

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



**Instituto Tecnológico de Tijuana**  
**Centro de Graduados e Investigación en Química**

TRABAJO DE TESIS

**“Síntesis de bioconjugados y su estudio de afinidad alta a receptores biológicos”**

Presentado por

M. C. Luceldi Carre Rangel

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de Tesis

Dr. Ignacio A. Rivero E.

TIJUANA, B. C.

FEBRERO DE 2023



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 24/mayo/2022

Oficio No. 299/CG/2022

Asunto: **Se autoriza impresión de trabajo de tesis**

**GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**PRESENTE**

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado **"Síntesis de Bioconjugados y su Estudio de Afinidad Alta a Receptores Biológicos"**, presentado por la **C. Luceldi Carre Rangel**, (con número de control D10211069), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Doctorado en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

**ATENTAMENTE**

**DR. IGNACIO ALFREDO RIVERO ESPEJEL**  
Presidente

  
**DR. MANUEL ALATORRE MEDA**  
Secretario del Jurado  
**DR. EDGAR ALONSO REYNOSO SOTO**  
Vocal del Jurado  
**DRA. KARLA ALEJANDRA ESPINOZA DUEÑAS**  
Vocal del Jurado  
**DR. VICTOR GUADALUPE GARCIA GONZALEZ**  
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación  
C.p. Expediente  
C.p. Interesado  
IARE/MAM/EARS/KAED/VGGG



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzín,  
Fracc. Tomás Aquino C.P. 22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400  
Ext. 101

INSTITUTO TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



**2022** Ricardo  
Flores  
Magón  
Año de  
Magón



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 31/octubre/2022

OFICIO No. 094/DEPI/2022

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**MARÍA MAGDALENA SERRANO ORTEGA**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE**

En lo referente al trabajo de tesis, "Síntesis de Bioconjugados y su Estudio de Afinidad Alta a Receptores Biológicos". Presentado por C. Luceldi Carrre Rangel, alumna del Doctorado en Ciencias en Química con numero de control D10211069; informo a usted que a solicitud del comité de tutorial, tengo a bien Autorizar la impresión de Tesis, atendiendo las disposiciones de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

Sin más por el momento le envió un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
Excelencia en Educación Tecnológica.



**GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO**  
**JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo

GHE/lap



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotsin,  
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400  
Est. 101

e-mail: dir.tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | Tijuana.tecnm.mx



**2022** *Ricardo*  
**Flores**  
*Año de*  
**Magón**  
PRELUDIO DE LA REVOLUCIÓN MAGÓN

"Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la patria"

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

### DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

#### CARTA DE CESION DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B.C. del 20 de junio del 2022, la C. Luceldi Carré Rangel, alumna del posgrado de Doctorado en ciencia en química con número de control D10211069 manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Ignacio A. Rivero Espejel y ceden los derechos del trabajo titulado "Síntesis de Bioconjugados y su Estudio de Afinidad Alta a Receptores Biológicos" al Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Tijuana para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la investigación no deberán de reproducir el contenido textual, figuras, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico; [irivero@tectijuana.mx](mailto:irivero@tectijuana.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Luceldi Carre Rangel



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin, Fracc.  
Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400 Est. 101  
e-mail: [dir\\_tijuana@tecnm.mx](mailto:dir_tijuana@tecnm.mx) | [tecnm.mx](http://tecnm.mx) | [Tijuana.tecnm.mx](http://Tijuana.tecnm.mx)



## DEDICATORIA

A mis padres, Urban y Rosa.

## CONTENIDO

CARTA DE LIBERACIÓN DE TESIS.....	ii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DEPI.....	iii
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiii
LISTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xv
AGRADECIMIENTOS.....	xvi
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	xvii
VITA.....	xviii
RESUMEN.....	xx
PUBLICACIONES PRODUCTO DE LA TESIS.....	xxii
CAPÍTULO I: BIOCONJUGADOS FLUORESCENTES DE ANGIOTENSINAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	4
2.2 Objetivo general.....	4
2.3 Objetivo específico.....	4
III. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Sistema Renina Angiotensina circulatorio.....	5
3.2 Funciones del Sistema Renina Angiotensina circulatorio.....	7
3.3 Sistema Renina Angiotensina de tejido y celular.....	8
3.4 Sistema Renina Angiotensina y la obesidad.....	9
3.5 Sistema Renina Angiotensina y Diabetes e hipertensión.....	9
3.6 Sistema Renina Angiotensina y Alzheimer.....	10
3.7 Simulación de la membrana plasmática.....	11
3.8 Fluorescencia Molecular.....	12

3.9	BODIPY.....	13
3.10	Bioconjugados.....	16
3.11	Hipótesis.....	17
IV.	EXPERIMENTAL.....	18
4.1	Generalidades.....	18
4.2	Secado de disolventes.....	18
4.3	Técnicas analíticas.....	18
4.4	Cromatografía.....	19
4.5	Metodología general para la síntesis de bioconjugados.....	20
4.6	Etapa 1: Síntesis de BODIPY.....	21
4.6.1	Síntesis de di(1H-pirrol-2-il)metanotiona (3).....	22
4.6.2	Síntesis de 2-((metiltio)-(1H-pirrol-2-il)metileno)-2H-pirrol-1-io yoduro (4).....	23
4.6.3	Síntesis de 8-tiometil-4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno (5).....	24
4.7	Etapa 2: Síntesis de péptidos.....	25
4.8	Etapa 3: Síntesis de bioconjugados.....	28
4.8.1	Síntesis de BODIPY amino (6a-6e).....	28
4.8.2	Síntesis de BODIPY Propargilo (6f).....	30
4.8.3	Síntesis de BODIPY Glicina (7a).....	31
4.8.4	Síntesis de BODIPY Colesterol (7b).....	32
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1	Caracterización estructural de los compuestos fluorescentes.....	33
5.2	BODIPY S-metilo (5).....	35
5.3	Caracterización estructural de los biconjugados.....	38
5.3.1	BODIPY-amino (6a).....	38
5.3.2	Caracterización estructural de BODIPY-amino (6b).....	40
5.3.3	Caracterización estructural del BODIPY amino 6c.....	42
5.3.4	Caracterización estructural de BODIPY-propargilo 6f.....	43
5.3.5	Caracterización estructural de BODIPY Glicina 6g.....	45

5.4	Caracterización estructural de los péptidos.....	48
5.5	Caracterización espectroscópica de los compuestos fluorescentes.....	50
5.5.1	BODIPY S-metilo.....	50
5.5.2	Bioconjugados.....	51
5.5.3	Estudio de fluorescencia en diferentes disolventes.....	53
5.5.4	Estudio de pH con BODIPY amino 6a.....	56
5.6	Unión de BODIPY 5 a los péptidos.....	58
5.7	Microscopia confocal de la resina.....	61
VI.	CONCLUSIONES.....	64
VII.	REFERENCIAS.....	65
VIII.	ANEXOS.....	71
	CAPÍTULO II: QUÍMICA CLICK.....	77
I.	INTRODUCCIÓN.....	78
II.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	79
	2.1 Justificación.....	79
	2.2 Objetivo general.....	79
	2.3 Objetivos específicos.....	79
III.	ANTECEDENTES.....	80
	3.1 Reacción cicloadición alquino-azida catalizada con cobre.....	80
	3.2 Electro síntesis orgánica.....	81
	3.3 Hipótesis.....	82
IV.	EXPERIMENTAL.....	83
	4.1 Generalidades.....	83
	4.2 Técnicas analíticas.....	83
	4.3 Cromatografía.....	84
	4.4 Síntesis de triazoles por metodología convencional.....	84
	4.5 Síntesis de triazoles por oxidación electroquímica.....	85
	4.5.1 Preparación de solución de electrolito.....	85
	4.5.2 Oxidación electroquímica de cobre metálico.....	85



4.5.3 Oxidación de cobre por pulso continuo.....	86
4.5.4 Oxidación de cobre por pulso inverso.....	87
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
5.1 Oxidación electroquímica de cobre metálico.....	89
5.2 Comparación de rendimientos entre método convencional y oxidación electroquímica.....	90
5.3 Estudio de la superficie y análisis elemental por FESEM.....	92
VI. CONCLUSIONES.....	99
VII. REFERENCIAS.....	100
VIII. ANEXOS.....	102

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura 1. Diagrama de degradación catalítica de péptidos en el RAS.....	6
Figura 2	Estructura y numeración de anillos.....	14
Figura 3	Representación de 2 de las 7 estructuras resonantes que presenta el BODIPY.....	14
Figura 4	Síntesis de BODIPY mediante la metodología de condensación de pirrol con un aldehído aromático.....	15
Figura 5	Síntesis de BODIPY mediante la metodología de condensación de pirrol con un ácido.....	15
Figura 6	Representación de la síntesis de BODIPY amino en cuatro pasos....	21
Figura 7	Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto 5.....	35
Figura 8	Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura de BODIPY amino 6a.....	38
Figura 9	Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura de BODIPY amino 6b.....	40
Figura 10	Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto 6f.....	43
Figura 11	Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto 6g.....	45
Figura 12	Espectro de IR de la resina de Wang antes, después del acoplamiento del primer AA y la resina unida a Ang I-Fmoc.....	48
Figura 13	Espectro de IR de la resina de Wang antes, después del acoplamiento del primer AA y la resina unida a Ang II-Fmoc, Ang III-Fmoc y Ang IV-Fmoc.....	49
Figura 14	Espectro de excitación y emisión de FM del compuesto 5 en DCM	50
Figura 15	Comparación del compuesto 4 (superior) y el BODIPY 5 (inferior) en DCM, antes y durante la irradiación con luz UV.....	51

Figura 16	Fotografía de la fluorescencia observada en diferentes BODIPYs (de izquierda a derecha: 5, 6a, 6b, 6f y 7) en solución $1 \times 10^{-3}$ .....	51
Figura 17	Espectros de excitación y emisión de FM para diferentes BODIPYs.....	52
Figura 18	Espectros de emisión de fluorescencia de BODIPY 5 y BODIPY 6a en acetonitrilo y agua.....	53
Figura 19	Estructuras resonantes del BODIPY S-metilo.....	54
Figura 20	Estructuras resonantes del BODIPY 6a.....	55
Figura 21	Estructura del BODIPY 6a en agua.....	56
Figura 22	Estudio de pH para el BODIPY 6a.....	56
Figura 23	Estructuras resonantes de la forma básica y ácida del BODIPY amino 6a.....	57
Figura 24	Estructuras de las cuatro diferentes angiotensinas (Ang I, Ang II, Ang III y Ang IV).....	58
Figura 25	Espectros IR de la unión de BODIPY a las angiotensinas.....	59
Figura 26	Fotografías de los péptidos en la resina, antes y después de unirse al BODIPY 5.....	60
Figura 27	Fluorescencia molecular de la solución de unión de BODIPY 5.....	60
Figura 28	Imágenes de microscopia confocal de los péptidos unidos a la resina de Wang.....	63
Figura 29	Voltamperometría cíclica de la placa de $\text{Cu}^0$ en el electrolito de soporte (TBATFB en tert-butanol/agua).....	63
Figura 30	Electrólisis de la electro-oxidación de Cu a un voltaje constante 0.3V/Ag/AgCl/Cl-sat $\text{KCl}_{(\text{tert-butanol/agua})}$ using TBATFB 1mM como electrolito de soporte.....	89
Figura 31	Imagen de FESEM de la placa de Cu: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis, c) Mapa de análisis elemental EDS, antes de la electrólisis, d) Mapa de análisis elemental EDS EDS, después de la electrólisis.....	90
Figura 32	Programa de pulsos para la síntesis electroquímica.....	93

Figura 33	Programa de pulsos para la síntesis electroquímica.....	94
Figura 34	Electro oxidación pulsada de cobre.....	95

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Etapas del trabajo experimental.....	20
Esquema 2	Metodología de síntesis del di (1H-pirrol-2-il) metanotiona (3).....	22
Esquema 3	Metodología de síntesis de 2-((metiltio)-(1H-pirrol-2-il)metileno)- 2H-pirrol-1-io yoduro (4).....	23
Esquema 4	Metodología de síntesis del BODIPY 5.....	24
Esquema 5	Diagrama representativo del flujo de la síntesis de péptidos.....	25
Esquema 6	Metodología de liberación del péptido de la resina de Wang.....	27
Esquema 7	Metodología de síntesis de los BODIPY amino (6a-6e).....	28
Esquema 8	Metodología de síntesis del BODIPY 6f.....	30
Esquema 9	Metodología de síntesis del BODIPY 6g.....	31
Esquema 10	Metodología de síntesis del BODIPY Colesterol (7b).....	32
Esquema 11	Mecanismo de reacción de la tiocetona (3).....	33
Esquema 12	Mecanismo de reacción del dipirrometeno S-metilo (4).....	34
Esquema 13	Mecanismo de reacción del BOIPY.....	34
Esquema 14	Reacción de cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen.....	80
Esquema 15	Reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada con cobre.....	80
Esquema 16	Reacción click usando sulfato de cobre como precursor metálico, por el método convencional.....	85
Esquema 17	Triazoles obtenidos por la reacción de electro-click.....	87
Esquema 18	Reacción electro-click por pulso inverso.....	88
Esquema 19	Mecanismo de reacción propuesto para la formación de triazoles por oxidación electroquímica de Cu <sup>0</sup> .....	97

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Señales compuesto 5 en RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	35
Tabla 2	Señales del compuesto 5 en IR.....	36
Tabla 3	Señales de BODIPY amino 6a en RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	39
Tabla 4	Señales de BODIPY 6a en IR.....	39
Tabla 5	Señales del compuesto 6b en RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	40
Tabla 6	Señales de BODIPY amino 6b en IR.....	41
Tabla 7	Señales de BODIPY amino 6c en IR.....	42
Tabla 8	Señales del compuesto 6f en RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	43
Tabla 9	Señales del compuesto 6f en IR.....	44
Tabla 10	Señales del compuesto 6g en RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	46
Tabla 11	Señales del compuesto 6g en IR.....	47
Tabla 12	Longitudes de onda de excitación y emisión máximas para diferentes BODIPYs.....	52
Tabla 13	Longitudes de onda de emisión máximas de los BODIPY 5 y 6a en diferentes disolventes.....	54
Tabla 14	Comparación entre los rendimientos de reacción obtenidos entre el método convencional de síntesis de triazoles y el método electroquímico.....	91
Tabla 15	Análisis elemental EDS del ET, antes y después de la SOEA.....	94
Tabla 16	Comparación entre el rendimiento obtenido entre el método convencional y el método electroquímico de pulsos.....	95

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 5 en $\text{CDCl}_3$ .....	71
Anexo 2	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 6a en $\text{CDCl}_3$ .....	72
Anexo 3	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 6a en $\text{CDCl}_3$ .....	72
Anexo 4	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 6b en $\text{CDCl}_3$ .....	73
Anexo 5	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 6b en $\text{CDCl}_3$ .....	74
Anexo 6	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 6f en $\text{CDCl}_3$ .....	75
Anexo 7	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 6f en $\text{CDCl}_3$ .....	76
Anexo 8	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 7a en $\text{CDCl}_3$ .....	76
Anexo 9	Espectro infrarrojo del compuesto 4a.....	102
Anexo 10	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 4a en $\text{CDCl}_3$ .....	103
Anexo 11	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 4a en $\text{CDCl}_3$ .....	104
Anexo 12	Espectro infrarrojo del compuesto 4b.....	105
Anexo 13	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 4b en $\text{DMSO}-\text{D}_6$ .....	106
Anexo 14	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 4b en $\text{DMSO}-\text{D}_6$ .....	107
Anexo 15	Espectro infrarrojo del compuesto 4c.....	108
Anexo 16	$^1\text{H}$ NMR del compuesto 4c en $\text{CDCl}_3$ .....	109
Anexo 17	$^{13}\text{C}$ NMR del compuesto 4c en $\text{CDCl}_3$ .....	110

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Ignacio Rivero, por su apoyo incondicional y su guía para el desarrollo del trabajo mostrado en este documento.

Agradezco a la Dra. Teresita Oropeza por todo su apoyo para la realización de la parte electroquímica del proyecto.

Agradezco al Dr. Jorge Avelino por el apoyo en la síntesis de BODIPY y por todos sus consejos sobre purificación por columna.

Agradezco al Dr. Manuel Alatorre y a la Dra. Eustolia Rodríguez por su apoyo en los estudios de microscopia confocal.

Por último, agradezco a la Ing. Química Mariana Vázquez por todo el apoyo que me brindó en síntesis y purificación de compuestos durante su estancia como practicante de laboratorio.



## RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Síntesis Orgánica en Fase Sólida del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección del Dr. Ignacio Rivero.

Se agradece el apoyo brindado por el CONACyT para la realización de estudios de postgrado (No. de registro del becario: 583636) y al Tecnológico Nacional de México por el desarrollo de esta investigación a través del proyecto 6823.18-P y 6344.17-P

Asimismo, el suscrito agradece al Instituto Tecnológico de Tijuana y al departamento del Centro de Graduados e Investigación en química por el apoyo brindado para la realización de estos estudios.

## VITA

6 de octubre de 1992	Nacida en Tijuana, Baja California, México.
Agosto 2014	Becaria Vinculación.
Noviembre 2014	Becaria Proyecta 100000, UNC Charlotte, USA.
Marzo 2015	Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología, Instituto Tecnológico de Tijuana.
2015-2017	Becaria CONACyT.
2017	Maestría en Ciencias en Química
2017-2021	Becaria CONACyT.
2022	Doctorado en Ciencias en Química

## Presentaciones

1. "Green synthesis of silver nanoparticles with dextrans and cyclodextrins". 2do Simposio Internacional de Nanociencias y Nanomateriales. Marzo 2012, Ensenada, B. C., México. (Presentación en cartel)
2. "Effect of the dextran molecular weight as stabilizing agent in the green synthesis of silver nanoparticles". IX Simposio Internacional: Investigación Química en la frontera". Noviembre 2013, Tijuana, B. C., México. (Presentación en cartel)
3. "Estudio del efecto del dextrano como agente redactor-estabilizante en la síntesis verde de nanopartículas de plata". Semana Académica de Ingeniería en Nanotecnología, Ingeniería Química e Ingeniería Ambiental. Noviembre del 2014, Tijuana, B. C., México. (Presentación en cartel, 1er. Lugar)
4. "Síntesis de una sonda de tipo BODIPY-triazol-angiotensina (IV) como marcador biológico". Seminario de Investigación III. Mayo 2017. Tijuana, B. C., México. (Presentación Oral)
5. "Síntesis de una sonda de tipo BODIPY-triazol-angiotensina (IV) como marcador biológico". XV Escuela de Verano de Química. Junio 2017. Tijuana, B. C., México. (Presentación Oral)

6. "Síntesis de una sonda de tipo BODIPY-triazol-angiotensina (IV) como marcador biológico". 52° Congreso Mexicano de Química. Septiembre 2017. Puerto Vallarta, Jal., México. (Presentación Oral)
7. "Electro-assisted click reaction by in-situ Cu oxidation". XI Simposio Internacional: Investigación Química en la Frontera. Noviembre 2018. Tijuana, B. C., México. (Presentación en cartel)
8. "Click chemistry evaluation for synthesis of a fluorescent BODIPY-Triazol-Angiotensin IV probe". XI Simposio Internacional: Investigación Química en la Frontera. Noviembre 2018. Tijuana, B. C., México. (Presentación Oral)
9. "Diseño de sensores de biomoléculas inmovilizadas con afinidad alta a receptores biológicos". Programa de seminarios del Centro de Graduados e Investigación en Química. Febrero 2019. Tijuana, B. C., México. (Presentación Oral)
10. "Síntesis de bioconjugados y su estudio de afinidad alta a receptores biológicos". Programa de seminarios del Centro de Graduados e Investigación en Química. Febrero 2020. Tijuana, B. C., México. (Presentación Oral)

### **Publicaciones**

- I. Carré-Rangel, L.; Alonso-Nuñez, G.; Espinoza-Gómez, H.; Z. Flores-López, L. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Effect of Dextran Molecular Weight Used as Stabilizing-Reducing Agent. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2015**, *15*, 1–7.
- II. Carre-Rangel, L.; Espinoza, K.; Oropeza-Guzmán, M. T.; Rivero, I. A. Synthesis of Triazoles by Electro-Assisted Click Reaction Using a Copper Foil Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2021**, *32*, 1373-1380.

### **Áreas de estudio**

Área principal: Química Orgánica

Síntesis orgánica en fase sólida

Síntesis y estudio de compuestos fluorescentes

## **RESUMEN**

### **“Síntesis de bioconjugados y su estudio de afinidad alta a receptores biológicos”**

por

**Luceldi Carré Rangel**

Doctora en Ciencias en Química

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2022

**Dr. Ignacio Rivero**

Director de Tesis.

Los péptidos y proteínas son los encargados de llevar a cabo numerosos procesos biológicos que se presentan cuando se desarrolla una respuesta fisiológica en el cuerpo humano. A pesar de lo importantes que son estos procesos biológicos para entender y diagnosticar enfermedades, aún no se comprende completamente el papel que desempeñan péptidos y proteínas en enfermedades degenerativas, como Alzheimer, diabetes, entre otras. Esto debido a que es complejo su monitoreo en tiempo real dentro de un sistema biológico. En el capítulo I del presente trabajo de investigación, se realizó la síntesis de 4 diferentes angiotensinas (Ang I, Ang II, Ang III y Ang IV), las cuales se marcaron con BODIPY, formando bioconjugados péptido fluorescentes, para su estudio en modelos celulares.

Por otra parte, la reacción de click, mejor conocida como química click, es uno de los principales métodos de unión entre moléculas, para la formación de bioconjugados, es por eso, que siempre se está buscando conseguir condiciones de reacción más suaves y compatibles con moléculas biológicas. En el capítulo II se realizó un estudio para mejorar el rendimiento de la reacción de click. Se encontró que la reacción entre un azida y un alquino terminal se puede catalizar con una lámina de cobre metálico al aplicar un voltaje. Utilizando el método descrito se realizó la síntesis

de tres diferentes triazoles, logrando establecer las condiciones necesarias en la síntesis de triazoles, para obtener rendimientos altos en tiempos de reacción cortos.

### **Abstract**

Peptides and proteins are responsible for carrying out numerous biological processes that occur when a physiological response is developed in the human body. Despite the importance of these biological processes to understand and diagnose diseases, the role that peptides and proteins play in degenerative diseases, such as Alzheimer's, diabetes, among others, is still not fully understood. This is because real-time monitoring within a biological system is complex. In chapter I of this research work, the synthesis of 4 different angiotensins (Ang I, Ang II, Ang III and Ang IV) was carried out, which were labeled with BODIPY, forming fluorescent peptide bioconjugates, for their study in cell models.

On the other hand, the click reaction, better known as click chemistry, is one of the main methods of bonding between molecules, for the formation of bioconjugates, which is why we are always seeking to achieve milder reaction conditions that are compatible with biological molecules. In chapter II, a study was carried out to improve the performance of the click reaction. It was found that the reaction between an azide and a terminal alkyne can be catalyzed with a metallic copper foil by applying a voltage. Using the described method, the synthesis of three different triazoles was carried out, managing to establish the necessary conditions in the synthesis of triazoles, to obtain high yields in short reaction times.

## **PUBLICACIONES PRODUCTO DE LA TESIS**

Carre-Rangel, L.; Espinoza, K.; Oropeza-Guzmán, M. T.; Rivero, I. A.  
Synthesis of Triazoles by Electro-Assisted Click Reaction Using a Copper Foil  
Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2021, 32, 1373-1380.

# CAPÍTULO I: BIOCONJUGADOS FLUORESCENTES DE ANGIOTENSINAS

## I. INTRODUCCIÓN

Los péptidos al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables de un gran número de funciones; muchas de las cuales todavía no se conocen en su totalidad. Las Angiotensinas, son péptidos que intervienen en enfermedades degenerativas, además de sus procesos normales de regular funciones corporales importantes.

Hasta hace poco se creía que los péptidos involucrados en las fisiologías reguladas por el RAS eran solamente angiotensina II y angiotensina III. En el año 2002, se propuso que angiotensina II mejoraba la capacidad de aprendizaje y memoria en animales modelo, sin embargo, la participación de angiotensina II en la consolidación de la memoria aún no se encuentra confirmada. Estudios apuntan a que la angiotensina IV del cerebro es responsable del comportamiento cognitivo, la confusión se presenta ya que al degradarse angiotensina II se convierte en angiotensina IV, la cual presenta dichas propiedades.

La facilitación cognitiva que mostraron pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, la cual originalmente fue atribuida a la angiotensina II, se debe a la acción de la angiotensina IV unida al receptor AT4, para el cual actúa como agonista con selectividad y afinidad alta.

La mayoría de los procesos biológicos mediados por péptidos, no se entienden por completo, debido a eso es importante desarrollar herramientas para su estudio y mejor comprensión.

Los bioconjugados son la unión de dos o más moléculas entre sí, generalmente por un enlace covalente, para crear un complejo formado por las moléculas ligadas, de las cuales, al menos alguna es de origen biológico, o es un fragmento o derivado de una biomolécula. La bioconjugación ha hecho posible el descubrimiento de nuevas biomoléculas, la elucidación de nuevos procesos biológicos complejos, el crecimiento de la industria médica, diagnóstico, ciencias de la vida y ciencia de materiales. Crear bioconjugados a partir de moléculas individuales para



formar nuevos complejos que tengan las propiedades combinadas de cada sustituyente de los que están hechas, resulta en la construcción de estructuras que tienen características no naturales para esas moléculas.

En el presente proyecto se plantea la síntesis de bioconjugados fluorescentes basados en angiotensinas (I, II, III y IV) y análogos de BODIPY, para la evaluación de sus propiedades químicas y biológicas, su aplicación como marcador y su estudio en sistemas biológicos

---

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La reciente relación que presentaron los péptidos angiotensinas en el desarrollo y tratamiento de enfermedades degenerativas, los ha convertido en moléculas de interés para el estudio de los procesos biológicos en los que están involucrados. Debido a eso y al éxito que han tenido los bioconjugados fluorescentes en la elucidación de sistemas complejos, se plantea la síntesis de bioconjugados fluorescentes basados en dichos péptidos, para la evaluación de sus propiedades químicas y biológicas, su aplicación como marcador y en estudios de sistemas biológicos.

### 2.2 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es sintetizar bioconjugados con angiotensinas como molécula de afinidad y BODIPY como molécula fluorescente para su aplicación en estudios biológicos.

### 2.3 Objetivos específicos

1. Sintetizar análogos de BODIPY para utilizarse como marcador fluorescente en bioconjugados.
2. Caracterizar los BODIPY por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (EM), Espectroscopia de Infrarrojo (IR), Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-vis) y Fluorescencia Molecular (FM).
3. Sintetizar los péptidos angiotensina I, II, III, IV por la técnica de fase sólida para utilizarse como molécula de afinidad en la formación de bioconjugados.
4. Caracterizar los péptidos por IR y EM.
5. Preparar bioconjugados con cada péptido usando diaminas alifáticas como molécula de reticulación, para aplicarse en estudios biológicos.
6. Caracterizar los bioconjugados por EM, IR, FM y Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).
7. Realizar estudios de permeabilidad celular para determinar su aplicación como etiquetas fluorescentes.

---

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Sistema Renina Angiotensina circulatorio

El sistema Renina-Angiotensina (RAS) está relacionado con funciones renales y vasculares. En el RAS se generan hormonas llamadas Angiotensinas, que surgen a partir de la acción de las proteasas sobre la proteína Angiotensinógeno. Las Angiotensinas se unen a los receptores de la superficie celular, generando señales que se traducen en respuestas fisiológicas.<sup>1</sup> A este RAS se le conoce como clásico o circulatorio, y en él se presenta una cascada de degradación enzimática, en donde la angiotensinógeno es convertida por Renina en Angiotensina I (Ang I), que posteriormente es convertida en Angiotensina II (Ang II) por la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

La Renina es una enzima proteasa de 37 kDa. En humanos es liberada en los riñones como Pro-Renina, su liberación se da en respuesta de tres estímulos: disminución en la presión arterial, disminución en el sodio entregado al túbulo distal y activación del sistema nervioso simpático. La Pro-Renina se activa por medio de la remoción del fragmento prolina. La proteína precursora, angiotensinógeno, es secretada por el hígado y enviada a la sangre, donde, una vez activa, la renina hidroliza a Angiotensinógeno, convirtiéndolo en Ang I.<sup>2</sup>

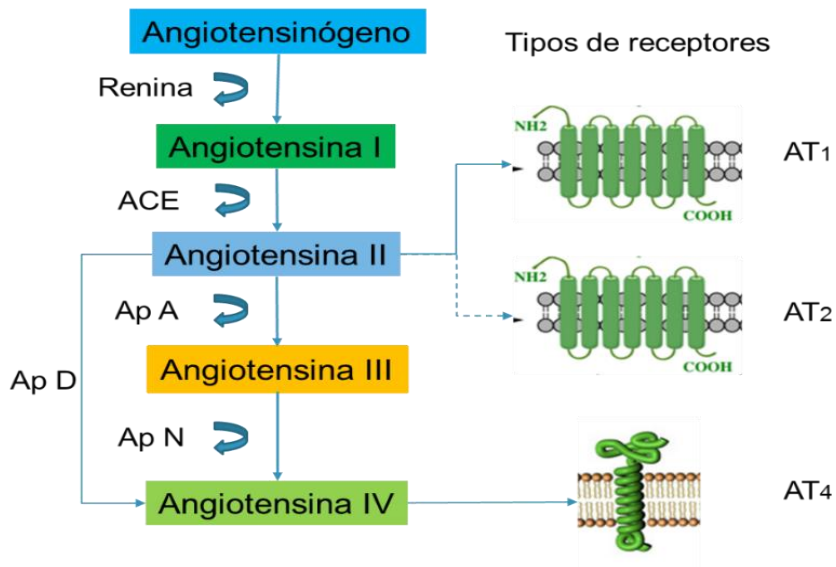
La Renina regula la presión arterial y el volumen de fluido extracelular (plasma sanguíneo, linfa y fluido intersticial), por medio de la formación de angiotensinas. Por ello, se han desarrollado inhibidores de Renina como tratamiento en enfermedad cardiovascular. Estos inhibidores previenen la formación de Ang I y por consecuencia de los metabolitos de angiotensina. Actualmente existen tres generaciones de inhibidores sintéticos de Renina y se sigue trabajando en mejorar su absorción y disminuir efectos secundarios.<sup>1</sup>

Después de la hidrólisis de angiotensinógeno, la Ang I inactiva es convertida por ACE al péptido activo Ang II mediante la remoción del fragmento C-terminal del dipéptido His-Leu.

ACE es una metaloenzima de zinc que se inhibe por agentes metal quelantes, se encuentra en la superficie de las células endoteliales de los pulmones, en las células epiteliales del riñón y colon, entre otros órganos. Por ello, el primer inhibidor ACE usado clínicamente, captopril, es un compuesto de tior con la capacidad de quelar al zinc.

En la actualidad son muchos los compuestos con diversas estructuras que han sido aceptados para su uso como inhibidor de ACE. Los inhibidores de ACE, disminuye la generación de Ang II, por lo que se disminuye la presión arterial y la reabsorción de agua y sodio y reduce el volumen de fluido extracelular. Los inhibidores de ACE presentan efectos secundarios porque la ACE hidroliza otros péptidos además de Ang I, por ello, ha aumentado el interés en el desarrollo de antagonistas para los receptores de angiotensina, que mejoren la selectividad y elimine efectos secundarios.<sup>1</sup>

La Ang III se produce de la unión de Ang I con ACE o de Ang II mediante su degradación al eliminar el extremo N-terminal con la peptidasa de zinc A (Aminopeptidasa A: APA) Ang III puede ser convertido en Ang IV por aminopeptidasa B mediante la eliminación de arginina por el extremo N-terminal (APB) o aminopeptidasa N (APN) (Figura 1).<sup>1</sup>



**Figura 1.** Diagrama de degradación catalítica de péptidos en el RAS

---

### 3.2 Funciones del Sistema Renina Angiotensina circulatorio

Las funciones más conocidas del RAS circulatorio, son la de regular la presión sanguínea y balancear los fluidos corporales, mediante la interacción de Ang II con el receptor de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>R). Sin embargo, las funciones del RAS, se pueden dividir en dos grandes grupos: el primero, las angiotensinas se unen a AT<sub>1</sub>R y promueven vasoconstricción, fibrosis e hipertrofia en el sistema cardiovascular; el segundo, la unión de Ang II con el receptor de angiotensina tipo 2 (AT<sub>2</sub>R) genera los efectos opuestos, como vasodilatación y prevención de hipertrofia, fibrosis y proliferación.<sup>2</sup>

La unión de Ang II a AT<sub>1</sub>R genera vasoconstricción y retención de sodio y agua, incrementando con esto la presión arterial, por lo que el RAS se ha relacionado al desarrollo de algunas enfermedades en humanos, como hipertensión, diabetes, inflamación, fibrosis, arritmias, enfermedades del riñón, entre otras.<sup>1</sup> Varias patologías se han asociado a la desregulación del RAS. Por ello, se ha desarrollado fármacos que interrumpen y/o modifican diferentes pasos de la cascada metabólica del sistema con el fin de controlar la presión sanguínea, fallas de corazón y riñón.<sup>1</sup>

La Ang III tiene la misma afinidad por AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R que Ang II, incluso ejerce acciones similares, como generar vasoconstricción y liberar aldosterona, sin embargo, la Ang III presenta acciones más importantes que Ang II mediante su unión a AT<sub>1</sub>R, como liberación de vasopresina.<sup>3</sup>

La Ang IV se une específicamente a AT<sub>4</sub>R, que es una enzima transmembrana, un receptor aminopeptidasa regulado por insulina/ Leu-*N*-exopeptidasa (IRAP). Ang IV actúa como inhibidor de IRAP, al cual no se unen Ang II y sus análogos o antagonistas. AT<sub>4</sub>R se localiza predominantemente en el cerebro, corazón, riñón y vasos sanguíneos.

