



Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones Fluorescent probes, an overview: properties, design and applications

C. A. Briones-Vázquez ^{a,*}, A. Álvarez-Hernández ^b

^a Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Pachuca, Hidalgo, México.

Resumen

Las sondas fluorescentes son compuestos químicos que presentan el fenómeno óptico de fluorescencia y son utilizados en la detección cualitativa y/o cuantitativa de una gran variedad de analitos. En consecuencia, se han convertido en una herramienta eficiente para la obtención de información dinámica sobre la localización y cuantificación de moléculas de interés. En este artículo, se describen conceptos generales alrededor de las sondas fluorescentes: historia, propiedades químicas y físicas, equipos de detección, características estructurales para el diseño y síntesis, mecanismos de acción frente a los analitos y algunas aplicaciones en el área de polímeros (elucidación de mecanismos, determinación de cinética, observación de cambios de morfología, etc.), en la obtención de imagen de tejidos y/o células en tiempo real en el área médico-biológica y en la detección de especies químicas potencialmente tóxicas, relacionados con la contaminación del medio ambiente.

Palabras Clave:

Sondas fluorescentes, sensores, fluorescencia, bioimagen,

Abstract

Fluorescent probes are chemical compounds that show fluorescence and are used in qualitative and / or quantitative detection methods of a great variety of analytes. Accordingly, they have become an efficient tool for obtaining dynamic information on the location and quantification of molecules of interest. In this article, general concepts about fluorescent probes are described. They include history, chemical and physical properties, detection equipment, structural characteristics for design and synthesis, mechanisms of action against analytes and some applications in the area of polymers (mechanism elucidation, kinetics determination, observation of morphology changes, etc.) obtention of bio-images of tissues and / or cells in real time useful in the medical-biological area and detection of potentially toxic chemicals, related to environmental pollution.

Keywords:

Fluorescent probes, sensors, fluorescence, bioimaging,

1. Introducción

Las sondas fluorescentes son compuestos químicos que poseen la capacidad de emitir fotones después de ser excitados con una longitud de onda adecuada y que debido a su alta sensibilidad, selectividad y respuesta rápida sirven para visualizar analitos con una alteración mínima en células vivas, tejidos y órganos (Chen y Xian, 2020). Debido a esto, se han convertido en herramientas indispensables para la obtención de información dinámica sobre la localización y cuantificación de moléculas de interés.

Cuando una molécula es sometida a una fuente de radiación electromagnética ocurren diferentes procesos que se ilustran en el diagrama de Jablonski (Figura 1). Un compuesto absorbe fotones al ser irradiado con luz ultravioleta, visible o incluso infrarroja. Si

la energía es suficiente puede excitar a un electrón en el estado basal (S_0) hasta un estado electrónico de mayor energía (S_2) con retención del valor de espín del electrón. Para que esto ocurra, la energía del fotón absorbido debe ser igual a la diferencia de energía entre los estados electrónicos y la excitación ocurre en una escala de tiempo de alrededor de 10^{-5} s (Tyson, et al., 2016). Enseguida ocurre la relajación vibracional; las moléculas en el estado excitado S_2 chocan con el disolvente y pierden parte de la energía hasta caer al estado excitado de menor energía S_1 . A partir del estado excitado S_1 el exceso de energía se puede disipar hasta regresar al estado basal, ya sea por la emisión de luz mediante uno de dos procesos radiativos, fluorescencia y fosforescencia, o por la emisión de calor. La fluorescencia ocurre muy rápido (10^{-9} – 10^{-6} s), cuando el electrón apareado en el estado singulete S_1 regresa

*Autor para la correspondencia: alvarez@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: avazquez.ab@gmail.com (Cristian Alain Briones Vázquez), alvarez@uaeh.edu.mx (Alejandro Álvarez-Hernández).

al estado basal S_0 con retención del valor de espín y emisión de luz. Generalmente, las moléculas que presentan este fenómeno óptico reciben el nombre de fluorocromos. La emisión de luz también puede ocurrir por un proceso mucho más lento ($10^{-3} - 10^3$ s) denominado intercruce de sistemas, en el cual el electrón apareado del estado S_1 invierte su espín y genera un estado excitado triplete T_1 . La denominación de estados singulete S_1 y triplete T_1 se da de acuerdo con la ecuación de multiplicidad $M=2S+1$, donde S es la suma del valor de espín. En la fluorescencia el espín está apareado (+1/2, -1/2), por tanto, $S=0$ y la multiplicidad es 1 (singulete, S); en la fosforescencia el espín está desapareado (+1/2, +1/2), por tanto, $S=1$ y la multiplicidad es 3 (triplete, T) (Lichtman y Conchello, 2005). Debido a los procesos de relajación vibracional el fotón emitido es de menor energía que el absorbido y tiene una longitud de onda más larga, en consecuencia, la fluorescencia emitida se distingue de la luz de excitación. Esta diferencia entre las longitudes de onda del fotón absorbido y el emitido se conoce como desplazamiento de Stokes. En los procesos no radiativos no hay emisión de luz, la energía se disipa por colisiones y vibraciones moleculares y se transfiere a las moléculas del disolvente y se va perdiendo en forma de calor, un proceso mejor conocido como extinción (Valeur, 2003).

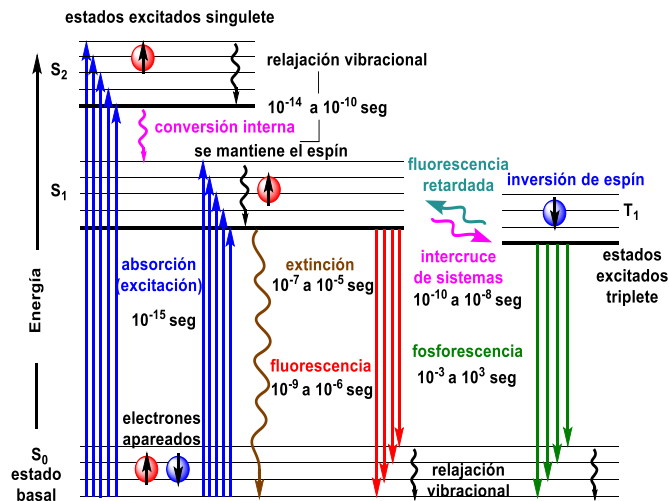


Figura 1. Diagrama de Jablonski.

