

UNIVERSIDAD DE MURCIA

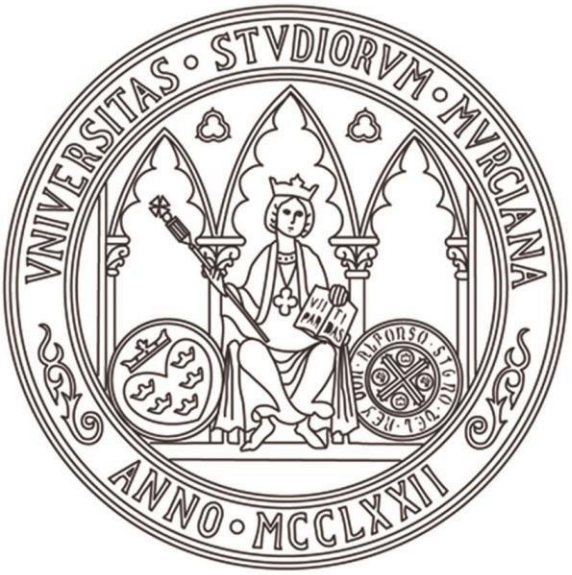
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Complejos organometálicos de Re(I), Ir(III), Ru(II) y Rh(III) con aplicaciones en medicina

D.ª Alicia Marco Calero

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Complejos organometálicos de Re(I), Ir(III), Ru(II) y Rh(III) con aplicaciones en medicina

Autor: D.ª Alicia Marco Calero

Director/es: D. José Ruiz López y

D.ª Natalia Cutillas Aulló

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Alicia Marco Calero

doctorando del Programa de Doctorado en

Química Básica y Aplicada

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Complejos organometálicos de Re(I), Ir(III), Ru(II) y Rh(III) con aplicaciones en medicina

y dirigida por,

D./Dña. José Ruiz López

D./Dña. Natalia María Sagrado Corazón Cutillas Aulló

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 26 de febrero de 2024

Fdo.: Alicia Marco Calero

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Firmante: ALICIA MARCO CALERO; Fecha-hora: 26/02/2024 09:51:40; Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios,OU=Ceres,O=FNMT-RCM,C=ES;

@dministración electrónica

Código seguro de verificación: RUxFMqe6-n2skDHZd-f0FBUBMA-Vwv0nuDq

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: https://sede.um.es/validador/

Este trabajo supone el punto final a cuatro años que conllevan muchas horas de dedicación, un gran aprendizaje, algún que otro sacrificio y, lo más importante, a personas que han hecho de este tiempo una experiencia vital única. Sin todas ellas habría sido más difícil llegar hasta aquí, por lo que me gustaría expresarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, a mi director de Tesis, el Dr. José Ruiz López, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación, y a mi directora y tutora, la Dra. Natalia Cutillas Aulló. Gracias por tu apoyo, tus ánimos y tu ayuda en todo momento, por la confianza depositada en mí y todas las ideas a lo largo de este camino.

Al resto de profesores del grupo de investigación, Loes, Venancio, Concha y Consuelo, por vuestro apoyo y ayuda.

A los colaboradores de otros grupos que han contribuido a este trabajo, el Prof. Dr. Fernando Gandía de la Universidad de Murcia, el Prof. Dr. Christoph Janiak de la Universidad de Düsseldorf, el Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa, la Dra. Delia Bautista de la Universidad de Murcia y la Dra. Natalia Busto de la Universidad de Burgos, y a los equipos de trabajo de todos ellos.

Al personal del Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia, especialmente a Diego, María del Mar, Pepe y María José, por su gran amabilidad, paciencia y disposición a ayudar siempre que lo he necesitado.

Reconocer también a la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, por la financiación recibida para la realización de la presente Tesis Doctoral a través de la concesión de un contrato FPI (21234/FPI/19). Así como a la Fundación Séneca por el proyecto 21989/PI/22 y al Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación (MCI/AEI/10.13039/501100011033) y fondos FEDER (Proyecto PID2021-122850NB-I00).

Por supuesto, a mis compañeros que formaron parte de Metalofármacos, Fran, Enrique y Gloria, por guiarme en mis inicios y enseñarme a trabajar en el laboratorio, y a los que siguen formando parte de él, Antonio, Isa, María José, Pezhman, Marta y, especialmente, a Alba, porque no me imagino estos años sin ti. Gracias por todos los buenos momentos que hemos vivido juntas, y por ayudarme a sobrevivir en los malos. Por último, no puedo olvidarme de los “acoplados”, Paco, por tus ánimos y apoyo, y María y Arturo, porque sois una de las mejores cosas que me ha dado la tesis. Gracias por vuestra bondad, cariño, consejos y disposición a ayudar siempre. Espero poder seguir disfrutando de vuestra amistad durante muchos años más.

A mis amigas, por escucharme, apoyarme y entenderme. Gracias a cada una de vosotras por todo lo que hemos vivido juntas, por saber que siempre estáis ahí cuando se os necesita.

A mis tíos y primos, por cuidarme y preocuparse siempre por mí.

A mis padres, por educarme libre y dejarme ser. Por cuidarme y guiarme, pero nunca juzgarme. A mi hermano, porque desde pequeña has sido para mí un ejemplo de persona trabajadora y valiente. Gracias por confiar en mí, sois un pilar fundamental en mi vida.

A Carmen, por haber vivido esta aventura junto a mí. Por compartir todos los días buenos, pero también los malos, ayudándome a salir a flote cuando más lo he necesitado. Por tu cariño y comprensión durante estos años.

Gracias a todas.

A mis abuelas, Amparo y Sofía,
que estarían muy orgullosas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Abreviaturas ..... **VII**

Tabla de compuestos ..... **XIII**

Capítulo 1: Introducción y objetivos **1**

1.1. Metales en medicina 3

1.2. Cáncer y primeros complejos de platino para su tratamiento 3

1.2.1. El cáncer en la actualidad y previsiones de futuro 3

1.2.2. Primeros complejos de platino para el tratamiento del cáncer 5

1.3. Complejos basados en otros metales 7

1.3.1. Complejos de renio para el tratamiento del cáncer 7

1.3.2. Complejos de iridio para el tratamiento del cáncer 10

1.4. Terapia fotodinámica 16

1.4.1. Primeros fotosensibilizadores para terapia fotodinámica 18

1.4.2. Complejos de rutenio para terapia fotodinámica 21

1.4.3. Complejos de iridio para terapia fotodinámica 24

1.5. Resistencia a antibióticos 26

1.5.1. Complejos metálicos de Ir y Rh como agentes antibacterianos 27

1.6. Objetivos 31

1.7. Bibliografía 32

Capítulo 2: Complejos de Re(I) como potenciales agentes selectivos y teragnósticos frente al cáncer. Estudios *in vivo* en *C. elegans* **43**

2.1. Introducción 45

2.2. Resultados y discusión 46

2.2.1. Síntesis 46

Síntesis de los ligandos N^N 46

Síntesis de los complejos metálicos 46

2.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos 47
Espectroscopia de RMN 47
Espectroscopia IR 50
Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) 51
2.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante rayos-X 53
2.2.4. Propiedades fotofísicas 55
2.2.5. Estudios de estabilidad 58
2.2.6. Estudio de hidrólisis 59
2.3. Estudios biológicos 60
2.4. Resumen 63
2.5. Bibliografía 64

Capítulo 3: Complejos de Ir(III) con ligando derivado de terpiridina: agentes antiproliferativos y antimetastásicos frente a cáncer de mama triple negativo 67

3.1. Introducción 69
3.2. Resultados y discusión 71
3.2.1. Síntesis 71
Síntesis de los proligandos HC^N 71
Síntesis de los complejos metálicos 71
3.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos 72
Espectroscopia de RMN 72
Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) 77
3.2.3. Propiedades fotofísicas 78
3.2.4. Estudios de estabilidad 80
3.2.5. Estudio de hidrólisis 81
3.2.6. Estudios de agregación 83
3.3. Estudios biológicos 85
3.3.1. Actividad antiproliferativa 85
3.3.2. Acumulación y localización en células 86

3.3.3. Mecanismo de muerte celular 87
3.3.4. Disrupción de la progresión del ciclo celular 88
3.3.5. Actividad antiinvasiva determinada por monitorización del crecimiento celular a tiempo real 89
3.3.6. Cuantificación de vimentina por citometría de flujo 90
3.3.7. Expresión de genes relacionados con EMT y MET 92
3.3.8. Morfología de la red de filamentos intermedios de vimentina 93
3.3.9. Ensayo de cierre de heridas 94
3.3.10. Cuantificación morfológica de esferoides tumorales y cuantificación del potencial de invasión celular 95
3.4. Resumen 97
3.5. Bibliografía 98

Capítulo 4: Complejos ciclometalados de Ir(III) y Ru(II) con ligandos de tipo quinoxalina: fotosensibilizadores para terapia fotodinámica 103

4.1. Introducción 105
4.2. Resultados y discusión 106
4.2.1. Síntesis 106
Síntesis de proligandos HC^N y ligando N^N 106
Síntesis de los complejos metálicos de Ir(III) 107
Síntesis de los complejos metálicos de Ru(II) 108
4.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos 108
Espectroscopia de RMN 108
Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) 109
4.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante rayos-X 111
4.2.4. Espectroscopia de absorción UV/Vis 114
4.2.5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad 116
4.2.6. Estudio de generación de ROS en medios libres de células 116
Generación de oxígeno singlete ($^1O_2$) 117
Generación de radical hidroxilo 119

4.3. Actividad biológica 121
4.4. Resumen 122
4.5. Bibliografía 123
Capítulo 5: Complejos de Ir(III) y Rh(III) semi-sándwich activos frente a bacterias Gram-positiva multirresistentes 125
5.1. Introducción 127
5.2. Resultados y discusión 128
5.2.1. Síntesis 128
Síntesis de los proligandos HC^N 128
Síntesis de los complejos metálicos 128
5.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos 129
Espectroscopia de RMN 129
Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) 134
5.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante rayos-X 135
5.2.4. Espectroscopia de absorción UV/Vis 136
5.2.5. Estudios de estabilidad 137
5.2.6. Estudios de hidrólisis 140
5.3. Estudios de la actividad antibacteriana *in vitro* 141
5.4. Resumen 143
5.5. Bibliografía 143
Capítulo 6: Conclusiones 147
Sección experimental 151
1. Materiales y reactivos 153
2. Instrumentación 153
2.1. RMN 153
2.2. Análisis elemental 153
2.3. Espectroscopia IR 154
2.4. Espectrometría de masas (ESI/MS o HPLC/MS) 154
2.5. Espectroscopia de absorción UV/Vis 155

2.6. Espectroscopia de emisión, medidas de rendimientos cuánticos de emisión y tiempos de vida media 155
2.7. Fuentes de irradiación de luz visible 155
2.8. Reacciones en microondas 155
3. Síntesis de los compuestos 155
3.1. Capítulo 2 155
Síntesis de ligandos N^N 155
Síntesis de complejos 156
3.2. Capítulo 3 162
Síntesis de proligandos HC^N 162
Síntesis de complejos 163
3.3. Capítulo 4 169
Síntesis de proligandos HC^N 169
Síntesis del ligando N^N 169
Síntesis de complejos de Ir(III) 170
Síntesis de complejos de Ru(II) 172
3.4. Capítulo 5 174
Síntesis de proligandos HC^N 174
Síntesis de complejos 176
4. Propiedades químicas, fotofísicas y fotoquímicas 178
4.1. Medidas de absorción y emisión 178
4.2. Medidas de estabilidad y fotoestabilidad por UV/Vis 178
4.3. Estudio del equilibrio de hidrólisis por RMN 178
4.4. Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete 179
4.5. Estudio de generación de radical hidroxilo 179
5. Toma de datos de difracción de rayos-X y refinamiento de las estructuras cristalinas 179
5.1. Capítulo 2 179
5.2. Capítulo 4 180

5.3. Capítulo 5 180
6. Experimentos biológicos 181
6.1. Capítulo 3 181
6.2. Capítulo 4 186
6.3. Capítulo 5 187
7. Bibliografía 188

ANEXOS

Anexo I A1
Anexo II A57
Anexo III A121
Anexo IV A147

ABREVIATURAS

A2780	línea celular de cáncer de ovario
ACN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
ACQ	apagado de la emisión por agregación
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIE	emisión inducida por agregación
Ar	anillo aromático
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
atm. N_2	atmósfera de nitrógeno
BGM	línea celular sana de riñón de mono
bpy	bipiridina
Bu	butilo
Bzq	7,8-benzoquinolina
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
CD_3Cl	cloroformo deuterado
CD_3CN	acetonitrilo deuterado
CDDP	cisplatino
Cg	centroide del anillo
CI	índice celular
ClPhq	4-cloro-2-fenilquinolina
Cp*	pentametilciclopentadienilo
Cp	ciclopentadienilo
d	doblete
D_2O	agua deuterada

DAPI	4’,6-diamidino-2-fenilindo
DCM	diclorometano
dFPhpy	2-(2,4-difluorofenil)piridina
DMAP	4-*N,N*-dimetilaminopiridina
DMEM	medio de cultivo *Dulbecco’s modified Eagle*
DMF	*N,N*-dimetilformamida
DMF-d_7	*N,N*-dimetilformamida deuterada
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	dimetilsulfóxido deuterado
Dox	doxorrubicina
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
dpbq	2,3-difenilbenzo[*g*]quinoxalina
dpp	2,3-difenilpirazina
dppn	benzo[i]dipirido[3,2-a:2′,3′-c]fenazina
dppz	dipirido[3,2-*a*:2′,3′-*c*]fenazina
dppz-izdo	dipirido[3,2-*a*:2′,3′-*c*]fenazina-10,11-imidazolona-2
dpq	pirazino[2,3-*f*][1,10]fenantrolina
dpqx	2,3-difenilquinoxalina
EMT	transición epitelio-mesénquima
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización mediante electrospray
ESKAPE	*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter species*
Et	etilo
Et_2O	éter etílico
EtOH	etanol
FAAS	espectroscopía de absorción atómica de llama

Fac-	orientación facial
FBS	suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FS	factor de selectividad, IC_{50} (línea sana) / IC_{50} (línea tumoral)
GSH	glutatión
HAIs	infecciones adquiridas en hospital
HDAC	histona deacetilasa
HeLa	línea tumoral de cáncer cervical
HPF	3'-*p*-(hidroxifenil)fluoresceína
HPLC/MS	cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas
IC_{50}	concentración de fármaco que inhibe el 50% de la actividad celular
ICP/MS	espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IDH	índice de desarrollo humano
IL	intraligando
ILCT	transferencia de carga intraligando
IP	ioduro de propidio
IR	infrarrojo
ISC	cruce entre sistemas
KOAc	acetato de potasio
LLCT	transferencia de carga ligando-ligando
LMCT	transferencia de carga ligando-metal
LogP	coeficiente de partición octanol/agua
m/z	relación masa-carga
m	multiplete
MBC	Concentración mínima bactericida
MCF-10A	línea sana de mama

MCF-7	línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231	línea celular de cáncer de mama triple negativo
Me	metilo
MeI	ioduro de metilo
MeOD-d_4	metanol deuterado
MeOH	metanol
MePhpy	2-(p-tolil)piridina
MET	transición mesénquima-epitelio
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MLCT	transferencia de carga metal-ligando
mopqx	2,3-bis(4-metoxifenil)benzo[*g*]quinoxalina
MS	espectrometría de masas
MT	multivulva
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NaOAc	acetato de sodio
NH_4OAc	acetato de amonio
NIR	Infrarrojo cercano
NMe_2	dimetilamino
NSCLC	cáncer de pulmón de células no pequeñas
OD_{600}	densidad óptica bacteriana
OMe	metoxi
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	suero tampón fosfato
PCC	coeficiente de correlación de Pearson
PDT	terapia fotodinámica

phen	fenantrolina
Phpy	2-fenilpiridina
Phq	1-fenilisoquinolina
PI	índice de fototoxicidad o fotoactivación
ppm	partes por millón
PS	fotosensibilizador
Py	piridina
RFP	proteína roja fluorescente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de cultivo “*Roswell Park Memorial Institute*”
RT-gPCR	PCR de transcripción inversa cuantitativa
RX	Rayos-X
S	singlete
SAR	relación estructura actividad
SCLC	cáncer de pulmón de células pequeñas
SEM	microscopía electrónica de barrido
SRB	sulforodamina B
t.a.	temperatura ambiente
t	triplete
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
t_{inv}	tiempo de invasión
TNBC	cáncer de mama triple negativo
t_R	tiempo de retención
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

ttpy	4′-(*p*-tolil)-2,2′:6′,2″-terpiridina
UV/Vis	ultravioleta visible
VIF	filamento intermedio de vimentina
VPA	ácido valproico

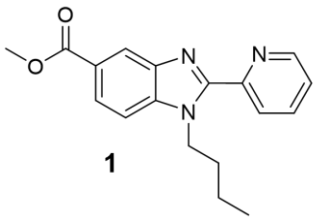
SÍMBOLOS

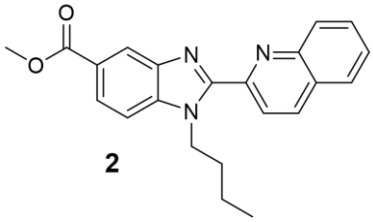
[^{1}H-^{13}C]-HMBC	Experimento de RMN bidimensional de correlación protón-carbono a varios enlaces
[^{1}H-^{13}C]-HSQC	Experimento de RMN bidimensional de correlación protón-carbono a través de los enlaces
[^{1}H-^{1}H]-COSY	Experimento de RMN bidimensional de correlación protón-protón a través de los enlaces
[^{1}H-^{1}H]-NOESY	Experimento de RMN bidimensional de correlación protón-protón a través del espacio
135-DEPT	Experimento de RMN con el método de mejora sin distorsión por transferencia de polarización a 135 º
^{13}C-RMN	Espectroscopia de RMN de carbono desacoplado de protón
^{1}H-RMN	Espectroscopia de RMN de protón
Φ	Rendimiento cuántico

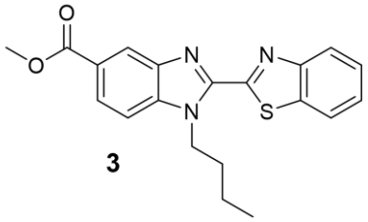
Tabla de compuestos

Capítulo 2

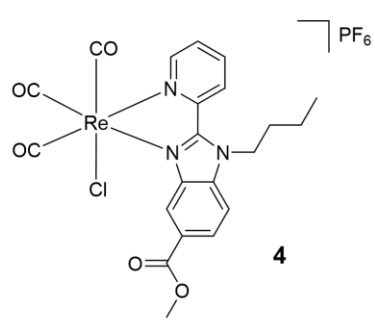
Ligandos N^N

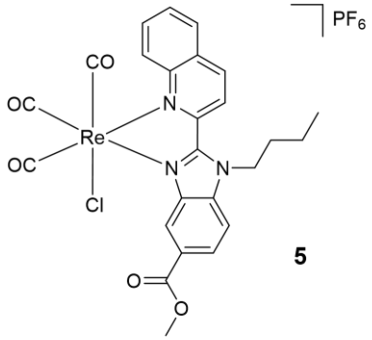

1

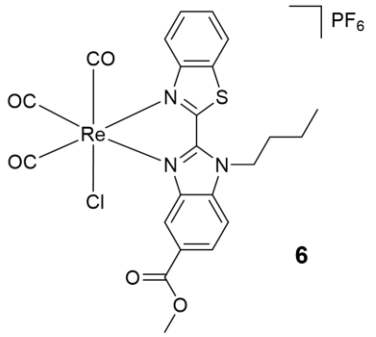

2

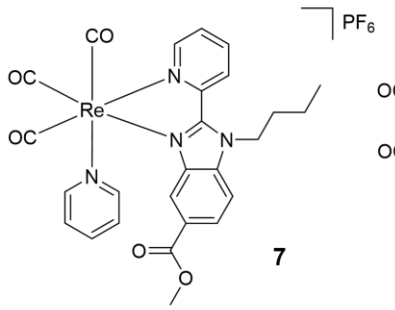

3

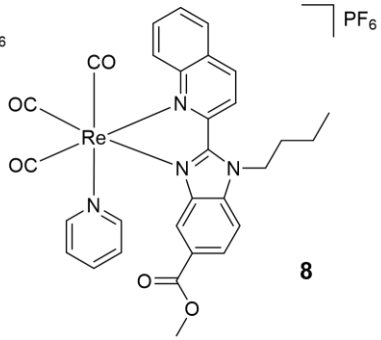
Complejos

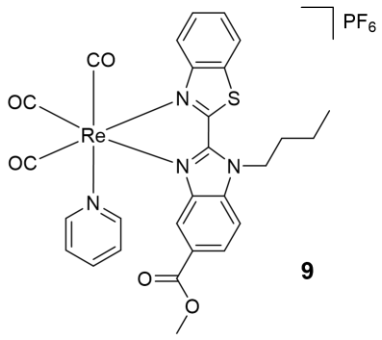

4

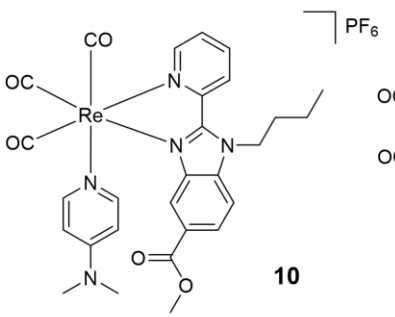

5

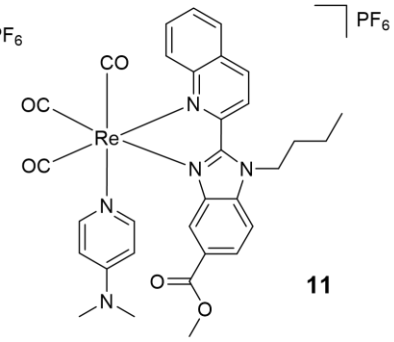

6

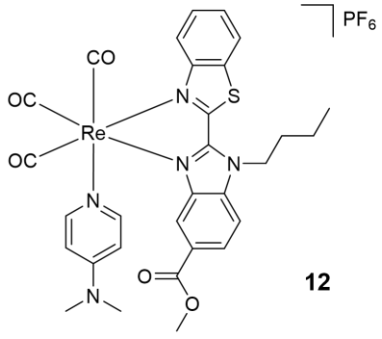

7


8


9

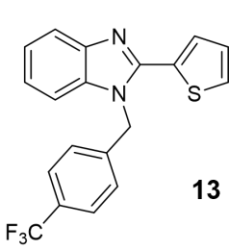

10


11

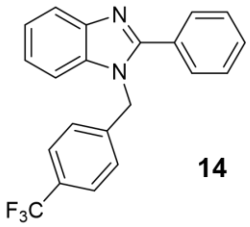

12

Capítulo 3

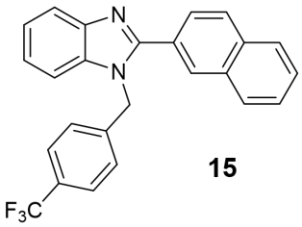
Proligandos HC^N



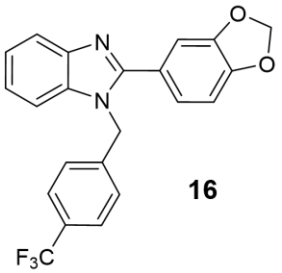
13



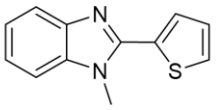
14



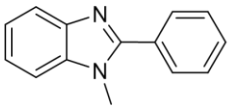
15



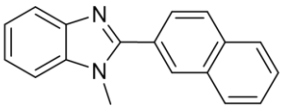
16



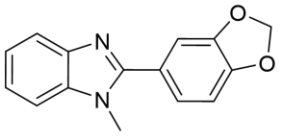
17



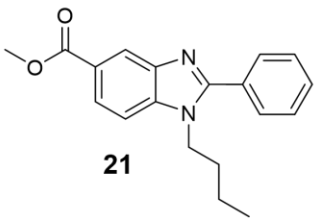
18



19

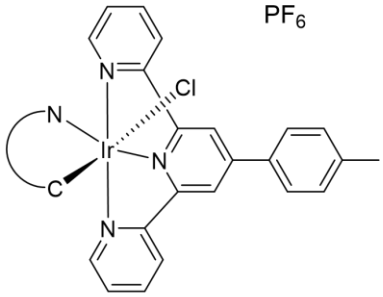


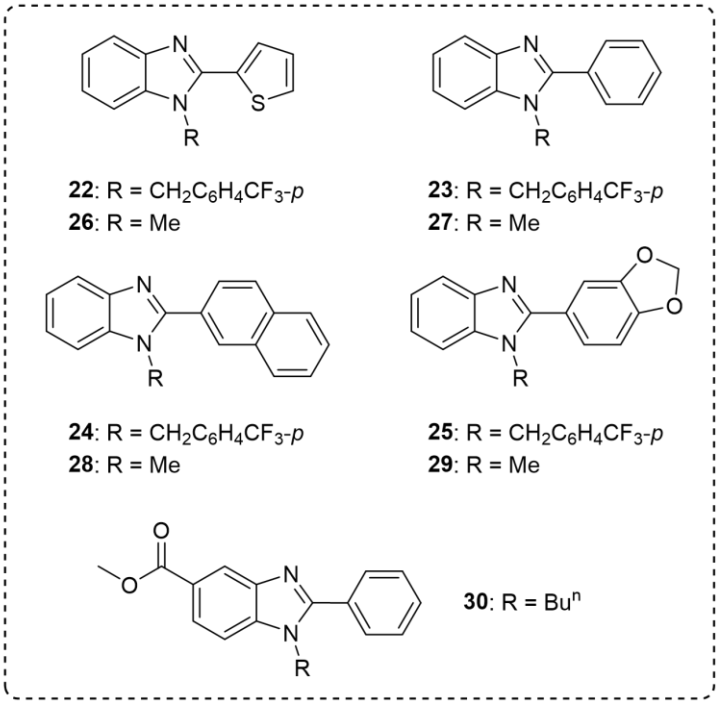
20



21

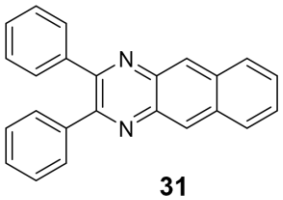
Complejos



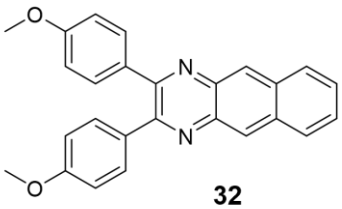


Capítulo 4

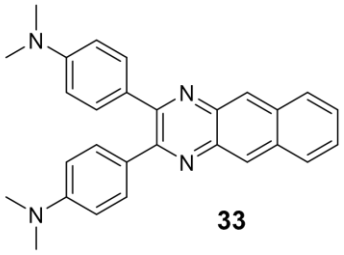
Proligandos HC^N



31

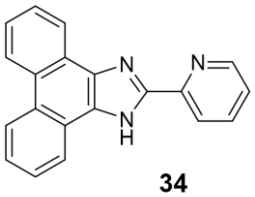


32



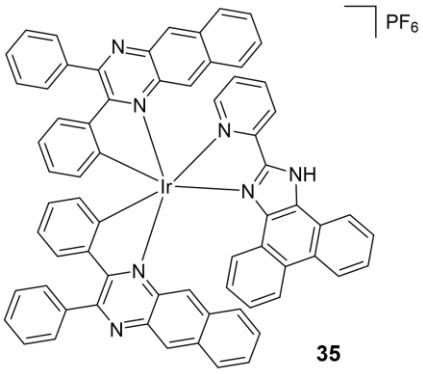
33

Ligando N^N

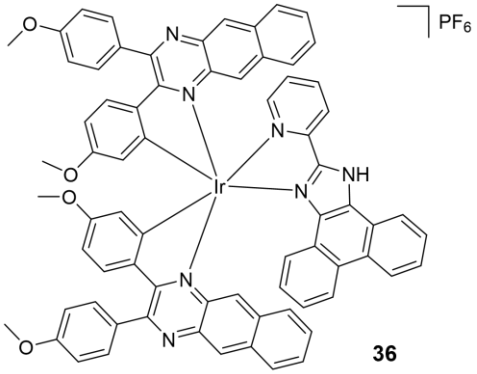


34

Complejos de Ir(III)

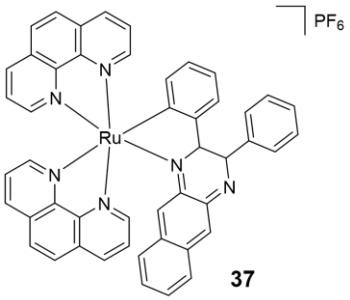


35

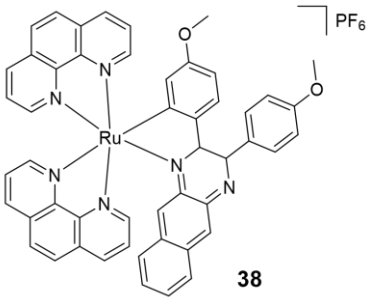


36

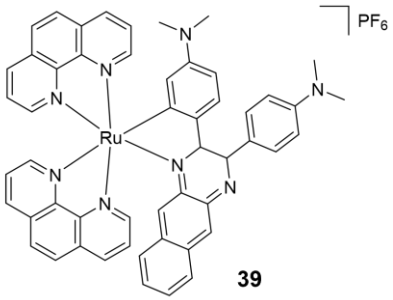
Complejos de Ru(II)



37



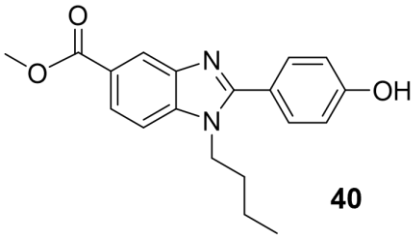
38



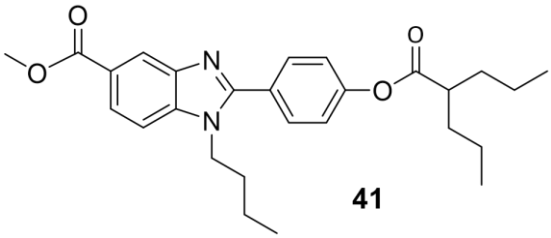
39

Capítulo 5

Proligandos HC^N

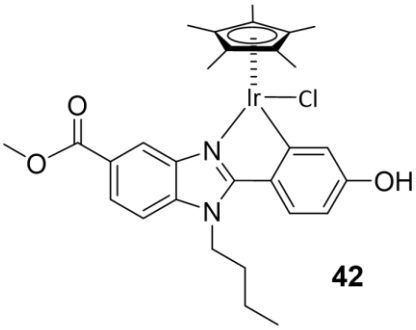


40

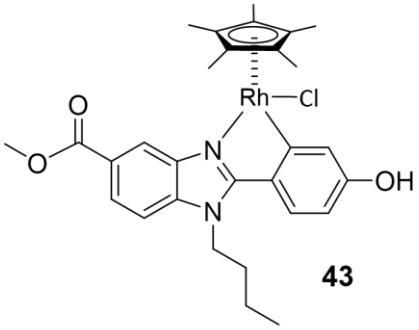


41

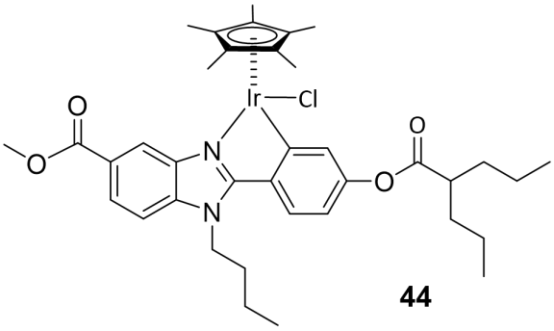
Complejos



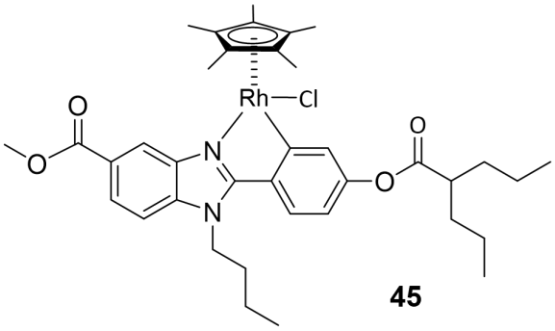
42



43



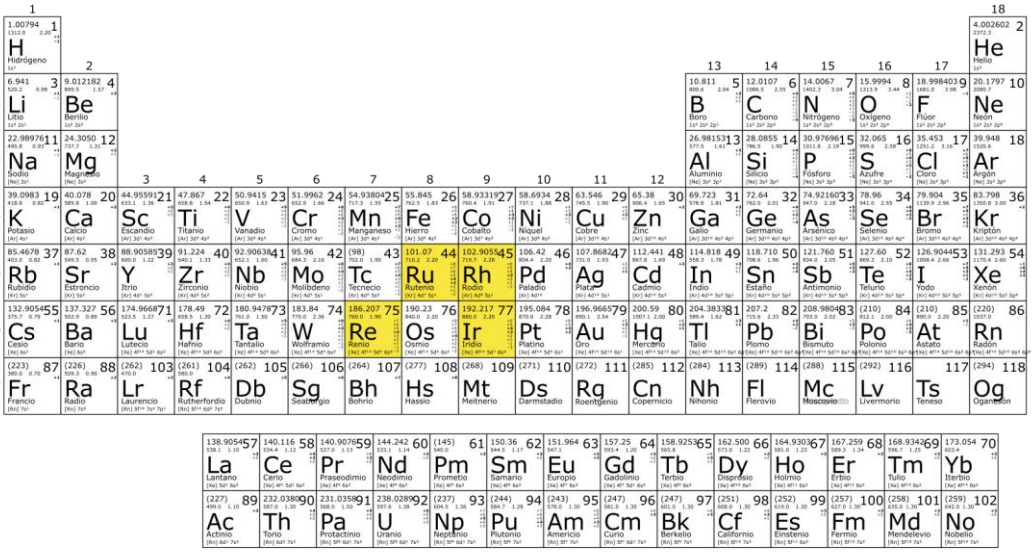
44



45

Capítulo 1

Introducción y objetivos



1.1. Metales en medicina

El uso de metales en medicina es una práctica ancestral que se remonta miles de años.[1] En el 3000 a.C. los egipcios utilizaban cobre para esterilizar el agua y hace 3500 años el oro se empleaba para diversos usos médicos en Arabia y China (más por su naturaleza de metal precioso que por el conocimiento de sus propiedades médicas). En el 1500 a.C. en Egipto usaban diversos remedios basados en hierro y en la misma época se descubrió que el zinc favorecía la cicatrización de heridas. En la era del Renacimiento europeo el cloruro de mercurio se empleaba como diurético y se descubrió que el hierro es un nutriente esencial. Pero ha sido en los últimos 100 años cuando se ha desarrollado de manera racional la actividad médica de los compuestos inorgánicos. Desde entonces, el conocimiento de la importancia de los elementos inorgánicos en los organismos ha abierto la posibilidad a los químicos de contribuir a la salud y bienestar humano. A principios de 1900 se empleó $K[Au(CN)_2]$ para tratar la tuberculosis, compuestos de antimonio para la leishmaniosis y sales de oro como antibacterianas.[2] El descubrimiento del compuesto de arsénico, arsfenamina (Salvarsán), en los años 20 para el tratamiento de la sífilis y posteriormente, en la década de los 60, del cisplatino para el tratamiento del cáncer, han propiciado el interés por la investigación en este campo.

En la década de los noventa los estudios se centraban en Pt, Gd, Tc, Au, V, Bi y Li, pero desde entonces esta lista ha seguido ampliándose a otros centros metálicos como Ru, Os, Ir y Re. El cáncer sigue predominando en el ámbito de las aplicaciones, pero en los últimos años, la creciente necesidad de desarrollar fármacos innovadores para hacer frente a las enfermedades infecciosas ha impulsado un aumento de la investigación de antibióticos basados metales.[1]

1.2. Cáncer y primeros complejos metálicos para su tratamiento

1.2.1. El cáncer en la actualidad y previsiones de futuro

El término “cáncer” se utiliza para aludir a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos (metástasis). Según el último informe de la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (Lyon, 2020),[3] se calcula que en el año 2020, en todo el mundo, se produjeron 19,3 millones de nuevos casos y al menos 10,0 millones de muertes por esta patología. El cáncer de mama ha superado al de pulmón convirtiéndose en el más diagnosticado, con una estimación de 2,3 millones de nuevos casos (11,7%), seguido del de pulmón (11,4%), colorrectal

(10,0%), próstata (7,3%) y estómago (5,6%). Respecto a la mortalidad, el de pulmón se mantiene como el más mortífero, con una estimación de 1,8 millones de muertes (18%), seguido del colorrectal (9,4%), hígado (8,3%), estómago (7,7%) y mama (6,9%). Para el año 2040 (**Figura 1.1**), se prevén 28,4 millones de nuevos casos, lo que supone un aumento del 47% con respecto al 2020, con un incremento mayor en los países en vías de desarrollo (del 64% al 96%) que en los desarrollados (del 32% al 56%) debido a los cambios demográficos. Esta situación puede verse agravada por el aumento de los factores de riesgo asociados a la globalización y al crecimiento económico. Los esfuerzos por crear una infraestructura sostenible para la difusión de medidas de prevención del cáncer y la prestación de atención oncológica en los países en transición son fundamentales para el control mundial del cáncer.[4]

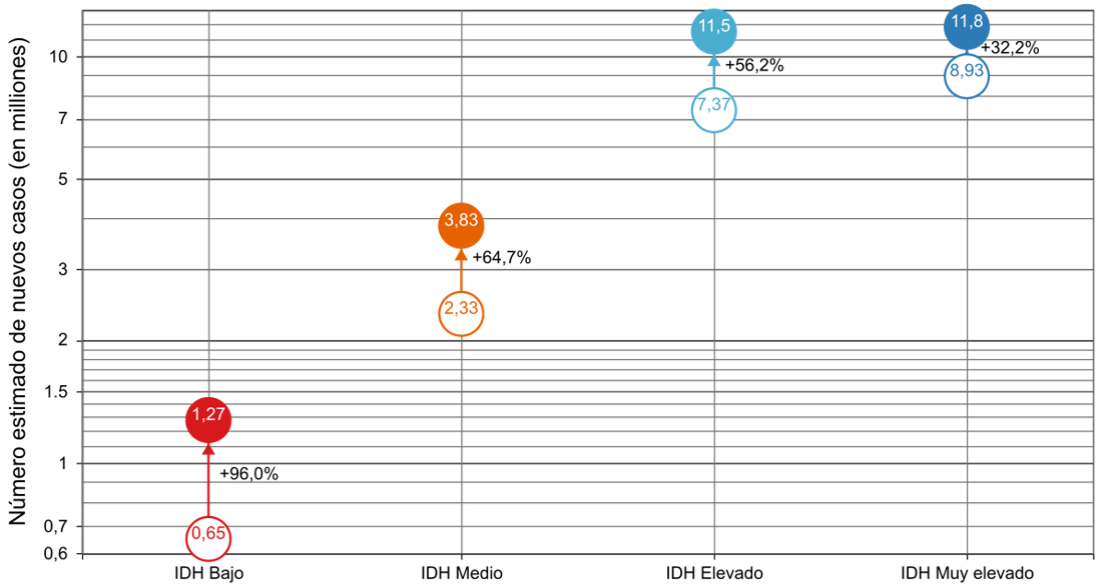


Figura 1.1. Estimación del número de nuevos casos para todos los tipos de cáncer (para ambos sexos) en 2040 según el Índice de Desarrollo Humano (IDH). Fuente: *GLOBOCAN 2020*.[5]

Se trata de una patología muy compleja cuyos patrones y tendencias de mortalidad varían mucho entre los distintos países y los diversos tipos de cáncer, debido a los diferentes estilos de vida, a la distinta exposición a carcinógenos, conocidos o no, así como a factores de contaminación medioambiental, y a la calidad de la infraestructura sanitaria existente.[6–9] En la mayoría de países con un elevado Índice de Desarrollo Humano (IDH), las tasas de mortalidad por cáncer están disminuyendo, principalmente como resultado del éxito logrado con las medidas de prevención, detección temprana y tratamiento. En cambio, en los países en transición, las tasas de mortalidad siguen aumentando o como mucho estabilizándose, como ocurre en el caso del cáncer de mama, próstata y colon.[6,9]

La prevalencia del cáncer ha generado la necesidad acuciante de desarrollar métodos efectivos de tratamiento. Habitualmente involucran una combinación de técnicas a través de las cuales, generalmente, el tumor se elimina mediante un procedimiento quirúrgico y el paciente es tratado mediante inmunoterapia, radioterapia o quimioterapia.

1.2.2. Primeros complejos de platino para el tratamiento del cáncer

El cisplatino (*cis*-diamminodicloruroplatino(II), **Figura 1.2**), es conocido como cloruro de Peyrone desde finales del siglo XIX, ya que Michele Peyrone fue el primero en sintetizarlo.[10] Sin embargo, su actividad citostática fue descubierta a finales de los años sesenta por Barnett Rosenberg cuando analizaba el efecto de un campo eléctrico sobre el crecimiento bacteriano. Observó que la proliferación bacteriana se paralizaba e inmovilizaba debido a compuestos de platino que se generaban a partir del electrodo utilizado. Posteriormente, tras profundizar en el estudio, identificó al cisplatino como un compuesto clave responsable del efecto antiproliferativo.[11] Los ensayos clínicos se iniciaron en el año 1971, y finalmente, en 1979, tanto la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) como algunos países europeos aprobaron su uso para el tratamiento del cáncer testicular y de ovario.[12]

El cisplatino (CDDP) es activo frente a un amplio espectro de tumores sólidos: ovario, testículo, vejiga, colon, pulmón, cabeza y cuello.[13–15] A menudo da lugar a una respuesta terapéutica asociada a una remisión completa, una respuesta parcial o a la estabilización de la enfermedad. Sin embargo, la terapia con CDDP va acompañada de importantes efectos secundarios como nefrotoxicidad, daño en los nervios periféricos, náuseas severas y vómitos.[10,16] Además, la resistencia al cisplatino representa el mayor obstáculo para el éxito del tratamiento. Muchos tumores son intrínsecamente resistentes a los fármacos de platino y otros, que son sensibles al principio, desarrollan una resistencia gradual tras la respuesta inicial.[17]

Los estudios realizados hasta la fecha indican que su mecanismo biológico está relacionado con el daño del ADN, la inhibición de la replicación y la transcripción o la combinación de ambos procesos. Uno de los principales factores que contribuye a la citotoxicidad del cisplatino es la formación de enlaces covalentes cuando interacciona con el ADN y la poca capacidad celular de reparar el ADN dañado.[10]

La segunda generación de fármacos de platino incluye, entre otros, a carboplatino (*cis*-diammino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II), **Figura 1.2**) que fue desarrollado con el fin de reducir la toxicidad del CDDP.[18] Su mecanismo de acción es similar al del cisplatino, pero presenta un menor grado de acuación debido al ligando

bidentado que posee.[19] Como resultado de la menor reactividad, la neurotoxicidad y nefrotoxicidad observadas tras su uso son mucho menores, por lo que se puede emplear en mayores dosis.[20] Este fármaco está aceptado a nivel mundial y ha reemplazado al cisplatino, en combinación con paclitaxel, en el tratamiento de diversos tumores como el cáncer de ovario.[20,21] Sin embargo, carboplatino tiene una eficacia limitada frente a los cánceres de testículos, carcinoma de células escamosas, de cabeza, de cuello y de vejiga, por lo que el cisplatino continúa empleándose para tratar estas enfermedades. Además, como ocurre con CDDP, la resistencia de los tumores al carboplatino es uno de los principales problemas de aplicación clínica.[22] Los mecanismos implicados en este proceso son similares en ambos casos.[23]

Otro ejemplo de compuesto de segunda generación es el nedaplatino (*cis*-diamminoglicolatoplatino(II), **Figura 1.2**). Aunque también mejora el perfil de toxicidad del CDDP, sólo ha sido aprobado en Japón para el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de cuello, cabeza y esofágico.[24,25]

Con el objetivo de superar la resistencia intrínseca de algunos tumores a los compuestos anteriormente mencionados, se desarrollaron los compuestos que conforman la tercera generación. Uno de ellos es el oxaliplatino (**Figura 1.2**). En combinación con 5-fluorouracil y folinato, se emplea para tratar el cáncer metastásico colorrectal que es intrínsecamente insensible al CDDP.[10,26,27] Su mecanismo de acción es diferente al del cisplatino, ya que inhibe la transcripción, y no produce resistencia cruzada con los anteriores.[28] Por lo tanto, el oxaliplatino y el cisplatino pueden lograr un efecto complementario en el tratamiento clínico contra el cáncer y han sido ampliamente utilizados.[28] Por otro lado, el ligando oxalato también reduce significativamente su reactividad limitando algunos efectos secundarios, como la neuropatía sensorial periférica.[25]

Otros fármacos de tercera generación son lobaplatino y heptaplatino (**Figura 1.2**). El primero sólo ha sido aprobado en China para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, leucemia mielógena crónica y cáncer de pulmón de células pequeñas.[25,29] El heptaplatino, en cambio, sólo se utiliza en la República de Corea para el tratamiento del cáncer gástrico.[25,30]

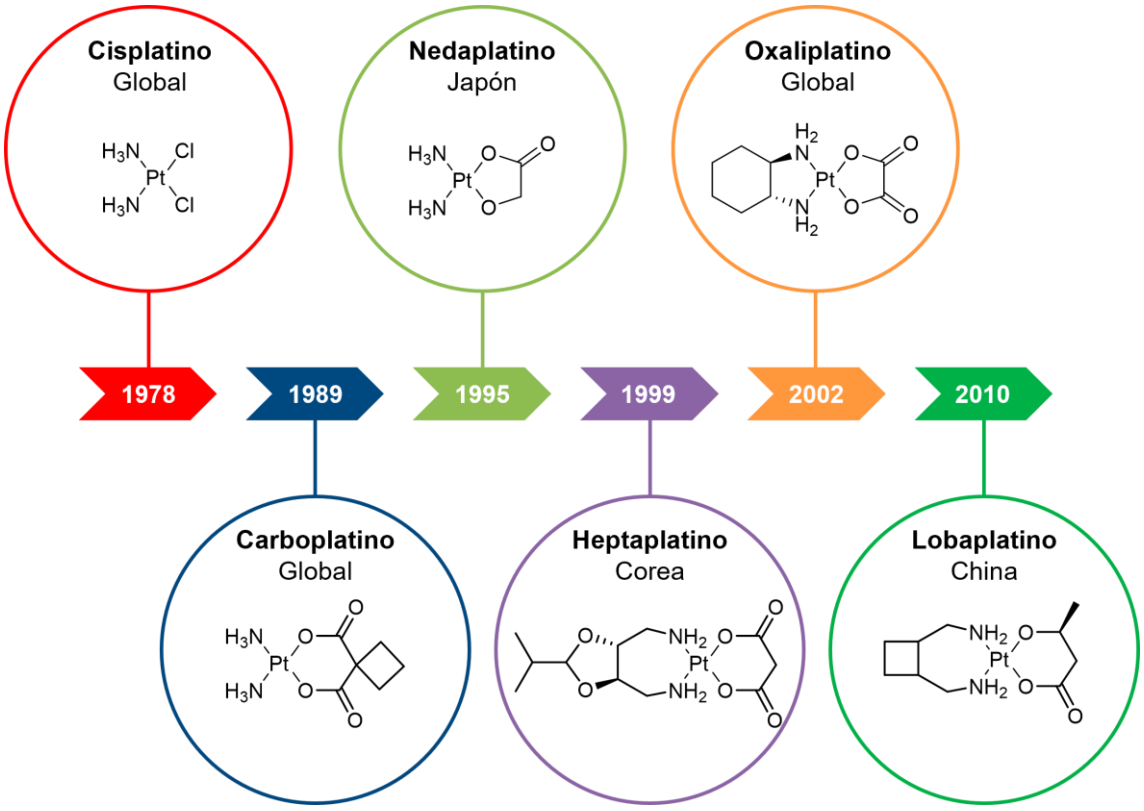


Figura 1.2. Fármacos de platino en uso clínico, junto con el año en que se aprobaron. Imagen adaptada.[22]

1.3. Complejos basados en otros metales

Tras el descubrimiento de los fármacos de platino como agentes quimioterapéuticos y dados sus efectos secundarios y la resistencia clínica de algunos tumores a su tratamiento, en los últimos años se han desarrollado alternativas basadas en otros metales de transición con el fin de mejorar los inconvenientes comentados.

1.3.1. Complejos de renio para el tratamiento del cáncer

Actualmente radiofármacos basados en ^{186}Re y ^{188}Re se utilizan en terapia del cáncer debido a que emiten radiación β^- y a que sus tiempos de vida media son cortos.[31,32] Sin embargo, la investigación en complejos antitumorales basados en este metal no fue significativa hasta la década del 2010. Desde entonces se han descrito numerosos ejemplos con gran potencial, gracias a que poseen interesantes propiedades intrínsecas para su aplicación en este campo.[33] La gran mayoría de los compuestos descritos presentan el núcleo *fac*-$Re(CO)_3$, debido a su estabilidad térmica y cinética, síntesis sencilla, y a la habilidad para formar complejos catiónicos o neutros, además de poseer excelentes propiedades fotoquímicas: fotoactivación, actividad redox, intercambio de ligandos o actividad catalítica;[34] y excelentes propiedades fotofísicas: largos desplazamientos de Stokes, largos tiempos de vida del estado excitado, elevados rendimientos cuánticos y buena emisión, que se puede modificar variando los

ligandos,[35,36] lo que permite observar el compuesto en el interior de la célula por microscopía, ayudando a estudiar su distribución celular y su mecanismo de acción. Además, muchos presentan una citotoxicidad prometedora y, como consecuencia de todo ello, estos complejos están emergiendo como prometedores agentes anticancerígenos y pueden ser una alternativa viable a los fármacos basados en platino.[37] Por otro lado, en general, sus mecanismos de acción son diferentes a los de los agentes convencionales de platino.[38–42] Su eficacia antitumoral *in vivo* es todavía poco conocida.[43,44]

Uno de los pioneros en investigar este tipo de complejos de renio (*fac*-[$Re(CO)_3$]) fue el grupo de Wilson, que desarrolló una serie de acuocomplejos que presentaron elevada citotoxicidad frente a diversas líneas celulares tumorales. El estudio del mecanismo de acción del mejor candidato de la serie (**Figura 1.3**), reveló que induce vacuolización citoplasmática de naturaleza lisosomal y muerte celular sin aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) ni despolarización de la membrana mitocondrial. Además, se observó que el modo de muerte celular no entraba en ninguna de las categorías canónicas como apoptosis, necrosis, paraptosis y autofagia, lo que sugería que podía ser diferente para esta clase de compuestos. Los estudios *in vivo* de su biodistribución y metabolismo en ratones demostraron buena estabilidad metabólica, confirmando que es adecuado para aplicaciones *in vivo*.[39]

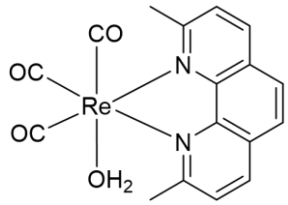


Figura 1.3. Complejo sintetizado por Wilson y colaboradores.[39]

En ese sentido, Gasser *et al*. han publicado recientemente los complejos de renio(I) que se muestran en la **Figura 1.4**. Aunque ambos son selectivos y activos frente a células de adenocarcinoma de próstata y disminuyen la producción de ATP, el compuesto **A** (**Figura 1.4A**) se acumula preferentemente en la mitocondria, mientras que **B** (**Figura 1.4B**) lo hace en el núcleo. Además, difieren en el tipo de muerte celular que provocan, **A** por paraptosis y **B** no encaja en los modos ensayados (necrosis, autofagia o paraptosis) aunque se detecta apoptosis en un porcentaje muy bajo. Todo ello sugiere la importancia de la naturaleza de los sustituyentes en el ligando N,N-dador sobre el mecanismo de muerte celular.[45]

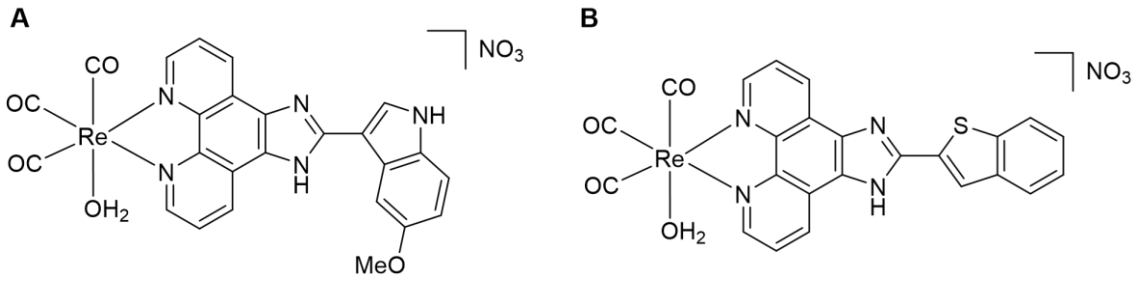


Figura 1.4. Complejos sintetizados por el grupo de Gasser.[45]

Por otro lado, el grupo de investigación de Mao desarrolló varios complejos funcionalizados con deferasirox, un fármaco empleado como agente quelatante de hierro cuando hay exceso de éste. El compuesto más activo (**Figura 1.5**) es capaz de aumentar la metilación de histonas, ADN y ARN y, en consecuencia, de afectar a eventos relacionados con la apoptosis, ARN-polimerasas y rutas de señalización relacionadas con las células-T. Resultó ser muy citotóxico en células de cáncer de mama triple negativo con un elevado factor de selectividad por las líneas tumorales. Además, es capaz de producir muerte celular inmunogénica con una potente actividad antitumoral *in vivo*.[46]

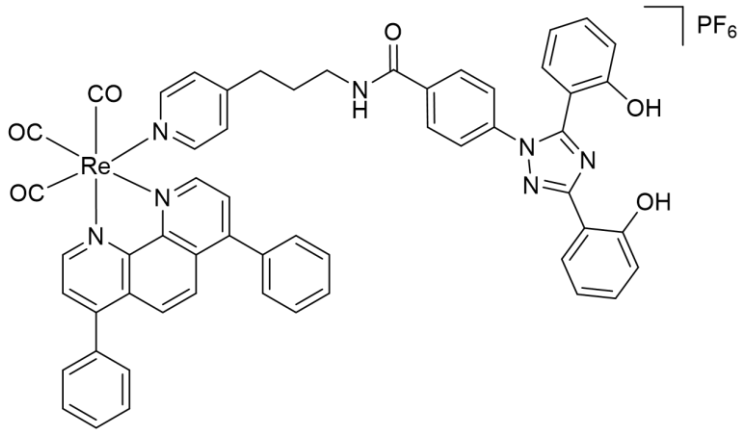


Figura 1.5. Complejos sintetizados por Mao *et al*.[46]

Así mismo, Li y colaboradores prepararon los compuestos de la **Figura 1.6**, funcionalizados con artesunato, un derivado químico de la artemisinina que presenta diversos efectos antitumorales, como antiproliferativo, regulador del ciclo celular y proapoptosis.[47] Se caracterizaron por su elevada citotoxicidad frente a células de cáncer de pulmón y de cérvix. El estudio de su mecanismo de acción demostró que inducen tanto apoptosis como ferroptosis a través del daño mitocondrial dependiente de caspasas y la alteración de los niveles de glutatión.[48]

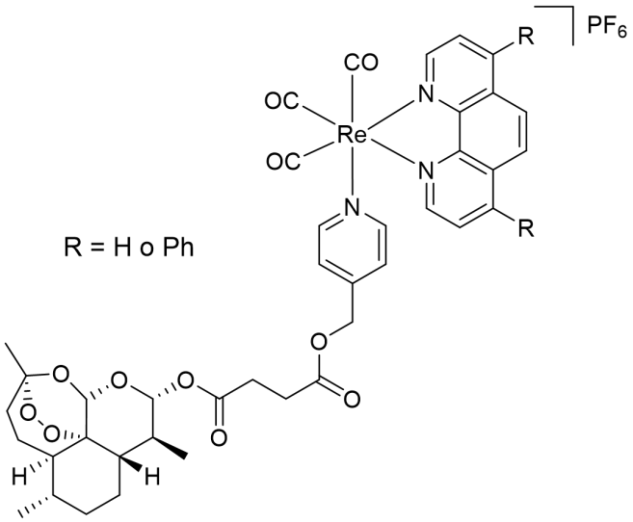


Figura 1.6. Complejos sintetizados por Li y colaboradores.[48]

Finalmente, Zobi *et al*. estudiaron *in vivo* los compuestos que aparecen en la **Figura 1.7**, utilizando modelos de carcinoma colorrectal en pez cebra. Observaron que no sólo presentan actividad anticancerígena, sino que también antiangiogénica y antimetastásica, inhibiendo casi completamente el crecimiento del tumor, su vascularización y la metástasis. Además, las dosis empleadas no fueron tóxicas para el modelo animal, mejorando notablemente los resultados de otros fármacos en uso clínico.[41]

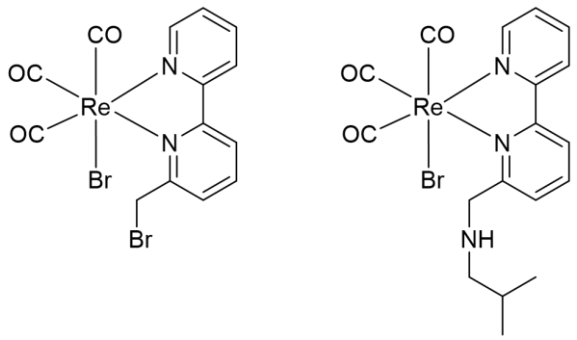


Figura 1.7. Complejos sintetizados por el grupo de Zobi.[41]

1.3.2. Complejos de iridio para el tratamiento del cáncer

El iridio, metal de transición del grupo del platino, posee interesantes propiedades fisicoquímicas que permiten modular la actividad de los complejos desde especies lábiles hasta otras prácticamente inertes. Además, presentan importantes ventajas frente a los de platino, como son una síntesis sencilla y una elevada estabilidad al aire y a la humedad.[49,50] Por todo ello, en los últimos años este metal ha despertado un enorme interés en el campo de la química inorgánica médica.

Los primeros complejos de iridio descritos como agentes anticancerígenos datan de los años setenta. Son complejos de Ir(I) (d^8), plano-cuadrados, isoelectrónicos a los de Pt(II), con uno o dos ligandos 1,5-ciclooctadieno.[51,52]

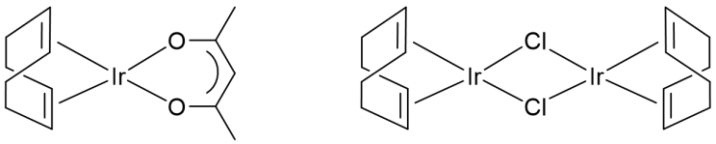


Figura 1.8. Complejos de Ir(I) plano-cuadrados.

Sin embargo, actualmente tienen más relevancia los de Ir(III), tanto los de tipo "semi-sándwich" como los octaédricos. Los del primer grupo destacan por su prometedora actividad antriproliferativa frente a una gran variedad de líneas de células cancerígenas.[53] Sadler y colaboradores han investigado extensamente estos compuestos pseudo-octaédricos de fórmula general $[(\eta^5\text{-}Cp^x)Ir(X\text{^}Y)L]^{0/+}$ (**Figura 1.9**), donde Cp^x es pentametilciclopentadienilo (Cp*) o un derivado de éste, X^Y es un ligando bidentado quelato de tipo N^N, C^N o N^O, y L es un ligando monodentado aniónico (un ion haluro) o neutro (como piridina o derivados). Gracias a la versatilidad de los ligandos, se ha preparado un gran número de complejos para los que pequeñas modificaciones en el entorno del metal suelen implicar cambios importantes en las propiedades del metalofármaco.[53]

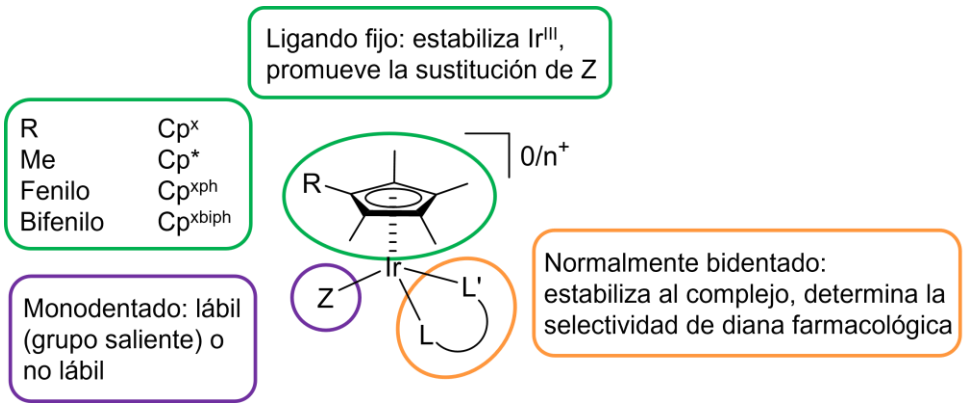


Figura 1.9. Estructura general de complejos de Ir(III) de tipo semi-sándwich con ligando pentametilciclopentadienilo. Los ligandos afectan a las propiedades químicas y biológicas. Imagen adaptada.[53]

En este sentido, Sadler *et al.* publicaron una serie de compuestos donde se evaluó el efecto electrónico en la actividad anticancerígena, siendo el complejo más activo frente a células de cánceres de ovario, pulmón y mama, el que contiene el grupo dador *N,N*-dimetilamino (**Figura 1.10**). Estos compuestos generan un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno en células de cáncer de ovario, provocando la disfunción mitocondrial por alteración del potencial de membrana.[54]

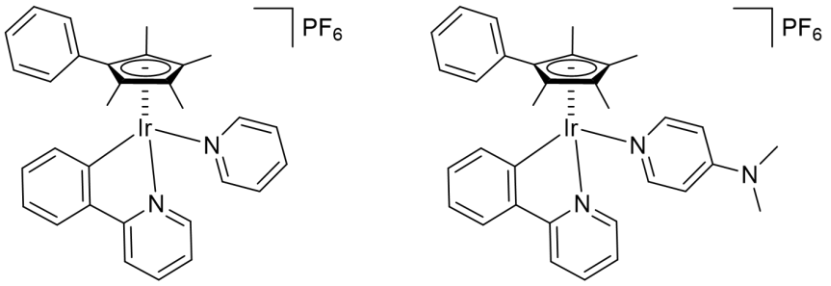


Figura 1.10. Complejos de Ir(III) publicados por Sadler *et al*.[54]

Por otro lado, el grupo de Ana Pizarro ha preparado complejos del tipo [Ir(η^5:κ^1-$C_5Me_4CH_2py$)(C,N)]PF_6 (**Figura 1.11**), con un ligando derivado del Cp* que actúa como quelato, uniéndose al metal también a través del átomo de N de la piridina. Los estudios frente a líneas celulares de cáncer de mama, colon, ovario y páncreas demostraron que presentan elevada citotoxicidad, con valores de IC_{50} (concentración de fármaco que inhibe el 50% de la actividad celular) del orden nanomolar, y además son selectivos. Los complejos producen ROS, induciendo estrés oxidativo en las células y provocan la despolarización de la membrana mitocondrial.[55]

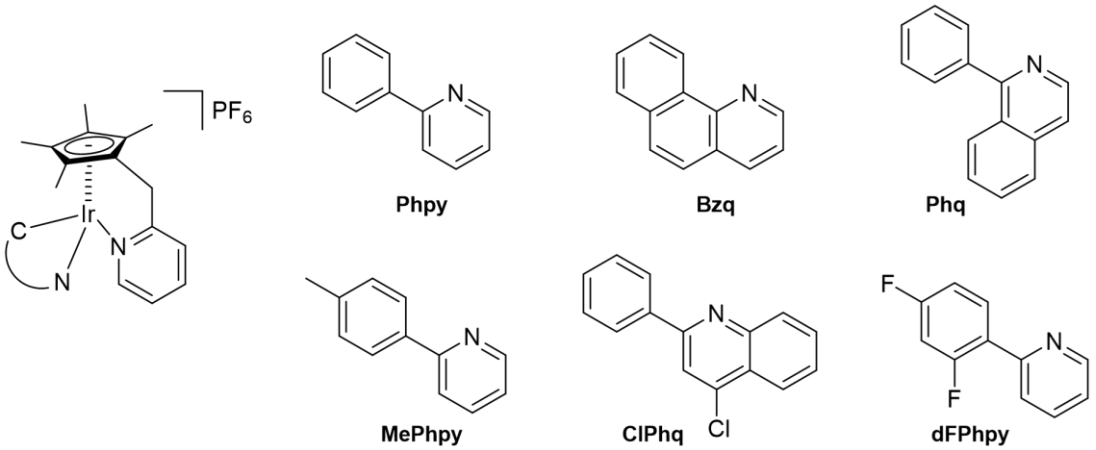


Figura 1.11. Complejos preparados por el grupo de investigación de Ana Pizarro.[55]

Otros ejemplos recientes de complejos semi-sándwich de Ir(III) donde el ligando areno es Cp* o un derivado de éste y X^Y es un ligando bidentado derivado de la fenantrolina, han sido descritos por Patra y colaboradores (**Figura 1.12**). El estudio citotóxico *in vitro* realizado en líneas de cánceres de ovario y cervical dio valores de IC_{50} del orden nanomolar, siendo capaces de superar la resistencia al cisplatino en las líneas celulares ensayadas. Además, estudios *in vivo* en modelos de pez cebra indican que el segundo compuesto presenta actividad tanto antiangiogénica como antitumoral sin resultar tóxico para dicha especie.[56]

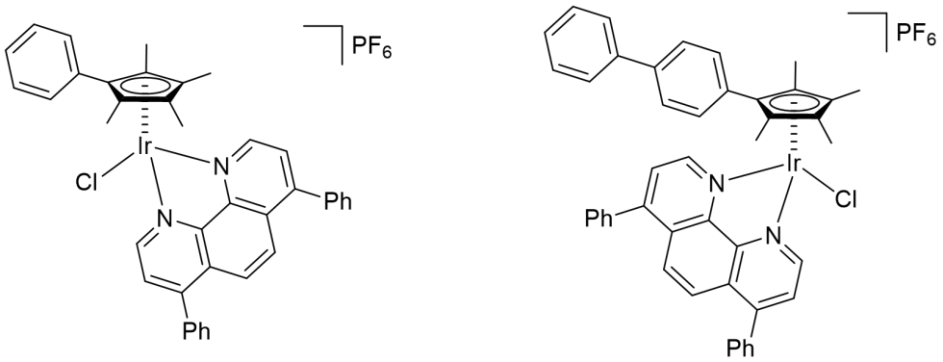


Figura 1.12. Complejos de Ir(III) sintetizados por el grupo de Patra.[56]

Así mismo, el complejo de la **Figura 1.13**, sintetizado por Espino *et al*. es activo frente a líneas celulares tumorales sensibles y resistentes a CDDP. Su diana farmacológica es la mitocondria y provoca la muerte celular por alteración del potencial de membrana con la consecuente liberación de protones. Además, estudios *in vivo* confirmaron también su actividad en ratones.[57]

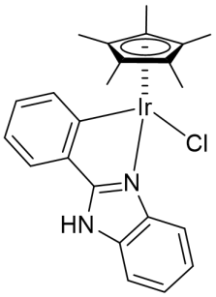


Figura 1.13. Complejo semi-sándwich de Ir(III) preparado por Espino y *et al*.[57]

Los complejos octaédricos de Ir(III) se han postulado como agentes anticancerígenos y/o de imagen, ya que destacan, especialmente, por su estabilidad (ion d6 de bajo espín) y por sus excelentes propiedades fotofísicas debido al efecto del átomo pesado, que favorece el cruce entre sistemas y que se traduce en compuestos con elevados rendimientos cuánticos de emisión, largos tiempos de vida media y grandes desplazamientos de Stokes. Además, debido a la gran cantidad de ligandos que se pueden utilizar, y a las modificaciones que se pueden introducir haciendo uso de distintos tipos de sustituyentes, es posible modificar su longitud de onda de emisión desde el visibles hasta el infrarrojo cercano.[49,58] Gracias a esto muchos de ellos presentan actividad teragnóstica, ya que se pueden emplear simultáneamente como agentes de terapia y diagnóstico.

Estos complejos pueden contener sólo ligandos bidentados, en cuyo caso su fórmula general sería: $[Ir(C\hat{}N)_2(N\hat{}N)]^+$ o $[Ir(C\hat{}N)_2(C'\hat{}N')]$; o uno o varios ligandos terdentados: $[Ir(N\hat{}N\hat{}N)(C\hat{}N)Cl]^+$, $[Ir(N\hat{}N\hat{}N)(C\hat{}N\hat{}C)]^+$, $[Ir(N\hat{}N\hat{}N)_2]^{3+}$ o $[Ir(N\hat{}N\hat{}N))(C\hat{}N))Cl]_2^{2+}$.

Para los primeros, se conocen multitud de ejemplos con propiedades antitumorales.[59] En este sentido, recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito el compuesto de la **Figura 1.14** en el que tanto el ligando C^N como el N^N contienen el núcleo benzimidazol. Sus propiedades luminiscentes permiten visualizarlo en el medio biológico, comportándose, por tanto, como un agente de bioimagen. Además, los estudios realizados *in vitro* indican que es tanto selectivo por las células cancerígenas como activo frente a la línea de ovario A2780 y provoca la muerte celular mediante un proceso de oncosis. Estudios *in vivo* con *Caenorhabditis elegans* mostraron que es capaz de reducir un 41% el área del tumor sin presentar toxicidad para el nematodo, aumentando su esperanza de vida un 18%.[60]

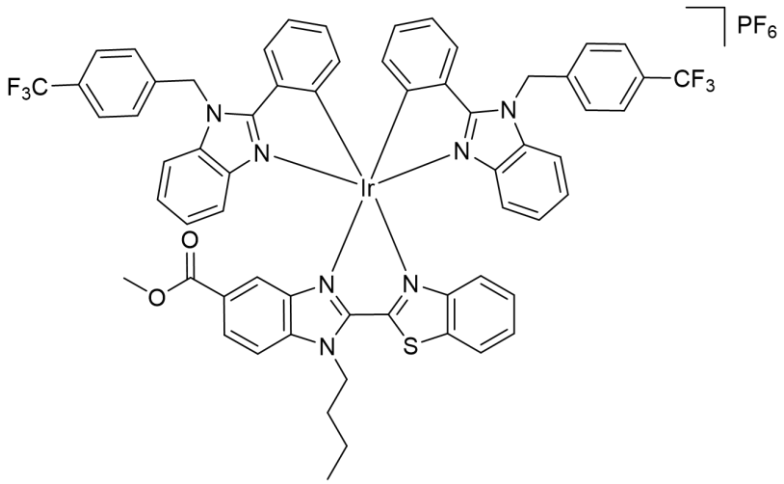


Figura 1.14. Complejo de tipo $[Ir(C^N)_2(N^N)]^+$ publicado por nuestro grupo de investigación.[60]

Otro ejemplo interesante es el publicado por Chao *et al*. que se muestra en la **Figura 1.15**. El compuesto se acumula en el retículo endoplasmático y es activo en cáncer de pulmón de células no pequeñas, que como se ha mencionado anteriormente es el segundo más diagnosticado. Su mecanismo de acción es la muerte celular inmunogénica, que ha surgido como una terapia prometedora frente al cáncer y que estimula una respuesta inmune contra antígenos asociados a la muerte celular, en particular los derivados de células cancerosas.[61]

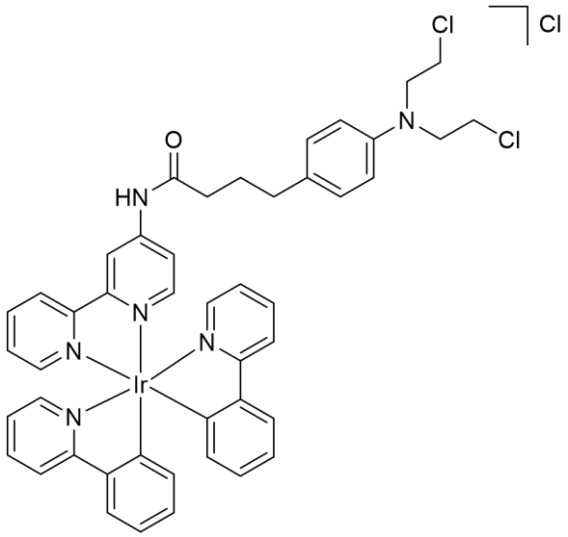


Figura 1.15. Complejo de Ir(III) publicado por Chao *et al*.[61]

Por otro lado, los complejos del tipo $[Ir(N^N^N)(C^N)X]^+$, que incorporan un ligando terdentado como la terpiridina, tienen un interés especial porque pueden aumentar la estabilidad química y proporcionar nuevos mecanismos de acción antitumoral que ayuden a vencer la resistencia intrínseca a los fármacos en uso clínico. Por ejemplo, el grupo de Dogan ha descrito los complejos de Ir(III) de la **Figura 1.16**, que son activos y selectivos frente a cánceres de colon y hepático, provocando la muerte celular por un proceso de apoptosis. Estos complejos también han resultado ser activos frente a bacterias *S. aureus*.[62]

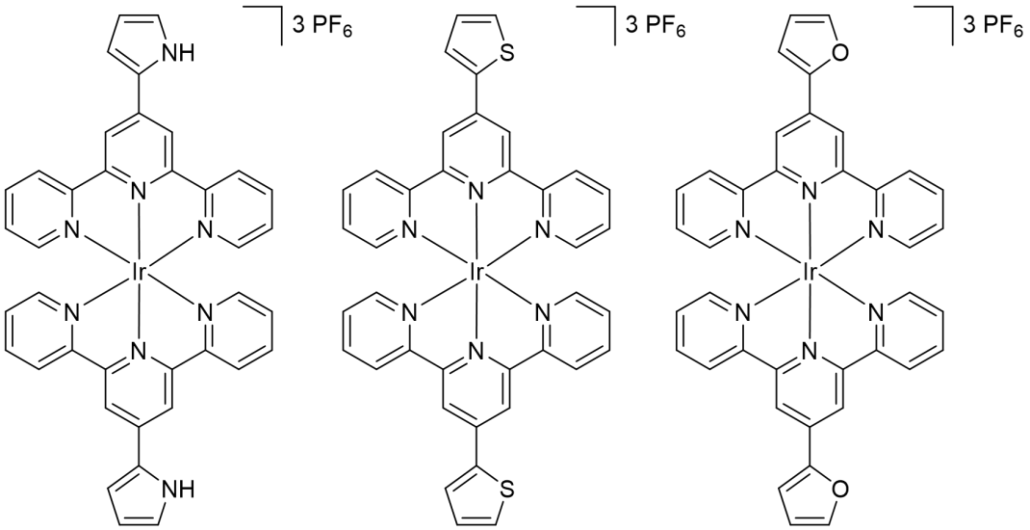


Figura 1.16. Complejos sintetizados por Dogan y colaboradores.[62]

Por tanto, cada vez más, los complejos de iridio(III) se perfilan como candidatos idóneos para el tratamiento del cáncer y muchos investigadores predicen que va a ser el siguiente gran metal en este campo.[63,64]

1.4. Terapia fotodinámica

Para evitar los efectos adversos que implican la mayoría de los tratamientos oncológicos comentados anteriormente, la terapia fotodinámica (PDT) se presenta como una opción terapéutica interesante, donde un compuesto sensible a la luz llamado fotosensibilizador (PS) se activa en una región específica por la acción de la luz.[65,66]

Esta técnica consta de dos etapas (**Figura 1.17**), una primera en la que tras administrar el fotosensibilizador, se incuba durante un periodo comprendido entre los 5 minutos y las 24 horas[67] para permitir que se distribuya por todo el cuerpo de manera no específica, o que se dirija al tejido diana, el tumor. En la segunda etapa, gracias a la acción de una radiación de determinada longitud de onda, el fármaco se activa únicamente en la región donde incide la luz. En ausencia de ésta, el PS no es tóxico, por lo que se reducen considerablemente los efectos secundarios.

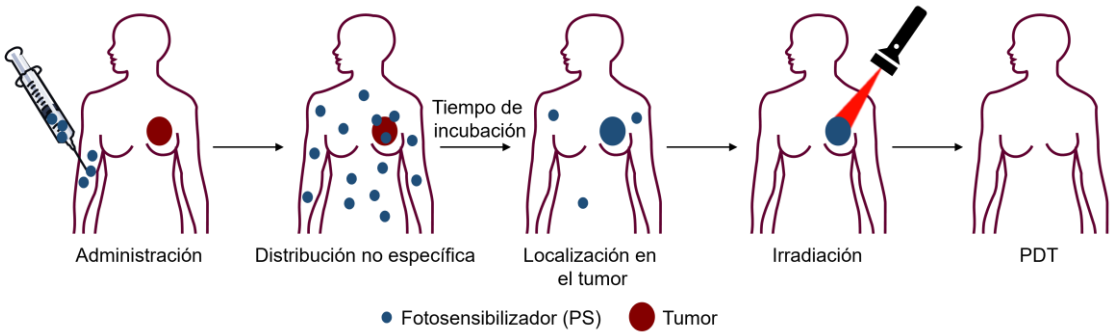


Figura 1.17. Representación esquemática del tratamiento con PDT. Imagen adaptada.[67]

El mecanismo de la PDT (**Figura 1.18**) consiste en que, por acción de la luz, el PS se excita desde el estado singlete fundamental (S_0) a un estado singlete excitado (S_1). A continuación, puede volver al estado fundamental S_0 emitiendo radiación fluorescente, o producirse un cruce entre sistemas (ISC) del S_1 a un estado triplete excitado (T_1). Posteriormente, o vuelve al estado fundamental mediante un proceso radiativo, fosforescencia, o interaccionando con el entorno biológico mediante un mecanismo de Tipo I o de Tipo II. En el mecanismo de Tipo I, se transfiere un electrón o protón, lo que provoca que distintas biomoléculas o el agua se oxiden para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales superóxido o hidroxilo. Mientras que en el mecanismo de Tipo II, se produce la transferencia de energía desde el PS en estado triplete excitado al oxígeno molecular ($^3O_2$), dando lugar a oxígeno singlete ($^1O_2$), altamente reactivo. En ambos procesos se generan ROS, que son las especies que realmente dañan a las células cancerígenas.[64,68–70] Esta dependencia del oxígeno, supone una limitación en la aplicación de la PDT para el tratamiento de tumores agresivos y resistentes a fármacos, ya que generalmente presentan concentraciones bajas de oxígeno, lo que se conoce como hipoxia.[67]

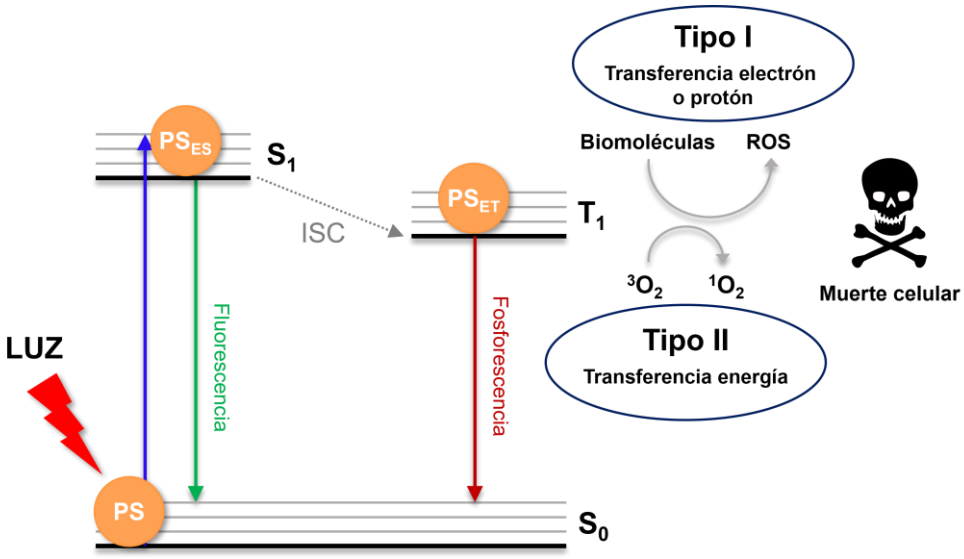


Figura 1.18. Diagrama de Jablonski modificado del proceso de fotosensibilización y mecanismo de acción de la terapia fotodinámica.[67]

Un buen PS debe cumplir una serie de requisitos: no ser tóxico en la oscuridad y activarse sólo por la acción de la luz, es decir, tener un elevado índice de fototoxicidad (PI, definido como $IC_{50,oscuridad}$ / $IC_{50,luz}$), presentar buena fotoestabilidad y solubilidad en medio acuoso, tener largos tiempo de vida del estado excitado y ser activo en hipoxia. También debe retenerse en el organismo durante un periodo mínimo para que pueda distribuirse y dé tiempo a realizar la terapia, pero debe eliminarse fácilmente tras el tratamiento, con buena degradabilidad.[71] Además, una selectividad tumoral elevada mejora la eficacia del mismo. Por tanto, conseguir una especie que reúna todos estos requisitos supone un gran reto para los científicos.[72–74] Por otra parte, es importante que absorba en la ventana fototerapéutica, que va de 650 a 850 nm, ya que la longitud de onda de la luz aplicada durante el procedimiento está directamente relacionada con la profundidad de penetración en el tejido. Las longitudes de onda corta de la zona del verde y el azul penetran muy poco en los tejidos, mientras que las del rojo o infrarrojo cercano (600–900 nm) penetran mucho más y son mejores para tratar tumores internos o más grandes (**Figura 1.19**).[67] Por tanto, para que el fotosensibilizador sólo cause el efecto terapéutico en el tejido canceroso sin dañar el sano adyacente, la longitud de onda usada se elige según la profundidad y la forma del tumor.