El mecanismo de señalización de AT<sub>4</sub>R no está bien definido, pero se ha descrito que interfiere en el flujo sanguíneo local y se le asocia a la regulación de

---

procesos cognitivos, así como funciones motoras y sensoriales.<sup>1</sup> A pesar de que se ha demostrado que diversos procesos biológicos son mediados por la unión de ang IV al AT<sub>4</sub>R, la forma como se desencadenan dichos procesos aún no se comprende por completo.<sup>4</sup> Debido a ello, es importante desarrollar herramientas para su estudio.

La Ang II es un constrictor de los vasos sanguíneos, pero también incrementan la reabsorción de agua y sodio lo que genera un aumento en el volumen de sangre.<sup>1</sup>

### **3.3 Sistema Renina Angiotensina de tejido y celular**

El RAS se encuentra de forma “local” en un gran número de tejidos; incluidos los riñones, glándulas suprarrenales, páncreas, corazón, piel, grasa y sistemas como vascular, nervioso, reproductivo y digestivo. Estos RAS locales contienen todos los elementos necesarios para la producción de Ang II y los otros derivados de angiotensinógeno, además de receptores renina/prorenina. El RAS local, pueden llevar a cabo diversas funciones: independientes del RAS circulatorio como en las glándulas adrenales y el cerebro, en donde las angiotensinas son responsables de respuestas fisiológicas que incluyen funciones no cardiovasculares; y también, funciones asociadas con el RAS circulatorio, como en el corazón y riñones.<sup>3</sup>

Anteriormente la Ang II era considerada como una hormona producida en la circulación y transmitida por la sangre, pero ahora se conoce que Ang II se produce localmente en varios tejidos, como en el cerebro, riñón, corazón y paredes de vasos sanguíneos y funciona como hormona paracrina y autocrina. Además de los efector clásicos del RAS, Ang II y otros péptidos metabolizados de esta y Ang I (Ang III, Ang IV y Ang(1-7)) mediante la acción de varias enzimas (APA, APB, APN, y ACE2), controlan el sistema de una forma diferente a la clásica.<sup>1</sup>

El RAS circulatorio se conoce por su acción reguladora de fluido, presión sanguínea y balance de electrolitos, mientras que el RAS local tiene efectos en los tejidos específicos que incluyen la proliferación, crecimiento y síntesis de proteínas.<sup>3</sup>

---

Aunado a eso, algunos estudios sugieren que existe un RAS intracelular, en células como neuronas y cardiomiocitos. De acuerdo con estos estudios, la Ang II puede entrar a la célula durante la internalización, mediante AT1R de membrana, o ser retenido en el compartimiento intracelular después de la síntesis. En el compartimiento intracelular, Ang II puede interactuar con receptores localizados sobre el núcleo, mitocondria y retículo endoplásmico.<sup>2</sup>

### **3.4 Sistema Renina Angiotensina y la obesidad**

El RAS y todos sus componentes se expresan también en el tejido adiposo blanco (TAB). La expresión local de angiotensinógeno en TAB incrementa después de la alimentación y disminuye con la inanición, a diferencia de la producción sistémica de RAS. Una dieta alta en grasas aumenta la expresión de angiotensinógeno en TAB, lo que representa de 20-30% del angiotensinógeno circulatorio en personas con obesidad, y es responsable por la hipertensión asociada a la obesidad. La disminución de angiotensinógeno suprime la acumulación de lípidos y la expresión del factor de transcripción adipogénico, por el contrario, la sobreexpresión de angiotensinógeno en TAB aumenta la adiposidad.<sup>2</sup>

### **3.5 Sistema Renina Angiotensina y Diabetes e hipertensión**

La Diabetes Mellitus (DM) es una condición crónica que se presenta cuando hay niveles elevados de glucosa en la sangre, esto es debido a que el cuerpo no puede producir suficiente o nada insulina, o incluso no puede usar la insulina existente de forma efectiva. La insulina es una hormona producida en el páncreas, y se encarga de transportar la glucosa del torrente sanguíneo a las células, donde es convertida en energía. La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a la insulina producen altos niveles de glucosa en la sangre o hiperglucemia. La hiperglucemia, puede causar daño a varios órganos del cuerpo, si no se controla en inicios de la enfermedad, lo que lleva a complicaciones de salud incapacitantes y potencialmente mortales, como enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía y

---

enfermedades oculares que conducen a la retinopatía y la ceguera.<sup>5</sup> Múltiples factores que incluyen hiperglucemia, triglicéridos elevados, presión arterial alta y adiposidad central, una condición clínica considerada como síndrome metabólico, resultan en enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.<sup>6</sup>

Las causas de la diabetes no se conocen por completo, pero existe una fuerte asociación con el sobrepeso y la obesidad. La diabetes se observa generalmente en adultos mayores, pero se presenta cada vez más en niños, adolescentes y adultos jóvenes debido a los crecientes niveles de obesidad, inactividad física y una mala alimentación.<sup>6,7</sup>

La hipertensión y diabetes son los factores de riesgo más comunes para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y generalmente se presentan juntos. Muchas vías activadas por Ang II se encuentran desreguladas en pacientes con diabetes, incluyendo estrés oxidativo<sup>8</sup> e inflamación.<sup>9</sup> El incremento en las especies reactivas de oxígeno desencadenada por la activación crónica de Ang II puede llevar a generar resistencia a la insulina<sup>10</sup> y dislipidemias, causando diabetes, además, puede generar un incremento en la retención de sodio contribuyendo a la hipertensión.<sup>11</sup> La activación crónica del RAS lleva a hipertensión y al deterioro de los sistemas renal y cardiovascular.<sup>12</sup>

### **3.6 Sistema Renina Angiotensina y Alzheimer**

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, resultado de la pérdida neuronal en áreas específicas del cerebro, cuyas causas no han sido determinadas y no cuenta con una forma de ser prevenida o curada hasta el momento.<sup>13</sup> Esta enfermedad se relaciona con la edad, ya que se presenta comúnmente en individuos mayores de 65 años.<sup>14</sup> El Alzheimer representa un problema de salud y económico mundial, ya que es la primera causa de demencia en adultos mayores y cada 4 segundos se diagnostica un caso nuevo.<sup>15</sup>



---

La enfermedad de Alzheimer se identifica por la presencia de dos tipos de elementos estructurales en el cerebro de los pacientes diagnosticados: se encuentran depósitos de proteínas  $\beta$  amiloide anormales,<sup>13,16</sup> (altamente insolubles, se localizan entre las células neuronales), nudos neurofibrilares (formados dentro del cuerpo celular de la neurona)<sup>17</sup> y presencia de hiperfosforilación de la proteína tau. Estos elementos se asocian al daño neuronal y pérdida sináptica progresivos, lo que conduce inicialmente a deterioros cognitivos y demencia (pérdida de memoria; disminución del lenguaje y en la capacidad de tomar decisiones; falta de atención y juicio; cambios en la conducta y personalidad), pero en etapas avanzadas, los pacientes pierden funciones motrices, por lo que se vuelve necesario la asistencia de otros para realizar tareas simples.<sup>18,19,20</sup>

Actualmente se han aprobado solo cuatro tratamientos para la enfermedad de Alzheimer, sin que haya un nuevo tratamiento eficaz en ensayos clínicos en más de 15 años.<sup>12</sup> Se ha demostrado un RAS en el cerebro, que trabaja independiente del resto de los órganos y que tiene todos los elementos del RAS.<sup>1</sup> Se ha descrito que la enfermedad cardiovascular disminuye el flujo de sangre cerebral, lo que lleva a estrés oxidativo y a su vez provoca neurodegeneración, por ello se ha demostrado que existe relación entre la enfermedad cardiovascular y Alzheimer.<sup>12</sup>

El RAS del cerebro que aún no se encuentra completamente explorado, pero su estudio abre la posibilidad de desarrollar fármacos específicos para dichas enfermedades.<sup>21</sup>

### **3.7 Simulación de membrana plasmática**

Las primeras detecciones de ACE fueron en su forma libre en plasma, sin embargo, menos del 10% de la cantidad total de ACE en el organismo es soluble, alrededor del 90% del ACE está distribuido en tejido, lo que sugiere que la mayor parte del ACE en humanos, se encuentra ligado a la membrana.<sup>22</sup>

---

Algunos estudios han reportado que existe diferencia entre la actividad de inhibidores de ACE que se evaluaron en tejido homogeneizado y tejido *ex vivo*, esto debido a que el proceso de homogeneización de tejido puede dañar la estructura de la membrana y alterar el estado de ACE, pasando de estar unida a la membrana a su estado libre. Lo anterior indica que la interacción entre ACE y sus inhibidores se ve afectada dependiendo de la interacción de la enzima con la membrana.<sup>22</sup>

La ACE presenta dos dominios catalíticos en su estructura, el dominio C y el dominio N. El primero, está más cerca de la membrana plasmática y es el que domina la regulación de la presión sanguínea y las funciones cardiovasculares.<sup>22</sup>

Una de las estrategias utilizadas para reducir la diferencia entre los resultados obtenidos en estudios *in vivo* e *in vitro*, es simular la membrana plasmática utilizando liposomas unidos a la proteína de interés, creando un ambiente celular sintético. Los liposomas presentan características estructurales similares a la membrana, pero están exentos de los factores ambientales complejos del organismo.<sup>22</sup>

### 3.8 Florescencia Molecular

La Fluorescencia Molecular (FM) es un fenómeno en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de fotones de cierta longitud de onda y posteriormente se relajan y emiten fotones a una longitud de onda distinta a la que fueron irradiados. El espectro de emisión que se obtiene de la excitación de las moléculas provee información cualitativa y cuantitativa del sistema de estudio. La medición de la intensidad de fluorescencia permite determinar cuantitativamente una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos en cantidades de trazas. Una de las características más atractivas de la fluorescencia es su sensibilidad, cuyos límites de detección se encuentran entre uno y tres órdenes de magnitud debajo de los métodos denominados espectroscopia de absorción.<sup>23</sup>

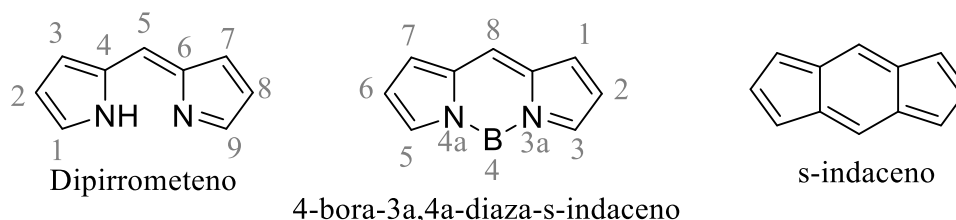
La FM es de gran utilidad en análisis médicos y biológicos ya que es una técnica analítica de alta sensibilidad y selectividad. Las sondas fluorescentes en combinación con la espectroscopia de fluorescencia, son una herramienta poderosa

para detectar en tiempo real moléculas transitorias, importantes en células y otros organismos vivos. Un aspecto importante para el diseño de sondas fluorescentes es que cuenten con sensibilidad de detección alta, para que así permitan obtener imágenes de las moléculas transitorias.<sup>24</sup>

Los tintes orgánicos han sido diseñados para exhibir longitudes de onda de excitación y emisión, compatibles con medios de observación biológicos. La adición de moléculas fluorescentes modifica las propiedades químicas y farmacológicas de la sonda fluorescente resultante, lo cual modifica su comportamiento celular.<sup>25</sup>

### 3.9 BODIPY

La abreviatura de BODIPY se refiere al difluoro boro dipirrometeno (por sus siglas en inglés), es una molécula fluorescente que juega un papel importante en aplicaciones tan variadas como: marcador en sondas biomoleculares *in vivo*<sup>26</sup>, fotosensibilizador en terapia fotodinámica<sup>27</sup>, en concentradores solares luminiscentes<sup>28</sup>, etc.<sup>29</sup>

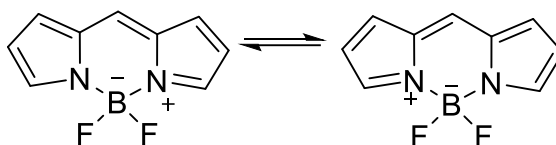


**Figura 2.** Estructura y numeración de anillos.

En la Figura 2 se puede observar la estructura y numeración según IUPAC para el dipirrometeno, boron dipirrometeno y s-indaceno. En el boron dipirrometeno, las posiciones numeradas como **3** y **5** son comúnmente llamadas  $\alpha$ , mientras que las posiciones numeradas como **1**, **2**, **6** y **7**, son llamadas posiciones  $\beta$ . La posición

numerada como **8**, es conocida como la posición meso, análogamente, estas son las mismas posiciones que se tienen para BODIPY.<sup>30</sup>

El BODIPY común tiene dos átomos de fluor unidos al boro, en la posición **4**; las posiciones **1-8** son sitios posibles para funcionalizar en alguna etapa de la síntesis. El BODIPY cuenta con **7** posibles estructuras resonantes, debido a la deslocalización de los electrones presente en los enlaces dobles, sin embargo, la carga negativa siempre permanece en el boro (Figura 3).<sup>31</sup>

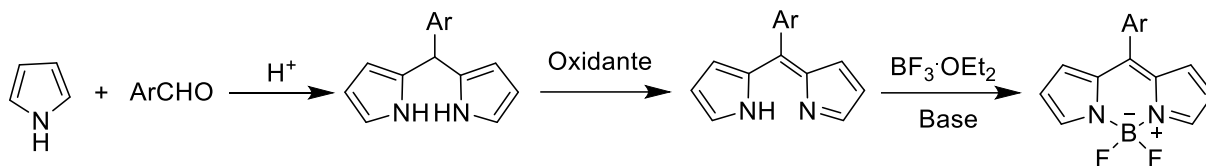


**Figura 3.** Representación de 2 de las 7 estructuras resonantes que presenta el BODIPY.

Están reportadas dos metodologías diferentes para obtener BODIPY, ambas adaptaciones de la química de porfirinas. El primer paso para la obtención del BODIPY, es la síntesis del dipirrometano.

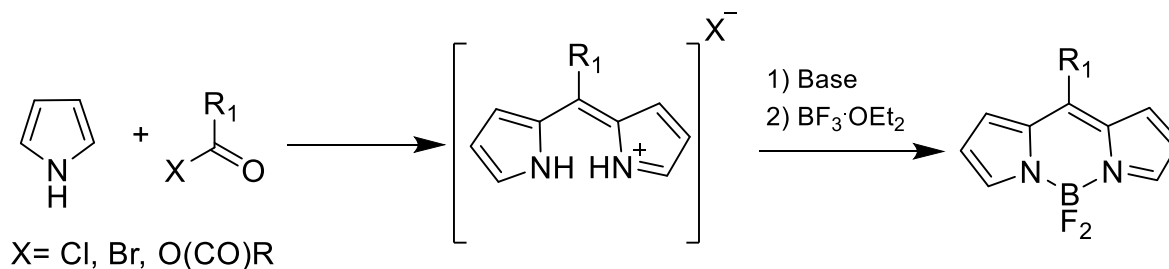
La primera metodología comienza con la condensación de pirrol con un aldehído aromático, mediante una catálisis ácida, para formar el dipirrometano. Los dipirrometanos generalmente son inestables y sensibles a la luz, agua y ácidos, por lo que es mejor usarlos inmediatamente después de ser preparados. La oxidación del dipirrometano, nos lleva a la formación del dipirrometeno. Debido a la dificultad de separar el dipirrometeno por cromatografía, regularmente se obtiene con bajos rendimientos. La reacción de dipirrometeno y  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  en presencia de un exceso de base, nos da como producto el BODIPY (Figura 4). Es posible hacer las reacciones en secuencia y purificar después de la obtención de cada producto o una reacción de un solo paso. A pesar de que la reacción en un solo paso es fácil, tiende a dejar rendimientos más bajos que la otra metodología. Para estas metodologías se pueden

usar pirroles sustituidos y no sustituidos. El uso de pirroles sustituidos da como resultado los BODIPYs sustituidos.<sup>31</sup>



**Figura 4.** Síntesis de BODIPY mediante la metodología de condensación de pirrol con un aldehído aromático.

En la segunda metodología se realiza una condensación catalizada por ácido de un pirrol que no está sustituido en la posición 2, para formar una sal. La sal se desprotona con una base y la fluoración se lleva a cabo con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  para obtener el BODIPY (Figura 5).<sup>31</sup>



**Figura 5.** Síntesis de BODIPY mediante la metodología de condensación de pirrol con un ácido.

Los BODIPY presentan características que los hacen especiales para la construcción de sensores moleculares: Coeficiente de extinción molar alto, rendimiento cuántico alto, estabilidad química y fotoquímica (en solución y en estado sólido), bandas de absorción y emisión agudas en los espectros de fluorescencia y propiedades de transferencia de electrón importantes.<sup>32</sup> Además, exhibe sensibilidad a la polaridad de los solventes y pH, buena solubilidad y estabilidad térmica alta.<sup>33</sup>

---

### 3.10 Bioconjugados

Los bioconjugados son la unión de dos o más moléculas entre sí, generalmente por un enlace covalente, para crear un complejo formado por las moléculas ligadas, de las cuales, al menos alguna es de origen biológico, o es un fragmento o derivado de una biomolécula. La síntesis de bioconjugados ha llevado a obtener nuevas biomoléculas, la elucidación de procesos biológicos complejos, además del crecimiento de la industria médica, el diagnóstico, ciencias de la vida y ciencia de materiales.<sup>34</sup> La creación de bioconjugados a partir de moléculas individuales para formar nuevas moléculas que tengan las propiedades combinadas de cada sustituyente de los que están hechas, resulta en la construcción de estructuras que tienen características no naturales para esas sustancias.<sup>35</sup> La mayoría de los procesos biológicos mediados por péptidos, no se entienden por completo, debido a eso es importante utilizar herramientas, como la formación de bioconjugados para realizar el estudio y elucidación de los mecanismos de acción.<sup>36</sup>

La modificación de péptidos y proteínas es un método utilizado para introducir propiedades artificiales a la molécula, permitiendo el desarrollo de nuevos bioconjugados, que son usados en bioimagen, diagnóstico médico y como fármacos.<sup>37</sup>

La mayoría de las modificaciones se lleva a cabo en las cadenas laterales, debido a que las modificaciones de la cadena principal pueden afectar la conformación, solubilidad, agregación y, por lo tanto, la actividad biológica del péptido, por esa razón, el N-terminal es un grupo atractivo para la modificación química debido a su accesibilidad y que es un grupo presente en todas las proteínas.<sup>38</sup> Además, el N-terminal no suele involucrarse en el plegamiento de las proteínas, por lo que es probable que la modificación en el aminoácido terminal no afectará en su actividad biológica. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amina del N-terminal tiene un  $pK_a$  más bajo que la  $\epsilon$ -amina de la cadena lateral de lys, por lo que se puede esperar que bajo las condiciones apropiadas, los reactivos se unen específicamente a las aminas N-terminales.<sup>37</sup>

### 3.11 Hipótesis

El BODIPY se puede unir a los péptidos angiotensina (Ang I, Ang II, Ang III y Ang IV) para la formación de bioconjugados fluorescentes, que facilitarán el estudio de sistemas biológicos.

---

## IV. EXPERIMENTAL

### 4.1 Generalidades

El desarrollo de la parte experimental se realizó en el laboratorio de Síntesis Orgánica en Fase Sólida, del Centro de Graduados e Investigación en Química, del Instituto Tecnológico de Tijuana.

Las reacciones llevadas a cabo con compuestos sensibles a la humedad u oxígeno, fueron efectuadas en atmósfera inerte (argón). La cristalería empleada fue lavada con agua destilada y secada en la estufa antes de ser usados.

### 4.2 Secado de disolventes

Los disolventes empleados en cromatografía, extracciones y en las reacciones que no fueron sensibles a humedad, se adquirieron con grado de alta pureza y se utilizaron sin purificación previa. En las reacciones sensibles a la humedad u oxígeno, fue necesario secar los disolventes antes de ser utilizados.

Al éter etílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) se le agregó sodio metálico como deshidratante y benzofenona como indicador, dejando agitar vigorosamente en atmósfera de argón. El  $\text{Et}_2\text{O}$  se destiló antes de ser utilizado en la reacción.

El diclorometano (DCM) se secó con pentóxido de fosforo, agitando vigorosamente en atmósfera de argón, para su posterior destilación.

### 4.3 Técnicas analíticas

Los espectros de RMN presentados fueron adquiridos con un equipo Varian de 200 MHz modelo Mercury. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) están expresados en partes por millón (ppm) y fueron medidos relativos a la señal de tetrametilsilano (TMS) en solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  a menos que se indique lo contrario). En la parte superior de los espectros se muestra el desplazamiento químico de las señales, mientras que en la parte inferior se muestra su área bajo la curva.



Los espectros de IR fueron adquiridos con un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer FT-IR-ATR 1605.

Los espectros de UV-Vis se obtuvieron con un espectrofotómetro de UV-Vis, Varian, Cary 50 Scan.

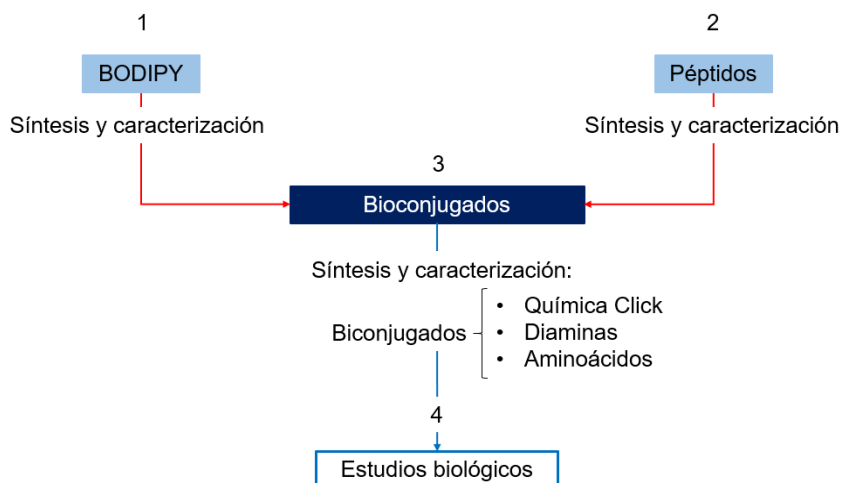
Los estudios de FM se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia, Varian, Cary Eclipse.

#### **4.4 Cromatografía**

La cromatografía de capa fina se realizó con placas de gel de sílice 60 sobre soporte de aluminio, con indicador  $F_{254}$ , siendo reveladas por exposición a la luz UV. Las purificaciones por cromatografía de columna se realizaron utilizando gel de sílice 60 como fase estacionaria, 230-240 mesh, con diferentes solventes como fase móvil, según la polaridad de la molécula a purificar.

#### 4.5 Metodología general para la síntesis de bioconjugados

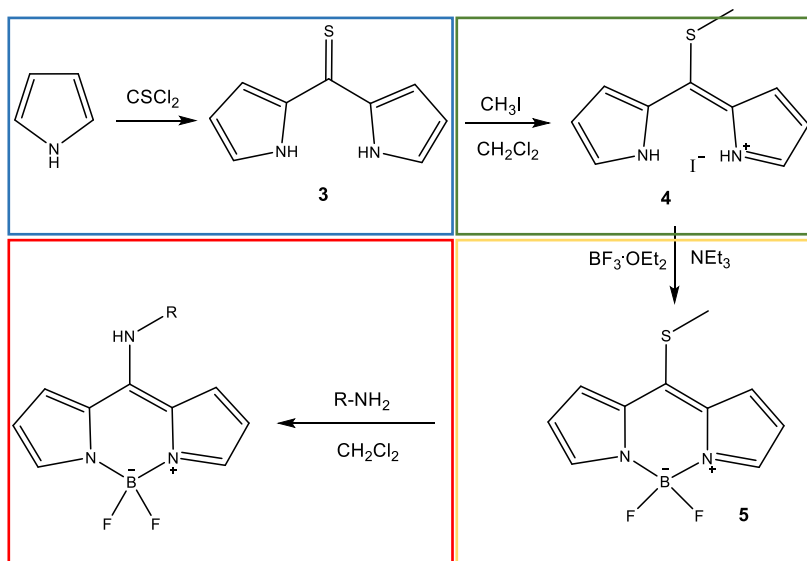
El trabajo experimental del proyecto se llevó a cabo en cuatro etapas (Esquema 1). En la primera etapa se realizó la síntesis y caracterización de los derivados de BODIPY. La segunda etapa constó de la síntesis y caracterización de los péptidos (ang I, II, III, IV). En la tercera etapa se llevó a cabo la síntesis y caracterización de los bioconjugados propuestos. En la cuarta etapa se realizaron los estudios biológicos.



**Esquema 1.** Etapas del trabajo experimental.

#### 4.6 Etapa 1: Síntesis de BODIPY

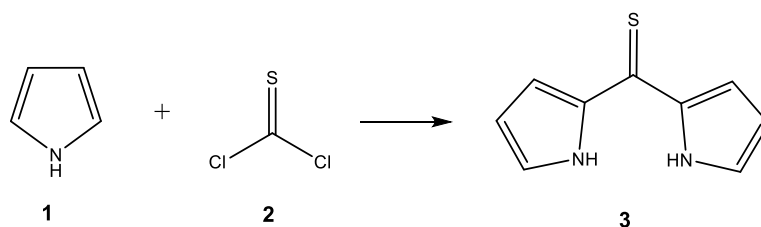
Los diferentes derivados de BODIPY se obtuvieron mediante una ruta de síntesis en cuatro pasos, la cual se puede observar en la Figura 6. Primero, se llevó a cabo la síntesis de la tiocetona (**3**) que forma el esqueleto del BODIPY (azul). Después, se realizó la metilación de la molécula **3**, que dio lugar a la molécula **4** (verde). Posteriormente (amarillo), la molécula **4** se acomplejó con trifluoruro de boro eterato de dietilo ( $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ ), para formar el BODIPY S metilo (**5**). Finalmente (rojo), se sustituyeron las aminas en la posición meso para crear la unión con el péptido deseado.



**Figura 6.** Representación de la síntesis de BODIPY amino en cuatro pasos.

#### 4.6.1 Síntesis de di(1*H*-pirrol-2-il)metanotiona (3)

En un baño de hielo, se montó un matríz bola, al cual se agregó una solución de pirrol (1) (670 mg, 10.0 mmol, 2.1 eq.) en Et<sub>2</sub>O seco (15 mL), posteriormente, se adicionó gota a gota una solución de tiofosgeno (2) (550 mg, 4.8 mmol, 1 eq.) en tolueno seco (13 mL). La mezcla de soluciones se dejó en agitación vigorosa por 10 min. Posteriormente, se agregó una solución al 10% de metanol-agua (12 mL) y se dejó agitar por 30 min a temperatura ambiente. Los solventes fueron removidos a presión reducida. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna, con alúmina neutra como fase estacionaria y con una mezcla de éter de petróleo/DCM (9:1) como fase móvil. El solvente se removió a presión reducida, para obtener como producto puro la tiocetona (3), un sólido naranja-rojizo (Esquema 2) con un rendimiento del 65%.

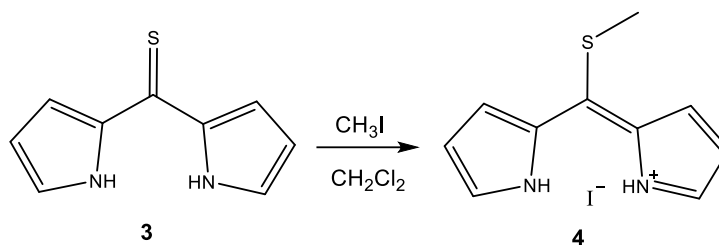


#### Esquema 2. Metodología de síntesis del di (1*H*-pirrol-2-il) metanotiona (3)

Sólido rojo-naranja. 549 mg, 65%; **P.f.:** 92-94 °C; **FTIR (ATR):** 3399 (N-H), 3341 (N-H), 1062 (C=S) cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)** δ 9.78 (sa), 7.17 (d, 2H), 7.03 (t, 2H), 6.38 (dd, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ 193.1 (C), 138.3 (C), 127.7 (CH), 115.8 (CH), 112.5 (CH); **EM (e/m):** 176.24 uma.

#### 4.6.2 Síntesis de 2-((metiltio)-(1*H*-pirrol-2-il)metileno)-2*H*-pirrol-1-io yoduro (**4**)

En un matraz bola, se agregó una solución de la tiocetona **3** (300 mg, 1.68 mmol, 1 eq.) en DCM seco (5 mL), posteriormente, a la solución se agregó yoduro de metilo (1192 mg, 8.4 mmol, 5 eq.). La mezcla de reacción se agitó por 24 h. El solvente se removió a presión reducida para obtener el dipirrometeno *S*-metilo (**4**), como un sólido viscoso rojo oscuro (Esquema 3). El compuesto **4** se usó sin ninguna purificación para la siguiente etapa.

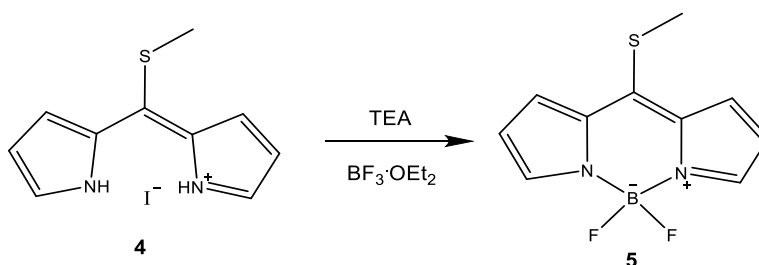


**Esquema 3.** Metodología de síntesis de 2-((metiltio)-(1*H*-pirrol-2-il)metileno)-2*H*-pirrol-1-io yoduro (**4**)

Sólido viscoso rojo oscuro; **Rendimiento:** (319 mg, 99%); **IR(ATR):** 3105 (C-H), 2930 (C-H), 1519 (C=N), 1311 (C-N), 1051 (B-F), 787 (C-S), 747 (B-N)  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):**  $\delta$  11.99 (sa), 7.92 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 6.67 (m, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):**  $\delta$  159.0 (C), 135.0 (CH), 125.7 (C), 125.1 (CH), 112.9 (CH), 18.0 (CH<sub>3</sub>); **EM (e/m):** 190.06 uma.

### 4.6.3 Síntesis de 8-tiometil-4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno (5)

En un matraz bola, se agregó una solución del compuesto **4** (300 mg, 1.56 mmol, 1.07 eq.) en DCM seco (21 mL), a continuación, se agregó TEA (160 mg, 1.57 mmol, 1.08 eq.). El sistema se aisló en atmósfera inerte y se agitó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (207 mg, 1.46 mmol, 1 eq.) y se dejó en agitación por 30 min. El disolvente se removió a presión reducida y el BODIPY S-metilo (**5**) se purificó por cromatografía en sílica gel, con 15% de AcOEt en éter de petróleo, para obtener un sólido rojo (Esquema 4).

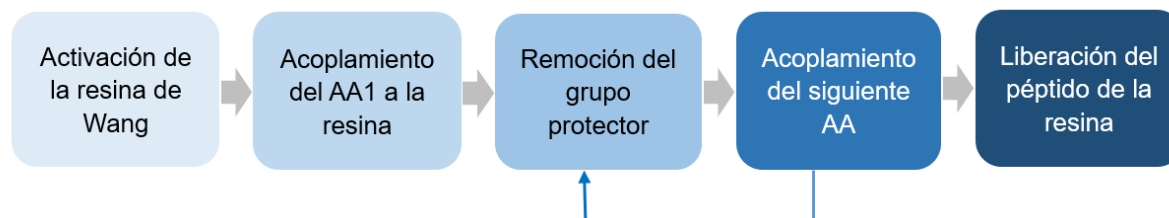


**Esquema 4.** Metodología de síntesis del BODIPY **5**

Sólido rojo; **Rendimiento:** (1008 mg, 16%); **P.f.:** 88-90 °C; **IR(ATR):** 3105 (C-H), 2930 (C-H), 1519 (C=N), 1311 (C-N), 1051 (B-F), 787 (C-S), 747 (B-N)  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):**  $\delta$  7.90-7.92 (t, 2H), 7.24-7.28 (m, 2H), 6.66-6.69 (dd, 2H), 2.92 (s, 3H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):**  $\delta$  154.0 (C), 141.1 (CH), 133.4 (CH), 127.5 (C), 117.6 (CH), 20.3 (CH<sub>3</sub>); **EM (e/m):** 238.7 uma.

#### 4.7 Etapa 2: Síntesis de péptidos

A continuación, se describen los pasos generales para llevar a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida, en el Esquema 5 se ilustra el flujo que sigue dicha síntesis.



**Esquema 5.** Diagrama representativo del flujo de la síntesis de péptidos.

*Activación de la resina de Wang:* En un frasco de plástico cubierto de la luz, se agregó 50 mg de resina de Wang (Ps) en dimetilformamida (DMF) (15 mL). Se dejaron en agitación por 12 h a temperatura ambiente. Después, la resina se filtró y se le realizaron lavados con DMF (15 mL x 2), MeOH (15 mL x 2) y DCM (15 mL x 2), posteriormente se dejó secar a presión reducida por 1 h.