Existen diferentes técnicas de medición para cuantificar las señales de fluorescencia de los compuestos que actúan como sondas dentro de muestras biológicas. Estas incluyen fluorimetría, citometría de flujo, fotometría microscópica, cámara, imágenes confocales y de dos fotones. Además, las proteínas aequorin que fluorescen en presencia de calcio, sirven como reporteros de luminiscencia para medir calcio en sistemas biológicos usando luminómetros basados en foto múltiplex o cámaras de conteo de fotones (Fricker, et al., 1999). Una gran ventaja que tienen las sondas, es que pueden introducirse directamente en la muestra y detectarse mediante una técnica de monitorización remota. En consecuencia, los sensores químicos ópticos que se emplean en la mayoría de las técnicas para la detección de fluorescencia consisten en una unidad de reconocimiento, una fuente de luz y un fotodetector, que generalmente es una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) (Schäferling, 2012). De esta manera se pueden obtener, imágenes en alta resolución de sistemas biológicos altamente complejos y una monitorización de células o tejidos analizados en tiempo real.

2. Historia y antecedentes

Los primeros informes científicos relacionados a la fluorescencia datan de 1838, cuando David Brewster observó "dispersión interna" de un mineral natural (fluorita) a partir de soluciones de quinina y clorofila. En 1853 George Stokes elaboró lo que hoy se conoce como Ley de Stokes, que establece que la luz fluorescente es siempre de una longitud de onda más larga que la luz excitante (Valeur y Berberan-Santos, 2011). El inicio de la industria de los tintes sintéticos por el químico inglés William Perkin en 1856 condujo a la síntesis de nuevos tintes fluorescentes (Kasten, 1989). Posteriormente, varios científicos contribuyeron a ampliar la ley de Stokes, en 1868 se llegó a la conclusión que los espectros fluorescentes eran característicos de cada sustancia y los químicos orgánicos rápidamente adaptaron la caracterización espectral por análisis de fluorescencia (Kasten, 1989). Alexander Jablonski junto con otros investigadores desarrollaron la comprensión teórica moderna de la observación de Stokes (Ueno y Nagano, 2011) (Figura 2).

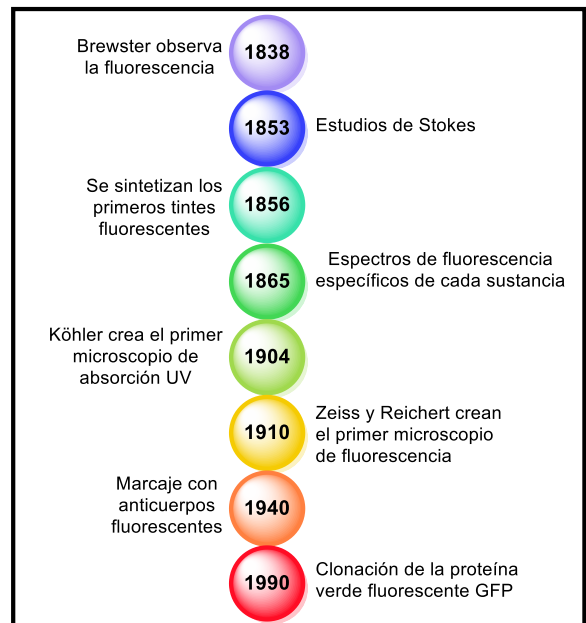


Figura 2. Línea del tiempo con sucesos relevantes alrededor de las sondas fluorescentes.

A medida que la fluorescencia se hizo más relevante, la microscopía la empleó como método de cuantificación a raíz de la invención del microscopio de absorción ultravioleta inventado por August Köhler de Zeiss-Jena en 1904 (Masters, 2010). En 1910, las empresas Carl Zeiss y Carl Reichert crearon los primeros microscopios de fluorescencia y con ello, maximizaron las propiedades de los compuestos fluorescentes, dando las bases para lo que hoy se conoce como microscopía de fluorescencia. A principios de la década de 1940, se desarrolló el marcaje de anticuerpos fluorescentes y desde principios de la década de 1990 se realizó la clonación de la proteína verde fluorescente (GFP) (Renz, 2013). La evolución de la microscopía de fluorescencia ha permitido el desarrollo de las técnicas modernas que permiten ver células y tejidos vivos en tiempo real. En la Tabla I se muestra una cronología con algunos de los fluorocromos biológicamente importantes, las fechas en que se sintetizaron por primera vez y sus aplicaciones en microscopía de fluorescencia y biología (Kasten, 1989).

Regularmente las muestras biológicas contienen restos intrínsecamente fluorescentes, debido a la presencia de proteínas con aminoácidos aromáticos detectables como triptófano, tirosina y fenilalanina. Sin embargo, el marcaje específico de moléculas biológicas que utilizan sondas fluorescentes como marcaje principal proporciona una especificidad molecular que no se obtiene por ningún otro método de observación visual. La utilidad potencial de la visualización por fluorescencia de biomoléculas llevó al desarrollo de una amplia gama de fluoróforos para el marcaje por fluorescencia de moléculas biológicas y de sensores capaces de informar sobre cambios en su entorno. Actualmente existen una gran variedad de fluoróforos con propiedades óptimas que incluyen estabilidad, brillo, absorción y emisión en rangos de longitud de onda específicos (Ueno y Nagano, 2011).

Tabla I: Fluorocromos biológicamente importantes (Kasten, 1989).

Fluorocromo	Aplicación biológica, detección
Azul anilina (1862)	Paredes celulares vegetales (callosa), β glucanos, eosinófilos, glucógeno
Rojo de alizarina S (1871)	Observación del crecimiento de huesos
Eosina Y (1871)	Contratinción, músculo, tejido vegetal, marca de inmunofluorescencia, constituyente de manchas de sangre, histonas
Rojo Congo (1884)	Contratinción, amiloide, sonda para confirmación de enzimas de unión a nucleótidos
Azul cresilo brillante (1892)	Lípidos, tinción vital de sangre, reticulocitos en frotis de sangre, protozoos, cromosomas
Fosfina 5G (1900)	Mastocitos, mucopolisacáridos ácidos, reactivo tipo Schiff
Esculina (1916)	Fluorocromo vital (protozoos), agente antipalúdico
Sulfoflavina brillante (1927)	Mancha de proteínas, esporas bacterianas
Prontosil (1932)	Fluorocromo vital (insectos y plantas), fibras de tejido conectivo
Quinina (1944)	Fluorocromo vital (protozoos), histología de insectos, agente antipalúdico, sensible a la luz
Porción roja (1966)	Observación del crecimiento de huesos
Rosa de bengala (1975)	Determinación de grasa, hígado, bacterias, función hepática

2.1. Propiedades de las sondas fluorescentes

En el diseño y síntesis de moléculas utilizadas como sondas fluorescentes, se debe considerar que el método de preparación sea eficiente, y en la estructura química, es necesario incorporar grupos donadores y aceptores de electrones en un sistema electrónico conjugado y rígido. Existen núcleos estructurales básicos que han sido utilizados por décadas en los compuestos fluorescentes como la cumarina, fluoresceína, rodol, rodamina, rosamina, bodipys, etc. (Wysocki y Lavis, 2011; Vendrell, et al., 2012). En la figura 3, se observan algunos núcleos básicos utilizados como sondas fluorescentes y su longitud de onda de absorción aproximada.