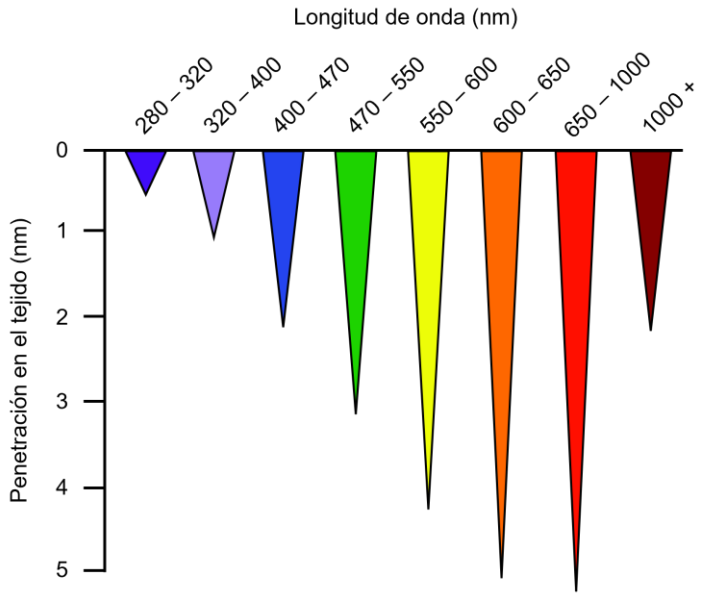


Figura 1.19. Profundidad de penetración en los tejidos según la longitud de onda. Imagen adaptada.[75]

La terapia fotodinámica se estableció por primera vez como método de tratamiento hace más de 100 años.[76] A finales del siglo XIX, Niels Finsen y colaboradores abrieron la puerta a la investigación basada en la fototerapia moderna, gracias al uso de la lámpara de arco de carbón para tratar el *lupus vulgaris*, por lo que fue reconocido con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1903.[77] En 1900 Raab *et al.* observaron que el tratamiento con luz en combinación con agentes fotosensibilizadores resultaba tóxico para *Paramecium*.[78] En 1907 el grupo de von Tappeiner y Jodlbauer demostró la necesidad del oxígeno en reacciones de fotosensibilización e introdujeron el término “activación fotodinámica”.[79]

1.4.1. Primeros fotosensibilizadores para terapia fotodinámica

A pesar de las ventajas mencionadas que presenta la PDT sobre las terapias convencionales en el tratamiento del cáncer, el interés por su uso no se reavivó hasta la década de 1990, cuando la FDA aprobó el primer fotosensibilizador, lo que estimuló el interés por este área de investigación.[76] El primer PS aprobado para uso clínico en cáncer de vejiga consistía en una mezcla oligomérica del porfímero de sodio (Fotofrina®, **Figura 1.20**).[67]

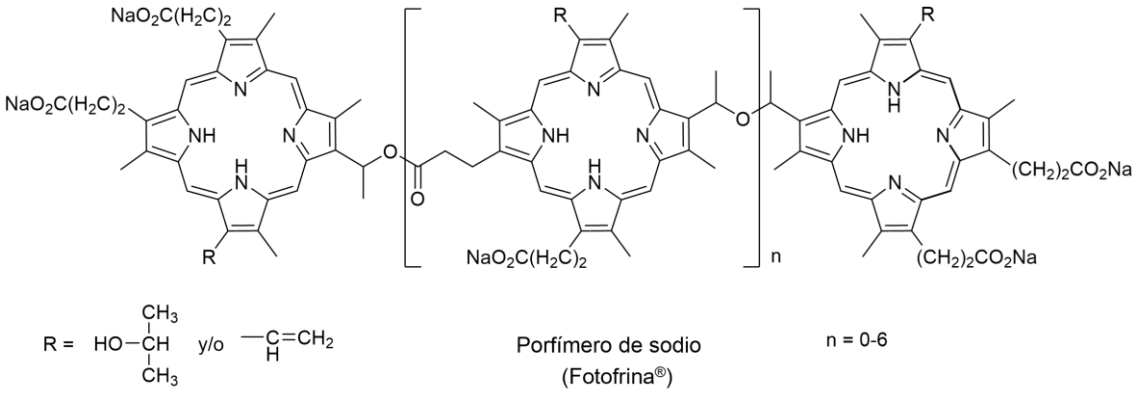


Figura 1.20. Estructura química de la mezcla oligomérica del porfímero sódico (Fotofrina®).

Posteriormente, la FDA aprobó esta técnica, empleando Fotofrina® u otros derivados de porfirinas, para el tratamiento del cáncer endobronquial y endoesofágico, así como de las lesiones premalignas y malignas precoces de piel, vejiga, estómago y cavidad oral.[80,81]

Los primeros fotosensibilizadores desarrollados para el tratamiento del cáncer fueron porfirinas, que son compuestos basados en un anillo de cuatro subunidades de pirrol modificadas e interconectadas, con una estructura altamente conjugada, gracias a la cual absorben luz de la región visible. Sus principales ventajas son sus rendimientos cuánticos relativamente altos en la producción de ROS y su variedad química. Sin embargo, presentan inconvenientes como: baja selectividad, escasa solubilidad en agua, poca fotoestabilidad, síntesis y purificación muy tediosas, lenta eliminación del organismo que provoca fotosensibilidad, y escasa absorción en la región del IR o IR cercano (NIR).[67,82] Algunos ejemplos de este tipo de PS son los derivados de la Fotofrina® (**Figura 1.20**) y la Hematoporfirina (HpD, **Figura 1.21**) y aunque se consideraron la primera generación, siguen siendo ampliamente usados hoy en día.[83] Absorben a 630 nm y presentan elevados rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete. Ambos se han empleado en el tratamiento de cánceres de cerebro, laringe, pulmón, piel, gástrico, colorrectal y esofágeo.[84,85] Las modificaciones en la estructura de las porfirinas constituyen la segunda generación de PS,[86] como la Clorina e6 (Ce6, **Figura 1.21**)[87] y la Temoporfina (m-THPC, **Figura 1.21**).[88] También la conforman las naftalocianinas[89] y las purpurinas.[90] Dada su selectividad por las células tumorales y su baja deposición cutánea, esta segunda generación es muy importante. Absorben en la región de los 630–800 nm y generan ROS. Pero presentan desventajas como un tiempo de vida de circulación muy bajo y una elevada tendencia a autoagregar.[82]

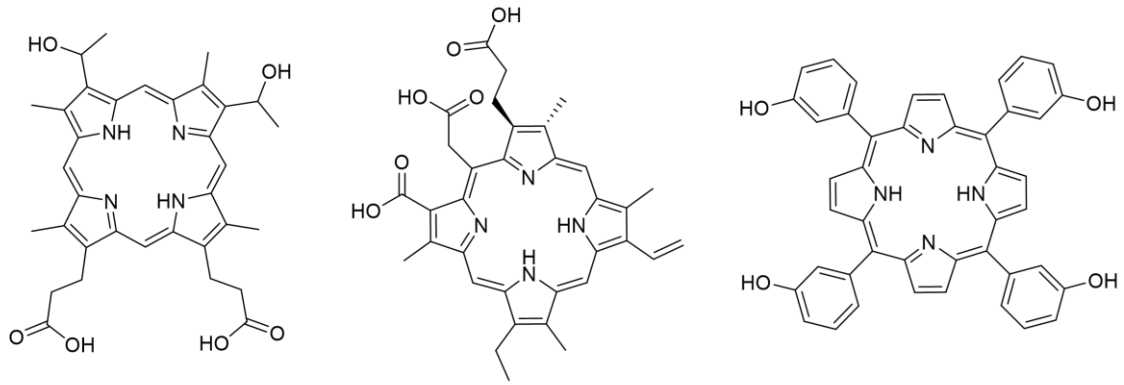


Figura 1.21. Estructura química de algunos fotosensibilizadores de primera y segunda generación aprobados por la FDA.

Entre los enfoques investigados para superar algunas de las limitaciones de los PS en uso clínico, destaca la incorporación de un ion metálico al "andamiaje" tetrapirrólico, ya que al formarse el complejo se puede estabilizar la molécula y mejorar su fotoestabilidad. Además, por efecto del átomo pesado, algunos metales pueden mejorar la eficiencia del cruce entre sistemas y, por tanto, la capacidad de generar ROS. Aunque se ha dedicado un esfuerzo enorme al desarrollo de complejos tetrapirrólicos que contengan metales, sólo unos pocos han avanzado hacia aplicaciones clínicas.[67,91] En la **Figura 1.22** se recogen dos ejemplos, que presentan un centro metálico de paladio, TOOKAD® (Padeliporfina/WST09)[92] y TOOKAD® soluble (Padeliporfina/WST11), desarrollado posteriormente para mejorar la mala solubilidad del primero.[93] Este último, al haber superado recientemente la Fase III de ensayos clínicos en varios países de la Unión Europea[94] y dados los interesantes resultados obtenidos, se ha aprobado para el tratamiento de cáncer de próstata en México, Israel y 31 países de la UE.[67]

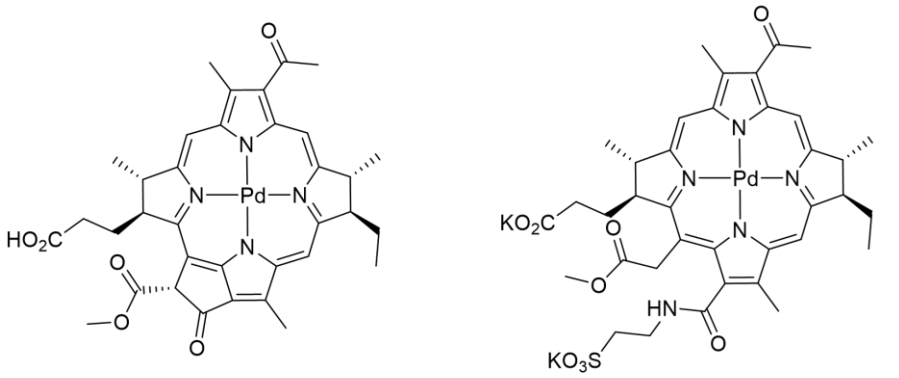


Figura 1.22. Estructura química de TOOKAD® y TOOKAD® soluble.

Por otra parte, el uso de complejos de metales de transición como PS constituye, cada vez más, una alternativa plausible a los compuestos tetrapirrólicos. En términos generales, presentan la ventaja de una mayor fotoestabilidad y, sobre todo, una mayor eficiencia en la formación de ROS, pudiendo ser diseñados para actuar por el mecanismo de Tipo I o de Tipo II.[82] Esta eficiencia se debe a su elevada constante de acoplamiento espin-órbita que favorece el mencionado ISC. Además, debido a la gran variedad de configuraciones electrónicas para estados excitados, resultan accesibles con luz visible o cercana al IR. Todo ello justifica que en los últimos años los complejos de rutenio e iridio, entre otros, se estén investigando ampliamente debido a su prometedor uso como agentes de PDT en el tratamiento del cáncer.[95]

1.4.2. Complejos de rutenio para terapia fotodinámica

Los compuestos octaédricos de rutenio(II) han recibido una enorme atención tanto como posibles agentes quimioterapéuticos, en el sentido clásico de la palabra, como prometedores fotosensibilizadores. En cuanto a su aplicación en PDT, de acuerdo con lo comentado anteriormente, presentan largos tiempos de vida media del estado triplete excitado y elevados rendimientos cuánticos de generación de ROS.[96,97] Además, modificando los ligandos se pueden modular propiedades tales como la solubilidad, eficiencia en la acumulación celular, habilidad para dirigirse a una diana concreta, así como propiedades fotofísicas, como son la fotoestabilidad o los desplazamientos de Stokes.[98]

En este grupo destacan especialmente los complejos con ligandos del tipo polipiridilo, aunque el único compuesto que ha entrado en fases de ensayos clínicos ha sido desarrollado por S. McFarland. En concreto, el compuesto TLD-1433 (**Figura 1.23**) se encuentra en Fase II en Canadá y Estados Unidos para el tratamiento de cáncer de

vejiga no músculo invasivo.[67] Se ha comprobado que los anillos de tiofeno del ligando afectan al tiempo de vida del estado triplete excitado, que participa tanto en la transferencia de un electrón como de energía. Además, la presencia de los tres anillos favorece la transferencia directa desde el estado singlete fundamental al estado triplete excitado.[99]

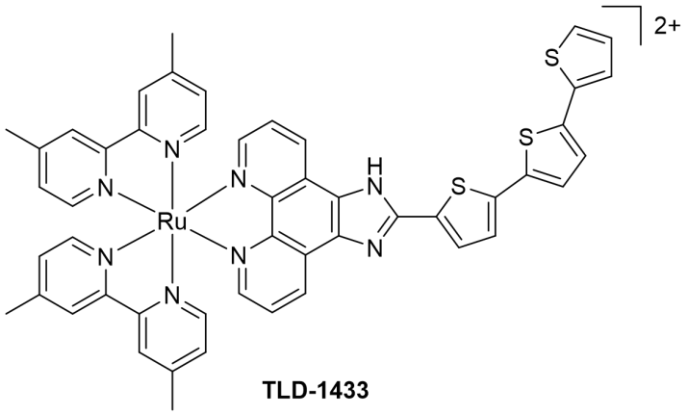


Figura 1.23. Complejo de Ru(II) de McFarland, TLD-1433.

El éxito del TLD-1433 impulsó la síntesis de nuevos complejos de Ru(II). En la **Figura 1.24** se recogen dos ejemplos. Ambos son capaces de interaccionar con el ADN, no son activos en la oscuridad y se fotoactivan tras la irradiación, presentando índices de fotoactivación (PI) muy elevados.[100,101]

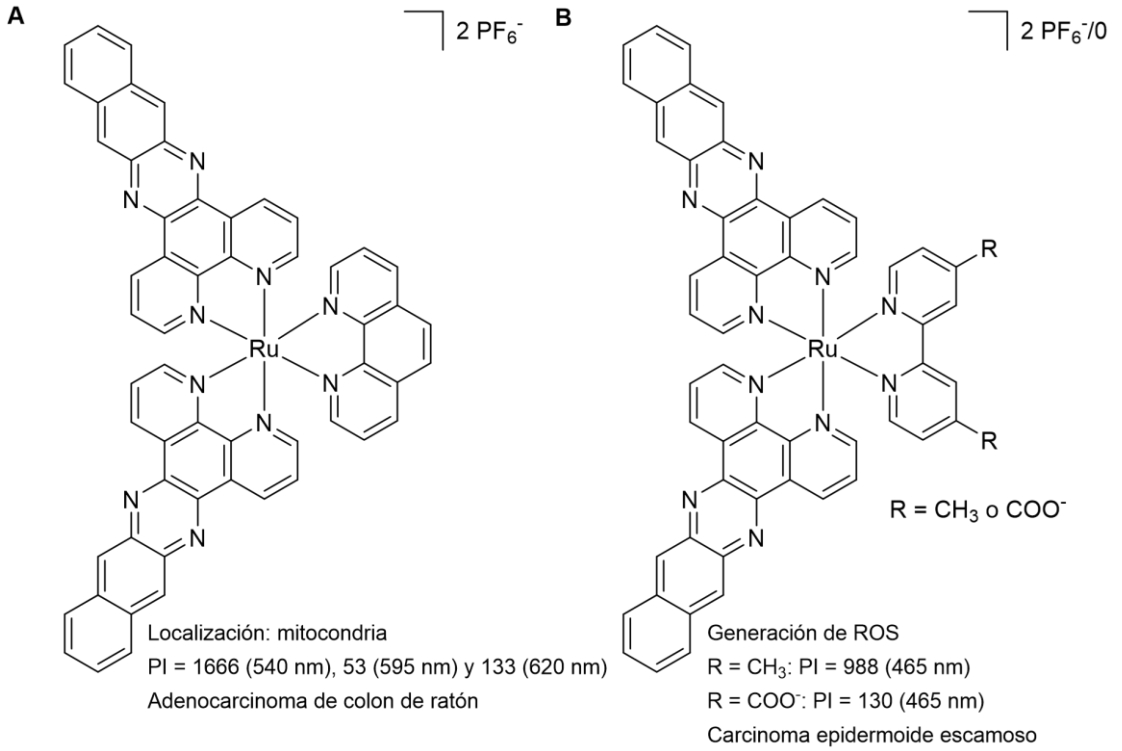


Figura 1.24. Estructura de los complejos de Ru(II) de tipo polipiridilo preparados por (A) Gasser *et. al.*[100] y (B) Giorgi y colaboradores.[101]

Por otro lado, Guo *et al*. han publicado recientemente una serie de complejos que se fotoactivan generando radical superóxido mediante un mecanismo de Tipo I, que es menos dependiente del oxígeno. Gracias a ello presentan actividad en hipoxia. Tras la irradiación con luz, el complejo de la **Figura 1.25** provoca la muerte celular por ferroptosis en células de cáncer de mama, con un PI de 244 en normoxia y de 58 en hipoxia.[102]

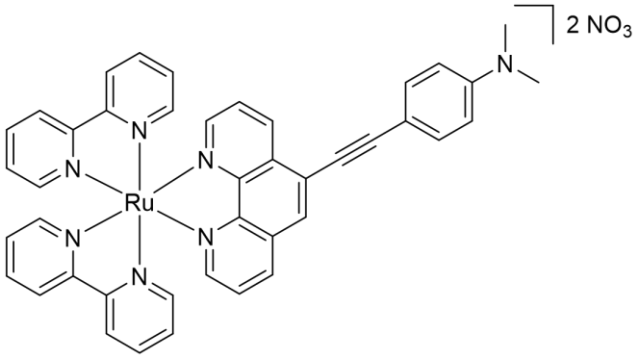


Figura 1.25. Complejo sintetizado por el grupo de investigación de Guo.[102]

Aunque hasta ahora, la mayoría de los fotosensibilizadores de rutenio descritos presentan la fórmula general $[Ru(N^N)_2(N'^N')]^{2+}$, con tres ligandos N,N-dadores iguales o diferentes, actualmente, se está ampliando la investigación a complejos octaédricos ciclometalados del tipo $[Ru(C^N)(N^N)_2]^{+}$, con un ligando C,N-dador y dos ligandos N,N-dadores, generalmente iguales.

En este sentido, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una serie de complejos de Ru(II) octaédricos ciclometalados (**Figura 1.26**) que, en células de cáncer de cérvix, presentan un PI muy elevado (>588 para el que contiene fenantrolina y >769 para el de dpq) tras ser irradiados con luz verde en hipoxia. Se ha comprobado que producen H_2O_2, ·OH y $^1O_2$ en condiciones de normoxia, mientras que en hipoxia producen H_2O_2 y anión superóxido ($\cdot O_2^-$).[103]

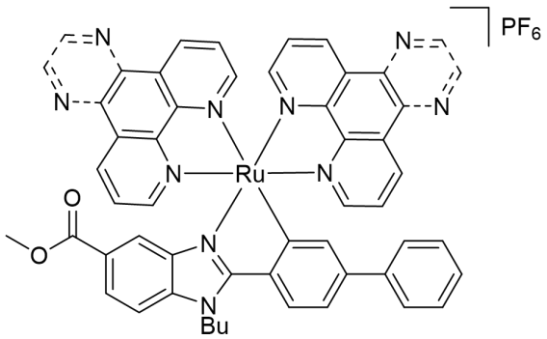


Figura 1.26. Complejos de Ru(II) ciclometalados preparados en nuestro grupo.[103]

Otro ejemplo destacable es el complejo publicado por Gasser *et al*. (**Figura 1.27**), que constituye uno de los primeros complejos de Ru(II) que se activa con luz cercana al

IR. Presenta valores bajos de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete, pero los índices de fotoactivación en adenocarcinoma de colon de ratón a 670 nm, 740 nm y 770 nm son >370, >156 y >4, respectivamente.[104]

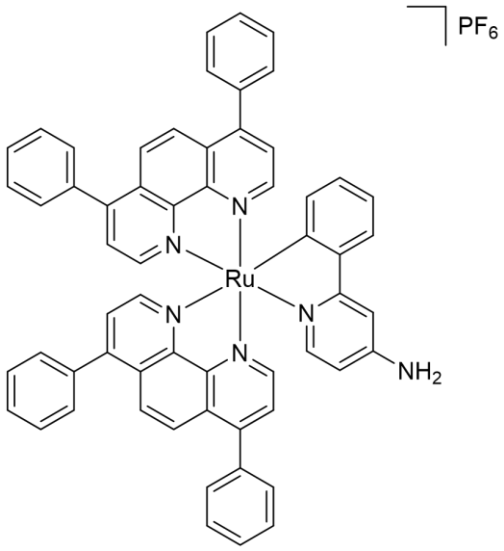


Figura 1.27. Complejo preparado por Gasser *et al.* capaz de fotoactivarse en el NIR.[104]

1.4.3. Complejos de iridio para terapia fotodinámica

Como se ha mencionado en el apartado 1.3.2, los compuestos de iridio han demostrado ampliamente su potencial como agentes anticancerígenos. En los últimos años, al igual que los análogos de rutenio, los complejos ciclometalados de iridio también se han estudiado extensamente en el campo de la PDT y se presentan como buenos candidatos a fotosensibilizadores para el tratamiento del cáncer.

La naturaleza triplete del estado excitado favorece: largos desplazamientos de Stokes que reducen la interferencia entre la excitación y la emisión, elevados rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete, elevados tiempos de vida de fosforescencia, y elevada estabilidad y fotoestabilidad.[95,105] Además, la carga positiva puede mejorar la solubilidad en agua en comparación con las porfirinas y ftalocianinas orgánicas. Como en el resto de complejos metálicos, sus propiedades se pueden modular con pequeñas modificaciones en los ligandos.[105] Gracias a ello, sus mecanismos de acción pueden ser muy variados y unirse al ADN, inhibir la interacción entre proteínas o su actividad, generar oxidación catalítica, etc. Lo que tiene un gran impacto en la actividad antitumoral, reforzando su interés en el campo de la PDT.[76]

Nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente los complejos de Ir(III) con ligandos basados en benzimidazol que se muestran en la **Figura 1.28**. Como se espera de un buen PS, no son tóxicos en la oscuridad, pero se activan con luz azul frente a células de melanoma de piel humana, tanto en condiciones de hipoxia como de

normoxia. Un estudio más profundo del último complejo de la serie indica que induce muerte celular inmunogénica.[106]

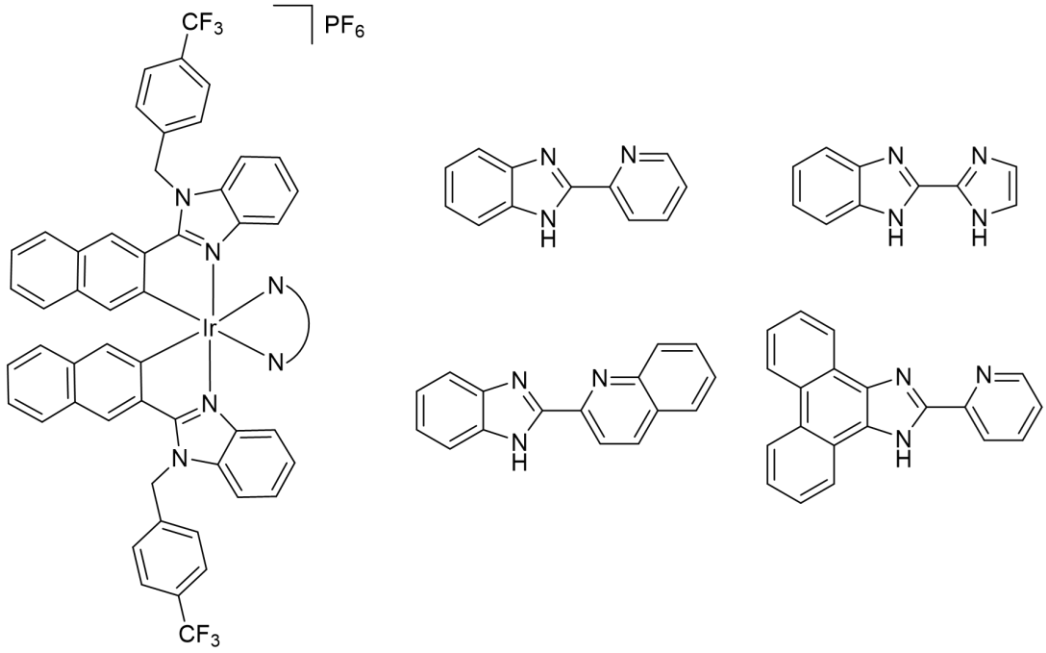


Figura 1.28. Complejos de Ir(III) sintetizados por nuestro grupo de investigación.[106]

Por otro lado, Gasser, Sadler, Chao *et al*. desarrollaron un compuesto con un ligando terdentado derivado de la terpiridina, un ligando C,N-dador, 3-fenilisoquinolina, y un ion cloruro (**Figura 1.29**). Esta especie se fotoactiva tanto en normoxia como en hipoxia en células cancerígenas y oxida fotocatalíticamente el NADH. Se localiza en la mitocondria e irrumpe el transporte de electrones por reducción del citocromo c, produciendo un desequilibrio redox intracelular y la muerte apoptótica inmunogénica de las células tumorales.[107]

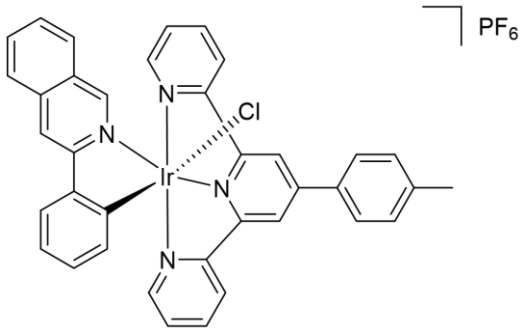


Figura 1.29. Complejo con ligando de tipo terpiridina sintetizado por Gasser, Sadler, Chao y colaboradores.[107]

A pesar de los enormes avances realizados en este campo, la mayoría de complejos de Ir(III) se fotoactivan con luz poco penetrante, azul (~465 nm),[108] por lo que resulta de enorme interés la síntesis de nuevos fotosensibilizadores que presenten bandas de absorción en la región del rojo. En este sentido, se ha reportado que gracias

a la elevada constante de acoplamiento espín-órbita, en algunos complejos de iridio es posible la absorción directa desde el estado singlete fundamental al estado triplete excitado más bajo posible. Dichas transiciones son débiles en las regiones del visible y del NIR y proporcionan otra ruta para aumentar la población del estado triplete excitado.[108]

En este sentido, Sun, McFarland y colaboradores sintetizaron complejos de Ir(III) que contienen, además del ligando polipiridilo dppn, dos ligandos ciclometalados tipo quinoxalina (**Figura 1.30**). Todos los compuestos absorben en la región del verde, pero el complejo con el ligando dpbq lo hace entre 500 y 850 nm. Todos se fotoactivan en células de melanoma y de leucemia, tanto con luz blanca (400–700 nm) como con luz roja (625 nm), siendo el que contiene el ligando dpbq el de mejores resultados en ambas. Los complejos de Ir(III) que contienen este ligando presentan una banda de absorción débil, desde 600 a 800 nm, debida a la transición directa desde el estado singlete excitado al triplete excitado, que se ha mencionado anteriormente.[108]

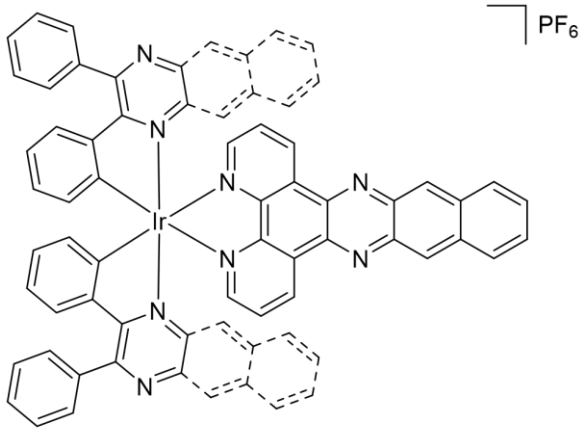


Figura 1.30. Complejos de Ir(III) sintetizados por Sun, McFarland y colaboradores capaces de fotoactivarse con luz roja.[108]

1.5. Resistencia a antibióticos

Según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones por resistencia a antibióticos causan cerca de 5 millones de muertes al año, y se estima que aumentarán a 10 millones para el año 2050,[109] aunque es posible que este valor se alcance antes debido, en parte, al exceso de prescripción generalizada de antibióticos en los pacientes con COVID-19 de los últimos tres años.[110,111]

La creciente propagación mundial de bacterias multirresistentes (comúnmente conocidas como “superbacterias”),[112] que causa enfermedades que no se pueden tratar con los antibióticos convencionales, supone una amenaza mundial. Resulta especialmente alarmante la lista de patógenos denominados por su acrónimo ESKAPE:

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter species*.[113] Este grupo de bacterias patógenas incluye a especies Gram-positiva y Gram-negativa capaces de "escapar" de la acción biocida de los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados. Los patógenos ESKAPE son los responsables de algunas de las infecciones adquiridas en hospitales más mortíferas, y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.[114] Lo que resulta realmente preocupante es que, a pesar de esta urgencia, la química orgánica médica convencional no ha logrado reponer la agotada reserva de antimicrobianos: en 2021, la OMS identificó 77 nuevos antibióticos en desarrollo clínico, de los cuales sólo 17 se consideran innovadores y sólo 3 abordan la lista prioritaria de patógenos.[115] Por lo que es urgente la investigación de nuevos tipos de fármacos con mecanismos de acción novedosos para desarrollar la próxima generación de antibióticos.

Conseguir nuevos fármacos de amplio espectro es complicado, ya que existen numerosas cepas bacterianas patógenas, y aunque se dividan a grandes rasgos en categorías como Gram-negativa y Gram-positiva, ambas pueden ser muy heterogéneas, por lo que encontrar dianas comunes a todas las bacterias patógenas, así como fármacos que las puedan tratar eficazmente, constituye un enorme reto. Además, estas evolucionan rápidamente desarrollando diversos modos de resistencia comunes a casi todos los tipos de antibióticos.[116,117] Los cuatro mecanismos de resistencia más comunes son: inactivación, disminución de la acumulación del fármaco, formación de biopelículas y modificaciones de la diana (como puede ser la alteración de las proteínas a las que se dirigen).[118,119]

La clave para los antibióticos del futuro es, sin duda, la síntesis de nuevos compuestos capaces de eludir estos modos de resistencia. Pero también es muy importante tener en cuenta que, aunque podamos producir un antibiótico de amplio espectro eficaz, la compleja implicación del microbioma en la salud humana significa que una actividad bactericida indiscriminada también podría ser muy perjudicial.[120]

1.5.1. Complejos metálicos de Ir y Rh como agentes antibacterianos

A principios del siglo XX Paul Ehrlich, fundador de la quimioterapia, desarrolló el compuesto de arsénico de la **Figura 1.31**, conocido como Salavarsán, para el tratamiento de la sífilis.[121] Sin embargo, los fármacos antibacterianos basados en metales se abandonaron tras el descubrimiento de la penicilina, pero en los últimos años han recobrado el interés debido a la prevalencia de los fenómenos de resistencia comentados anteriormente.

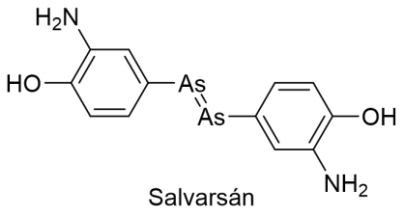


Figura 1.31. Estructura química de la arsfenamina (comercializada bajo el nombre de Salvarsán) desarrollado para el tratamiento de la sífilis.

Al igual que ocurre con los metalofármacos para el tratamiento del cáncer, en el ámbito de los antibióticos, el uso de complejos metálicos implica una mayor versatilidad que las moléculas orgánicas,[122] debido a la posibilidad de generar una gran variedad de estructuras tridimensionales frente a las estructuras sencillas mono o bidimensionales de éstas últimas.[123] Además, los primeros pueden diseñarse racionalmente para reducir su toxicidad y presentar múltiples modos de acción gracias a sus propiedades de intercambio de ligandos, catalíticas, redox y fotofísicas.[124]

Como se destaca en un artículo de Frei y colaboradores, durante el estudio de su actividad antibacteriana, los complejos metálicos mostraron una mayor tasa de éxito que los compuestos orgánicos. Alrededor del 10% de los complejos se identificaron como activos y no tóxicos, mientras que sólo el 0,9% de los puramente orgánicos mostraron actividad sin toxicidad significativa.[123]

Un ejemplo es el complejo de Ru(II) activo frente a bacterias sintetizado por el grupo de investigación de McFarland, TLD-1433 (**Figura 1.23**). Además de su eficacia para el tratamiento de cáncer de vejiga, también es capaz de actuar como fotosensibilizador para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* mediante terapia fotodinámica antimicrobiana.[125]

Aunque en la bibliografía se han descrito numerosos ejemplos de complejos antibacterianos de diversos metales de transición como Au,[126,127] Re,[128,129] Pt,[130,131] y el Ru,[132] en este trabajo nos centraremos en los de iridio y rodio.

Muchos estudios han demostrado que los complejos de iridio también pueden presentar actividad antibacteriana. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente un SAR (relación estructura actividad) de cinco compuestos de Ir(III) del tipo trisquelato $[Ir(C^N)_2(N^N)]PF_6$ (**Figura 1.32**) en los que se modifica el ligando N^N mientras que C^N es, en todos los casos, 2-fenilbenzimidazol. Las especies más activas fueron las primeras de la serie, con los ligandos polipiridilo fenantrolina y dpq, frente bacterias resistentes Gram-positiva, especialmente *S. aureus*. Mostraron mayor actividad que el antibiótico norfloxacin y, además, se comprobó que no eran tóxicas para las células humanas de riñón.[133]

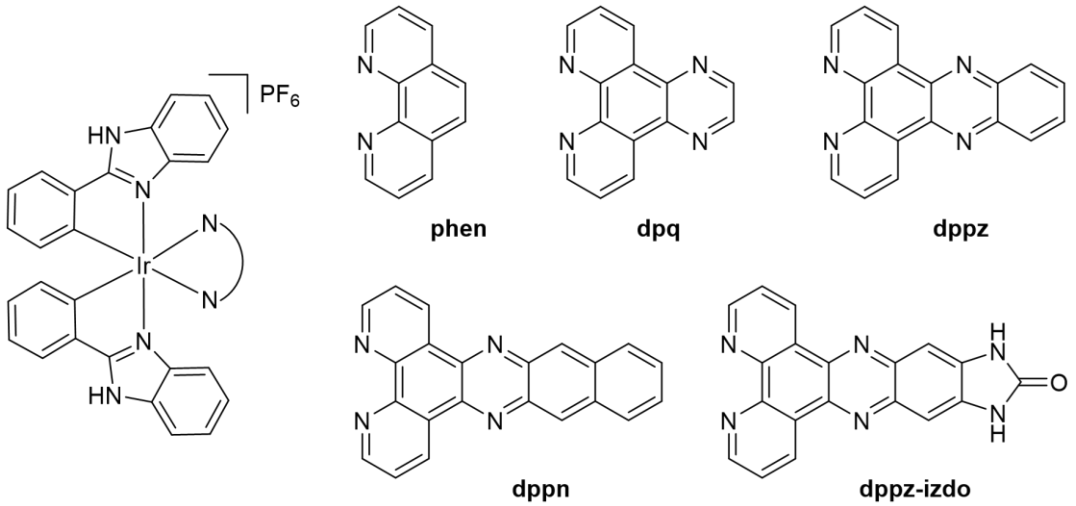


Figura 1.32. Complejos de Ir(III) con actividad antibacteriana sintetizados por nuestro grupo de investigación.[133]

Otro grupo significativo de complejos con actividad antibacteriana lo constituyen los del tipo semi-sándwich. Por ejemplo, Sadler, Chellan y colaborares han descrito los compuestos de iridio y rodio conjugados con sulfadoxina, un fármaco empleado en el tratamiento de la malaria (**Figura 1.33**). Presentan actividad antiplasmodial y antibacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis*, resultando el derivado de iridio con Cp^{xbiph} el más activo.[134]

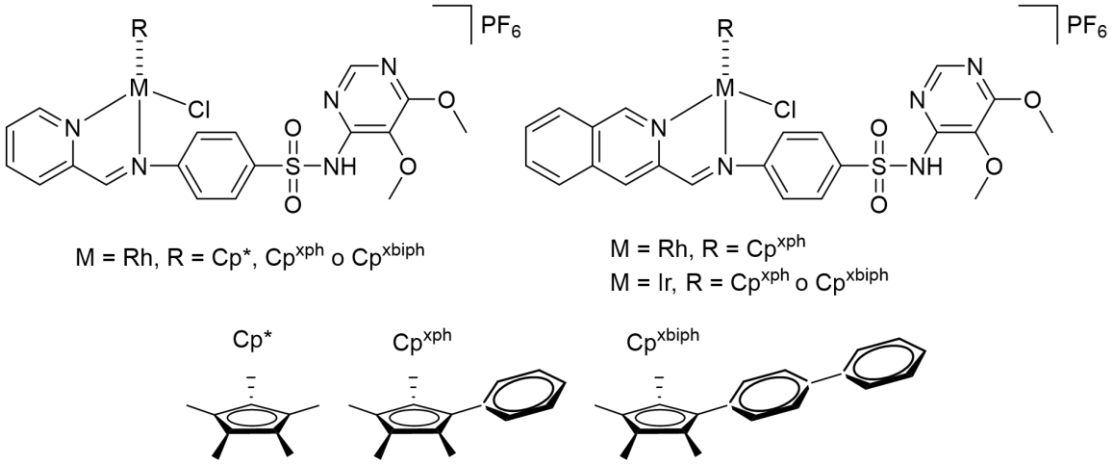


Figura 1.33. Complejos sintetizados por Sadler, Chellan y colaboradores.[134]

Por otro lado, el grupo de Sadler publicó los complejos de la **Figura 1.34**, que contienen ligandos biguanidas, que son compuestos con aplicaciones farmacológicas como el antidiabético metformina u otros que actúan como antimicrobianos o antivirales. Los complejos son activos frente a bacterias Gram-negativa y Gram-positiva además de presentar acción antifúngica frente a *C.albicans* y *C. neoformans*. También observaron que en coadministración con vancomicina (antibiótico empleado para tratar infecciones intestinales), restauran la actividad de ésta frente a *Enterococci* resistente a ella.[135]

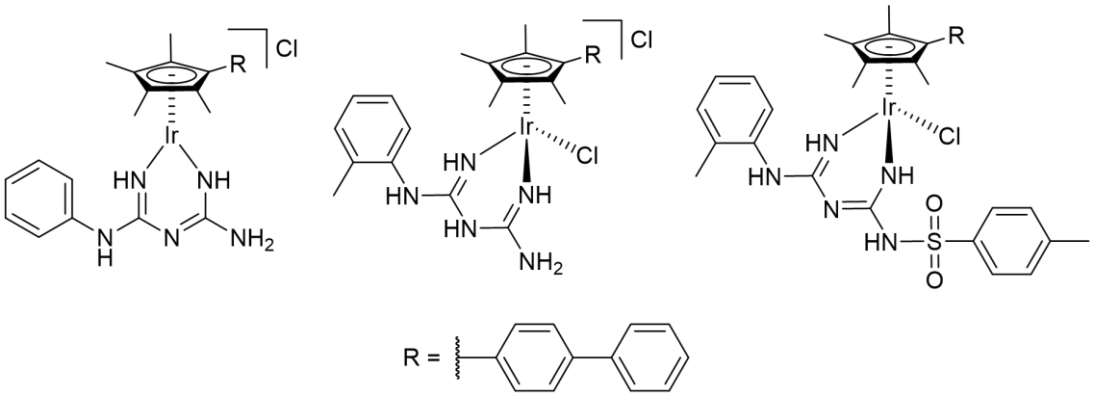


Figura 1.34. Estructura de complejos sintetizados por el grupo de investigación de Sadler.[135]

Otro ejemplo de este tipo es el compuesto de la **Figura 1.35**, sintetizado por Merola *et al*., que es activo frente a la bacteria Gram-positiva *S. aureus*, incluyendo varios tipos de cepas resistentes a la meticilina, que es un antibiótico del grupo de las penicilinas. Además, se estudió en ratones y no resultó nocivo para el animal incluso empleando dosis altas.[136]

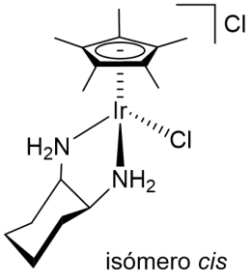


Figura 1.35. Estructura del complejo preparado por Merola *et al*.[136]

Recientemente, se han descrito complejos semi-sándwich basados en benzimidazol (**Figura 1.36**). El primero resultó ser activo frente a la bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), las Gram-negativa (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) y hongos como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*, además de no ser tóxico para células sanas de riñón humano. Sin embargo, el segundo, que contiene un grupo sulfonato para mejorar la solubilidad en agua, no es activo frente a las bacterias, pero sí frente al hongo *C. neoformans*, respetando también la línea sana de riñón.[137]

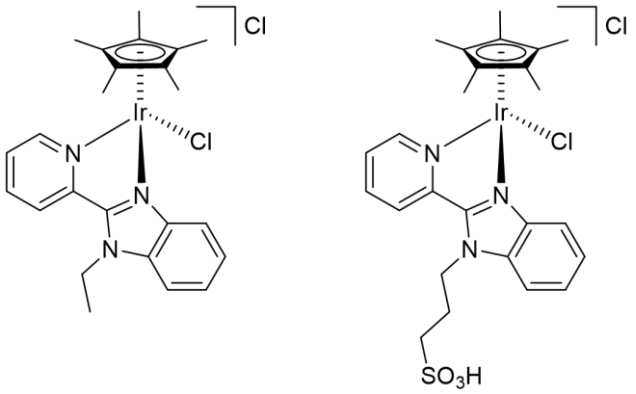


Figura 1.36. Estructura de los complejos sintetizados por Mansour *et al*.[137]

Por otro lado, Smith *et al*. publicaron los complejos catiónicos y neutros de **Figura 1.37**. Presentan un ligando benzimidazol con un grupo aminoquinolina, que ha demostrado mejorar las propiedades antimicrobianas de otros compuestos en estudios previos. Se evaluó la actividad antiplasmodial y antibacteriana frente a *Plasmodium falciparum* y *Mycobacterium tuberculosis* y todos resultaron activos, aunque las especies neutras fueron las más activas.[138]

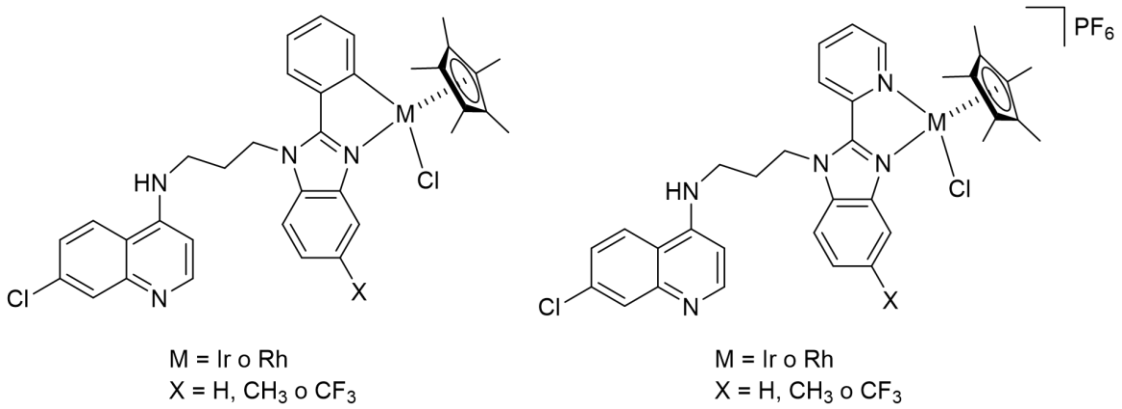


Figura 1.37. Estructura de los complejos preparados por el grupo de investigación de Smith.[138]

1.6. Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, la presente Tesis Doctoral se centra en el diseño, la síntesis y caracterización de nuevos complejos organometálicos para su potencial aplicación en medicina, concretamente en complejos de Re(I), Ir(III), Ru(II) y Rh(III). Se desarrolla a lo largo de seis capítulos, incluyendo una introducción general (Capítulo 1) y las conclusiones finales (Capítulo 6). En el Capítulo 2 se presentan nuevos compuestos de Re(I) como posibles agentes antitumorales y se estudia cómo la introducción de modificaciones en los ligandos afecta a su estabilidad y a su actividad anticancerígena. El Capítulo 3 recoge la síntesis de una nueva serie de complejos terdentados de Ir(III), así como el estudio del efecto de las diversas modificaciones estructurales en sus propiedades antiproliferativas y antimetastásicas

frente a cáncer de mama triple negativo. En el Capítulo 4 se desarrollan complejos de Ir(III) y Ru(II) con ligandos C^N tipo quinoxalinas con el fin de evaluar su posible aplicación como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica. Por último, el Capítulo 5 se centra en el estudio de las propiedades antibacterianas de una serie de complejos neutros semi-sándwich de Ir(III) y Rh(III).

Esta Tesis se enmarca en un campo de investigación multidisciplinar, por lo que tanto los estudios biológicos obtenidos *in vitro* e *in vivo*, así como la resolución de las estructuras cristalinas mediante rayos-X, han involucrado la colaboración con otros grupos de investigación expertos en los diversos campos: Prof. Dr. Fernando Gandía (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Murcia), Prof. Dr. Viktor Brabec (Instituto de Biofísica de Brno, República Checa), Dra. Natalia Busto (Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Burgos) y Prof. Dr. Christoph Janiak (Instituto de Química Inorgánica y Química Estructural, Universidad de Düsseldorf).

Los objetivos planteados en cada uno de los capítulos fueron:

- Capítulo 2. Síntesis y caracterización de complejos de Re(I) del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N^N)L]^{0/+}$ con ligandos N^N basados en benzimidazol. Optimización de su actividad anticancerígena por modificación de los ligandos L y N,N-dadores.
- Capítulo 3. Modificación del ligando ciclometalado en una serie de complejos de Ir(III) del tipo $[Ir(ttpy)(C^N)Cl]PF_6$, donde "ttpy" es 4′-(*p*-tolil)-2,2′:6′,2″-terpiridina, para modular sus propiedades fotofísicas y biológicas como agentes antiproliferativos y antimetastásicos en líneas de cáncer de mama triple negativo.
- Capítulo 4. Desarrollo de nuevos fotosensibilizadores para PDT de Ir(III) y Ru(II), capaces de absorber en el rojo, con ligandos C,N-dadores basados en quinoxalina. Estudio del efecto de los sustituyentes sobre las propiedades fotofísicas y fototóxicas *in vitro*.
- Capítulo 5. Estudio del efecto de la funcionalización con valproato de complejos de tipo semi-sándwich de Ir(III) y Rh(III), con ligandos derivados de benzimidazol, en la actividad antibacteriana frente a cepas resistentes.

1.7. Bibliografía

(1) Franz, K. J.; Metzler-Nolte, N. Introduction: Metals in Medicine. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 727–729. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00685.
(2) Orvig, C.; Abrams, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2201–2204. https://doi.org/10.1021/cr980419w.
(3) CP, W.; E, W.; BW, S. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*; IARC.

(4) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71* (3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660.
(5) *Cancer Tomorrow - IARC (WHO)*. https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bubbles (accessed 2023-11-22).
(6) Mathers, C. D.; Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **2006**, *3* (11), e442. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442.
(7) Institute for Health Metrics and Evaluation; (2019). *Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) data resources: GBD results tool.* Institute for Health Metrics and Evaluation. https://vizhub.healthdata.org/gbd-results (accessed 2023-11-22).
(8) *Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report 2018.* WCRF/AICR (2018). https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/ (accessed 2023-11-22).
(9) Landrigan, P. J.; Fuller, R.; Acosta, N. J. R.; Adeyi, O.; Arnold, R.; Basu, N. (Nil); Baldé, A. B.; Bertollini, R.; Bose-O'Reilly, S.; Boufford, J. I.; Breysse, P. N.; Chiles, T.; Mahidol, C.; Coll-Seck, A. M.; Cropper, M. L.; Fobil, J.; Fuster, V.; Greenstone, M.; Haines, A.; Hanrahan, D.; Hunter, D.; Khare, M.; Krupnick, A.; Lanphear, B.; Lohani, B.; Martin, K.; Mathiasen, K. V.; McTeer, M. A.; Murray, C. J. L.; Ndahimananjara, J. D.; Perera, F.; Potočnik, J.; Preker, A. S.; Ramesh, J.; Rockström, J.; Salinas, C.; Samson, L. D.; Sandilya, K.; Sly, P. D.; Smith, K. R.; Steiner, A.; Stewart, R. B.; Suk, W. A.; Schayck, O. C. P. van; Yadama, G. N.; Yumkella, K.; Zhong, M. The Lancet Commission on Pollution and Health. *The Lancet* **2018**, *391* (10119), 462–512. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0.
(10) Dilruba, S.; Kalayda, G. V. Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future. *Cancer Chemother Pharmacol* **2016**, *77* (6), 1103–1124. https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z.
(11) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205* (4972), 698–699. https://doi.org/10.1038/205698a0.
(12) Wiltshaw, E. Cisplatin in the Treatment of Cancer. *Platinum Metals Review* **1979**, *23* (3), 90–98. https://doi.org/10.1595/003214079X2339098.
(13) Galanski, M. S. Recent Developments in the Field of Anticancer Platinum Complexes. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **2006**, *1* (2), 285–295. 10.2174/157489206777442287.
(14) Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (4), 307–320. https://doi.org/10.1038/nrd1691.
(15) Cohen, S. M.; Lippard, S. J. Cisplatin: From DNA Damage to Cancer Chemotherapy. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Academic Press, 2001; Vol. 67, pp 93–130. https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)67026-0.
(16) Qi, L.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Jia, F.; Zhao, Y.; Wang, F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32* (8), 1469–1486. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00204.
(17) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, *31* (15), 1869–1883. https://doi.org/10.1038/onc.2011.384.
(18) Harrap, K. R. Preclinical Studies Identifying Carboplatin as a Viable Cisplatin Alternative. *Cancer Treat. Rev.* **1985**, *12*, 21–33. https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90015-5.
(19) Calvert, A. H.; Harland, S. J.; Newell, D. R.; Siddik, Z. H.; Jones, A. C.; McElwain, T. J.; Raju, S.; Wiltshaw, E.; Smith, I. E.; Baker, J. M.; Peckham, M. J.; Harrap, K. R. Early Clinical Studies with Cis-Diammine-1,1-Cyclobutane Dicarboxylate

Platinum II. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1982**, *9* (3), 140–147. https://doi.org/10.1007/BF00257742.

(20) Ho, G. Y.; Woodward, N.; Coward, J. I. G. Cisplatin versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *102*, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014.

(21) Ozols, R. F.; Bundy, B. N.; Greer, B. E.; Fowler, J. M.; Clarke-Pearson, D.; Burger, R. A.; Mannel, R. S.; DeGeest, K.; Hartenbach, E. M.; Baergen, R. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *JCO* **2003**, *21* (17), 3194–3200. https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.153.

(22) Kenny, R. G.; Marmion, C. J. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs-A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1058–1137. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00271.

(23) Stewart, D. J. Mechanisms of Resistance to Cisplatin and Carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2007**, *63* (1), 12–31. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001.

(24) Akaza, H.; Togashi, M.; Nishio, Y.; Miki, T.; Kotake, T.; Matsumura, Y.; Yoshida, O.; Aso, Y.; 254-S Urological Cancer Study Group. Phase II Study Ofcis-Diammine(Glycolato)Platinum, 254-S, in Patients with Advanced Germ-Cell Testicular Cancer, Prostatic Cancer, and Transitional-Cell Carcinoma of the Urinary Tract. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, *31* (3), 187–192. https://doi.org/10.1007/BF00685546.

(25) Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (35), 8113–8127. https://doi.org/10.1039/C0DT00292E.

(26) Altinok, A.; Lévi, F.; Goldbeter, A. Identifying Mechanisms of Chronotolerance and Chronoefficacy for the Anticancer Drugs 5-Fluorouracil and Oxaliplatin by Computational Modeling. *Eur. J. Pharma. Sci.* **2009**, *36* (1), 20–38. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.10.024.

(27) André, T.; Boni, C.; Mounedji-Boudiaf, L.; Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Zaninelli, M.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; Tabah-Fisch, I.; de Gramont, A. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (23), 2343–2351. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709.

(28) Zhang, C.; Xu, C.; Gao, X.; Yao, Q. Platinum-Based Drugs for Cancer Therapy and Anti-Tumor Strategies. *Theranostics* **2022**, *12* (5), 2115–2132. https://doi.org/10.7150/thno.69424.

(29) McKeage, M. J. Lobaplatin: A New Antitumour Platinum Drug. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2001**, *10* (1), 119–128. https://doi.org/10.1517/13543784.10.1.119.

(30) Oh, S. C.; Yoon, S. Y.; Seo, J. H.; Choi, C. W.; Kim, B. S.; Shin, S. W.; Kim, Y. H.; Kim, S. Y.; Yoon, H. J.; Cho, K. S.; Kim, J. S. Pilot Study of Heptaplatin, UFT-E and Leucovorin in Advanced Gastric Carcinoma. *Cancer Res. Treat.* **2003**, *35* (2), 117–122. https://doi.org/10.4143/crt.2003.35.2.117.

(31) Nunes, P.; Morais, G. R.; Palma, E.; Silva, F.; Oliveira, M. C.; Ferreira, V. F. C.; Mendes, F.; Gano, L.; Miranda, H. V.; Outeiro, T. F.; Santos, I.; Paulo, A. Isostructural Re(I)/99mTc(I) Tricarbonyl Complexes for Cancer Theranostics. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5182–5194. https://doi.org/10.1039/C5OB00124B.

(32) Azadbakht, B.; Afarideh, H.; Ghannadi-Maragheh, M.; Bahrami-Samani, A.; Asgari, M. Preparation and Evaluation of APTES-PEG Coated Iron Oxide Nanoparticles Conjugated to Rhenium-188 Labeled Rituximab. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *48*, 26–30. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.05.002.

(33) Leonidova, A.; Gasser, G. Underestimated Potential of Organometallic Rhenium Complexes as Anticancer Agents. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (10), 2180–2193. https://doi.org/10.1021/cb500528c.
(34) Sharma S., A.; N., V.; Kar, B.; Das, U.; Paira, P. Target-Specific Mononuclear and Binuclear Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes as Upcoming Anticancer Drugs. *RSC Adv.* **2022**, *12* (31), 20264–20295. https://doi.org/10.1039/D2RA03434D.
(35) Thorp-Greenwood, F. L.; Balasingham, R. G.; Coogan, M. P. Organometallic Complexes of Transition Metals in Luminescent Cell Imaging Applications. *J. Organometallic Chem.* **2012**, *714*, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.01.020.
(36) Ye, R.-R.; Tan, C.-P.; Chen, M.-H.; Hao, L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Mono- and Dinuclear Phosphorescent Rhenium(I) Complexes: Impact of Subcellular Localization on Anticancer Mechanisms. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (23), 7800–7809. https://doi.org/10.1002/chem.201505160.
(37) Konkankit, C. C.; Vaughn, B. A.; Huang, Z.; Boros, E.; Wilson, J. J. Systematically Altering the Lipophilicity of Rhenium(I) Tricarbonyl Anticancer Agents to Tune the Rate at Which They Induce Cell Death. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (45), 16062–16066. https://doi.org/10.1039/D0DT01097A.
(38) Marker, S. C.; King, A. P.; Swanda, R. V.; Vaughn, B.; Boros, E.; Qian, S.-B.; Wilson, J. J. Exploring Ovarian Cancer Cell Resistance to Rhenium Anticancer Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (32), 13391–13400. https://doi.org/10.1002/anie.202004883.
(39) Knopf, K. M.; Murphy, B. L.; MacMillan, S. N.; Baskin, J. M.; Barr, M. P.; Boros, E.; Wilson, J. J. In Vitro Anticancer Activity and in Vivo Biodistribution of Rhenium(I) Tricarbonyl Aqua Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (40), 14302–14314. https://doi.org/10.1021/jacs.7b08640.
(40) Bauer, E. B.; Haase, A. A.; Reich, R. M.; Crans, D. C.; Kühn, F. E. Organometallic and Coordination Rhenium Compounds and Their Potential in Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *393*, 79–117. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.04.014.
(41) Delasoie, J.; Pavic, A.; Voutier, N.; Vojnovic, S.; Crochet, A.; Nikodinovic-Runic, J.; Zobi, F. Identification of Novel Potent and Non-Toxic Anticancer, Anti-Angiogenic and Antimetastatic Rhenium Complexes against Colorectal Carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *204*, 112583. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112583.
(42) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584. https://doi.org/10.1038/nrc2167.
(43) Collery, P.; Desmaele, D.; Vijaykumar, V. Design of Rhenium Compounds in Targeted Anticancer Therapeutics. *Curr. Pharm. Des. 25* (31), 3306–3322. https://doi.org/10.2174/1381612825666190902161400.
(44) Mansour, A. M.; Ibrahim, N. M.; Farag, A. M.; Abo-Elfadl, M. T. Evaluation of Cytotoxic Properties of Two Fluorescent *Fac*-Re$(CO)_3$ Complexes Bearing an *N* , *N* -Bidentate Benzimidazole Coligand. *RSC Adv.* **2022**, *12* (47), 30829–30837. https://doi.org/10.1039/D2RA05992D.
(45) Enslin, L. E.; Purkait, K.; Pozza, M. D.; Saubamea, B.; Mesdom, P.; Visser, H. G.; Gasser, G.; Schutte-Smith, M. Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes of 1,10-Phenanthroline Derivatives with Unexpectedly High Cytotoxicity. *Inorg. Chem.* **2023**. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c00730.
(46) Pan, Z.-Y.; Tan, C.-P.; Rao, L.-S.; Zhang, H.; Zheng, Y.; Hao, L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Recoding the Cancer Epigenome by Intervening in Metabolism and Iron Homeostasis with Mitochondria-Targeted Rhenium(I) Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (42), 18755–18762. https://doi.org/10.1002/anie.202008624.
(47) Greenshields, A. L.; Fernando, W.; Hoskin, D. W. The Anti-Malarial Drug Artesunate Causes Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Triple-Negative MDA-MB-468 and HER2-Enriched SK-BR-3 Breast Cancer Cells. *Exp Mol Pathol.* **2019**, *107*, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.01.006.

(48) Ye, R.-R.; Chen, B.-C.; Lu, J.-J.; Ma, X.-R.; Li, R.-T. Phosphorescent Rhenium(I) Complexes Conjugated with Artesunate: Mitochondrial Targeting and Apoptosis-Ferroptosis Dual Induction. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *223*, 111537. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111537.
(49) Zamora, A.; Vigueras, G.; Rodríguez, V.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Cyclometalated Iridium(III) Luminescent Complexes in Therapy and Phototherapy. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *360*, 34–76. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.010.
(50) Ma, D.-L.; Chan, D. S.-H.; Leung, C.-H. Group 9 Organometallic Compounds for Therapeutic and Bioanalytical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (12), 3614–3631. https://doi.org/10.1021/ar500310z.
(51) Giraldi, T.; Sava, G.; Mestroni, G.; Zassinovich, G.; Stolfa, D. Antitumour Action of Rhodium(I) and Iridium(I) Complexes. *Chem Biol Interact.* **1978**, *22* (2), 231–238. https://doi.org/10.1016/0009-2797(78)90128-X.
(52) Sava, G.; Zorzet, S.; Perissin, L.; Mestroni, G.; Zassinovich, G.; Bontempi, A. Coordination Metal Complexes of Rh(I), Ir(I) and Ru(II): Recent Advances on Antimetastatic Activity on Solid Mouse Tumors. *Inorganica Chim. Acta* **1987**, *137* (1), 69–71. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)87119-4.
(53) Liu, Z.; Sadler, P. J. Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (4), 1174–1185. https://doi.org/10.1021/ar400266c.
(54) Liu, Z.; Romero-Canelón, I.; Habtemariam, A.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Potent Half-Sandwich Iridium(III) Anticancer Complexes Containing C∧N-Chelated and Pyridine Ligands. *Organometallics* **2014**, *33* (19), 5324–5333. https://doi.org/10.1021/om500644f.
(55) Carrasco, A. C.; Rodríguez-Fanjul, V.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M. Structurally Strained Half-Sandwich Iridium(III) Complexes As Highly Potent Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 4005–4021. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02000.
(56) Gadre, S.; M, M.; Chakraborty, G.; Rayrikar, A.; Paul, S.; Patra, C.; Patra, M. Development of a Highly *In Vivo* Efficacious Dual Antitumor and Antiangiogenic Organoiridium Complex as a Potential Anti-Lung Cancer Agent. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (19), 13481–13500. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00704.
(57) Acuña, M. I.; Rubio, A. R.; Martínez-Alonso, M.; Busto, N.; Rodríguez, A. M.; Davila-Ferreira, N.; Smythe, C.; Espino, G.; García, B.; Domínguez, F. Targets, Mechanisms and Cytotoxicity of Half-Sandwich Ir(III) Complexes Are Modulated by Structural Modifications on the Benzazole Ancillary Ligand. *Cancers* **2023**, *15* (1), 107. https://doi.org/10.3390/cancers15010107.
(58) Alsaeedi, M. S. Insight into Luminescent Iridium Complexes: Their Potential in Light-Emitting Electrochemical Cells. *J. Saudi Chem. Soc.* **2022**, *26* (2), 101442. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101442.
(59) Ho, P.-Y.; Ho, C.-L.; Wong, W.-Y. Recent Advances of Iridium(III) Metallophosphors for Health-Related Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *413*, 213267. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213267.
(60) Ortega-Forte, E.; Hernández-García, S.; Vigueras, G.; Henarejos-Escudero, P.; Cutillas, N.; Ruiz, J.; Gandía-Herrero, F. Potent Anticancer Activity of a Novel Iridium Metallodrug via Oncosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79* (10), 510. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04526-5.
(61) Wang, L.; Guan, R.; Xie, L.; Liao, X.; Xiong, K.; Rees, T. W.; Chen, Y.; Ji, L.; Chao, H. An ER-Targeting Iridium(III) Complex That Induces Immunogenic Cell Death in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (9), 4657–4665. https://doi.org/10.1002/anie.202013987.
(62) Sahin, C.; Mutlu, D.; Nasirli, F.; Mahmoudi, G.; Zubkov, F. I.; Arslan, S.; Dogan, N. M. New Iridium Bis-terpyridine Complexes: Synthesis, Characterization, Antibiofilm and Anticancer Potentials. *Biometals* **2021**, *34* (3), 701–713. https://doi.org/10.1007/s10534-021-00307-y.

(63) McGhie, B. S.; Aldrich-Wright, J. R. Photoactive and Luminescent Transition Metal Complexes as Anticancer Agents: A Guiding Light in the Search for New and Improved Cancer Treatments. *Biomedicines* **2022**, *10* (3), 578. https://doi.org/10.3390/biomedicines10030578.

(64) Das, U.; Kar, B.; Pete, S.; Paira, P. Ru(II), Ir(III), Re(I) and Rh(III) Based Complexes as next Generation Anticancer Metallopharmaceuticals. *Dalton Trans.* **2021**, *50* (32), 11259–11290. https://doi.org/10.1039/D1DT01326B.

(65) Kim, S.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Pandey, R. K.; Prasad, P. N. Organically Modified Silica Nanoparticles Co-Encapsulating Photosensitizing Drug and Aggregation-Enhanced Two-Photon Absorbing Fluorescent Dye Aggregates for Two-Photon Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2669–2675. https://doi.org/10.1021/ja0680257.

(66) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. https://doi.org/10.3322/caac.20114.

(67) Karges, J. Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (5), e202112236. https://doi.org/10.1002/anie.202112236.

(68) Hatz, S.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84* (5), 1284–1290. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00359.x.

(69) Zhao, X.; Liu, J.; Fan, J.; Chao, H.; Peng, X. Recent Progress in Photosensitizers for Overcoming the Challenges of Photodynamic Therapy: From Molecular Design to Application. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (6), 4185–4219. https://doi.org/10.1039/D0CS00173B.

(70) Zhang, S.-Q.; Meng, T.-T.; Li, J.; Hong, F.; Liu, J.; Wang, Y.; Gao, L.-H.; Zhao, H.; Wang, K.-Z. Near-IR/Visible-Emitting Thiophenyl-Based Ru(II) Complexes: Efficient Photodynamic Therapy, Cellular Uptake, and DNA Binding. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (20), 14244–14259. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02420.

(71) Wang, R.; Li, X.; Yoon, J. Organelle-Targeted Photosensitizers for Precision Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (17), 19543–19571. https://doi.org/10.1021/acsami.1c02019.

(72) Yuan, Y.; Zhang, C.-J.; Gao, M.; Zhang, R.; Tang, B. Z.; Liu, B. Specific Light-Up Bioprobe with Aggregation-Induced Emission and Activatable Photoactivity for the Targeted and Image-Guided Photodynamic Ablation of Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (6), 1780–1786. https://doi.org/10.1002/anie.201408476.

(73) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One-Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1* (4), 279–293. https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

(74) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY Dyes in Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *42* (1), 77–88. https://doi.org/10.1039/C2CS35216H.

(75) Ruggiero, E.; Castro, S. A.; Habtemariam, A.; Salassa, L. Upconverting Nanoparticles for the near Infrared Photoactivation of Transition Metal Complexes: New Opportunities and Challenges in Medicinal Inorganic Photochemistry. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (33), 13012–13020. https://doi.org/10.1039/C6DT01428C.

(76) Kar, B.; Das, U.; Roy, N.; Paira, P. Recent Advances on Organelle Specific Ru(II)/Ir(III)/Re(I) Based Complexes for Photodynamic Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *474*, 214860. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214860.

(77) Bonnett, R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24* (1), 19. https://doi.org/10.1039/cs9952400019.
(78) Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C. Porphyrin-Based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54* (17), 4151–4202. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5.
(79) Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74* (5), 656–669. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2.
(80) Dougherty, T. J. An Update on Photodynamic Therapy Applications. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **2002**, *20* (1), 3–7. https://doi.org/10.1089/104454702753474931.
(81) Oleinick, N. L.; Evans, H. H. The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms. *Rad. Res.* **1998**, *150* (5), S146–S156. https://doi.org/10.2307/3579816.
(82) Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Castillejos, M. C.; Romero-Ben, E.; Rosales-Barrios, C.; Khiar, N. Photodynamic Therapy: Photosensitizers and Nanostructures. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5* (10), 3788–3812. https://doi.org/10.1039/D0QM00922A.
(83) Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Therapy and Its Applications. *Oncotarget* **2017**, *8* (46), 81591–81603. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20189.
(84) Stylli, S. S.; Howes, M.; MacGregor, L.; Rajendra, P.; Kaye, A. H. Photodynamic Therapy of Brain Tumours: Evaluation of Porphyrin Uptake versus Clinical Outcome. *J. Clin. Neurosci.* **2004**, *11* (6), 584–596. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.02.001.
(85) Sun, B.; Li, W.; Liu, N. Curative Effect of the Recent Photofrin Photodynamic Adjuvant Treatment on Young Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Oncology Letters* **2016**, *11* (3), 2071–2074. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4179.
(86) Gattuso, H.; Monari, A.; Marazzi, M. Photophysics of Chlorin E6: From One- and Two-Photon Absorption to Fluorescence and Phosphorescence. *RSC Adv.* **2017**, *7* (18), 10992–10999. https://doi.org/10.1039/C6RA28616J.
(87) Fernando, A.; Gariépy, J. Coupling Chlorin E6 to the Surface of Nanoscale Gas Vesicles Strongly Enhances Their Intracellular Delivery and Photodynamic Killing of Cancer Cells. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 2802. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59584-1.
(88) Petri, A.; Yova, D.; Alexandratou, E.; Kyriazi, M.; Rallis, M. Comparative Characterization of the Cellular Uptake and Photodynamic Efficiency of Foscan® and Fospeg in a Human Prostate Cancer Cell Line. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2012**, *9* (4), 344–354. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2012.03.008.
(89) Duffy, M. J.; Planas, O.; Faust, A.; Vogl, T.; Hermann, S.; Schäfers, M.; Nonell, S.; Strassert, C. A. Towards Optimized Naphthalocyanines as Sonochromes for Photoacoustic Imaging in Vivo. *Photoacoustics* **2018**, *9*, 49–61. https://doi.org/10.1016/j.pacs.2017.12.001.
(90) Morgan, A. R.; Rampersaud, A.; Garbo, G. M.; Keck, R. W.; Selman, S. H. New Sensitizers for Photodynamic Therapy. Controlled Synthesis of Purpurins and Their Effect on Normal Tissue. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (4), 904–908. https://doi.org/10.1021/jm00124a029.
(91) Lo, P.-C.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Pandey, R. K.; Ng, D. K. P.; Torres, T.; Dumoulin, F. The Unique Features and Promises of Phthalocyanines as Advanced Photosensitisers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (4), 1041–1056. https://doi.org/10.1039/C9CS00129H.
(92) Brandis, A. S. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*; Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., Scheer, H., Eds.; Advances in Photosynthesis and Respiration;

Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; pp 485–494. https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_1.

(93) Gheewala, T.; Skwor, T.; Munirathinam, G. Photosensitizers in Prostate Cancer Therapy. *Oncotarget* **2017**, *8* (18), 30524–30538. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15496.

(94) Azzouzi, A.-R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclauss, F.; van der Poel, H. G.; Stief, C. G.; Rassweiler, J.; Salomon, G.; Solsona, E.; Alcaraz, A.; Tammela, T. T.; Rosario, D. J.; Gomez-Veiga, F.; Ahlgren, G.; Benzaghou, F.; Gaillac, B.; Amzal, B.; Debruyne, F. M. J.; Fromont, G.; Gratzke, C.; Emberton, M.; PCM301 Study Group. Padeliporfin Vascular-Targeted Photodynamic Therapy versus Active Surveillance in Men with Low-Risk Prostate Cancer (CLIN1001 PCM301): An Open-Label, Phase 3, Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol* **2017**, *18* (2), 181–191. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30661-1.

(95) Wu, Y.; Li, S.; Chen, Y.; He, W.; Guo, Z. Recent Advances in Noble Metal Complex Based Photodynamic Therapy. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (18), 5085–5106. https://doi.org/10.1039/D1SC05478C.

(96) Zheng, Q.; Liu, X.; Zheng, Y.; Yeung, K. W. K.; Cui, Z.; Liang, Y.; Li, Z.; Zhu, S.; Wang, X.; Wu, S. The Recent Progress on Metal-Organic Frameworks for Phototherapy. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (8), 5086–5125. https://doi.org/10.1039/D1CS00056J.

(97) McKenzie, L. K.; Bryant, H. E.; Weinstein, J. A. Transition Metal Complexes as Photosensitisers in One- and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, *2*–29. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.020.

(98) Liu, J.; Zhang, C.; Rees, T. W.; Ke, L.; Ji, L.; Chao, H. Harnessing Ruthenium(II) as Photodynamic Agents: Encouraging Advances in Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *363*, 17–28. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.002.

(99) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 797–828. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211.

(100) Pozza, M. D.; Mesdom, P.; Abdullrahman, A.; Prieto Otoya, T. D.; Arnoux, P.; Frochot, C.; Niogret, G.; Saubaméa, B.; Burckel, P.; Hall, J. P.; Hollenstein, M.; Cardin, C. J.; Gasser, G. Increasing the π-Expansive Ligands in Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation for Photodynamic Therapy Applications. *Inorg. Chem.* **2023**, *62* (45), 18510–18523. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c02606.

(101) Giacomazzo, G. E.; Schlich, M.; Casula, L.; Galantini, L.; Del Giudice, A.; Pietraperzia, G.; Sinico, C.; Cencetti, F.; Pecchioli, S.; Valtancoli, B.; Conti, L.; Murgia, S.; Giorgi, C. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes with π-Expansive Ligands: Synthesis and Cubosome Encapsulation for Photodynamic Therapy of Non-Melanoma Skin Cancer. *Inorg. Chem. Front.* **2023**, *10* (10), 3025–3036. https://doi.org/10.1039/D2QI02678C.

(102) Qi, F.; Yuan, H.; Chen, Y.; Peng, X.-X.; Wu, Y.; He, W.; Guo, Z. Type I Photoreaction and Photoinduced Ferroptosis by a Ru(II) Complex to Overcome Tumor Hypoxia in Photodynamic Therapy. *CCS Chemistry* **2022**, *5* (7), 1583–1591. https://doi.org/10.31635/ccschem.022.202202074.

(103) Ballester, F. J.; Ortega, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Ru(II) Photosensitizers Competent for Hypoxic Cancers via Green Light Activation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (71), 10301–10304. https://doi.org/10.1039/D0CC02417A.

(104) Martínez-Alonso, M.; Gandioso, A.; Thibaudeau, C.; Qin, X.; Arnoux, P.; Demeubayeva, N.; Guérineau, V.; Frochot, C.; Jung, A. C.; Gaiddon, C.; Gasser, G. A Novel Near-IR Absorbing Ruthenium(II) Complex as Photosensitizer for

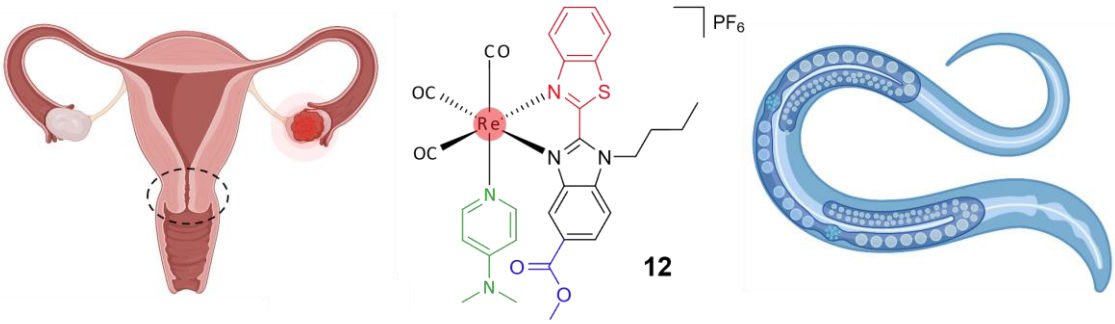
Photodynamic Therapy and Its Cetuximab Bioconjugates. *ChemBioChem* **2023**, *24* (15), e202300203. https://doi.org/10.1002/cbic.202300203.
(105) Huang, H.; Banerjee, S.; Sadler, P. J. Recent Advances in the Design of Targeted Iridium(III) Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *ChemBioChem* **2018**, *19* (15), 1574–1589. https://doi.org/10.1002/cbic.201800182.
(106) Vigueras, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kostrhunova, H.; Kasparkova, J.; Ruiz, J.; Brabec, V. A Photoactivated Ir(III) Complex Targets Cancer Stem Cells and Induces Secretion of Damage-Associated Molecular Patterns in Melanoma Cells Characteristic of Immunogenic Cell Death. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, *8* (21), 4696–4711. https://doi.org/10.1039/D1QI00856K.
(107) Huang, H.; Banerjee, S.; Qiu, K.; Zhang, P.; Blacque, O.; Malcomson, T.; Paterson, M. J.; Clarkson, G. J.; Staniforth, M.; Stavros, V. G.; Gasser, G.; Chao, H.; Sadler, P. J. Targeted Photoredox Catalysis in Cancer Cells. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (11), 1041–1048. https://doi.org/10.1038/s41557-019-0328-4.
(108) Wang, C.; Lystrom, L.; Yin, H.; Hetu, M.; Kilina, S.; McFarland, S. A.; Sun, W. Increasing the Triplet Lifetime and Extending the Ground-State Absorption of Biscyclometalated Ir(III) Complexes for Reverse Saturable Absorption and Photodynamic Therapy Applications. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (41), 16366–16378. https://doi.org/10.1039/C6DT02416E.
(109) Tellez-Isaias, G.; Joshua, I. A.; Bobai, M.; Woje, C. S. The Global Antimicrobial Resistance Epidemic - Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions. In *The Global Antimicrobial Resistance Epidemic - Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions*; IntechOpen, **2022**. https://doi.org/10.5772/intechopen.98171.
(110) Cong, W.; Poudel, A. N.; Alhusein, N.; Wang, H.; Yao, G.; Lambert, H. Antimicrobial Use in COVID-19 Patients in the First Phase of the SARS-CoV-2 Pandemic: A Scoping Review. *Antibiotics* **2021**, *10* (6), 745. https://doi.org/10.3390/antibiotics10060745.
(111) Frei, A.; Verderosa, A. D.; Elliott, A. G.; Zuegg, J.; Blaskovich, M. A. T. Metals to Combat Antimicrobial Resistance. *Nat Rev Chem* **2023**, *7* (3), 202–224. https://doi.org/10.1038/s41570-023-00463-4.
(112) Khan, S. N.; Khan, A. U. Breaking the Spell: Combating Multidrug Resistant 'Superbugs.' *Front Microbiol* **2016**, *7*, 174. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00174.
(113) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *CLIN INFECT DIS* **2009**, *48* (1), 1–12. https://doi.org/10.1086/595011.
(114) Ma, Y.-X.; Wang, C.-Y.; Li, Y.-Y.; Li, J.; Wan, Q.-Q.; Chen, J.-H.; Tay, F. R.; Niu, L.-N. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Adv. Sci.* **2020**, *7* (1), 1901872. https://doi.org/10.1002/advs.201901872.
(115) *2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis*. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240047655 (accessed 2024-01-09).
(116) O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; Report; Government of the United Kingdom, **2016**. https://apo.org.au/node/63983 (accessed 2023-12-10).
(117) De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *33* (3), 10.1128/cmr.00181-19. https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19.
(118) De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *33* (3), 10.1128/cmr.00181-19. https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19.