*Acoplamiento del primer AA a la resina de Wang:* A los 50 mg de Ps, previamente lavados, se le agregó DMF (15 mL) y una solución de AA1-Fmoc, HOBt•H<sub>2</sub>O, DMAP y DIC (10 mL, 5 eq.) en DMF. La mezcla de reacción se agitó por 12 h a temperatura ambiente, después se dejó secar a presión reducida. El mismo protocolo de unión con AA1-Fmoc se realizó dos veces para obtener Ps-AA1-Fmoc. Después de realizar el doble protocolo, la resina se lavó con DMF (15 mL x 3) y se secó por 1 h bajo presión reducida.

*Remoción del grupo protector:* A una suspensión de Ps-AA1-Fmoc en DMF (15 mL) se le agregó una solución de piperidina al 20% en DMF (15 mL). Se realizaron lavados con DMF (15 mL x 2), MeOH (15 mL x 2) y DCM (15 mL x 2), para finalmente obtener Ps-AA1.

*Método general de acoplamiento de aminoácidos protegidos:* A la Ps-AA1, se le agregó DMF (15 mL) y una solución de HOBt•H<sub>2</sub>O, DMAP, DIC y AA-Fmoc (diferente

---

AA según el ciclo y péptido, 10 mL, 5 eq.), se dejó en agitación por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se filtró la solución y se dejó a presión reducida por 15 min. Se realizó doble protocolo de acoplamiento para cada AA. Se realizaron lavados con DMF (15 mL x 3) y se dejó secar por 15 minutos más a presión reducida. Este proceso se realizó sucesivamente hasta obtener el péptido con la secuencia de AA deseada (Ps-péptido-Fmoc). La desprotección del Ps-péptido-Fmoc se realiza con la metodología descrita anteriormente, para obtener el péptido unido a la resina de Wang (Ps-péptido).

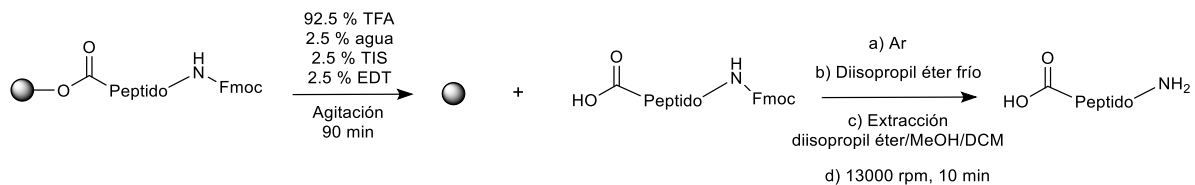
Una vez obtenida la secuencia peptídica deseada, se pueden unir a esta una variedad amplia de moléculas (que contengan un carboxilo terminal) en los grupos amino primarios de los AA. Regularmente se busca unir moléculas que agreguen una propiedad extra al péptido, la cual sirve para potenciar sus efectos terapéuticos, inmovilizar los péptidos o facilitar su estudio. Si es necesario agregar moléculas a la secuencia peptídica, estas se unen utilizando condiciones, reactivos y solventes compatibles con síntesis en fase sólida cuando el péptido aun esta unido a la resina de Wang.

*Liberación del péptido de la resina:* La reacción de liberación vía TFA genera carbocationes que son intermediarios altamente reactivos. Estos carbocationes reaccionan específicamente con las cadenas laterales de tirosina, triptófano, metionina y cisteína (ricos en electrones), generando productos no deseados. Por ello, en el proceso de liberación, se agregan especies nucleofílicas, como tioanisol (metil fenil sulfuro) y 1,2-etanoditiol (EDT).<sup>39</sup>

La remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales y la liberación del péptido de la resina se llevó a cabo en una sola reacción.<sup>40</sup> A la resina se le agregó 10 mL de una solución 92.5 % TFA, 2.5 % agua, 2.5 % TIS y 2.5 % EDT. La mezcla se dejó reaccionar en agitación constante por 90 min. Una vez que la reacción se ha completado, se burbujeó gas argón en la solución para evaporar la mayor cantidad de solvente posible.<sup>39</sup> El péptido liberado se lavó con diisopropil éter frío, MeOH y DCM y se centrifugó entre cada lavado por 10 minutos a 13000 rpm.



Después de centrifugar, se separó el precipitado y se dejó secar a temperatura ambiente. Se obtuvo el producto como un sólido blanco lechoso (Esquema 6). La secuencia de los péptidos fue confirmada por EM.<sup>41</sup>

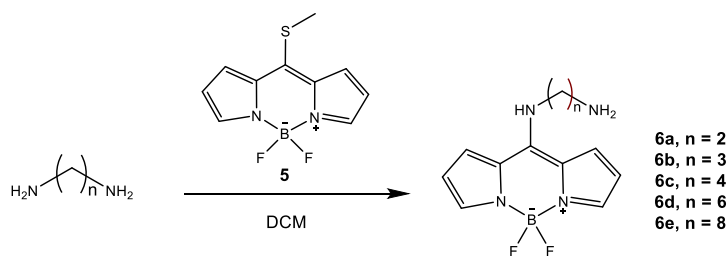


**Esquema 6.** Metodología de liberación del péptido de la resina de Wang.

## 4.8 Etapa 3: Síntesis de bioconjugados

### 4.8.1 Síntesis de BODIPY amino (6a-6e)

En un matraz bola, se preparó una solución de diamina en DCM (15 mL): 1,2-etanodiamina (EDA) (13 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), 1,3-propildiamina (PDA) (16 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), 1,4-butanodiamina (BDA) (19 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), 1,6-hexanodiamina (HDA) (25 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) o 1,8-octanodiamina (ODA) (31 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), según el espaciador de interés. A continuación, se agregó gota a gota una solución del compuesto **5** (50 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) en DCM seco (15 mL). Se dejó en agitación por 12 h (EDA, PDA y BDA) o por 24 h (HDA y ODA). El disolvente se evaporó a presión reducida y todos los productos de reacción se purificaron por cromatografía en columna con sílica gel y DCM, para obtener los BODIPY amino **6a**, **6b**, **6c**, **6d** y **6e**, respectivamente, como un sólido amarillo mostaza (Esquema 7).



**Esquema 7.** Metodología de síntesis de los BODIPY amino (6a-6e).

BODIPY amino **6a**: Sólido amarillo mostaza; **Rendimiento**: (363 mg, 75%); **IR(ATR)**: 3322 (NH<sub>2</sub>), 2956 (C-H), 1641 (C=N), 1016 (B-F) cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 7.43-7.27 (d, 2H), 7.20 (s, 2H), 6.48-6.28 (d, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.76 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.5 (s, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 149.3 (C), 130.0 (CH), 124.3 (CH), 114.4 (C), 112.18 (CH), 50.2 (CH<sub>2</sub>), 48.5 (CH<sub>2</sub>).

BODIPY amino **6b**: Sólido amarillo mostaza; **IR(ATR)**: 3366 (NH<sub>2</sub>), 3248 (N-H), 1585 (C=N), 1550 (C=C), 1333 (C-N), 1065 (B-F), 791 (B-N) cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 11.7 (sa, 1H), 7.40-7.07 (dd, 2H), 7.06-7.05 (m, 2H), 6.45-6.22 (m, 2H), 3.94-3.82 (dt, 2H), 2.51-2.49 (m, 2H), 1.93-1.87 (M, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 148.8 (C), 130.9 (CH), 124.8 (CH), 115.9 (C), 110.3 (CH), 48.5 (CH<sub>2</sub>), 47.6 (CH<sub>2</sub>), 29.38 (CH<sub>2</sub>).

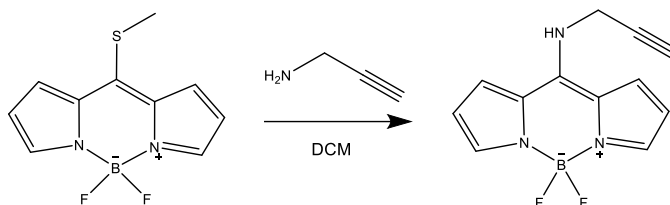
BODIPY amino **6c**: Sólido amarillo mostaza; **IR(ATR)**: 3367 (NH<sub>2</sub>), 2936 (C-H), 1592 (C=N), 1555 (C=C) 1340 (C-N), 1092 (B-F), 753 (B-N) cm<sup>-1</sup>.

BODIPY amino **6d**: Sólido amarillo mostaza; **Rendimiento**: (30 mg, 47%)

BODIPY amino **6e**: Sólido amarillo mostaza; **Rendimiento**: (42 mg, 59%)

#### 4.8.2 Síntesis de BODIPY Propargilo (6f)

A una solución del compuesto **5** (582 mg, 2.45 mmol, 1 eq.) en DCM (50 mL), se le agregó propargilamina (405 mg, 7.35 mmol, 3 eq.), la mezcla se dejó en agitación por 12 h, para obtener el BODIPY-propargilo (**6f**). El solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó en sílica gel, con AcOEt en éter de petróleo al 20%, el compuesto **6f** se obtuvo como un sólido amarillo mostaza (Esquema 8).

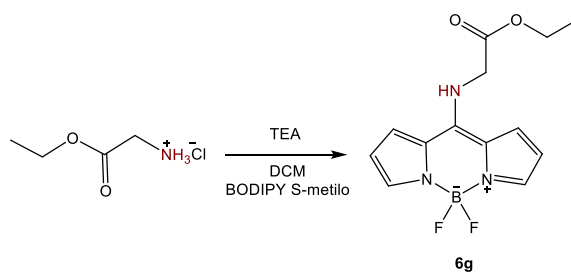


**Esquema 8.** Metodología de síntesis del BODIPY **6f**.

Sólido amarillo mostaza; **Rendimiento:** (525 mg, 87%); **P.f.:** 156-158 °C; **IR(ATR):** 3365 (C≡CH), 3285 (NH), 2126 (C≡C), 1591 (C=N), 1552 (C=C), 1370 (C-N), 1063 (B-F), 730 (B-N); **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ 9.72 (sa), 7.68-7.63 (d, 2H), 7.07-7.11 (d, 2H), 6.46-6.50 (t, 2H), 4.48-4.42 (dd, 2H), 2.54 (t, 1H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ 153.7 (C), 140.3 (CH), 137.0 (CH), 129.6 (C), 121.5 (C), 118.5 (CH), 83.3(C), 82.13 (C), 400 (CH<sub>2</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** δ -145.62 , -145.77 , -145.92 , -146.07; **EM (e/m):** 245.04 uma.

### 4.8.3 Síntesis de BODIPY Glicina (7a)

En un vial se mezcló clorhidrato de glicina etil éster (30 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) con TEA (21 mg, 0.21 mmol, 1 eq.), posteriormente, la mezcla se disolvió en DCM (4 mL) y se agregó el compuesto **5** (50 mg, 0.21 mmol, 1 eq.). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por 12 h, después de ese tiempo el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de sílica con DCM, para obtener un sólido amarillo pálido (Esquema 9).

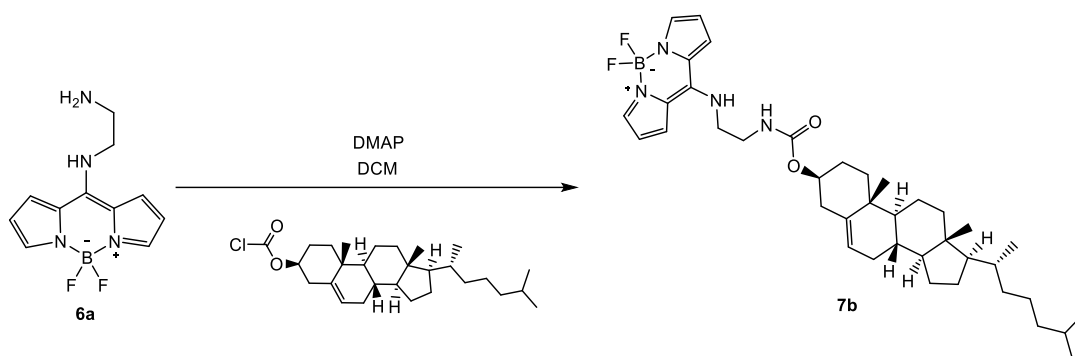


Esquema 9. Metodología de síntesis del BODIPY **6g**.

Sólido amarillo pálido; **IR(ATR):** 3218 (NH), 2988 (C-H), 1750 (C=O), 1344 (C-N), 1040 (B-F), 755 (B-N)  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):**  $\delta$  9.96 (sa, 1H), 7.62 (s, 2H), 7.48-7.43 (m, 2H), 6.56-6.44 (m, 2H), 4.24-4.19 (m, 2H), 4.12-4.07 (m, 1H), 1.23-1.15 (m, 6H); **RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):**  $\delta$  168.3 (C), 149.3 (C), 130.9 (CH), 124.8 (CH), 115.8 (C) 110.3 (CH), 62.0 ( $\text{CH}_2$ ), 47.8 (CH), 14.5 ( $2\text{CH}_2$ ).

#### 4.8.4 Síntesis de BODIPY Colesterol (7b)

En un matraz bola se agregó el compuesto **6a** (106 mg, 0.42 mmol, 1 eq.), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (55 mg, 0.44 mmol, 1.05 eq.) y DCM seco (15 mL). La suspensión se aisló en atmósfera de argón y se dejó en agitación por 5 min. Posteriormente, se dejó enfriar en un baño de hielo por 20 min. A parte, se preparó una solución de colesteril cloroformato en DCM (15 mL), esta solución se agregó gota a gota a la solución del compuesto **6a**. La mezcla se dejó en agitación vigorosa por 6 h a temperatura ambiente. Al crudo de reacción se le agregaron 50 mL de agua saturada con NH<sub>4</sub>Cl y se lavó con DCM (2 x 50 mL). Se separaron las fases y se evaporó el solvente en la fase orgánica. El BODIPY colesterol (**7**) se separó con alúmina neutra y DCM por cromatografía en columna, para obtener el producto puro como un sólido amarillo pálido (Esquema 10).



**Esquema 10.** Metodología de síntesis del BODIPY Colesterol (**7b**).

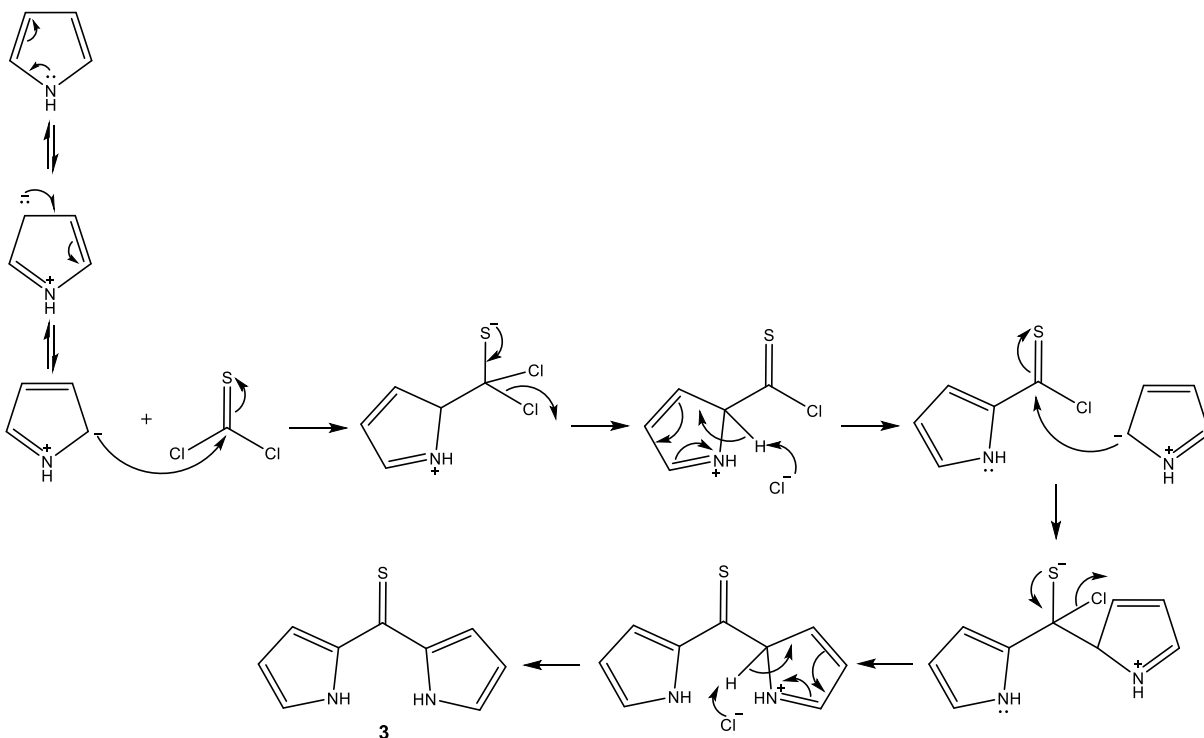
Sólido amarillo pálido; **Rendimiento:** (159 mg, 57%).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización estructural de los compuestos fluorescentes

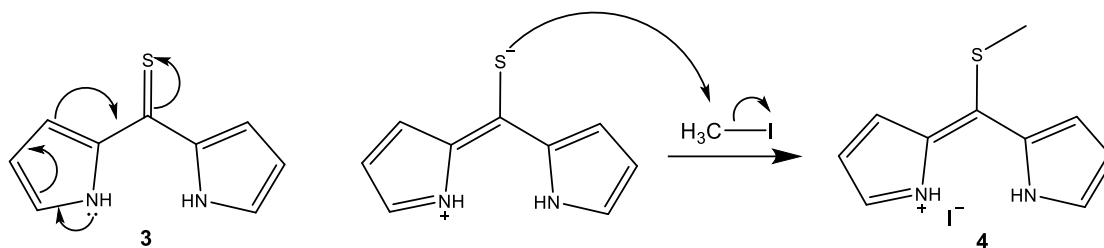
La síntesis del BODIPY se realizó según la metodología reportada por Goud y colaboradores, en la cual, a partir de pirrol, tiofosgeno y trifluoroborato, sintetizan un BODIPY con la capacidad de modificarse para acoplar un grupo amino;<sup>42</sup> para su posterior incorporación a los biconjugados propuestos.

La molécula **3** se forma por medio de la condensación de pirrol con tiofosgeno. Una de las estructuras resonantes contribuye con la carga negativa en la posición 2 o 5, siendo esta carga la que reacciona con el carbono del tiofosgeno para finalmente obtener la tiocetona (Esquema 11).



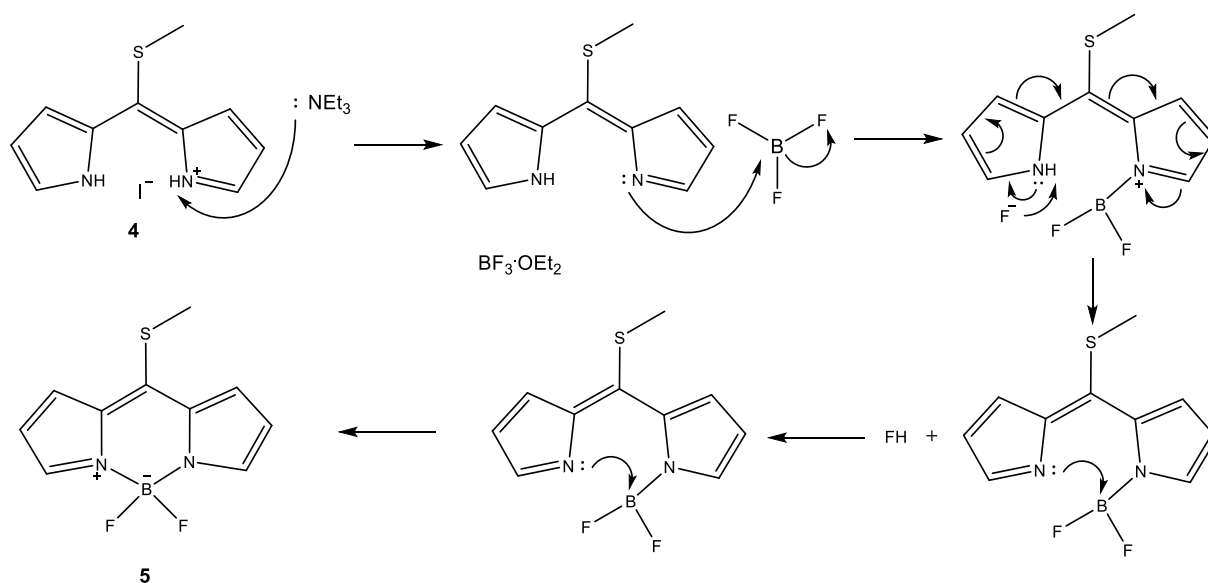
Esquema 11. Mecanismo de reacción de la tiocetona (3).

Una de las estructuras resonantes del compuesto **3**, contribuye con la carga negativa en el azufre para reaccionar con el carbono del yoduro de metilo, desplazando al yodo y formando el dipirrometeno S-metilo (**4**), como se muestra en el Esquema 12.



**Esquema 12.** Mecanismo de reacción del dipirrometeno S-metilo (**4**).

Posteriormente, a la solución de dipirrometeno S-metilo se agregó TEA como base, seguido por  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , el cual permitió acomplejar la molécula con boro (Esquema 13).

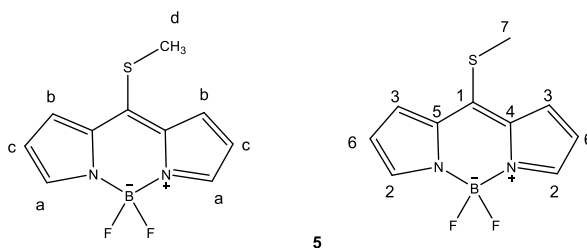


**Esquema 13.** Mecanismo de reacción del BOPIPY.



## 5.2 BODIPY S-metilo (5)

En la Figura 7 se enumeraron los protones y carbonos para la asignación de señales encontradas en la caracterización por RMN para el compuesto **5**. Las señales del compuesto **5**, encontradas en RMN se muestran en la Tabla 1.



**Figura 7.** Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto **5**.

**Tabla 1.** Señales compuesto **5** en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
Señal	δ ppm	Señal	δ ppm
a	7.92-7.90 (t, 2H),	1	154 (C)
b	7.28-7.24 (m, 2H),	2	141.1 (CH)
c	6.69-6.66 (dd, 2H),	3	133.4 (CH)
d	2.92 (s, 3H)	4	127.5 (C)
		5	117.6 (CH)
		6a,b	20.3 (CH <sub>3</sub> )

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se encontró una señal a 7.92-7.90 ppm que forma de triplete correspondiente a los hidrógenos **a**; a 7.28-7.24 ppm, se mostró un multiplete asignado a los hidrógenos **b**; se pudo observar a 6.69-6.66 ppm un triplete que corresponde a los hidrógenos **c** del dipirrometeno; por último, a 2.92 se observó un singlete, asignado a los tres protones **d**.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observó una señal a 154 ppm correspondiente al carbono cuaternario en la posición meso (**1**); la señal de los carbonos terciarios **2** se encontró a 141.1 ppm, mientras que la señal de los carbonos **3** se encontró a 133.7 ppm. Los carbonos **4** y **5** mostraron una señal a 127.5 ppm; la señal de los carbonos terciarios **6** se observó a 117.6 ppm; por último, a 20.3 ppm se encontró la señal para el carbono primario unido a azufre (**7**).

**Tabla 2.** Señales del compuesto **5** en IR.

IR BODIPY S-metilo ( <b>5</b> )	
Señal	cm <sup>-1</sup>
C-H estiramiento vinílico	3105
C-H estiramiento alifático	2930
C=C	1519
C-N tensión	1311
B-F estiramiento	1051
C-S	787
B-N vibración	747

En el espectro de IR del compuesto **5** se pudo observar a 3105 cm<sup>-1</sup> las señales de estiramiento de carbono-hidrógeno vinílicos, a 2930 cm<sup>-1</sup> se encontraron la señal de estiramiento de los carbono-hidrógeno alifáticos, la señal correspondiente al doble enlace carbono-carbono apareció en 1519 cm<sup>-1</sup>, en 1311 cm<sup>-1</sup> se observó la señal de tensión del enlace carbono-nitrógeno, en 1051 cm<sup>-1</sup> se presentó la señal de estiramiento del enlace boro-fluor,<sup>43</sup> la señal del enlace carbono-azufre apareció en 787 cm<sup>-1</sup> y en 747 cm<sup>-1</sup> la señal de vibración del enlace boro-nitrógeno,<sup>43</sup> estos últimos, característicos de la complejación del dipirrometeno con boro. Las señales del compuesto **5**, encontradas en IR se muestran en la Tabla 2.

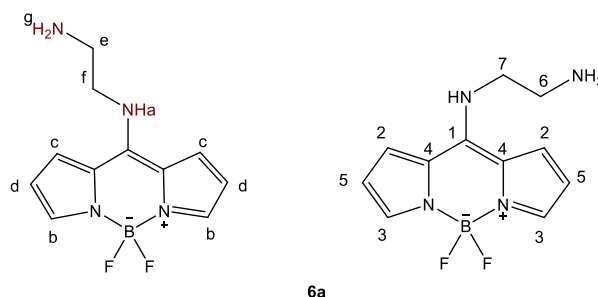
La formación de los bioconjugados, se denota por la incorporación de las señales de los sustituyentes a las señales anteriormente mencionadas para el BODIPY-S metilo, así como la desaparición de las señales del metilo, por lo que solo se describirán dichos cambios en los espectros de las caracterizaciones de los bioconjugados.

### 5.3 Caracterización estructural de los biconjugados

Se realizó la sustitución del compuesto **5** con cinco diferentes diaminas alifáticas, propargilamina, glicina esterificada, tris amina y un derivado de colesterol. Esto para obtener la base de diferentes bioconjugados de dos brazos. De dichas sustituciones se obtuvieron los BODIPY amino **6a-e**, BODIPY propargilo (**6f**), BODIPY glicina (**6g**) y BODIPY colesterol (**7**).

#### 5.3.1 BODIPY-amino (**6a**)

En la Figura 8 se enumeran los protones y carbonos, para la asignación de señales encontradas en la caracterización por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , del compuesto **6a**. Las señales del compuesto **6a**, encontradas en RMN se muestran en la Tabla 3.



**Figura 8.** Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura de BODIPY amino **6a**.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , se observaron las señales características de los protones unidos al anillo de BODIPY, entre 7.43 y 6.28 ppm. En 4.18 ppm se observó un singulete, asignado a los protones del carbono unido a la amina primaria de la molécula (**e**); en 3.76 ppm se encontró un multiplete que se asigna a los protones del carbono unido a la amina secundaria (**f**); por último, a 3.04 ppm se encuentra un multiplete que integra para los protones **g** unidos a nitrógeno de la amina terminal.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se pudo observar las señales características para los carbonos del anillo en el BODIPY, entre 149.4 ppm y 112.2 ppm; la señal para el carbono **6** unido a la amina primaria se encontró a 50.3 ppm; por último, en 48.5 ppm se encuentra la señal asignada al carbono **7**.

**Tabla 3.** Señales de BODIPY amino **6a** en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
Señal	δ ppm	Señal	δ ppm
b	7.43-7.27 (d, 2H)	1	149.4 (C)
c	7.20 (s, 2H)	2	130.9 (CH)
d	6.48-6.28 (d, 2H),	3	124.3 (CH)
e	4.18 (s, 2H)	4	114.4 (C)
f	3.76 (m, 2H)	5	112.2 (CH)
g	3.04 (m, 2H)	6	50.3 (CH <sub>2</sub> )
		7	48.5 (CH <sub>2</sub> )

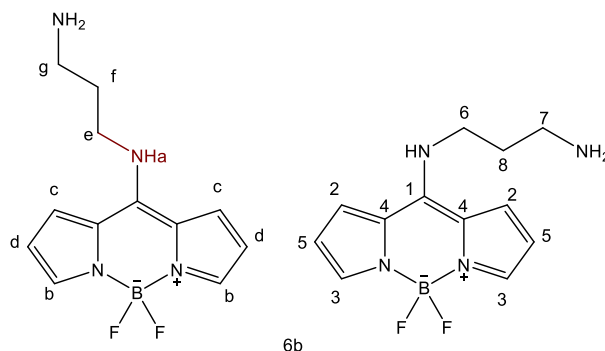
En el espectro de IR del compuesto **6a** se puede observar a 3322 cm<sup>-1</sup> la señal de estiramiento de nitrógeno-hidrógeno de una amina primaria, siendo dicha señal la determinante para denotar la formación del producto. El resto de las señales del BODIPY **6a**, encontradas en el espectro de IR se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Señales de BODIPY **6a** en IR.

IR BODIPY amino <b>6a</b>	
Señal	cm <sup>-1</sup>
NH <sub>2</sub> estiramiento	3322
C-H estiramiento alifático	2956
C=N	1641
B-F Estiramiento	1016

### 5.3.2 Caracterización estructural de BODIPY-amino (6b)

En la Figura 9 se enumeran los protones y carbonos para la asignación de señales encontradas para el compuesto **6b**.



**Figura 9.** Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura de BODIPY amino **6b**.

**Tabla 5.** Señales del compuesto **6b** en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
Señal	δ ppm (J = Hz)	Señal	δ ppm
a	11.36 (sa, 1H)	1	148.8 (C)
b	7.40-7.15 (dd, 2H)	2	130.9 (CH)
c	7.08-7.05 (m, 2H)	3	124.8 (CH)
d	6.45-6.22 (m, 2H),	4	115.9 (C)
e	3.94-3.82 (d, 2H)	5	110.3 (CH)
f	12.51-12.49 (t, 2H)	6	48.5 (CH <sub>2</sub> )
g	1.93-1.87 (m, 2H)	7	47.6 (CH <sub>2</sub> )
		8	29.4 (CH <sub>2</sub> )

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H; se puede observar una señal ancha a 11.36 ppm, correspondiente al protón **a**; entre 7.40 ppm y 6.22 se presentaron las señales de los protones unidos al anillo del BODIPY. La formación de la molécula propuesta se denota por la aparición de la señal en 3.94-3.82 ppm, un doblete que se asignó a los protones (**e**) del carbono unido a la amina secundaria; mientras que para los protones (**f**) unidos al carbono del centro en la cadena, se encontró una señal triple entre 2.51-2.49 ppm; por último, en 1.93-1.87 se encontró una señal triple que se asoció a los protones (**g**) unidos a la amina primaria terminal, los últimos tres, asociados a la cadena alifática de la molécula. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se pudo observar las señales de los carbonos **1-5** entre 148.8 ppm y 110.3 ppm, correspondientes al anillo de BODIPY; a 48.5 ppm se encuentra la señal para el carbono secundario **6** unido a la amina secundaria; a 47.6 ppm se encuentra la señal del carbono secundario **7** unido a la amina primaria; mientras que el carbono secundario **8** del centro de la cadena alifática se encuentra con un desplazamiento de 29.4 ppm.

Las señales del compuesto **6b**, encontradas en RMN se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 6.** Señales de BODIPY amino **6b** en IR.

IR BODIPY amino ( <b>6b</b> )	
Señal	cm <sup>-1</sup>
N-H <sub>2</sub> estiramiento	3366
N-H estiramiento	3248
C=N	1595 débil
C=C	1550
C-N	1333
B-F	1065
B-N	791

En el espectro de IR del compuesto (**6b**), se observó una señal aguda a  $3366\text{ cm}^{-1}$ , asociada al estiramiento del enlace carbono-nitrógeno, correspondiente a una amina primaria, debido al hombro que presenta la banda; a  $3248\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal de estiramiento de los enlaces carbono-nitrógeno de una amina secundaria. El resto de las señales presentes en el espectro son consistentes a las reportadas para el anillo de BODIPY, por lo que no se discuten y se encuentran resumidas en la Tabla 6.

### 5.3.3 Caracterización estructural del BODIPY amino **6c**

El compuesto **6c** mostró una banda a  $3218\text{ cm}^{-1}$  característica para la señal de estiramiento de nitrógeno-hidrógeno de una amina primaria y a  $2936\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal de estiramiento de los enlaces carbono-hidrógeno de la cadena alifática. Las señales más relevantes del BODIPY **6c**, encontradas en el espectro de IR se muestran en la Tabla 7.

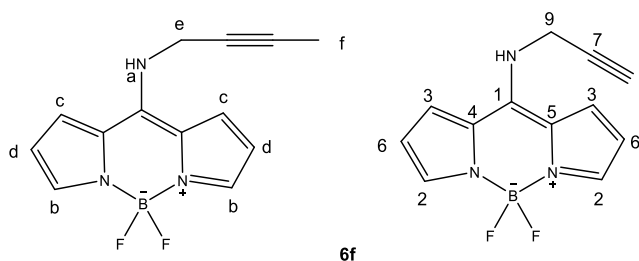
**Tabla 7.** Señales de BODIPY amino **6c** en IR.

IR BODIPY amino <b>6c</b>	
Señal	$\text{cm}^{-1}$
NH estiramiento	3367
C-H estiramiento	2936
C=N	1592
C=C	1555
C-N	1340
B-F estiramiento	1092
B-N	753



### 5.3.4 Caracterización estructural de BODIPY-propargilo **6f**

En la Figura 10 se enumeran los protones y carbonos para la asignación de señales encontradas en la caracterización por RMN. Las señales del compuesto **6f**, encontradas en RMN se muestran en la Tabla 8.



