la misma tendencia es evidente: las propiedades se conservan hasta $x_M = 0,3$, y a mayores concentraciones de agua los rendimientos disminuyen o bien las mediciones presentan errores grandes debidos a baja solubilidad y malos ajustes de la cinética de conversión.

La disminución de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y fotoconversión a bajos x_M implican un aumento en el decaimiento no-radiativo y no-reactivo de los estados excitados de los isómeros cerrados y abiertos. Para corroborar esta hipótesis, se midieron los tiempos de vida de **15**, **33** y **34**, los tres derivados con grupos etilo sin, con una y con dos unidades de glucosa (Figura 4.8A). Se ve claramente que los tiempos de vida disminuyen a medida que aumenta la proporción de agua. A partir de $x_M = 0,3$ se observa un quiebre en la tendencia y τ_f disminuye rotundamente. Usando las ecuaciones descritas en el Capítulo 2 se pueden calcular las constantes de decaimiento correspondientes (Tabla 4.1) y los valores del decaimiento no-radiativo k_{nr} se grafican en la Figura 4.8B. Se observa un repentino aumento en k_{nr} a partir de $x_M = 0,3$, lo cual explica el desfavorecimiento de los caminos de fotoreversión y emisión.

Ya que ni el espectro de absorción ni el de emisión presentan cambios en sus perfiles a bajas x_M , queda descartada la formación de una tercera especie producto de reacciones fotoquímicas secundarias o de reacción con el oxígeno ambiental, y la falta de turbidez o precipitados en la solución descarta la formación de especies agregadas durante o después de la irradiación. Una explicación podría ser la formación de complejos como resultado del apilamiento $\pi - \pi$ entre dos sistemas aromáticos¹¹⁵ de DHAOs. Sin embargo, los decaimientos de fluorescencia son mono-exponenciales, y diheteroariltenos no-oxidados han sido solubilizados con grupos hidrofílicos conservando sus propiedades fotoquímicas en soluciones acuosas.^{30;31;33}

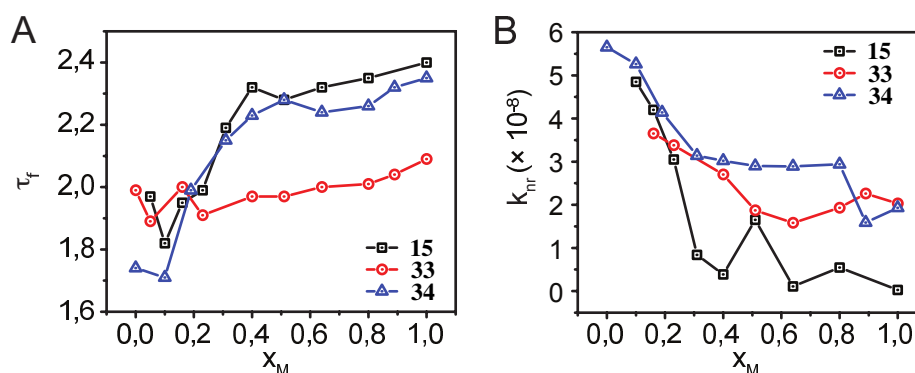


Figura 4.8: Tiempos de vida media de fluorescencia (A) y constantes cinéticas de decaimiento no-radiativo (B) de **15**, **33** y **34** en mezclas metanol:agua.

Tabla 4.1: Constantes cinéticas de decaimiento para compuestos **15**, **33** y **34**.

Compuesto 15						
x_M	τ_f	$\Phi_{C \rightarrow A} (\times 10^4)$	$k_{C \rightarrow A} (\times 10^{-5})$	Φ_f	$k_f (\times 10^{-8})$	$k_{nr} (\times 10^{-7})$
1,00	2,40	11	4,5	0,99	4,1	0,26
0,80	2,35	8,5	3,6	0,87	3,7	5,5
0,64	2,32	7,8	3,4	0,97	4,2	1,1
0,51	2,28	8,0	3, 5	0,62	2,7	16
0,40	2,32	8,4	3,6	0,91	3,9	3,9
0,31	2,19	10	4,8	0,81	3,7	8,4
0,23	1,99	39	20	0,39	2,0	30
0,16	1,95	6,0	3,1	0,18	0,92	42
0,10	1,82	8,8	4,8	0,12	0,65	49

Compuesto 33						
x_M	τ_f	$\Phi_{C \rightarrow A} (\times 10^3)$	$k_{C \rightarrow A} (\times 10^{-6})$	Φ_f	$k_f (\times 10^{-8})$	$k_{nr} (\times 10^{-8})$
1,00	2,09	3,2	1,5	0,57	2,7	2,0
0,89	2,04	2,8	1,4	0,54	2,6	2,3
0,80	2,01	2,9	1,4	0,61	3,0	1,9
0,64	2,00	2,9	1,4	0,68	3,4	1,6
0,51	1,97	3,1	1,6	0,63	3,2	1,9
0,40	1,97	2,6	1,3	0,46	2,4	2,7
0,23	1,91	5,5	2,9	0,35	1,8	3,4
0,16	2,00	28	14	0,24	1,2	3,7

Compuesto 34						
x_M	τ_f	$\Phi_{C \rightarrow A} (\times 10^4)$	$k_{C \rightarrow A} (\times 10^{-5})$	Φ_f	$k_f (\times 10^{-8})$	$k_{nr} (\times 10^{-8})$
1,00	2,35	3,4	1,4	0,55	2,3	1,9
0,89	2,32	5,4	2,3	0,63	2,7	1,6
0,80	2,26	3,5	1,6	0,34	1,5	2,9
0,64	2,24	2,3	1,0	0,35	1,6	2,9
0,51	2,28	3,8	1,7	0,34	1,5	2,9
0,40	2,23	2,6	1,2	0,33	1,5	3,0
0,31	2,15	2,8	1,3	0,32	1,5	3,1
0,19	1,99	0,33	0,17	0,18	0,88	4,1
0,10	1,71	0,022	0,013	0,10	0,58	5,3
0,00	1,74	0,17	0,099	0,017	0,097	5,7

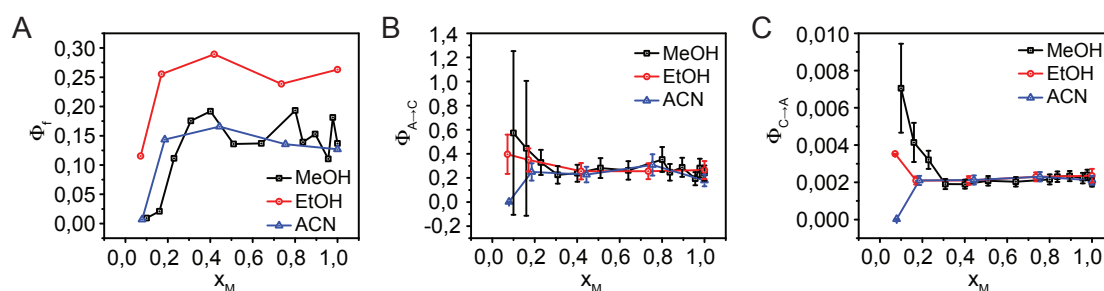


Figura 4.9: Variación del rendimiento cuántico de fluorescencia (A) y rendimientos cuánticos de fotociclación (B) y fotoreversión (C) de **32** en mezclas metanol:agua (negro), etanol:agua (rojo) y acetonitrilo:agua (azul).

Por último, y para constatar que el elemento problemático es el agua y no el metanol, se repitieron las mediciones de solubilidad y de las propiedades fotoquímicas de **32** en mezclas de agua y otros solventes polares: etanol y acetonitrilo. Los valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia y fotoconversión en estas mezclas se comparan con aquellas en metanol:agua en la Figura 4.9. El compuesto **32** presenta el mismo comportamiento en todas estas mezclas: la solubilidad no mejora y todos los rendimientos disminuyen o su error aumenta al disminuir la fracción molar del solvente orgánico por debajo de $x_{ACN} = 0,15$ y $x_{EtOH} = 0,10$ aproximadamente. En el caso de acetonitrilo, hay un consenso general entre distintos autores que para $x_{ACN} < 0,10 - 0,33$ (dependiendo del método de cálculo) la estructura del solvente está dominada por las moléculas de agua y el valor de x_{ACN} es homogéneo a través de la solución.^{116;117} A x_{ACN} por encima de estos valores, la estructura de la solución presenta microheterogeneidad, tal que moléculas de agua se encuentran cerca de otras moléculas de agua e idem para el acetonitrilo. Para el etanol ocurre un fenómeno similar pero a x_{EtOH} todavía menores; la solución se torna microheterogénea y moléculas de etanol se encuentran totalmente hidratadas recién a $x_{EtOH} > 0,07 - 0,2$.^{118;119} Los cambios estructurales de los solventes vienen acompañados a su vez por puntos de inflexión en las propiedades termodinámicas de todas las mezclas (metanol, etanol y acetonitrilo). La correlación entre la dominación del agua en la estructura molecular del solvente y la pérdida de potencial fotocromático de los DHAOs es clara en cada uno de estos casos.

El conjunto de los experimentos sugieren que hay interacciones desfavorables específicas entre el agua y el grupo sulfona, irónicamente responsable por la fluorescencia de los DHAOs en primer lugar. A pesar de poder solubilizar individualmente una molécula de DHAO en agua por modificación covalente con grupos hidrofílicos, esta técnica no alcanza para conservar sus propiedades fotoquímicas.

4.4 Adsorción a albúmina

La adsorción de DHAOs a la albúmina de suero bovino (BSA) se evaluó como técnica de solubilización, sirviendo simultáneamente como aproximación a las interacciones no-covalentes de los DHAOs con proteínas dentro de la célula. La BSA es una proteína globular de 66 kDa con una estructura conocida que tiene entre 2 y 7 sitios de unión conocidos^{120;121;122} donde se unen diversas hormonas y ácidos grasos.¹²² A diferencia de la unión a sitios internos o activos de la proteína, la adsorción es no-específica, no hay una afinidad particular del adsorbato por el sitio de adsorción, y las interacciones son mayormente de Van der Waals o electrostáticas. Sin embargo, evidencia experimental¹²³ sugiere que los sitios de unión son los preferidos para la adsorción de una amplia variedad de moléculas orgánicas, y en particular cromóforos con estructuras mayormente hidrofóbicas.

La conservación de las propiedades fotoquímicas de los DHAOs por adsorción a BSA se evaluó adsorbiendo derivados sin glucosa (compuestos **11** y **15**) a su superficie, y con glucosa (compuestos **32** y **33**) para evaluar si la presencia de un grupo hidrofílico afectaba la adsorción. Se prepararon tres soluciones madres para cada DHAO y las mismas se irradiaron previamente con luz UV para llegar al estado fotoestacionario. Se preparó una solución madre de BSA de 0,1 μ M en buffer de fosfato, y luego se mezclaron soluciones de DHAOs con y sin BSA (solo con buffer), siempre conservando un mismo volumen de metanol, según la planilla de Excel en la Figura 4.10. Las muestras se agitaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 500 rpm para precipitar DHAO no-adsorbido. El sobrenadante se removió y el precipitado se resuspendió en un volumen equivalente de metanol. Se midieron espectros de absorción y emisión antes y después de un ciclo de fotoreversión-fotociclación de los precipitados y sobrenadantes, con y sin BSA, para cada una de los DHAOs.

Debido a la insolubilidad de todos los DHAOs en soluciones de menos de 2,5% v/v metanol en agua, todas las muestras sin BSA presentaron un 100% de fotocromismo en el precipitado

	Concentración (M)	Equivalentes		Volumen BSA (μ L)	Vol Total MeOH (μ L)	Volumen de DHAO (μ L)			Concentración DHAO (M)
		BSA	DHAO			Sn Madre 1	Sn Madre 2	Sn Madre 3	
Solución Madre BSA	1E-07	1	1	800	20	1			1,0E-07
Solución Madre DHAO 1	8E-05	1	1,5	800	20	1,5			1,5E-07
Solución Madre DHAO 2	4E-04	1	2	800	20	2			2,0E-07
Solución Madre DHAO 3	8E-04	1	2,5	800	20	2,5			2,5E-07
		1	3	800	20	3			3,0E-07
		1	4	800	20	4			4,0E-07
		1	5	800	20		1		5,0E-07
		1	6	800	20		1,2		6,0E-07
		1	7	800	20		1,4		7,0E-07
		1	8	800	20		1,6		8,0E-07
		1	9	800	20			0,9	9,0E-07
		1	10	800	20			1	1,0E-06
		1	20	800	20			2	2,0E-06
		1	30	800	20			3	3,0E-06

Figura 4.10: Planilla de Excel de cálculos para la preparación de las soluciones de BSA y DHAOs.

resuspendido. Las muestras con BSA mostraron un comportamiento marcadamente distinto, como se observa en la Figura 4.11. Los porcentajes de DHAO precipitado y soluble se calcularon respecto a los moles totales que se agregaron a cada muestra, con lo cual hay un cierto error en las determinaciones gracias a la ineficiente extracción del sobrenadante y la resuspensión del precipitado. Para todos los compuestos, con pocos equivalentes de DHAO se observa una pequeña proporción en el precipitado, pero la mayor parte se encuentra soluble. A medida que aumentan los equivalentes de DHAO, la proporción soluble permanece aproximadamente igual para **11** y **15**, incluso aumentando para **33**. Sin embargo, para el compuesto **32** se ve claramente un punto de quiebre, donde el DHAO prefiere estar agregado que adsorbido a partir de los 10 equivalentes, y se invierten las proporciones precipitadas y solubles. Es sorprendente que los demás compuestos no presenten este comportamiento, ya que es lo esperado para una curva de adsorción. También es llamativo que con 30 equivalentes de **32**, un 95% de estos esten precipitados, y que no se conserve la solubilidad de al menos un 20% (6 equivalentes), ya que un 60% de 10 equivalentes permanecían solubles.

Es imposible determinar a partir de estos gráficos el número de moléculas de DHAO promedio que se adsorben a una molécula de BSA, ya que no se obtuvieron curvas normales de

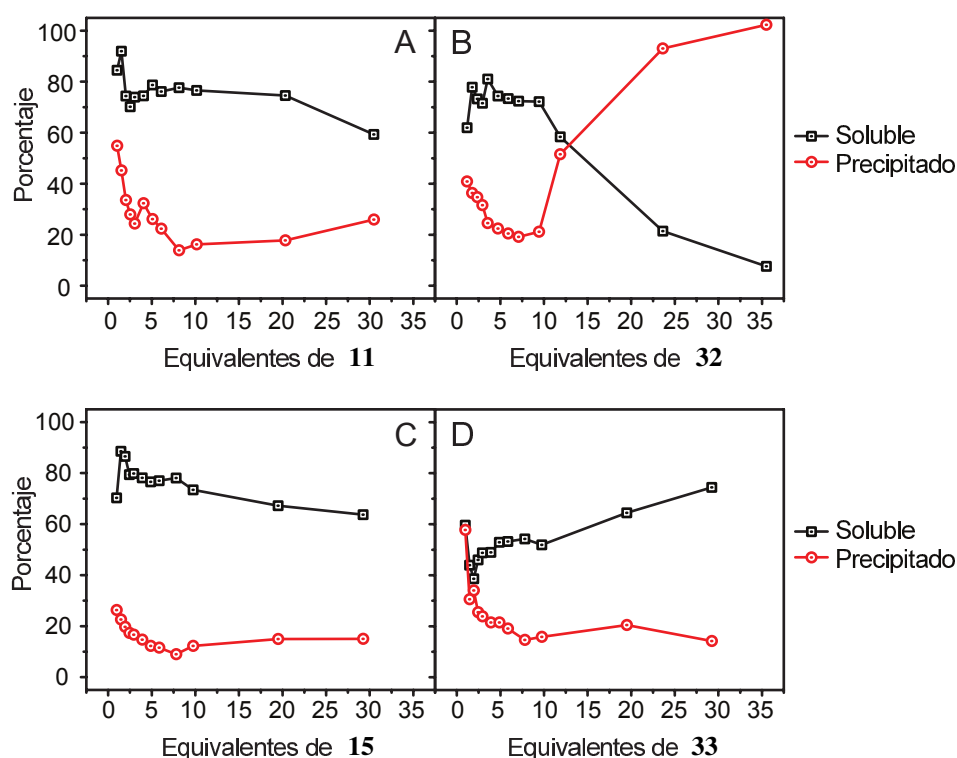


Figura 4.11: Porcentaje de fracción soluble (negro) y precipitado (rojo) de los DHAOs **11** (A), **32** (B), **15** (C) y **33** (D) en mezclas de BSA con distintos equivalentes de DHAO.

saturación. La adsorción de más de 7 equivalentes de DHAO a BSA implica adsorción a sitios desconocidos o adsorción no dirigida a sitios de unión. La presencia de un precipitado incluso a bajos equivalentes podría significar que compiten las interacciones van der Waals con la BSA y las interacciones $\pi - \pi$ de los DHAOs que llevan a la agregación.

En cuanto a la conservación de las propiedades fotoquímicas de los DHAOs adsorbidos a BSA, no se observó fotoconversión de ningún tipo en solución para ninguno de los derivados. Los espectros de emisión de los compuestos **15** y **33** en metanol puro y adsorbido a BSA se grafican en la Figura 4.12. Como se ve, los valores de Φ_f disminuyen al menos 20 veces al estar adsorbidos y en solución acuosa. La disminución en la emisión se podría deber a una interacción desfavorable con el solvente; a una transferencia de energía a los residuos aromáticos de la proteína;¹²⁴ ó a la interacción $\pi - \pi$ con residuos aromáticos.¹²⁵ Se ha demostrado que los sitios de unión de la BSA cambian levemente su conformación en presencia de un ligando^{123;126;127} maximizando las interacciones hidrofóbicas, lo cual podría llevar a una mayor protección del solvente pero también a un mayor solapamiento de los orbitales de los residuos con los del ligando. Mientras la adsorción a BSA solubiliza efectivamente a los DHAOs, gracias a alguna de estas interacciones desfavorables el nuevo entorno no es adecuado para conservar la emisión y la fotoconversión.

4.5 Inclusión en proteínas de unión de ácidos grasos

Las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs, del inglés fatty acid binding proteins) son proteínas de 14-15 kDa que unen específicamente ácidos grasos saturados e insaturados con alta afinidad¹²⁸ y sirven de chaperonas intracelulares de los mismos. FABPs de distintas

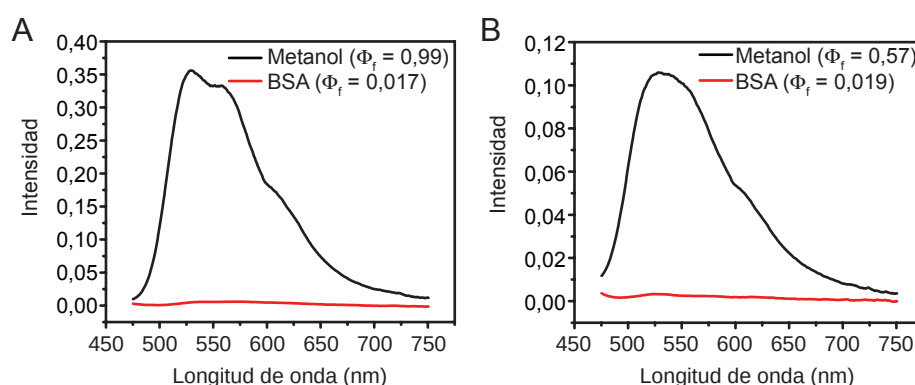


Figura 4.12: Espectros de emisión de **15** (A) y **33** (B) en metanol (negro) y adsorbido a BSA (rojo), y sus respectivos Φ_f .

partes del organismo unen diversos ácidos grasos con afinidad variable, y en general cuanto más hidrofóbico el ligando, más fuerte la unión. Todos los FABPs tienen una estructura de barril β con una cavidad decorada con residuos hidrofóbicos y polares en el interior,¹²⁹ y una “tapa” de un lado del barril conformada por un loop en la estructura secundaria. En particular, la FABP del hígado (L-FABP) tiene una cavidad considerablemente más grande que FABPs provenientes de otros lugares del organismo, por ejemplo del intestino (I-FABP), y puede unir simultáneamente dos moléculas de ácidos grasos (Figura 4.13). Se ha demostrado que las FABPs son capaces de unir otras moléculas lipofílicas, por ejemplo fluoróforos orgánicos.^{130;131}

El desempeño de las FABPs como anfitriones de DHAOs se evaluó con el compuesto **11**, de tamaño demasiado grande para ser solubilizado por la cavidad de la ciclodextrina. Se agradece especialmente la colaboración del Dr. Lisandro Falomir-Lockhart en estos experimentos. Soluciones de 10 μM de FABPs intestinales (I-) y de hígado (L-) en 50 mM buffer de fosfato con 100 mM CaCl_2 se incubaron con 0,5 μM de **11** pre-irradiado con luz UV en DMSO (10% DMSO en total). Se incubó también una muestra sin proteína, en las mismas condiciones, para controlar la formación de micelas de DHAO que podrían interferir. Luego las muestras se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño y se midió la absorbancia a 275 nm de cada fracción para localizar la proteína. Los cromatogramas se encuentran en la Figura 4.14, donde se ve la ausencia de micelas de DHAO en la muestra sin proteína, y las dos bandas de elución de las FABPs. Ya que no se trata de una unión covalente del DHAO a la proteína, no fue posible purificar el complejo de FABP libre, por ejemplo por electroforesis. Se caracterizaron las muestras al igual que en los experimentos previos, midiendo los espectros de absorción y emisión antes y después de fotoconvertir a los DHAOs (Figura 4.15). Se observó una buena fotoreversión de ambos complejos, y conservación de la emisión, aunque esta fue menor

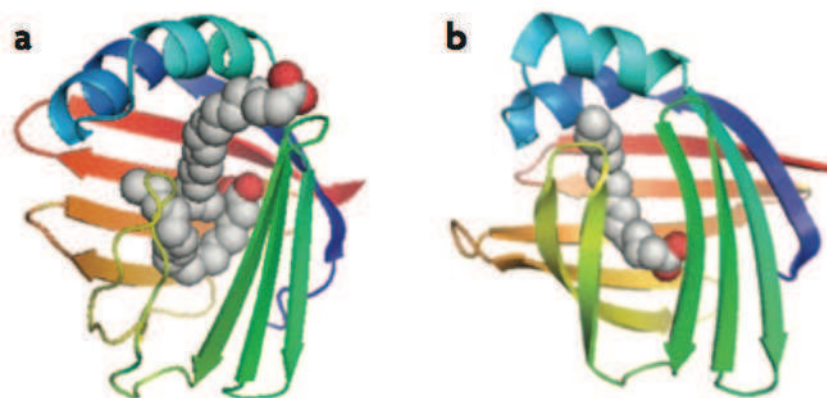


Figura 4.13: Estructura de dos ácidos oléicos unidos a L-FABP (a) y ácido palmítico unido a I-FABP (b). Adaptado con permiso de Furuhashi y Hotamisligil¹²⁸. Copyright 2016 Nature Publishing Group.

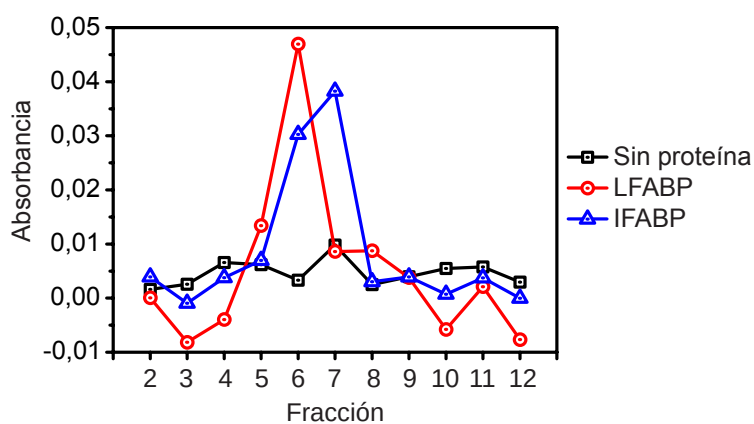


Figura 4.14: Cromatograma de elución de muestras de DHAO **11** con y sin FABPs. Absorbancia medida a 275 nm.

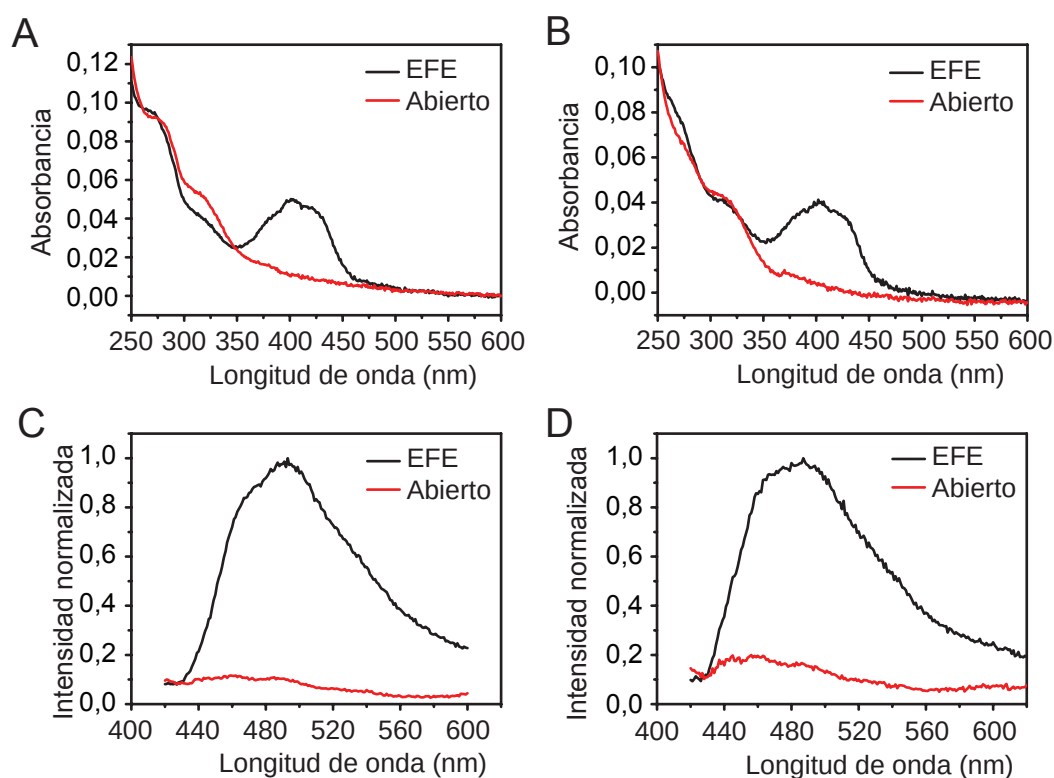


Figura 4.15: Espectros de absorción y emisión de los complejos **11**:I-FABP (A, C) y **11**:L-FABP (B, D) antes (negro) y después (rojo) de irradiar con luz visible.

que en solventes orgánicos. Incluso se pudieron realizar ciclos de fotoconversión, los cuales se muestran para el complejo **11**:L-FABP en la Figura 4.16. Los espectros de absorción y emisión varían de la forma esperada al irradiar con luz UV (rojo a violeta, Figura 4.16A) y se pudieron realizar múltiples ciclos de fotoconversión (Figura 4.16B). Se observa una disminución en la absorbancia máxima de la forma abierta durante los ciclos, pero no en la emisión. Este fenómeno se había visto con la ciclodextrina, donde luego de un ciclo la emisión aumentaba a pesar de no recuperarse la absorbancia inicial. Nuevamente, puede ser indicativo de un mejor acomodamiento del DHAO en la cavidad del FABP. Los resultados son prometedores, ya que se pudo conservar la fotoconversión y la emisión de los DHAO en soluciones acuosas utilizando las cavidades de las FABP como anfitriones.

4.6 Conjugación covalente a proteínas

4.6.1 Síntesis de derivados con maleimida

La última sección de este capítulo trata de la conjugación de DHAOs a proteínas mediante enlaces covalentes para generar sondas para proteínas y estructuras celulares y simultáneamente como técnica de solubilización. Se sintetizaron tres compuestos derivados de DHAOs con grupos funcionales tipo maleimida, que reaccionan rápidamente con grupos sulfhidrilos en condiciones acuosas y suaves para proteínas. Se seleccionaron dos sustituyentes de DHAOs de aquellos estudiados en el Capítulo 2: el grupo amida (compuesto **11**) ya que presentaba buena fotoconversión y propiedades intermedias de los DHAOs; y el grupo etoxibromo (compuesto **14**) que proporcionaba solvatocromismo al fotocromico. Las rutas

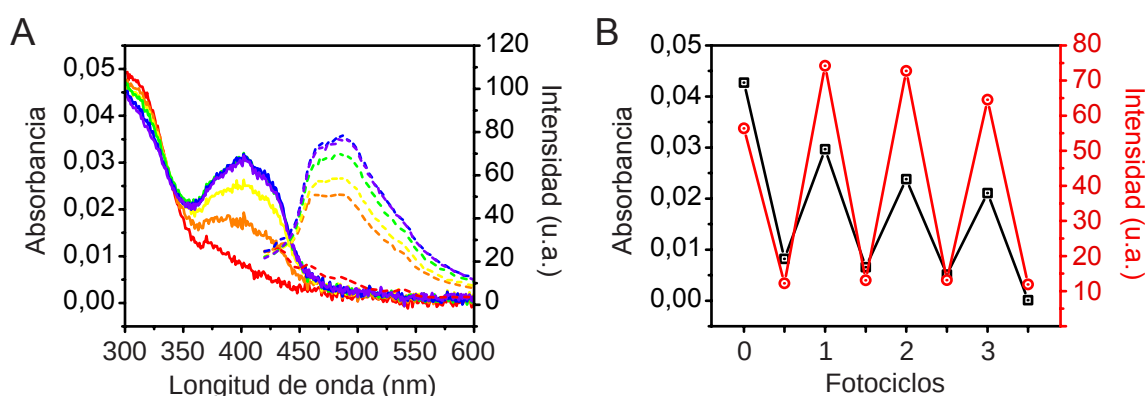
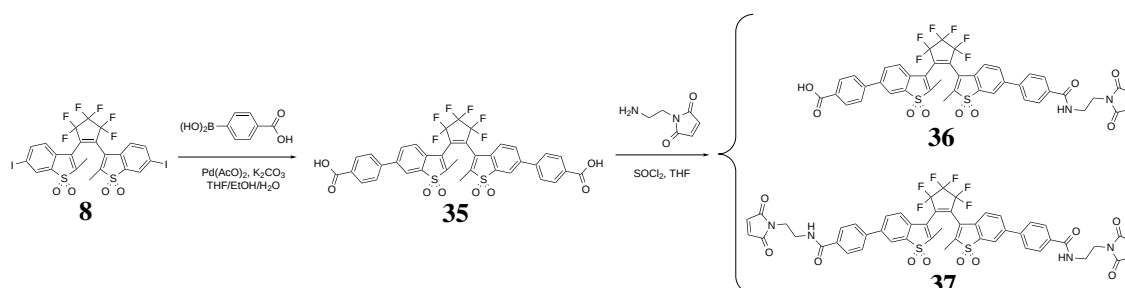


Figura 4.16: Espectros de absorción y emisión del complejo **11**:L-FABP durante fotociclación con luz UV (A) y valores de absorbancia máxima del isómero cerrado y emisión durante fotociclos con luz visible y UV alternda (B).

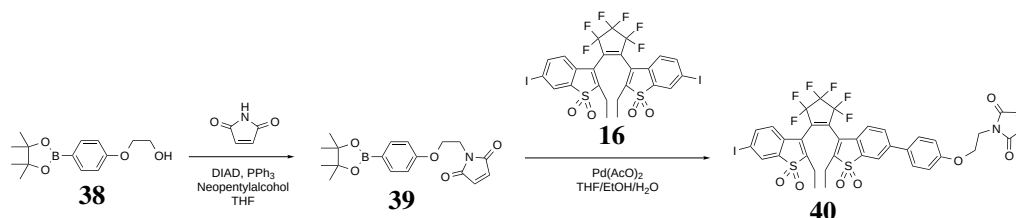
sintéticas desarrolladas para la síntesis de los derivados con maleimida de estos dos DHAOs se aprecian en los Esquemas 4.8 y 4.9.

Los derivados con grupos amida se sintetizaron a partir del producto **35** de la reacción Suzuki del precursor **8** con el ácido 4-carboxifenilborónico. Se activaron los carbonilos de **35** con SOCl_2 y se reaccionaron con N-aminoetilmaleimida para generar los derivados mono- y di-sustituídos. El compuesto **40** se sintetizó con mayor dificultad, incorporando primero el grupo maleimido al ácido borónico **38** mediante una reacción de Mitsunobu en condiciones optimizadas de la literatura.¹³² El producto **39** se acopló al precursor de DHAOs **16** mediante un acoplamiento de Suzuki obteniéndose el producto **40**.

Se caracterizaron estos tres compuestos espectroscópicamente, y los espectros de absorción



Esquema 4.8: Síntesis de derivados de DHAOs con maleimida y grupos amida.



Esquema 4.9: Síntesis de un derivado de DHAO con maleimida y grupo etoxibromo.

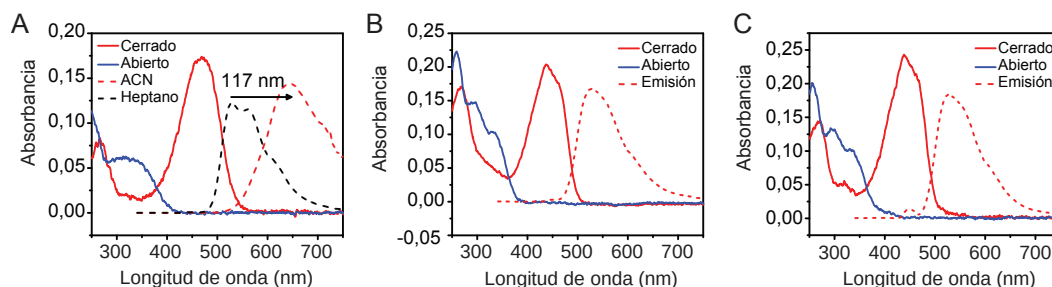


Figura 4.17: Espectros de absorción y emisión de los isómeros abiertos (azul) y cerrados (rojo) de los compuestos **40** (A, acetonitrilo y heptano), **36** (B, acetonitrilo) y **37** (C, acetonitrilo).

y emisión en acetonitrilo se pueden observar en la Figura 4.17. El compuesto **40** es además solvatocrómico, ya que el grupo etoxi le proporciona esta característica, y se puede observar en la Figura 4.17A un desplazamiento de 117 nm de la emisión en heptano a acetonitrilo, comparable con los resultados presentados para el compuesto **14** en el Capítulo 2. Las demás propiedades fotoquímicas se muestran en la Tabla 4.2. El compuesto **40** presenta rendimientos cuánticos de conversión menores a los compuestos no solvatocrómicos (al igual que el derivado **14** en el Capítulo 2) y un valor mayor también de Φ_f debido a la presencia de los dos grupos etilo en los carbonos reactivos.

4.6.2 Conjugación a proteínas

Para la conjugación se eligió trabajar con dos proteínas distintas: α -sinucleína y un anticuerpo secundario. Se agradece especialmente la colaboración del Dr. Nathan Cook en esta sección.

α -Sinucleína:

La α -sinucleína es una proteína pequeña de 140 aminoácidos que es intrínsecamente desordenada, y se encuentra en los agregados amiloide que se forman en neuronas en la enfermedad de Parkinson. Se decidió conjugar un DHAO a esta proteína debido a varias razones: el grupo del Dr. Jovin tiene vasta experiencia en la agregación de la sinucleína y sus interacciones con membranas y otras proteínas; el tamaño pequeño de esta proteína permitiría evaluar si una proteína chica provee un entorno suficientemente favorable para conservar la fotoconversión en agua; y además la proteína cuenta con tres regiones definidas con distinto carácter hidrofóbico o ácido, tal que se podía evaluar el efecto de éste carácter sobre la sonda, y vice versa particularmente durante la agregación (ver Capítulo 6). Se eligió trabajar con mutantes de α -sinucleína con cisteínas en las posiciones 18 (N-terminal, residuos hidrofóbicos), 90 (región central, residuos hidrofóbicos) y 140 (C-terminal, residuos ácidos) para evaluar el efecto de las cargas locales y/o hidrofobicidad sobre la solubilización y fotoconversión. Se conjugaron estos mutantes al compuesto **40**, ya que el solvatocromismo

Tabla 4.2: Propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los derivados con maleimida.

Conjugado	$\lambda_{\max, A}^{\text{abs}}$ (nm), ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max, C}^{\text{abs}}$ (nm), ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f	$\Phi_{A \rightarrow C} (\times 10^2)$	$\Phi_{C \rightarrow A} (\times 10^4)$
40	320, 11,6	470, 35,8	647	0,88	1,2	0,34
36	329, 19,2	438, 38,4	526	0,48	58	8,2
37	332, 19,0	437, 37,6	530	0,81	31	18

del fotocromico serviría para reportar información sobre el entorno de la molécula en cada posición, y al compuesto **37** como sonda no-solvatocrómica. En el Capítulo 6 se detalla el uso de estos conjugados de **40** como sondas solvatocrómicas durante la agregación de la α -sinucleína.

El protocolo para la conjugación de los mutantes de α -sinucleína se optimizó teniendo en cuenta la insolubilidad de los DHAOs en buffer de fosfato: se evaluó la solubilidad de la α -sinucleína y el compuesto **40** en mezclas de distintos volúmenes de solventes orgánicos en buffer (Tabla 4.3). Se requiere al menos un 40% de acetonitrilo para solubilizar 90 μ M del compuesto **40** en buffer manteniendo una solubilidad de 30 μ M de α -sinucleína. Se usaron las siguientes condiciones para conjugar **40** y **37** y los mutantes de α -sinucleína detallados en la Tabla 4.4: 40% acetonitrilo en buffer de fosfato 25 mM con concentraciones finales de 30 μ M de α -sinucleína, 90 μ M de DHAO y 1 mM de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina, agente reductor). Los DHAOs se conjugaron como el isómero abierto, con una pequeña proporción de isómero cerrado debido a luz espúrea. Ya que el compuesto **37** tiene dos grupos maleimida, en exceso de DHAO se esperaba que se formen tanto monómeros como dímeros de α -sinucleína. Las mezclas se agitaron constantemente durante 12 horas, protegidas de luz ambiental. La numeración de cada conjugado se encuentra en la Tabla 4.4 como referencia.

Las proteínas marcadas fueron purificadas por cromatografía de exclusión de tamaño y las fracciones analizadas midiendo la absorbancia a 275 nm (proteína) y 350 nm (DHAO). Los cromatogramas correspondientes a las reacciones de α -sinucleína-A140C:**40** y α -sinucleína-A18C:**37** se muestran en la Figura 4.18. La Figura 4.18A correspondiente

Tabla 4.3: Ensayos de solubilidad de α -sinucleína (30 μ M) y **40** (90 μ M).

Ensayo Número	Solvente orgánico	% Solvente	Soluble?
1	DMSO	1	No
2	DMSO	16	No
3	DMSO	30	No
5	DMSO	50	No
6	DMSO	60	No
7	ACN	10	No
8	ACN	20	No
9	ACN	30	No
10	ACN	40	Sí
11	ACN	50	Sí
12	ACN	60	Sí

Tabla 4.4: Numeración y descripción de los conjugados de α -sinucleína.

Mutante de α -sinucleína	DHAO	Numeración del Conjugado	Propiedad
A18C	40	41	Solvatocrómico
A90C	40	42	Solvatocrómico
A140C	40	43	Solvatocrómico
A18C	37	44	Monómero de α -sinucleína
A18C	37	45	Dímero de α -sinucleína

al conjugado **43** se muestra en representación también de los mutantes **41** y **42**, donde se ve el pico correspondiente a la elución de una mezcla de proteína libre y proteína marcada. El cromatograma de la Figura 4.18B presenta dos picos, supuestamente correspondientes al monómero y al dímero formados, incorporando el DHAO **37** como puente entre dos unidades de α -sinucleína.

Usando la relación de absorbancias entre 275 nm y 350 nm se obtuvo el rendimiento de marcación. Los coeficientes de absortividad molar (ϵ) de los DHAOs y α -sinucleína, y aquellos calculados para los conjugados se muestran en la Tabla 4.5. Los valores de absorbancia de los cromatogramas de **41**, **42** y **43** corresponden aproximadamente a la relación calculada, sugiriendo una marcación cuasi-cuantitativa de la proteína para todos estos conjugados. Las relaciones de absorbancias 275 nm/350 nm de los dos picos del cromatograma de la marcación de α -sinucleína-A18C con **37** (2,01 y 2,20 para el primer y segundo pico) también se corresponden aproximadamente con las relaciones de ϵ calculadas para un monómero y un dímero de sinucleína: $\epsilon_{275}/\epsilon_{350} = 1,93$ para el monómero, $\epsilon_{275}/\epsilon_{350} =$

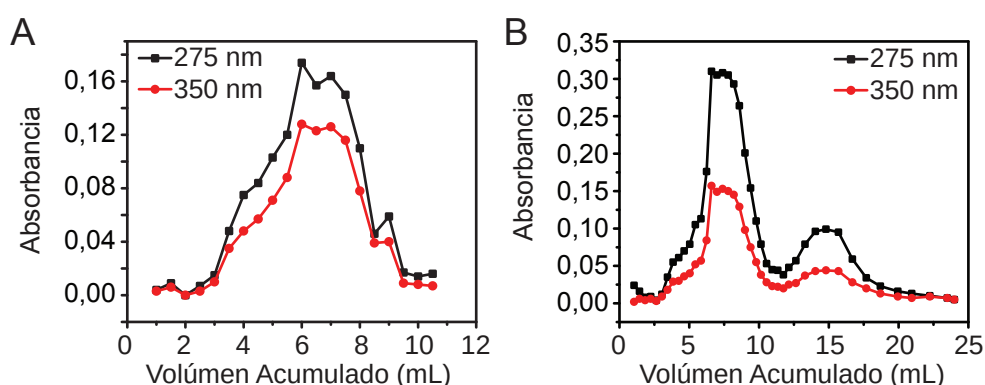
**Figura 4.18:** Cromatograma de elución del conjugado de α -sinucleína-A140C:**40** (A) y α -sinucleína-A18C:**37** (B).

Tabla 4.5: Coeficientes de absortividad molar de los conjugados DHAO: α -sinucleína.

Conjugado	$\epsilon (\times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$					
	α -Sinucleín		DHAO		Conjugado	
	275 nm	350 nm	275 nm	350 nm	275 nm	350 nm
41, 42, 43	4	0	12	11	16	11
44	4	0	25	15	29	15
45	4	0	25	15	34	15

2,26 para el dímero. Esto indica que los dos picos son monómero y dímero de sinucleína aproximadamente 100% marcados. Las fracciones de cada cromatograma correspondientes a las proteínas marcadas se juntaron y se concentraron por centrifugación para obtener los conjugados **41, 42, 43, 44** y **45** puros.

Los conjugados de α -sinucleína se caracterizaron como de costumbre. Los espectros de absorción y emisión correspondientes a los conjugados con la sonda solvatocrómica **41, 42** y **43** se muestran en la Figura 4.19. Las longitudes de onda de máxima absorbancia y emisión del isómero cerrado para cada uno de los conjugados solvatocrómicos fueron iguales a la del DHAO solo en acetonitrilo, indicando que el entorno de la sonda es de aproximadamente igual polaridad (Tabla 4.6). Los grados de conversión en el estado fotoestacionario fueron prácticamente del 100% para los conjugados **41** y **42**, pero para **43** sorprendentemente pareciera que el fotocromico llegó a un grado mucho menor de fotoconversión, dado el perfil del espectro de absorción. Esto es curioso, ya que la fotoreversión de los derivados con grupos etoxi es notoriamente lenta, llevando a altos grados de fotoconversión. Una fotociclación deficiente puede deberse a heterogeneidad en el entorno de las sondas, favoreciendo que algunas fotociclen pero otras no. A pesar de que los conjugados fotociclaron en mayor o menor medida, una vez llegado al estado fotoestacionario los DHAOs no se pudieron fotorevertir

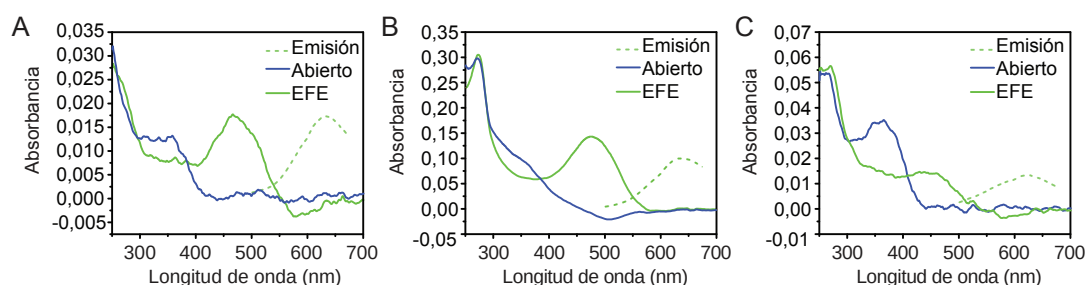
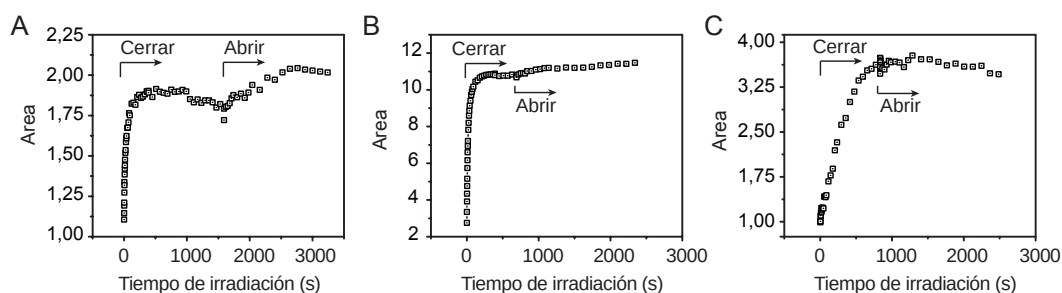
**Figura 4.19:** Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) de los conjugados **41** (A), **42** (B) y **43** (C) antes (azul) y después (verde) de irradiación con luz UV.

Tabla 4.6: Propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los conjugados con sinucleína.

Conjugado	$\lambda_{\max,A}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max,C}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_f	$\Phi_{A \rightarrow C} (\times 10^2)$	$\Phi_{C \rightarrow A} (\times 10^4)$
41	355	466	630	0,048	4,8	0
42	-	475	636	0,041	7,7	0
43	365	440	626	0,052	0,39	0
44	341	447	625	0,023	0,19	0
45	-	450	532	0,025	0,040	1,5

(Figura 4.20). Las curvas de fotoconversión muestran que al irradiar el estado fotoestacionario con luz visible, las integrales de emisión no disminuyen, sino que se mantienen e incluso aumentan. A la vez, los rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_f (Tabla 4.6) son muchísimo menores a aquellos de las sondas libres en solvente orgánico. Esto apunta a un fenómeno parecido al demostrado en la Sección 4.3 con los DHAO modificados con glucosas, donde en solventes con alta fracción molar de agua los Φ_f y $\Phi_{C \rightarrow A}$ disminuían debido a un aumento en la constante de decaimiento no-radiativo k_{nr} del estado excitado del isómero cerrado. Mientras las fotociclación no es afectada (los rendimientos cuánticos son comparables a los del compuesto **40** en acetonitrilo), la fotoreversión y la emisión no compite con el decaimiento no-radiativo.

Para los conjugados **44** y **45** los espectros de absorción y emisión se observan en la Figura 4.21. Las longitudes de onda de absorción (Tabla 4.6) de estos conjugados coinciden aproximadamente con aquellas del DHAO **37** en acetonitrilo, y mientras la emisión de **45** es parecida a la del DHAO libre, la emisión de **44** está desplazada casi 100 nm hacia el rojo. Este hecho fue inesperado ya que esta sonda no es solvatocrómica, por lo cual un cambio en la polaridad del entorno no puede explicar el desplazamiento. La curva de emisión de ambos conjugados parece estar compuesta por tres bandas, que cambian en intensidad relativa en los dos conjugados. Este cambio en la emisión se puede deber a la interacción del grupo ácido libre del conjugado **44** con los residuos básicos de la proteína. Al donar su protón en su carácter

**Figura 4.20:** Curvas de área de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luego visible (abrir) para los conjugados **41** (A), **42** (B) y **43** (C).

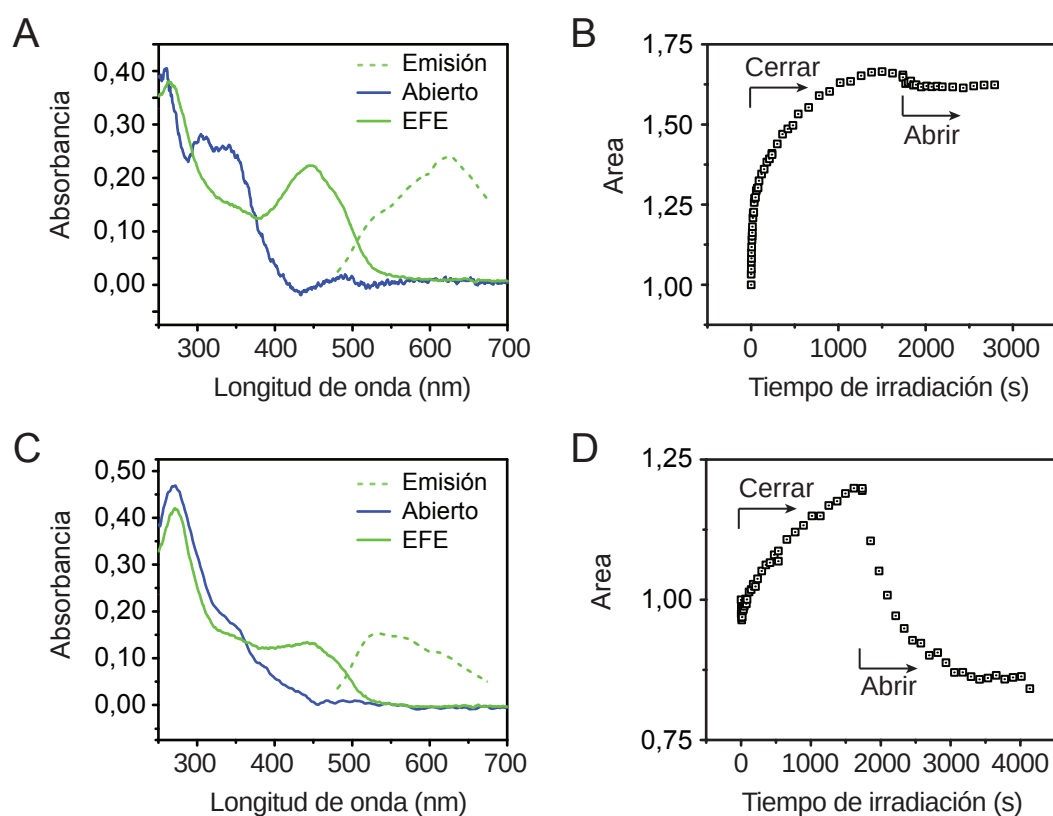


Figura 4.21: Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) de los conjugados **44** (A) y **45** (C) antes (azul) y después (verde) de irradiación con luz UV. Curvas de área de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luego visible (abrir) para los conjugados **44** (B), **45** (D).

ácido, la carga negativa del grupo carboxilo resuena entre los dos enlaces C-O generando una densidad electrónica negativa sobre este extremo del DHAO, impactando la estabilidad relativa de los modos vibracionales del estado excitado del isómero cerrado.

Los rendimientos cuánticos de fotociclación de ambos conjugados **44** y **45** son 2 y 3 órdenes de magnitud menores al $\Phi_{A \rightarrow C}$ del DHAO **37** libre en acetonitrilo, lo cual es de esperar ya que en altas fracciones molares de agua disminuía $\Phi_{A \rightarrow C}$ para los DHAO controles (Sección 4.1). Aunque sea con menor rendimiento, los conjugados fotociclaron en tiempos manejables; pero la fotoreversión no fue posible para el conjugado **44**, al igual que para todos los conjugados con el DHAO solvatocrómico. Sí parece, sin embargo, haber una disminución mínima en el área de emisión que se mantiene luego en un valor constante durante la irradiación. Nuevamente, a pesar de no fotorevertir, tampoco parecería, por el perfil del espectro de absorción, haber llegado al estado fotoestacionario con casi 100% isómero cerrado que se esperaría dada una fotoreversión nula. Esto apunta otra vez a una heterogeneidad en el entorno de los fotocromicos, ya que algunos pueden sufrir fotociclación y otros no. Al estudiar los espectros de emisión del conjugado **44** durante la fotoconversión (Figura 4.22A), se observa que al cerrar el DHAO con luz UV la banda de emisión de mayor longitud de onda aumenta en mayor proporción que la de menor longitud de onda. Al abrir con luz visible, las bandas de menor longitud de onda desaparecen casi por completo, mientras sigue aumentando la intensidad de la banda de mayor longitud de onda. Ya que la banda de mayor longitud de onda probablemente este relacionada con la interacción del grupo ácido con otros residuos, al fotociclar el DHAO este pierde flexibilidad y se acomoda en el entorno aminoacídico, definiéndose las interacciones con los residuos para esta nueva configuración. Luego, al intentar fotorevertir el compuesto, este se termina de acomodar en su entorno, y no se observan más cambios en los espectros de absorción o emisión con irradiaciones subsecuentes.

El conjugado **45**, al contrario, sí presenta una fotoreversión (Figura 4.21D) con un $\Phi_{C \rightarrow A}$

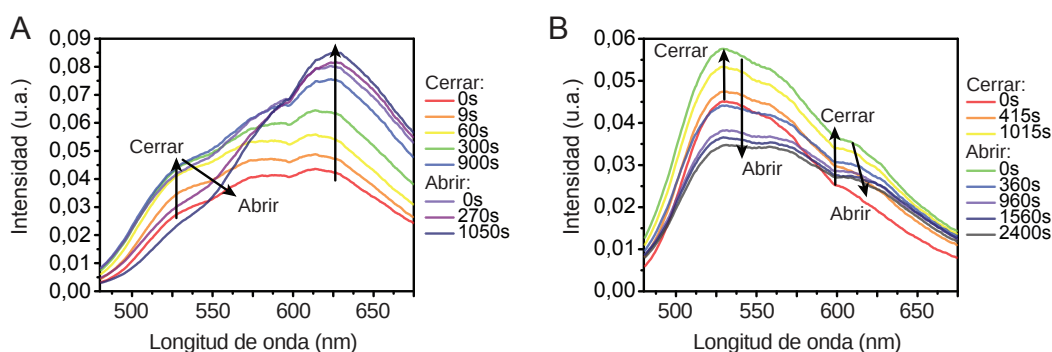


Figura 4.22: Espectros de emisión de los conjugados **44** (A) y **45** (B) durante un ciclo de irradiación con luz UV y luego visible.

solamente un orden de magnitud menor al del DHAO libre en solvente orgánico (Tabla 4.6). Para asegurar que el conjugado era capaz de fotociclar entre los isómeros abiertos y cerrados, se repitieron las irradiaciones con UV y visible, y los fotociclos se pueden apreciar en la Figura 4.23. A pesar de una disminución en la absorbancia, indicando un grado de fotodegradación apreciable, no se observan grandes cambios en la emisión después de algunos ciclos. Al igual que el conjugado **44**, el perfil de la emisión de este conjugado cambia luego de un ciclo de fotoconversión (Figura 4.22B). Sin embargo, aunque la intensidad relativa de la banda de mayor longitud de onda aumenta mínimamente respecto a la de menor longitud de onda, el efecto no es tan dramático como para el conjugado **44**, y en este caso es posible realizar más fotociclos luego del primero, y el perfil de emisión no varía durante estos. El DHAO di-funcionalizado no tiene grupos ácidos libres que son susceptibles a interacciones con residuos próximos, lo cual explica el menor cambio en el perfil de emisión. Adicionalmente, es posible que la fotoreversión factible de este conjugado se deba o bien a un entorno más amigable para el DHAO al estar rodeado de dos cadenas protéicas, o bien a que el hecho de actuar como una bisagra entra las dos cadenas de α -sinucleína favorezca el camino de fotoreversión ya que el isómero abierto es más flexible. En este sentido, el rendimiento de fotociclación es un orden menor al del conjugado **44**, indicando menor preferencia por la ciclación al excitar al isómero abierto, posiblemente por la mayor flexibilidad de este.

En términos de la efectividad de la conjugación a α -sinucleína para la solubilización y conservación de las propiedades fotoquímicas de los DHAOs se pueden derivar algunas conclusiones de estos ensayos. A pesar de que efectivamente se solubilizaron los fotocrómicos en agua, los mismos perdieron sus propiedades emisoras de fluorescencia al disminuir los rendimientos cuánticos a menos de 5%. Además, una vez activados con luz UV no se pueden fotorevertir, excepto en el caso de un dímero donde el DHAO actúe de bisagra. En el Capítulo 6 se describen los experimentos de agregación que se realizaron con la gama de mutantes

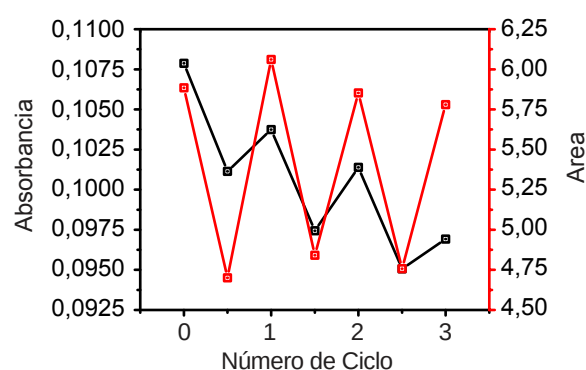


Figura 4.23: Absorbancia máxima y área de emisión del isómero cerrado del conjugado **45** durante ciclos de irradiación con luz visible y UV.

conjugados a DHAO, y fin de estudiar la agregación misma de la α -sinucleína y de evaluar si la formación de agregados extendidos afecta la capacidad de fotoconversión de los fotocromicos en agua.

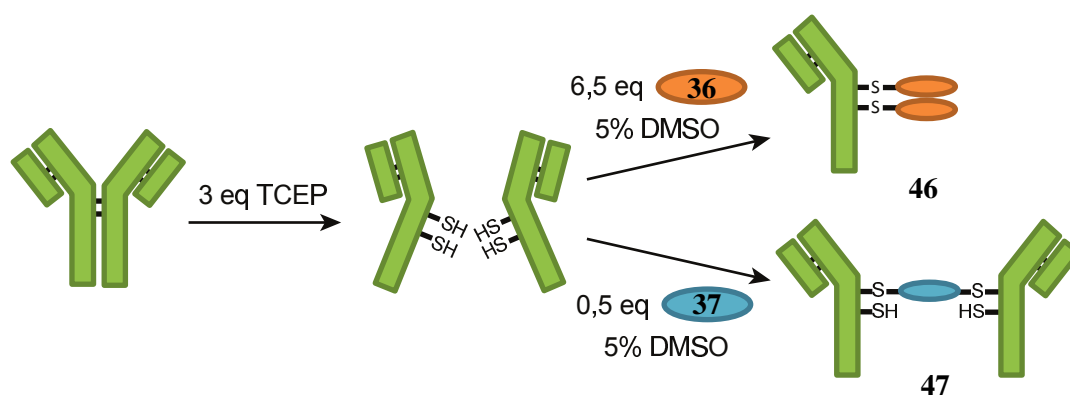
Anticuerpo secundario

Las inmunoglobulinas son proteínas voluminosas utilizadas por el sistema inmune para el reconocimiento de antígenos. Están compuestos de dos cadenas pesadas y dos livianas, unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos regiones de reconocimiento de epítomos en los dos extremos de la estructura con forma de Y. La inmunohistoquímica se basa en la utilización de anticuerpos marcados con sustancias coloridas o fluorescentes para teñir estructuras específicas dentro de la célula,¹³³ gracias a la especificidad y afinidad de los anticuerpos para una enorme variedad de epítomos. Si se usan fluoróforos para marcar el anticuerpo,¹³⁴ la muestra biológica se puede observar luego en un microscopio de fluorescencia. Los anticuerpos primarios unen antígenos directamente, mientras que los anticuerpos secundarios unen anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios se utilizan ampliamente en la inmunoquímica debido a que se pueden detectar diversos antígenos (unidos a anticuerpos primarios) con un mismo anticuerpo marcado fluorescentemente.

Se utilizó un anticuerpo secundario IgG Cabra-anti-Conejo (AB) como ejemplo de una proteína de gran tamaño y de estructura definida. En particular se redujeron los puentes disulfuros que unían las cadenas pesadas del AB y se conjugaron los compuestos **36** y **37** a los sulfhidrilos libres. Los ABs marcados sirvieron posteriormente para teñir células marcadas con anticuerpos primarios de Conejo para obtener imágenes bajo el microscopio, lo cual se detalla en el Capítulo 6.

La región bisagra del AB une a las dos cadenas pesadas del mismo a través de puentes disulfuro. Las cisteínas involucradas son buenos blancos para la marcación del AB ya que se encuentran lejos de la región que reconoce el epítomo del antígeno. Se desarrolló un protocolo para la marcación específica de estas cisteínas, reduciendo únicamente los puentes disulfuro de la región bisagra del AB, basado en protocolos de la literatura.^{135;136} El DHAO **36** se reaccionó en exceso con el AB con tal de marcar múltiples cisteínas con el fotocromico (Esquema 4.10). En el caso del DHAO **37** se utilizaron solamente 0,5 equivalentes para favorecer la doble conjugación, y posible formación de un puente fotocromico entre cisteínas.

Se mezclaron los siguientes reactivos en orden: 118 μ L de una solución de 12 μ M de AB (1 eq) en buffer de fosfato 25 mM; 0,2 μ L de 19 mM TCEP (3 eq); y una solución de 5 mM de cada DHAO en DMSO (volumen adecuado para los equivalentes necesarios), diluido previamente en 6 μ L DMSO, y agregado en alícuotas de 2 μ L cada 15 minutos. Las mezclas



Esquema 4.10: Procedimiento de marcación de AB con **36** y **37**.

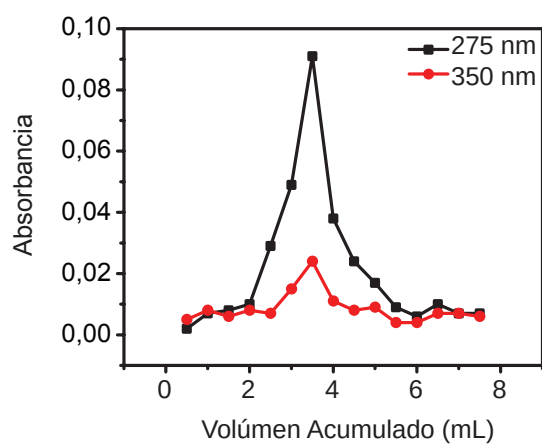


Figura 4.24: Cromatograma de elución del conjugado de AB:36.

finales contenían 5% DMSO en buffer y no presentaban turbidez. Se incubaron a 37°C durante 2 horas luego de la última adición de DHAO, agitando a 300 rpm. Luego se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño y el cromatograma para el conjugado **36**:AB (conjugado **46**) se puede observar en la Figura 4.24, donde la absorbancia se midió nuevamente a 275 nm para detectar la proteína y a 350 nm para el DHAO. La relación de ϵ a 275 nm y 350 nm para los ABs marcados es de aproximadamente $250.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente, para una marcación 1:1. Se pueden calcular los equivalentes de DHAO por AB usando la relación de absorbancias del cromatograma:

$$\frac{A^{350}/\epsilon_{DHAO}}{A^{275}/\epsilon_{AB}} = \frac{C_{DHAO}}{C_{AB}} = \text{Equivalentes de DHAO} \quad (4.5)$$

De esta relación se obtuvo una marcación con 3,66 equivalentes de **36** y 0,35 equivalentes de **37** por AB. Esto significa que al menos 3 cisteínas por AB se marcaron con **36** en el conjugado **46**, mientras que para el conjugado **47** con **37** un 35% de los anticuerpos fueron marcados con 1 molécula de DHAO. Las fracciones correspondientes a proteína marcada fueron unidas para cada conjugado y concentradas por centrifugación.

Se intentó conjugar también los derivados maleimida a nano-cuerpos:¹³⁷ anticuerpos pequeños (12-15 kDa) de un solo dominio, capaces de unir antígenos con tanta especificidad como los anticuerpos más voluminosos. Los nano-cuerpos presentan ventajas importantes debido a su tamaño pequeño que facilita su producción,¹³⁸ y tienen generalmente mayor resistencia a temperatura y detergentes. Desafortunadamente, debido a los distintos requisitos de solubilidad de los DHAOs y los nano-cuerpos, no fue posible realizar la conjugación.

Los espectros de absorción y emisión de las fracciones concentradas de AB marcados se muestran en la Figura 4.25. Se observa en particular para el conjugado **47** una relación mucho mayor de la absorbancia a 275:350 nm, debido a que hay dos anticuerpos por cada molécula de

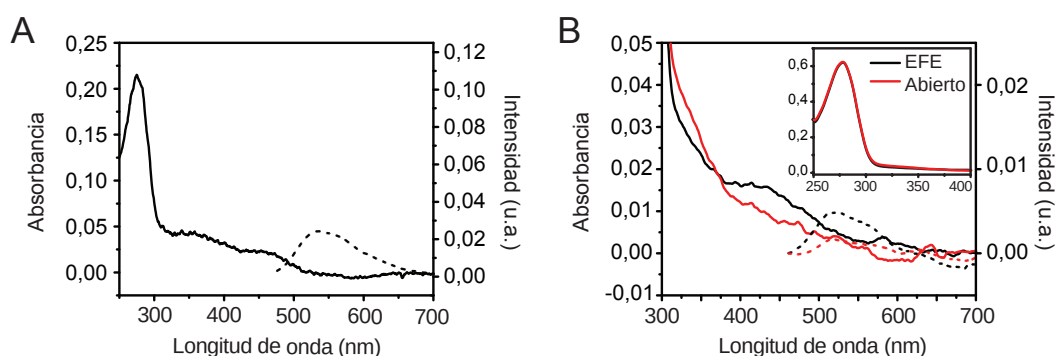


Figura 4.25: Espectros de absorción y emisión de soluciones de **46** (A) y **47** antes (negro) y después (rojo) de irradiación con luz UV.

DHAO puente. Para el conjugado **46** no se muestra el espectro después de irradiación UV ya que este no cambia debido a fotoconversión sino que se fotodegrada, fenómeno que se aprecia claramente en la disminución de la absorbancia del isómero cerrado y de la emisión durante irradiación con luz UV (Figura 4.26A). Resultó sorprendente entonces que el conjugado tipo puente **47** sí presentara fotoconversión tanto para cerrar ($\Phi_{A \rightarrow C} = 2,6 \times 10^{-3}$) como abrir ($\Phi_{C \rightarrow A} = 6,0 \times 10^{-3}$) el DHAO (Figura 4.26B). También se observa fotodegradación en este caso (la intensidad de emisión disminuye luego de aumentar durante irradiación con luz UV) pero hay una clara fotoconversión reversible. En comparación con el DHAO **37** libre en acetonitrilo, $\Phi_{A \rightarrow C}$ es dos ordenes menor, pero $\Phi_{C \rightarrow A}$ es mayor para el conjugado **47**. Nuevamente es probable que la flexibilidad del isómero abierto favorezca la fotoreversión para el conjugado puenteado, y por ende la fotoconversión sea reversible.

En cuanto a la efectividad como técnica de solubilización, a pesar de efectivamente solubilizar los DHAOs, los anticuerpos tienen la misma desventaja que la α -sinucleína: los rendimientos cuánticos de fluorescencia son muy bajos (0,02 para el conjugado **47** en estado fotoestacionario), y la fotoreversión es problemática, excepto si el DHAO forma un puente entre dos estructuras protéicas de mayor tamaño. Interesantemente, no solo la estructura de la proteína, sino también la estructura del ensamblado proteína-DHAO tiene una gran influencia sobre las propiedades del fotocromico.

4.7 Conclusión parcial de solubilización

Al proporcionarle a un dado DHAO solubilidad en agua, se esperaba simultáneamente una conservación de fluorescencia y fotoconversión, especialmente con los derivados con grupos etilo en el carbono reactivo. Se exploraron un amplio rango de técnicas de solubilización,

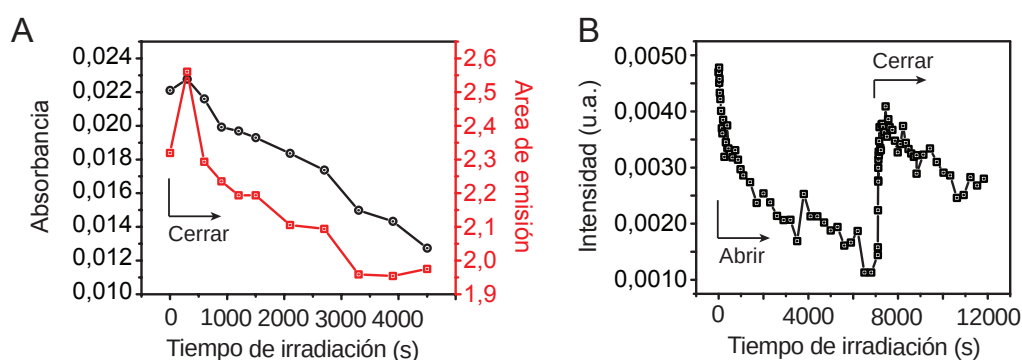


Figura 4.26: Curvas de absorbancia e intensidad de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luz visible (abrir) para los conjugados **46** (A) y **47** (B).

covalentes y no-covalentes. Dentro de las covalentes, modificación con grupos hidrofílicos les infiere una mayor compatibilidad con solventes acuosos a los DHAOs, pero no se compara en capacidad con la conjugación a proteínas. Lamentablemente la solubilización con estas técnicas no fue capaz de conservar la fotoconversión ni los rendimientos cuánticos altos de emisión, a no ser que el fotocromico esté estéricamente desafiado como puente entre dos entidades de tamaño mayor. En cuanto a las técnicas no covalentes, la inclusión en la cavidad de γ -ciclodextrina no resultó en una eficiente solubilización, y la adsorción a BSA no logró conservar la fotoquímica en agua. La única técnica prometedora para la solubilización y conservación de las propiedades de los DHAOs es la inclusión en la cavidad de FABPs. Sin embargo, la labilidad de la inclusión puede ser una limitante para aplicaciones celulares, así como la fotodegradación luego de unos pocos ciclos puede ser una limitante para ciertas técnicas de microscopía de super-resolución.