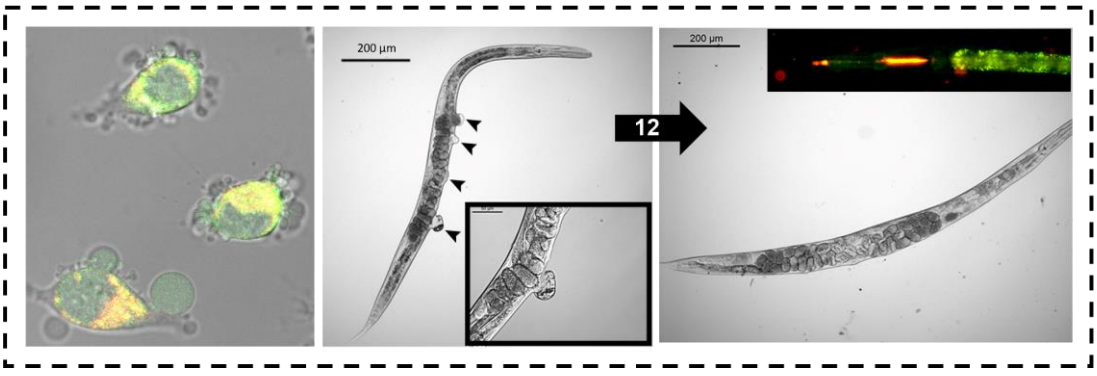
(119) Darby, E. M.; Trampari, E.; Siasat, P.; Gaya, M. S.; Alav, I.; Webber, M. A.; Blair, J. M. A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited. *Nat Rev Microbiol* **2023**, *21* (5), 280–295. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y.
(120) Maier, L.; Goemans, C. V.; Wirbel, J.; Kuhn, M.; Eberl, C.; Pruteanu, M.; Müller, P.; Garcia-Santamarina, S.; Cacace, E.; Zhang, B.; Gekeler, C.; Banerjee, T.; Anderson, E. E.; Milanese, A.; Löber, U.; Forslund, S. K.; Patil, K. R.; Zimmermann, M.; Stecher, B.; Zeller, G.; Bork, P.; Typas, A. Unravelling the Collateral Damage of Antibiotics on Gut Bacteria. *Nature* **2021**, *599* (7883), 120–124. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03986-2.
(121) Lykknes, A.; Kvittingen, L. Arsenic: Not So Evil After All? *J. Chem. Educ.* **2003**, *80* (5), 497. https://doi.org/10.1021/ed080p497.
(122) Rees, T. W.; Ho, P.-Y.; Hess, J. Recent Advances in Metal Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *ChemBioChem* **2023**, *24* (16), e202200796. https://doi.org/10.1002/cbic.202200796.
(123) Frei, A.; Zuegg, J.; Elliott, A. G.; Baker, M.; Braese, S.; Brown, C.; Chen, F.; G. Dowson, C.; Dujardin, G.; Jung, N.; King, A. P.; Mansour, A. M.; Massi, M.; Moat, J.; Mohamed, H. A.; Renfrew, A. K.; Rutledge, P. J.; Sadler, P. J.; Todd, M. H.; Willans, C. E.; Wilson, J. J.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Metal Complexes as a Promising Source for New Antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (10), 2627–2639. https://doi.org/10.1039/C9SC06460E.
(124) Waters, J. E.; Stevens-Cullinane, L.; Siebenmann, L.; Hess, J. Recent Advances in the Development of Metal Complexes as Antibacterial Agents with Metal-Specific Modes of Action. *Curr. Opin. Microbiol.* **2023**, *75*, 102347. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102347.
(125) Arenas, Y.; Monro, S.; Shi, G.; Mandel, A.; McFarland, S.; Lilge, L. Photodynamic Inactivation of Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus with Ru(II)-Based Type I/Type II Photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2013**, *10* (4), 615–625. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.07.001.
(126) Esarte Palomero, O.; Cunningham, A. L.; Davies, B. W.; Jones, R. A. Antibacterial Thiamine Inspired Silver (I) and Gold (I) N-Heterocyclic Carbene Compounds. *Inorganica Chim. Acta* **2021**, *517*, 120152. https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120152.
(127) Lj. Stevanović, N.; Kljun, J.; Aleksic, I.; Skaro Bogojevic, S.; Milivojevic, D.; Veselinovic, A.; Turel, I.; I. Djuran, M.; Nikodinovic-Runic, J.; Đ. Glišić, B. Clinically Used Antifungal Azoles as Ligands for Gold(III) Complexes: The Influence of the Au(III) Ion on the Antimicrobial Activity of the Complex. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (13), 5322–5334. https://doi.org/10.1039/D2DT00411A.
(128) Sovari, S. N.; Radakovic, N.; Roch, P.; Crochet, A.; Pavic, A.; Zobi, F. Combatting AMR: A Molecular Approach to the Discovery of Potent and Non-Toxic Rhenium Complexes Active against *C. Albicans*-MRSA Co-Infection. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113858. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113858.
(129) Schindler, K.; Cortat, Y.; Nedyalkova, M.; Crochet, A.; Lattuada, M.; Pavic, A.; Zobi, F. Antimicrobial Activity of Rhenium Di- and Tricarbonyl Diimine Complexes: Insights on Membrane-Bound S. Aureus Protein Binding. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (9), 1107. https://doi.org/10.3390/ph15091107.
(130) Frei, A.; Ramu, S.; Lowe, G. J.; Dinh, H.; Semenec, L.; Elliott, A. G.; Zuegg, J.; Deckers, A.; Jung, N.; Bräse, S.; Cain, A. K.; Blaskovich, M. A. T. Platinum Cyclooctadiene Complexes with Activity against Gram-Positive Bacteria. *ChemMedChem* **2021**, *16* (20), 3165–3171. https://doi.org/10.1002/cmdc.202100157.
(131) Chlumsky, O.; Purkrtova, S.; Michova, H.; Sykorova, H.; Slepicka, P.; Fajstavr, D.; Ulbrich, P.; Viktorova, J.; Demnerova, K. Antimicrobial Properties of Palladium and Platinum Nanoparticles: A New Tool for Combating Food-Borne Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (15), 7892. https://doi.org/10.3390/ijms22157892.

(132) Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V. Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (6), 874. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060874.
(133) Busto, N.; Vigueras, G.; Cutillas, N.; García, B.; Ruiz, J. Inert Cationic Iridium(III) Complexes with Phenanthroline-Based Ligands: Application in Antimicrobial Inactivation of Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (25), 9653–9663. https://doi.org/10.1039/D2DT00752E.
(134) Chellan, P.; Avery, V. M.; Duffy, S.; Triccas, J. A.; Nagalingam, G.; Tam, C.; Cheng, L. W.; Liu, J.; Land, K. M.; Clarkson, G. J.; Romero-Canelón, I.; Sadler, P. J. Organometallic Conjugates of the Drug Sulfadoxine for Combatting Antimicrobial Resistance. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (40), 10078–10090. https://doi.org/10.1002/chem.201801090.
(135) Chen, F.; Moat, J.; McFeely, D.; Clarkson, G.; Hands-Portman, I. J.; Furner-Pardoe, J. P.; Harrison, F.; Dowson, C. G.; Sadler, P. J. Biguanide Iridium(III) Complexes with Potent Antimicrobial Activity. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (16), 7330–7344. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00906.
(136) DuChane, C. M.; Karpin, G. W.; Ehrich, M.; Falkinham, J. O.; Merola, J. S. Iridium Piano Stool Complexes with Activity against S. Aureus and MRSA: It Is Past Time to Truly Think Outside of the Box. *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10* (8), 1391–1398. https://doi.org/10.1039/C9MD00140A.
(137) Mansour, A. M.; Radacki, K. Antimicrobial Properties of Half-Sandwich Ir(III) Cyclopentadienyl Complexes with Pyridylbenzimidazole Ligands. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (14), 4491–4501. https://doi.org/10.1039/D0DT00451K.
(138) Baartzes, N.; Jordaan, A.; Warner, D. F.; Combrinck, J.; Taylor, D.; Chibale, K.; Smith, G. S. Antimicrobial Evaluation of Neutral and Cationic Iridium(III) and Rhodium(III) Aminoquinoline-Benzimidazole Hybrid Complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *206*, 112694. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112694.

Capítulo 2

Complejos de Re(I) como potenciales agentes selectivos y teragnósticos frente al cáncer. Estudios *in vivo* en *C. elegans*





Los estudios *in vitro* en células tumorales los ha realizado Pezhman Ashoo de nuestro grupo de investigación, mientras que los estudios *in vivo* en *C. elegans* han sido realizados por el grupo del Prof. Dr. Fernando Gandía de la Universidad de Murcia.

2.1. Introducción

Como se ha comentado en el capítulo anterior, en la última década los complejos de renio, en particular los tricarbonilcomplejos, han demostrado tener excelentes propiedades anticancerígenas,[1,2] ser inhibidores de la proteasa principal del SARS-CoV-2[3,4] y, recientemente, se han estudiado como agentes terapéuticos para la lesión por isquemia-reperfusión.[5] En general, los mecanismos de acción de los compuestos anticancerígenos de Re(I) con un núcleo *fac*-$[Re(CO)_3]^+$ son muy distintos a los de los fármacos convencionales basados en platino. Su orgánulo diana no suele ser el núcleo, sino otros vulnerables como la mitocondria y, como se ha comentado, un mecanismo de acción diferente es una estrategia empleada para combatir la resistencia a agentes quimioterapéuticos,[6] como es el caso de este tipo de compuestos de Re(I).[6–14] Sin embargo, su eficacia antitumoral *in vivo* es todavía poco conocida. Por otro lado, resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en complejos organometálicos de Ru(II) e Ir(III) con ligandos basados en benzimidazol han demostrado que: pequeñas modificaciones en este tipo de ligando provocan un gran cambio en la actividad anticancerígena *in vitro*;[15–18] un grupo butilo como sustituyente del átomo de N del benzimidazol mejora las propiedades lipofílicas, lo que favorece tanto su entrada en la célula como que se dirija preferentemente a la mitocondria;[15] y un grupo éster en el núcleo de benzimidazol puede ser útil para futuras funcionalizaciones.[19]

Por todo ello, con el fin de introducir nuevos compuestos metálicos para la inhibición eficaz y selectiva del cáncer, en el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de una nueva serie de complejos de Re(I) del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N\text{^}N)L]^{0/+}$ (**Figura 2.1**), donde N^N es un ligando bidentado basado en benzimidazol y L es un ligando monodentado (cloruro, piridina o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina). Todos los complejos se probaron frente a dos líneas tumorales (HeLa y A2780) y frente a la línea de células sanas BGM. Posteriormente, los mejores candidatos se estudiaron en esferoides tumorales 3D de células HeLa. Además, teniendo en cuenta que la estirpe tumoral JK1466 de *Caenorhabditis elegans* se ha utilizado para realizar estudios *in vivo* de actividad biológica y de mecanismo de acción tanto de fármacos orgánicos como de compuestos basados en metales,[17,20] decidimos realizar ensayos *in vivo* tanto en dicho modelo como la cepa MT2124 con el fin aumentar los tipos de modelos cancerígenos.

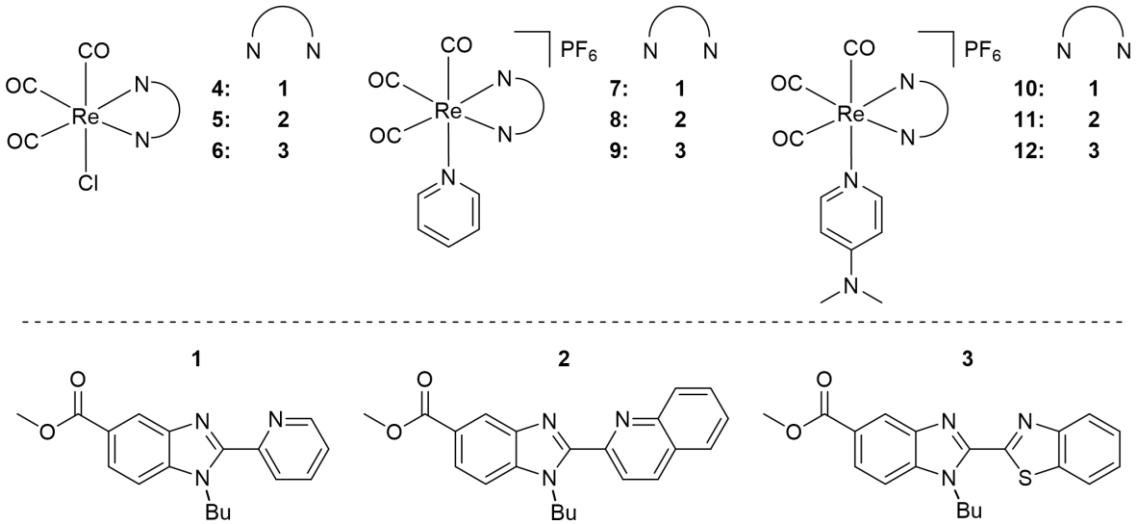


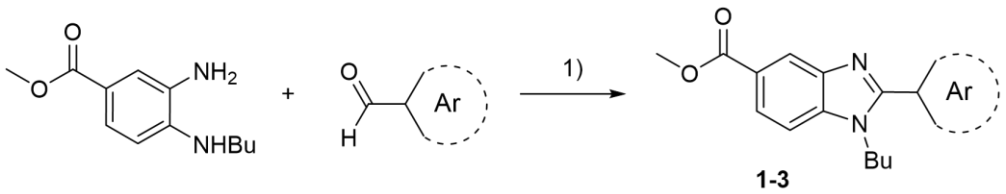
Figura 2.1. Estructura general de los compuestos sintetizados.

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Síntesis

Síntesis de los ligandos N^N

Los tres ligandos empleados en este capítulo (**1**–**3**) son de tipo N,N-dadores y presentan una estructura derivada de benzimidazol con un sustituyente butilo sobre el átomo de N de éste y un grupo éster para su posible funcionalización. Se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía,[17,21] por condensación de la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo) previamente sintetizada (**Esquema E2.1**) con el aldehído correspondiente: 2-piridilcarboxaldehído, 2-quinolincarboxalehído o benzo[*b*]tiofeno-2-carboxaldehído (**Esquema 2.1**).



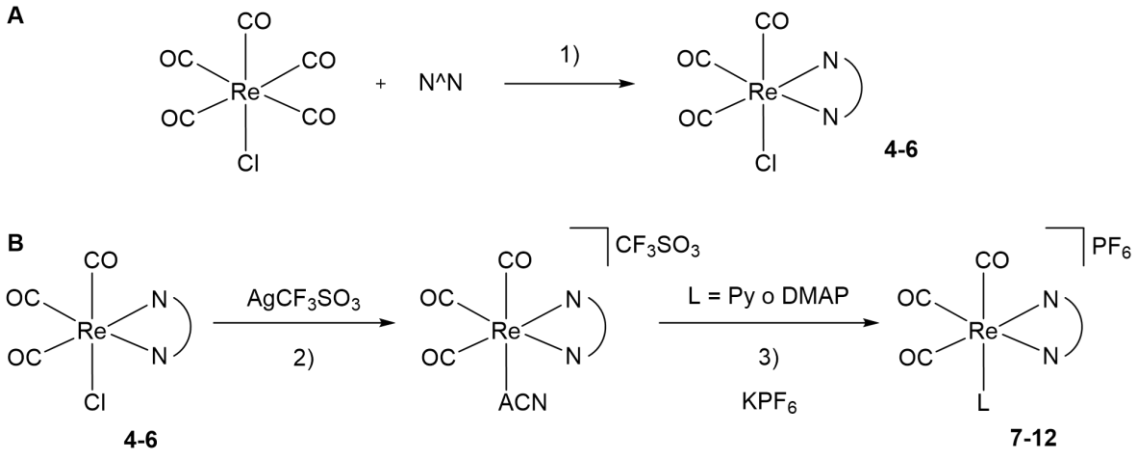
Esquema 2.1. Síntesis de los ligandos N^N tipo benzimidazol, **1**–**3**. Condiciones de reacción: (1) H_2O:EtOH (1:1, v:v), $NaHSO_3$, 80 ºC, 18 h.

Síntesis de los complejos metálicos

Los complejos **4**–**6** se prepararon mediante una adaptación de los protocolos descritos en la bibliografía,[22] a través de la reacción del complejo pentacarbonilclorurorenio(I), $[Re(CO)_5Cl]$, con el ligando N^N correspondiente, en tolueno a reflujo durante 4 h y bajo atmósfera de nitrógeno (**Esquema 2.2A**).

Por otro lado, la sustitución de los ligandos cloruro por piridina (py) o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) podría modular el potencial anticancerígeno de los compuestos obtenidos, como se ha comprobado para algunos complejos de Ir(III) y

Os(II),[20,23] por lo que se llevó a cabo la síntesis de **7**–**12**, que se realizó en dos etapas (**Esquema 2.2B**).[24] Primero, tuvo lugar la reacción del complejo precursor correspondiente (**4**–**6**) con la sal de plata, $AgCF_3SO_3$, en acetonitrilo a reflujo durante 24 h en atmósfera inerte. En la segunda etapa, el intermedio obtenido anteriormente y el ligando monodentado correspondiente, py o DMAP, se mantuvieron a 60 ºC en THF:MeOH (3:1, v:v) durante 12 h en atmosfera de N_2, dando como resultado una disolución del complejo final con el ion trifluorometanosulfonato como contraión. Finalmente, la adición de exceso de KPF_6 a la mezcla condujo a los nuevos complejos **7**–**12**.



Esquema 2.2. Síntesis de los nuevos complejos de Re(I) (A) **4**–**6** y (B) **7**–**12**. Condiciones de reacción: (1) tolueno, 110 ºC, 4 h, atm. N_2; (2) acetonitrilo, 80 ºC, 24 h, atm. N_2; (3) THF:MeOH (3:1, v:v), 60 ºC, 12 h, atm. N_2.

2.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos

Todos los complejos sintetizados son sólidos de color amarillo o naranja y se caracterizaron mediante análisis elemental, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y espectros bidimensionales. También se caracterizaron por espectroscopia infrarroja (IR).

Espectroscopia de RMN

Todos los espectros de RMN se encuentran recogidos en las **Figuras A2.1–A2.45** del Anexo I. En la **Figura 2.2** se presenta la numeración empleada en el estudio de los espectros de RMN.

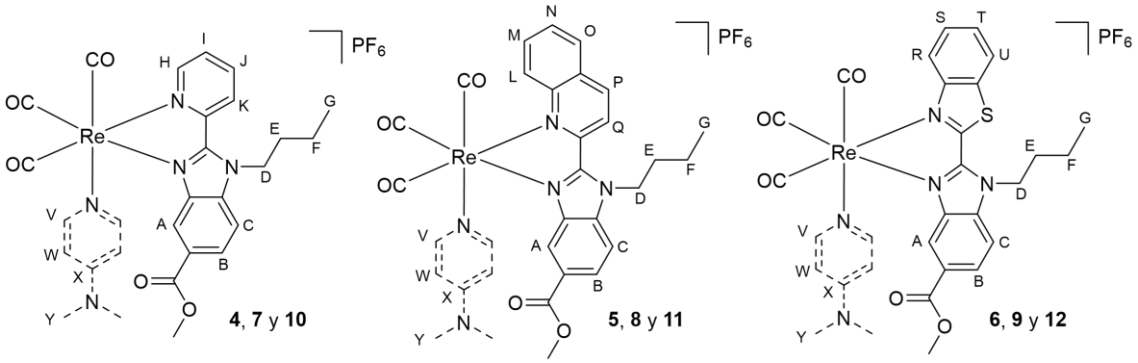


Figura 2.2. Numeración general empleada en el estudio de las señales por RMN.

Todos los complejos muestran en su ^{1}H-RMN las resonancias aromáticas, δ 9,50–6,00 ppm, y las alifáticas correspondientes al grupo éster (H_{OMe}), como un singlete en torno a δ 4 ppm, y al grupo butilo, como tres multipletes (H_D, H_E y H_F) entre δ 5,00 y 1,50 ppm y un triplete (H_G) a δ 1,00 ppm (**Figura 2.3A** para el complejo **4**). En el caso de **7**–**9**, además, se observan las tres señales del ligando piridina a δ 8,20–7,15 ppm (H_V, H_W y H_X) (**Figura 2.3B** para **9**), mientras que **10**–**12** muestran las correspondientes a la DMAP: dos dobletes en la región δ 7,60–6,20 ppm (H_V y H_W) y un singlete a 2,85 ppm (H_Y) (**Figura 2.3C** para **10**).

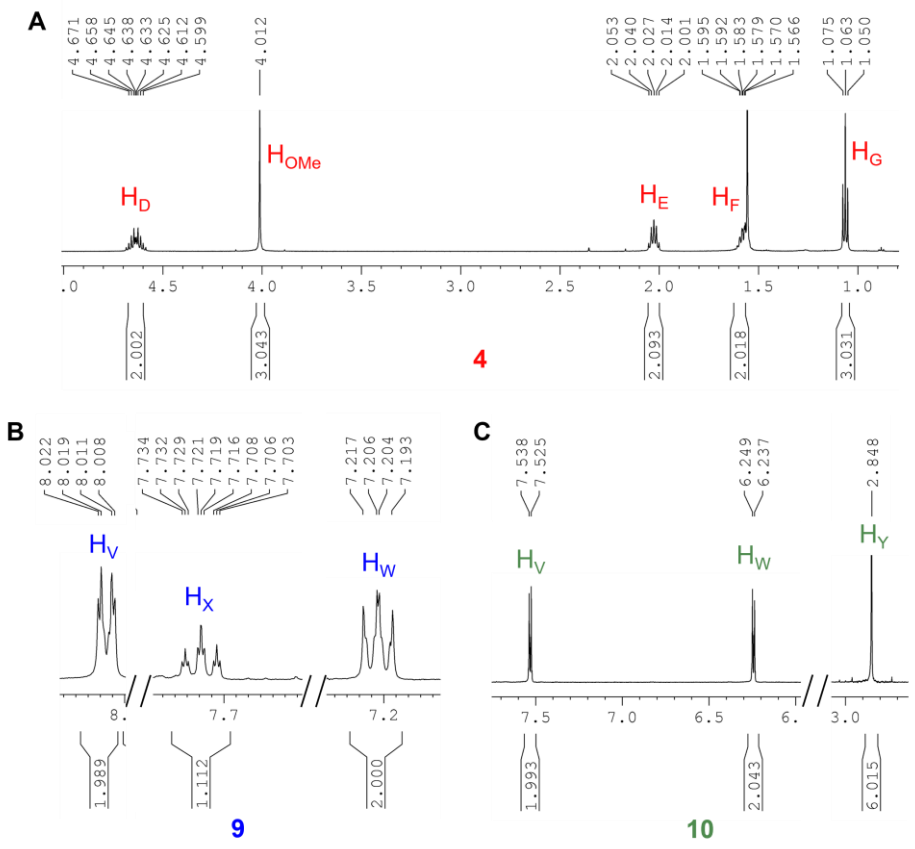


Figura 2.3. Espectros de ^{1}H-RMN donde se observan las señales correspondientes al (A) grupo butilo y OMe del complejo **4** ($CDCl_3$); (B) ligando piridina del complejo **9** ($CDCl_3$); (C) ligando DMAP del complejo **10** (CD_3CN). 600 MHz a t.a.

Por otro lado, es posible llevar a cabo una comparación de la zona aromática de un clorocomplejo y sus análogos con piridina y DMAP, con el fin de estudiar los desplazamientos producidos en las señales del N^N tras la sustitución del ligando monodentado. En la **Figura 2.4** se muestran, a modo de ejemplo comparativo, los espectros de los complejos **6**, **9** y **12**. Las señales H_B, H_U, H_S, H_T y H_C sufren un pequeño desplazamiento a campo bajo tras la sustitución del cloruro por la piridina o la DMAP.

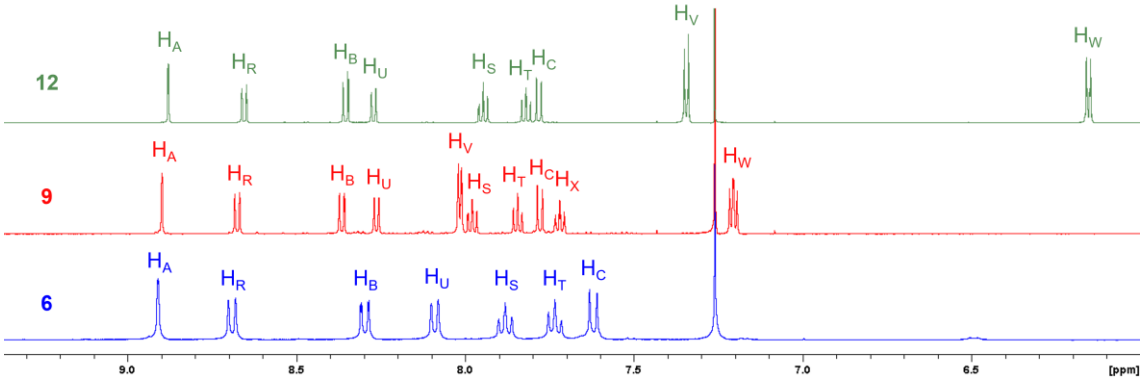


Figura 2.4. Comparación de la zona aromática de los espectros ^{1}H-RMN de los complejos **6**, **9** y **12** con el fin de estudiar el efecto de la sustitución del ligando monodentado. Registrados en $CDCl_3$ a t.a., 600 MHz.

En cuanto a la región alifática se observa un pequeño desplazamiento a campo bajo de las señales correspondientes a H_D y H_{OMe} al sustituir el ligando cloruro, y un ligero desplazamiento a campo alto de $H_{E\text{-}G}$. Además, en el espectro del complejo **12** aparece la nueva señal H_Y correspondiente al grupo NMe_2 (**Figura 2.5**).

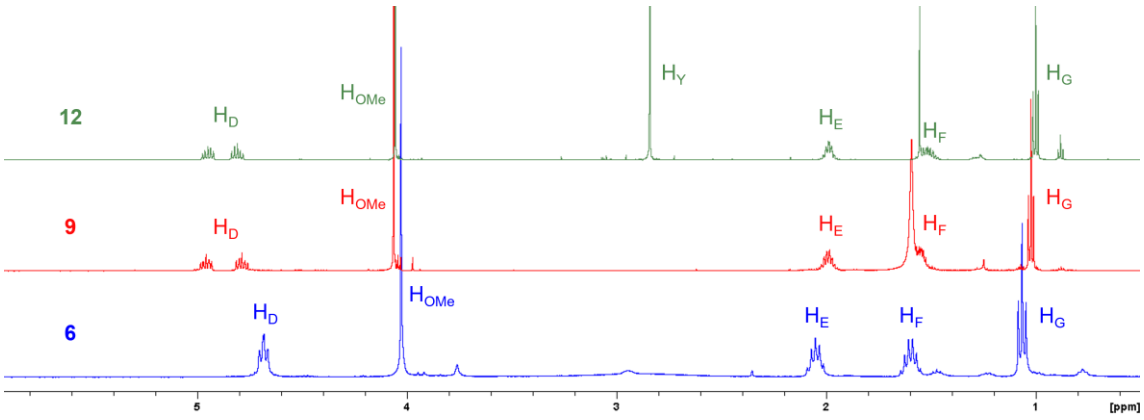


Figura 2.5. Comparación de la zona alifática de los espectros ^{1}H-RMN de los complejos **6**, **9** y **12** con el fin de estudiar el efecto de la sustitución del ligando monodentado. Registrados en $CDCl_3$ a t.a., 600 MHz.

Respecto a los espectros de ^{13}C-RMN, se puede realizar el mismo análisis que para los ^{1}H-RMN. En la **Figura 2.6** se encuentran recogidas las señales más características: las correspondientes a los grupos éster (C_{OMe}, a δ 52,8 ppm) y butilo ($C_{D\text{-}G}$, δ 46,5–13,0 ppm), presentes en todos los complejos (**Figura 2.6A** para **4**), las del

ligando piridina ($C_{V\text{-}X}$) (**Figura 2.6B** para **9**) y las de la DMAP ($C_{V\text{-}Y}$) (**Figura 2.6C** para **10**).

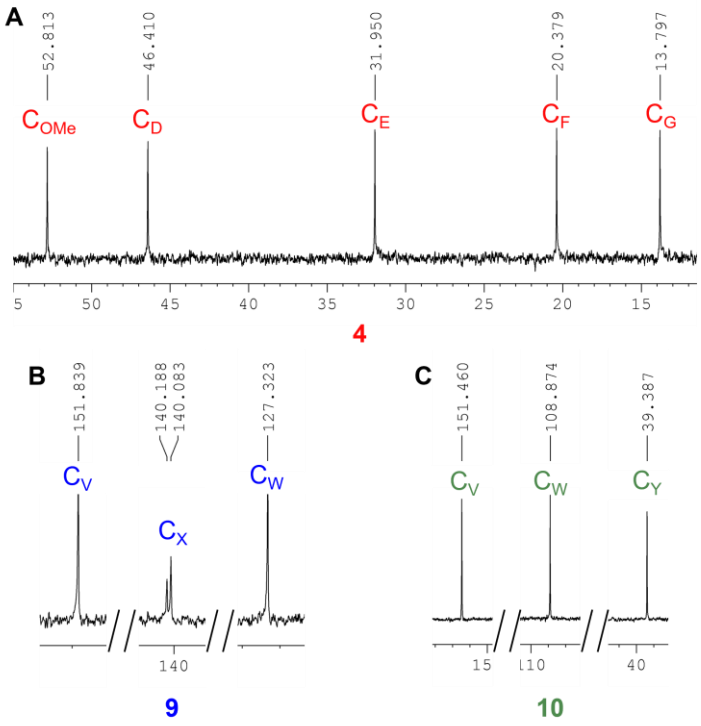


Figura 2.6. Ampliaciones de espectros de ^{13}C-RMN donde se observan las señales correspondientes al (A) grupo butilo y éster del complejo **4** ($CDCl_3$); (B) ligando piridina de **9** ($CDCl_3$); (C) ligando DMAP para **10** (CD_3CN). A t.a., 151 MHz.

En las **Figuras A2.46** y **A2.47** del Anexo I se encuentran recogidas las ampliaciones de las zonas aromática y alifática de los espectros de ^{13}C-RMN de los complejos **6**, **9** y **12**, con el fin de estudiar el efecto del ligando monodentado en las señales del N^N. Las correspondientes a $C_{S,T,B}$ apenas se desplazan al sustituir el cloruro por la piridina o DMAP, mientras que las de C_R y C_A aparecen ligeramente a campo más alto, y C_U y C_C a campo bajo al sustituir el cloruro. Además, en el espectro de **9**, se muestran las nuevas señales correspondientes al ligando piridina (C_V, C_X y C_W, a δ 152, 141 y 128 ppm, respectivamente). Así como se observan las de la DMAP en el de **12** (C_V y C_W, a δ 150 y 108 ppm, respectivamente). La zona alifática, en cambio, no sufre ningún desplazamiento tras la sustitución del ligando monodentado (**Figura A2.47**). Simplemente se observa la aparición de la señal correspondiente al C_Y de la DMAP a δ 39 ppm para **12**.

Espectroscopia infrarroja (IR)

Los complejos se caracterizaron por IR. Las **Figuras A2.48**–**A2.56** del Anexo I muestran los espectros IR y en todos los casos se observan bandas en la región de 2030–1890 cm^{-1} que se atribuyen a las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas

de los grupos carbonilos. Esto concuerda con lo descrito en la bibliografía para este tipo de complejos con esteroisomería *fac*- de los ligandos CO alrededor del centro metálico en complejos del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N\hat{}N)L]^{0/+}$.[25]

Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

Con el fin de completar la caracterización de los complejos y comprobar que su pureza era superior al 96%, se llevaron a cabo el análisis de cromatografía líquida acoplada a masas y el análisis elemental, que confirman también que se cumple la estequiometría propuesta (**Tabla 2.1**).

Los cromatogramas, registrados empleando un gradiente de la mezcla ACN:H_2O (**Tabla E2.1**), dieron como resultado un solo pico (**Figura 2.7**), cuyo espectro de masas corresponde con el ion molecular con pérdida de cloruro $[M\text{-}Cl]^+$ en el caso de **4**–**6** y con pérdida del contraión, $[M\text{-}PF_6]^+$, para **7**–**12** (**Tabla 2.1** y **Figuras A2.63**–**A2.68** del Anexo I). En todos los casos el perfil isotópico coincide con el obtenido mediante cálculos teóricos.

Tabla 2.1. Resultados de HPLC/MS y análisis elemental de los complejos sintetizados.

Compuesto	t_R (min)	Fragmento	(m/z)[a]	%C[a]	%H[a]	%N[a]	%S[a]
4	9,459	$[M\text{-}Cl]^+$	580,0854 (580,0882)	40,7 (41,01)	3,08 (3,11)	6,75 (6,83)	-
5	10,825	$[M\text{-}Cl]^+$	630,1065 (630,1039)	45,10 (45,15)	3,12 (3,18)	6,30 (6,32)	-
6	10,743	$[M\text{-}Cl]^+$	636,0584 (636,0603)	41,20 (41,16)	2,82 (2,85)	6,20 (6,26)	4,71 (4,78)
7	6,484	$[M\text{-}PF_6]^+$	659,1325 (659,1304)	38,95 (38,86)	3,10 (3,01)	6,86 (6,97)	-
8	7,285	$[M\text{-}PF_6]^+$	709,1482 (709,1461)	42,26 (42,21)	3,12 (3,07)	6,38 (6,56)	-
9	7,269	$[M\text{-}PF_6]^+$	715,1045 (715,1025)	39,02 (39,12)	2,85 (2,81)	6,49 (6,52)	3,79 (3,73)
10	6,995	$[M\text{-}PF_6]^+$	702,1748 (702,1726)	39,84 (39,72)	3,54 (3,45)	8,29 (8,27)	-
11	7,749	$[M\text{-}PF_6]^+$	752,1904 (725,1883)	42,86 (42,86)	3,58 (3,48)	7,87 (7,81)	-
12	7,692	$[M\text{-}PF_6]^+$	758,1468 (758,1447)	39,83 (39,91)	3,25 (3,24)	7,67 (7,76)	3,59 (3,55)

[a]Valores teóricos entre paréntesis.

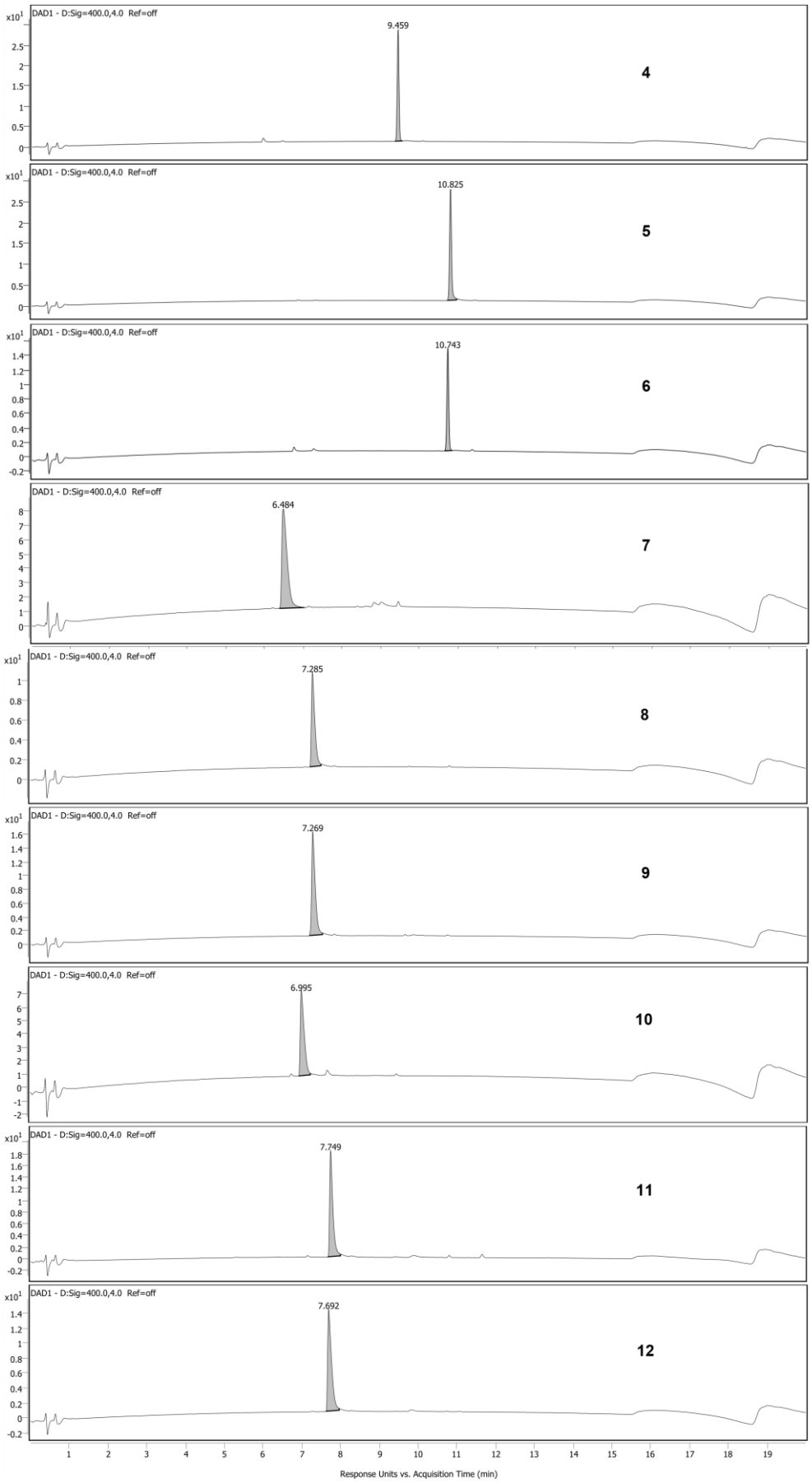


Figura 2.7. Cromatograma de los complejos disueltos en ACN. Gradiente ACN:H_2O, λ=400 nm.

2.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante rayos-X

La resolución de los cristales la llevó a cabo el equipo del Prof. Dr. Christoph Janiak de la Universidad de Düsseldorf, Alemania.

Las estructuras moleculares de los complejos **6** y **11** fueron corroboradas mediante difracción de rayos-X. Los cristales de **6** se obtuvieron de manera fortuita por evaporación lenta del disolvente en un tubo de RMN con una disolución del complejo en $CDCl_3$. Esta estructura no contiene moléculas de disolvente (**Figura 2.8** y **Tablas A2.1a**,**b**). Sin embargo, cuando los cristales de **6** crecen por difusión lenta de hexano en una disolución del complejo en cloroformo o por evaporación del disolvente tras unos días, se obtienen agujas muy pequeñas, cuyos datos dieron como resultado la estructura de **6** como solvato de $CHCl_3$ (**6**·$CHCl_3$) (más información en el Anexo I, **Tablas A2.1c,d**). Los monocristales de **11** se obtuvieron por difusión lenta de hexano en una disolución saturada del complejo en acetonitrilo. En la **Figura 2.8** y la **Figura 2.9** se muestran las estructuras los complejos **6** y **11**, respectivamente, así como las distancias y ángulos de enlace en torno al centro metálico, cuyos valores coinciden con los encontrados previamente (**Tablas A2.1b** y **A2.2b**).[26] Los datos cristalográficos de las estructuras cristalinas y sus celdillas unidad se encuentran recogidos en la **Tabla 2.2**.

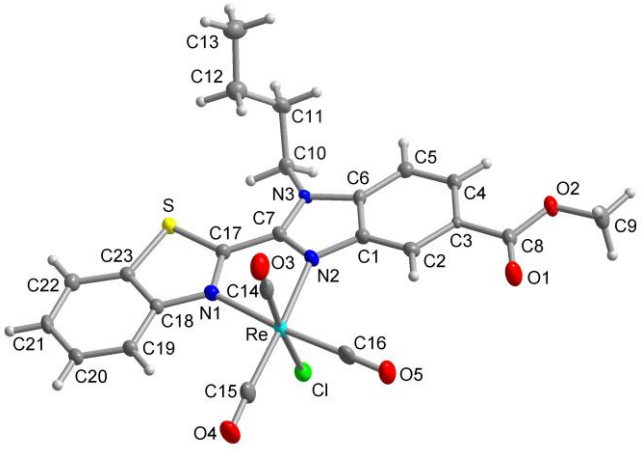


Figura 2.8. Estructura cristalina del complejo **6**. Distancias de enlace [Å]: Re-N(1): 2,208(3); Re-N(2): 2,152(3); Re-Cl: 2,4707(10); Re-C(14): 1,928(4); Re-C(15): 1,921(4); Re-C(16): 1,908(4). Ángulos [º]: C(16)-Re-C(15): 85,95(15); C(16)-Re-C(14): 89,84(16); C(16)-Re-Cl: 89,64(13); C(16)-Re-N(1): 171,04(13); C(16)-Re-N(2): 98,94(13); C(15)-Re-C(14): 90,67(17); C(15)-Re-Cl: 93,91(14); C(15)-Re-N(1): 101,20(13); C(15)-Re-N(2): 173,21(14); C(14)-Re-Cl: 175,34(11); C(14)-Re-N(1): 95,41(13); C(14)-Re-N(2): 94,02(13); N(1)-Re-N(2): 73,50(11); N(1)-Re-Cl: 84,53(8); N(2)-Re-Cl: 81,48(8); O(3)-C(14)-Re: 178,2(3); O(4)-C(15)-Re: 177,6 (4); O(5)-C(16)-Re: 177,7(4).

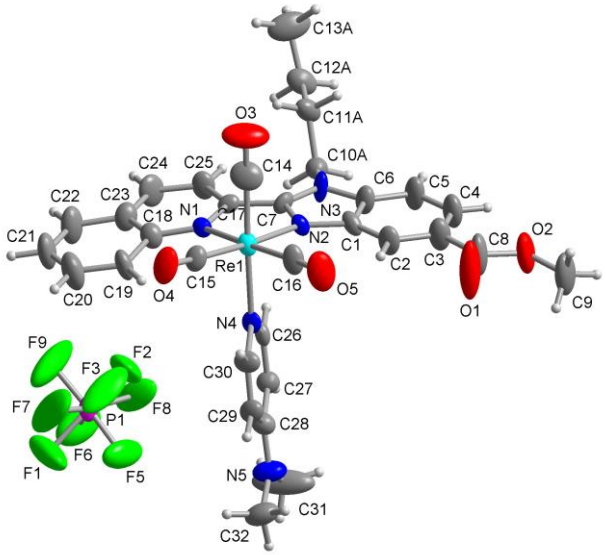


Figura 2.9. Estructura cristalina del complejo **11**. Distancias de enlace [Å]: Re-N(1): 2,254(8); Re-N(2): 2,145(8); Re-N(4): 2,202(8); Re-C(14): 1,915(15); Re-C(15): 1,910(10); Re-C(16): 1,889(11). Ángulos [º]: C(16)-Re-C(15): 85,3(4); C(16)-Re-C(14): 88,5(6); C(16)-Re-N(4): 91,0(5); C(16)-Re-N(1): 171,9(4); C(16)-Re-N(2): 99,4(4); C(15)-Re-C(14): 87,7(5); C(15)-Re-N(4): 94,5(4); C(15)-Re-N(1): 102,5(4); C(15)-Re-N(2): 175,1(4); C(14)-Re-N(4): 177,6(5); C(14)-Re-N(1): 94,1(4); C(14)-Re-N(2): 90,9(4); N(1)-Re-N(2): 72,9(3); N(1)-Re-N(4): 86,1(3); N(2)-Re-N(4): 86,9(3); O(3)-C(14)-Re: 175,9(11); O(4)-C(15)-Re: 177,3(11); O(5)-C(16)-Re: 176,9(13).

Tabla 2.2. Datos cristalográficos de los complejos **6**, **11** y **6**·$CHCl_3$.

Sistema cristalino: ortorrómbico.				
Complejo	**Grupo espacial**	**a [Å]**	**b [Å]**	**c [Å]**
6	Pbcn	16,6417(5)	20,7828(5)	13,2927(4)
11	Pnna	21,5188(18)	21,545(2)	17,2204(14)
Sistema cristalino: monoclínico.				
Complejo	**Grupo espacial**	**a [Å]**	**b [Å]**	**c [Å]**
6·$CHCl_3$	$P2_1/c$	11.4025 (9)	24.8750 (15)	10.1631 (7)

Los centros de Re(I) adoptan una geometría octaédrica distorsionada con el centro metálico unido al ligando bidentado N^N, con la esfera de coordinación restante ocupada por tres ligandos carbonilo dispuestos en orientación facial (*fac*-) y un ion cloruro axial (para **6**) o una molécula de DMAP (para **11**). Además, se observan moléculas adicionales de cloroformo desordenadas en la estructura cristalina de **6** y de diclorometano en **11** (**Tabla A2.2b**). Para este último, también se observa que la carga de los aniones PF_6 desordenados rotacionalmente equilibra la carga monocatiónica global del complejo.

Por otro lado, ambas estructuras, **6** y **11**, se estabilizan por interacciones inter e intramoleculares (**Figura 2.10** y **Tablas A2.3** y **A2.4** para **6** y **Figura 2.11** y **Tablas A2.5** y **A2.6** para **11**).[27,28] Las interacciones de empaquetamiento supramolecular fueron

analizadas con PLATON. Para el complejo **6** las interacciones π–π entre los ligandos N^N se muestran en la **Figura 2.10**,[27,29] siendo la distancia más corta entre centroides de 3,590 Å. En **11** hay interacciones de apilamiento-π (**Figura 2.11**), además de interacciones intermoleculares C-H···Cg(anillo).

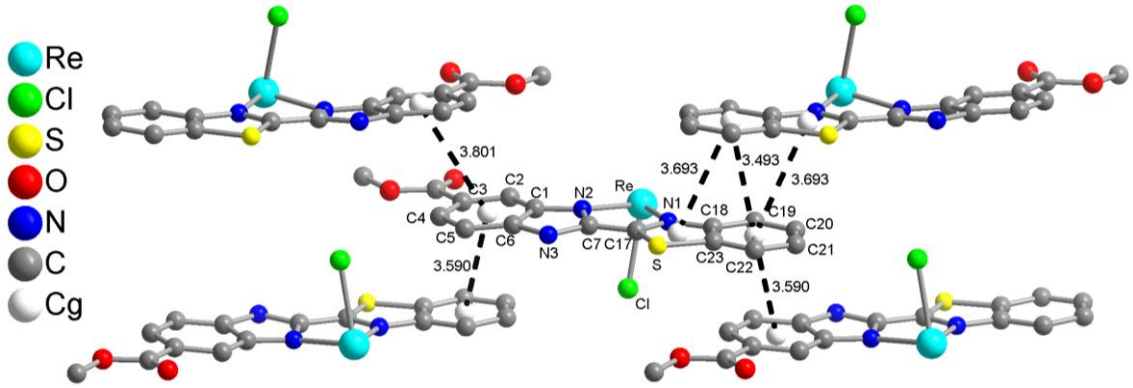


Figura 2.10. Interacciones π–π en el cristal de **6** indicadas con líneas discontinuas negras con las distancias centroide-centroide en Å. En la **Tabla A2.3** (Cg = centroide del anillo) se recogen más detalles de estas interacciones, incluyendo las transformaciones de simetría. Los átomos de H, el grupo butilo y los ligandos CO se han omitido por claridad de la imagen.

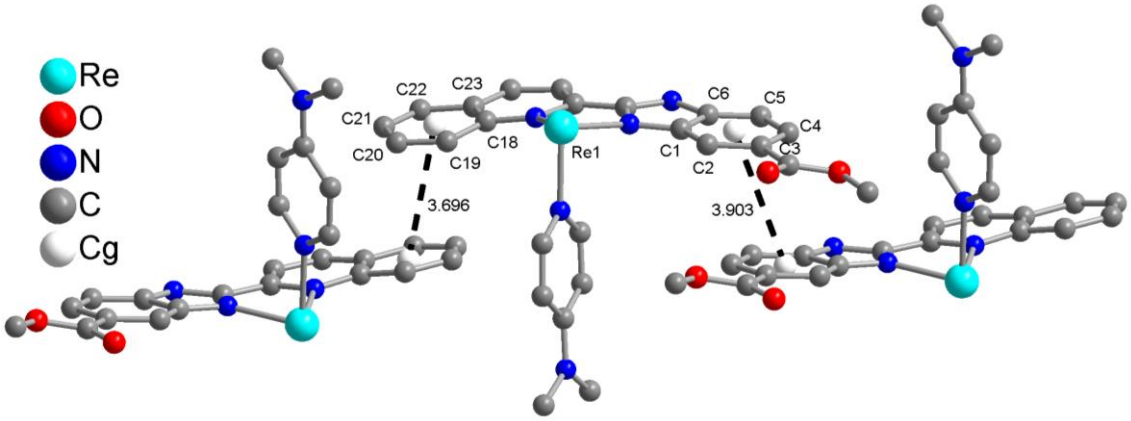


Figura 2.11. Interacciones π–π en el cristal de **11** indicadas con líneas discontinuas negras con las distancias centroide-centroide en Å. En la **Tabla A2.5** (Cg = centroide del anillo) se recogen más detalles de estas interacciones, incluyendo las transformaciones de simetría. Los átomos de H, el grupo butilo y los ligandos CO se han omitido por claridad de la imagen.

2.2.4. Propiedades fotofísicas

Se ha llevado a cabo la caracterización fotofísica de los nuevos complejos sintetizados. Para ello, se registraron los espectros de absorción UV/Vis en acetonitrilo y agua (1% DMSO) (**Figura 2.12A-B** y **Figura A2.70**, respectivamente) y los espectros de emisión en ambos disolventes y en estado sólido (**Figura A2.71**).

Todos los complejos mostraron bandas de absorción intensas y de elevada energía en el rango de los 260–280 nm, correspondientes a las transiciones intraligando π-π* permitidas por la regla de espín. Las bandas de menor energía localizadas en la región 360–450 nm se corresponden con las transiciones de transferencia de carga

metal-ligando (MLCT) (**Tabla 2.3**).[30] Por otro lado, se ha observado que muchos complejos de Re(I) del tipo *fac*-[Re(CO)$_3$(diimina)X], donde X representa un halógeno, presentan emisión fosforescente debido a las transferencias de carga metal-ligando (^{3}MLCT) en las que intervienen los orbitales del ligando aceptor diimina,[31] por lo que la luminiscencia de los complejos **4**–**12** se estudió en acetonitrilo, disolución acuosa y estado sólido (**Figura A2.71**). Excitando a la longitud de onda del máximo de absorción (320–380 nm), todos los complejos presentan muy baja emisión tanto en medio acuoso como en acetonitrilo, con máximos de emisión desde 570 hasta 625 nm (**Figura A2.71B** y **Tabla 2.3**). Los rendimientos cuánticos de emisión se midieron en acetonitrilo en atmósfera de argón y todos ellos fueron menores del 1%, excepto para el complejo **7**, que fue del 2,3%. Sin embargo, los complejos presentan elevada emisión en estado sólido (**Figura 2.12C** para el complejo **12** y **Figura A2.71C** para todos), lo que sugiere que la emisión podría tener su origen en la agregación molecular en el medio rígido a través del apilamiento π-π de los ligandos quelato. Se observó que, tanto en estado sólido como en disolución, los complejos que contienen el ligando **1** presentan máximos de emisión a 550–570 nm, mientras que los complejos con **2** ó **3** mostraron un desplazamiento batocrómico hasta 605–630 nm, probablemente debido al aumento de la conjugación de tipo π del ligando N^N en **2** o la presencia del átomo de S en **3**.[32]

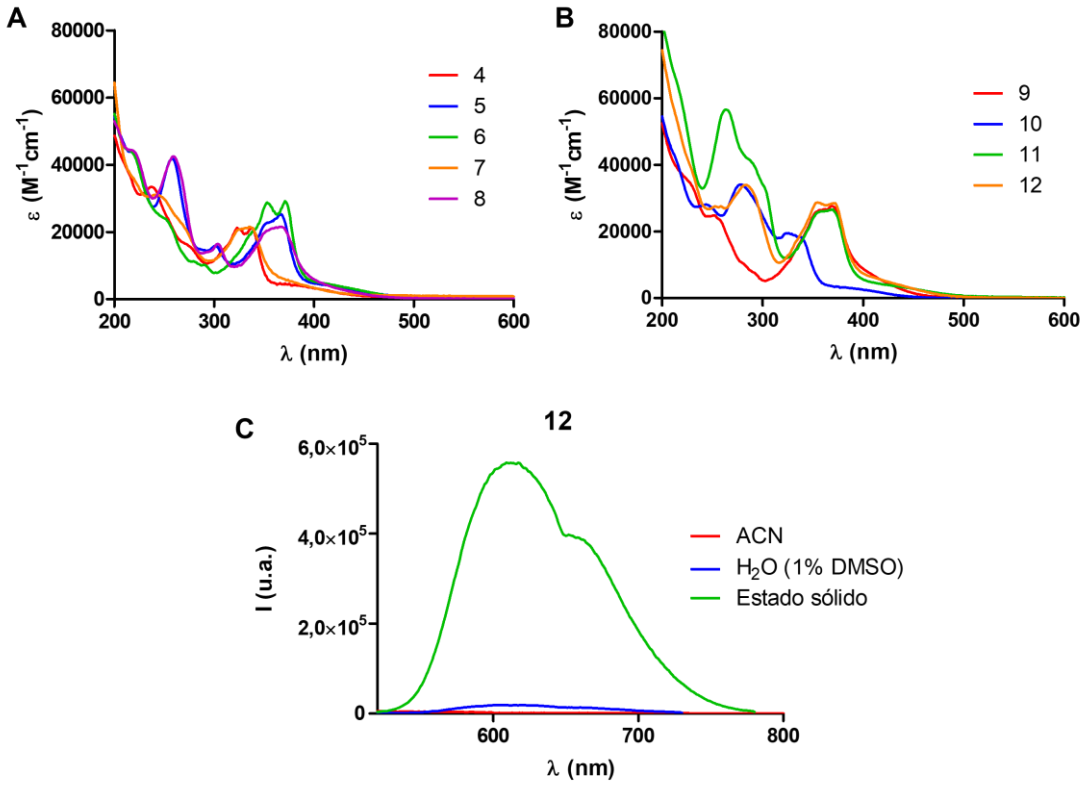


Figura 2.12. Espectro de absorción de los complejos (A) **4**–**8** y (B) **9**–**12** en acetonitrilo (10 µM) a t.a. (C) Espectro de emisión del complejo **12** en disolución de acetonitrilo y agua (1% DMSO) (10 µM) y en estado sólido.

Tabla 2.3. Longitudes de onda de absorción y emisión de los complejos **4**–**12** en acetonitrilo y agua (1% DMSO) en presencia de oxígeno, y en estado sólido.

	Acetonitrilo			Agua (1% DMSO)			Estado sólido	
Comp	**λ (Ɛ, $M^{-1}cm^{-1}$)**	**λ_{exc}**	**λ_{em}**	**λ (Ɛ, $M^{-1}cm^{-1}$)**	**λ_{exc}**	**λ_{em}**	**λ_{exc}**	**λ_{em}**
4	241 (32660), 280 (14220), 327 (20490), 342 (19080), 385 (4100)	330	-	275 (12600), 328 (17220), 338 (17050), 388 (2190)	330	590	370	570
5	263 (40850), 305 (16250), 360 (23610), 370 (23730), 413 (4200)	380	-	265 (26440), 307 (13130), 367 (16980), 380 (17420), 430 (4690)	380	630	400	620
6	256 (21870), 288 (10410), 357 (27550), 374 (27450), 417 (3770)	330	550	289 (7490), 366 (11680), 385 (11710), 433 (3770)	380	630	400	630
7	246 (32980), 328 (20960), 340 (20380), 383 (4800)	330	580	275 (18660), 329 (19180), 339 (19000), 384 (3600)	360	570	370	550
8	263 (40850), 307 (15180), 361 (21280), 372 (20780), 420 (3470)	370	630	262 (34660), 307 (12420), 358 (17000), 371 (16400), 422 (2730)	365	620	370	610
9	257 (23600), 361 (26050), 373 (26630), 427 (4730)	370	630	287 (9520), 358 (25220), 373 (26080), 422 (5270)	370	620	370	605
10	249 (27260), 281 (33810), 329 (19290), 342 (18790), 393 (2790)	320	520	282 (34590), 330 (18570), 340 (17540), 400 (2180)	370	600	370	560
11	265 (56450), 295 (37380), 359 (26020), 373 (25380), 431 (3660)	320	-	270 (39290), 295 (27150), 360 (18740), 373 (17890), 440 (2040)	370	620	370	620
12	259 (27500), 289 (32550), 359 (28150), 375 (26730), 439 (3710)	360	-	287 (28140), 358 (24700), 374 (24210), 437 (3370)	370	620	370	620

2.2.5. Estudios de estabilidad

Se registraron los espectros UV/Vis a distintos tiempos tanto en DMSO como en medio de cultivo RPMI (5% DMSO) (*Roswell Park Memorial Institute*) con el objetivo de comprobar si los compuestos son estables en dichos medios.

En el caso de los complejos **4**–**7** y **10**–**12** no se observan cambios en DMSO, mientras que **8** y **9** presentan un desplazamiento en sus bandas de absorción, siendo mucho más evidente en el primero de ellos (**Figura 2.13A**-**B** para **8** y **12** y **Figura A2.72** para todos). Con el fin de estudiar en mayor profundidad el comportamiento de estos dos últimos complejos, se registraron los espectros de ^{1}H-RMN en DMSO-d_6 a distintos tiempos. En la **Figura 2.13C** se observa cómo para **8** se produce la disociación parcial del ligando piridina con el tiempo, probablemente por sustitución de éste por el DMSO formando el solvatocomplejo. En cambio, **9** y **12** permanecen inalterados (**Figuras A2.73** y **A2.74** para **9** y **12**, respectivamente).

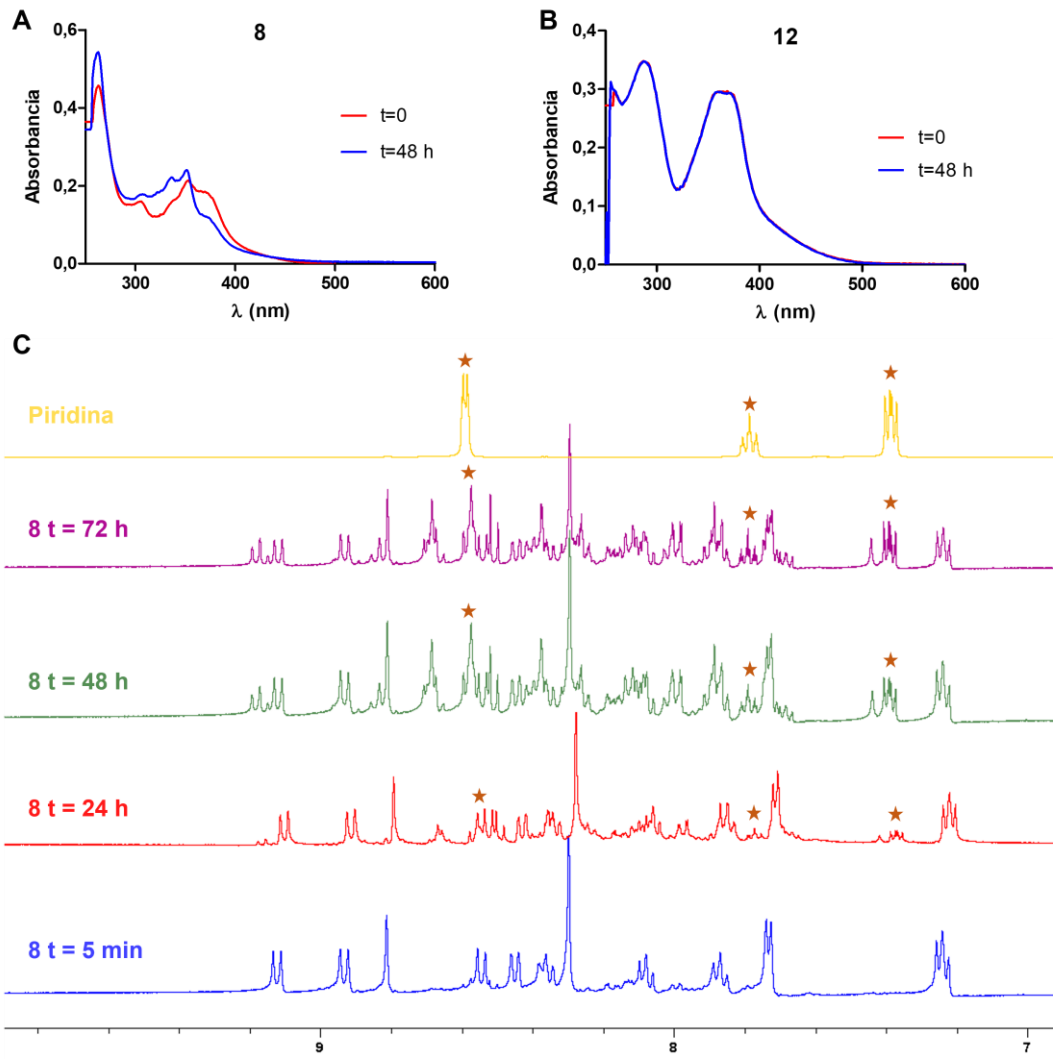


Figura 2.13. Evolución del espectro UV/Vis con el tiempo para los complejos (A) **8** (10 µM) y (B) **12** (10 µM), en DMSO a 37 ºC. (C) Evolución del espectro ^{1}H-RMN para **8** (1 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

A pesar de que los complejos **4**–**6** no muestran cambios con el tiempo en en DMSO por UV/Vis (**Figura A2.72**), se profundizó en la posibilidad de que se forme el solvatocomplejo por sustitución del ligando cloruro. Para ello se registraron los espectros ESI-MS por inserción directa de sus disoluciones en DMSO y, en los tres casos, se observa el aducto $[M\text{-}Cl+DMSO]^+$ (**Figuras A2.75**–**A2.77**), sugiriendo que, posiblemente, en DMSO el solvatocomplejo podría formarse instantáneamente por lo que no se detectan cambios con el tiempo en los espectros UV/Vis.

En la **Figura A2.78** se muestra el resultado del estudio de estabilidad en RPMI (5% DMSO). Los complejos **7** y **9**–**12** son estables, puesto que no se observaron desplazamientos en los máximos de absorción. Sin embargo, el resto (**4**–**6** y **8**) sí que muestran cambios con el tiempo. En el caso de los tres primeros, posiblemente sea debido a la formación de los solvatocomplejos mencionados anteriormente.

2.2.6. Estudio de hidrólisis

Las reacciones de acuación de los ligandos cloruros son comunes en los metalofármacos y a veces se consideran parte de la etapa de activación.[33] Además, se ha demostrado recientemente que algunos complejos del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N\text{^}N)(H_2O)]^{0/+}$ son muy citotóxicos.[2] Por este motivo, también se estudió el comportamiento de los clorocomplejos en presencia de agua, con el fin de evaluar si tiene lugar la hidrólisis del ligando cloruro. Para ello se estudió la evolución con el tiempo del espectro ^{1}H-RMN del complejo **4** en MeOD-d_4, ya que éste contiene agua. Como se observa en la **Figura 2.14**, a partir de los 10 min comienza a formarse el acuocomplejo y a las 24 h parece que se ha alcanzado el equilibrio. A las 72 h, la situación es la misma que a las 24 h, y tras la adición de ion cloruro hasta una concentración final 100 mM, se vuelve a observar una única especie, el clorocomplejo inicial.

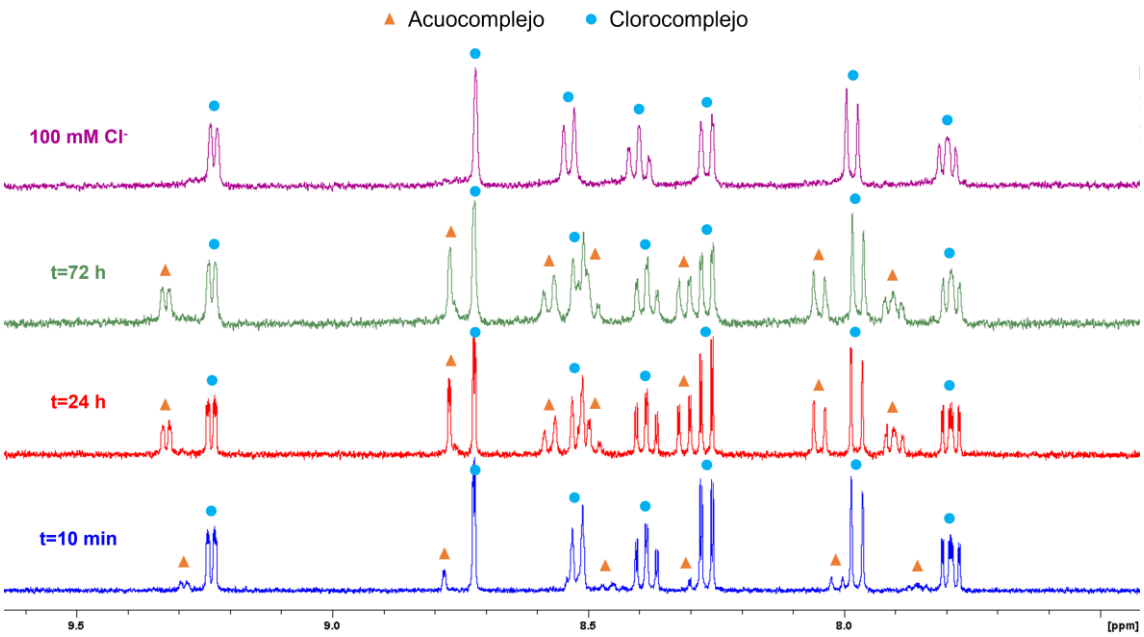


Figura 2.14. Estudio de hidrólisis del complejo **4** (1 mM) en MeOD-d_4 por ^{1}H-RMN, 400 MHz, a t.a.: tras 10 min (línea azul), 24 h (línea roja), 72 h (línea verde) y tras 72 h y la adición de Cl^- (100 mM) (línea morada).

2.3. Estudios biológicos

La evaluación del potencial como agentes antitumorales de los nuevos complejos de Re(I) descritos fue uno de los objetivos de este capítulo. Para ello, se realizaron tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. Los primeros los llevó a cabo Pezhman Ashoo, miembro de nuestro grupo de investigación, y los segundos fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Fernando Gandía de la Universidad de Murcia. Con el fin de resaltar la prometedora actividad anticancerígena de los compuestos descritos, a continuación, se resumen los resultados biológicos obtenidos.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos **4**–**12** y CDDP en las líneas tumorales de cáncer cervical (HeLa) y de cáncer de ovario (A2780), así como en una línea sana de riñón de mono (BGM), con el fin de determinar la selectividad de los complejos por las células cancerígenas. En la **Tabla 2.4** se recogen los resultados, y se puede observar cómo los complejos **10**–**12**, que tienen en común el ligando monodentado DMAP, presentan los menores valores de IC_{50}. Además, también exhiben los mejores factores de selectividad (FS, IC_{50} (línea BGM) / IC_{50} (línea A2780)), especialmente el complejo **12**.

Tabla 2.4. Valores de IC_{50} (μM) de los complejos sintetizados y cisplatino en células tumorales y sanas. Determinados por el ensayo con MTT tras 48 h de tratamiento.

$IC_{50,48h}$ (μM)[a]	HeLa	A2780	BGM	FS[b]
4	17,3 ± 1,1	7,3 ± 0,3	> 100	> 13,7
5	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,1	> 100	> 19,6
6	4,4 ± 0,3	5,1 ± 0,4	> 100	> 19,6
7	10,6 ± 0,6	2,0 ± 0,1	17,1 ± 1,0	8,6
8	4,2 ± 0,4	0,89 ± 0,07	10,5 ± 0,3	11,8
9	5,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	23,0 ± 8,6	19,2
10	9,1 ± 1,0	0,92 ± 0,08	48,6 ± 2,3	52,8
11	3,1 ± 0,2	0,49 ± 0,07	9,0 ± 0,4	18,4
12	1,9 ± 0,1	0,30 ± 0,03	11,3 ± 1,0	37,7
CDDP	23,3 ± 2,0	2,9 ± 0,4	6,8 ± 0,9	2,3

[a]Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. [b]El FS se define como IC_{50} (células sanas BGM) / IC_{50} (células tumorales A2780).

Por otro lado, se evaluó también la actividad antiproliferativa de los complejos **10**–**12** en esferoides 3D de células HeLa, ya que, en general, constituyen un modelo mejor que los cultivos celulares bidimensionales al reproducir más fielmente las condiciones de un tumor, presentando, por ejemplo, un centro hipóxico y una capa exterior oxigenada.[34] Todos ellos demostraron reducir el tamaño del esferoide con respecto al control (**Figura A2.79**). La citotoxicidad de **10**–**12** observada en los modelos 2D y 3D respalda el potencial de estos compuestos como prometedores candidatos para la terapia del cáncer. El potente efecto antiproliferativo observado para **12**, sobre todo en la línea A2780, sugiere que es capaz de inhibir eficazmente el crecimiento de células cancerígenas y por ello ha sido el compuesto elegido para estudiar en mayor profundidad.

Mediante un estudio de acumulación, se comprobó que los compuestos **10**–**12** penetran en el interior celular atravesando la membrana por una ruta dependiente de energía, asociada a menudo con transportadores específicos o procesos mediados por un receptor, asegurando una distribución eficiente y dirigida. Además, por microscopía confocal se observó que el complejo **12** se acumula en la mitocondria y se detectaron cambios morfológicos en las células que sugieren una muerte celular por piroptosis. Posteriormente, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se pudo comprobar cómo a diferencia del cisplatino, que provoca la muerte celular por apoptosis y da lugar a la formación de grandes burbujas que sobresalen de la membrana plasmática y a que la célula se hinche, el tratamiento con el complejo **12** provoca el aplanamiento del citoplasma, lo que constituye un rasgo comúnmente asociado a la piroptosis (**Figura A2.80**). A diferencia de la apoptosis, la piroptosis representa un modo de muerte celular que implica respuestas inflamatorias y características morfológicas distintas.[35]

Se llevó a cabo también un estudio para evaluar la habilidad del complejo **12** para generar especies reactivas de oxígeno en las células y los resultados mostraron que, tras el tratamiento con **12**, se produce un aumento de los niveles de ROS tanto en normoxia como en hipoxia. Estos fueron mayores en normoxia, sugiriendo que **12** induce un aumento de los niveles intracelulares de ROS de una forma dependiente de la cantidad de oxígeno presente, conduciendo a una muerte celular dependiente de ROS.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de dicho complejo de alterar el potencial de membrana mitocondrial, que presenta un papel crucial en la regulación de procesos celulares y su disrupción se asocia con la activación de mecanismos de muerte celular. Se observó que el complejo **12** disminuye los niveles del potencial de membrana, sugiriendo que tiene lugar una alteración de ésta e implicando, por tanto, a la disfunción mitocondrial en el mecanismo de acción antitumoral de **12**. Este proceso podría estar relacionado con la generación de ROS en el interior de las mitocondrias y la alteración de la integridad de la membrana mediada por la piroptosis.[36]

Finalmente, como se ha mencionado, el grupo de investigación del Prof. Dr. Fernando Gandía llevó a cabo estudios *in vivo* con el complejo **12**, empleando el modelo animal *Caenorhabditis elegans*. Mediante imágenes de microscopía de fluorescencia fue posible visualizar el complejo en el interior del sistema digestivo del animal, especialmente en el área de la faringe, lo que es indicativo de su ingestión y asimilación por parte del nematodo (**Figura A2.81**). Posteriormente, se evaluaron los efectos del complejo en el desarrollo del tumor en *C. elegans* en la cepa JK1466, que presenta una mutación que altera la transición de la mitosis a la meiosis de las células gonadales, provocando que estas se detengan en la mitosis, incapaces de diferenciarse, y se acumulen en la gónada formando tumores letales para el animal.[17,20,37] Sin embargo, el tratamiento con **12** fue capaz de reducir el tamaño del tumor un 34,6% (**Figura A2.82**) mientras que estudios recientes mostraron que el cisplatino es capaz de reducirlo un 48%.

Por otro lado, la cepa MT2124 de *C. elegans* tiene una mutación del gen necesario para el desarrollo de vulvas, de la espícula o de la progresión meiótica de la línea germinal. Por lo que dichos nematodos tienen hasta cuatro pseudovulvas ectópicas,[38] además de la vulva normal, que sobresalen en la cara ventral de los gusanos. El tratamiento con **12** redujo la incidencia del fenotipo multivulva (MT) hasta un 68,7% y el número de vulvas un 22% (**Figura A2.83C**), mientras que el cisplatino redujo la incidencia un 58,2% y el número de vulvas un 52% (**Figura A2.83B**). También se evaluaron los efectos de toxicidad de **12** y CDDP midiendo el tamaño y la etapa de desarrollo de la cepa MT2124 expuesta a distintas concentraciones de los complejos.

El CDDP resultó ser más tóxico que **12**, ya que a la misma concentración el primero redujo el tamaño del animal un 18%, mientras que **12** sólo lo redujo un 2%. Además, el cisplatino entorpeció el desarrollo de los nematodos, que no crecieron hasta la etapa de adulto joven, como ocurre normalmente en esas condiciones, careciendo de gónadas maduras, ovocitos y huevos fecundados. Con **12**, en cambio, sí lo hicieron (**Figura A2.84**). Estudios previos ya habían descrito que, tras exponerlos a cisplatino en condiciones similares el tamaño del animal disminuía un 75% y su progenie se veía afectada teniendo sólo un 10% de la cría esperada.[39]

Por todo ello, se deduce que **12** es tan efectivo como cisplatino en la reducción del crecimiento del tumor en ambas cepas de *C. elegans*, JK1466 y MT2124, con la ventaja de resultar menos tóxico y más selectivo, ya que no entorpeció el desarrollo del nematodo y la progenie, como sí ocurre con CDDP.

Por último, se evaluó la capacidad de generación de ROS *in vivo* en la cepa MT2124 de *C. elegans*, con el fin de dilucidar el mecanismo de acción que hay detrás del efecto antitumoral. Se detectó que, en las condiciones ensayadas, al tratar a los nematodos con **12**, los niveles totales de ROS en su interior duplicaron a los observados en el control. Por tanto, es probable que dicho complejo sea capaz de reducir la proliferación celular en *C. elegans* alterando el equilibrio redox de las células tumorales.

2.4. Resumen

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de una nueva serie de nueve complejos de Re(I) del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N\text{^}N)L]^{0/+}$, donde N^N es, en todos los casos, un ligando bidentado derivado de benzimidazol y L es el ligando monodentado cloruro, piridina o DMAP, para estudiar su posible actividad anticancerígena.

Se ha realizado un estudio de las propiedades fotofísicas de los nuevos complejos, demostrando que apenas presentan luminiscencia en disolución, pero emiten en estado sólido. A pesar de ello, el complejo **12** se pudo visualizar tanto en el interior celular como en los modelos animales utilizados. Se ha estudiado también la estabilidad en diferentes medios, obteniendo los mejores resultados con **10**–**12**.

Por otro lado, los estudios biológicos *in vitro* demostraron que todos los compuestos son citotóxicos en las líneas tumorales de cáncer de cérvix (HeLa) y de ovario (A2780), además de ser selectivos. Los mejores resultados se observaron en aquellos que presentan el ligando DMAP, que demostraron poseer también propiedades antiproliferativas en modelos de esferoides 3D de células HeLa.

El complejo **12** presentó los mejores resultados y se estudió en mayor profundidad. Se acumula en la mitocondria, provoca disrupción del potencial de membrana y generación de ROS. Su mecanismo de acción provoca la muerte celular por apoptosis y piroptosis. Además, los estudios *in vivo* en modelos animales de *C. elegans* demostraron que **12** reduce el tamaño del tumor (cepa JK1466), así como la incidencia en el número de vulvas (cepa MT2124) y, al contrario que el cisplatino, no resulta tóxico para los animales.

2.5. Bibliografía

(1) Marker, S. C.; King, A. P.; Swanda, R. V.; Vaughn, B.; Boros, E.; Qian, S.-B.; Wilson, J. J. Exploring Ovarian Cancer Cell Resistance to Rhenium Anticancer Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (32), 13391–13400. https://doi.org/10.1002/anie.202004883.

(2) Enslin, L. E.; Purkait, K.; Pozza, M. D.; Saubamea, B.; Mesdom, P.; Visser, H. G.; Gasser, G.; Schutte-Smith, M. Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes of 1,10-Phenanthroline Derivatives with Unexpectedly High Cytotoxicity. *Inorg. Chem.* **2023**, *62* (31), 12237–12251. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c00730.

(3) Karges, J.; Giardini, M. A.; Blacque, O.; Woodworth, B.; Siqueira-Neto, J. L.; Cohen, S. M. Enantioselective Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease with Rhenium(I) Picolinic Acid Complexes. *Chem. Sci.* **2023**, *14* (3), 711–720. https://doi.org/10.1039/D2SC05473F.

(4) Karges, J.; Kalaj, M.; Gembicky, M.; Cohen, S. M. ReI Tricarbonyl Complexes as Coordinate Covalent Inhibitors for the SARS-CoV-2 Main Cysteine Protease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (19), 10716–10723. https://doi.org/10.1002/anie.202016768.

(5) Bigham, N. P.; Wilson, J. J. Metal Coordination Complexes as Therapeutic Agents for Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (17), 9389–9409. https://doi.org/10.1021/jacs.3c01984.

(6) Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Targeting Mitochondria for Cancer Therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (6), 447–464. https://doi.org/10.1038/nrd3137.

(7) Wang, F.-X.; Liang, J.-H.; Zhang, H.; Wang, Z.-H.; Wan, Q.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Mitochondria-Accumulating Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes Induce Cell Death via Irreversible Oxidative Stress and Glutathione Metabolism Disturbance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (14), 13123–13133. https://doi.org/10.1021/acsami.9b01057.

(8) Konkankit, C. C.; King, A. P.; Knopf, K. M.; Southard, T. L.; Wilson, J. J. In Vivo Anticancer Activity of a Rhenium(I) Tricarbonyl Complex. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (5), 822–827. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00128.

(9) Pan, Z.-Y.; Tan, C.-P.; Rao, L.-S.; Zhang, H.; Zheng, Y.; Hao, L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Recoding the Cancer Epigenome by Intervening in Metabolism and Iron Homeostasis with Mitochondria-Targeted Rhenium(I) Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (42), 18755–18762. https://doi.org/10.1002/anie.202008624.

(10) Capper, M. S.; Packman, H.; Rehkämper, M. Rhenium-Based Complexes and in Vivo Testing: A Brief History. *ChemBioChem* **2020**, *21* (15), 2111–2115. https://doi.org/10.1002/cbic.202000117.

(11) Birsoy, K.; Sabatini, D. M.; Possemato, R. Untuning the Tumor Metabolic Machine: Targeting Cancer Metabolism: A Bedside Lesson. *Nat Med* **2012**, *18* (7), 1022–1023. https://doi.org/10.1038/nm.2870.

(12) Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15* (12), 3021–3038. https://doi.org/10.1089/ars.2011.3969.

(13) Zhang, X.; Fryknäs, M.; Hernlund, E.; Fayad, W.; De Milito, A.; Olofsson, M. H.; Gogvadze, V.; Dang, L.; Påhlman, S.; Schughart, L. A. K.; Rickardson, L.; D′Arcy, P.; Gullbo, J.; Nygren, P.; Larsson, R.; Linder, S. Induction of Mitochondrial Dysfunction as a Strategy for Targeting Tumour Cells in Metabolically Compromised Microenvironments. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 3295. https://doi.org/10.1038/ncomms4295.

(14) Sharma S., A.; N., V.; Kar, B.; Das, U.; Paira, P. Target-Specific Mononuclear and Binuclear Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes as Upcoming Anticancer Drugs. *RSC Adv.* **2022**, *12* (31), 20264–20295. https://doi.org/10.1039/D2RA03434D.

(15) Yellol, G. S.; Yellol, J. G.; Kenche, V. B.; Liu, X. M.; Barnham, K. J.; Donaire, A.; Janiak, C.; Ruiz, J. Synthesis of 2-Pyridyl-Benzimidazole Iridium(III), Ruthenium(II), and Platinum(II) Complexes. Study of the Activity as Inhibitors of Amyloid-β Aggregation and Neurotoxicity Evaluation. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (2), 470–475. https://doi.org/10.1021/ic502119b.

(16) Ortega-Forte, E.; Rovira, A.; López-Corrales, M.; Hernández-García, A.; Ballester, F. J.; Izquierdo-García, E.; Jordà-Redondo, M.; Bosch, M.; Nonell, S.; Santana, M. D.; Ruiz, J.; Marchán, V.; Gasser, G. A Near-Infrared Light-Activatable Ru(II)-Coumarin Photosensitizer Active under Hypoxic Conditions. *Chem. Sci.* **2023**, *14* (26), 7170–7184. https://doi.org/10.1039/D3SC01844J.

(17) Ortega-Forte, E.; Hernández-García, S.; Vigueras, G.; Henarejos-Escudero, P.; Cutillas, N.; Ruiz, J.; Gandía-Herrero, F. Potent Anticancer Activity of a Novel Iridium Metallodrug via Oncosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79* (10), 510. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04526-5.

(18) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhloufi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7310–7327. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01194.

(19) Novohradsky, V.; Zamora, A.; Gandioso, A.; Brabec, V.; Ruiz, J.; Marchán, V. Somatostatin Receptor-Targeted Organometallic Iridium(III) Complexes as Novel Theranostic Agents. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (40), 5523–5526. https://doi.org/10.1039/C7CC01946G.

(20) Ortega, E.; Ballester, F. J.; Hernández-García, A.; Hernández-García, S.; Guerrero-Rubio, M. A.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Gandía-Herrero, F.; Ruiz, J. Novel Organo-Osmium(II) Proteosynthesis Inhibitors Active against Human Ovarian Cancer Cells Reduce Gonad Tumor Growth in *Caenorhabditis Elegans*. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, *8* (1), 141–155. https://doi.org/10.1039/C9QI01704F.

(21) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Yellol, G.; Zajac, J.; Donaire, A.; Vigueras, G.; Novohradsky, V.; Janiak, C.; Brabec, V.; Ruiz, J. Highly Potent Extranuclear-Targeted Luminescent Iridium(III) Antitumor Agents Containing Benzimidazole-Based Ligands with a Handle for Functionalization. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (98), 14165–14168. https://doi.org/10.1039/C6CC07909A.

(22) Juris, A.; Campagna, S.; Bidd, I.; Lehn, J. M.; Ziessel, R. Synthesis and Photophysical and Electrochemical Properties of New Halotricarbonyl(Polypyridine)Rhenium(I) Complexes. *Inorg. Chem.* **1988**, *27* (22), 4007–4011. https://doi.org/10.1021/ic00295a022.