**Figura 10.** Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto **6f**.

**Tabla 8.** Señales del compuesto **6f** en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
Señal	δ ppm (J = Hz)	Señal	δ ppm
a	9.21 (sa)	1	153.7 (C)
b	7.65-7.59 (d, 2H),	2	140.3 (CH)
c	7.43-7.37 (d, 2H),	3	137.0 (CH)
d	6.59-6.40 (d, 2H),	4	129.6 (C)
e	4.69-4.68 (d, 2H),	5	121.5 (C)
f	3.04-3.02 (t)	6	118.5 (CH)
		7	83.3 (C)
		8	82.1 (C)
		9	40.0 (CH <sub>2</sub> )

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se puede observar una señal ancha a 9.21 ppm, del protón **a** de la amina; entre 7.65 ppm y 6.40 ppm, se encontraron las señales asociadas al anillo de BODIPY. Las señales asociadas a la incorporación de propargilamina al anillo, se encontraron entre 4.69-4.68 ppm donde se observa un doble de dobles, con constante de acoplamiento de 4.68 Hz, asignado a los protones **e**, del metileno de la amina; y 3.04-3.02 ppm, donde se encontró un triplete, con J=3.02 Hz, asignado para el hidrógeno **f** del triple enlace.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se encontraron las señales correspondientes a los carbonos del anillo entre 153.7 ppm y 118.5 ppm; los carbonos cuaternarios del grupo propargilo **7** y **8** corresponden a las señales que se observaron a 83.3 y 82.1 respectivamente; y a 40.0 ppm se encontró la señal para el carbono secundario **9** unido a la amina.

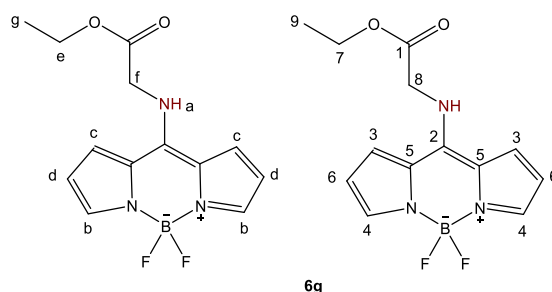
**Tabla 9.** Señales del compuesto **6f** en IR.

IR BODIPY amino ( <b>6b</b> )	
Señal	cm <sup>-1</sup>
C≡C-H estiramiento	3365
N-H estiramiento	3285
C≡C	2126
C=N	1591
C=C	1552
C-N tensión	1370
B-F	1063
B-N	730

En el espectro de IR del compuesto **6f** se pudo observar a  $3365\text{ cm}^{-1}$  la señal de estiramiento del enlace hidrógeno-carbono del acetileno; a  $3285\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal de estiramiento nitrógeno-hidrógeno de una amina secundaria; en  $2126\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal débil que se asocia al estiramiento de los carbonos unidos por triple enlace del acetileno. Las señales mencionadas anteriormente denotan la formación de la molécula propuesta. Estas y el resto de las señales que presenta el BODIPY propargilo en el espectro de IR se muestran en la Tabla 9.

### 5.3.5 Caracterización estructural de BODIPY Glicina **6g**

En la Figura 11 se enumeran los protones y carbonos, para la asignación de señales encontradas en la caracterización por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , del compuesto **6g**.



**Figura 11.** Asignación de protones (izquierda) y carbonos (derecha) en la estructura del compuesto **6g**.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , en 9.96 ppm se puede observar una señal ancha correspondiente al protón **a** de la amina; a 4.24-4.19 ppm se observa un multiplete, asignado a los 3 protones **e**; en 4.12-4.09 ppm se encuentra un multiplete que se asigna al protón **f**; la señal de los protones **g** se encuentra a 1.23-1.15 ppm.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se puede observar una señal a 168.3 ppm, correspondiente al carbono cuaternario **1**; a 62.0 ppm se encuentra la señal para el carbono secundario **7**; en 47.8 ppm se muestra la señal del carbono **8**; por último, 14.46 ppm se encuentra la señal asignada al carbono secundario **7**.

Las señales del compuesto **6g**, encontradas en RMN se muestran en la Tabla

Tabla 10. Señales del compuesto **6g** en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
Señal	δ ppm (J = Hz)	Señal	δ ppm
a	9.96 (sa, 1H)	1	168.3 (C)
b	7.62 (s, 2H)	2	149.3 (C)
c	7.48-7.43 (m, 3H),	3	130.9 (CH)
d	6.56-6.44 (m, 3H)	4	124.8 (CH)
e	4.24-4.19 (m, 3H)	5	115.7 (C)
f	4.12-4.09 (m, 1H)	6	110.3 (CH)
g	1.23-1.15 (m, 1H)	7	62.0 (CH <sub>2</sub> )
		8	47.85 (CH <sub>2</sub> )
		9	14.46 (2CH <sub>3</sub> )

En el espectro de IR del compuesto **6g** se pueden observar a 3218 cm<sup>-1</sup> la señal de estiramiento del enlace nitrógeno-hidrógeno de una amina primaria; a 2988 cm<sup>-1</sup> se encuentra la señal de estiramiento de los carbono-hidrógeno alifáticos; en 1750 cm<sup>-1</sup> se encuentra la señal que se asocia al estiramiento carbono-oxígeno del carboxilo de la molécula; en 1594 se encuentra la señal de carbono-nitrógeno unido por doble enlace. Las señales del compuesto **6g**, encontradas en el espectro de IR se muestran en la Tabla 11.

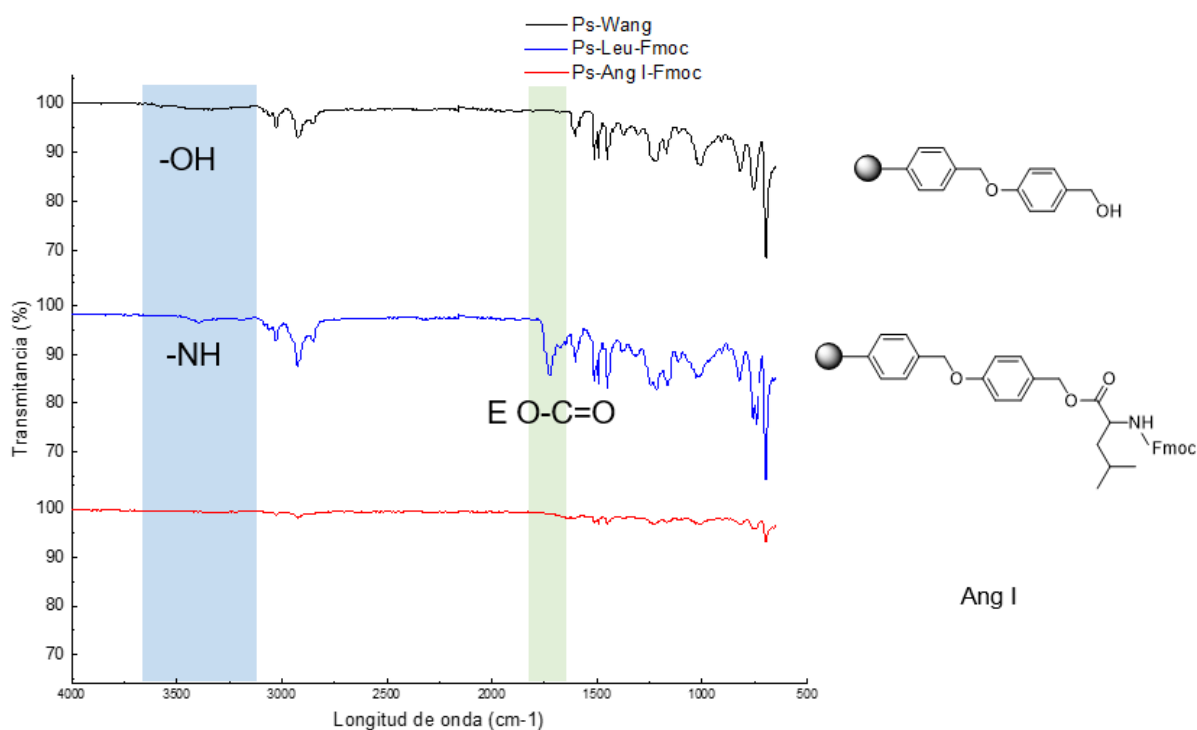
**Tabla 11.** Señales del compuesto **6g** en IR.

<b>IR BODIPY amino 6a</b>	
<b>Señal</b>	<b>cm<sup>-1</sup></b>
NH estiramiento	3218
C-H estiramiento	2988
C=O	1750
C=N	1592
C=C	1552
C-N	1344
B-F estiramiento	1040
B-N	755

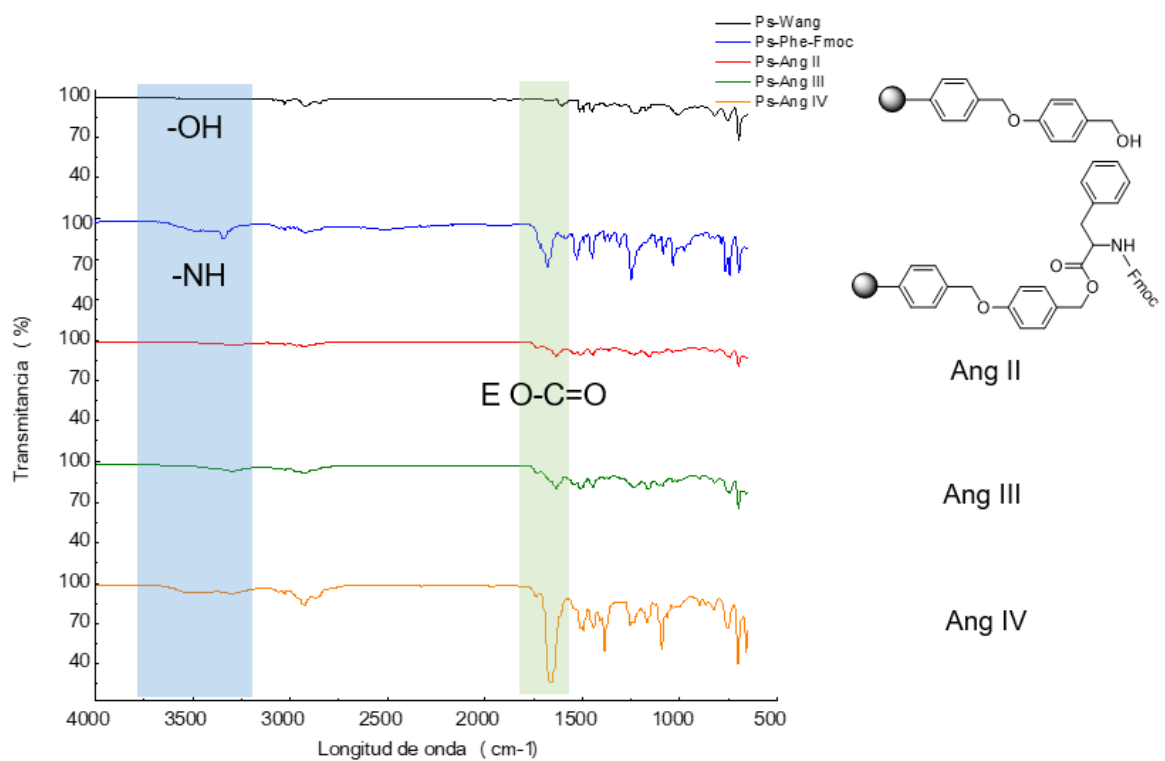
## 5.4 Caracterización estructural de los péptidos

En la Figura 12 se muestra la caracterización por IR de Ang I-Fmoc. Se compara las señales de la resina de Wang, antes y después de unir el primer AA (Leu), así como una vez que se ha sintetizado el péptido Ang I. Se puede destacar la desaparición de una banda de OH aproximadamente a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , de la resina de Wang; así como la aparición de la banda característica del grupo carbonilo de amida a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , una vez que se han unido los AA. Esto nos indica que se llevó a cabo la síntesis del péptido Ang I sobre la resina de Wang.

En la Figura 13 se observa la desaparición de la banda de OH cuando se une el primer AA (Phe) que es el mismo para los tres péptidos restantes. La formación de los enlaces peptídicos se denota por la aparición de una banda pequeña a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al carbonilo de amida presente en la estructura de los AA, en los péptidos Ang II, Ang III y Ang IV.



**Figura 12.** Espectro de IR de la resina de Wang antes, después del acoplamiento del primer AA y la resina unida a Ang I-Fmoc.

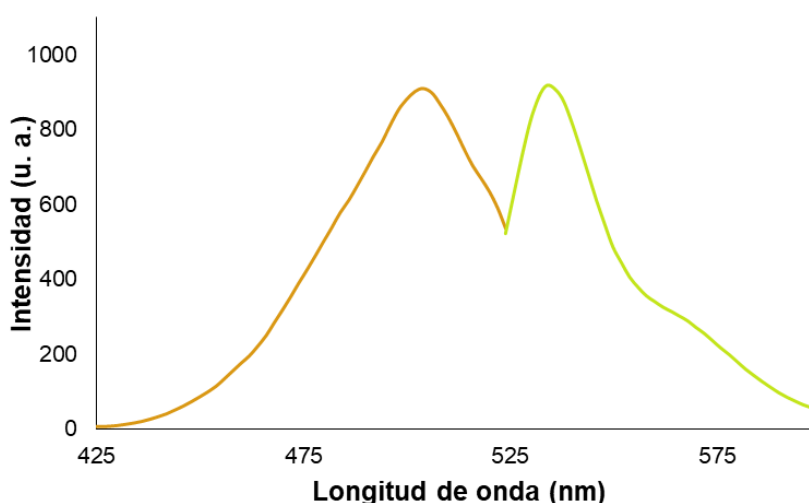


**Figura 13.** Espectro de IR de la resina de Wang antes, después del acoplamiento del primer AA y la resina unida a Ang II-Fmoc, Ang III-Fmoc y Ang IV-Fmoc.

## 5.5 Caracterización espectroscópica de los compuestos fluorescentes

### 5.5.1 BODIPY S-metilo

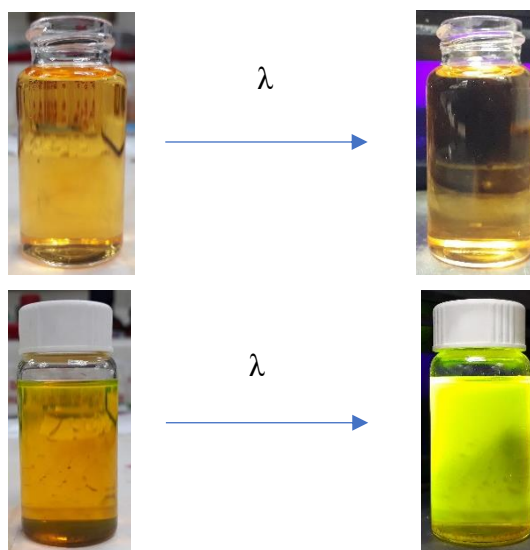
La complejación del compuesto **4** con  $\text{BF}_3$  dio como producto el BODIPY **5** y su formación se denota por la aparición de emisión de fluorescencia. El compuesto **5** se caracterizó por FM para obtener información sobre su emisión. Este presenta una banda de excitación a 503 nm, mientras que el máximo de emisión de la molécula se encuentra a 535 nm (Figura 14).



**Figura 14.** Espectro de excitación y emisión de FM del compuesto **5** en DCM.

En la parte superior de la Figura 15, se muestra el compuesto **4** en solución, antes y después de ser irradiado con la longitud larga de una lámpara manual de luz UV. Se puede observar una solución clara amarillo-naranja, la cual no muestra cambio al ser irradiada por la lámpara, a diferencia del compuesto **5** (inferior), que se observa como una solución clara color naranja, que bajo la luz natural ya muestra un halo fluorescente en la superficie de la solución y cuando es irradiado por la luz UV, fluórese en color verde neón intenso, que corresponde con la longitud de onda de emisión a 535 nm, la cual se encuentra en la zona del espectro visible.





**Figura 15.** Comparación del compuesto **4** (superior) y el BODIPY **5** (inferior) en DCM, antes y durante la irradiación con luz UV.

### 5.5.2 Biconjugados

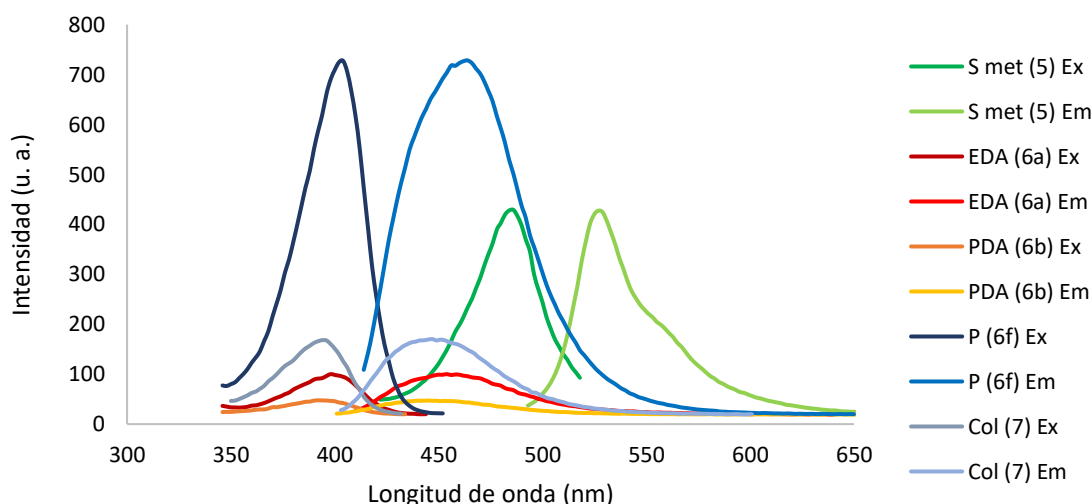
Se realizó la sustitución del BODIPY **5** con cinco diferentes diaminas (EDA, PDA, BDA, HDA, ODA). En todos los casos, se obtuvo un sólido amarillo pálido, que en solución presenta coloración amarillo tenue, pero cuando se hace incidir radiación UV, presentan una emisión de FM en el azul, que se puede observar a simple vista (Figura 16).



**Figura 16.** Fotografía de la fluorescencia observada en diferentes BODIPYs (de izquierda a derecha: **5**, **6a**, **6b**, **6f** y **7**) en solución  $1 \times 10^{-3}$

En la Figura 17, se pudo observar las bandas de excitación y emisión de los BODIPY **5**, **6a**, **6b**, **6f** y **7** en acetonitrilo. El BODIPY **5** presenta una intensidad de fluorescencia de 425 u. a. de fluorescencia, siendo superado en intensidad solo por el BODIPY **6f**, que presenta 723 u. a. de fluorescencia cuando se midieron en el mismo disolvente y a la misma concentración. El resto de los BODIPYs mostraron una notable

disminución de la intensidad de fluorescencia (**6a**: 100 u. a., **6b**: 47 u. a. y **7**: 170 u. a.), en comparación con su antecesor (BODIPY **5**).



**Figura 17.** Espectros de excitación y emisión de FM para diferentes BODIPYs.

Los valores de las longitudes máximas de excitación y emisión de las moléculas presentadas en la Figura 17 se resumen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Longitudes de onda de excitación y emisión máximas para diferentes BODIPYs.

BODIPY	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Intensidad (u. a.)
5	486	529	425
6a	400	458	100
6b	396	451	47
6f	404	463	723
7	396	450	170

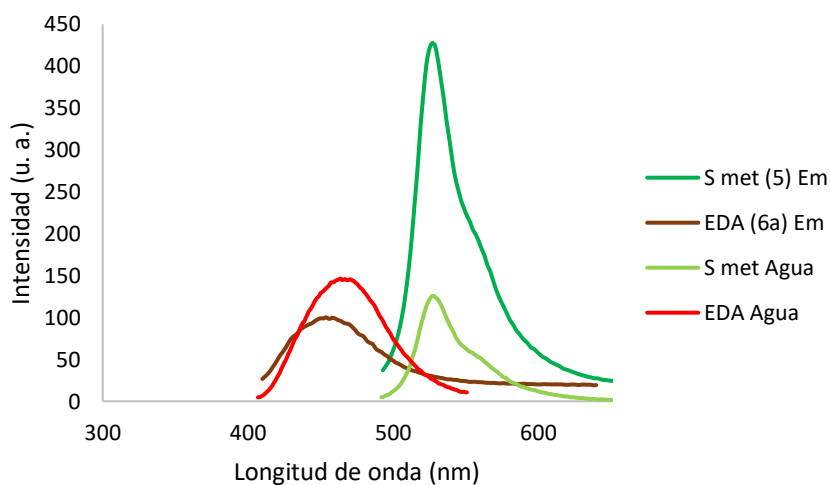
El BODIPY **6a**, se modificó en el extremo de la amina primaria con un derivado de colesterol, dicha modificación se tradujo en un incremento en la intensidad de fluorescencia de 70 u. a. y un desplazamiento hipsocrómico de 8 nm en la longitud de onda de emisión.

La sustitución del BODIPY S-metilo en la posición meso con diferentes aminas, genera sin excepción un desplazamiento hipsocrómico de la banda de emisión, pasando de emitir en verde (BODIPY S-metilo) a emitir en el azul, como es el caso de todos los biconjugados presentados en esta sección.<sup>44</sup> Al ser un grupo electrodonador, la sustitución del amino en la posición meso debería provocar un efecto batocrómico, pero la N-sustitución en esta posición desestabiliza al orbital LUMO, aumentando la diferencia energética entre HOMO y LUMO, provocando así un desplazamiento hipsocrómico de unos 100 nm con respecto al BODIPY original.

### 5.5.3 Estudio de fluorescencia en diferentes disolventes

La finalidad de sintetizar diferentes bioconjugados fluorescentes es usarlos en aplicaciones de carácter biológico, por lo que se requirió estudiar la fluorescencia de dichos compuestos en agua como disolvente.

En la Figura 18 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de los BODIPY **5** y BODIPY **6a** en acetonitrilo y agua.



**Figura 18.** Espectros de emisión de fluorescencia de BODIPY **5** y BODIPY **6a** en acetonitrilo y agua.

En la Tabla 13 se resumen las longitudes de onda de emisión y las intensidades de las moléculas, evaluadas en diferentes solventes.

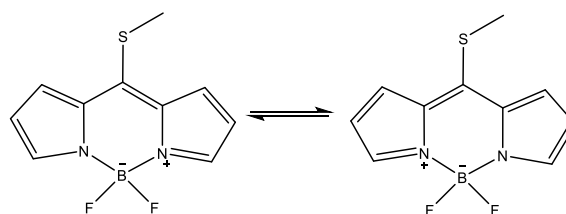
**Tabla 13.** Longitudes de onda de emisión máximas de los BODIPY **5** y **6a** en diferentes disolventes.

Solvente	Acetonitrilo		Agua	
	Emisión (nm)	Intensidad (u. a.)	Emisión (nm)	Intensidad (u. a.)
5	529	425	529	125
6a	458	100	469	145

El cambio de disolvente (acetonitrilo por agua) no afectó la longitud de onda de emisión de fluorescencia para el BODIPY S-metilo, sin embargo, se encontró una disminución de la intensidad de fluorescencia de 300 u. a., quedando con 125 u. a. como intensidad final. No ocurrió lo mismo para el BODIPY amino **6a**, para el cual se encontró que, la longitud de onda de emisión presentaba un desplazamiento batocrómico de 11 nm, además, la intensidad de emisión aumentó por 45 u. a. al evaluar su FM en agua.

La explicación a dicho fenómeno se encuentra en las estructuras resonantes de cada molécula, así como en la naturaleza de los disolventes utilizados.

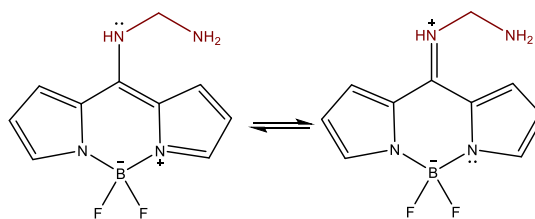
Las estructuras resonantes que presenta el BODIPY **5**, presenta las cargas positivas en los nitrógenos del anillo, ambos unidos a boro (Figura 19).



**Figura 19.** Estructuras resonantes del BODIPY S-metilo.

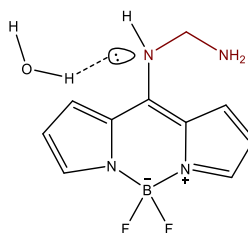
El acetonitrilo es un solvente polar aprótico. Lo suficientemente polar para solubilizar la molécula. Por otro lado, el BODIPY **5** no presenta buena solubilidad en agua, motivo al que se le puede atribuir la disminución de la intensidad de fluorescencia. Además, no se generan interacciones considerables con las cargas de la molécula para generar cambios estructurales que afecten la longitud de onda de emisión.

Las estructuras resonantes del BODIPY **6a**, a diferencia del BODIPY **5**, muestran la posibilidad de que la carga positiva en la molécula se encuentre en el átomo unido al carbono meso. En el caso de acetonitrilo, el nitrógeno puede compartir sus electrones libres con el anillo de BODIPY, generando dos zonas diferentes de electrones  $\pi$ , lo cual rompe la conjugación en el anillo y por lo tanto genera una disminución en la intensidad de fluorescencia (Figura 20).



**Figura 20.** Estructuras resonantes del BODIPY **6a**.

Cuando el BODIPY **6a** se analiza en agua, se puede observar un aumento en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de emisión. Esto sucede debido a que los protones del agua pueden interactuar con los electrones libres del nitrógeno en la posición meso, por lo que estos ya no están disponibles para contribuir en la estructura resonante, y no sucede la ruptura de la conjugación que se genera en el anillo, como cuando la molécula se encuentra en acetonitrilo.

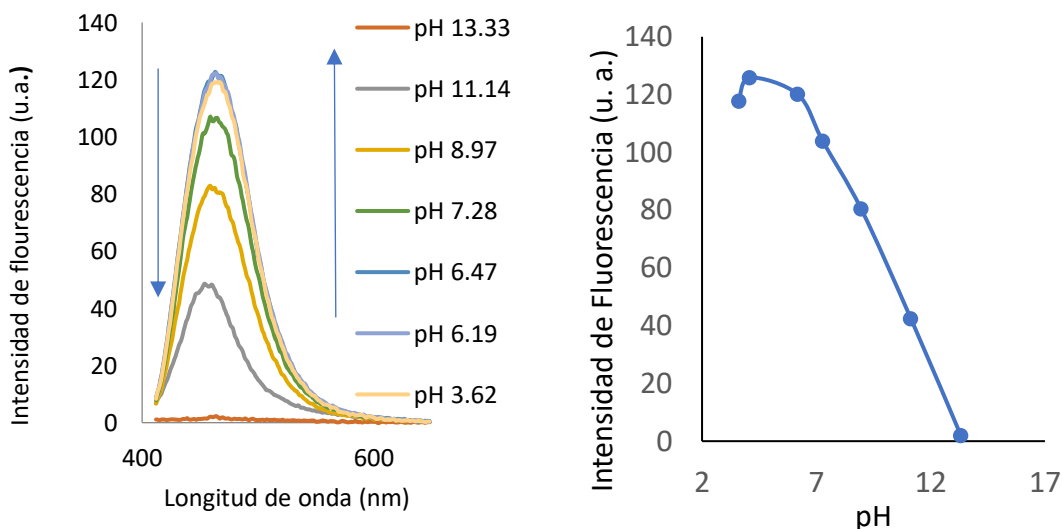


**Figura 21.** Estructura del BODIPY **6a** en agua.

#### 5.5.4 Estudio de pH con BODIPY amino **6a**.

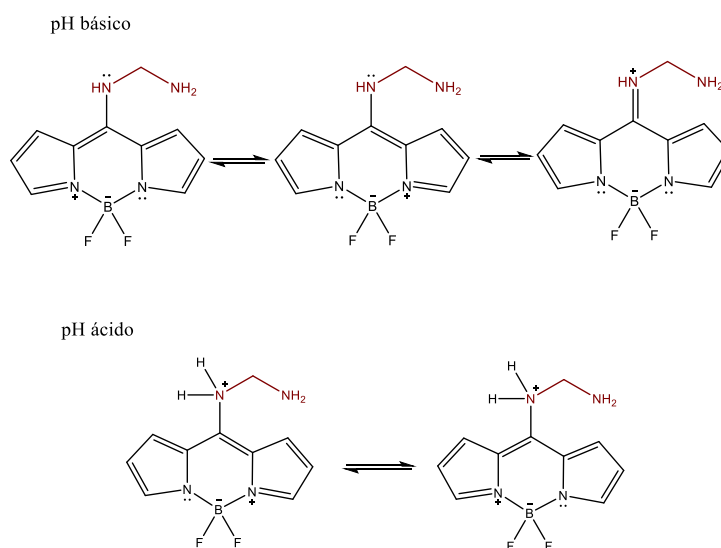
Se realizó un estudio variando el pH de la solución de BODIPY amino **6a** en agua, para comprobar la interacción de los electrones del nitrógeno meso con los electrones conjugados del anillo.

El pH del BODIPY **6a** en agua fue neutro (7.08) y mostró 126 u. a. de intensidad de fluorescencia. Cuando a la solución se le agregó ácido, esta pasó a un pH de 2.13 y se observó un aumento de 8 u. a. en la intensidad de fluorescencia. Lo contrario ocurrió cuando la solución se volvió básica, con un pH de 11.83, ya que se abatió la fluorescencia de BODIPY **6a** por 111 u. a. de intensidad, con respecto al BODIPY **6a** a pH neutro (Figura 22).



**Figura 22.** Estudio de pH para el BODIPY **6a**.

Regularmente, número mayor de estructuras resonantes lleva a un primer estado excitado más estable y como consecuencia, desplazamiento de la fluorescencia a la región ultravioleta.

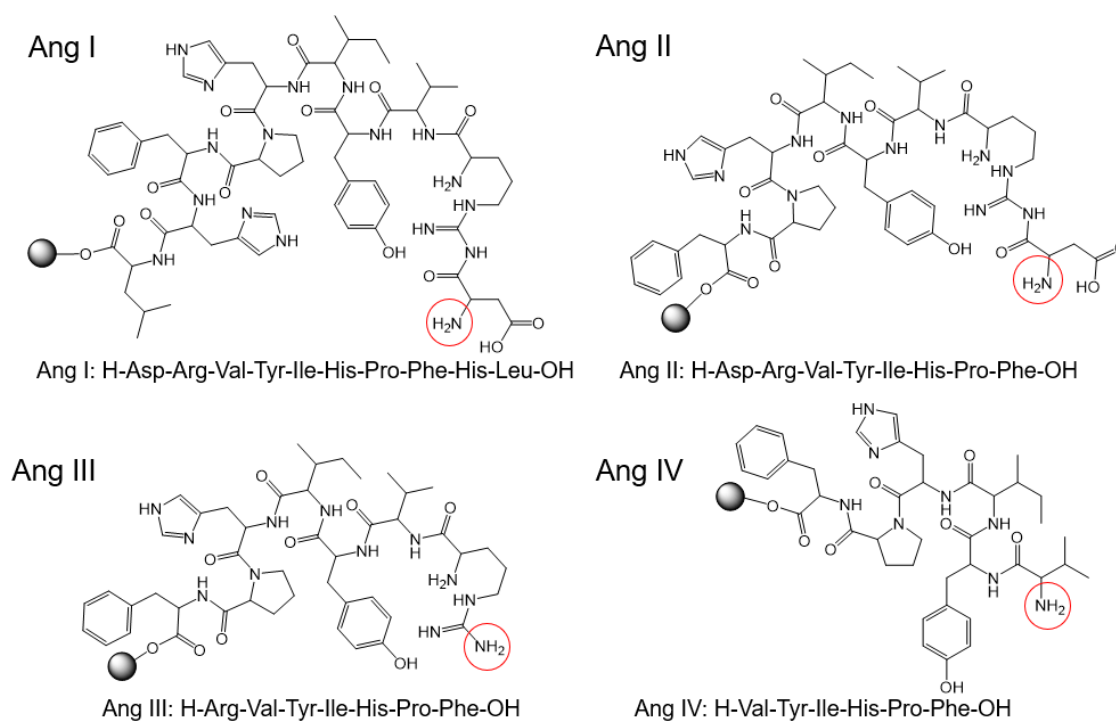


**Figura 23.** Estructuras resonantes de la forma básica y ácida del BODIPY amino **6a**.

El cambio en la emisión de compuestos de este tipo se debe al diferente número de estructuras resonantes asociadas con la forma ácida o básica de la molécula. Sin embargo, aunque en la forma básica la molécula presenta un número mayor de estructuras resonantes, una de ellas rompe la conjugación en el anillo de BODIPY, por lo que la fluorescencia se abate casi por completo. A diferencia de la forma ácida, que, aunque posee un número menor de estructuras resonantes, ambas mantienen la conjugación electrónica del anillo, por lo que la intensidad de fluorescencia aumenta (Figura 23).

## 5.6 Unión de BODIPY 5 a los péptidos

Anteriormente se han realizado sustituciones en la posición meso del BODIPY 5 por aminas primarias, por ello, una vez que se desprotegió la amina terminal de los péptidos, se llevó a cabo la unión directa del BODIPY 5. En la Figura 24 se observó las estructuras completas de los cuatro péptidos unidos a la resina de Wang. Se planteó realizar la unión de BODIPY como un AA más, es decir, cuando el péptido se encuentra unido a la resina, esto para aprovechar las ventajas de la síntesis en fase sólida.