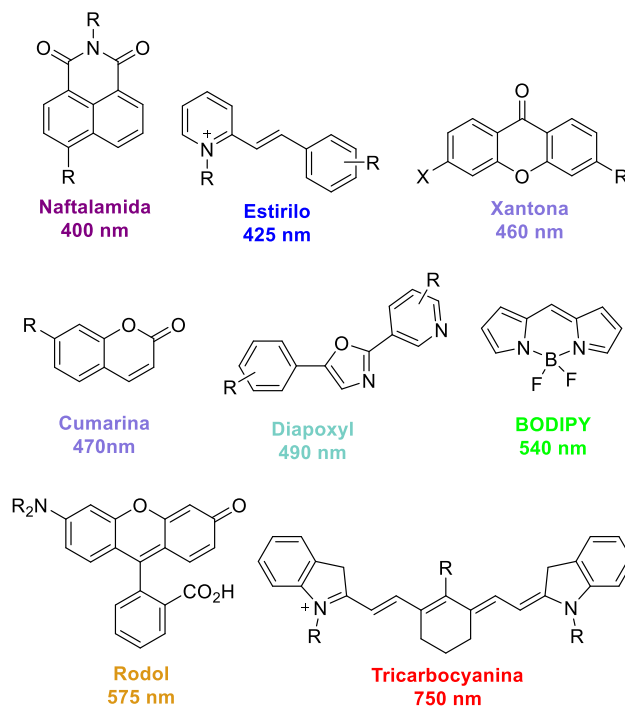


Figura 3. Núcleos estructurales de compuestos fluorescentes.

También se deben estudiar varios parámetros ópticos relacionados a la eficiencia de la sonda fluorescente. El *rendimiento cuántico* (Φ_F) se define como la relación entre los fotones absorbidos y emitidos por la molécula durante la irradiación de luz, dicho valor oscila entre un rango de 0-1 (Birks, 1976; Valeur, 2003). El *desplazamiento de Stokes* se define como la diferencia entre el máximo de emisión de fluorescencia y el máximo de absorción y que comúnmente se expresa en longitudes de onda (nm). Este parámetro es útil para calcular la cantidad de energía de excitación que se pierde por vibraciones moleculares. Es indispensable contar con moléculas rígidas que restrinjan el movimiento y las vibraciones moleculares para tener una menor pérdida de energía de excitación. Esto se logra, combinando fragmentos estructuralmente rígidos como heterociclos aromáticos, grupos arilos y enlaces dobles o triples (Valeur, 2003). También se debe considerar la influencia que tiene el compuesto con el pH del medio en el que se encuentra, debido a que esta propiedad, influye en la estructura electrónica al modificar los grupos donadores o aceptores y sitios básicos o ácidos en la sonda fluorescente. Por otra parte, el incremento de la temperatura aumenta las colisiones moleculares y la energía absorbida por la molécula se disipa en forma de calor, abatiendo la fluorescencia.

Sin embargo, existen varias complicaciones para el desarrollo de sondas fluorescentes con aplicaciones biológicas, entre las cuales se encuentra la detección inteligente, es decir, la detección selectiva del analito objetivo en condiciones fisiológicamente relevantes. Además, es deseable una cinética de reacción rápida para el monitoreo en tiempo real de procesos biológicos; una señal óptima de alta sensibilidad y límites de detección bajos para lograr una extracción de datos confiable en las condiciones del medio ambiente. Las sondas fluorescentes deben tener permeabilidad celular, especificidad de orgánulos (para investigación subcelular) y baja citotoxicidad. Para aplicaciones de imágenes in vivo y de tejidos profundos, las sondas deben operar en la región de infrarrojo cercano para que exista el menor daño a los tejidos biológicos (fototoxicidad) y evitar la autofluorescencia de las sustancias biológicas presentes (Singha, et al., 2019).

Para incrementar la solubilidad en agua a las moléculas fluorescentes se incorporan grupos polares como ácidos sulfónicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) y ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$) en forma neutra o como sales, los cuales pueden estar unidos directamente al cromóforo principal de la sonda o a una cadena alifática que a su vez se une al cromóforo principal. Sin embargo, el exceso de estos grupos polares en la estructura del compuesto tiende a reducir la permeabilidad celular, debido a la afinidad de estos grupos por la membrana celular. Para otorgarle a los compuestos permeabilidad a las células, se insertan amidas deficientes de electrones como la *N,N*-dimetilsulfamida, esto se logra a través de la derivatización de ácidos carboxílicos presentes en la molécula (Jun, et al., 2020).

3. Mecanismos de acción de las sondas fluorescentes frente a los analitos

Las sondas fluorescentes se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de acción que presentan en presencia de un analito, entre los más comunes se encuentran, sondas con transferencia de carga intramolecular, sondas basadas en transferencia de energía de resonancia de Förster y sondas con transferencia fotoinducida de electrones (Schäferling, 2012).

3.1. Sondas con mecanismo Transferencia de carga intramolecular

Las sondas basadas en este mecanismo se construyen conjugando directamente grupos donadores (D) y aceptores (A) con fluoróforos (F) como puente del compuesto (Figura 4A). Esta arquitectura electrónica “D–F–A” da como resultado fuertes efectos “jalón-empuje” que ayudan a aumentar la intensidad de la fluorescencia y el desplazamiento de la longitud de onda de emisión hacia el rojo (Liu, et al., 2018). Por ejemplo, Zhu y colaboradores reportaron en 2020 la síntesis y aplicación de una sonda fluorescente para detectar hidrazinas, con un desplazamiento de Stokes de 186 nm (Figura 4B). Esta sonda muestra un cambio en la intensidad de fluorescencia después de la reacción con hidrazina. La remoción del grupo éster deja libre al fenol, lo que activa la transferencia de carga hacia el grupo aceptor $=\text{C}(\text{CN})_2$, ocasionando el aumento de la intensidad de fluorescencia del compuesto. Este tipo de mecanismo de activación electrónica por reacción química en las sondas fluorescentes es de gran utilidad para detectar analitos con alta sensibilidad, selectividad y precisión.