Se puede concluir que los DHAOs requieren un alto nivel de protección de moléculas de agua para conservar sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas. Un esfuerzo de modelado computacional es necesario para elucidar las interacciones específicas que devienen en este comportamiento. En tanto las aplicaciones en microscopía de fluorescencia, pareciera que las posibilidades están limitadas a métodos donde el entorno del fluoróforo es mayormente hidrofóbico. Es decir, o bien métodos no-acuosos, que excluyen microscopía de células vivas y por ende experimentos de seguimiento en tiempo real de procesos celulares, o bien métodos donde la sonda se incorpora directamente a una organela celular o una membrana. Sin embargo, esto no deprecia de ninguna manera las posibilidades prometedoras en microscopía de células fijadas debido al desempeño excepcional de los DHAOs en solventes orgánicos y materiales poliméricos. La aplicación exitosa de los DHAOs en este tipo de técnicas se describe en el Capítulo 6.

El trabajo realizado en este capítulo se resumió en un manuscrito, que al momento de presentación de esta tesis se encuentra próximo a presentación a una revista de calibre internacional.

Fluoróforo de activación multiple

En la Introducción se describieron los requisitos de un fluoróforo para microscopías de super-resolución: en particular, es necesario tener un control fino sobre la activación y desactivación del mismo. Los diheteroariletenos oxidados (DHAOs) proveen este control, ya que requieren de *un* estímulo lumínico para activar la forma emisora. Inspirados en el concepto de la excitación con múltiples fotones, se idearon estrategias de activación basadas en los DHAOs que requieran *más de un* estímulo para activar la forma emisora. El aumento de resolución de un fluoróforo de estas características sería un producto de la necesidad de múltiples estímulos y de la capacidad de activar y desactivar la emisión. En este Capítulo se detallará el concepto de la activación con múltiples fotones y de los fluoróforos de activación multiple, la síntesis de un fluoróforo básico y la explicación de su complejo desempeño fotoquímico. Se ofrece también una estrategia para mejorar el comportamiento del fluoróforo basada en simulaciones de la fotoquímica del mismo.

5.1 Concepto de excitación con múltiples fotones

5.1.1 Respuesta a múltiples estímulos

Una molécula M que responda a dos o más estímulos (s_i , de naturaleza indefinida) se puede dividir en dos o más partes (P_i), tal que cada una responda a un solo estímulo (Figura 5.1). Para cumplir con el requisito de fluorescencia de la molécula, esta debe contar además con al menos una parte (F) capaz de emitir luz. F no responde *necesariamente* a un estímulo. Con tal de regular la emisión de la parte F y que sean necesarios dos o más estímulos para activar la misma, las partes no-fluorescentes P_i deben interaccionar con F . Esta interacción se puede dar mediante el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) detallada en la Sección 5.1.3, donde F actúa como donador de fluorescencia y P_i como aceptores.

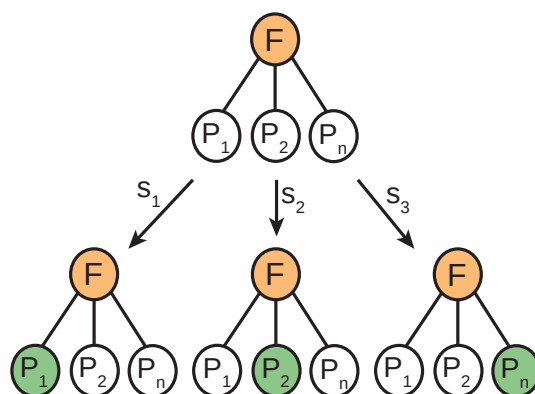


Figura 5.1: Construcción de un fluoróforo que se active con múltiples estímulos.

Los diheteroarilketenos no-oxidados (DHAs) clasifican como moléculas que responden a un estímulo (lumínico) con lo cual constituirían una parte *P*, mientras los DHAOs clasifican simultáneamente como partes *F* y *P*. Combinando los DHAs y DHAOs con otro fluoróforos y moléculas susceptibles a diversos estímulos, se pueden generar un amplio rango de moléculas que respondan a dos o más estímulos. Ejemplos de este tipo de moléculas que contengan o bien un DHA o un DHAO se ven en la Figura 5.2.

Las Figuras 5.2A y B muestran combinaciones de DHA y DHAO con grupos protectores tipo «jaula». Los grupos «jaula» son liberados al estimular los mismos con luz, y se utilizan particularmente en el área de la biología celular, ya que unidos a ciertos componentes celulares pueden inhibir procesos biológicos, que son activados al liberar la «jaula».^{139;140;141} En el caso esquematizado en la Figura 5.2A se requiere una «jaula» que actúe como aceptor de FRET del DHAO una vez activado al isómero cerrado, un rol que ha sido demostrado en la literatura.^{142;143} En el caso de la Figura 5.2B el grupo «jaula» está inhibiendo la fluorescencia de un fluoróforo *F* (esencialmente otro proceso de FRET), y debe ser liberado para que el fluoróforo pueda emitir luz. El DHA debe estar en la forma abierta tal que no exista FRET entre estos dos componentes para observar la fluorescencia.

Las Figuras 5.2C y D muestran ejemplos de DHA combinados con fluoróforos susceptibles a cambios en el pH (por ejemplo flavonas,¹⁴⁴ naftalimidas¹⁴⁵ o complejos organometálicos¹⁴⁶) o carácter redox (por ejemplo cianinas¹⁴⁷ o tetratiafulvalenos¹⁴⁸) del entorno. En estos casos, un estímulo es lumínico (para desactivar el DHA como aceptor de FRET), pero el segundo estímulo es químico, y hay que modificar las condiciones de la solución para activar la fluorescencia. En comparación con los estímulos lumínicos, los estímulos químicos corren la desventaja de no poder localizar precisamente el efecto de los mismos.

El ejemplo en la Figura 5.2E es una combinación de un DHA con un DHAO. Esta combinación requiere de una activación del DHAO para formar el isómero fluorescente cerrado, y una

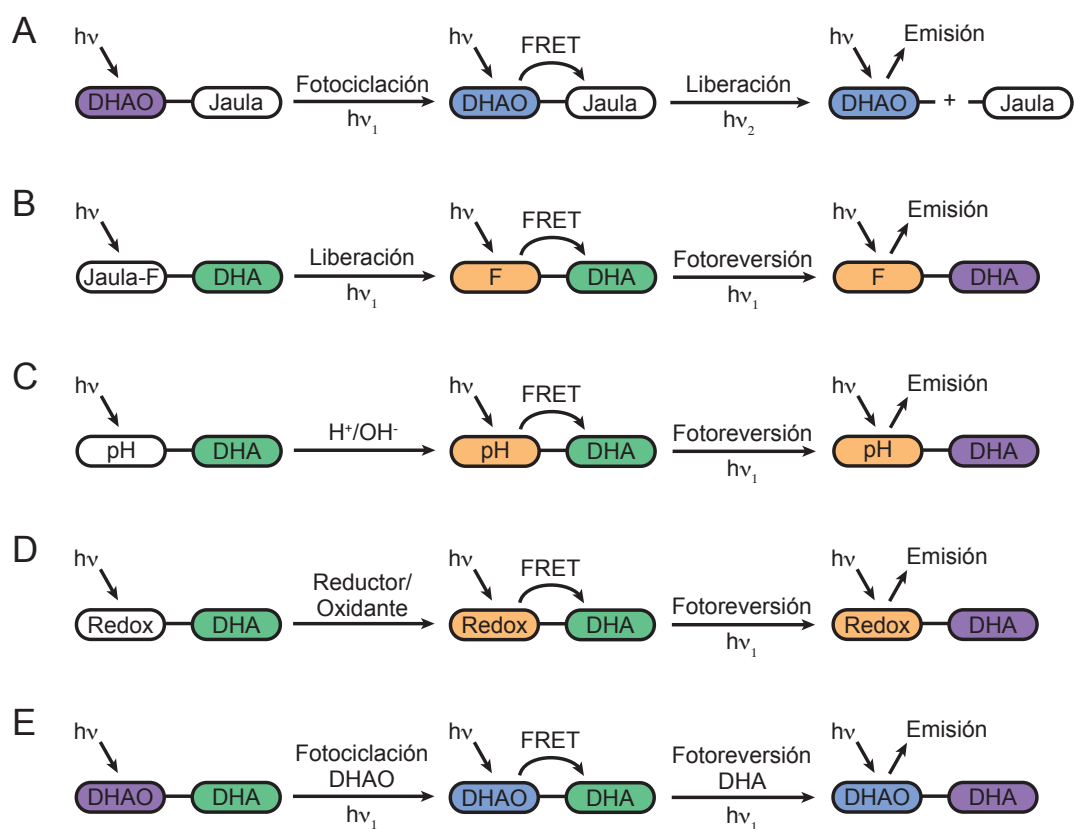


Figura 5.2: Ejemplos de moléculas con múltiple activación: DHAO-jaula (A), jaula-DHA (B), DHA-fluoróforo pH dependiente (C), DHA-fluoróforo redox dependiente (D), DHAO-DHA (E). Izquierda: estados iniciales, centro: múltiples activaciones, derecha: estados fluorescentes.

desactivación del DHA para evitar FRET entre el fluoróforo y el DHA cerrado (pc-FRET, del inglés photochromic-FRET¹⁴⁹). Se requieren nuevamente dos estímulos lumínicos como en el ejemplo de los compuestos «jaula», pero en este caso la activación sería reversible, ya que se puede fotorevertir el isómero cerrado del DHAO para desactivar la emisión. En principio serían suficientes dos fotones para activar el complejo una vez en el estado inicial de la Figura 5.2E, y ambos fotones deberían incidir sobre la misma molécula: un concepto similar al que se aprovecha para aumentar la resolución en la microscopía de dos (o más) fotones.

5.1.2 Aumento teórico de la resolución

La microscopía de dos fotones, demostrada por primera vez en 1990 por Denk *et al.*,¹⁵⁰ es una técnica de microscopía de escaneo con laser que usa excitación no-lineal para excitar la fluorescencia de una muestra en un plano. El fenómeno de excitación por dos (y múltiples) fotones se describió en 1931 por Göppert-Mayer,¹⁵¹ donde se demostró que dos fotones de energías menores podían causar una excitación idéntica a aquella producida por un fotón de mayor energía. Los procesos de decaimiento del estado excitado luego de la excitación por dos fotones son idénticos a aquellos luego de una excitación “normal” con un solo fotón, con lo cual si la molécula es fluorescente, va a emitir un fotón de fluorescencia independiente del tipo de excitación.¹⁵²

Para que se produzca una excitación equivalente a una excitación con un fotón de con mayor energía, los fotones de menor energía deben interaccionar cuasi-simultáneamente con la molécula, en un tiempo alrededor de 10^{-16} segundos.¹⁵² Para excitar eficientemente se utiliza normalmente un laser de femtosegundos, con tal de aumentar la probabilidad de interacción de una molécula con múltiples fotones simultáneamente. En el caso de excitación con dos fotones la fluorescencia aumenta con el promedio de la intensidad al cuadrado, no linealmente con la intensidad como en la excitación con un solo fotón; procesos de excitación bifotónicos se denominan no-lineales gracias a esta dependencia cuadrática. Fuera del foco, la probabilidad de absorción de dos fotones es mínima debido a la baja intensidad, lo cual disminuye particularmente en el eje *z* el tamaño del volumen focal. El formalismo que describe el fenómeno de excitación por múltiples fotones, su eficiencia y la resolución lograda en los ejes *x*, *y* y *z* está basado en el hecho que los fotones deben interaccionar con la molécula simultáneamente.^{150;152} Así, el número de fotones absorbidos por fluoróforo depende de la duración y la frecuencia de pulsos del laser, y la sección transversal de absorción de dos fotones de la molécula.

Este fenómeno es particularmente interesante para la microscopía celular, ya que una abundante cantidad de fluoróforos se excitan eficientemente en el UV, y la excitación a

longitudes de onda bajas es perjudicial para las células. Utilizando excitación de dos o más fotones, el fluoróforo se puede excitar con longitudes de onda mayores, en el visible o el infrarrojo cercano, evitando el daño de las células.^{153;154;155} Adicionalmente, longitudes de onda en el rango 650-950 nm penetran los tejidos biológicos hasta mayores profundidades, debido a que son absorbidas en menor proporción por el agua y se dispersan menos que ondas de menor longitud.¹⁵⁴ En combinación con la dependencia cuadrática de la emisión con la intensidad de excitación y la naturaleza pulsada de la excitación, la microscopía de dos fotones permite realizar secciones ópticas profundas de muestras gruesas con menor fotodegradación de los fluoróforos y con una resolución en z mayor a la microscopía confocal.

En el concepto de activación múltiple de los derivados dobles DHA-DHAO (Figura 5.2E) no es necesaria la coincidencia temporal de los fotones, sino solamente la coincidencia espacial. La determinación del aumento de la resolución se calcula entonces de manera distinta que en la excitación con dos fotones, aunque el efecto es parecido: la fluorescencia depende del producto de las probabilidades de varias activaciones, y la precisión de activación aumenta en comparación con una simple activación.

Volúmen efectivo de activación

La distribución de emisión $F(x)$ para una muestra de fluoróforos fotoactivables es dada por el producto de la distribución espacial de los fluoróforos $S(x)$, la probabilidad de excitación de un fluoróforo $A[I_{act}(x)]$ y la probabilidad de activación de un fluoróforo $E[I_{exc}(x)]$ (Ecuación 5.1), como describe en la Información Suplementaria de Li *et al.*¹⁵⁶ en una publicación reciente:

$$F(x) = S(x) \cdot A[I_{act}(x)] \cdot E[I_{exc}(x)] \quad (5.1)$$

donde $I_{act}(x)$ y $I_{exc}(x)$ son las distribuciones de intensidades de activación y excitación respectivamente, y los factores A y E representan las probabilidades de absorción y emisión de un fluoróforo. En un sistema con n múltiples activaciones, la Ecuación 5.1 se puede escribir como:

$$F(x) = S(x) \cdot A[I_{act}^{resultante}(x)] \cdot E[I_{exc}(x)] \quad (5.2)$$

donde la probabilidad de activación resultante de múltiples activaciones $A[I_{act}^{resultante}(x)]$ es dada por el producto de las probabilidades individuales de cada activación necesaria:

$$A[I_{act}^{resultante}(x)] = A_1[I_{act}^1(x)] \cdot A_2[I_{act}^2(x)] \cdots A_n[I_{act}^n(x)] \quad (5.3)$$

Las distribuciones de intensidad $I_{act}(x)$ equivalen a las funciones de dispersión de punto (PSF, del inglés) de activación, que dependen del arreglo óptico del microscopio, la naturaleza de la

muestra y la longitud de onda de activación. De esta manera, la PSF de activación resultante de n activaciones es dada por el producto de las PSF individuales:

$$PSF_{resultante} = PSF_1 \cdot PSF_2 \cdots PSF_n \quad (5.4)$$

A medida que aumenta el número de superposiciones espaciales de PSFs de activación necesarias para la emisión, disminuye el tamaño de la PSF resultante. A modo ilustrativo, se calculó una PSF para un arreglo típico de microscopía: NA = 0,95, grosor de coverslip de vidrio = 170 μm , luz polarizada circularmente para eliminar aberraciones y $\lambda = 450 \text{ nm}$,

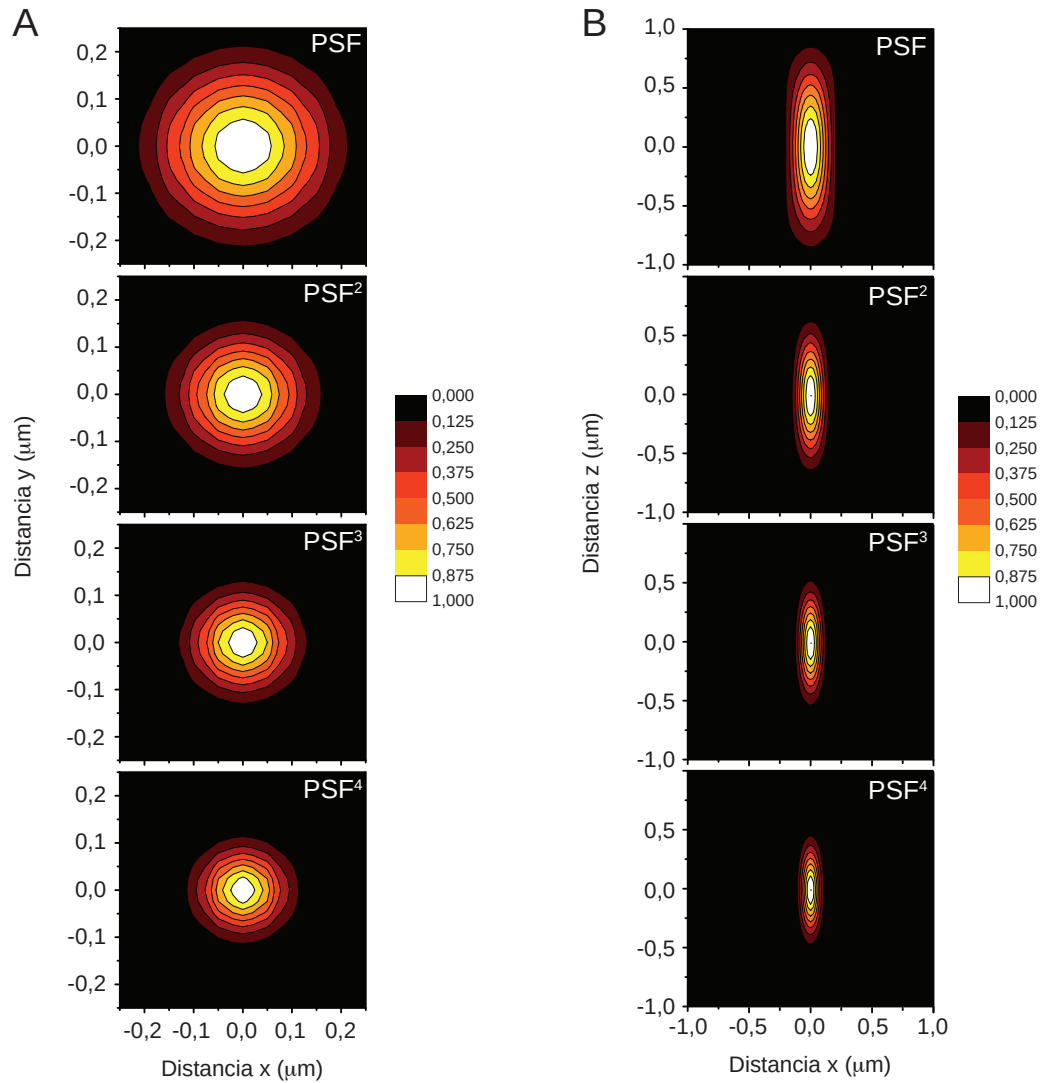


Figura 5.3: Proyecciones de intensidad de PSF a PSF⁴ en los planos xy (A) y xz (B).

utilizando el programa PSF Lab de The One Molecule Group.¹⁵⁷ En la Figura 5.3 se muestran las proyecciones de intensidad en los planos xy y xz de esta PSF, y se pueden comparar con los contornos respectivos de PSFs resultantes de superposiciones de 2, 3 y 4 PSFs idénticas (PSF², PSF³ y PSF⁴). Se puede apreciar que al aumentar el número de activaciones, el tamaño de la PSF de activación resultante disminuye tanto en el plano xy como en el plano xz . La resolución aumenta casi dos veces en todas las direcciones. Aproximando el volumen de activación por un elipsoide, con dimensiones r_x , r_y y r_z iguales a medio ancho a mitad de altura (FWHM) de los PSF calculados en x , y y z , se obtiene que el volumen de activación disminuye sustancialmente desde $0,28 \mu\text{m}^3$ para PSF¹ hasta $0,036 \mu\text{m}^3$ para PSF⁴. En términos prácticos, si se supone una muestra marcada con un fluoróforo cada 50 nm, una PSF simple activaría al menos 540 fluoróforos, mientras que una PSF⁴ activaría solamente 68 fluoróforos. La relación entre el volumen de activación resultante y el número de activaciones es exponencial (Figura 5.4): no-lineal, al igual que en la microscopía de dos fotones. Con cuatro activaciones, se obtendría una reducción de casi un orden de magnitud en el volumen de activación y el número total de fluoróforos activados, y un aumento de dos en la frecuencia espacial resoluble. Principalmente, utilizando múltiples activaciones se consigue aumentar la resolución en la dirección axial, a diferencia de muchas técnicas de super-resolución que únicamente mejoran la resolución en el plano xy .

5.1.3 Transferencia de energía de resonancia de Förster

La transferencia de energía por resonancia de Förster¹⁵⁸ (FRET, del inglés) es un fenómeno fotofísico en el cual una molécula D en su estado excitado le transfiere energía no-radiativamente a otra molécula A. La transferencia de energía surge del acoplamiento

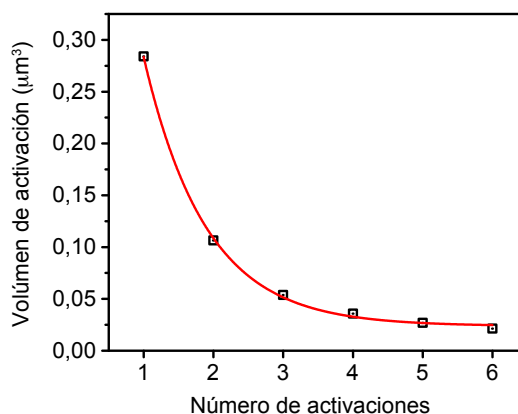


Figura 5.4: Volumen de activación vs. número de activaciones para una PSF a 450 nm (negro) y fiteo exponencial (rojo).

dipolo-dipolo entre las dos moléculas. La eficiencia de FRET depende de la distancia entre D y A a la sexta potencia:

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (5.5)$$

donde r es la distancia entre D y A y R_0 es la distancia de Förster para el par D-A; es decir la distancia a la cual la eficiencia de transferencia de energía es del 50%. R_0 se calcula como:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \Phi_D^0}{128 \pi^5 N_A \eta^4} J \quad (5.6)$$

donde κ^2 es el factor de orientación relativa de los dipolos de D y A, Φ_D^0 es el rendimiento cuántico de fluorescencia de D en ausencia de A, N_A es el número de Avogadro y η es el índice de refracción del medio. J es la integral de solapamiento espectral (emisión de D y absorción de A) y se calcula como:

$$J = \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5.7)$$

donde $I_D(\lambda)$ es el espectro de emisión de D normalizado (tal que $\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda = 1$) y $\epsilon_A(\lambda)$ es el coeficiente de absortividad molar de A. J representa el grado de superposición que presentan los espectros de emisión de D y de absorción de A. El factor de orientación κ^2 se calcula como:

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (5.8)$$

donde θ_A y θ_D son los ángulos de los momentos de transición de absorción de A y de emisión de D respecto al vector de separación A-D, respectivamente, y θ_{DA} es la diferencia entre estos ángulos. Se toma un valor de $\kappa^2 = 2/3$ para moléculas pequeñas en solución en el caso de que sus tiempos de correlación rotacional sean más cortos que los tiempos involucrados en la desactivación del estado excitado de D y la rotación sea isotrópica.

Se pueden extraer varias conclusiones acerca de los requerimientos del sistema D-A de este desarrollo teórico. En la Figura 5.5 se observa que si r es mucho menor que R_0 , entonces $E_{FRET} = 1$. A distancias muy cortas, se produce directamente un solapamiento de orbitales entre D y A, y la transferencia de energía ya no es por resonancia de Förster, sino que ocurre la transferencia de electrones descrita por Dexter. Por el contrario, si r es mucho mayor que R_0 , entonces la E_{FRET} se acerca a 0. El primer requerimiento para el fenómeno de FRET es entonces que r debe ser entre $R_0/2$ y $2R_0$ nm aproximadamente.

El parámetro J define el segundo requerimiento de FRET: debe existir una buena superposición de los espectros de emisión de D y de absorción de A, para que el valor de J y por ende E_{FRET} sean grandes. Por último, es necesario que Φ_D^0 sea alto, tal que por cada evento de excitación haya altas probabilidades de que FRET pueda competir con los otros procesos de desactivación del estado excitado.

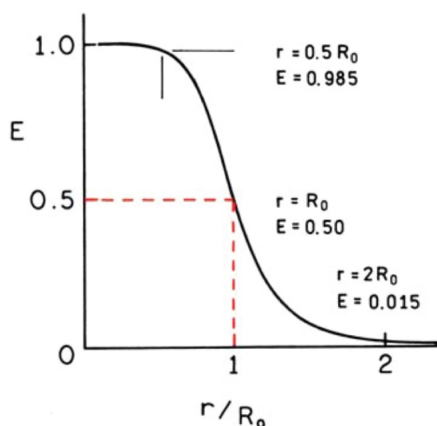


Figura 5.5: Eficiencia de FRET vs. r/R_0 . Reimpreso con permiso de Albrecht *et al.*¹⁵⁹ Copyright 2016 Springer-Verlag.

Experimentalmente, se puede comprobar la existencia de FRET verificando: la disminución de la intensidad de fluorescencia de D; el aumento de la intensidad de fluorescencia de A al excitar D, si A es también fluorescente; y la disminución del tiempo de vida media de fluorescencia de D.

5.1.4 Diseño del DHA-DHAO

En la Sección 5.1.1 se describió la conformación de un compuesto DHA-DHAO, con dos componentes que responden a estímulos lumínicos y que deben interactuar mediante FRET. La eficiencia de FRET será apreciable únicamente si la banda de absorción del aceptor se solapa con la banda de emisión del donador (ver Sección 5.1.3). El DHAO fluorescente en este caso es el donador y el DHA no-fluorescente es el aceptor. El espectro típico de emisión de un DHAO en el estado fotoestacionario (EFE) coincide aproximadamente con el espectro típico de absorción del DHA en EFE, como se puede apreciar en la Figura 5.6, aunque el grado de solapamiento dependerá de la naturaleza de los sustituyentes de cada componente. Dados los resultados del Capítulo 2, para evitar un gran corrimiento en las bandas de absorción y emisión de ambos DHA y DHAO es necesario evitar el uso de sustituyentes con un gran carácter dador o donador de electrones.

El compuesto DHA-DHAO tendrá cuatro estados de isomerización posibles: A-A, A-C, C-A y C-C, donde A es abierto y C es cerrado, la primera letra corresponde al DHA y la segunda al DHAO (Esquema 5.1). El isómero C del DHA es el aceptor, y el isómero C del DHAO es el dador. Por ende, las especies A-A, C-A son oscuras por falta del isómero C del DHAO, la especie C-C es oscura gracias a FRET entre las dos especies, y la especie A-C

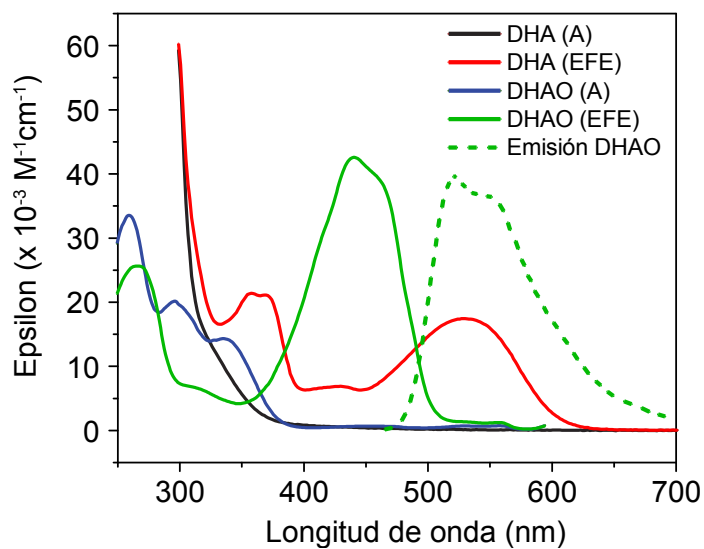
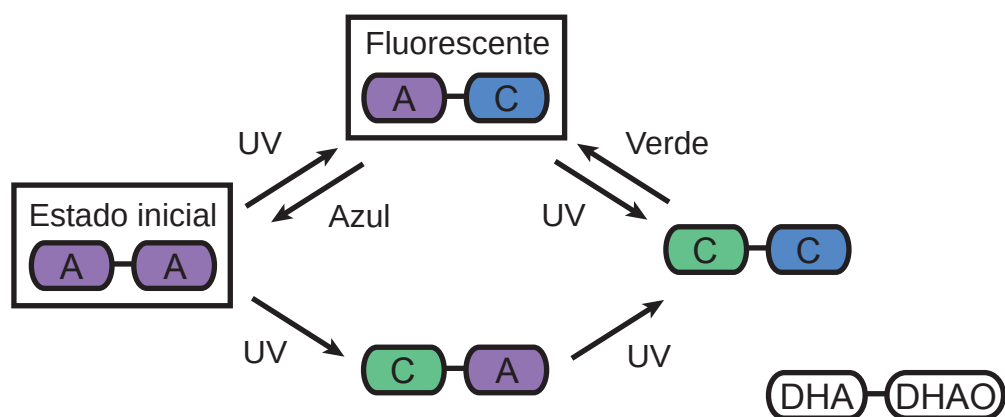


Figura 5.6: Espectros de absorción de DHA abierto (A, negro) y en EFE (rojo) y DHAO abierto (A, azul) y en EFE (verde), y espectro de emisión de DHAO cerrado (verde, línea punteada).



Esquema 5.1: Isómeros del compuesto DHA-DHAO, y las irradiaciones necesarias para llevarlos al estado fluorescente.

es fluorescente. Para llegar al estado fluorescente desde el estado inicial A-A se requiere de luz UV para la fotociclación de ambos DHA y DHAO (en principio en cualquier orden) y luego la fotoreversión del DHA con luz verde. De esta manera, la secuencia de irradiación de una muestra de DHA-DHAO para su activación sería con UV y luego verde: en efecto, tres activaciones por molécula (dos fotones UV y uno verde), cumpliendo con los requisitos de activación por múltiples fotones. En la siguiente Sección se detallará la estructura del DHA-DHAO diseñado y su síntesis.

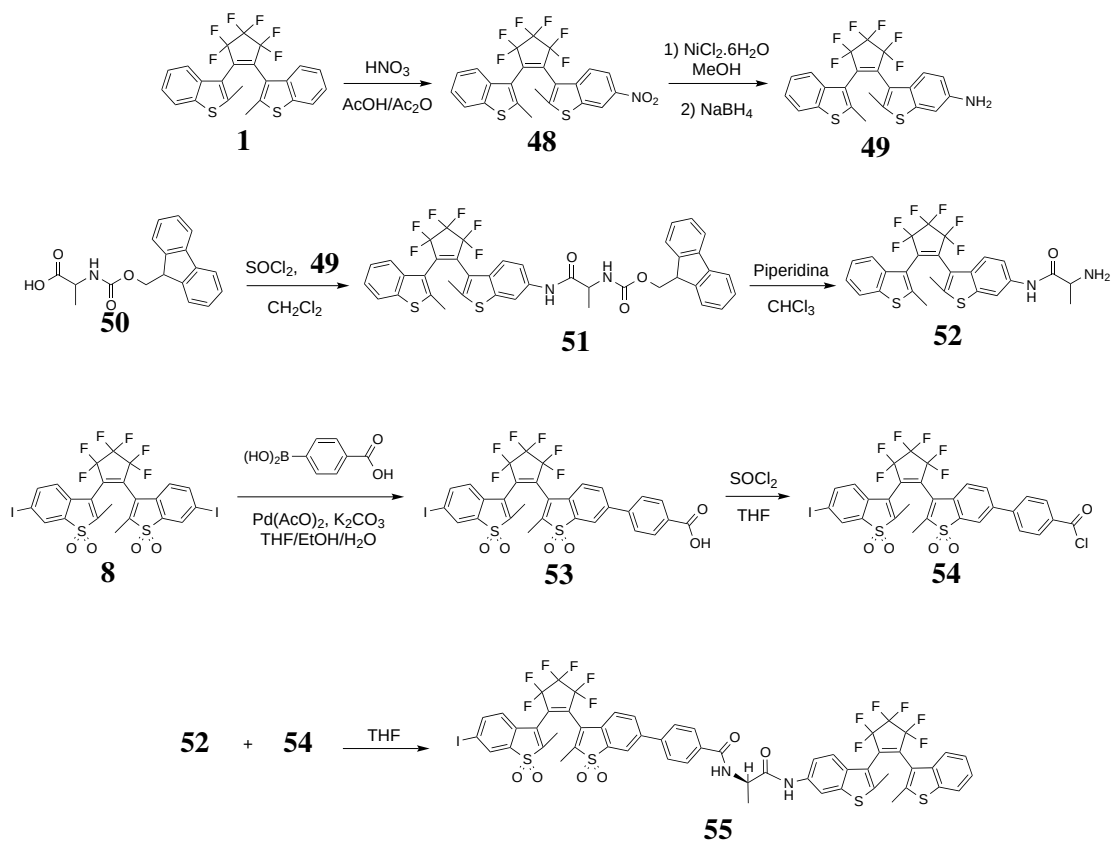
5.2 Síntesis y caracterización de DHA-DHAO

5.2.1 Síntesis

La estructura del fluoróforo combinado DHA-DHAO se diseñó con tal de aprovechar rutas sintéticas previamente establecidas⁴¹ e incorporar grupos funcionales que no modificaran sustancialmente las propiedades espectroscópicas de los fotocromicos (Capítulo 2). Las rutas sintéticas correspondientes al DHAO, el DHA y el ensamblado de DHA-DHAO se pueden apreciar en el Esquema 5.2. En el caso del DHA, se incorporó una amina como grupo funcional en la posición 6 del heteroarilo (**49**) mediante una nitración en condiciones fuertemente ácidas⁴¹ y una posterior reducción con borhidruro de sodio del precursor **1**. La anilina se reaccionó luego con una alanina NH₂-protegida (**50**) que sirve como espaciador entre el DHA y el DHAO. El grupo protector carbamato fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) se liberó en presencia de piperidina produciendo la amina primaria libre **52**.⁴¹ Esta reaccionó luego con el cloruro de acilo **54**, producto de la activación del derivado ácido **53** sintetizado mediante una Suzuki, para formar el fluoróforo combinado DHA-DHAO **55**.

5.2.2 Resultados espectroscópicos

Una solución de aproximadamente 0,5 μ M del DHA-DHAO **55** en AcOEt, en el estado A-A (Figura 5.7, espectro verde oscuro), se expuso a irradiación UV hasta llegar al EFE-UV (estado fotoestacionario en presencia de luz UV, Figura 5.7, espectro verde claro). El espectro teórico del estado A-A (Figura 5.7, espectro rojo), compuesto por la suma de los espectros de absorción de los isómeros abiertos del DHA **52** y del DHAO **11** (sustituyentes amida, ver Capítulo 2) se aproxima al experimental, aunque este está desplazado hacia el rojo. Sin embargo, el espectro teórico del estado C-C (Figura 5.7, espectro naranja) dista del espectro del EFE-UV experimental. Esto significa que el EFE-UV no contiene, como uno intuiría, mayormente el estado C-C, sino una mezcla más homogénea de todos los isómeros.



Esquema 5.2: Síntesis del DHA-DHAO 55.

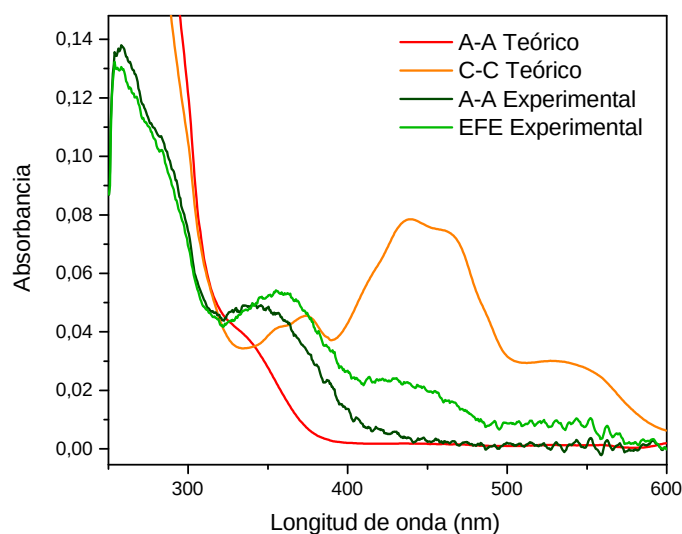


Figura 5.7: Espectros de absorción del DHA-DHAO **55** teóricos del estado A-A (rojo) y C-C (naranja), y experimentales del estado A-A (verde oscuro) y el estado fotoestacionario (verde claro).

En la Figura 5.8 se observan los espectros de absorción y emisión de la misma solución de **55** durante irradiaciones con luz UV (340 ± 20 nm, 2 mW), azul (445 ± 20 nm, 41 mW) y verde (530 ± 10 nm, 46 mW), y los máximos de absorbancia y área de emisión se grafican en la Figura 5.9. Los espectros de absorción están compuestos por tres bandas con máximos alrededor de: 350 nm, correspondiente a la suma de los componentes de ambos isómeros del DHA y el DHAO en el UV; 440 nm, correspondiente al isómero cerrado del DHAO; y 520 nm, correspondiente al isómero cerrado del DHA.

Todos los isómeros posibles de **55** absorben en el UV, con lo cual en el EFE-UV se llega a un equilibrio entre todas estas especies (Figura 5.8A). Se ve claramente la formación del isómero C del DHA por la aparición de una banda de absorción en 520 nm, y del isómero C del DHAO por la aparición de una banda a 450 nm (Figura 5.9A). Además, se observa la formación del estado fluorescente A-C de **55** porque la emisión a 520 nm aumenta (Figura 5.9B). Los espectros indican que el EFE-UV probablemente esté compuesto de los estados A-C, C-A y C-C.

Si se irradia luego con luz verde (Figura 5.8B, arriba, y Figura 5.9A), se observa la desaparición de la banda a 520 nm ya que se fotorevierte únicamente el DHA al isómero abierto. Se esperaría, si hubiera una cantidad apreciable del estado C-C en el EFE, que este se convertiría al estado A-C fluorescente (Figura 5.1), y que la emisión aumentaría. Pero el espectro de emisión permanece aproximadamente igual, lo que parecería indicar que de hecho no hay una

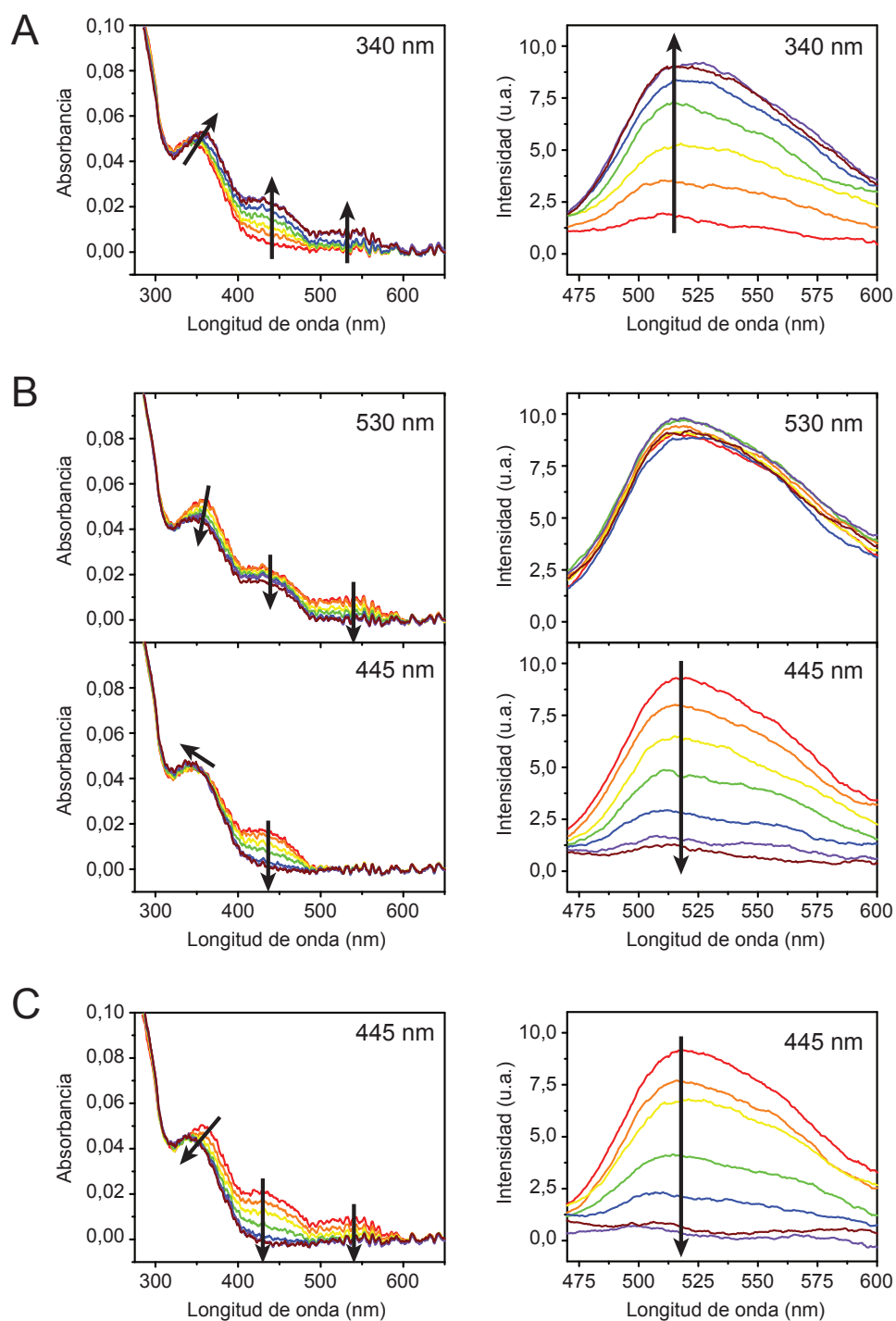


Figura 5.8: Espectros de absorción y emisión del DHA-DHAO **55** durante irradiaciones con: (A) luz UV; (B) luz verde y luego azul después del UV inicial; y (C) luz azul después del UV inicial. Las flechas indican la dirección del cambio en las bandas del espectro.

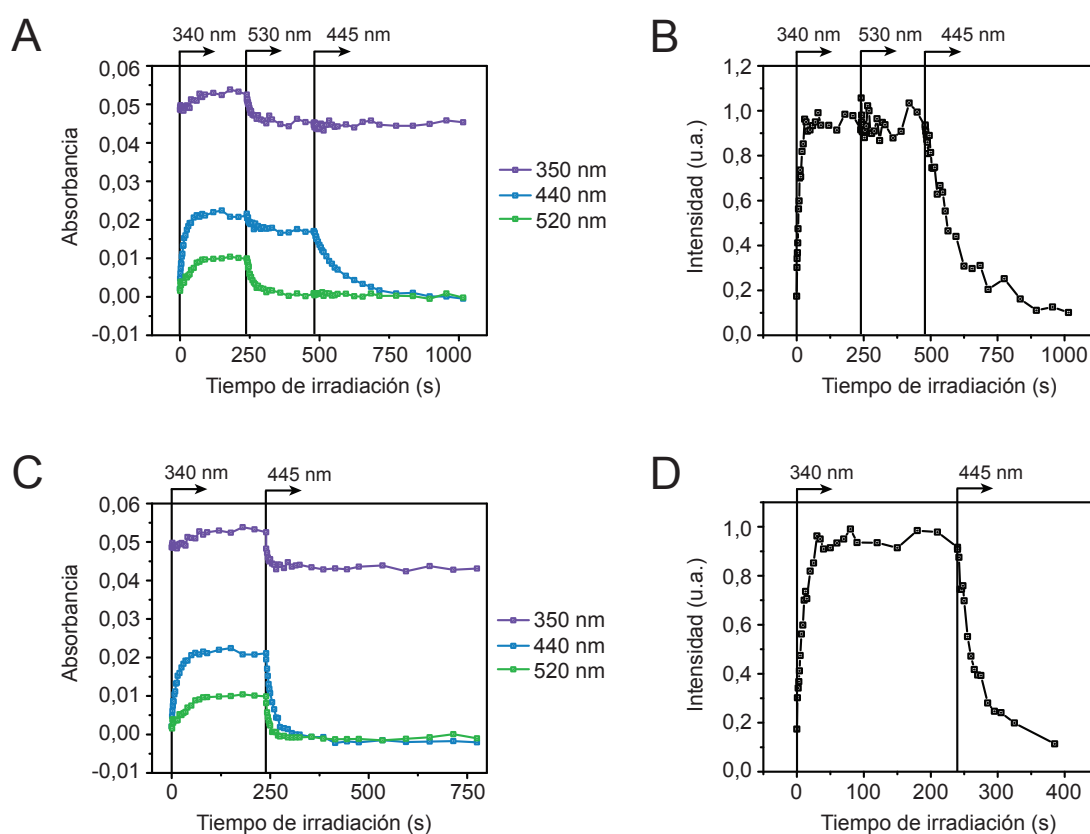


Figura 5.9: Máximos de absorción y emisión del DHA-DHAO **55** durante irradiaciones con: (A,B) luz UV, luz verde y luz azul; y (C,D) luz UV y luz azul. Las flechas indican el comienzo de la irradiación.

gran cantidad de estado C-C en el EFE-UV. Si se irradia luego la misma solución con luz azul (Figura 5.8B, abajo) desaparece la absorción a 450 nm (y la emisión a 520 nm, Figura 5.9B) ya que se fotorevierte el isómero C del DHAO, y se recupera en su totalidad el estado A-A con sus correspondientes espectros de absorción y emisión.

Si, a partir del EFE-UV obtenido en la primera irradiación (Figura 5.8A), se ilumina la solución con luz azul directamente (Figura 5.8C y Figura 5.9C y D), se observa un decaimiento simultáneo de las bandas de absorción a 450 nm y 520 nm, y de la emisión. Al absorber el isómero C del DHAO luz visible, este fluoresce o fotorevierte. Si fluoresce, se puede producir FRET al DHA, el cual va a revertir al isómero abierto. De esta manera todas las reacciones fotoquímicas conducen al estado A-A.

El DHA-DHAO **55** se sintetizó para poner a prueba el concepto del requerimiento de múltiples activaciones para formar el estado fluorescente. Se esperaba la formación de una gran cantidad del estado C-C no-fluorescente luego de la irradiación con luz UV, y luego la formación del estado A-C fluorescente con luz verde. Sin embargo, al llegar al EFE-UV resulta que no hay mayormente estado C-C, sino una mezcla de C-A, A-C y C-C, entonces ninguna secuencia de irradiaciones secuenciales conduce a una activación de la emisión únicamente luego de dos pasos. ¿Qué está pasando durante las irradiaciones?

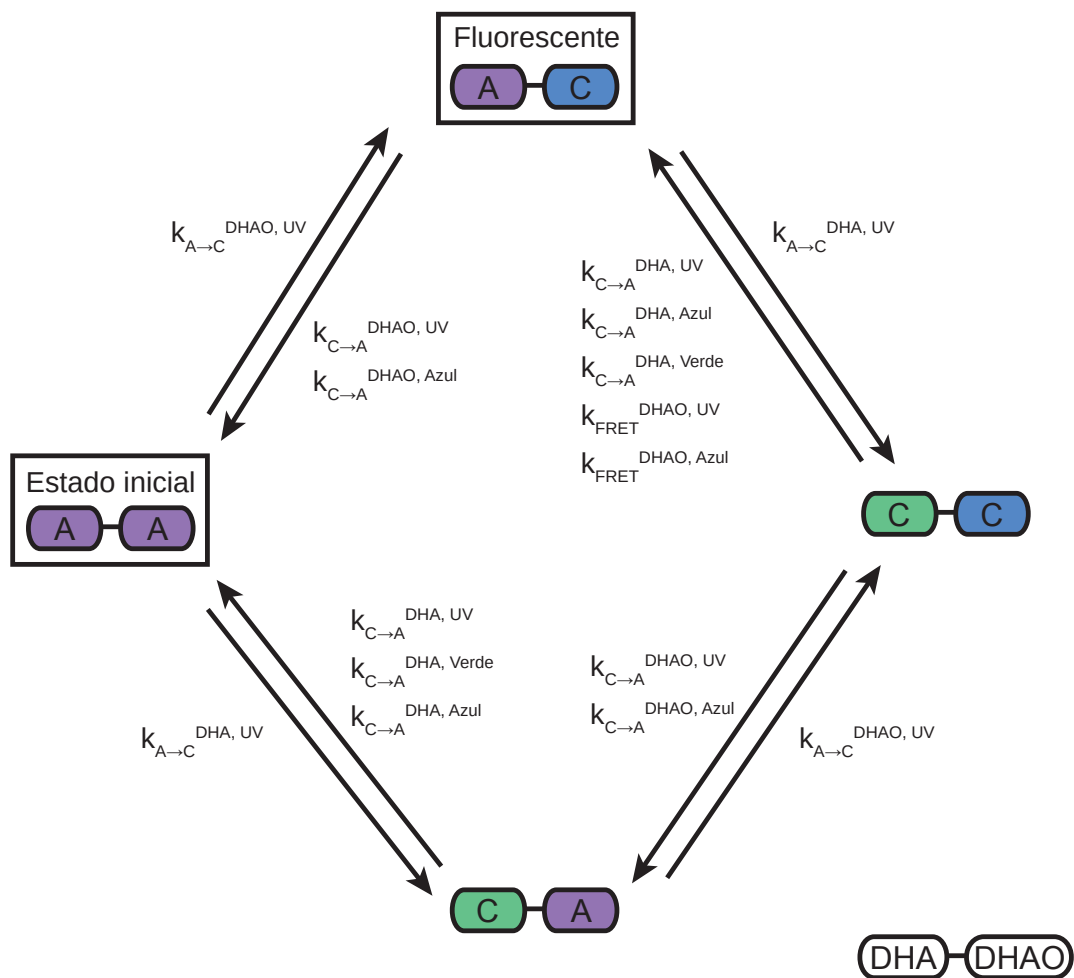
5.3 Simulando el DHA-DHAO

5.3.1 Esquema completo fotoquímico del DHA-DHAO

Para comprender los cambios en los espectros de absorción y emisión observados del DHA-DHAO **55** se volvió al esquema de isómeros del DHA-DHAO y se completó con todas las reacciones fotoquímicas que ocurren al irradiar con luz UV, azul o verde. El diagrama resultante se puede apreciar en el Esquema 5.3. Como se puede apreciar, el esquema es mucho más complejo que el original. Por ejemplo, si se aíslan las constantes cinéticas relacionadas con todos los procesos que ocurren al irradiar la muestra con luz UV, se observa que además de las fotociclaciones de ambos DHA y DHAO, contribuyen las fotoreversiones resultantes de la absorción de parte del UV por los isómeros cerrados ($k_{C \rightarrow A}^{UV}$), y la fotoreversión del DHA resultante del FRET entre DHAO y DHA ($k_{FRET}^{DHAO,UV}$).

5.3.2 Ecuaciones cinéticas

La composición de la muestra en el EFE (bajo irradiación con cualquier longitud de onda) depende de la relación entre todas estas constantes cinéticas y se puede calcular mediante las



Esquema 5.3: Isómeros del compuesto DHA-DHAO y las constantes asociadas con cada uno de los procesos de fotoconversión de DHA o DHAO bajo irradiación con luz UV, azul y verde. 'A→C' indica fotociclación, 'C→A' indica fotoreversión, y 'FRET' indica fotoreversión resultante de FRET.

siguientes ecuaciones cinéticas de cada especie:

$$\frac{d[A-A]}{dt} = -\left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}\right)[A-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde}\right)[C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul}\right)[A-C] \quad (5.9)$$

$$\frac{d[C-A]}{dt} = k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}[A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}\right)[C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul}\right)[C-C] \quad (5.10)$$

$$\frac{d[A-C]}{dt} = k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}[A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}\right)[A-C] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul}\right)[C-C] \quad (5.11)$$

$$\frac{d[C-C]}{dt} = k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}[A-C] + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}[C-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul}\right)[C-C] \quad (5.12)$$

Estas ecuaciones son la clave para entender cuales son los procesos dominantes durante cada irradiación. Para utilizarlas es necesario definir el valor de cada una de las constantes. En la Sección 2.3.1 del Capítulo 2 se vió que las constantes cinéticas se relacionan con los rendimientos cuánticos Φ (por ejemplo para una reacción de fotociclación) mediante:

$$k_{A \rightarrow C} = k_{ex}^A \Phi_{A \rightarrow C} \quad (5.13)$$

La constante de excitación k_{ex}^X (en s^{-1}) se define como:

$$k_{ex}^X = \sigma_{\lambda}^X \Psi_{\lambda} \quad \sigma_{\lambda}^X = \epsilon_{\lambda}^X \frac{10^3 \ln 10}{N_A} \quad \Psi_{\lambda} = 5 \times 10^{15} \lambda I_0 \quad (5.14)$$

donde las unidades de σ_{λ}^X son $cm^2 \text{ molécula}^{-1}$, ϵ_{λ}^X en $M^{-1}cm^{-1}$, Ψ_{λ} en fotones $s^{-1} cm^{-2}$, λ en nm e I_0 en W/cm^2 .¹⁴⁹ En cuanto a las constantes cinéticas de fotoreversión del DHA por FRET desde el DHAO ($k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV}$ y $k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul}$), estas se calculan mediante:

$$k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO} = k_{ex}^{DHAO-C} \Phi_{FRET,C \rightarrow A,DHA} \quad (5.15)$$

donde k_{ex}^{DHAO-C} es la constante de excitación del isómero cerrado del DHAO, y $\Phi_{FRET,C \rightarrow A,DHA}$ es el rendimiento cuántico de formación del isómero abierto de DHA mediante FRET. Este se puede calcular como el producto del rendimiento cuántico de fotoreversión del DHA ($\Phi_{C \rightarrow A}^{DHA}$) y la eficiencia de FRET (E_{FRET} , ver Sección 5.1.3):

$$\Phi_{FRET,C \rightarrow A,DHA} = \Phi_{C \rightarrow A}^{DHA} E_{FRET} \quad (5.16)$$

Utilizando las ecuaciones descritas en la Sección 5.1.3 se calculó la E_{FRET} para esta molécula. $J = 9,9 \times 10^{14} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se calculó con el programa ale de FluorTools; se tomó un valor de $\kappa^2 = 2/3$ para moléculas con libre rotación;¹⁴⁹ $\Phi_f^{DHAO} = 0,2$; y $r = 18,9 \text{ Å}$, medida entre los carbonos reactivos de DHA y DHAO.¹⁶⁰ A partir estos valores se deriva que el radio de Förster es de $R_0 = 3,8 \text{ nm}$ y la eficiencia de FRET es de $E_{FRET} = 0,99$.

Los datos que se requieren para calcular las constantes cinéticas son: los coeficientes de absorción molar ϵ del DHA⁴¹ y DHAO (Capítulo 2); los rendimientos cuánticos Φ de cada proceso; las longitudes de onda λ de irradiación; y las intensidades de irradiación I_0 . Los valores correspondientes a estos parámetros se encuentran en la Tabla 5.1. A modo de ejemplo, las intensidades se definieron como 1 mW/cm^2 para 340 nm , 100 mW/cm^2 para 450 nm y 1 mW/cm^2 para 520 nm y se calcularon en base a estos valores las constantes cinéticas de todas las fotociclaciones y fotoreversiones, incluyendo finalmente las correspondientes a fotoreversión inducida por FRET. Las constantes calculadas se aprecian en última columna de la Tabla 5.1. Es importante recordar que estas dependen de la intensidad, con lo cual se informarán siempre con las simulaciones siguientes las intensidades utilizadas.

Tabla 5.1: Valores de constantes cinéticas y parámetros asociados para DHA-DHAO 55.

Compuesto	Reacción	λ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Φ	k (s^{-1})
DHA	A $\rightarrow$ C	340	9000	0,35	$2,05 \times 10^{-2}$
	C $\rightarrow$ A	340	17000		$3,87 \times 10^{-2}$
	C $\rightarrow$ A	450	6000	0,35	$1,81 \times 10^0$
	C $\rightarrow$ A	530	17000		$5,91 \times 10^{-2}$
DHAO	A $\rightarrow$ C	340	12000	0,45	$3,51 \times 10^{-2}$
	C $\rightarrow$ A	340	5000	0,0011	$3,57 \times 10^{-5}$
	C $\rightarrow$ A	450	36000		$3,41 \times 10^{-2}$
DHAO	FRET, DHA C $\rightarrow$ A	340	5000	0,35	$1,12 \times 10^{-2}$
	FRET, DHA C $\rightarrow$ A	450	36000	0,35	$1,07 \times 10^1$

5.3.3 Simulación en Python

Con las ecuaciones cinéticas y las constantes calculadas se prosiguió a simular la respuesta de una muestra de DHA-DHAO **55** a irradiaciones de distintas longitudes de onda computacionalmente. Se escribió un programa de simulación en el lenguaje Python (el programa completo se encuentra en el Apéndice B) para simular los cambios en una población inicial $[[A-A], [C-A], [A-C], [C-C]]$ de DHA-DHAO (donde $[X-X]$ es la concentración del estado $X-X$), durante n irradiaciones secuenciales de 340, 450 o 520 nm durante tiempos $t_1...t_n$ e intensidades I_{UV} , I_{Azul} e I_{Verde} . Al iniciar una simulación, se calculan y guardan como archivos de Excel los datos de variación de concentraciones en el tiempo y los espectros aproximados de absorción y emisión del DHA-DHAO calculados en base a estos. El programa permite realizar también simulaciones con secuencias largas o múltiples longitudes de onda de irradiación simultáneas, y simular también distintas estructuras de DHA-DHAO, como se verá en la siguiente Sección.

Se comenzó realizando una simulación básica de tres irradiaciones (1. 340nm, 1 mW/cm². 2. 520 nm, 1 mW/cm². 3. 450 nm, 100 mW/cm²) y una concentración inicial de 10 μ M de DHA-DHAO **55** en estado A-A, representativa de los experimentos en la Sección 5.2.2. Los resultados de la simulación se aprecian en la Figura 5.10.

Irradiación con UV

La primera irradiación es con luz UV (340 nm) a baja potencia (1 mW/cm²). Ambos DHA y DHAO fotociclan, y el estado A-A isomeriza a A-C y C-A rápidamente (Figura 5.10A). A partir de estos dos isómeros se puede formar el estado C-C, lo cual se observa luego de un período de retraso corto. Mientras la concentración del isómero A-C (fluorescente) aumenta exponencialmente a lo largo de la irradiación con UV, el isómero C-A llega a una concentración máxima de $\sim 1 \mu$ M, pero luego disminuye hasta 0 μ M. En su lugar aumenta la concentración de C-C. Las constantes cinéticas ayudan a explicar este fenómeno, y las ecuaciones correspondientes a la etapa de irradiación por UV son:

$$\frac{d[A-A]}{dt} = -\left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}\right)[A-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}\right)[C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV}\right)[A-C] \quad (5.17)$$

$$\frac{d[C-A]}{dt} = -k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}[A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}\right)[C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV}\right)[C-C] \quad (5.18)$$

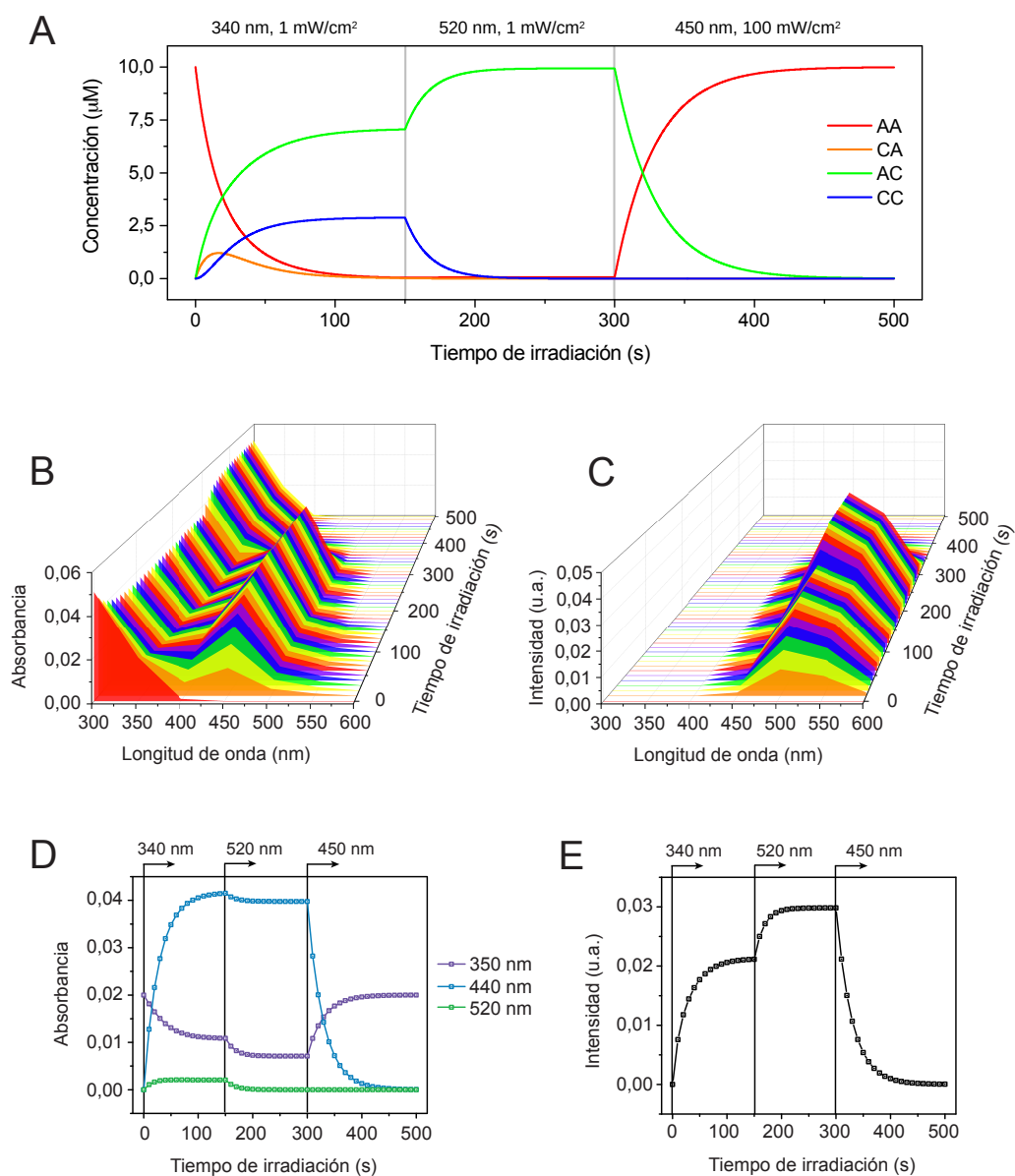


Figura 5.10: Simulación de DHA-DHAO 55 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).

$$\frac{d[A-C]}{dt} = k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C] \quad (5.19)$$

$$\frac{d[C-C]}{dt} = k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-C] + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [C-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C] \quad (5.20)$$

En presencia de luz UV, $k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}$ es tres órdenes mayor que $k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV}$ (Tabla 5.1, Ecuación 5.18), por lo que se puede aproximar que C-C no fotorevierte a C-A. A la vez, el equilibrio entre C-C y A-C está desplazado hacia este último, ya que la fotoreversión de DHA (directa y por FRET) domina: $k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-C] < \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C]$ (Ecuación 5.20). En conjunto, el equilibrio está desplazado hacia la formación de A-C bajo irradiación UV.

Irradiación con luz verde

Luego de la irradiación con UV se simula una iluminación con luz verde de 520 nm (1 mW/cm²). En estas condiciones la única especie que sobrevive es el estado A-C fluorescente (Figura 5.10A). Las ecuaciones correspondientes a este período son:

$$\frac{d[A-A]}{dt} = \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-A] \quad (5.21)$$

$$\frac{d[C-A]}{dt} = - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-A] \quad (5.22)$$

$$\frac{d[A-C]}{dt} = \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-C] \quad (5.23)$$

$$\frac{d[C-C]}{dt} = - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-C] \quad (5.24)$$

Las concentraciones de A-A y C-A son muy bajas al comienzo de esta etapa, y el problema se reduce a un equilibrio entre C-C y A-C. Ya que C-C fotorevierte directamente a A-C (Ecuaciones 5.23 y 5.24), al llegar al estado fotoestacionario con luz verde se obtiene únicamente el estado A-C fluorescente. El espectro de absorción (Figura 5.10B y D) pertenece a este isómero aislado, y se llega a un máximo de emisión (Figura 5.10C y E).

Irradiación con luz azul

Al irradiar con luz azul de 450 nm intensa (100 mW/cm²), el isómero C del DHAO fotorevierte y el estado A-C retorna al estado A-A, con un decaimiento mono-exponencial según:

$$\frac{d[A-C]}{dt} = - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO, Azul} \right) [A-C] \quad (5.25)$$

El DHA-DHAO vuelve así a su estado inicial, con 100 % A-A.

Comparación con los resultados experimentales

Si se comparan los resultados de la simulación, en particular las curvas de máximos de absorción y emisión (Figura 5.10D y E), con los resultados experimentales de una secuencia de irradiación similar (Sección 5.2.2, Figura 5.9A y B), se observan diferencias en particular en la emisión. Mientras la fluorescencia llega solamente al 70 % de su valor máximo en el EFE-UV de la simulación, en el experimento la emisión llegó a su máximo en el EFE-UV, con lo cual no se apreció un aumento de la misma al irradiar con luz verde. Esto se puede deber a diferencias entre las constantes cinéticas de los procesos de fotoconversión de los componentes DHA y DHAO por separado y en el combinado DHA-DHAO. También se puede deber a que la simulación solo tiene en cuenta fotoreversión del DHA por absorción directa o por FRET, pero no por la (improbable) reabsorción de la emisión del DHAO. Más allá de esta diferencia, el comportamiento real (experimental) del DHA-DHAO es muy parecido al simulado, validando la representación del sistema con las ecuaciones planteadas.

Activación múltiple

En términos de la activación múltiple, desafortunadamente en el EFE-UV A-C es la especie dominante (Figura 5.10E). El porcentaje de A-C previo a la irradiación con luz verde es de ~ 70 %, con lo cual la emisión es activada después de una sola irradiación y no se obtiene una activación múltiple del tipo que se requiere para aumentar la resolución con este compuesto. El principal responsable de la gran proporción de A-C en el EFE-UV es la constante $k_{C \rightarrow A}^{DHA, UV}$, la cual domina en el equilibrio C-C/A-C. En la próxima sección se describen mejoras al sistema para lograr el comportamiento deseado.

5.4 Propuesta teórica

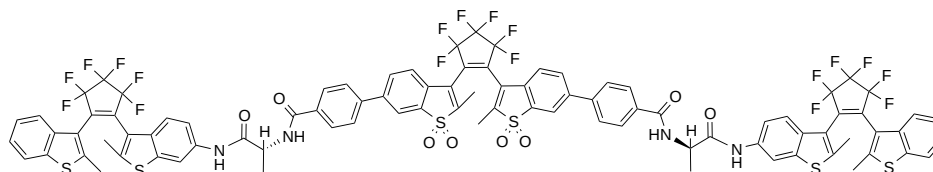
En la Sección 5.3.3, la constante de fotoreversión del compuesto DHA bajo irradiación UV, $k_{C \rightarrow A}^{DHA, UV}$, se identificó como el principal responsable de una excesiva formación del estado A-C

de DHA-DHAO en el EFE-UV. La predominancia de A-C se puede evitar con dos estrategias: adicionar otro DHA (aceptor de FRET), para duplicar el valor de la $k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}$ resultante que compite con $k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$; o modificar el DHA tal que $k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$ sea menor. En esta Sección se desarrollan ambas propuestas, y se evalúa el desempeño de los compuestos en simulaciones dentro del marco del concepto de múltiples activaciones.