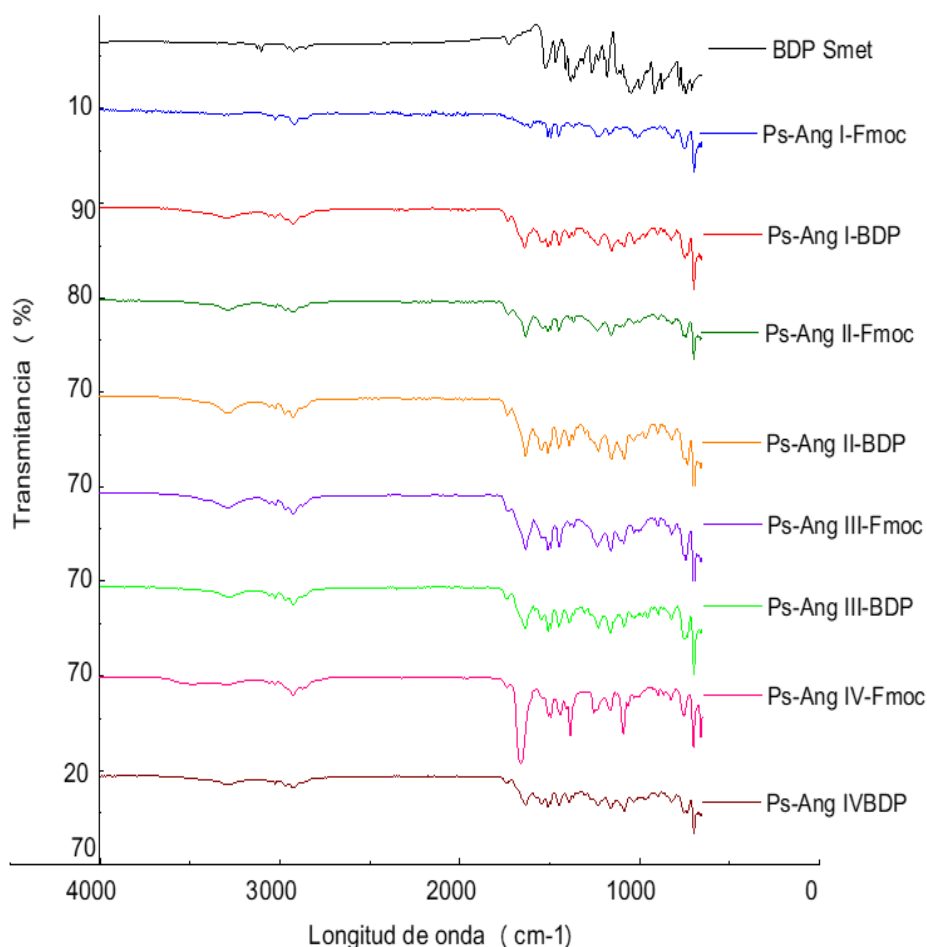


**Figura 24.** Estructuras de las cuatro diferentes angiotensinas (Ang I, Ang II, Ang III y Ang IV)

En la Figura 25 se pudo observar el espectro de IR de los cuatro péptidos antes y después de la unión directa del compuesto 5. Debido a que las señales de



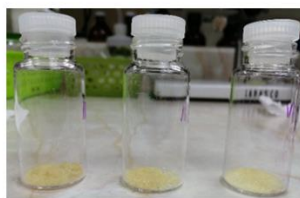
BODIPY 5 se traslapan en el espectro con las de los grupos presentes en los péptidos y la resina, no fue posible distinguir alguna señal que denotara la unión de las moléculas.



**Figura 25.** Espectros IR de la unión de BODIPY a las angiotensinas.

La inspección visual realizada a los péptidos unidos a la resina de Wang, mostró un cambio en el color en las esferas de la resina, es decir, la resina se tiñó del color de la solución de BODIPY utilizada para realizar la unión (Figura 26).

Péptidos unidos a resina

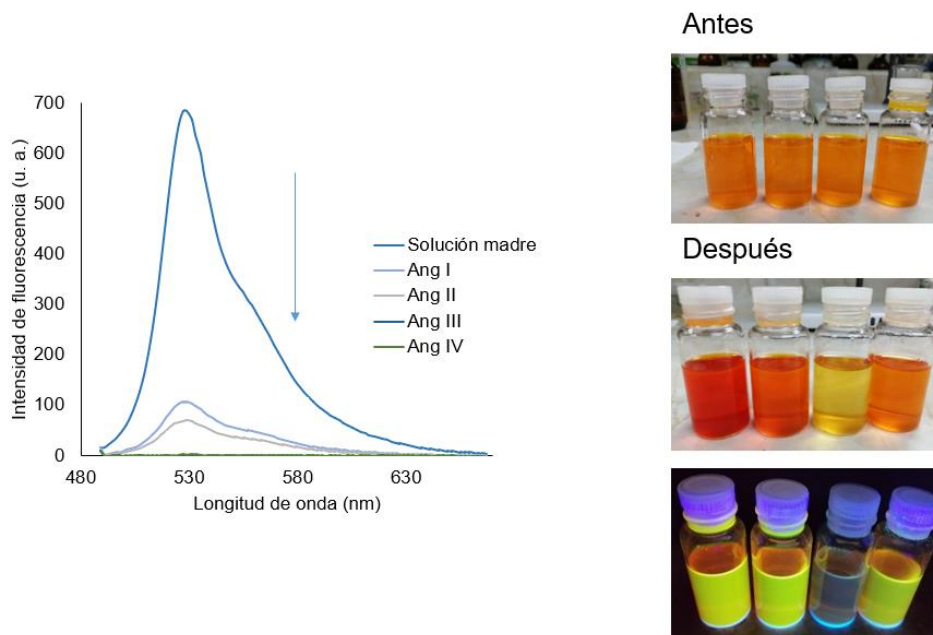


Péptidos unidos a BDP



**Figura 26.** Fotografías de los péptidos en la resina, antes y después de unirse al BODIPY 5.

La unión del compuesto **5** se monitorizó por FM, el abatimiento de la fluorescencia en la solución de BODIPY sugiere que la molécula ya no está presente en la solución debido a que se encuentra unida al péptido que, a su vez, está soportado sobre la superficie de la resina (Figura 27).



**Figura 27.** Fluorescencia molecular de la solución de unión de BODIPY 5.

## 5.7 Microscopia confocal de la resina

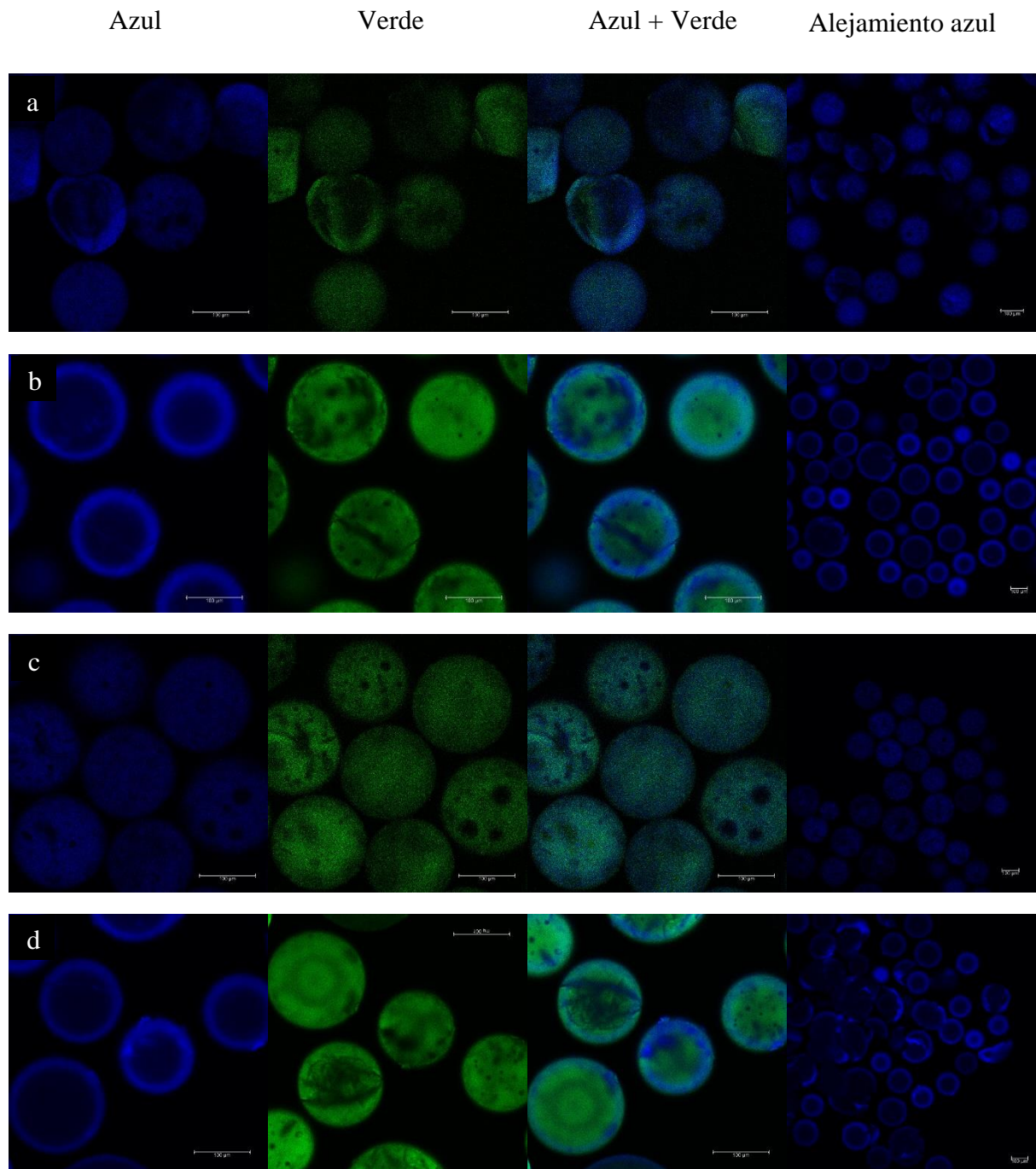
Se realizó un estudio de microscopía confocal del péptido unido a la resina de Wang, antes y después de la unión del compuesto **5**. Esto para confirmar los resultados obtenidos en el estudio realizado a la solución, utilizada para unir el BODIPY al péptido.

En la Figura 28 se puede observar la imagen de algunas esferas de resina de Wang. En la primera columna se muestran las esferas en el canal azul; en la segunda, las mismas esferas en el canal verde; en la tercera, ambos canales juntos; en la cuarta columna se muestra un alejamiento de la muestra en el canal azul.

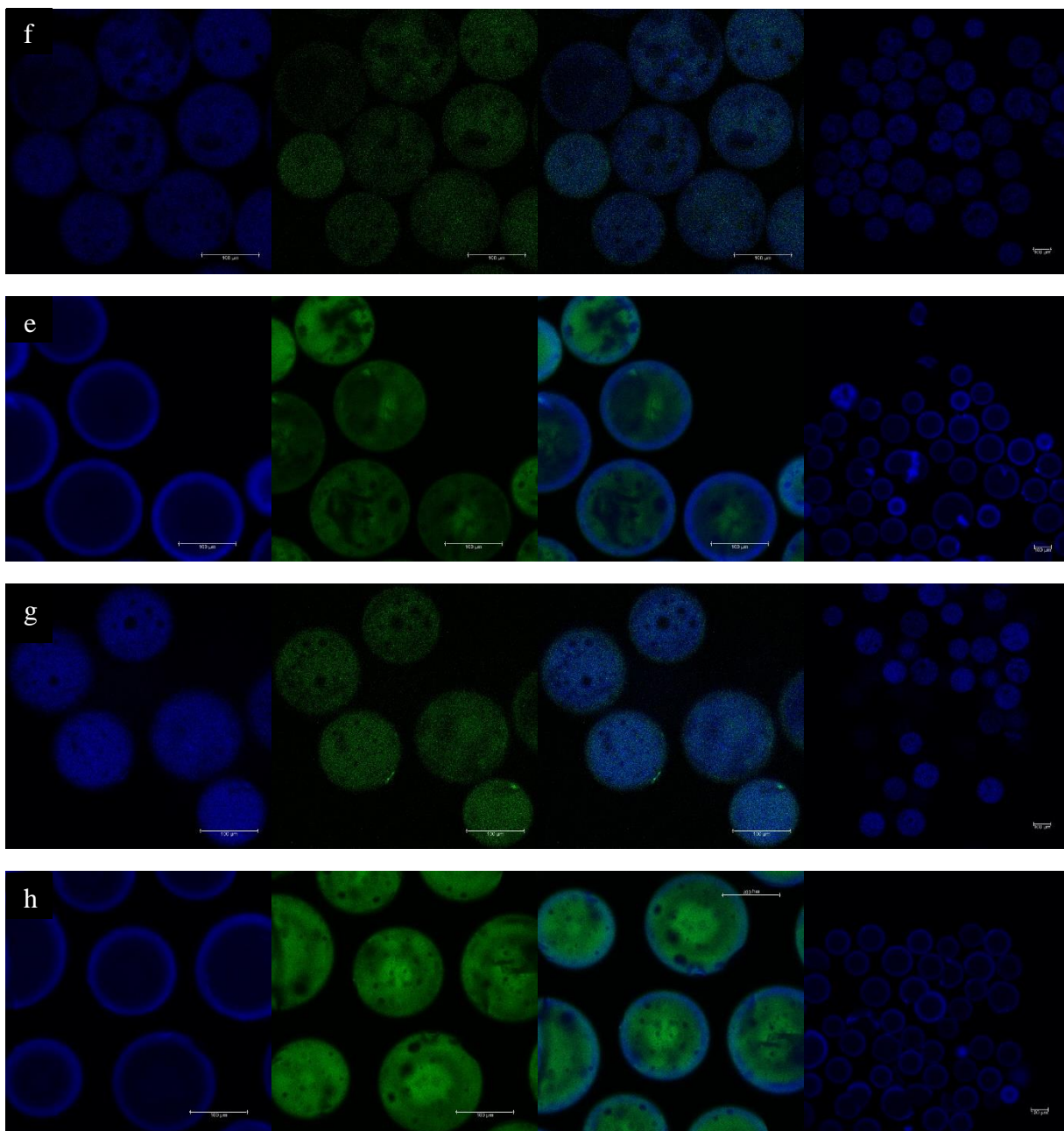
En las filas **a**, **c**, **e** y **g** se observan Ps-Ang I-Fmoc, Ps-Ang II-Fmoc, Ps-Ang III-Fmoc y Ps-Ang IV-Fmoc, respectivamente. Los cuatro péptidos muestran fluorescencia en ambos canales, esto pudiera deberse a que algunos AA presentes en los péptidos sintetizados emiten fluorescencia por sí solos. Las imágenes muestran que tanto la fluorescencia azul como la verde se encuentran sobre la superficie y el interior de la resina. Esto debido a que la unión de los AA no se da exclusivamente sobre la superficie, ya que pueden llegar a formarse enlaces con los grupos que se encuentran al interior de la resina. En las filas **b**, **d**, **f** y **h** se muestran las imágenes de Ps-Ang I-BDP, PS-Ang II-BDP, Ps-Ang III-BDP y Ps-Ang IV-BDP, respectivamente. Estas muestras presentan fluorescencia en ambos canales (al igual que las muestras que no se hicieron reaccionar con el compuesto **5**), sin embargo, se puede observar un aumento de la fluorescencia sobre la superficie de la resina, en el canal azul, lo que sugiere que el compuesto **5** reaccionó principalmente con las cadenas peptídicas ancladas en la superficie de la resina. También se puede notar un aumento en la fluorescencia en el canal verde, distribuido en toda la resina, lo que puede deberse a residuos de compuesto **5** que quedaron inmersos en la misma.

En las imágenes de alejamiento en el canal azul, se puede observar que no todas las esferas muestran el mismo aumento de fluorescencia en la superficie, lo que indica que no todas las esferas de resina reaccionaron correctamente con el compuesto **5**. A pesar de que los resultados obtenidos en este estudio sugieren que

las reacciones no se llevaron a cabo homogéneamente a lo largo de toda la resina, sí confirman que se unió el compuesto **5** a los péptidos sintetizados.



**Figura 28.** Imágenes de microscopia confocal de los péptidos unidos a la resina de Wang.



**Figura 29.** Imágenes de microscopía confocal de los péptidos unidos a la resina de Wang. Continuación

## VI. CONCLUSIONES

- 1) El efecto del disolvente (CDM, ACN y H<sub>2</sub>O), en el BODIPY **5** presentó variaciones pequeñas de las bandas de absorción y emisión todas en la región del verde.
- 2) Se preparó una biblioteca de derivados de BODIPY **5**, con sustitución en la posición meso por una amina. Este cambio en la posición provocó un desplazamiento hipsocrómico en la longitud de onda de emisión, por lo que los nuevos BODIPYs emitieron en la región del azul.
- 3) El método utilizado en el acoplamiento de moléculas de interés biológico como aminoácidos y derivados de colesterol al BODIPY **5** fue una metodología viable para obtener derivados fluorescentes de las mismas.
- 4) El BODIPY **6a**, presentó diferentes estructuras resonantes cuando se encontró en su forma básica o ácida, por lo que un medio ácido favorece la fluorescencia y un medio básico la abate. Por lo tanto, este compuesto se puede aplicar como sensor de pH.
- 5) El método de acoplamiento de péptidos fue utilizado para obtener la unión del BODIPY **5** a los péptidos Ang I, Ang II, Ang III y Ang IV. Por lo tanto, esta metodología es efectiva en el marcaje de péptidos.



---

**VII. REFERENCIAS**

- (1) Juillerat-Jeanneret, L. The Other Angiotensin II Receptor: AT2R as a Therapeutic Target. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 1978–1995.
- (2) Tyurin-Kuzmin, P. A.; Kalinina, N. I.; Kulebyakin, K. Y.; Balatskiy, A. V.; Sysoeva, V. Y.; Tkachuk, V. A. Angiotensin Receptor Subtypes Regulate Adipose Tissue Renewal and Remodelling. *FEBS J.* **2020**, *287*, 1076–1087.
- (3) Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-Angiotensin System Revisited. *J. Intern. Med.* **2008**, *264*, 224–236.
- (4) Lukaszuk, A.; Demaegdt, H.; Szemenyei, E.; Tóth, G.; Tymecka, D.; Misicka, A.; Karoyan, P.; Vanderheyden, P.; Vauquelin, G.; Tourwé, D.  $\beta$ -Homo-Amino Acid Scan of Angiotensin IV. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2291–2296.
- (5) Federation, I. D. *Diabetes Atlas*, 8ava ed.; International Diabetes Federation: Bruselas, 2017.
- (6) Martínez, M. C.; Andriantsitohaina, R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1674–1686.
- (7) Pardo, F.; Villalobos-Labra, R.; Sobrevia, B.; Toledo, F.; Sobrevia, L. Extracellular Vesicles in Obesity and Diabetes Mellitus. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *60*, 81–91.
- (8) Lee, S. H.; Fujioka, S.; Takahashi, R.; Oe, T. Angiotensin II-Induced Oxidative Stress in Human Endothelial Cells: Modification of Cellular Molecules through Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 1412–1422.
- (9) Wilkinson-Berka, J. L.; Suphapimol, V.; Jerome, J. R.; Deliyanti, D.; Allingham, M. J. Angiotensin II and Aldosterone in Retinal Vasculopathy and Inflammation. *Exp. Eye Res.* **2019**, *187*.
- (10) Leite, A. P. O.; Aragão, D. S.; Nogueira, M. D.; Pereira, R. O.; Jara, Z. P.; Fiorino, P.; Casarini, D. E.; Farah, V. Modulation of Renin Angiotensin System

- 
- Components by High Glucose Levels in the Culture of Collecting Duct Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 22809–22818.
- (11) Masi, S.; Uliana, M.; Viridis, A. Angiotensin II and Vascular Damage in Hypertension: Role of Oxidative Stress and Sympathetic Activation. *Vascul. Pharmacol.* **2019**, *115*, 13–17.
- (12) Riching, A. S.; Major, J. L.; Londono, P.; Bagchi, R. A. The Brain–Heart Axis: Alzheimer’s, Diabetes, and Hypertension. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 21–28.
- (13) Asthana, S.; Mallick, B.; Alexandrescu, A. T.; Jha, S. IAPP in Type II Diabetes: Basic Research on Structure, Molecular Interactions, and Disease Mechanisms Suggests Potential Intervention Strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2018**, *1860*, 1765–1782.
- (14) Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G. T. Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- (15) Engel, M. F. M.; Khemtémourian, L.; Kleijer, C. C.; Meeldijk, H. J. D.; Jacobs, J.; Verkleij, A. J.; de Kruijff, B.; Killian, J. A.; Höppener, J. W. M. Membrane Damage by Human Islet Amyloid Polypeptide through Fibril Growth at the Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 6033 LP – 6038.
- (16) Cheng, K. K.; Chan, P. S.; Fan, S.; Kwan, S. M.; Yeung, K. L.; Wang, Y.-X. J.; Chow, A. H. L.; Wu, E. X.; Baum, L. Curcumin-Conjugated Magnetic Nanoparticles for Detecting Amyloid Plaques in Alzheimer’s Disease Mice Using Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Biomaterials* **2015**, *44*, 155–172.
- (17) Brender, J. R.; Lee, E. L.; Hartman, K.; Wong, P. T.; Ramamoorthy, A.; Steel, D. G.; Gafni, A. Biphasic Effects of Insulin on Islet Amyloid Polypeptide Membrane Disruption. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 685–692.
- (18) Knight, J. D.; Miranker, A. D. Phospholipid Catalysis of Diabetic Amyloid Assembly. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 1175–1187.



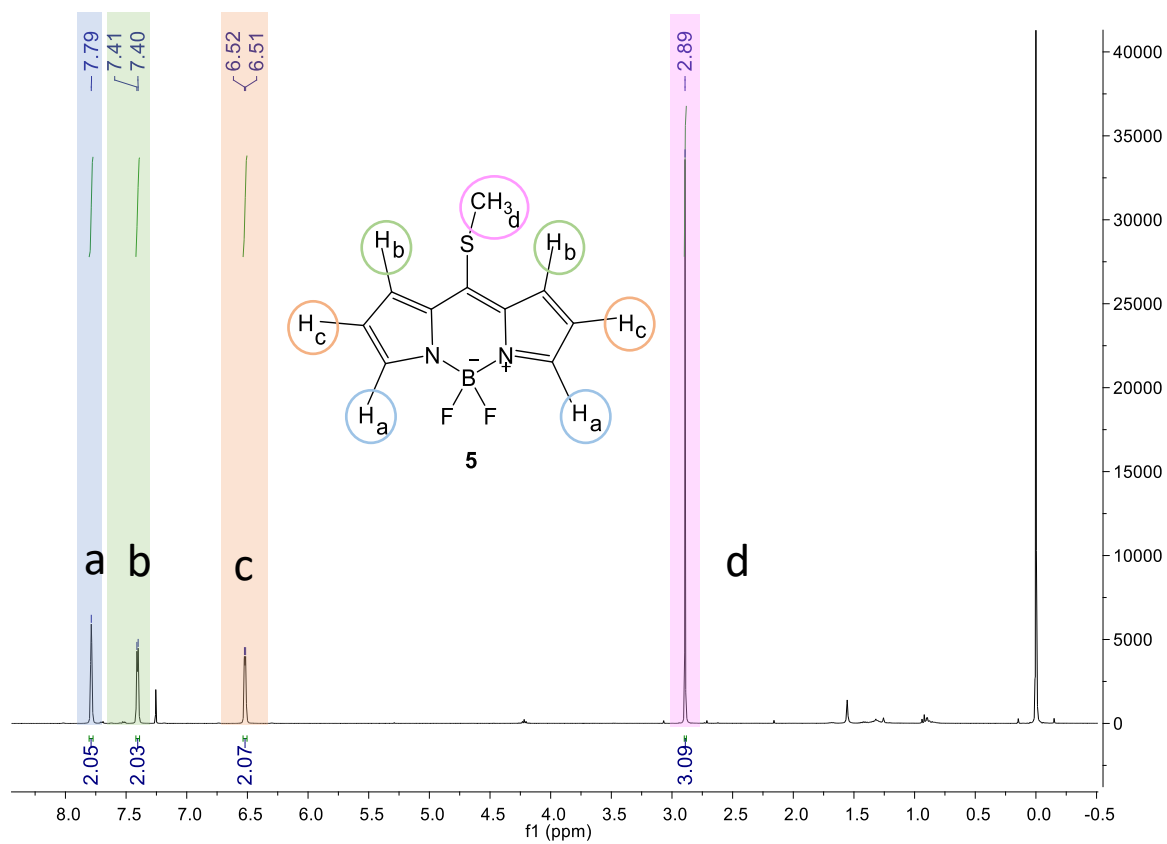
- 
- (19) Nanga, R. P. R.; Brender, J.; Subramanian, V.; Ramamoorthy, A. Structure and Membrane Orientation of IAPP in Its Natively Amidated Form at Physiological PH in a Membrane Environment. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2337–2342.
- (20) Zhang, Y.; Song, W. Islet Amyloid Polypeptide: Another Key Molecule in Alzheimer's Pathogenesis? *Prog. Neurobiol.* **2017**, *153*, 100–120.
- (21) Gard, P. R. The Role of Angiotensin II in Cognition and Behaviour. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *438*, 1–14.
- (22) Liu, C.; Liu, J.; Wang, M.; Zhang, B.; Wang, E.; Liu, B.; Zhang, T. Construction and Application of Membrane-Bound Angiotensin-I Converting Enzyme System: A New Approach for the Evaluation of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *J. Agric. Food Chem.* **2020**.
- (23) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Principles of Instrumental Analysis; 2007; p 399.
- (24) Zhang, H.-X.; Chen, J.-B.; Guo, X.-F.; Wang, H.; Zhang, H.-S. Highly Sensitive Low-Background Fluorescent Probes for Imaging of Nitric Oxide in Cells and Tissues. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3115–3123.
- (25) Thireau, J.; Marteaux, J.; Delagrangé, P.; Lefoulon, F.; Dufourny, L.; Guillaumet, G.; Suzenet, F. Original Design of Fluorescent Ligands by Fusing BODIPY and Melatonin Neurohormone. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 158–161.
- (26) Gai, L.; Sun, W. Recent Advances in Estrogen Receptor-Targeted Probes Conjugated to BODIPY Dyes. *Steroids* **2022**, *183*, 109031.
- (27) Xiao, Y.; Huang, X.; Feng, J.; Ni, Z.; Gai, L.; Xiao, X.; Sui, X.; Lu, H. A Simple Route toward Triplet-Forming Thionated BODIPY-Based Photosensitizers. *Dye. Pigment.* **2022**, *200*, 110167.

- 
- (28) Yildiz, E. A.; Sevinc, G.; Yaglioglu, H. G.; Hayvali, M. Strategies towards Enhancing the Efficiency of BODIPY Dyes in Dye Sensitized Solar Cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2019**, *375*, 148–157.
- (29) Luo, L.; Wu, D.; Li, W.; Zhang, S.; Ma, Y.; Yan, S.; You, J. Regioselective Decarboxylative Direct C–H Arylation of Boron Dipyrromethenes (BODIPYs) at 2,6-Positions: A Facile Access to a Diversity-Oriented BODIPY Library. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6080–6083.
- (30) Mukherjee, N.; Gaur, R.; Shahabuddin, S.; Chandra, P. Recent Progress in Lysosome-Targetable Fluorescent BODIPY Probes for Bioimaging Applications. *Mater. Today Proc.* **2022**.
- (31) Boens, N.; Verbelen, B.; Ortiz, M. J.; Jiao, L.; Dehaen, W. Synthesis of BODIPY Dyes through Postfunctionalization of the Boron Dipyrromethene Core. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *399*.
- (32) Zhao, C.; Zhou, Y.; Lin, Q.; Zhu, L.; Feng, P.; Zhang, Y.; Cao, J. Development of an Indole-Based Boron-Dipyrromethene Fluorescent Probe for Benzenethiols. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 642–647.
- (33) Ziessel, R.; Bonardi, L.; Retailleau, P.; Ulrich, G. Isocyanate-, Isothiocyanate-, Urea-, and Thiourea-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes as Fluorescent Probes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3093–3102.
- (34) Hermanson, G. T. Chapter 1 - Introduction to Bioconjugation; Hermanson, G. T. B. T.-B. T. (Third E., Ed.; Academic Press: Boston, 2013; pp 1–125.
- (35) Wolfe, L. S.; Calabrese, M. F.; Nath, A.; Blaho, D. V; Miranker, A. D.; Xiong, Y. Protein-Induced Photophysical Changes to the Amyloid Indicator Dye Thioflavin T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 16863 LP – 16868.
- (36) Pardo, F.; Villalobos-Labra, R.; Sobrevia, B.; Toledo, F.; Sobrevia, L. Extracellular Vesicles in Obesity and Diabetes Mellitus. *Mol. Aspects Med.* **2018**, *60*, 81–91.

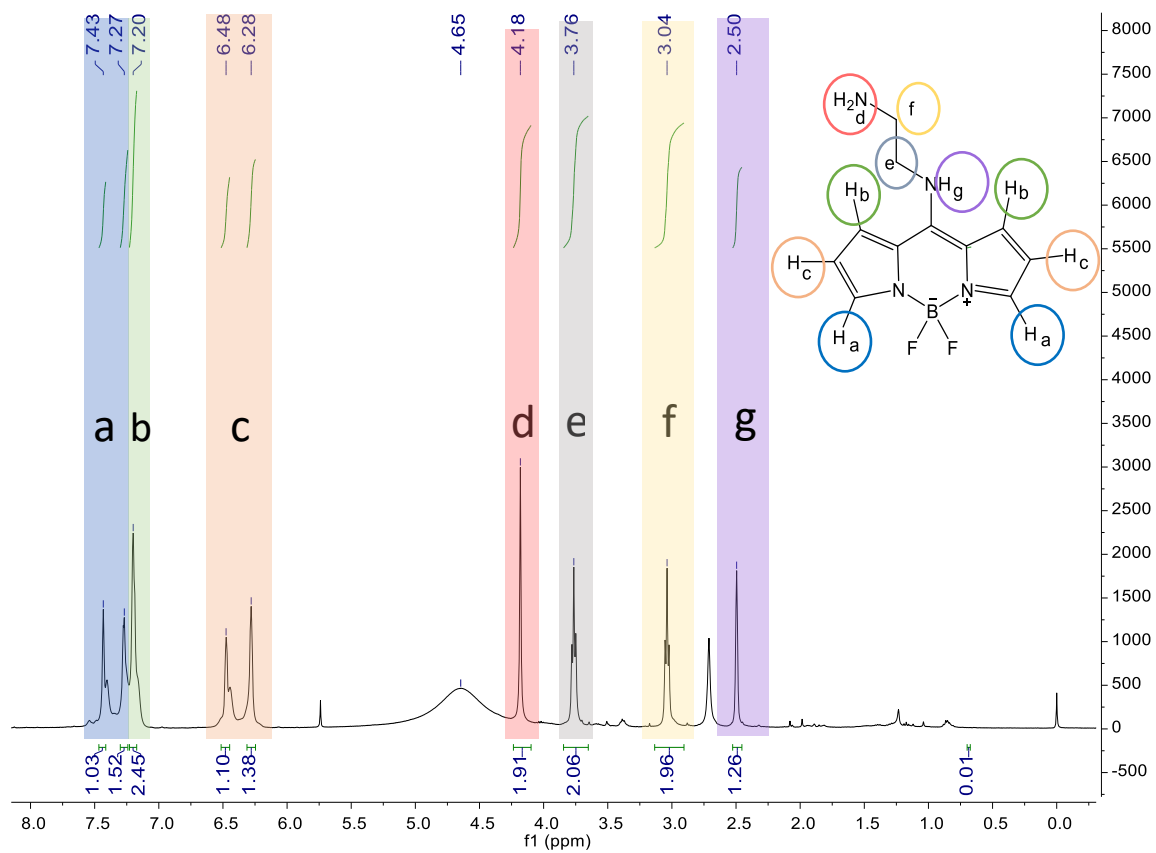
- 
- (37) Inoue, N.; Onoda, A.; Hayashi, T. Site-Specific Modification of Proteins through N-Terminal Azide Labeling and a Chelation-Assisted CuAAC Reaction. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2427–2434.
- (38) Boto, A.; González, C. C.; Hernández, D.; Romero-Estudillo, I.; Saavedra, C. J. Site-Selective Modification of Peptide Backbones. *Org. Chem. Front.* **2021**, *8*, 6720–6759.
- (39) Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; Do Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, *20*, 53–69.
- (40) Wiegand, P.; Lupu, L.; Huttmann, N.; Wack, J.; Rawer, S.; Przybylski, M.; Schmitz, K. Epitope Identification and Affinity Determination of an Inhibiting Human Antibody to Interleukin 8 (CXCL8) by SPR- Biosensor-Mass Spectrometry Combination. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*, 109–116.
- (41) Hansen, S.; Nile, A. H.; Mehta, S. C.; Fuhrmann, J.; Hannoush, R. N. Lead Optimization Yields High Affinity Frizzled 7-Targeting Peptides That Modulate Clostridium Difficile Toxin B Pathogenicity in Epithelial Cells. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7739–7750.
- (42) Goud, T. V.; Tutar, A.; Biellmann, J.-F. Synthesis of 8-Heteroatom-Substituted 4,4-Difluoro-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene Dyes (BODIPY). *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5084–5091.
- (43) Obando, O.; Morales, P.; Caceres, D. Borazinas Fluorinadas. *Rev. Colomb. Química* **1984**, *13*, 99–107.
- (44) Treich, N. R.; Wimpenny, J. D.; Kieffer, I. A.; Heiden, Z. M. Synthesis and Characterization of Chiral and Achiral Diamines Containing One or Two BODIPY Molecules. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 14370–14378.
- (45) Bharathi, M. V.; Chhabra, M.; Paira, P. Development of Surface Immobilized 3-Azidocoumarin-Based Fluorogenic Probe via Strain Promoted Click Chemistry.

*Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 5737–5742.