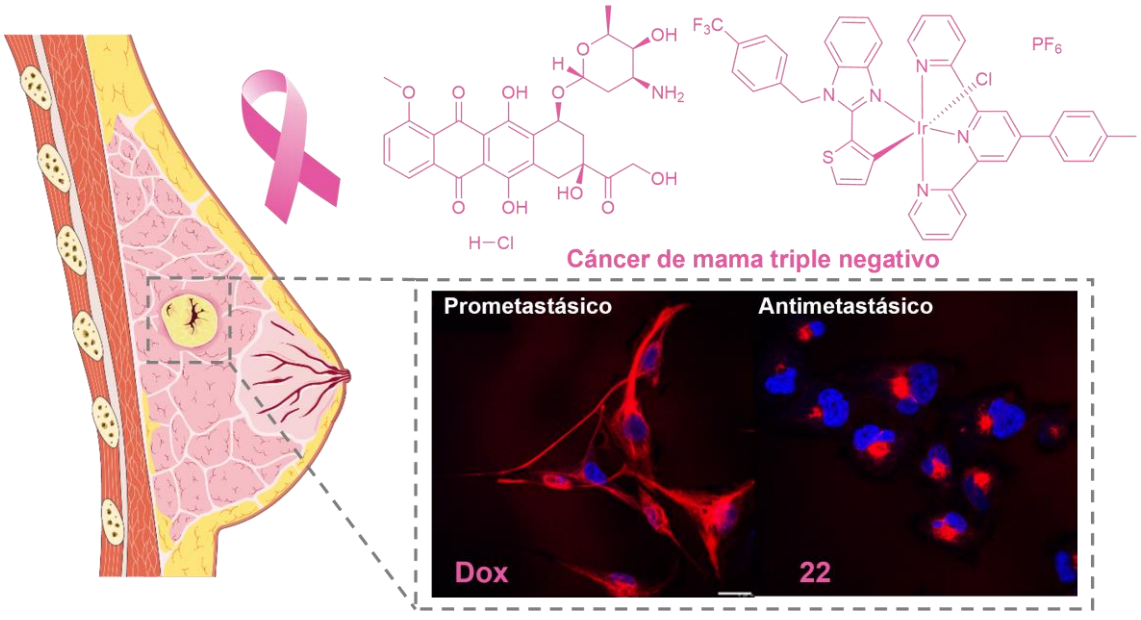
(23) Liu, Z.; Romero-Canelón, I.; Habtemariam, A.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Potent Half-Sandwich Iridium(III) Anticancer Complexes Containing C^N-Chelated and Pyridine Ligands. *Organometallics* **2014**, *33* (19), 5324–5333. https://doi.org/10.1021/om500644f.

(24) Lo, K. K.-W.; Tsang, K. H.-K.; Sze, K.-S. Utilization of the Highly Environment-Sensitive Emission Properties of Rhenium(I) Amidodipyridoquinoxaline Biotin Complexes in the Development of Biological Probes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (4), 1714–1722. https://doi.org/10.1021/ic051266f.

(25) Fredericks, S. M.; Luong, J. C.; Wrighton, M. S. Multiple Emissions from Rhenium(I) Complexes: Intraligand and Charge-Transfer Emission from Substituted Metal Carbonyl Cations. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (24), 7415–7417. https://doi.org/10.1021/ja00518a054.
(26) Leung, P. K.-K.; Lee, L. C.-C.; Ip, T. K.-Y.; Liu, H.-W.; Yiu, S.-M.; Lee, N. P.; Lo, K. K.-W. Luminescent Rhenium(ı) Perfluorobiphenyl Complexes as Site-Specific Labels for Peptides to Afford Photofunctional Bioconjugates. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (85), 11256–11259. https://doi.org/10.1039/D1CC04740J.
(27) Yang, X.-J.; Drepper, F.; Wu, B.; Sun, W.-H.; Haehnel, W.; Janiak, C. From Model Compounds to Protein Binding: Syntheses, Characterizations and Fluorescence Studies of $[Ru^{II}(Bipy)(Terpy)L]^{2+}$ Complexes (Bipy = 2,2′-Bipyridine; Terpy = 2,2′:6′,2″-Terpyridine; L = Imidazole, Pyrazole and Derivatives, Cytochrome c). *Dalton Trans.* **2005**, No. 2, 256–267. https://doi.org/10.1039/B414999H.
(28) Janiak, C. A Critical Account on π–π Stacking in Metal Complexes with Aromatic Nitrogen-Containing Ligands †. *Dalton Trans.* **2000**, *21*, 3885–3896. https://doi.org/10.1039/b003010o.
(29) Spek, A. L. A Multipurpose Crystallographic Tool. *Utrecht, The Netherlands* **2005**.
(30) Gonçalves, M. R.; Frin, K. P. M. Synthesis, Characterization, Photophysical and Electrochemical Properties of Rhenium(I) Tricarbonyl Diimine Complexes with Triphenylphosphine Ligand. *Polyhedron* **2017**, *132*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.029.
(31) Fernández-Moreira, V.; Gimeno, M. C. Heterobimetallic Complexes for Theranostic Applications. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (14), 3345–3353. https://doi.org/10.1002/chem.201705335.
(32) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (4), 855–866. https://doi.org/10.1021/cb500078u.
(33) M, M.; Gadre, S.; Chhatar, S.; Chakraborty, G.; Ahmed, N.; Patra, C.; Patra, M. Potent Ruthenium–Ferrocene Bimetallic Antitumor Antiangiogenic Agent That Circumvents Platinum Resistance: From Synthesis and Mechanistic Studies to *In Vivo* Evaluation in Zebrafish. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (24), 16353–16371. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01174.
(34) Nunes, A. S.; Barros, A. S.; Costa, E. C.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. 3D Tumor Spheroids as in Vitro Models to Mimic in Vivo Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs. *Biotechnology and Bioengineering* **2019**, *116* (1), 206–226. https://doi.org/10.1002/bit.26845.
(35) Zhang, Y.; Doan, B.-T.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers as Inducers of Regulated Cell Death Mechanisms. *Chem. Rev.* **2023**, *123* (16), 10135–10155. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00161.
(36) Li, Q.; Shi, N.; Cai, C.; Zhang, M.; He, J.; Tan, Y.; Fu, W. The Role of Mitochondria in Pyroptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 630771. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.630771.
(37) Kirienko, N. V.; Mani, K.; Fay, D. S. Cancer Models in *Caenorhabditis Elegans*. *Developmental Dynamics* **2010**, *239* (5), 1413–1448. https://doi.org/10.1002/dvdy.22247.
(38) Kobet, R. A.; Pan, X.; Zhang, B.; Pak, S. C.; Asch, A. S.; Lee, M.-H. *Caenorhabditis Elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification. *Biomol Ther (Seoul)* **2014**, *22* (5), 371–383. https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.084.
(39) García-Rodríguez, F. J.; Martínez-Fernández, C.; Brena, D.; Kukhtar, D.; Serrat, X.; Nadal, E.; Boxem, M.; Honnen, S.; Miranda-Vizuete, A.; Villanueva, A.; Cerón, J. Genetic and Cellular Sensitivity of *Caenorhabditis Elegans* to the Chemotherapeutic Agent Cisplatin. *Dis Model Mech* **2018**, *11* (6), dmm033506. https://doi.org/10.1242/dmm.033506.

Capítulo 3

Complejos de Ir(III) con ligando derivado de terpiridina: agentes antiproliferativos y antimetastásicos frente a cáncer de mama triple negativo



Los estudios biológicos realizados en este capítulo los llevó a cabo el grupo dirigido por el Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa.

3.1. Introducción

A pesar del gran potencial que tienen los fármacos de platino en múltiples tratamientos quimioterapéuticos, no suelen ser activos frente a las metástasis tumorales, incluso las terapias de combinación tienen un éxito muy limitado en estos casos. La consecuencia final es que más del 90% de las muertes por cáncer se deben a procesos metastásicos.[1] Por lo tanto, resulta de enorme interés encontrar fármacos con actividad antimetastásica en lugar de sólo dirigidos a tumores primarios.[1,2]

Por otro lado, aunque se han descrito innumerables complejos metálicos con actividad anticancerígena, sus propiedades antimetastásicas no se han investigado en profundidad. Si bien hay algunos ejemplos de compuestos que contienen cobalto, cobre, oro, gadolinio, níquel, paladio, platino, rutenio y vanadio.[2,3] Cabe destacar que dos compuestos de rutenio, NAMI-A y RAPTA-C (**Figura 3.1**), fueron reconocidos y ampliamente estudiados por sus propiedades antimetastásicas *in vitro* e *in vivo*. Sorprendentemente, la actividad antiproliferativa de NAMI-A en células cancerígenas resultó ser mucho peor que la del cisplatino, pero es capaz de inhibir las principales etapas del proceso metastásico (diseminación del tumor primario, migración, invasión y readhesión).

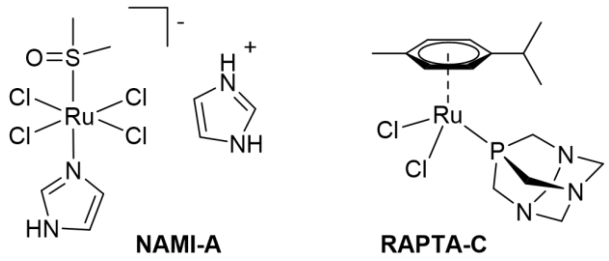


Figura 3.1. Estructura de los complejos de Ru(II) NAMI-A y RAPTA-C.

Por estos motivos y dado que recientemente se han publicado artículos que describen el potencial de algunos complejos de iridio en este campo,[4–8] nos propusimos la búsqueda de compuestos de Ir(III) que presentasen actividad antiproliferativa y antimetastásica como estrategia frente a neoplasias con potencial metastásico.

Uno de los cánceres donde la metástasis es responsable de la mayor parte de las muertes es el cáncer de mama,[9,10] particularmente el triple negativo (TNBC), un subtipo muy agresivo y con una elevada tasa de mortalidad. Por otro lado, actualmente, uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivo para tratar el cáncer de mama es la doxorrubicina.[11] Sin embargo, aunque es potente, presenta múltiples efectos secundarios como cardiotoxicidad, mielosupresión y eritrodisestesia palmar y plantar.[12–14] Además, los datos clínicos demuestran que las pacientes tratadas, incluso con una dosis baja de este fármaco, presentan una menor supervivencia libre de la progresión

del tumor y una menor supervivencia global.[15] Por tanto, el uso de este agente en pacientes con cáncer de mama, por un lado mata las células cancerígenas primarias pero, por otro lado, promueve la metástasis.[16] Los nuevos quimioterapéuticos capaces de tratar de manera efectiva el TNBC deberían inhibir el proceso metastásico y, al mismo tiempo, eliminar las células cancerígenas primarias.

En el presente capítulo se describe la síntesis y caracterización de una nueva serie de complejos del tipo $[Ir(ttpy)(C\hat{}N)Cl]^+$, donde "ttpy" es 4′-(*p*-tolil)-2,2′:6′,2″-terpiridina y C^N representa a diferentes ligandos de tipo C,N-dadores con una estructura derivada de benzimidazol con diferentes sustituyentes en el átomo de N: *p*-(trifluorometil)bencilo, metilo o butilo. Además, uno de ellos contiene un grupo éster que permitirá su futura funcionalización (**Figura 3.2**). Con la incorporación de un ligando tridentado pretendimos evitar la quiralidad que presentan muchos complejos con ligandos bidentados,[17] lo que puede originar efectos secundarios imprevistos. Todos los compuestos se estudiaron frente a distintas líneas de cáncer de mama, centrando el interés en la TNBC y comparando la actividad antiproliferativa y antimetastásica de los complejos sintetizados con los resultados obtenidos para la doxorrubicina.

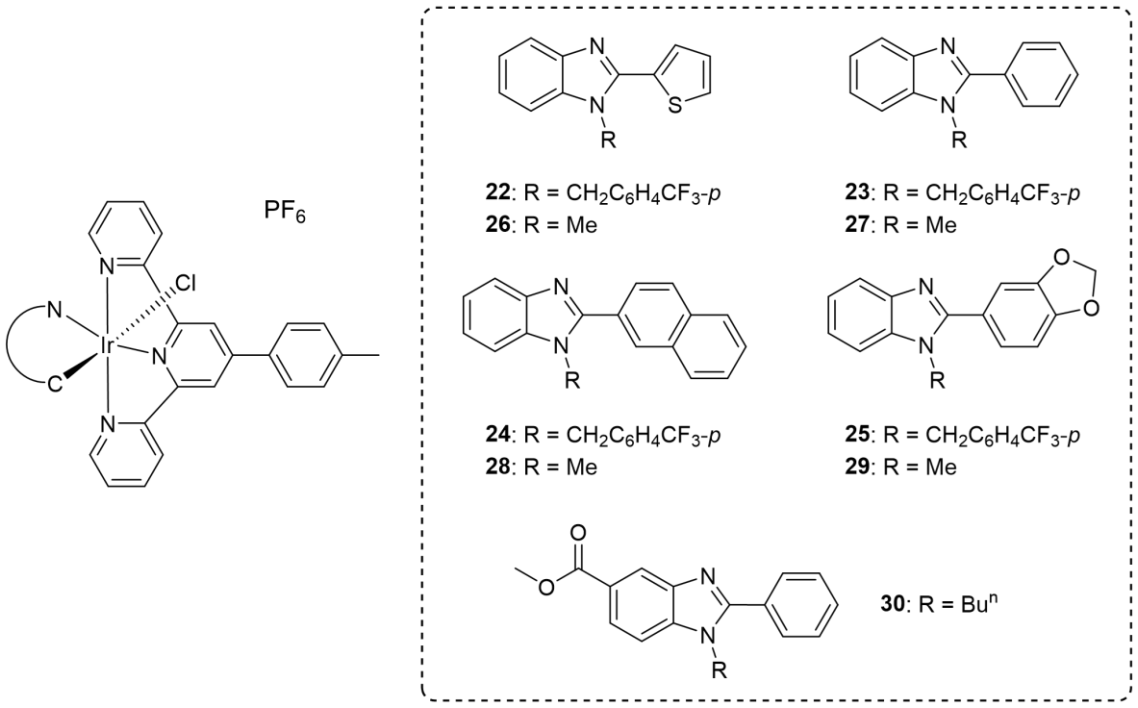


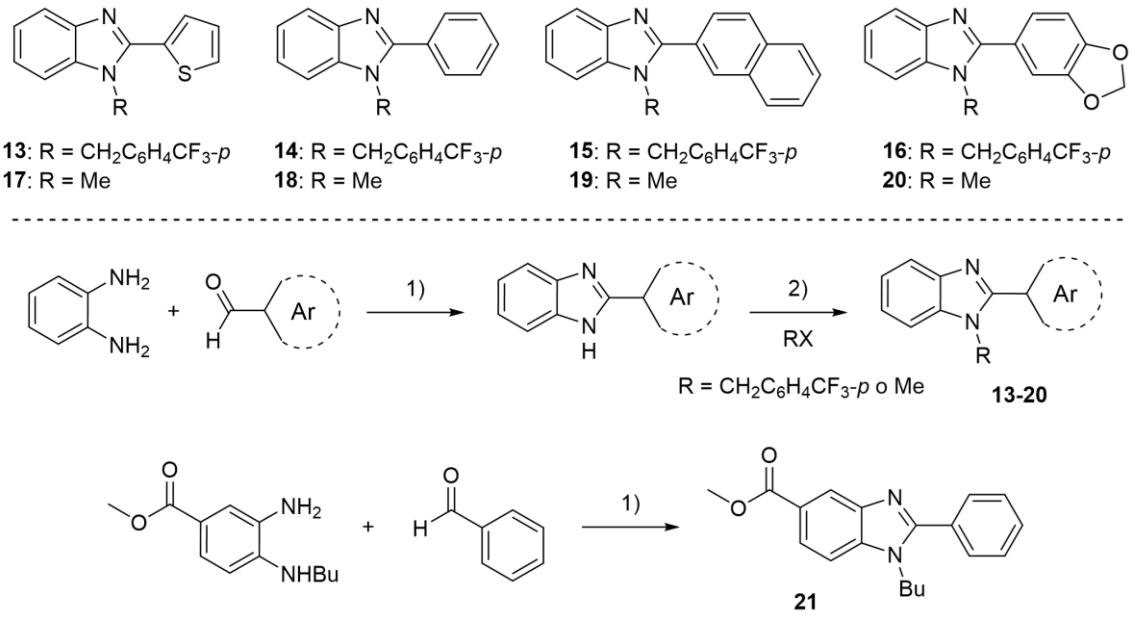
Figura 3.2. Estructura general de los nuevos compuestos sintetizados.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Síntesis

Síntesis de proligandos HC^N

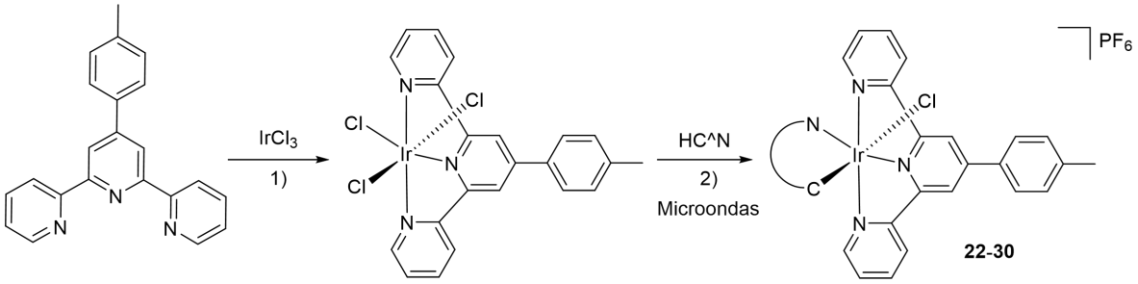
La síntesis de los proligandos se llevó a cabo siguiendo protocolos descritos en la bibliografía (**Esquema 3.1**).[18,19] Los compuestos **13**–**20** se obtuvieron en dos etapas. En primer lugar, se preparó el precursor, mediante una reacción de condensación entre la *o*-fenilendiamina y el aldehído correspondiente en una mezcla de agua:etanol (1:1, v:v) en presencia de $NaHSO_3$ a 80 ºC durante 18 h. Posteriormente, la reacción entre el 2-(aril)benzimidazol, obtenido en la etapa anterior, y el haluro correspondiente (MeI o bromuro de 4-(triflurometil)bencilo) en acetonitrilo y en presencia de Cs_2CO_3 durante 24 h a 45 ºC, conduce a **13**–**20**. Por otro lado, la síntesis de **21** se realizó por condensación de la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo) previamente sintetizada (**Esquema E2.1**, sección experimental) con benzaldehído.[20]



Esquema 3.1. Síntesis de los proligandos HC^N de tipo benzimidazol. Condiciones de reacción: (1) H_2O:EtOH (1:1, v:v), $NaHSO_3$, 80 ºC, 18 h; (2) ACN, Cs_2CO_3, 45 ºC, 24 h.

Síntesis de los complejos metálicos

Los complejos se prepararon mediante procedimientos descritos previamente en la bibliografía con pequeñas modificaciones.[21,22] Inicialmente, $IrCl_3$ se hizo reaccionar con el ligando terdentado, 4′-(*p*-tolil)-2,2′:6′,2″-terpiridina, en etilenglicol a 180 ºC durante 25 min en atmósfera de N_2 y, a continuación, la reacción de éste con el proligando correspondiente (**13**–**21**), en etilenglicol a 240 ºC durante 12 min y en presencia de KPF_6, en un microondas de reacción, conduce a los complejos **22**–**30** (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2. Síntesis de los complejos **22**–**30**. Condiciones de reacción: (1) Etilenglicol, 180 ºC, 25 min, atm. N_2; (2) Etilenglicol, KPF_6, 240 ºC, 12 min.

3.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos

Los nuevos compuestos sintetizados se caracterizaron mediante técnicas de: análisis elemental, ESI-MS, HPLC/MS y ^{19}F-RMN, ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y espectros bidimensionales de RMN.

Espectroscopia de RMN

Las señales de los espectros de RMN de los nuevos compuestos fueron asignadas con ayuda de bidimensionales [^{1}H-^{1}H]-COSY, [^{1}H-^{13}C]-HSQC y [^{1}H-^{13}C]-HMBC. Todos los espectros de RMN se encuentran recogidos en las **Figuras A3.1–A3.66** del Anexo II, así como los desplazamientos químicos en las **Tablas A3.1–A3.4**. En la **Figura 3.3** se muestra la numeración empleada en la asignación de las señales.

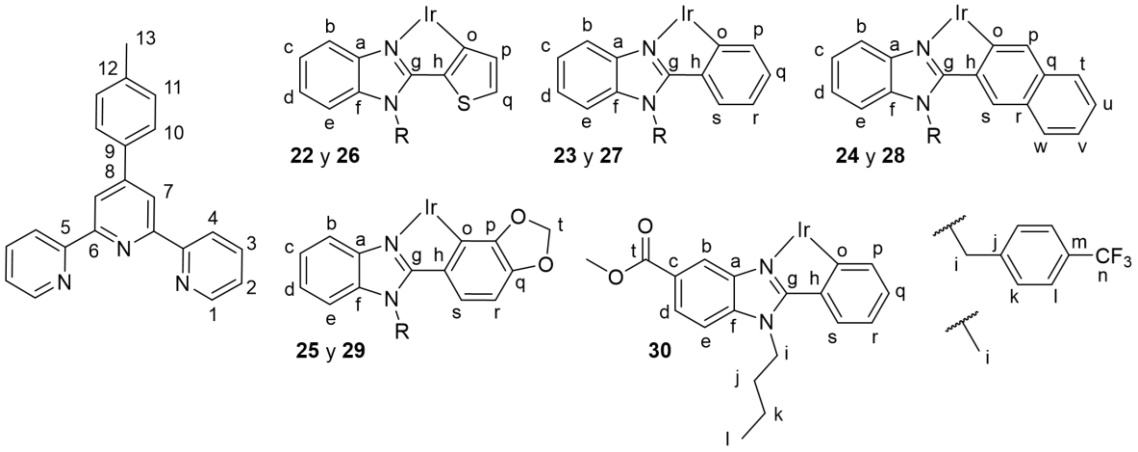


Figura 3.3. Numeración empleada en la asignación de señales de los espectros de RMN.

Dado que el proligando **16** se describe aquí por primera vez, también se ha llevado a cabo su caracterización completa. Su espectro ^{1}H-RMN (**Figura A3.1**) presenta las siguientes señales características: los protones $H_{b\text{-}e}$, situados en la región aromática del espectro entre δ 7,86–7,13 ppm; las señales de H_s y H_r, localizadas a δ 7,09 y 6,86 ppm, respectivamente; el CH_2 del grupo dioxolano (H_t) a δ 6,03 ppm. También se observan las señales propias del sustituyente 4-(triflurometil)bencilo: H_i a δ 5,50 ppm, H_l y H_k a δ 7,60 y 7,21 ppm, respectivamente.

Por otro lado, el ^{1}H-RMN en DMSO-d_6 de los complejos metálicos muestra en todos los casos, los protones aromáticos localizados en la región δ 6,00–9,50 ppm; el grupo metilo perteneciente al ligando terdentado (H_{13}), que se observa a δ 2,50 ppm en el ligando libre, se encuentra solapado con la señal del DMSO-d_6. Para mayor claridad, en la **Figura 3.4** se presentan sólo las resonancias aromáticas correspondientes al ligando N^N^N ($H_{1\text{-}11}$) localizadas entre δ 9,30–7,50 ppm y que son muy similares en todos los complejos.

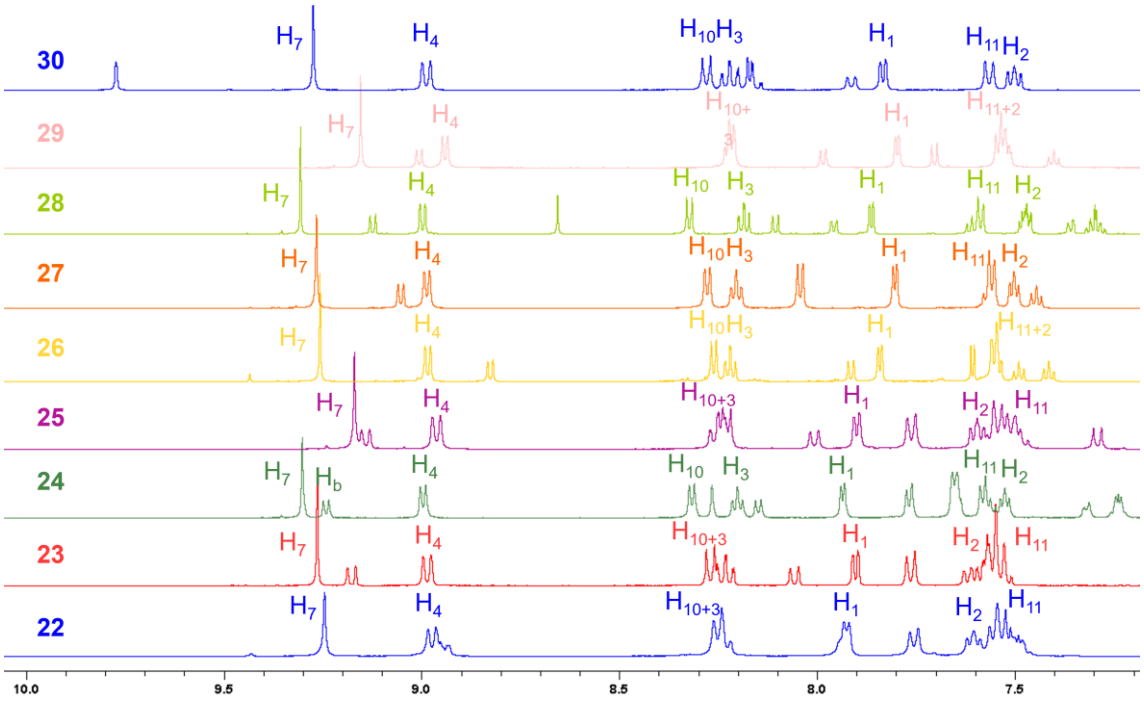


Figura 3.4. Ampliación zona aromática de los espectros ^{1}H-RMN de todos los complejos con el fin de estudiar las señales $H_{1\text{-}11}$ (el resto se han omitido por claridad), en DMSO-d_6, a t.a., 600 MHz.

Otro grupo de señales comunes a todos los complejos son las aromáticas $H_{b\text{-}e}$, pertenecientes al núcleo de benzimidazol del ligando C^N (**Figura 3.5**). Los desplazamientos observados son muy similares en **22**–**29**, pero en el caso de **30**, los protones H_b y H_d, que se encuentran en posición orto con el grupo éster, se ven afectados desplazándose a campo más bajo por el desapantallamiento que sufren.

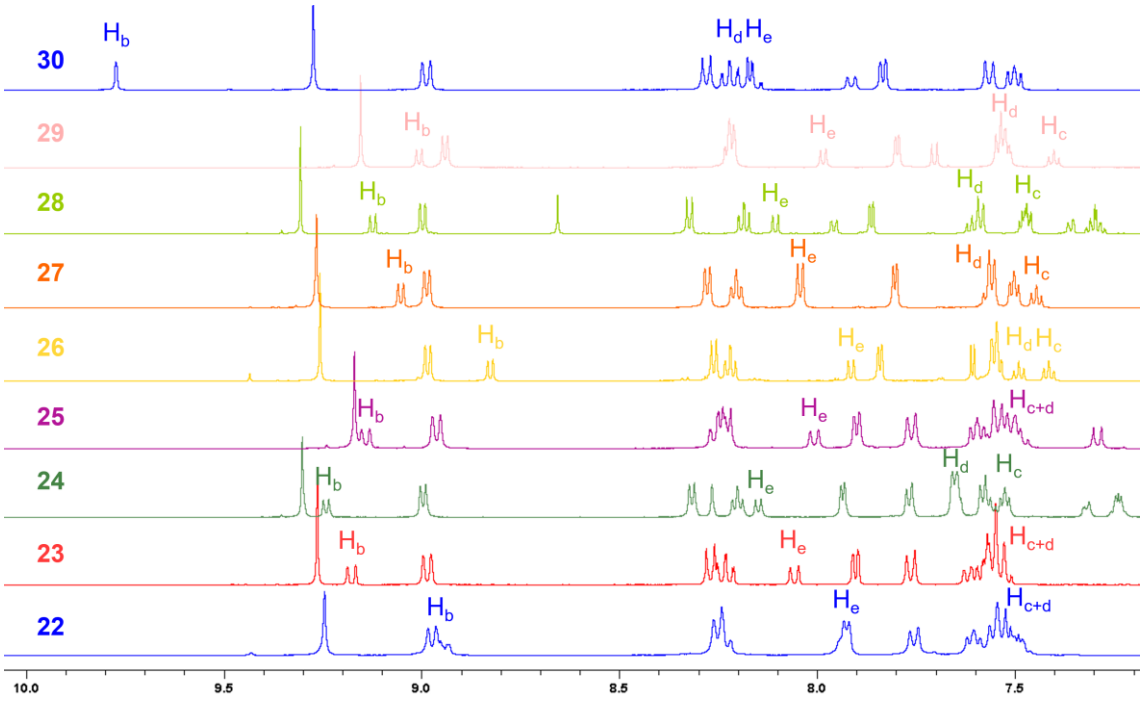


Figura 3.5. Ampliación zona aromática de los espectros ^{1}H-RMN de todos los complejos con el fin de estudiar las señales $H_{b\text{-}e}$ (el resto se han omitido por claridad), en DMSO-d_6, a t.a., 600 MHz.

En cuanto a los bencilderivados (complejos **22**–**25**), muestran un singlete debido al CH_2 (H_i) correspondiente al grupo bencilo entre δ 6,55–6,16 ppm y los protones aromáticos de dicho grupo, H_k y H_l, a δ 7,65–7,46 y 7,76 ppm, respectivamente (**Figura 3.6A** para el complejo **23**). Para los metilderivados, **26**–**29**, el singlete correspondiente al grupo metilo (H_i) se localiza entre δ 4,62–4,29 ppm (**Figura 3.6B** para **28**). El complejo **30** presenta el singlete del éster a δ 3,86 ppm (H_{OMe}) y las cuatro señales del grupo butilo: un triplete a δ 4,95 ppm (H_i), dos multipletes a δ 2,00 y 1,58 ppm (H_j y H_k, respectivamente) y un triplete a δ 0,99 ppm (H_l) (**Figura 3.6C** para **30**).

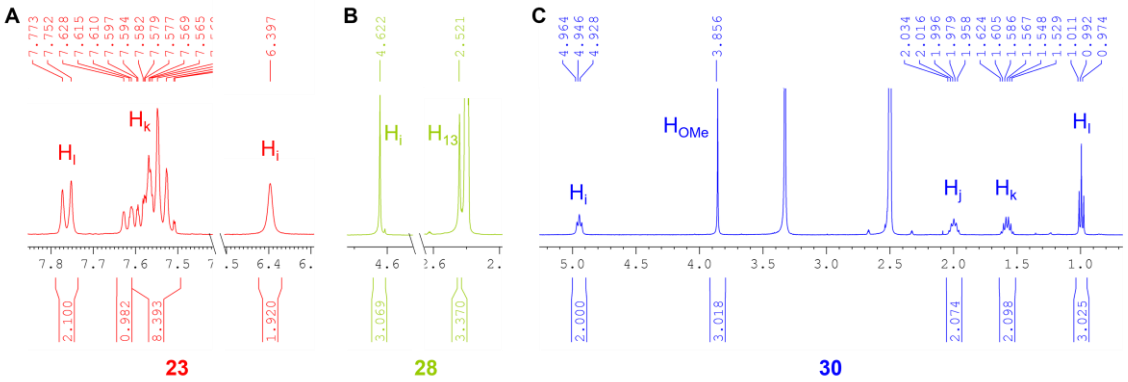


Figura 3.6. Señales del ^{1}H-RMN para los distintos sustituyentes del N del benzimidazol: (A) Protones H_l, H_k y H_i del complejo **23**; (B) Protones H_i y H_{13} del complejo **28**; (C) Protones H_i, H_{OMe}, H_j, H_k y H_l del complejo **30**.

Por último, también se observan las señales correspondientes a los diferentes sustituyentes unidos al benzimidazol, $H_{p\text{-}w}$ (**Figura 3.7**). Como se aprecia en dicha figura, los desplazamientos son muy similares para los complejos equivalentes: **22** y **26**, **23** y **27**, **24** y **28**, y **25** y **29**. Cabe destacar que, al comparar las distintas parejas de complejos, el protón H_s está más desapantallado cuando el ligando C^N presenta el grupo metilo en lugar del *p*-(trifluorometil)bencilo, posiblemente debido a un apantallamiento por la cercanía de H_s con este grupo bencilo más voluminoso. Para **30**, las señales $H_{p\text{-}s}$ se asemejan a las observadas para **23** y **27**, ya que los tres presentan el mismo núcleo de 2-(fenil)benzimidazol y, en este caso, H_s se observa también más desapantallado que en **23**.

En el caso de los complejos **25** y **29**, gracias a la asignación, es posible conocer la orientación del sustituyente arilo del benzimidazol. Se puede confirmar que el ligando se une al metal a través del C_o y no a través del C_s, ya que existe un acoplamiento entre los protones H_s y H_r que, de no ser así, H_o y H_r aparecerían como singletes y no se acoplarían a ningún otro.

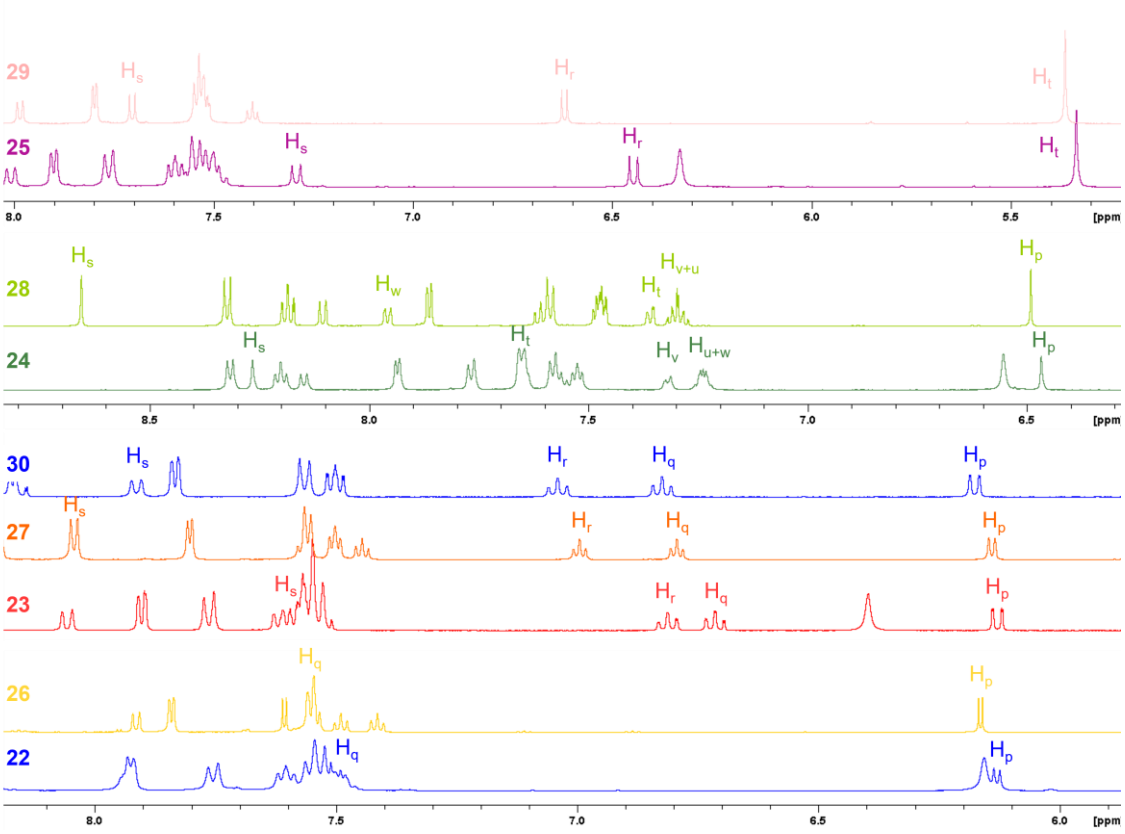


Figura 3.7. Ampliación zona aromática de los espectros ^{1}H-RMN de los distintos pares de complejos con el fin de estudiar las señales $H_{p\text{-}w}$, en DMSO-d_6, a t.a., 600 MHz.

Como se ha mencionado anteriormente, se han registrado también los espectros de ^{13}C-RMN. En las **Tablas A3.3** y **A3.4** del Anexo II se recogen todas las señales de los distintos compuestos.

El proligando **16** presenta, al igual que en los espectros ^{1}H-RMN algunas señales características: el carbono C_g, que se encuentra más desapantallado, a δ 153,9 ppm; los $C_{a\text{-}f}$ a δ 143,2–110,2 ppm; las señales de C_s y C_r, localizadas a δ 123,5 y 108,8 ppm, respectivamente; el CH_2 del grupo dioxolano (C_t) a δ 101,7 ppm; y los carbonos cuaternarios C_o, C_p y C_q a δ 109,7, 148,3 y 149,4 ppm, respectivamente. Además, se observan las señales correspondientes al sustituyente 4-(triflurometil)bencilo: C_i (δ 48,1 ppm), C_l (δ 126,3 ppm) y C_k (δ 126,4 ppm).

Por otro lado, los desplazamientos del ligando N^N^N ($C_{1\text{-}13}$ son prácticamente idénticos en todos los complejos (**Figura A3.67**). Igual ocurre con los carbonos aromáticos del núcleo de bezimidazol de los ligandos C^N, $C_{a\text{-}g}$ (**Figura A3.68**), excepto para **30** donde los carbonos $C_{b\text{-}d}$ se encuentran más desapantallados por la presencia del grupo éster. Cabe destacar que, en todos los casos, el C_g se localiza a campo bajo (δ 160 ppm) debido a que se encuentra enlazado directamente a los dos átomos de nitrógeno del benzimidazol.

Se observan también las señales de los sustituyentes *p*-(trifluorometil)bencilo o metilo de los ligandos C^N (**Figura A3.69**). Para los complejos **22**–**25**, el CH_2 (C_i) del grupo bencilo, se observa a δ 47,2 ppm y los aromáticos a δ 140,7 (C_j), 127,0 (C_k), 125,8 (C_l), 128,4 (C_m) y 122,8 (C_n) ppm (**Figura A3.69A** para **23**). Para **26**–**29** el grupo metilo (C_i) se localiza a δ 32,0 ppm (**Figura A3.69B** para **28**) y **30** presenta los carbonos del grupo éster, C_t y C_{OMe}, a δ 166,4 y 52,3 ppm, respectivamente. Además, se localizan también las señales del grupo butilo: C_i a δ 44,8 ppm, C_j a δ 31,4 ppm, C_k a δ 19,5 ppm y C_l a δ 13,9 ppm (**Figura A3.69C**).

Por último, para los carbonos $C_{o\text{-}w}$ correspondientes a los distintos ligandos C^N (**Figura A3.70**), apenas se aprecia variación al sustituir el metilo por el *p*-(trifluorometil)bencilo entre complejos similares, siendo los desplazamientos químicos prácticamente idénticos. En el caso del carbono C_h ocurre exactamente lo mismo, se observan señales muy parecidas cuando se mantiene el sustituyente del benzimidazol.

Además de los ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN, se han registrado también los espectros de ^{19}F-RMN para algunos de los complejos. En todos los casos F_{PF6} se observa como un doblete a δ 73,0 ppm y para los compuestos que contienen el sustituyente *p*-(trifluorometil)bencilo, el F_{CF3} aparece como singlete a δ 63,1 ppm, con una relación de las integrales F_{PF6}:F_{CF3} 2:1, lo que ratifica la pureza de los nuevos complejos (**Figuras**

A3.13, **A3.20**, **A3.27**, **A3.34**, **A3.47** y **A3.66** para **22**, **23**, **24**, **25**, **27** y **30**, respectivamente).

Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

Para completar la caracterización de los nuevos compuestos sintetizados se registraron sus espectros de masas tanto por inserción directa mediante ionización por electrospray (ESI-MS) (**Figuras A3.71**–**A3.80**), como por cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS).

El proligando **16** se caracterizó usando ESI-MS por inserción directa, obteniendo un espectro correspondiente al aducto $[M+H]^+$, cuyo perfil isotópico concuerda con el teórico (**Figura A3.71** y **Tabla 3.1**). Para los complejos, además de esta técnica, se empleó el HPLC/MS. En la **Figura 3.8** se muestran los distintos cromatogramas registrados en modo isocrático en ACN:MeOH (0,1% ácido fórmico) (1:1, v:v), que junto con el análisis elemental (**Tabla 3.1**), confirmaron que la pureza de los complejos era mayor del 96%, mostrando un único pico cuyo espectro de masas coincide con el calculado teóricamente para el ion molecular $[M-PF_6]^+$ (**Figura A3.81** y **Tabla 3.1**). El perfil isotópico obtenido coincide con el teórico en todos los casos.

Tabla 3.1. Resultados HPLC/MS y análisis elemental de los nuevos compuestos.

Compuesto	t_R (min)	Fragmento	(m/z)[a]	%C[a]	%H[a]	%N[a]	%S[a]
16	-	$[M+H]^+$	397,1154 (397,1158)	66,81 (66,67)	3,80 (3,81)	7,06 (7,07)	-
22	0,411	$[M-PF_6]^+$	908,1434 (908,1414)	46,79 (46,75)	2,84 (2,78)	6,63 (6,65)	3,19 (304)
23	0,429	$[M-PF_6]^+$	902,1879 (902,1849)	49,57 (49,31)	2,96 (2,98)	6,52 (6,69)	-
24	0,441	$[M-PF_6]^+$	952,2016 (952,2006)	51,38 (51,44)	2,91 (3,03)	6,28 (6,38)	-
25	0,439	$[M-PF_6]^+$	946,1771 (946,1748)	48,57 (48,42)	3,09 (2,96)	6,27 (6,42)	-
26	0,415	$[M-PF_6]^+$	764,1227 (764,1227)	45,08 (44,91)	2,91 (2,88)	7,58 (7,70)	3,62 (3,53)
27	0,436	$[M-PF_6]^+$	758,1664 (758,1663)	47,82 (47,87)	3,36 (3,22)	7,78 (7,75)	-
28	0,409	$[M-PF_6]^+$	808,1829 (808,1819)	50,46 (50,40)	3,18 (3,17)	7,23 (7,35)	-
29	0,433	$[M-PF_6]^+$	802,1559 (802,156)	46,92 (46,91)	3,02 (2,98)	7,40 (7,39)	-
30	0,446	$[M-PF_6]^+$	858,2172 (858,2186)	49,21 (49,08)	3,57 (3,62)	6,97 (6,98)	-

[a]Valores teóricos entre paréntesis.



Figura 3.8. Cromatograma de los complejos sintetizados disueltos en DMSO. Registrados en modo isocrático en ACN:MeOH (0,1% ácido fórmico) (1:1, v:v), λ= 310 nm.

3.2.3. Propiedades fotofísicas

Se ha llevado a cabo un estudio de las propiedades fotofísicas de todos los complejos sintetizados. Para ello se registraron sus espectros de absorción UV/Vis y emisión en acetonitrilo y en agua (1% DMSO). Además, se estudió en mayor profundidad la luminiscencia en acetonitrilo mediante la medida del tiempo de vida media y del rendimiento cuántico de emisión.

En la **Figura 3.9** se muestran los espectros de absorción y emisión en acetonitrilo. Todos los complejos presentan bandas intensas de elevada energía en el rango de 250–350 nm debidas a las transiciones electrónicas π−π* localizadas en los ligandos ciclometalado y terpiridina. La banda más ancha a 350–430 nm se puede

atribuir a las transiciones de transferencia de carga metal-ligando (MLCT) y de transferencia de carga ligando-ligando (LLCT). Por otro lado, los hombros de débil absorción que se localizan a ~450 nm se deben a las transiciones prohibidas por la regla de spin ^{3}MLCT/LLCT, consecuencia del acoplamiento spin-órbita del átomo pesado de Ir(III) (ζ = 3909 cm^{-1}).[23] La naturaleza triplete de dichos estados excitados hace que sean apropiados para bioimagen y terapia fotodinámica.[24] Como se puede observar, las modificaciones estructurales del ligando C^N afectan moderadamente a los espectros de absorción UV/Vis en ambos medios. En la **Figura A3.82** se recogen los espectros de absorción UV/Vis de todos los complejos en agua (1% DMSO).

Cabe destacar que, al excitar a 405 nm, los complejos emiten en las regiones que van del amarillo al rojo en acetonitrilo y en agua (1% DMSO) (**Figura 3.9** y **Figura A3.82**, respectivamente). Los complejos **22** y **26** presentan las mayores longitudes de onda de emisión en acetonitrilo, seguramente debido a la presencia del grupo tiofen-2-ilo en el ligando C^N.

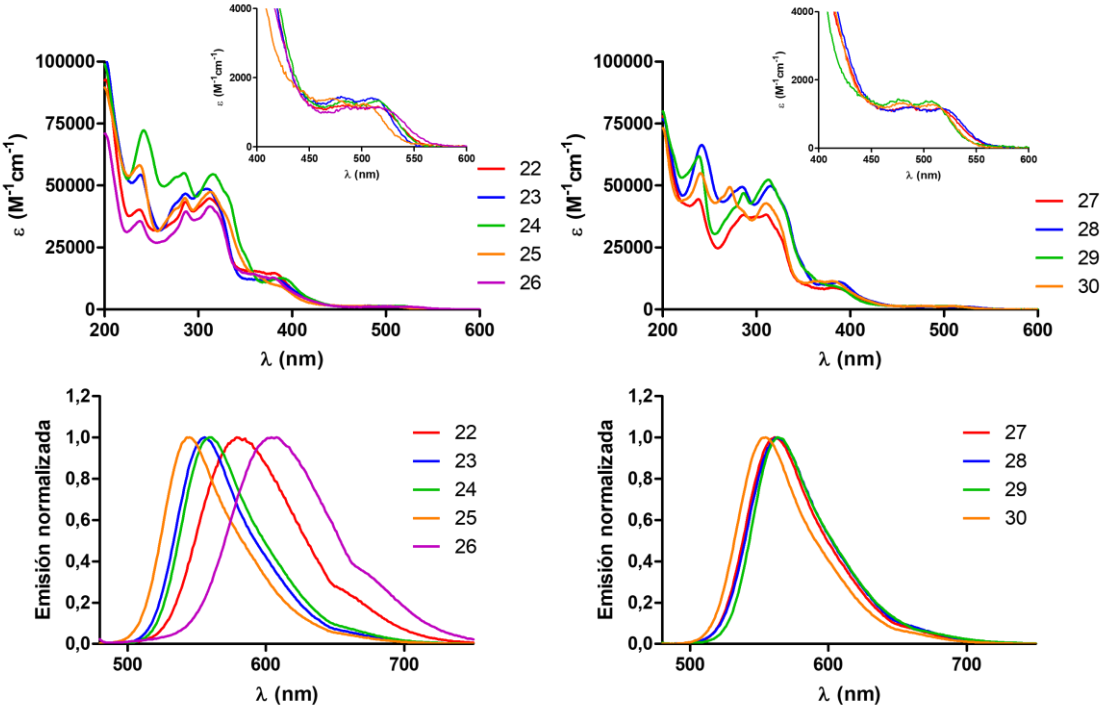


Figura 3.9. Espectros de absorción UV/Vis (arriba) y espectros de emisión normalizados (abajo) de **22**–**30** en acetonitrilo en presencia de oxígeno (λ_{exc} = 405 nm, 10 µM). En los espectros de absorción se muestra una ampliación de la región 400–600 nm.

En la **Tabla 3.2** se recogen algunas propiedades ópticas de los complejos en acetonitrilo en ausencia de oxígeno. Los tiempos de vida de emisión de los complejos a temperatura ambiente varían desde los 0,34 µs para el complejo **22** hasta 5,99 µs en el caso del complejo **27**, rango que se encuentra dentro del orden de valores observados previamente en la bibliografía.[25] Los complejos **23** y **30** presentan valores de rendimiento

cuántico de fosforescencia mayores del 70%, mientras que los complejos **22** y **26** presentan valores inferiores al 10% en las mismas condiciones.

Tabla 3.2. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y emisión (λ_{em}), tiempos de vida (τ_{em}) y rendimientos cuánticos (Φ_{em}) de emisión de los complejos en acetonitrilo a temperatura ambiente.

Complejo	λ_{exc}[a] (nm)	λ_{em} (nm)	τ_{em}[b] (µs)	Φ_{em}[b] (%)
22	350	580	0,34	9,4
23	370	555	2,62	75,8
24	350	560	2,16	65,1
25	370	545	0,73	20,9
26	310	610	0,911 (89%) 2,98 (11%)	5
27	370	560	5,99	60
28	350	565	1,80 (74%) 2,42 (26%)	52,1
29	330	565	0,589 (83%) 0,872 (17%)	17
30	370	555	2,63	72,1

[a]λ_{exc} máxima. [b] Tiempos de vida ($\lambda_{NanoLED}$= 372 nm) y rendimiento cuántico de emisión medidos en ausencia de oxígeno.

En el caso del complejo **22**, como se muestra en la **Figura 3.10A**, se observa el apagado de la emisión (λ_{exc} = 355 nm) tanto en agua como en tampón fosfato (PBS) al compararla con el comportamiento en acetonitrilo. Por último, cabe destacar que las longitudes de onda máximas de emisión de **22**, en distintos disolventes, aumentan gradualmente en el orden DCM < ACN < DMSO < H_2O (**Figura 3.10B**), es decir, con la polaridad del disolvente, lo que sugiere la existencia de un efecto solvatocrómico.

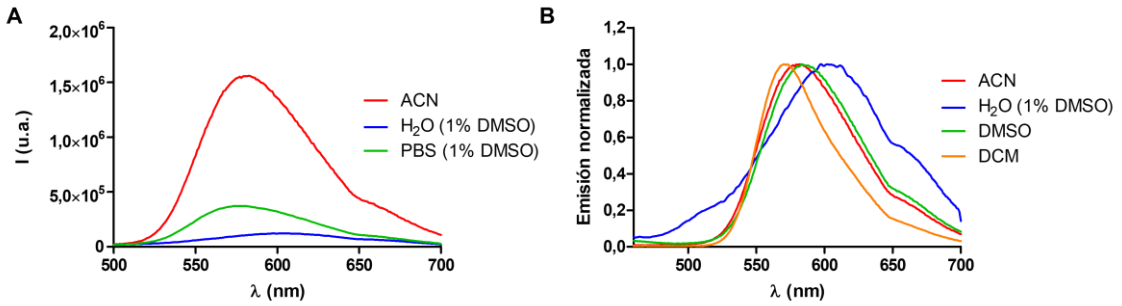


Figura 3.10. (A) Espectros de emisión del complejo **22** en ACN, agua (1% DMSO) y PBS (1% DMSO). (B) Espectros de emisión normalizados de **22** en ACN, agua (1% DMSO), DMSO y DCM. λ_{exc}= 355 nm, 10 µM.

3.2.4. Estudios de estabilidad

Se comprobó la estabilidad de todos los complejos en DMSO y RPMI (5% DMSO) a diferentes tiempos mediante espectroscopia de absorción UV/Vis (**Figura 3.11A** y **Figura 3.11B** para **22** y **Figuras A3.83**–**A3.84** para **23**–**30**). Los espectros

obtenidos antes y después del tiempo de incubación son iguales, lo que demuestra que los complejos son estables en dichas condiciones. Además, con el fin de simular mejor las condiciones celulares, se investigó su estabilidad en presencia de glutatión (GSH) (10 mM) o de NADH (100 µM) en agua (1% DMSO) por UV/Vis (**Figura 3.11C** para **22** y **Figuras A3.85**–**A3.87** para **23**–**30**). En ningún caso hay cambios en la forma de los espectros, lo que de nuevo demuestra que los compuestos son estables en las distintas condiciones estudiadas.

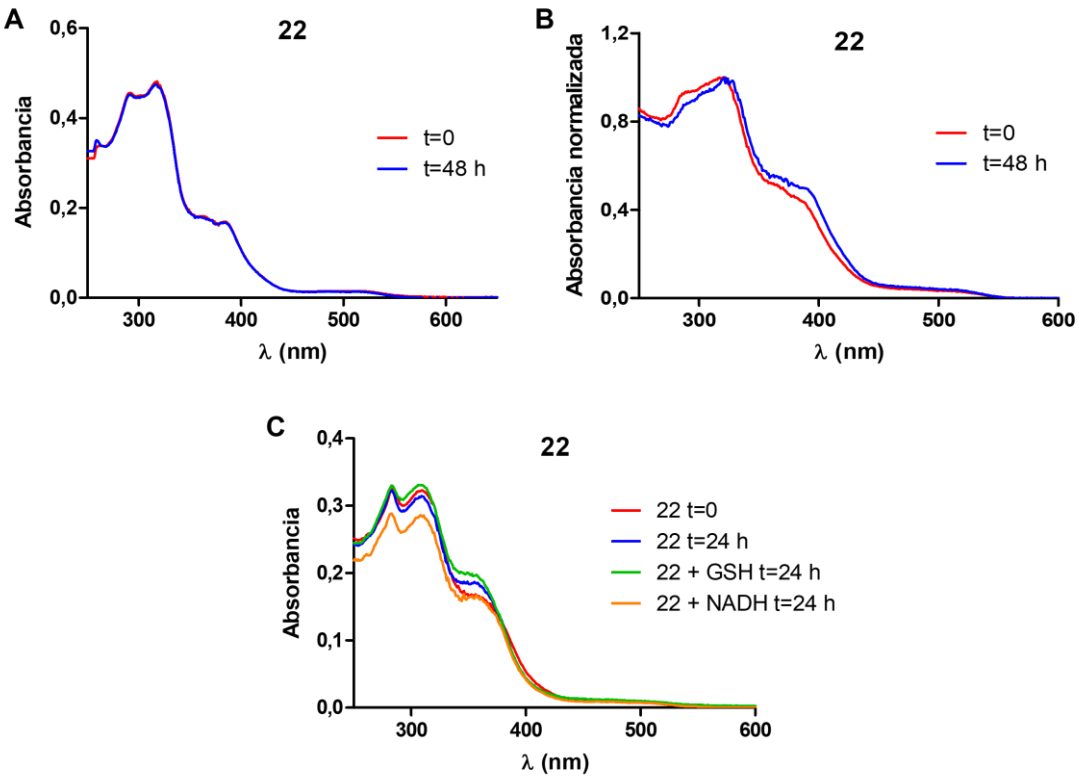


Figura 3.11. Evolución con el tiempo del espectro de absorción del complejo **22** en (A) DMSO (B) RPMI (5% DMSO) y (C) en ausencia (líneas roja y azul) y en presencia de GSH (10 mM) o NADH (100 µM) en agua (1% DMSO). Concentración de **22**: 10 µM.

3.2.5. Estudio de hidrólisis

Además, se comprobó la estabilidad frente a la hidrólisis, con el fin de evaluar si los complejos sufren, o no, la sustitución parcial o total del ligando cloruro en presencia de agua. Este experimento se llevó a cabo por ^{1}H-RMN en DMSO-d_6 (30% D_2O) y por HPLC/MS usando como fase móvil la mezcla acetonitrilo:agua (80:20) en modo isocrático.

Como se observa en la **Figura 3.12** para el complejo **23** (**Figura A3.88** para **30**), no se producen cambios tras 4 días en disolución de DMSO-d_6 (30% D_2O). Después de dicho tiempo, se adicionó ion cloruro ajustando las concentraciones finales a 4, 23 y 100

mM, resultando un espectro idéntico a los iniciales, hecho que sugiere que los nuevos complejos estudiados no sufren hidrólisis en esas condiciones.

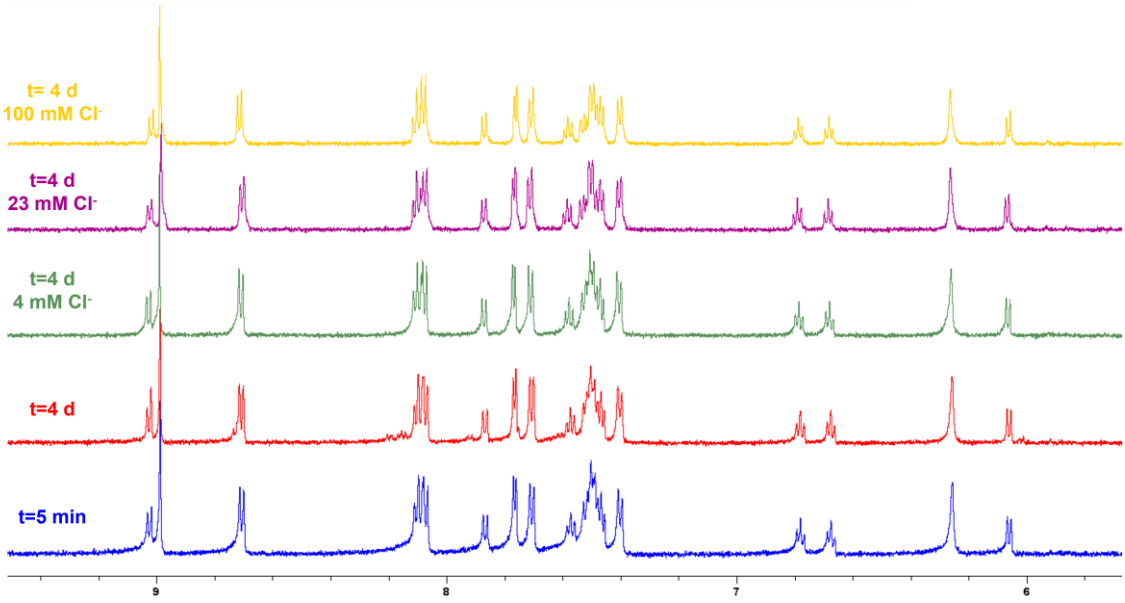


Figura 3.12. Estudio de hidrólisis del complejo **23** (1 mM) en DMSO-d_6 (30% D_2O) por ^{1}H-RMN, 600 MHz, a t.a.: tras 5 min (línea azul), 4 días (línea roja), tras 4 días y la adición de Cl^- 4 mM (línea verde), 23 mM (línea morada) y 100 mM (línea amarilla).

Para corroborar este resultado se realizó también un estudio por HPLC/MS. En la **Figura 3.13** se recoge el resultado para **22** en acetonitrilo:agua (80:20), cuyo cromatograma muestra sólo un pico y su espectro de masas concuerda con el correspondiente al aducto $[M\text{-}PF_6]^+$, indicando la fuerza del enlace Ir–Cl, que permanece inalterado. La **Figura A3.89** confirma resultados similares para los complejos **23**, **28** y **29**.

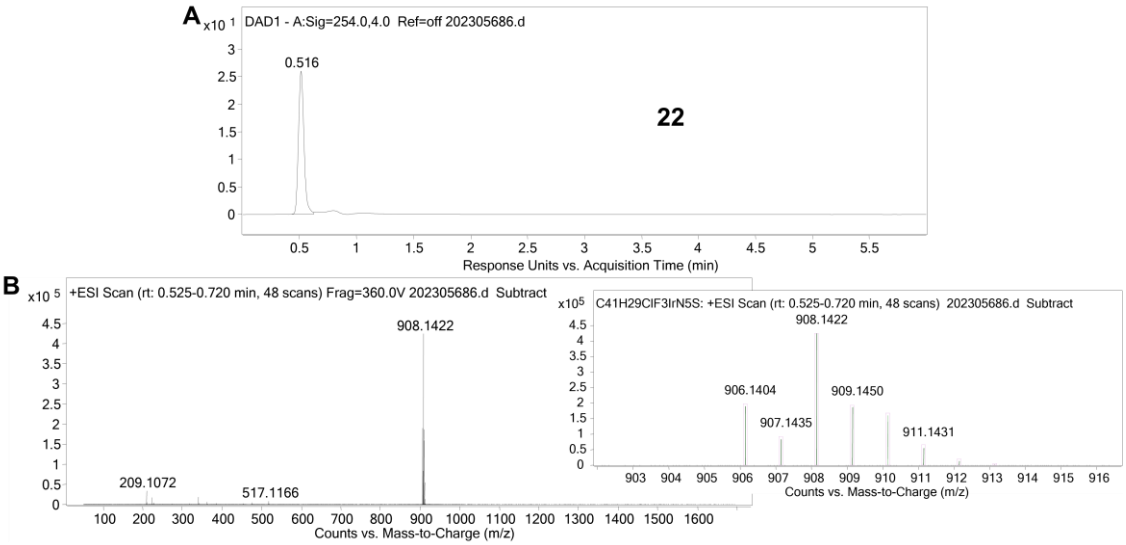


Figura 3.13. (A) Cromatograma de HPLC del complejo **22** (detector UV 310 nm) usando acetonitrilo:agua (80:20) como fase móvil en modo isocrático (0,1% ácido fórmico) y (B) el espectro de masas correspondiente, mostrando el pico $[M\text{-}PF_6]^+$.

3.2.6. Estudios de agregación

Se ha llevado a cabo un estudio de agregación de los complejos **24**–**26** mediante ^{1}H-RMN en DMSO-d_6 a las concentraciones 1, 5 y 10 mM, y a una concentración fija (1 mM), pero modificando el porcentaje de D_2O (0, 10, 30, 50, 70%) en DMSO-d_6. Para ninguno de los complejos estudiados, **24**–**26**, se producen cambios en las señales al aumentar la concentración (**Figura 3.14** para **24** y **Figuras A3.90** y **A3.91** para **25** y **26**, respectivamente), aunque en **25** y **26** se observa un redondeo de las señales a 10 mM. Sin embargo, en los tres casos se produce un desplazamiento de las señales con el aumento del porcentaje de agua (**Figura 3.15** para **24** y **Figuras A3.92** y **A3.93** para **25** y **26**, respectivamente), así como una bajada importante de la intensidad, resultando difícil registrar los espectros. Cabe destacar que no se observó la aparición de precipitado en ningún tubo. Este comportamiento suele estar relacionado con un fenómeno de agregación.

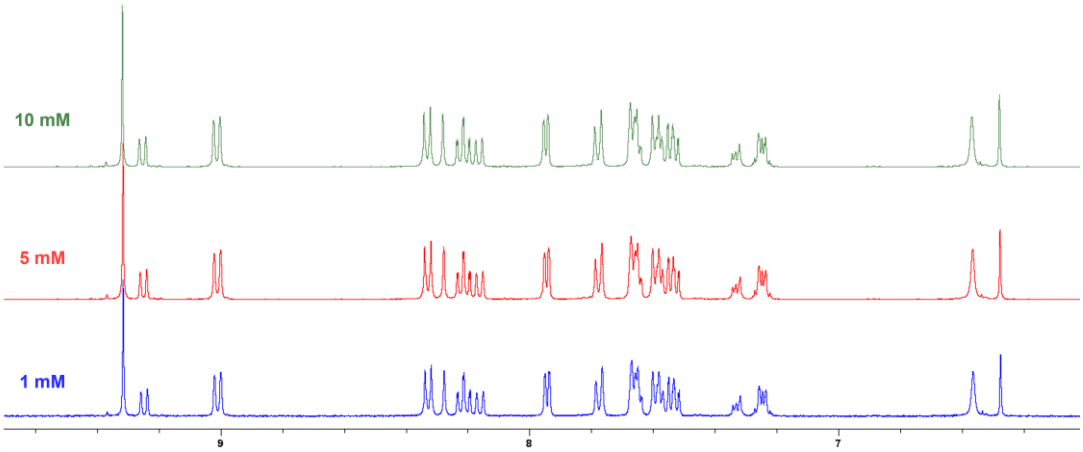


Figura 3.14. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **24** a distintas concentraciones (1, 5 y 10 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

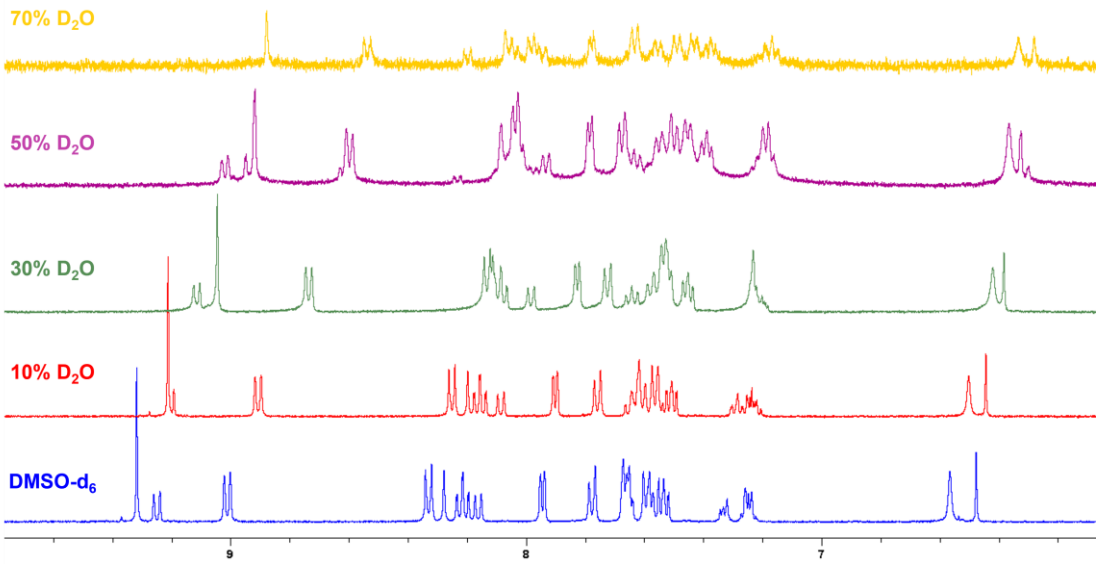


Figura 3.15. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **24** a distintos porcentajes de D_2O (0, 10, 30, 50 y 70%) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

Una vez comprobada la agregación en presencia de agua por ^{1}H-RMN, se estudió la emisión a distintas proporciones DMSO:H_2O con el fin de evaluar si se produce un aumento (AIE) o una disminución (ACQ) de su intensidad por agregación.[26] Se evaluaron los complejos **22**, **24**, **25** y **30** empleando concentraciones fijas (10 µM) y distintos porcentajes de agua (0, 30, 50, 70, 90, 95, 99%) en DMSO. En la **Figura 3.16A** se recoge el resultado para **22**, donde se observa que en ausencia de agua emite en la región naranja (580 nm), pero a medida que aumenta la proporción de esta, deja de hacerlo. En la **Figura 3.16B** se muestra una foto de las cubetas bajo la lámpara UV de 365 nm donde se confirma lo anterior.

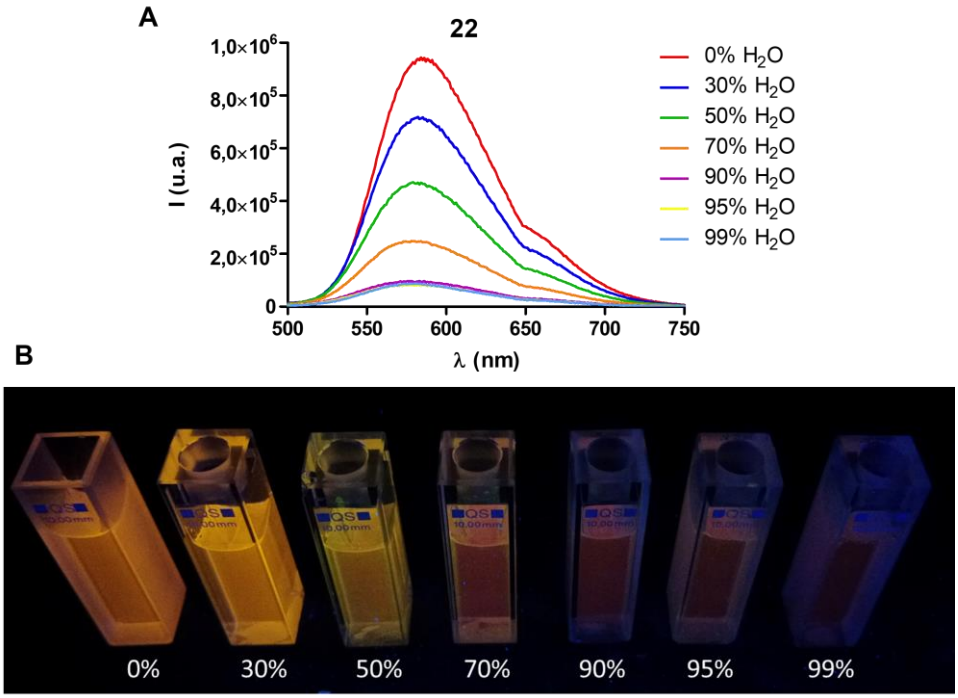


Figura 3.16. (A) Espectros de emisión del complejo **22** (10 µM) a distintos porcentajes de agua. (B) Fotografía de las cubetas empleadas en el experimento bajo una lámpara de 365 nm.

En el caso de los complejos **24** y **25** (**Figuras A3.94** y **A3.95**, respectivamente), se observa cómo la luminiscencia se mantiene igual con 0 y 30% de agua, pero a partir del 50% disminuye prácticamente a la mitad. Para **30** (**Figura A3.96**), la intensidad de emisión baja a partir del 70% de agua, pero no llega a apagarse del todo, sino que sigue siendo elevada hasta el 99%. En este caso se produce también un ligero desplazamiento hacia el verde a partir del 50% de agua. Para todos los complejos estudiados tiene lugar un fenómeno de apagado por agregación, ACQ.[26] En la **Figura A3.97** se recoge una gráfica comparativa de la evolución de la intensidad de emisión con el porcentaje de agua para los distintos complejos.

3.3. Estudios biológicos

Uno de los objetivos de este trabajo era investigar la posible actividad de los complejos sintetizados frente a distintas líneas cancerígenas. Estos estudios los ha llevado a cabo el grupo de investigación dirigido por el Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa.

El estudio se centra en evaluar la actividad antiproliferativa y antimetastásica de los complejos en distintas líneas de cáncer de mama comparando los resultados obtenidos con los del fármaco en uso clínico, doxorrubicina.

3.3.1. Actividad antiproliferativa

Una de las primeras etapas en la identificación de nuevos quimioterapéuticos antitumorales es la realización de un estudio antiproliferativo *in vitro* de los candidatos. La actividad antiproliferativa de los nuevos complejos sintetizados se evaluó frente a los modelos de líneas celulares tumorales humanas: de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, muy agresiva e invasiva, de cáncer de mama MCF-7, poco agresiva y no invasiva; y, con fines comparativos, la línea sana de mama MCF-10A del mismo origen epitelial.

El tratamiento convencional de quimioterapia para el cáncer de mama suele incluir la doxorrubicina (Dox).[9] Por lo que este fármaco se empleó como control, con fines comparativos, en todos los estudios realizados. La **Tabla 3.3** recoge los valores de IC_{50} obtenidos para los complejos en las tres líneas celulares. Para la línea MDA-MB-231, se encontraron en el rango de 0,7 µM (**25**) a 3,9 µM (**28**). Para la MCF-7 fueron desde 1,1 µM (**22**) hasta 5,0 µM (**27**). Además, incluye el valor del factor de selectividad (FS, IC_{50} (línea sana) / media IC_{50} (líneas cancerígenas)), que es otro parámetro utilizado para predecir la efectividad y el potencial no tóxico del fármaco, es decir, su habilidad de respetar las células sanas. El complejo **25** resultó ser el más efectivo, ya que presenta los menores valores de IC_{50} y el mayor FS, siendo **22** el segundo mejor candidato en este ensayo. En ambos casos los índices de selectividad son considerablemente mayores que para la doxorrubicina (28 y 25 frente a 18).

Tabla 3.3. Valores de IC_{50} de los distintos complejos y de la doxorrubicina. Realizado por ensayo con sulforodamina B tras 72 h de incubación.

$IC_{50,72h}$ (μM)[a]	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A	FS
22	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1	32 ± 5	25
23	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	28 ± 4	16
24	2,9 ± 0,4	2,7 ± 0,1	17 ± 2	6
25	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	25 ± 2	28
26	1,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2	27 ± 2	14
27	1,7 ± 0,4	5,0 ± 0,6	25 ± 3	8
28	3,9 ± 0,6	2,0 ± 0,3	31 ± 5	10
29	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,1	27 ± 5	20
30	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,4	24 ± 4	8
Dox	0,62 ± 0,08	0,33 ± 0,07	8,6 ± 0,8	18

[a]Los datos representan la media ± desviación estándar de al menos tres repeticiones independientes. FS calculado como IC_{50} (MCF-10A sana) / media IC_{50} (MDA-MB-231 y MCF-7 cancerígenas).

3.3.2. Acumulación y localización en células

La actividad antitumoral de los compuestos depende de su habilidad para acumularse en el interior de las células. Por lo que, para obtener información básica sobre los mecanismos responsables de dicha actividad, se determinó el contenido de iridio en células de la línea MDA-MB-231, mediante ICP/MS (**Tabla 3.4**). También se calculó el Log*P* (coeficiente de partición octanol/agua), resultando que la capacidad de atravesar la membrana celular se correlaciona con la lipofilia (**Tabla 3.4**), y concuerda con la idea de que atraviesan la membrana citoplasmática por difusión pasiva.

Tabla 3.4. Estudio de acumulación de Ir en células MDA-MB-231 tratadas con los complejos sintetizados (1 μM) durante 24 h, y valores de Log*P* obtenidos.

Complejo	Acumulación celular (ng Ir/10^6 células)	Log*P*[a]
22	35 ± 1	0,42
23	39 ± 2	0,65
24	60 ± 2	0,95
25	73 ± 3	0,83
26	39 ± 4	0,40
27	27 ± 1	0,46
28	43 ± 5	0,77
29	53,3 ± 0,3	0,76
30	54 ± 3	0,85

[a]Valores de Log*P* (octanol/agua) para los complejos determinado por el método del "frasco de agitación". Coeficiente de correlación de Spearman = 0,87.

Para entender mejor el mecanismo de acción, es importante conocer la localización de los complejos en el interior celular. En nuestro caso, no se observó señal fosforescente en el núcleo, por lo que se descarta el ADN nuclear como diana, pero sí

se detectó parte en el citoplasma (**Figura 3.17** para **22** y **Figura A3.98** para el resto). Para determinar si se acumulan en la mitocondria, como en otros complejos de Ir(III) semejantes,[27–30] se realizó un estudio de colocalización empleando MitoTracker™ en la línea MDA-MB-231 (**Figura 3.17** para **22** y **Figura A3.98** para el resto). Los coeficientes de Pearson calculados fueron de 0,37–0,75 confirmando que, generalmente, se localizan principalmente en dicho orgánulo. Los mayores valores se obtuvieron para **22**–**24** y **27**–**29**.

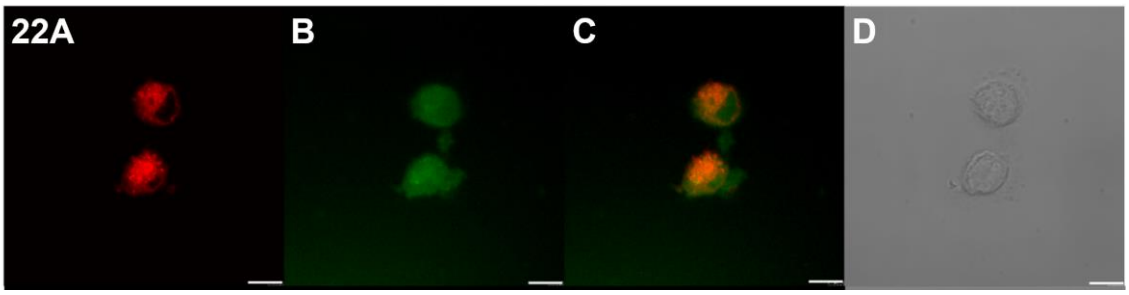


Figura 3.17. Estudio de colocalización de **22** en células MDA-MB-231. Las muestras fueron tratadas con el compuesto a una concentración 5 µM durante 5 h y teñidas con MitoTracker™ Rojo. A: Fluorescencia del MitoTracker™ Rojo, B: fluorescencia del complejo, C: superposición de la fluorescencia observada en A y B, D: campo brillante. La barra de escala representa 10 µm.

3.3.3. Mecanismo de muerte celular

Con el fin de conocer si los complejos son citotóxicos (elimina las células cancerosas impidiendo que se dividan y crezcan, pudiendo reducir el tamaño de los tumores) o citostáticos (frena el crecimiento de la células sin destruirlas, impidiendo que los tumores crezcan y se diseminen, pero sin reducir su tamaño), se evaluó si **22** provoca muerte celular en la línea MDA-MB-231.[31] Para ello se realizó un ensayo de cuantificación de apoptosis y necrosis con anexina V y ioduro de propidio empleando muestras tratadas con etanol y estaurosporina como controles positivos de necrosis y apoptosis, respectivamente.

En la **Figura 3.18** se observa que al tratar las células con **22**, tiene lugar un aumento de la población celular en el cuadrante inferior derecha, lo que significa que induce apoptosis temprana. Además, **22** no induce necrosis en TNBC (cuadrante superior izquierda). Mientras que el aumento de la concentración empleada favorece la apoptosis tardía. Cualitativamente, el resto de los complejos muestran resultados semejantes (**Figura A3.99**). Por tanto, este estudio demuestra que los nuevos compuestos no sólo evitan que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 crezcan o se multipliquen, sino que también las matan mediante apoptosis, un proceso de muerte programada.

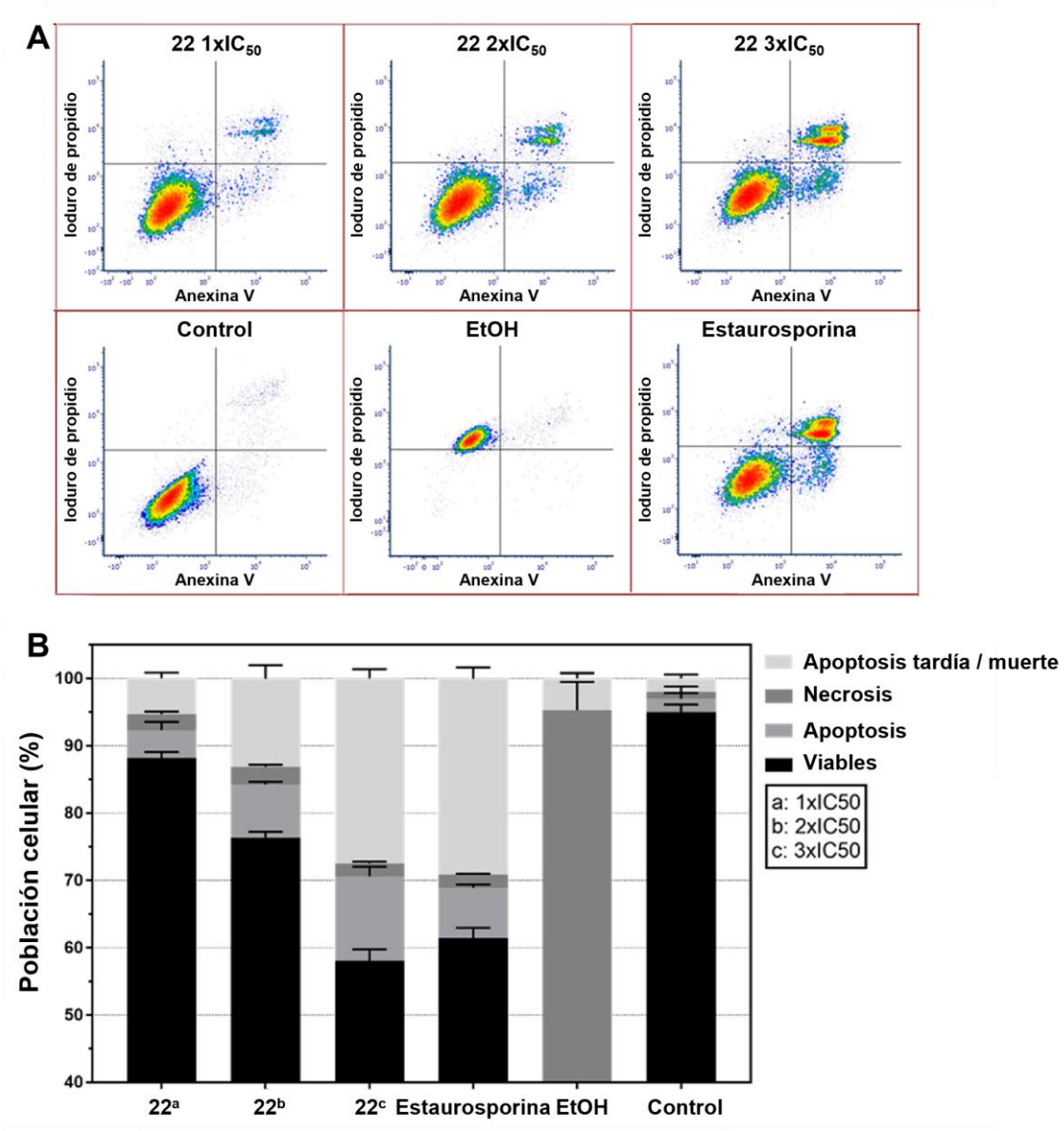


Figura 3.18. (A) Densidad de puntos indicativa de muerte celular, determinada por el ensayo de anexina V/ ioduro de propidio. Células MDA-MB-231 tratadas con concentraciones equitóxicas de **22** correspondientes a 1-, 2- o 3-veces el $IC_{50,72h}$. Estaurosporina y EtOH representan controles positivos para apoptosis y necrosis, respectivamente. (B) Análisis cuantitativo de muerte celular de MDA-MB-231 inducido por **22** a las concentraciones indicadas y determinado mediante el ensayo indicado por citometría de flujo. Las barras de error son las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

3.3.4. Disrupción de la progresión del ciclo celular

A continuación, se evaluó, por citometría de flujo en qué fase se interrumpe el ciclo celular en la línea MDA-MB-231 por acción de los compuestos sintetizados. En todos los casos, tras el tratamiento con los mismos, se produce un aumento de la población celular en la fase G2/M, una ligera disminución en la G0/G1 y un pequeño cambio en la fase S (**Figura A3.100**). La supresión observada en G2 puede forzar a las células cancerosas a entrar en la fase M y a la llamada "catástrofe mitótica" y apoptosis.