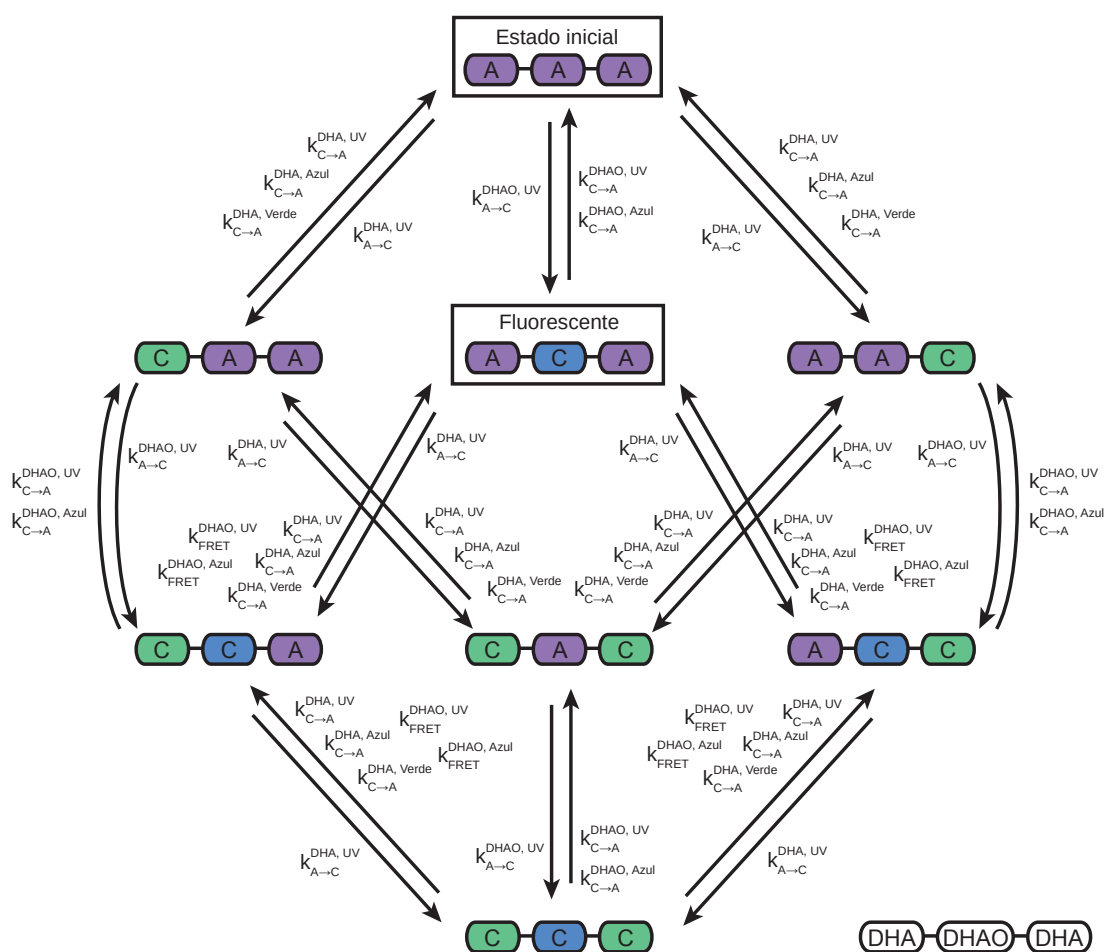
5.4.1 Dos grupos DHA aceptores

Se propuso la estructura que se observa en el Esquema 5.4 de un compuesto triple DHA-DHAO-DHA **56** con tal de reducir la proporción del estado fluorescente en el EFE-UV. En este caso el DHAO está doblemente sustituido con dos grupos equivalentes, funcionalizados de la misma manera que el DHA-DHAO **55**. Como se trata de las mismas estructuras básicas de DHA y DHAO, las constantes cinéticas de fotociclación, fotoreversión y fotoreversión como producto de FRET son las mismas que para el DHA-DHAO **55**. Sin embargo, ahora el número de isómeros posibles es 8, no 4 como en el caso del compuesto doble DHA-DHAO. Los estados posibles y las constantes cinéticas relacionadas con cada uno de los procesos fotoquímicos se pueden apreciar en el Esquema 5.5. El único estado fluorescente es A-C-A, ya que la emisión del DHAO en C-C-A, A-C-C y C-C-C se transfiere vía FRET al DHA. En comparación con el compuesto doble DHA-DHAO, el esquema de isómeros y las relaciones entre ellos para DHA-DHAO-DHA **56** es mucho más complejo. Las ecuaciones cinéticas correspondientes a cada uno de los ocho isómeros son:

$$\begin{aligned} \frac{d[A-A-A]}{dt} = & - \left(2k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [A-A-A] + \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) ([C-A-A] + [A-A-C]) + \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} \right) [A-C-A] \quad (5.26) \end{aligned}$$



Esquema 5.4: Estructura del compuesto triple DHA-DHAO-DHA **56**.



Esquema 5.5: Isómeros del compuesto DHA-DHAO-DHA 56, y las irradiaciones necesarias para llevarlos al estado fluorescente.

$$\begin{aligned}
\frac{d[C-A-A]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-A-A] - \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [C-A-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} \right) [C-C-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-A-C] \quad (5.27)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[A-C-A]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [A-A-A] - \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + 2k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + \right. \\
& \left. k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} \right) ([C-C-A] + [A-C-C]) \quad (5.28)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[A-A-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-A-A] - \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-A-C] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} \right) [C-A-C] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} \right) [A-C-C] \quad (5.29)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[C-C-A]}{dt} = & \left(k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [C-A-A] + \left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] - \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + \right. \\
& \left. k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [C-C-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} \right) [C-C-C] \quad (5.30)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[C-A-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} ([C-A-A] + [A-A-C]) - \\
& \left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + 2k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + 2k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [C-A-C] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} \right) [C-C-C] \quad (5.31)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[A-C-C]}{dt} = & \left(k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [A-A-C] + \left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] - \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + \right. \\
& \left. k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-C] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} \right) [C-C-C] \quad (5.32)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[C-C-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [C-A-C] + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} ([C-C-A] + [A-C-C] - \\
& \left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + 2k_{C \rightarrow A}^{DHA,Azul} + 2k_{C \rightarrow A}^{DHA,Verde} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,Azul} + \right. \\
& \left. 2k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + 2k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,Azul} \right) [C-C-C] \quad (5.33)
\end{aligned}$$

El programa de Python se adaptó para simular el comportamiento del DHA-DHAO-DHA **56** con estas ecuaciones y las constantes calculadas para el DHA-DHAO **55** (Tabla 5.1). Los resultados de la simulación de irradiaciones de 340 nm (1 mW/cm²) seguida por 520 nm (1 mW/cm²) y luego 450 nm (50 mW/cm²) se pueden observar en la Figura 5.11.

Irradiación con UV

Al irradiar con luz UV el estado A-A-A desaparece y aparece una mezcla de los demás estados. Predominan los estados A-C-A (fluorescente), A-C-C, C-C-A y C-C-C. Las ecuaciones que corresponden a esta etapa son:

$$\begin{aligned}
\frac{d[A-A-A]}{dt} = & - \left(2k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [A-A-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} \right) ([C-A-A] + [A-A-C]) + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + \right) [A-C-A] \quad (5.34)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[C-A-A]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [C-A-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} \right) [C-C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} \right) [C-A-C] \quad (5.35)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[A-C-A]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [A-A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + 2k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] + \\
& \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) ([C-C-A] + [A-C-C]) \quad (5.36)
\end{aligned}$$

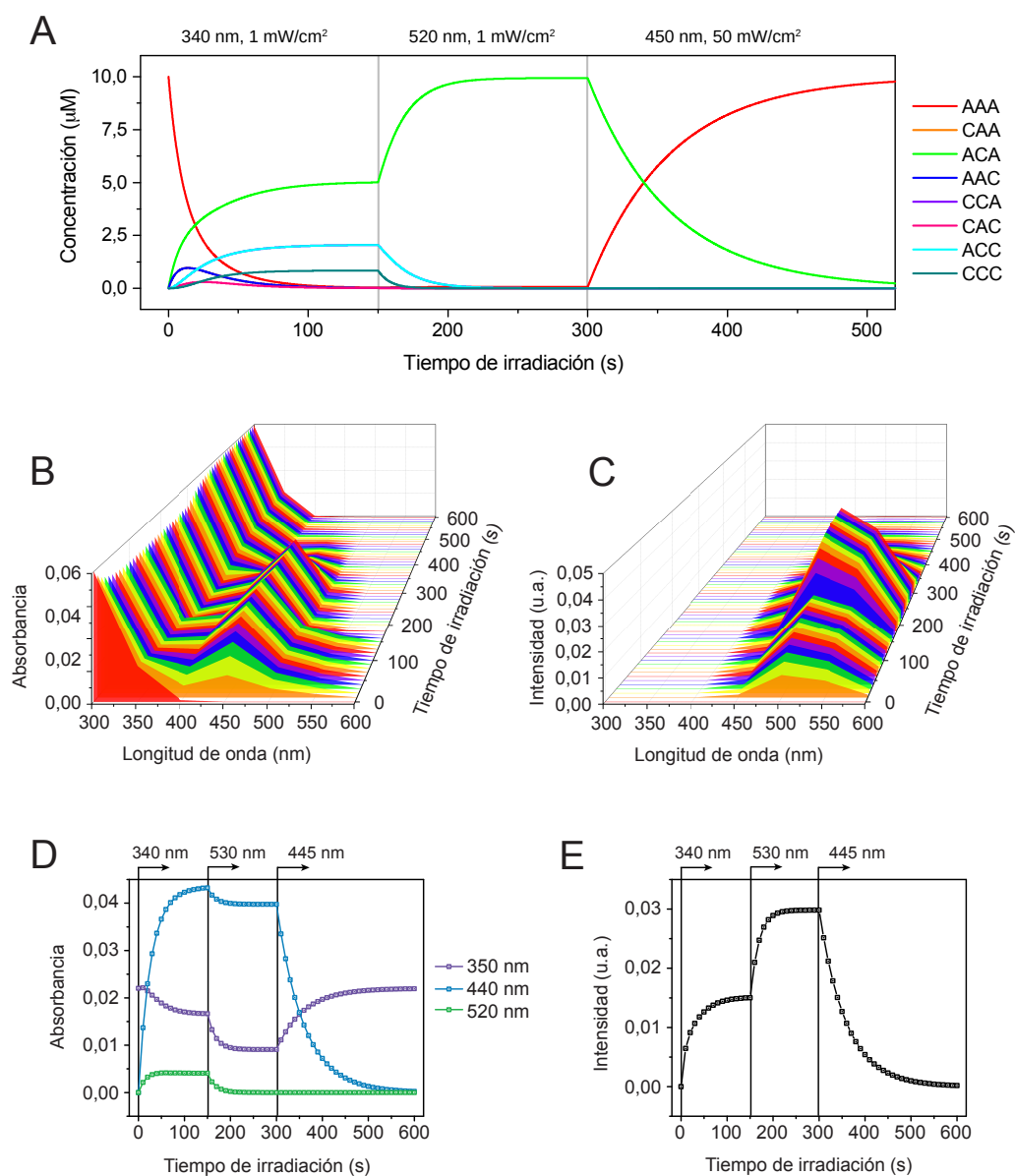


Figura 5.11: Simulación de DHA-DHAO-DHA **56** durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).

$$\begin{aligned} \frac{d[A-A-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A-A-A] - \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-A-C] + \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} \right) [C-A-C] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} \right) [A-C-C] \end{aligned} \quad (5.37)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C-C-A]}{dt} = & \left(k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [C-A-A] + \left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] - \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [C-C-A] + \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C-C] \end{aligned} \quad (5.38)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C-A-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} ([C-A-A] + [A-A-C]) - \\ & \left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [C-A-C] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} \right) [C-C-C] \end{aligned} \quad (5.39)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[A-C-C]}{dt} = & \left(k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} \right) [A-A-C] + \left(k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-A] - \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} \right) [A-C-C] + \\ & \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C-C] \end{aligned} \quad (5.40)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C-C-C]}{dt} = & k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} [C-A-C] + k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} ([C-C-A] + [A-C-C]) - \\ & \left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV} + 2k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C-C] \end{aligned} \quad (5.41)$$

La razón por la cual todos los estados que únicamente tienen DHAs fotociclados (C-A-A, A-A-C y C-A-C) se forman y luego se consumen durante el transcurso de la irradiación, es la misma que para el DHA-DHAO **55**: la constante de fotociclación $k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV}$ es tres órdenes mayor que $k_{C \rightarrow A}^{DHAO,UV}$, por lo cual los equilibrios entre estos estados y los estados con el DHAO en forma cerrada correspondientes (C-C-A, A-C-C y C-C-C) están desplazados hacia estos últimos (Ecuaciones 5.35, 5.37 y 5.39). Al formarse los estados con al menos un DHA y el DHAO fotociclados, compiten luego los procesos de fotociclación del DHA y fotoreversión directa y vía FRET del mismo (al igual que el DHA-DHAO). La suma $\left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV} \right) [C-C-C]$ es mayor a $k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} ([C-C-A] + [A-C-C])$ con lo cual el estado C-C-C está desfavorecido respecto a los estados C-C-A y A-C-C (Ecuación 5.41). Finalmente, ambos C-C-A y A-C-C fotorevierten directamente y mediante FRET a A-C-A, según el equilibrio dictado por las constantes respectivas (Ecuación 5.36). Como se puede observar en la Figura 5.11A, C y E, en el EFE-UV se forma aproximadamente un 50 %

del estado fluorescente A-C-A.

Irradiación con luz verde

Irradiando la muestra simulada con luz verde a partir del EFE-UV, aumenta la concentración del estado A-C-A, ya que este es el único que no absorbe en esa región. Las ecuaciones relevantes para los estados predominantes en el EFE-UV se reducen a:

$$\frac{d[A-C-A]}{dt} = \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) ([C-C-A] + [A-C-C]) \quad (5.42)$$

$$\frac{d[C-C-A]}{dt} = -\left(k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) [C-C-A] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) [C-C-C] \quad (5.43)$$

$$\frac{d[A-C-C]}{dt} = -\left(k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) [A-C-C] + \left(k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) [C-C-C] \quad (5.44)$$

$$\frac{d[C-C-C]}{dt} = -\left(2k_{C \rightarrow A}^{DHA, Verde}\right) [C-C-C] \quad (5.45)$$

Ya que $[C-C-C] < [C-C-A]$ o $[A-C-C]$, todos los equilibrios están desplazados hacia A-C-A. La fluorescencia llega a su máximo en el EFE-Verde (Figura 5.11E) y el espectro de absorción pertenece únicamente al isómero A-C-A, sin contribución alguna del DHA cerrado en el azul (Figura 5.11B y D).

Irradiación con luz azul

Para volver el sistema al estado inicial, se irradia con luz azul tal que el DHAO cerrado fotorevierta. La única ecuación relevante en esta etapa es:

$$\frac{d[A-C-A]}{dt} = -\left(k_{C \rightarrow A}^{DHAO, Azul}\right) [A-C-A] \quad (5.46)$$

y el decaimiento de la concentración de A-C-A es mono-exponencial, al igual que en la misma etapa para el compuesto doble DHA-DHAO. La emisión decae hasta volverse oscura la mezcla (Figura 5.11C y E) y se forma nuevamente 100 % del estado A-A-A inicial (Figura 5.11A), con absorción únicamente en el UV (Figura 5.11B y D).

Activación múltiple

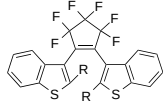
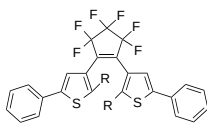
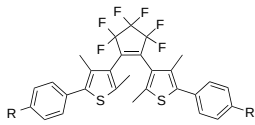
En términos del concepto de activación múltiple, se obtiene una mejora en el sistema respecto al sistema doble DHA-DHAO, ya que el porcentaje de la especie fluorescente se reduce de

70 % a 50 % en el EFE-UV. Sin embargo, aún no es suficiente para aumentar la resolución con múltiples activaciones, porque no se requieren dos irradiaciones para obtener una emisión apreciable, sino una sola. Se podría reducir todavía más la proporción de A-C-A en el EFE-UV con más grupos aceptores tipo DHA, pero las moléculas que contengan un DHAO y tres o más DHA resultarían grandes, y la coincidencia del centro de la PSF y los centros reactivos se podría ver perjudicada.

5.4.2 Menor constante de fotoreversión del DHA

La segunda estrategia para reducir la proporción de la especie fluorescente en el estado EFE-UV es reemplazar el DHA **52** por otro aceptor fotocromico que tenga un rendimiento cuántico de fotoreversión menor, tal que la $k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$ resulte menor. Naturalmente se buscaron DHAs de estructura parecida a **52**, para conservar las propiedades fotocromicas características de los DHAs. La búsqueda bibliográfica rindió los derivados de DHA que se encuentran en la Tabla 5.2, junto a sus rendimientos cuánticos de fotociclación $\Phi_{A \rightarrow C}$ y fotoreversión $\Phi_{C \rightarrow A}$. El DHA **52** utilizado en las Secciones previas se encuentra en la cuarta fila, a modo de comparar sus rendimientos los demás derivados.

Tabla 5.2: Rendimientos cuánticos de fotoconversión de DHAs.

Estructura base	Grupo Funcional R	Número	$\lambda_{\max,C}^{abs}$ (nm)	$\Phi_{A \rightarrow C}$	$\Phi_{C \rightarrow A}$	Ref.
	CN	57	496	0,28	0,59	161
	-≡-Ph	58	520	0,13	0,55	
	-≡-Pr	59	520	0,21	0,58	
	CH ₃	1	517	0,35	0,35	
	OCH ₃	60	547	0,34	0,03	
	CN	61	545	0,42	0,41	24;161
	-≡-Ph	62	575	0,17	0,32	
	-≡-Pr	63	575	0,41	0,27	
	CH=C(CH ₃) ₂	64	625	0,25	0,23	
	CH ₃	65	575	0,59	0,013	
	CH ₂ OCH ₃	66	580	0,50	0,0062	
	OCH ₃	67	625	0,44	$1,7 \times 10^{-5}$	23
	CN	68	570	0,50	0,018	
	CH ₃	69	562	0,46	0,015	
	OCH ₃	70	597	0,48	0,008	
	N(Et) ₂	71	597	0,37	0,0025	

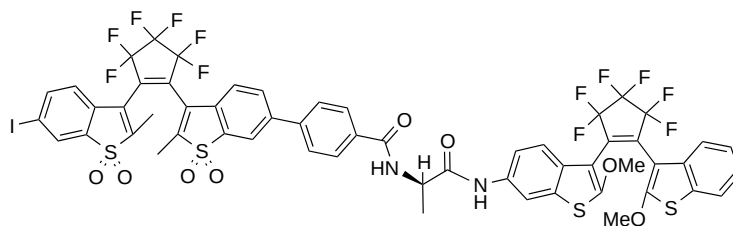
Más allá de presentar un $\Phi_{C \rightarrow A}$ menor al DHA **52**, el nuevo fotocromico debe tener una banda de absorción del isómero cerrado (con máximo en $\lambda_{max,C}^{abs}$) que se superponga con el espectro de emisión del DHAO **11**, alrededor de 520 - 560 nm (Figura 5.6). Además, el $\Phi_{A \rightarrow C}$ debe ser parecido al de **52**, tal que el único parámetro que cambie sustancialmente en el esquema cinético sea $k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$.

Teniendo en cuenta estas restricciones, hay un compuesto que claramente cumple con estos requisitos: el DHA **60**. El máximo de absorción del isómero cerrado de **60** está desplazado hacia el rojo en comparación con **52**, pero la banda de emisión del DHAO **11** es amplia, con lo cual se esperaría una buena superposición de los espectros. El $\Phi_{A \rightarrow C}$ es muy similar, mientras que el $\Phi_{C \rightarrow A}$ es un orden de magnitud menor que para **52**.

Se calcularon en base a estos rendimientos cuánticos las constantes cinéticas correspondientes al DHA **60** y se simuló el comportamiento de una molécula compuesta de una unidad DHA **60** y una unidad DHAO **11** (DHA-DHAO **72**, Esquema 5.6), durante una secuencia de irradiaciones parecida a aquella utilizada para el compuesto DHA-DHAO **55** (1: 340nm, 2 mW/cm². 2: 520 nm, 10 mW/cm². 3: 450 nm, 100 mW/cm²). Los resultados de la simulación se observan en la Figura 5.12. En comparación con las condiciones de irradiación del DHA-DHAO **55**, la intensidad del UV se duplicó y se aumentó un orden de magnitud la intensidad de la luz verde, justamente debido a la menor velocidad de la reacción de fotoreversión del DHA **60**. Las ecuaciones cinéticas correspondientes al compuesto **72** son las mismas que para el compuesto **55** (ver Sección 5.3.2). Las constantes cinéticas de ambos DHA-DHAO **55** y **72** se observan en la Tabla 5.3.

Irradiación con luz UV

Al irradiar con luz UV, se establece un equilibrio entre las especie A-C y C-C (Figura 5.12A). Al igual que para el compuesto **55**, el isómero C-A del DHA-DHAO **72** aumenta en concentración y luego decae, debido a que el equilibrio entre C-A y C-C está desplazado hacia este último ($k_{A \rightarrow C}^{DHAO,UV} > k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$, Tabla 5.3). Sin embargo, a diferencia del DHA-DHAO



Esquema 5.6: Estructura del compuesto doble DHA-DHAO **72**.

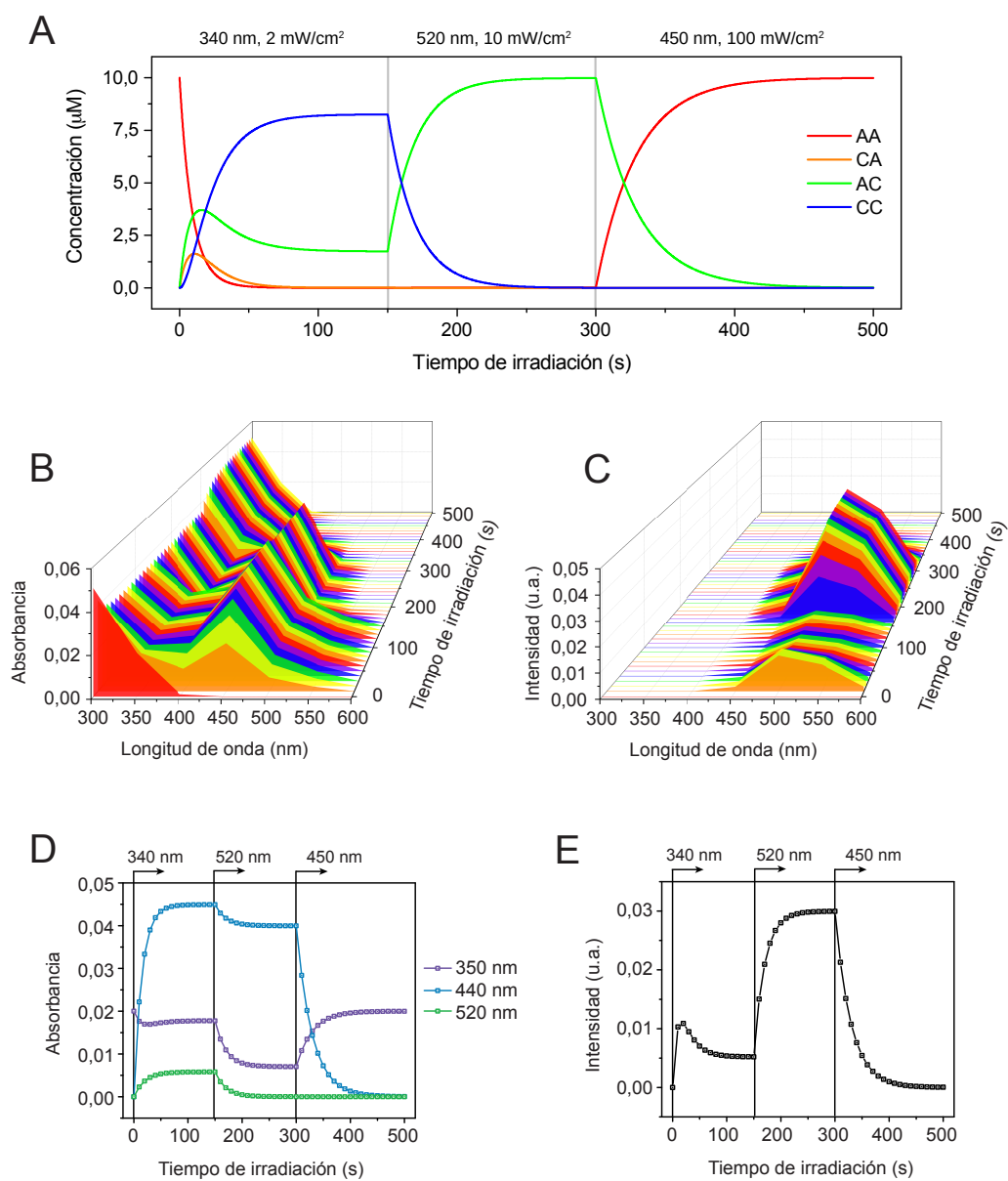


Figura 5.12: Simulación de DHA-DHAO 72 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).

Tabla 5.3: Valores de constantes cinéticas de DHA-DHAOs **55** y **72**.

Compuesto	Reacción	λ (nm)	k (s ⁻¹) para 55	k (s ⁻¹) para 72
DHA	A→C	340	$2,05 \times 10^{-2}$	$4,09 \times 10^{-2}$
	C→A	340	$3,87 \times 10^{-2}$	$3,31 \times 10^{-3}$
	C→A	450	$1,81 \times 10^0$	$1,55 \times 10^{-1}$
	C→A	520	$5,91 \times 10^{-2}$	$5,07 \times 10^{-2}$
DHAO	A→C	340	$3,51 \times 10^{-2}$	$7,02 \times 10^{-2}$
	C→A	340	$3,57 \times 10^{-5}$	$3,57 \times 10^{-5}$
	C→A	450	$3,41 \times 10^{-2}$	$3,41 \times 10^{-2}$
DHAO	FRET, DHA C→A	340	$1,12 \times 10^{-2}$	$1,92 \times 10^{-3}$
	FRET, DHA C→A	450	$1,07 \times 10^1$	$9,16 \times 10^{-1}$

original, el equilibrio entre A-C y C-C está desplazado hacia C-C. Las constantes cinéticas involucradas se relacionan según $k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV} [A - C] > (k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV} + k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV}) [C - C]$, ya que $k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$ (y por ende también $k_{FRET,C \rightarrow A,DHA}^{DHAO,UV}$) es un orden menor que $k_{A \rightarrow C}^{DHA,UV}$. En conjunto, en el EFE-UV hay una mayoría de la especie C-C, y una cantidad mucho menor de A-C.

Irradiación con luz verde y luz azul

De igual manera que para el DHA-DHAO **55**, al irradiar con luz verde el equilibrio entre A-C y C-C está desplazado hacia la especie fluorescente A-C, aunque con una velocidad menor ($k_{C \rightarrow A}^{DHA,UV}$ es un orden menor), razón por la cual se utilizó una luz verde más intensa. El espectro al llegar al EFE-Verde coincide con aquel correspondiente únicamente a la especie A-C (Figura 5.12B y D), sin contribución en el verde del isómero cerrado del DHA, y la emisión aumenta al 100% (Figura 5.12C y E). Al irradiar luego con luz azul la simulación retorna al estado inicial, no fluorescente con 100% de la especie A-A.

Activación múltiple

El porcentaje de DHA-DHAO **72** en el estado fluorescente en el EFE-UV es aproximadamente 20%, lo que representa una mejora sustancial comparado con el 70% que se logra con el DHA-DHAO **55** o el 50% con el compuesto triple DHA-DHAO-DHA **56**. Esta fracción relativamente pequeña de isómero fluorescente en el EFE-UV significa que al irradiar con luz verde, se estarían activando un 80% de las moléculas oscuras remanentes. Es decir, solo

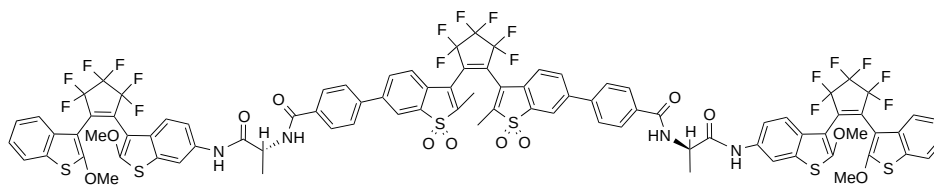
un 20% de las moléculas se activan con una sola irradiación, mientras que un 80% necesitan la secuencia de irradiaciones para activarse al isómero brillante. ¿Se puede reducir todavía más este número? De la misma manera que se redujo este porcentaje al agregar otro fotocromico al DHA-DHAO **55** para generar el DHA-DHAO-DHA **56**, se esperaría que dos unidades del DHA **60** tendrían el mismo efecto.

5.4.3 Dos grupos DHA aceptores con menor constante de fotoreversión

Se procedió a simular el DHA-DHAO-DHA triple **73** (Esquema 5.7) y los resultados se observan en la Figura 5.13. Las ecuaciones cinéticas son idénticas a aquellas usadas en la Sección 5.4.1, y los valores de las constantes cinéticas se detallan en la Sección 5.4.2. La secuencia de irradiación es similar al DHA-DHAO-DHA original **56**, excepto que las intensidades del UV y del verde son mayores (al igual que para el DHA-DHAO **72**).

Se observa que, sumando los dos efectos (dos grupos aceptores de FRET y menores constantes de fotoreversión del DHA), el porcentaje de la especie fluorescente A-C-A en el EFE-UV es de apenas 5% (Figura 5.13A). Al competir ahora eficientemente el proceso de fotociclación del DHA en el UV con la fotoreversión del DHA en el UV, la especie mayoritaria en el EFE-UV es C-C-C, seguida por las especies C-C-A y A-C-C, las cuales todas son no-fluorescentes. La intensidad de emisión en el EFE-UV es mínima, a pesar de formarse algo de la especie A-C-A al comienzo de la irradiación con luz UV (Figura 5.13C y E). Esto significa que, al irradiar luego con luz verde, la totalidad de los DHA se fotorevierten y la muestra recupera el 100% de la intensidad de fluorescencia (Figura 5.13A, C, E). La emisión se desactiva abriendo los isómeros de DHAO con luz azul, y se recupera el estado inicial oscuro.

El compuesto triple DHA-DHAO-DHA **73** conforma entonces el primer ejemplo de una molécula que cumple con los requisitos del concepto de activación múltiple de la fluorescencia. En la próxima Sección se detallará un experimento básico de microscopía, para explicar cómo se pueden aprovechar las propiedades únicas de **73**.



Esquema 5.7: Estructura del compuesto triple DHA-DHAO-DHA **73**.

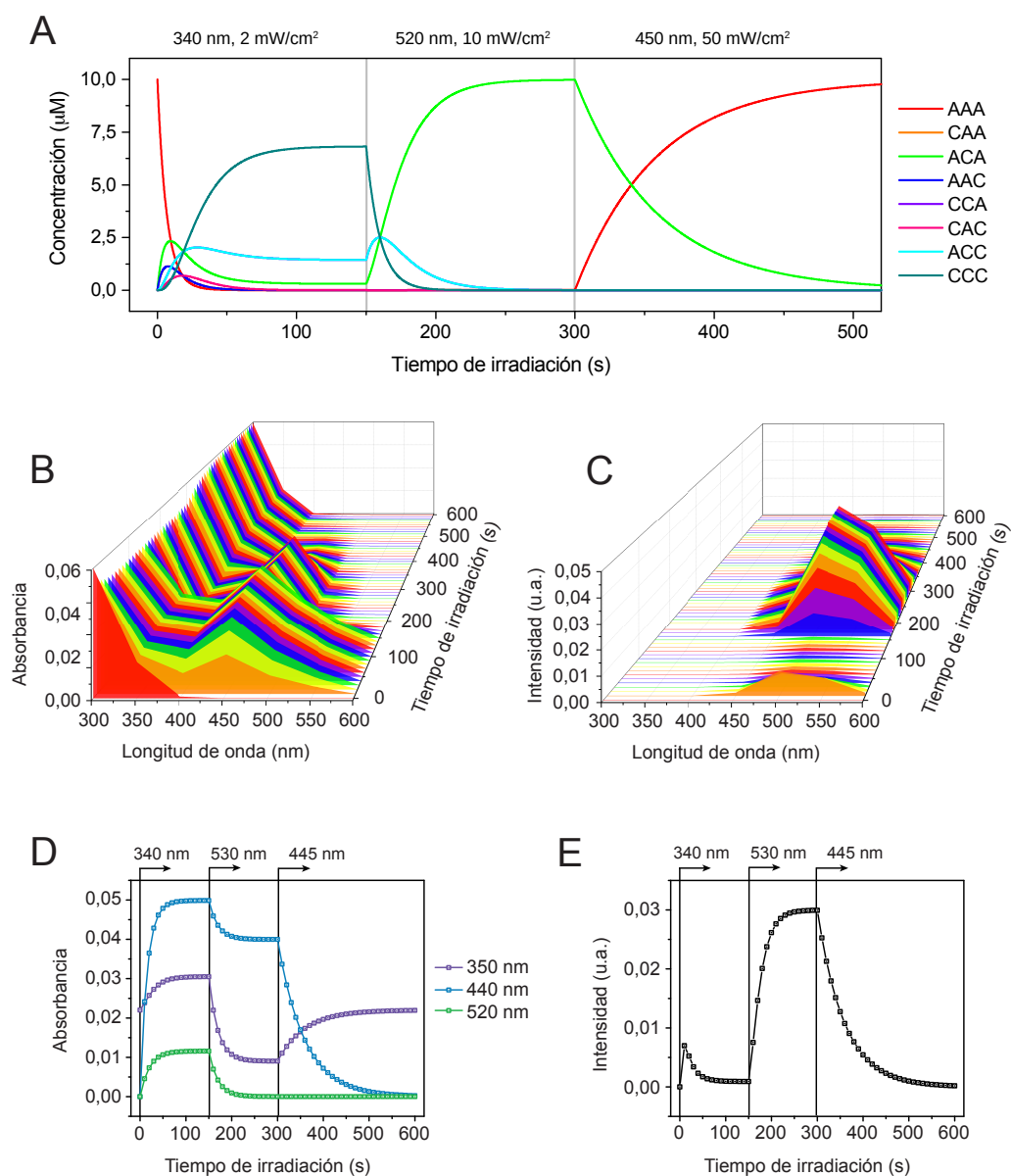


Figura 5.13: Simulación de DHA-DHAO-DHA **73** durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).

5.5 Experimento básico de microscopía

5.5.1 Activación de los fluoróforos

Una vez demostrada la capacidad del DHA-DHAO-DHA **73** para activarse mayormente tras dos irradiaciones, es necesario definir precisamente cómo sería un experimento microscópico con este tipo de compuestos, que conduzca a un aumento de la resolución comparado con un experimento confocal tradicional. En la Figura 5.14 se ilustra una muestra marcada uniformemente con moléculas de **73**.

Si se ilumina la muestra con luz UV enfocada (la PSF se observa en la Figura 5.14), se van a isomerizar las moléculas dentro de la PSF según la intensidad en cada punto y según las ecuaciones cinéticas descritas en la Sección 5.4.1, hasta llegar al EFE-UV correspondiente en cada punto de la muestra. En el centro de la PSF, donde la intensidad es mayor, una mayor proporción de las moléculas van a estar en el EFE-UV, mientras que en los bordes de la PSF una menor cantidad de moléculas fotocromáticas van a estar fotoconvertidas.

Las principales especies presentes en el EFE-UV son A-C-C, C-C-A y C-C-C. Para llegar a estos estados a partir de A-A-A, es necesario que *al menos* 2, 2 o 3 fotones incidan sobre una misma molécula, respectivamente. Esto significa que la PSF *resultante* que define la distribución de las moléculas isomerizadas en el EFE-UV de la Figura 5.14 tiene un perfil tipo PSF³. Hasta este punto, se tiene un perfil de múltiples fotones, pero sin activación porque no hay fluorescencia (solo hay un 5% de las moléculas en el estado fluorescente en el centro de la PSF). Luego de la irradiación con luz UV se irradia con luz verde, tal como en las simulaciones previas. Todas las moléculas revierten al estado fluorescente A-C-A, dados los

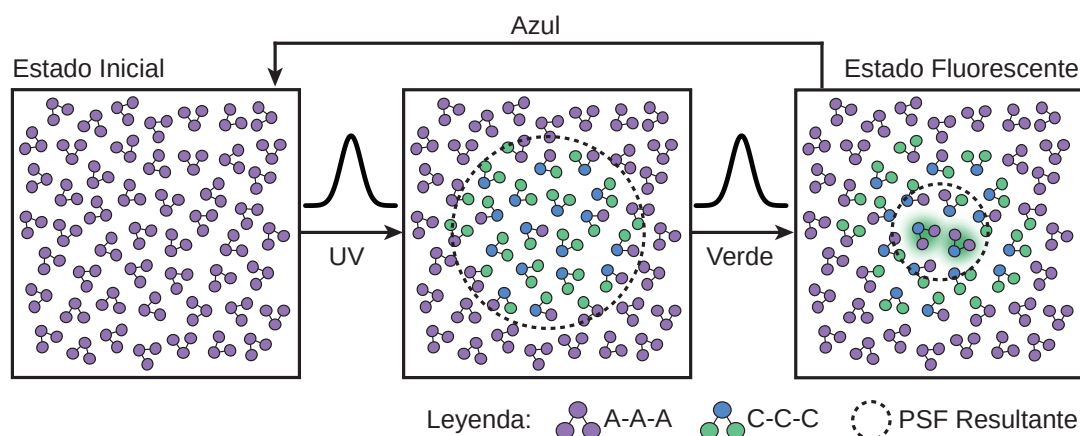


Figura 5.14: Experimento básico confocal de activación múltiple de DHA-DHAO-DHA **73**.

fotones suficientes. Como mínimo, los estados C-C-A y A-C-C requiere un fotón para activar la fluorescencia, mientras que las moléculas en estado C-C-C requieren de por lo menos dos fotones. Así, se obtiene un perfil tipo PSF^2 para la activación por luz verde del EFE-UV. En total, la PSF resultante de todo el proceso, UV y verde, tiene un perfil *al menos* del tipo PSF^5 .

Utilizando el programa PSF Lab de The One Molecule Group,¹⁵⁷ se calculó una PSF para un arreglo típico de microscopía: NA = 0,95, grosor de coverslip de vidrio = 170 μm , luz

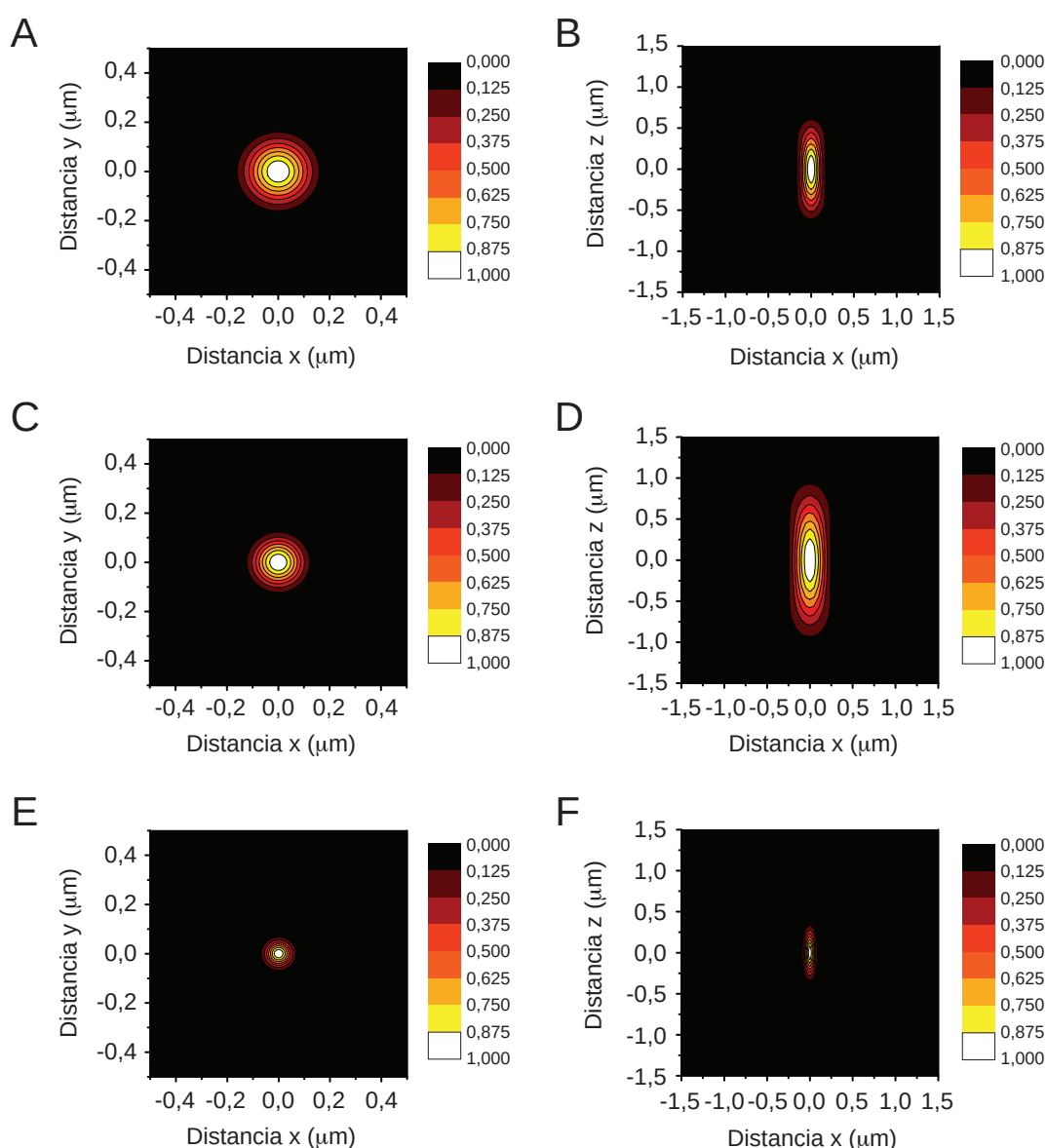


Figura 5.15: Mapas de contorno en el plano xy y xz de PSF a 340 nm (A y B), PSF a 520 nm (C y D) y PSF^5 (E y F).

polarizada circularmente para eliminar aberraciones y $\lambda = 340$ nm o 520 nm según la etapa de irradiación. Los mapas de contorno de las PSFs (normalizadas) en los planos xy y xz para 340 nm y 520 nm se muestran en la Figura 5.15A y B, C y D, respectivamente. La PSF de 340 nm (PSF_{340}) tiene un ancho a mitad de altura (FWHM) de 194 nm en x e y , y de 763 nm en z ; la PSF de 520 nm (PSF_{520}) tiene FWHM de 296 nm en x e y , y de $1,17 \mu\text{m}$ en z . Si se calcula la PSF resultante, $PSF^5 = PSF_{340}^3 \times PSF_{520}^2$, se obtiene el perfil que se observa en la Figura 5.15E y F para los planos xy y xz . Se puede apreciar que PSF^5 es mucho más pequeña que ambas PSF originales. El FWHM de PSF^5 es de 78 nm en x e y , y de 400 nm en z : una reducción de 60-74% en x e y , y de 48-66% en z , dependiendo si se compara con PSF_{340} o con PSF_{520} . Calculando el volumen de activación como un elipsoide de diámetros iguales a los FWHM, este se reduce en un fenomenal 92-98% (nuevamente dependiendo de la comparación): de $0,43 \mu\text{m}^3$ para PSF_{520} a $0,010 \mu\text{m}^3$ para PSF^5 . En términos de resolución, si la luz de excitación es de $\lambda = 450$ nm y $NA = 0,95$, dos fluoróforos se pueden resolver normalmente si están a 289 nm el uno del otro (según el criterio de Rayleigh) en el plano xy y $1,1 \mu\text{m}$ en el eje z , mientras que con la activación múltiple descrita se podrían resolver como mínimo fluoróforos separados por alrededor de 87 nm en el plano xy y alrededor de 448 nm en el eje z , un aumento de más de 3 veces en la resolución en xy y más de 2 veces en z .

5.5.2 Reconstruyendo la imagen

Una vez activados los fluoróforos en un volumen reducido gracias a la PSF^5 , se requiere excitar los mismos para construir la imagen fluorescente, antes de retornar todos los fotocrómicos al estado abierto. La excitación se puede hacer o bien enfocada, con una PSF de excitación similar al de activación, o bien de campo amplio, iluminando toda la muestra a la vez. En ambos casos, la intensidad de excitación debe ser menor a la intensidad de activación, para evitar cambios en la muestra; particularmente, al excitar a 450 nm los fotocrómicos van a revertir al estado abierto, disminuyendo la fluorescencia. Una estrategia confocal solaparía la PSF de excitación de 450 nm sobre la PSF^5 , resultando en la excitación de un volumen todavía menor de la muestra. Luego de obtener la relación señal:ruido adecuada, se aumentaría la intensidad del haz de 450 nm para fotorevertir todos los DHAO, y se procedería a enfocar el siguiente punto (cercano) de la muestra y a repetir el experimento de activación-excitación-fotoreversión. Excitando con un campo amplio, se deben obtener suficientes fotones para localizar con mayor precisión el origen de la fluorescencia para cada activación. ¿Cuál sería el límite de resolución en estos dos casos?

Debido a que es necesario llegar al EFE-UV antes de irradiar con luz azul para activar los fluoróforos, no se puede reducir el *número total* de fluoróforos activados en la PSF resultante bajando la intensidad de activación - solo se necesitaría más tiempo de irradiación pero se

llegaría también a un EFE-UV. Por ende, el número de fluoróforos activados va a depender de la densidad de marcación y del tamaño de la PSF resultante, y no de la intensidad de irradiación. Si la densidad de marcación es menor a la resolución de la PSF resultante, se podrán localizar los fluoróforos con tanta precisión como permita el fluoróforo antes de fotodegradarse (de manera similar a PALM,⁶⁰ Sección 1.4.2 en la Introducción). Si una muestra está marcada más densamente que un fluoróforo por cada volumen de activación resultante, no se van a poder resolver todos los fluoróforos individualmente con un único ciclo de activación-excitación. Sin embargo, dado que se trata de un equilibrio en el EFE-UV, es posible que al repetir el ciclo de activación, se genere una distribución levemente distinta de fluoróforos activados dentro del volumen de activación. Al repetir el ciclo activación-excitación repetidas veces en un mismo punto focal, se podrían distinguir fluoróforos individuales por la desconvolución de las imágenes, y así lograr una imagen con resolución mucho mayor a aquella provista por la PSF resultante.

5.6 Conclusión de la estrategia de activación múltiple

En este capítulo se describió en detalle el concepto de la activación múltiple de sistemas de fluoróforos fotocromicos y el aumento teórico de la resolución alcanzable con esta técnica. Las ecuaciones que describen la compleja fotoquímica de los compuestos dobles o triples se derivaron de los diagramas de fotociclaciones y fotoreversiones correspondientes, y se utilizaron para simular el comportamiento de distintos sistemas bajo diversas condiciones de irradiación. Al identificar el factor responsable de la mayor proporción del estado fluorescente al irradiar el sistema de dos componentes inicial con luz UV, se buscó corregir adaptando el fluoróforo con unidades que proporcionen al sistema las propiedades fotoquímicas deseadas. Un sistema triple con dos aceptores fotocromicos con fotoreversión lenta en el UV y un donador fluorescente presentó los requerimientos cinéticos necesarios, y se simuló su comportamiento demostrando la efectividad de la activación con múltiples estímulos lumínicos. Finalmente, se describió un experimento básico de microscopía con activación múltiple y la reconstrucción de una imagen de fluorescencia con super-resolución. La activación múltiple permite reducir teóricamente el volumen de activación de una muestra por más de 90%, y aumentar al menos dos veces la resolución en los tres ejes cartesianos en comparación con la microscopía limitada por la difracción natural de la luz.

Aplicaciones de diheteroariletos fluorescentes

En los Capítulos 2 y 4 se exploraron las propiedades fotoquímicas y estrategias de solubilización de los diheteroariletos fluorescentes (DHAOs), siempre con el objetivo de adecuar los mismos para su uso en la microscopía celular. Se lograron desplazar las longitudes de onda de absorción y emisión levemente hacia el rojo sin modificar las características de fotoconversión y se otorgó solvatocromicidad al DHAO con sustituyentes altamente dadores de electrones, con el costo de pérdida de fotoreversión. La búsqueda de solubilización identificó la necesidad de proteger sustancialmente al DHAO del entorno acuoso para conservar la fluorescencia y fotoconversión. Al final del Capítulo 4 se sintetizaron además derivados de DHAOs con grupos funcionales maleimida, capaces de actuar como sondas al conjugarse con proteínas de interés.

Una vez conocidas las propiedades y requerimientos de los DHAOs, fue posible determinar las áreas de aplicación de los mismos dentro del marco de la investigación biológica. En primer lugar, las sondas solvatocrómicas son capaces de reportar la polaridad del entorno mediante el desplazamiento de su fluorescencia, además de ser fluoróforos fotoactivables. Como se describe en este Capítulo, se utilizaron como indicadores de polaridad del entorno de las distintas posiciones de la α -sinucleína durante su agregación y se compararon con un indicador de formación de fibras conocido, revelando cambios en el entorno de la proteína mucho antes que la formación de fibras. En segundo lugar, se utilizaron los DHAOs como sondas fluorescentes bajo el microscopio y se evaluó su capacidad de fotoconversión en muestras biológicas fijadas. Junto con las propiedades de iluminación estructurada del microscopio de arreglo programable (PAM) del Dr. Jovin se lograron fotoconvertir selectivamente distintas áreas de una muestra de neuronas de hipocampo de rata, demostrando la flexibilidad del método y el potencial para aumentar la resolución con la combinación de ambas técnicas.

En este Capítulo se detallan los experimentos realizados, y se discuten las limitaciones y el futuro de las sondas de DHAOs en el contexto de las aplicaciones biológicas.

6.1 Fotoconversión en seco

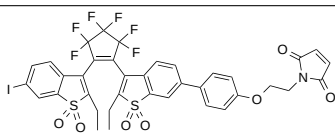
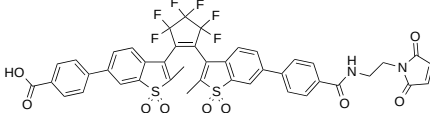
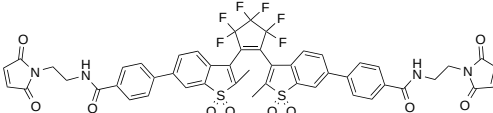
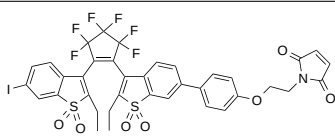
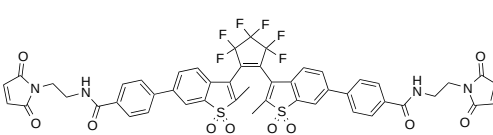
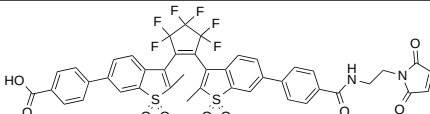
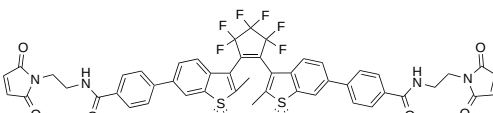
En las Secciones 4.6.1 y 4.6.2 del Capítulo 4 se caracterizaron los derivados de DHAO con maleimida y los conjugados de α -sinucleína y anticuerpos en solventes orgánicos y soluciones acuosas. Exceptuando los conjugados dobles, donde la sonda **37** (DHAO con dos unidades maleimida) unía dos entidades protéicas tanto de α -sinucleína como de anticuerpos, los conjugados no conservaron las propiedades fotoquímicas o la fluorescencia en soluciones acuosas. Por ende, se evaluaron los conjugados «en seco», depositándolos sobre cubreobjetos de vidrio y fotoconvirtiendo los mismos bajo el microscopio. Se agradece particularmente al Dr. Nathan Cook por su ayuda durante la fase experimental de esta Sección. A modo recordatorio, se enumeran en la Tabla 6.1 las sondas con maleimida y los conjugados de proteínas sintetizados en el Capítulo 4 y utilizados en las próximas secciones. Las sondas **36** y **37** son no-solvatocrómicas y fotoreversibles, mientras que **40** es fotoactivable y solvatocrómica. Los conjugados **41**, **42** y **43** incorporan la sonda solvatocrómica a la α -sinucleína, mientras que **44** y **45** son monómeros y dímeros de α -sinucleína con la sonda no-solvatocrómica. Los conjugados **46** y **47** son anticuerpos marcados con sondas no-solvatocrómicas mono- y di-sustituídas formando un puente entre dos unidades de anticuerpo, respectivamente.

En el Capítulo 4 se vio que los conjugados **41**, **42**, **43**, **44** y **46** eran fotoactivables pero no fotoreversibles en solución acuosa. Aunque este comportamiento era de esperar para los conjugados con la sonda solvatocrómica fotoactivable, no lo era para los demás conjugados. Este efecto se debía probablemente a la presencia de moléculas de agua en su entorno que desfavorecen la fotoconversión y la emisión, y no a un cambio de estructura o modificación química permanente. Por ende, si se removía el agua del entorno, se esperaba que los DHAOs se comportaran de manera natural.

Siguiendo esta lógica, y en preparación para el uso de las sondas en muestras biológicas, se prepararon muestras de los DHAOs y los conjugados depositando 5 μ L de cada compuesto en soluciones acuosas u orgánicas de aproximadamente 10 μ M sobre un cubreobjetos de vidrio y secando a 500 rpm para formar una capa delgada de muestra seca. Se depositaron 8 μ L de Mowiol[®], un medio de montaje polimérico ampliamente utilizado en microscopía celular, sobre las placas de vidrio y se ubicaron los cubreobjetos boca-abajo sobre estas para proveer un entorno hidrofóbico a los DHAOs.

Se utilizó un microscopio de campo amplio con un láser de 450 nm para la excitación y fotoreversión, y un filtro de paso largo de 510 nm para la emisión, para medir la respuesta de las muestras secas a los estímulos lumínicos. El microscopio estaba compuesto de un objetivo de agua de 60x, marca Olympus, y se tomaron imágenes con tiempos de integración de 1

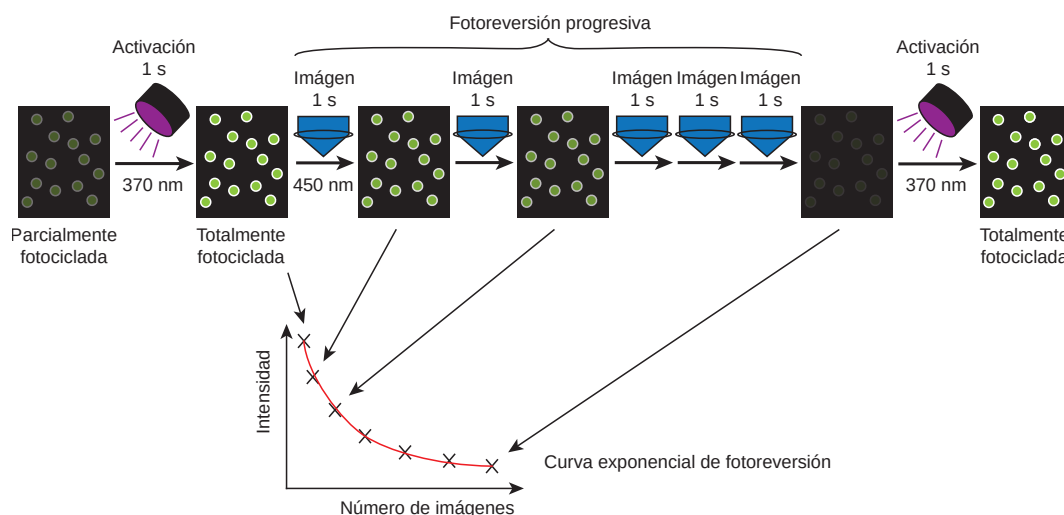
Tabla 6.1: Numeración de derivados de DHAO con maleimida y conjugados de proteínas.

Numeración	Fluoróforo	Proteína
40		-
36		-
37		-
41		α -Sinucleína A18C
42		α -Sinucleína A90C
43		α -Sinucleína A140C
44		α -Sinucleína A18C, monómero
45		α -Sinucleína A18C, dímero
46		Anticuerpo Secundario
47		Anticuerpo Secundario, puenteado

segundo. Las muestras inicialmente en un estado fotoestacionario intermedio (parcialmente fotociclados) se ubicaron en el foco del objetivo. Se irradiaron directamente (no a través del objetivo) con una lámpara de mercurio y un filtro de paso de banda de 370 nm durante 1 segundo para fotociclar los DHAO, y luego se tomaron una secuencia de imágenes microscópicas a 450 nm durante un tiempo adecuado para conseguir la fotoreversión de la muestra. En el Esquema 6.1 se muestra el algoritmo de las mediciones realizadas. A partir de las intensidades de las imágenes adquiridas se puede derivar la curva de fotoreversión de los DHAOs.

6.1.1 Derivados con maleimida **40**, **36** y **37**

En la Figura 6.1A y B se observan las imágenes obtenidas, acorde al protocolo detallado previamente, durante la fotoreversión progresiva de los compuestos **40** y **36**. Se puede observar que a medida que avanza el tiempo de irradiación, se reduce la intensidad de fluorescencia - en principio, se fotorevierten los DHAOs. En la Figura 6.1B se puede observar que luego de un flash de luz UV a los 120 segundos, la fluorescencia es recuperada y se pueden fotorevertir nuevamente los DHAO al estado abierto tras más irradiaciones con luz visible. Integrando la intensidad de la imagen entera para cada una de las imágenes tomadas durante la secuencia de irradiación, se puede graficar el valor de la intensidad promedio de la muestra vs. el tiempo de irradiación (Figura 6.1C, D y E). Se puede observar la diferencia en velocidad relativa de fotoreversión de los compuestos: los derivados no-solvatocrómicos (Figura 6.1D y E) fotorevierten eficientemente, rápidamente decreciendo a 0 la intensidad



Esquema 6.1: Protocolo de irradiación y toma de imágenes para muestras secas de DHAO-maleimida y conjugados.

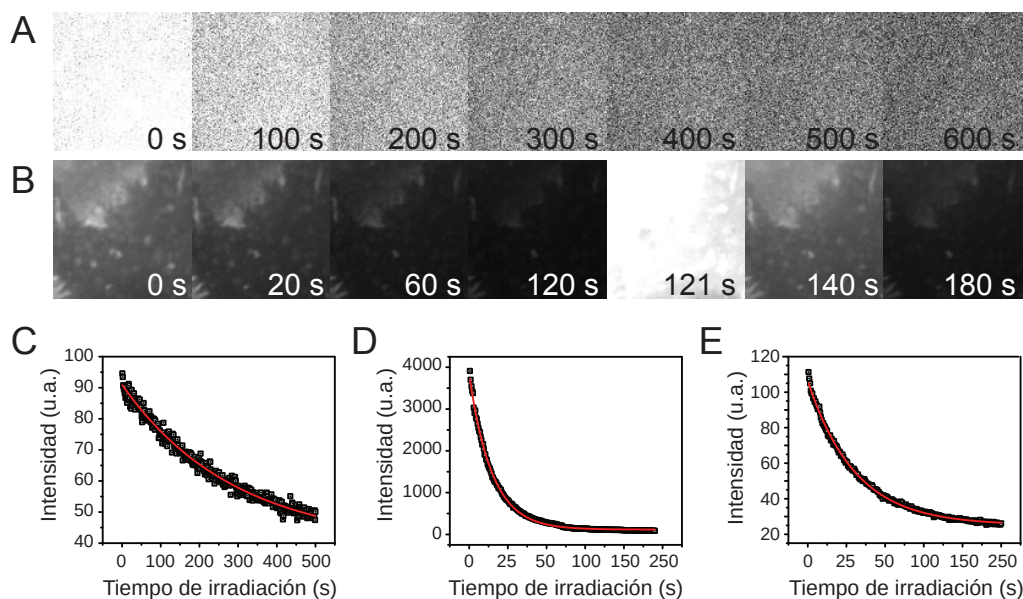


Figura 6.1: Imágenes de **40** (A) y **36** (B) en seco durante fotoreversión con luz visible. (B) es expuesto a un flash de UV a los 120 segundos. Curvas de intensidad vs tiempo de irradiación para **40** (C, ajuste monoexponencial), **36** (D, ajuste biexponencial) y **37** (E, ajuste biexponencial) derivadas de las imágenes obtenidas.

total de emisión, mientras que el derivado solvatocrómico (Figura 6.1C), que en solución fotorevierte lentamente, también lo hace lentamente en la capa polimérica. Las curvas se pueden ajustar con una función exponencial, al igual que se detalló en el Capítulo 2, que permitiría derivar la constante de velocidad de fotoreversión. Sin embargo, las curvas de los compuestos no-solvatocrómicos no se ajustan bien a una función mono-exponencial sino a una función bi-exponencial: durante la fotoreversión de estos derivados de maleimida en seco bajo el microscopio, la fotodegradación no es despreciable. Se puede observar la fotodegradación del compuesto **36** particularmente en la Figura 6.2, donde se grafica la intensidad de emisión vs. el tiempo de irradiación durante varios ciclos secuenciales de fotoreversión y fotociclación con un tiempo corto de luz UV. Luego de tres ciclos, la intensidad de emisión que se recupera al irradiar con UV es cada vez menor, a pesar de activar siempre con un mismo tiempo de UV.

A pesar de la fotodegradación, los derivados de maleimida de los DHAOs se comportan de manera esperada bajo el microscopio en películas poliméricas sólidas. El derivado **40** solvatocrómico se puede fotoactivar rápidamente y fotorevertir lentamente, mientras los derivados **36** y **37** son 100% fotorevertibles en tiempos razonables. Las mutantes de α -sinucleína carecen de estructura secundaria en solución, y por ende al ser depositadas las mutantes marcadas en el cubreobjetos, los DHAOs quedan totalmente expuestos, libres de interaccionar con el polímero de montaje de la misma forma que los DHAOs libres. A

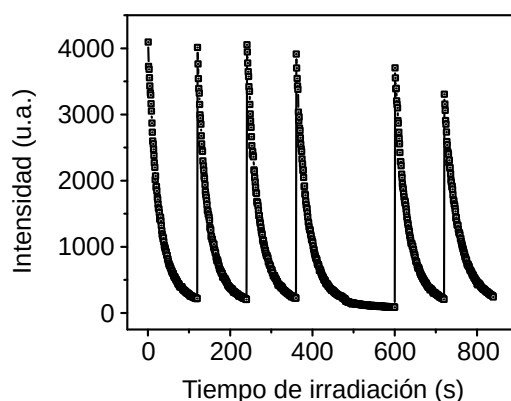


Figura 6.2: Intensidad de emisión vs. tiempo de irradiación durante ciclos de fotoreversión en seco de **36**.

diferencia de la α -sinucleína, los anticuerpos tienen una estructura secundaria definida, con lo cual se podría esperar un entorno distinto que el DHAO libre, y por ende una fotoconversión bajo el microscopio distinta. Se evaluó el comportamiento de los anticuerpos marcados en la siguiente Sección.

6.1.2 Anticuerpos marcados

Se prepararon muestras de ambos anticuerpos secundarios marcados, **46** y **47**, de la misma manera que en la Sección previa: soluciones acuosas de ambas proteínas se depositaron sobre un cubreobjetos, secaron y cubrieron con Mowiol. Se utilizó el mismo protocolo de irradiación (Esquema 6.1) y las curvas de intensidad vs. tiempo de irradiación se pueden observar en la Figura 6.3A y B. En el caso de los anticuerpos, se puede apreciar claramente que el conjugado **46** fotorevierte eficientemente, decayendo la intensidad de forma mono-exponencial, mientras que el conjugado **47**, una vez fotociclado, no puede fotorevertir. Esto es en contraste con el comportamiento de los conjugados en solución: el derivado mono-sustituído no fotorevertía en solución acuosa, pero el conjugado puenteado fotoconvertía de forma reversible. El razonamiento del Capítulo 4 acerca de por qué los conjugados tipo puente fotorevierten en solución con mayor facilidad está relacionado con la flexibilidad del isómero abierto y la mayor libertad de movimiento que este le proporciona a los conjugados voluminosos y estéricamente desafiados. En el caso de la muestra seca, donde los anticuerpos en principio están fijos, la fotoreversión de los DHAOs no proporciona mayor flexibilidad; de hecho, al contrario, la tensión estérica en el conjugado puente podría estar inhibiendo la fotoreversión por completo. El conjugado simple **46**, al contrario, puede sufrir repetidos fotociclos (Figura 6.3C) con una fotodegradación similar a la que se observó para los DHAOs libres.

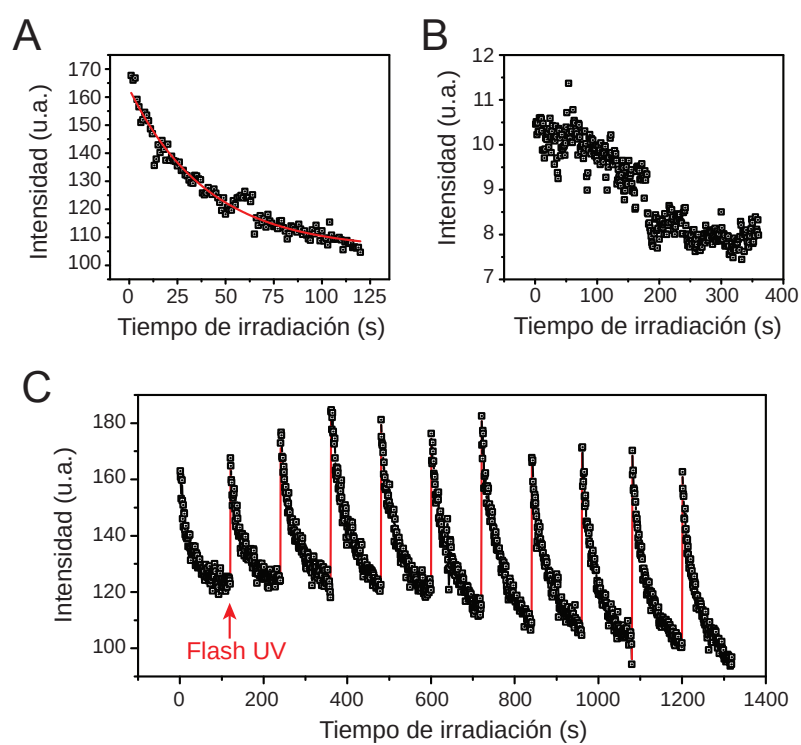


Figura 6.3: Intensidad de emisión vs. tiempo de irradiación durante fotoreversión en seco de **46** (A) y **47** (B) y durante fotociclos de **46** (C).

6.1.3 Polímeros y Microscopios

La fotoconversión de los DHAOs fue comprobada en una variedad de condiciones y en distintos microscopios. Se comprobó la fotoconversión de DHAOs (sin conjugar) depositados en cubreobjetos: sin aditivos; en una filmina de PVA (polivinilacetato); en una filmina de PMMA (polimetilmetilacrilato); con distintos aceites usados para montar muestras biológicas. En todos los casos, los resultados fueron los mismos: los DHAOs libres fotoconvierten reversiblemente. También se utilizaron dos microscopios distintos (uno confocal y otro de campo amplio) con los mismos resultados, y velocidades de fotoconversión dependientes de la intensidad de la luz disponible a través del objetivo. Por ejemplo, en el microscopio de campo amplio desarrollado por los Lic. Federico Barabas y Lic. Luciano Masullo del grupo de Nanofísica Aplicada del Centro de Investigaciones en Bionanociencias, la intensidad de luz disponible era mucho mayor, resultando en una fotoreversión muy veloz del DHAO **11** (Figura 6.4). El DHAO se activaba con un pulso corto de luz UV y se desactivaba en apenas unos segundos de irradiación visible. Las condiciones de irradiación se pueden modificar por ende para adecuar la velocidad de fotoconversión al experimento a realizar: fotociclación o fotoreversión lenta permiten minimizar la cantidad de luz que recibe la muestra y conseguir estados parcialmente fotoconvertidos de los DHAOs; fotoconversión rápida permite realizar muchos fotociclos en poco tiempo.

6.2 Agregación de α -Sinucleína

En el Capítulo 4 se describió la estructura de la α -sinucleína, una proteína involucrada en la formación de agregados amiloides llamados cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson. La α -sinucleína está compuesta por 140 aminoácidos y es intrínsecamente desordenada en solución. La estructura primaria se puede subdividir en dos secciones según su interacción con membranas lipídicas:^{162;163} aproximadamente los primeros 97 aminoácidos N-terminales están involucrados en la formación de estructuras tipo α -hélice en contacto con una membrana

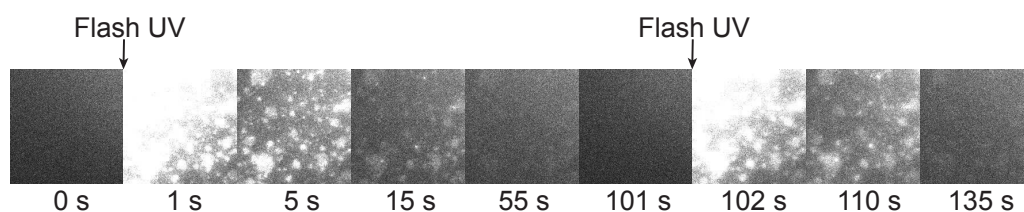
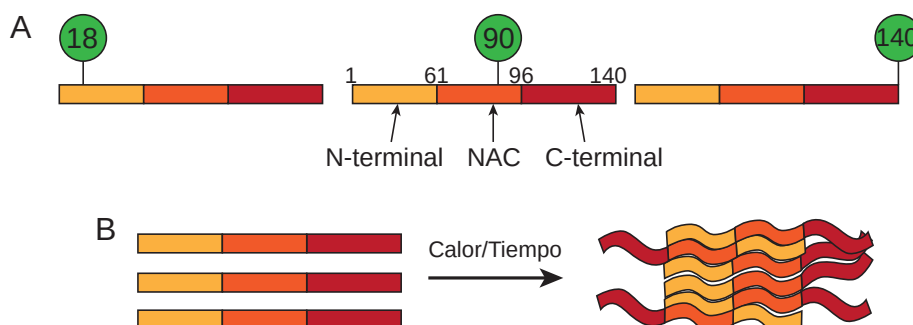


Figura 6.4: Imágenes de DHAO **11** en una filmina de PMMA durante fotoreversión con luz visible intensa y fotociclación con luz UV en pulsos cortos.

fosfolipídica, mientras que los restantes aminoácidos C-terminales no adquieren estructura secundaria, y presentan una interacción débil con la superficie de la membrana debido a su carga relativamente negativa. De los aminoácidos 1-97, los primeros 25 residuos se caracterizan por su fuerte interacción con membranas¹⁶⁴ mientras los residuos 26-97 son más sensibles a la naturaleza de la membrana y determinan la afinidad de la α -sinucleína por la misma. Los residuos 61-95 componen la región denominada NAC (componente que no forma amiloides- β), implicada en la agregación de la proteína.