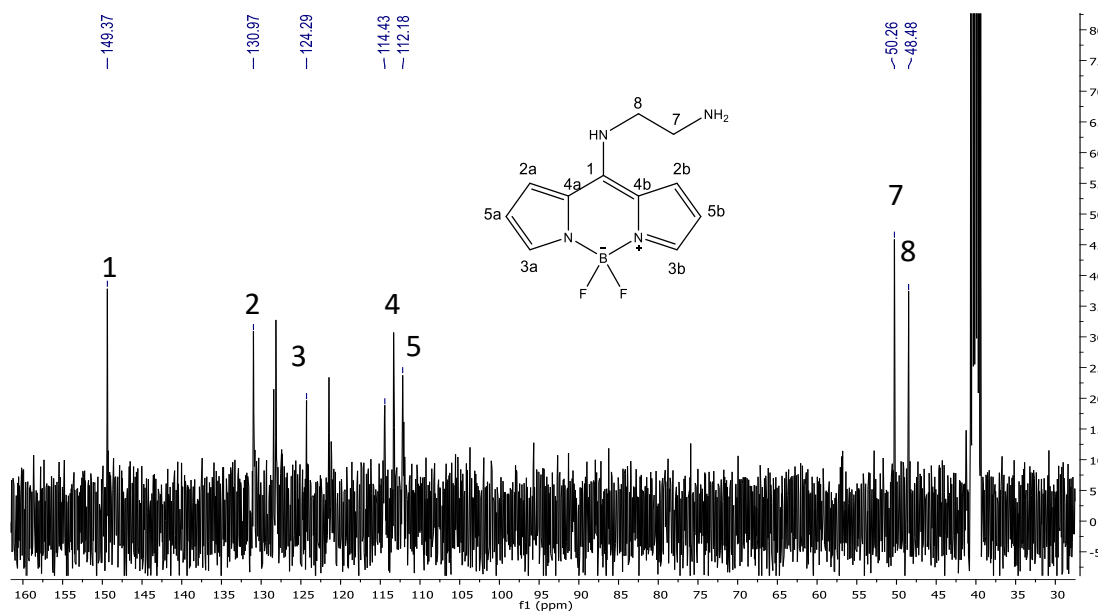
## VIII. ANEXOS



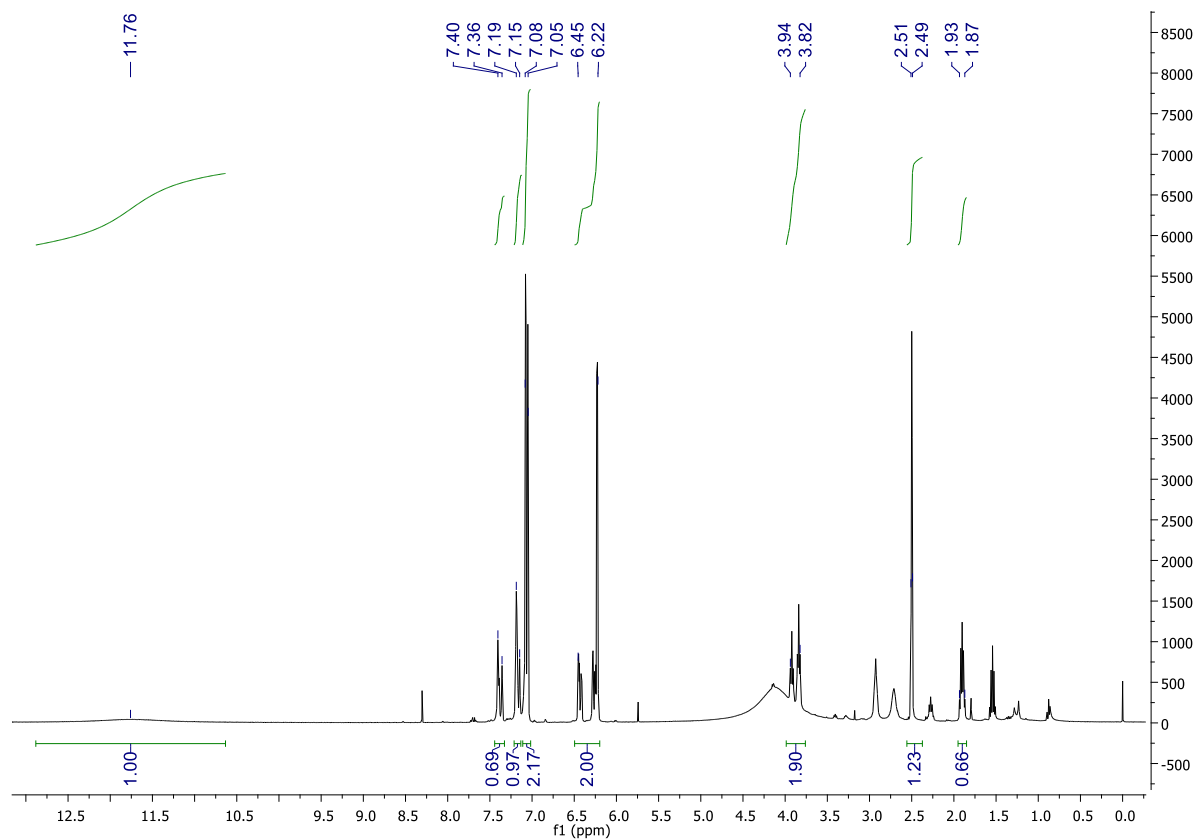
Anexo 1.  $^1\text{H}$  NMR del compuesto **5** en  $\text{CDCl}_3$



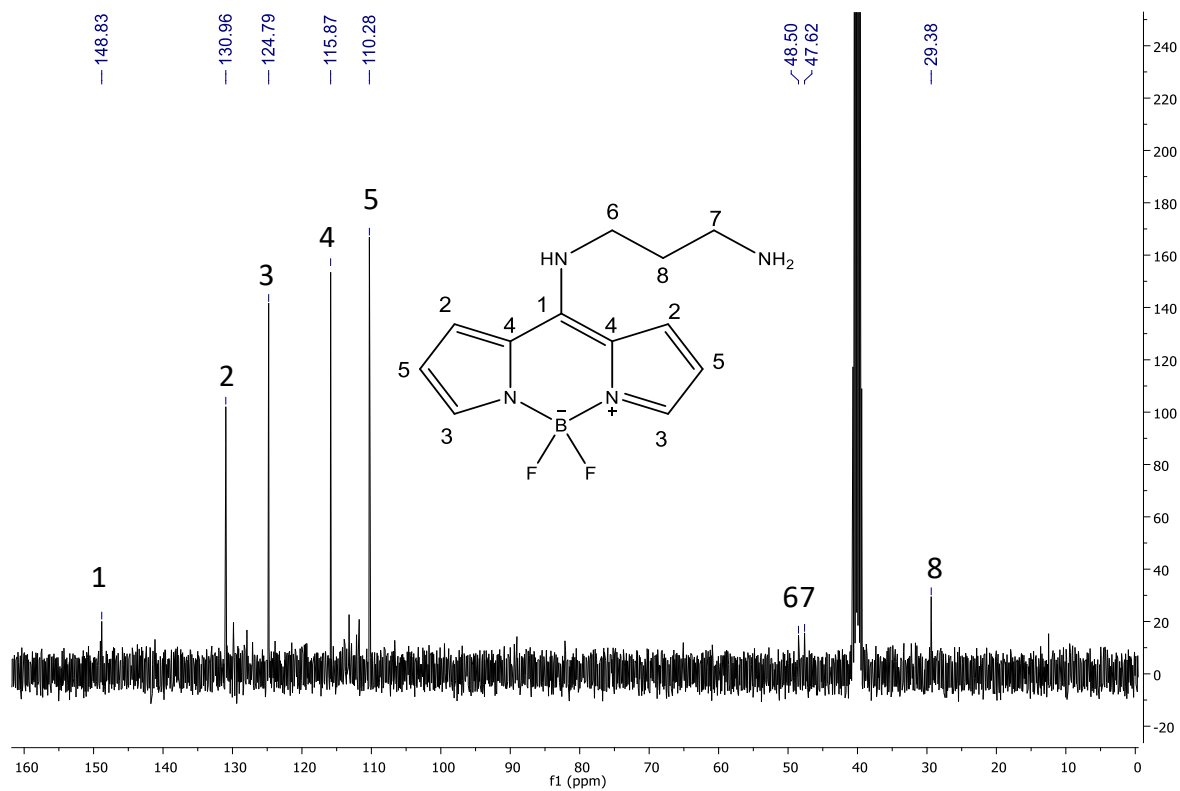
**Anexo 2. <sup>1</sup>H NMR del compuesto 6a en CDCl<sub>3</sub>**



**Anexo 3. <sup>13</sup>C NMR del compuesto 6a en CDCl<sub>3</sub>**

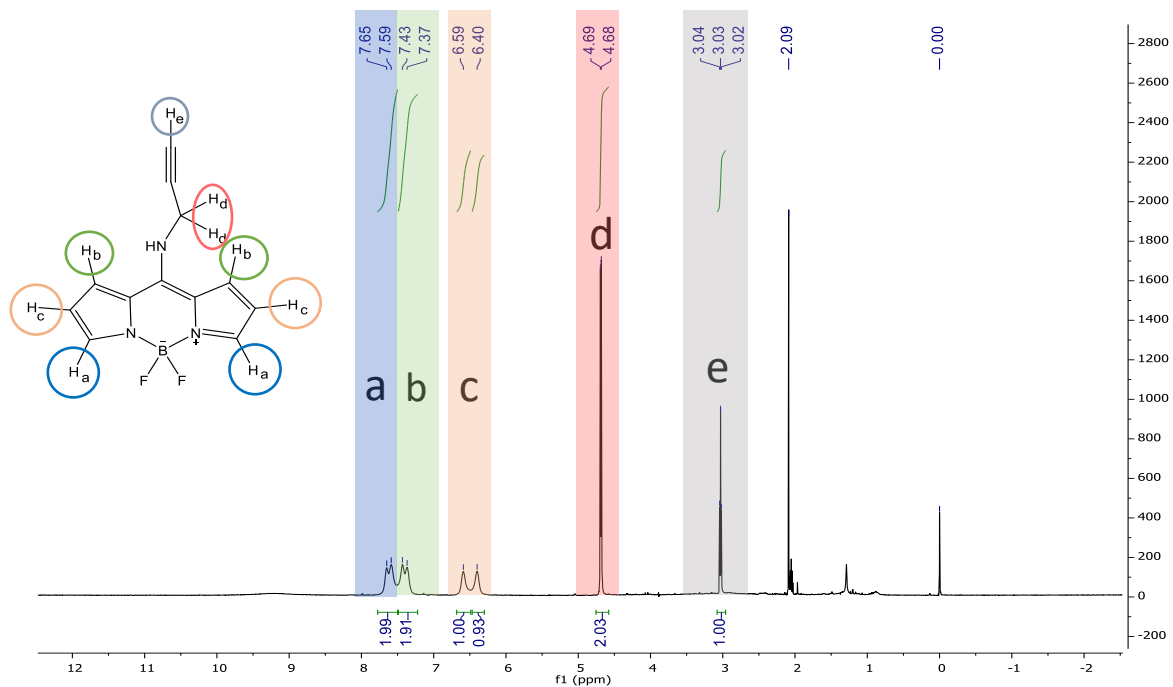


Anexo 4.  $^1\text{H}$  NMR del compuesto **6b** en  $\text{CDCl}_3$

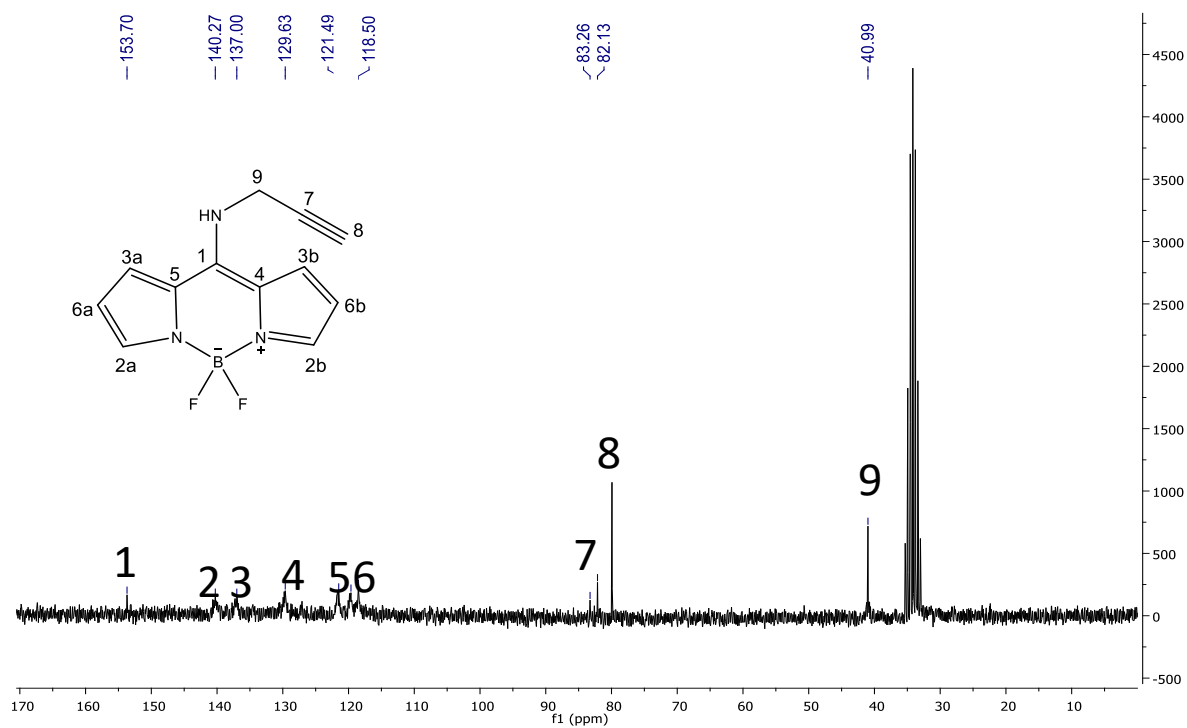


Anexo 5.  $^{13}\text{C}$  NMR del compuesto **6b** en  $\text{CDCl}_3$ .

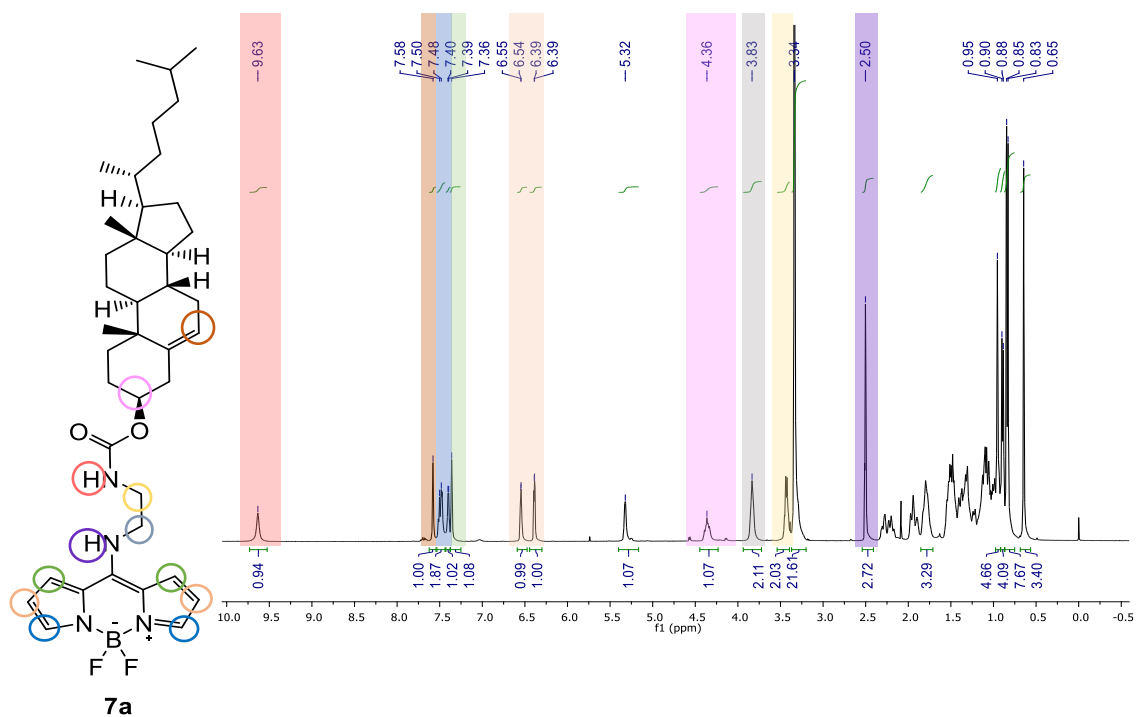




Anexo 6.  $^1\text{H}$  NMR del compuesto **6f** en  $\text{CDCl}_3$



Anexo 7. <sup>13</sup>C NMR del compuesto **6f** en CDCl<sub>3</sub>



Anexo 8. <sup>1</sup>H NMR del compuesto **7a** en CDCl<sub>3</sub>

## CAPÍTULO II: QUÍMICA CLICK

## I. INTRODUCCIÓN

El grupo de Karl Barry Sharpless definió a la química click como reacciones cuyo objetivo es unir dos bloques de construcción moleculares, de manera selectiva y bajo condiciones de reacción suaves, obteniendo rendimientos altos, generando solo subproductos de reacción inofensivos y fáciles de separar por métodos no cromatográficos. Con ello definió las características que deberían tener las reacciones que pretenden ser utilizadas para la modificación de material biológico, como es el caso de la formación de bioconjugados.<sup>45</sup> Entre las características más deseadas en el proceso de química click se encuentran compatibilidad con agua u oxígeno; se pueden utilizar materiales y reactivos disponibles fácilmente; se puede llevar a cabo en ausencia de solventes o con solventes inofensivos y sencillamente removibles, además de obtención de productos fáciles de aislar y estables bajo condiciones fisiológicas.<sup>46</sup>

Entre las reacciones click más comunes se encuentran las reacciones tiol-eno, reacciones de oximas, reacciones de Diels Alder, adición de Michael y reacciones piridilsulfoniluradas; sin embargo, la reacción más conocida y en la que se piensa cuando se habla de química click es la cicloadición de alquinos con azidas orgánicas.<sup>47</sup>

---

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación

La química click permite realizar la unión de dos moléculas con buena selectividad y en condiciones de reacción suaves, indispensables en el manejo y modificación de material biológico, por lo que el estudio de la reacción es importante para encontrar las condiciones de catálisis óptimas, compatibles con sistemas biológicos.

### 2.2 Objetivo general

El objetivo general de este apartado es estudiar las condiciones óptimas de catálisis en la reacción de click, para poder ser utilizadas en la formación de bioconjugados.

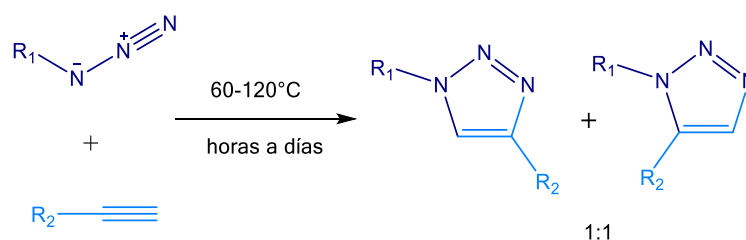
### 2.3 Objetivos específicos

- i. Estudiar el efecto de diferentes fuentes de cobre<sup>+1</sup> en la reacción click modelo, mediante la preparación del catalizador por métodos *in situ*:
  - a) Por la reducción química de sales de Cu<sup>+2</sup> en solución y
  - b) Por la oxidación de cobre metálico en una celda electroquímica de tres electrodos.
- ii. Encontrar las condiciones óptimas para la reacción click con los reactivos modelos utilizados en el estudio.
- iii. Sinterizar bioconjugados con las condiciones óptimas de la reacción click encontradas en el estudio.
- iv. Caracterizar los productos de reacción por técnicas espectroscópicas: Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), UV-vis y Fluorescencia Molecular (FM); y espectrométricas; Espectrometría de Masas (EM).

### III. ANTECEDENTES

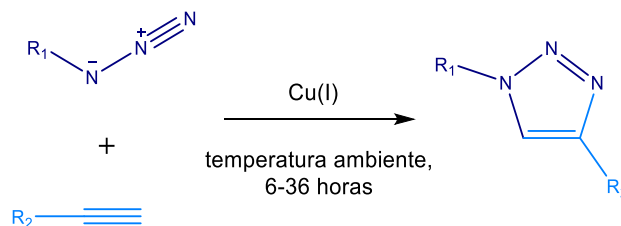
#### 3.1 Reacción cicloadición alquino-azida catalizada con cobre

El grupo de Huisgen fue el primero en realizar la cicloadición 1,3 dipolar de azidas con alquinos terminales en 1963. La cicloadición de Huisgen origina la mezcla entre los productos 1,4 y 1,5-disustituídos. La reacción se lleva a cabo mediante calentamiento (60-120°C) y puede durar de horas a días (Esquema 14).<sup>48</sup>



**Esquema 14.** Reacción de cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen.

El grupo de investigación de Sharpless reportó en el año 2002, la reacción de click 1,3-dipolar, la cual es catalizada con  $\text{Cu}^{+1}$ . La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y tiene conversiones altas en tiempos menores que la cicloadición sin catalizar reportada por Huisgen, además, es regioselectiva para la obtención de los triazoles 1,4-disustituídos (Esquema 15).<sup>49</sup>



**Esquema 15.** Reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada con cobre.

---

La CuAAC se ha convertido en uno de los modelos más utilizados en el estudio de fármacos, síntesis orgánica y ciencia de los materiales debido a su campo de aplicación amplio, su fácil implementación y los rendimientos de reacción altos, además de que no se ve afectada por la presencia de grupos funcionales, puede proceder con diversas fuentes de  $\text{Cu}^{+1}$ .<sup>47,50</sup>

El uso de la química click se ha visto incrementado en aplicaciones de diversas disciplinas, como química orgánica, química farmacéutica, ciencia de materiales, polímeros, sobre todo, en bioconjugación, etc.<sup>51</sup>

El grupo de Bharathiy y colaboradores reportó una sonda de imagen con la reacción cicloadición 1,3-dipolar, en la cual se inmoviliza selectivamente bioconjugados en fase sólida. Los análogos de azido cumarina se hicieron reaccionar con alquinos (no fluorescentes) para formar triazoles fluorescentes, útiles para aplicaciones biológicas, especialmente para etiquetado *in vivo*.<sup>45</sup>

### 3.2 Electro síntesis orgánica

La electroquímica es un método limpio que permite obtener muchos intermediarios de reacción de forma no termal. Las moléculas pueden ser activadas por la adición o remoción de electrones mediado por un electrodo. Las conversiones en electroquímica son limpias, se pueden llevar a cabo directamente en el electrodo, usando un electrodo para generar una molécula reactiva o un reactivo de transferencia de electrón.<sup>52</sup>

La electro síntesis orgánica se considera un método verde ya que permite reemplazar oxidantes o reductores tóxicos, se pueden generar reactivos inestables o peligrosos para el ambiente de manera *in situ*, esto reduce el gasto energético, además, como el flujo de electrones se puede controlar mediante el voltaje aplicado, las reacciones se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente.<sup>53</sup>

En todos los casos las reacciones se realizan en celdas electroquímicas, que son fáciles de construir. Se utilizar una solución de un electrolito de soporte en un

solvente polar para mejorar la conductividad del medio. El electrolito generalmente es una sal, debiendo transportar la corriente que pasa entre los electrodos, además de ser inerte al potencial de oxidación o reducción utilizados.<sup>52</sup>

Las celdas deben tener un ánodo y un cátodo. El electrodo donde se realiza la reacción deseada se conoce como electrodo de trabajo, el potencial del electrodo de trabajo se puede controlar con respecto a un electrodo de referencia. El circuito eléctrico se cierra utilizando un tercer electrodo, que se conoce como contraelectrodo.<sup>53</sup>

La energía es modificada utilizando una fuente de poder, el cátodo va conectado al polo negativo de la fuente de poder de corriente directa, y el ánodo al polo positivo.<sup>52</sup> En una reacción electroquímica, las moléculas son activadas por la adición o remoción de electrones en la superficie de un electrodo. La adición de un electrón proveniente del cátodo al LUMO de la molécula genera la reducción, mientras que en el ánodo ocurre lo contrario, la remoción de un electrón del HOMO da como resultado la oxidación de la molécula. La transferencia electrónica a la molécula ocurre en la superficie del electrodo y se considera un proceso heterogéneo, la reacción química deseada procede en la solución.<sup>53</sup>

### **3.3 Hipótesis**

El estudio de la catálisis de la química click permitirá encontrar las condiciones de reacción óptimas, para realizar la unión de materiales de interés biológico, de forma rápida y con rendimientos de conversión altos, para la generación de bioconjugados.



---

## IV. EXPERIMENTAL

### 4.1 Generalidades

El desarrollo de la síntesis convencional de triazoles se realizó en el laboratorio de síntesis orgánica en fase sólida. El desarrollo de la síntesis electroquímica se realizó en el laboratorio de tratamiento de aguas. Ambos laboratorios se encuentran en las instalaciones del Centro de Graduados e Investigación en Química, del Instituto Tecnológico de Tijuana.

### 4.2 Técnicas analíticas

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , fueron obtenidos con un equipo Varian de 200 MHz modelo Mercury a 300 K, usando tubos con 5 mm de muestra en  $\text{CDCl}_3$  y/o dimetil sulfóxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) están expresados en partes por millón (ppm). En la parte superior de los espectros se muestra el desplazamiento químico de las señales, mientras que en la parte inferior se muestra su área bajo la curva.

Los espectros de IR fueron obtenidos con un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer FT-IR 1600.

Los espectros de masa fueron obtenidos con un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C MS a 70 eV por inserción directa.

La morfología y la composición elemental de la superficie fueron determinadas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) JEOL 7800F Prime. La espectroscopia de energía dispersiva (EDS) se determinó con un Bruker QUANTAX 200.

La voltamperometría cíclica se realizó usando un potentiostato-galvanostato BASI. Las electrólisis para síntesis de triazoles se llevaron a cabo usando un potentiostato-galvanostato Autolab. En ambos equipos se utilizó el software Epsilon.

### 4.3 Cromatografía

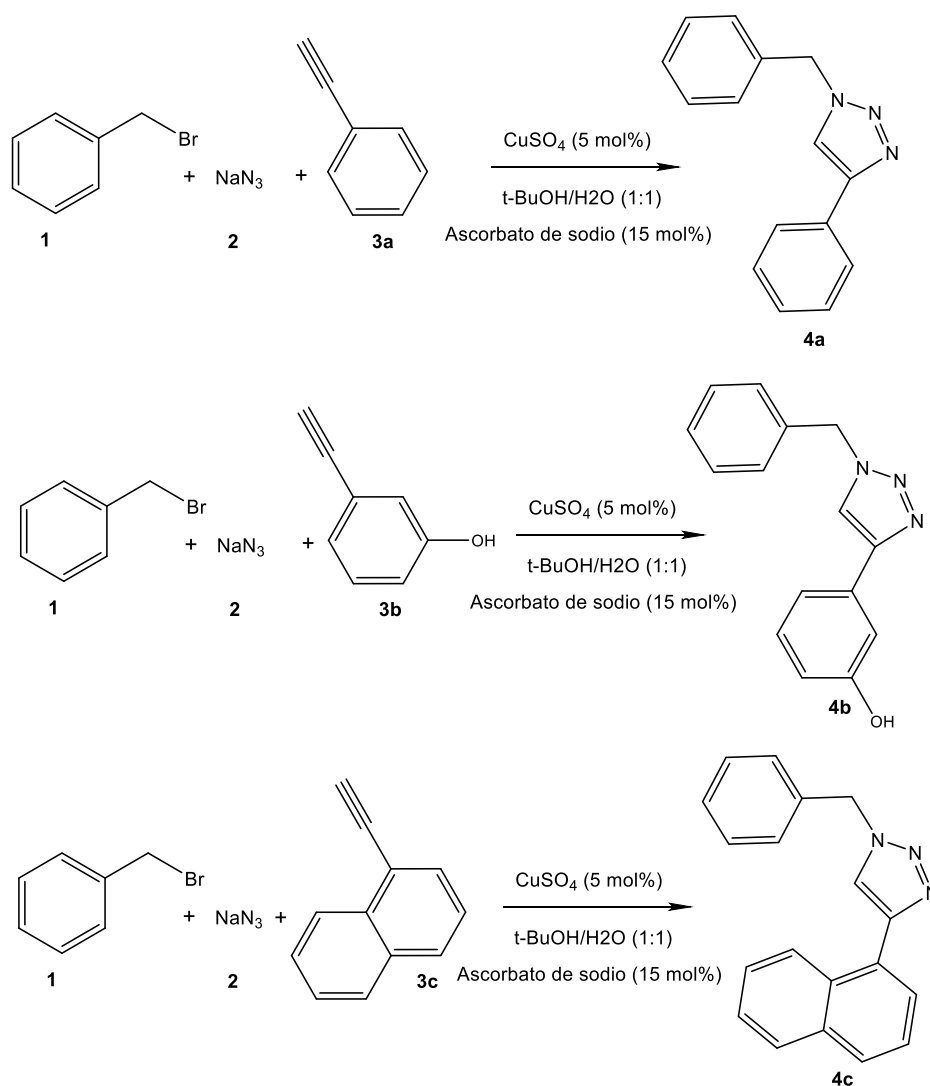
Los compuestos sintetizados fueron detectados por cromatografía de capa fina, utilizando placas de gel de sílice 60 sobre soporte de aluminio, con indicador F<sub>254</sub>, siendo reveladas por exposición a la luz UV.

### 4.4 Síntesis de triazoles por metodología convencional

A partir del uso de bromuro de bencilo (**1**), azida de sodio (**2**) y un alquino (fenilacetileno (**3a**), 3-hidroxifenilacetileno (**3b**) o 1-etinilnaftaleno (**3c**), según el experimento), se probó el sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) como reactivo modelo precursor de Cu<sup>+1</sup>, para obtener los triazoles **4a-c**. Los compuestos **4a-c** se utilizaron como productos modelo para el estudio del rendimiento obtenido en la reacción click.

En un vial de 20 mL se agregaron 4 mL de una mezcla *tert*-butanol/agua (t-BuOH/H<sub>2</sub>O) en proporciones 1:1, bromuro de bencilo (0.100 mL, 0.840 mmol, 1 eq.) y azida de sodio (60.1 mg, 0.924 mmol, 1.1 eq.), se dejó en agitación por 8 horas. Posteriormente se agregó ascorbato de sodio (15 mol%, 0.126 mmol), sulfato de cobre (5 mol%, 0.042 mmol) y por último, se agregó el alquino correspondiente según el experimento: fenilacetileno (0.092 mL, 0.840 mmol), para obtener el 1-bencil-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (**4a**); 3-hidroxifenilacetileno (0.056 mL, 0.840 mmol), para obtener el 3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenol (**4b**); o 1-etinilnaftaleno (**7**) (0.120 mL, 0.840 mmol), para obtener el 1-bencil-4-(naftalen-1-il)-1H-1,2,3-triazol (**4c**); como se muestra en el Esquema 16.

La mezcla se dejó en agitación vigorosa durante 60 minutos. El crudo de reacción se filtró con una capa de tierra de diatomácea pequeña y sílica gel, posteriormente se extrajo con 100 mL de acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica se concentró a presión reducida (170 mbar, 50°C) hasta obtener los sólidos correspondientes a los compuestos **4a-c**.



**Esquema 16.** Reacción click usando sulfato de cobre como precursor metálico, por el método convencional.

## 4.5 Síntesis de triazoles por oxidación electroquímica

### 4.5.1 Preparación de solución de electrolito

El equivalente a 0.1 mmol de sal de tetrabutilamonio tetrafluoroborato (TBATFB) se colocó en un matraz con 40 mL de *tert*-butanol/agua (1:1), la mezcla se mantuvo en agitación magnética por 2 minutos para disolver el sólido, después se pasó a un matraz volumétrico y se aforó a 50 mL.