3.3.5. Actividad antiinvasiva determinada por monitorización del crecimiento celular en tiempo real

La invasión es uno de los principales procesos durante el cual las células cancerosas migran desde los tumores primarios, expandiéndose y penetrando en tejidos adyacentes. La metástasis es un proceso que involucra la migración de las células tumorales a otro tejido del cuerpo, donde se forma un tumor secundario o nuevo. Por este motivo, un comportamiento invasivo constituye uno de los primeros pasos de la metástasis.[32] Se ha observado en ratones que las células de la línea MDA-MB-231 presentan mayor potencial metastásico que las MCF-7.[33] Por lo que se emplearon las primeras para realizar el estudio de las propiedades antiinvasivas y antimetastásicas de los complejos mediante monitorización del crecimiento celular en tiempo real.

Para ello se utilizó un sistema *xCELLigence DP RTCA CIM plate 16* de migración,[34] basado en el principio de la cámara de Boyden, que permite la monitorización a tiempo real del número de células invasivas. Cuando éstas migran desde la parte superior a la inferior del pocillo a través de una membrana microporosa con microelectrodos integrados, entran en contacto y se adhieren a estos afectando a la impedancia. El resultado del experimento realizado con este sistema se expresa mediante el índice celular (CI), que aumenta cuando las células invaden. Además, es posible analizar el tiempo transcurrido desde la siembra de las células hasta el momento en que se inicia la invasión a través de la membrana para cada una de las muestras tratadas con los compuestos (t_{inv}). Este período viene determinado por la intersección de la curva correspondiente a cada compuesto en función del tiempo, con la línea recta correspondiente al valor umbral (CI = 0). Mayores valores de t_{inv} indican una menor invasión de las células tratadas (**Figura 3.19**). Este proceso invasivo se monitorizó durante 7 días para determinar si la muerte celular se producía después de que se hubiera producido la invasión.

Antes de realizar el ensayo, se determinó la toxicidad de los compuestos a las concentraciones empleadas en el mismo mediante el test de exclusión de viabilidad celular con azul tripán, que permite determinar el número de células viables en una suspensión. El resultado obtenido indicó que la viabilidad celular apenas se afectaba a dichas concentraciones (disminución un 3–12%).

Los datos observados en la **Figura 3.19A** demuestran que el tratamiento con **22** inhibe por completo la invasión celular, mientras que la doxorrubicina presenta un perfil con un t_{inv} = 35 h, lo que demuestra la mejor eficacia del complejo **22** debido a su elevado potencial antimetastásico. Por otro lado, los valores obtenidos para el resto de los

compuestos demuestran que la eficiencia antiiinvasiva de **23** (t_{inv} = 53 h) fue también mayor que para doxorrubicina, pero no así para **24**, **26**, **28** y **29** (t_{inv} = 35–40 h) que fue similar a ésta. Finalmente, **25** y **30** apenas redujeron la invasión (t_{inv} = 23 h) en comparación con el control sin tratamiento (t_{inv} = 21 h).

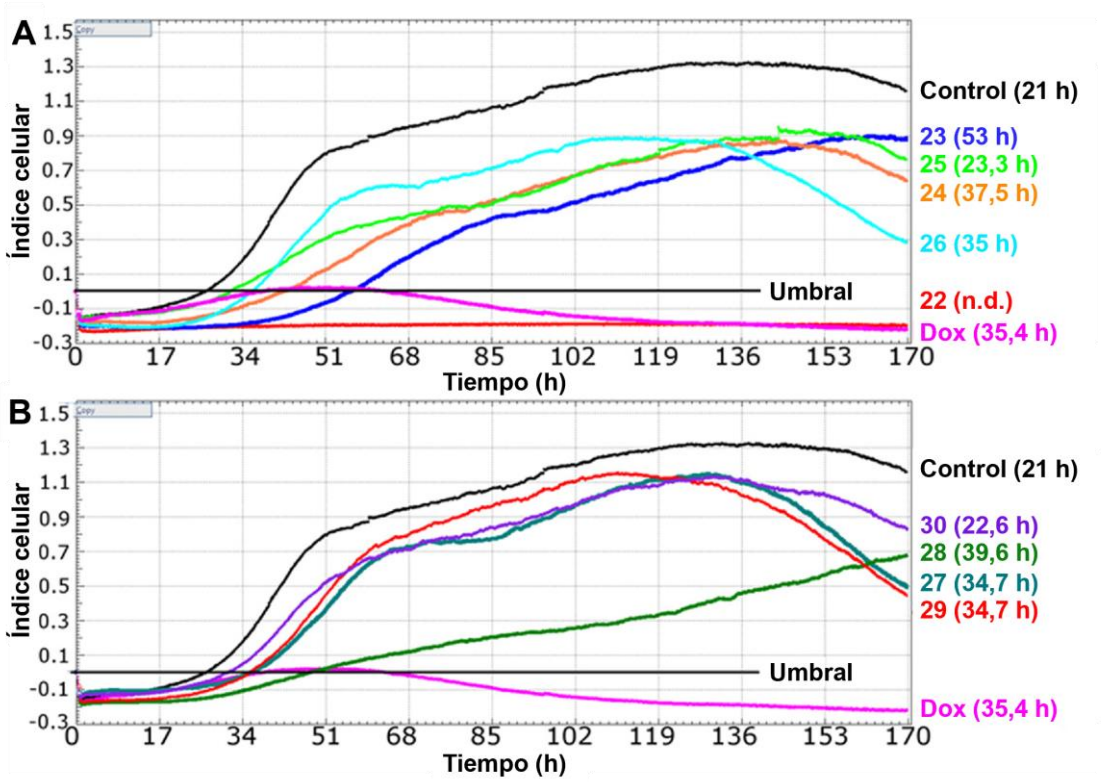


Figura 3.19. Efecto de los complejos y la doxorrubicina en el carácter invasivo de células MDA-MB-231 a tiempo real. La invasión celular a tiempo real fue determinada continuamente por un analizador (RTCA) xCellingence. Las células fueron tratadas con concentraciones equitóxicas ($IC_{50,72h}$) de **22**–**26** (A) o **27**–**30** (B) durante 24 h antes del ensayo invasivo. El tiempo entre paréntesis indica el periodo necesario para que las células invadan la matriz de membrana (intersección de CI con el valor umbral, t_{inv}); t_{inv} representa la media de tres experimentos independientes y de cada muestra tratada por duplicado. Las muestras se monitorearon durante 7 días.

Los perfiles de **24**–**27**, **29**, **30**, de doxorrubicina y del control sin tratamiento mostraron una disminución gradual del CI después del aumento inicial, que puede significar que se desencadenó la muerte celular en subpoblaciones de células invasoras tras periodos de tratamiento más prolongados.

3.3.6. Cuantificación de vimentina por citometría de flujo

Estudiando la habilidad de los complejos para reducir la expresión de vimentina en los tumores se puede evaluar su capacidad de actuar como agentes antimetastásicos. La vimentina es una proteína de filamentos intermedios de tipo III sobreexpresada en cánceres epiteliales agresivos, que inducen migración celular, por lo que se asocia con el aumento de las tasas de metástasis. Es, por tanto, un importante marcador de transición epitelio-mesénquima (EMT), que es el proceso empleado por las

células cancerígenas para adquirir la habilidad de invadir los tejidos de alrededor, resistir a los fármacos y escapar de la inmunidad. Esta proteína tiene un papel conocido en la migración celular y la movilidad, y muchos estudios la han identificado como una nueva proteína diana para eliminar de manera efectiva la resistencia a fármacos y la potencial reaparición en el caso del TNBC.[35,36]

Se evaluó si la expresión de vimentina podía verse afectada por los complejos en células MDA-MB-231 VIM RFP con expresión estable de la proteína roja fluorescente (RFP) asociada a la vimentina. Para ello se empleó la citometría de flujo después de 24, 48 (datos no mostrados debido a los cambios insignificantes) y 72 h de tratamiento con los compuestos, empleando concentraciones 0,25-, 0,5-, 1- y 2-veces el $IC_{50,72h}$ (**Figura 3.20**). Tras 72 h se observó que los efectos provocados por **22** sobre las células eran opuestos a los de la doxorrubicina. Para esta última, sólo se consiguió disminuir la expresión de vimentina con concentraciones del doble del $IC_{50,72h}$, mientras que el resto de las concentraciones provocaron un aumento, consistente con su conocida habilidad para fomentar la migración e invasión celular en el cáncer de mama.[16,37] Por el contrario, el complejo **22** mostró buenos resultados a concentraciones de 0,5-, 1- y 2-veces el $IC_{50,72h}$. Otro candidato que mostró buenos resultados fue **30**, aunque de manera menos eficiente que **22**.

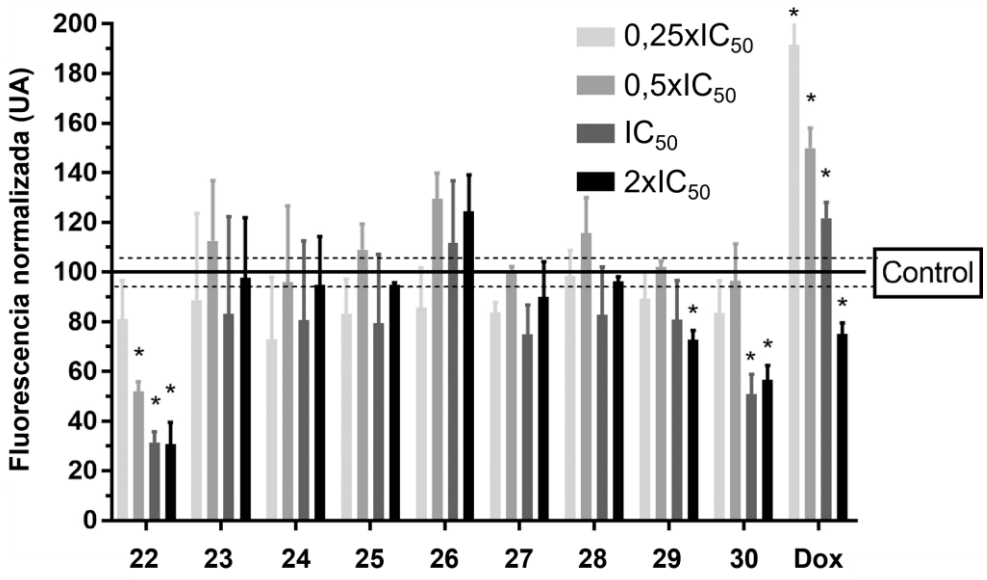


Figura 3.20. Análisis de citometría de flujo de células MDA-MB-231 VIM RFP tratadas con los complejos **22**–**30** durante 72 h con incremento de las concentraciones de complejo y analizando con el fin de determinar la fluorescencia de la VIM RFP. Los valores de fluorescencia fueron normalizados al control sin tratar. Los datos son la media de cuatro experimentos independientes, las barras de error definen las desviaciones estándar y los asteriscos (*) denotan una diferencia significativa respecto al control sin tratar ($P \leq 0,01$), calculado mediante el Test-t de Student.

3.3.7. Expresión de genes relacionados con EMT y MET

La eficiencia antimetastásica de los complejos también se puede evaluar mediante su habilidad para afectar a la expresión de algunos genes relacionados con la EMT y la transición reversa, mesénquima-epitelio (MET), que parecen tener papeles cruciales en la diseminación metastásica de los tumores.

El proceso EMT va acompañado de una disminución de la expresión del marcador de células epiteliales E-cadherina y un aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina, N-cadherina, β-catenina y el factor de transcripción Snail1. Por lo que, tras el tratamiento con los complejos, un aumento de la expresión de E-cadherina y disminución de vimentina, N-cadherina, β-catenina y Snail1, sería indicativo de actividad antimetastásica por parte de los compuestos.

Para determinar la expresión de estos genes, se llevó a cabo un análisis de PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) en células MDA-MB-231 tratadas con los complejos o la doxorrubicina. Se trataron durante 24 h con las concentraciones del $IC_{50,72h}$ y, para el análisis de expresión de genes relacionados con EMT o MET a través de la cuantificación del ARNm, se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En la **Figura 3.21** se puede observar que el complejo **22** es el único que sigue el criterio mencionado: provoca una disminución de los niveles de vimentina (~6-veces), N-cadherina (~5-veces), β-catenina (~5-veces) y Sanil1 (~4-veces) y un aumento de la expresión de E-cadherina. Estos resultados resaltan el potencial de este complejo para actuar como un agente antimetastásico.

La doxorrubicina, en cambio, provoca exactamente lo contrario que **22**, un aumento de los niveles de N-cadherina (~3-veces), β-catenina (~3-veces) y Snail1 (~2-veces), además de un ligero aumento de vimentina y una leve disminución de la expresión de E-cadherina. Estos resultados también son consistentes y apoyan la idea de que dosis subletales de doxorrubicina activan la vía EMT en células de cáncer de mama[38–41] y confirman, por tanto, que el uso de este fármaco es inapropiado para TNBC, ya que puede causar resistencia al tratamiento y metástasis.[16]

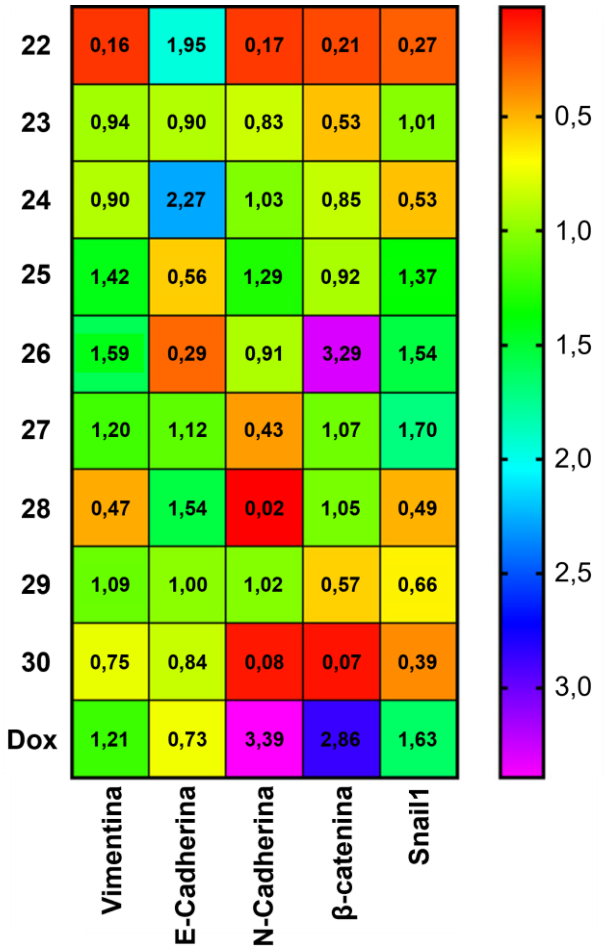


Figura 3.21. Expresión relativa de ARNm de los genes relacionados con EMT en células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas durante 24 h con concentraciones equitóxicas de los complejos ($IC_{50,72h}$). La cuantificación relativa de la respectiva expresión de ARNm del gen fue calculada usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. β-actina se empleó como control de referencia endógena, y el control sin tratar fue usado para calibración arbitraria. Los datos se representan como un mapa de calor y son la media de cuatro experimentos independientes, cuadruplicado para cada gen analizado en el respectivo análisis PCR.

3.3.8. Morfología de la red de filamentos intermedios de vimentina

Existe evidencia en la bibliografía que demuestra que la sobreexpresión de vimentina y la formación de filamentos intermedios de ésta (VIFs) en células cancerosas provoca un aumento de su movilidad, de su potencial invasivo y de la formación de metástasis.[42,43] Además, se sabe que los VIFs son muy importantes en la regulación de la forma celular y, por tanto, la migración.[44] Debido al ensamblaje de estos, las células cancerígenas adoptan formas alargadas propias de las mesenquimales, mientras que las que no presentan estos filamentos son redondeadas.[45]

Se llevó a cabo un estudio, mediante microscopía confocal, de la morfología de los VIFs en células MDA-MB-231 VIM RFP tratadas con **22** o con doxorrubicina (**Figura 3.22**). Para ello, se tiñeron los filamentos de vimentina con RFP y los núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo). Las células del control sin tratar mostraron colas

de aparente polarización de la vimentina,[46] mientras que las tratadas con doxorrubicina adoptaron la estructura típica,[42,43] apoyando la idea de que ésta induce la sobreexpresión de VIFs en dichas células, promoviendo su movilidad y potencial invasivo. Sin embargo, las tratadas con el complejo **22** presentaron una significante despolimerización y condensación de la red citoesquelética de vimentina, es decir, una morfología de células epiteliales. Este complejo se comporta, por tanto, como un agente antimetastásico en células TNBC, contrario al carácter proinvasivo de la doxorrubicina.

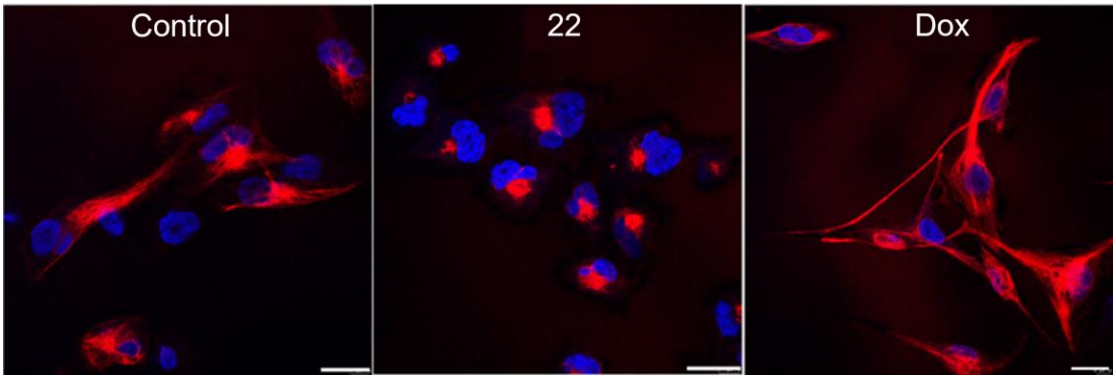


Figura 3.22. Microscopía confocal de células MDA-MB-231 VIM RFP. Las células fueron tratadas durante 24 h con concentraciones equitóxicas de los compuestos ($IC_{50,72h}$). Los filamentos de vimentina se marcaron con la RFP (rojo), mientras que los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las figuras son representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala representa 20 µm.

3.3.9. Ensayo de cierre de heridas

El ensayo de cierre de heridas es un método sencillo para evaluar la migración celular en 2D hacia el espacio libre recién creado para cerrar la herida y establecer nuevas interacciones célula-célula, por lo que representa una aproximación de cómo las células cancerígenas pueden migrar.[47] Se emplearon células MDA-MB-231 VIM RFP y microscopía confocal para monitorizar con mayor precisión el cierre de la herida y distinguir los pseudópodos diminutos de las células migratorias.

En este estudio se evaluó la capacidad de cierre de herida tras 24 h de tratamiento con los compuestos **22**–**30** (**Figura 3.23**) y se compararon los resultados con los del control sin tratar. En la **Figura 3.23B** para el complejo **22**, se comprueba que después del tratamiento sólo se cierra la herida un 10%, demostrando un gran efecto antimigratorio en esta línea celular. Por el contrario, para la doxorrubicina fue de un 67%, muy similar a la del control (70%). Además, en la **Figura 3.23A** se observa cómo la doxorrubicina induce la formación de pseudópodos (visualizados gracias a la vimentina marcada en rojo), lo que indica una colonización eficaz de la zona de la herida por las células cancerosas, es decir, favorece la movilidad y migración de éstas.

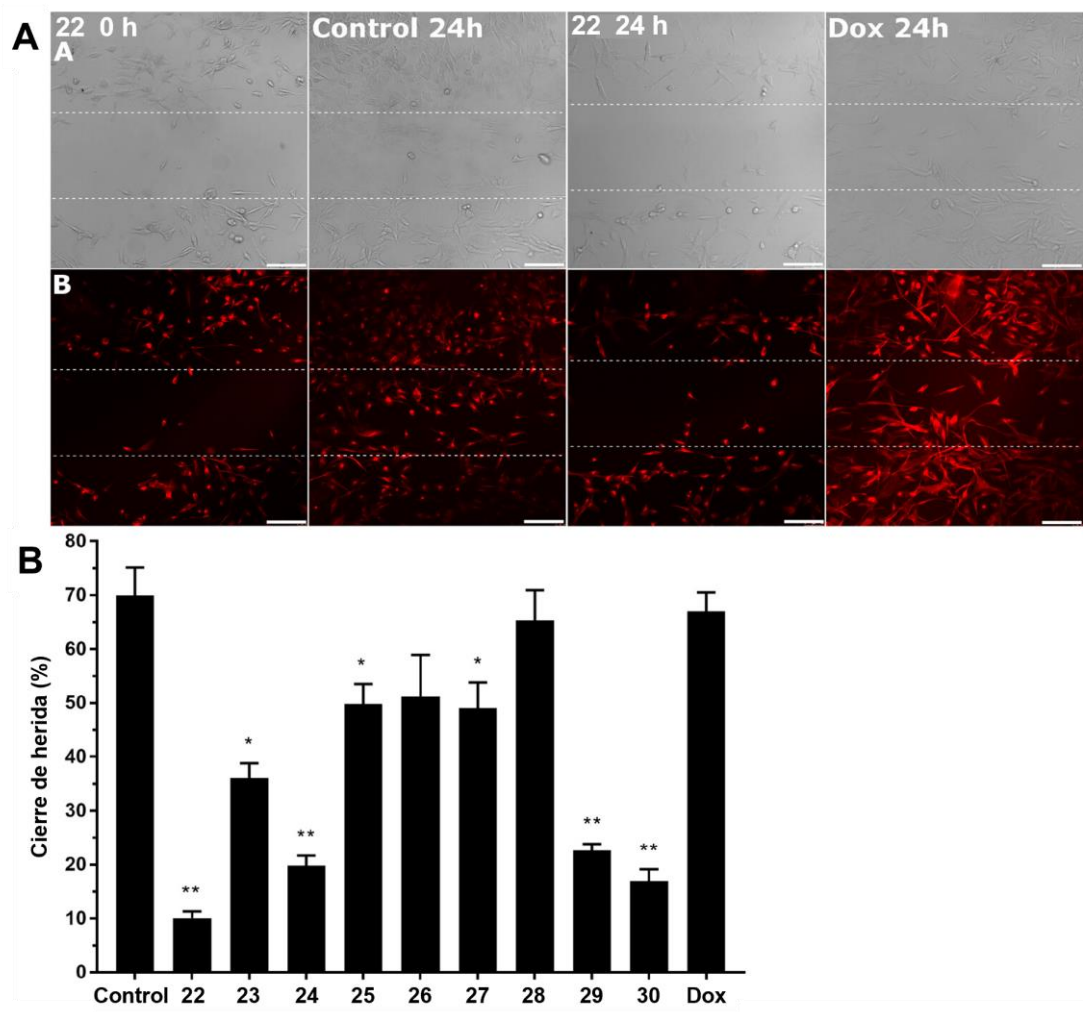


Figura 3.23. Migración de células MDA-MB-231 VIM RFP por ensayo de cierre de herida *in vitro* y microscopía confocal. Las células fueron tratadas durante 24 h con concentraciones de **22** o doxorrubicina correspondientes a sus valores de $IC_{50,72h}$. (A) Las imágenes del ensayo de cierre de herida se registraron a t=0 y 24 h después del tratamiento. Fila A, campo brillante; fila B, fluorescencia de VIM RFP. Las líneas discontinuas horizontales marcan los límites del rasguño. La barra de escala representa 100 µm. (B) Análisis del ensayo de cicatrización de herida. Las imágenes fueron analizadas mediante el sorfware *ImageJ*, y ambos canales (campo brillante y fluorescencia) se usaron para analizar en mayor profundidad. El área de cierre de la herida fue calculada y los datos se analizaron estadísticamente mediante Test-t de *Student*. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto al control de células sin tratar con **P ≤ 0,001 y *P ≤ 0,05.

3.3.10. Cuantificación morfológica de esferoides tumorales y cuantificación del potencial de invasión celular

La transición de proliferación a invasión de las células cancerígenas se inicia normalmente por estrés nutricional y por las condiciones desfavorables causadas por el crecimiento progresivo del tumor primario.[48] En este ensayo, para estudiar la dinámica de las células por las que el tumor primario comienza a invadir, se monitorizó el cambio de morfología de esferoides generados con células MDA-MB-231 embebidas en una matriz de agar.[49] Hay que tener en cuenta que los esferoides tumorales multicelulares representan el modelo 3D *in vitro* más utilizado[50] y ofrecen la oportunidad de estudiar el

potencial invasivo de las células cancerígenas en condiciones mucho más próximas a la situación *in vivo* que cuando se emplea el tradicional ensayo *Transwell*.[49]

En nuestro caso, para evaluar el potencial invasivo de los esferoides se utilizaron los parámetros morfológicos.[51] Entre ellos, el perímetro es el más útil para cuantificar la proliferación, mientras que la redondez, la integridad de la forma y la cuantificación de las protrusiones están relacionados con el potencial invasivo.[49,51] Cuando la morfología es compacta, las células de la superficie siguen el contorno del esferoide, indicando el carácter proliferante pero no invasor, mientras que bordes difusos y rugosos, con aparición de protrusiones primarias y secundarias, son signos del carácter invasivo de las células periféricas. La evaluación de la circularidad (redondez) fue analizada por detección automatizada del borde y medida del área contenida. Una circularidad de 1 indica un esferoide perfectamente circular, y valores menores indican pérdida de ésta. La solidez es un indicador de la regularidad de la superficie o de su rugosidad, es decir, de protrusiones primarias y de la regularidad global del esferoide.[51]

Las células MDA-MB-231 se sembraron en una matriz de agar y se cultivaron durante 7 días para formar los esferoides, que fueron tratados con el complejo **22** o doxorrubicina ($IC_{50,72h}$). Después de 72 h se fotografiaron con un microscopio de contraste de fase y se analizó su morfología (**Figura 3.24** y **Tabla 3.5**). El análisis detallado del control (sin tratamiento) muestra un perímetro medio de 2,1 mm, una circularidad casi perfecta (0,96) y un carácter cóncavo con un centro oscuro, indicando que es altamente compacto. En las muestras tratadas con doxorrubicina, las protrusiones secundarias fueron de 73 μm. Por otro lado, la elevada solidez (6,3) también indica elevada rugosidad. Además, estos esferoides presentan también un elevado perímetro (2,8 mm). Este conjunto de resultados corrobora el gran potencial invasivo de las células periféricas tratadas con este fármaco en uso clínico.

Por el contrario, cuando se realiza el tratamiento con **22**, el perímetro medido fue de 0,8 mm sin detección de protrusiones. Además, la estructura del esferoide colapsó, dando como resultado un falso positivo de aumento del factor de solidez (**Tabla 3.5**). Poniendo nuevamente de manifiesto el excepcional comportamiento del complejo **22** para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

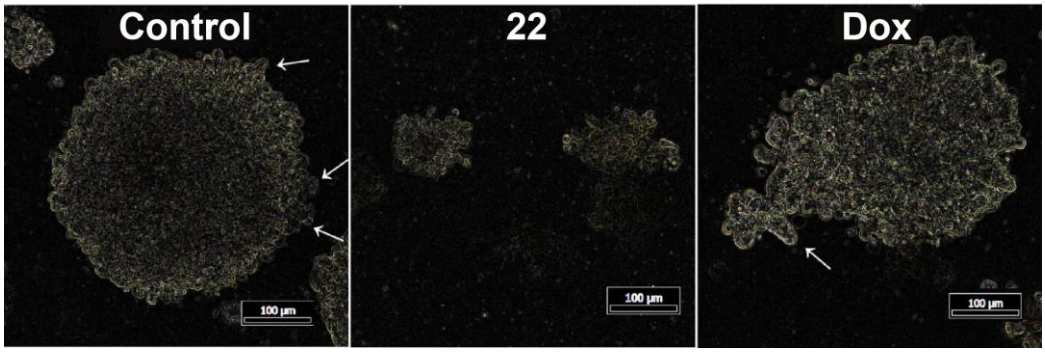


Figura 3.24. Cuantificación morfológica del potencial invasivo de las células MDA-MB-231 en forma de esferoide tumoral en 3D. Los esferoides formados durante 7 días fueron tratados durante 72 h con los compuestos ($IC_{50,72h}$) y analizados mediante el software *ImageJ*. La barra de escala representa 100 µm (flechas: protrusiones).

Tabla 3.5. Análisis morfológico de esferoides 3D de células MDA-MB-231.[a]

	Perímetro (µm)	Circularidad	Solidez	Protrusiones (número: longitud); P. secundarias[b]
Control	2120 ± 310	0,96	3	4: 32 µm
22	800 ± 111	0,82	4,7[c]	-
Dox	2820 ± 506	0,66	6,3	2: 73 µm; prot. sec.

[a]Los experimentos se realizaron por triplicado, con el subsecuente análisis de 10 esferoides por muestra. [b]Protrusiones secundarias. [c]La solidez se vio afectada por el colapso de la estructura del esferoide y la completa disgregación.

3.4. Resumen

En el presente capítulo se ha descrito la síntesis y caracterización de una serie de nuevos complejos octaédricos de Ir(III) del tipo $[Ir(ttpy)(C^N)Cl]PF_6$, con el objetivo de estudiar el efecto de las modificaciones llevadas a cabo en el núcleo 2-arilbenzimidazol del ligando C^N en sus propiedades ópticas y biológicas. Además, el complejo **30**, presenta un grupo éster que permite funcionalizarlo.

Se ha llevado a cabo un estudio de las propiedades fotofísicas de los complejos, que exhiben una elevada luminiscencia, permitiendo su visualización en el interior de las células mediante microscopía confocal. Se ha evaluado la emisión de los complejos con distintas proporciones de agua demostrando que, al aumentar la cantidad de esta, se produce un apagado de la emisión debido a la agregación (fenómeno ACQ). También se han realizado estudios de estabilidad tanto en DMSO como en medio de cultivo por UV/Vis y todos los complejos permanecieron inalterados. Así como un estudio de la estabilidad frente a la hidrólisis, demostrándose que el ligando cloruro permanece inalterado.

Se ha demostrado que las modificaciones en la estructura afectan notablemente a las propiedades biológicas. Se evaluó su actividad antiproliferativa frente a células de

cáncer de mama triple negativo, así como frente a una línea sana de mama. Los complejos **22** y **25** presentaron una citotoxicidad similar a la doxorrubicina, pero mejor factor de selectividad frente a las líneas tumorales. Posteriormente, se estudió el potencial invasivo a tiempo real y el complejo **22** mostró los mejores resultados, al igual que lo hizo en el experimento relacionado con la expresión de vimentina. En la evaluación del potencial antimetastásico mediante el estudio de expresión de diversos genes, **22** resultó ser el único compuesto que sigue el criterio marcado para considerar al fármaco antimetastásico. En cambio, la doxorrubicina demostró promover la habilidad invasiva y migratoria de las células estudiadas. Además, se llevó a cabo un estudio por microscopía confocal para visualizar los filamentos intermedios de vimentina, relacionados también con la metástasis, y los resultados obtenidos para **22** fueron también muy prometedores. El ensayo de cierre de la herida demostró que las células tratadas con doxorrubicina tienen tendencia migratoria, mientras que las tratadas con **22** apenas se desplazan. Por último, se realizó un estudio antiproliferativo y antiinvasivo en esferoides en 3D de células de TNBC, el resultado para el complejo **22** fue también muy interesante, mostrando de nuevo un carácter antimetastásico a diferencia del carácter migratorio e invasivo de la doxorrubicina.

Por todo ello, se puede concluir que el complejo **22** se presenta como el mejor candidato de la serie desde el punto de vista de fármaco antiproliferativo y antimetastásico en la línea de cáncer de mama triple negativo estudiada. En el conjunto de experimentos biológicos realizados en este capítulo, **22** presenta resultados muy prometedores y alentadores.

3.5. Bibliografía

(1) Ganesh, K.; Massagué, J. Targeting Metastatic Cancer. *Nat Med* **2021**, *27* (1), 34–44. https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4.

(2) Bergamo, A.; Sava, G. Linking the Future of Anticancer Metal-Complexes to the Therapy of Tumour Metastases. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8818–8835. https://doi.org/10.1039/C5CS00134J.

(3) Brindell, M.; Gurgul, I.; Janczy-Cempa, E.; Gajda-Morszewski, P.; Mazuryk, O. Moving Ru Polypyridyl Complexes beyond Cytotoxic Activity towards Metastasis Inhibition. *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *226*, 111652. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111652.

(4) Tian, Z.; Yang, Y.; Guo, L.; Zhong, G.; Li, J.; Liu, Z. Dual-Functional Cyclometalated Iridium Imine NHC Complexes: Highly Potent Anticancer and Antimetastatic Agents. *Inorg. Chem. Front.* **2018**, *5* (12), 3106–3112. https://doi.org/10.1039/C8QI00920A.

(5) Ma, W.; Ge, X.; Xu, Z.; Zhang, S.; He, X.; Li, J.; Xia, X.; Chen, X.; Liu, Z. Theranostic Lysosomal Targeting Anticancer and Antimetastatic Agents: Half-Sandwich Iridium(III) Rhodamine Complexes. *ACS Omega* **2019**, *4* (12), 15240–15248. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01863.

(6) Liu, X.; Chen, S.; Ge, X.; Zhang, Y.; Xie, Y.; Hao, Y.; Wu, D.; Zhao, J.; Yuan, X.-A.; Tian, L.; Liu, Z. Dual Functions of Iridium(III) 2-Phenylpyridine Complexes:

Metastasis Inhibition and Lysosomal Damage. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *205*, 110983. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110983.

(7) Wang, F.-X.; Chen, M.-H.; Lin, Y.-N.; Zhang, H.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Dual Functions of Cyclometalated Iridium(III) Complexes: Anti-Metastasis and Lysosome-Damaged Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (49), 42471–42481. https://doi.org/10.1021/acsami.7b10258.

(8) Panchangam, R. L.; Rao, R. N.; Balamurali, M. M.; Hingamire, T. B.; Shanmugam, D.; Manickam, V.; Chanda, K. Antitumor Effects of Ir(III)-2H-Indazole Complexes for Triple Negative Breast Cancer. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (23), 17593–17607. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02193.

(9) Bianchini, G.; De Angelis, C.; Licata, L.; Gianni, L. Treatment Landscape of Triple-Negative Breast Cancer-Expanded Options, Evolving Needs. *Nat Rev Clin Oncol* **2022**, *19* (2), 91–113. https://doi.org/10.1038/s41571-021-00565-2.

(10) Zagami, P.; Carey, L. A. Triple Negative Breast Cancer: Pitfalls and Progress. *NPJ Breast Cancer* **2022**, *8* (1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0.

(11) Yousefi, H.; Khosla, M.; Lauterboeck, L.; Okpechi, S. C.; Worthylake, D.; Garai, J.; Zabaleta, J.; Guidry, J.; Zarandi, M. A.; Wyczechowska, D.; Jayawickramarajah, J.; Yang, Q.; Kissil, J.; Alahari, S. K. A Combination of Novel NSC Small Molecule Inhibitor along with Doxorubicin Inhibits Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer through Metabolic Reprogramming. *Oncogene* **2022**, *41* (47), 5076–5091. https://doi.org/10.1038/s41388-022-02497-2.

(12) Humber, C. E.; Tierney, J. F.; Symonds, R. P.; Collingwood, M.; Kirwan, J.; Williams, C.; Green, J. A. Chemotherapy for Advanced, Recurrent or Metastatic Endometrial Cancer: A Systematic Review of Cochrane Collaboration. *Ann. Oncol.* **2007**, *18* (3), 409–420. https://doi.org/10.1093/annonc/mdl417.

(13) Zhang, X.; Hu, C.; Kong, C.-Y.; Song, P.; Wu, H.-M.; Xu, S.-C.; Yuan, Y.-P.; Deng, W.; Ma, Z.-G.; Tang, Q.-Z. FNDC5 Alleviates Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Activating AKT. *Cell Death Differ* **2020**, *27* (2), 540–555. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0372-z.

(14) Yu, X.; Ruan, Y.; Huang, X.; Dou, L.; Lan, M.; Cui, J.; Chen, B.; Gong, H.; Wang, Q.; Yan, M.; Sun, S.; Qiu, Q.; Zhang, X.; Man, Y.; Tang, W.; Li, J.; Shen, T. Dexrazoxane Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting Both Apoptosis and Necroptosis in Cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *523* (1), 140–146. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.027.

(15) Carmo-Pereira, J.; Costa, F. O.; Henriques, E.; Godinho, F.; Cantinho-Lopes, M. G.; Sales-Luis, A.; Rubens, R. D. A Comparison of Two Doses of Adriamycin in the Primary Chemotherapy of Disseminated Breast Carcinoma. *Br J Cancer* **1987**, *56* (4), 471–473. https://doi.org/10.1038/bjc.1987.226.

(16) Sun, Z.; Zhou, D.; Yang, J.; Zhang, D. Doxorubicin Promotes Breast Cancer Cell Migration and Invasion via DCAF13. *FEBS Open Bio* **2022**, *12* (1), 221–230. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13330.

(17) Ma, J.; Zhang, X.; Huang, X.; Luo, S.; Meggers, E. Preparation of Chiral-at-Metal Catalysts and Their Use in Asymmetric Photoredox Chemistry. *Nat Protoc* **2018**, *13* (4), 605–632. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.138.

(18) Betti, M.; Genesio, E.; Marconi, G.; Sanna Coccone, S.; Wiedenau, P. A Scalable Route to the SMO Receptor Antagonist SEN826: Benzimidazole Synthesis via Enhanced in Situ Formation of the Bisulfite–Aldehyde Complex. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18* (6), 699–708. https://doi.org/10.1021/op4002092.

(19) Novohradsky, V.; Vigueras, G.; Pracharova, J.; Cutillas, N.; Janiak, C.; Kostrhunova, H.; Brabec, V.; Ruiz, J.; Kasparkova, J. Molecular Superoxide Radical Photogeneration in Cancer Cells by Dipyridophenazine Iridium(III) Complexes. *Inorg. Chem. Front.* **2019**, *6* (9), 2500–2513. https://doi.org/10.1039/C9QI00811J.

(20) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhloufi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. Novel C,N-Cyclometalated

Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7310–7327. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01194.

(21) Yoshikawa, N.; Yamabe, S.; Kanehisa, N.; Kai, Y.; Takashima, H.; Tsukahara, K. Synthesis, Characterization, and DFT Investigation of IrIII Tolylterpyridine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007* (13), 1911–1919. https://doi.org/10.1002/ejic.200600995.

(22) Porras, J. A.; Mills, I. N.; Transue, W. J.; Bernhard, S. Highly Fluorinated Ir(III)–2,2′:6′,2″-Terpyridine–Phenylpyridine–X Complexes via Selective C–F Activation: Robust Photocatalysts for Solar Fuel Generation and Photoredox Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (30), 9460–9472. https://doi.org/10.1021/jacs.6b03246.

(23) Wang, C.; Chen, J.; Xu, J.; Wei, F.; Yam, C. Y.; Wong, K. M.-C.; Sit, P. H.-L.; Teoh, W. Y. Selective Visible Light Reduction of Carbon Dioxide over Iridium(III)-Terpyridine Photocatalysts. *Materials Today Chemistry* **2021**, *22*, 100563. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100563.

(24) DiLuzio, S.; Mdluli, V.; Connell, T. U.; Lewis, J.; VanBenschoten, V.; Bernhard, S. High-Throughput Screening and Automated Data-Driven Analysis of the Triplet Photophysical Properties of Structurally Diverse, Heteroleptic Iridium(III) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (2), 1179–1194. https://doi.org/10.1021/jacs.0c12290.

(25) Huang, H.; Banerjee, S.; Qiu, K.; Zhang, P.; Blacque, O.; Malcomson, T.; Paterson, M. J.; Clarkson, G. J.; Staniforth, M.; Stavros, V. G.; Gasser, G.; Chao, H.; Sadler, P. J. Targeted Photoredox Catalysis in Cancer Cells. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (11), 1041–1048. https://doi.org/10.1038/s41557-019-0328-4.

(26) Di, L.; Xing, Y.; Yang, Z.; Qiao, C.; Xia, Z. Photostable Aggregation-Induced Emission of Iridium(III) Complex Realizing Robust and High-Resolution Imaging of Latent Fingerprints. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2023**, *375*, 132898. https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132898.

(27) Zhang, W.-Y.; Yi, Q.-Y.; Wang, Y.-J.; Du, F.; He, M.; Tang, B.; Wan, D.; Liu, Y.-J.; Huang, H.-L. Photoinduced Anticancer Activity Studies of Iridium(III) Complexes Targeting Mitochondria and Tubules. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 568–584. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.013.

(28) Li, J.; Chen, H.; Zeng, L.; Rees, T. W.; Xiong, K.; Chen, Y.; Ji, L.; Chao, H. Mitochondria-Targeting Cyclometalated Iridium(III) Complexes for Tumor Hypoxic Imaging and Therapy. *Inorg. Chem. Front.* **2019**, *6* (4), 1003–1010. https://doi.org/10.1039/C9QI00081J.

(29) Hao, J.; Zhang, H.; Tian, L.; Yang, L.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Xing, D. Evaluation of Anticancer Effects in Vitro of New Iridium(III) Complexes Targeting the Mitochondria. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *221*, 111465. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111465.

(30) Vigueras, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kostrhunova, H.; Kasparkova, J.; Ruiz, J.; Brabec, V. A Photoactivated Ir(III) Complex Targets Cancer Stem Cells and Induces Secretion of Damage-Associated Molecular Patterns in Melanoma Cells Characteristic of Immunogenic Cell Death. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, *8* (21), 4696–4711. https://doi.org/10.1039/D1QI00856K.

(31) Eastman, A. Improving Anticancer Drug Development Begins with Cell Culture: Misinformation Perpetrated by the Misuse of Cytotoxicity Assays. *Oncotarget* **2016**, *8* (5), 8854–8866. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12673.

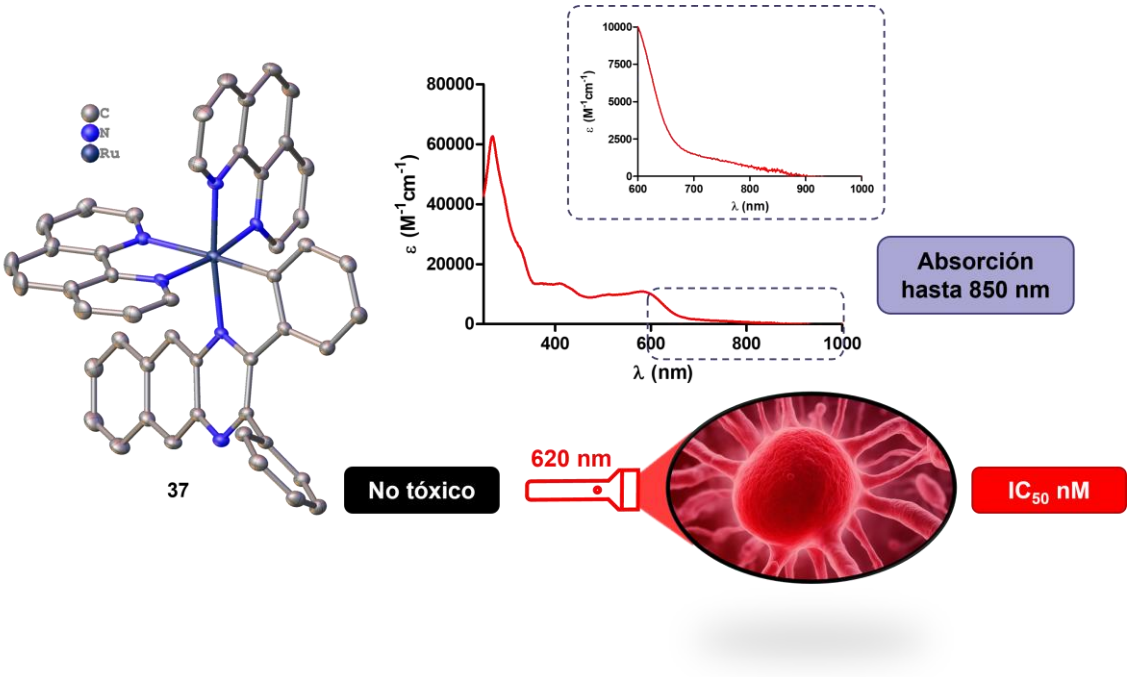
(32) Henriet, E.; Knutsdottir, H.; Grasset, E. M.; Dunworth, M.; Haynes, M.; Bader, J. S.; Ewald, A. J. Triple Negative Breast Tumors Contain Heterogeneous Cancer Cells Expressing Distinct KRAS-Dependent Collective and Disseminative Invasion Programs. *Oncogene* **2023**, *42* (10), 737–747. https://doi.org/10.1038/s41388-022-02586-2.

(33) Xu, H. N.; Nioka, S.; Glickson, J. D.; Chance, B.; Li, L. Z. Quantitative Mitochondrial Redox Imaging of Breast Cancer Metastatic Potential. *JBO* **2010**, *15* (3), 036010. https://doi.org/10.1117/1.3431714.
(34) Bouchalova, P.; Bouchal, P. Current Methods for Studying Metastatic Potential of Tumor Cells. *Cancer Cell Int* **2022**, *22* (1), 394. https://doi.org/10.1186/s12935-022-02801-w.
(35) Winter, M.; Meignan, S.; Völkel, P.; Angrand, P.-O.; Chopin, V.; Bidan, N.; Toillon, R.-A.; Adriaenssens, E.; Lagadec, C.; Le Bourhis, X. Vimentin Promotes the Aggressiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Surviving Chemotherapeutic Treatment. *Cells* **2021**, *10* (6), 1504. https://doi.org/10.3390/cells10061504.
(36) Wan, P.-K.; Tong, K.-C.; Lok, C.-N.; Zhang, C.; Chang, X.-Y.; Sze, K.-H.; Wong, A. S. T.; Che, C.-M. Platinum(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes Arrest Metastatic Tumor Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* (17), e2025806118. https://doi.org/10.1073/pnas.2025806118.
(37) Chen, W.-C.; Lai, Y.-A.; Lin, Y.-C.; Ma, J.-W.; Huang, L.-F.; Yang, N.-S.; Ho, C.-T.; Kuo, S.-C.; Way, T.-D. Curcumin Suppresses Doxorubicin-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition via the Inhibition of TGF-β and PI3K/AKT Signaling Pathways in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (48), 11817–11824. https://doi.org/10.1021/jf404092f.
(38) Liu, C.-L.; Chen, M.-J.; Lin, J.-C.; Lin, C.-H.; Huang, W.-C.; Cheng, S.-P.; Chen, S.-N.; Chang, Y.-C. Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through the Upregulation of the RhoA/MLC Pathway. *J Breast Cancer* **2019**, *22* (2), 185–195. https://doi.org/10.4048/jbc.2019.22.e22.
(39) Mohammed, S.; Shamseddine, A. A.; Newcomb, B.; Chavez, R. S.; Panzner, T. D.; Lee, A. H.; Canals, D.; Okeoma, C. M.; Clarke, C. J.; Hannun, Y. A. Sublethal Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells: Role of Src Family Non-Receptor Tyrosine Kinases. *Breast Cancer Res* **2021**, *23* (1), 76. https://doi.org/10.1186/s13058-021-01452-5.
(40) Li, Q.-Q.; Xu, J.-D.; Wang, W.-J.; Cao, X.-X.; Chen, Q.; Tang, F.; Chen, Z.-Q.; Liu, X.-P.; Xu, Z.-D. Twist1-Mediated Adriamycin-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Relates to Multidrug Resistance and Invasive Potential in Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (8), 2657–2665. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2372.
(41) Mirzaei, S.; Abadi, A. J.; Gholami, M. H.; Hashemi, F.; Zabolian, A.; Hushmandi, K.; Zarrabi, A.; Entezari, M.; Aref, A. R.; Khan, H.; Ashrafizadeh, M.; Samarghandian, S. The Involvement of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Doxorubicin Resistance: Possible Molecular Targets. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *908*, 174344. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174344.
(42) De Pascalis, C.; Pérez-González, C.; Seetharaman, S.; Boëda, B.; Vianay, B.; Burute, M.; Leduc, C.; Borghi, N.; Trepat, X.; Etienne-Manneville, S. Intermediate Filaments Control Collective Migration by Restricting Traction Forces and Sustaining Cell–Cell Contacts. *J. Cell Biol.* **2018**, *217* (9), 3031–3044. https://doi.org/10.1083/jcb.201801162.
(43) Strouhalova, K.; Přechová, M.; Gandalovičová, A.; Brábek, J.; Gregor, M.; Rosel, D. Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers* **2020**, *12* (1), 184. https://doi.org/10.3390/cancers12010184.
(44) Hugo, H.; Ackland, M. L.; Blick, T.; Lawrence, M. G.; Clements, J. A.; Williams, E. D.; Thompson, E. W. Epithelial-Mesenchymal and Mesenchymal—Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213* (2), 374–383. https://doi.org/10.1002/jcp.21223.
(45) Mendez, M. G.; Kojima, S.-I.; Goldman, R. D. Vimentin Induces Changes in Cell Shape, Motility, and Adhesion during the Epithelial to Mesenchymal Transition. *FASEB J.* **2010**, *24* (6), 1838–1851. https://doi.org/10.1096/fj.09-151639.

(46) Xuan, B.; Ghosh, D.; Jiang, J.; Shao, R.; Dawson, M. R. Vimentin Filaments Drive Migratory Persistence in Polyploidal Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117* (43), 26756–26765. https://doi.org/10.1073/pnas.2011912117.
(47) Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat Protoc* **2007**, *2* (2), 329–333. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30.
(48) Bergers, G.; Fendt, S.-M. The Metabolism of Cancer Cells during Metastasis. *Nat Rev Cancer* **2021**, *21* (3), 162–180. https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2.
(49) He, Y.; Xiong, L.; Gao, X.; Hai, M.; Liu, Y.; Wang, G.; Chen, G.; Shuai, J.; Jiao, Y.; Zhang, X.; Liu, R.; Liu, L. Morphological Quantification of Proliferation-to-Invasion Transition in Tumor Spheroids. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.* **2020**, *1864* (1), 129460. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129460.
(50) Froehlich, K.; Haeger, J.-D.; Heger, J.; Pastuschek, J.; Photini, S. M.; Yan, Y.; Lupp, A.; Pfarrer, C.; Mrowka, R.; Schleußner, E.; Markert, U. R.; Schmidt, A. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2016**, *21* (3), 89–98. https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2.
(51) Amaral, R. L. F.; Miranda, M.; Marcato, P. D.; Swiech, K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Front. Physiol.* **2017**, *8* (605). https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00605.

Capítulo 4

Complejos ciclometalados de Ir(III) y Ru(II) con ligandos de tipo quinoxalina: fotosensibilizadores para terapia fotodinámica



4.1. Introducción

Uno de los grandes retos en el campo de la terapia fotodinámica es, como se ha mencionado en el Capítulo 1, desarrollar fotosensibilizadores que absorban en la ventana fototerapéutica, en la región del rojo o infrarrojo cercano, ya que esas longitudes de onda resultan más penetrantes y menos dañinas para los tejidos.[1]

En este sentido, se ha descrito que los complejos de Ir(III) que contienen un ligando ciclometalado 2,3-difenilbenzo[*g*]quinoxalina (dpbq)[2] poseen bandas de absorción débiles pero anchas entre 600–800 nm debido a la absorción directa desde el estado singlete fundamental hasta el triplete excitado, aumentando así la población de éste. Sin embargo, este eficiente cruce entre sistemas también facilita la desactivación desde el estado triplete excitado más bajo, reduciendo su tiempo de vida media, por lo que equilibrar estos dos efectos es fundamental para el desarrollo de complejos metálicos con tiempos de vida media elevados y bandas anchas de absorción, tanto en el estado excitado como en el fundamental.[3]

De acuerdo con esta idea, McFarland *et al*. sintetizaron complejos de iridio con dicho ligando dpbq,[4] y observaron que las transiciones prohibidas por la regla de espín se desplazan hacia la región del rojo debido a la elevada conjugación π de dicho ligando, consiguiendo así que los complejos presentaran colas de absorción hasta los 800 nm. Además, este ligando juega un papel dominante contribuyendo en la mayoría de las bandas de absorción.[4]

Por otro lado, existen algunos ejemplos de complejos ciclometalados de Ru(II) como fotosensiblizadores para PDT.[5–8] Se ha observado que la ciclometalación reduce la energía de la transferencia de carga metal-ligando (^{3}MLCT) y acorta el tiempo de vida del estado excitado en este tipo de complejos.[9] Además, el carácter aniónico del ligando provoca un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción MLCT.[10] Chao *et al*. observaron importantes mejoras en la citotoxicidad de los complejos de Ru(II) que contienen ligandos C^N en comparación con los que presentan sólo N^N.[11] Recientemente, Gasser y colaboradores han descrito complejos de este tipo capaces de fotoactivarse en el NIR.[12]

Por todo ello, nos propusimos la síntesis y caracterización de dos complejos de Ir(III) de tipo $[Ir(C^N)_2(N^N)]^+$, donde C^N representa al ligando quinoxalina dpbq o mopqx, y N^N un ligando basado en benzimizadol, escogido particularmente debido a los resultados de fotoactivación demostrados en un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación sobre complejos de iridio conteniendo dicho ligando.[13] Así como la síntesis y caracterización de tres complejos de Ru(II) de fórmula general $[Ru(N^N)_2(C^N)]^+$

donde N^N es fenantrolina y C^N una quinoxalina basada también en dpbq (**Figura 4.1**). Todos los compuestos fueron caracterizados por diferentes técnicas químicas y fotofísicas con el fin de evaluar sus propiedades y su posible aplicación como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica. Además, se realizaron ensayos preliminares de su actividad citotóxica en células tumorales y todos ellos mostraron fotoactivación.

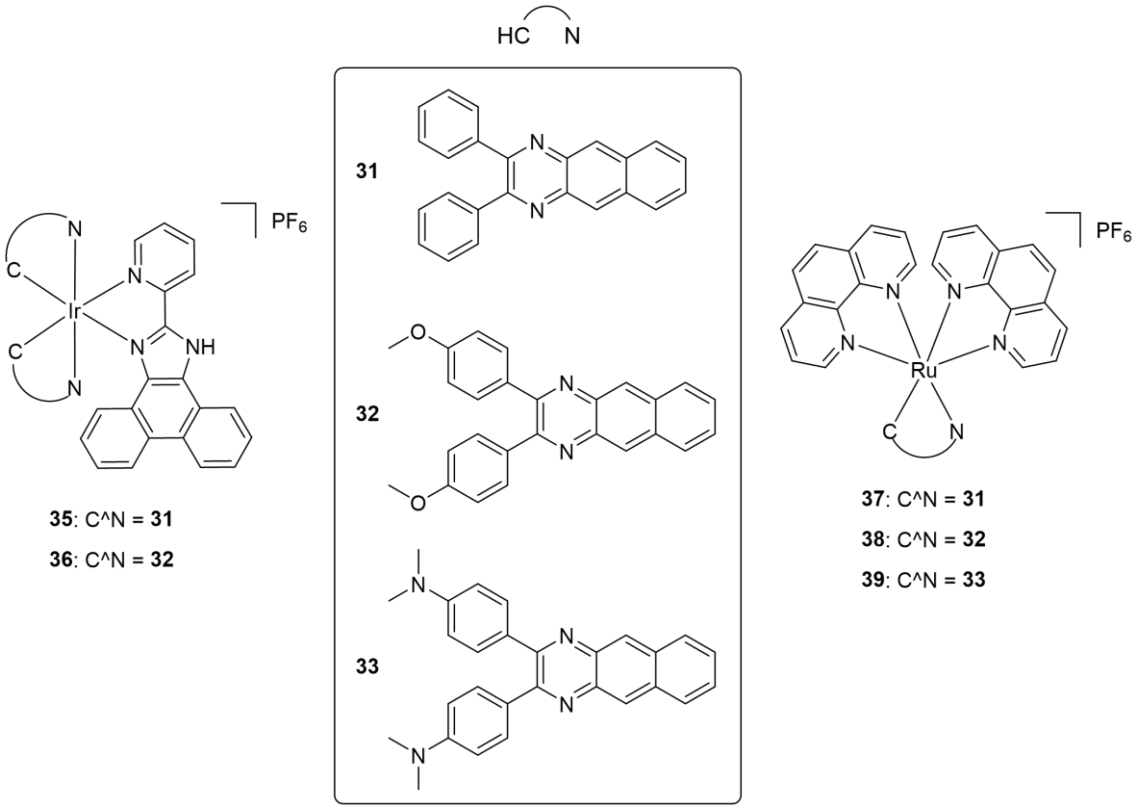


Figura 4.1. Estructura general de los nuevos compuestos sintetizados.

4.2. Resultados y discusión

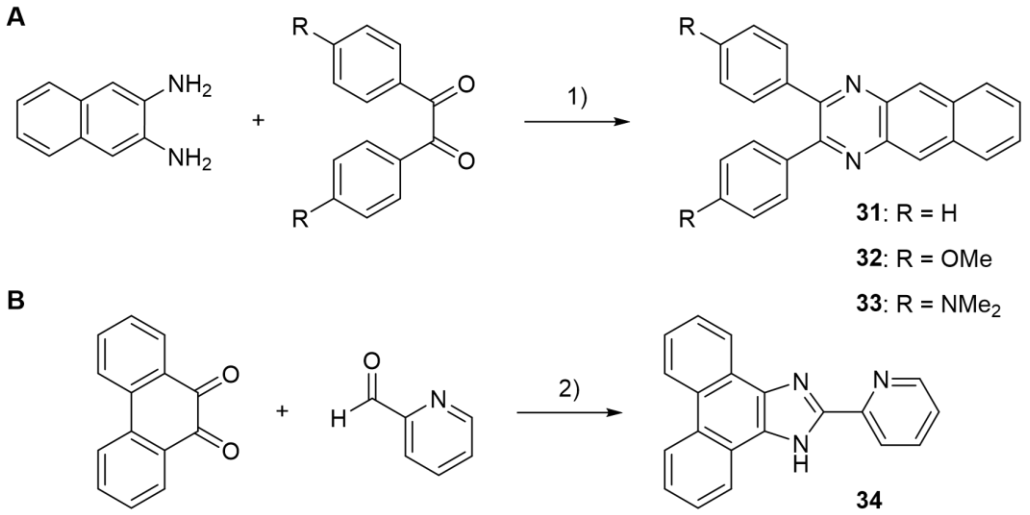
4.2.1. Síntesis

Síntesis de proligandos HC^N y ligando N^N

Se prepararon tres proligandos de tipo C,N-dadores con un núcleo común de 2,3-difenilquinoxalina y los sustituyentes OMe y NMe_2, con el fin de estudiar el efecto de desplazamiento hacia el rojo de las bandas de absorción observado previamente para complejos de este tipo con sustituyentes dadores.[14] Se sintetizó también el ligando N,N-dador con un núcleo de benzimidazol, 2-(piridin-2-il)-1*H*-fenantro[9,10-*d*]imidazol.

Tanto los proligandos previamente descritos (**31** y **32**) como el nuevo (**33**), se sintetizaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía.[3,15] Por condensación de la diamina 2,3-diaminonaftaleno y la diona correspondiente: bencilo, 4,4'-dimetoxibencilo o 4,4'-bis(dimetilamino)bencilo, en presencia de ácido trifluoroacético (**Esquema 4.1A**). El ligando N^N (**34**) se preparó siguiendo la

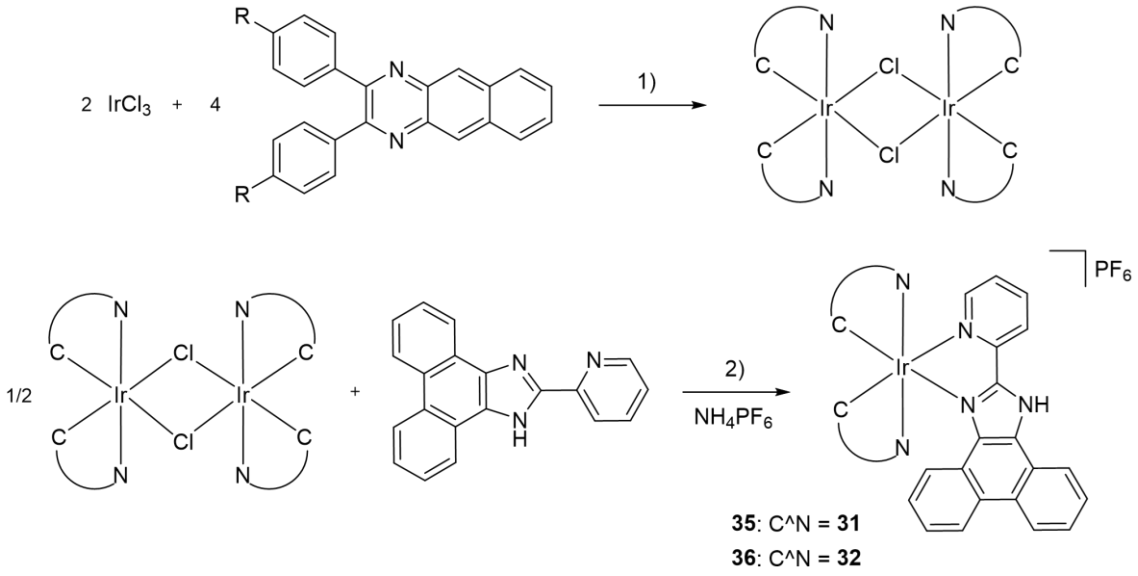
bibliografía,[16] por condensación entre 9,10-fenantrenoquinona y piridina-2-carboxaldehído en presencia de acetato de amonio y iodo (**Esquema 4.1B**).



Esquema 4.1. Síntesis de los ligandos (A) C^N de tipo quinoxalina y (B) N^N derivado de benzimidazol. Condiciones de reacción: (1) EtOH, CF_3COOH, 65 ºC, 24 h; (2) EtOH, NH_4AcO, I_2, 80 ºC, 18 h.

Síntesis de los complejos metálicos de Ir(III)

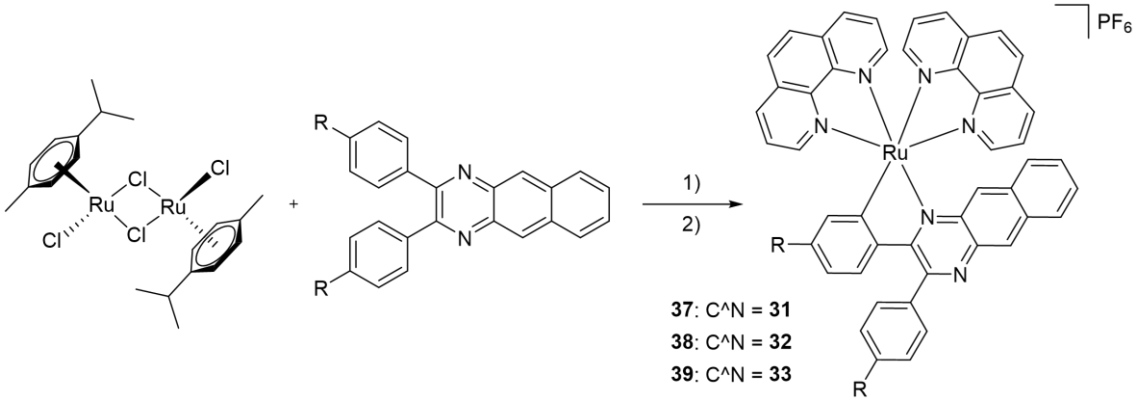
Los complejos de Ir(III) se prepararon siguiendo procedimientos descritos con pequeñas modificaciones.[3] La síntesis se realizó en dos etapas (**Esquema 4.2**), ambas bajo atmósfera de nitrógeno. Primero se obtuvo el dímero, por reacción de $IrCl_3$ con el proligando correspondiente (**31** ó **32**) en 2-etoxietanol a 135 ºC durante 48 h. Posteriormente, tuvo lugar la reacción del dímero con **34** en 2-etoxietanol a 135 ºC, en presencia de $AgCF_3SO_3$, durante 24 h. Por último, se adicionó NH_4PF_6 para cambiar el contraión.



Esquema 4.2. Síntesis de los complejos de Ir(III). Condiciones de reacción: (1) 2-etoxietanol, 135 ºC, 48 h, atm. N_2; (2) 2-etoxietanol, $AgCF_3SO_3$, 135 ºC, 24 h, atm. N_2.

Síntesis de los complejos metálicos de Ru(II)

Los complejos de Ru(II) se prepararon también siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía con pequeñas modificaciones.[7] La síntesis consistió en dos etapas (**Esquema 4.3**), ambas realizadas en un microondas de reacción. En primer lugar, se hizo reaccionar el dímero de dicloro(*p*-cimeno)rutenio(II) con el proligando correspondiente (**31**–**33**) en presencia de KOAc y KPF_6 en acetonitrilo a 90 ºC durante 3 h, dando lugar a un intermedio que, sin mayor purificación, se hizo reaccionar con la fenantrolina, en metanol a 90 ºC durante 3 h.



Esquema 4.3. Síntesis de los complejos de Ru(II). Condiciones de reacción: (1) acetonitrilo, KOAc, KPF_6, 90 ºC, 3 h; (2) metanol, fenantrolina, 90 ºC, 3 h.

4.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos

Los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante diferentes técnicas: análisis elemental, espectrometria ESI-MS, HPLC/MS, así como ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN.

Espectroscopia de RMN

Dada la complejidad de los espectros ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN (**Figuras A4.1**–**A4.18** del Anexo III) por el elevado número de señales en la zona aromática, no se ha podido llevar a cabo la asignación. A pesar de ello, es posible hacer un pequeño análisis de los distintos espectros.

Tanto el nuevo proligando sintetizado (**33**) como los complejos presentan señales aromáticas en la región δ 9,50–6,00 ppm. Además, los compuestos que contienen el ligando **32** muestran las resonancias características de los grupos OMe (**Figura 4.2A**). En el caso de **36**, dado que los ligandos C^N no son equivalentes y los grupos OMe de una misma quinoxalina tampoco, se observan cuatro singletes a δ 3,98, 3,81, 3,46 y 3,24 ppm integrando cada uno de ellos por 3 protones. Sin embargo, el análogo de Ru(II), **38**, sólo presenta un ligando C^N en su estructura, por lo que sólo observamos dos singletes a δ 3,91 y 3,27 ppm con una integral por 3 protones.

Por otro lado, el proligando **33** y el complejo que lo contiene, **39**, presentan las señales de los grupos NMe_2 (**Figura 4.2B**). Para **33** son equivalentes y aparecen como

un singlete a δ 3,00 ppm que integra por 12 protones, mientras que **39** muestra dos singletes a δ 3,04 y 2,41 ppm que integran por 6 protones.

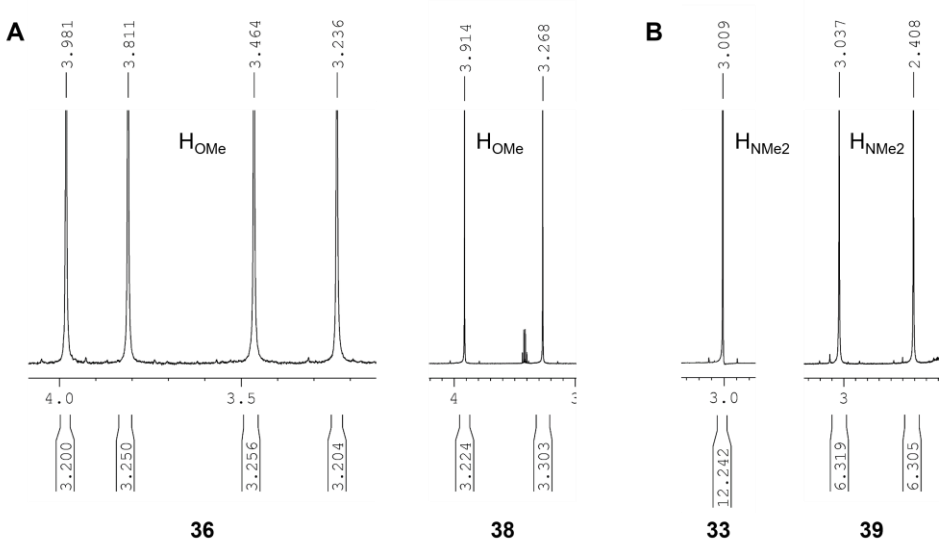


Figura 4.2. Señales características de los espectros ^{1}H-RMN de (A) **36** y **38** en CD_3CN y (B) **33** y **39** en $CDCl_3$ y CD_3CN, respectivamente. A t.a., 400 MHz.

De la misma manera, los espectros de ^{13}C-RMN presentan los mismos grupos de señales: las aromáticas comunes al proligando **33** y a los complejos (δ 170–100 ppm); cuatro señales para **36** a δ 56,3, 56,0, 55,7 y 55,5 ppm y dos en el caso de **38** a δ 56,2 y 54,9 ppm debidas a los OMe (**Figura 4.3A**); una señal a δ 40,4 ppm en el espectro de **33** y dos a δ 40,4 y 39,3 ppm para **39** correspondientes a los grupos NMe_2 (**Figura 4.3B**).

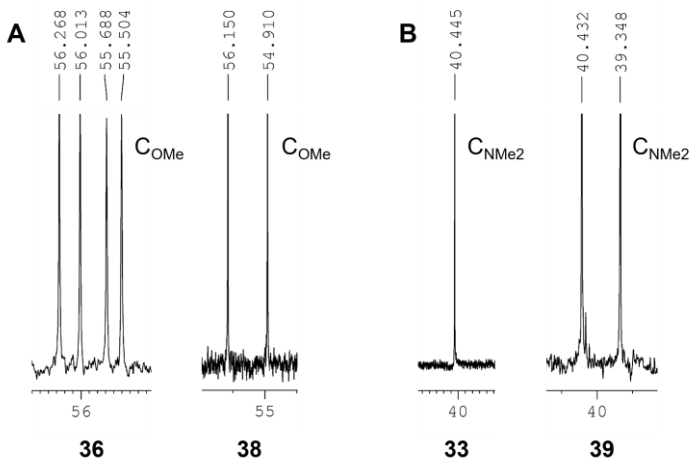


Figura 4.3. Señales características de los espectros ^{13}C-RMN de (A) **36** y **38** en CD_3CN y (B) **33** y **39** en $CDCl_3$ y CD_3CN, respectivamente. A t.a., 101 MHz.

Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

Para completar la caracterización de los nuevos compuestos sintetizados se registraron sus espectros de masas tanto por inserción directa mediante ionización electrospray (ESI-MS) (**Figuras A4.19**–**A4.24**), como por HPLC/MS.

El proligando **33** se caracterizó mediante ESI-MS por inserción directa, obteniendo un espectro correspondiente al aducto $[M+H]^+$, cuyo perfil isotópico concuerda con el calculado (**Figura A4.19** y **Tabla 4.1**). Para los complejos, además de esta técnica, se empleó el HPLC/MS. En la **Figura 4.4** se recogen los distintos cromatogramas que, junto con el análisis elemental (**Tabla 4.1**), confirmaron la estequiometría propuesta y la pureza superior al 96%. Todos ellos muestran un único pico cuyo espectro de masas coincide con el calculado teóricamente para el ion molecular $[M\text{-}PF_6]^+$ (**Figuras A4.25–A4.26** y **Tabla 4.1**) y el perfil isotópico obtenido coincide con el teórico en todos los casos.

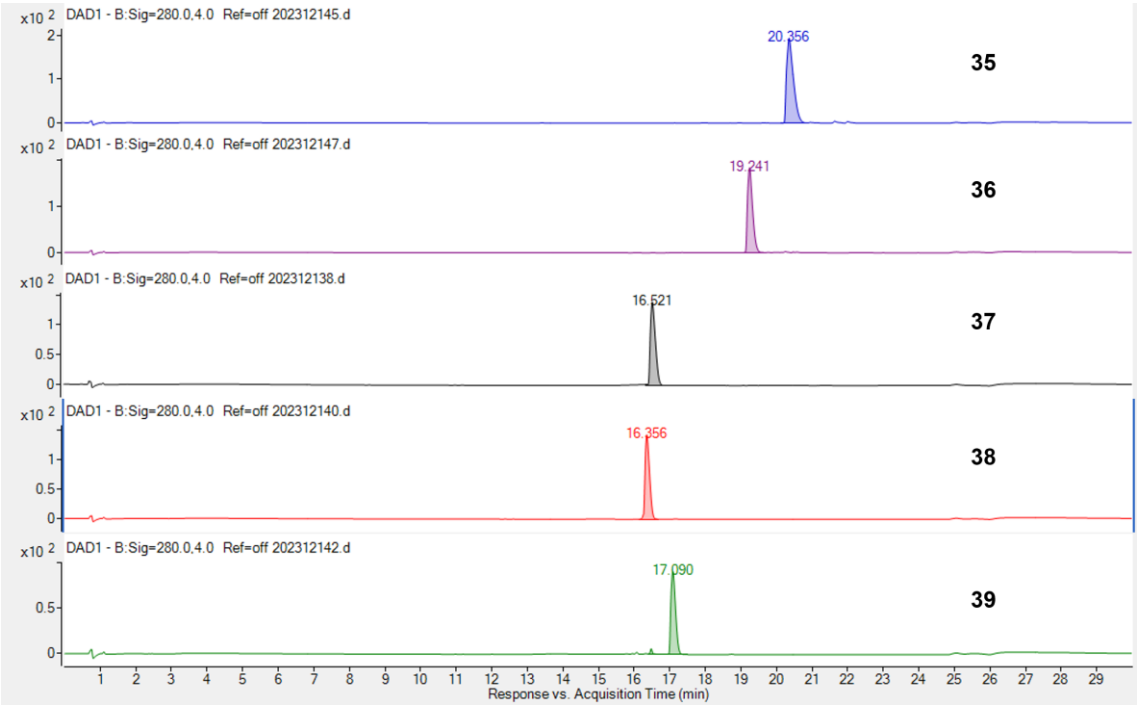


Figura 4.4. Cromatograma de los complejos sintetizados disueltos en acetonitrilo y registrados con un gradiente de la mezcla ACN:H_2O, λ= 280 nm.

Tabla 4.1. Resultados masas y análisis elemental de los compuestos sintetizados.

Compuesto	t_R (min)	Fragmento	(m/z)[a]	%C[a]	%H[a]	%N[a]
33	-	$[M+H]^+$	419,2235 (419,2230)	80,21 (80,16)	6,43 (6,49)	13,22 (13,35)
35	20,356	$[M\text{-}PF_6]^+$	1150,3222 (1150,3220)	63,01 (63,05)	3,28 (3,35)	7,58 (7,57)
36	19,241	$[M\text{-}PF_6]^+$	1270,3642 (1270,3632)	61,02 (61,10)	3,42 (3,63)	7,05 (6,93)
37	16,521	$[M\text{-}PF_6]^+$	793,1674 (793,1648)	61,45 (61,47)	3,51 (3,33)	8,81 (8,96)
38	16,356	$[M\text{-}PF_6]^+$	853,1893 (853,1859)	60,14 (60,18)	3,54 (3,54)	8,30 (8,42)
39	17,090	$[M\text{-}PF_6]^+$	879,2515 (879,2498)	60,98 (60,99)	4,07 (4,04)	11,01 (10,94)

[a]Valores teóricos entre paréntesis.

4.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante rayos-X

La estructura molecular del complejo **37** se corroboró mediante difracción de rayos-X. Los cristales se obtuvieron por evaporación lenta del disolvente de una disolución del complejo en CD_3CN en un tubo de RMN. La resolución del cristal la llevó a cabo la Dra. Delia Bautista del Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia. En la **Figura 4.5** se muestra la estructura del complejo **37** y algunas de las distancias y ángulos alrededor del centro metálico, que son similares a las observadas previamente en complejos de este tipo.[7] Además, como se ha descrito previamente, la distancia del enlace Ru-N2 *trans* al Ru-C48, es mayor que el resto de enlaces Ru-N debido a la elevada influencia *trans* del átomo de carbono.[6,7] En la **Tabla 4.2** se recogen los datos cristalográficos y de la celdilla unidad. En la **Tabla A4.1** del Anexo III se muestran el resto de los datos del refinamiento.

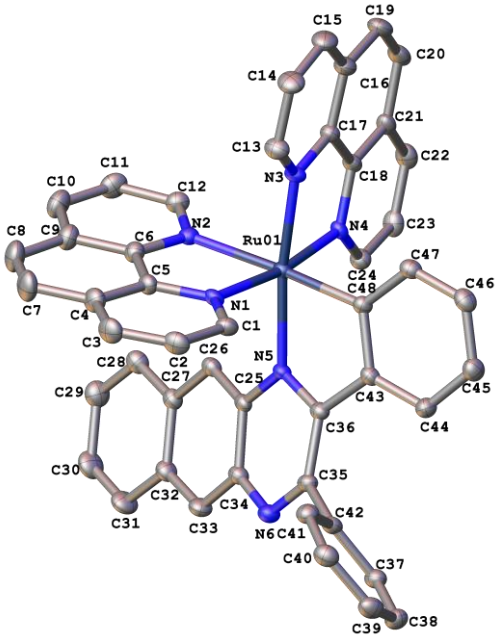


Figura 4.5. Estructura cristalina del complejo **37**. Distancias de enlace [Å]: Ru(01)-C(48): 2,016(3); Ru(01)-N(5): 2,103(2); Ru(01)-N(1): 2,068(2); Ru(01)-N(2): 2,168(2); Ru(01)-N(3): 2,054 (2); Ru(01)-N(4): 2,050(2). Ángulos [º]: C(48)-Ru(01)-N(5): 79,34(9); C(48)-Ru(01)-N(1): 94,65(9); C(48)-Ru(01)-N(2): 172,97(9); C(48)-Ru(01)-N(3): 92,62(10); C(48)-Ru(01)-N(4): 93,57(9); N(5)-Ru(01)-N(1): 86,86(8); N(5)-Ru(01)-N(2): 100,54(8); N(5)-Ru(01)-N(3): 171,90(9); N(5)-Ru(01)-N(4): 99,40(8); N(1)-Ru(01)-N(2): 78,34(8); N(1)-Ru(01)-N(3): 94,80(8); N(1)-Ru(01)-N(4): 170,48(9); N(2)-Ru(01)-N(3): 87,56(8); N(2)-Ru(01)-N(4): 93,39(8); N(3)-Ru(01)-N(4): 80,01(8).

Tabla 4.2. Datos cristalográficos del complejo **37**.

Sistema cristalino: triclínico. Grupo espacial: P-1					
a [Å]	**b [Å]**	**c [Å]**	**α [º]**	**β [º]**	**γ [º]**
12,3082(18)	12,9969(19)	15,014(2)	82,486(5)	71,564(6)	65,822(5)

La estructura cristalina confirma la geometría octaédrica distorsionada típica de este tipo de complejos.[6,7] Tanto los dos ligandos fenantrolina como la quinoxalina se

unen al centro metálico formando un quelato bidentado κ^2-N,N y κ^2-C,N. En el caso del C^N, se observa que los dos anillos fenilo no se encuentran en el mismo plano. Por otro lado, se estudiaron las interacciones intramoleculares e intermoleculares y, como se recoge en la **Figura 4.6**, el complejo establece enlaces de hidrógeno entre el H2 y el F1 del contraion PF_6 (**Tabla 4.3**).