En las neuronas de pacientes, la α -sinucleína se agrega formando fibras caracterizadas por estructuras tipo hoja- β que eventualmente llevan a la formación de cuerpos de Lewy. El proceso de agregación, los distintos oligómeros que se puedan formar en el proceso y su toxicidad relativa sigue generando discordia al día de hoy,^{165;166;167;168} siendo compleja la caracterización de estas especies intermedias y la reproducción de condiciones fisiológicamente representativas. Dentro de las técnicas de análisis de la agregación se destacan las espectroscopías de resonancia (de spin nuclear^{164;169} y electrónico¹⁷⁰), las microscopías de fuerza atómica¹⁶⁵, de fluorescencia^{166;171} y de electrones,¹⁷² y la fluorescencia como reportero de las condiciones de entorno,^{162;173;174} de distancias entre residuos mediante FRET,^{175;176} ó de formación de fibras.¹⁷⁷ El uso de fluoróforos solvatocrómicos o ratiométricos sensibles como sondas de polaridad del entorno pueden proporcionar información sobre las interacciones entre monómeros previas a la formación de fibras ordenadas.¹⁷³ En este contexto, los DHAOs solvatocrómicos desarrollados en el Capítulo 2 son de interés, ya que proveen sensibilidad al entorno, complementado con su fotoconversión apta para microscopías de super-resolución.

En la Sección 4.6.2 del Capítulo 4 se detalló la conjugación de tres mutantes de cisteína de la α -sinucleína, en posiciones 18, 90 y 140, a DHAOs con grupos funcionales tipo maleimida. Se puede observar en el Esquema 6.2 que las tres posiciones se encuentran en cada una de las tres regiones de interés de la α -sinucleína: N-terminal, región NAC y C-terminal. Al



Esquema 6.2: A) Mutantes cisteína de α -sinucleína marcadas con DHAO solvatocrómico 40 y regiones de interés. B) Agregación de α -sinucleína.

formar fibras, las regiones N-terminal y NAC forman estructuras tipo hoja- β que interaccionan fuertemente vía fuerzas Van der Waals, mientras que la región C-terminal retiene su libertad conformacional. Oligómeros intermediarios en el proceso de agregación probablemente presenten interacciones entre las tres regiones distintas a los monómeros libres en solución o a las fibras, y sondas que sean capaces de reportar condiciones de entorno pueden servir para identificar los estadios de formación de estas especies.

6.2.1 Agregados de α -sinucleína en solución

Para evaluar el desempeño de los DHAO como sondas para esta aplicación, las mutantes de α -sinucleína marcadas con el DHAO solvatocrómico **40** (conjugados **41**, **42** y **43**) se sometieron a condiciones favorables para la agregación y se evaluaron las propiedades fotoquímicas de los agregados. Se mezclaron muestras de las tres mutantes marcadas con DHAO parcialmente fotoactivado junto con α -sinucleína *wildtype* (nativa, sin modificaciones) en una relación 5:95 tal que la agregación no sea influenciada por la presencia de la sonda, en buffer de fosfato a pH 7,14 y con una concentración total de proteína de 0,1 mM. Las soluciones se incubaron en la oscuridad durante 7 horas mezclando a 1250 rpm a 70°C, y luego durante la noche a 37°C.

Se midieron los espectros de emisión de las muestras a distintos tiempos retirando las mismas del agitador momentáneamente. Los espectros de emisión del DHAO al inicio del experimento, después de 5 hs y al cabo de 20 hs se muestran en la Figura 6.5. Se puede observar para todas las posiciones que la banda de emisión se desplaza hacia el azul en el primer período de agregación, indicando un entorno menos polar de las sondas que el inicial, y luego la fluorescencia disminuye y predomina la dispersión al formarse las fibras.

Al cabo de 20 hs se centrifugaron las muestras para precipitar las fibras y se removió el sobrenadante. Luego el precipitado se resuspendió dos veces en buffer de fosfato,

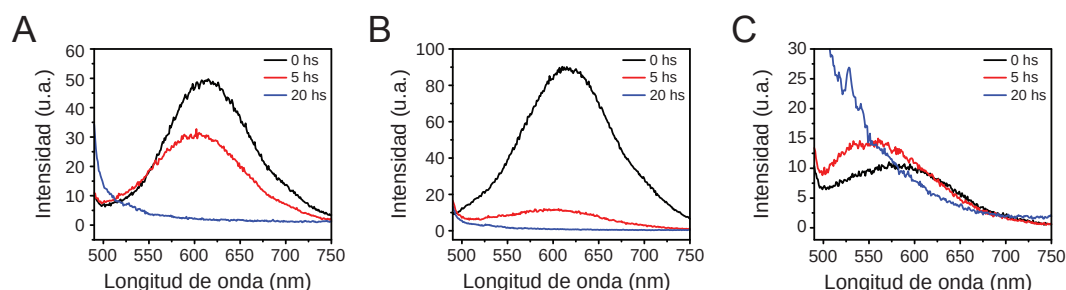


Figura 6.5: Espectros de emisión del DHAO en las mutantes de α -sinucleína **41** (A), **42** (B) y **43** (C) durante agregación.

centrifugando y removiendo el sobrenadante nuevamente para retener únicamente los agregados de peso molecular mayor. Las fibras se resuspendieron finalmente con un volumen de buffer de fosfato equivalente al volumen original de la solución, y sus propiedades espectroscópicas y fotoquímicas se evaluaron de la misma manera que se estudiaron para todos los fluoróforos en los Capítulos 2 y 4. Los espectros de absorción y emisión de las fibras resuspendidas se pueden apreciar en la Figura 6.6, antes y después de someter las muestras a fotoconversión con luz UV y visible. Los espectros de absorción muestran una dispersión importante, ocultando el perfil normal del DHAO, mientras que los espectros de emisión son de una intensidad muy baja, más de 10 veces menor a la intensidad de emisión de

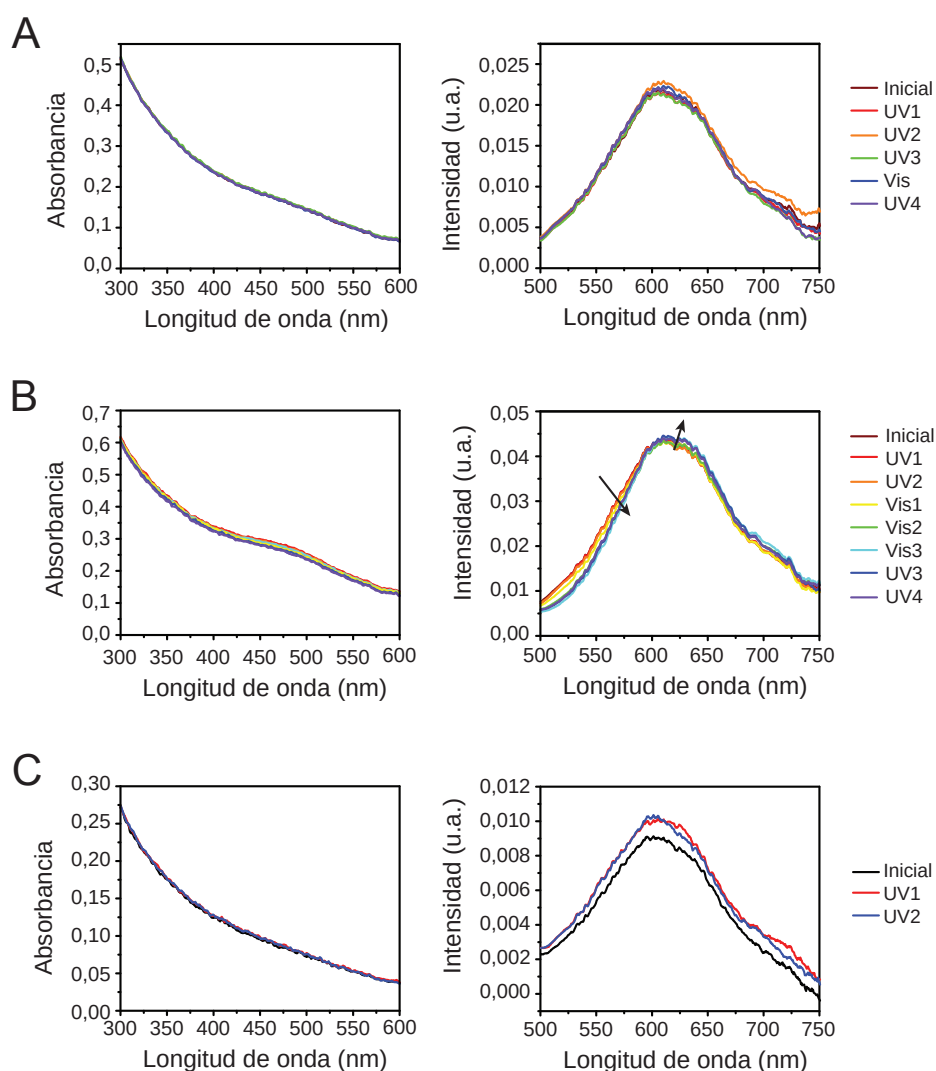


Figura 6.6: Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) del DHAO en agregados de α -sinucleína con **41** (A), **42** (B) y **43** (C) antes y después de fotoconversión con luz UV y/o visible.

los monómeros de α -sinucleína en solución. Los espectros no muestran cambios apreciables en el caso de las mutantes en posición 18 y 140 (Figura 6.6A y C). Aquellos correspondientes a la posición 90 presentan pequeños cambios, donde la absorbancia disminuye sin importar la longitud de onda de irradiación, y el espectro de fluorescencia cambia en intensidad y se desplaza hacia mayor longitud de onda. Sin embargo, estos cambios no se correlacionan con la naturaleza de la irradiación de la manera esperada para un fenómeno de fotoconversión del DHAO, indicando que los fluoróforos o bien se encuentran rodeados de agua o bien están estéricamente restringidos y no pueden isomerizar. Este resultado fue inesperado, ya que la naturaleza hidrofóbica del centro de las fibras (compuesta por la región NAC principalmente) se anticipaba que proporcionaría un entorno favorable para los DHAO en las posiciones 18 y 90 al menos.

6.2.2 Agregados de α -sinucleína en seco

De los agregados descritos en la Sección previa se tomaron 3 μL y se depositaron en cubreobjetos de vidrio, preparando muestras secas y embebidas en Mowiol para el microscopio tal como se detalló en la Sección 6.1. Las muestras se fotoactivaron con un flash de UV, y se tomaron imágenes de la misma durante irradiación con luz visible, al igual que para los DHAOs libres. Las intensidades de las muestras secas durante fotoreversión se grafican en la Figura 6.7, para los agregados de **41**, **42** y **43**, y para agregados de **44** y **45**, generados de la misma manera que los conjugados solvatocrómicos. Se observa un decaimiento aparentemente biexponencial de la intensidad de emisión con el tiempo de irradiación visible en todos los casos, exceptuando el agregado de **43**. Esto indicaría un proceso apreciable de fotodegradación, al igual que en el caso de los DHAOs libres (Sección 6.1.1), y/o la presencia de múltiples poblaciones de DHAOs, resultando en un decaimiento multiexponencial, que en caso ilustrado aparenta un proceso de dos componentes debido al limitado rango temporal. Varios procesos podrían estar vinculados, incluyendo: (1) distintas posiciones de la sonda en relación a los residuos de la proteína en diferentes conformaciones, generando más o menos interacciones; y (2) distintos microentornos de la sonda dependientes de la compleja relación proteína-solvente en el medio de inclusión Mowiol (un adhesivo hidrocoloidal en alcohol polivinílico) a medida que solidifica. La variación de la emisión de las fibras con **43** parece casi lineal (Figura 6.7C), y no se ajusta satisfactoriamente con una exponencial - se supone que en este caso la fotoreversión es prácticamente nula y únicamente hay un componente de fotodegradación. En comparación con los DHAO no solvatocrómicos, la fotoreversión de los DHAO solvatocrómicos es mucho más lenta. Sin embargo, se observa fotoreversión en todos los casos (exceptuando **43**), al contrario de las fibras en solución. Nuevamente la sustracción de agua del medio tiene un efecto positivo sobre la capacidad de fotoconversión de los DHAOs, incluso dentro de estructuras protéicas ordenadas.

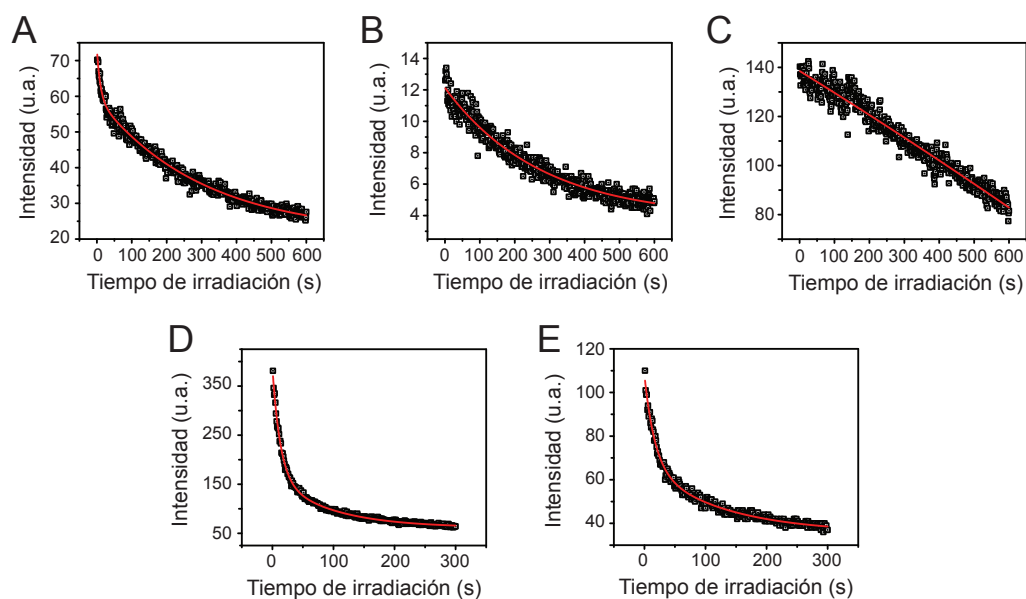


Figura 6.7: Intensidad de emisión de muestras secas de agregados de **41** (A), **42** (B), **43** (C), **44** (D) y **44** (E) durante fotoreversión. Los ajustes son biexponenciales.

6.2.3 Monitoreo de agregación en tiempo real

En la Sección 6.2.1 se registró un desplazamiento notorio de la emisión de la α -sinucleína al progresar la agregación. Se realizó entonces una nueva agregación de las mutantes marcadas con DHAO solvatocrómico, midiendo el espectro de emisión de la sonda en tiempo real. Se utilizó para este experimento un espectrofluorímetro adaptado con un sostén de cubetas con regulación térmica y agitación controlada diseñado por el Dr. Anthony De Vries. El dispositivo permitió definir las condiciones de agregación para todo el experimento y medir espectros de emisión con la menor perturbación posible. Se siguió un protocolo establecido en el laboratorio del Dr. Jovin para la agregación reproducible de α -sinucleína¹⁷⁸ utilizando cubetas de 5x5 mm de cuarzo con agitadores y tapones de teflon. Se mezclaron por separado las mutantes marcadas **41**, **42** y **43**, con α -sinucleína *wildtype* en proporción 5:95 y un volumen final de 400 μ L de buffer de fosfato con 0,02% NaN₃. La concentración total de proteína era 150 μ M. Las mezclas se ultracentrifugaron a 130 $\vec{kg}$ durante 1 hora para precipitar agregados pequeños que pudieran servir como semillas para la formación de fibras. Las muestras se irradiaron previamente con luz UV para llegar a un estado fotoestacionario intermedio, tal que la señal fluorescente fuese apreciable. Se preparó también una cuarta muestra con únicamente α -sinucleína *wildtype* y 5% de tioflavina-T (THT), un fluoróforo que reporta la formación de fibras, para servir como control de agregación. Excitando a 350 nm, se midieron los espectros de emisión de las muestras cada 30 minutos durante 24 horas con una agitación de 1200 rpm

aproximadamente y una temperatura constante de 70°C. Lamentablemente un error técnico invalidó los resultados de la agregación de la mutante **43**, con lo cual se presentan únicamente los datos relacionados con la sonda solvatocrómica en posiciones 18 y 90, y el control con THT.

Los espectros adquiridos se analizaron para extraer el corrimiento del máximo de emisión durante la agregación, y la variación de la intensidad de emisión para cada uno de los fluoróforos. Los resultados se pueden observar en la Figura 6.8. La intensidad de la emisión de THT muestra que la formación de fibras ocurre a partir de las 10 horas aproximadamente. Sin embargo, tanto el DHAO solvatocrómico en la posición 18 (**41**) como en la posición 90 (**42**) presentan cambios en su espectro de emisión alrededor de las 5 horas: la intensidad aumenta, y el máximo de emisión se comienza a desplazar hacia el azul. Ambos fenómenos significan una disminución de la polaridad del entorno, compatible con la formación de agregados que reduzcan la accesibilidad del agua a la sonda. Ya que el aumento de intensidad del THT no coincide con el cambio en las propiedades espectroscópicas de los DHAOs, significa que las sondas solvatocrómicas están detectando la formación de oligómeros previos a la formación de fibras, un fenómeno que se vió previamente con otras sondas fluorescentes (Yushchenko *et al*¹⁷³). Los resultados preliminares de las agregaciones de α -sinucleína usando los DHAO solvatocrómicos como sondas de polaridad son alentadores, y se requiere un trabajo más intenso para derivar conclusiones puntuales sobre la naturaleza de los agregados intermediarios que se forman.

6.3 Microscopía de arreglo programable con DHAOs

En la Sección 1.4.2 de la Introducción se describió un microscopio de arreglo programable (PAM^{76;77}) capaz de aumentar la resolución de una imagen fluorescente mediante iluminación

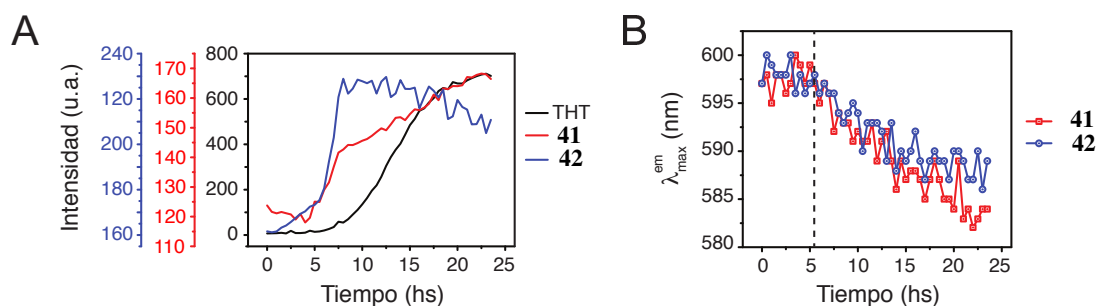
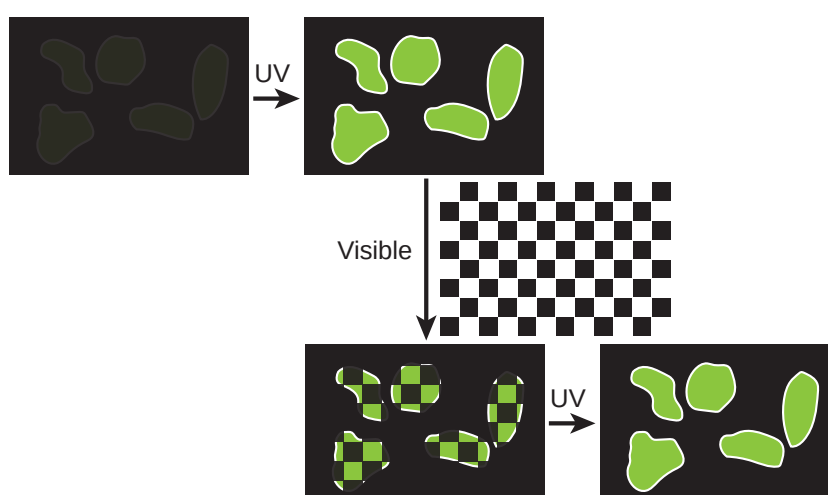


Figura 6.8: Intensidad de emisión (A) y longitud de onda de máxima emisión (B) durante la agregación de α -sinucleína con DHAO solvatocrómico en posición 18 (rojo), 90 (azul) y con THT (negro).

y detección estructurada. Una de las ventajas del PAM es la posibilidad de iluminar específicamente las áreas de interés de una muestra, reduciendo la fotodegradación de fluoróforos y el daño a la muestra. Combinado con la fotomodulación de la emisión de los DHAOs, se abren nuevas posibilidades para la microscopía de alta resolución.

En pos de evaluar el desempeño de los DHAOs como fluoróforos para microscopía celular, y de explorar la versatilidad del PAM, se realizaron experimentos de fotoconversión de neuronas marcadas con DHAOs. Este trabajo se realizó con la colaboración activa del Dr. Nathan Cook, Dr. Anthony De Vries, Dra. Vaishali Chakrabarti, Dra. Donna Arndt-Jovin y el Dr. Thomas Jovin, y se les agradece a todos especialmente por el esfuerzo conjunto. Se prepararon muestras de neuronas de hipocampo de rata, extraídas de ratas recién nacidas, depositadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina y crecidas en condiciones estériles. El día 2 las neuronas se marcaron con dos anticuerpos primarios, dirigidos a componentes importantes del citoesqueleto: conejo anti-Map 2 de rata, y conejo anti- β 3-tubulina de rata. Luego se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario **46** sintetizado previamente (Sección 4.6.2, Capítulo 4). Luego de optimizar las condiciones de tinción, se obtuvieron muestras densamente marcadas con el fluoróforo que se muestran a continuación.

El primer protocolo de irradiación de las muestras de neuronas se puede observar en el Esquema 6.3. Comenzando con una muestra oscura (DHAOs desactivados), se activa la emisión de los fluoróforos con irradiación UV. Luego, de manera similar a aquella usada previamente para medir la fotoreversión de las sondas en la Sección 6.1, se irradia la muestra con luz visible durante un tiempo determinado, tomando una secuencia de imágenes. La iluminación estructurada del PAM permite definir un patrón determinado, por ejemplo un



Esquema 6.3: Protocolo 1 de irradiación para muestras de neuronas con el PAM.

arreglo de cuadrados tipo tablero de ajedrez, con el cual se pueden fotoconvertir selectivamente áreas definidas de la muestra. En el caso de este protocolo, se fotorevirtió la muestra con el patrón de tablero de ajedrez, tal que las áreas blancas se iluminaran con luz visible, y la negras no se irradiaran. En la Figura 6.9 se pueden apreciar las imágenes conjugadas y no-conjugadas del PAM al irradiar con un patrón de tablero de ajedrez. La imagen conjugada es la imagen que se registra en la cámara de la luz reflejada de los pixeles que están «encendidos», mientras que la imagen no-conjugada corresponde a los pixeles «apagados». Se observa entonces que el patrón de ajedrez está a la inversa en la imagen no-conjugada, y además la intensidad de la imagen no-conjugada es menor, al deberse justamente a luz dispersa. Al cabo de la secuencia de imágenes, los DHAOS en las partes blancas del patrón se desactivan, volviendo oscuras esas áreas de la muestra, mientras que las áreas negras permanecen fluorescentes. Al irradiar por último con luz UV nuevamente, se vuelven a activar todas las áreas de la muestra, volviendo al estado original.

El protocolo se aplicó a una muestra de neuronas, obteniéndose las imágenes que se observan en la Figura 6.10. La muestra fotoactivada previamente con luz UV se fotorevirtió selectivamente con el patrón de ajedrez durante 20 segundos, y luego durante otros 40 segundos. Se puede observar en las imágenes correspondientes en la Figura 6.10 la naturaleza cuadrículada de la fluorescencia de la muestra, luego de las irradiaciones. Se comprobó que el decaimiento de la intensidad durante la irradiación con luz visible correspondiera a la fotoreversión de la muestra analizando nuevamente la intensidad de las imágenes durante la irradiación (Figura 6.11). La curva se ajusta bien a una función bi-exponencial debido a la fotoreversión y también fotodegradación de la muestra, al igual que los conjugados con anticuerpos **46** y **47** detallados en la Sección 6.1.2. Aunque se irradiaba solamente en los cuadrículos «encendidos» del patrón, la luz dispersa genera fotoreversión también en las áreas «apagadas» de la muestra. La intensidad promedio del cuadrículo central «apagado» disminuye de 160 cuentas a 154 después de 20 segundos y a 132 luego de otros 40 segundos

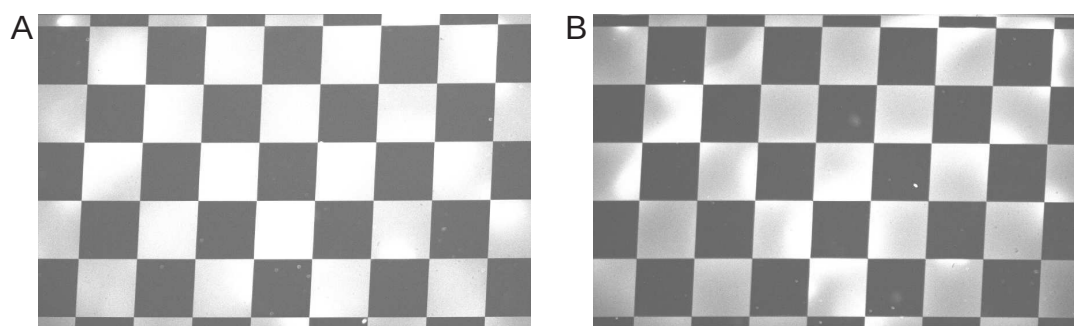


Figura 6.9: Imágenes conjugada (A) y no-conjugada (B) de la muestra de neuronas iluminadas con un patrón de ajedrez.

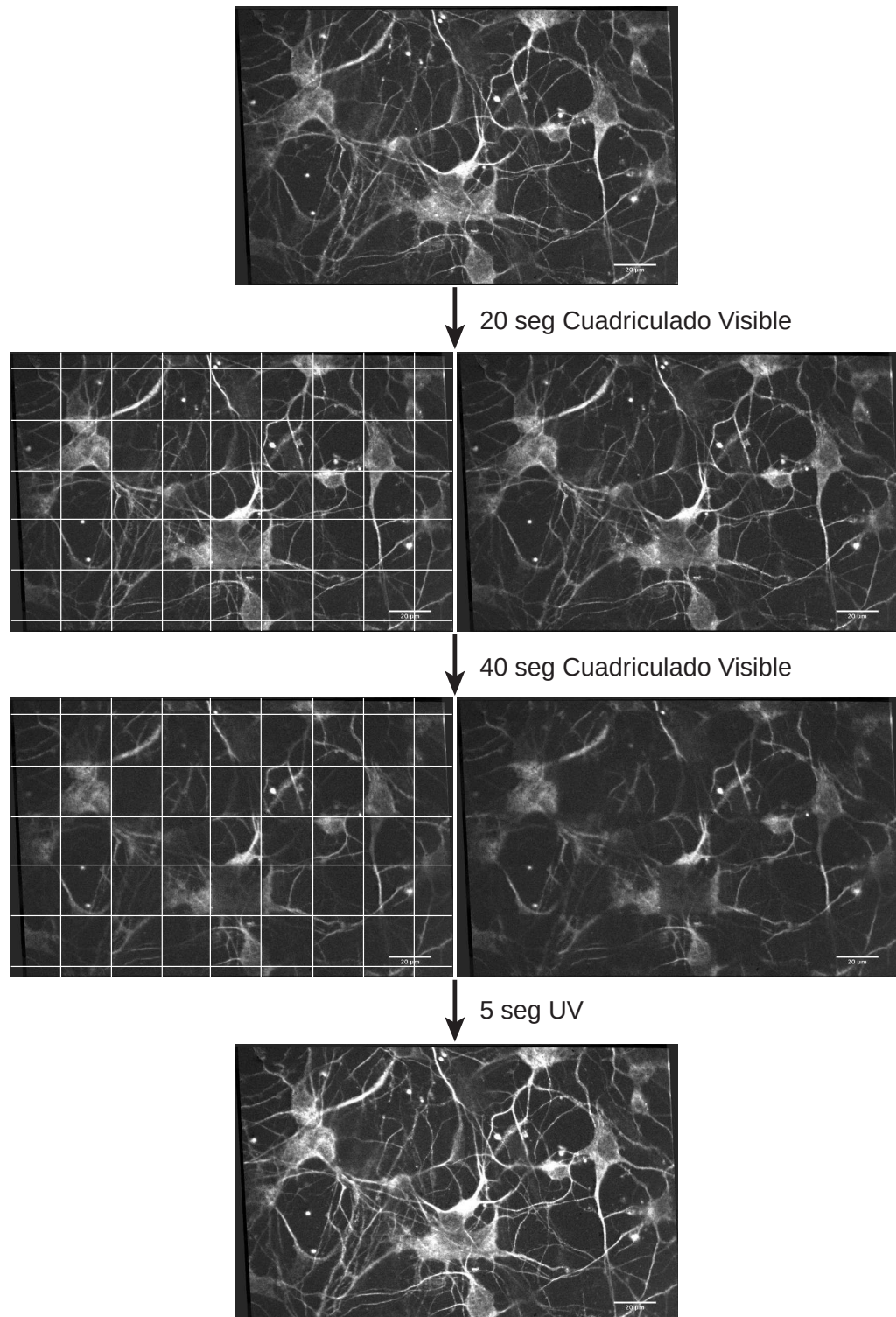


Figura 6.10: Secuencia de imágenes de neuronas de hipocampo durante fotoreversión con un patrón de ajedrez y fotoactivación con luz UV. El cuadrulado superpuesto sobre las imágenes fotorevertidas a la derecha resalta las áreas fotorevertidas.

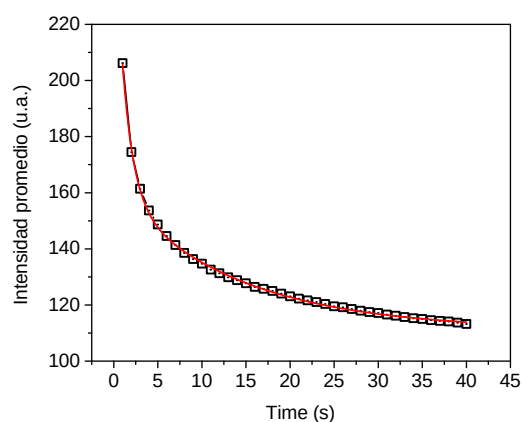


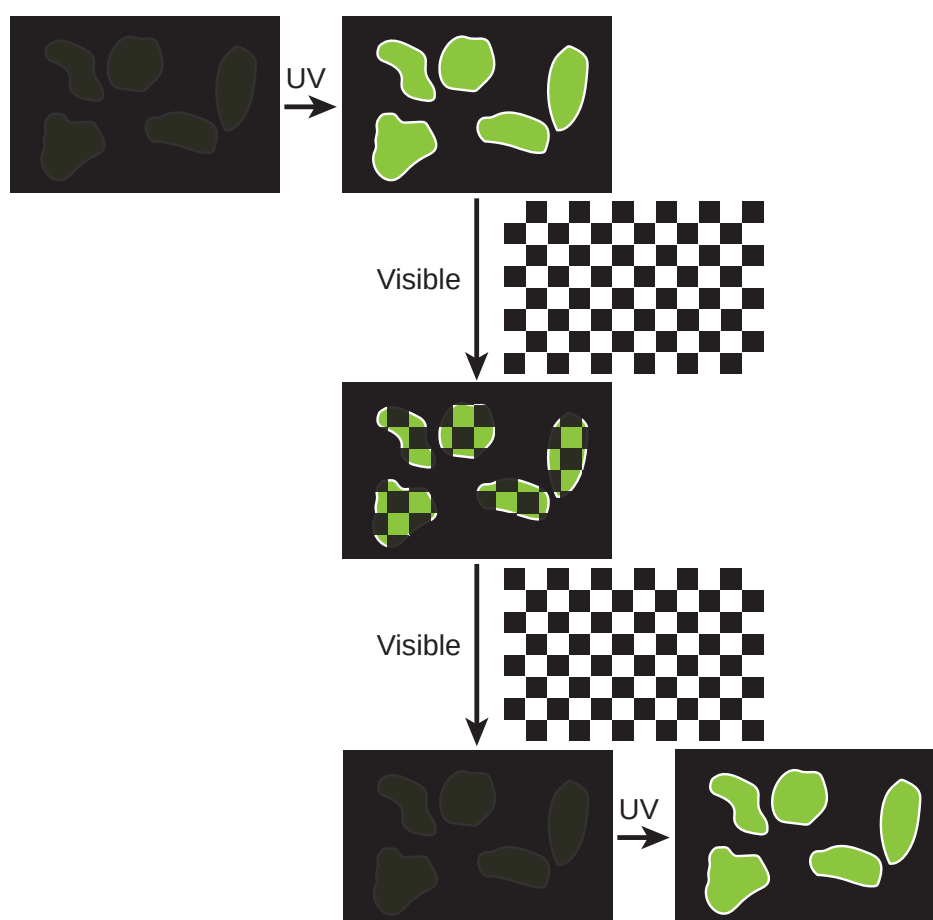
Figura 6.11: Intensidad promedio de la imagen vs. tiempo de irradiación con el patrón de ajedrez de luz visible de la muestra de neuronas de hipocampo.

de fotoreversión. Es decir, en el tiempo que se requiere para fotorevertir casi completamente las áreas pretendidas de la muestra, las áreas no-irradiadas pierden casi un 20% de su intensidad inicial. Al irradiar luego con luz UV de forma pareja, los DHAO abiertos se vuelven a fotociclar, restaurando la fluorescencia de toda la muestra. Efectivamente los DHAOs se fotoconvierten de manera esperada en las neuronas fijadas.

Se aplicó un segundo protocolo para fotorevertir secuencialmente las áreas del cuadriculado (Esquema 6.4). El comienzo es idéntico al protocolo 1, y luego de la primera fotoreversión con el patrón de ajedrez, se irradió la muestra con el mismo patrón pero invertido. De esta manera, se comprobaría que áreas inicialmente no-irradiadas se podían fotorevertir por separado. En la Figura 6.12 se pueden observar las imágenes correspondientes a este protocolo de irradiación, nuevamente con el cuadriculado superpuesto para facilitar el análisis. Se puede apreciar un patrón leve de ajedrez de fotoreversión luego de 40 segundos de irradiación visible, pero la muestra parece homogéneamente activada luego de otros 40 segundos con un patrón inverso, habiendo fotorevertido por igual a todas las áreas de la muestra. Se consigue activar nuevamente a los DHAOs irradiando de forma pareja con luz UV.

6.4 Conclusión parcial de aplicaciones

En este Capítulo se describieron dos aplicaciones puntuales de los DHAOs en contextos biológicos: sondas de polaridad para la detección de agregados tempranos de α -sinucleína; y sondas fluorescentes y fotoconvertibles para microscopía celular. El trabajo detallado es



Esquema 6.4: Protocolo 2 de irradiación para muestras de neuronas con el PAM.

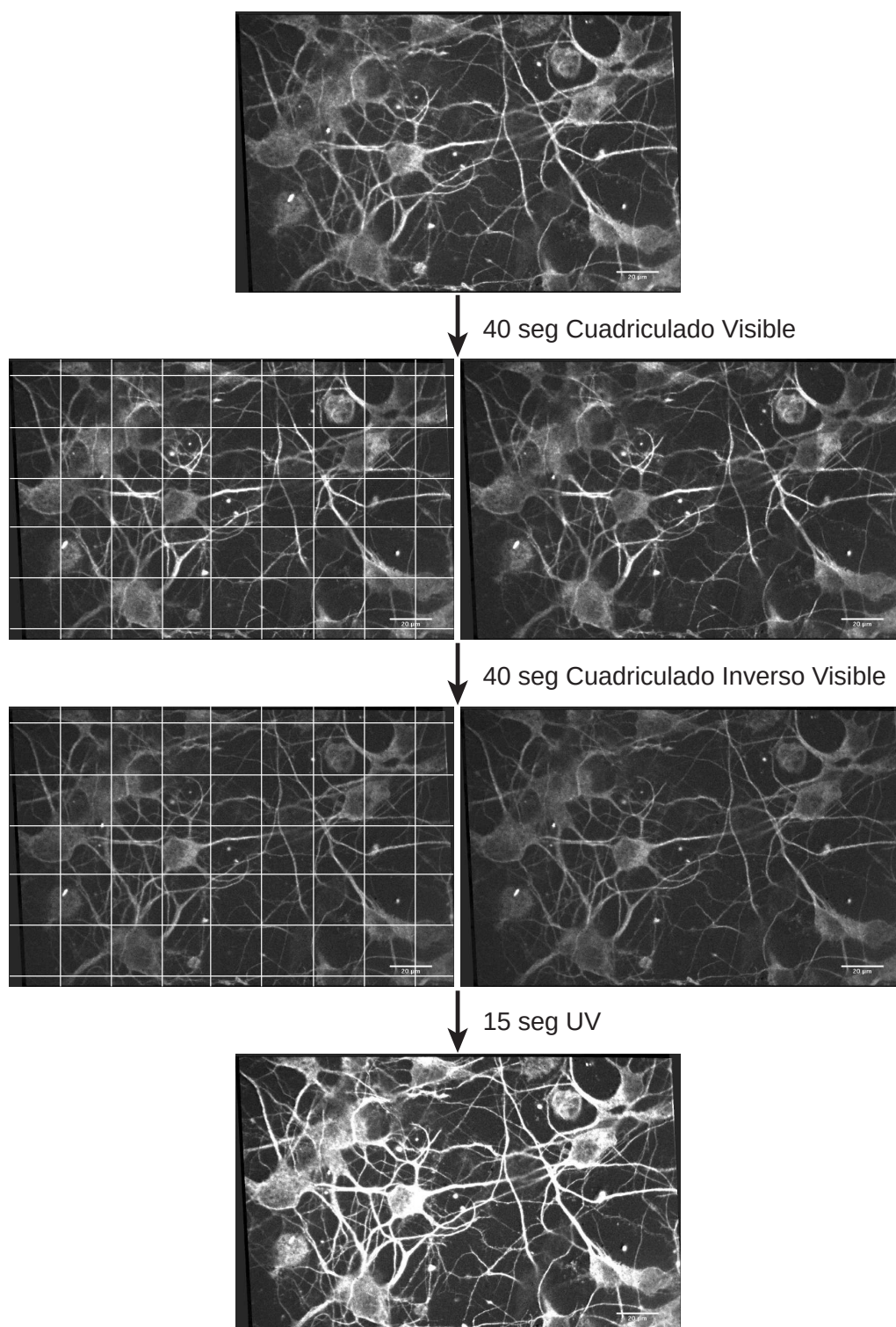


Figura 6.12: Secuencia de imágenes de neuronas de hipocampo durante dos fotoreversiones secuenciales e inversas con un patrón de ajedrez y fotoactivación con luz UV. El cuadriculado superpuesto sobre las imágenes fotorevertidas a la derecha resalta las áreas fotorevertidas.

solamente un acercamiento a las posibles aplicaciones, y de ninguna manera un estudio exhaustivo de las propiedades y limitaciones del uso de DHAOs en las mismas.

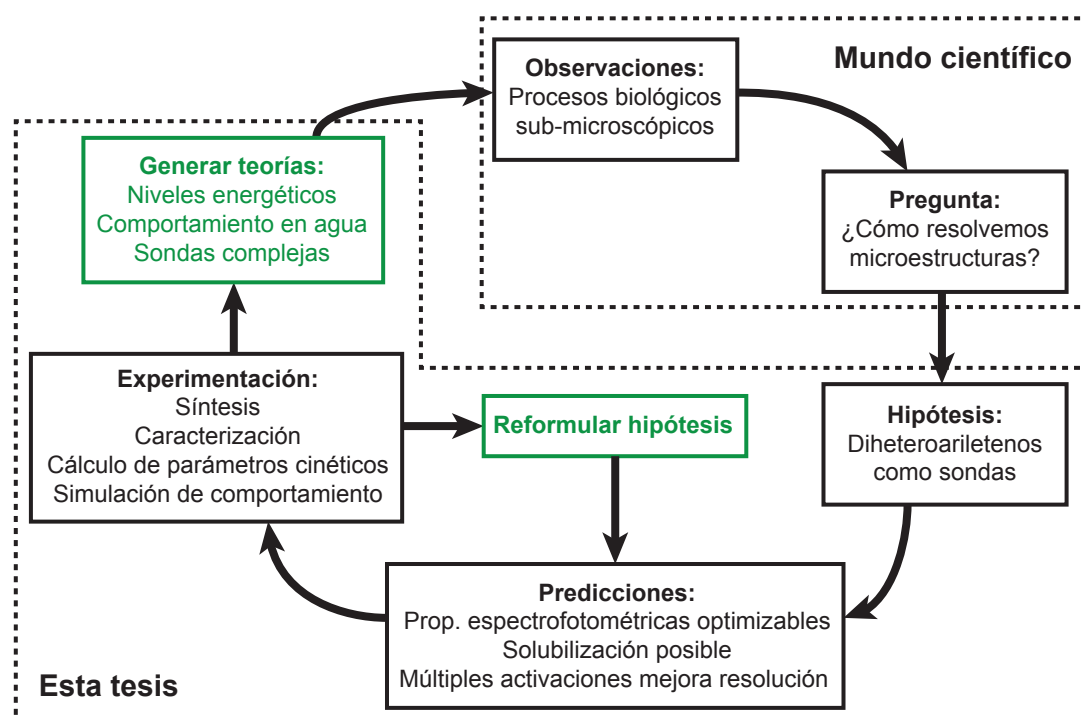
Los experimentos presentados en el Capítulo 4 mostraron que en definitiva el agua es el elemento limitante para el buen desempeño de los DHAOs en términos de fluorescencia y fotoconversión. Mientras la α -sinucleína y el anticuerpo libres no proporcionaron un entorno adecuado para la fotoconversión de los fluoróforos, se anticipaba que las fibras de α -sinucleína sí lo harían, gracias a la naturaleza hidrofóbica de las mismas. Sin embargo, tampoco las fibras lograron proteger los fotocromicos del agua, con lo cual la fotoconversión se puede aprovechar en condiciones no-acuosas para estos derivados de DHAO.

A pesar del bajo rendimiento cuántico de fluorescencia en soluciones acuosas, el DHAO solvatocrómico sirvió para monitorear la polaridad del entorno de distintas posiciones de la α -sinucleína durante su agregación, revelando la clara formación de especies intermedias varias horas antes de la formación de fibras maduras. Aunque en solución no fotoconvierten los DHAOs, se podrían observar alícuotas de α -sinucleína a distintos tiempos de agregación bajo el microscopio, tal de obtener información tanto super-resolutiva gracias a la fotoconversión, como de polaridad gracias a la solvatocromicidad de la sonda. La agregación de la α -sinucleína no es tampoco el único proceso que se podría estudiar con sondas de estas características, sino que clasifica cualquier proceso que implique un cambio en polaridad local con dimensiones del orden de 10Å.

Al evaluar el comportamiento de las proteínas conjugadas bajo el microscopio, y sin la presencia del agua, nuevamente se recuperaron las propiedades normales de los DHAOs. Tanto los conjugados libres, como las fibras de α -sinucleína y los anticuerpos secundarios unidos a sus blancos en muestras neuronales presentaron fluorescencia y fotoconversión. A diferencia de los fluoróforos en solución, bajo el haz del microscopio los DHAOs presentan una fotodegradación mayor, demostrado por la naturaleza biexponencial del decaimiento de intensidad con el tiempo de irradiación. La naturaleza bi-exponencial puede también estar indicando la presencia de más de una clase de DHAO unido a la proteína, con entornos distintos que produce decaimientos distintos. Afortunadamente, la fotodegradación se puede minimizar reduciendo la intensidad con la cual se irradia la muestra, aunque esto llevaría a tiempos más largos de fotoreversión. Los experimentos de fotoconversión en el PAM mostraron que se puede fotoconvertir y excitar selectivamente distintas áreas de una muestra, reduciendo todavía más la fotodegradación en sectores de la muestra que no interesan o que se quieran preservar. El grado de fotoconversión de cada área iluminada se puede controlar con la cantidad de luz UV que se utiliza para activar los DHAO, con lo cual se puede obtener una baja densidad de fluoróforos encendidos minimizando la luz de fotociclación, y lograr un aumento de la resolución de manera similar a aquella utilizada en las técnicas de STORM o PALM.

Se requiere, naturalmente, indagar más profundamente en las técnicas detalladas para mejorar las mismas y aprovechar al máximo las propiedades de los DHAOs. Las aplicaciones presentadas en este Capítulo, aunque sean preliminares, son un importante paso hacia la demostración de la utilidad de los DHAOs en el contexto de problemas biológicos y físicos.

Conclusiones



Esquema 7.1: El método científico¹⁷⁹ aplicado a este trabajo de tesis.

Al comienzo de esta tesis se propuso modificar los diheteroariletenos fluorescentes (DHAOs) con tal de cumplir con los requisitos de los métodos modernos de microscopía de fluorescencia de alta resolución. Como se aprecia en el Esquema 7.1, esta hipótesis surge de una inquietud actual del mundo científico: cómo resolver estructuras por debajo del micrómetro, para poder observar procesos biológicos sub-microscópicos. Para verificar la hipótesis de que los DHAOs podrían servir como sondas fluorescentes para la microscopía celular, se identificaron los

desafíos y se propusieron estrategias adecuadas para sobrellevarlos. Una intensa fase de experimentación, incluyendo síntesis y caracterización de derivados de DHAOs, un análisis fotoquímico integral y, en el caso de la propuesta de múltiples activaciones, simulación del comportamiento de las sondas, llevó a la reformulación de la hipótesis original y el mejoramiento de las predicciones y propuestas para lograr el objetivo. Finalmente, se generaron teorías respecto a los niveles energéticos de los DHAOs y el efecto de sustituyentes, la susceptibilidad de los DHAOs al agua, y el aumento de resolución posible mediante el uso de las sondas complejas diseñadas.

En el esquema del método científico detallado, mientras las instancias negras indican momentos de creatividad y formulación de propuestas, las instancias verdes indican momentos de evaluación y formulación de conclusiones. Las conclusiones evalúan el éxito relativo y la trascendencia del trabajo realizado dentro del marco de la hipótesis original y el estado del arte a nivel mundial. Mientras se elaboraron conclusiones breves al final de cada capítulo de esta tesis, este último capítulo repasaré los objetivos, los logros, las limitaciones y las implicaciones de cada proyecto en mayor detalle.

7.1 Acerca del efecto sustituyente y la solvatocromicidad

El objetivo de sustituir los DHAOs con grupos dadores y aceptores de electrones fue de optimizar mediante esta modificación las propiedades espectrofotométricas para la microscopía celular: es decir, desplazar las longitudes de onda de absorción y emisión hacia el rojo, aumentar los rendimientos cuánticos de emisión, y conocer la relación entre el carácter electro-dador del sustituyente y las velocidades de fotoconversión para adaptar las mismas a la técnica utilizada. Efectivamente, se lograron dos de estos objetivos: se descubrió que sustituyentes electro-dadores desplazan los espectros hacia longitudes de onda mayores, y se encontró una relación lineal entre la constante de Hammett σ' y los rendimientos cuánticos de fotoconversión.

Sin embargo, la longitud de onda de la emisión y la constante de fotoreversión están íntimamente e inversamente relacionadas mediante la superficie de energía potencial de los isómeros del DHAO. Al estabilizar el estado excitado del isómero cerrado con grupos dadores de electrones, aumenta la energía de activación necesaria para fotorevertir el compuesto. Esto lleva a un compromiso en términos del uso de estos derivados en microscopía: o bien se valora la posibilidad de excitar al fluoróforo con energías menores, o bien se retiene la fotoreversibilidad. Para aplicaciones donde se requiera únicamente fotoactivar el fluoróforo, para luego extinguir permanentemente la fluorescencia por fotodegradación (por ejemplo PALM), sustituyentes dadores de electrones son ideales. Para aplicaciones donde

se requiera por ejemplo medir repetidamente la muestra a distintos intervalos temporales, sustituyentes atractores de electrones son más convenientes, presentando velocidades de conversión mayores.

En todos los casos, dado que el sustituyente no afecta apreciablemente la longitud de onda de absorción del isómero abierto, se deben fotociclar los DHAOs con luz UV. Aunque los rendimientos cuánticos de fotociclación son muy altos y se requiere poca luz para fotoactivar los compuestos, el uso del UV sigue siendo una limitación para la microscopía celular. Esta propiedad se debe resolver modificando de otra manera la estructura del DHAO, utilizando por ejemplo: sustituyentes que extiendan todavía más la conjugación del sistema π del isómero abierto; sustituyentes en otras posiciones del anillo aromático; ó heteroarilos de otra naturaleza.

Otra limitación del uso de sustituyentes para optimizar los fluoróforos es que el rendimiento cuántico de fluorescencia no es afectado por la naturaleza de los mismos. En el Capítulo 4 se trabajó entonces con derivados de DHAOs con grupos etilo en los carbonos reactivos, que tienen rendimientos cuánticos más cercanos a 1.

La solvatocromicidad inesperada pero lógica de los DHAOs con grupos dadores de electrones adiciona una propiedad llamativa a la combinación de emisión y fotoconversión existente. La estabilización del estado excitado del isómero cerrado por este tipo de grupos es debido a la mayor densidad electrónica del centro reactivo en comparación con los extremos del DHAO, polarizando el fotocromico y volviéndolo susceptible a la dipolaridad del solvente. Mientras esta propiedad se consigue únicamente a costo de la fotoreversibilidad del DHAO, la generación de un fluoróforo fotoactivable y solvatocrómico es novedoso en sí. Adicionalmente, aunque no haya sido uno de los objetivos iniciales, la solvatocromicidad es una nueva dimensión que se cobró relevancia en los Capítulos 4 y 6, y que se puede tener en cuenta para aplicaciones futuras.

Las relaciones cuantificadas entre la naturaleza del sustituyente, las propiedades espectrofotométricas y fotoquímicas, y el efecto del solvente se pueden utilizar para el diseño de nuevos fluoróforos derivados de los DHAOs. Permiten estimar el comportamiento de fluoróforos asimétricos, que aprovechen las propiedades que le otorgan ambos sustituyentes, o de fluoróforos que combinen los DHAOs con fotocromicos de otra naturaleza. Los estudios realizados contribuyen a la relativamente acotada literatura disponible actualmente sobre los DHAOs.

7.2 Acerca de la solubilización de DHAOs en agua

Las estrategias de solubilización evaluadas se pueden dividir en tres categorías: aquellas que no solubilizaron los DHAOs, aquellas que los solubilizaron efectivamente en agua, y aquellas

que solubilizaron y conservaron las propiedades fotoquímicas de los fluoróforos. La diferencia entre las primeras dos categorías parecería depender del tamaño de la entidad soluble a la cual se adsorbe o conjuga el compuesto (ciclodextrina vs. BSA, α -sinucleína o anticuerpos) o bien del carácter hidrofílico que tiene el mismo DHAO (no-modificado vs. modificado con glucosas). Lo que destaca la tercera categoría es el grado de protección del centro reactivo del solvente acuoso (adsorción a la superficie de BSA vs. inclusión en la cavidad de FABP), y factores no-fotoquímicos que afecten la factibilidad de las fotoconversiones (ej. tensiones entre entidades protéicas). La resistencia a fatiga de los DHAOs solubilizados con estrategias de la tercera categoría sorprendentemente no depende del grado de labilidad de la unión entre el DHAO y la proteína involucrada, sino que la fotodegradación es considerable tanto para la inclusión y como para la conjugación.

El conjunto de las observaciones indica que mientras la polaridad del solvente afecta el desempeño de los fluoróforos, es el agua en sí el que tiene interacciones específicas desfavorables con el centro reactivo y que impide conservar sus propiedades fotoquímicas. Mientras las interacciones todavía no se identificaron, se puede estimar que están relacionadas en forma directa con los centros sulfona, ya que diheteroariletenos no oxidados solubilizados con monosacáridos fotoconvierten libremente. En términos de su utilización en microscopía, la falta de fotoconversión en proximidad con el agua es una limitante para técnicas *in vivo*, por ejemplo, pero no restringe las posibilidades dentro de los métodos no-acuosos, como se demostró en el Capítulo 6.

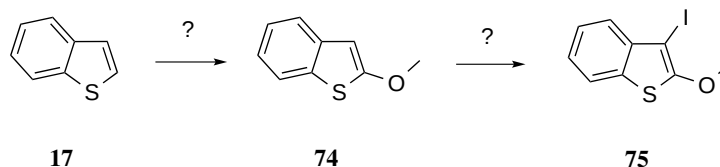
Es importante destacar en esta Sección que los experimentos de fotoconversión realizados para los DHAO control, modificados con glucosa y adsorbidos a BSA, que involucraron estudios sistemáticos de mezclas de solventes, no se podrían haber logrado sin el espectrofotómetro y fotomodulador construido previamente (Capítulo 3). Mientras con el equipo diseñado los experimentos se pudieron realizar en tiempos cortos y sin necesidad de estar atento al instrumento durante la medición, obtener la misma cantidad de datos con los espectrofotómetros y lámparas comerciales por separado hubiera sido enteramente impráctico.

Las estrategias exploradas cubren un campo amplio de técnicas de solubilización uni-molecular de los DHAOs. De extender la lista de estrategias sería recomendable poner el foco en la inclusión en cavidades protéicas, particularmente en cavidades grandes donde el DHAO se pueda acomodar en su totalidad y reducir la labilidad conjugando directamente el fluoróforo a la cavidad. Por supuesto que para la microscopía de super-resolución, el tamaño de la sonda no es irrelevante, e incluir el DHAO en una cavidad implica un aumento del tamaño de fluoróforo a varios nanómetros. Sin embargo, de exitosamente solubilizar y conservar en agua las propiedades fotoquímicas y resistencia a fatiga de los DHAOs, el compromiso del tamaño de la sonda no resultaría tan grave para ciertas aplicaciones, dadas las excepcionales propiedades de los fluoróforos.

7.3 Acerca del concepto de múltiples activaciones

Una de las motivaciones principales de esta tesis fue poder crear nuevas sondas fluorescentes basadas en los DHAOs cuyas propiedades fotoquímicas permitieran desarrollar metodologías microscópicas que aumentaran la resolución, no mediante desarrollos físicos u ópticos sino específicamente mediante la modulación química de la emisión de los fluoróforos. Es decir, que las mismas propiedades de los fluoróforos determinaran la resolución sin requerir grandes modificaciones instrumentales ni manipulación posterior de los datos. La propuesta de múltiples activaciones desarrollada cumple este objetivo, teóricamente aumentando la resolución en las tres dimensiones. Particularmente el aumento de la resolución axial es de interés, ya que actualmente las técnicas que mayor resolución alcanzan fallan en este tercer eje.

Mientras el fluoróforo propuesto (**73**) presenta una fotoquímica compleja, la síntesis es relativamente sencilla, dado que la mayoría de las reacciones están establecidas previamente. Se intentó sintetizar este compuesto, una vez definido el mismo mediante las simulaciones que el comportamiento sería el requerido, pero debido a restricciones temporales no se logró obtener. En particular, son dos los pasos de reacción a resolver para lograr su síntesis (Esquema 7.2): la metoxilación del benzotiofeno y su posterior iodación. El compuesto **74** se podría



Esquema 7.2: Síntesis a resolver del precursor **75**.

obtener mediante una reacción organolítica del benzotiofeno con butillitio, seguida de una iodación para instalar un buen grupo saliente en la posición 2 del heteroanillo. Luego se reemplazaría el yodo con un grupo metoxi mediante una sustitución nucleofílica. El siguiente paso para generar el compuesto **75** procedería en condiciones mas suaves que la iodación utilizada normalmente en esta tesis, con precursores con grupos metilo o etilo en la posición 2, debido al carácter activante del grupo metoxi. Una vez establecidas estas reacciones, la síntesis del resto del fotocromico doble sería idéntica a aquella descrita en la Sección 5.2 del Capítulo 5.

Al igual que todos los DHAOs en general, el compuesto doble **73** sería altamente insoluble en agua, y las propiedades fotoquímicas también serían incompatibles con el agua en caso de solubilizar con grupos hidrofílicos el mismo. Habría que aplicar la estrategia de inclusión

en una cavidad protéica a este fluoróforo con tal de solubilizar y conservar las propiedades del mismo en medios acuosos. Es importante notar que las dimensiones del compuesto **73** son grandes, a pesar de usar un espaciador aminoacídico corto entre las dos unidades de diheteroariletenos. De solubilizar con proteínas este fluoróforo, se obtendría una sonda con dimensiones cercanas a los 10 nm - un tamaño comparable con las nanopartículas fluorescentes, y un factor más a considerar al utilizarlo como sonda. Sin embargo, de la misma manera que los DHAOs individuales (Capítulo 6), el compuesto se podría aprovechar en condiciones no-acuosas (adicionando un grupo conjugable) sin la necesidad de alterar o complementar su estructura.

El próximo paso en el desarrollo de este concepto es la síntesis del compuesto **73**, la verificación de su comportamiento fotoquímico en solución y luego la evaluación del concepto de múltiple activación bajo el microscopio. La metodología detallada en la Sección 5.5 describe el experimento básico de irradiación y detección, y se requeriría finalmente un análisis de las imágenes producidas para comprobar el aumento de resolución en los tres ejes. Esta serie de experimentos constituiría el «proof of concept», la prueba del concepto, de múltiples activaciones como técnica de super-resolución.

7.4 Acerca de las aplicaciones biológicas

Las posibles aplicaciones biológicas de los DHAOs se definieron recién al finalizar el estudio de sus propiedades espectrofotométricas y su solubilización (Capítulos 2 y 4). El descubrimiento de la solvatocromicidad del DHAO **14** abrió la puerta a aplicaciones que aprovechen la capacidad de sensado de polaridad de este fluoróforo, mientras que los intentos frustrados de solubilización con conservación de la fotoquímica de los DHAOs limitaron las aplicaciones inmediatas a métodos no-acuosos.

Aunque se requieren más estudios de agregación de la α -sinucleína con la sonda solvatocrómica para discernir los cambios en polaridad que se detectan en cada posición de la proteína en cada momento de la agregación, los experimentos detallados en el Capítulo 6 son un punto de partida sólido que motivan la realización de experimentos futuros. Adicionalmente, existen otras proteínas que sufren procesos de agregación similares que también se podrían estudiar con esta misma sonda, así como otros fenómenos biológicos que involucran cambios en polaridad local (integración y transporte en membranas, por ejemplo). El color de la emisión agrega una dimensión más a la información microscópica, al igual que el tiempo de vida media del fluoróforo, y sumado a la fotoactivación del DHAO se pueden postular experimentos interesantes que combinen y aprovechen todas estas propiedades.

El uso de los DHAOs como sondas fotoconvertibles en muestras de neuronas es, según la literatura explorada, el primer ejemplo de la aplicación de los fluoróforos en muestras biológicas bajo el microscopio. Se comprobó que en condiciones no-acuosas (células fijadas y embebidas en medios poliméricos de montaje) y conjugadas a estructuras celulares los DHAOs fotoconvierten de manera esperada, obteniéndose buenas imágenes del citoesqueleto de las neuronas. Adicionalmente, se demostró la capacidad del PAM para fotoconvertir selectivamente los fluoróforos según su ubicación espacial, modulando de esta manera el grado de fotoconversión de regiones de la muestra. Nuevamente, los experimentos presentados son apenas un puntapié para el desarrollo de estas técnicas. Inclusive el aumento en resolución que se consigue en las imágenes obtenidas se debe hasta el momento a las capacidades del PAM, y no a la fotomodulación del DHAO. Sin embargo, la fotoconversión simple y rápida de los DHAOs en las muestras permite extrapolar las conclusiones, e inferir sobre la capacidad de los DHAOs de servir como sondas fluorescentes en técnicas similares al PALM, con fotoconversión sin fotodegradación, o al STORM, con fotomodulación de la emisión en vez de espontánea.

La aplicación exitosa de los DHAOs en la microscopía celular cumple el objetivo original de la tesis - la creación de sondas adecuadas para técnicas modernas de microscopía de fluorescencia. La propuesta de una nueva estrategia para aumentar la resolución mediante múltiples activaciones de un compuesto doble ofrece, además, una metodología para lograr super-resolución en tres dimensiones únicamente en base a las propiedades de los diheteroariletenos. El estudio de la solubilización provee un marco experimental para definir las áreas de utilidad de las sondas actuales, mientras que la optimización de las propiedades espectrofotométricas aporta una base de razonamiento para el diseño de nuevas sondas con propiedades fotoquímicas apropiadas para cada aplicación. En su conjunto, la investigación realizada en esta tesis contribuye sustancialmente al conocimiento actual de los DHAOs y su aplicación como sondas fluorescentes en microscopía de fluorescencia.

7.5 Reflexiones generales

Quisiera aprovechar este Capítulo de Conclusiones para agregar unas reflexiones generales propias sobre los años que invertí en este trabajo de doctorado.

Considero que la formación de un doctorado no incluye únicamente los componentes académicos y científicos, sino que además conlleva un crecimiento y aprendizaje personal que complementa estos aspectos. Durante los cuatro o cinco años de doctorado, los estudiantes aprendemos entre otras cosas a realizar búsquedas bibliográficas, a generar propuestas respaldadas por los antecedentes, a elegir los experimentos adecuados para comprobar las hipótesis, a evaluar críticamente los métodos y los resultados, y a razonar los éxitos y los fracasos dentro del marco teórico y experimental. Pero también aprendemos a planificar los tiempos, a optimizar la designación de recursos, a trabajar bajo y libre de presión, a encontrar y generar motivación propia, y a trabajar en equipo. Adquirimos experiencia en el análisis riguroso de datos, en el debate entre colegas y en la presentación de resultados, y desarrollamos la disciplina y la persistencia necesaria para llevar a cabo un proyecto de comienzo a fin. Creo que estas cualidades convierten al Doctor en Ciencias en un profesional valioso más allá del campo de la investigación académica, y que estas características se pueden extender y beneficiar a otros ámbitos de la industria y de la sociedad.

A pesar de que nos formamos como científicos en una especialidad particular - química, física, biología - el trabajo científico rara vez está dividido de esta manera. Tuve la oportunidad de investigar al lado de otros químicos, y también de bioquímicos, biólogos, físicos, ingenieros, programadores y médicos investigadores. También conté con el apoyo de técnicos en química, bioquímica, mecánica e informática para el desarrollo de diversos aspectos de mi tesis. Mi formación se benefició enormemente del intercambio con científicos en todas estas disciplinas. La interdisciplinariedad se ve reflejada en una parte considerable del Capítulo 4 y en los Capítulos 3, 5 y 6 enteros.

La Argentina, a través del Ministerio de Educación, el CONICET y la UBA, depositó en mi una enorme confianza al otorgarme becas, espacio y materiales de trabajo, y educación gratuita para que pueda obtener mi título de Doctorado. Mediante becas conjuntas del Ministerio de Educación y el Servicio de Intercambio Estudiantil Alemán (DAAD), y de la Sociedad Max Planck y la Fundación Bunge y Born, tuve la oportunidad de realizar una parte sustancial de mi trabajo de investigación en Alemania, y gran parte del resultado se lo debo a estos organismos. Con el título por el cual estoy optando, espero poderle devolver a la sociedad todavía más de lo que ella ya me dió.

Agradecimientos

Antes que nada, quisiera agradecer muy especialmente a Elizabeth Jares-Erijman. Sin casi conocerme, Eli me recibió con los brazos abiertos y me ofreció no solamente incorporarme a su grupo, sino también la posibilidad de comenzar un proyecto interesante y novedoso con vistas a trabajar en Alemania. Si no hubiera sido por su generosidad y confianza, no habría empezado en el 2011 esta tesis. Eli me dio una enorme oportunidad y para siempre voy a estar profundamente agradecida a ella por eso.

Quiero agradecer especialmente a Thomas Jovin por haberme dado la oportunidad de embarcar en este proyecto con él, y por el apoyo, la confianza y la paciencia que me tuvo durante estos cuatro años y medio de tesis. Tom supo enseñarme cuando no sabía, ayudarme cuando estaba en apuros y motivarme cuando estaba frustrada. La interdisciplinaridad del trabajo producido es gracias a su inagotable curiosidad y amplísima visión integral de la ciencia, y soy muy afortunada de haber tenido un director de tesis con tanta experiencia, tanto conocimiento y tanta creatividad. Su apoyo tanto científico como personal fue valiosísimo, y nunca habría llegado a donde estoy hoy sin su constante aporte. Realmente, un millón de gracias.

Quiero agradecer también a Pedro Aramendía quién me recibió en su instituto al volver a la Argentina. Cambiar de país en el medio de un proyecto no es una tarea trivial, y le agradezco muchísimo a Pedro haberme facilitado el proceso. Gracias a su apoyo pude terminar mi tesis con todas las herramientas necesarias, y agradezco haber encontrado siempre la puerta de su oficina abierta para pedir ayuda.

Gracias a Oscar Varela por haberme aconsejado muy amablemente durante el doctorado tanto con los formalismos como con la preparación de seminarios.

Gracias a Sebastián Díaz por su constante apoyo y amistad, tanto dentro como fuera del laboratorio. No podría haber pedido un mejor compañero. Gracias a Luciana Giordano por su paciencia y ayuda particularmente al comienzo de esta tesis. Gran parte de mis conocimientos de síntesis se los debo a ella. Gracias a Lisandro Falomir-Lockhart por su colaboración y por su permanente buena predisposición. Thanks to Anthony de Vries for his collaboration with the photoconverter project and his much needed IT support. Thanks to Volodymyr Shvadchak for challenging my knowledge of chemistry and for keeping me on my feet when it came to project

ideas. Thanks to Luis Oliveira, Elisa Turriani and Michelle Botelho for making the workplace a friendly place. Thank you to Nathan Cook, Vaishali Chakrabarti and Donna Arndt-Jovin for their collaboration with the protein and cell work. The imaging work especially was a real group effort, and I am tremendously grateful for their help. Thanks to Francisco Balzarotti for his collaboration with the spectrophotometer. Ich danke Anja Marquardt und Helga Nagel für alle ihre Hilfe im Labor; mit ihrer Hilfe war meine Arbeit viel einfacher und ich danke ihnen sehr viel. Ich danke auch Gabriele Mädler und Kerstin Börst für ihre Unterstützung im Institut.

Gracias a los miembros del grupo de Eli por integrarme al grupo y por toda la ayuda en el laboratorio. Gracias a Julio Azcárate por enseñarme a trabajar con diheteroariltenos y por su paciencia mientras aprendía. Gracias a Carla Spagnuolo por prestarme un espacio en su laboratorio. Gracias a María Emilia Cano por siempre darme una mano con los espectros de RMN.

Gracias a todos los miembros del CIBION por recibirme abiertamente en el Polo. Gracias a Federico Barabas, Luciano Masullo y Fernando Stefani por su colaboración con la fotoconversión bajo el microscopio. Gracias a Alan Szalai, Ana Bellomo, Natalia Bachir, Andrés Selzcer y Ariel De Candia por su apoyo en el laboratorio. Gracias a María Eugenia Monge y Ana Clara de Tomaso por su ayuda con el espectrómetro de masas. Gracias a Deborah Grant y a Santiago Randazzo por su ayuda administrativa.

Ich danke besonders der Dr. Vladimir Belov und die Facility für synthetische organische Chemie für alle ihre Hilfe mit HPLC und NMR, MS und UV-Vis Spektren. Ich danke die Optiks Abteilung, die IT & Elektronik Service und die Feinmechanik-Werkstatt für ihre Unterstützung mit allen meinen Projekten.

Thanks to all my friends in Göttingen; my stay in Germany was so much better thanks to games nights, girls nights, evenings out in the center and Glühwein at the Weihnachtsmarkt. Ich danke besonders Pantea Emami Khalkhali und Michael Stark, weil die beide haben meine Zeit in Göttingen viel verbessert. Ich war ganz glücklich in meiner Suche nach einem WG.

Gracias a todos mis amigos en Buenos Aires por su constante apoyo y distracción en los momentos de más tensión.

Gracias a mi mamá, por creer en mí y por motivarme siempre. Gracias a mi papá, por sus visitas de fin de semana y por su gran ayuda con el espectrofotómetro y todas las instancias de programación. Thanks to my siblings, who were always around for a chat and helped me through the rough times. Gracias a mi familia extendida por siempre ser optimistas con mi trabajo.