3.2. Sondas con mecanismo de Transferencia de energía por resonancia Förster.

La transferencia de energía por resonancia Förster o FRET es un fenómeno de transferencia de energía entre dos o más cromóforos dentro de una misma molécula. El cromóforo donante (D) puede transferir la energía del estado excitado al cromóforo aceptor (A) más cercano de manera no radiativa a través de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance debido a la superposición espectral de ambos cromóforos. En otras palabras, la longitud de onda de emisión del donador y de excitación del aceptor se superponen, así que la energía del cromóforo donador excitado se transfiere al aceptor. Esto permite la excitación de cromóforos aceptores con la longitud de onda de excitación de cromóforos donadores (Liu, et al., 2018). En la figura 5, se ilustran los mecanismos generales de sondas basadas en FRET, las cuales pueden contener unidades D y A con fragmentos sensibles al analito, tal es el caso del ejemplo ilustrado en la figura 5A, donde

se muestra un compuesto selectivo para detectar ion bisulfito (HSO_3^-) mediante una reacción de adición de Michael. El átomo C-4 de la unidad de benzopiridilio es susceptible a ser atacado por nucleófilos, como el bisulfito, biotioles o derivados de azufre. Después de la adición de bisulfito, se bloquea el proceso FRET de toda la molécula y en consecuencia se desencadena un cambio significativo en la fluorescencia, generando un efecto de emisión hipsocrómico de 630 nm a 482 nm (Liu, et al., 2019). Otros compuestos pueden tener enlaces escindibles como el ejemplo en la figura 5B donde se muestra un compuesto sensible a Hg^{2+} . El ion metálico induce la formación de un fragmento tipo rodamina de anillo abierto a partir de la espirolactama que activan el proceso FRET en la molécula y desencadena un aumento significativo de la emisión de fluorescencia a 584 nm y una disminución de la emisión de fluorescencia en 464 nm (Ge, et al., 2017).

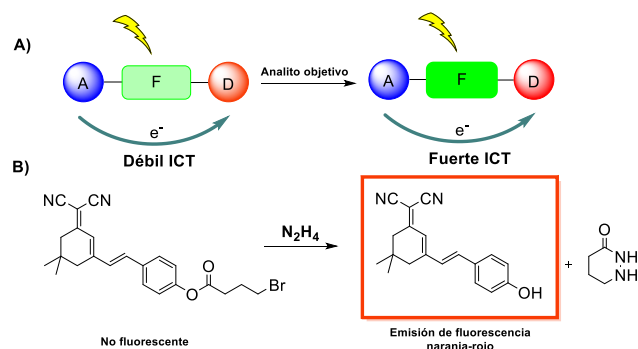


Figura 4. A) Mecanismo ICT (Liu, et al., 2018); B) Ejemplo de una sonda fluorescente con mecanismo ICT (Zhu, et al., 2020).

3.3. Sondas con mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida

Este fenómeno, conocido como PET, es una transferencia intramolecular de electrones y se puede dividir en dos categorías (Liu, et al., 2018). Una de ellas es a-PET representa la transferencia de electrones de un grupo aceptor (A) al fluoróforo excitado y causa la reducción del fluoróforo, así como la extinción de la fluorescencia, también se denomina PET reductor, ejemplo ilustrado en la figura 6A, donde se muestra un compuesto con una estructura de espirolactona de anillo cerrado no fluorescente, que tras la adición de ClO^- , induce la oxidación del átomo de P del compuesto, bloqueando el proceso PET intramolecular, generando una fuerte emisión de fluorescencia a 550 nm (Huang, et al., 2017). Por otro lado, en la figura 6B se ilustra el mecanismo d-PET que representa el proceso de transferencia de electrones desde un fluoróforo excitado a un grupo donador de electrones (D), también se denomina PET oxidativo, en el cual, la sonda derivada de 1,8-naftalamida es susceptible a la reacción con nucleófilos como H_2S y biotioles. La adición de estos compuestos ocasiona la ruptura del grupo sulfonato y la liberación del grupo fenol que bloquea el proceso PET y genera una fuerte emisión de fluorescencia a 551 nm (Xu, et al., 2019).

3.4. Sondas con mecanismo múltiple

Las sondas fluorescentes no están limitadas a presentar un solo mecanismo. Se pueden diseñar sondas que presenten dos o más mecanismos. Por ejemplo, Kopchuk y colaboradores diseñaron una sonda basada en biperidinas que presenta mecanismos ICT-

PET para la detección de Zn (II). La sonda presenta un mecanismo ICT por la donación electrónica del sustituyente R del grupo arilo hacia el grupo bipyridino y es poco fluorescente. Simultáneamente los pares libres de los nitrógenos de la dipicolamina presente en la molécula encienden un mecanismo PET. Cuando la sonda reacciona con Zn²⁺ se apaga el mecanismo PET y emite fluorescencia en 455 nm (Kopchuk, et al., 2012) (Figura 7A). Dong y colaboradores han logrado preparar una sonda que presenta los tres mecanismos ICT-FRET-PET. Esta sonda se aplicó a la medición cuantitativa del pH en un rango de 5.0 a 7.2 en el retículo endoplasmático durante el estrés del retículo y la estimulación inducida por dexametasona. Conforme se modifica el pH del medio, los grupos ácido-base de la molécula ganan o pierden iones H⁺ y alteran los mecanismos de acción de la molécula. Un mecanismo FRET que va de la cumarina hacia la 1,8-naftalimida genera la emisión de fluorescencia en 427 nm, un mecanismo PET de encendido, que va de la piperazina hacia la 1,8-naftalimida permite la emisión en 469 nm y un mecanismo ICT generado por el flujo de electrones en la cumarina logra la emisión en 527 nm. (Dong, et al., 2019) (Figura 7B).