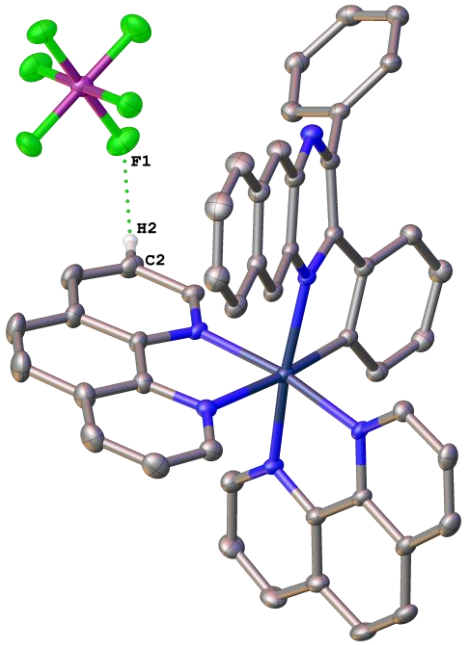


Figura 4.6. Interacciones por enlace de hidrógeno observadas para el complejo **37**. Se han omitido los hidrógenos no participantes en dicho enlace por mayor claridad.

Tabla 4.3. Enlaces de hidrógeno observados en la estructura cristalina.

D-H···A	d(D-H) [Å]	d(H···A) [Å]	d(D···A) [Å]	<(DHA) [º]
C(2)-H(2)···F(1)[a]	0,95	2,55	3,460(3)	161,5

[a]Transformación de simetría usada para generar los átomos equivalentes: x+1,y-1,z

Se estudiaron también las posibles interacciones π-π. En la **Figura 4.7** se recogen las observadas entre los cationes del complejo **37**. Estas se producen entre los anillos del plano 1 (C4, C5, C6, C7, C8 y C9) y entre los del plano 2 (N4, C18, C21, C22, C23 y C24) (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4. Parámetros de las interacciones π-π.

	Distancia centroide centroide [Å]	Ángulo diedro [º]	Desplazamiento
Plano 1 - Plano 1	3,725(2)	0,03(17)	1,511
Plano 2 - Plano 2	3,5458(16)	0,03(13)	1,267

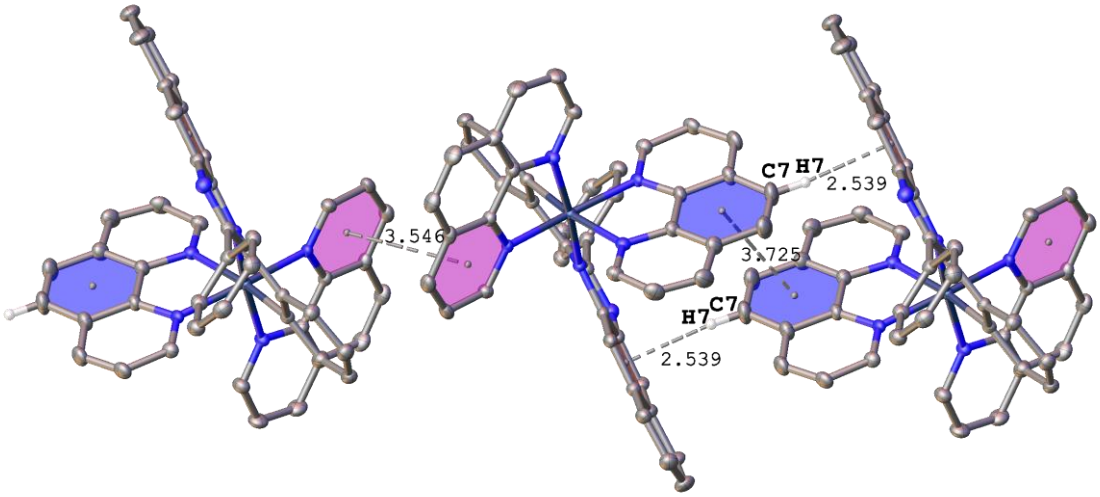


Figura 4.7. Interacciones π-π observadas en la estructura cristalina del complejo **37**.

Además, se observa una interacción del tipo C-H···π entre moléculas vecinas, C(7)H(7)-Plano 3 (C25, C26, C27, C32, C33 y C34). Esta interacción da lugar a que las moléculas se empaqueten formando dímeros (**Figura 4.8** y **Tabla 4.5**).

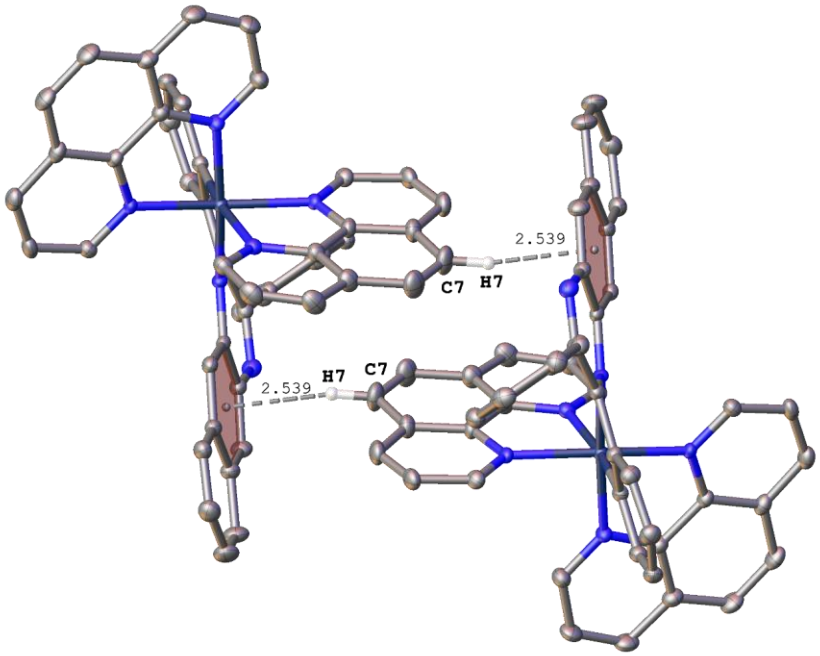


Figura 4.8. Interacción de tipo C-H···π observada en la estructura cristalina del complejo **37**.

Tabla 4.5. Parámetro de la interacción C-H···π.

	Distancia C-Cg [Å]	**Distancia H-Cg [Å]**	**Ángulo C-H···Cg [º]**
C7()-H(7)···Cg3	3,411(3)	2,539	153

Cg3: centroide del Plano 3 (C25, C26, C27, C32, C33 y C34)

4.2.4. Espectroscopia de absorción UV/Vis

Se han registrado los espectros de absorción UV/Vis en acetonitrilo y en agua (1% DMSO) de todos los complejos (**Figura 4.9**). En el caso de los compuestos de iridio, **35** y **36**, se observan bandas intensas de elevada energía en la región de 250–350 nm debidas a las transiciones de transferencia de carga centradas en los ligandos, de tipo π−π*.[4] Las menos intensas de menor energía y valores de longitud de onda por encima de los ~370 nm se atribuyen a una mezcla de transiciones de tipo ^{1}π,π*/LLCT/^{1}MLCT/^{1}ILCT/^{1}LMCT.[4] Además, como se muestra en la ampliación de los espectros, presentan colas débiles por encima de ~600 nm que, como se ha publicado para otros complejos de Ir(III) con este tipo de ligandos, probablemente se deban a transiciones directas S_0-T_n prohibidas por la regla de selección de espín (^{3}π,π*/^{3}CT).[17] En el caso de los complejos de rutenio, **37**–**39**, también presentan bandas intensas de mayor energía en la región por debajo de los ~350 nm, asociadas a las transferencias de carga intraligando de tipo π−π*. Las bandas de menor energía se deben a transferencias de carga metal-ligando (MLCT), tanto de tipo Ru^{2+}→N^N como Ru^{2+}→C^N. Además, al igual que los complejos de iridio, muestran colas de absorción, pero en este caso se localizan en la zona de los ~800 nm.[18]

Como se puede observar, las modificaciones estructurales del ligando C^N afectan a los espectros de absorción de los complejos de Ir(III) y de Ru(II) en ambos medios. En los que contienen sustituyentes dadores, se produce un desplazamiento batocrómico en las bandas de menor energía, sobre todo en el caso de **39**, probablemente debido al mayor carácter dador del grupo dimetilamino. En la **Tabla 4.6** se encuentran recogidos los datos espectroscópicos de todos los complejos en ambos disolventes y en la **Figura A4.27** se muestran los espectros de absorción de todos los complejos juntos.

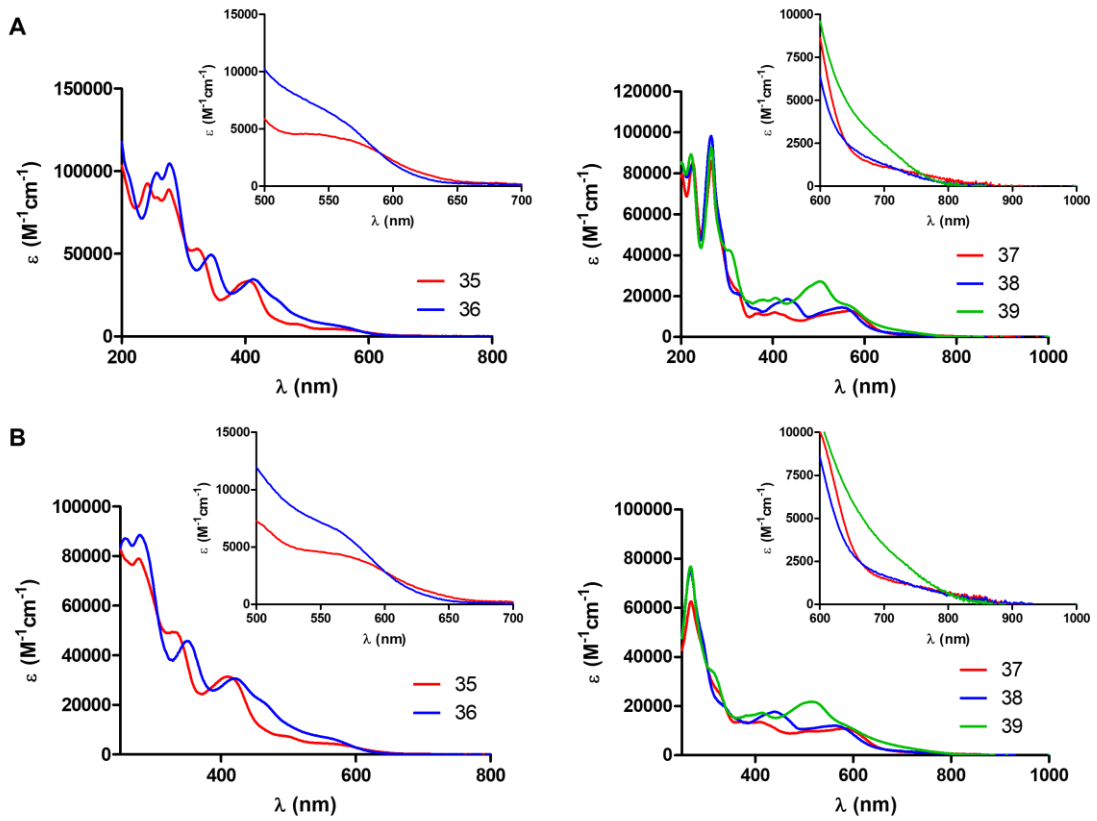


Figura 4.9. Espectros de absorción UV/Vis de los complejos **35**–**39** en (A) acetonitrilo y (B) agua (1% DMSO), a t.a., 10 μM, en presencia de oxígeno. En los espectros de los complejos de iridio se muestra una ampliación de la región 500–700 nm y en los de rutenio de 600–1000 nm.

Tabla 4.6. Datos de espectroscopia de absorción UV/Vis en acetonitrilo y agua (1% DMSO).

Compuesto	λ [nm] (Ɛ [$M^{-1}cm^{-1}$])
	Acetonitrilo
35	245 (90960), 280 (86790), 325 (51960), 410 (34330), 550 (4360)
36	260 (96300), 280 (101830), 350 (47010), 420 (32970), 460 (19230), 550 (5880)
37	230 (84710), 265 (84930), h290 (44120), h320 (23110), 368 (11510), 410 (11690), 500 (10530), 570 (12600), 700 (1140)
38	225 (83660), 265 (96010), h290 (46840), 325 (21230), 435 (18370), 560 (14300), 700 (1270)
39	225 (88970), 265 (92160), h308 (41990), 383 (18020), 410 (18680), 505 (27020), h570 (14830), 700 (2330)
	Agua (1% DMSO)
35	280 (77400), 340 (47190), 415 (31100), 500 (6970), 570 (4030)
36	285 (86540), 355 (45140), 430 (30020), 470 (18530), 570 (5770)
37	270 (61910), h330 (24580), 415 (13310), 508 (9760), 590 (10760), 700 (1490)
38	270 (74790), h294 (46370), 340 (19570), 445 (17610), 570 (11930), 700 (1630)
39	270 (75870), h320 (33200), 420 (17010), 517 (21770), h600 (11260), 700 (3360)

4.2.5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

Se comprobó la estabilidad de todos los complejos en DMSO y RPMI (5% DMSO) mediante espectroscopia de absorción UV/Vis a diferentes tiempos (**Figura 4.10A-B** para **37** y **Figuras A4.28**–**A4.29** para el resto de los complejos). Todos los espectros permanecieron inalterados con el tiempo, demostrando la estabilidad de los mismos en dichas condiciones. Además, para confirmar su fotoestabilidad y, por tanto, su posible aplicación como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica, se registró su espectro UV/Vis tras la irradiación con luz azul (465 nm, 5 mW/cm^2) (**Figura 4.10C** para **37** y **Figura A4.30** para el resto) y con luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2) en el caso de los complejos de rutenio (**Figura 4.10D** para **37** y **Figura A4.31** para **37**–**39**). Como se puede observar, no se producen desplazamientos en las bandas de absorción, demostrando que los complejos son también fotoestables.

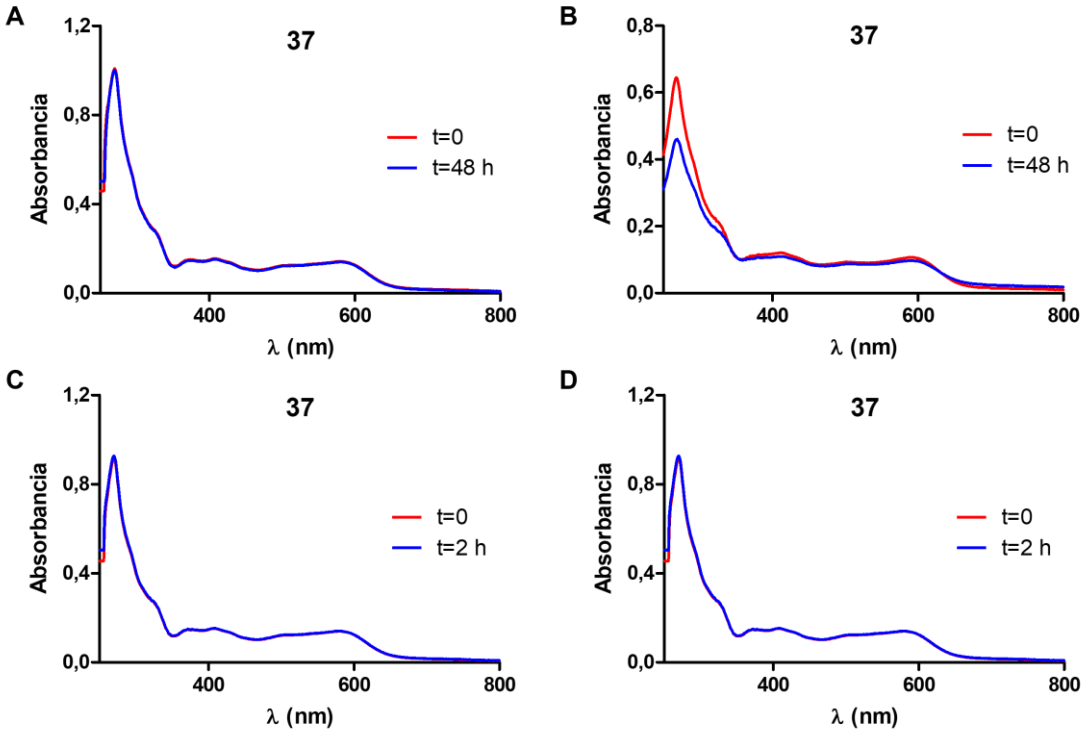


Figura 4.10. Evolución con el tiempo del espectro de absorción del complejo **37** (10 µM) en (A) DMSO, (B) RPMI (5% DMSO), (C) DMSO tras la irradiación con luz azul (465 nm, 5 mW/cm^2) y (D) DMSO tras la irradiación con luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2).

4.2.6. Estudio de generación de ROS en medios libres de células

Un fotosensibilizador para PDT ha de generar especies reactivas de oxígeno tras ser irradiado con luz de determinada longitud de onda. Por tanto, con el fin de evaluar la capacidad de estos complejos para generar ROS, se realizaron distintos ensayos con el fin de detectar qué tipos de especies reactivas de oxígeno se generan en medios libres de células.

Generación de oxígeno singlete ($^1O_2$)

Una de las ROS que generan comúnmente este tipo de complejos es oxígeno singlete, cuyo rendimiento cuántico se puede calcular mediante un ensayo que emplea la sonda DPBF (1,3-difenilisobenzofurano), que es sensible a dicha especie.[19] Para ello se prepararon distintas disoluciones del complejo y de DPBF en acetonitrilo y se registró el espectro de absorción de esta última a diferentes tiempos tras irradiar con luz azul, verde (**35** y **36**) o roja (**37**–**39**) en presencia de los complejos. Esta molécula presenta un máximo de absorción a 411 nm y, a medida que se va generando la especie $^1O_2$, la intensidad va disminuyendo. Para poder calcular el rendimiento cuántico (Φ_Δ), se empleó como referencia ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$ para la luz azul y verde y azul de metileno para luz roja).[7,20,21]

En la **Figura 4.11** se recogen los resultados para los nuevos complejos de iridio con luz azul (**Figura 4.11A**) y con luz verde (**Figura 4.11B**). Como puede observarse, el comportamiento es muy similar para ambos compuestos y en las dos condiciones empleadas. En la **Figura 4.12** se muestra la representación de la absorbancia de DPBF a 411 nm frente al tiempo, con el fin de obtener las rectas cuya pendiente permite calcular, mediante la **Ecuación 4.1**, el valor de Φ_Δ (**Tabla 4.7**) al compararlo con la referencia, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (**Figura A4.32A-B**).

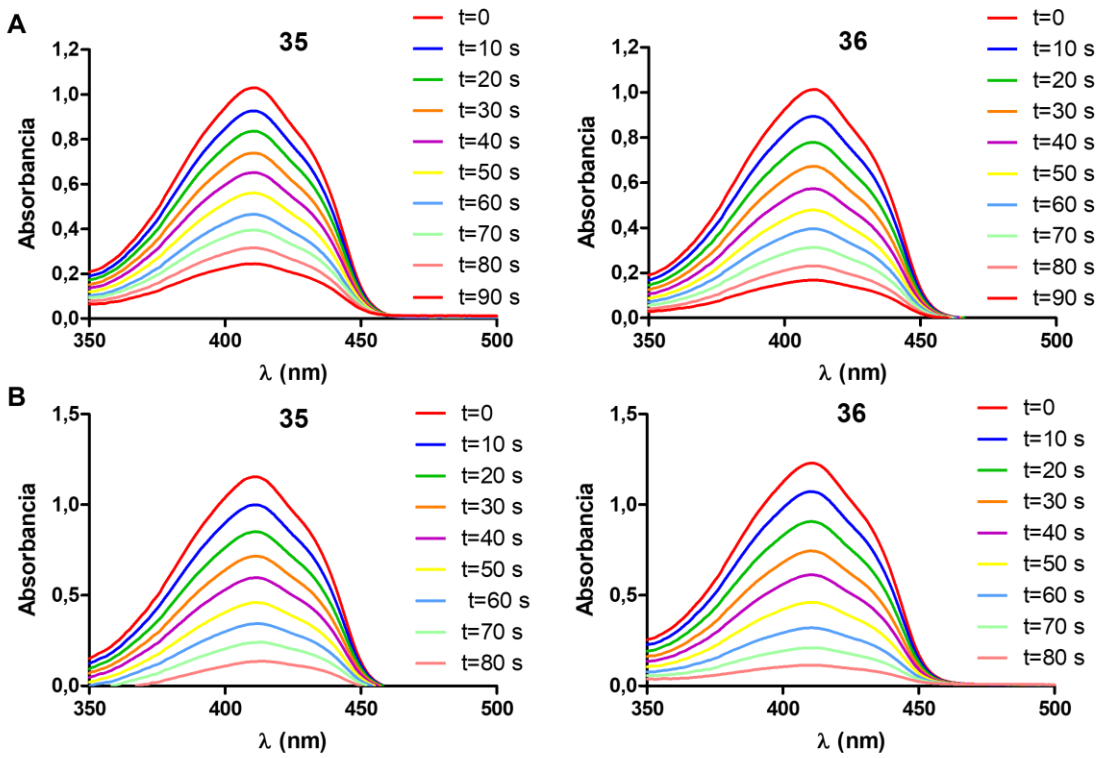


Figura 4.11. Disminución de la absorción de la DPBF en presencia de los complejos **35** y **36** tras la irradiación con luz (A) azul (465 nm, 0,7 mW/cm^2) y (B) verde (520 nm, 0,8 mW/cm^2).

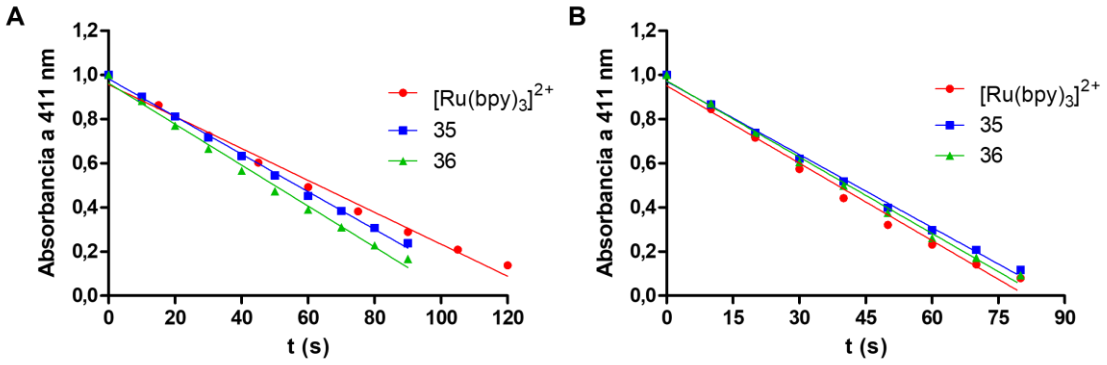


Figura 4.12. Representación de la absorbancia a 411 nm vs al tiempo de irradiación de la disolución de DPBF en presencia de los complejos **35** y **36** con luz (A) azul (465 nm, 0,7 mW/cm^2) y (B) verde (520 nm, 0,8 mW/cm^2). $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ se empleó como referencia.

En el caso de los complejos **37**–**39**, se empleó luz roja y azul de metileno como referencia. En la **Figura 4.13** se recogen los resultados para estos experimentos (**Figura A4.32C** para la referencia) y en la **Figura 4.14** la representación gráfica de la absorbancia de la DPBF a 411 nm frente al tiempo de irradiación.

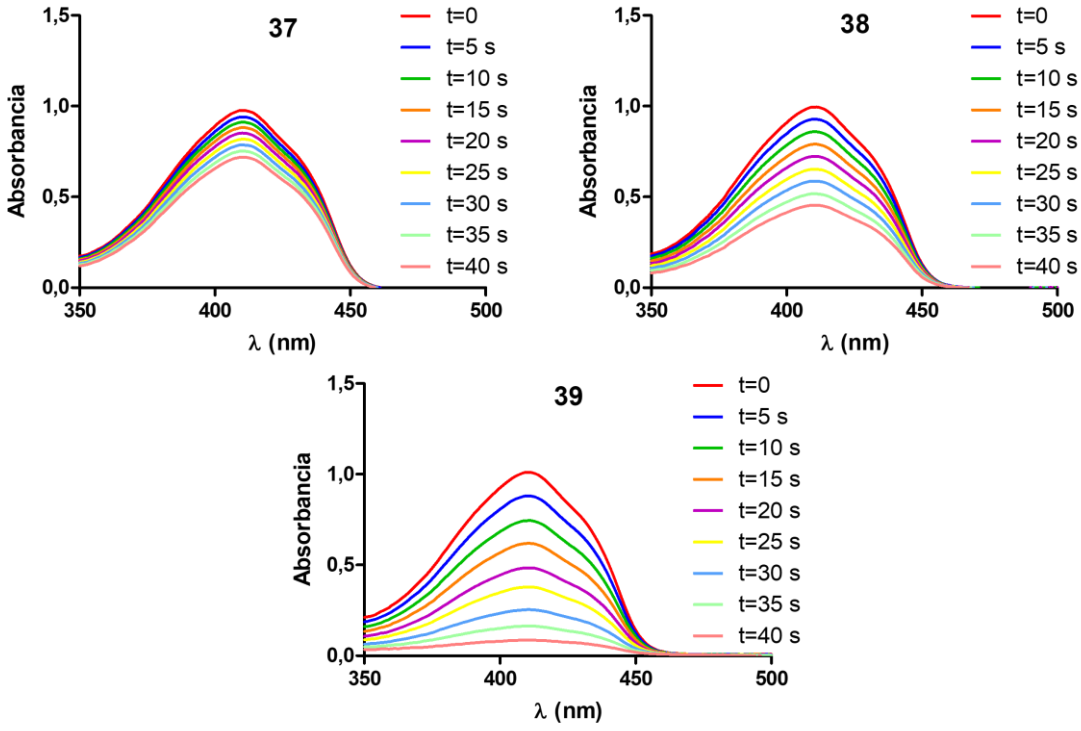


Figura 4.13. Disminución de la intensidad de absorción de la DPBF en presencia de los complejos **37**–**39** tras la irradiación con luz roja (620 nm, 5,06 mW/cm^2).

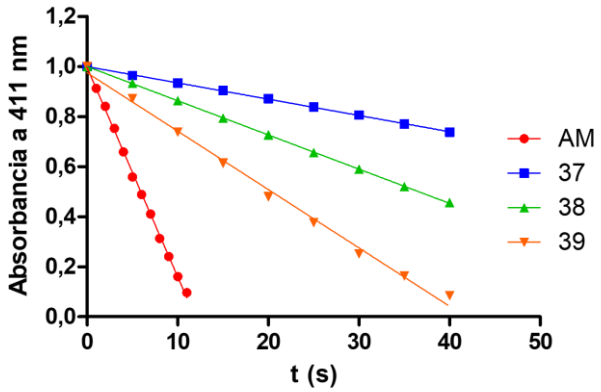


Figura 4.14. Representación de la absorbancia a 411 nm vs al tiempo de irradiación de la disolución de DPBF en presencia de los complejos **37**–**39** con luz roja (620 nm, 5,06 mW/cm^2). Azul de metileno (AM) se empleó como referencia.

Para calcular los valores de rendimiento cuántico de generación de $^1O_2$ (**Tabla 4.7**) se empleó la **Ecuación 4.1**, en la que $\Phi_{\Delta R}$ es el rendimiento cuántico de la referencia,[22,23] m_R y m_M son las pendientes de las rectas de la referencia y la muestra, respectivamente (**Figura 4.12** y **Figura 4.14**), A_R y A_M son las absorbancias de la muestra y la referencia a la longitud de onda de irradiación.[7]

Ecuación 4.1. $$\Phi_{\Delta M} = \Phi_{\Delta R}\left(\frac{m_M}{m_R}\right)\left(\frac{1-10^{AR}}{1-10^{AM}}\right)$$

Tabla 4.7. Valores de Φ_Δ calculados para los distintos complejos.

Complejo	Luz	Φ_Δ[a]
35	Azul	0,63
36		0,69
35	Verde	0,53
36		0,54
37	Roja	0,05
38		0,09
39		0,17

[a]Valores de $\Phi_{\Delta,ref}$ para las referencias empleadas: $[Ru(bpy)_3]^2$ (0,57, azul y verde) y azul metileno (roja, 0,60).

Generación de radical hidroxilo

Además de la producción de oxígeno singlete, se investigó la capacidad de los complejos para generar radical hidroxilo, una especie reactiva de oxígeno específica del mecanismo Tipo I de la PDT. Para ello se empleó la sonda HPF (3'-*p*-(hidroxifenil)fluoresceína).[24,25] Se registraron los espectros de una disolución de complejo (10 μM) junto con HPF (10 μM) en PBS (5% DMF) a diferentes tiempos de irradiación con luz azul, verde (**35** y **36**) o roja (**37**–**39**). La HPF no es fluorescente en ausencia de ·OH, pero en presencia de éste aumenta su emisión.

En la **Figura 4.15** se observan los resultados para los complejos **35** y **36**, tras la irradiación con luz azul y verde. En el caso de la luz azul a los 10 min de irradiación se estabiliza (**Figura 4.15A** y **Figura 4.16A**), mientras que con la verde, tras 1 h de irradiación apenas aumenta la emisión (**Figura 4.15B** y **Figura 4.16B**). En la **Figura 4.16** se representa la emisión en el máximo de la HPF (514 nm) frente al tiempo de irradiación con el fin de ver con mayor claridad la capacidad de los complejos de generar ·OH con las distintas luces.

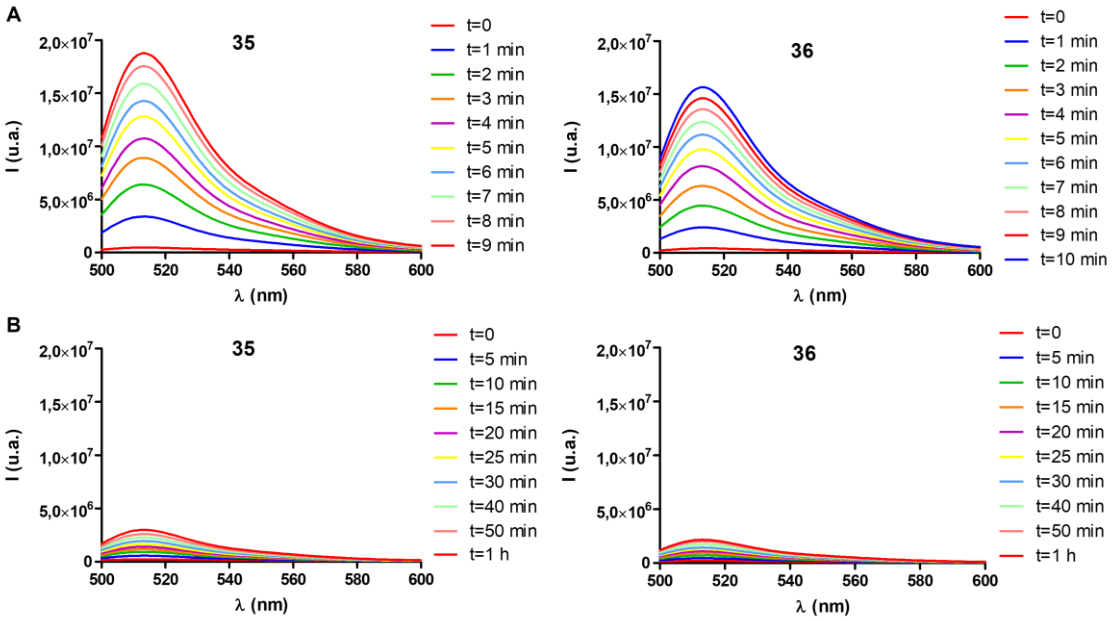


Figura 4.15. Aumento de la intensidad de emisión de HPF (10 µM) en presencia de los complejos **35** y **36** (10 µM) tras la irradiación con luz (A) azul (465 nm, 5,0 mW/cm^2) y (B) verde (520 nm, 1,8 mW/cm^2). Los espectros se registraron con λ_{exc} = 490 nm.

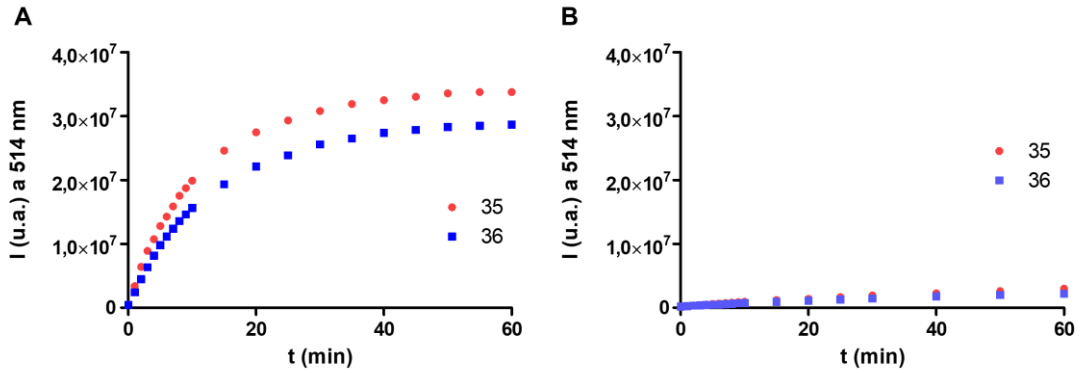


Figura 4.16. Representación de la intensidad de emisión de la HPF a 514 nm frente al tiempo de exposición a la luz en presencia de **35** y **36**. (A) Luz azul (465 nm, 5,0 mW/cm^2) y (B) luz verde (520 nm, 1,8 mW/cm^2). λ_{exc} = 490 nm.

La **Figura 4.17** recoge los resultados para **37**–**39** tras irradiar con luz roja. Éstos tienen poca capacidad de generar radical hidroxilo, ya que el aumento de la emisión es pequeño (**Figura 4.18**) en comparación con otros observados.[20]

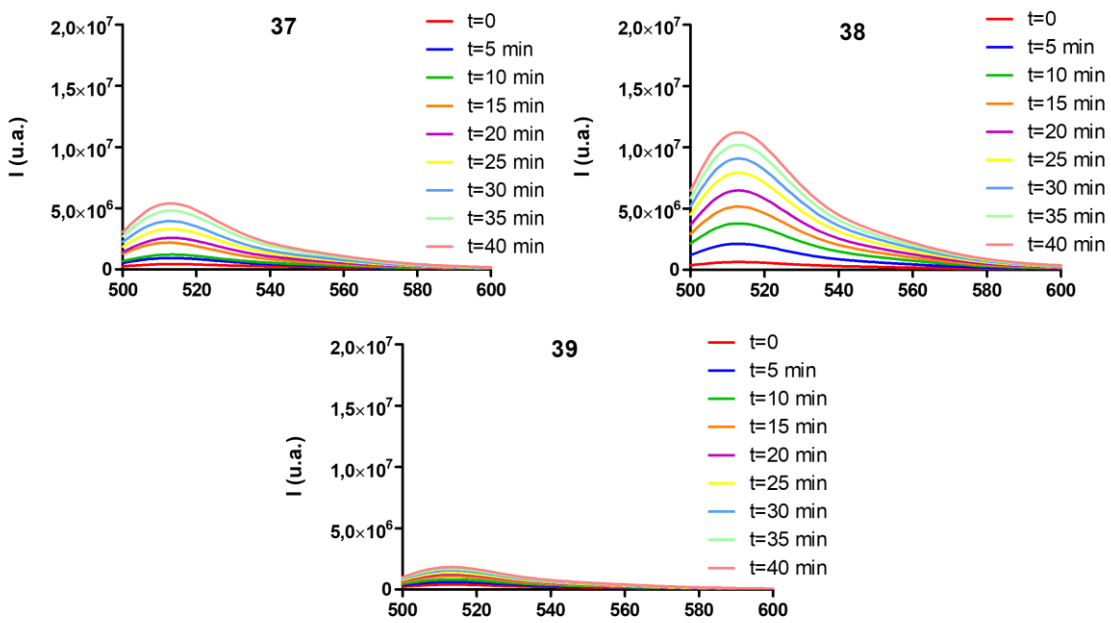


Figura 4.17. Aumento de la intensidad de emisión de HPF (10 µM) en presencia de los complejos **37**–**39** (10 µM) tras la irradiación con luz roja (620 nm, 20 mW/cm^2). Los espectros se registraron con λ_{exc} = 490 nm.

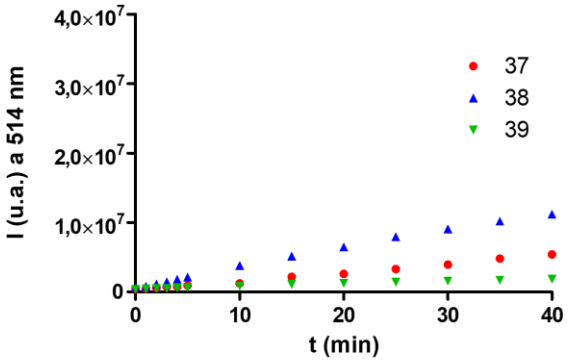


Figura 4.18. Representación de la intensidad de emisión de la HPF a 514 nm frente al tiempo de exposición a la luz roja (320 nm, 20 mW/cm^2) en presencia de **37**–**39**.

Este tipo de análisis puede servir como estudio previo para ver qué especies reactivas de oxígeno pueden estar implicadas en la acción antitumoral.

4.3. Actividad biológica

Se ha llevado a cabo un estudio preliminar de fototoxicidad de los distintos complejos en la línea de cáncer cervical (HeLa) en ausencia y presencia de luz azul (**35** y **36**) o roja (**37**–**39**). En la **Tabla 4.8** se recogen los resultados.

Tabla 4.8. Valores de IC_{50} obtenidos mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa tratada con los distintos complejos, en oscuridad y tras la irradiación con luz azul o roja.[a]

IC_{50} (μM)		**HeLa**		
Complejo	**Luz**	**Oscuridad**	**Luz**	**PI[b]**
35	Azul	> 100	0,99 ± 0,22	> 101
36		> 100	1,32 ± 0,13	> 75
37	Roja	> 100	0,137 ± 0,008	> 729
38		1,73 ± 0,16	0,027 ± 0,005	64,1
39		1,72 ± 0,23	0,011 ± 0,001	156,4

[a]Las células se trataron durante 2 h (1 h de incubación y 1 h de irradiación (4,8 mW/cm^2 para la luz azul y 15 mW/cm^2 para la roja)), seguidamente se incubaron 46 h en medio libre de complejo. [b]El PI (índice de fototoxicidad) se define como $IC_{50,oscuridad}$ / $IC_{50,luz}$.

Como se puede observar, los nuevos complejos presentan unos valores de citotoxicidad muy prometedores para su uso como agentes anticancerígenos en terapia fotodinámica. Así, los complejos **35**, **36** y **37** no son tóxicos en la oscuridad, todos se activan tras la irradiación llegando a tener valores de IC_{50} de hasta 11 nanomolar (**39**) y presentan índices de fotoactivación muy elevados, especialmente **37** cuando se irradia con luz roja.

4.4. Resumen

En el presente capítulo se describe la síntesis y caraterización de cinco nuevos complejos de Ir(III) y Ru(II) con ligandos C,N-dadores tipo quinoxalina con el objetivo de desarrollar compuestos capaces de fotoactivarse con radiaciones más penetrantes que la frecuentemente utilizada luz azul. Todos los ligandos C^N contienen el núcleo común 2,3-difenilquinoxalina, destacando que se describe por primera vez un derivado que contiene como sustituyente el grupo dador NMe_2. Además, los compuestos heterolépticos de Ir(III) presentan como ligando auxiliar 2-(piridin-2-il)-1*H*-fenantro[9,10-*d*]imidazol, mientras que los de Ru(II) contienen como ligando N^N la fenantrolina.

Todos los compuestos se han caracterizado estructuralmente y mediante espectroscopia de absorción UV/Vis en distintos medios, y se ha comprobado que presentan colas de absorción en la región de ~600 nm en el caso de los de iridio y ~800 nm para los de rutenio.

Además, se comprobó que se trata de complejos fotoestables tras la exposición a la luz. Así mismo, se evaluó su capacidad para producir ROS, analizando la generación de $^1O_2$ y ·OH en medios libres de células. Los complejos de iridio irradiados con luz azul presentan los mejores resultados, siendo capaces de generar ambas especies.

Por último, un estudio preliminar de fototoxicidad en la línea celular HeLa en presencia y ausencia de luz indica que los nuevos complejos presentan índices de fotoactivación muy elevados, especialmente **37**, no siendo tóxico en la oscuridad.

4.5. Bibliografía

(1) Karges, J. Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (5), e202112236. https://doi.org/10.1002/anie.202112236.

(2) Chen, H.-Y.; Yang, C.-H.; Chi, Y.; Cheng, Y.-M.; Yeh, Y.-S.; Chou, P.-T.; Hsieh, H.-Y.; Liu, C.-S.; Peng, S.-M.; Lee, G.-H. Room-Temperature NIR Phosphorescence of New Iridium(III) Complexes with Ligands Derived from Benzoquinoxaline. *Can. J. Chem.* **2006**, *84* (2), 309–318. https://doi.org/10.1139/v05-253.

(3) Wang, C.; Lystrom, L.; Yin, H.; Hetu, M.; Kilina, S.; McFarland, S. A.; Sun, W. Increasing the Triplet Lifetime and Extending the Ground-State Absorption of Biscyclometalated Ir(III) Complexes for Reverse Saturable Absorption and Photodynamic Therapy Applications. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (41), 16366–16378. https://doi.org/10.1039/C6DT02416E.

(4) Wang, L.; Yin, H.; Cui, P.; Hetu, M.; Wang, C.; Monro, S.; Schaller, R. D.; Cameron, C. G.; Liu, B.; Kilina, S.; McFarland, S. A.; Sun, W. Near-infrared-emitting heteroleptic cationic iridium complexes derived from 2,3-diphenylbenzo[*g*]quinoxaline as *in vitro* theranostic photodynamic therapy agents. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (25), 8091–8103. https://doi.org/10.1039/C7DT00913E.

(5) Ghosh, G.; Colón, K. L.; Fuller, A.; Sainuddin, T.; Bradner, E.; McCain, J.; Monro, S. M. A.; Yin, H.; Hetu, M. W.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Cyclometalated Ruthenium(II) Complexes Derived from α-Oligothiophenes as Highly Selective Cytotoxic or Photocytotoxic Agents. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (13), 7694–7712. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00689.

(6) Solís-Ruiz, J. A.; Barthe, A.; Riegel, G.; Saavedra-Díaz, R. O.; Gaiddon, C.; Le Lagadec, R. Light activation of cyclometalated ruthenium complexes drives towards caspase 3 dependent apoptosis in gastric cancer cells. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *208*, 111080. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111080.

(7) Ballester, F. J.; Ortega, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Ru(II) photosensitizers competent for hypoxic cancers *via* green light activation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (71), 10301–10304. https://doi.org/10.1039/D0CC02417A.

(8) Ortega-Forte, E.; Rovira, A.; López-Corrales, M.; Hernández-García, A.; Ballester, F. J.; Izquierdo-García, E.; Jordà-Redondo, M.; Bosch, M.; Nonell, S.; Santana, M. D.; Ruiz, J.; Marchán, V.; Gasser, G. A near-infrared light-activatable Ru(II)-coumarin photosensitizer active under hypoxic conditions. *Chem. Sci.* **2023**, *14* (26), 7170–7184. https://doi.org/10.1039/D3SC01844J.

(9) Huang, H.; Zhang, P.; Yu, B.; Chen, Y.; Wang, J.; Ji, L.; Chao, H. Targeting Nucleus DNA with a Cyclometalated Dipyridophenazineruthenium(II) Complex. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (21), 8971–8983. https://doi.org/10.1021/jm501095r.

(10) Bomben, P. G.; Robson, K. C. D.; Koivisto, B. D.; Berlinguette, C. P. Cyclometalated ruthenium chromophores for the dye-sensitized solar cell. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (15), 1438–1450. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.005.

(11) Huang, H.; Zhang, P.; Chen, H.; Ji, L.; Chao, H. Comparison Between Polypyridyl and Cyclometalated Ruthenium(II) Complexes: Anticancer Activities Against 2D and 3D Cancer Models. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (2), 715–725. https://doi.org/10.1002/chem.201404922.

(12) Martínez-Alonso, M.; Gandioso, A.; Thibaudeau, C.; Qin, X.; Arnoux, P.; Demeubayeva, N.; Guérineau, V.; Frochot, C.; Jung, A. C.; Gaiddon, C.; Gasser, G. A Novel Near-IR Absorbing Ruthenium(II) Complex as Photosensitizer for

Photodynamic Therapy and Its Cetuximab Bioconjugates. *ChemBioChem* **2023**, *24* (15), e202300203. https://doi.org/10.1002/cbic.202300203.

(13) Vigueras, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kostrhunova, H.; Kasparkova, J.; Ruiz, J.; Brabec, V. A Photoactivated Ir(III) Complex Targets Cancer Stem Cells and Induces Secretion of Damage-Associated Molecular Patterns in Melanoma Cells Characteristic of Immunogenic Cell Death. *Inorg. Chem. Front.* **2021**, *8* (21), 4696–4711. https://doi.org/10.1039/D1QI00856K.

(14) Phillips, K. A.; Stonelake, T. M.; Horton, P. N.; Coles, S. J.; Hallett, A. J.; O'Kell, S. P.; Beames, J. M.; Pope, S. J. A. Dual Visible/NIR emission from organometallic iridium(III) complexes. *J. Organometallic Chem.* **2019**, *893*, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.04.019.

(15) Chen, G.-Y.; Chang, B.-R.; Shih, T.-A.; Lin, C.-H.; Lo, C.-L.; Chen, Y.-Z.; Liu, Y.-X.; Li, Y.-R.; Guo, J.-T.; Lu, C.-W.; Yang, Z.-P.; Su, H.-C. Cationic IrIII Emitters with Near-Infrared Emission Beyond 800 nm and Their Use in Light-Emitting Electrochemical Cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (21), 5489–5497. https://doi.org/10.1002/chem.201805902.

(16) Behmadi, H.; Roshani, M.; Saadati, S. M. Synthesis of Phenanthrimidazole from 9,10-Phenanthraquinone and Aldehydes by Molecular Iodine as Catalyst. *Chinese Chemical Letters* **2009**, *20* (1), 5–8. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2008.09.047.

(17) Xu, H.; Chen, R.; Sun, Q.; Lai, W.; Su, Q.; Huang, W.; Liu, X. Recent Progress in Metal–Organic Complexes for Optoelectronic Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3259–3302. https://doi.org/10.1039/C3CS60449G.

(18) Sainuddin, T.; McCain, J.; Pinto, M.; Yin, H.; Gibson, J.; Hetu, M.; McFarland, S. A. Organometallic Ru(II) Photosensitizers Derived from π-Expansive Cyclometalating Ligands: Surprising Theranostic PDT Effects. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (1), 83–95. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01838.

(19) Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2020**, *204*, 111787. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787.

(20) Kasparkova, J.; Hernández-García, A.; Kostrhunova, H.; Goicuría, M.; Novohradsky, V.; Bautista, D.; Markova, L.; Santana, M. D.; Brabec, V.; Ruiz, J. Novel 2-(5-arylthiophen-2-yl)-benzoazole Cyclometalated Iridium(III) dppz Complexes Exhibit Selective Phototoxicity in Cancer Cells by Lysosomal Damage and Oncosis. *J. Med. Chem.* **2024**, *67* (1), 691–708. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01978.

(21) Bonelli, J.; Ortega-Forte, E.; Rovira, A.; Bosch, M.; Torres, O.; Cuscó, C.; Rocas, J.; Ruiz, J.; Marchán, V. Improving Photodynamic Therapy Anticancer Activity of a Mitochondria-Targeted Coumarin Photosensitizer Using a Polyurethane–Polyurea Hybrid Nanocarrier. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (7), 2900–2913. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00361.

(22) Ghosh, G.; Yin, H.; Monro, S. M. A.; Sainuddin, T.; Lapoot, L.; Greer, A.; McFarland, S. A. Synthesis and Characterization of Ru(II) Complexes with π-Expansive Imidazophen Ligands for the Photokilling of Human Melanoma Cells. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96* (2), 349–357. https://doi.org/10.1111/php.13177.

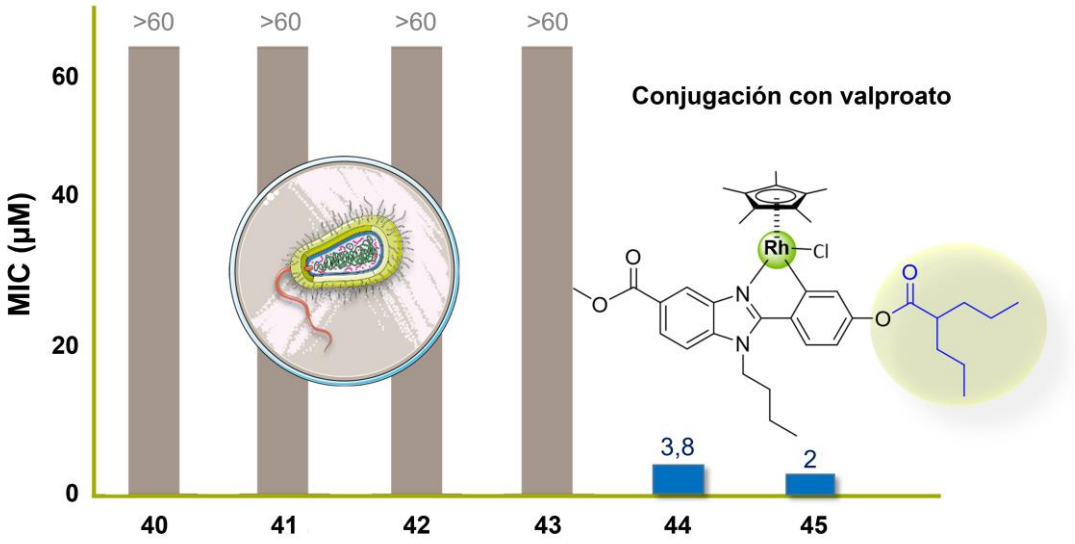
(23) Lutkus, L. V.; Rickenbach, S. S.; McCormick, T. M. Singlet Oxygen Quantum Yields Determined by Oxygen Consumption. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2019**, *378*, 131–135. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.04.029.

(24) Price, M.; Reiners, J. J.; Santiago, A. M.; Kessel, D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85* (5), 1177–1181. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00555.x.

(25) Zhuang, Z.; Dai, J.; Yu, M.; Li, J.; Shen, P.; Hu, R.; Lou, X.; Zhao, Z.; Tang, B. Z. Type I Photosensitizers Based on Phosphindole Oxide for Photodynamic Therapy: Apoptosis and Autophagy Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (13), 3405–3417. https://doi.org/10.1039/D0SC00785D.

Capítulo 5

Complejos de Ir(III) y Rh(III) semi-sándwich activos frente a bacterias Gram-positiva multirresistentes



Los estudios biológicos realizados en este capítulo los llevó a cabo la Dra. Natalia Busto de la Universidad de Burgos.

5.1. Introducción

A pesar de que los complejos semi-sándwich de iridio y rodio se han estudiado en menor medida que los de rutenio para su posible aplicación en el tratamiento de infecciones,[1] recientemente han surgido estudios que resaltan las propiedades antibacterianas de los mismos, particularmente los que presentan un ligando Cp*, que proporciona estabilidad e hidrofobicidad, y ligandos quelato neutros[2–4] o ligandos tipo carbeno.[5,6] Sin embargo, cuando comenzamos este trabajo, no existían ejemplos de complejos semi-sándwich de rodio o iridio con ligandos C,N-quelato que presentaran actividad antimicrobiana frente a patógenos ESKAPE.

El ácido valproico (VPA) es un ácido graso de cadena corta ramificada que se emplea clínicamente para tratar la epilepsia.[7] Esta pequeña molécula ha resultado ser un inhibidor de histona deacetilasa (HDAC), lo que ha provocado un aumento del interés en su posible uso en quimioterapia.[8,9] Estudios recientes han demostrado que el VPA y sus derivados también presentan propiedades antimicrobianas.[10–13]

En el presente capítulo se describe la síntesis y caracterización de nuevos complejos semi-sándwich de Ir(III) y Rh(III) que contienen un ligando C,N-quelato basado en benzimidazol funcionalizado con valproato (**44** y **45**, **Figura 5.1**). Además, se han estudiado también sus homólogos sin funcionalizar (**42** y **43**, **Figura 5.1**) con fines comparativos. Como se ha comentado anteriormente, cabe destacar que los nuevos ligandos se diseñaron con el núcleo de benzimidazol debido a la gran variedad de propiedades farmacológicas que posee, tanto la molécula orgánica,[14–16] como sus derivados metálicos.[2,17–19] Así mismo, se presentan los resultados de ensayos biológicos *in vitro* realizados para evaluar su actividad frente a varias cepas de bacterias multirresistentes de interés clínico: dos Gram-positiva (*Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y dos Gram-negativa (*Acinetobacter baumanii* y *Pseudomonas aeruginosa*). Además, se describe cómo la conjugación del valproato parece ser crucial en la actividad frente a bacterias Gram-positiva.

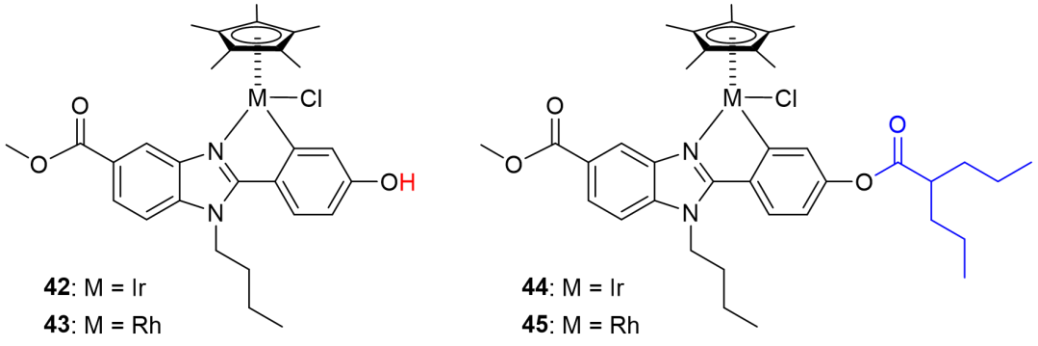


Figura 5.1. Estructura general de los complejos sintetizados en este capítulo.

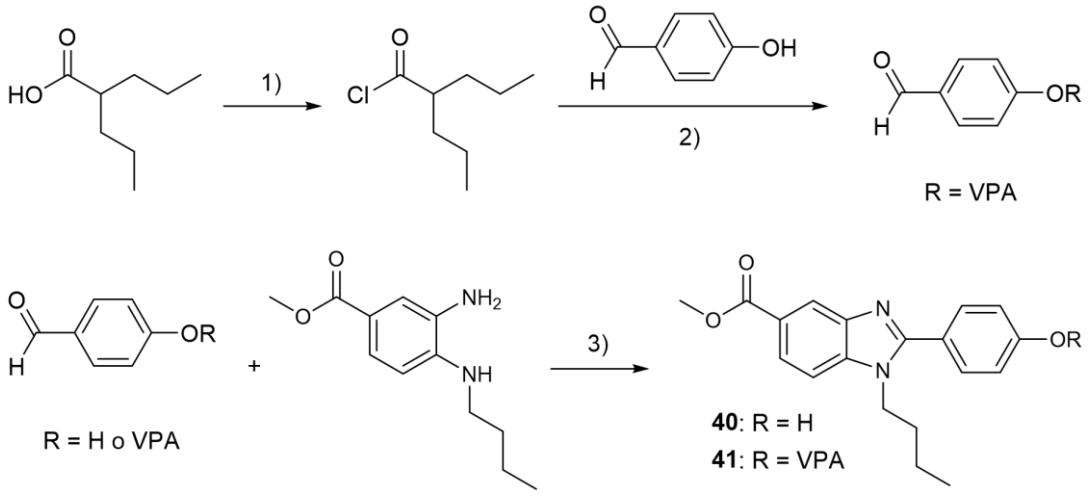
5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Síntesis

Síntesis de los proligandos HC^N

El primero de ellos (**40**) es similar a otros descritos anteriormente por nuestro grupo de investigación,[17,18] si bien en este caso contiene un grupo hidroxilo en el anillo fenilo que permite su funcionalización. El segundo (**41**) contiene el mismo núcleo de benzimidazol pero se ha conjugado con ácido valproico, con el fin de estudiar su efecto en la actividad antibacteriana de los complejos. Además, ambos contienen un grupo éster que permite extender la funcionalización, por ejemplo, para dirigirlos a una diana específica.

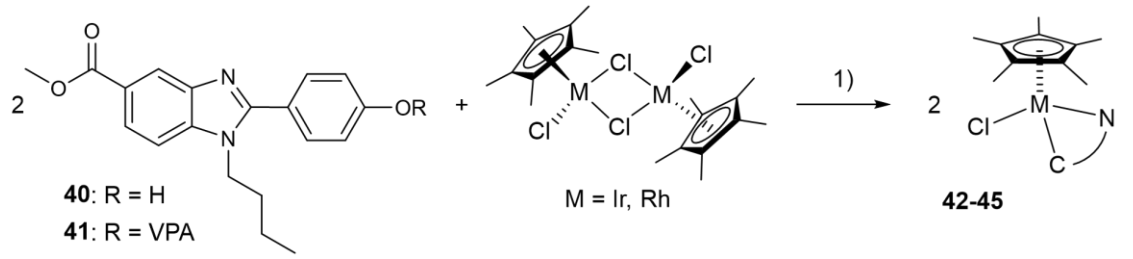
Ambos se obtuvieron siguiendo los procedimientos previamente descritos en la bibliografía,[20,21] por reacción de condensación entre la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo) y el correspondiente aldehído en una mezcla agua:etanol (1:1, v:v) en presencia de $NaHSO_3$ a 80 ºC durante 18 h (**Esquema 5.1**). Además, para el proligando **41** el procedimiento incluyó dos etapas previas para obtener el cloruro de ácido valproico y su posterior reacción con 4-hidroxibenzaldehído para formar el aldehído funcionalizado.[22]



Esquema 5.1. Procedimiento de síntesis de proligandos HC^N de tipo benzimidazol. Condiciones de reacción: (1) $SOCl_2$, t.a., 4 h, atm. N_2; (2) Et_3N, DMF, t.a., 12 h, atm. N_2; (3) H_2O:EtOH (1:1, v:v), $NaHSO_3$, 80 ºC, 18 h.

Síntesis de los complejos metálicos

Los complejos se sintetizaron siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía,[17] haciendo reaccionar el dímero de Ir o Rh, $[M(\eta^5\text{-}C_5Me_5)Cl_2]_2$, con el proligando HC^N correspondiente en diclorometano en presencia de acetato de sodio a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 h (**Esquema 5.2**).



Esquema 5.2. Procedimiento de síntesis de los complejos semi-sándwich de Ir(III) y Rh(III). Condiciones de reacción: (1) diclorometano, NaOAc, t.a., 24 h, atm. N_2.

5.2.2. Caracterización de los nuevos compuestos

Todos los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante diferentes técnicas: RMN ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y 2D (**Figuras A5.1**–**A5.27**), análisis elemental, ESI-MS y HPLC/MS (**Figuras A5.32**–**A5.37**).

Espectroscopia de RMN

Los espectros ^{1}H-RMN de los proligandos y de los complejos presentan las señales características que cabría esperar. En la **Figura 5.2**, a modo de ejemplo, se muestra el espectro del complejo **44**. El grupo éster se observa como un singlete que integra por tres protones en la región en torno a δ 4 ppm y el grupo butilo presenta tres multipletes a δ 4,70–4,20 ppm (H_G), 1,90–1,70 ppm (H_H) y 1,50–1,20 ppm (H_I) y un triplete en torno a δ 0,90 ppm (H_J). Además de estas señales comunes en todos los espectros, los compuestos que contienen el grupo valproato muestran también las correspondientes a este: un multiplete debido a un protón a δ 2,60 ppm (H_L), dos multipletes que integran por 4 protones a δ 1,80–1,60 ppm ($H_{M/N}$) y 1,50–1,40 ppm (H_O) y un triplete que integra a seis protones a δ 1,00–0,90 ppm (H_P). En los espectros de los cuatro complejos metálicos, se observa también una señal de tipo singlete a δ 1,80–1,70 ppm (H_K) correspondiente a los grupos metilo del anillo Cp*, con una integral debida a quince protones.

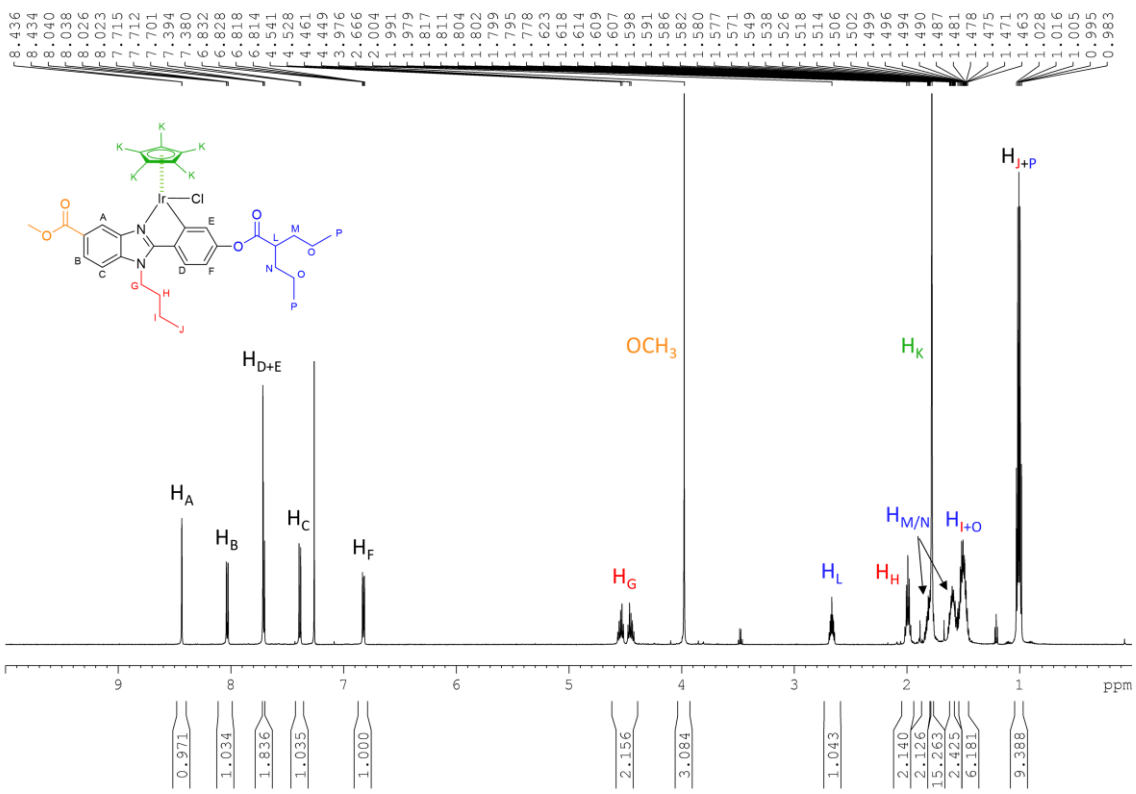


Figura 5.2. Espectro de ^{1}H-RMN de **44** en $CDCl_3$ donde se muestran los distintos grupos de señales características de estos complejos.

Tabla 5.1. δ (ppm) de ^{1}H-RMN del proligando **40** y los complejos **42** y **43**, a t.a., DMF-d_7.

DMF-d_7	**40**	**42**	**43**
A	8,33	8,35	8,40
B	7,97	7,99	7,98
C	7,8	7,89	7,90
D	7,74	7,83	7,78
E	7,08	7,57	7,55
F	-	6,65	6,66
G	4,42	4,75	4,72
H	1,77	1,91	1,90
I	1,25	1,48	1,46
J	0,82	0,94	0,94
K	-	1,78	1,70
OCH_3	3,94	3,99	4,00
Ar-OH	10,29	9,97	9,99

Tabla 5.2. δ (ppm) de ^{1}H-RMN del proligando **41** y los complejos **44** y **45**, a t.a., $CDCl_3$.

$CDCl_3$	**41**	**44**	**45**
A	8,55	8,44	8,50
B	8,06	8,03	8,02
C	7,45	7,39	7,40
D	7,77	7,71	7,65
E	7,28	7,72	7,71
F	-	6,82	6,84
G	4,27	4,50	4,45
H	1,81	1,99	1,97
I	1,30	1,51	1,49
J	0,89	1,00	1,00
K	-	1,78	1,70
OCH_3	3,96	3,98	3,98
L	2,65	2,66	2,67
M/N	1,76 1,60	1,81 1,60	1,81 1,60
O	1,47	1,51	1,49
P	0,98	1,00	1,00

En la **Tabla 5.1** y **Tabla 5.2** se recogen los desplazamientos químicos a los cuales resuenan los protones de los ligandos y sus complejos derivados, lo que facilita comparar el desplazamiento producido por efecto de la ciclometalación. Así, el protón correspondiente al grupo hidroxilo (Ar-OH) sufre un pequeño desplazamiento a campo alto al coordinarse al metal (**Tabla 5.1**). Por otro lado, en la **Figura 5.3**, en la que se recoge la zona aromática de **40**, **42** y **43**, observamos que en los protones aromáticos H_{A-D} se producen ligeras modificaciones a campo bajo al formarse el complejo. Como era de esperar, el mayor cambio se observa en las señales correspondientes a H_E y H_F, que en el caso del proligando, al ser equivalentes, se observan como una única señal (H_E, 7,08 ppm) que integra por dos protones, pero tras coordinarse al metal se desdobla en dos diferentes. Mientras que H_E, adyacente al nuevo enlace M-C, se encuentra mucho más desapantallado (7,56 ppm), H_F se encuentra mucho más apantallado y su señal se observa a campo alto (6,65 ppm). Este efecto ocurre de manera idéntica independientemente del metal.

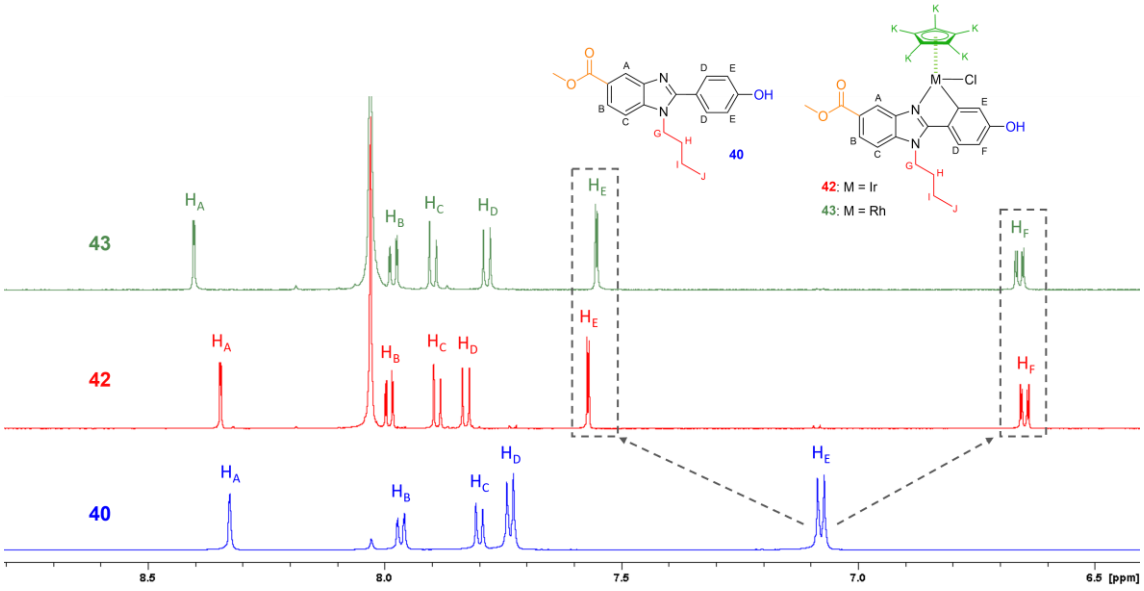


Figura 5.3. Comparación de la región aromática de los espectros de ^{1}H-RMN del proligando **40** y los complejos **42** y **43**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 600 MHz.

De la misma manera, para el proligando **41** y los complejos **44** y **45** (**Figura 5.4** y **Tabla 5.2**), observamos un comportamiento similar al anterior. En este caso, tras la coordinación del metal, las señales correspondientes a los protones H_{A-D} se desplazan ligeramente hacia campo alto respecto al ligando libre y para los protones H_E y H_F se observa, como para **42** y **43**, el desapantallamiento para H_E (7,72 ppm) y el apantallamiento para H_F (6,83 ppm).

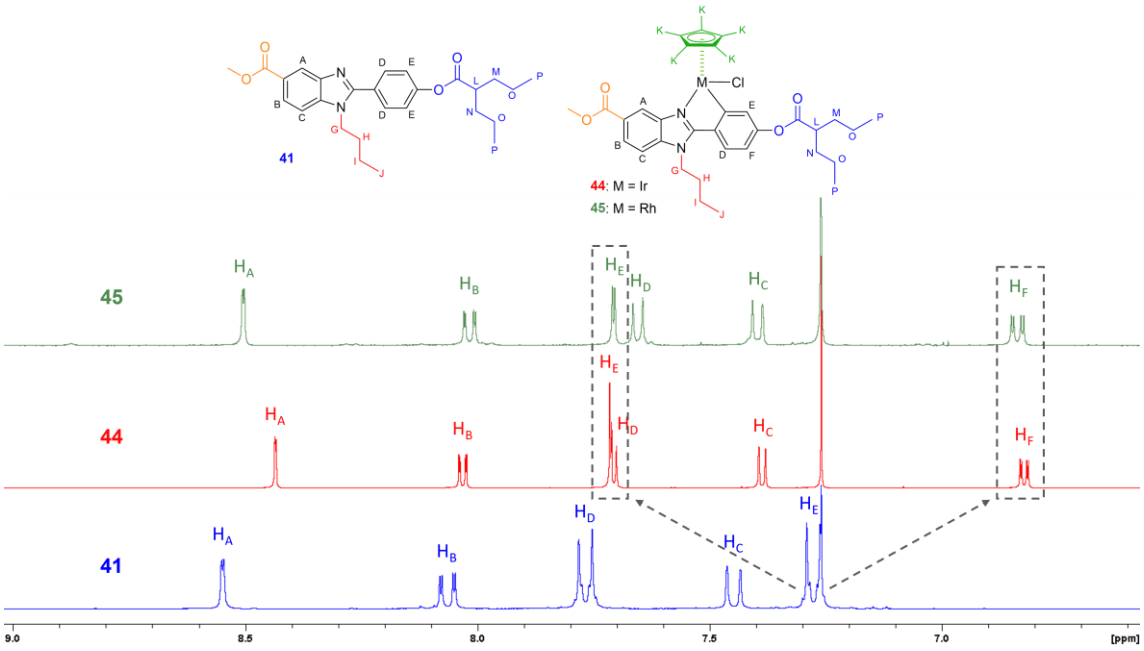


Figura 5.4. Comparación de la zona aromática de los espectros de ^{1}H-RMN del proligando **41** y los complejos **44** y **45**, registrados en $CDCl_3$ a t.a., 600 MHz.

En la región alifática, todas las señales sufren un desplazamiento a campo bajo tras la formación del complejo, tanto para iridio como para rodio. En todos los complejos se observa la aparición del singlete (H_K) correspondiente a los metilos del ligando Cp* (**Figura 5.5** y **Figura 5.6**). Además de esto, al comparar **41**, **44** y **45** (**Figura 5.6**) se produce también el solapamiento de algunas señales correspondientes al butilo y al VPA tras coordinarse al metal.

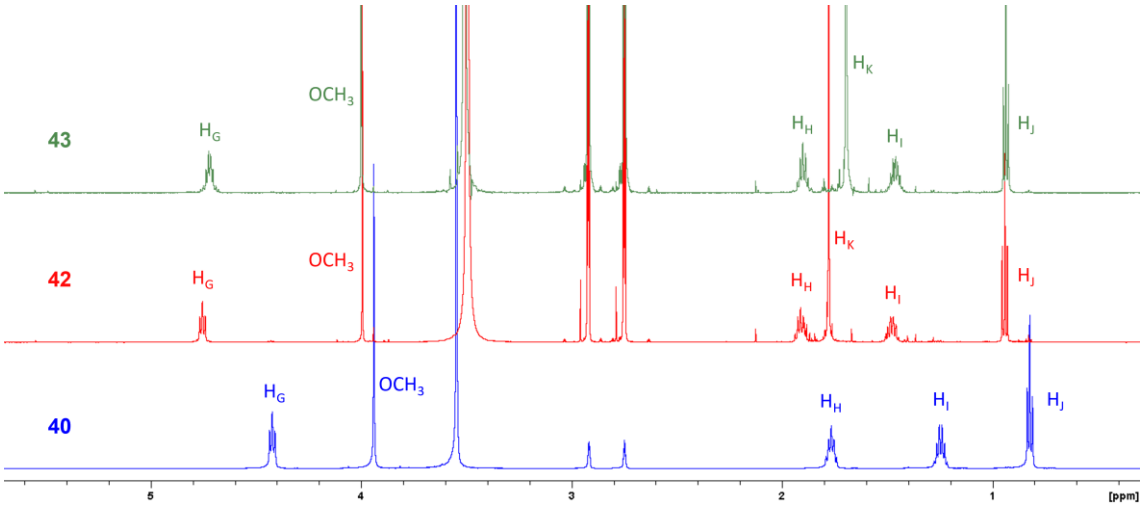


Figura 5.5. Comparación de la zona alifática de los espectros de ^{1}H-RMN del proligando **40** y los complejos **42** y **43**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 600 MHz.

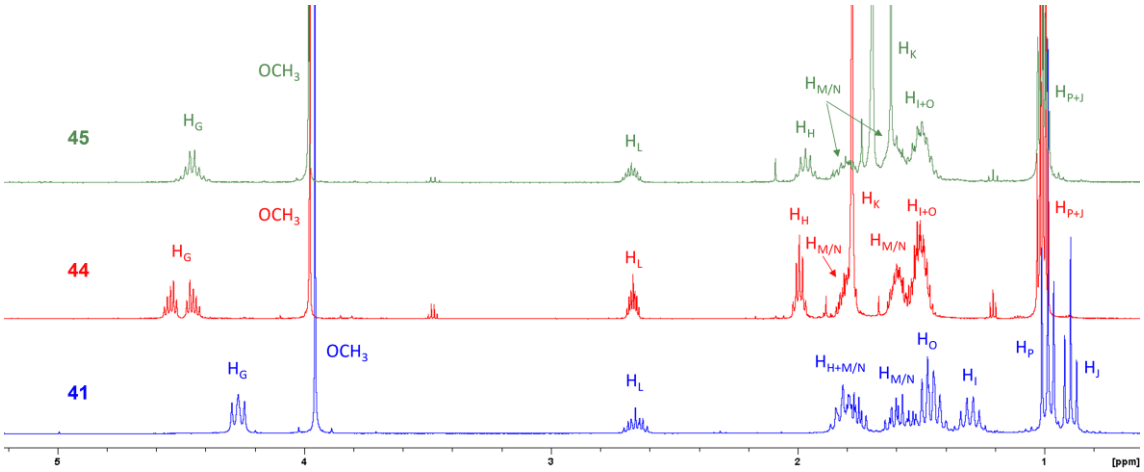


Figura 5.6. Comparación de la región alifática de los espectros de ^{1}H-RMN del proligando **41** y los complejos **44** y **45**, registrados en $CDCl_3$ a t.a., 600 MHz.

Del mismo modo se ha llevado a cabo el estudio de los espectros de ^{13}C-RMN. En las **Tabla 5.3** y **Tabla 5.4** se muestran las señales observadas.

Tabla 5.3. δ (ppm) de ^{13}C-RMN para **40**, **42** y **43**.

$DMF\text{-}d_7$	**40**	**42**	**43**
A	121,0	117,9	118,2
B	123,5	123,6	123,5
C	111,0	111,1	111,1
D	131,2	126,5	125,9
E	116,0	123,9	124,8
F	-	110,2	110,8
G	44,7	44,6	44,7
H	31,8	31,9	31,9
I	19,8	19,9	19,9
J	13,3	13,6	13,6
K	-	9,4	9,4
OCH_3	51,9	52,1	52,1

Tabla 5.4. δ (ppm) de ^{13}C-RMN para **41**, **44** y **45**.

$CDCl_3$	**41**	**44**	**45**
A	122,1	119,1	119,5
B	124,9	124,6	124,6
C	110,1	109,9	109,9
D	130,8	125,0	124,5
E	122,5	130,1	131,0
F	-	115,4	116,3
G	45,1	45,1	45,2
H	32,0	32,0	31,9
I	20,1	20,4	20,4
J	13,7	13,9	13,9
K	-	9,7	9,9
OCH_3	52,3	52,4	52,4
L	45,6	45,8	45,8
M/N	34,8	35,0	35,0
	34,8	34,9	34,9
O	20,9	20,9	20,9
P	14,2	14,2	14,2

Las resonancias de los carbonos aromáticos pertenecientes al grupo fenilo ($C_{D\text{-}F}$) son las que más se afectan por la ciclometalación. Así, el carbono C_D, tras la coordinación al metal, se observa a campo más alto en todos los casos (**Figuras A5.28** y **A5.29**) y al igual que ocurría en los espectros de protón, la señal correspondiente a C_E del ligando se desdobla (C_E y C_F). En el resto del espectro apenas se observan modificaciones (**Figuras A5.30** y **A5.31**).

Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

Como se ha mencionado anteriormente, la caracterización se completó mediante análisis elemental, cromatografía líquida y espectrometría de masas (**Tabla 5.5** y **Figuras A5.32**–**A5.37**). Los datos así obtenidos demuestran la validez de la estequiometría propuesta y garantizan que la pureza de los compuestos sintetizados es superior al 96%. Por otro lado, los espectros de masas muestran el perfil isotópico esperado para cada una de las muestras. Para los proligandos se empleó la técnica de espectrometría de masas por inserción directa mediante ionización por electrospray (ESI-MS), obteniendo como pico mayoritario el correspondiente al aducto $[M+H]^+$ (**Tabla 5.5** y **Figuras A5.32** y **A5.33**). Los complejos se estudiaron por HPLC/MS empleando un gradiente de la mezcla ACN:H_2O (**Tabla E.3**). Los cromatogramas (**Figura 5.7**) muestran un solo pico cuyo espectro de masas se corresponde con el ion molecular con pérdida del ligando cloruro, $[M-Cl]^+$ (**Tabla 5.5** y **Figuras A5.34**–**A5.37**).

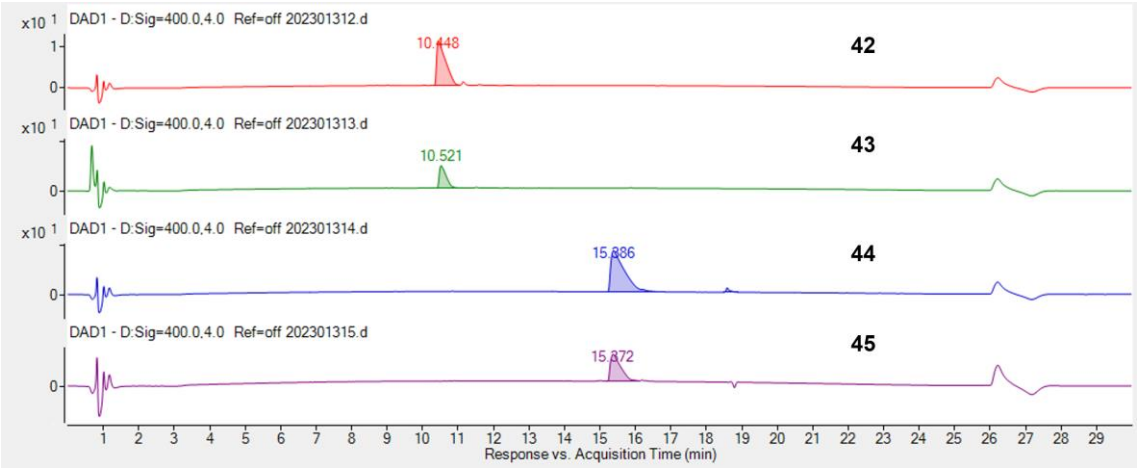


Figura 5.7. Cromatograma de los complejos sintetizados disueltos en DMF. Registrados en una mezcla ACN:H_2O (0,1% ácido acético), λ= 400 nm.

Tabla 5.5. Valores obtenidos por ESI-MS y análisis elemental. [a]Valores teóricos entre paréntesis.