Quiero agradecer a la Dra Marta Maier y al Dr Gerardo Burton de la Subcomisión de Doctorado de Química Orgánica por toda su ayuda, especialmente al final de mi doctorado. Gracias a Nancy Aguirre por su paciencia y ayuda en cada instancia.

Finalmente, quiero agradecer también a los organismos que me financiaron el doctorado: el Ministerio de Educación, el Deutscher Akademischer Austausch Dienst, la Fundación Bunge y Born, el Max Planck Gesellschaft y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Gracias también a la UBA y a todos los profesores que tuve, por la alta calidad de educación que brindan.

Siento un enorme orgullo profesional y personal al poder optar por el título de Doctor en Química Orgánica de la UBA, y el llegar a este momento se debe en gran parte a la ayuda de muchas personas a lo largo de la carrera. A todos, muchísimas gracias.

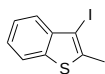
Síntesis y Caracterización

A.1 Síntesis

Procedimientos generales

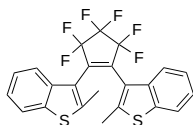
Todos los solventes y reactivos se adquirieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación previa. Los ácidos borónicos se obtuvieron de Combi-Blocks Inc. Cromatografía en columna se realizó con silica gel (Merck Silica 60, tamaño de partícula 0,040-0,063 mm; Merck Silica 60, mesh 230-400; o Sigma Aldrich C18 fase reversa, tamaño de partícula 0,040-0,063 mm). Los espectros de RMN se adquirieron en los solventes deuterados indicados en espectrómetros: Agilent 200-MR, Varian Inova 500 MHz y Bruker Fourier 300. El solvente deuterado residual se usó como estándar interno. Espectros de masa de alta resolución se obtuvieron con: ESI-HRMS microTOF de Bruker Daltronik GmbH; y Waters UPLC-ESI-HRMS.

2-metil-3-iodobenzotiofeno (6):



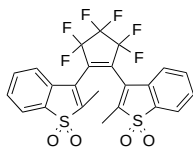
En un balón de 250 mL se mezclaron 20 mmol (3 g) de 2-metilbenzotiofeno (5), 60 mL ácido acético glacial, 12 mL H₂O destilada, 1,8 mL H₂SO₄ concentrado, 10 mmol (2,5 g) I₂ y 4 mmol (0,9 g) H₅IO₆. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y fue evaluada por CCD con ciclohexano. Al cabo de 4 hs se neutralizó lentamente el I₂ en exceso con NaHSO₃ (ss) y NaOH (s) hasta que se tornó incolora la solución. Se utilizó un baño de hielo si la temperatura de la solución aumentaba en exceso. La mezcla luego se filtró a presión negativa con un embudo de vidrio fritado. Las aguas madres se extrayeron repetidas veces con CH₂Cl₂ y AcOEt y el solvente orgánico se evaporó. Los sólidos se lavaron con H₂O y se recrystalizaron de MeOH:H₂O 9:1. Los cristales blancos se filtraron, lavaron con H₂O y secaron a vacío. Rendimiento 90%.

1,2-Bis(2-metil-1-benzotiofen-3-il)perfluorociclopenteno (1):



En un balón de 250 mL seco con un bazo magnético seco se mezclaron 10 mmol (2,7 g) **6** seco y 90 mL THF anhidro. Se tapó con un septum de goma y se estabilizó a -78°C en un baño de hielo seco en acetona en atmósfera de Ar. Se agregó 11,5 mmol (750 mg) de *n*-butillitio 1,6 M en hexano lentamente y se dejó reaccionar durante 1 h. La cantidad de **6** no reaccionado se evaluó mediante CCD en ciclohexano y cuando no había rastro de reactivo se adicionó 5 mmol (0,66 mL) de perfluorociclopenteno (**7**) lentamente. El color de la solución cambió de amarillo a naranja. Se dejó reaccionar durante 1.5 hs y se dejó estabilizar a temperatura ambiente. Se neutralizó con HCl 1 M y se extrajo con THF. La fase orgánica se lavó con NaCl (ss), se secó con Na_2SO_4 (s), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por cromatografía en columna con ciclohexano para dar un rendimiento de 50%. El producto fotocrómico se detecta fácilmente en CCD.

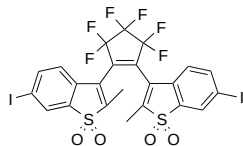
1,2-Bis(2-metil-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (**2**):



En un balón de 250 mL se mezclaron 2,5 mmol (1,2 g) de **1** y 59 mL ácido acético glacial. La mezcla se reflujo a 110°C durante 30 min y luego se agregó 6,8 mL H_2O_2 50% m/m en agua. La reacción se evaluó por CCD en ciclohexano:AcOEt 9:1, y cuando no quedó reactivo se vertió sobre agua helada y se filtró cuidadosamente el precipitado con un embudo de vidrio fritado y papel de filtro. Las aguas madres se extrayeron con CH_2Cl_2 , la fase orgánica se evaporó y se secaron los sólidos juntos. Rendimiento 80%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76-7.72 (dd, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.16-7.14 (d, 2H), 2.20 (s, 3H, ap), 2.06 (s, 3H, p), 1.82 (s, cerrado).

1,2-Bis(2-metil-6-iodo-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (**8**):



En un balón de 250 mL se mezclaron 5,5 mmol (2,9 g) de **2** y 97 mL de H_2SO_4 concentrado con un bazo magnético y se agitó la mezcla en un baño de hielo/agua/NaCl a -10°C durante 15 min. Luego se adicionaron 11 mmol (2,8 g) I_2 y 6,2 mmol (1,4 g) H_5IO_6 y la mezcla se agitó durante 2 hs. La reacción se evaluó mediante CCD en ciclohexano:AcOEt 7:3 y cuando se consumió todo el reactivo se vertió la solución en una solución fría de NaHSO_3 (ss) para neutralizar el I_2 excedente, y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con NaHSO_3 (ss), NaHCO_3 (ss) y H_2O , se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a vacío. El producto amarillo se obtuvo con un rendimiento de 100%.

Isómero abierto: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08-8.03 (d, 2H), 7.95-7.94 (d, 2H), 7.81-7.79 (d, 2H), 6.88-6.81 (dd, 2H), 2.16 (s, 3H, ap), 2.00 (s, 3H p).

Isómero cerrado: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (d, 2H), 8.16-8.13 (dd, 2H), 7.93-7.91 (d, 2H), 1.81 (s, 6H).

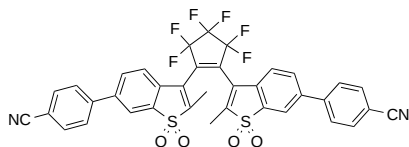
Procedimiento general de acoplamiento Suzuki 1:

En un balón de 25 mL se mezclaron 0,13 mmol (1 eq) de **8**, 0,52 mmol (4 eq) ácido borónico y 7 mL THF. La mezcla amarilla se agita hasta disolución de todos los reactivos. Luego se agregan, en orden: 0,026 mmol (0,2 eq) de $\text{Pd}_2(\text{bda})_3$, 0,064 mmol (0,5 eq) de $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_{11})_3$ y 7 mL (0,4 eq) de K_2CO_3 (ss). La solución se torna rojo oscuro y la velocidad de agitación se aumenta para favorecer el mezclado de las dos fases. La reacción se evalúa mediante CCD en la mezcla de ciclohexano:AcOEt correspondiente (gradiente de 9:1 a 6:4, generalmente) y al consumirse todo el reactivo se corta con HCl 1M. La mezcla de productos se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 y se evapora a vacío. El producto deseado es purificado con cromatografía en columna.

Procedimiento general de acoplamiento Suzuki 2 (optimizado):

En un balón de 25 mL se mezclaron 0,25 mmol (1 eq) de **8**, 1 mmol (4 eq) ácido borónico, 4 mL THF y 3 mL EtOH. La mezcla amarilla se agita hasta disolución de todos los reactivos. Luego se agregan, en orden: 0,001 mmol (0,005 eq) de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, 0,51 mmol (2 eq) de K_2CO_3 y 2 mL H_2O . La solución se torna lentamente rojo oscuro y la velocidad de agitación se aumenta para favorecer el mezclado de las dos fases. La reacción se evalúa mediante CCD en la mezcla de ciclohexano:AcOEt correspondiente (gradiente de 9:1 a 6:4, generalmente) y al consumirse todo el reactivo se corta con HCl 1M y NaCl (ss). La mezcla de productos se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 y se evapora a vacío. El producto deseado es purificado con cromatografía en columna.

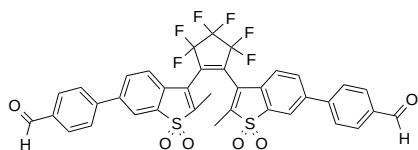
1,2-Bis(2-metil-6-(4-cianofenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (**9**):



Procedimiento Suzuki 2 con ácido 4-cianofenilborónico. Rendimiento 87%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97-7.94 (d, 2H), 7.82-7.74 (m, 6H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.28-7.26 (d,

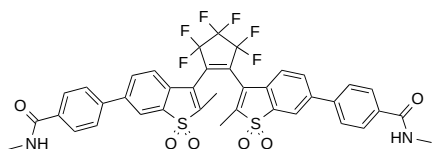
2H), 2.26 (s, 2,5H, ap), 2.13 (s, 3,5H, p), 1.90 (s, cerrado). ^{13}C NMR: (ppm) δ 144.24, 142.52, 142.42, 136.45, 133.35, 133.20, 132.69, 132.41, 128.14, 127.98, 127.87, 123.14, 121.74, 118.34, 113.07, 9.30. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ [M-H] 733.0696, encontrado: 733.0698 [M+Na]: 757.0661, encontrado: 757.0659.

1,2-Bis(2-metil-6-(4-formilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (10):



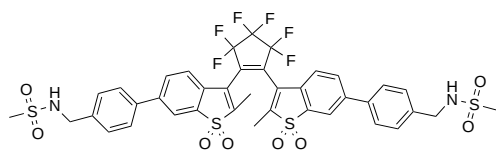
Procedimiento Suzuki 2 con ácido 4-formilfenilborónico. Rendimiento 64%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.09-10.05 (2s, 2H), 8.02-7.95 (m, 5H), 7.87-7.85 (d, 2H), 7.76-7.66 (m, 5H), 7.29-7.27 (d, 2H), 2.26 (s, 2,5H, ap), 2.13 (s, 3,5H, p). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 191.62, 191.53, 190.88, 144.06, 143.12, 136.51, 136.36, 132.77, 132.51, 132.45, 130.81, 130.70, 128.16, 127.97, 127.86, 123.08, 122.91, 121.84, 121.74, 116.05, 9.27. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{O}_6\text{S}_2$ [M+Na]: 763.0654, encontrado: 763.0650 [M+NH₄]: 758.1100, encontrado: 758.1103 [M-H] 739.0689, encontrado: 739.0689.

1,2-Bis(2-metil-6-(4-N-metilaminocarbonilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (11):



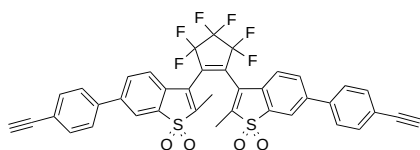
Procedimiento Suzuki 1 con ácido 4-N-metilaminocarbonilfenilborónico. Rendimiento 44%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98-7.82 (m, 7H), 7.65-7.63 (m, 3H), 7.55-7.53 (d, 2H), 7.26-7.24 (d, 2H), 6.24 (m, 2H), 3.04 (m, 6H), 2.24 (s, 2,8H, ap), 2.12 (s, 3,2H, p), 1.90 (cerrado). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.47, 136.27, 135.15, 132.53, 129.83, 128.16, 127.98, 127.66, 127.46, 127.35, 123.03, 121.66, 121.51, 27.10, 9.23. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ [M+H]: 799.1362, encontrado: 799.1366 [M+Na]: 821.1186, encontrado: 821.1185.

1,2-Bis(2-metil-6-(4-metanosulfonilaminometilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (12):



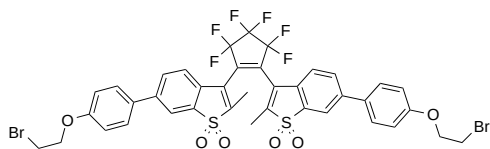
Procedimiento Suzuki 1 con ácido 4-metanosulfonilaminometilfenilborónico. Rendimiento 28%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91-7.83 (d, 2H), 7.80-7.78 (s, 1H), 7.60-7.53 (m, 3H), 7.46-7.36 (m, 6H), 7.25-7.23 (d, 2H), 5.19-5.07 (2t, 2H), 4.36-4.29 (2d, 4H), 2.90-2.88 (2s, 6H), 2.22 (s, 3H, ap), 2.10 (s, 3H, p), 1.88 (cerrado). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 143.97, 143.78, 143.53, 143.38, 138.20, 138.08, 137.72, 137.50, 136.05, 132.31, 131.99, 128.99, 128.84, 128.72, 128.35, 128.17, 127.84, 127.63, 127.48, 123.96, 123.11, 121.40, 121.12, 46.74, 46.63, 41.21, 41.09, 29.38, 27.03, 9.14, 8.97. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]$: 921.0835, encontrado: 921.0838.

1,2-Bis(2-metil-6-(4-etinilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (13):



Procedimiento Suzuki 2 con ácido 4-etinilfenilborónico. Rendimiento 67%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97-7.92 (d, 2H), 7.81-7.78 (d, 1H), 7.62-7.46 (m, 9H), 7.24-7.22 (d, 2H), 3.19-3.17 (d, 2H), 2.24 (s, 2,8H, ap), 2.11 (2, 3,2H, p). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 143.67, 136.27, 133.31, 133.14, 132.31, 132.06, 128.41, 127.34, 127.16, 127.08, 123.89, 123.16, 122.98, 121.53, 121.40, 121.30, 82.95, 79.69, 79.21, 9.21. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{H}]$ 731.0791, encontrado: 731.0787 $[\text{M}+\text{Na}]$: 755.0756, encontrado: 755.0751.

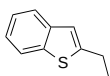
1,2-Bis(2-metil-6-(4-(2-bromoetoxi)fenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (14):



Procedimiento Suzuki 1 con ácido 4-(2-bromoetoxi)fenilborónico. Rendimiento 26%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93-7.87 (d, 2H), 7.76-7.74 (d, 1H), 7.60-7.58 (d, 1H), 7.54-7.44

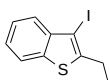
(dd, 4H), 7.21-7.19 (d, 2H), 7.03-6.96 (dd, 4H), 4.37-4.31 (m, 4H), 3.69-3.63 (m, 4H), 2.23 (s, 2,8H, ap), 2.09 (s, 3,2H p), 1.89 (cerrado). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 159.07, 144.03, 143.79, 143.62, 142.95, 136.13, 131.70, 131.45, 131.24, 128.56, 128.49, 127.68, 127.48, 123.98, 122.91, 121.05, 120.91, 115.75, 115.59, 68.09, 31.05, 27.05, 9.10, 8.99. HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{F}_6\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]$: 952.9469, encontrado: 952.9473.

2-etilbenzotiofeno (18):



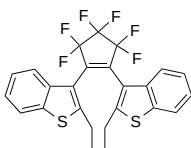
En un balón de 100 mL seco con un bazo magnético seco se mezclaron 7,5 mmol (1 g) benzotiofeno (**17**) y 12 mL THF anhidro. El balón se tapó con un septum de goma y se enfrió a -78°C en un baño de hielo seco en acetona en atmósfera de Ar. Luego se adicionó 12 mmol (1,1 mL) n-butillitio 1,6 M en hexano lentamente y la solución se agitó a -78°C durante 1 h. La cantidad de (**17**) sin reaccionar se evaluó por CCD en ciclohexano. Cuando todo el reactivo se consumió se agregó 14,9 mmol (1,1 mL) de bromoetano lentamente y se dejó reaccionar 1 h. Luego la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se cortó la reacción con HCl 1 M. Se extrajo el producto con THF, se lavó la fase orgánica con NaCl (ss), se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente.

2-etil-3-iodobenzotiofeno (19):



En un balón de 100 mL se mezclaron 6,2 mmol (1 g) de **18**, 18 mL de ácido acético glacial, 4 mL de H_2O , 0,5 mL de H_2SO_4 , 3 mmol (0,78 g) I_2 y 1,2 mmol (0,28 g) H_5IO_6 . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 hs. La reacción se evaluó mediante CCD en ciclohexano. Cuando el reactivo se consumió, la reacción se cortó con NaHSO_3 (ss) hasta que la solución se volvió incolora, y se neutralizó con NaOH (s). Se filtró el precipitado y se lavó con H_2O , y luego se recrystalizó de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1. Los cristales blancos se filtraron, lavaron con H_2O y secaron a vacío.

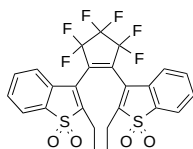
1,2-Bis(2-etil-1-benzotiofen-3-il)perfluorociclopenteno (20):



En un balón de 250 mL seco con un bazo magnético seco se mezclaron 3,65 mmol (1 g) **19** seco y 32 mL THF anhidro. Se tapó con un septum de goma y se estabilizó a -78°C en un baño de hielo seco en acetona en atmósfera de Ar. Se agregó 4,1 mmol (270 mg) de n-butillitio 1,6 M en hexano lentamente y se dejó reaccionar durante 1 h. La cantidad de **19** no reaccionado se evaluó mediante

CCD en ciclohexano y cuando no había rastro de reactivo se adicionó 1,8 mmol (0,24 mL) de perfluorociclopenteno (**7**) lentamente. El color de la solución cambió de amarillo a naranja. Se dejó reaccionar durante 1.5 hs y se dejó estabilizar a temperatura ambiente. Se neutralizó con HCl 1 M y se extrajo con THF. La fase orgánica se lavó con NaCl (ss), se secó con Na₂SO₄ (s), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por cromatografía en columna con ciclohexano para dar un rendimiento de 50%. El producto fotocromico se detecta fácilmente en CCD.

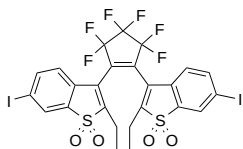
1,2-Bis(2-metil-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (**21**):



En un balón de 250 mL se mezclaron 2 mmol (1 g) de **20** y 46 mL ácido acético glacial. La mezcla se refluxó a 110°C durante 30 min y luego se agregó 5,3 mL H₂O₂ 50% m/m en agua. La reacción se evaluó por CCD en ciclohexano:AcOEt 9:1, y cuando no quedó reactivo se vertió sobre agua helada y se filtró cuidadosamente el precipitado con un embudo de vidrio fritado y papel de filtro. Las

aguas madres se extrayeron con CH₂Cl₂, la fase orgánica se evaporó y se secaron los sólidos juntos. Rendimiento 90%.

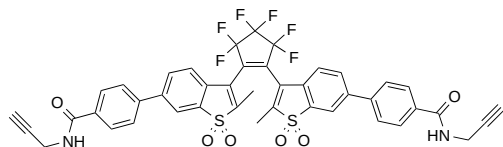
1,2-Bis(2-metil-6-iodo-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)perfluorociclopenteno (**16**):



En un balón de 250 mL se mezclaron 5,5 mmol (2,9 g) de **21** y 97 mL de H₂SO₄ concentrado con un buzo magnético y se agitó la mezcla en un baño de hielo/agua/NaCl a -10°C durante 15 min. Luego se adicionaron 11 mmol (2,8 g) I₂ y 6,2 mmol (1,4 g) H₅IO₆ y la mezcla se agitó durante 2 hs. La reacción se evaluó mediante CCD en ciclohexano:AcOEt 7:3 y cuando se consumió todo el reactivo se

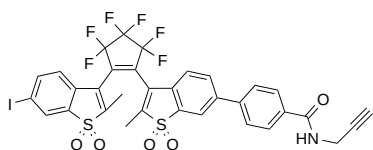
vertió la solución en una solución fría de NaHSO₃ (ss) para neutralizar el I₂ excedente, y se extrajo con CH₂Cl₂ y AcOEt. La fase orgánica se lavó con NaHSO₃ (ss), NaHCO₃ (ss) y H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a vacío. El producto amarillo se obtuvo con un rendimiento de 100%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06-8.06 (d, 1H), 8.01-8.00 (d, 1H), 7.96-7.93 (dd, 1H), 7.80-7.77 (dd, 1H), 6.92-6.90 (d, 1H), 6.81-6.79 (d, 1H), 2.59-2.33 (m, 4H), 1.38 (t, 2,4H, ap), 1.06 (t, 3,6H, p). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 148.60, 148.11, 142.90, 142.56, 137.05, 131.48, 131.44, 128.92, 128.79, 124.01, 123.61, 122.97, 122.82, 96.57, 96.53, 32.08, 27.07, 22.85, 19.39, 19.23, 14.27, 11.85, 11.62. [M+Na]: 834.8381, encontrado: 834.8458.

1,2-Bis(2-metil-6-(4-(2-propinilamino)carbonilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il)-perfluorociclopenteno (**22**):



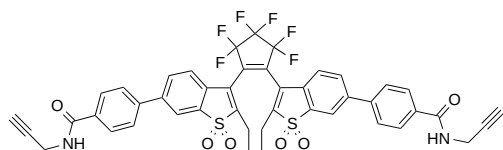
Procedimiento Suzuki 2 con **8** y ácido 4-(2-propinilamino)carbonilfenilborónico. $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ agregado en 4 fracciones. Rendimiento 10%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97-7.83 (m, 7H), 7.65-7.52 (m, 5H), 7.27-7.25 (d, 1H), 6.9216.86 (dd, 1H), 6.68-6.62 (m, 2H), 4.28 (m, 4H), 2.24 (s, 3,5H, ap), 2.11 (s, 2,5H, p), 1.89 (cerrado). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.48, 143.33, 136.21, 134.18, 132.58, 132.34, 129.17, 129.04, 128.94, 128.39, 128.26, 128.21, 127.86, 127.66, 127.53, 127.49, 127.47, 127.40, 127.35, 123.02, 121.65, 121.46, 115.55, 79.44, 72.14, 32.04, 30.00, 29.78, 29.48, 29.37, 22.81, 9.21. $[\text{M}+\text{H}]$: 847.1371, encontrado: 847.1382 $[\text{M}+\text{Na}]$: 869.1191, encontrado: 869.1196.

3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8 tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-6-{p-[(2-propynylamino)carbonyl]phenyl}-1 thia-1,1-indenedione (27):



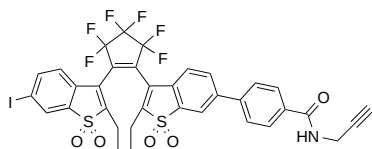
Producto secundario de procedimiento Suzuki 2 con **8** y ácido 4-(2-propinilamino) carbonilfenilborónico. $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ agregado en 4 fracciones. Rendimiento 20%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07-7.91 (m, 3H), 7.81-7.57 (m, 4H), 7.45 (m, 1H), 7.16-7.14 (m, 1H), 6.91-6.89 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 4.30-4.28 (m, 2H), 2.20 (s, 3H, ap), 2.06 (s, 3H, p). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.29, 166.32, 143.19, 142.95, 136.62, 136.29, 135.28, 134.22, 133.99, 133.71, 132.56, 132.37, 131.77, 131.67, 130.98, 130.80, 128.18, 127.52, 123.64, 122.92, 122.75, 122.55, 121.66, 79.38, 72.30, 60.54, 21.20, 14.35, 9.14, 9.02. $[\text{M}+\text{H}]$: 815.9810, encontrado: 815.5120 $[\text{M}+\text{Na}]$: 837.9630, encontrado: 837.9638.

1,2-Bis(2-etil-6-(4-(2-propinilamino)carbonilfenil)-1-benzotiofen-1,1-dióxido-3-il) perfluorociclopenteno (15):



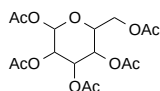
Procedimiento Suzuki 2 con **16** y ácido 4-(2-propinilamino)-carbonilfenilborónico. Pd(AcO)₂ agregado en 4 fracciones. Rendimiento 33%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97-7.88 (m, 5H), 7.78-7.76 (d, 1H), 7.69-7.65 (m, 4H), 7.55-7.53 (d, 1H), 7.30-7.28 (dd, 2H), 6.88-6.86 (d, 1H), 6.51-6.44 (2m, 2H), 4.30-4.28 (m, 4H), 2.68-2.32 (m, 4H), 1.28-1.24 (t, 3,4H, ap), 1.14-1.11 (t, 2,6H, p). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.50, 148.70, 146.04, 143.27, 143.11, 141.39, 136.72, 134.74, 134.13, 132.53, 132.17, 129.22, 128.36, 128.20, 128.16, 127.86, 127.73, 127.57, 127.51, 127.42, 123.34, 121.28, 121.00, 115.61, 79.74, 79.36, 77.36, 72.32, 72.00, 29.40, 27.06, 19.41, 12.06, 11.83, 10.37. [M+Na]: 897.1504, encontrado: 897.1514.

2-Ethyl-3-{2-(8-ethyl-4-iodo-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl}-6-[p-[(2-propynilamino)carbonyl]phenyl]-1-thia-1,1-indenedione (28**):**



Producto secundario de procedimiento Suzuki 2 con **16** y ácido 4-(2-propinilamino)-carbonilfenilborónico. Pd(AcO)₂ agregado en 4 fracciones. Rendimiento 55%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.93-7.89 (m, 3H), 7.84-7.76 (m, 2H), 7.65-7.58 (m, 3H), 7.28-7.17 (dd, 1H), 6.95-6.91 (t, 1H), 6.64 (m, 1H), 4.27 (m, 2H), 2.66-2.49 (m, 3H), 2.43-2.35 (m, 1H), 1.09-1.03 (3t, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.40, 143.27, 142.91, 142.59, 141.23, 141.21, 136.98, 136.68, 136.66, 134.19, 134.15, 132.50, 132.21, 131.36, 131.29, 128.93, 128.40, 128.23, 128.18, 127.62, 127.41, 121.28, 121.23, 96.48, 96.45, 79.47, 72.12, 32.04, 31.89, 31.53, 29.98, 29.47, 22.80, 19.32, 19.24, 14.23, 11.76, 11.60. [M+Na]: 865.9943, encontrado: 865.9982.

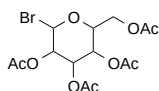
3,4,5,6-Tetraacetoxitetrahydro-2H-piran-2-il)metil acetato (23**):**



En un balón de 25 mL se mezclaron intimamente 5,5 mmol (1 g) de glucosa (**26**) y 6,6 mmol (0,55 g) de NaOAc. Se agregó 55 mmol (5,2 mL) anhídrido acético y se refluxó la mezcla durante 2 hs. La reacción se cortó volcando la mezcla sobre hielo y el precipitado se filtró y purificó por recristalización con MeOH. Rendimiento 43%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.17 (d, α), 5.97 (d, 1H β), 5.44 (t, 1H β), 5.34 (t, α), 5.08 (t, α), 5.02 (dd, α), 4.96 (t, 1H, β), 4.92 (dd, 1H, β), 4.22 (dd, α), 4.20 (dd, 1H, β), 4.17 (d, 1H, β), 4.15 (d, α), 4.02 (dd, α), 3.99 (dd, 1H β), 2.18 (s, α), 2.07 (s, 3H, β), 2.01 (s, α), 2.01 (s, 3H, β), 2.00 (s, 3H, β), 2.00 (s, α), 1.99 (s, 3H, β), 1.98 (s, α), 1.94 (s, 3H, β). ¹³C NMR (101 MHz,

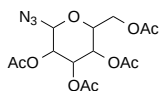
DMSO) δ 169.96, 169.46, 169.22, 169.07, 168.72, 90.78, 71.71, 71.33, 70.03, 67.63, 61.42, 20.47, 20.36, 20.56.

3,4,5-Triacetoxi-6-bromotetrahidro-2H-piran-2-il)metil acetato (24):



En un balón de 100 mL se disolvió 2,6 mmol (1 g) de **23** en 7,5 mL CH_2Cl_2 y se agregó 33 mmol (2,7 g, 6 mL) de HBr en AcOH. La reacción se evaluó mediante CCD con AcOEt:éter 1:1. Cuando se consumió todo el reactivo se extrajo el producto de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ y la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 , NaCl (ss) y H_2O , se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a vacío. Se recrystalizó el producto de AcOEt/éter para dar un rendimiento de 86%. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.74 (d, 1H), 5.52 (t, 1H), 5.18 (t, 1H), 4.92 (dd, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.13 (d, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 172.14, 171.48, 171.05, 88.74, 73.70, 71.84, 71.58, 68.57, 62.41, 30.67, 20.52, 20.49, 20.43.

3,4,5-Triacetoxi-6-azidotetrahidro-2H-piran-2-il)metil acetato (25):

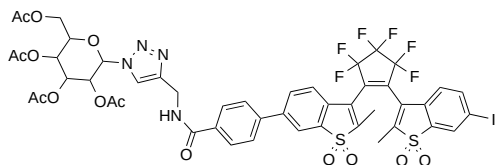


En un balón de 100 mL se suspendieron 2,2 mmol (880 mg) de **24** y 6,7 mmol (440 mg) de NaN_3 en 14 mL DMF anhidro. Se agitó la mezcla a 50°C durante 1,5 hs y se evaluó la reacción mediante CCD con AcOEt:éter 1:1. Cuando se consumió todo el reactivo el solvente se evaporó y el residuo se disolvió en CHCl_3 y se lavó con H_2O , NaHCO_3 (ss) y NaCl (ss), se secó con Na_2SO_4 y se evaporó al vacío. La masa cruda se lavó con Et_2O para dar el producto con un rendimiento de 64%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 5.32 (t, 1H), 5.14 (d, 1H), 4.98 (t, 1H), 4.82 (dd, 1H), 4.13 (m, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03(s, 3H), 1.99(s, 3H), 1.95(s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.00, 169.51, 169.22, 169.10, 86.21, 72.74, 71.76, 70.50, 67.74, 61.66, 20.48, 20.34, 20.58, 20.53. $[\text{M}+\text{Na}]$: 396.1019 encontrado: 396.1075.

Procedimiento general para reacciones tipo Click:

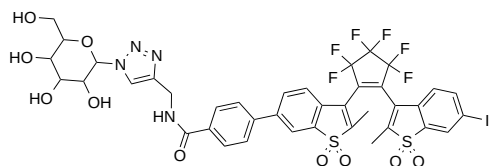
En un balón de 100 mL se disolvieron 0,5 mmol (1 eq) de alquino y 2 mmol (4 eq) de azida en 17 mL THF anhidro bajo atmósfera de N_2 . Se agregaron a la suspensión 0,05 mmol (0,1 eq) TBTA y 0,05 mmol (0,1 eq) $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$ disueltos en 8 mL MeOH. La mezcla se agitó hasta que se consumió todo el reactivo, evaluado por CCD con el solvente correspondiente. Al finalizar la reacción, se evaporó el solvente y el producto se purificó mediante cromatografía en columna con un gradiente de ciclohexano:AcOEt desde 9:1 a 3:7.

[3,4,5-Triacetoxy-6-(4-[[p-(3-{3,3,4,4,5,5-hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl]-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl)benzoylamino]methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]tetrahydro-2H-pyran-2-yl] methyl acetate (29):



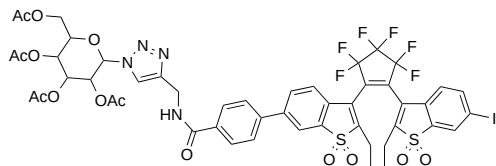
Procedimiento Click con **27** y **25**. Rendimiento 60%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.33, 8.31, 8.23, 8.09, 8.07, 8.04, 7.98, 7.96, 7.94, 7.91, 7.83, 7.79, 7.77, 7.65, 7.63, 7.52, 7.50, 7.26, 7.24, 5.88, 5.86, 5.44, 5.43, 5.25, 4.77, 4.31, 4.28, 4.17, 4.14, 4.02, 2.23, 2.11, 2.08, 2.07, 2.07, 2.03, 2.02, 1.89, 1.87. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.65, 170.08, 169.46, 169.04, 169.02, 166.73, 166.64, 146.43, 145.29, 143.04, 141.21, 140.66, 136.26, 135.04, 134.44, 133.55, 132.56, 132.25, 129.41, 129.23, 128.87, 128.68, 128.38, 128.20, 127.70, 127.48, 127.38, 127.32, 123.79, 123.03, 121.57, 121.26, 85.97, 77.36, 75.35, 72.74, 70.59, 67.78, 61.63, 35.63, 32.05, 29.84, 22.84, 20.84, 20.69, 20.67, 20.35, 20.34, 18.15, 14.27, 9.23, 9.06. Espectros en dos dimensiones se aprecian hacia el final del Apéndice.

3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-6-(p-{{1-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}methyl)amino}carbonyl} phenyl)-1-thia-1,1-indenedione (32):



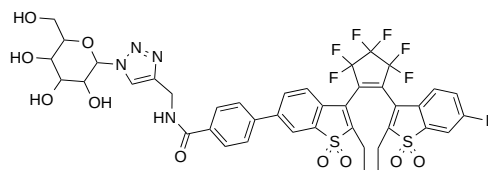
En un balón de 10 mL se disolvió 0,025 mmol (30 mg) de **29** en 3,7 mL MeOH y se agregaron 0,1 mmol (13 mg) de K_2CO_3 . Se agitó la mezcla durante 20 min y se filtró rápidamente el K_2CO_3 para cortar la reacción. El solvente se evapora y se purifica inmediatamente por cromatografía en columna de fase reversa con $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 2:8 para rendir 45% producto. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.55, 8.46, 8.40, 8.38, 8.34, 8.16, 8.15, 8.05, 8.03, 8.02, 8.01, 7.99, 7.98, 7.96, 7.86, 5.61, 5.59, 4.70, 3.89, 3.85, 3.71, 3.59, 3.56, 3.51, 3.40, 2.12, 1.82. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 146.39, 129.57, 129.54, 129.38, 128.72, 128.39, 128.38, 128.24, 123.66, 89.62, 81.13, 78.47, 78.12, 74.02, 70.89, 62.38, 36.21, 30.78, 20.06, 11.92. Espectros en dos dimensiones se aprecian hacia el final del Apéndice. $[\text{M}+\text{Na}]$: 1043.0328, encontrado: 1043.0325.

[3,4,5-Triacetoxy-6-(4-[[p-(2-ethyl-3-{2-(8-ethyl-4-iodo-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl]-1-oxo-1-thia-6-indenoyl)benzoylamino]methyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methyl acetate (30):



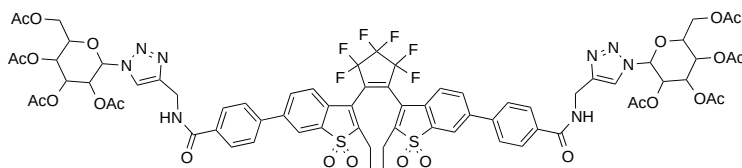
Procedimiento Click con **28** y **25**. Rendimiento 70%. [M+Na]: 1239.1064, encontrado: 1239.1106. Producto utilizado directamente en la reacción de desprotección.

2-Ethyl-3-{2-(8-ethyl-4-iodo-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl}-6-(p-[[1-(3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino]carbonyl]phenyl)-1-thia-1,1-indenedione (33):



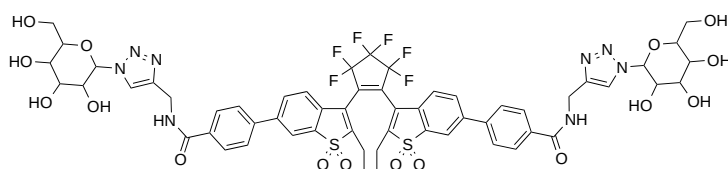
En un balón de 10 mL se disolvió 0,021 mmol (30 mg) de **30** en 3 mL MeOH y se agregaron 0,08 mmol (11 mg) de K₂CO₃. Se agitó la mezcla durante 20 min y se filtró rápidamente el K₂CO₃ para cortar la reacción. El solvente se evapora y se purifica inmediatamente por cromatografía en columna de fase reversa con H₂O:MeOH 2:8 para rendir 55% producto. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.45, 8.39, 8.36, 8.32, 8.20, 8.14, 8.10, 8.05, 8.02, 8.00, 7.98, 7.95, 7.84, 7.82, 7.77, 7.74, 7.53, 7.46, 7.24, 5.61, 5.59, 4.69, 4.11, 4.09, 3.90, 3.89, 3.71, 3.56, 3.56, 3.51, 2.66, 2.63, 2.47, 2.45, 2.44, 2.32, 2.30, 1.38, 1.36, 1.24. ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 146.39, 129.57, 129.54, 129.38, 128.72, 128.39, 128.38, 128.24, 123.66, 89.62, 81.13, 78.47, 78.12, 74.02, 70.89, 62.38, 36.21, 30.78, 20.06, 11.92. [M+Na]: 1071.0641, encontrado: 1071.0669.

[3,4,5-Triacetoxy-6-(4-[[p-(8-ethyl-9-{2-[2-ethyl-1-oxo-6-(p-[[1-(3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino]carbonyl]phenyl)-1-thia-3-indenoyl]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl]-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-4-yl)benzoylamino]methyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methyl acetate (31):



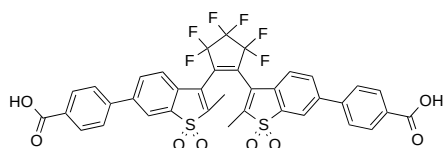
Procedimiento Click con **15** y **25**. Rendimiento 70%. Producto utilizado directamente en la reacción de desprotección.

2-Ethyl-3-{2-[8-ethyl-7,7-dioxo-4-(p-[[[1-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl)amino]carbonyl]phenyl)-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl}-6-(p-[[[1-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) tetrahydro-2H-pyran-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl)amino]carbonyl]phenyl)-1-thia-1,1-indenedione (34):



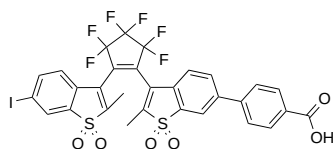
En un balón de 10 mL se disolvió 0,021 mmol (30 mg) de **31** en 3 mL MeOH y se agregaron 0,08 mmol (11 mg) de K_2CO_3 . Se agitó la mezcla durante 20 min y se filtró rápidamente el K_2CO_3 para cortar la reacción. El solvente se evapora y se purifica inmediatamente por cromatografía en columna de fase reversa con $H_2O:MeOH$ 2:8 para rendir 55% producto. 1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8.36, 8.32, 8.32, 8.28, 8.24, 8.22, 8.14, 8.07, 7.96, 7.94, 7.89, 7.88, 7.87, 7.86, 7.81, 7.77, 7.77, 7.64, 7.50, 5.59, 5.57, 4.62, 3.88, 3.85, 3.83, 3.65, 3.56, 3.54, 3.51, 3.48, 3.44, 2.64, 2.41, 2.33, 2.16, 1.85, 1.30, 1.06. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 169.79, 167.91, 145.29, 140.42, 134.79, 134.28, 128.50, 128.36, 128.27, 127.93, 127.59, 127.52, 127.27, 122.94, 92.84, 87.83, 79.22, 76.50, 72.47, 69.23, 60.83, 35.12, 31.77, 29.55, 29.48, 22.54, 22.42, 13.62, 9.68. $[M+Na]$: 1307.2901, encontrado: 1307.2909.

p-[3-(2-{4-(p-Carboxyphenyl)-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl}-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl)-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl]benzoic acid (35):



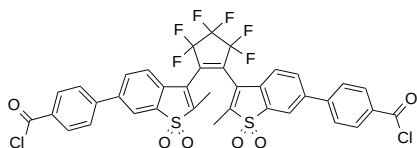
Procedimiento Suzuki 2 con **8** y ácido 4-carboxifenilborónico. Alicuotas de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ fueron agregadas cada 15 min durante 2,5 hs. Purificado por cromatografía en columna con 1% v/v AcOH. Rendimiento 26%. ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8.11-8.03 (m, 6H), 7.93-7.80 (m, 4H), 7.71 (d, 2H), 7.52 (dd, 2H), 2.23 (s, 3,2H, ap), 2.12 (s, 2,8H, p). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 207.62, 172.64, 167.45, 167.41, 145.69, 145.24, 143.78, 143.63, 143.14, 136.69, 134.19, 134.00, 131.43, 131.31, 131.23, 128.74, 128.43, 128.37, 128.34, 124.97, 124.81, 122.10, 121.95, 9.42, 9.27.

p-(3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl)benzoic acid (53):



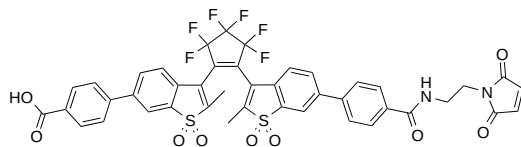
Producto secundario de la reacción previa. Rendimiento 42%. ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ 8.20 (d, 1H), 8.13-8.00 (m, 4H), 7.81-7.74 (m, 3H), 7.46 (d, 1H), 7.16 (dd, 1H), 2.20 (s, 1,6H, ap), 2.17 (s, 1,7H, ap), 2.06-2.05 (2xs, 2,3H, p). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 172.74, 167.82, 167.50, 162.37, 144.48, 144.30, 134.17, 133.97, 132.48, 131.31, 131.28, 128.43, 128.40, 122.48, 122.10, 9.39, 9.32, 9.25, 9.18. $[\text{M}+\text{Na}]$: 800.9313, encontrado: 800.9315.

p-[3-(2-{4-[p-(Chloroformyl)phenyl]-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl}-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl)-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl]benzoyl chloride (76):



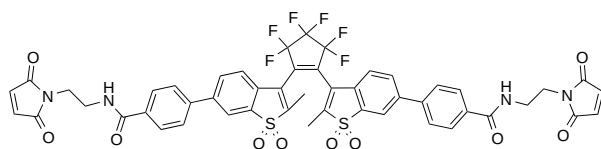
En un balón de 10 mL seco se mezclaron 0,065 mmol (50 mg) de **35** y 25 μL SOCl_2 con 1,5 mL THF anhidro bajo atmósfera de Ar. Se agitó a 50°C durante 30 min y luego se evaporó el solvente bajo vacío durante 1 h a 50°C . El excedente de SOCl_2 , SO_2 y HCl se removieron de esta manera. El producto se utilizó inmediatamente para la próxima reacción.

p-{3-[2-(4-{p-[2-(2,5-Dioxo-1H-pyrrol-1-yl)ethoxycarbonyl]phenyl}-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl]-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl}benzoic acid (36):



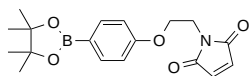
A 0,065 mmol (52,4 mg) de **76** recientemente preparado se adicionó 0,16 mmol (40 mg) de trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida seca y 400 uL THF anhidro. La solución se agitó a 50°C durante 2,5 hs, y luego se cortó con NaOH 1 M, se extrajo con AcOEt y se evaporó a vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna con 1% v/v AcOH. Rendimiento 60%. ¹H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8.48-8.42 (m, 1H), 8.30-7.71 (m, 13H), 6.86-6.83 (m, 2H), 3.75 (m, 2H), 3.63 (m, 2H), 2.35 (s, 2H, ap), 2.25 (s, 2H, p), 1.91 (s, 2H, cerrado). ¹³C NMR (101 MHz, Acetona) δ 171.82, 171.79, 167.14, 167.08, 143.96, 143.81, 140.71, 137.05, 136.77, 135.21, 135.19, 134.75, 134.61, 133.93, 133.75, 133.68, 133.51, 131.41, 131.30, 131.25, 131.19, 131.12, 129.88, 129.60, 129.04, 128.89, 128.85, 128.79, 128.73, 128.60, 128.39, 128.27, 128.20, 128.15, 128.04, 127.98, 127.93, 127.90, 124.94, 124.72, 124.66, 124.00, 122.02, 121.87, 121.80, 121.75, 115.67, 39.10, 39.08, 38.28, 9.22, 9.04, 8.34. [M+Na]: 917.1038, encontrado: 917.1083.

2-(2,5-Dioxo-1H-pyrrol-1-yl)ethyl p-{9-[2-(6-{p-[2-(2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)ethoxycarbonyl]phenyl}-2-methyl-1-oxo-1-thia-3-indenyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl]-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-4-yl}benzoate (37):



Producto secundario de la reacción previa. Rendimiento 48%. ¹H NMR (400 MHz, Acetona) δ 8.43 (d, 1H), 8.25-7.54 (m, 13H), 6.85 (m, 4H), 3.74 (m, 4H), 3.62 (m, 4H), 2.33 (s, 2,5H), 1.49 (s, 2,5H), 1.90 (s, 1H, cerrado). ¹³C NMR (101 MHz, Acetona) δ 172.57, 171.86, 171.84, 167.27, 167.20, 143.87, 143.76, 141.34, 141.22, 140.70, 136.99, 136.95, 136.69, 135.99, 135.95, 135.21, 135.19, 135.14, 134.62, 133.76, 133.52, 132.84, 132.81, 132.73, 132.63, 129.52, 129.40, 129.32, 129.06, 128.91, 128.88, 128.82, 128.35, 128.01, 127.94, 127.90, 124.96, 124.66, 124.03, 121.83, 121.77, 121.66, 39.08, 38.24, 9.19, 8.99, 8.31. [M+Na]: 1039.1518, encontrado: 1039.1578.

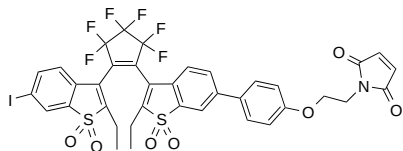
1-{2-[p-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy]ethyl}-1H-pyrrole-2,5-dione (39):



En un balón 10 mL se mezclaron 0,86 mmol (220 mg) PPh_3 y 6 mL THF y se enfrió a -78°C en un baño de hielo seco y acetona.

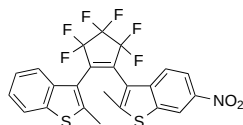
Se agregó 0,86 mmol (0,17 mL) DIAD lentamente durante 2-3 min, y la solución amarilla se agitó durante 5 minutos. Luego se agregó 0,95 mmol (250 mg) de 2-[p-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy]ethanol (**38**) lentamente durante 1 min y se agitó durante otros 5 minutos. Finalmente se agregó 0,47 mmol (42 mg) neopentilalcohol y 0,86 mmol (84 mg) maleimida secuencialmente y la suspensión se agitó durante otros 5 minutos a -78°C . Cuando se disolvieron todos los reactivos la reacción se removió del baño de hielo seco y se mezcló durante 24 hs a temperatura ambiente. La solución se torna lentamente rojo-marrón. Se evalúa el progreso de la reacción por CCD en AcOEt:ciclohexano 1:1. Se corta la reacción evaporando el solvente y se purifica por cromatografía en columna con ciclohexano:AcOEt 8:2. Rendimiento 22%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (d, 2H), 6.84 (d, 2H), 6.70 (s, 2H), 4.14 (t, 2H), 3.93 (t, 2H), 1.32 (s, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.57, 160.90, 136.61, 134.32, 113.98, 83.69, 64.50, 37.27, 24.97. $[\text{M}+\text{Na}]$: 366.1489, encontrado: 366.1514.

6-[p-[2-(2,5-Dioxo-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]phenyl]-2-ethyl-3-[2-(8-ethyl-4-iodo-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopenten-1-yl]-1-thia-1,1-indenedione (40**):**



Procedimiento Suzuki 2 con **16** y **39**. El $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ se agregó en 4 alicuotas. Rendimiento 15%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,98 (dd, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,74 (ddd, 1H), 7,53 (ddd, 1H), 7,50 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,14 (dd, 1H), 6,96 (dd, 2H), 6,91 (dd, 1H), 6,74 (m, 2H), 4,19 (m, 2H), 3,97 (m, 2H), 2,55 (m, 3H), 2,37 (m, 1H), 1,08 (t, 3H), 1,05 (t, 3H). $[\text{M}+\text{Na}]$: 923.9997, encontrado: 924.0043.

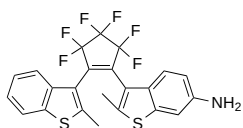
3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(8-methyl-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-6-nitro-1-thiaindene (48**):**



En un balón de 100 mL se mezclaron 2,14 mmol (1 g) **1** con 25 mL ácido acético glacial y 2,25 mL anhídrido acético en un baño de hielo. 6,4 mmol (0,27 mL) de HNO_3 se agregaron lentamente con agitación vigorosa, y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 30 hs. La reacción se evaluó mediante CCD con

ciclohexano:AcOEt 9:1, y al finalizar se agregó 25 mL H₂O helada, con lo cual precipitó un sólido blanco-amarillo. La solución se neutralizó con NaOH (c) y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna con ciclohexano para rendir 45% producto.

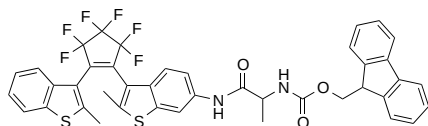
3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(8-methyl-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-thia-6-indenylamine (49):



En un balon de 100 mL se mezclaron 0,39 mmol (200 mg) de **48** y 40 mL MeOH y se agregó a la suspensión 2,7 mmol (650 mg) de NiCl₂·6H₂O agitando vigorosamente hasta disolución completa de **48**. La solución se enfrió en un baño de hielo y se agregó 10,5 mmol (400 mg) de NaBH₄. Un precipitado negro se formó de inmediato.

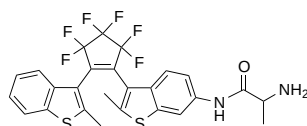
Se evaluó por CCD con ciclohexano:AcOEt 7:3. Al cabo de 0,5 hs a temperatura ambiente la reacción se cortó con HCl 0,04 N, se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se extrajo con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó al vacío para obtener un aceite rosa con rendimiento 77%.

(1S)-2-(3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(8-methyl-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-thia-6-indenylamino)-1-methyl-2-oxoethylamino (9H-fluoren-9-yl)acetate (51):



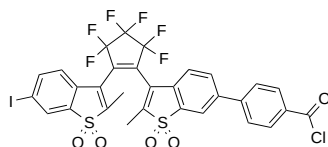
En un balon seco refluado con Ar se agregó 0,2 mmol (65 mg) de FMOCalaOH (**77**), 1,5 mL THF anhidro y luego 0,3 mmol (22,7 uL) de SOCl₂. La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h en atmósfera de Ar y luego se evaporó el solvente y los excedentes de SOCl₂, SO₂ y HCl durante 1 h a 50°C. El producto se disolvió directamente en 400 uL THF anhidro y se agregó 0,1 mmol (50 mg) de **49** seco. La solución se agitó durante 2 hs a 50°C, se cortó con NaOH, y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna con ciclohexano para obtener un rendimiento del 54%.

(2S)-2-Amino-1-(3-{3,3,4,4,5,5-hexafluoro-2-(8-methyl-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-thia-6-indenylamino)-1-propanone (52):



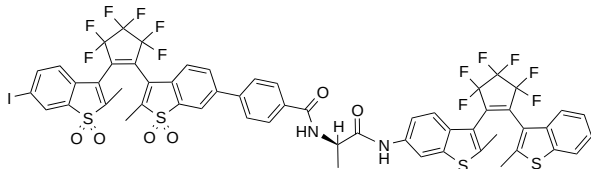
En un balón de 10 mL se mezclaron 0,03 mmol (22 mg) de **51**, 2 mmol (180 uL) de piperidina y 2 mL CHCl_3 . Se agitó la mezcla a 50°C durante 70 min y se evaluó por CCD con ciclohexano:AcOEt 7:3. Al finalizar, se cortó con HCl y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó al vacío, y el producto se purificó por cromatografía en una columna corta de sílica gel con ciclohexano. Rendimiento 60%.

p-(3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-oxo-1-thia-6-indenoyl)benzoyl chloride (54**):**



En un balón de 10 mL seco se mezclaron 0,019 mmol (15 mg) de **53** y 2 uL SOCl_2 con 1,5 mL THF anhidro bajo atmósfera de Ar. Se agitó a 50°C durante 1 h y luego se evaporó el solvente bajo vacío durante 1 h a 50°C . El excedente de SOCl_2 , SO_2 y HCl se removieron de esta manera. El producto se utilizó inmediatamente para la próxima reacción.

6-(p-[(1R)-2-(3-{3,3,4,4,5,5-Hexafluoro-2-(8-methyl-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-thia-6-indenylamino)-1-methyl-2-oxoethylamino]carbonyl)phenyl)-3-{3,3,4,4,5,5-hexafluoro-2-(4-iodo-8-methyl-7,7-dioxo-7-thiabicyclo[4.3.0]nona-1,3,5,8-tetraen-9-yl)-1-cyclopenten-1-yl}-2-methyl-1-thia-1,1-indenedione (55**):**

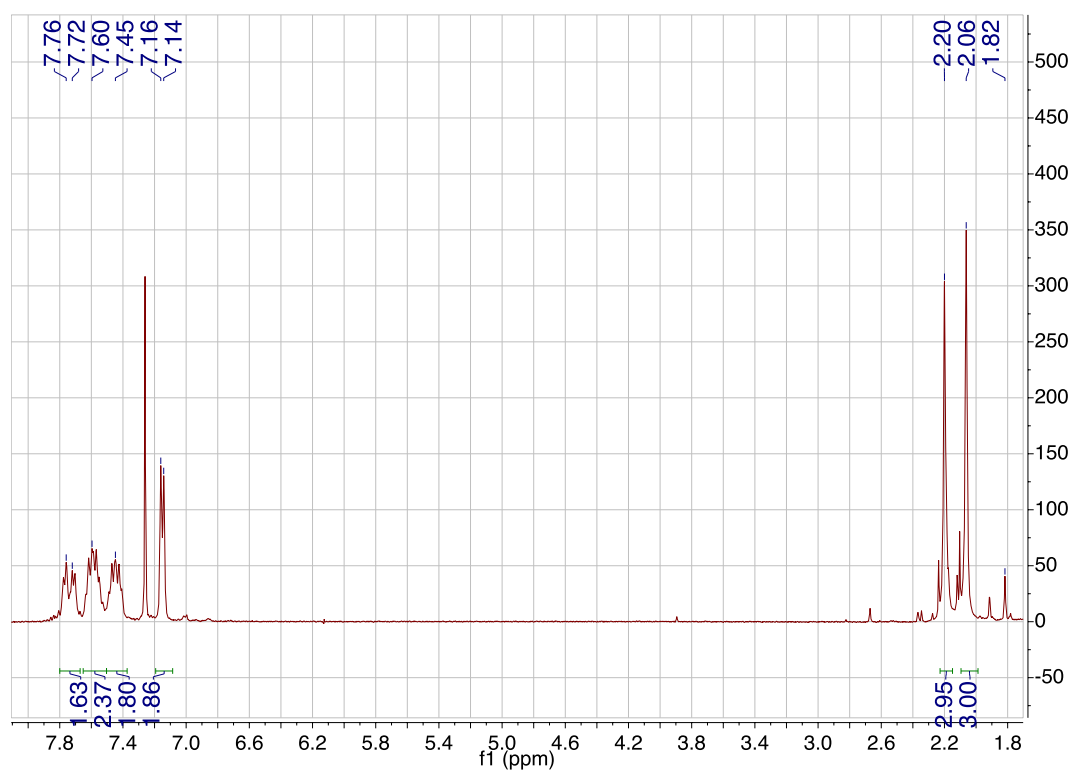


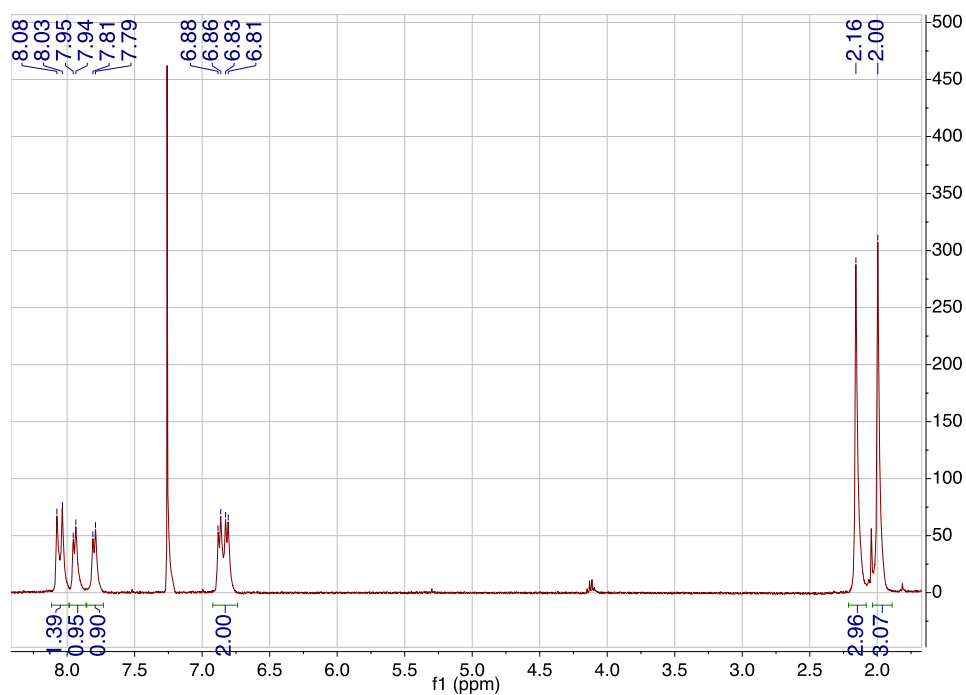
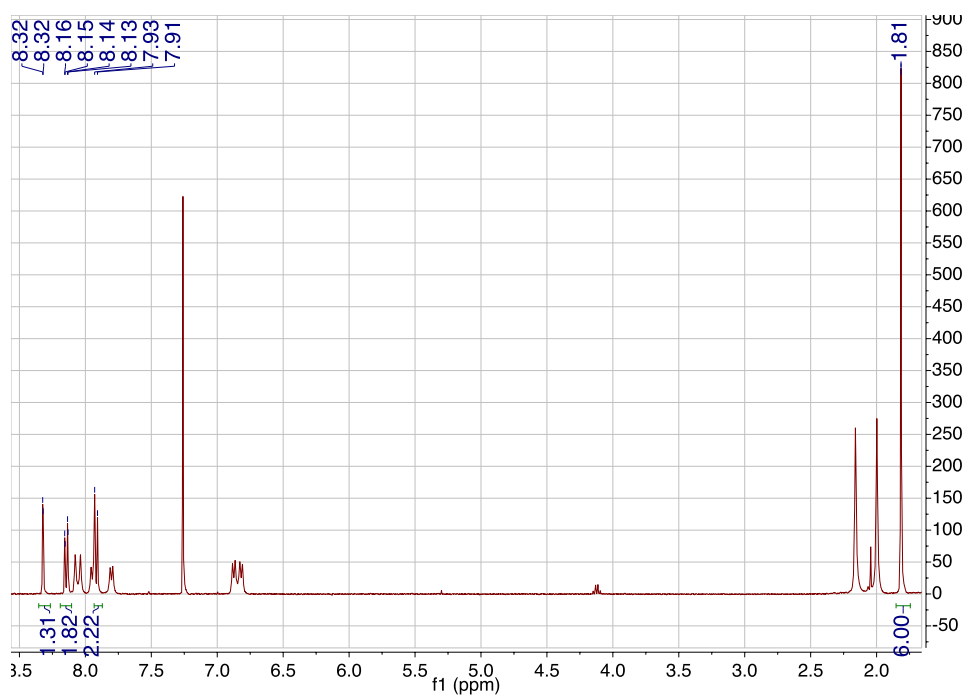
A un balón de 10 mL que contenía 0,019 mmol de **54** seco, se agregó 1 mL THF y 0,027 mmol (15 mg) de **52**. La solución se agitó a 50° por 24 hs, se cortó con NaOH y extrajo con AcOEt. La fase orgánica se evaporó al vacío y el producto se purificó por cromatografía preparativa en capa delgada con AcOEt. Rendimiento 19%. La masa obtenida no fue suficiente para medir espectros de RMN. $[M+H]^+$: 1315.0309, encontrado: 1315.0171.

A.2 Espectros de RMN

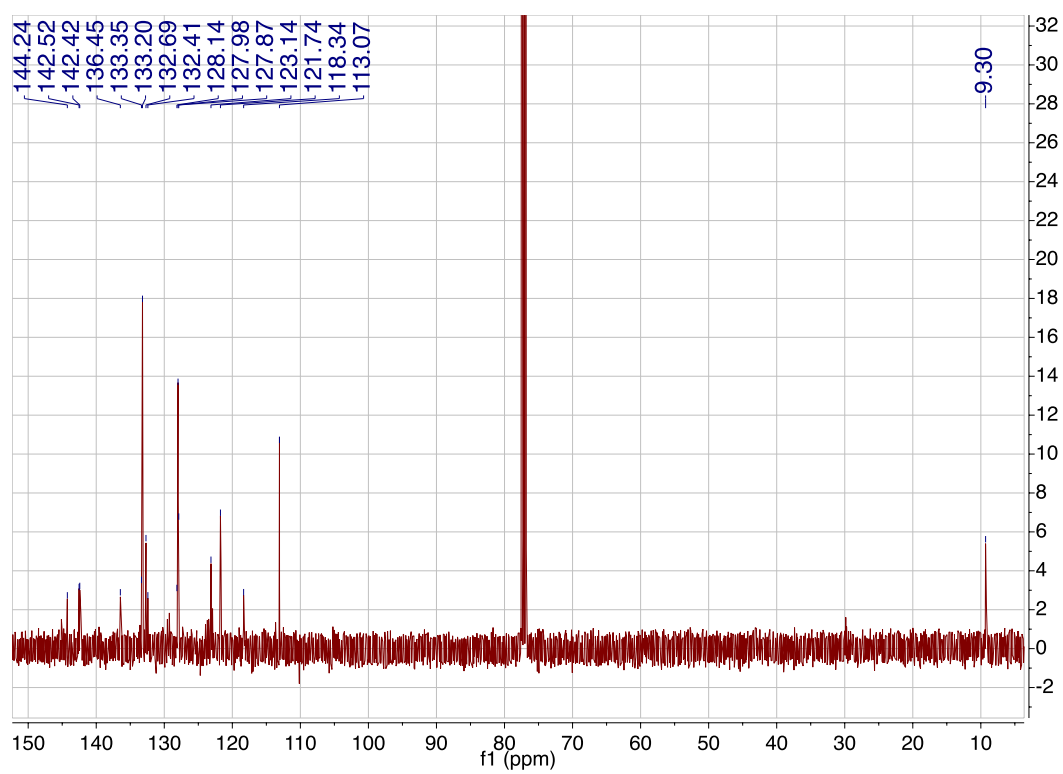
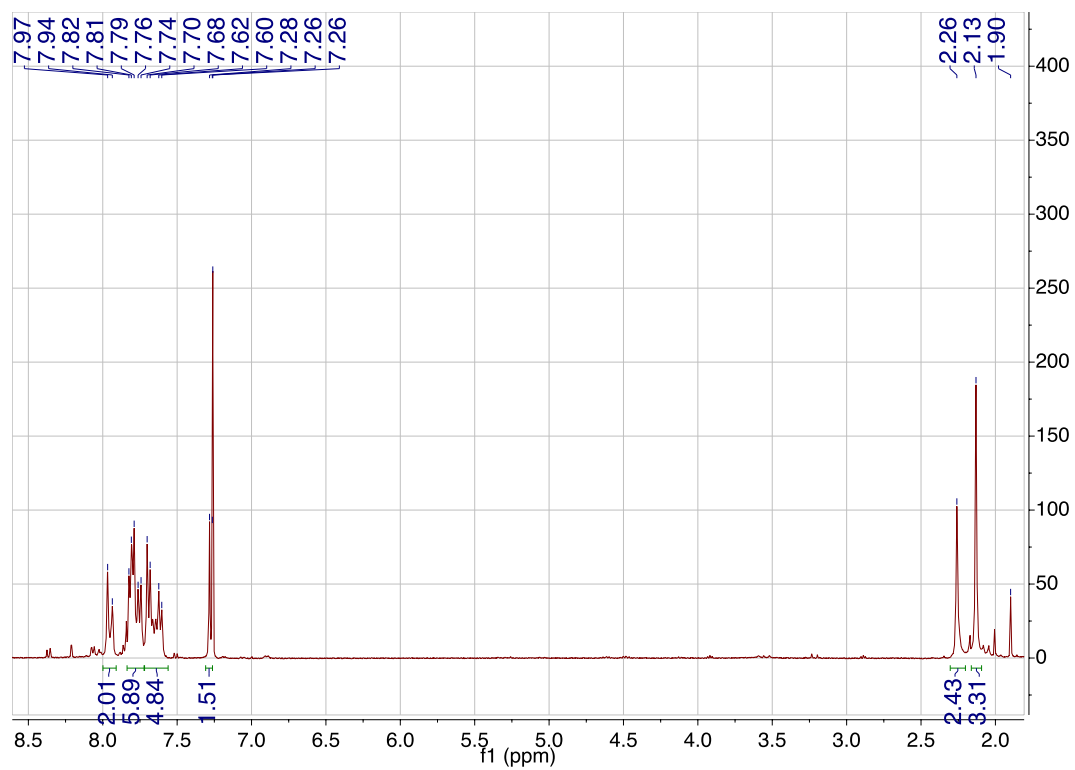
Se incluyen espectros de ^1H y ^{13}C RMN para todos los compuestos nuevos, donde los DHAOs se encuentran casi completamente en el isómero abierto (< 10% isómero cerrado) con algunas excepciones. Los picos que no se señalan en los espectros corresponden normalmente a picos de isómeros cerrados, y si hay picos prominentes de solventes los mismos se señalan. Señales de los carbonos de los isómeros cerrados no se observan en los espectros de ^{13}C .