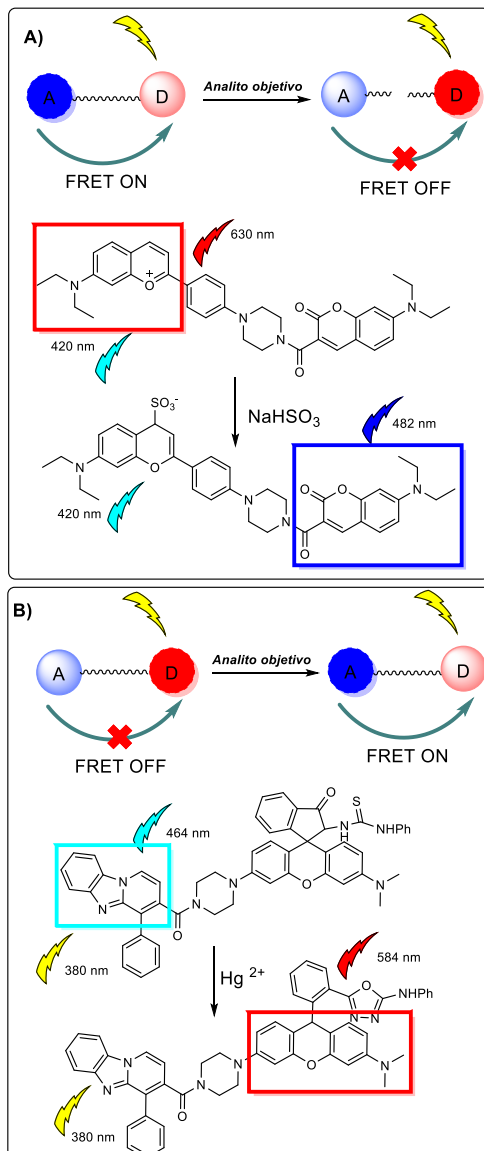


Figura 5. Mecanismos de sondas FRET (Liu, et al., 2018); A) Sonda con fragmento sensible al analito (Liu, et al., 2019), B) Sonda con enlaces escindibles (Ge, et al., 2017).

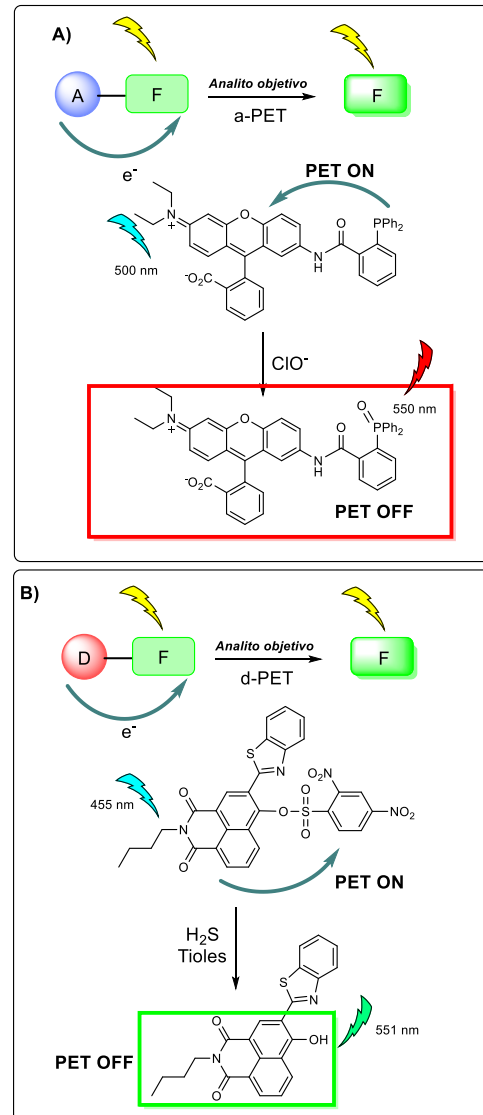


Figura 6. Sondas con mecanismos PET (Liu, et al., 2018); A) Sonda basada en mecanismo a-PET (Huang, et al., 2017), B) Sonda basada en mecanismo d-PET (Xu, et al., 2019).

4. Aplicaciones

4.1. Polímeros

A lo largo de los años, se han reportado una gran variedad de estructuras de sondas fluorescentes con distintas aplicaciones. Por ejemplo, en el área de ciencias de los materiales se utilizan para el estudio de procesos dinámicos de interés en el área de polímeros (Bosch, et al., 2005), como mecanismos de polimerización (Valdés-Aguilera, et al., 1990; Ortyl, et al., 2012) (Figura 8A), cinética de polimerización (Paczkowzki y Neckers, 1991) (Figura 8B), cambios de morfología de hinchamiento en el polímero (Serrano, et al., 2000) (Figura 8C), fotodegradación (Peinado, et al., 2002) (Figura 8D), transiciones térmicas en polímeros (Corrales, et al., 2004) (Figura 8E), etc.

En cada uno de los estudios de polimerización, se utiliza una sonda, la cual, interacciona con el compuesto a polimerizar por diferentes interacciones (dipolares, electrostáticas, tipo pi, etc.). Los procesos que ocurren ocasionan el cambio de la intensidad de

fluorescencia y se cuantifican con ayuda de técnicas espectroscópicas.

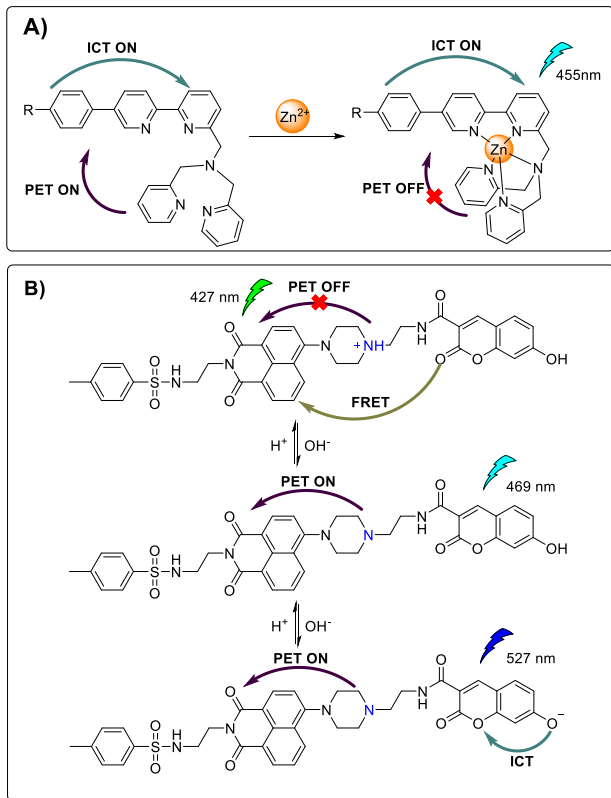


Figura 7. Sondas fluorescentes con mecanismo múltiple de acción: A) Sonda de mecanismo doble PET-ICT (Kopchuk, et al., 2012); B) Sonda de mecanismo triple PET-FRET-ICT (Dong, et al., 2019).