Compuesto	t_R (min)	Fragmento	(m/z)[a]	%C[a]	%H[a]	%N[a]
40	-	$[M+H]^+$	325,155 (325,1547)	70,42 (70,35)	6,28 (6,21)	8,56 (8,64)
41	-	$[M+H]^+$	451,2595 (451,2591)	72,06 (71,97)	7,53 (7,61)	6,30 (6,22)
42	10,448	$[M-Cl]^+$	651,2191 (651,2199)	50,77 (50,76)	4,83 (4,99)	4,01 (4,08)
43	10,521	$[M-Cl]^+$	561,1616 (561,1625)	58,40 (58,35)	5,57 (5,74)	4,57 (4,69)
44	15,386	$[M-Cl]^+$	777,3241 (777,3243)	54,68 (54,70)	5,87 (5,96)	3,42 (3,45)
45	15,372	$[M-Cl]^+$	687,2681 (687,2665)	61,41 (61,45)	6,65 (6,69)	3,72 (3,87)

5.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante Rayos-X

La estructura molecular del complejo **45** fue corroborada mediante difracción de rayos-X. Los cristales se obtuvieron por difusión lenta de hexano en una disolución saturada de complejo en diclorometano. La resolución del cristal la llevó a cabo la Dra. Delia Bautista Cerezo del Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia. En la **Figura 5.8** se muestra la estructura del complejo **45** junto con algunas distancias y ángulos de enlace significativos. Los datos cristalográficos de dicha estructura cristalina y su celdilla unidad se encuentran recogidos en la **Tabla 5.6**. El resto de los datos de refinamiento se pueden ver en la **Tabla A5.1** del Anexo IV.

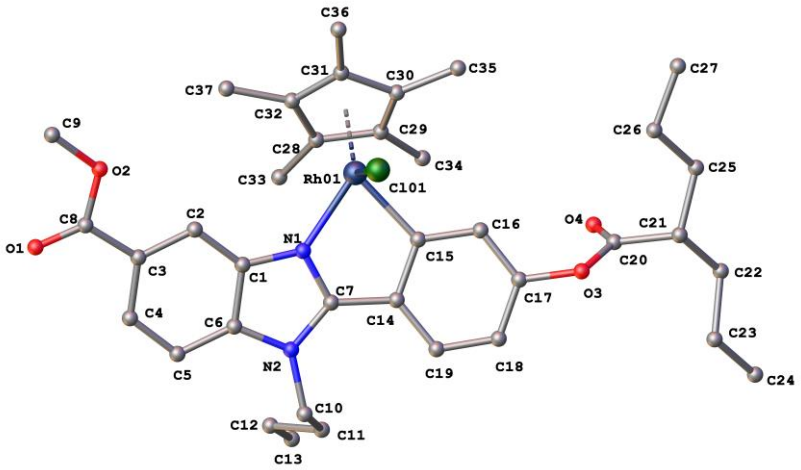


Figura 5.8. Estructura cristalina del complejo **45**. Distancias de enlace [Å]: Rh(01)-C(15): 2,0252(13); Rh(01)-N(1): 2,0865(11); Rh(01)-C(30): 2,1480(13); Rh(01)-C(28): 2,1496(14); Rh(01)-C(29): 2,1590(14); Rh(01)-C(31): 2,2421(14); Rh(01)-C(32): 2,2694(14); Rh(01)-Cl(01): 2,3942(4). Ángulos [°]: C(15)-Rh(01)-N(1): 77,82(5); N(1)-Rh(01)-C(32): 105,87(5); C(15)-Rh(01)-Cl(01): 87,02(4); N(1)-Rh(01)-Cl(01): 92,02(3).

Tabla 5.6. Datos cristalográficos del complejo **45**.

Sistema cristalino: triclínico. Grupo espacial: P-1					
a [Å]	**b [Å]**	**c [Å]**	**α [º]**	**β [º]**	**γ [º]**
10,8394(5)	11,3065(6)	14,4856(7)	105,159(2)	94,760(2)	90,872(2)

La estructura confirma la geometría pseudo-octaédrica con forma de “taburete de piano” típica de los complejos semi-sándwich,[2,17,23] donde el ligando Cp* se une al centro metálico η^5 coordinado a través de un enlace tipo π. A su vez, el ligando C^N se coordina al metal formando un quelato bidentado (κ^2-C,N), donde los anillos de benzimidazol y fenilo no se encuentran exactamente en el mismo plano. La última posición de coordinación la ocupa el ligando cloruro. Por otro lado, la distancia de enlace Rh–Cl [2,3942(4) Å] es similar a las observadas previamente en otros complejos de Rh(III) C^N-ciclometalados de este tipo.[24]

En cuanto a las interacciones intermoleculares e intramoleculares, se ha observado que el complejo **45** establece enlaces de hidrógeno entre el ligando cloruro

de una molécula y uno de los hidrógenos del carbono C10 perteneciente al grupo butilo de la molécula adyacente (**Figura 5.9** y **Tabla 5.7**).

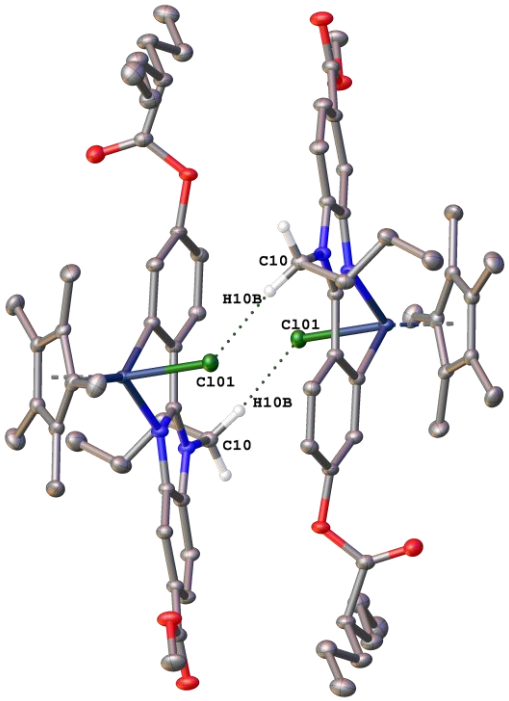


Figura 5.9. Interacciones por enlace de hidrógeno observadas para el complejo **45**. Se han omitido los hidrógenos no participantes en dicho enlace por mayor claridad.

Tabla 5.7. Enlaces de hidrógeno observados en la estructura cristalina.

D-H···A	d(D-H) [Å]	d(H···A) [Å]	d(D···A) [Å]	<(DHA) [º]
C(10)-H(10B)···Cl(01)[a]	0,99	2,77	3,5956(14)	140,8

[a]Transformación de simetría usada para generar los átomos equivalentes: -x+1,-y+1,-z+1

5.2.4. Espectroscopia de absorción UV/Vis

Se han registrado los espectros de absorción UV/Vis de los cuatro nuevos complejos en acetonitrilo y en agua (1% DMF) (**Figura 5.10**).

Todos los complejos presentan, tanto en acetonitrilo como en agua (1% DMF), bandas más intensas a 230–270 nm, correspondientes a las transiciones intraligando (IL) de tipo π-π*, y una segunda banda menos intensa y energética a ~330 nm debida a las transiciones de transferencia de carga metal-ligando (^{1}MLCT y ^{3}MLCT).[25]

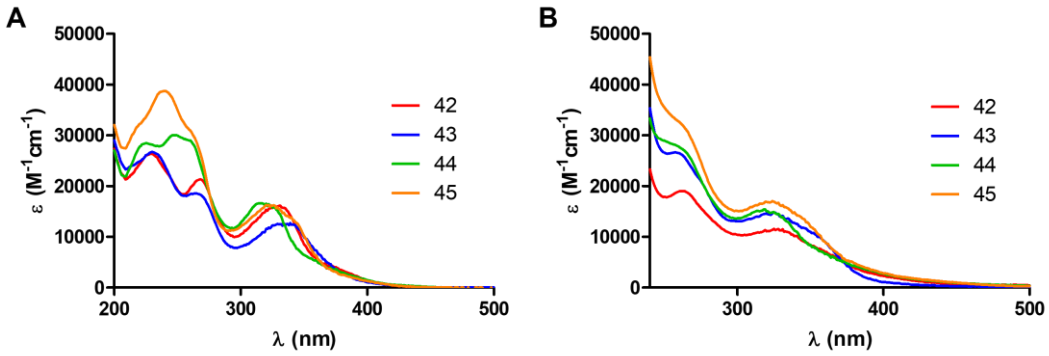


Figura 5.10. Espectros de absorción UV/Vis de los complejos en (A) acetonitrilo y (B) agua (1% DMF), registrados a una concentración 10 µM, a t.a. y en presencia de oxígeno.

En la **Tabla 5.8** se recogen los valores de todos los máximos de absorción y su coeficiente de extinción molar.

Tabla 5.8. Datos de espectroscopia de absorción UV/Vis en acetonitrilo y agua (1% DMF).

Compuesto	**λ [nm] (Ɛ [$M^{-1}cm^{-1}$])**
	Acetonitrilo
42	232 (26000), 271 (20730), 331 (15400)
43	233 (26420), 269 (18170), 335 (12200)
44	228 (28520), 251 (29800), h263 (28050), 322 (16480)
45	223 (33000), 242 (38530), h265 (28720), 326 (16220), h348 (11240)
	Agua (1% DMF)
42	265 (18820), 330 (11510), h362 (6730)
43	262 (26170), 328 (14560), h358 (9530)
44	265 (26650), 324 (14870), h376 (5360)
45	264 (31420), 327 (16610), h362 (8430)

5.2.5. Estudios de estabilidad

Se comprobó la estabilidad de los complejos sintetizados en distintos medios de interés para los posteriores estudios biológicos.

Inicialmente, mediante ^{1}H-RMN se estudió la estabilidad de los complejos **42** y **43** en DMSO-d_6 (**Figura 5.11** y **Figura 5.12**, respectivamente). Como puede observarse, en ambos casos se aprecia la aparición de nuevas señales, probablemente, correspondientes al solvatocomplejo formado por el intercambio del ligando cloruro por una molécula de DMSO.[19] Este comportamiento se explica por el hecho de que los complejos de iridio(III) presentan una gran afinidad por unirse al dimetilsulfóxido.[26] Además, en el caso de **43** el intercambio es mucho más rápido. Como se observa en la evolución del espectro, a los 5 minutos ya es mayoritario el solvatocomplejo final.

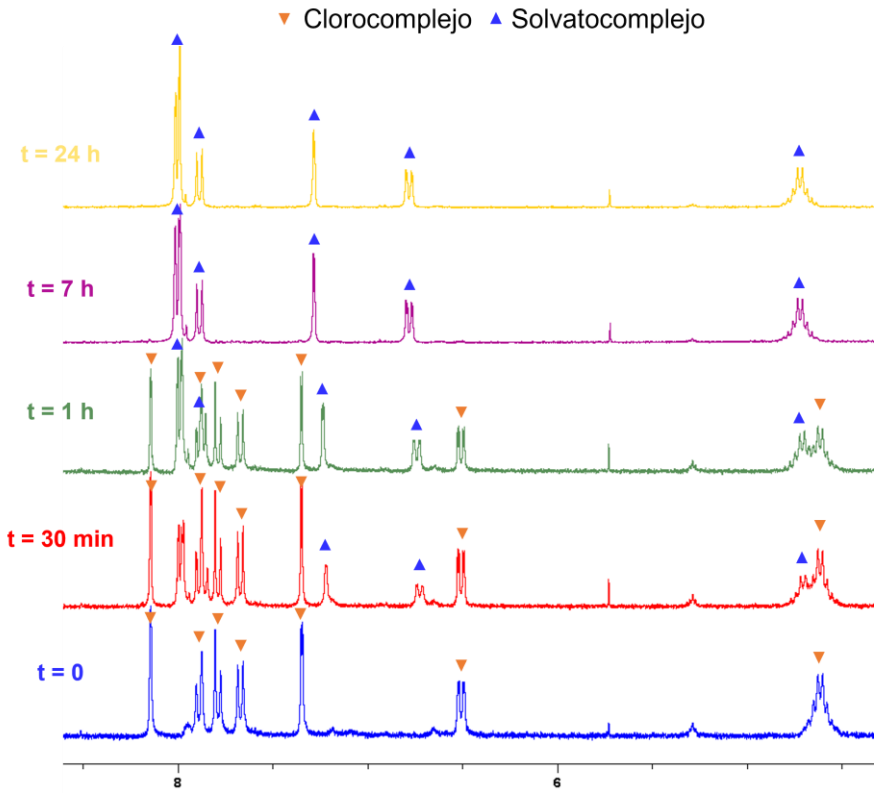


Figura 5.11. Estudio de estabilidad del complejo **42** en DMSO-d_6 por ^{1}H-RMN a t=0, 30 min y 1, 7 y 24 h a t.a., 400 MHz.

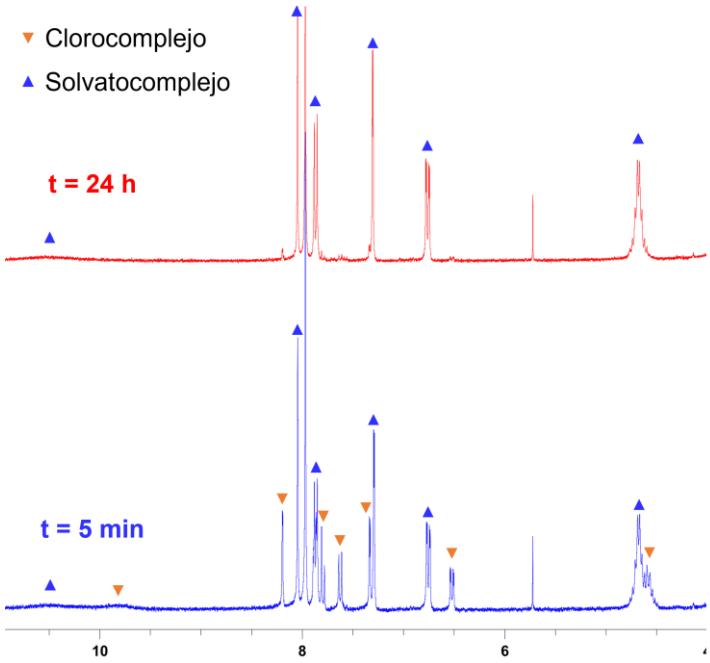


Figura 5.12. Estudio de estabilidad del complejo **43** en DMSO-d_6 por ^{1}H-RMN a t=5 min y 24 h a t.a., 400 MHz.

Debido al comportamiento en DMSO-d_6, se estudió la estabilidad de todos los complejos empleando DMF-d_7 y en esta ocasión no se produjo ningún cambio al cabo de 48 h a temperatura ambiente, confirmando la estabilidad de los mismos en este

medio (**Figura 5.13** para **42** y **Figuras A5.39**–**A5.41** para el resto). Teniendo en cuenta estos resultados, la DMF fue el disolvente elegido para el resto de los estudios.

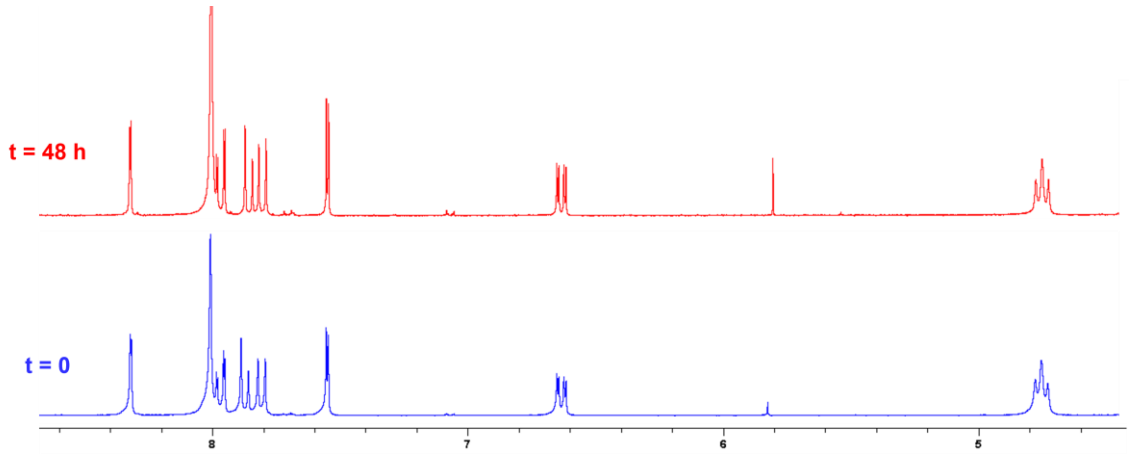


Figura 5.13. Estudio de estabilidad del complejo **42** en DMF-d_7 por ^{1}H-RMN a t=0 y 48 h a t.a., 400 MHz.

Por último, se comprobó la estabilidad de **42**–**45** en medio de cultivo RPMI (5% DMF) mediante espectroscopia UV/Vis tras 24 h de incubación a 37 ºC. Como se puede observar en la **Figura 5.14**, los complejos que contienen el ligando **41** mostraron la mejor estabilidad en este medio, ya que no se observan desplazamientos en sus máximos de absorción, por lo que la presencia del grupo valproato parece mejorar la estabilidad en este tipo de complejos.

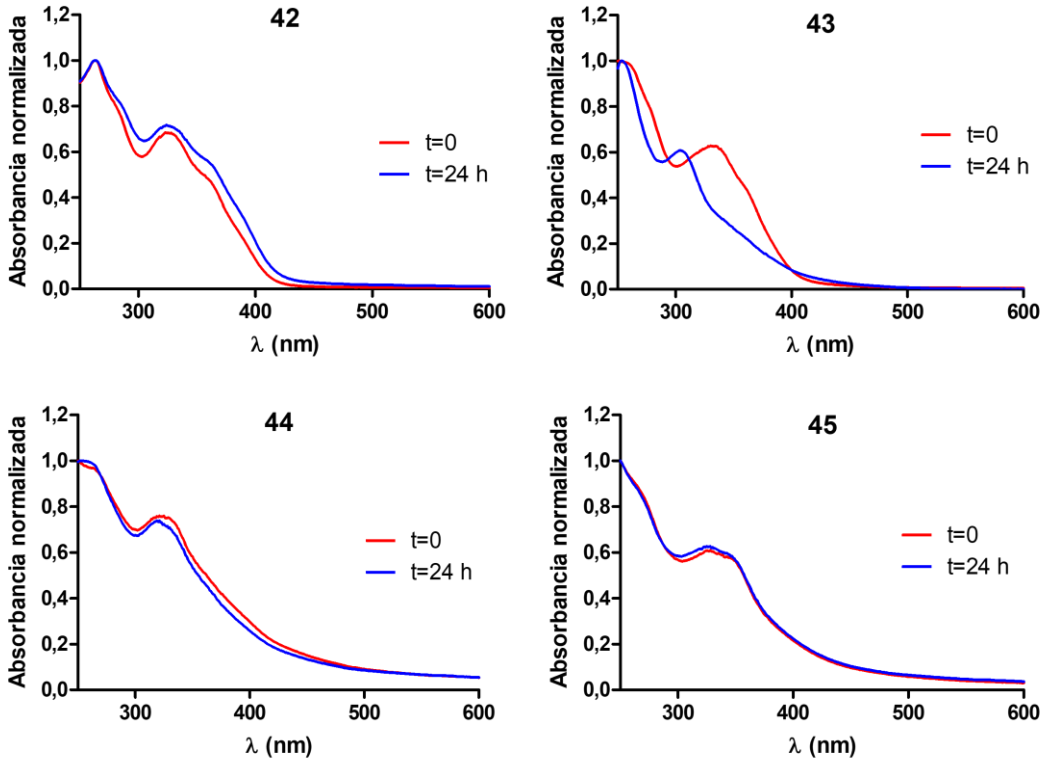


Figura 5.14. Estudio de estabilidad de los complejos en RPMI (5% DMF) por UV/Vis tras 24 h de incubación a 37 ºC a una concentración 10 µM.

5.2.6. Estudio de hidrólisis

Además de los estudios realizados anteriormente, también se comprobó el comportamiento de los complejos en medio acuoso, tanto en ausencia como en presencia de iones cloruro en concentraciones biológicamente relevantes.

Para ello, se registró el espectro de ^{1}H-RMN del complejo **45** en MeOD:D_2O (2:1) a distintos tiempos (**Figura 5.15**). A los 5 min tras la disolución en la mezcla de disolventes, la especie que se encuentra en mayor proporción es el acuocomplejo, siendo minoritario el clorocomplejo de partida. Al cabo de 24 h, el espectro no cambia con respecto al de los 5 min, indicando que el equilibrio se alcanza de manera prácticamente inmediata. A continuación, se adiciona ion cloruro hasta una concentración 4 mM y se observa un desplazamiento del equilibrio hacia la formación del clorocomplejo, desapareciendo casi por completo el solvatocomplejo. Finalmente, al añadir un mayor exceso de ion cloruro (23 mM) desaparece completamente el acuocomplejo, siendo el clorocomplejo la única especie. Lo que indica que el complejo **45** sufre una hidrólisis parcial en medio acuoso, que es completamente reversible en presencia de exceso de iones cloruro.

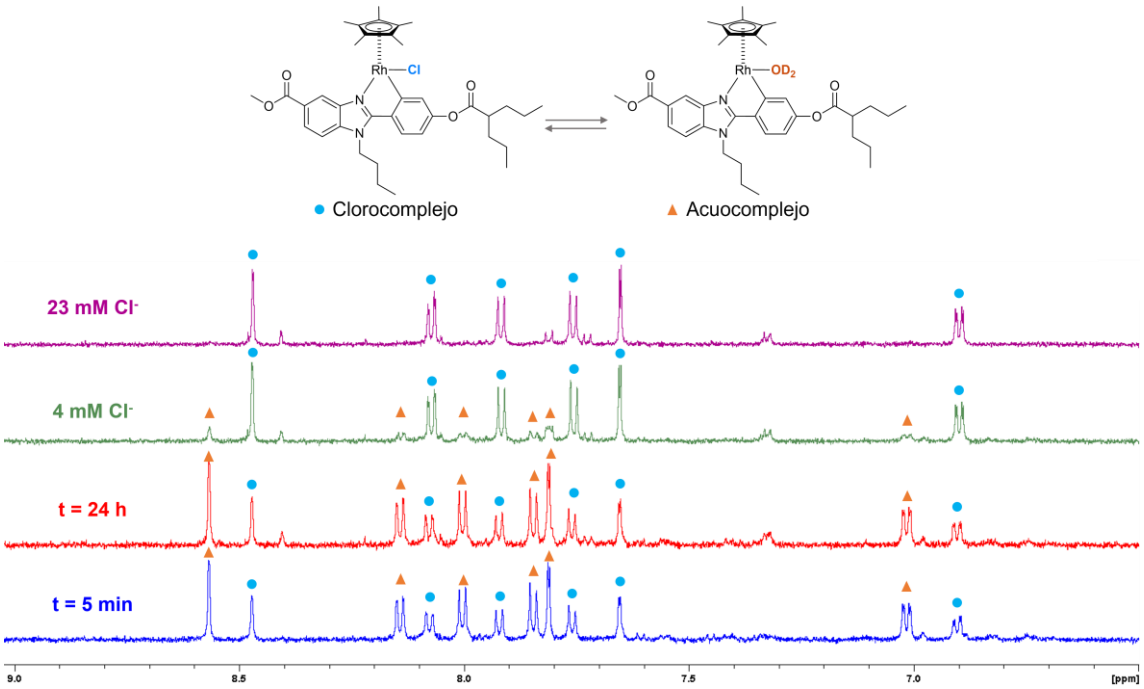


Figura 5.15. Estudio de hidrólisis del complejo **45** (1 mM) en MeOD:D_2O (2:1) por ^{1}H-RMN, 600 MHz, a t.a.: tras 5 min (línea azul), 24 h (línea roja), tras 24 h y la adición de Cl^- (4 mM) (línea verde) y tras 24 h y la adición de Cl^- (23 mM) (línea morada).

5.3. Estudios de la actividad antibacteriana *in vitro*

Uno de los objetivos de este trabajo fue investigar la posible actividad de los compuestos sintetizados como agentes antibacterianos frente a bacterias multirresistentes. Estos estudios los llevó a cabo la Dra. Natalia Busto de la Universidad de Burgos.

Se evaluó la habilidad de los nuevos complejos para inhibir el crecimiento de dos cepas de bacterias Gram-positiva: *Enterococcus faecium* (resistente a la vancomicina) y *Staphylococcus aureus* (resistente a la meticilina); y dos Gram-negativa: *Acinetobacter baumanii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se empleó el método de microdiluciones en caldo y se analizaron los proligandos, el ácido valproico y los complejos metálicos junto con la Norfloxacina (antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas de amplio espectro), que se usó como control positivo.

La **Tabla 5.9** recoge los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC), que es la concentración más baja del antibiótico que da como resultado la inhibición de crecimiento visible (colonias en una placa o turbidez en caldo de cultivo).

Tabla 5.9. Valores de MIC (μM) del ácido valproico (VPA), los proligandos y los complejos sintetizados. La Norfloxacina se incluyó como control positivo.

MIC (μM)	**Gram-positiva**		**Gram-negativa**	
	E. faecium	***S. aureus***	***A. baumanii***	***P. aeruginosa***
40	>60	>60	>60	>60
41	>60	>60	>60	>60
VPA	>60	>60	>60	>60
42	>60	>60	>60	>60
43	>60	>60	>60	>60
44	7,5	3,8	>60	>60
45	3,8	2	>60	>60
Norfloxacina	6	6	20	3

Los resultados obtenidos muestran que tanto los proligandos, **40** y **41**, como el ácido valproico no presentaron, por sí solos, actividad frente a ninguna de las cepas estudiadas. También se observó que ninguno de los compuestos estudiados, excepto el control positivo, mostraba actividad frente a las cepas de bacterias Gram-negativa, probablemente debido a la naturaleza neutra de los compuestos. Los complejos **44** y **45**, que contienen el grupo valproato en el ligando ciclometalado, fueron los únicos que mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas Gram-positiva, siendo el derivado de rodio, **45**, el complejo más activo en ambas cepas, incluso más que el antibiótico de amplio espectro Norfloxacina. El papel que juega el centro metálico es secundario frente al papel del conjugado con valproato, que parece ser el responsable de la actividad

antimicrobiana de estos compuestos y que podría estar relacionada con la habilidad del grupo valproato para inhibir la histona deacetilasa y para afectar a la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias y hongos.[27]

Con el fin de determinar si estos complejos se comportan como bactericidas (matan a las bacterias) o bacteriostáticos (previenen el crecimiento bacteriano), se calcularon los valores de la mínima concentración bactericida (MBC), que es la concentración más baja de antibiótico capaz de matar el 99,9% del inóculo original en un periodo de tiempo determinado. En la **Tabla 5.10** se recogen los valores de MBC y los cocientes MBC/MIC, que determinan el comportamiento como agente bactericida (MBC/MIC ≤4) o bacteriostático (MBC/MIC >4).

Tabla 5.10. Valores de MBC (μM) y de los cocientes MBC/MIC de los complejos **44** y **45**.

MBC (μM)	Gram-positiva	
	E. faecium	***S. aureus***
44	60	30
45	15	7,5

MBC/MIC	Gram-positiva	
	E. faecium	***S. aureus***
44	8	7,9
45	3,9	3,8

De acuerdo con los resultados obtenidos, se dedujo que el complejo **44** resultó ser un agente bacteriostático mientras que **45** se comportó como agente bactericida. Lo que demuestra que el centro metálico determina la magnitud del efecto antimicrobiano.

Por último, un estudio de acumulación de los cuatro complejos en el interior de las bacterias mediante la técnica ICP/MS (**Figura 5.16**) indica que, a pesar de que los complejos de iridio se acumulan más que sus análogos de rodio en todas las cepas, apenas entran en las Gram-negativa (*A. baumanii* y *P. aeruginosa*), probablemente debido al hecho de que estas bacterias presentan una membrana externa extra que impide la entrada de los fármacos.[28]

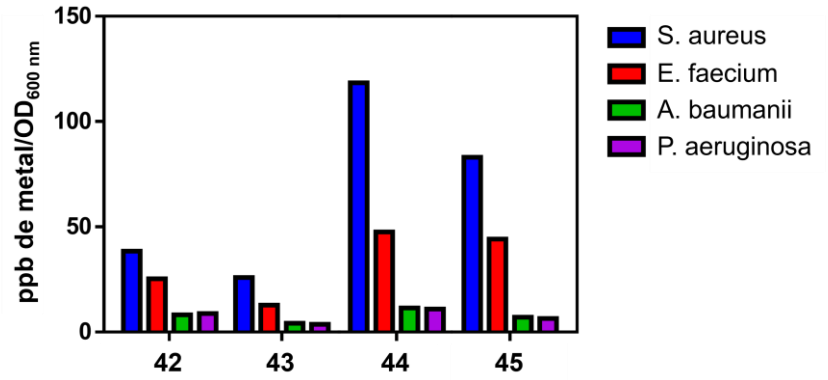


Figura 5.16. Estudio mediante ICP/MS de acumulación del metal en las bacterias tratadas con los complejos (1 μM) durante 4 h.

El tipo de centro metálico y la acumulación bacteriana no se correlaciona con la actividad antimicrobiana (**Tabla 5.9**). El complejo de iridio se acumula en mayor medida en la cepa *S. aureus*, pero el de rodio presenta mejor actividad frente a esta. Un comportamiento similar ya ha sido observado anteriormente[5] y señala que podría deberse al hecho de que los complejos metálicos presentaran mecanismos de acción diferentes. Por otro lado, los complejos que contienen el ligando **41** se acumulan en mayor medida que los del ligando **40**, lo que demuestra que el grupo valproato mejora la internalización en la bacteria gracias a su carácter lipofílico.

5.4. Resumen

En el presente capítulo se describe la síntesis y caracterización de una serie de nuevos ligandos y complejos de tipo semi-sándwich de Ir(III) y Rh(III). Se ha evaluado el efecto de las modificaciones estructurales, como son la conjugación de un grupo valproato y la variación del metal, en sus propiedades químicas y biológicas frente a cepas de bacterias multirresistentes. Los estudios en diferentes medios sugirieron que la presencia del grupo valproato mejora la estabilidad de los complejos que lo contienen, **44** y **45**. Además, **45** demostró sufrir un proceso de hidrólisis en medio acuoso reversible en presencia de cloruros.

Todos los compuestos resultaron ser inertes frente a las bacterias Gram-negativa, probablemente debido a la naturaleza neutra de éstos y su escasa internalización. Sin embargo, los complejos conjugados con valproato (**44** y **45**) mostraron actividad antibacteriana frente a patógenos Gram-positivo, por lo que la conjugación del valproato parece ser crucial en la actividad frente a bacterias Gram-positiva, especialmente en el caso del complejo **45** frente a *S. aureus*, una bacteria cuya incidencia está sufriendo un rápido aumento y causa 11.000 muertes al año en Estados Unidos.[29]

Por lo que sabemos, este es el primer estudio de complejos antibacterianos de Ir(III) y Rh(III) con ligandos C,N-quelato frente a algunos patógenos ESKAPE. Los resultados preliminares de actividad antimicrobiana que se presentan en este capítulo son prometedores y alentadores para seguir investigando este tipo de complejos funcionalizados con valproato, incluyendo el estudio de su mecanismo de acción.

5.5. Bibliografía

(1) Li, F.; Collins, J. G.; Keene, F. R. Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (8), 2529–2542. https://doi.org/10.1039/C4CS00343H.

(2) Mansour, A. M.; Radacki, K. Antimicrobial Properties of Half-Sandwich Ir(III) Cyclopentadienyl Complexes with Pyridylbenzimidazole Ligands. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (14), 4491–4501. https://doi.org/10.1039/D0DT00451K.

(3) Chellan, P.; Avery, V. M.; Duffy, S.; Triccas, J. A.; Nagalingam, G.; Tam, C.; Cheng, L. W.; Liu, J.; Land, K. M.; Clarkson, G. J.; Romero-Canelón, I.; Sadler, P. J. Organometallic Conjugates of the Drug Sulfadoxine for Combatting Antimicrobial Resistance. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (40), 10078–10090. https://doi.org/10.1002/chem.201801090.

(4) Chen, F.; Moat, J.; McFeely, D.; Clarkson, G.; Hands-Portman, I. J.; Furner-Pardoe, J. P.; Harrison, F.; Dowson, C. G.; Sadler, P. J. Biguanide Iridium(III) Complexes with Potent Antimicrobial Activity. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (16), 7330–7344. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00906.

(5) Bernier, C. M.; DuChane, C. M.; Martinez, J. S.; Falkinham, J. O. I.; Merola, J. S. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of RhIII and IrIII N-Heterocyclic Carbene Piano-Stool Complexes. *Organometallics* **2021**, *40* (11), 1670–1681. https://doi.org/10.1021/acs.organomet.1c00166.

(6) Yang, Y.; Guo, L.; Tian, Z.; Gong, Y.; Zheng, H.; Zhang, S.; Xu, Z.; Ge, X.; Liu, Z. Novel and Versatile Imine-N-Heterocyclic Carbene Half-Sandwich Iridium(III) Complexes as Lysosome-Targeted Anticancer Agents. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (17), 11087–11098. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01656.

(7) Bruni, J.; Wilder, B. J. Valproic acid. Review of a new antiepileptic drug. *Arch. Neurol.* **1979**, *36* (7), 393–398. https://doi.org/10.1001/archneur.1979.00500430023002.

(8) Blaheta, R. A.; Nau, H.; Michaelis, M.; Cinatl.Jr, J. Valproate and Valproate-Analogues: Potent Tools to Fight Against Cancer. *Curr. Med. Chem. 9* (15), 1417–1433. https://doi.org/ 10.2174/0929867023369763.

(9) Feng, W.; Kenney, S. C. Valproic Acid Enhances the Efficacy of Chemotherapy in EBV-Positive Tumors by Increasing Lytic Viral Gene Expression. *Cancer Res.* **2006**, *66* (17), 8762–8769. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1006.

(10) Dong, L.; Fang, L.; Dai, X.; Zhang, J.; Wang, J.; Xu, P. Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of Valproic Acid-Pyrazole Conjugates as a Potential Agent against Periodontitis. *Drug Dev. Res.* **2022**, *83* (1), 131–141. https://doi.org/10.1002/ddr.21851.

(11) Zutz, C.; Bacher, M.; Parich, A.; Kluger, B.; Gacek-Matthews, A.; Schuhmacher, R.; Wagner, M.; Rychli, K.; Strauss, J. Valproic Acid Induces Antimicrobial Compound Production in Doratomyces Microspores. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 510. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00510.

(12) Tabrizi, L.; McArdle, P.; Ektefan, M.; Chiniforoshan, H. Synthesis, Crystal Structure, Spectroscopic and Biological Properties of Mixed Ligand Complexes of Cadmium(II), Cobalt(II) and Manganese(II) Valproate with 1,10-Phenanthroline and Imidazole. *Inorganica Chim. Acta* **2016**, *439*, 138–144. https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.10.015.

(13) Esiobu, N.; Hoosein, N. An Assessment of the in Vitro Antimicrobial Effects of Two Antiepileptic Drugs–Sodium Valproate and Phenytoin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2003**, *83* (1), 63–68. https://doi.org/10.1023/A:1022992224594.

(14) Bansal, Y.; Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (21), 6208–6236. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013.

(15) Song, D.; Ma, S. Recent Development of Benzimidazole-Containing Antibacterial Agents. *ChemMedChem* **2016**, *11* (7), 646–659. https://doi.org/10.1002/cmdc.201600041.

(16) Boiani, M.; Gonzalez, M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. *Mini Rev. Med. Chem. 5* (4), 409–424. https://doi.org/ 10.2174/1389557053544047.

(17) Yellol, G. S.; Donaire, A.; Yellol, J. G.; Vasylyeva, V.; Janiak, C.; Ruiz, J. On the Antitumor Properties of Novel Cyclometalated Benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) Complexes. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (98), 11533. https://doi.org/10.1039/c3cc46239k.

(18) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhloufi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7310–7327. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01194.

(19) Acuña, M. I.; Rubio, A. R.; Martínez-Alonso, M.; Busto, N.; Rodríguez, A. M.; Davila-Ferreira, N.; Smythe, C.; Espino, G.; García, B.; Domínguez, F. Targets, Mechanisms and Cytotoxicity of Half-Sandwich Ir(III) Complexes Are Modulated by Structural Modifications on the Benzazole Ancillary Ligand. *Cancers* **2023**, *15* (1), 107. https://doi.org/10.3390/cancers15010107.

(20) Jiang, Y.; Jia, S.; Li, X.; Sun, Y.; Li, W.; Zhang, W.; Xu, G. An Efficient NaHSO3-Promoted Protocol for Chemoselective Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles in Water. *Chem. Pap.* **2018**, *72* (5), 1265–1276. https://doi.org/10.1007/s11696-017-0367-5.

(21) Betti, M.; Genesio, E.; Marconi, G.; Sanna Coccone, S.; Wiedenau, P. A Scalable Route to the SMO Receptor Antagonist SEN826: Benzimidazole Synthesis via Enhanced in Situ Formation of the Bisulfite–Aldehyde Complex. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18* (6), 699–708. https://doi.org/10.1021/op4002092.

(22) Ye, R.-R.; Cao, J.-J.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Valproic Acid-Functionalized Cyclometalated Iridium(III) Complexes as Mitochondria-Targeting Anticancer Agents. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (60), 15166–15176. https://doi.org/10.1002/chem.201703157.

(23) Zhang, W.-Y.; Banerjee, S.; Hughes, G. M.; Bridgewater, H. E.; Song, J.-I.; Breeze, B. G.; Clarkson, G. J.; Coverdale, J. P. C.; Sanchez-Cano, C.; Ponte, F.; Sicilia, E.; Sadler, P. J. Ligand-Centred Redox Activation of Inert Organoiridium Anticancer Catalysts. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (21), 5466–5480. https://doi.org/10.1039/D0SC00897D.

(24) Cerón-Carrasco, J. P.; Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D.; Zúñiga, J.; Requena, A. DFT Simulation of Structural and Optical Properties of 9-Aminoacridine Half-Sandwich Ru(II), Rh(III), and Ir(III) Antitumoral Complexes and Their Interaction with DNA. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (8), 3898–3910. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00139.

(25) Tabrizi, L. The Discovery of Half-Sandwich Iridium Complexes Containing Lidocaine and (Pyren-1-yl)ethynyl Derivatives of Phenylcyanamide Ligands for Photodynamic Therapy. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (22), 7242–7252. https://doi.org/10.1039/C7DT01091E.

(26) Carrasco, A. C.; Rodríguez-Fanjul, V.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M. Structurally Strained Half-Sandwich Iridium(III) Complexes As Highly Potent Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (8), 4005–4021. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02000.

(27) Poolchanuan, P.; Unagul, P.; Thongnest, S.; Wiyakrutta, S.; Ngamrojanavanich, N.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. An Anticonvulsive Drug, Valproic Acid (Valproate), Has Effects on the Biosynthesis of Fatty Acids and Polyketides in Microorganisms. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 9300. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66251-y.

(28) Busto, N.; Vigueras, G.; Cutillas, N.; García, B.; Ruiz, J. Inert Cationic Iridium(III) Complexes with Phenanthroline-Based Ligands: Application in Antimicrobial Inactivation of Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (25), 9653–9663. https://doi.org/10.1039/D2DT00752E.

(29) Thorpe, K. E.; Joski, P.; Johnston, K. J. Antibiotic-Resistant Infection Treatment Costs Have Doubled Since 2002, Now Exceeding $2 Billion Annually. *Health Affairs* **2018**, *37* (4), 662–669. https://doi.org/10.1377/hlthaff.2017.1153.

Capítulo 6

Conclusiones

1. Se ha sintetizado y caracterizado una serie de nueve complejos de Re(I) del tipo *fac*-$[Re(CO)_3(N^N)L]^{0/+}$ donde N^N es un ligando bidentado basado en benzimidazol y L es el ligando monodentado cloruro, piridina o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina. Se ha comprobado que modificaciones en los ligandos N^N y L tienen una gran repercusión en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Los clorocomplejos son los menos estables en todos los medios ensayados, por el contrario, los compuestos que contienen el ligando DMAP no se alteran en las condiciones probadas. Todos los complejos son luminiscentes en estado sólido, lo que ha permitido realizar estudios de microscopía confocal y de fluorescencia. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* en las líneas tumorales A2780 y HeLa han demostrado que los derivados con DMAP son los más activos y selectivos, especialmente el complejo **12**. Su mecanismo de acción implica la generación de ROS, la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la muerte celular por piroptosis. Por otro lado, los estudios *in vivo* en cepas de *C. elegans* demuestran que **12** es capaz de reducir el tamaño del tumor en la cepa JK1466 y la incidencia del número de vulvas en la cepa MT2124, sin resultar tóxico para el animal.

2. Se ha desarrollado una serie de complejos de Ir(III) de fórmula general $[Ir(ttpy)(C^N)Cl]PF_6$, donde "ttpy" es 4′-(*p*-tolil)-2,2′:6′,2″-terpiridina y C^N es un ligando basado en benzimidazol con un grupo alquilo o arilo como sustituyente en el átomo de N. Todas las especies son luminiscentes y estables en las condiciones estudiadas, no hidrolizándose en presencia de agua. Se ha evaluado la actividad anticancerígena de los nuevos complejos en las líneas tumorales de mama MDA-MB-231 y MCF-7 y todos ellos presentan elevada citotoxicidad y selectividad, aunque se ha comprobado que las modificaciones estructurales en los ligandos C^N tienen un gran impacto en sus propiedades biológicas, siendo el complejo **22**, con el grupo tiofen-2-ilo unido al benzimidazol, el de mayor actividad antiinvasiva y antimetastásica frente a TNBC, uno de los tipos de tumores más agresivos de cáncer de mama. Además, todos los ensayos realizados indican que en estos aspectos es mucho más eficiente que la doxorrubicina, fármaco en uso clínico utilizado en este tipo de cánceres.

3. Se han diseñado dos nuevas series de complejos ciclometalados de Ir(III) y Ru(II) de fórmula general $[Ir(C^N)_2(N^N)]PF_6$ y $[Ru(C^N)(N^N)_2]PF_6$, respectivamente, donde C^N es un ligando derivado de 2,3-difenilbenzo[*g*]quinoxalina. Se ha comprobado que todos los compuestos presentan débiles bandas de absorción en torno a 600 nm, que son estables en distintos medios y fotoestables tras la irradiación con luz azul y roja. Los estudios de generación de ROS en medios libres de células indican que poseen elevados rendimientos cuánticos de generación de $^1O_2$. Además, un estudio preliminar de fototoxicidad ha demostrado que todos ellos presentan índices de fotoactivación muy

elevados en la línea tumoral HeLa tras irradiar con luz azul los compuestos de iridio y luz roja los de rutenio.

4. Se ha funcionalizado un proligando HC^N derivado de fenilbenzimidazol con un grupo valproato. Se han sintetizado y caracterizado complejos de Ir(III) y Rh(III), tipo semi-sándwich, de fórmula general [M(η^5-Cp*)(C^N)Cl], con dicho proligando y sus homólogos sin funcionalizar con fines comparativos. Los estudios de estabilidad mostraron que el grupo valproato aumenta la estabilidad de los nuevos compuestos. En cuanto a su actividad antibacteriana, ningún complejo es activo frente a cepas Gram-negativa, mientras que los derivados conjugados con valproato mostraron acción antibacteriana frente a patógenos Gram-positiva, concretamente frente a las cepas *Enterococcus faecium* (resistente a la vancomicina) y *Staphylococcus aureus* (resistente a la meticilina) comportándose el compuesto de Ir (**44**) como agente bacteriostático y el de Rh (**45**) como bactericida. Todo ello demuestra que la funcionalización con el grupo valproato es responsable de la actividad antimicrobiana, mientras que el metal gobierna la magnitud de dicho efecto.

Sección experimental

1. Materiales y reactivos

El ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico, butilamina, zinc en polvo, formiato de amonio, 2-piridincarboxaldehído, 2-quinolincarboxaldehído, benzo[*b*]tiofen-2-carboxaldehído, $Re(CO)_5Cl$, $AgCF_3SO_3$, piridina, 4-(dimetilamino)piridina, la 4'-(*p*-tolil)-2,2':6',2''-terpiridina, bromuro de 4-(trifluorometil)bencilo, 4-(trifluorometil)bencilamina, 2-fenilbenzimidazol, 3,4-(metilendioxi)benzaldehído, 2-naftaldehído, 1,2-fenilendiamina, 2-tiofencarboxaldehído, trietilamina, ácido trifluoroacético, sulfato de magnesio, hexafluorofosfato de potasio, la difeniletanodiona, 2,3-diaminonaftaleno, 4,4′-dimetoxibenzil, 9,10-fenantrenoquinona, 2-piridincarboxaldehído, triflurometanosulfonato de plata, ácido trifluoroacético, DPBF y HPF se adquirieron en Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se utilizaron sin purificación adicional. El hexafluorofosfato de amonio fue suministrado por FluoroChem. El $IrCl_3 \cdot H_2O$ y el dímero de cloruro de pentametilciclopentadienilrodio(III) ($[Rh(\eta^5\text{-}C_5Me_5)Cl_2]_2$) se adquirieron en Johnson Matthey.

Los disolventes DMSO, DMF, $CHCl_3$, ACN, Et_2O, hexano, AcOEt, etilenglicol y DCM fueron adquiridos de Scharlau (Barcelona, España) o LabBox. MeOH y EtOH fueron se adquirieron en J. Baker. Y los disolventes deuterados se en Euriso-top.

Las células MDA-MB-231, MDA-MB-231 Vim RFP, MCF-7 y MCF10A se adquirieron en ATCC. La sulforodamina B, la doxorrubicina y el ioduro de propidio procedían de Merck (Alemania). La matriz Geltrex procedía de Gibco. El medio esencial mínimo de Dubelco se adquirió y el FBS se adquirieron en Biosera y la gentamicina en Merck (Alemania).

2. Instrumentación

2.1. RMN

Los espectros de RMN de ^1H y $^{13}C\{^1H\}$ se registraron en un espectrómetro Bruker AC 300E, Bruker AV 400 o Bruker AV 600. Los desplazamientos químicos se citaron respecto a las impurezas de los disolventes deuterados.

2.2. Análisis elemental

Los análisis de C, H, N y S se llevaron a cabo en un microanalizador Carlo Erba modelo EA 1108, con un software EAGER 200.

2.3. Espectroscopia infrarroja

Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Jasco FT/IR-4600 con un sistema ATR-PRO ONE.

2.4. Espectrometría de masas (ESI/MS o HPLC/MS)

La pureza de algunos de los complejos obtenidos en el Capítulo 2 se analizó mediante RP-HPLC/MS en un equipo Agilent LC/Q-TOF 6546. La columna fue Zorbax Exlipse Plus C18, 2,1x50 mm, 1,8 µm. El flujo empleado fue de 0,4 mL/min y el gradiente y la composición de la fase móvil se muestran en la **Tabla E.1**.

Tabla E.1. Método empleado para el análisis de HPLC/MS en el Capítulo 2.

Tiempo (min)	0,1% ácido fórmico en H_2O	0,1% ácido fórmico en ACN
0-15	98	2
15-18	5	95
18-20	98	2
20-30	5	95

Los espectros de masas y HPLC/MS de los Capítulos 3, 4 y 5 se registraron en un equipo Agilent HPLC 1290 Series II + Agilent iFunnel 6550 QTOF AJS Dual ESI, empleando una columna Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1x100, 1,8 µm. El flujo empleado fue de 0,4 L/min y los gradientes se recogen en las **Tablas E.2** y **E.3**.

Tabla E.2. Método empleado para el análisis de HPLC/MS en el Capítulo 3.

Tiempo (min)	ACN	0,1% ácido fórmico en MeOH
0-30	50	50

Tabla E.3. Método empleado para el análisis de HPLC/MS en los Capítulos 4 y 5.

Tiempo (min)	0,1% ácido fórmico en H_2O	0,1% ácido fórmico en ACN
0-2	80	20
24-25	0	100
26-30	80	20

Los datos de espectrometría de masas se adquirieron en el modo de ionización positiva. Las muestras se disolvieron en ACN o en DMSO. Los espectros de masas muestran, en todos los casos, una distribución isotópica muy próxima a la calculada experimentalmente para la formulación del complejo catiónico. Mediante esta técnica comprobamos que los compuestos sintetizados empleados en los experimentos biológicos tenían una pureza ≥ 96%.

2.5. Espectroscopia de absorción UV/Vis

La espectroscopia de UV/Vis se registró en un espectrómetro PerkinElmer Lambda 750S con un software operativo.

2.6. Espectroscopia de emisión, medidas de rendimientos cuánticos de emisión y tiempos de vida media

Los espectros de emisión se registraron con un espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3−22 modular con una lámpara de xenon de 450W. Las medidas se realizaron en una configuración de ángulo recto utilizando cubetas de fluorescencia de cuarzo de 10 mm para disoluciones a 298 K. Los tiempos de vida de emisión (τ) se midieron utilizando un controlador IBH FluoroHub TCSPC y una fuente de excitación de diodo de pulso NanoLED (τ < 10μs); la incertidumbre estimada es de ± 10% o mejor. Los rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{em}) se midieron utilizando un espectrómetro de rendimiento cuántico absoluto de PL Hamamatsu C11347; la incertidumbre estimada es de ± 5% o mejor. Para las medidas en ausencia de oxígeno, las disoluciones de las muestras se burbujearon previamente con argón durante 30 minutos

2.7. Fuentes de irradiación de luz visible

Los experimentos de irradiación se realizaron empleando un fotorreactor EXPO-Panels de Luzchem (Canadá) equipado con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm^2) o un fotorreactor Well Plate Illuminator de Luzchem (Canadá) de luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2).

2.8. Reacciones en microondas

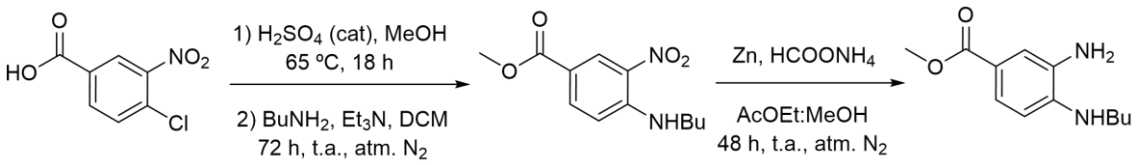
La síntesis de los complejos se llevó a cabo en un microondas de reacción modelo Anton Para Monowave 50 (315 W).

3. Síntesis de los compuestos

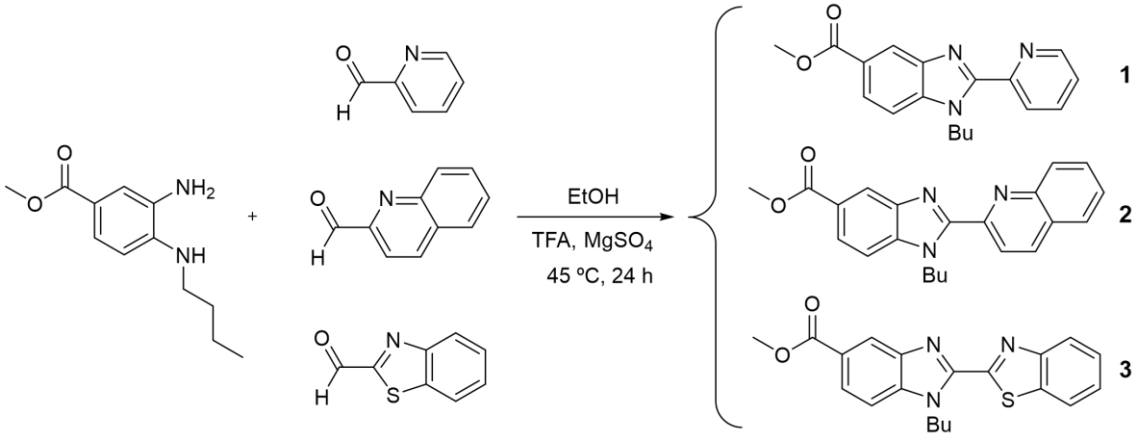
3.1. Capítulo 2

<u>Síntesis de ligandos N^N</u>

La síntesis de los ligandos N^N se llevó a cabo por reacción de condensación entre la diamina previamente preparada (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo, **Esquema E2.1**)[1] y el aldehído correspondiente (2-piridincarboxaldehído, 2-quinolincarboxaldehído o benzo[*b*]tiofen-2-carboxaldehído) (**Esquema E2.2**), como se describe en la bibliografía.[2,3]



Esquema E2.1. Síntesis del 3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo.



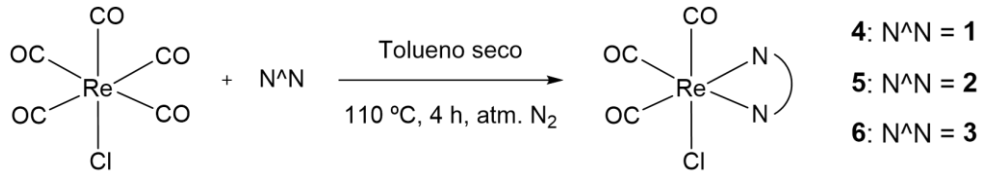
Esquema E2.2. Síntesis de los ligandos N^N.

Síntesis de complejos

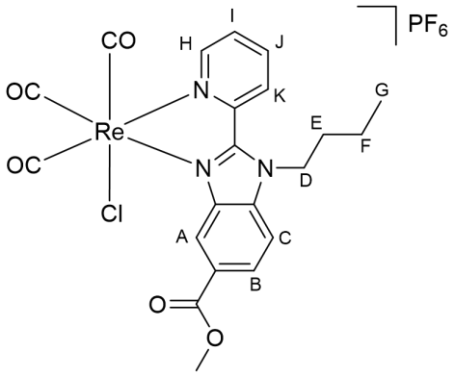
Todas las reacciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno.

Síntesis de complejos neutros del tipo [ReCl(CO)$_3$(N^N)]

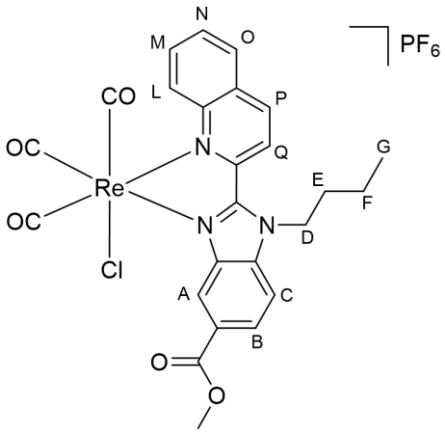
Los complejos neutros **4**–**6** se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (**Esquema E2.3**).[4] Una suspensión de $Re(CO)_5Cl$ (0,25 mmol, 90,4 mg) y del ligando N^N correspondiente (0,25 mmol) en 10 mL de tolueno seco se agitó a 110 ºC durante 4 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado obtenido se filtró, se lavó con agua y éter y se secó al aire. Se obtuvo un sólido puro de color amarillo-naranja.



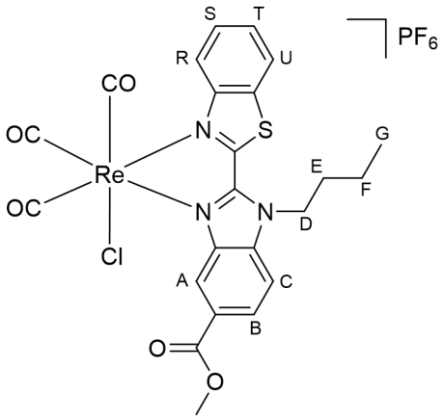
Esquema E2.3. Procedimiento general para la síntesis de los complejos **4**–**6**.



4: 50%. ^{1}H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ 9,26 (dd, *J* = 5,5, 1,0 Hz, 1H, H_H), 8,82 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H, H_A), 8,26 (dd, *J* = 8,7, 1,1 Hz, 1H, H_B), 8,17 (ddd, *J* = 8,1, 7,5, 1,0 Hz, 1H, H_J), 8,12 (dd, *J* = 8,1, 0,9 Hz, 1H, H_K), 7,61 (ddd, *J* = 7,5, 5,5, 0,9 Hz, 1H, H_I), 7,58 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H_C), 4,70 – 4,57 (m, 2H, H_D), 4,01 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,03 (m, 2H, H_E), 1,59 (m, 2H, H_F), 1,06 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 197,2, 196,8, 188,7, 166,4, 155,4 (C_H), 153,4, 147,3, 140,1, 139,4 (C_J), 138,6, 128,3, 128,0 (C_B), 127,4 (C_I), 123,6 (C_K), 122,6 (C_A), 110,8 (C_C), 52,8 (C_{OCH3}), 46,4 (C_D), 32,0 (C_E), 20,4 (C_F), 13,8 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 580,0882 m/z; exp.: 580,0854 m/z. Anal. Calc. para $C_{21}H_{19}ClN_3O_5Re$: %C, 41,01; %H, 3,11; %N, 6,83. Experimental: %C, 40,70; %H, 3,08; %N, 6,75.



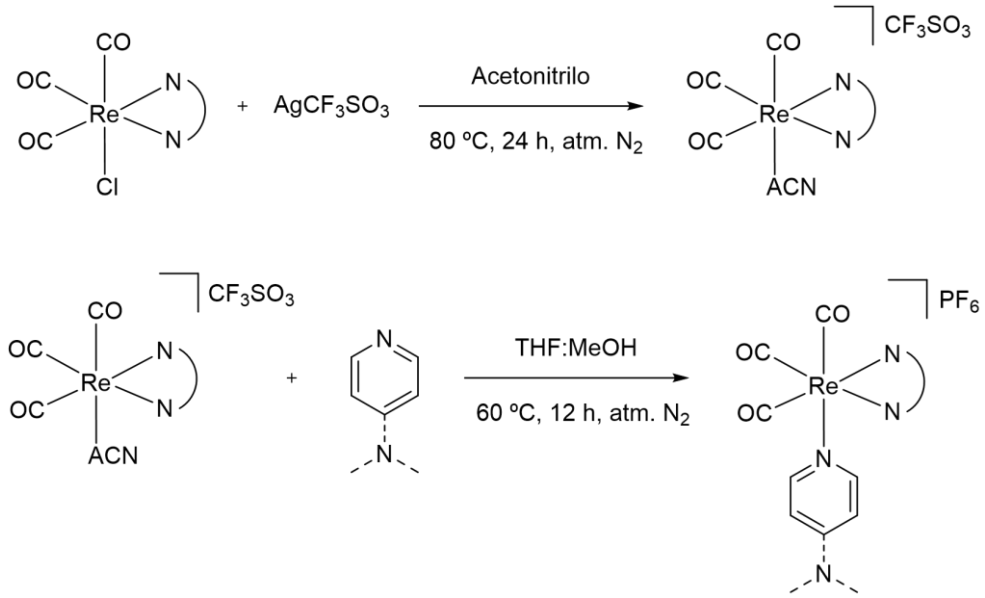
5: 71%. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,09 (dd, *J* = 8,8, 0,7 Hz, 1H, H_L), 8,95 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H, H_A), 8,60 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, $H_{Q/P}$), 8,28 (dd, *J* = 8,7, 1,1 Hz, 1H, H_B), 8,18 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, $H_{Q/P}$), 8,07 (ddd, *J* = 8,8, 6,9, 1,3 Hz, 1H, H_M), 7,98 (dd, *J* = 8,0, 1,3 Hz, 1H, H_O), 7,81 (ddd, *J* = 8,0, 6,9, 0,7 Hz, 1H, H_N), 7,61 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H_C), 4,79 – 4,61 (m, 2H, H_D), 4,03 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,06 (m, 2H, H_E), 1,59 (m, 2H, H_F), 1,06 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 197,3, 196,1, 188,9, 166,4, 155,5, 149,3, 149,1, 140,9 ($C_{Q/P}$), 140,7, 138,7, 133,7 (C_M), 131,3 (C_L), 130,1 (C_N), 128,8, 128,6 (C_O), 128,3, 128,0 (C_B), 122,5 (C_A), 119,0 ($C_{Q/P}$), 110,9 (C_C), 52,9 (C_{OCH3}), 46,8 (C_D), 32,2 (C_E), 20,4 (C_F), 13,8 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 630,1039 m/z; exp.: 630,1065 m/z. Anal. Calc. para $C_{25}H_{21}ClN_3O_5Re$: %C, 45,15; %H, 3,18; %N, 6,32. Experimental: %C, 45,10; %H, 3,12; %N, 6,30.



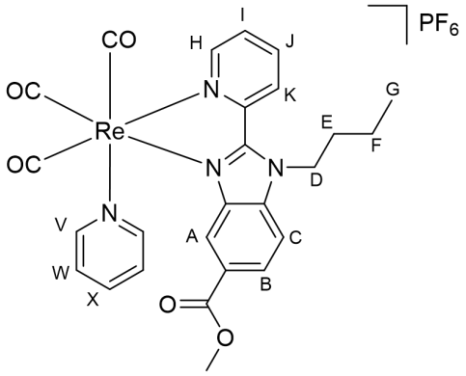
6: 54%. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,91 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H, H_A), 8,69 (dd, *J* = 8,4, 0,9 Hz, 1H, H_R), 8,30 (dd, *J* = 8,8, 1,0 Hz, 1H, H_B), 8,09 (dt, *J* = 8,1, 0,8 Hz, 1H, H_U), 7,88 (ddd, *J* = 8,4, 7,3, 0,8 Hz, 1H, H_S), 7,74 (ddd, *J* = 8,1, 7,3, 0,9 Hz, 1H, H_T), 7,62 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H_C), 4,68 (m, 2H, H_D), 4,03 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,05 (m, 2H, H_E), 1,60 (m, 2H, H_F), 1,06 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 196,9, 196,0, 187,3, 166,2, 155,6, 150,5, 150,3, 140,9, 138,0, 133,0, 130,0 (C_S), 129,3 (C_T), 128,8, 128,5 (C_B), 124,6 (C_R), 122,6 (C_U), 122,5 (C_A), 111,2 (C_C), 52,9 (C_{OCH3}), 47,1 (C_D), 32,3 (C_E), 20,5 (C_F), 13,8 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 636,0603 m/z; exp.: 636,0584 m/z. Anal. Calc. para $C_{23}H_{19}ClN_3O_5ReS$: %C, 41,16; %H, 2,85; %N, 6,26; %S, 4,78. Experimental: %C, 41,20; %H, 2,82; %N, 6,20; %S, 4,71.

Síntesis de complejos catiónicos del tipo [ReL(CO)$_3$(N^N)][PF$_6$] (L = Piridina, DMAP)

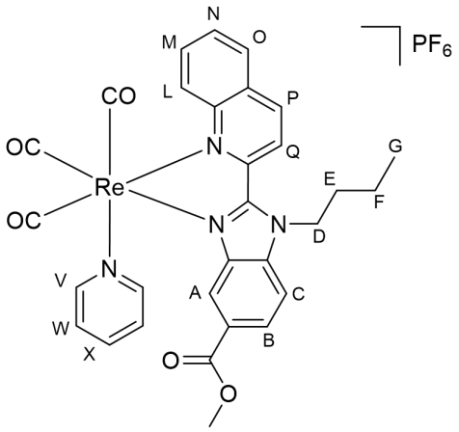
Los complejos catiónicos **7**–**12** se prepararon a partir de los complejos neutros siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (**Esquema E2.4**).[5] Una suspensión del complejo neutro correspondiente **4**–**6** (0,15 mmol) y $AgCF_3SO_3$ (0,15 mmol, 38,5 mg) en 50 mL de acetonitrilo se agitó a 80 ºC durante 24 h. Se filtró el AgCl formado y el filtrado se llevó a sequedad dando lugar a un sólido naranja que se empleó sin más purificación. Este sólido se disolvió en 12 mL de la mezcla THF:CH_3OH (3:1) y se añadió piridina o 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (0,15 mmol, 18,3 mg) dejándolo reaccionar durante 18 h a 60 ºC. Posteriormente, se añadió KPF_6 (0,75 mmol, 138 mg) a la mezcla y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El crudo de reacción se llevó hasta casi sequedad y el sólido resultante se filtró y se lavó con agua y hexano. El producto final se purificó por columna cromatográfica de alúmina empleando la mezcla CH_2Cl_2:CH_3CN (8:2) como eluyente. Finalmente, se obtuvo un sólido puro de color amarillo-naranja.



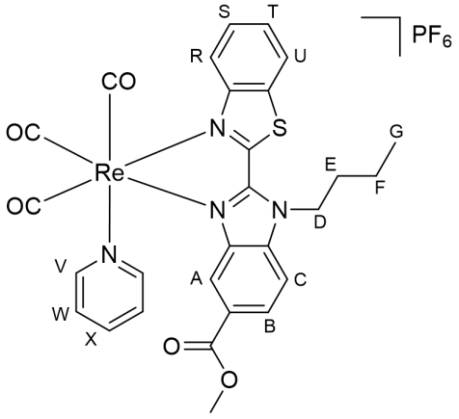
Esquema E2.4. Procedimiento general para la síntesis de los complejos **7**–**12**.



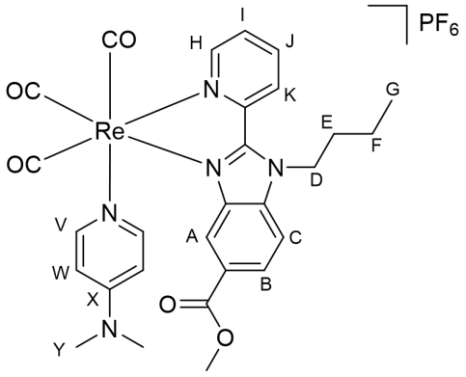
7: 32%. ^{1}H-RMN (600 MHz, CD_3CN) δ 9,39 (dd, *J* = 5,4, 1,0 Hz, 1H, H_H), 8,81 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H, H_A), 8,35 (ddd, *J* = 8,8, 8,1, 1,0 Hz, 1H, H_J), 8,29 (dd, *J* = 8,7, 1,5 Hz, 1H, H_B), 8,28 (dd, *J* = 8,3, 0,9 Hz, 1H, H_K), 8,18 (dd, *J* = 6,6, 1,5 Hz, 2H, H_V), 7,93 (dd, *J* = 8,6, 0,5 Hz, 1H, H_C), 7,86 (ddd, *J* = 7,5, 5,4, 1,1 Hz, 1H, H_I), 7,80 (tt, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H, H_X), 7,22 (dd, J = 7,7, 6,6 Hz, 2H, H_W), 4,66 (m, 2H, H_D), 4,00 (s, 3H, H_{OCH3}), 1,87 (m, 2H, H_E), 1,39 (m, 2H, H_F), 0,90 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 197,3, 196,7, 191,8, 167,1, 156,7 (C_H), 156,1, 153,2 (C_V), 147,7, 142,7 (C_J), 140,7 (C_X), 140,2, 140,2, 130,2 (C_I), 129,6, 128,3 (C_B), 127,6 (C_W), 126,8 (C_K), 121,1 (C_A), 113,8 (C_C), 53,3 (C_{OCH3}), 47,4 (C_D), 31,9 (C_E), 20,5 (C_F), 13,9 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 659,1304 m/z; exp.: 659,1325 m/z. Anal. Calc. para $C_{26}H_{24}F_6N_4O_5PRe$: %C, 38,86; %H, 3,01; %N, 6,97. Experimental: %C, 38,95; %H, 3,10; %N, 6,86.



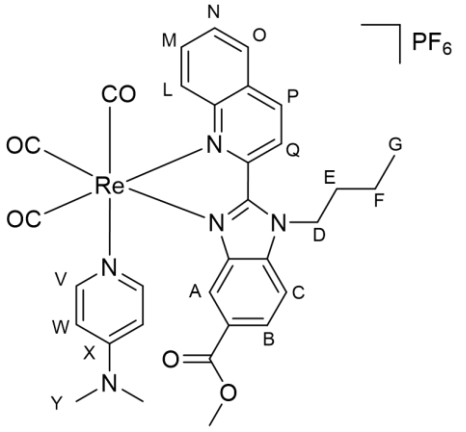
8: 16%. ^{1}H-RMN (600 MHz, CD_3CN) δ 9,05 (dd, *J* = 8,8, 0,8 Hz, 1H, H_L), 8,94 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, H_A), 8,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, $H_{P/Q}$), 8,33 (dd, *J* = 8,8, 1,4 Hz, 1H, H_B), 8,28 (m, 3H, $H_{P/Q+M+O}$), 8,02 (ddd, *J* = 8,0, 6,9, 0,8 Hz, 1H, H_N), 7,97 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H_C), 7,72 (m, 3H, H_{V+X}), 7,06 (m, 2H, H_W), 4,73 (m, 2H, H_D), 4,02 (s, 3H, H_{OCH3}), 1,84 (m, 2H, H_E), 1,33 (m, 2H, H_F), 0,88 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 197,3, 196,2, 192,1, 167,1, 157,0, 153,0 ($C_{V/X}$), 150,4, 149,3, 144,1 ($C_{P/Q}$), 140,8, 140,8 ($C_{X/V}$), 140,4, 135,7 ($C_{M/P/Q/O}$), 131,5 (C_N), 130,9, 130,8 ($C_{O/P/Q/M}$), 130,6 (C_L), 129,9, 128,6 (C_B), 127,6 (C_W), 121,7 ($C_{P/Q/O/M}$), 121,3 (C_A), 114,1 (C_C), 53,4 (C_{OCH3}), 47,8 (C_D), 32,3 (C_E), 20,5 (C_F), 13,9 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 709,1461 m/z; exp.: 709,1482 m/z. Anal. Calc. para $C_{30}H_{26}F_6N_4O_5PRe$ %C, 42,21; %H, 3,07; %N, 6,56. Experimental: %C, 42,26; %H, 3,12; %N, 6,38.



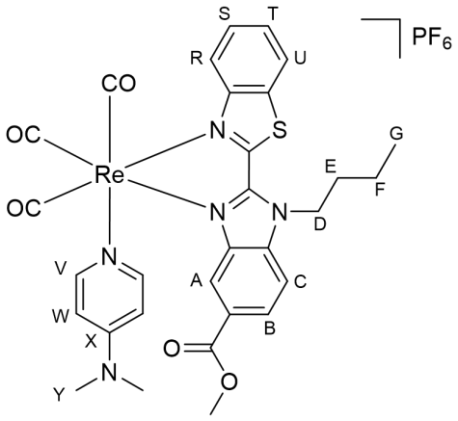
9: 27%. ^{1}H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,90 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H, H_A), 8,68 (dd, *J* = 8,5, 0,8 Hz, 1H, H_R), 8,37 (dd, *J* = 8,6, 1,0 Hz, 1H, H_B), 8,26 (d, *J* = 8,2, 0,9 Hz, 1H, H_U), 8,02 (dd, *J* = 6,7, 1,5 Hz, 2H, H_V), 7,98 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 0,9 Hz, 1H, H_S), 7,84 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 0,8 Hz, 1H, H_T), 7,78 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_C), 7,72 (tt, *J* = 7,8, 1,5 Hz, 1H, H_X), 7,20 (dd, *J* = 7,8, 6,7 Hz, 2H, H_W), 5,00 – 4,75 (m, 2H, H_D), 4,06 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,00 (m, 2H, H_E), 1,55 (m, 2H, H_F), 1,02 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 196,0, 194,8, 189,2, 166,0, 158,3, 151,8 (C_V), 151,0, 149,5, 140,2, 140,1 (C_X), 138,7, 134,5, 130,7 (C_S), 129,7 (C_T), 129,6, 128,9 (C_B), 127,3 (C_W), 124,2 (C_U), 122,6 (C_R), 120,5 (C_A), 113,1 (C_C), 53,1 (C_{OCH3}), 47,7 (C_D), 32,1 (C_E), 20,5 (C_F), 13,8 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 715,1025 m/z; exp.: 715,1045 m/z. Anal. Calc. para $C_{28}H_{24}F_6N_4O_5PReS$: %C, 39,12; %H, 2,81; %N, 6,52; %S, 3,73. Experimental: %C, 39,02; %H, 2,85; %N, 6,49; %S, 3,79.



10: 59%. ^{1}H-RMN (600 MHz, CD_3CN) δ 9,35 (d, *J* = 5,5, 0,9 Hz, 1H, H_H), 8,77 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, H_A), 8,35 (ddd, *J* = 8,8, 7,9, 1,6 Hz, 1H, H_J), 8,31 (dd, *J* = 7,8, 0,9 Hz, 1H, H_K), 8,29 (dd, *J* = 8,8, 1,4 Hz, 1H, H_B), 7,92 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H_C), 7,83 (ddd, *J* = 7,2, 5,5, 1,4 Hz, 1H, H_I), 7,53 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, H_V), 6,24 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, H_W), 4,69 (m, 2H, H_D), 3,99 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,85 (s, 6H, H_Y), 1,85 (m, 2H, H_E), 1,34 (m, 2H, H_F), 0,88 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 197,8, 197,2, 192,2, 167,0, 156,6 (C_H), 155,9, 155,6, 151,5 (C_V), 147,6, 142,5 (C_J), 140,3, 140,1, 129,9 (C_I), 129,5, 128,3 (C_B), 126,7 (C_K), 121,1 (C_A), 113,8 (C_C), 108,9 (C_W), 53,3 (C_{OCH3}), 47,4 (C_D), 39,4 (C_Y), 32,0 (C_E), 20,5 (C_F), 13,9 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 702,1726 m/z; exp.: 702,1748 m/z. Anal. Calc. para $C_{28}H_{29}F_6N_5O_5PRe$: %C, 39,72; %H, 3,45; %N, 8,27. Experimental: %C, 39,84; %H, 3,54; %N, 8,29.



11: 48%. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,13 (dd, *J* = 8,6, 0,5 Hz, 1H, H_P), 8,93 (dd, *J* = 8,5, 0,5 Hz, 1H, H_O), 8,79 (d, *J* = 0,5 Hz, 1H, H_A), 8,61 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_Q), 8,45 (dd, *J* = 8,0, 1,0 Hz, 1H, H_L), 8,35 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 1,0 Hz, 1H, H_N), 8,30 (m, 2H, H_{C+B}), 8,07 (ddd, *J* = 8,0, 7,2, 0,8 Hz, 1H, H_M), 6,98 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H_V), 6,30 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H_W), 4,98 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, H_D), 3,99 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,78 (s, 6H, H_Y), 1,81 – 1,64 (m, 2H, H_E), 1,26 – 1,07 (m, 2H, H_F), 0,75 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMSO) δ 196,9, 195,7, 191,7, 165,6, 155,8, 154,1, 149,6 (C_V), 149,1, 147,5, 143,3 (C_P), 139,1, 134,8 (C_N), 130,4 (C_M), 129,9 (C_L), 129,4, 128,8 (C_O), 128,0, 127,3 (C_B), 121,2 (C_Q), 119,3 (C_A), 113,9 (C_C), 108,2 (C_W), 52,8 (C_{OCH3}), 46,3 (C_D), 38,5 (C_Y), 31,5 (C_E), 19,1 (C_F), 13,5 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 752,1883 m/z; exp.: 752,1904 m/z. Anal. Calc. para $C_{32}H_{31}F_6N_5O_5PRe$: %C, 42,86; %H, 3,48; %N, 7,81. Experimental: %C, 42,86; %H, 3,58; %N, 7,87.

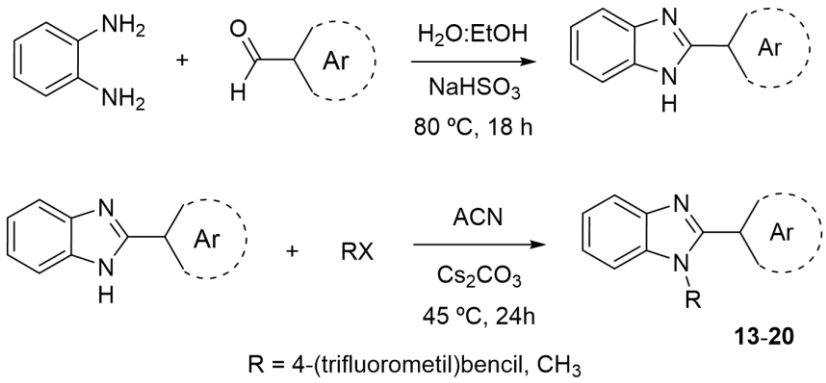


12: 36%. ^{1}H-RMN (600 MHz, CD_3CN) δ 8,88 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H, H_A), 8,70 (dd, *J* = 8,4, 0,9 Hz, 1H, H_R), 8,38 (dd, *J* = 8,3, 1,0 Hz, 1H, H_U), 8,34 (dd, *J* = 8,8, 1,1 Hz, 1H, H_B), 8,06 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,0 Hz, 1H, H_S), 7,97 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H_C), 7,89 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 0,9 Hz, 1H, H_T), 7,42 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, H_V), 6,17 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, H_W), 4,72 (m, 2H, H_D), 4,01 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,81 (s, 6H, H_Y), 2,13 (m, 2H, H_E), 1,46 – 1,28 (m, 2H, H_F), 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, H_G). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 197,2, 196,8, 190,9, 167,0, 159,8, 155,6, 152,5, 151,7 (C_V), 150,3, 141,0, 139,5, 135,1, 131,6 (C_S), 130,5 (C_T), 130,2, 129,0 (C_B), 125,2 (C_U), 123,6 (C_R), 121,2 (C_A), 114,2 (C_C), 108,9 (C_W), 53,4 (C_{OCH3}), 48,2 (C_D), 39,3 (C_Y), 32,2 (C_E), 20,7 (C_F), 13,9 (C_G). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 758,1447 m/z; exp.: 758,1468 m/z. Anal. Calc. para $C_{30}H_{29}F_6N_5O_5PReS$: %C, 39,91; %H, 3,24; %N, 7,76; %S, 3,55. Experimental: %C, 39,83; %H, 3,25; %N, 7,67; %S, 3,59.

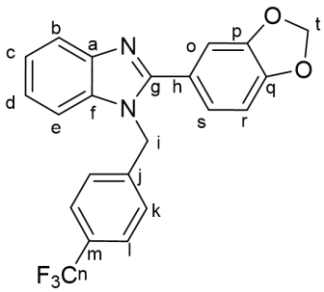
3.2. Capítulo 3

Síntesis de los proligandos HC^N

La síntesis de los proligandos HC^N (**13**–**20**) se llevó a cabo con pequeñas modificaciones del procedimiento descrito en la bibliografía (**Esquema E3.1**).[6,7] En la primera etapa se disolvió bisulfito de sodio (10 mmol, 1,04 g) en 4 mL de agua y, posteriormente, se añadió el aldehído correspondiente (1 mmol). La mezcla se agitó a 100 ºC durante 1 h. A continuación, se añadió *o*-fenilendiamina (1 mmol, 108 mg) disuelta en 4 mL de etanol y se hizo reaccionar a 80 ºC durante 18 h. El 2-(aril)benzimidazol correspondiente se filtró y se lavó con agua y hexano. En la segunda etapa, el intermedio anterior (0,5 mmol) y bromuro de 4-(trifluorometil)bencilo o ioduro de metilo (0,6 mmol) se agitaron en presencia de Cs_2CO_3 (1 mmol, 326 mg) en 10 mL de acetonitrilo a 45 ºC durante 24 h. Posteriormente, la mezcla se llevó a sequedad y se disolvió en diclorometano realizando extracciones con agua (3x30 mL). Finalmente, se secó la fase orgánica dando lugar a un sólido blanco puro.

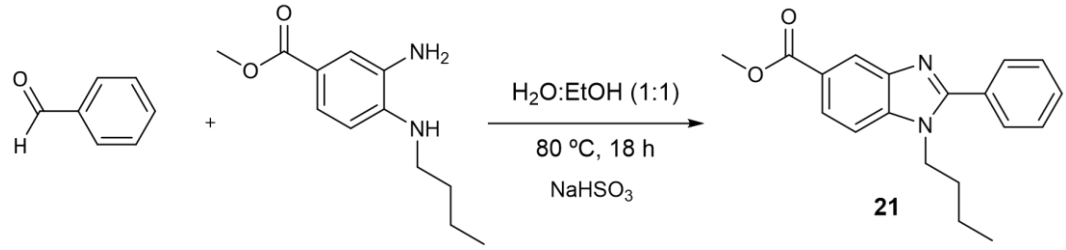


Esquema E3.1. Síntesis de los proligandos **13**–**20**.



16: 43%. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 (dd, *J* = 8,0, 1,0 Hz, 1H, H_b), 7,60 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H_l), 7,32 (dd, *J* = 7,2, 1,1 Hz, 1H, H_c), 7,23 (ddd, *J* = 8,0, 7,1, 0,9 Hz, 1H, H_d), 7,21 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H_k), 7,16 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H_o), 7,13 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H_e), 7,09 (dd, *J* = 8,0, 1,7 Hz, 1H, H_s), 6,86 (dd, *J* = 8,0, 0,6 Hz, 1H, H_r), 6,03 (s, 2H, H_t), 5,50 (s, 2H, H_i). ^{13}C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 153,9 (C_g), 149,4 (C_q), 148,3 (C_p), 143,2 (C_a), 140,5 (C_j), 135,9 (C_f), 130,4 (C_n), 126,4 (C_k), 126,3 (C_l), 125,0 (C_m), 123,6 (C_h), 123,5 (C_s), 123,3 (C_d), 123,1 (C_c), 120,2 (C_b), 110,2 (C_e), 109,7 (C_o), 108,8 (C_r), 101,7 (C_t), 48,1 (C_i). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M+H]^+$ = 397,1158 m/z; exp.: 397,1154 m/z. Anal. Calc. para $C_{22}H_{15}F_3N_2O_2$: %C, 66,67; %H, 3,81; %N, 7,07. Experimental: %C, 66,81; %H, 3,80; %N, 7,06.