2

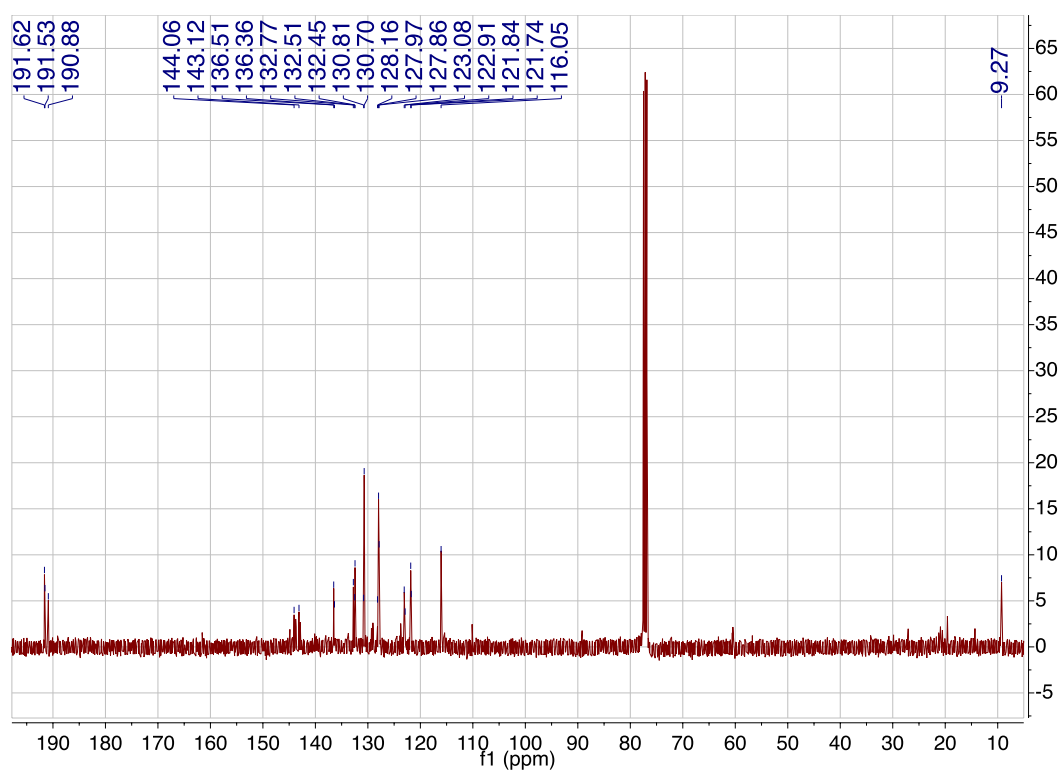
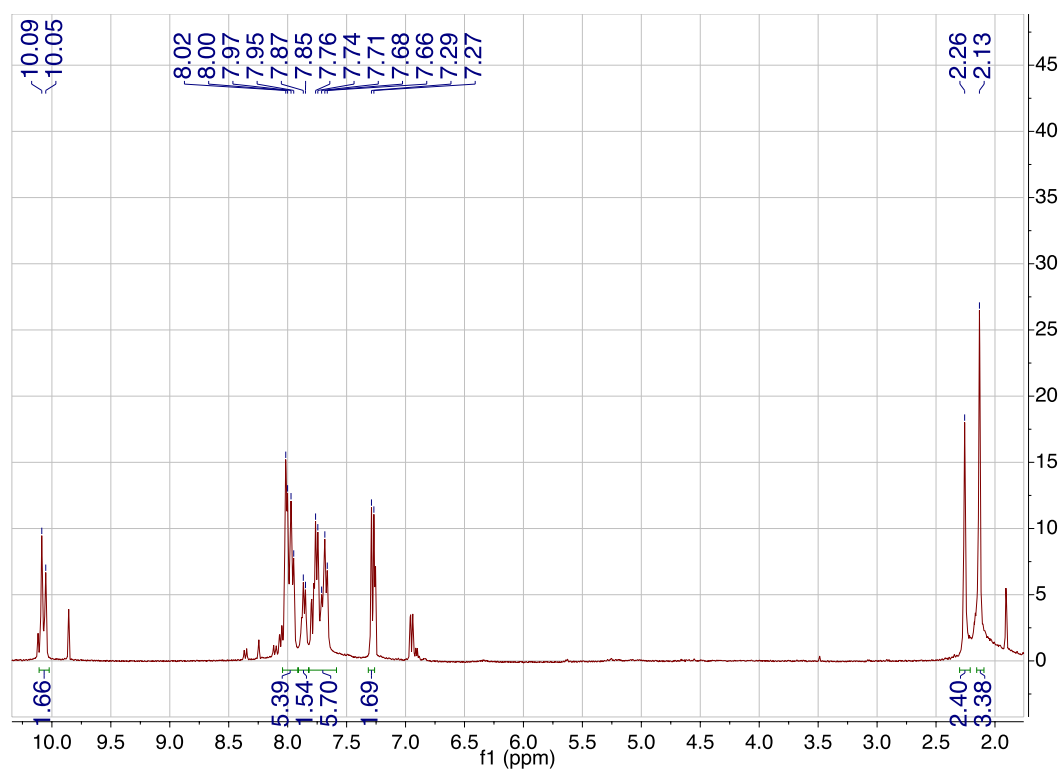


8 Isómero abierto**8** Estado fotoestacionario UV; mezcla de isómeros abierto (minoritario) y cerrado (mayoritario)

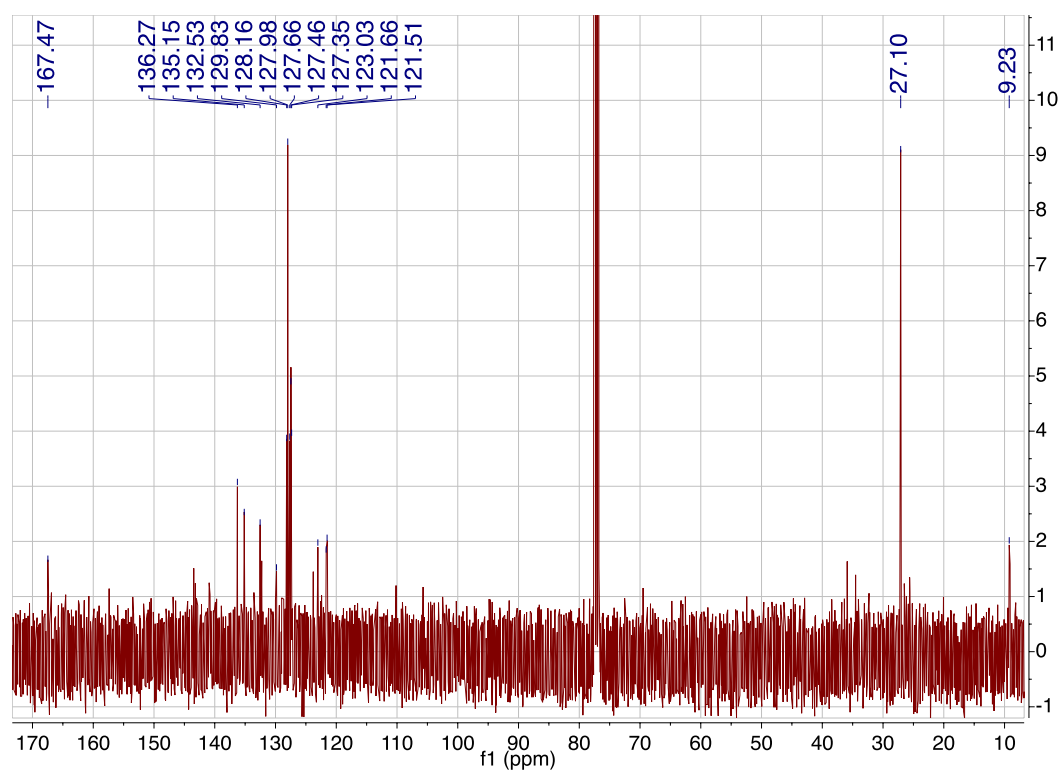
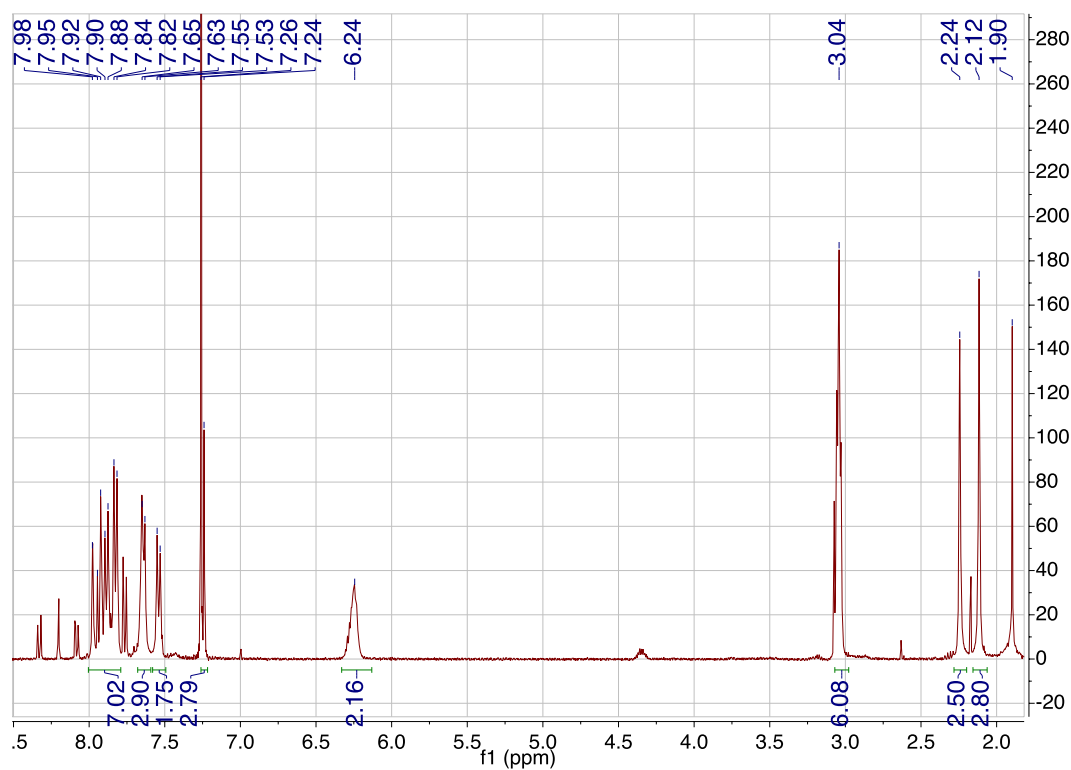
9



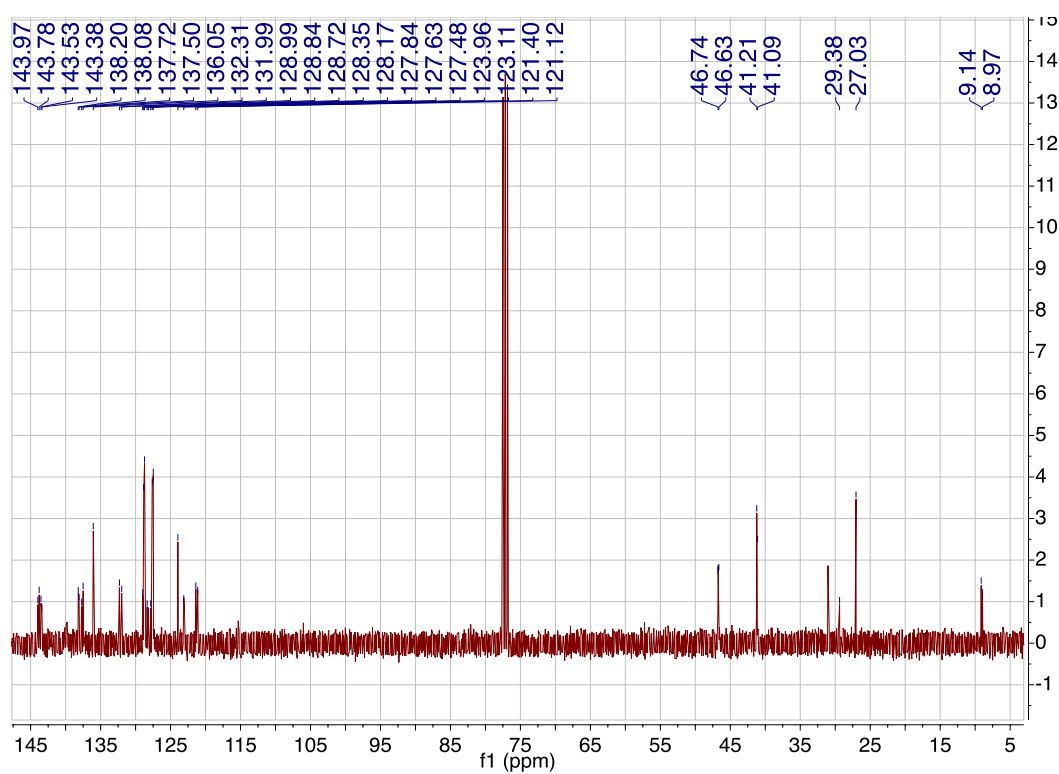
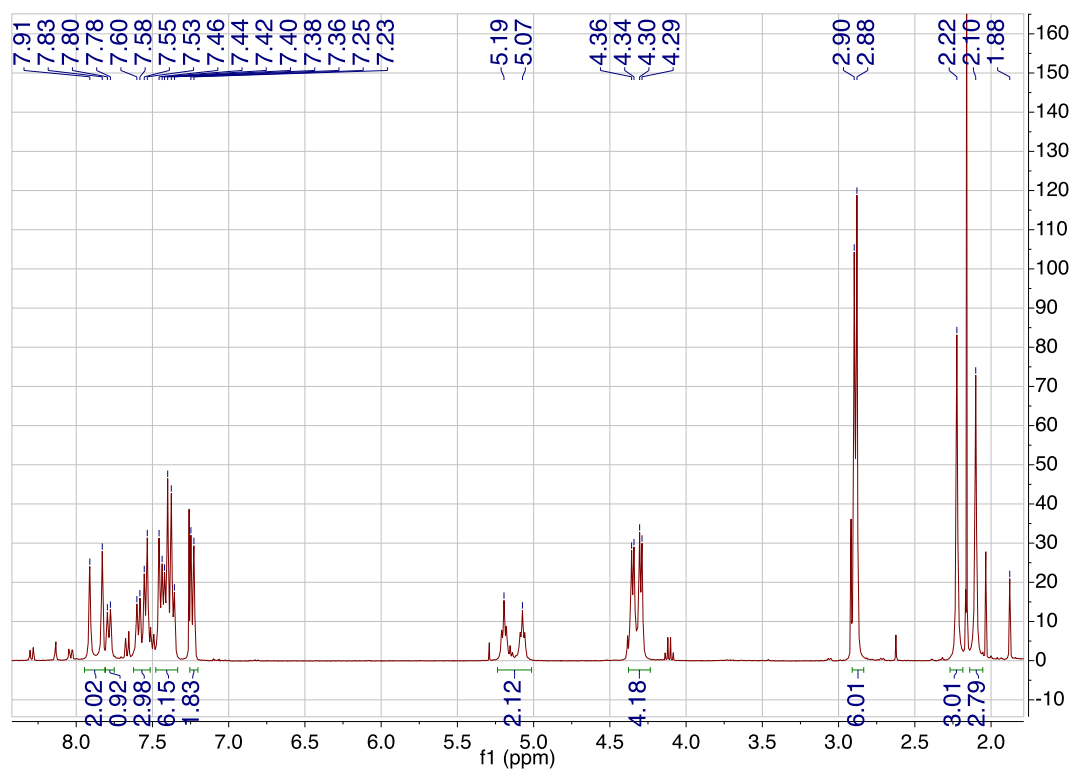
10



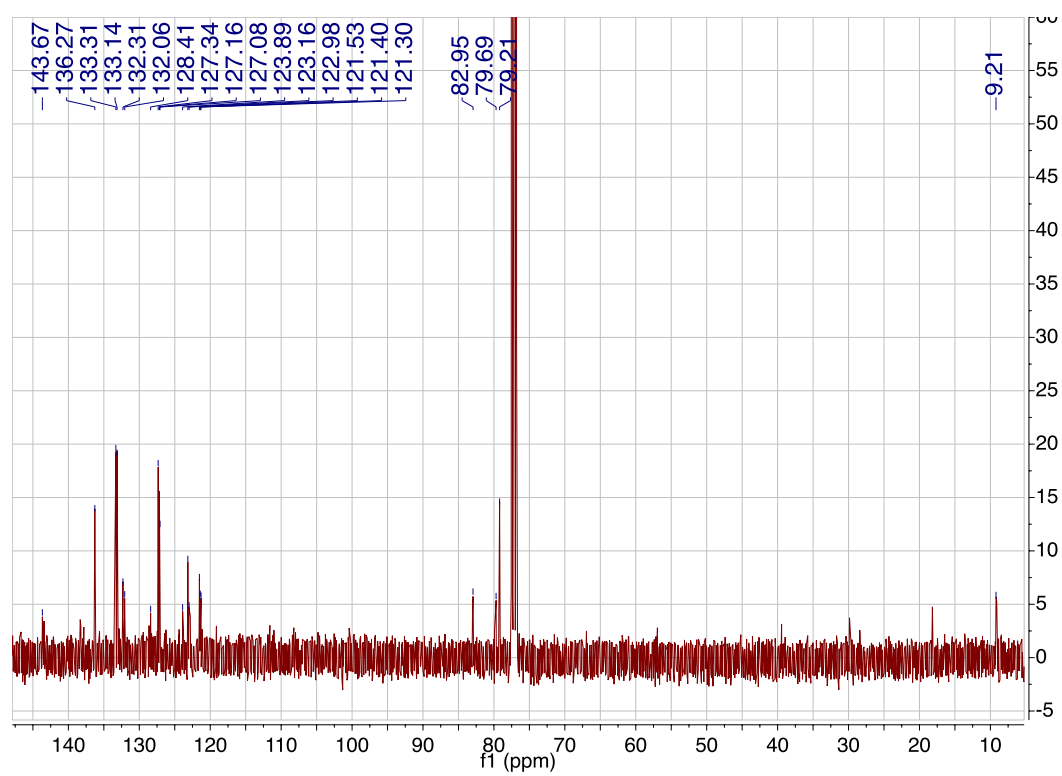
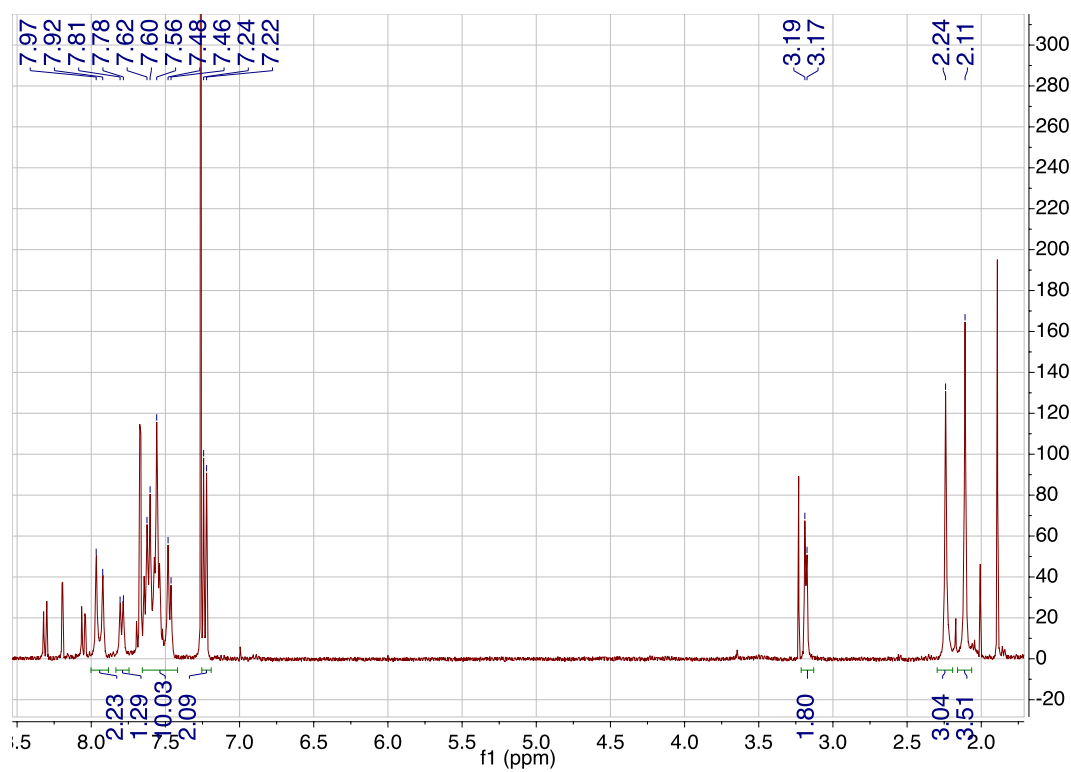
11



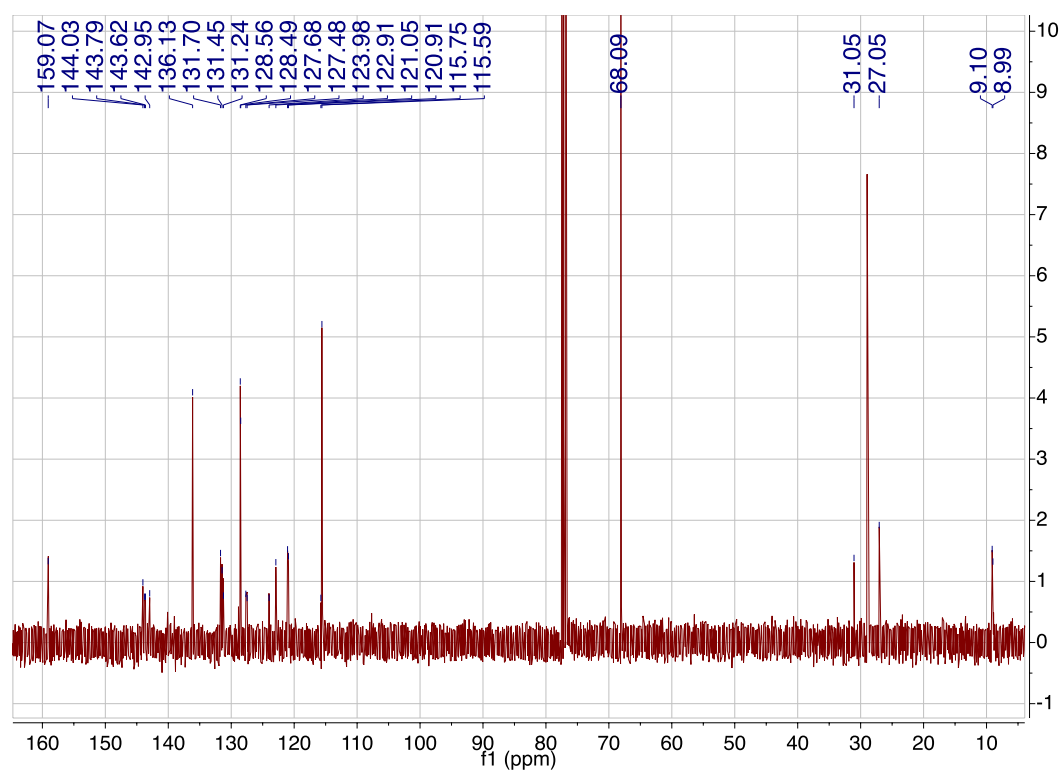
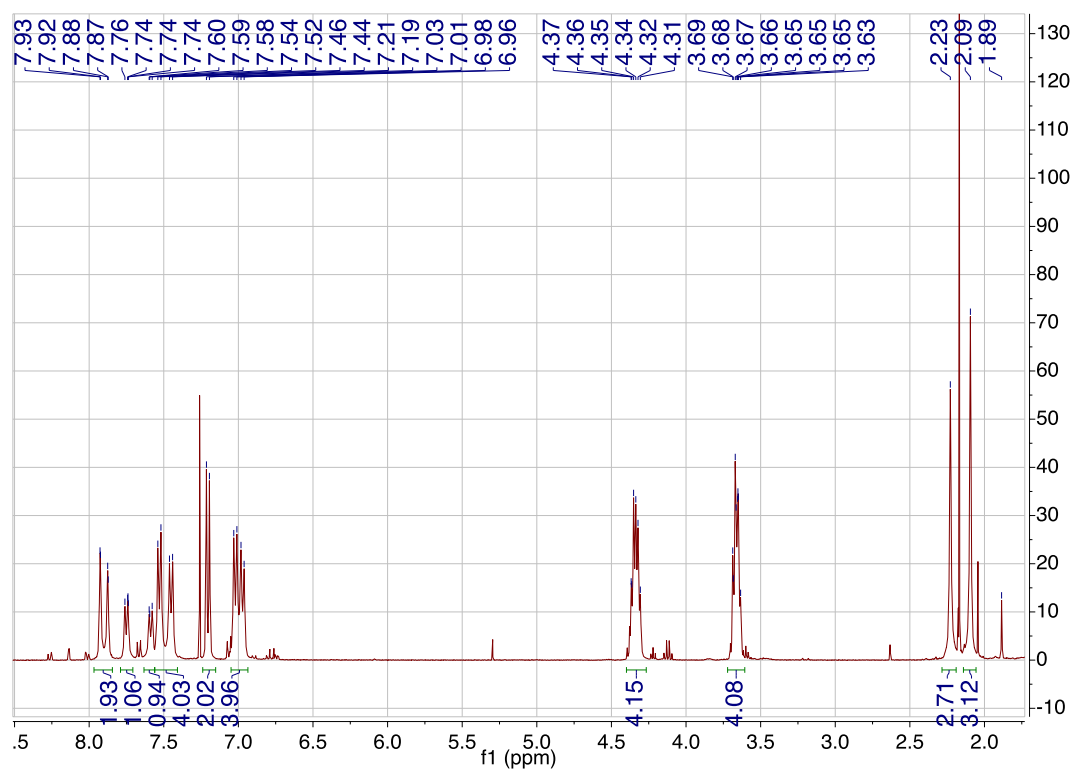
12



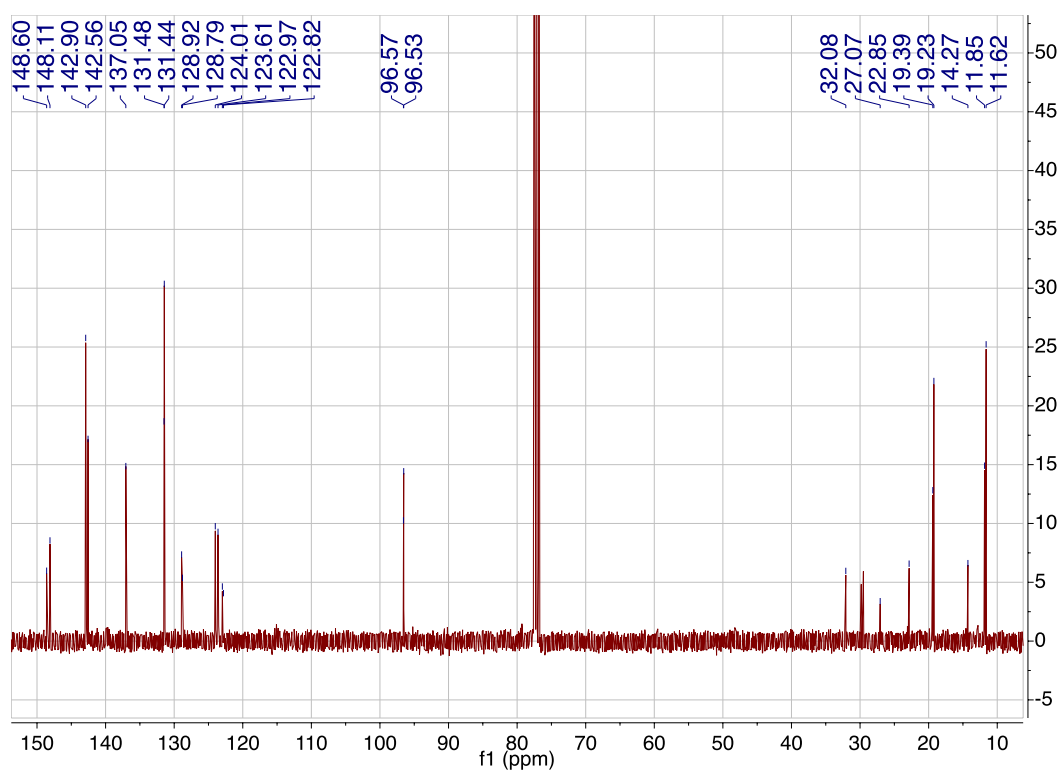
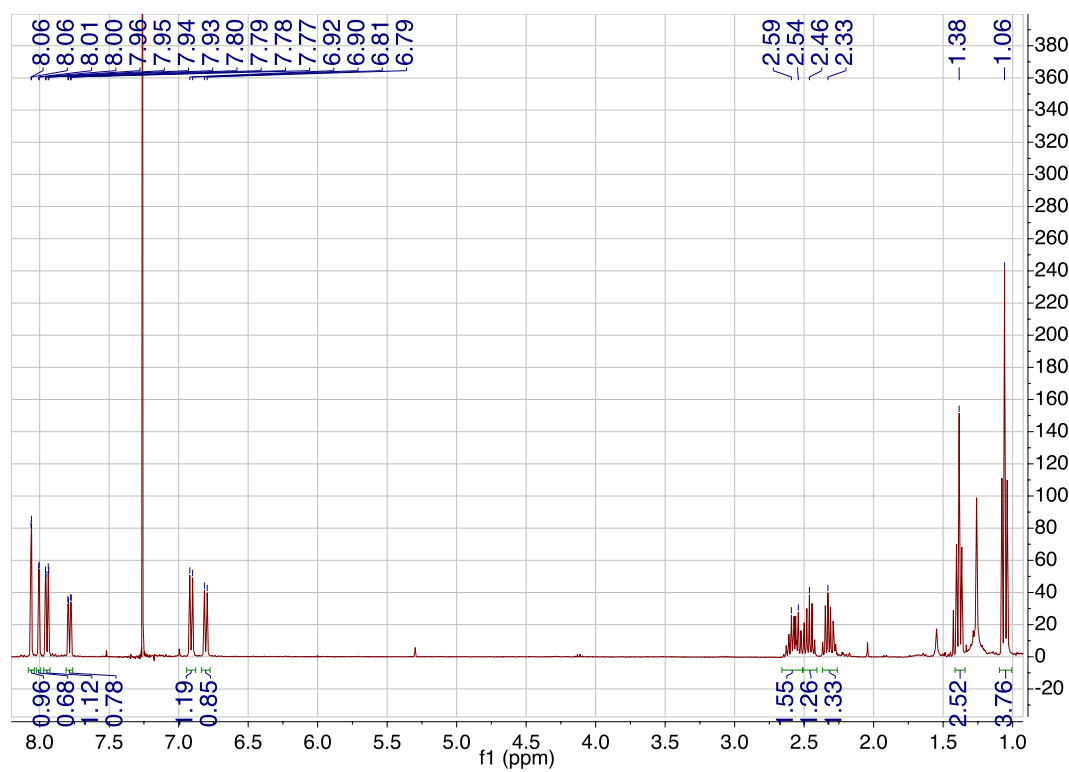
13

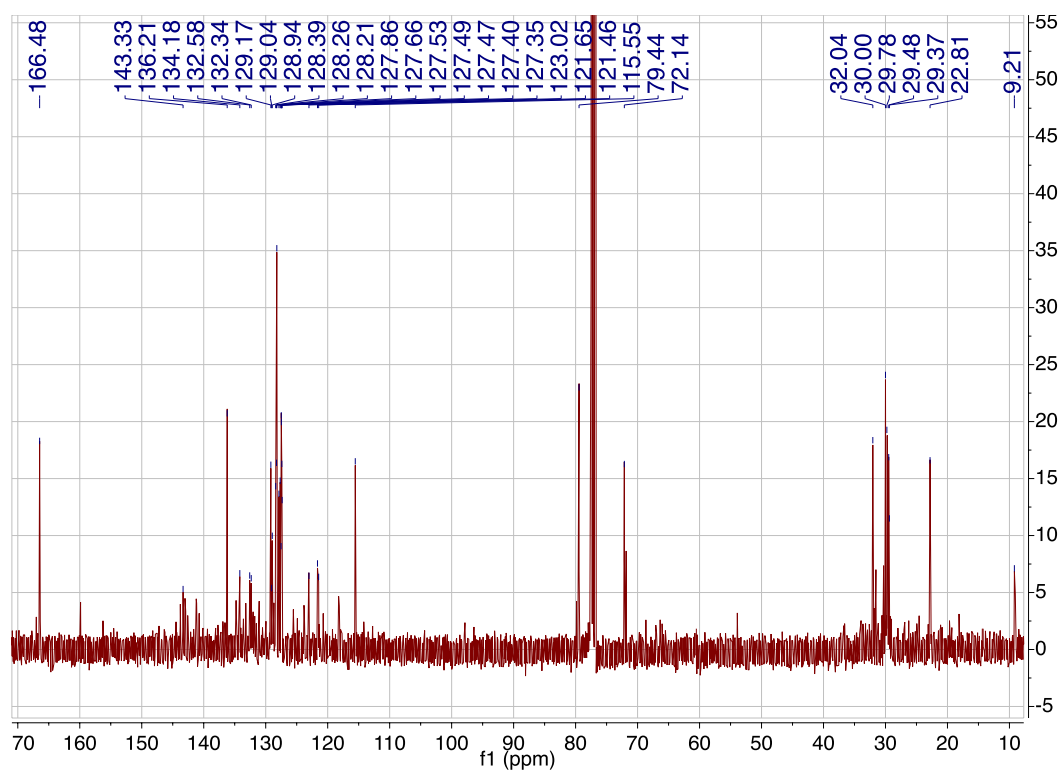
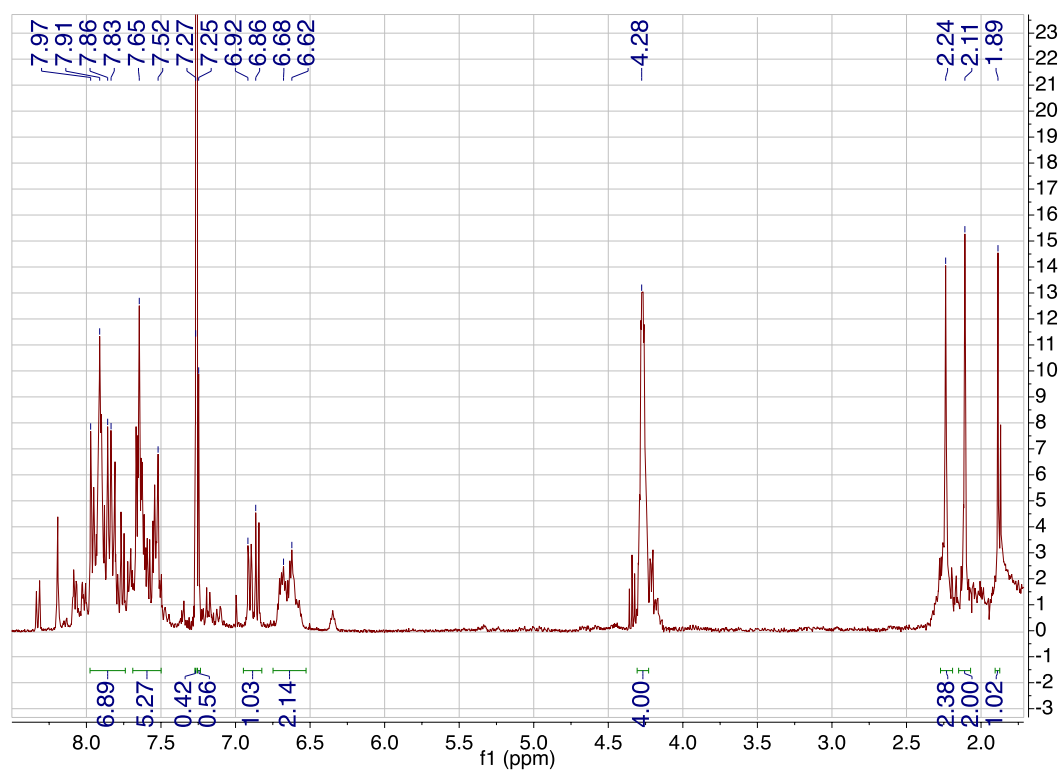


14

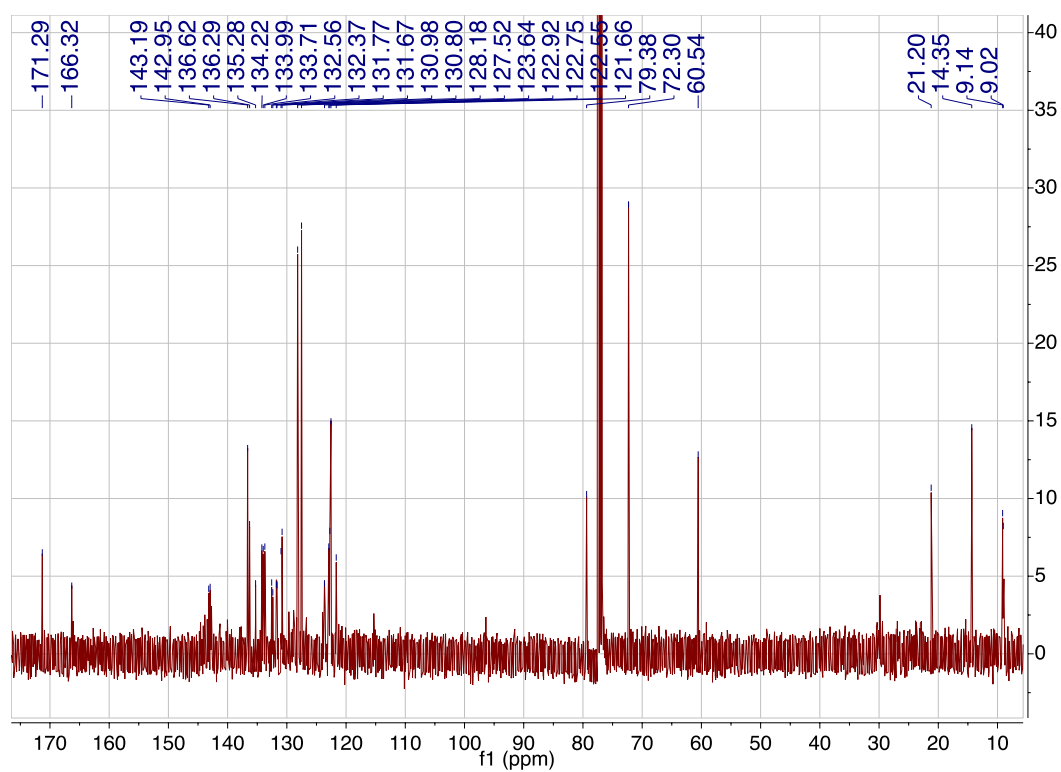
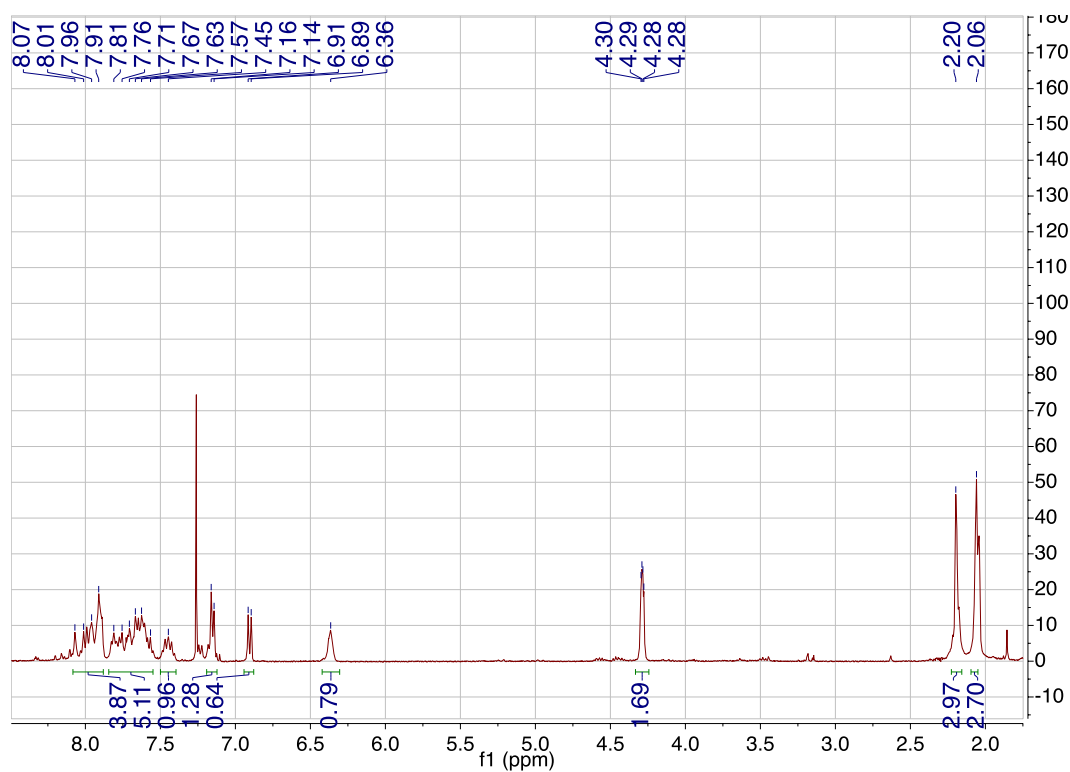


16

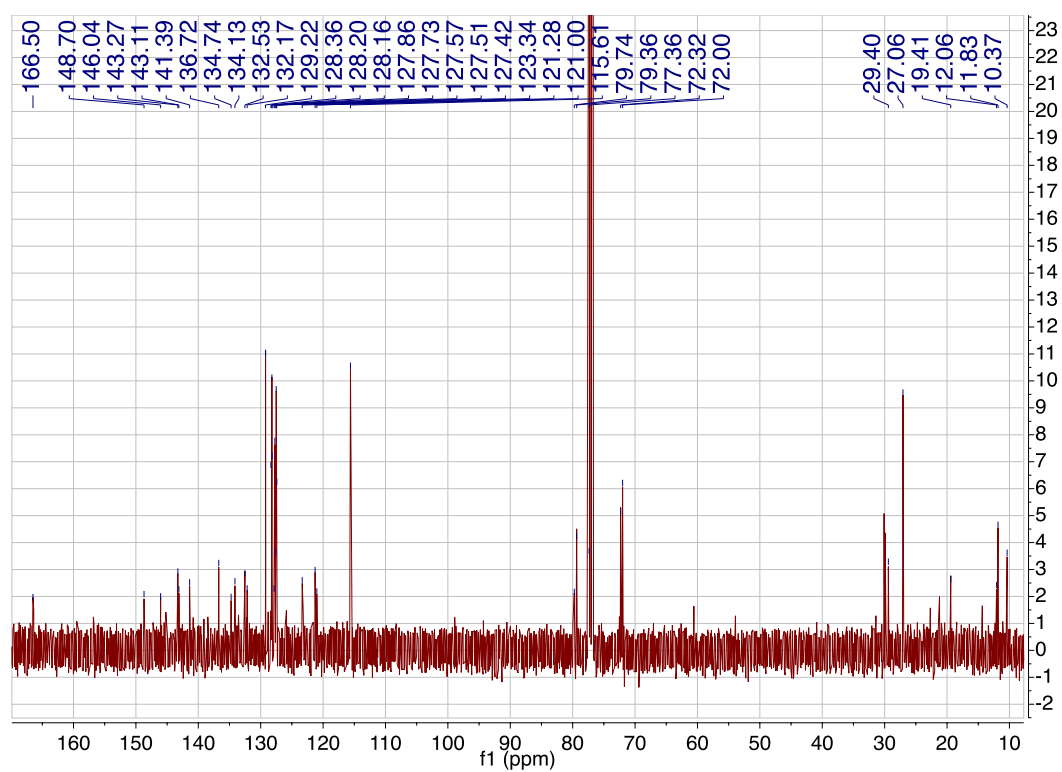
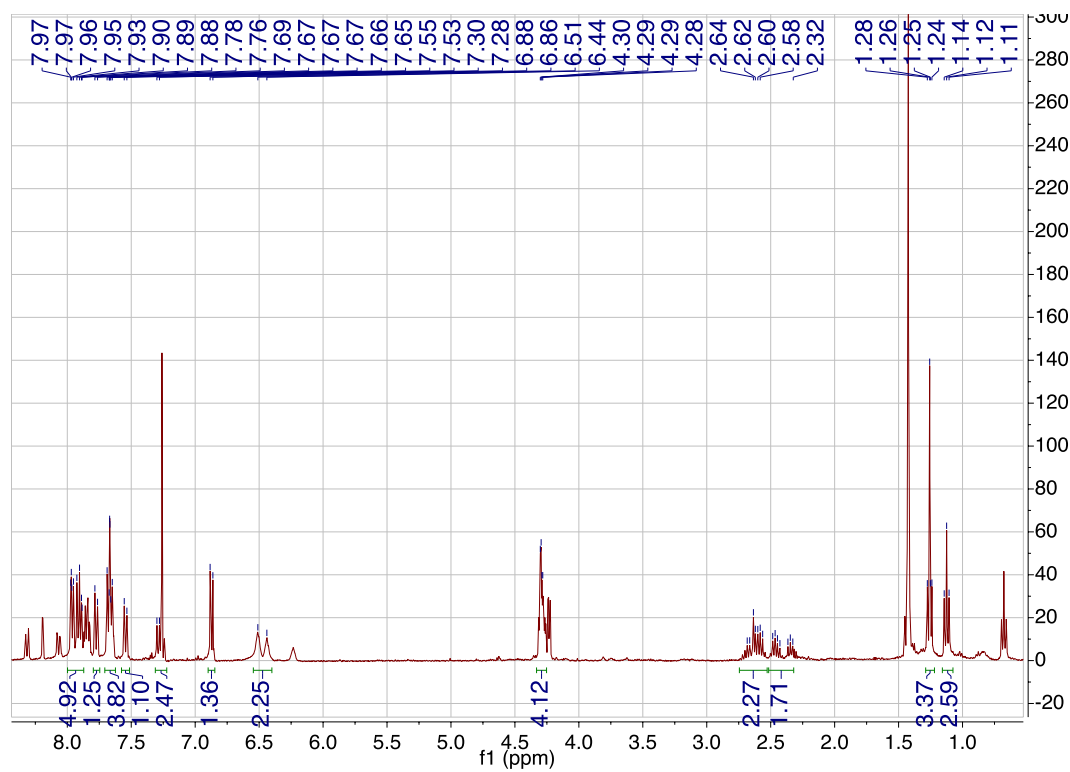




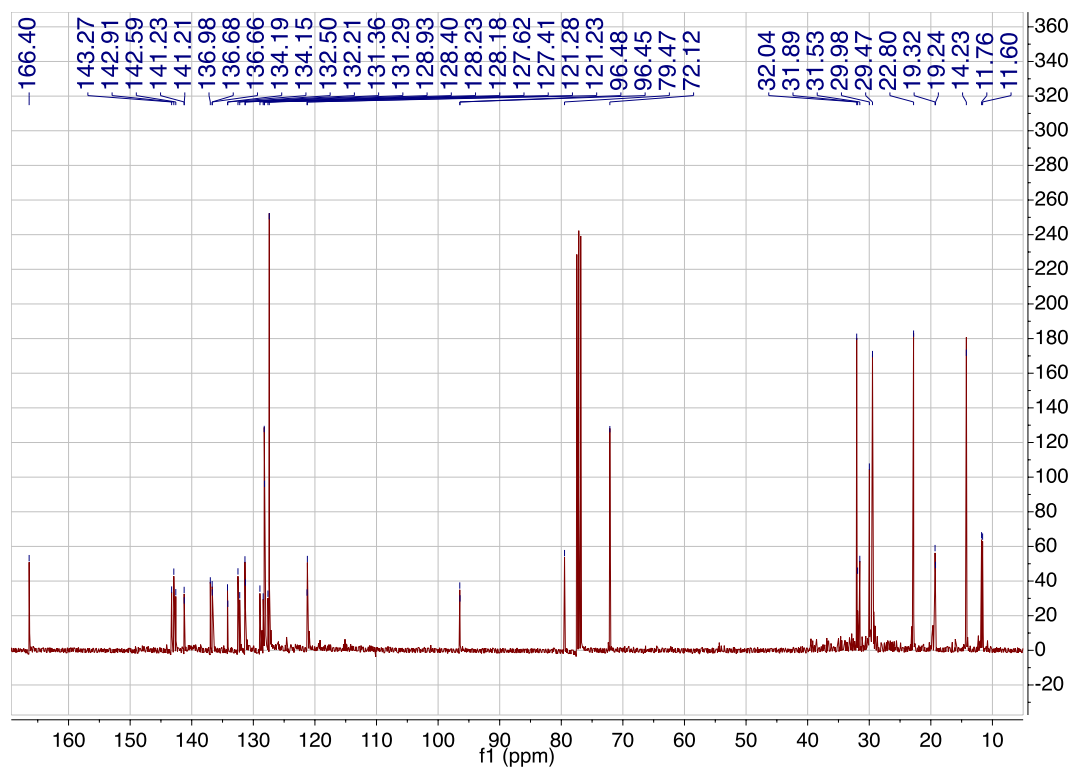
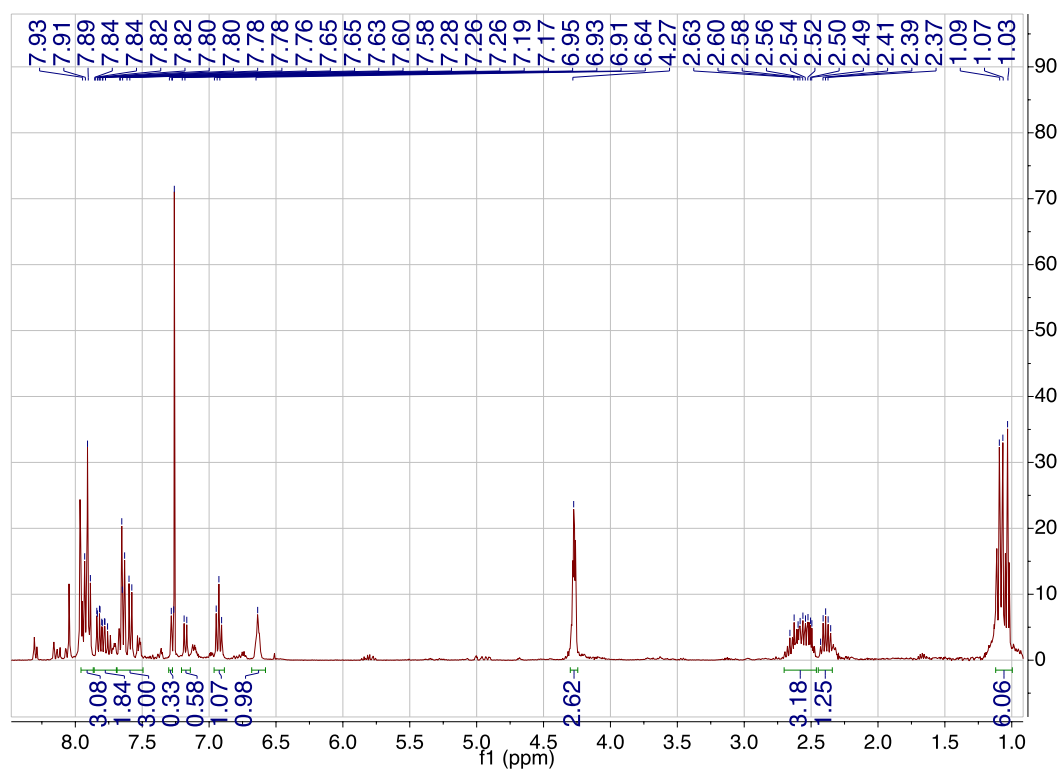
27

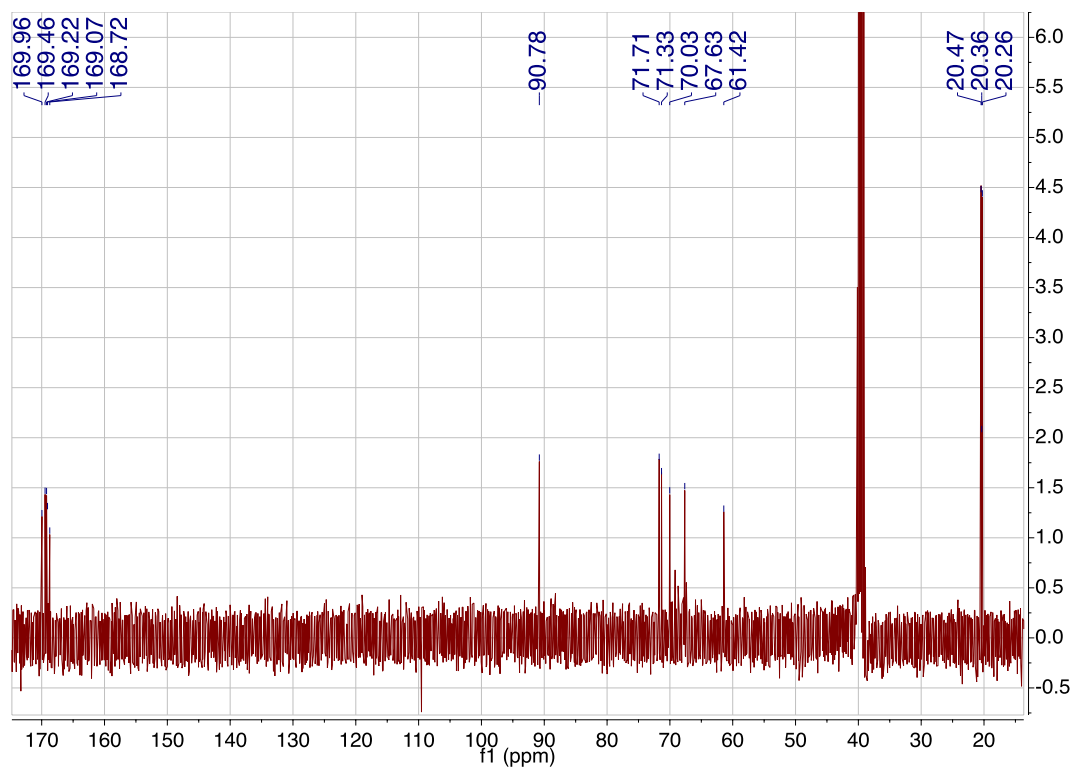
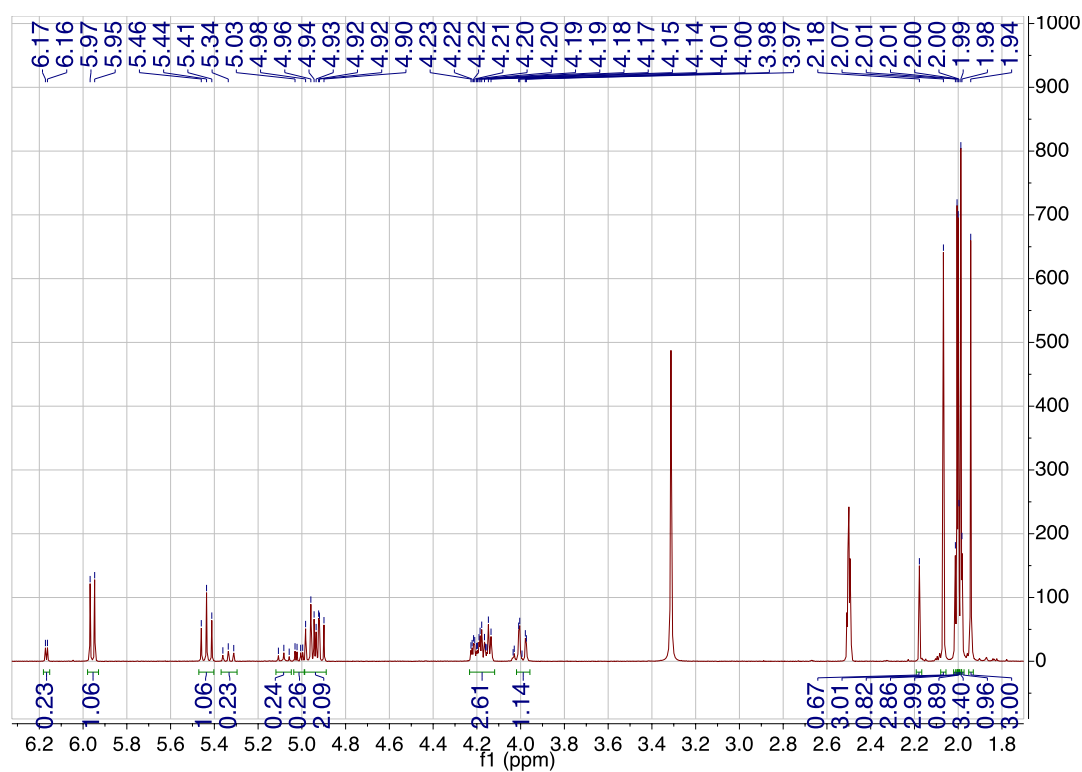


15

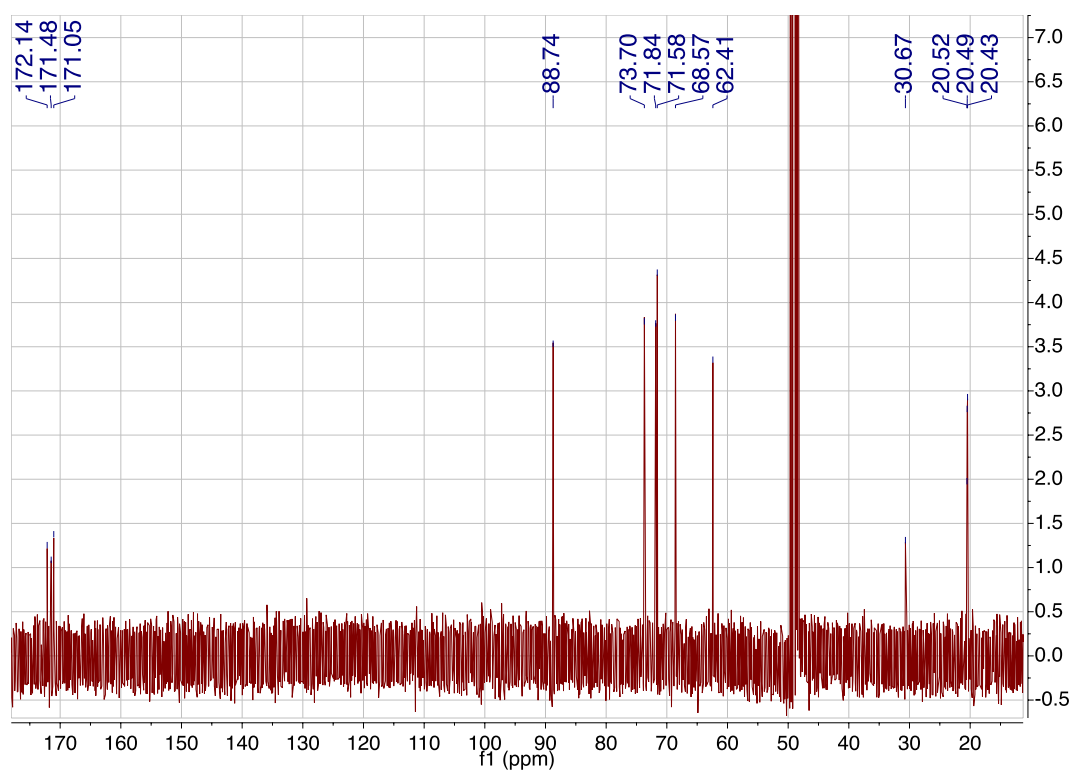
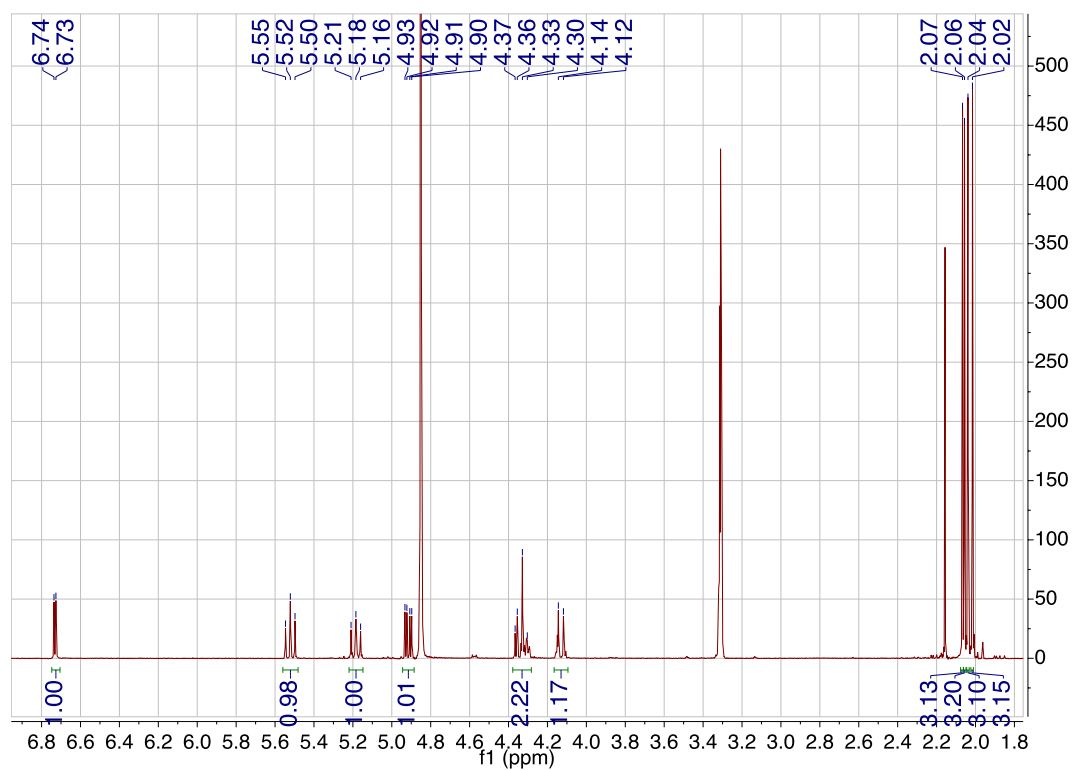


28

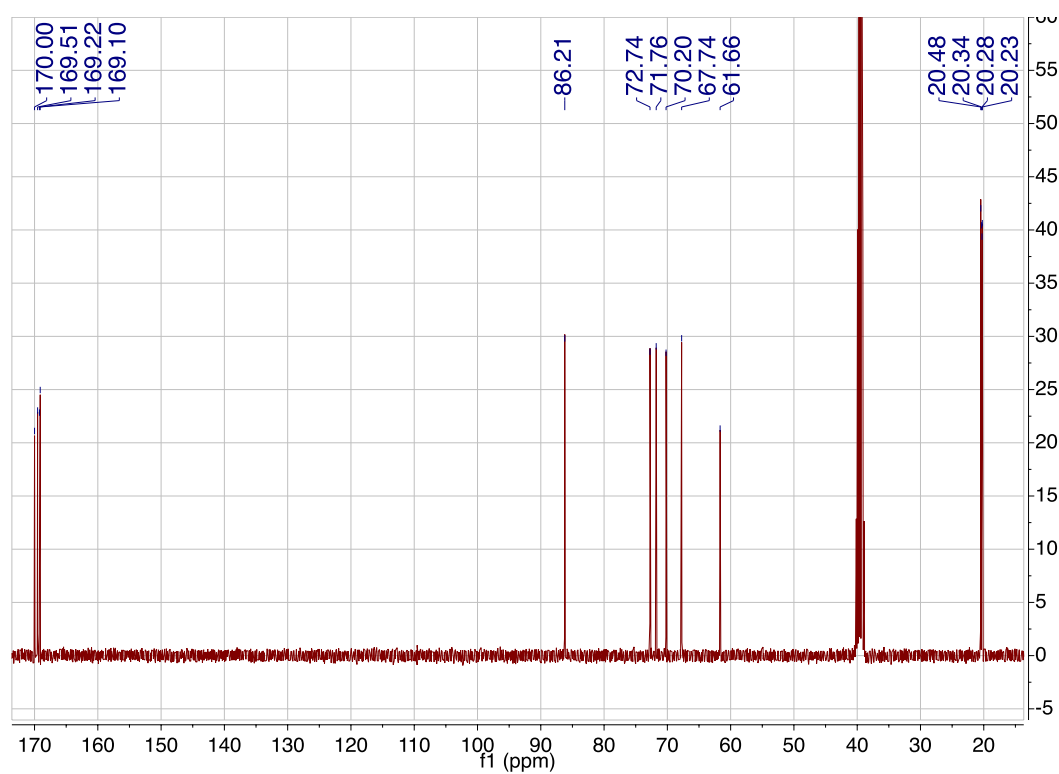
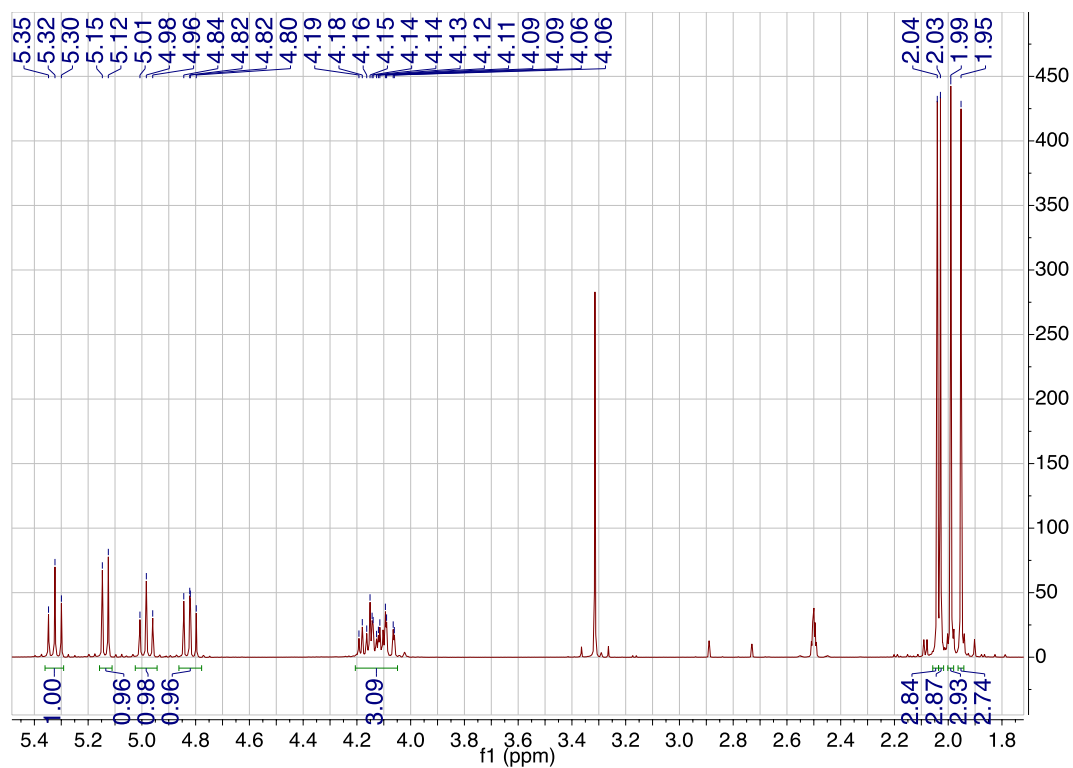




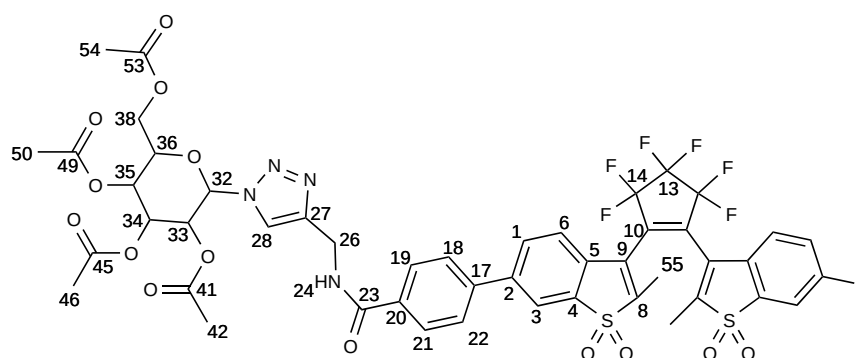
24

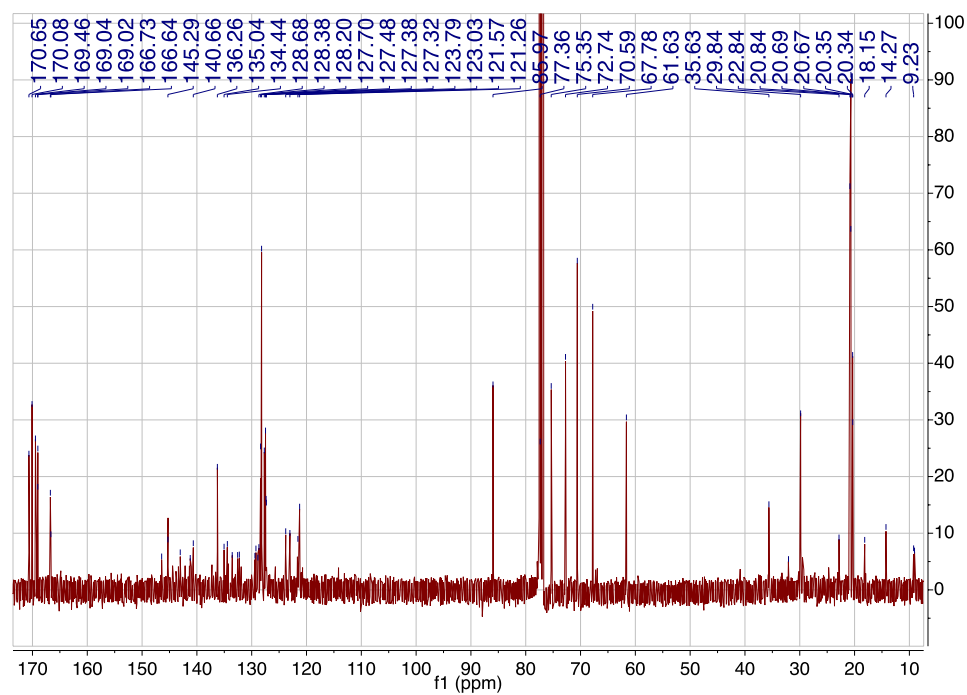
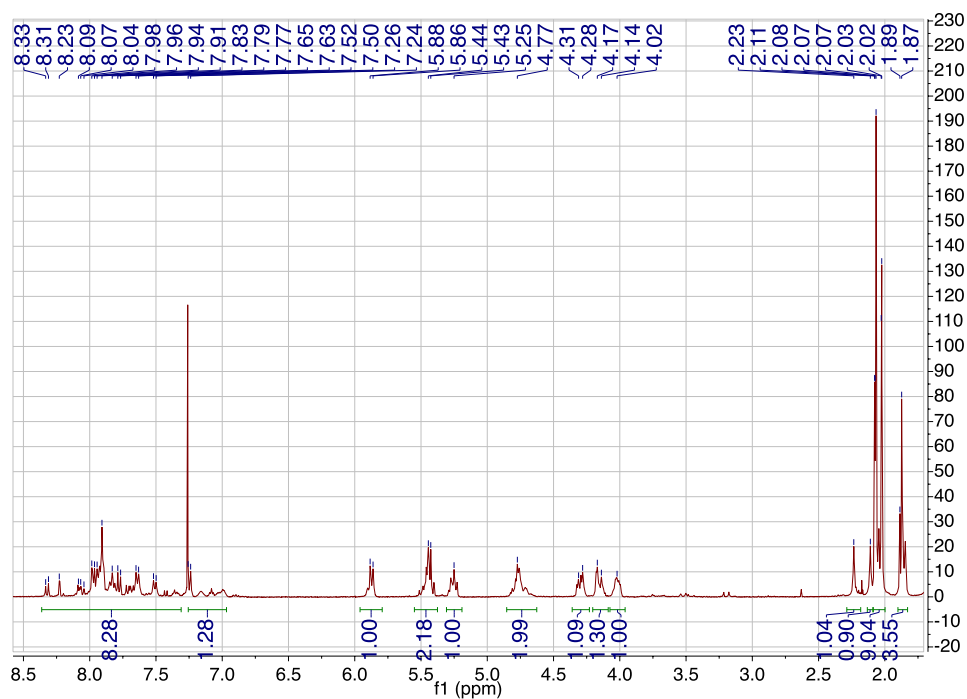