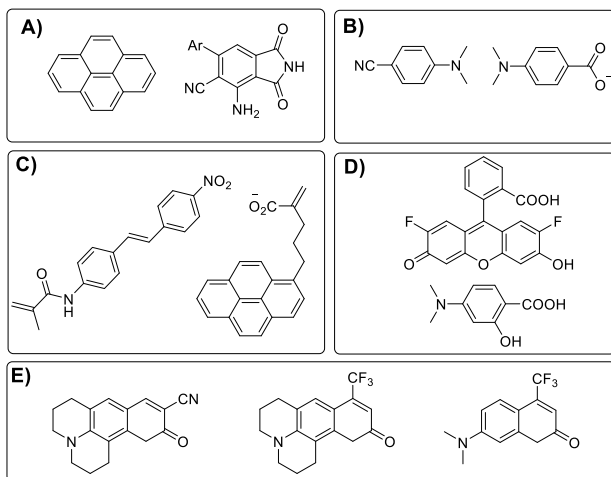


Figura 8. Sondas con aplicaciones en estudios de polímeros.

4.2. Médico-biológica

El área médico-biológica ha sido la más favorecida por los avances de las técnicas espectroscópicas, que permiten obtener imágenes de tejidos y/o células en tiempo real con muy buena resolución con la ayuda de sondas fluorescentes sensibles a compuestos, células y tejidos de interés bioquímico.

Por ejemplo, se han podido observar el ácido desoxirribonucleico (ADN) con una sonda fluorescente a base de indol (Kapuscinski, 1995) (Figura 9A), originalmente la sonda, tiene una banda de excitación en 340 nm y un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo con un máximo de emisión de 453 nm, cuando se une al ADN hay un cambio de excitación batocrómico a 463 nm, un cambio de emisión hipsocrómico a 448 nm y el rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta más de 20 veces. También se ha reportado la detección del ion fluoruro (F^-) en agua y en células de carcinoma humano A549 con una sonda fluorescente a base de cumarina (Kim, et al., 2009) (Figura 9B), la sonda exhibe un cambio de intensidad de fluorescencia a 461 nm tras la adición de F^- , el cual hace una reacción de sustitución en el átomo de silicio, liberando el cromóforo a base de cumarina.

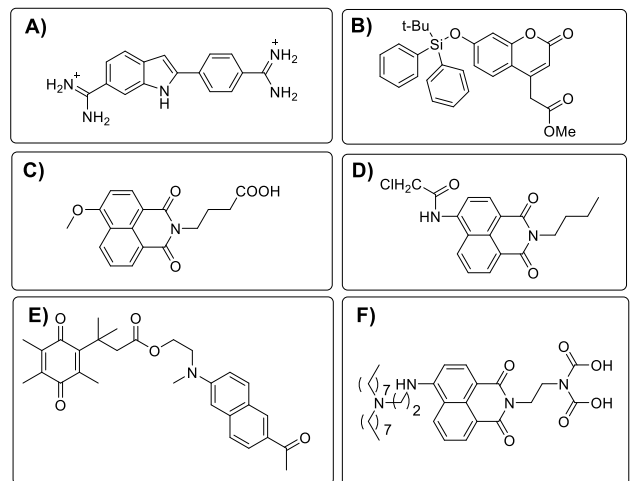


Figura 9. Sondas con aplicación médico-biológica.

De igual manera, se reportó la detección de la hemoproteína citocromo P450 1A con una sonda fluorescente a base de 1,8-naftalimida (Dai, et al., 2015) (Figura 9C), tras la adición de la sonda incubada con el citocromo P450 1A, se produjo una mejora notable de la fluorescencia a 564 nm, acompañada de una disminución gradual del pico de emisión a 452 nm, de igual manera, el color de las muestras incubadas cambió de incolora a amarilla, los autores describen que la sonda puede servir como un indicador colorimétrico "a simple vista" para la enzima objetivo.

La enzima carboxilesterasa 2 (hCE2) presente en células y tejidos humanos, fue identificada con una sonda fluorescente a base de 1,8-naftalimida (Jin, et al., 2015) (Figura 9D), tras la adición de hCE2, el pico de emisión máximo experimentó un desplazamiento hacia el rojo de 452 nm a 542 nm, desplazamiento hacia el rojo de 452 nm a 542 nm, la emisión desplazada al rojo después de la hidrólisis con la enzima debe atribuirse a la mayor eficiencia del mecanismo ICT del compuesto amino liberado.

El complejo NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (hNQO1) con una sonda fluorescente a base de quinona (Kwon, et al., 2017) (Figura 9E), después de la incubación de reductores biológicos para NADH y hNQO1 muestran una fuerte fluorescencia a 520 nm, los autores proponen un mecanismo de ciclación en el compuesto de partida, inducido por los analitos, que tras finalizar se libera un fragmento cumarina y un naftaleno.

Se ha identificado la variación del pH de células cancerosas y tejidos tumorales con una sonda a base de 1,8-naftalimida (Kim, et al., 2020) (Figura 9F), la cual, tras la reducción del pH, se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia a 531 nm, debido al bloqueo de un mecanismo PET, a causa de la protonación de los átomos de nitrógeno donantes presentes en la molécula.

4.3. Ciencias ambientales

Otra área de aplicación de las sondas fluorescentes se da en la detección de especies químicas potencialmente tóxicas relacionadas con la contaminación del medio ambiente. Por ejemplo, se puede hacer la detección selectiva de iones cianuro (CN^-) y fluoruro (F^-) y CO_2 (Figura 10A) (Kwon, et al., 2019). Estas especies provocan cambios en los espectros de fluorescencia de la sonda, se genera un nuevo pico a 375 nm y disminuye el pico de fluorescencia original a 465 nm.

Por otra parte, se ha reportado el uso de una sonda para la detección de iones Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} (Figura 10B) (Hu, et al., 2010). En este caso, la intensidad de fluorescencia se incrementa al adicionar iones Cd^{2+} y Zn^{2+} , y se apaga cuando se adicionan iones Cu^{2+} y Hg^{2+} .

Se ha reportado el uso de una sonda fluorescente selectiva para MeHg^+ y Hg^{2+} , en la que la longitud de onda de emisión de fluorescencia presenta un efecto batocrómico de alrededor de 15 nm, pasando de la emisión original de 534 nm a 549 y 548 nm, respectivamente (Figura 10C) (Deng, et al., 2017).