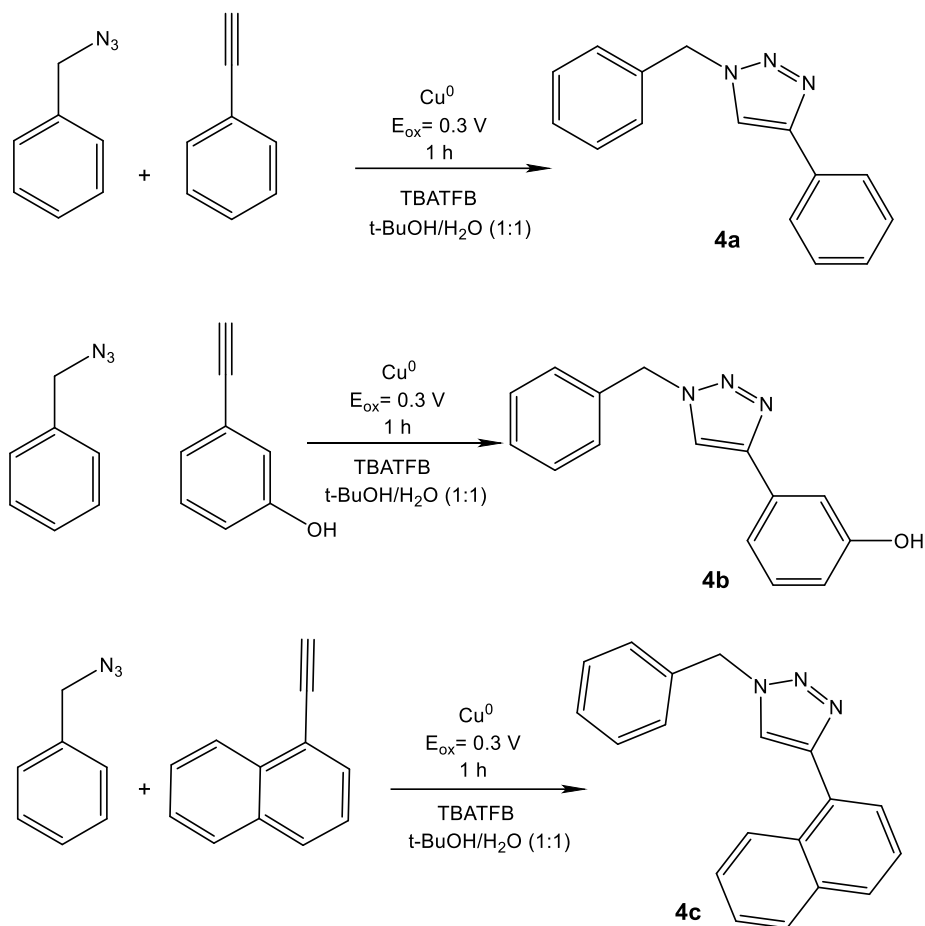
#### 4.5.2 Oxidación electroquímica de cobre metálico

En una celda electroquímica de 20 mL se colocaron 4 mL del electrolito de soporte. Se usó un sistema típico de 3 electrodos: una placa de Cu<sup>0</sup> de alta pureza (0.25 cm<sup>2</sup> de área) se usó como electrodo de trabajo (ET), un alambre de Pt se usó como contra electrodo (CE), y un alambre de Ag/AgCl inmerso en una solución saturada de KCl/*tert*-butanol/agua (1:1) como electrodo de referencia. Se realizó una voltamperometría cíclica de la placa de Cu<sup>0</sup> para seleccionar el potencial de electrooxidación apropiado para la evaluación. El potencial del electrodo se usó para la electrosíntesis de triazoles.<sup>54</sup>

#### 4.5.3 Oxidación de cobre por pulso continuo

En una celda electroquímica de 20 mL se agregaron 4 mL del electrolito de soporte, el electrodo de Cu<sup>0</sup>, el electrodo de Pt y el electrodo de Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> sat KCl (*tert*-butanol /agua). Posteriormente se agregaron los reactivos para la síntesis de triazoles: bromuro de bencilo (0.100 mL, 0.840 mmol, 1 eq.), azida de sodio (60.1 mg, 0.924 mmol, 1.1 eq.) y por último, se agregó el alquino correspondiente según el experimento: fenilacetileno (0.092 mL, 0.840 mmol), para obtener el 1-bencil-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (**4a**); 3-hidroxifenilacetileno (0.056 mL, 0.840 mmol), para obtener el 3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenol (**4b**); o 1-etinilnaftaleno (**7**) (0.120 mL, 0.840 mmol), para obtener el 1-bencil-4-(naftalen-1-il)-1H-1,2,3-triazol (**4c**); como se muestra en el Esquema 17.

La mezcla de reacción se dejó en agitación magnética y se inyectó atmósfera inerte, simultáneamente, se aplicó un potencial de 0.3 V con un potencióstato/galvanostato, por 60 minutos. Finalizado el tiempo de reacción, la mezcla se filtró con una capa de tierra de diatomácea y sílica gel, posteriormente se extrajo con 40 mL de AcOEt. La fase orgánica se concentró a presión reducida (240 mbar, 50 °C) hasta obtener los productos **4a-c** secos.



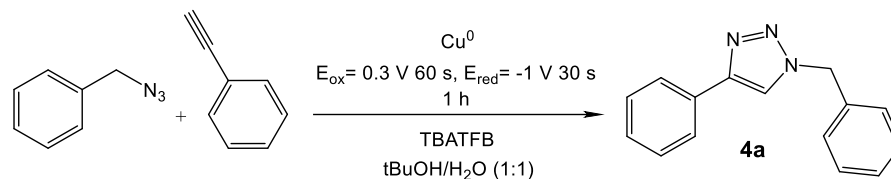
**Esquema 17.** Triazoles obtenidos por la reacción de electro-click.

#### 4.5.4 Oxidación de cobre por pulso inverso:

En una celda electroquímica de 20 mL se agregaron 4 mL del electrolito de soporte, el electrodo de  $\text{Cu}^0$ , el electrodo de Pt y el electrodo de  $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{\text{satKCl}}$  (*tert*-butanol/agua). Posteriormente se agregaron los reactivos para la síntesis de triazoles: bromuro de bencilo (0.100 mL, 0.840 mmol, 1 eq.), azida de sodio (60.1 mg, 0.924 mmol, 1.1 eq.) y fenilacetileno (0.092 mL, 0.840 mmol).

La mezcla de reacción se dejó en agitación magnética y se inyectó atmósfera inerte, simultáneamente, se aplicó un programa de pulsos por 1 hora, alternando un

potencial de oxidación de 0.3 V por 60 segundos con un potencial de reducción de -1.0 V por 30 segundos (Esquema 18).



**Esquema 18.** Reacción electro-click por pulso inverso

*1-bencil-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (4a)*: Sólido blanco; **Rendimiento**: ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.; **P.f.**: 119-121°C; **IR(ATR)**: 3142-3027, 1609-1548, 1077-1026, 725-695, 830 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 7.80-7.77 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.42-7.29(m, 8H), 5.55 (s, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 148.0 (C), 134.7 (C), 130.5 (C), 129.1 (3CH), 128.8 (4CH), 128.0 (3CH), 125.7 (CH), 54.2 (CH<sub>2</sub>); **EM (e/m)**: 235.0 uma.

*3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenol (4b)*: Sólido viscoso verde olivo; **Rendimiento**: ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.; **IR(ATR)**: 3684-3160, 3136-3027, 1636-1511, 1226, 1057, 830 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 8.96 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.36-7.32 (m, 6H) 7.23-7.20 (m, 2H), 6.81-6.79 (d, 2H) 5.56 (s, 2H); **RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 157.8 (C), 148.1 (C), 134.9 (2C), 131.7 (2CH), 129.9 (2CH), 129.1 (2CH), 128.0 (CH), 120.0 (CH), 115.6 (2CH), 54.1 (CH<sub>2</sub>); **EM (e/m)**: 251.1 uma.

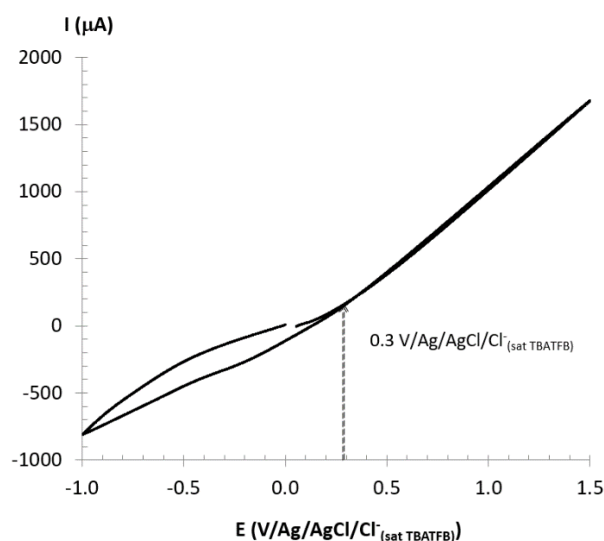
*1-bencil-4-(naftalen-1-il)-1H-1,2,3-triazol (4c)*: Aceite café rojizo; **Rendimiento**: ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.; **IR(ATR)**: 3147-3033, 1508-1412, 1053, 803 cm<sup>-1</sup>; **RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)**: δ 8.40-8.37 (d, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.72-7.70 (dd, 1H), 7.54-7.52 (m, 4H), 7.42-7.40 (m, 6H), 7.28 (s, 1H), 5.68 (s, 1H); **RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 147.4 (C), 134.7 (C), 133.9 (C), 131.1 (C), 129.2 (C), 128.9-128.9 (CH) 128.2 (3CH), 127.2 (2CH), 126.6 (2CH), 126.0 (2CH), 125.5 (CH), 125.3 (CH), 122.4 (CH), 54.3 (CH<sub>2</sub>); **EM (e/m)**: 285.1 uma.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Oxidación electroquímica de cobre metálico

El  $\text{Cu}^0$  como electrodo anódico, forma especies  $\text{Cu}^{+1}$  y/o  $\text{Cu}^{+2}$  en medio acuoso<sup>55,56,57,58</sup> El proceso de formación de especies  $\text{Cu}^{+1}$  puede ser controlado, controlando el potencial del electrodo y las condiciones de la solución.

La placa de Cu se sumergió en el electrolito de soporte para determinar el comienzo de su potencial de electro oxidación, en TBATFD disuelto en tert-butanol/agua, los cuales sirvieron como electrolito de soporte. Se realizó una voltamperometría cíclica bajo estas condiciones, a partir de la Figura 30 se puede observar que a 0.3 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> sat KCl es el comienzo del potencial para la electro disolución de Cu, en el medio de reacción compatible con la síntesis de triazoles, dicho potencial es más positivo comparado con el valor termodinámico de la electro oxidación de  $\text{Cu}^0$  a  $\text{Cu}^{+2}$  en medio acuoso (0.12 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> sat KCl) y el mismo que  $\text{Cu}^0$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , confirmando la formación de  $\text{Cu}^{+1}$  en la superficie del electrodo. Para la síntesis orgánica electro-asistida (SOEA) de triazoles a un potencial constante, se usó el potencial de 0.3 V vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> sat KCl, asumiendo que la electro-oxidación sería muy lenta a este potencial del electrodo.<sup>59</sup>

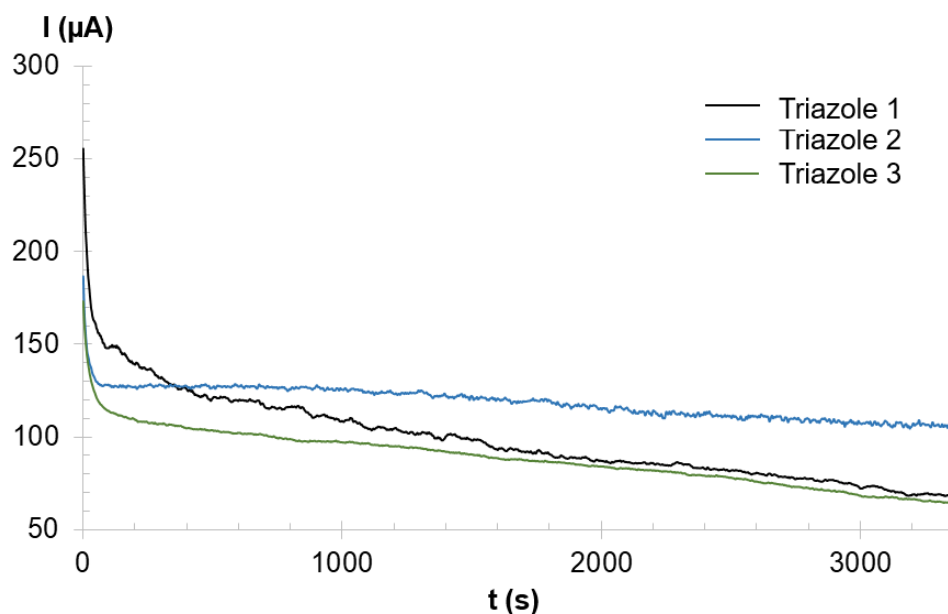


**Figura 30.** Voltamperometría cíclica de la placa de  $\text{Cu}^0$  en el electrolito de soporte (TBATFB en tert-butanol/agua).

## 5.2 Comparación de rendimientos entre método convencional y oxidación electroquímica

Se realizó la síntesis de tres diferentes triazoles catalizada por la oxidación electroquímica de una placa de  $\text{Cu}^0$ . La oxidación se llevó a cabo aplicando un pulso constante de 0.3 V.

La SOEA de triazoles fue registrada en una gráfica de corriente contra tiempo, representada por la electrólisis de una celda sin división de tres electrodos, usando como ET una placa de  $\text{Cu}^0$  de alta pureza, para producir un catalizador sólido para la síntesis a temperatura ambiente (Figura 31). Para los tres triazoles se puede observar una caída en la corriente similar entre sí, sugiriendo la pasivación de la superficie después de los primeros 8 minutos de la reacción, aproximadamente. La pasivación de la superficie es principalmente, un efecto producido por los triazoles. Estos compuestos son bien conocidos por su acción como inhibidores de corrosión metálica.<sup>60</sup>


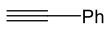
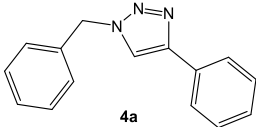

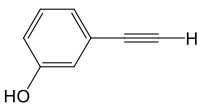
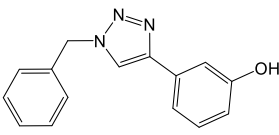

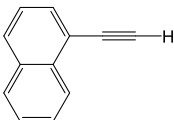
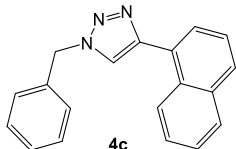


**Figura 31.** Electrólisis de la electro-oxidación de Cu a un voltaje constante 0.3V/Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>sat</sub> KCl(tert-butanol/agua) using TBATFB 1mM como electrolito de soporte.



Los rendimientos obtenidos por este método de síntesis se compararon con los obtenidos por el método tradicional reportado, en el cual se utilizó  $\text{CuSO}_4$  y ascorbato de sodio para catalizar la reacción. En la Tabla 14 se presentan los reactivos y rendimientos de reacción utilizados en los dos diferentes métodos. Se puede observar que en ambos procedimientos los rendimientos siguen una misma tendencia, los rendimientos más altos fueron obtenidos en el alquino policíclico, sugiriendo una mejor catálisis para la reacción click para triazoles voluminosos.

**Tabla 14.** Comparación entre los rendimientos de reacción obtenidos entre el método convencional de síntesis de triazoles y el método electroquímico.

Azida	Alquino	Producto	Rendimiento a 60 minutos		Equivalente Molar Electrolytico
			Método Convencional (%)	Método Electroquímico (%)	$\text{Cu}^{+1} (\mu\text{M})$
			56	78	1.36
			66	86	1.94
			61	90	1.18

El método convencional muestra un 56% de rendimiento a 60 minutos, para el compuesto **4a**, mientras que, en el mismo tiempo, el método electroquímico muestra un rendimiento del 78%, lo que representa un incremento del 22% en el desempeño de la reacción. Para el compuesto **4b**, el método electroquímico nos da un rendimiento del 86%, dando un incremento del 20% comparado con el rendimiento obtenido del

método general (66%). Para el compuesto **4c**, el método general muestra el rendimiento más modesto de 61%, el cual fue mejorado notoriamente por el método electroquímico con un incremento de casi 30%, mostrando un 90% del rendimiento de reacción en una hora. El método electroquímico muestra incrementos de más de 20% en el rendimiento de reacción en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que el método convencional. Estos resultados indican que la formación de  $\text{Cu}^{+1}$  en la superficie de la placa de  $\text{Cu}^0$  fue eficiente, lo cual aumentó la velocidad de la reacción.

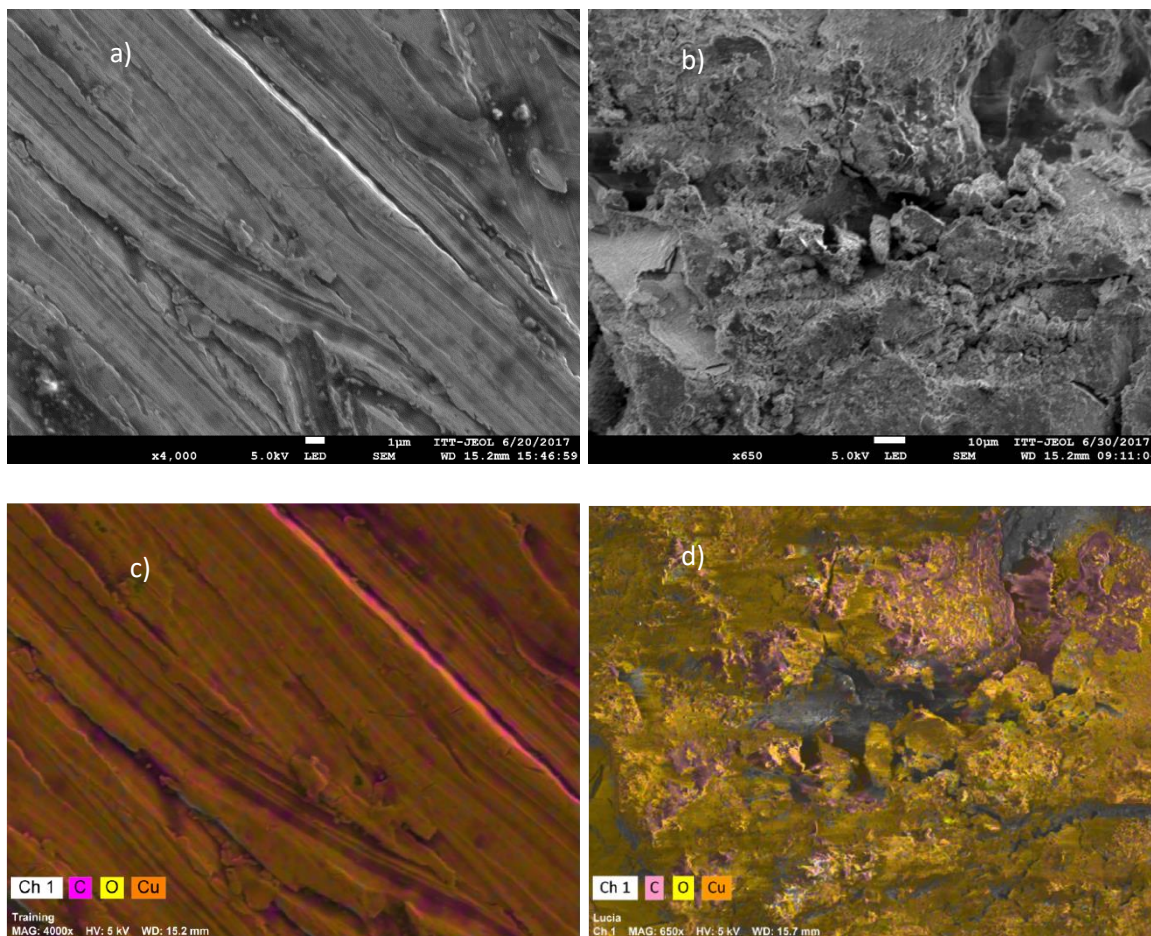
### 5.3 Estudio de la superficie y análisis elemental por FESEM

El estudio de morfología de la placa de  $\text{Cu}^0$ , antes y después de la SOEA, se realizó por FESEM y análisis elemental EDS. Las dos muestras fueron analizadas sin ninguna preparación adicional para el estudio.

La Figura 32. Imagen de FESEM de la placa de Cu: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrolisis, c) Mapa de análisis elemental EDS, antes de la electrolisis, d) Mapa de análisis elemental EDS EDS, después de la electrolisis. permite describir el efecto de la oxidación electroquímica en el ET. En el apartado b y c se puede observar el cambio que sufrió la placa, al formarse nuevas especies sobre la superficie. Durante la SOEA, la placa de  $\text{Cu}^0$  pareció disolverse lentamente en el medio de reacción y se volvió azul, color que se reveló en mayor superficie de la placa conforme avanzó el tiempo de reacción. Esto es un claro indicador de la formación de  $\text{Cu}^{+1}$ .<sup>61</sup>

Después de la electrólisis, pequeños orificios se formaron en la superficie del ET, lo que demuestra el desprendimiento de especies por efecto de la oxidación.

La Tabla 15 muestra el análisis elemental de EDS de la placa de Cu antes y después de la electrólisis. Estos resultados indican que una nueva fase de Cu se ha formado y mediante la postulación de un mecanismo de reacción, se propone que la nueva fase es  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Se ha reportado anteriormente que  $\text{Cu}_2\text{O}$  se puede formar como sólido cristalino mediante deposición electroquímica en  $\text{Cu}^0$ .<sup>62</sup>



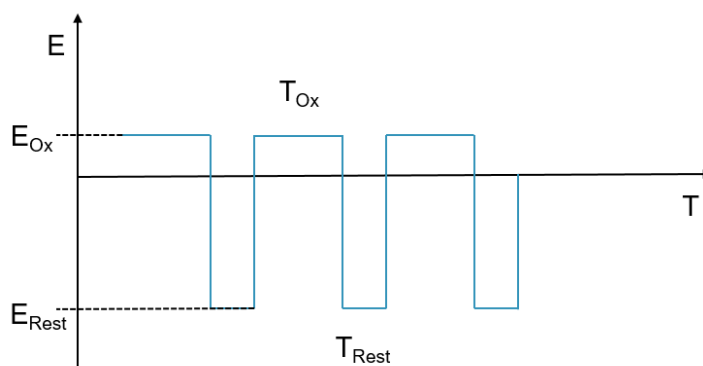
**Figura 32.** Imagen de FESEM de la placa de Cu: a) Antes de la electrólisis, b) Después de la electrólisis, c) Mapa de análisis elemental EDS, antes de la electrólisis, d) Mapa de análisis elemental EDS EDS, después de la electrólisis.

El cambio en el estado de oxidación de  $\text{Cu}^0$  a  $\text{Cu}^{+1}$  puede formar un óxido estable que satura el ET, reduciendo la velocidad de la reacción. Aun así, el rendimiento de la reacción fue mejorado por la electro-oxidación de cobre *in situ*, comparado con la reacción catalizada por  $\text{CuSO}_4$ /ascorbato de sodio. Esto demuestra que el proceso electroquímico es más eficiente y rápido.

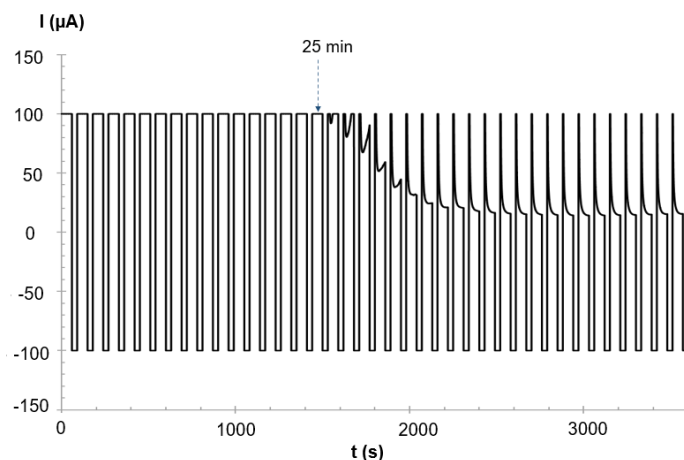
**Tabla 15.** Análisis elemental EDS del ET, antes y después de la SOEA.

Elemento	Antes de la oxidación electroquímica (% atómico)	Después de la oxidación electroquímica (% atómico)
Cu	95.04	63.32
C	3.02	16.23
O	1.36	10.08
Otros	0.58	10.37

Estos resultados sugieren que usando una señal de pulsos se puede mejorar el desempeño de la catálisis metálica y asegurar la actividad constante. Se realizó un segundo experimento electroquímico, utilizando un programa de pulso inverso, que se diseñó para mantener la corriente constante durante toda la electrólisis, para evitar la pasivación de la superficie por la formación de nuevas especies que la inactivan cuando se aplica el pulso constante. La Figura 33 muestra el programa de potencial utilizado, compuesto por 40 ciclos que alterna un pulso de oxidación de 0.3 V por 60 segundos con un pulso de descanso a -1.0 V por 30 segundos.

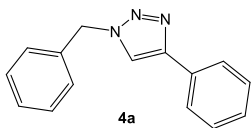
**Figura 33.** Programa de pulsos para la síntesis electroquímica.

Se logró sintetizar el compuesto **4a** utilizando este método, con buenos rendimientos, como se observa en la electrólisis de pulso inverso mostrada en la Figura 34. El programa de pulsos permitió mantener la corriente a 100  $\mu\text{A}$  por los primeros 16 pulsos, lo cual indica que introducir pulsos de descanso entre los pulsos de oxidación evita la pasivación de la superficie los primeros 25 minutos de electrólisis.



**Figura 34.** Electro oxidación pulsada de cobre.

**Tabla 16.** Comparación entre el rendimiento obtenido entre el método convencional y el método electroquímico de pulsos.

Azida	Alquino	Producto	Rendimiento a 60 minutos		Equivalente Molar electroquímico $\text{Cu}^{1+}$ ( $\mu\text{M}$ )
			Método convencional (%)	Método electroquímico de pulsos (%)	
<chem>Ph-CH2-N3</chem>	<chem>Ph-C#C</chem>	 <b>4a</b>	56	92	0.77

En la Tabla 16 se comparó el rendimiento obtenido en el método convencional contra el rendimiento obtenido con el método electroquímico de pulsos. El programa de pulsos mejoró el rendimiento de la síntesis por 36%, para la formación del

compuesto **4a**, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, dando un rendimiento de 92% en una hora de reacción.

Integrando la gráfica corriente-tiempo y usando la ley de Faraday (Ecuación 1), fue posible calcular la cantidad en moles de  $\text{Cu}^{1+}$  producido como catalizador. Esta estimación, nos dice que la cantidad de  $\text{Cu}^{1+}$  generado para catalizar la reacción en el programa de potencial constante fue de 1.5  $\mu\text{mol}$  (promedio de los compuestos 4a-c) en una hora (Tabla 16), que es 10 veces menor que la cantidad de Cu usada en el método convencional. La misma estimación para el programa de potencial en pulsos fue 0.77  $\mu\text{mol}$ . La eficiencia del método se debió a la producción controlada de  $\text{Cu}^{1+}$  bajo condiciones de oxidación electroquímica suaves.

$$m = Q/n F \quad (1)$$

dónde:

m = masa <moles>

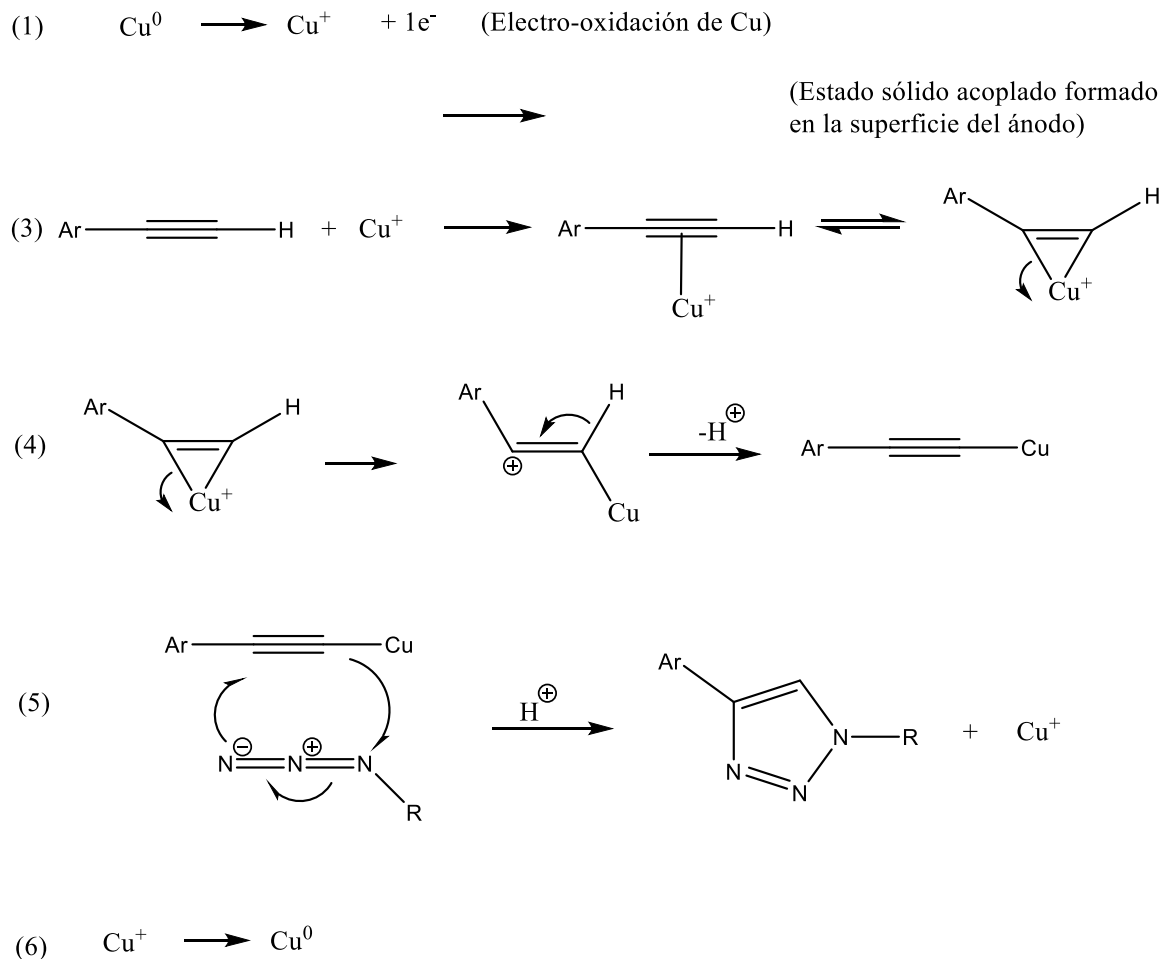
Q = carga <C>

n = número de  $e^-$

F = Constante de Faraday <96485 C/mol>

En el programa de potencial constante, el catalizador era formado en todo el tiempo de reacción, pero se incrementaba en pequeñas cantidades, debido a que la corriente decrecía notablemente debido a la inactivación de la superficie del electrodo de trabajo. Por el contrario, en el programa de pulsos, en los primeros 25 minutos de la reacción, la corriente permanece constante a 100  $\mu\text{A}$ , para ese momento, se generó el 65% del total del catalizador en la reacción. Es por ello que a pesar de que en el programa de pulsos se encuentra una menor cantidad de cobre en la reacción, se obtiene un rendimiento mayor.

El programa de pulsos fue un método más eficiente y verde para sintetizar triazoles, con altos rendimientos y con una cantidad baja de  $\text{Cu}^{1+}$  a 60 minutos.



**Esquema 19.** Mecanismo de reacción propuesto para la formación de triazoles por oxidación electroquímica de  $\text{Cu}^0$ .

Se postuló un mecanismo de reacción que respalda la formación de triazoles por oxidación electroquímica de  $\text{Cu}^0$ . En el Esquema 19 se puede observar el proceso de oxidación que inicia en la placa de cobre (Paso 1). Siguiendo con la formación del catión  $\text{Cu}^{1+}$  que en condiciones básicas puede formar  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Paso 2). Los cationes  $\text{Cu}^{1+}$  actúan como ácido de Lewis y reaccionan con el alquino por adición y formando un complejo piramidal asimétrico (Paso 3). El complejo piramidal se reorganiza para formar la sal de alquino de Cu (Paso 4). Esta sal reacciona con el azida para obtener

como producto un triazol (Paso 5). Finalmente,  $\text{Cu}^{1+}$  puede ser reducido a  $\text{Cu}^0$  (Paso 6). El catión  $\text{Cu}^{1+}$  actúa como catalizador ácido de Lewis, porque, con una pequeña cantidad es suficiente para producir la reacción y este se reutiliza en un proceso cíclico hasta que  $\text{Cu}^{1+}$  es estabilizado como  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Por lo tanto, si la reacción en el proceso cíclico es muy eficiente, una pequeña cantidad de  $\text{Cu}^{1+}$  es requerida y la formación de  $\text{Cu}_2\text{O}$  será mínima, como se demostró en el análisis de FESEM.



**VI. CONCLUSIONES**

- 1) La reacción de química click fue efectiva para unir moléculas permitiendo la formación de conjugados.
- 2) La formación de la especie activa ( $\text{Cu}^{1+}$ ) generada por la oxidación electroquímica fue más eficiente que el método convencional, para la catálisis de la reacción click.
- 3) En este trabajo se utilizaron cantidades pequeñas de cobre para realizar la activación, lo que minimizó la contaminación de los productos (Triazoles).
- 4) El proceso electroquímico generó la cantidad de sal de cobre necesaria *in situ* de manera controlada, para realizar la catálisis en la reacción de química click.
- 5) El método electroquímico fue una forma más rápida y eficiente de realizar la síntesis de triazoles, comparada con el método convencional, al obtener rendimientos del 78-90% en una hora.
- 6) Al aplicar un potencial de pulso inverso se logró sintetizar triazoles con altos rendimientos, en 60 minutos de reacción, con una cantidad pequeña de catalizador de cobre. Este método permitió evitar la pasivación de la superficie.