25

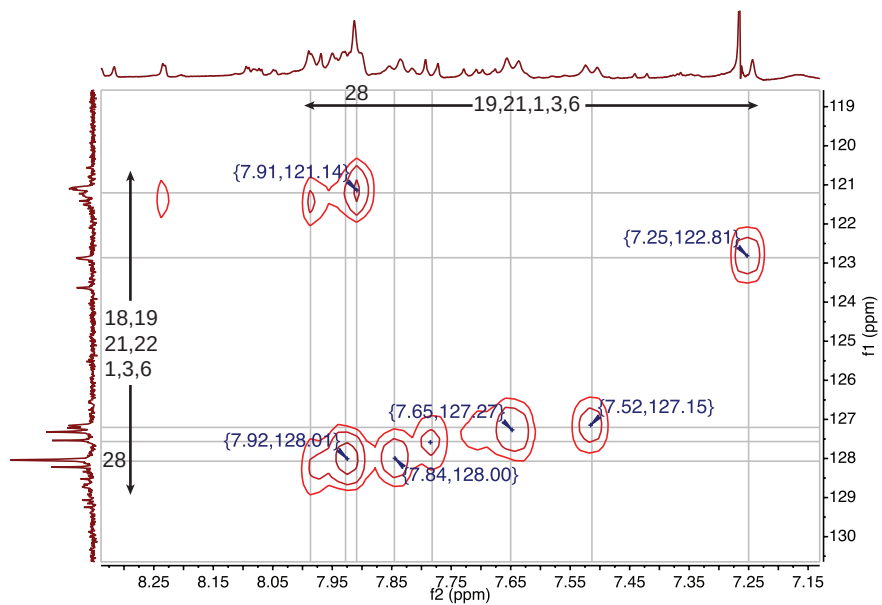
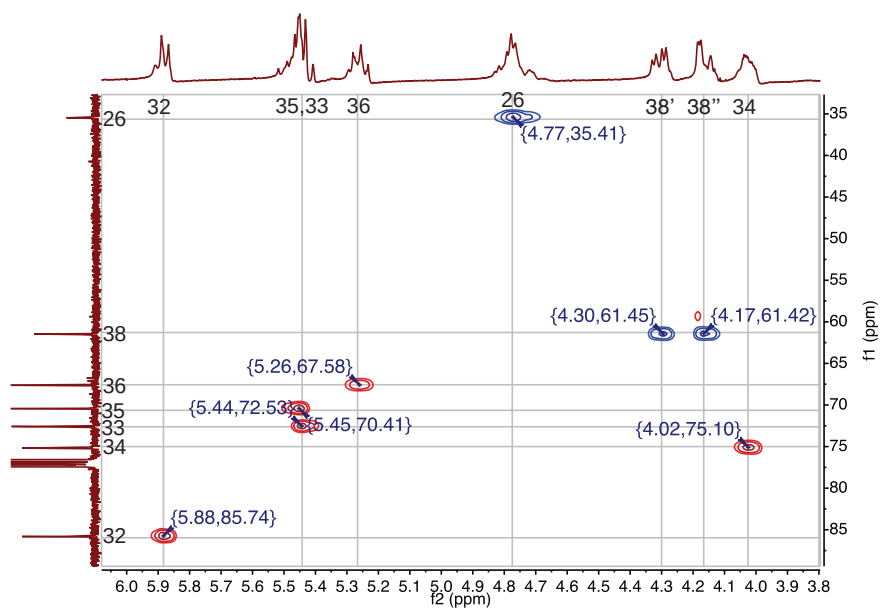
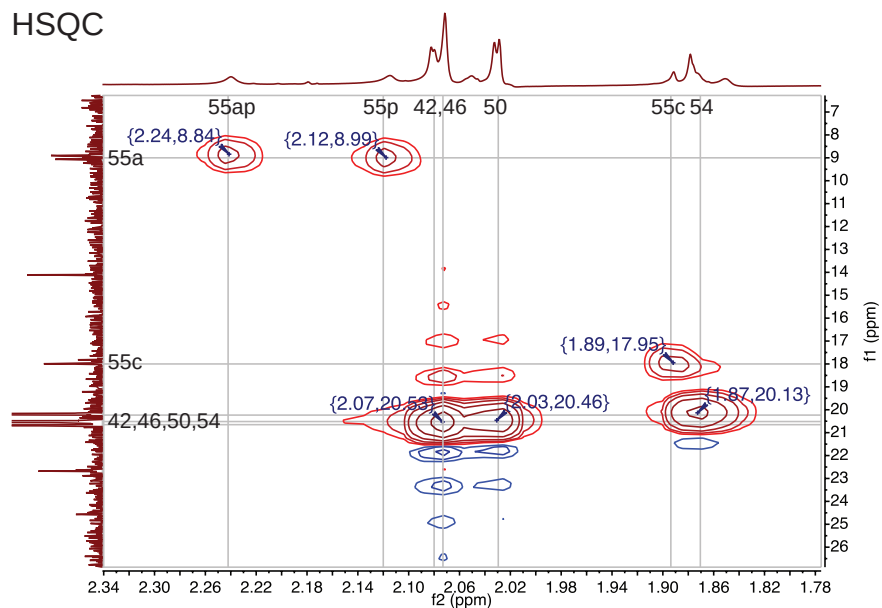


29

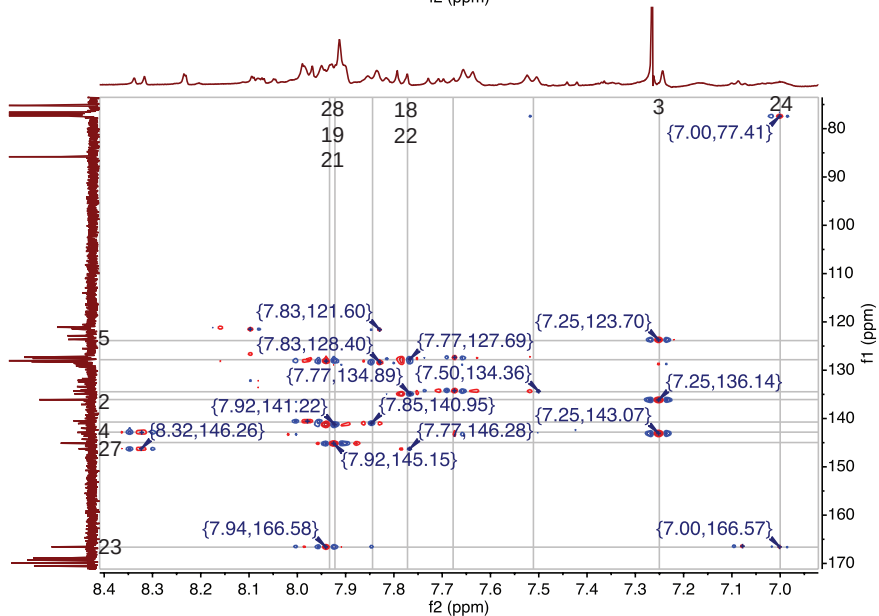
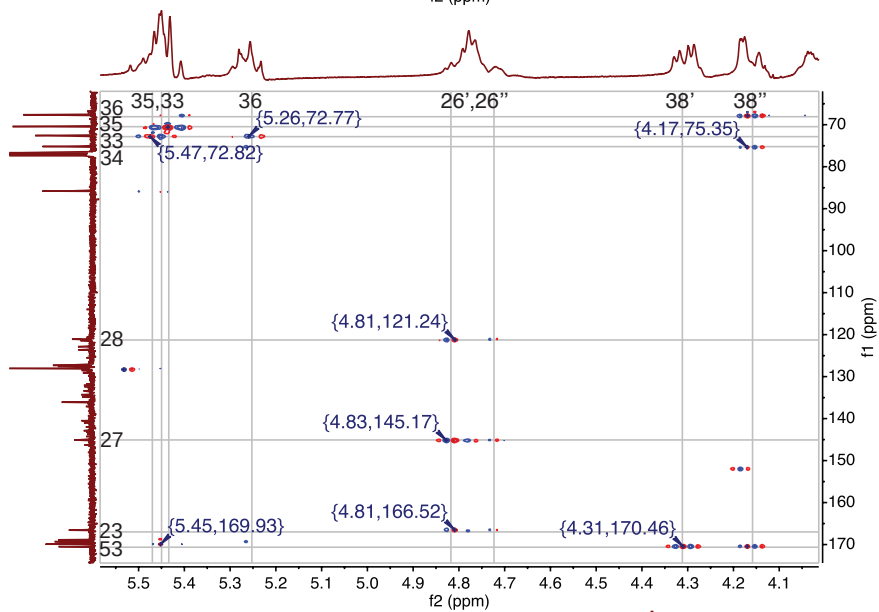
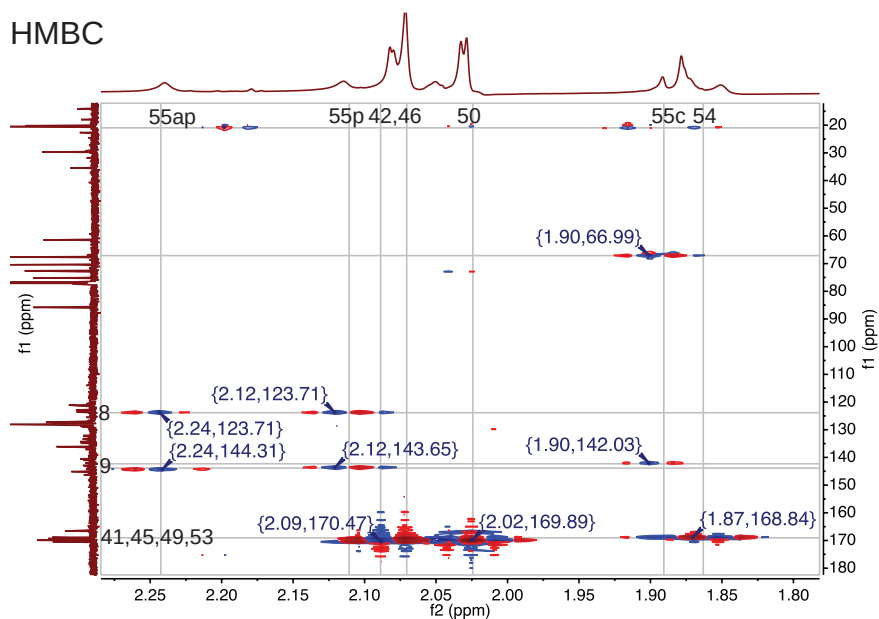




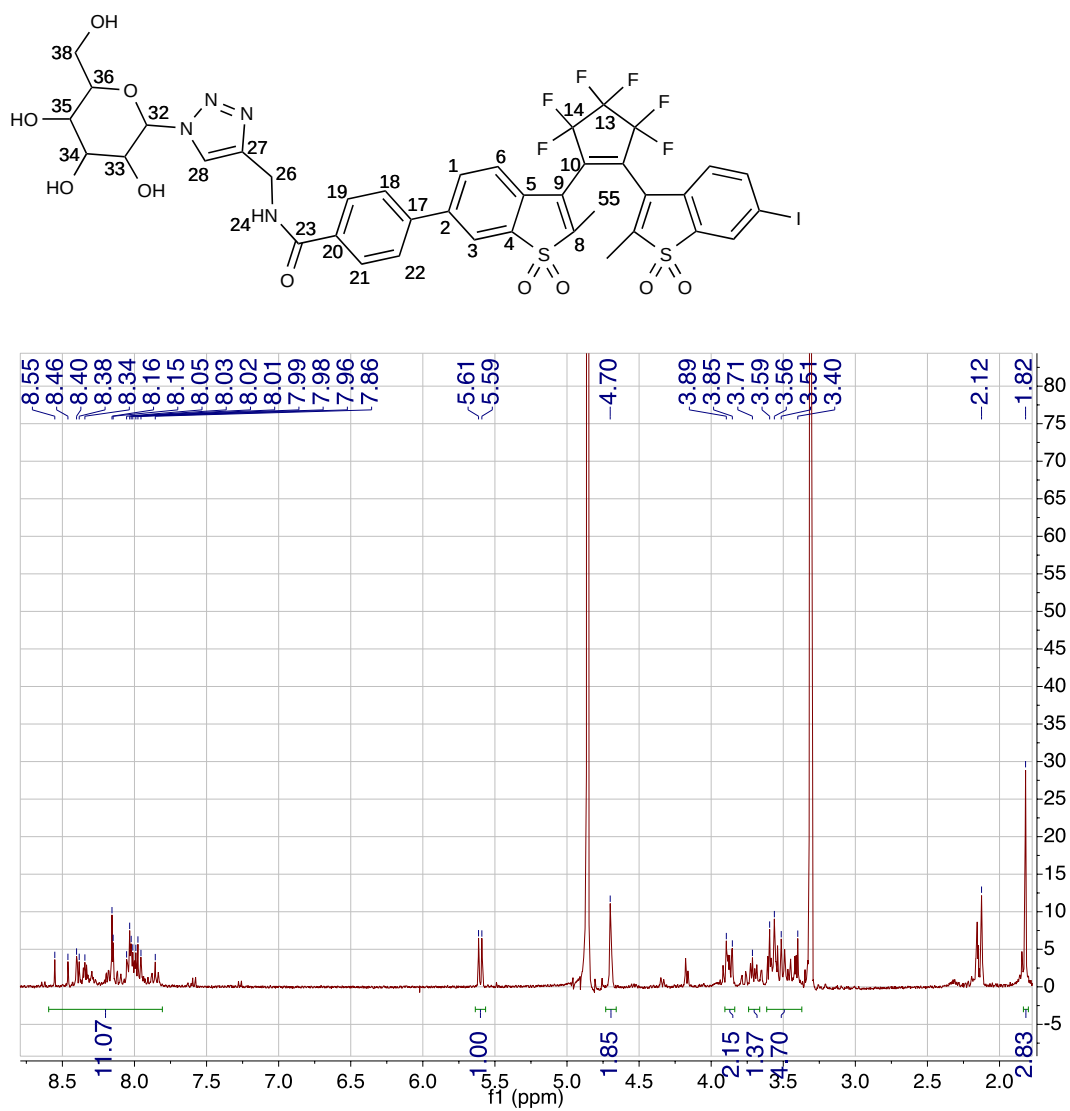
HSQC



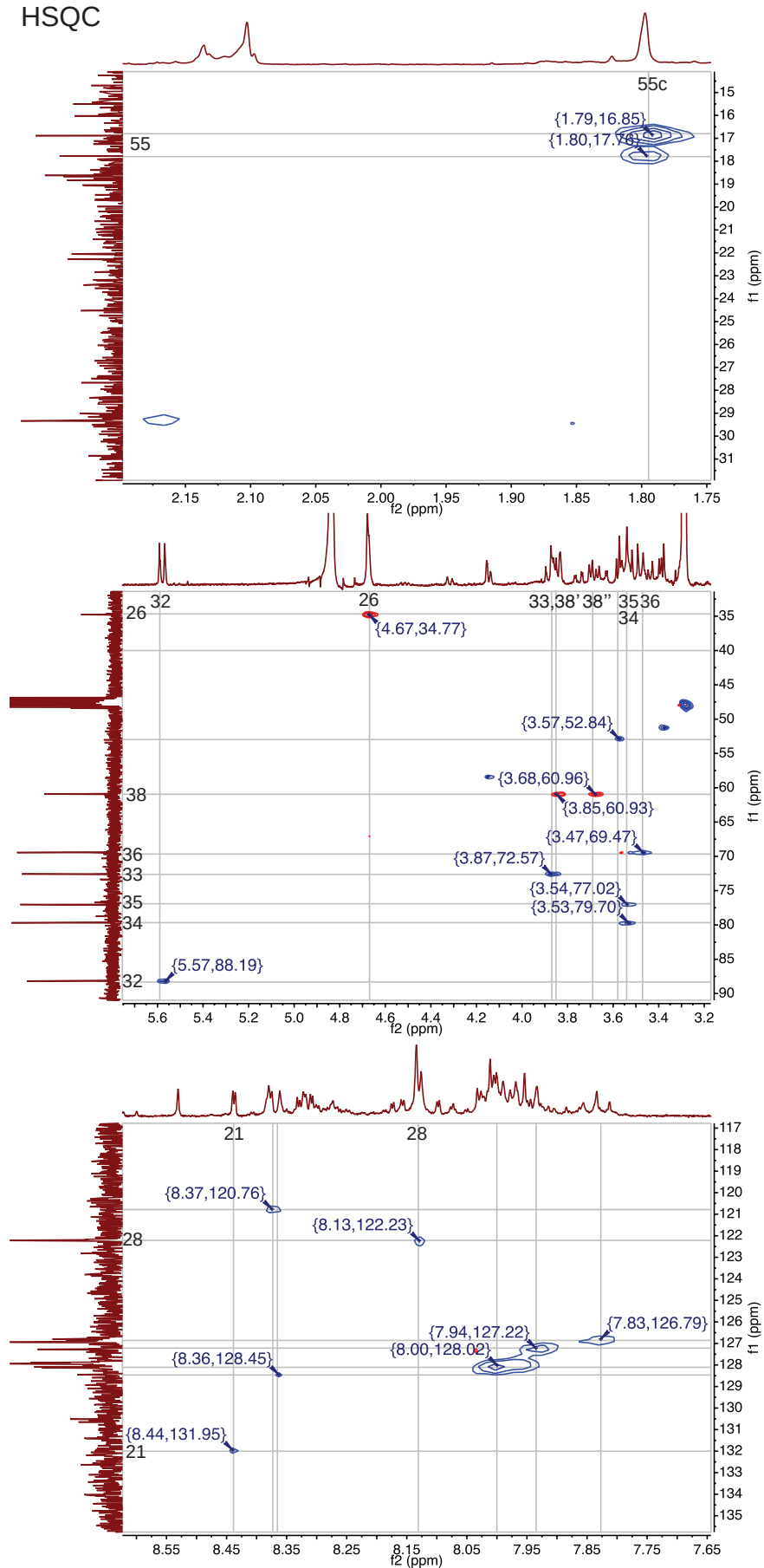
HMBC



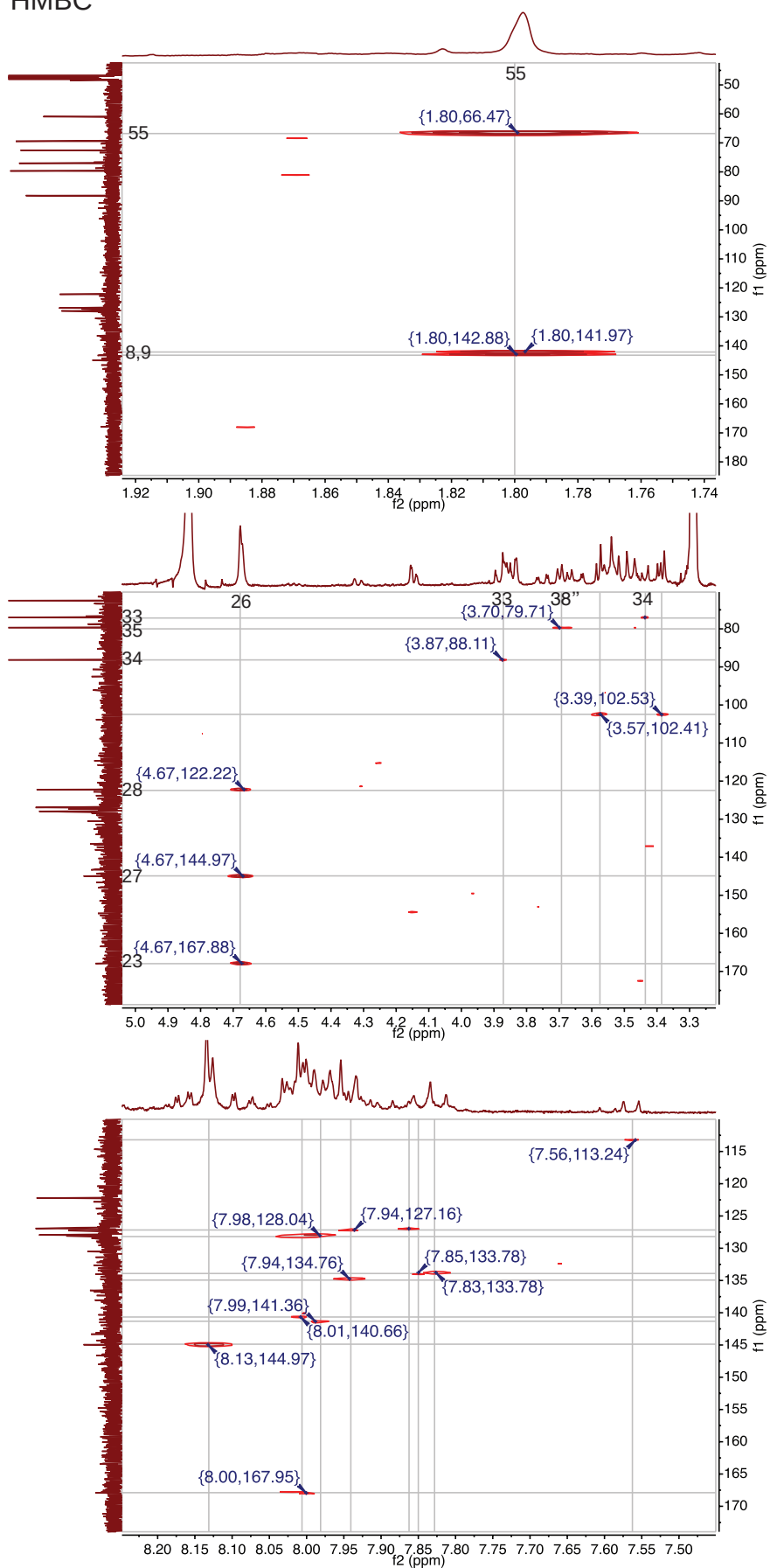
32



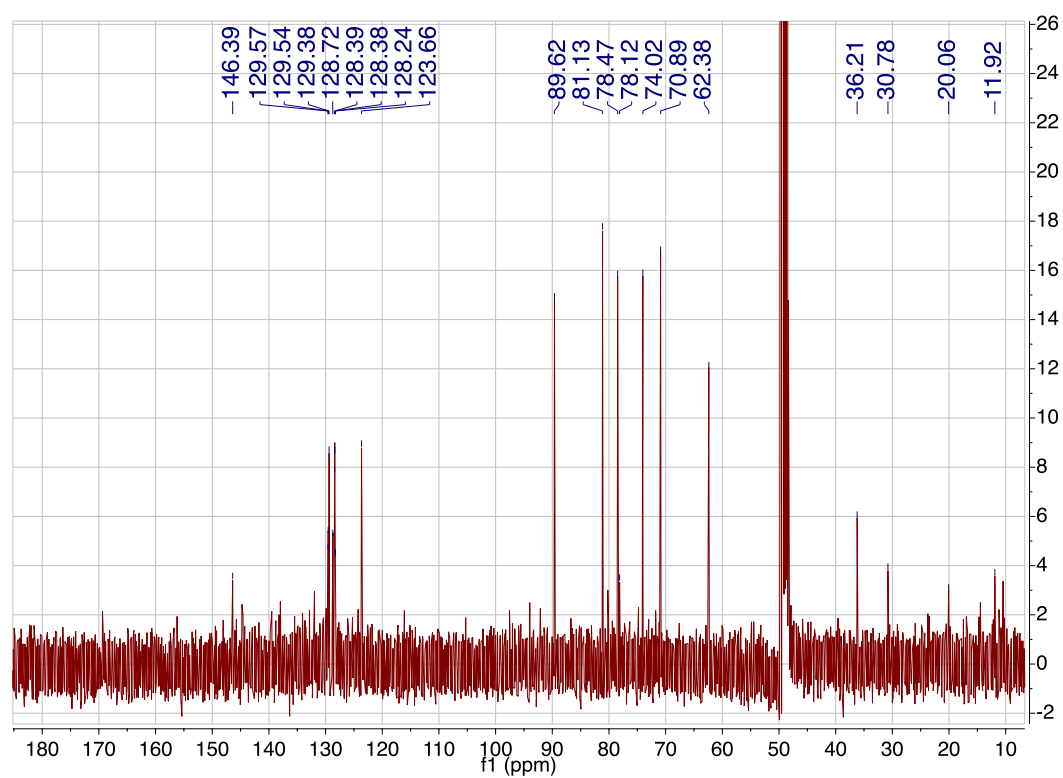
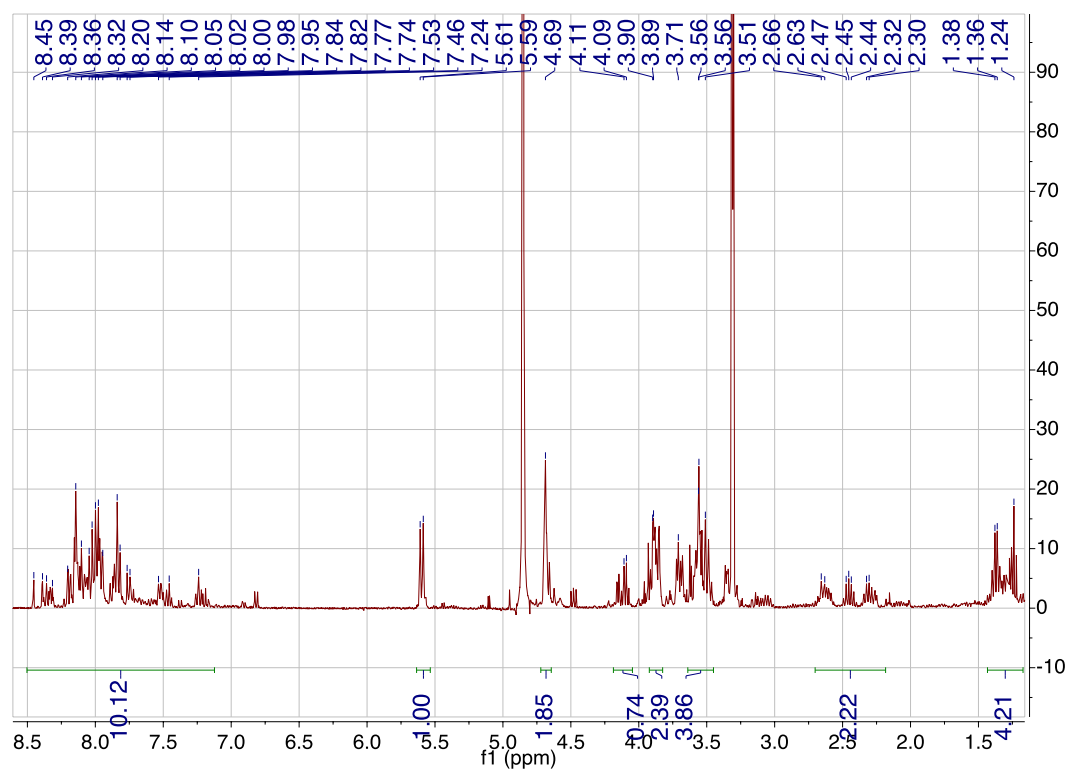
HSQC



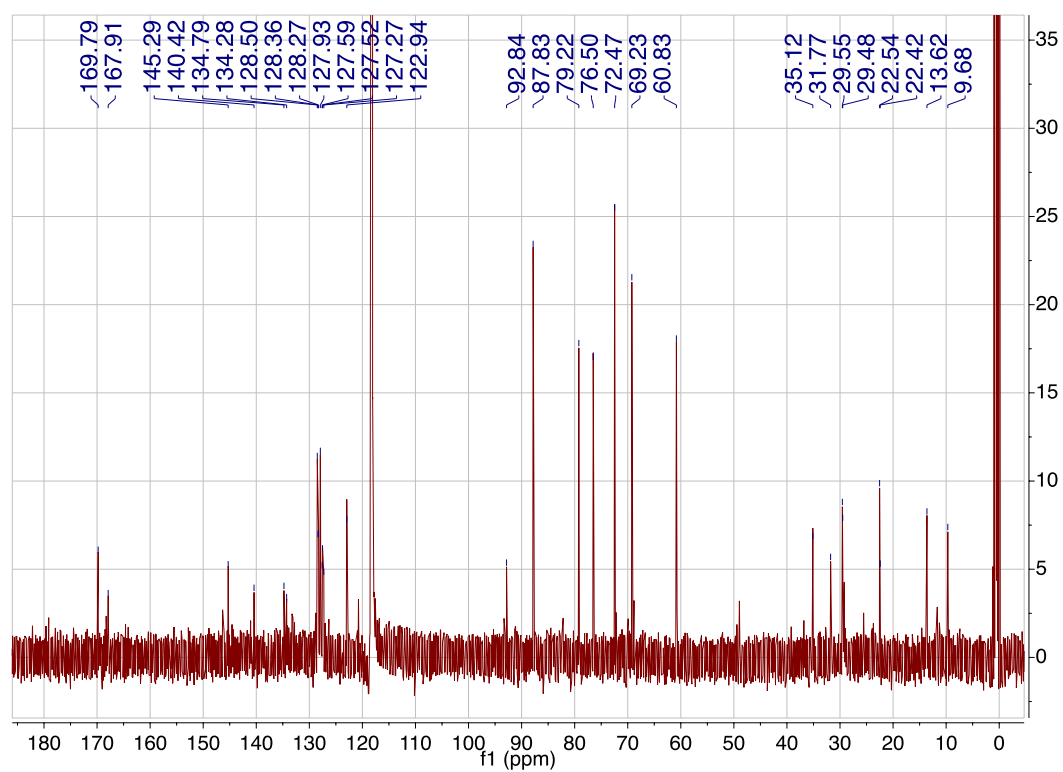
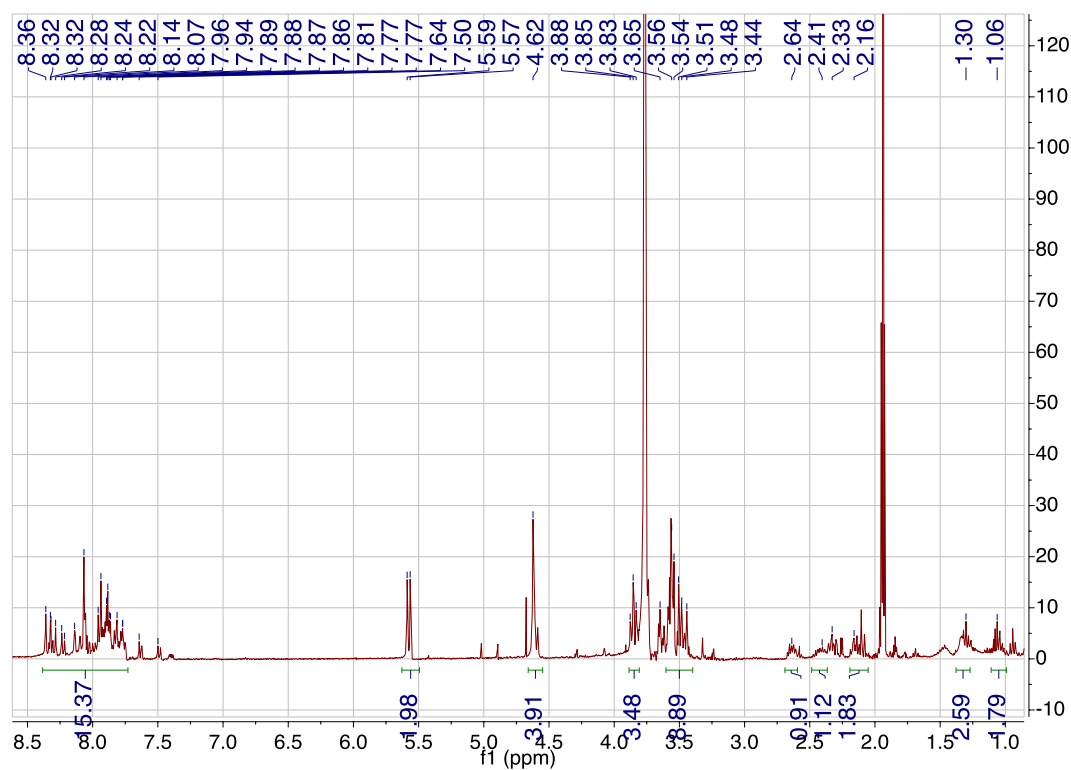
HMBC



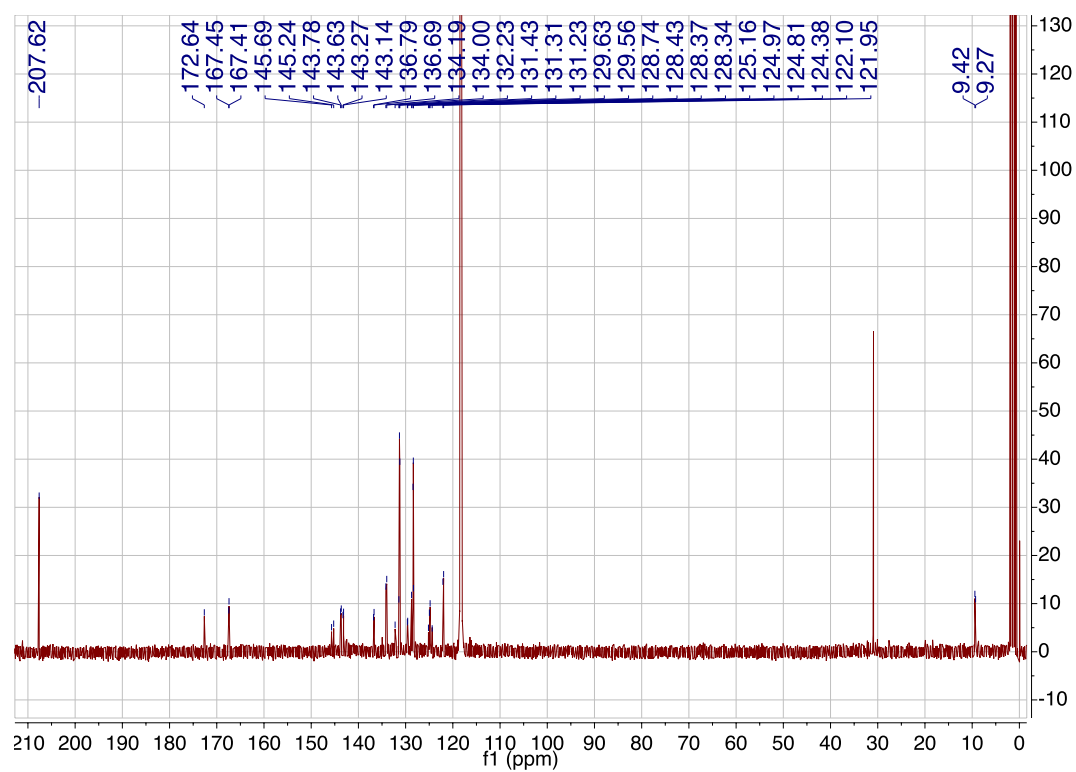
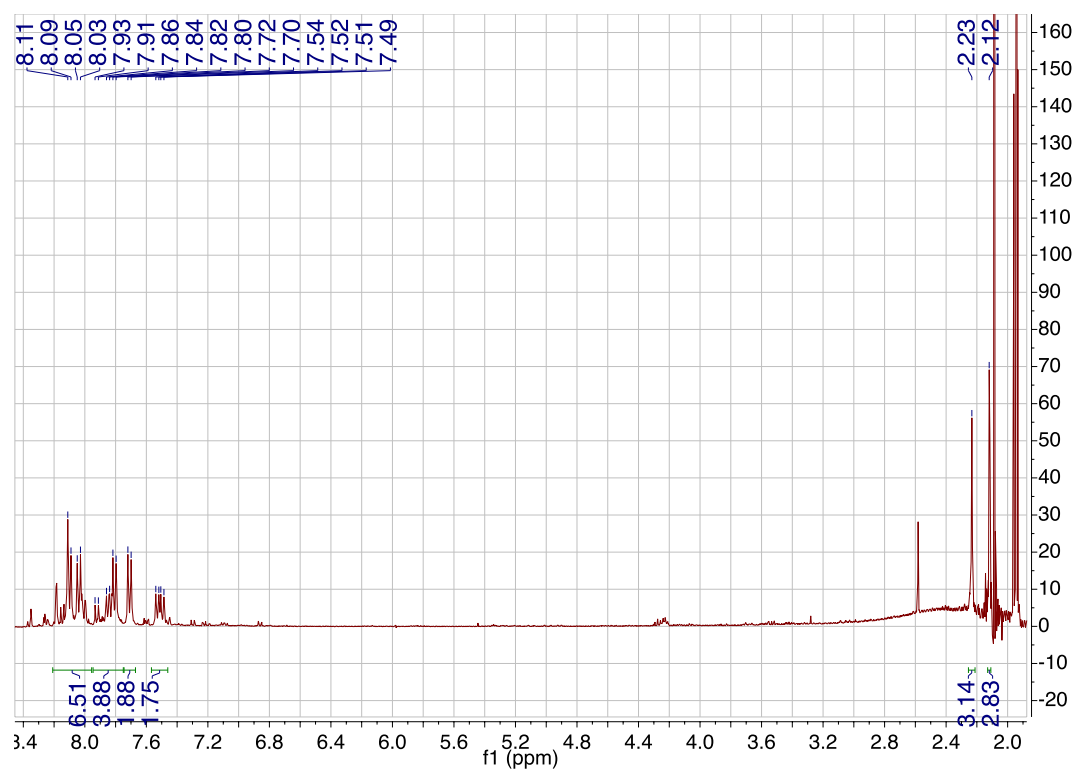
33



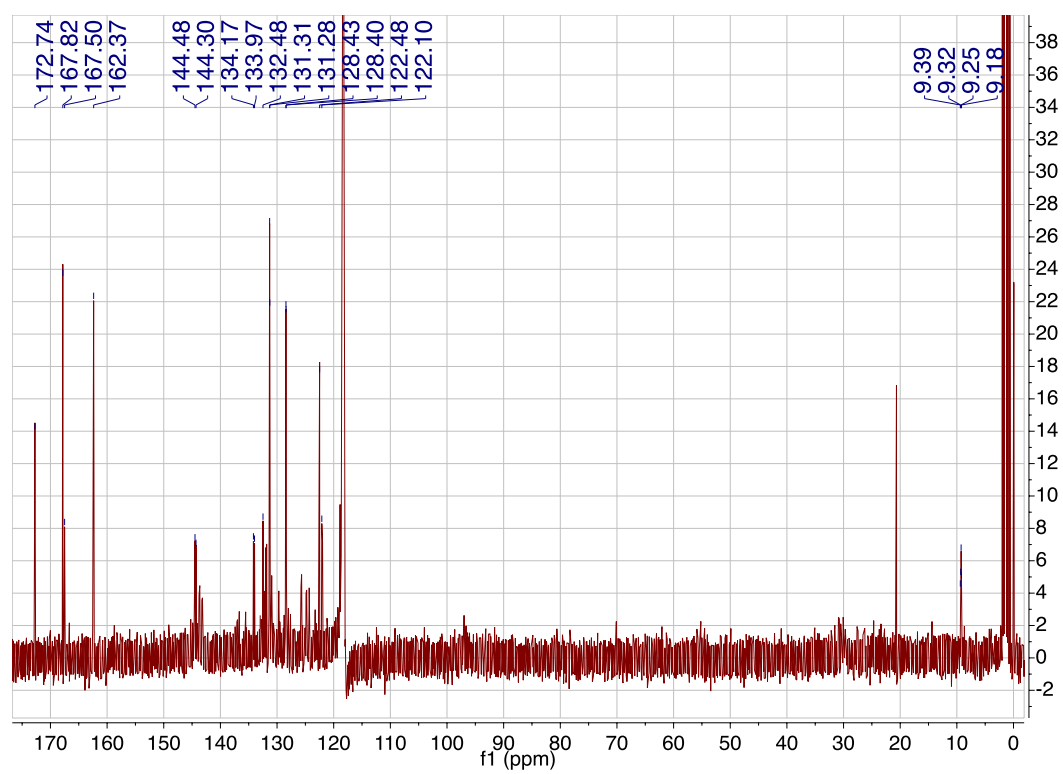
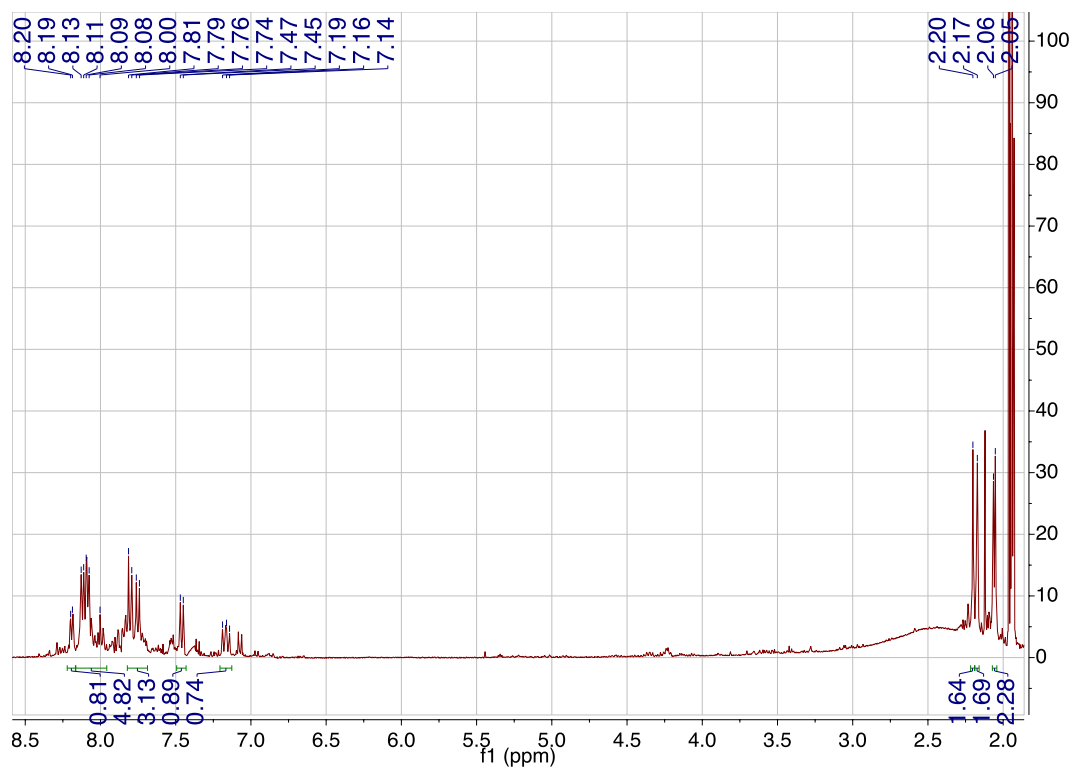
34



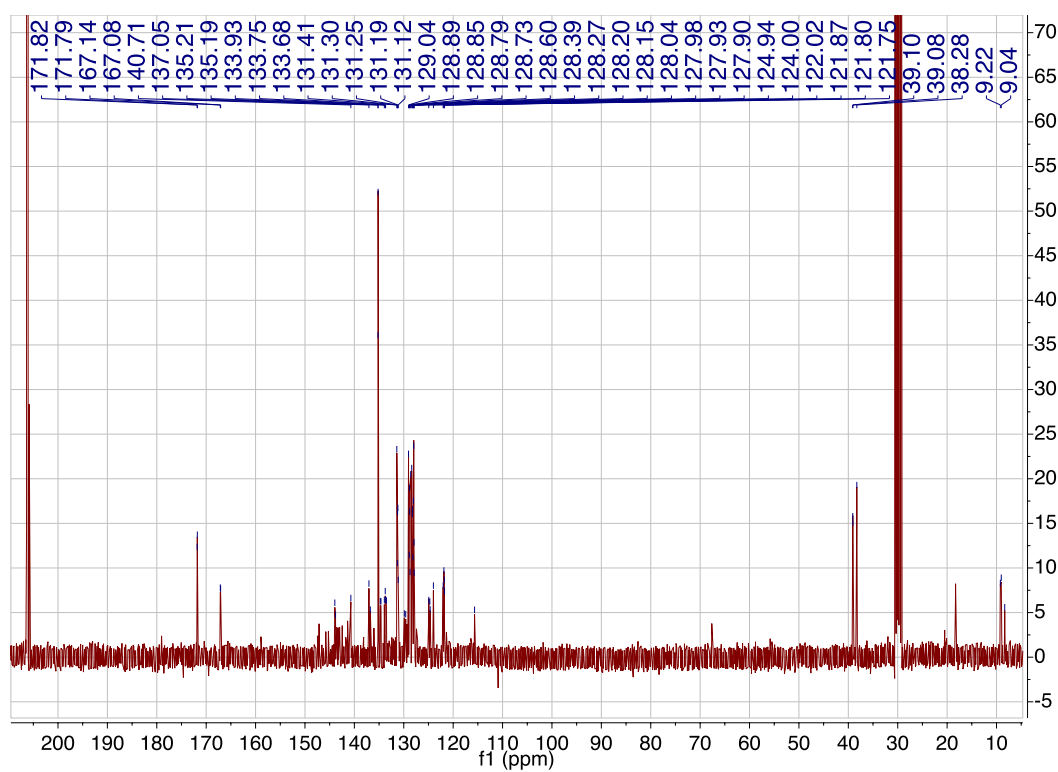
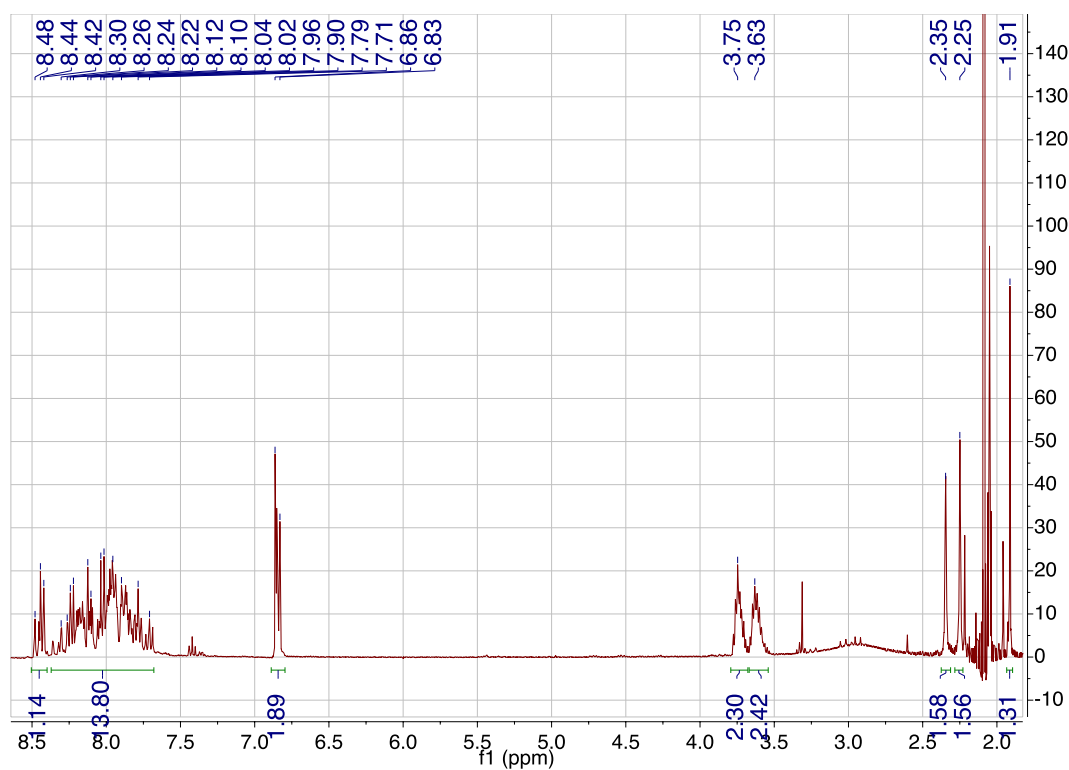
35



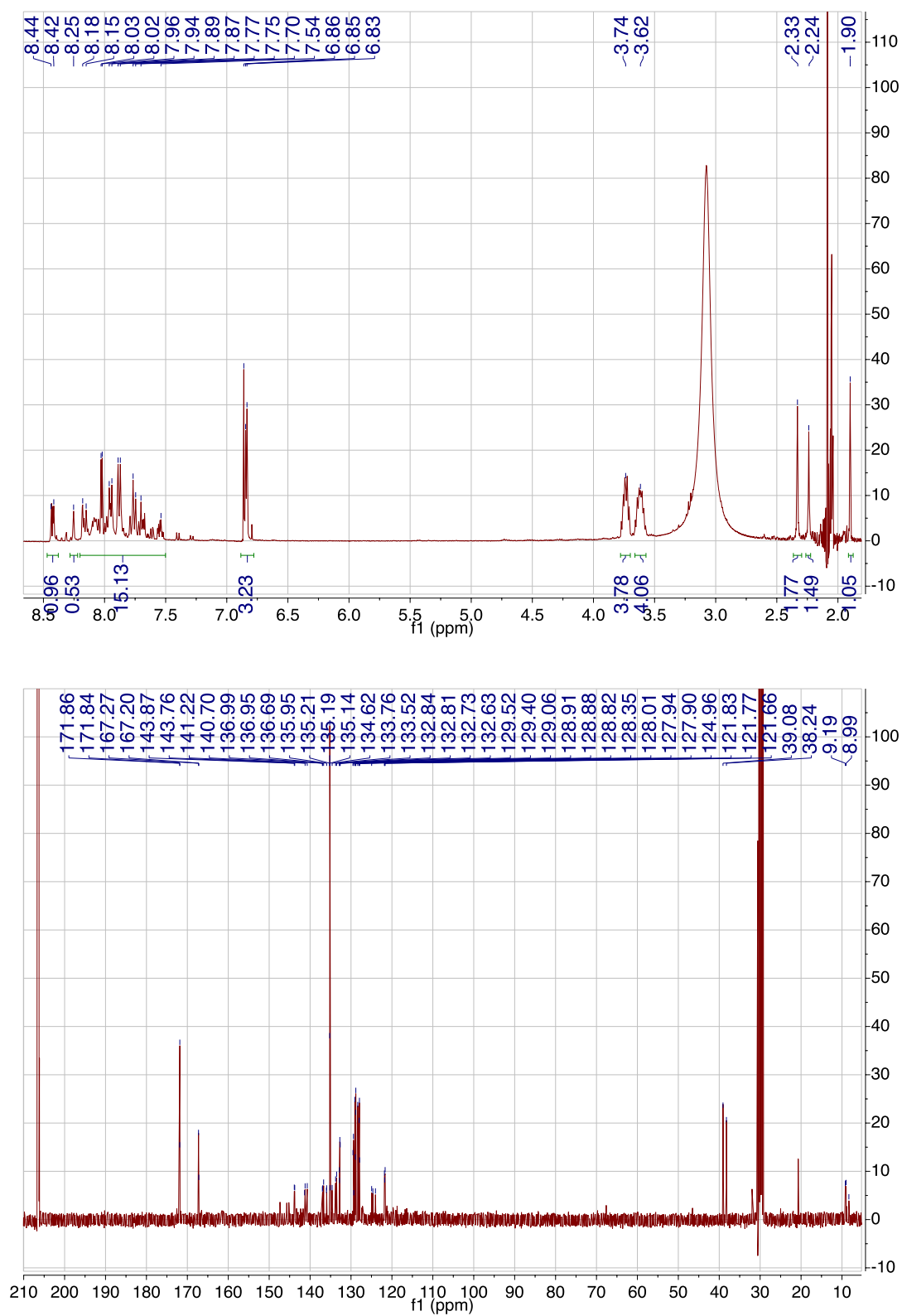
53



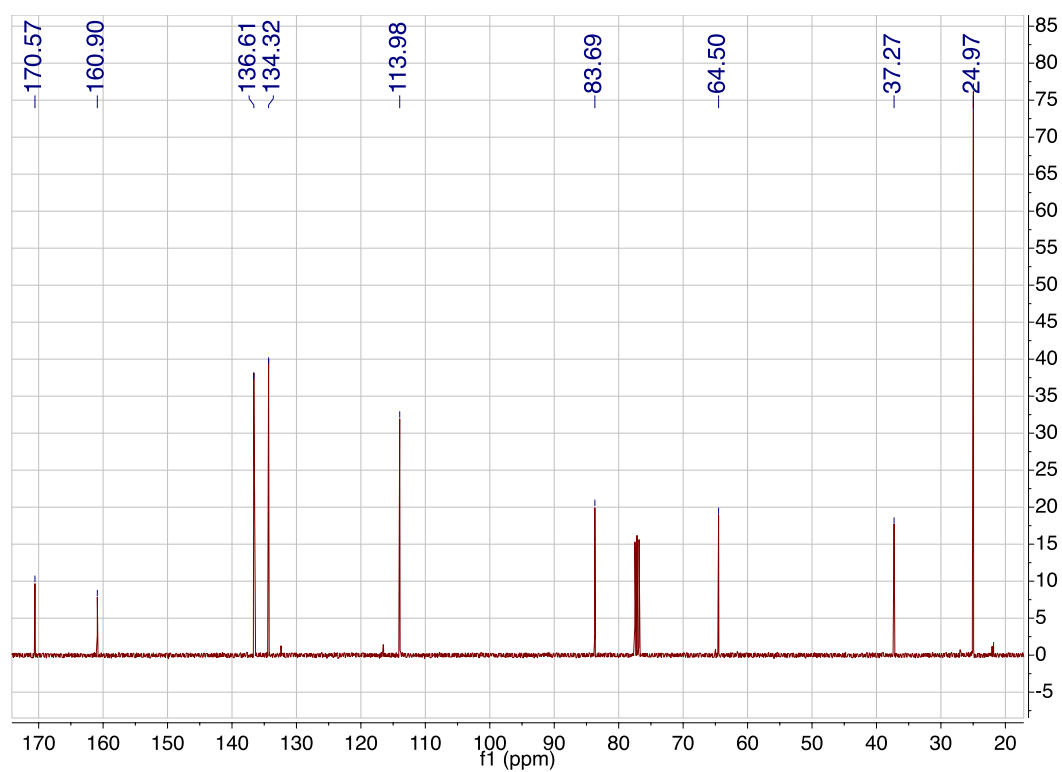
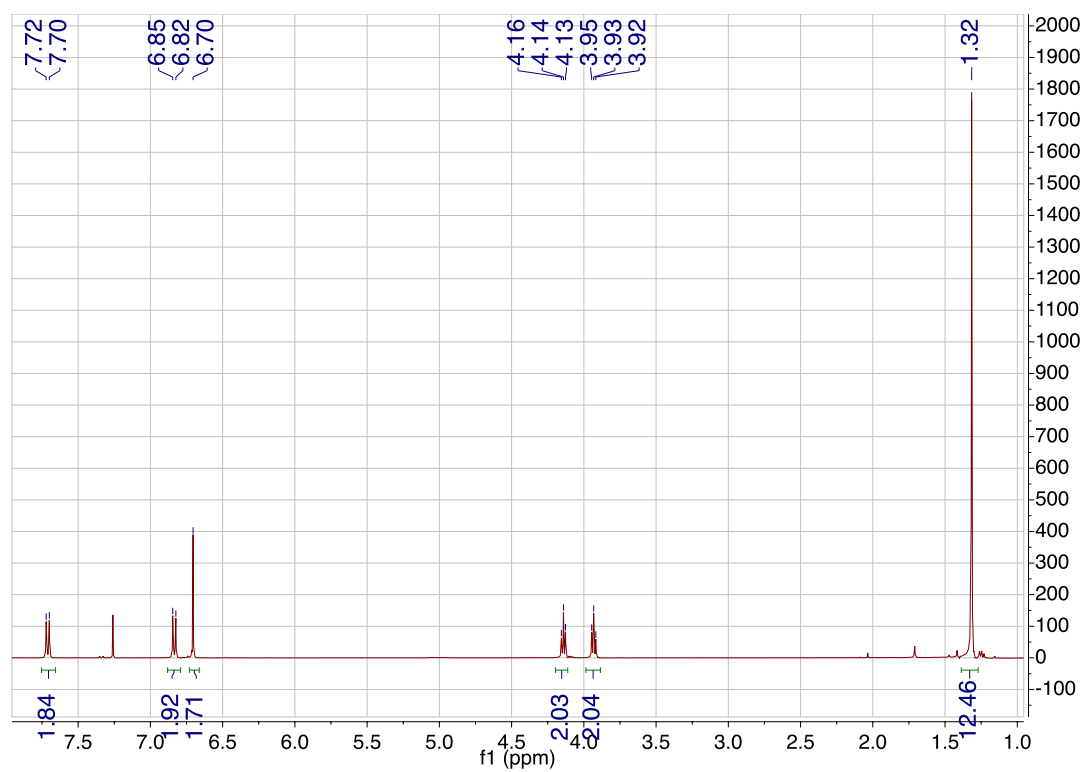
36



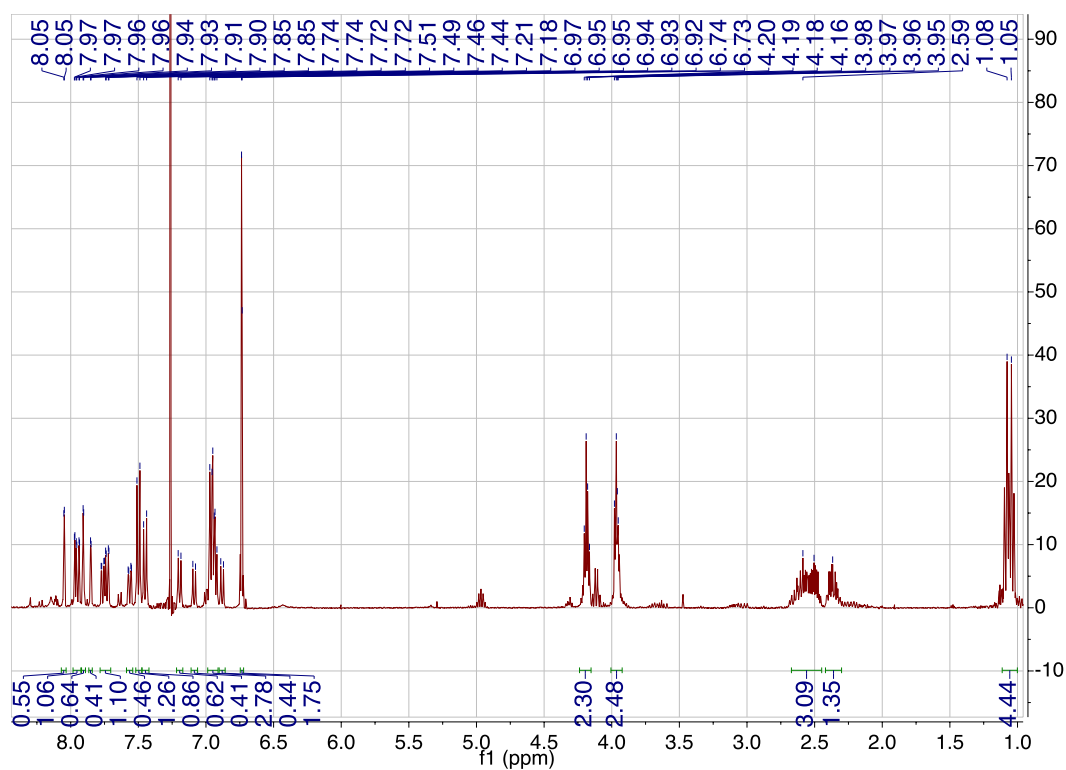
37



39



40



A.3 Caracterización espectrofotométrica

Todos los solventes utilizados para los espectros UV-visible fueron de grado espectroscópico. Las muestras se irradiaron utilizando una lámpara de arco de Hg (SUV-DC, Lumatec, Deisenhofen) y filtros de paso de banda apropiados cuando necesario antes de los experimentos para convertir las muestras a los isómeros apropiados. Se utilizaron cubetas de cuarzo de Hellma de distintos tamaños según el espectrofotómetro y el experimento. Efectos de filtro internos se evitaron usando soluciones diluidas ($10 \mu\text{M}$). La proporción de los isómeros abiertos y cerrados no se vio afectada por la cantidad de luz utilizada para monitorear el sistema. Los experimentos de fotoconversión se realizaron con el espectrofotómetro descrito en el Capítulo 3. Otros espectros de absorción se obtuvieron con un equipo Cary 100 UV-visible, Varian ó un equipo Shimadzu UV-vis. Otros espectros de emisión se midieron con un Cary Eclipse de Varian ó un instrumento de Photon Technology International. La temperatura de las muestras en todos los experimentos fue de 20°C . Tiempos de vida media se midieron en un Fluorolog-TCSPC de Horiba Jobin Yvon, excitando a 460 nm con un nanoLED de Horiba Scientific. Los tiempos de vida se calcularon con software de Mathematica, o con el software integrado del equipo.

Simulación DHA-DHAO

Se encuentra a siguiente el programa de Python que se generó para simular el comportamiento de moléculas tipo DHA-DHAO o DHA-DHAO-DHA bajo irradiación con luz UV (340 nm), azul (450 nm) o verde (520 nm). El código se divide en dos partes: el programa en sí, y los comandos para simular los experimentos detallados en el Capítulo 5.