Las sondas fluorescentes permiten identificar óxido nítrico, (NO) (Figura 10D) (Kojima, et al., 1998). En este caso las aminas ricas en electrones alteran la energía del grupo aromático para facilitar la transferencia de electrones fotoinducida (PET) y provocan una extinción de la fluorescencia. En presencia de NO se forma un ariltriazol pobre en electrones, que anula el mecanismo PET y permite la fluorescencia. La sonda ilustrada en la figura 10E se reportó para la detección selectiva de Cr^{3+} y Al^{3+} , la fluorescencia aumentando su intensidad y la longitud de onda de emisión a 582 nm en presencia de estos iones (Liu, et al., 2011).

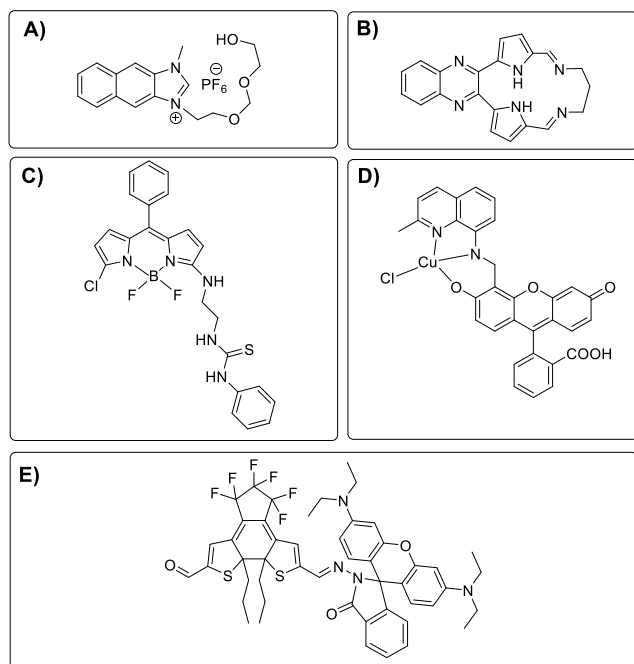


Figura 10. Sondas de detección de iones

Conclusiones

La fluorescencia es una de las herramientas actuales más potentes de detección de analitos en ambientes biológicos. Los compuestos utilizados como sondas fluorescentes se han convertido en una herramienta indispensable en el área médico-biológica para monitorear procesos dinámicos y detectar patologías gracias al estudio de células y tejidos, en tiempo real y

de manera no invasiva. La investigación en sondas fluorescentes abarca los procesos de diseño y síntesis, los estudios mecanísticos y modos de activación, el estudio de propiedades físicas y químicas de los compuestos y sus aplicaciones dirigidas hacia la obtención de bioimágenes y el avance de técnicas espectroscópicas.

Agradecimientos

CABV agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de tiempo completo otorgada para sus estudios de maestría.

Referencias

- Birks, J. B. (1976). Fluorescence quantum yield measurements. *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and chemistry*, 80(3), 389. <https://dx.doi.org/10.6028%2Fjres.080A.038>
- Bosch, P., Catalina, F., Corrales, T., and Peinado, C. (2005). Fluorescent probes for sensing processes in polymers. *Chemistry—A European Journal*, 11(15), 4314–4325. <https://doi.org/10.1002/chem.200401349>
- Chen, W., Xian, M. (2020). Washington Red (WR) dyes and their imaging applications. *Methods in Enzymology*, 640, 149–163. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.027>
- Corrales, T., Abrusci, C., Peinado, C., Catalina, F. (2004). Fluorescent sensor as physical amplifier of chemiluminescence: application to the study of poly (ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 37(17), 6596–6605. <https://doi.org/10.1021/ma0491917>
- Dai, Z. R., Ge, G. B., Feng, L., Ning, J., Hu, L. H., Jin, Q., Yang, L. (2015). A highly selective ratiometric two-photon fluorescent probe for human cytochrome P450 1A. *Journal of the American Chemical Society*, 137(45), 14488–14495. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09854>
- Deng, M., Gong, D., Han, S. C., Zhu, X., Iqbal, A., Liu, W., ... & Guo, H. (2017). BODIPY based phenylthiourea derivatives as highly selective MeHg^+ and Hg^{2+} ions fluorescent chemodosimeter and its application to bioimaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.139>
- Dong, B., Song, W., Lu, Y., Kong, X., Mehmood, A. H., Lin, W. (2019). An ultrasensitive ratiometric fluorescent probe based on the ICT-PET-FRET mechanism for the quantitative measurement of pH values in the endoplasmic reticulum (ER). *Chemical Communications*, 55(72), 10776–10779. <https://doi.org/10.1039/C9CC03114F>
- Fricker, M. D., Plieth, C., Knight, H., Blancaflor, E., Knight, M. R., White, N. S., Gilroy, S. (1999). Fluorescence and luminescence techniques to probe ion activities in living plant cells. In *Fluorescent and luminescent probes for biological activity* (pp. 569–596). Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-012447836-7/50044-0>
- Ge, Y., Liu, A., Ji, R., Shen, S., Cao, X. (2017). Detection of Hg^{2+} by a FRET ratiometric fluorescent probe based on a novel pyrido [1, 2-a] benzimidazole-rhodamine system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.097>
- Hu, Y., Li, Q. Q., Li, H., Guo, Q. N., Lu, Y. G., & Li, Z. Y. (2010). A novel class of Cd (II), Hg (II) turn-on and Cu (II), Zn (II) turn-off Schiff base fluorescent probes. *Dalton Transactions*, 39(47), 11344–11352. <https://doi.org/10.1039/C0DT00737D>
- Huang, K., He, S., Zeng, X. (2017). A fluoran-based fluorescent probe via a strategy of blocking the intramolecular photoinduced electron transfer (PET) process. *Tetrahedron Letters*, 58(20), 2004–2008. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.037>
- Jin, Q., Feng, L., Wang, D. D., Dai, Z. R., Wang, P., Zou, L. W., Yang, L. (2015). A two-photon ratiometric fluorescent probe for imaging carboxylesterase 2 in living cells and tissues. *ACS applied materials & interfaces*, 7(51), 28474–28481. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09573>
- Jun, J. V., Chenoweth, D. M., Petersson, E. J. (2020). Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(30), 5747–5763. <https://doi.org/10.1039/D0OB01131B>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Kasten, F. H. (1989). The origins of modern fluorescence microscopy and fluorescent probes. In *Cell structure and function by microspectrofluorometry* (pp. 3–50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417760-4.50008-2>