---

**VII. REFERENCIAS**

- (46) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (47) Liang, L.; Astruc, D. The Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) “Click” Reaction and Its Applications. An Overview. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
- (48) Huisgen, R. 1.3-Dipolare Cycloadditionen. *Angew. Chem.* **1963**, *13*, 604–637.
- (49) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (50) Tale, R. H.; Gopula, V. B.; Toradmal, G. K. Azide – Alkyne Cycloaddition ( CuAAC ) at Low Catalyst Loading. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5864–5869.
- (51) Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. Copper Nanoparticles in Click Chemistry: An Alternative Catalytic System for the Cycloaddition of Terminal Alkynes and Azides. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2358–2362.
- (52) Utley, J. James Utley. *Society* **1997**, *26*, 157–167.
- (53) Frontana-Uribe, B. A.; Little, R. D.; Ibanez, J. G.; Palma, A.; Vasquez-Medrano, R. Organic Electrosynthesis: A Promising Green Methodology in Organic Chemistry. *Green Chem.* **2010**, *12*, 2099–2119.
- (54) Eh, A. L.-S.; Lin, M.-F.; Cui, M.; Cai, G.; Lee, P. S. A Copper-Based Reversible Electrochemical Mirror Device with Switchability between Transparent, Blue, and Mirror States. *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5*, 6547–6554.
- (55) Heli, H.; Jafarian, M.; Mahjani, M. G.; Gobal, F. Electro-Oxidation of Methanol on Copper in Alkaline Solution. *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 4999–

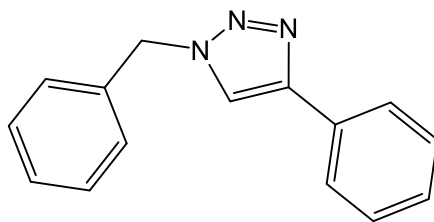
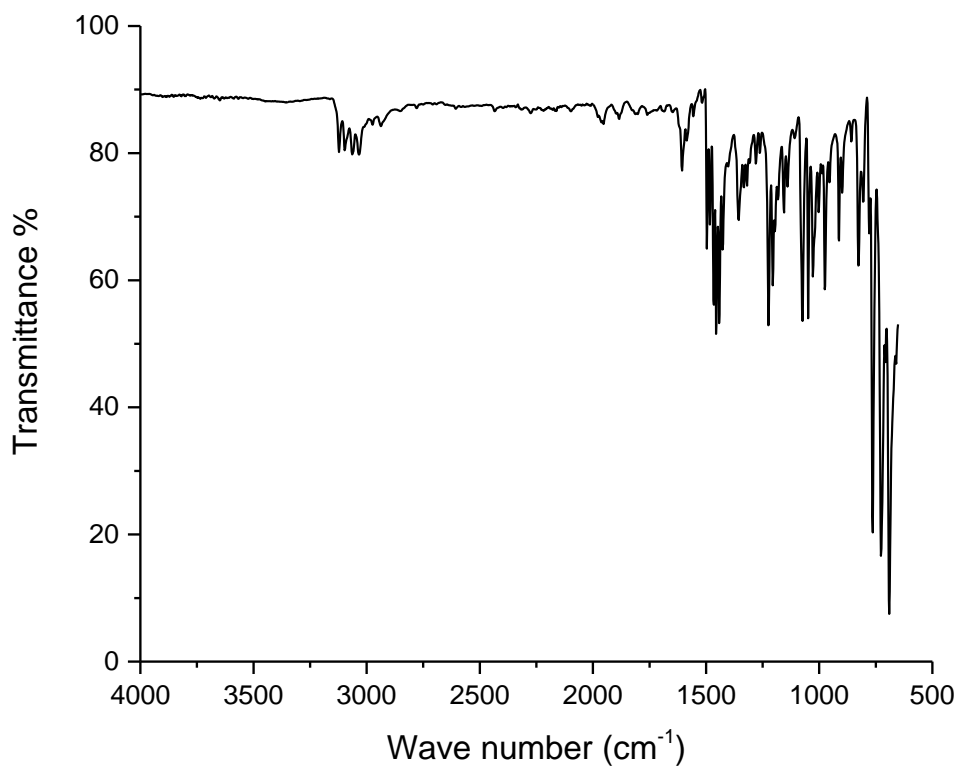
---

5006.

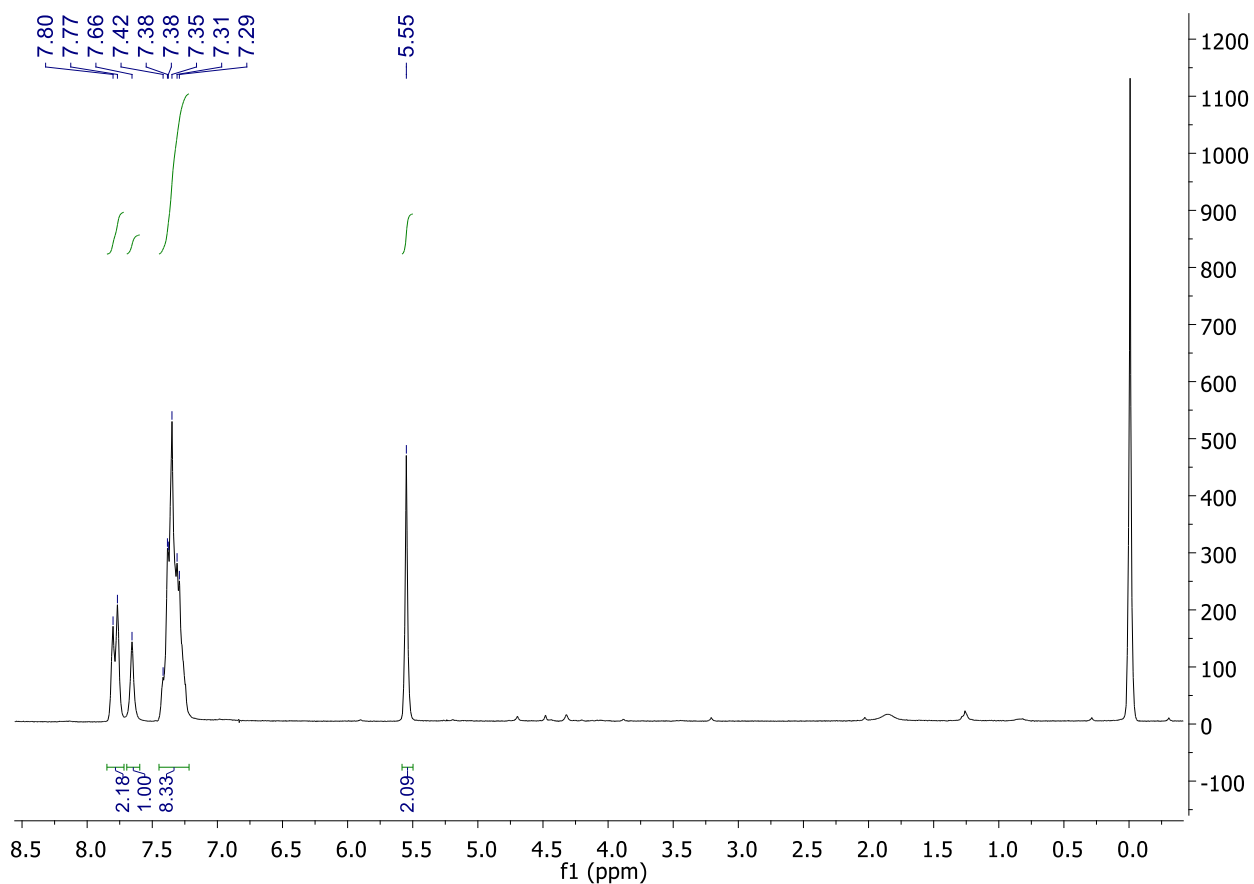
- (56) JAFARIAN, M.; AVEI, M.; Danaee, I.; Gobal, F.; Mahjani, G. Electrochemical Oxidation of Saccharose on Copper (Hydr)Oxide-Modified Electrode in Alkaline Media. *Chinese J. Catal. - CHIN J CATAL* **2010**, *31*, 1351–1357.
- (57) Fineberg, D. J.; Haynes, R.; Jannett, F. J.; Rapp, W. E. Chemical and Electrochemical Oxidation of Copper in Dielectric Millimeter Waveguide Tubes. *J. Appl. Electrochem.* **1983**, *13*, 177–182.
- (58) Auer, A.; Andersen, M.; Wernig, E.-M.; Hörmann, N. G.; Buller, N.; Reuter, K.; Kunze-Liebhäuser, J. Self-Activation of Copper Electrodes during CO Electro-Oxidation in Alkaline Electrolyte. *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 797–803.
- (59) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; White, H. S. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; New York, 1980.
- (60) Faisal, M.; Saeed, A.; Shahzad, D.; Abbas, N.; Larik, A. F. .; Pervaiz, A. C.; Fattah, T. A.; Khan, D. M.; Shehzadi, S. A. No Title. *Corros. Rev.* **2018**, *36*, 507.
- (61) Koffyberg, F. P.; Benko, F. A. A Photoelectrochemical Determination of the Position of the Conduction and Valence Band Edges of P-type CuO. *J. Appl. Phys.* **1982**, *53*, 1173–1177.
- (62) Liao, L. C.-K.; Tung, T.-Y. Fabrication of Compositions of Cu-Cu<sub>2</sub>O Crystal Films by Electrochemical Deposition with Potential Pulse Settings. *Electrochim. Acta* **2018**, *282*, 395–401.

**VIII. ANEXOS**

Espectroscopia de compuestos

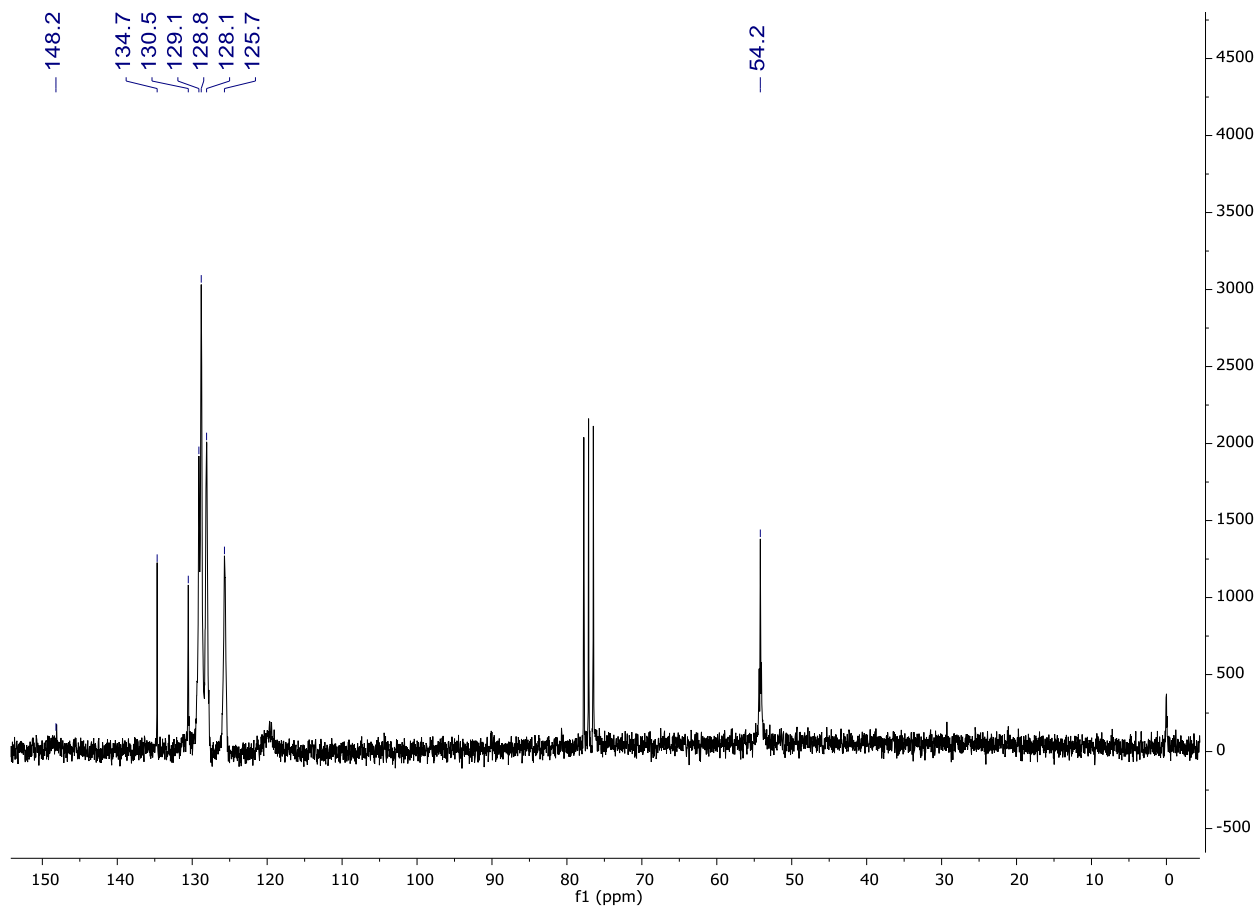
*1-bencil-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (4a)***ESPECTRO INFRARROJO****Anexo 9.** Espectro infrarrojo del compuesto **4a**.

ESPECTRO  $^1\text{H}$  NMR

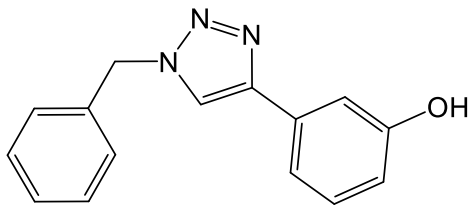


Anexo 10.  $^1\text{H}$  NMR del compuesto **4a** en  $\text{CDCl}_3$

ESPECTRO  $^{13}\text{C}$ -NMR

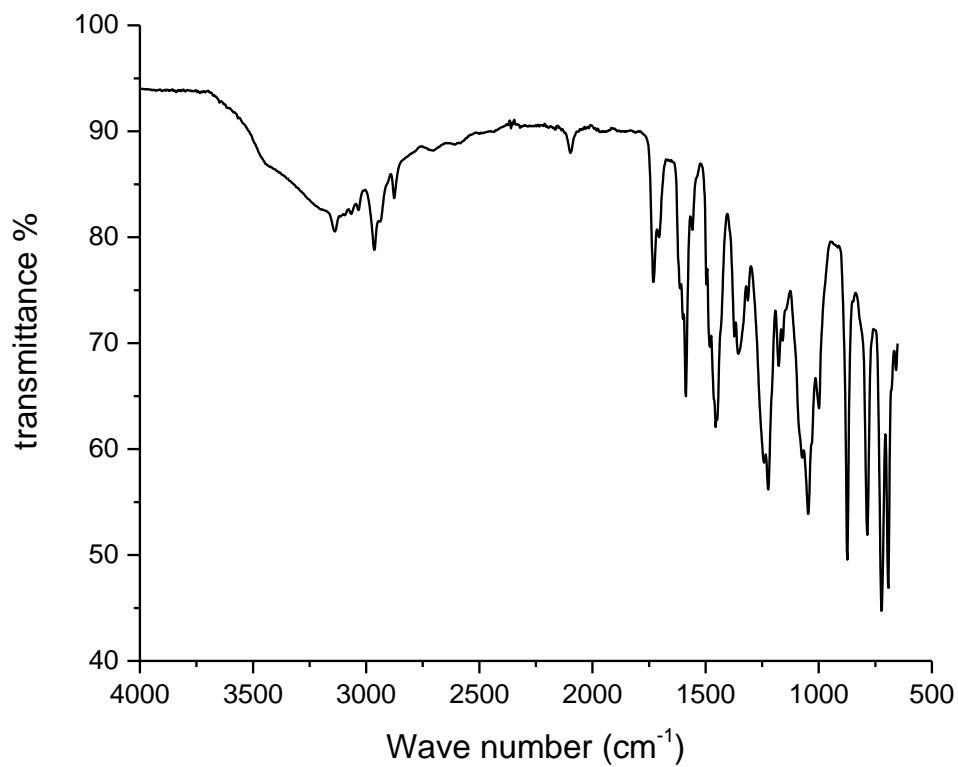


Anexo 11.  $^{13}\text{C}$  NMR del compuesto **4a** en  $\text{CDCl}_3$

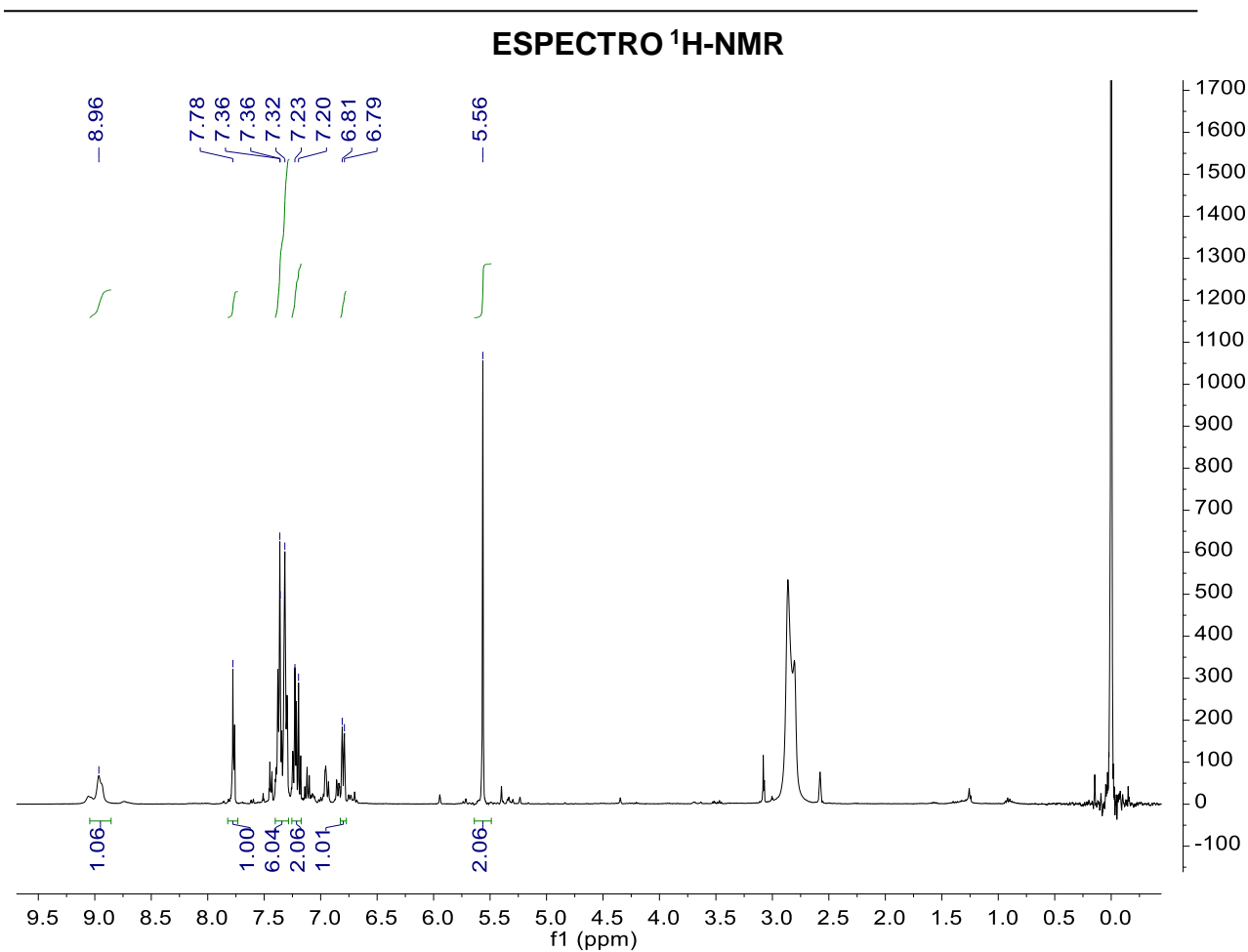


3-(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenol (**4b**)

### ESPECTRO INFRARROJO



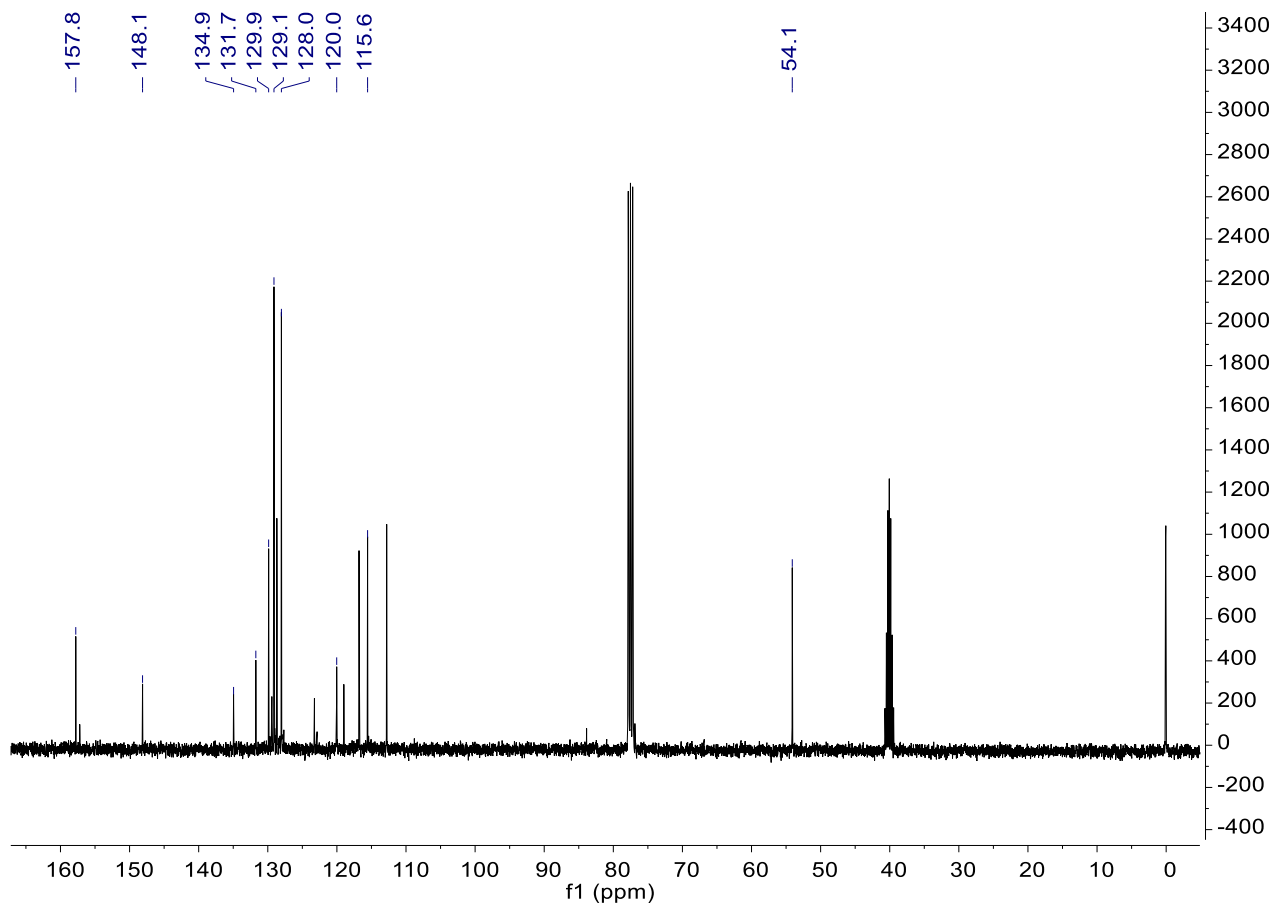
Anexo 12. Espectro infrarrojo del compuesto **4b**.



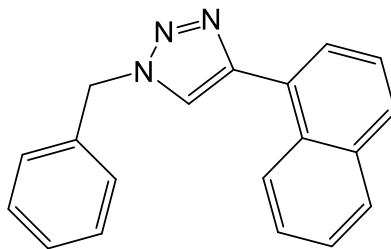
**Anexo 13.** <sup>1</sup>H NMR del compuesto **4b** en DMSO-D<sub>6</sub>.



ESPECTRO  $^{13}\text{C}$ -NMR

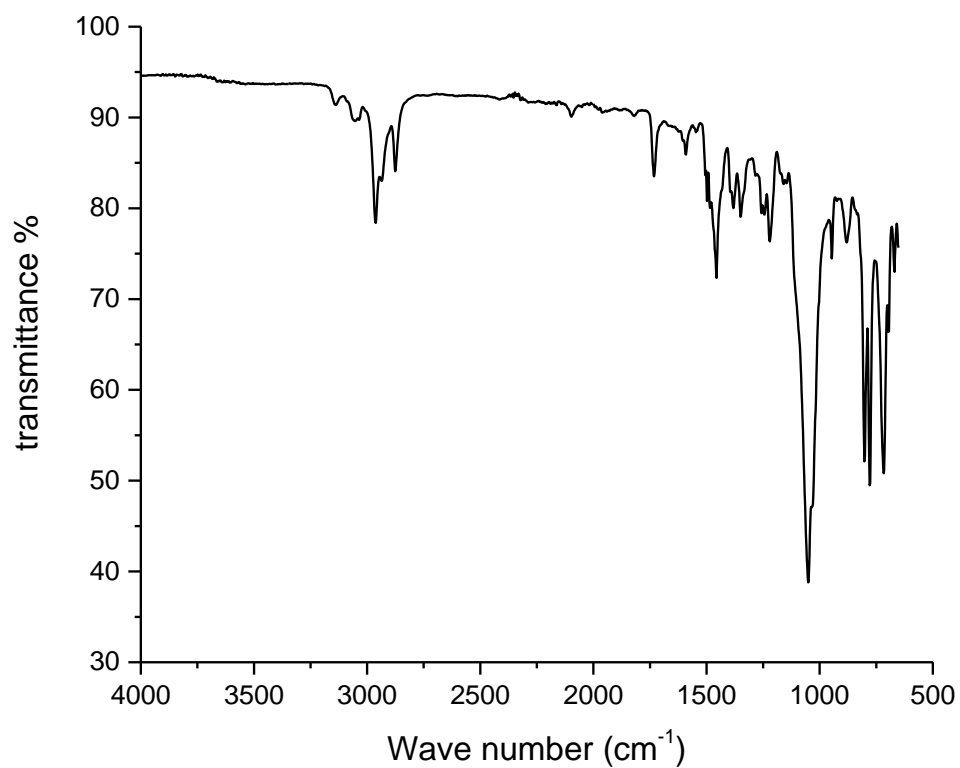


Anexo 14.  $^{13}\text{C}$  NMR del compuesto **4b** en  $\text{DMSO-D}_6$ .

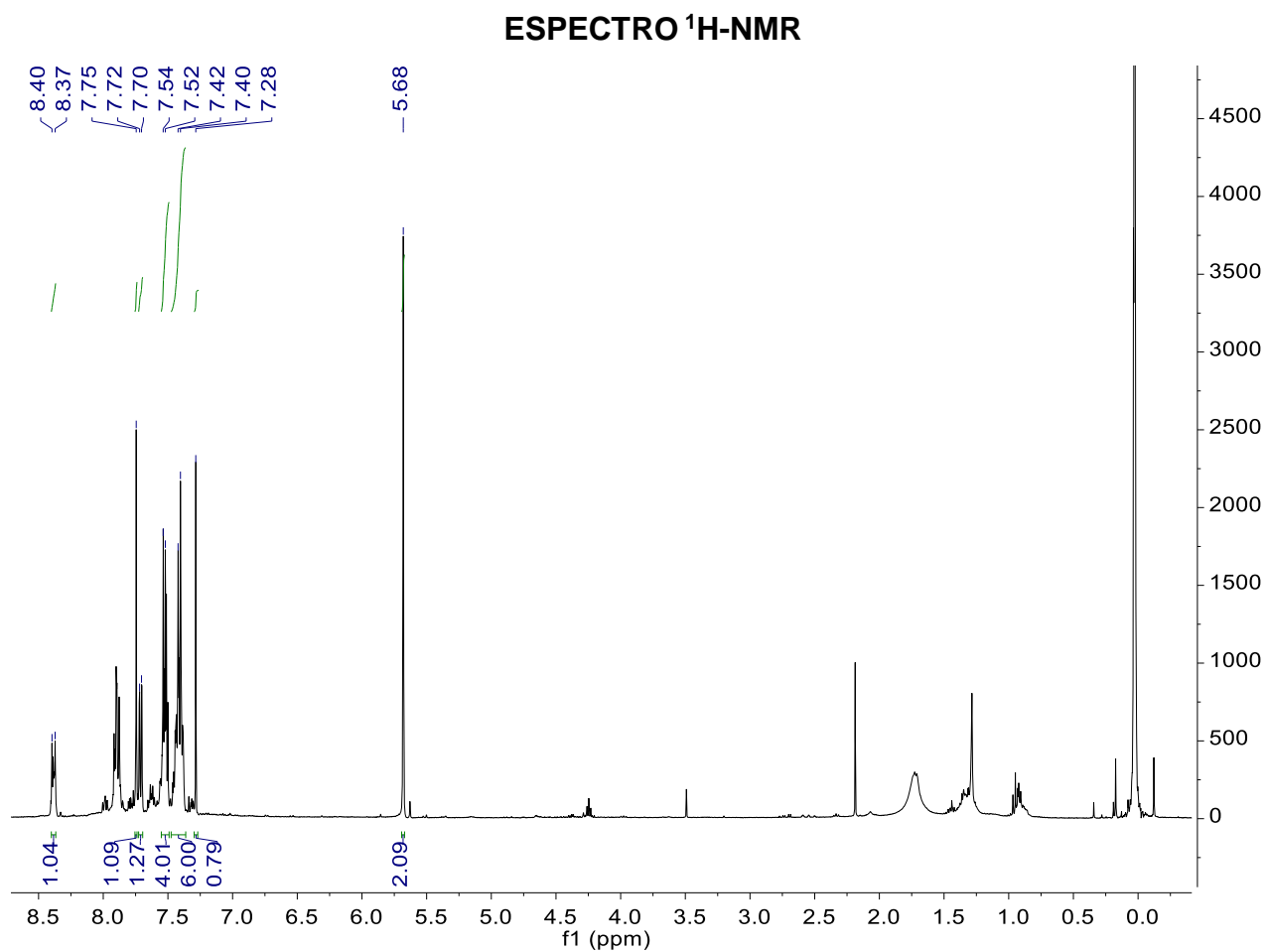


1-bencil-4-(naftalen-1-il)-1H-1,2,3-triazol (**4c**)

### ESPECTRO INFRARROJO

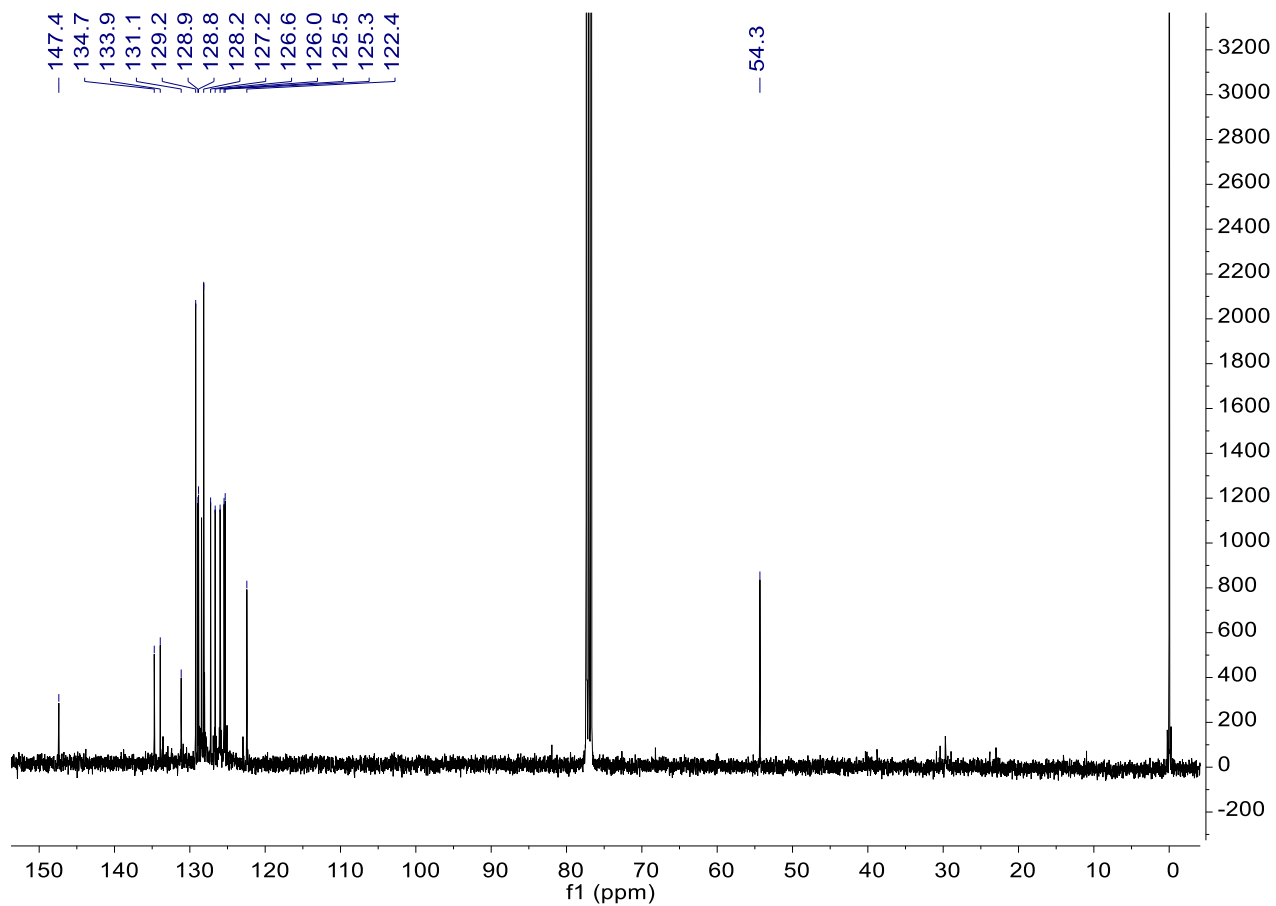


Anexo 15. Espectro infrarrojo del compuesto **4c**.



**Anexo 16.** <sup>1</sup>H NMR del compuesto **4c** en CDCl<sub>3</sub>.

ESPECTRO  $^{13}\text{C}$ -NMR



Anexo 17.  $^{13}\text{C}$  NMR del compuesto **4c** en  $\text{CDCl}_3$ .