B.1 Programa

```
import copy
import pylab
import xlswriter

def QYs(PCorPCOMe):
    if PCorPCOMe == 'PC':
        QYoc1, QYco1, QYoc2, QYco2 = 0.35, 0.35, 0.45, 0.0011
    if PCorPCOMe == 'PCOMe':
        QYoc1, QYco1, QYoc2, QYco2 = 0.35, 0.03, 0.45, 0.0011
    return QYoc1, QYco1, QYoc2, QYco2

def calcKs(intensities, PCorPCOMe):
    sigmaoc1uv = 3.42*10**-17
    sigmacoluv = 6.46*10**-17
    sigmacolb = 2.28*10**-17
    sigmacolg = 6.46*10**-17
    sigmaoc2uv = 4.59*10**-17
    sigmaco2uv = 1.91*10**-17
    sigmaco2b = 1.38*10**-16
    iuv = intensities[0]
    ib = intensities[1]
    ig = intensities[2]
```

```

EFRET = 1
kexoc1uv = sigmaoc1uv * 5*10**15 * 340 * iuv
kexcoluv = sigmacoluv * 5*10**15 * 340 * iuv
kexcolb = sigmacolb * 5*10**15 * 450 * ib
kexcolg = sigmacolg * 5*10**15 * 520 * ig
kexoc2uv = sigmaoc2uv * 5*10**15 * 340 * iuv
kexco2uv = sigmaco2uv * 5*10**15 * 340 * iuv
kexco2b = sigmaco2b * 5*10**15 * 450 * ib
QYoc1, QYco1, QYoc2, QYco2 = QYs(PCorPCOMe)
koc1uv = kexoc1uv * QYoc1
kcoluv = kexcoluv * QYco1
kcolb = kexcolb * QYco1
kcolg = kexcolg * QYco1
koc2uv = kexoc2uv * QYoc2
kco2uv = kexco2uv * QYco2
kco2b = kexco2b * QYco2
kfret2uv = kexco2uv * QYco1 * EFRET
kfret2b = kexco2b * QYco1 * EFRET
return (koc1uv, kcoluv, kcolb, kcolg, koc2uv, kco2uv, kco2b, kfret2uv,
        kfret2b)

# For two-unit constructs (PC-PCf type):
# populations = [00, C0, 0C, CC]

# For three-unit constructs (PC-PCf-PC type):
# populations = [000, C00, 0C0, 00C, CC0, C0C, 0CC, CCC]

def singlePhotonSim(PCorPCOMe, TwoOrThree, wavelength, intensities, duration,
populations):
    """ simulates what happens during duration seconds to the populations
    of all species under irradiation with wavelength at intensity. populations
    is list of lists, with concentration of each species at each time point."""
    iuv, ib, ig = 0, 0, 0
    if 340 in wavelength: iuv = intensities[0]
    if 450 in wavelength: ib = intensities[1]
    if 520 in wavelength: ig = intensities[2]
    intensities = [iuv, ib, ig]
    (koc1uv, kcoluv, kcolb, kcolg, koc2uv, kco2uv,
    kco2b, kfret2uv, kfret2b) = calcKs(intensities, PCorPCOMe)
    for tenthsecond in range(duration*10):
        startpops = copy.deepcopy(populations[-1])
        if TwoOrThree == 'Two':
            d00 = (- (koc1uv + koc2uv)*startpops[0] + (kcoluv + kcolb
                    + kcolg)*startpops[1] + (kco2uv + kco2b)*startpops[2])/10
            dC0 = (koc1uv*startpops[0] - (kcoluv + kcolb + kcolg +
                    koc2uv)*startpops[1] + (kco2uv + kco2b)*startpops[3])/10
            d0C = (koc2uv*startpops[0] - (kco2uv + kco2b + koc1uv

```

```

        )*startpops[2] + (kcoluv + kcolb + kcolg + kfret2uv +
        kfret2b)*startpops[3])/10
    dCC = (kocluv*startpops[2] + koc2uv*startpops[1] - (kcoluv + kcolb
        + kco2uv + kcolg + kco2b + kfret2uv + kfret2b
        )*startpops[3])/10
    newconc = [populations[-1][0] + d00, populations[-1][1] + dC0, \
        populations[-1][2] + d0C, populations[-1][3] + dCC]
    populations.append(newconc)
if TwoOrThree == 'Three':
    d000 = (-(2*kocluv + koc2uv)*startpops[0] + (kcoluv + kcolb +
        kcolg)*startpops[1] + (kcoluv + kcolb + kcolg)*startpops[3] \
        + (kco2uv + kco2b)*startpops[2])/10
    dC00 = (kocluv*startpops[0] - (kcoluv + kcolb + kcolg + koc2uv +
        kocluv)*startpops[1] + (kco2uv + kco2b)*startpops[4] + (
        kcoluv + kcolb + kcolg)*startpops[5])/10
    d0C0 = (koc2uv*startpops[0] - (kco2uv + kco2b + 2*kocluv
        )*startpops[2] + (kcoluv + kcolb + kcolg + kfret2uv +
        kfret2b)*startpops[4] + (kcoluv + kcolb + kcolg + kfret2uv
        + kfret2b)*startpops[6])/10
    d00C = (kocluv*startpops[0] - (kcoluv + kcolb + kcolg + koc2uv
        + kocluv)*startpops[3] + (kcoluv + kcolb + kcolg
        )*startpops[5] + (kco2uv + kco2b)*startpops[6])/10
    dCC0 = (koc2uv*startpops[1] + kocluv*startpops[2] - (kcoluv +
        kcolb + kco2uv + kcolg + kco2b + kfret2uv + kfret2b +
        kocluv)*startpops[4] + (kcoluv + kcolb + kcolg + kfret2uv
        + kfret2b)*startpops[7])/10
    dC0C = (kocluv*startpops[1] + kocluv*startpops[3] - (2*kcoluv +
        2*kcolb + 2*kcolg + koc2uv)*startpops[5] + (kco2uv + kco2b
        )*startpops[7])/10
    d0CC = (koc2uv*startpops[3] + kocluv*startpops[2] - (kcoluv +
        kco2uv + kcolb + kcolg + kco2b + kfret2uv + kfret2b +
        kocluv)*startpops[6] + (kcoluv + kcolb + kcolg + kfret2uv
        + kfret2b)*startpops[7])/10
    dCCC = (koc2uv*startpops[5] + (kocluv*startpops[4] +
        kocluv*startpops[6]) - (kco2uv + kco2b + 2*(kcoluv + kcolb
        + kcolg + kfret2uv + kfret2b))*startpops[7])/10
    newconc = [populations[-1][0] + d000, populations[-1][1] + dC00, \
        populations[-1][2] + d0C0, populations[-1][3] + d00C, \
        populations[-1][4] + dCC0, populations[-1][5] + dC0C, \
        populations[-1][6] + d0CC, populations[-1][7] + dCCC]
    populations.append(newconc)
return populations

def multiPhotonSim(PCorPCOMe, TwoOrThree, wavelengths, intensities, durations):
    if TwoOrThree == 'Two':
        populations = [[1*10**-6, 0, 0, 0]]
        for i in range(len(wavelengths)):

```

```

        populations = singlePhotonSim(PCorPCOMe, TwoOrThree,
                                      wavelengths[i], intensities,
                                      durations[i], populations)

    if TwoOrThree == 'Three':
        populations = [[1*10**-6, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0]]
        for i in range(len(wavelengths)):
            populations = singlePhotonSim(PCorPCOMe, TwoOrThree,
                                          wavelengths[i], intensities,
                                          durations[i], populations)

    drawGraph(populations, TwoOrThree, durations)
    information, headers, xdata, ydata = compileSimData(populations,
                                                         TwoOrThree,
                                                         wavelengths,
                                                         intensities,
                                                         durations)

    return populations, information, headers, xdata, ydata

def drawGraph(populations, TwoOrThree, durations):
    """ initiate list with all proportions for each molecule during run.
    Also makes list of how many photons there were, for the x values"""
    if TwoOrThree == 'Two':
        moleculeList = [[], [], [], []]
        headers = ['Irradiation Time (s)', '00', 'C0', 'OC', 'CC']
    if TwoOrThree == 'Three':
        moleculeList = [[], [], [], [], [], [], [], []]
        headers = ['Irradiation Time (s)', '000', 'C00', 'OC0', 'OOC', \
                  'CC0', 'COC', 'OCC', 'CCC']

    xlength = []
    start = 0
    for j in populations:
        xlength.append(start)
        start += 0.1
        for i in range(len(moleculeList)):
            moleculeList[i].append(j[i])
    # plot graph with X lines for each state of molecule
    xmaximum = 0
    for i in durations:
        xmaximum += i
    if TwoOrThree == 'Two':
        for number in range(4):
            pylab.plot(xlength, moleculeList[number], label=headers[number+1])
            pylab.xlim(-10, xmaximum)
            pylab.ylim(-0.05*10**-6, 1.05*10**-6)
            pylab.xlabel('Irradiation time (s)')
            pylab.ylabel('Concentration')
            pylab.legend(loc = 7)
    if TwoOrThree == 'Three':

```

```

        subplot = 1
    for number in range(8):
        pylab.subplot(2, 4, subplot)
        pylab.plot(xlength, moleculeList[number], label=headers[number+1])
        pylab.xlabel('Irradiation Time (s)')
        pylab.ylabel('Concentration')
        pylab.legend(loc = 2)
        pylab.ylim(-0.05*10**-6, 1.05*10**-6)
        subplot += 1
pylab.show()

def newExcelFile(title, information, description, headers, xdata, ydata):
    """Creates new excel file named title, creates worksheet and stores data"""
    fileTitle = '/Users/florenciagillanders/Desktop/PhD/' + \
        'Computational Chemistry/PC-PCf simulator/For Thesis/' + \
        title + '.xlsx'
    workbook = xlswriter.Workbook(fileTitle)
    for item in range(len(description)):
        worksheet = workbook.add_worksheet()
        bold = workbook.add_format({'bold': True})
        worksheet.write(0, 0, title, bold)
        worksheet.write(1, 0, information, bold)
        worksheet.write(2, 0, description[item], bold)
        row, col = 3, 0
        for header in headers[item]:
            worksheet.write(row, col, header, bold)
            col += 1
        row, col = 4, 0
        for dat in xdata[item]:
            worksheet.write(row, col, dat)
            row += 1
        row, col = 4, 1
        for dat in ydata[item]:
            for da in dat:
                worksheet.write(row, col, da)
                row += 1
            row = 4
            col += 1
    workbook.close()
    return workbook

def compileSimData(populations, TwoOrThree, wavelengths, intensities,
                  durations):
    information = ''
    for i in range(len(wavelengths)):
        information += str(wavelengths[i]) + ' nm (' + str(intensities[i]) \
            + ' W/cm2) for ' + str(durations[i]) + ' s'

```

```

        if i < len(wavelengths) - 1:
            information += ' and then '
    if TwoOrThree == 'Two':
        headers = [['Irradiation Time (s)', '00', 'C0', 'OC', 'CC']]
        ydata = [[], [], [], []]
    if TwoOrThree == 'Three':
        headers = [['Irradiation Time (s)', '000', 'C00', 'OC0', 'OOC',
                    'CC0', 'COC', 'OCC', 'CCC']]
        ydata = [[], [], [], [], [], [], [], []]
    xdata = [[]]
    time = 0
    for i in range(len(populations)):
        xdata[0].append(time)
        time += 0.1
        for j in range(len(ydata)):
            ydata[j].append(populations[i][j])
    return information, headers, xdata, ydata

def predictSpectrumPoint(populations, TwoOrThree):
    """Calculates spectrum for a combination of populations (eg for time t).
    TwoOrThree is a number indicating PC-PCf or PC-PCf-PC type construct.
    populations is a list of the relative concentration of each species."""
    absSpectrum = []
    fluorSpectrum = []
    wavelengths = [300, 350, 400, 450, 500, 550, 600]
    PCopen = [30000, 2000, 0, 0, 0, 0, 0]
    PCclosed = [30000, 15000, 7000, 6000, 15000, 7000, 0]
    PCfopen = [20000, 18000, 1000, 0, 0, 0, 0]
    PCfclosed = [5000, 5000, 15000, 40000, 3000, 0, 0]
    PCffluor = [0, 0, 0, 5000, 40000, 30000, 5000]
    if TwoOrThree == 'Two':
        for wavelength in range(len(wavelengths)):
            O0 = (PCopen[wavelength]*populations[0] +
                  PCfopen[wavelength]*populations[0])
            C0 = (PCclosed[wavelength]*populations[1] +
                  PCfopen[wavelength]*populations[1])
            OC = (PCopen[wavelength]*populations[2] +
                  PCfclosed[wavelength]*populations[2])
            CC = (PCclosed[wavelength]*populations[3] +
                  PCfclosed[wavelength]*populations[3])
            absSpectrum.append(O0 + C0 + OC + CC)
        for wavelength in range(len(wavelengths)):
            OC = PCffluor[wavelength]*populations[2]
            fluorSpectrum.append(OC)
    if TwoOrThree == 'Three':
        for wavelength in range(len(wavelengths)):
            O00 = (2*PCopen[wavelength]*populations[0] +

```

```

        PCfopen[wavelength]*populations[0])
    C00 = (PCclosed[wavelength]*populations[1] +
        PCfopen[wavelength]*populations[1] +
        PCopen[wavelength]*populations[1])
    O00 = (2*PCopen[wavelength]*populations[2] +
        PCfclosed[wavelength]*populations[2])
    O0C = (PCopen[wavelength]*populations[3] +
        PCfopen[wavelength]*populations[3] +
        PCclosed[wavelength]*populations[3])
    CC0 = (PCclosed[wavelength]*populations[4] +
        PCfclosed[wavelength]*populations[4] +
        PCopen[wavelength]*populations[4])
    C0C = (2*PCclosed[wavelength]*populations[5] +
        PCfopen[wavelength]*populations[5])
    OCC = (PCopen[wavelength]*populations[6] +
        PCfclosed[wavelength]*populations[6] +
        PCclosed[wavelength]*populations[6])
    CCC = (2*PCclosed[wavelength]*populations[7] +
        PCfclosed[wavelength]*populations[7])
    absSpectrum.append(O00 + C00 + O0C + O0C + CC0 + C0C + OCC + CCC)
    for wavelength in range(len(wavelengths)):
        OC0 = PCffluor[wavelength]*populations[2]
        fluorSpectrum.append(OC0)
    return absSpectrum, fluorSpectrum, wavelengths

def buildSpectra(popList, TwoOrThree):
    """Builds absorbance and emission spectra from given results of
    simulation popList every 10 seconds of simulation time."""
    ydata = [], []
    headers = [['Wavelength (nm)'], ['Wavelength (nm)']]
    description = ['Absorbance', 'Emission']
    time = 0
    while time < len(popList):
        headers[0].append(str(time/10))
        headers[1].append(str(time/10))
        absorbance, fluorescence, wavelengths = \
            predictSpectrumPoint(popList[time], TwoOrThree)
        ydata[0].append(absorbance)
        ydata[1].append(fluorescence)
        time += 100
    return headers, description, ydata, wavelengths

```


B.2 Simulaciones

```

#Simulation of DHA-DHAO with
#      1) 340 nm (1 mW/cm2) during 150 s
#      2) 520 nm (1 mW/cm2) during 150 s
#      3) 450 nm (100 mW/cm2) during 200 s

pylab.figure(1)
populations, information, headers, xdata, ydata = multiPhotonSim('PC',
    'Two', [[340], [520], [450]], [0.001, 0.1, 0.001],
    [150, 150, 200])
newExcelFile('PC-PCf simulation1', information, ['Relative Populations'],
    headers, xdata, [ydata])
headers, description, ydata, wavelengths = buildSpectra(populations, 'Two')
newExcelFile('PC-PCf simulation1 Spectra', information, description,
    headers, [wavelengths, wavelengths], ydata)

#Simulation of DHA(OMe)-DHAO with
#      1) 340 nm (2 mW/cm2) during 150 s
#      2) 520 nm (10 mW/cm2) during 150 s
#      3) 450 nm (100 mW/cm2) during 200 s

pylab.figure(2)
populations, information, headers, xdata, ydata = multiPhotonSim('PCOMe',
    'Two', [[340], [520], [450]], [0.002, 0.1, 0.01],
    [150, 150, 200])
newExcelFile('PCOMe-PCf simulation1', information, ['Relative Populations'],
    headers, xdata, [ydata])
headers, description, ydata, wavelengths = buildSpectra(populations, 'Two')
newExcelFile('PCOMe-PCf simulation1 Spectra', information, description,
    headers, [wavelengths, wavelengths], ydata)

#Simulation of DHA-DHAO-DHA with
#      1) 340 nm (1 mW/cm2) during 150 s
#      2) 520 nm (1 mW/cm2) during 150 s
#      3) 450 nm (50 mW/cm2) during 300 s

pylab.figure(3)
populations, information, headers, xdata, ydata = multiPhotonSim('PC',
    'Three', [[340], [520], [450]], [0.001, 0.05, 0.001],
    [150, 150, 300])
newExcelFile('PC-PCf-PC simulation1', information, ['Relative Populations'],
    headers, xdata, [ydata])
headers, description, ydata, wavelengths = buildSpectra(populations, 'Three')
newExcelFile('PC-PCf-PC simulation1 Spectra', information, description,

```

```
headers, [wavelengths, wavelengths], ydata)

#Simulation of DHA(OMe)-DHA0-DHA(OMe) with
#      1) 340 nm (2 mW/cm2) during 150 s
#      2) 520 nm (10 mW/cm2) during 150 s
#      3) 450 nm (50 mW/cm2) during 300 s

pylab.figure(4)
populations, information, headers, xdata, ydata = multiPhotonSim('PCOMe',
    'Three', [[340], [520], [450]], [0.002, 0.05, 0.01],
    [150, 150, 300])
newExcelFile('PCOMe-PCf-PCOMe simulation1', information,
    ['Relative Populations'], headers, xdata, [ydata])
headers, description, ydata, wavelengths = buildSpectra(populations, 'Three')
newExcelFile('PCOMe-PCf-PCOMe simulation1 Spectra', information, description,
    headers, [wavelengths, wavelengths], ydata)
```

Índice de figuras

1.1	Espectro de absorción de 1 : isómero abierto (línea continua), estado fotoestacionario (línea punto-rayada), isómero cerrado (línea rayada). Adaptado con permiso de Hanazawa <i>et al.</i> ¹⁰ Copyright 2016 Royal Society of Chemistry.	8
1.2	A) Absorción de 1 : isómero abierto (línea punteada), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea continua). B) Emisión de 1 : isómero abierto (línea sólida), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea punteada). C) Absorción de 4 : isómero abierto (línea punto-rayada), estado fotoestacionario (línea rayada), isómero cerrado (línea continua) y emisión del estado fotoestacionario (línea verde). Adaptado con permiso de Jeong <i>et al.</i> ¹⁵ (A, B) y Uno <i>et al.</i> ¹⁴ (C). Copyright 2016 Elsevier y Copyright 2016 American Chemical Society.	13
1.3	Intensidad del patrón de Airy en escala logarítmica.	17
2.1	A) Estructura de los isómeros de 8 . Señales de RMN de la forma abierta (B y D) y del estado fotoestacionario (C y E). Flechas verdes indican señales del isómero cerrado que aumentan; flechas rojas indican señales de la forma abierta que disminuyen.	28
2.2	Espectros de absorción de los isómeros abiertos (A) y cerrados (B), y espectros de emisión normalizados (C) de los compuestos 9 a 14 excitados en sus respectivos máximos de absorción.	37
2.3	Curvas de concentración del isómero cerrado vs. tiempo de irradiación durante fotociclación (A) y fotoreversión (B).	37
2.4	Intensidad de emisión normalizada durante ciclos de fotoconversión para compuestos 11 , 12 y 13	39
2.5	Variación de intensidad de emisión del compuesto 11 durante irradiación con luz UV (340 nm).	39
2.6	Correlaciones de Hammett con σ' y máximos de absorbancia (A), máximos de emisión (B), rendimientos cuánticos de fotociclación (C) y fotoreversión (D) y ϵ en el máximo de absorbancia para el isómero abierto y cerrado (E).	40
2.7	Espectros de emisión normalizados de 9 (A) y 14 (B) en distintos solventes.	47
2.8	Fotografía de la fluorescencia de 14 en heptano (A), dioxano (B), acetato de etilo (C) y metanol (D).	47
2.9	Número de onda del máximo de emisión (A) y tiempo de vida media de fluorescencia (B) vs. E_T^N para 9-14 en distintos solventes.	48
2.10	Gráficos de Lippert-Mataga para derivados 9-14 con sus respectivos ajustes lineales.	49

2.11 Ajustes de Lippert-Mataga vs. la constante de Hammett σ' para los derivados 9-14 . Ajuste lineal: $y = 32100 - 29600x$	50
2.12 Correlación del parámetro de dipolaridad del solvente (b_{SDP}) con el máximo de emisión y el tiempo de vida media de fluorescencia para los derivados 9-14	51
2.13 Espectros de RMN de los metilos del centro reactivo para el compuesto 14 en distintos solventes deuterados.	54
3.1 Espectros adquiridos con los espectrofotómetros comerciales.	64
3.2 Fotografías del primer armado del espectrofotómetro y fotomodulador. Algunos componentes se señalan.	67
3.3 A) Espectros de la lámpara de absorción a distintos tiempos de integración del detector. B) Curva polinomial de calibración del detector.	69
3.4 Espectros de emisión de los fluoróforos estándar BAM F002-F005.	70
3.5 A) Espectros de excitación de los fluoróforos de referencia en el espectrofotómetro de referencia (línea continua) y el construido (línea punteada). B) Factor de corrección calculado.	71
3.6 Estabilidad de las lámparas de Tungsteno-Deuterio (A), Xenón (B) y Mercurio (C) en el tiempo a distintas longitudes de onda.	73
3.7 A) Intensidad de señal antes y después de restar la señal oscura. B) Ruido de absorbancia después de promediar la señal.	73
3.8 Cuentas por segundo normalizadas para distintos tiempos de irradiación.	74
3.9 Algoritmos para medición de espectros de intensidad o absorbancia de (izquierda a derecha) oscuro, referencia, blanco y muestra.	76
3.10 Programación en LabView para los espectros de A) oscuro y referencia, B) blanco y C) muestra.	77
3.11 Programación en LabView para una medida completa de absorbancia.	78
3.12 A) Algoritmos para medición de y B) programación con LabView para espectros de emisión.	78
3.13 Programación en LabView para una medida completa de emisión.	79
3.14 Programación en LabView para una medida completa de excitación.	80
3.15 Programación en LabView para una medida completa de excitación bidimensional.	81
3.16 Programación en LabView para una irradiación con la lámpara de Mercurio (A) y la lámpara de Xenón y el monocromador (B).	81
3.17 Programación en LabView para una medición de la intensidad de irradiación.	82
3.18 Programación en LabView para experimentos de cinética de fotoconversión.	83

3.19	Programación en LabView para experimentos de fotociclos.	83
3.20	Bases de datos para guardar las mediciones.	84
3.21	Programación en LabView para el guardado de datos de fotociclos.	84
3.22	Diseño final del espectrofotómetro y fotomodulador.	86
3.23	Programación en LabView de la rueda de filtros para fotoconversiones.	86
3.24	Programación en LabView para el guardado de datos temporario de fotociclos.	86
3.25	Pantalla inicial de interfaz gráfica.	88
3.26	Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de absorbancia: oscuro, referencia, blanco y muestra.	89
3.27	Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de emisión y excitación.	90
3.28	Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de excitación bidimensional e irradiación.	91
3.29	Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de cinética de fotoconversión y fotociclos.	92
3.30	Sectores de la interfaz gráfica correspondientes a mediciones de intensidad de irradiación y guardado y reseteado de datos.	93
3.31	Curvas de fotociclación del compuesto 9 en AcOEt medidas con un espectrofotómetro comercial (A) y el espectrofotómetro construido (B).	95
4.1	Variación de absorbancia máxima del isómero cerrado (A) y longitud de onda del máximo de absorción (B) de la forma cerrada, rendimiento cuántico de fluorescencia (C) y rendimientos cuánticos de fotociclación (D) y fotoreversión (E) de 11 y 15 en mezclas metanol:agua.	100
4.2	Topología de la red de enlaces de hidrógeno de configuraciones típicas en mezclas de metanol:agua de $x_M = 0,1$ (a), $0,5$ (b), $0,75$ (c), $1,0$ (d). Reproducido de Bakó <i>et al.</i> ¹¹⁰ con permiso de las PCCP Owner Societies.	101
4.3	Planilla de Excel usada para definir los equivalentes de ciclodextrina necesarios para la solubilización de 8 . Equivalentes que resultarían en una constante de inclusión del orden de 1000 M^{-1} se resaltan en verde.	103
4.4	Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) para soluciones de 8 en 10% y 30% v/v metanol en agua con distintos equivalentes de β - (arriba) y γ -ciclodextrina (abajo).	104
4.5	Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) para soluciones de 22 en 25% v/v metanol en agua con β - (A) y γ -ciclodextrina (B).	105

4.6	A) Numeración del compuesto 32 . Espectros de ^1H RMN ($\delta = 1,7 - 6,0$) para 29 en CDCl_3 (B) y 32 en CD_3OD (C).	107
4.7	Variación de absorbancia máxima (A) y longitud de onda del máximo de absorción (B) de la forma cerrada, rendimiento cuántico de fluorescencia (C) y rendimientos cuánticos de fotociclación (D) y fotoreversión (E) de 32 , 33 y 34 en mezclas metanol:agua.	108
4.8	Tiempos de vida media de fluorescencia (A) y constantes cinéticas de decaimiento no-radiativo (B) de 15 , 33 y 34 en mezclas metanol:agua.	109
4.9	Variación del rendimiento cuántico de fluorescencia (A) y rendimientos cuánticos de fotociclación (B) y fotoreversión (C) de 32 en mezclas metanol:agua (negro), etanol:agua (rojo) y acetonitrilo:agua (azul).	111
4.10	Planilla de Excel de cálculos para la preparación de las soluciones de BSA y DHAOs.	112
4.11	Porcentaje de fracción soluble (negro) y precipitado (rojo) de los DHAOs 11 (A), 32 (B), 15 (C) y 33 (D) en mezclas de BSA con distintos equivalentes de DHAO.	113
4.12	Espectros de emisión de 15 (A) y 33 (B) en metanol (negro) y adsorbido a BSA (rojo), y sus respectivos Φ_f	114
4.13	Estructura de dos ácidos oléicos unidos a L-FABP (a) y ácido palmítico unido a I-FABP (b). Adaptado con permiso de Furuhashi y Hotamisligil ¹²⁸ . Copyright 2016 Nature Publishing Group.	115
4.14	Cromatograma de elución de muestras de DHAO 11 con y sin FABPs. Absorbancia medida a 275 nm.	116
4.15	Espectros de absorción y emisión de los complejos 11 :I-FABP (A, C) y 11 :L-FABP (B, D) antes (negro) y después (rojo) de irradiar con luz visible.	116
4.16	Espectros de absorción y emisión del complejo 11 :L-FABP durante fotociclación con luz UV (A) y valores de absorbancia máxima del isómero cerrado y emisión durante fotociclos con luz visible y UV alternda (B).	117
4.17	Espectros de absorción y emisión de los isómeros abiertos (azul) y cerrados (rojo) de los compuestos 40 (A, acetonitrilo y heptano), 36 (B, acetonitrilo) y 37 (C, acetonitrilo).	118
4.18	Cromatograma de elución del conjugado de α -sinucleína-A140C: 40 (A) y α -sinucleína-A18C: 37 (B).	121
4.19	Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) de los conjugados 41 (A), 42 (B) y 43 (C) antes (azul) y después (verde) de irradiación con luz UV.	122
4.20	Curvas de área de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luego visible (abrir) para los conjugados 41 (A), 42 (B) y 43 (C).	123
4.21	Espectros de absorción (línea continua) y emisión (línea punteada) de los conjugados 44 (A) y 45 (C) antes (azul) y después (verde) de irradiación con luz UV. Curvas de área de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luego visible (abrir) para los conjugados 44 (B), 45 (D).	124

4.22	Espectros de emisión de los conjugados 44 (A) y 45 (B) durante un ciclo de irradiación con luz UV y luego visible.	125
4.23	Absorbancia máxima y área de emisión del isómero cerrado del conjugado 45 durante ciclos de irradiación con luz visible y UV.	126
4.24	Cromatograma de elución del conjugado de AB: 36	128
4.25	Espectros de absorción y emisión de soluciones de 46 (A) y 47 antes (negro) y después (rojo) de irradiación con luz UV.	129
4.26	Curvas de absorbancia e intensidad de emisión durante irradiación con luz UV (cerrar) y luz visible (abrir) para los conjugados 46 (A) y 47 (B).	130
5.1	Construcción de un fluoróforo que se active con múltiples estímulos.	134
5.2	Ejemplos de moléculas con múltiple activación: DHAO-jaula (A), jaula-DHA (B), DHA-fluoróforo pH dependiente (C), DHA-fluoróforo redox dependiente (D), DHAO-DHA (E). Izquierda: estados iniciales, centro: múltiples activaciones, derecha: estados fluorescentes.	135
5.3	Proyecciones de intensidad de PSF a PSF^4 en los planos xy (A) y xz (B).	138
5.4	Volúmen de activación vs. número de activaciones para una PSF a 450 nm (negro) y fiteo exponencial (rojo).	139
5.5	Eficiencia de FRET vs. r/R_0 . Reimpreso con permiso de Albrecht <i>et al.</i> ¹⁵⁹ Copyright 2016 Springer-Verlag.	141
5.6	Espectros de absorción de DHA abierto (A, negro) y en EFE (rojo) y DHAO abierto (A, azul) y en EFE (verde), y espectro de emisión de DHAO cerrado (verde, línea punteada).	142
5.7	Espectros de absorción del DHA-DHAO 55 teóricos del estado A-A (rojo) y C-C (naranja), y experimentales del estado A-A (verde oscuro) y el estado fotoestacionario (verde claro).	145
5.8	Espectros de absorción y emisión del DHA-DHAO 55 durante irradiaciones con: (A) luz UV; (B) luz verde y luego azul después del UV inicial; y (C) luz azul después del UV inicial. Las flechas indican la dirección del cambio en las bandas del espectro.	146
5.9	Máximos de absorción y emisión del DHA-DHAO 55 durante irradiaciones con: (A,B) luz UV, luz verde y luz azul; y (C,D) luz UV y luz azul. Las flechas indican el comienzo de la irradiación.	147
5.10	Simulación de DHA-DHAO 55 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).	153
5.11	Simulación de DHA-DHAO-DHA 56 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).	160

5.12 Simulación de DHA-DHAO 72 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).	165
5.13 Simulación de DHA-DHAO-DHA 73 durante una secuencia de irradiación. Variación de concentraciones de los cuatro isómeros (A), espectros de absorción (B) y emisión (C), y máximos de absorción (D) y emisión (E).	168
5.14 Experimento básico confocal de activación múltiple de DHA-DHAO-DHA 73	169
5.15 Mapas de contorno en el plano xy y xz de PSF a 340 nm (A y B), PSF a 520 nm (A y B) y PSF ⁵ (C y D).	170
6.1 Imágenes de 40 (A) y 36 (B) en seco durante fotoreversión con luz visible. (B) es expuesto a un flash de UV a los 120 segundos. Curvas de intensidad vs tiempo de irradiación para 40 (C, ajuste monoexponencial), 36 (D, ajuste biexponencial) y 37 (E, ajuste biexponencial) derivadas de las imágenes obtenidas.	177
6.2 Intensidad de emisión vs. tiempo de irradiación durante ciclos de fotoreversión en seco de 36 . . .	178
6.3 Intensidad de emisión vs. tiempo de irradiación durante fotoreversión en seco de 46 (A) y 47 (B) y durante fotociclos de 46 (C).	179
6.4 Imágenes de DHAO 11 en una filmina de PMMA durante fotoreversión con luz visible intensa y fotociclación con luz UV en pulsos cortos.	180
6.5 Espectros de emisión del DHAO en las mutantes de α -sinucleína 41 (A), 42 (B) y 43 (C) durante agregación.	182
6.6 Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) del DHAO en agregados de α -sinucleína con 41 (A), 42 (B) y 43 (C) antes y después de fotoconversión con luz UV y/o visible.	183
6.7 Intensidad de emisión de muestras secas de agregados de 41 (A), 42 (B), 43 (C), 44 (D) y 44 (E) durante fotoreversión. Los ajustes son biexponenciales.	185
6.8 Intensidad de emisión (A) y longitud de onda de máxima emisión (B) durante la agregación de α -sinucleína con DHAO solvatocrómico en posición 18 (rojo), 90 (azul) y con THT (negro). . . .	186
6.9 Imágenes conjugada (A) y no-conjugada (B) de la muestra de neuronas iluminadas con un patrón de ajedrez.	188
6.10 Secuencia de imágenes de neuronas de hipocampo durante fotoreversión con un patrón de ajedrez y fotoactivación con luz UV. El cuadrículado superpuesto sobre las imágenes fotorevertidas a la derecha resalta las áreas fotorevertidas.	189
6.11 Intensidad promedio de la imagen vs. tiempo de irradiación con el patrón de ajedrez de luz visible de la muestra de neuronas de hipocampo.	190
6.12 Secuencia de imágenes de neuronas de hipocampo durante dos fotoreversiones secuenciales e inversas con un patrón de ajedrez y fotoactivación con luz UV. El cuadrículado superpuesto sobre las imágenes fotorevertidas a la derecha resalta las áreas fotorevertidas.	192

Índice de esquemas

1.1	Fotocromismo de una dada molécula A.	2
1.2	Familias de compuestos fotocromicos.	3
1.3	Estructura básica de un diheteroarileno.	5
1.4	Reacción fotoquímica de electrociclación del 1,3,5-hexatrieno disustituido.	5
1.5	Isomerizaciones fotoquímicas del estilbeno.	5
1.6	Conformeros e isomerización de 1	6
1.7	Procesos fotofísicos y fotoquímicos del DHA 1 . Reimpreso con permiso de Ishibashi <i>et al.</i> ¹² Copyright 2016 American Chemical Society.	7
1.8	Niveles energéticos correspondientes a los isómeros de 1 . Adaptado con permiso de Ishibashi <i>et al.</i> ¹³ y Uno <i>et al.</i> ¹⁴ Copyright 2016 American Chemical Society.	7
1.9	Estructura básica de un DHA oxidado.	12
1.10	HOMO (abajo), LUMO (arriba) y la diferencia energética entre los dos orbitales para 1 (derecha) y 2 (izquierda). Adaptado con permiso de Jeong <i>et al.</i> ¹⁵ Copyright 2016 Elsevier.	14
1.11	Diseño óptico del microscopio de arreglo programable de 3ra generación. Reimpreso con permiso de De Beule <i>et al.</i> ⁷⁶ Copyright 2016 SPIE.	19
2.1	Estructura general de un sustituyente.	25
2.2	Síntesis de DHAOs con sustituyentes dadores y atractores de electrones.	26
2.3	Cambios cualitativos propuestos en la superficie de energía potencial de los DHAOs. Superficies sin (línea continua) y con (línea punteada) sustituyentes dadores de electrones, indicando el aumento de longitud de onda de absorción y emisión (verde), aumento en energía de transición (rojo) y desplazamiento del IC (azul).	41
3.1	Intensidades de luz antes y después de atravesar una muestra absorptiva.	58
3.2	Elementos de un espectrofotómetro de absorción comercial (A) y el formato elegido (B).	59

3.3	Elementos de un espectrofotómetro de fluorescencia comercial (A) y el formato elegido (B). . . .	60
3.4	Recolección de luz transmitida y emitida de una muestra por una fibra óptica y construcción de un espectrofotómetro con detector DCA.	61
3.5	A) Fibra Óptica. B) Lente convergente.	62
3.6	Camino óptico de absorción, excitación y recolección de la luz.	63
3.7	Diseño inicial del espectrofotómetro y fotomodulador.	63
3.8	Componentes del espectrofotómetro y fotomodulador, versión 1.	65
3.9	Sostén de cubeta: vista superior, lateral, y fotografía.	66
3.10	Componentes del espectrofotómetro y fotomodulador, versión 2.	68
4.1	Síntesis de DHAO con grupos etilo en los carbonos reactivos.	98
4.2	Síntesis de DHAO controles.	98
4.3	Estructura y dimensiones aproximadas del compuesto 8 y β - y γ -ciclodextrina.	102
4.4	Síntesis del compuesto 22	105
4.5	Síntesis de azido-glucosa.	106
4.6	Síntesis de precursores con grupos alquino terminales.	106
4.7	Síntesis de derivados de DHAOs con glucosa.	107
4.8	Síntesis de derivados de DHAOs con maleimida y grupos amida.	118
4.9	Síntesis de un derivado de DHAO con maleimida y grupo etoxibromo.	118
4.10	Procedimiento de marcación de AB con 36 y 37	128
5.1	Isómeros del compuesto DHA-DHAO, y las irradiaciones necesarias para llevarlos al estado fluorescente.	142
5.2	Síntesis del DHA-DHAO 55	144
5.3	Isómeros del compuesto DHA-DHAO y las constantes asociadas con cada uno de los procesos de fotoconversión de DHA o DHAO bajo irradiación con luz UV, azul y verde. 'A→C' indica fotociclación, 'C→A' indica fotoreversión, y 'FRET' indica fotoreversión resultante de FRET. . .	149
5.4	Estructura del compuesto triple DHA-DHAO-DHA 56	156

5.5	Isómeros del compuesto DHA-DHAO-DHA 56 , y las irradiaciones necesarias para llevarlos al estado fluorescente.	157
5.6	Estructura del compuesto doble DHA-DHAO 72	164
5.7	Estructura del compuesto triple DHA-DHAO-DHA 73	167
6.1	Protocolo de irradiación y toma de imágenes para muestras secas de DHAO-maleimida y conjugados.	176
6.2	A) Mutantes cisteína de α -sinucleína marcadas con DHAO solvatocrómico 40 y regiones de interés. B) Agregación de α -sinucleína.	181
6.3	Protocolo 1 de irradiación para muestras de neuronas con el PAM.	187
6.4	Protocolo 2 de irradiación para muestras de neuronas con el PAM.	191
7.1	El método científico ¹⁷⁹ aplicado a este trabajo de tesis.	195
7.2	Síntesis a resolver del precursor 75	199

Índice de tablas

2.1	Selección de grupos funcionales.	26
2.2	Comparación de condiciones de reacción para los acoplamientos de Suzuki.	30
2.3	Propiedades espectroscópicas de los compuestos 9 - 14 en AcOEt.	36
2.4	Propiedades fotoquímicas de los compuestos 9 - 14 en AcOEt.	38
2.5	Regresiones lineales ($y = a + bx$) de las correlaciones de Hammett.	41
2.6	Dependencia de las propiedades espectroscópicas de 9-14 con el solvente.	45
2.7	Dependencia del máximo de absorbancia del isómero abierto de 9-14 con el solvente.	46
2.8	Rendimiento cuántico de fotoconversión para 9 y 14 en distintos solventes.	46
2.9	Valores de Δf y Δv para los derivados 9-14	49
2.10	Regresiones lineales de los gráficos de Lippert-Mataga.	50
2.11	Parámetros ajustados de Catalán.	52
2.12	Constantes de decaimiento del estado excitado calculadas para 9 en distintos solventes.	53
3.1	Especificaciones de espectrógrafos comerciales testeados.	64
3.2	Fluoróforos estándar y parámetros usados para obtener los espectros de excitación.	71
3.3	Tiempo aproximado de actividades durante experimentos de absorción, emisión y fotoconversión en espectrofotómetros comerciales y el equipo construido.	94
4.1	Constantes cinéticas de decaimiento para compuestos 15 , 33 y 34	110
4.2	Propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los derivados con maleimida.	119
4.3	Ensayos de solubilidad de α -sinucleína (30 μ M) y 40 (90 μ M).	120
4.4	Numeración y descripción de los conjugados de α -sinucleína.	121
4.5	Coefficientes de absortividad molar de los conjugados DHAO: α -sinucleína.	122
4.6	Propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de los conjugados con sinucleína.	123
5.1	Valores de constantes cinéticas y parámetros asociados para DHA-DHAO 55	151
5.2	Rendimientos cuánticos de fotoconversión de DHAs.	163
5.3	Valores de constantes cinéticas de DHA-DHAOs 55 y 72	166
6.1	Numeración de derivados de DHAO con maleimida y conjugados de proteínas.	175

Bibliografía

- [1] Stefan W Hell, Steffen J Sahl, Mark Bates, Xiaowei Zhuang, Rainer Heintzmann, Martin J Booth, Joerg Bewersdorf, Gleb Shtengel, Harald Hess, Philip Tinnefeld, Alf Honigmann, Stefan Jakobs, Ilaria Testa, Laurent Cognet, Brahim Lounis, Helge Ewers, Simon J Davis, Christian Eggeling, David Klenerman, Katrin I Willig, Giuseppe Vicidomini, Marco Castello, Alberto Diaspro, and Thorben Cordes. The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *Journal of Physics D: Applied Physics*, pages 1–35, October 2015.
- [2] Alex Knight, Clemens F Kaminski, and Markus Sauer. Super-resolution fluorescent methods: where next for super-resolution? *Methods and Applications in Fluorescence*, pages 1–2, August 2015.
- [3] H Bouas-Laurent and H Dürr. Organic photochromism (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 2001.
- [4] Oliver P Ernst, David T Lodowski, Marcus Elstner, Peter Hegemann, Leonid S Brown, and Hideki Kandori. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1):126–163, January 2014.
- [5] W R Briggs and J L Spudich. Handbook of photosensory receptors. Wiley-VCH, 2005.
- [6] Seiya Kobatake, Shizuka Takami, Hiroaki Muto, Tomoyuki Ishikawa, and Masahiro Irie. Rapid and reversible shape changes of molecular crystals on photoirradiation. *Nature*, 446(7137):778–781, April 2007.
- [7] C Motta, M I Trioni, G P Brivio, and K L Sebastian. Conductance of a photochromic molecular switch with graphene leads. *Physical Review B*, 84(11):113408, September 2011.
- [8] Tiago Buckup, Christopher Sarter, Hans-Robert Volpp, Andres Jäschke, and Marcus Motzkus. Ultrafast Time-Resolved Spectroscopy of Diarylethene-Based Photoswitchable Deoxyuridine Nucleosides. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6(23):4717–4721, December 2015.
- [9] Georg Hohlneicher, Martin Mueller, Monika Demmer, Johann Lex, John H Penn, Li Xian Gan, and Paul D Loesel. 1,2-Diphenylcycloalkenes: electronic and geometric structures in the gas phase, solution, and solid state. *Journal of the American Chemical Society*, 110(14):4483–4494, May 2002.
- [10] Makoto Hanazawa, Ritsuo Sumiya, Yukio Horikawa, and Masahiro Irie. Thermally irreversible photochromic systems. Reversible photocyclization of 1,2-bis (2-methylbenzo[b]thiophen-3-yl)perfluorocycloalkene derivatives. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (3):206–207, January 1992.
- [11] Kingo Uchida, S Nakamura, and Masahiro Irie. Photochromism of Dinaphthylethene Derivatives - Stability of the Closed-Ring Forms. *Research on Chemical Intermediates*, 21(8-9):861–876, 1995.

-
- [12] Yukihide Ishibashi, Mika Fujiwara, Toshiyuki Umesato, Hisayuki Saito, Seiya Kobatake, Masahiro Irie, and Hiroshi Miyasaka. Cyclization Reaction Dynamics of a Photochromic Diarylethene Derivative as Revealed by Femtosecond to Microsecond Time-Resolved Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(10):4265–4272, March 2011.
- [13] Yukihide Ishibashi, Toshiyuki Umesato, Seiya Kobatake, Masahiro Irie, and Hiroshi Miyasaka. Femtosecond Laser Photolysis Studies on Temperature Dependence of Cyclization and Cycloreversion Reactions of a Photochromic Diarylethene Derivative. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(7):4862–4869, February 2012.
- [14] Kakishi Uno, Hiroyuki Niikura, Masakazu Morimoto, Yukihide Ishibashi, Hiroshi Miyasaka, and Masahiro Irie. In situ preparation of highly fluorescent dyes upon photoirradiation. *Journal of the American Chemical Society*, 133(34):13558–13564, August 2011.
- [15] Yong-Chul Jeong, Jun Pil Han, Yongho Kim, Eunkyong Kim, Sung Ik Yang, and Kwang-Hyun Ahn. Characterization and photophysical properties of sulfur-oxidized diarylethenes. *Tetrahedron*, 63(15):3173–3182, April 2007.
- [16] Michinori Takeshita, Nobuo Kato, Susumu Kawauchi, Tatsuya Imase, Junji Watanabe, and Masahiro Irie. Photochromism of Dithienylethenes Included in Cyclodextrins. *The Journal of Organic Chemistry*, 63(25):9306–9313, December 1998.
- [17] Francesco Stellacci, Chiaro Bertarelli, Francesca Toscano, Maria C Gallazzi, Gianni Zotti, and Giuseppe Zerbi. A High Quantum Yield Diarylethene-Backbone Photochromic Polymer. *Advanced Materials*, 11(4):292–295, March 1999.
- [18] Kingo Uchida, Eriko Tsuchida, Yoshifumi Aoi, Shinichiro Nakamura, and Masahiro Irie. Substitution Effect on the Coloration Quantum Yield of a Photochromic Bisbenzothienylethene. *Chemistry Letters*, (1):63–64, 1999.
- [19] Tadatsugu Yamaguchi and Masahiro Irie. Photochromism of bis(2-alkyl-1-benzothiophen-3-yl)perfluorocyclopentene derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 178(2-3):162–169, March 2006.
- [20] Masahiro Irie, O Miyatake, and Kingo Uchida. Photochromic diarylethenes with intralocking arms. *Journal of the American Chemical Society*, 1994.
- [21] Kingo Uchida, Michinori Takeshita, and Masahiro Irie. Novel saccharide tweezers with a diarylethene photoswitch. *Chemical Science*, pages 1807–1808, 1996.
- [22] Michinori Takeshita and Masahiro Irie. Photoresponsive Tweezers for Alkali Metal Ions . Photochromic Diarylethenes Having Two Crown Ether Moieties. *Journal of Organic Chemistry*, 63:6643–6649, 1998.
- [23] Masahiro Irie, Kazuyuki Sakemura, Masakazu Okinaka, and Kingo Uchida. Photochromism of Dithienylethenes with Electron-Donating Substituents. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(25):8305–8309, December 1995.
- [24] Kentaro Morimitsu, Seiya Kobatake, Shinichiro Nakamura, and Masahiro Irie. Efficient Photocycloreversion Reaction of Diarylethenes by Introduction of Cyano Substituents to the Reactive Carbons. *Chemistry Letters*, 32(9):858–859, 2003.

-
- [25] Takaki Sumi, Yuta Takagi, Akira Yagi, Masakazu Morimoto, and Masahiro Irie. Photoirradiation wavelength dependence of cycloreversion quantum yields of diarylethenes. *Chemical Communications*, 50(30):3928–3930, 2014.
- [26] Martin Herder, Bernd M Schmidt, Lutz Grubert, Michael Pätzel, Jutta Schwarz, and Stefan Hecht. Improving the fatigue resistance of diarylethene switches. *Journal of the American Chemical Society*, 137(7):2738–2747, February 2015.
- [27] Michinori Takeshita, Masahiro Irie, and Chang Nam Choi. Enhancement of the photocyclization quantum yield of 2,2'-dimethyl-3,3'-(perfluorocyclopentene-1,2-diyl)bis(benzo[b]-thiophene-6-sulfonate) by inclusion in a cyclodextrin cavity. *Chemical Communications*, (23):2265–2266, 1997.
- [28] Masashi Saitoh, Tuyoshi Fukaminato, and Masahiro Irie. Photochromism of a diarylethene derivative in aqueous solution capping with a water-soluble nano-cavitand. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 207(1):28–31, September 2009.
- [29] Mai Fukagawa, Izuru Kawamura, Takashi Ubukata, and Yasushi Yokoyama. Enantioselective Photochromism of Diarylethenes in Human Serum Albumin. *Chemistry - A European Journal*, 19(29):9434–9437, July 2013.
- [30] Svetlana M Polyakova, Vladimir N Belov, Mariano L Bossi, and Stefan W Hell. Synthesis of Photochromic Compounds for Aqueous Solutions and Focusable Light. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011(18):3301–3312, June 2011.
- [31] Zhipeng Tong, Shouzhi Pu, Qiang Xiao, Gang Liu, and Shiqiang Cui. Synthesis and photochromism of a novel water-soluble diarylethene with glucosyltriazolyl groups. *Tetrahedron Letters*, 54(6):474–477, February 2013.
- [32] Yuichiro Shoji, Akira Yagi, Masahiro Horiuchi, Masakazu Morimoto, Masahiro Irie, Akira Yagi, and Masahiro Horiuchi. Photochromic Diarylethene Derivatives Bearing Hydrophilic Substituents. *Israel Journal of Chemistry*, 53(5):303–311, May 2013.
- [33] Shouzhi Pu, Hongliang Liu, Gang Liu, Bing Chen, and Zhipeng Tong. The effects of phenyl-bridged glucosyltriazolyl groups on the properties of water-soluble diarylethene derivatives. *Tetrahedron*, 70(4):852–858, January 2014.
- [34] Takashi Hirose, Kenji Matsuda, and Masahiro Irie. Self-Assembly of Photochromic Diarylethenes with Amphiphilic Side Chains: Reversible Thermal and Photochemical Control. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(20):7499–7508, September 2006.
- [35] Kenji Higashiguchi, Genki Taira, Jun-ichiro Kitai, Takashi Hirose, and Kenji Matsuda. Photoinduced macroscopic morphological transformation of an amphiphilic diarylethene assembly: reversible dynamic motion. *Journal of the American Chemical Society*, 137(7):2722–2729, February 2015.
- [36] Takashi Hirose, Masahiro Irie, and Kenji Matsuda. Temperature-Light Dual Control of Clouding Behavior of an Oligo(ethylene glycol)-Diarylethene Hybrid System. *Advanced Materials*, 20(11):2137–2141, June 2008.
- [37] Chao Xiao, Wei-Ye Zhao, Da-Yang Zhou, Yan Huang, Ye Tao, Wan-Hua Wu, and Cheng Yang. Recent advance of photochromic diarylethenes-containing supramolecular systems. *Chinese Chemical Letters*, 26(7):817–824, July 2015.

-
- [38] Yasuko Osakada, Lindsey Hanson, and Bianxiao Cui. Diarylethene doped biocompatible polymer dots for fluorescence switching . *Chemical Communications*, 48(27):3285–3287, 2012.
- [39] Hye-youn Jung, Suyeon You, Chaewoon Lee, Seungkwon You, and Yoonkyung Kim. One-pot synthesis of monodispersed silica nanoparticles for diarylethene-based reversible fluorescence photoswitching in living cells. *Chemical Communications*, 49(68):7528–7530, 2013.
- [40] Tuoqi Wu, John-Christopher Boyer, Madeleine Barker, Danielle Wilson, and Neil R Branda. A “Plug-and-Play” Method to Prepare Water-Soluble Photoresponsive Encapsulated Upconverting Nanoparticles Containing Hydrophobic Molecular Switches. *Chemistry of Materials*, 25(12):2495–2502, June 2013.
- [41] Sebastián A Díaz, María H Etchehon, Guillermo O Menéndez, Luciana Giordano, Thomas M Jovin, and Elizabeth Andrea Jares-Erijman. Photoswitchable Water-Soluble Quantum Dots: pcFRET Based on Amphiphilic Photochromic Polymer Coating. *ACS Nano*, 5(4):2795–2805, April 2011.
- [42] Yong-Chul Jeong, Sung Ik Yang, Kwang-Hyun Ahn, and Eunkyong Kim. Highly fluorescent photochromic diarylethene in the closed-ring form. *Chemical Communications*, (19):2503, 2005.
- [43] Yong-Chul Jeong, Dae Gyu Park, In Su Lee, Sung Ik Yang, and Kwang-Hyun Ahn. Highly fluorescent photochromic diarylethene with an excellent fatigue property . *Journal of Materials Chemistry*, 19(1):97–103, 2009.
- [44] Yong-Chul Jeong, Dae Gyu Park, In Su Lee, Sung Ik Yang, and Kwang-Hyun Ahn. Highly fluorescent photochromic diarylethene with an excellent fatigue property. *Journal of Materials Chemistry*, 19(1):97, 2008.
- [45] Hiroshi Miyasaka, Tetsuro Katayama, Masahiro Irie, Yuta Takagi, Masakazu Morimoto, Yuta Takagi, Yukihide Ishibashi, Tomohiro Kunishi, and Tomohiro Kunishi. Photoswitchable fluorescent diarylethene derivatives with short alkyl chain substituents. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(11):1661, 2012.
- [46] Takaki Sumi, Tomohiro Kaburagi, Masakazu Morimoto, Kanako Une, Hikaru Sotome, Syoji Ito, Hiroshi Miyasaka, and Masahiro Irie. Fluorescent Photochromic Diarylethene That Turns on with Visible Light. *Organic Letters*, 17(19):4802–4805, October 2015.
- [47] Prabuddha Sengupta, Schuyler B van Engelenburg, and Jennifer Lippincott-Schwartz. Superresolution imaging of biological systems using photoactivated localization microscopy. *Chemical Reviews*, 114(6):3189–3202, March 2014.
- [48] George Patterson, Michael Davidson, Suliana Manley, and Jennifer Lippincott-Schwartz. Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 61(1):345–367, March 2010.
- [49] Marta Fernández-Suárez and Alice Y Ting. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12):929–943, November 2008.
- [50] G B Airy. On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 5:283, 1835.
- [51] E Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.

-
- [52] W B Amos and J G White. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biology of the Cell*, 95(6):335–342, January 2012.
- [53] A Diaspro. *Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications and advances*. Wiley VCH, 2001.
- [54] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of Cell Biology*, 89(1):141–145, April 1981.
- [55] Eric Betzig, A Lewis, A Harootunian, M Isaacson, and E Kratschmer. Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM). *Biophysical Journal*, 49(1):269–279, January 1986.
- [56] Stefan W Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11):780–782, June 1994.
- [57] Mats G L Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37):13081–13086, September 2005.
- [58] Volker Westphal and Stefan W Hell. Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope. *Physical Review Letters*, 94(14):143903, April 2005.
- [59] E Hesper Rego, Lin Shao, John J Macklin, Lukman Winoto, Göran a Johansson, Nicholas Kamps-Hughes, Michael W Davidson, and Mats G L Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3):E135–43, January 2012.
- [60] Eric Betzig, G H Patterson, R Sougrat, O W Lindwasser, S Olenych, J S Bonifacino, M W Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, H F Hess, George H Patterson, Rachid Sougrat, O Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S Bonifacino, Michael W Davidson, and Harald F Hess. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, September 2006.
- [61] Hari Shroff, Catherine G Galbraith, James A Galbraith, and Eric Betzig. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nature Methods*, 5(5):417–423, May 2008.
- [62] R M Dickson, A B Cubitt, R Y Tsien, and W E Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640):355–358, July 1997.
- [63] Atsushi Miyawaki and Yusuke Niino. Molecular Spies for Bioimaging—Fluorescent Protein-Based Probes. *Molecular Cell*, 58(4):632–643, May 2015.
- [64] Jennifer Lippincott-Schwartz and George H Patterson. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11):555–565, November 2009.
- [65] Siyuan Wang, Jeffrey R Moffitt, Graham T Dempsey, X Sunney Xie, and Xiaowei Zhuang. Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23):8452–8457, June 2014.
- [66] Joshua C Vaughan, Shu Jia, and Xiaowei Zhuang. Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging. *Nature Methods*, 9(12):1181–1184, December 2012.

-
- [67] Dhermendra K Tiwari, Yoshiyuki Arai, Masahito Yamanaka, Tomoki Matsuda, Masakazu Agetsuma, Masahiro Nakano, Katsumasa Fujita, and Takeharu Nagai. A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. *Nature Methods*, 12(6):515–518, June 2015.
- [68] Xin X Zhou and Michael Z Lin. Photoswitchable fluorescent proteins: ten years of colorful chemistry and exciting applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(4):682–690, August 2013.
- [69] Ryoko Ando, Hiroshi Hama, Miki Yamamoto-Hino, Hideaki Mizuno, and Atsushi Miyawaki. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20):12651–12656, October 2002.
- [70] Sean A McKinney, Christopher S Murphy, Kristin L Hazelwood, Michael W Davidson, and Loren L Looger. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nature Methods*, 6(2):131–133, February 2009.
- [71] Graham T Dempsey, Kok Hao Chen, Mark Bates, Joshua C Vaughan, and Xiaowei Zhuang. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nature Methods*, 8(12):1027–1036, November 2011.
- [72] Jianquan Xu, Kayvan F Tehrani, and Peter Kner. Multicolor 3D super-resolution imaging by quantum dot stochastic optical reconstruction microscopy. *ACS Nano*, 9(3):2917–2925, March 2015.
- [73] E Hesper Rego, Ricardo Henriques, Caron Griffiths, Musa M Mhlana, and E Hesper Rego. PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers*, 95(5):322–331, January 2011.
- [74] Xiaowei Zhuang, Michael J Rust, Mark Bates, and Michael J Rust. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10):793–796, August 2006.
- [75] Sara A Jones, Sang-Hee Shim, Jiang He, and Xiaowei Zhuang. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature Methods*, 8(6):499–505, June 2011.
- [76] Pieter A A De Beule, Anthony H B De Vries, Donna J Arndt-Jovin, and Thomas M Jovin. Generation-3 programmable array microscope with digital micro-mirror device. SPIE, 2011.
- [77] W Caarls, B Rieger, a H B De Vries, D J Arndt-Jovin, and T M Jovin. Minimizing light exposure with the programmable array microscope. *Journal of Microscopy*, 241(1):101–110, December 2010.
- [78] Anna Oddone, Ione Verdeny Vilanova, Johnny Tam, and Melike Lakadamyali. Super-resolution imaging with stochastic single-molecule localization: Concepts, technical developments, and biological applications. *Microscopy Research and Technique*, 77(7):n/a–n/a, February 2014.
- [79] Louis P Hammett and P Hammett. The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 59(1):96–103, 1937.
- [80] Corwin Hansch, A Leo, and W Taft. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.*, 91:165–195, 1991.
- [81] Erich Kleinpeter, Kari Neuvonen, Helmi Neuvonen, Andreas Koch, and Paavo Pasanen. Electron-Withdrawing Substituents Decrease the Electrophilicity of the Carbonyl Carbon . An Investigation with the Aid of ¹³C NMR Chemical Shifts, ν (CdO) Frequency Values, Charge Densities, and Isodesmic Reactions To Interpret Substituent Effects. *Journal of Organic Chemistry*, 67:6995–7003, 2002.

-
- [82] R Contreras, J Andrés, L R Domingo, and R Castillo. Effect of electron-withdrawing substituents on the electrophilicity of carbonyl carbons. *Tetrahedron*, 2005.
- [83] T Yamaji, T Saito, K Hayamizu, and M Yanagisawa. Spectral database for organic compounds, SDBS. <http://sdb.sdb.aist.go.jp/>, 2014.
- [84] Xinjiang Cui, Yan Zhang, Feng Shi, and Youquan Deng. Organic Ligand-Free Alkylation of Amines, Carboxamides, Sulfonamides, and Ketones by Using Alcohols Catalyzed by Heterogeneous Ag/Mo Oxides. *Chemistry*, 17(3):1021–1028, November 2010.
- [85] Jun Qiu, Limin Wang, Mingtao Liu, Qiang Shen, and Jun Tang. An efficient and simple protocol for a PdCl₂-ligandless and additive-free Suzuki coupling reaction of aryl bromides. *Tetrahedron Letters*, 52(48):6489–6491, November 2011.
- [86] B Valeur and M N Berberan-Santos. Molecular fluorescence: principles and applications. Wiley-VCH, 2012.
- [87] Dominique Guillaumont, Takao Kobayashi, Katsuya Kanda, Hiroshi Miyasaka, Kingo Uchida, Seiya Kobatake, Katsunori Shibata, Shinichiro Nakamura, and Masahiro Irie. An ab Initio MO Study of the Photochromic Reaction of Dithienylethenes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(31):7222–7227, August 2002.
- [88] Christian Reichardt. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94(8):2319–2358, 1994.
- [89] Joseph R Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 1999.
- [90] Javier Catalán. Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(17):5951–5960, April 2009.
- [91] Aleksander Filarowski, Wim M De Borggraeve, Lesley Pandey, Javier Catalán, Mark Van der Auweraer, Małgorzata Kluba, Katarzyna Cieřlik-Boczula, Aleksander Koll, Andrzej Kochel, and Noël Boens. Generalized solvent scales as a tool for investigating solvent dependence of spectroscopic and kinetic parameters. Application to fluorescent BODIPY dyes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(7):996, 2010.
- [92] Jonathan A Fauerbach, Thomas M Jovin, Elizabeth Andrea Jares-Erijman, Luciana Giordano, and Volodymyr V Shvadchak. Highly Solvatochromic 7-Aryl-3-hydroxychromones. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3:1011–1016, 2012.
- [93] Suzanne Fery-Forgues, Jean-Pierre Fayet, and André Lopez. Drastic changes in the fluorescence properties of NBD probes with the polarity of the medium: involvement of a TICT state? *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 70(3):229–243, 1993.
- [94] Seiya Kobatake, Yuko Terakawa, and Hiroyuki Imagawa. Solvent effect on photochromism of a dithienylperfluorocyclopentene having diethylamino group. *Tetrahedron*, 65(31):6104–6108, August 2009.
- [95] Reichel Samuel, Nicholas R Conley, W E Moerner, Zhikuan Lu, Samuel J Lord, Na Liu, Hsiao-lu D Lee, Stefanie Y Nishimura, Andrea K Pomerantz, Katherine A Willets, Hui Wang, Ryan Weber, Alexander Semyonov, Meng He, and Robert J Twieg. DCDHF Fluorophores for Single-Molecule Imaging in Cells. *ChemPhysChem*, 10(1):55–65, January 2009.

-
- [96] Florencia Gillanders, Luciana Giordano, Sebastián A Díaz, Thomas M Jovin, and Elizabeth Andrea Jares-Erijman. Photoswitchable fluorescent diheteroarylethenes: substituent effects on photochromic and solvatochromic properties. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(3):603–612, March 2014.
- [97] J M Hollas. *Modern Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- [98] M G Gore. Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach. Oxford University Press, 2000.
- [99] T Owen. *Fundamentals of UV-visible spectroscopy: a primer*. 1996.
- [100] Dianna G Jones. Photodiode array detectors in UV-VIS spectroscopy: part I. *Analytical Chemistry*, 57(9):1057A–1073A, August 1985.
- [101] John Kenkel. *Analytical Chemistry for Technicians, Third Edition*. 2010.
- [102] www.bwtek.com.
- [103] www.avantes.com.
- [104] www.oceanoptics.com.
- [105] www.ni.com/labview.
- [106] D Pfeifer, K Hoffmann, A Hoffmann, C Monte, and Ute Resch-Genger. The Calibration Kit Spectral Fluorescence Standards—a simple and certified tool for the standardization of the spectral characteristics of fluorescence instruments. *Journal of Fluorescence*, 16(4):581–587, July 2006.
- [107] Ute Resch-Genger and D Pfeifer. *Certification report*. Fluorescence Standards BAM-F001–BAM-F005, 2006.
- [108] Slawomir Urban, Bernhard Beiring, Nuria Ortega, Daniel Paul, and Frank Glorius. Asymmetric Hydrogenation of Thiophenes and Benzothiophenes. *Journal of the American Chemical Society*, 134(37):15241–15244, September 2012.
- [109] S Z Mikhail and Kimel W R. Densities and Viscosities. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 6(4):533–538, December 1961.
- [110] Imre Bakó, Tünde Megyes, Szabolcs Bálint, Tamás Grósz, and Viorel Chihai. Water–methanol mixtures: topology of hydrogen bonded network. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(32):5004, 2008.
- [111] L Dougan, S P Bates, R Hargreaves, J P Fox, J Crain, J L Finney, V Réat, and A K Soper. Methanol-water solutions: A bi-percolating liquid mixture. *The Journal of Chemical Physics*, 121(13):6456, 2004.
- [112] M E Davis and M E Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(12):1023–1035, December 2004.
- [113] Venkatramana M Rao and Valentino J Stella. When Can Cyclodextrins Be Considered for Solubilization Purposes? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92:927, April 2003.
- [114] Max von Delius, Edzard M Geertsema, David A Leigh, and David A Leigh. A synthetic small molecule that can walk down a track. *Nature Chemistry*, 2(2):96–101, December 2009.

-
- [115] Hyejin Yoo, Jaesung Yang, Andrew Yousef, Michael R Wasielewski, and Dongho Kim. Excimer formation dynamics of intramolecular pi-stacked perylenediimides probed by single-molecule fluorescence spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 132(11):3939–3944, March 2010.
- [116] John E Bertie and Zhida Lan. *Liquid Water–Acetonitrile Mixtures at 25 °C: The Hydrogen-Bonded Structure Studied through Infrared Absolute Integrated Absorption Intensities*, volume 101. American Chemical Society, May 1997.
- [117] Toshiyuki Takamuku, M Tabata, and Atsushi Yamaguchi. Liquid structure of acetonitrile-water mixtures by x-ray diffraction and infrared spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998.
- [118] Akihiro Wakisaka and Kazuo Matsuura. Microheterogeneity of ethanol–water binary mixtures observed at the cluster level. *Journal of molecular liquids*, 129(1-2):25–32, October 2006.
- [119] Masaki Matsumoto, Nobuyuki Nishi, Toshiya Furusawa, Masaru Saita, Toshiyuki Takamuku, Motoyuki Yamagami, and Toshio Yamaguchi. Structure of Clusters in Ethanol-Water Binary Solutions Studied by Mass Spectrometry and X-Ray Diffraction. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 68(7):1775–1783, 1995.
- [120] Stephen Curry, Peter Brick, and Nicholas P Franks. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2-3):131–140, November 1999.
- [121] J A Hamilton, S Era, S P Bhamidipati, and R G Reed. Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6):2051–2054, March 1991.
- [122] Patricia A Zunszain, Jamie Ghuman, Teruyuki Komatsu, Eishun Tsuchida, and Stephen Curry. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC structural biology*, 3(1):6, July 2003.
- [123] A N Glazer. On the Prevalence of „Nonspecific” Binding at the Specific Binding Sites of Globular Proteins. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pages 1057–1063, 1970.
- [124] Bidisa Sengupta and Pradeep K Sengupta. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and biophysical research communications*, 299(3):400–403, December 2002.
- [125] Viviane Maes, Johan Hoebeke, Antoine Vercruysse, and Louis Kanarek. Optical Studies Into the Nature of the High-Affinity Binding-Site of Human-Serum Albumin for Phenylbutazone. *Molecular Pharmacology*, 16(1):147–153, 1979.
- [126] Anna Sułkowska. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614(1-3):227–232, September 2002.
- [127] Ashoka Ray, Jacqueline A Reynolds, Helga Polet, and Jacinto Steinhardt. Binding of Large Organic Anions and Neutral Molecules by Native Bovine Serum Albumin. *Biochemistry*, 5(8):2606–2616, August 1966.
- [128] Masato Furuhashi and Gökhan S Hotamisligil. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(6):489–503, June 2008.

-
- [129] A W Zimmerman and J H Veerkamp. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(7):1096–1116, 2002.
- [130] Rahul Patil, Aisha Laguerre, Jerome Wielens, Stephen J Headey, Martin L Williams, Maria L R Hughes, Biswaranjan Mohanty, Christopher J H Porter, and Martin J Scanlon. Characterization of two distinct modes of drug binding to human intestinal fatty acid binding protein. *ACS Chemical Biology*, 9(11):2526–2534, November 2014.
- [131] Sara Chuang, Tony Velkov, James Horne, Christopher J H Porter, and Martin J Scanlon. Characterization of the drug binding specificity of rat liver fatty acid binding protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(13):3755–3764, July 2008.
- [132] Michael A Walker. A High Yielding Synthesis of N-Alkyl Maleimides Using a Novel Modification of Mitsunobu Reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(c):5352–5355, 1995.
- [133] Igor B Buchwalow and W Böcker. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer-Verlag, 2010.
- [134] Greg T Hermannson. *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 2013.
- [135] Michael M C Sun, Kevin S Beam, Charles G Cervený, Kevin J Hamblett, Richard S Blackmore, Michael Y Torgov, Felicia G M Handley, Nathan C Ihle, Peter D Senter, and Stephen C Alley. Reduction–Alkylation Strategies for the Modification of Specific Monoclonal Antibody Disulfides. *Bioconjugate Chemistry*, 16(5):1282–1290, September 2005.
- [136] Peter Bläuenstein, Johannes T Locher, Klaus Seybold, Helena Koprivova, Gy z A Janoki, Helmut R M cke, Peter Hasler, Adrian Ammann, Ilse Novak-Hofer, Alan Smith, and P August Schubiger. Experience with the iodine-123 and technetium-99m labelled anti-granulocyte antibody MAb47: a comparison of labelling methods. *European Journal of Nuclear Medicine*, 22(7):690–698, July 1995.
- [137] Tino Pleiner, Mark Bates, Sergei Trakhanov, Chung-Tien Lee, Jan Erik Schliep, Hema Chug, Marc Böhning, Holger Stark, Henning Urlaub, and Dirk Görlich. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *eLife*, 4:213, December 2015.
- [138] Peter C Fridy, Yinyin Li, Sarah Keegan, Mary K Thompson, Ilona Nudelman, Johannes F Scheid, Marlene Oeffinger, Michel C Nussenzweig, David Fenyö, Brian T Chait, and Michael P Rout. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nature Methods*, 11(12):1253–1260, December 2014.
- [139] Y P Ouedraogo. *Synthesis and Computational Studies of Photoreactive Caged Molecules*. PhD thesis, May 2012.
- [140] Graham C R Ellis-Davies. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods*, 4(8):619–628, August 2007.
- [141] J H Kaplan and a P Somlyo. Flash photolysis of caged compounds: New tools for cellular physiology. *Trends in Neurosciences*, 12(2):54–59, January 1989.
- [142] Gang Han, Taleb Mokari, Caroline Ajo-Franklin, and Bruce E Cohen. Caged Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 130(47):15811–15813, November 2008.
- [143] Genhua Zheng, Yan-Ming Guo, and Wen-Hong Li. Photoactivatable and Water Soluble FRET Dyes with High Uncaging Cross Section. *Journal of the American Chemical Society*, 129:10616–10617, August 2007.

-
- [144] Rudolf Schipfer, Otto S Wolfbeis, and Andreas Knierzinger. pH-Dependent fluorescence spectroscopy. Part 12. Flavone, 7-hydroxyflavone, and 7-methoxyflavone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2, 0(11):1443–1448, 1981.
- [145] A P de Silva, A Goligher, H Gunaratne, and T Rice. The pH-dependent fluorescence of pyridylmethyl-4-amino-1, 8-naphthalimides. *Arkivoc*, 2003.
- [146] Hai-Long Jiang, Dawei Feng, Kecheng Wang, Zhi-Yuan Gu, Zhangwen Wei, Ying-Pin Chen, and Hong-Cai Zhou. An exceptionally stable, porphyrinic Zr metal-organic framework exhibiting pH-dependent fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 135(37):13934–13938, September 2013.
- [147] Jun Yin, Younghee Kwon, Dabin Kim, Dayoung Lee, Gyoungmi Kim, Ying Hu, Ji-Hwan Ryu, and Juyoung Yoon. Cyanine-based fluorescent probe for highly selective detection of glutathione in cell cultures and live mouse tissues. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14):5351–5358, April 2014.
- [148] Stéphanie Leroy-Lhez, Jérôme Baffreau, Lara Perrin, Eric Levillain, Magali Allain, Maria-Jesus Blesa, and Piétrick Hudhomme. Tetrathiafulvalene in a Perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide)-Based Dyad: A New Reversible Fluorescence-Redox Dependent Molecular System. *The Journal of Organic Chemistry*, 70(16):6313–6320, July 2005.
- [149] Luciana Giordano, Elizabeth Andrea Jares-Erijman, Thomas M Jovin, and Masahiro Irie. Diheteroarylethenes as Thermally Stable Photoswitchable Acceptors in Photochromic Fluorescence Resonance Energy Transfer (pcFRET). *Journal of the American Chemical Society*, 124(25):7481–7489, June 2002.
- [150] W Denk, J Strickler, and W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, April 1990.
- [151] Maria Göppert Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen Der Physik*, 401(3):273–294, January 1931.
- [152] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11):1369–1377, November 2003.
- [153] Ryosuke Kawakami, Kazuaki Sawada, Aya Sato, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Hiroyuki Yokoyama, and Tomomi Nemoto. Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser. *Scientific reports*, 3:1014, 2013.
- [154] Fritjof Helmchen and Winfried Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12):932–940, December 2005.
- [155] Nicholas G Horton, Ke Wang, Demirhan Kobat, Catharine G Clark, Frank W Wise, Chris B Schaffer, and Chris Xu. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nature Photonics*, 7(3):205–209, March 2013.
- [156] Dong Li, Lin Shao, Bi-Chang Chen, Xi Zhang, Mingshu Zhang, Brian Moses, Daniel E Milkie, Jordan R Beach, John A Hammer, Mithun Pasham, Tomas Kirchhausen, Michelle A Baird, Michael W Davidson, Pingyong Xu, and Eric Betzig. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science*, 349(6251):944, August 2015.

-
- [157] Michael J Nasse and Jörg C Woehl. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 27(2):295–302, February 2010.
- [158] Th Förster. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 33(6):166–175, 1946.
- [159] Christiane Albrecht. Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(5):1223–1224, 2008.
- [160] Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, and Geoffrey R Hutchison. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1):17, 2012.
- [161] Kentaro Morimitsu, Seiya Kobatake, and Masahiro Irie. Control of Cycloreversion Quantum Yields of Diarylethenes by Introduction of Substituents at the Reactive Carbons. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 431(1):451–454, 2005.
- [162] Volodymyr V Shvadchak, Lisandro J Falomir-Lockhart, Dmytro A Yushchenko, and Thomas M Jovin. Specificity and kinetics of alpha-synuclein binding to model membranes determined with fluorescent excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) probe. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15):13023–13032, April 2011.
- [163] Candace M Pfefferkorn, Zhiping Jiang, and Jennifer C Lee. Biophysics of α -synuclein membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(2):162–171, February 2012.
- [164] Giuliana Fusco, Alfonso De Simone, Tata Gopinath, Vitaly Vostrikov, Michele Vendruscolo, Christopher M Dobson, and Gianluigi Veglia. Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nature Communications*, 5:3827, 2014.
- [165] Wojciech Paslawski, Nikolai Lorenzen, and Daniel E Otzen. Formation and Characterization of α -Synuclein Oligomers. *Methods in molecular biology*, 1345(Chapter 9):133–150, 2016.
- [166] Niels Zijlstra, Nathalie Schilderink, and Vinod Subramaniam. Fluorescence Methods for Unraveling Oligomeric Amyloid Intermediates. *Methods in molecular biology*, 1345(Chapter 10):151–169, 2016.
- [167] Timothy J Kaufmann and P M Harrison. Intracellular soluble alpha Synuclein oligomers reduce pyramidal cell excitability. *The Journal of Physiology*, pages 1–22, 2016.
- [168] Patrick J Salvesson, Ryan K Spencer, and James S Nowick. X-ray Crystallographic Structure of Oligomers Formed by a Toxic β -Hairpin Derived from α -Synuclein: Trimers and Higher-Order Oligomers. *Journal of the American Chemical Society*, 138(13):4458–4467, March 2016.
- [169] Martin Schwalbe, Valéry Ozenne, Stefan Bibow, Mariusz Jaremko, Lukasz Jaremko, Michal Gajda, Malene Ringkjøbing Jensen, Jacek Biernat, Stefan Becker, Eckhard Mandelkow, Markus Zweckstetter, and Martin Blackledge. Predictive atomic resolution descriptions of intrinsically disordered hTau40 and α -synuclein in solution from NMR and small angle scattering. *Structure*, 22(2):238–249, February 2014.
- [170] Christine C Jao, Ani Der-Sarkissian, Jeannie Chen, and Ralf Langen. Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22):8331–8336, June 2004.

-
- [171] M Julia Roberti, Jonas Foelling, M Soledad Celej, Mariano Bossi, Thomas M Jovin, and Elizabeth Andrea Jares-Erijman. Imaging Nanometer-Sized α -Synuclein Aggregates by Superresolution Fluorescence Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 102(7):1598–1607, 2012.
- [172] Valerie L Anderson and Watt W Webb. Transmission electron microscopy characterization of fluorescently labelled amyloid beta 1-40 and α -synuclein aggregates. *Bmc Biotechnology*, 11(1), 2011.
- [173] Thomas M Jovin, Dmytro A Yushchenko, Jonathan A Fauerbach, Shyamala Thirunavukkuarasu, and Elizabeth Andrea Jares-Erijman. Fluorescent Ratiometric MFC Probe Sensitive to Early Stages of α -Synuclein Aggregation. *Journal of the American Chemical Society*, 132(23):7860–7861, June 2010.
- [174] M Soledad Celej, Thomas M Jovin, Alexander P Demchenko, and Wouter Caarls. A Triple-Emission Fluorescent Probe Reveals Distinctive Amyloid Fibrillar Polymorphism of Wild-Type α -Synuclein and Its Familial Parkinson’s Disease Mutants. *Biochemistry*, 48(31):7465–7472, August 2009.
- [175] Gabriele S Kaminski Schierle, Carlos W Bertoncini, Fiona T S Chan, Annemieke T van der Goot, Stefanie Schwedler, Jeremy Skepper, Simon Schlachter, Tjakko van Ham, Alessandro Esposito, Janet R Kumita, Ellen A A Nollen, Christopher M Dobson, and Clemens F Kaminski. A FRET sensor for non-invasive imaging of amyloid formation in vivo. *ChemPhysChem*, 12(3):673–680, February 2011.
- [176] Elisha Haas. Ensemble FRET methods in studies of intrinsically disordered proteins. *Methods in molecular biology*, 895(28):467–498, 2012.
- [177] Ritu Khurana, Chris Coleman, Cristian Ionescu-Zanetti, Sue A Carter, Vinay Krishna, Rajesh K Grover, Raja Roy, and Shashi Singh. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3):229–238, September 2005.
- [178] Jonathan A Fauerbach, Dmytro A Yushchenko, Sarah H Shahmoradian, Wah Chiu, Thomas M Jovin, and Elizabeth Andrea Jares-Erijman. Supramolecular Non-Amyloid Intermediates in the Early Stages of α -Synuclein Aggregation. *Biophysical Journal*, 102(5):1127–1136, March 2012.
- [179] I Bernard Cohen, Anne Whitman, and Julia Budenz. *The Principia: The Authoritative Translation and Guide: Mathematical Principles of Natural Philosophy*. 2016.