- Kim, S. Y., Park, J., Koh, M., Park, S. B., Hong, J. I. (2009). Fluorescent probe for detection of fluoride in water and bioimaging in A549 human lung carcinoma cells. *Chemical communications*, (31), 4735-4737. <https://doi.org/10.1039/B908745A>
- Kim, S. Y., Podder, A., Lee, H., Cho, Y. J., Han, E. H., Khatun, S., Bhuniya, S. (2020). Self-assembled amphiphilic fluorescent probe: detecting pH-fluctuations within cancer cells and tumour tissues. *Chemical Science*, 11(36), 9875-9883. <https://doi.org/10.1039/D0SC03795H>
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., & Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical chemistry*, 70(13), 2446-2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- Kopchuk, D. S., Prokhorov, A. M., Slepukhin, P. A., Kozhevnikov, D. N. (2012). Design of ICT-PET fluorescent probes for zinc (II) based on 5-aryl-2, 2'-bipyridines. *Tetrahedron Letters*, 53(46), 6265-6268. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.09.027>
- Kwon, N., Cho, M. K., Park, S. J., Kim, D., Nam, S. J., Cui, L., Yoon, J. (2017). An efficient two-photon fluorescent probe for human NAD (P) H: quinone oxidoreductase (hNQO1) detection and imaging in tumor cells. *Chemical Communications*, 53(3), 525-528. <https://doi.org/10.1039/C6CC08971B>
- Kwon, N., Baek, G., Swamy, K. M. K., Lee, M., Xu, Q., Kim, Y., & Yoon, J. (2019). Naphthoimidazolium based ratiometric fluorescent probes for F⁻ and CN⁻, and anion-activated CO₂ sensing. *Dyes and Pigments*, 171, 107679. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107679>
- Lichtman, J. W., Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Liu, H. W., Chen, L., Xu, C., Li, Z., Zhang, H., Zhang, X. B., Tan, W. (2018). Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. *Chemical Society Reviews*, 47(18), 7140-7180. <https://doi.org/10.1039/C7CS00862G>
- Liu, W., Pu, S., Jiang, D., Cui, S., Liu, G., & Fan, C. (2011). Fluorescent probes for Al (III) and Cr (III) based on a photochromic diarylethene bearing a fluorescent rhodamine unit. *Microchimica Acta*, 174(3), 329-336. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0610-7>
- Liu, W., Zhang, D., Ni, B., Li, J., Weng, H., Ye, Y. (2019). Mitochondria-targeted and FRET based ratiometric fluorescent probe for SO₂ and its cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 284, 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.158>
- Masters, B. R. (2010). The development of fluorescence microscopy. *eLS, Encyclopedia of Life sciences*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022093>
- Ortyl, J., Galek, M., Milart, P., Popielarz, R. (2012). Aminophthalimide probes for monitoring of cationic photopolymerization by fluorescence probe technology and their effect on the polymerization kinetics. *Polymer Testing*, 31(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.01.008>
- Paczkowski, J., Neckers, D. C. (1991). Twisted intramolecular charge-transfer phenomenon as a quantitative probe of polymerization kinetics. *Macromolecules*, 24(10), 3013-3016. <https://doi.org/10.1021/ma00010a059>
- Peinado, C., Allen, N. S., Salvador, E. F., Corrales, T., Catalina, F. (2002). Chemiluminescence and fluorescence for monitoring the photooxidation of an UV-cured aliphatic polyurethane-acrylate based adhesive. *Polymer degradation and stability*, 77(3), 523-529. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00111-8)
- Renz, M. (2013). Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective. *Cytometry Part A*, 83(9), 767-779. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22295>
- Schäferling, M. (2012). The art of fluorescence imaging with chemical sensors. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(15), 3532-3554. <https://doi.org/10.1002/anie.201105459>
- Serrano, B., Baselga, J., Bravo, J., Mikes, F., Sese, L., Esteban, I., Pierola, I. F. (2000). Chemical imaging of phase-separated polymer blends by fluorescence microscopy. *Journal of Fluorescence*, 10(2), 135-135. <https://doi.org/10.1023/A:1009439024969>
- Singha, S., Jun, Y. W., Sarkar, S., Ahn, K. H. (2019). An endeavor in the reaction-based approach to fluorescent probes for biorelevant analytes: Challenges and achievements. *Accounts of chemical research*, 52(9), 2571-2581. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00314>
- Tyson, J. A., Calatayud, D. G., Mirabello, V., Mao, B., Pascu, S. I. (2016). Labeling of graphene, graphene oxides, and of their congeners: imaging and biosensing applications of relevance to cancer theranostics. *Advances in Inorganic Chemistry*, 68, 397-440. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2015.09.007>
- Ueno, T., & Nagano, T. (2011). Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature methods*, 8(8), 642-645. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1663>
- Valdes-Aguilera, O., Pathak, C. P., Neckers, D. C. (1990). Pyrene as a fluorescent probe for monitoring polymerization rates. *Macromolecules*, 23(2), 689-692. <https://doi.org/10.1021/ma00204a055>
- Valeur, B. (2003). Molecular fluorescence. *Digital Encyclopedia of Applied Physics*, 477-531. <https://doi.org/10.1002/3527600434.eap684>
- Valeur, B., Berberan-Santos, M. N. (2011). A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. *Journal of Chemical Education*, 88(6), 731-738. <https://doi.org/10.1021/ed100182h>
- Vendrell, M., Zhai, D., Er, J. C., Chang, Y. T. (2012). Combinatorial strategies in fluorescent probe development. *Chemical reviews*, 112(8), 4391-4420. <https://doi.org/10.1021/cr200355j>
- Wysocki, L. M., Lavis, L. D. (2011). Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. *Current opinion in chemical biology*, 15(6), 752-759. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.013>
- Xu, K., He, L., Yang, Y., Lin, W. (2019). A PET-based turn-on fluorescent probe for sensitive detection of thiols and H₂S and its bioimaging application in living cells, tissues and zebrafish. *New Journal of Chemistry*, 43(7), 2865-2869. <https://doi.org/10.1039/C8NJ04926B>
- Zhu, M., Xu, Y., Sang, L., Zhao, Z., Wang, L., Wu, X., Li, H. (2020). An ICT-based fluorescent probe with a large Stokes shift for measuring hydrazine in biological and water samples. *Environmental Pollution*, 256, 113427. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113427>