En el caso del proligando **21**, primero fue necesaria la síntesis de la diamina (**Esquema E2.1**).[1]



Esquema E3.2. Síntesis del proligando **21**.

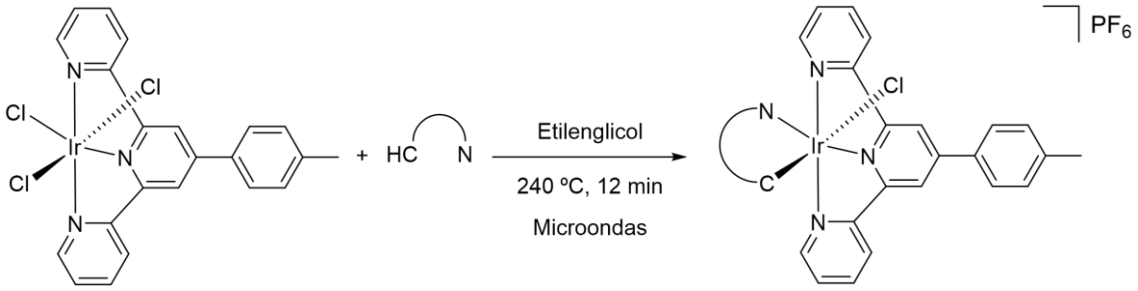
Síntesis de los complejos

La síntesis del complejo precursor se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (**Esquema E3.3**).[8]

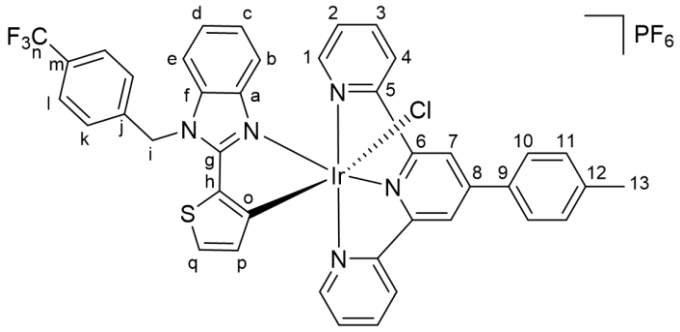


Esquema E3.3. Síntesis del complejo precursor.

Los complejos finales se sintetizaron adaptando el método descrito en la bibliografía (**Esquema E3.4**).[9] El complejo precursor (0,1 mmol, 62,2 mg), hexafluorofosfato de potasio (0,6 mmol, 110,4 mg) y el proligando HC^N correspondiente (0,2 mmol) se añadieron, junto con 4 mL de etilenglicol, al vial de microondas y se hicieron reaccionar durante 12 min a 240 ºC. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado naranja se filtró lavando con agua y éter. El sólido se disolvió en acetonitrilo y se filtró en una columna de alúmina. El filtrado se llevó a sequedad dando lugar al sólido puro de color naranja.

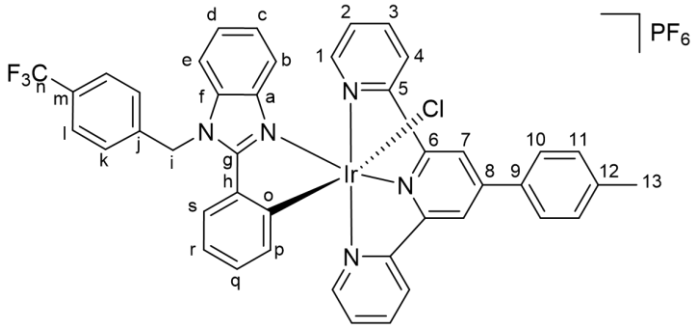


Esquema E3.4. Procedimiento de síntesis de los complejos finales, **22**–**30**.

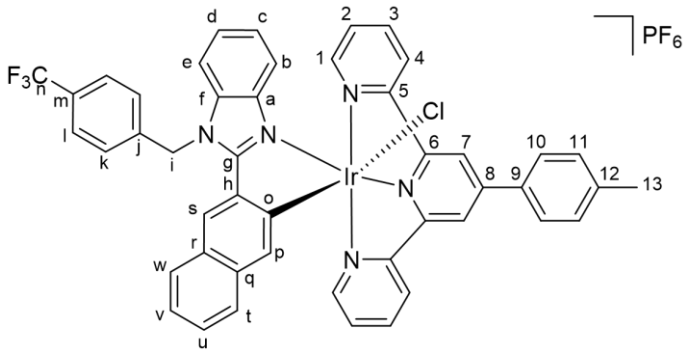


22: 79%. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,25 (s, 2H, H_7), 8,98 (d, 2H, H_4), 8,94 (dd, 1H, H_b), 8,26 (d, 2H, H_{10}), 8,22 (d, 2H, H_3), 7,93 (m, 3H, H_{e+1}), 7,75 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H_l), 7,61 (m, 2H, H_2), 7,57–7,42 (m, 7H, $H_{11+k+q/p+d+c}$), 6,16 (s, 2H, H_i), 6,13 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, $H_{p/q}$), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d_6) δ 159,5 (C_g), 158,0 (C_5), 155,8 (C_6), 152,4 (C_1), 151,2 (C_8), 146,4 (C_h), 141,1 (C_{12}), 140,9 (C_a), 140,4 (C_j), 139,9 (C_3), 134,8 (C_f), 132,6 ($C_{q/p}$), 132,1 (C_9), 129,7 (C_{11}), 128,9 (C_2), 128,5 ($C_{p/q}$), 128,3 (C_m), 127,9 (C_{10}), 126,9 (C_k), 125,7 (C_l), 125,5 (C_4), 124,1 (C_c), 123,2 (C_d), 123,0 (C_o), 122,5 (C_n), 120,9 (C_7), 117,0 (C_b), 111,2 (C_e), 47,6 (C_i), 20,7 (C_{13}). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −63,11 (s, 3F, CF_3), −72,95 (d, J_{P-F} = 714,5 Hz, 6F,

PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 908,1414 m/z; exp.: 908,1434 m/z. Anal. Calc. para $C_{41}H_{29}ClF_9IrN_5PS$: %C, 46,75; %H, 2,78; %N, 6,65; %S, 3,04. Experimental: %C, 46,79; %H, 2,84; %N, 6,63; %S, 3,19.

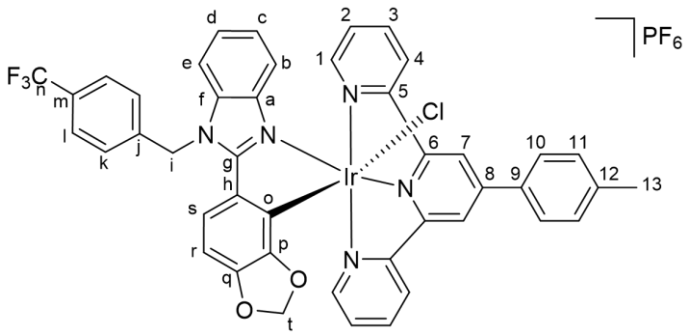


23: 65%. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,26 (s, 2H, H_7), 9,17 (dd, *J* = 8,0, 0,7 Hz, 1H, H_b), 8,98 (dd, *J* = 8,0, 0,6 Hz, 2H, H_4), 8,27 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H_{10}), 8,23 (m, 2H, H_3), 8,05 (dd, *J* = 8,2, 0,4 Hz, 1H, H_e), 7,90 (dd, *J* = 5,7, 1,4 Hz, 2H, H_1), 7,76 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H_l), 7,62 (dd, *J* = 7,6, 1,3 Hz, 1H, H_s), 7,58–7,50 (m, 8H, $H_{d+c+k+2+11}$), 6,81 (td, *J* = 7,6, 1,0 Hz, 1H, H_r), 6,71 (td, *J* = 7,6, 1,3 Hz, 1H, H_q), 6,40 (s, 2H, H_i), 6,13 (dd, *J* = 7,6, 1,0 Hz, 1H, H_p), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160,8 (C_g), 157,9 (C_5), 155,4 (C_6), 152,1 (C_1), 151,0 (C_8), 142,4 (C_o), 141,1 (C_{12}), 140,7 (C_j), 140,3 (C_a), 139,8 (C_3), 136,1 (C_f), 133,0 (C_h), 132,1 (C_9), 130,7 (C_p), 130,3 (C_q), 129,7 (C_{11}), 128,8 (C_2), 128,2 (C_m), 127,8 (C_{10}), 126,7 (C_k), 125,7 (C_{4+l}), 125,5 (C_s), 125,2 (C_n), 124,3 (C_c), 124,2 (C_d), 123,4 (C_r), 120,9 (C_7), 118,2 (C_b), 111,2 (C_e), 47,0 (C_i), 20,7 (C_{13}). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −63,12 (s, 3F, CF_3), −72,97 (d, $J_{P\text{-}F}$ = 709,3 Hz, 6F, PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 902,1849 m/z; exp.: 902,1879 m/z. Anal. Calc. para $C_{43}H_{31}ClF_9IrN_5P$: %C, 49,31; %H, 2,98; %N, 6,69. Experimental: %C, 49,57; %H, 2,96; %N, 6,52.

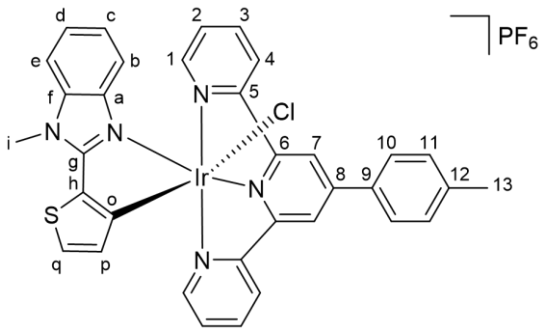


24: 70%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMSO-d_6) δ 9,30 (s, 2H, H_7), 9,24 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H_b), 9,00 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H_4), 8,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H_{10}), 8,27 (s, 1H, H_s), 8,20 (m, 2H, H_3), 8,15 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, H_e), 7,94 (d, *J* = 5,1 Hz, 2H, H_1), 7,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H_l), 7,65 (m, 4H, H_{t+d+k}), 7,58 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H_{11}), 7,55 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, H_c), 7,52 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, H_2), 7,32 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, H_v), 7,24 (m, 2H, H_{u+w}), 6,55 (s, 2H, H_i), 6,47 (s, 1H, H_p), 2,52 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (75 MHz, DMSO-d_6) δ 159,7 (C_g), 158,1 (C_5), 155,6 (C_6), 152,1 (C_1), 151,1 (C_8), 141,2 (C_{12}), 140,9 (C_j), 140,5 (C_a), 139,8 (C_3), 136,7 (C_f), 134,9 (C_q), 133,4 (C_o), 132,2 (C_9), 131,7 (C_h), 129,8 (C_{11}), 129,6 (C_r), 128,7 (C_2), 128,6 (C_m), 128,3 (C_p), 127,9 (C_{10}), 127,6 (C_w), 127,0 (C_k), 125,8 ($C_{4+s+d+v+t+l}$), 124,7 (C_u), 124,4 (C_c), 122,1 (C_n), 121,0 (C_7), 118,6 (C_b), 111,4 (C_e), 47,2 (C_i), 20,8 (C_{13}). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −63,14 (s, 3F,

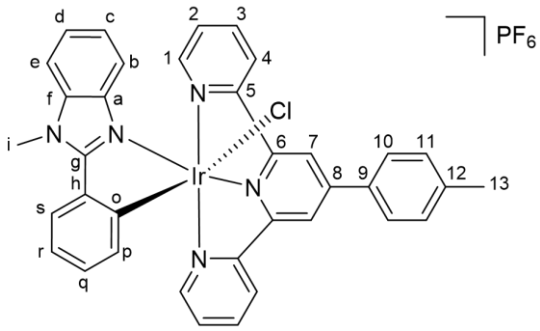
CF_3), −72,95 (d, $J_{P\text{-}F}$ = 697,1 Hz, 6F, PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 952,2006 m/z; exp.: 952,2016 m/z. Anal. Calc. para $C_{47}H_{33}ClF_9IrN_5P$: %C, 51,44; %H, 3,03; %N, 6,38. Experimental: %C, 51,38; %H, 2,91; %N, 6,28.



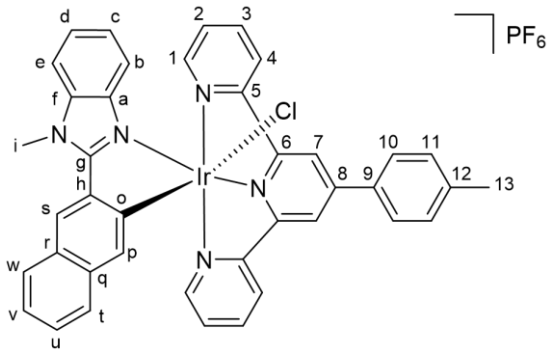
25: 83%. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,17 (s, 2H, H_7), 9,14 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H_b), 8,96 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H_4), 8,29 – 8,19 (m, 4H, H_{3+10}), 8,01 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H_e), 7,90 (dd, J = 5,6, 0,8 Hz, 2H, H_1), 7,76 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H_l), 7,60 (ddd, J = 7,1, 5,6, 1,0 Hz, 2H, H_2), 7,57–7,46 (m, 6H, $H_{11+k+c+d}$), 7,29 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H_s), 6,45 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H_r), 6,33 (s, 2H, H_i), 5,33 (s, 2H, H_t), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d_6) δ 161,1 (C_g), 158,9 (C_5), 156,6 (C_6), 152,3 (C_1), 151,9 (C_p), 151,1 (C_8), 146,8 (C_q), 141,2 (C_{12}), 140,9 (C_j), 140,5 (C_a), 140,2 (C_3), 136,3 (C_f), 132,4 (C_9), 129,9 (C_{11}), 128,9 (C_2), 128,4 (C_m), 128,1 (C_h), 127,9 (C_{10}), 126,9 (C_k), 125,9 (C_l), 125,5 (C_4), 124,3 (C_c), 124,1 (C_d), 122,8 (C_n), 121,7 (C_s), 120,3 (C_7), 118,2 (C_b), 116,1 (C_o), 111,2 (C_e), 104,6 (C_r), 99,8 (C_t), 47,2 (C_i), 20,9 (C_{13}). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −63,14 (s, 3F, CF_3), −72,97 (d, $J_{P\text{-}F}$ = 702,4 Hz, 6F, PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 946,1748 m/z; exp.: 946,1771 m/z. Anal. Calc. para $C_{44}H_{31}ClF_9IrN_5O_2P$: %C, 48,42; %H, 2,86; %N, 6,42. Experimental: %C, 48,57; %H, 3,09; %N, 6,27.



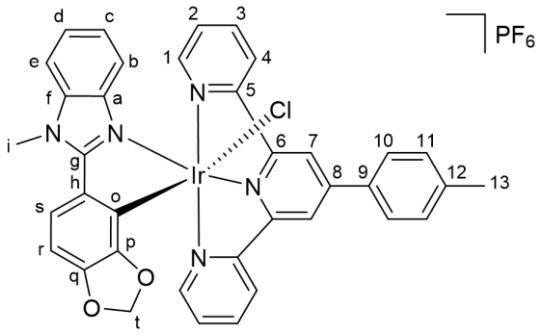
26: 62%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMSO-d_6) δ 9,26 (s, 2H, H_7), 8,98 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H_4), 8,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H_b), 8,26 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H_{10}), 8,22 (td, J = 8,1, 1,4 Hz, 2H, H_3), 7,91 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H_e), 7,84 (d, J = 5,3 Hz, 2H, H_1), 7,61 (d, J = 4,9 Hz, 1H, H_q), 7,57–7,52 (m, 4H, H_{11+2}), 7,49 (ddd, J = 8,2, 7,2, 0,9 Hz, 1H, H_d), 7,41 (ddd, J = 8,1, 7,2, 0,9 Hz, 1H, H_c), 6,16 (d, J = 4,9 Hz, 1H, H_p), 4,29 (s, 3H, H_i), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMSO-d_6) δ 159,7 (C_g), 158,3 (C_5), 156,1 (C_6), 152,7 (C_1), 151,3 (C_8), 145,2 (C_h), 141,3 (C_{12}), 141,0 (C_a), 140,0 (C_3), 135,3 (C_f), 132,4 (C_9), 132,0 (C_q), 129,9 (C_{11}), 128,9 (C_2), 128,8 (C_p), 128,1 (C_{10}), 125,7 (C_4), 124,0 (C_o), 123,8 (C_c), 122,9 (C_d), 121,1 (C_7), 116,8 (C_b), 111,4 (C_e), 31,8 (C_i), 21,0 (C_{13}). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 764,1227 m/z; exp.: 764,1227 m/z. Anal. Calc. para $C_{34}H_{26}ClF_6IrN_5PS$: %C, 44,91; %H, 2,88; %N, 7,70; %S, 3.53. Experimental: %C, 45,08; %H, 2,91; %N, 7,58; %S, 3,62.



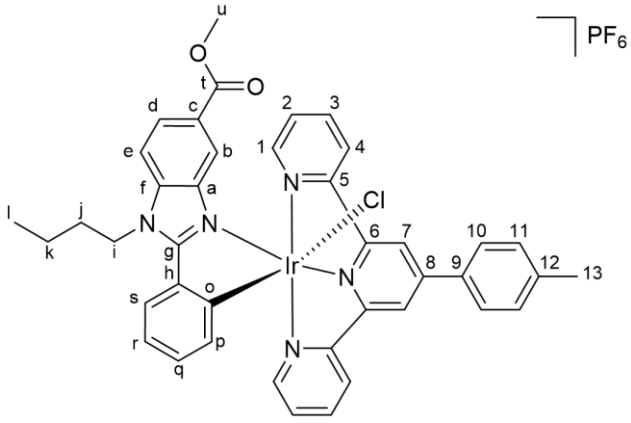
27: 57%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMSO-d_6) δ 9,27 (s, 2H, H_7), 9,05 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H_b), 8,99 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H_4), 8,28 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, H_{10}), 8,20 (ddd, *J* = 8,0, 7,3, 1,2 Hz, 2H, H_3), 8,04 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H_{e+s}), 7,80 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H, H_1), 7,56 (m, 3H, H_{d+11}), 7,50 (ddd, *J* = 7,3, 6,0, 1,2 Hz, 2H, H_2), 7,45 (ddd, *J* = 8,4, 7,6, 0,9 Hz, 1H, H_c), 7,00 (ddd, *J* = 8,4, 7,8, 0,8 Hz, 1H, H_r), 6,80 (ddd, *J* = 8,4, 7,8, 0,8 Hz, 1H, H_q), 6,14 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1H, H_p), 4,48 (s, 3H, H_i), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMSO-d_6) δ 161,1 (C_g), 158,2 (C_5), 155,8 (C_6), 152,4 (C_1), 151,2 (C_8), 142,0 (C_o), 141,3 (C_{12}), 140,3 (C_a), 139,9 (C_3), 136,3 (C_f), 134,4 (C_h), 132,4 (C_9), 130,9 (C_p), 130,3 (C_q), 130,0 (C_{11}), 128,8 (C_2), 128,1 (C_{10}), 126,1 (C_s), 125,9 (C_4), 123,8 (C_c), 123,7 (C_{d+r}), 121,1 (C_7), 118,0 (C_b), 111,5 (C_e), 32,4 (C_i), 21,0 (C_{13}). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −72,96 (d, $J_{P\text{-}F}$ = 707,0 Hz, 6F, PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 758,1663 m/z; exp.: 758,1664 m/z. Anal. Calc. para $C_{36}H_{28}ClF_6IrN_5P$: %C, 47,87; %H, 3,12; %N, 7,75. Experimental: %C, 47.82; %H, 3,36; %N, 7,78.



28: 66%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMSO-d_6) δ 9,31 (s, 2H, H_7), 9,12 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H_b), 9,00 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H_4), 8,66 (s, 1H, H_s), 8,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H_{10}), 8,19 (td, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 2H, H_3), 8,11 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 0,9 Hz, 1H, H_e), 7,96 (dd, *J* = 8,2, 1,5 Hz, 1H, H_w), 7,86 (dd, *J* = 5,7, 1,1 Hz, 2H, H_1), 7,62 (dd, *J* = 7,2, 1,0 Hz, 1H, H_d), 7,59 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H_{11}), 7,50 – 7,45 (m, 3H, H_{c+2}), 7,36 (dd, *J* = 7,6, 1,3 Hz, 1H, H_t), 7,33 – 7,26 (m, 2H, H_{v+u}), 6,49 (s, 1H, H_p), 4,62 (s, 3H, H_i), 2,52 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMSO-d_6) δ 160,1 (C_g), 158,3 (C_5), 155,9 (C_6), 152,3 (C_1), 151,2 (C_8), 141,3 (C_{12}), 140,5 (C_a), 139,9 (C_3), 136,7 (C_f), 135,0 (C_o), 133,6 (C_q), 133,0 (C_h), 132,4 (C_9), 130,1 (C_r), 130,0 (C_{11}), 129,0 (C_w), 128,7 (C_2), 128,4 (C_p), 128,1 (C_{10}), 127,5 (C_u), 126,0 (C_s), 125,9 (C_{t+4}), 124,8 (C_v), 124,1 (C_c), 123,9 (C_d), 121,1 (C_7), 118,3 (C_b), 111,6 (C_e), 32,7 (C_i), 21,0 (C_{13}). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 808,1819 m/z; exp.: 808,1829 m/z. Anal. Calc. para $C_{40}H_{30}ClF_6IrN_5P$: %C, 50,40; %H, 3,17; %N, 7,35. Experimental: %C, 50,46; %H, 3,18; %N, 7,23.



29: 59%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMSO-d_6) δ 9,15 (s, 2H, H_7), 9,00 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H_b), 8,94 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H_4), 8,25–8,19 (m, 4H, H_{3+10}), 7,98 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H_e), 7,80 (dd, *J* = 6,1, 1,0 Hz, 2H, H_1), 7,70 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H_s), 7,56–7,49 (m, 5H, H_{11+2+d}), 7,40 (ddd, *J* = 8,2, 7,4, 0,8 Hz, 1H, H_c), 6,62 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H_r), 5,36 (s, 2H, H_t), 4,40 (s, 3H, H_i), 2,50 (s, 3H, H_{13}). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMSO-d_6) δ 161,3 (C_g), 159,0 (C_5), 156,7 (C_6), 152,3 (C_1), 152,0 (C_p), 151,1 (C_8), 146,7 (C_q), 141,2 (C_{12}), 140,4 (C_a), 140,2 (C_3), 136,3 (C_f), 132,5 (C_9), 130,0 (C_{11}), 129,3 (C_h), 128,8 (C_2), 128,0 (C_{10}), 125,5 (C_4), 123,7 (C_c), 123,5 (C_d), 122,0 (C_s), 120,4 (C_7), 117,8 (C_b), 115,6 (C_o), 111,3 (C_e), 104,6 (C_r), 99,8 (C_t), 32,4 (C_i), 21,0 (C_{13}). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 802,1560 m/z; exp.: 802,1559 m/z. Anal. Calc. para $C_{37}H_{28}ClF_6IrN_5O_2P$: %C, 46,91; %H, 2,98; %N, 7,39. Experimental: %C, 46,92; %H, 3,02; %N, 7,40.

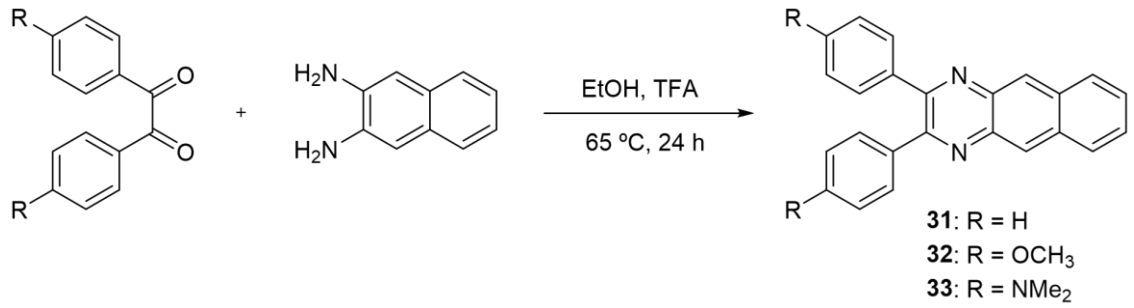


30: 59%. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,77 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H, H_b), 9,27 (s, 2H, H_7), 8,99 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H_4), 8,28 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H_{10}), 8,22 (dt, *J* = 7,9, 1,0 Hz, 2H, H_3), 8,19–8,13 (m, 2H, H_{d+e}), 7,92 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H_s), 7,83 (dd, *J* = 5,6, 1,0 Hz, 2H, H_1), 7,56 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H_{11}), 7,49 (ddd, *J* = 7,9, 5,6, 1,2 Hz, 2H, H_2), 7,04 (dt, *J* = 7,7, 0,9 Hz, 1H, H_r), 6,82 (dt, *J* = 7,7, 0,8 Hz, 1H, H_q), 6,18 (dd, *J* = 7,7, 0,9 Hz, 1H, H_p), 4,95 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, H_i), 3,86 (s, 3H, H_u), 2,50 (s, 3H, H_{13}), 2,00 (m, 2H, H_j), 1,58 (m, 2H, H_k), 0,99 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, H_l). ^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d_6) δ 166,4 (C_t), 162,6 (C_g), 158,1 (C_5), 155,7 (C_6), 152,5 (C_1), 151,3 (C_8), 143,2 (C_o), 141,4 (C_{12}), 140,2 (C_a), 140,0 (C_3), 139,3 (C_f), 133,4 (C_h), 132,3 (C_9), 131,2 (C_p), 130,9 (C_q), 130,0 (C_{11}), 129,0 (C_2), 128,1 (C_{10}), 126,2 (C_s), 125,9 (C_4), 125,6 (C_c), 124,7 (C_d), 124,1 (C_r), 121,2 (C_7), 120,2 (C_b), 111,9 (C_e), 52,3 (C_u), 44,8 (C_i), 31,4 (C_j), 21,0 (C_{13}), 19,5 (C_k), 13,9 (C_l). ^{19}F{^{1}H}-RMN (377 MHz, DMSO-d_6): δ −72,96 (d, $J_{P\text{-}F}$ = 707,0 Hz, 6F, PF_6). Masas ESI-MS (modo ion. pos., DMSO): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 858,2186 m/z; exp.: 858,2172 m/z. Anal. Calc. para $C_{41}H_{36}ClF_6IrN_5O_2P$: %C, 49,08; %H, 3,62; %N, 6,98. Experimental: %C, 49,21; %H, 3,57; %N, 6,97.

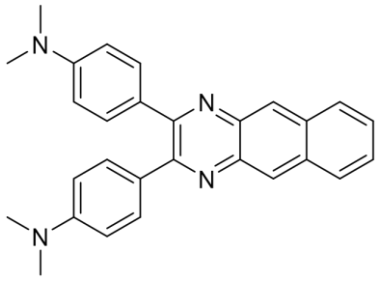
3.3. Capítulo 4

Síntesis de proligandos HC^N

La síntesis de los proligandos se llevó a cabo siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía (**Esquema E4.1**).[10,11] Una suspensión de 2,3-diaminonaftaleno (0,951 mmol, 150,5 mg), la diona correspondiente (0,951 mmol) (difeniletanodiona, 4,4′-dimetoxibencil o 4,4'-bis(dimetilamino)bencil) y 60 µL de TFA (0,784 mmol, 90 mg) en 15 mL de EtOH se agitó durante 24 h a 65 ºC. El precipitado obtenido se filtró obteniendo el sólido puro de color amarillo oscuro (**31** y **32**) o naranja (**33**).



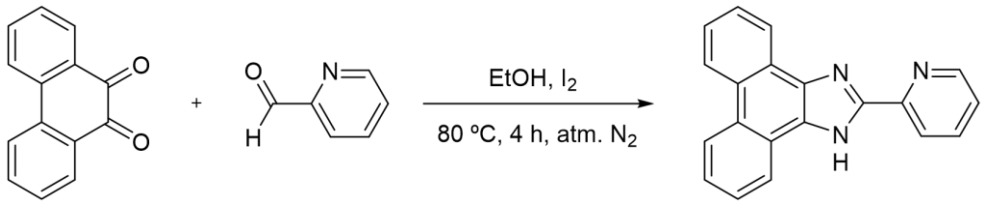
Esquema E4.1. Síntesis de los proligandos HC^N.



33: 75%. ^{1}H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,61 (s, 2H), 8,06 (dd, *J* = 6,4, 3,3 Hz, 2H), 7,57 (d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 7,50 (m, 2H), 6,69 (d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 3,01 (s, 12H). ^{13}C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 154,6, 151,0, 138,3, 133,7, 131,1, 128,6, 127,6, 126,8, 126,1, 111,8, 40,4. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M+H]^+$ = 419,2230 m/z; exp.: 419,2235 m/z. Anal. Calc. para $C_{28}H_{26}N_4$: %C, 80,16; %H, 6,49; %N, 13,35. Experimental: %C, 80,21; %H, 6,43; %N, 13,22.

Síntesis del ligando N^N

El ligando N^N (**34**) se sintetizó siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (**Esquema E4.2**).[12] Una suspensión de 9,10-fenantrenoquinona (1,442 mmol, 300 mg), 2-piridincarboxaldehído (1,442 mmol, 137 µL), I_2 (0,072 mmol, 18,3 mg) y NH_4OAc (14,42 mmol, 1,1 g) en 20 mL de EtOH, se agitó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 24 h. Posteriormente, se añadió gota a gota una disolución saturada de $Na_2S_2O_3$ en 40 mL de agua, dando lugar a un precipitado que se filtró y se lavó con agua y hexano. El sólido obtenido se purificó en columna cromatográfica de sílice, utilizando DCM:MeOH (95:5) como eluyente. Se obtuvo un sólido beige.

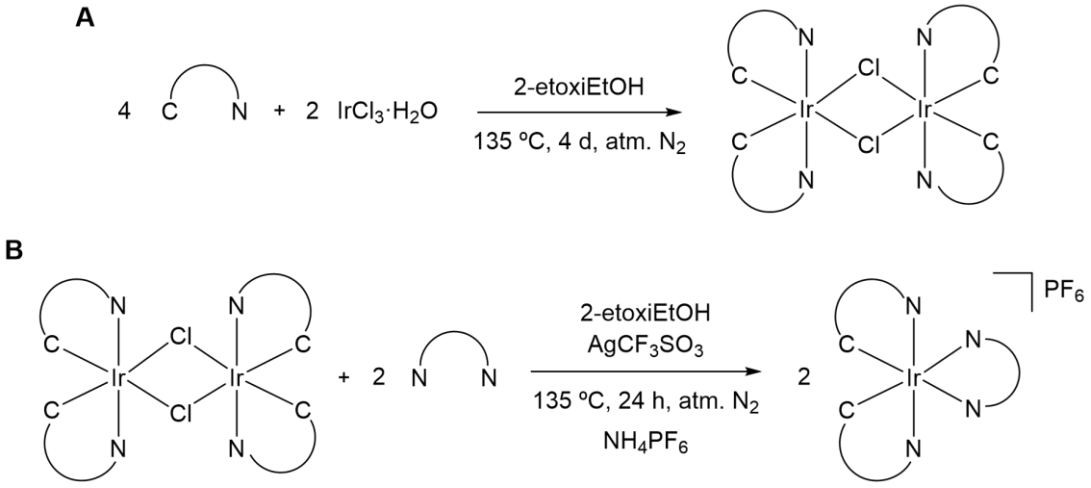


Esquema E4.2. Síntesis del ligando **34**.

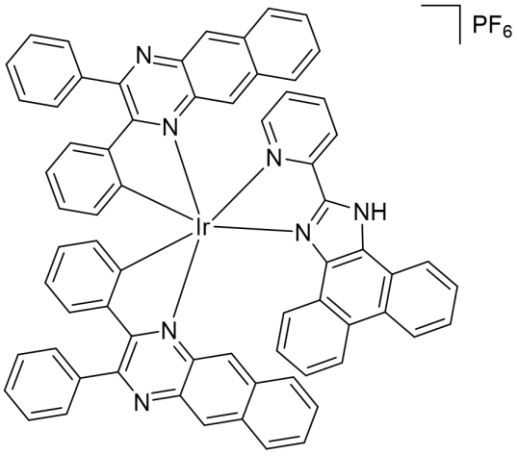
Síntesis de complejos de Ir(III)

Los complejos se prepararon realizando pequeñas modificaciones a los protocolos descritos en la bibliografía (**Esquema E4.3**).[11] La síntesis se llevó a cabo en dos etapas. Primero tuvo lugar la formación del dímero, $[Ir(C\hat{}N)_2(\mu\text{-}Cl)]_2$. Para ello se hizo reaccionar $IrCl_3 \cdot H_2O$ (0,376 mmol, 112,4 mg) y el proligando correspondiente (**31**, **32** ó **33**) (0,753 mmol) en 8 mL de 2-etoxietanol a reflujo durante 4 días. Posteriormente se añadió agua dando lugar a un precipitado, que se filtró lavando con agua. El sólido rojo oscuro obtenido se purificó por recristalización en DCM:hexano.

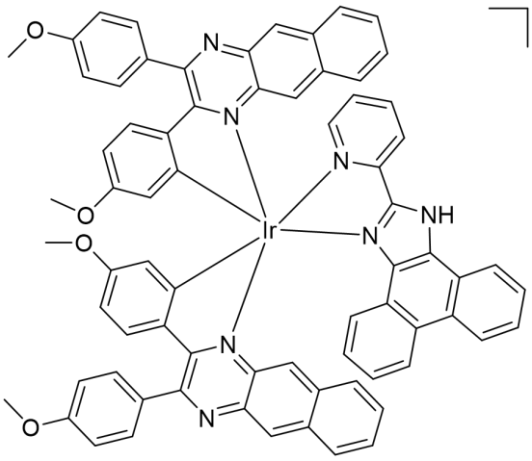
Por último, tuvo lugar la síntesis del monómero final. Para ello se hizo reaccionar el dímero correspondiente (0,062 mmol), el ligando **34** (0,118 mmol, 35 mg) y $AgCF_3SO_3$ (0,124 mmol, 32,1 mg) en 15 mL de 2-etoxietanol a reflujo durante 24 h. Posteriormente, el crudo de reacción se filtró con celita, se añadió NH_4PF_6 (0,623 mmol, 101,54 mg) al filtrado y éste se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se llevó a casi sequedad, se precipitó con agua, se filtró y el sólido se lavó con agua y éter. El producto de reacción se purificó en columna cromatográfica de alúmina con DCM como eluyente y aumentando progresivamente la proporción de ACN hasta un 20%. Se obtuvo un sólido rojo oscuro.



Esquema E4.3. Procedimiento general para la síntesis de los complejos de Ir(III): (A) síntesis del dímero y (B) síntesis del monómero final.



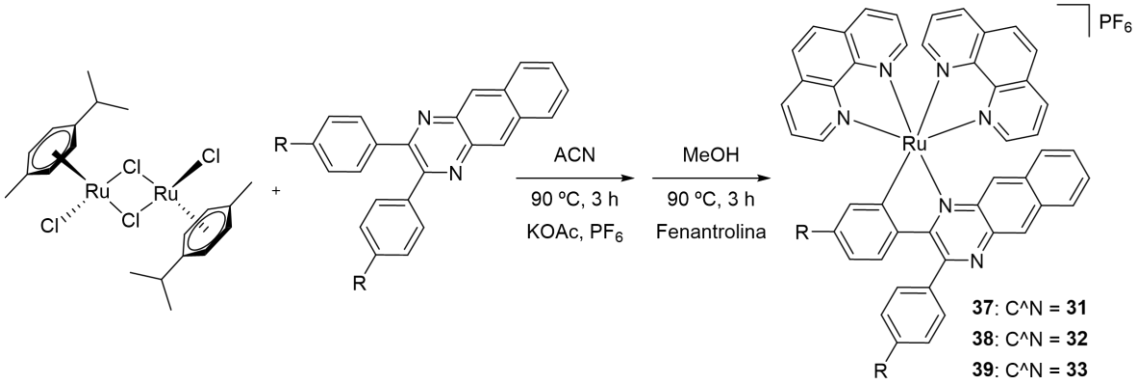
35: 25%. ^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3CN) δ 10,07 (s, 1H), 8,87 – 8,82 (m, 1H), 8,73 – 8,67 (m, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,42 – 8,32 (m, 3H), 8,09 – 7,94 (m, 7H), 7,89 – 7,82 (m, 1H), 7,78 – 7,71 (m, 3H), 7,67 (s, 1H), 7,57 – 7,47 (m, 5H), 7,46 – 7,35 (m, 4H), 7,32 – 7,25 (m, 2H), 7,17 (s, 1H), 7,13 – 7,07 (m, 1H), 6,86 – 6,67 (m, 7H), 6,66 – 6,54 (m, 3H), 6,17 – 6,11 (m, 1H). ^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d_6) δ 153,7, 151,7, 149,1, 148,0, 146,8, 145,9, 144,6, 144,0, 141,2, 139,5, 138,9, 137,0, 136,7, 136,3, 135,8, 134,9, 134,8, 133,5, 133,2, 132,9, 132,0, 131,9, 131,5, 131,3, 130,9, 130,3, 130,1, 129,8, 129,6, 129,5, 129,3, 128,8, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,2, 128,1, 127,8, 127,6, 127,4, 127,4, 126,6, 126,3, 125,1, 124,6, 123,6, 122,6, 122,5, 121,8, 121,4, 121,2, 119,1. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 1150,3220 m/z; exp.: 1150,3222 m/z. Anal. Calc. para $C_{68}H_{43}F_6IrN_7P$: %C, 63,05; %H, 3,35; %N, 7,57. Experimental: %C, 63,01; %H, 3,28; %N, 7,58.



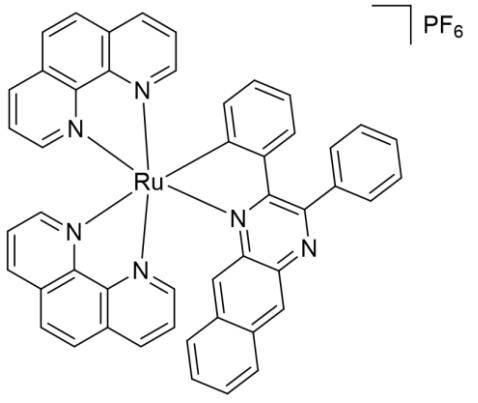
36: 36%. ^{1}H-RMN (300 MHz, CD_3CN) δ 9,62 (s, 1H), 8,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,82 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,65 – 8,56 (m, 2H), 8,32 (s, 1H), 8,28 (dd, *J* = 8,2, 1,0 Hz, 1H), 8,19 (dd, *J* = 7,9, 1,0 Hz, 1H), 8,09 – 8,02 (m, 2H), 8,01 – 7,90 (m, 5H), 7,79 – 7,72 (m, 1H), 7,71 – 7,56 (m, 4H), 7,53 – 7,45 (m, 1H), 7,45 – 7,35 (m, 3H), 7,33 – 7,23 (m, 3H), 7,06 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,89 – 6,82 (m, 2H), 6,79 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 6,69 – 6,61 (m, 2H), 6,43 (dd, *J* = 9,1, 2,6 Hz, 1H), 6,32 – 6,19 (m, 3H), 6,08 (dd, *J* = 2,6, 0,7 Hz, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 3,24 (s, 3H). ^{13}C-RMN (101 MHz, CD_3CN) δ 166,6, 165,1, 162,7, 162,3, 162,1, 161,5, 158,2, 155,5, 155,4, 154,7, 153,9, 151,4, 150,2, 141,0, 139,9, 138,3, 138,0, 138,0, 136,7, 135,5, 135,4, 135,3, 134,5, 134,3, 134,1, 133,5, 133,5, 132,6, 131,7, 131,1, 130,4, 130,0, 129,0, 128,8, 128,8, 128,7, 128,7, 128,4, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,9, 127,8, 127,4, 127,2, 125,0, 125,0, 124,9, 124,8, 123,7, 123,0, 122,2, 120,3, 119,7, 115,4, 114,6, 108,8, 108,4, 56,3, 56,0, 55,7, 55,5. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 1270,3632 m/z; exp.: 1270,3642 m/z. Anal. Calc. para $C_{72}H_{51}F_6IrN_7O_4P$: %C, 61,10; %H, 3,63; %N, 6,93. Experimental: %C, 61,02; %H, 3,42; %N, 7,05.

Síntesis de complejos de Ru(II)

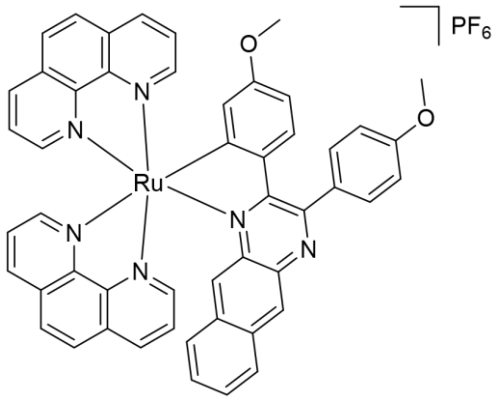
La preparación de los compuestos se llevó a cabo en dos etapas siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía con ligeras modificaciones (**Esquema E4.4**).[13] En primer lugar se añadió [Ru(*p*-cimeno)Cl_2]$_2$ (0,1 mmol, 63 mg), el proligando correspondiente (**31**, **32** ó **33**, 0,2 mmol), KOAc (0,6 mmol, 59 mg) y KPF_6 (0,8 mmol, 148 mg), junto con 5 mL de acetonitrilo a un vial de microondas. La mezcla se agitó durante 3 h a 90 ºC y posteriormente se llevó a sequedad, obtenido un intermedio amarillento. En la segunda etapa, se hizo reaccionar dicho intermedio con fenantrolina (0,4 mmol, 72 mg) durante 3 h a 90 ºC en 5 mL de metanol en un microondas de reacción. Finalmente, se llevó a sequedad y se obtuvo un sólido violeta oscuro que se purificó mediante columna cromatográfica de alúmina empleando como eluyente la mezcla DCM:ACN (8:2).



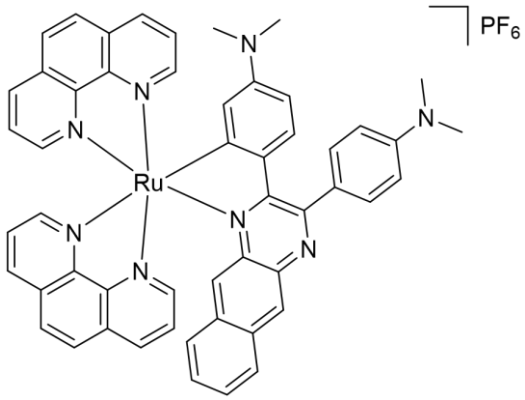
Esquema E4.4. Procedimiento general para la síntesis de los complejos de Ru(II).



37: 35%. ^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3CN) δ 8,64 (s, 1H), 8,53 – 8,48 (m, 2H), 8,47 – 8,42 (m, 4H), 8,41 – 8,36 (m, 2H), 8,25 – 8,16 (m, 2H), 8,05 – 7,99 (m, 2H), 7,96 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,85 – 7,43 (m, 4H), 7,66 – 7,59 (m, 4H), 7,49 – 7,44 (m, 1H), 7,44 – 7,39 (m, 2H), 7,38 – 7,31 (m, 1H), 7,27 – 7,23 (m, 1H), 7,22 – 7,18 (m, 1H), 6,58 – 6,48 (m, 2H), 6,28 – 6,20 (m, 1H). ^{13}C-RMN (101 MHz, CD_3CN) δ 203,0, 165,0, 156,0, 154,7, 153,8, 151,3, 150,8, 150,0, 148,8, 148,4, 148,0, 146,3, 142,3, 142,2, 138,1, 137,2, 136,4, 136,0, 135,4, 134,8, 134,1, 134,0, 133,0, 131,7, 131,6, 131,6, 131,1, 130,4, 130,1, 129,8, 128,9, 128,8, 128,7, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 128,2, 128,0, 127,6, 126,7, 126,4, 126,3, 126,0, 122,5, 120,9. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 793,1648 m/z; exp.: 793,1674 m/z. Anal. Calc. para $C_{48}H_{31}F_6N_6PRu$: %C, 61,47; %H, 3,33; %N, 8,96. Experimental: %C, 61,45; %H, 3,51; %N, 8,81.



38: 40%. ^{1}H-RMN (600 MHz, CD_3CN) δ 8,53 – 8,49 (m, 3H), 8,47 – 8,44 (m, 2H), 8,44 – 8,41 (m, 2H), 8,40 – 8,36 (m, 2H), 8,23 – 8,16 (m, 2H), 8,05 – 8,00 (m, 2H), 7,93 – 7,89 (m, 1H), 7,79 (dd, *J* = 8,1, 4,8 Hz, 1H), 7,77 – 7,72 (m, 3H), 7,64 (dd, *J* = 5,2, 1,2 Hz, 1H), 7,47 (dd, *J* = 8,0, 5,5 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,2, 5,3 Hz, 1H), 7,40 – 7,36 (m, 1H), 7,33 – 7,29 (m, 1H), 7,28 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,15 – 7,11 (m, 3H), 6,15 (dd, *J* = 9,0, 2,6 Hz, 1H), 5,67 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,27 (s, 3H). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 206,0, 164,3, 161,7, 159,4, 156,0, 154,3, 153,8, 151,4, 150,8, 150,0, 148,9, 148,7, 146,3, 142,1, 140,5, 138,0, 137,1, 135,8, 135,3, 134,7, 134,6, 134,5, 134,0, 133,6, 131,8, 131,6, 131,5, 131,4, 131,2, 128,8, 128,7, 128,6, 128,5, 128,5, 128,4, 128,3, 127,7, 127,2, 126,7, 126,4, 126,3, 126,0, 122,0, 120,0, 115,0, 107,9, 56,2, 54,9. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 853,1859 m/z; exp.: 853,1893 m/z. Anal. Calc. para $C_{50}H_{35}F_6N_6O_2PRu$: %C, 60,18; %H, 3,54; %N, 8,42. Experimental: %C, 60,14; %H, 3,54; %N, 8,30.

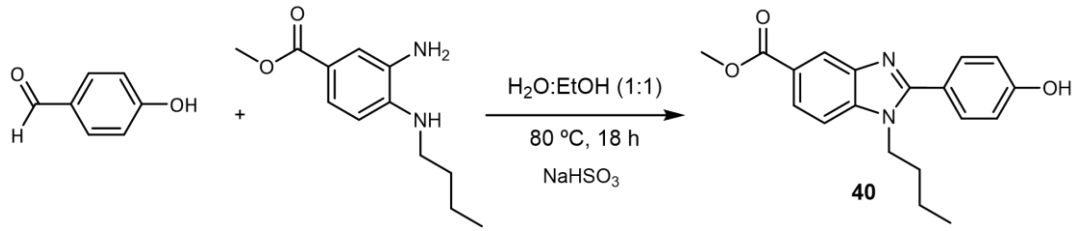


39: 37%. ^{1}H-RMN (400 MHz, CD_3CN) δ 8,56 – 8,48 (m, 4H), 8,44 – 8,34 (m, 3H), 8,31 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,20 – 8,12 (m, 2H), 8,07 – 8,00 (m, 2H), 7,89 – 7,84 (m, 1H), 7,81 – 7,72 (m, 2H), 7,69 – 7,65 (m, 2H), 7,64 (dd, *J* = 5,4, 1,2 Hz, 1H), 7,46 – 7,42 (m, 1H), 7,41 – 7,36 (m, 1H), 7,35 – 7,29 (m, 1H), 7,29 – 7,22 (m, 2H), 7,08 – 7,04 (m, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 5,92 (dd, *J* = 9,2, 2,7 Hz, 1H), 5,35 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,04 (s, 6H), 2,41 (s, 6H). ^{13}C-RMN (151 MHz, CD_3CN) δ 204,6, 164,1, 156,0, 155,0, 153,6, 152,4, 151,4, 150,8, 150,1, 149,4, 149,1, 146,4, 142,2, 138,2, 136,8, 135,5, 135,4, 134,7, 134,2, 134,1, 133,9, 133,0, 131,7, 131,5, 131,3, 131,2, 131,1, 129,6, 128,7, 128,5, 128,4, 128,3, 128,0, 127,7, 127,3, 126,6, 126,5, 126,2, 126,1, 125,8, 121,0, 117,2, 112,5, 106,6, 40,4, 39,3. Masas ESI-MS (modo ion. pos., ACN): calc.: $[M\text{-}PF_6]^+$ = 879,2498 m/z; exp.: 879,2515 m/z. Anal. Calc. para $C_{52}H_{41}F_6N_8PRu$: %C, 60,99; %H, 4,04; %N, 10,94. Experimental: %C, 60,98; %H, 4,07; %N, 11,01.

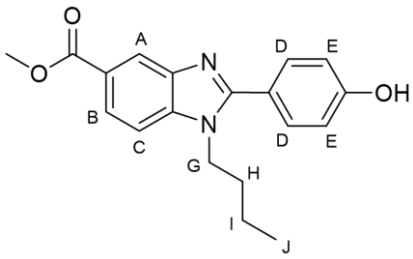
3.4. Capítulo 5

Síntesis de proligandos HC^N

La síntesis de **40** se llevó a cabo con pequeñas variaciones respecto a lo descrito en la bibliografía. En una primera etapa se preparó la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (**Esquema E2.1**).[1] La condensación del aldehído y la diamina (**Esquema E5.1**) se llevó a cabo siguiendo la bibliografía.[6,14] Se disolvió $NaHSO_3$ (24,2 mol, 2,5 g) en 4 mL de agua. Posteriormente, se añadió 4-hidroxibenaldehído (2,42 mmol, 295 mg) y la mezcla se agitó durante 30 min a 100 ºC. Después, se adicionó la diamina disuelta en 4 mL de etanol. Tras 18 h a 80 ºC, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con agua y hexano. Finalmente, **40** se obtuvo como un sólido blanco puro.



Esquema E5.1. Síntesis del proligando **40**.

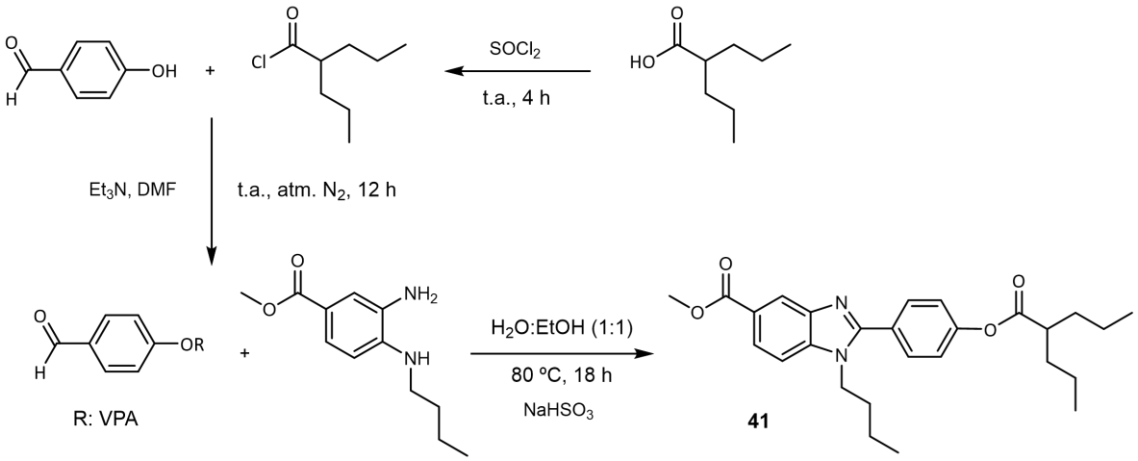


40: 80%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMF-d_7) δ 10,29 (s, 1H, Ar-OH), 8,33 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, H_A), 7,97 (dd, *J* = 8,5, 1,6 Hz, 1H, H_B), 7,80 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H_C), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_D), 7,08 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_E), 4,42 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, H_G), 3,94 (s, 3H, H_{OCH3}), 1,81 – 1,72 (m, 2H, H_H), 1,29 – 1,20 (m, 2H, H_I), 0,82 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, H_J). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMF-d_7) δ 167,4, 160,0, 156,2, 143,1, 139,8, 131,2 (C_D), 124,1, 123,5 (C_B), 121,4, 121,0 (C_A), 116,0 (C_E), 111,0 (C_C), 51,9 (C_{OCH3}), 44,7 (C_G), 31,8 (C_H), 19,8 (C_I), 13,3 (C_J). Masas ESI-MS (modo ion. pos. DMF): calc.: $[M+H]^+$ = 325,1547 m/z; exp.: 325,1550 m/z. Anal. Calc. para $C_{19}H_{20}N_2O_3$: %C, 70,35; %H, 6,21; %N, 8,64. Experimental: %C, 70,42; %H, 6,28; %N, 8,56.

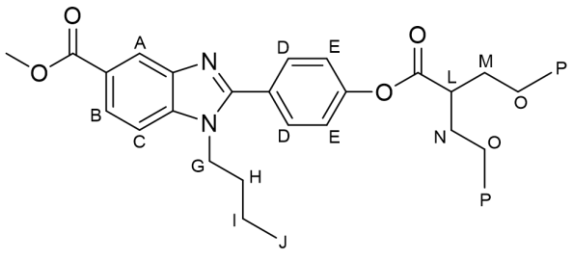
La síntesis de **41** se realizó en varias etapas (**Esquema E5.2**).[15] En la primera etapa tuvo lugar la formación del cloruro de ácido, para ello una disolución de ácido valproico (13,9 mmol, 1 g) en 6 mL de $SOCl_2$ se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se llevó a sequedad y se redisolvió en 2 mL de DMF seca. Aparte, se disolvieron 4-hidroxibenzaldehído (12 mmol, 1,47 g) y trietilamina (72 mmol, 10 mL) en 3 mL de DMF seca. Finalmente, la disolución del cloruro de valproico se añadió gota a gota a través de una cánula sobre la disolución del aldehído y la trietilamina y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente en atmósfera

inerte. Después de este tiempo, se añadieron 50 mL de DCM a la mezcla y se extrajo, al menos cinco veces, con 100 mL de agua. El sólido resultante se purificó mediante columna cromatográfica de sílice usando como eluyente una mezcla DCM:MeOH (95:5). De esta manera se obtuvo el aldehído funcionalizado.

La última etapa consiste en la condensación del aldehído anterior y la diamina y se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención del proligando **40**.[6,14] Tras la disolución de $NaHSO_3$ (24,2 mmol, 2,5 g) en 4 mL de agua, se añadió el aldehído (2,42 mmol, 600 mg) y se agitó durante 30 min a 100 ºC. Después, se adicionó la diamina (2,42 mmol, 540 mg) disuelta en 4 mL de etanol y la mezcla se agitó durante 18 h a 80 ºC. Se llevó a sequedad y se disolvió en 50 mL de DCM para, posteriormente, extraerla con 50 mL de agua destilada. Se obtuvo un aceite rosa que se purificó mediante columna cromatográfica de sílice usando como eluyente una mezcla EtOAc:Hex (1:3). El proligando **41** se obtuvo puro en forma de aceite amarillo.



Esquema E5.2. Síntesis del proligando **41**.

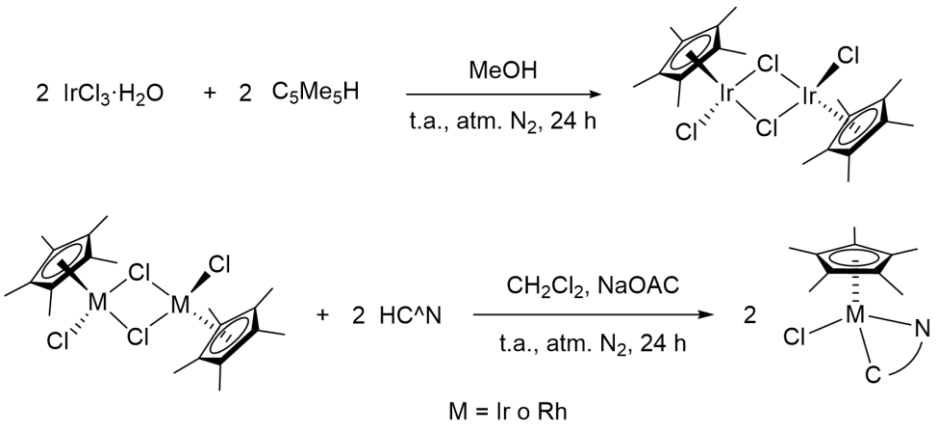


41: 75%. ^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,55 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H_A), 8,06 (dd, *J* = 8,5, 1,5 Hz, 1H, H_B), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_D), 7,45 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H_C), 7,28 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H_E), 4,27 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, H_G), 3,96 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,72 – 2,59 (m, 1H, H_L), 1,89 – 1.69 (m, 4H, $H_{H+M/N}$), 1,66 – 1,53 (m, 2H, $H_{M/N}$), 1,52 – 1,38 (m, 4H, H_O), 1,37 – 1,22 (m, 2H, H_I), 0,98 (t, *J* = 7,2 Hz, 6H, H_P), 0,89 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, H_J). ^{13}C-RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 174,8, 167,5, 154,4, 152,7, 138,6, 130,8 (C_D), 126,8, 125,3, 124,9 (C_B), 122,5 (C_E), 122,1 (C_A), 110,1 (C_C), 52,3 (C_{OCH3}), 45,6 (C_L), 45,1 (C_G), 34,8 (C_{M+N}), 32,0 (C_H), 20,9 (C_O), 20,1 (C_I), 14,2 (C_P), 13,7 (C_J). Masas ESI-MS (modo ion. pos. $CHCl_3$): calc.: $[M+H]^+$ = 451,2591 m/z; exp.: 451,2595 m/z. Anal. Calc. para

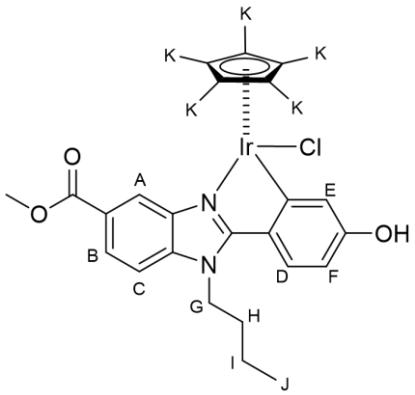
$C_{27}H_{34}N_2O_4$: %C, 71,97; %H, 7,61; %N, 6,22. Experimental: %C, 72,06; %H, 7,53; %N, 6,30.

Síntesis de complejos

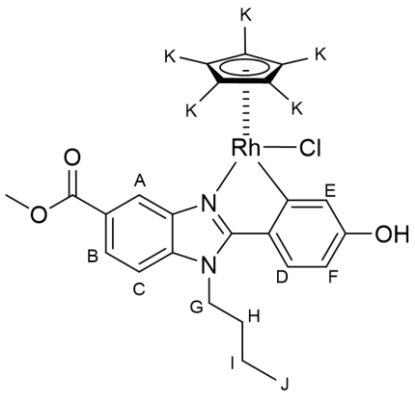
Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno mediante técnicas estándar de Schlenk descritas previamente (**Esquema E5.3**).[16] En el caso de los complejos de Ir(III) fue necesario sintetizar el dímero, $[Ir(\eta^5\text{-}C_5Me_5)Cl_2]_2$, por reacción de $IrCl_3 \cdot H_2O$ (0,2 mmol, 60 mg) y pentametilciclopentadieno (0,2 mmol, 27 mg) en metanol durante 24 h a temperatura ambiente. El sólido naranja obtenido se aisló y se secó a vacío. Para la síntesis de los complejos, una suspensión del dímero correspondiente (0,2 mmol), el proligando correspondiente (**40** o **41**) (0,4 mmol) y acetato de sodio (0,5 mmol, 41 mg) en 10 mL de DCM se hizo reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con éter etílico. De esta manera se obtuvieron los sólidos puros de los complejos de color amarillo/naranja.



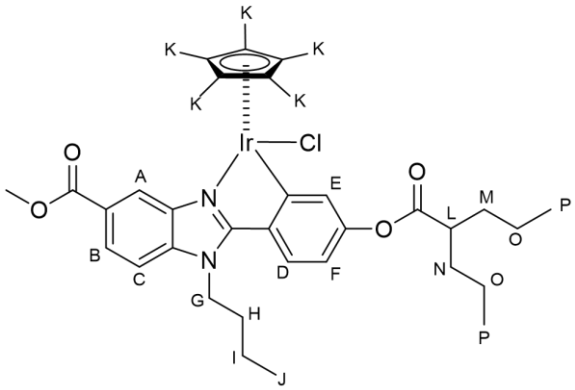
Esquema E5.3. Procedimiento general para la síntesis de los complejos **42**–**45**.



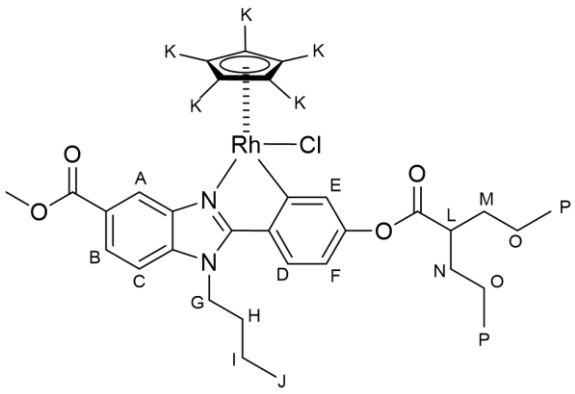
42: 87%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMF-d_7) δ 9,97 (s, 1H, Ar-OH), 8,35 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, H_A), 7,99 (dd, *J* = 8,6, 1,8 Hz, 1H, H_B), 7,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_C), 7,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H_D), 7,57 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, H_E), 6,65 (dd, *J* = 8,5, 2,5 Hz, 1H, H_F), 4,75 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, H_G), 3,99 (s, 3H, H_{OCH3}), 1,95 – 1,88 (m, 2H, H_H), 1,78 (s, 15H, H_K), 1,52 – 1,44 (m, 2H, H_I), 0,94 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_J). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMF-d_7) δ 169,2, 167,0, 164,3, 160,2, 139,9, 139,7, 126,5 (C_D), 125,4, 124,6, 123,9 (C_E), 123,6 (C_B), 117,9 (C_A), 111,1 (C_C), 110,2 (C_F), 88,2, 52,1 (C_{OCH3}), 44,6 (C_G), 31,9 (C_H), 19,9 (C_I), 13,6 (C_J), 9,4 (C_K). Masas ESI-MS (modo ion. pos. DMF): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 651,2199 m/z; exp.: 651,2191 m/z. Anal. Calc. para $C_{29}H_{34}ClIrN_2O_3$: %C, 50,76; %H, 4,99; %N, 4,08. Experimental: %C, 50,77; %H, 4,83; %N, 4,01.



43: 67%. ^{1}H-RMN (600 MHz, DMF-d_7) δ 9,99 (s, 1H, Ar-OH), 8,40 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H_A), 7,98 (dd, *J* = 8,6, 1,5 Hz, 1H, H_B), 7,90 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_C), 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H_D), 7,55 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H_E), 6,66 (dd, *J* = 8,5, 2,4 Hz, 1H, H_F), 4,77 – 4,67 (m, 2H, H_G), 4,00 (s, 3H, H_{OCH3}), 1,94 – 1,86 (m, 2H, H_H), 1,70 (s, 15H, H_K), 1,50 – 1,42 (m, 2H, H_I), 0,94 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, H_J). ^{13}C-RMN (151 MHz, DMF-d_7) δ 167,1, 160,3, 158,9, 140,2, 140,1, 125,9 (C_D), 125,8, 124,8 (C_E), 124,5, 123,5 (C_B), 118,2 (C_A), 111,1 (C_C), 110,8 (C_F), 95,8, 95,8, 52,1 (C_{OCH3}), 44,7 (C_G), 31,9 (C_H), 19,9 (C_I), 13,6 (C_J), 9,4 (C_K). Masas ESI-MS (modo ion. pos. DMF): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 561,1625 m/z; exp.: 561,1616 m/z. Anal. Calc. para $C_{29}H_{34}ClN_2O_3Rh$: %C, 58,35; %H, 5,74; %N, 4,69. Experimental: %C, 58,40; %H, 5,57; %N, 4,57.



44: 46%. ^{1}H-RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,44 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H_A), 8,03 (dd, *J* = 8,6, 1,5 Hz, 1H, H_B), 7,70 (m, 2H, H_{E+D}), 7,39 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_C), 6,82 (dd, *J* = 8,4, 2,2 Hz, 1H, H_F), 4,58 – 4,41 (m, 2H, H_G), 3,98 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,70 – 2,64 (m, 1H, H_L), 2,03 – 1,95 (m, 2H, H_H), 1,85 – 1,80 (m, 2H, $H_{M/N}$), 1,78 (s, 15H, H_K), 1,64 – 1,56 (m, 2H, $H_{M/N}$), 1,55 – 1,44 (m, 6H, H_{I+O}), 1,04 – 0,97 (m, 9H, H_{J+P}). ^{13}C-RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 175,5, 167,9, 167,2, 163,1, 152,3, 139,4, 139,3, 131,2, 130,1 (C_E), 125,4, 125,0 (C_D), 124,6 (C_B), 119,1 (C_A), 115,4 (C_F), 109,9 (C_C), 88,6, 52,4 (C_{OCH3}), 45,8 (C_L), 45,1 (C_G), 35,0 ($C_{M/N}$), 34,9 ($C_{M/N}$), 32,0 (C_H), 20,9 (C_O), 20,4 (C_I), 14,2 (C_P), 13,9 (C_J), 9,7 (C_K). Masas ESI-MS (modo ion. pos. DMF): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 777,3243 m/z; exp.: 777,3241 m/z. Anal. Calc. para $C_{37}H_{48}ClIrN_2O_4$: %C, 54,70; %H, 5,96; %N, 3,45. Experimental: %C, 54,68; %H, 5,87; %N, 3,42.



45: 34%. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,50 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, H_A), 8,02 (dd, *J* = 8,6, 1,6 Hz, 1H, H_B), 7,71 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H_E), 7,65 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H_D), 7,40 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H_C), 6,84 (dd, *J* = 8,4, 2,3 Hz, 1H, H_F), 4,53 – 4,38 (m, 2H, H_G), 3,98 (s, 3H, H_{OCH3}), 2,72 – 2,63 (m, 1H, H_L), 2,02 – 1,91 (m, 2H, H_H), 1,87 – 1,76 (m, 2H, $H_{M/N}$), 1,70 (s, 15H, H_K), 1,60 – 1,56 (m, 2H, $H_{M/N}$), 1,54 – 1,44 (m, 6H, H_{I+O}), 1,04 – 0,97 (m, 9H, H_{J+P}). ^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 175,5, 167,3, 159,0, 151,2, 139,8, 139,6, 131,7, 131,0 (C_E), 125,2, 124,6 (C_B), 124,5 (C_D), 119,5 (C_A), 116,3 (C_F), 109,9 (C_C), 96,2, 96,2, 52,4 (C_{OCH3}), 45,8 (C_L), 45,2 (C_G), 35,0 ($C_{M/N}$), 34,9 ($C_{M/N}$), 31,9 (C_H), 20,9, 20,9 (C_O), 20,4 (C_I), 14,2 (C_P), 13,9 (C_J), 9,9 (C_K). Masas ESI-MS (modo ion. pos. DMF): calc.: $[M\text{-}Cl]^+$ = 687,2665 m/z; exp.: 687,2681 m/z. Anal. Calc. para $C_{37}H_{48}ClN_2O_4Rh$: %C, 61,45; %H, 6,69; %N, 3,87. Experimental: %C, 61,41; %H, 6,65; %N, 3,72.

4. Propiedades químicas, fotofísicas y fotoquímicas

4.1. Medidas de absorción y emisión

Todos los espectros de absorción y emisión se registraron a una concentración final 10 µM de complejo en acetonitrilo y agua (1% DMSO o DMF).

4.2. Medidas de estabilidad y fotoestabilidad por UV/Vis

La estabilidad y fotoestabilidad se evaluó por espectroscopia UV/Vis preparando disoluciones de una concentración final 10 µM de complejo en el disolvente correspondiente. Para los estudios de estabilidad en oscuridad, los espectros se registraron a t=0 y tras incubar las muestras a 37 ºC durante 48 h. En el caso de las medidas de fotoestabilidad, se registraron los espectros a t=0 y tras la irradiación con la luz correspondiente durante 2 h.

4.3. Estudio del equilibrio de hidrólisis por RMN

Los experimentos de hidrólisis por RMN se realizaron en distintas condiciones dependiendo de los compuestos. En el Capítulo 2 se realizó preparando una disolución del complejo 1 mM en MeOD-d_4 y registrando los espectros con el tiempo. Posteriormente, se añadió ion cloruro hasta una concentración final 100 mM. Sin embargo, en el Capítulo 3, el complejo se disolvió en DMSO-d_6 (30% D_2O) a una concentración final 1 mM y tras registrar los espectros con el tiempo, se añadió cloruro hasta concentraciones finales de 4, 23 y 100 mM. Por último, en el Capítulo 5, se preparó

una disolución 1 mM de complejo en una mezcla MeOD:D_2O (2:1) y tras estudiar su evolución con el tiempo, se adicionaron iones cloruro hasta una concentración 4 y 23 mM. Para todos ellos se emplearon tubos de RMN con un volumen final de 500 µL y todos los espectros se registraron a 25 ºC.

4.4. Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete

Para calcular el rendimiento cuántico de oxígeno singlete se empleó el procedimiento descrito en la bibliografía con pequeñas modificaciones.[13,17] Se llevó a cabo por espectroscopia de absorción UV/Vis registrando el espectro de la DPBF en presencia de los distintos compuestos e irradiando con luz de determinada longitud de onda. Para ello se prepararon disoluciones de los complejos en acetonitrilo. Las concentraciones se ajustaron para cada muestra de manera que la absorbancia a la longitud de onda de la luz empleada fuera la misma para todos los compuestos ensayados y para la referencia. Una vez registrados los espectros a distintos tiempos, se representó la absorbancia de la DPBF a 411 nm frente al tiempo de irradiación para obtener las rectas cuyas pendientes nos permiten obtener el valor del Φ_Δ mediante la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\Delta M} = \Phi_{\Delta R}\left(\frac{m_M}{m_R}\right)\left(\frac{1-10^{AR}}{1-10^{AM}}\right)$$

Donde $\Phi_{\Delta R}$ es el rendimiento cuántico de la referencia, m_R y m_M son las pendientes de las rectas de la referencia y la muestra, respectivamente y A_R y A_M son las absorbancias de la muestra y la referencia a la longitud de onda de irradiación.

4.5. Estudio de generación de radical hidroxilo

La evaluación de la capacidad de los complejos para generar radical hidroxilo tras la exposición a la luz se llevó a cabo mediante medidas de emisión de la sonda HPF en presencia de los complejos. Para ello se prepararon disoluciones de los compuestos (10 µM) junto con HPF (10 µM) en PBS (5% DMF) y se registró la evolución de los espectros de emisión (λ_{exc} = 490 nm) con el tiempo.

5. Toma de datos de difracción de rayos-X y refinamiento de las estructuras cristalinas

5.1. Capítulo 2

Los detalles de las determinaciones estructurares por rayos-X y de los parámetros de refinamiento se recogen en las **Tablas A2.1** y **A2.2** del Anexo I. Los cristales se montaron en fibras de vidrio y se transfirieron a la corriente de gas frío del difractómetro Bruker Smart APEX. Los datos se registraron con radiación Mo Kα (λ=

0,71073 Å) en modo de barrido ω. La estructura se resolvió por métodos directos; el refinamiento se realizó por mínimos cuadrados de matriz completa en F^2 utilizando el programa SHELXL;[18,19] corrección empírica de absorción (multi-scan) con SADABS (Bruker). Los gráficos se dibujaron con DIAMOND.[20] Los números de referencia CCDC son 2282513 para **6**, 2325369 para **6**·$CHCl_3$ y 2282514 para **11**.

La cadena butílica en **11** está desordenada en dos posiciones con una ocupación del 58% y del 42% para los átomos marcados como A y B. Además, el anión PF_6 está desordenado rotacionalmente. La estructura de **11** también contiene dos moléculas de disolvente CH_2Cl_2 parcialmente ocupadas (79% y 55% de ocupación) con grandes factores de temperatura y residuos de disolvente no contabilizados, posiblemente de una posición compartida de CH_2Cl_2 con una molécula de codisolvente de hexano. Estos residuos de disolvente no contabilizados dan lugar a huecos accesibles al disolvente de 106 $Å^3$ en la estructura de **11**. En la **Tabla A2.2b** se muestra una imagen de la molécula de **11** con el desorden de la cadena butílica y las dos moléculas de CH_2Cl_2.

Las medidas de la difracción de rayos-X en polvo (PXRD) se hicieron en un Rigaku MiniFlex (600 W, 40 kV, 15 mA) y radiación Cu-K_α (λ_{media}= 1,54184 Å) a temperatura ambiente con un soporte de silicona de bajo fondo en geometría Bragg-Brentano. El mayor reflejo fue normalizado a 1. Los patrones de polvo simulados derivaron de los datos del monocristal con el software MERCURY 2020.3.0.

5.2. Capítulo 4

Las intensidades se registraron a baja temperatura en un difractómetro Bruker D8QUEST usando radiación Mo Kα monocromática (λ= 0,71073 Å).[21] Las correcciones de absorción se basaron en barridos múltiples (programa SADABS). Las estructuras se refinaron anisotrópicamente usando SHELXL-2018.[18]

5.3. Capítulo 5

Las intensidades se registraron a baja temperatura en un difractómetro Bruker D8QUEST usando radiación Mo Kα monocromática (λ= 0,71073 Å).[21] Las correcciones de absorción se basaron en barridos múltiples (programa SADABS). Las estructuras se refinaron anisotrópicamente usando SHELXL-2018.[18] Los átomos de hidrógeno se incluyeron utilizando grupos metilo rígidos o un modelo.

6. Experimentos biológicos

6.1. Capítulo 3

Líneas celulares

Las células MDA-MB-231, MDA-MB-231 Vim RFP, MCF-7 y MCF10A se mantuvieron en medio esencial mínimo de Dubelco suplementado con un 10% de FBS y gentamicina. Las células se cultivaron en un incubador de CO_2 humidificado (5%) y se subcultivaron 2-3 veces por semana según la proliferación de cada línea celular, pero todavía en estado subconfluyente, para mantener las características de crecimiento exponencial.

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los compuestos investigados se evaluó mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB). Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células/pocillo en 100 µL de medio. Tras la incubación durante una noche en un incubador de CO_2 humidificado, las células se trataron con los compuestos ensayados con un volumen final de 200 µL/pocillo. Tras 72 h adicionales, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 1 h a 4 ºC con ácido tricloroacético. A continuación, las células se tiñeron con colorante SRB al 0,4% durante 30 min. Las células teñidas se disolvieron con Tris (10 mM). La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm con un lector de absorbancia (*SPARK TECAN, SCHOELLER*). Los valores de lectura se convirtieron en el porcentaje del control (% de supervivencia celular). Los efectos antiproliferativos se expresaron como valores de IC_{50} calculados a partir de las curvas de la supervivencia celular (%) frente a la concentración del fármaco (µM). Las concentraciones de los compuestos durante el tratamiento se verificaron mediante FAAS o ICP/MS.

Test de exclusión de azul trypan

Se sembraron las células MDA-MB-231 o MDA-MB-231 Vim RFP con la misma densidad y formato que el plástico de cultivo usado, dependiendo de cada experimento. Después de la incubación durante una noche, las células se trataron con las concentraciones de los compuestos correspondientes al valor de $IC_{50,72h}$ y se incubaron durante 24 h. A continuación, se recogieron las muestras por tripsinización, y se añadió azul tripan al 0,4% a la suspensión celular (Biorad, EE.UU.). Por último, se analizó la viabilidad celular en un contador de células automático TC10.

Acumulación celular

Para determinar la acumulación celular de los complejos en la línea MDA-MB-231 se sembraron las células en placas Petri de 100 mm a una densidad de $1,5\times10^6$

células/placa. Tras una noche de preincubación, las células se expusieron a los complejos durante 24 h. Después del tratamiento, se recogieron las células, se contaron, se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron por centrifugación. También se analizó la viabilidad de las células mediante un ensayo de exclusión con azul tripán para verificar el estado de las muestras recogidas y descartar la posible alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Por último, los gránulos celulares se digirieron utilizando un sistema de digestión ácida por microondas (HCl, 5 M) (CEM Mars). La cantidad de metal absorbido por las células se determinó mediante ICP/MS.

Medida de lipofilia

El coeficiente de partición octanol/agua, logP, se midió por el método del "frasco de agitación". El agua y el n-octanol se saturaron previamente con n-octanol y agua, respectivamente, junto con NaCl (100 mM). Los compuestos se disolvieron en la fase acuosa y se mezcló con octanol saturado de agua en una proporción volumétrica de 1:6. Las muestras se agitaron exhaustivamente en un vórtex durante toda la noche a temperatura ambiente para establecer el equilibrio. Para separar las fases, las muestras se centrifugaron a 3000g durante 5 min. La concentración de iridio en la fase acuosa ($[Ir]_a$) se determinó mediante ICP/MS; la concentración de iridio en la fase octanol ($[Ir]_o$) se calculó como la diferencia entre la concentración inicial y la concentración en la fase acuosa tras la agitación, y el logP resultante se calculó mediante la siguiente fórmula: $logP = log([Ir]_o/[Ir]_a)\cdot(1/6)] = log([Ir]_{inicial}–[Ir]_a) / [Ir]_a)\cdot(1/6)]$.

Estudio de localización celular

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de cultivo confocal con fondo de cristal de 35 mm (*Mattek Co., MA, EE.UU*.) a una densidad de 1×10^5 células por placa y se incubaron durante toda la noche. A continuación, las células se trataron con los complejos (5 µM) y se incubaron durante 5 h. Tras la incubación, las células se tiñeron con MitoTracker™ (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU*.). Las muestras se fijaron con formaldehído al 3,7%, se montaron *con ProLongTM Diamond antifade mountant medium* (*ThermoFisher Scientific*) y se analizaron en el microscopio confocal de barrido láser *Leica TCS SP5* (*Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania*). Los complejos de Ir investigados se excitaron a 355 nm. Las muestras se escanearon secuencialmente. El análisis de la colocalización de las imágenes adquiridas se realizó utilizando el software *ImageJ*, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) mediante el método de regresión para estimar el umbral. Los valores de PCC se expresan como la media de dos experimentos independientes ± desviación estándar.

Detección de la muerte celular

La muerte celular se determinó mediante el ensayo estándar Anexina-V/IP y se analizó por citometría de flujo. Se sembraron las células MDA-MB-231 en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/pocillo. Tras una noche de incubación, las células se trataron con el complejo a la concentración correspondiente al múltiplo de $IC_{50,72h}$ (1, 2, $3\times IC_{50,72h}$) y se incubaron durante 18 h más. Los controles se trataron con DMSO al 1%. Además, los controles positivos de apoptosis se trataron durante 3 h con 1 µM de estaurosporina, mientras que los controles positivos de necrosis se trataron durante 1 h con EtOH al 10%. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se separaron mediante recolección no enzimática con *CellStriper* (Corning). Las muestras se transfirieron a un tampón de unión de anexina-V y se tiñeron con tinte azul pacífico de anexina-V (Thermo Fisher Scientific) / IP (Merck, 1 µg/mL). Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se analizaron por citometría de flujo *Cell Stream* (Luminex, EE.UU.). Los datos se procesaron en el software de análisis *Cell Stream* o *FCS Express 7* (DeNovo Software, CA). Se analizaron al menos 30000 eventos por cada muestra realizada por triplicado, y el experimento se repitió cuatro veces de forma independiente.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células MDA-MB-231 se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Tras una preincubación de una noche en un medio libre de fármacos, las células se trataron durante 24 h con los complejos y la doxorrubicina a sus concentraciones correspondientes a valores de $2\times IC_{50,72h}$. Las muestras se recogieron por tripsinización, se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en etanol al 70% y se mantuvieron a 4 ºC durante toda la noche. Las células fijadas se enjuagaron dos veces con PBS y se tiñeron con ioduro de propidio diluído a 50 µg/mL en una disolución de Vindel (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 100 µg/mL RNasa A) durante 30 min a 37 ºC. Los perfiles del ciclo celular se midieron con un citómetro de flujo *FACS Verse* (Becton Dickinson, Alemania). El análisis de datos se procesó en *FCS Express 7* (DeNovo Software, CA). Los resultados se confirmaron en dos experimentos independientes. Cada análisis consta de, al menos, 20000 células individuales, separadas mediante el método *FCS-H a FCS-A*. Los datos se sometieron a análisis estadístico mediante el Test-t de Student, y las diferencias significativas ($p\leq0,05$) respecto al control tratado con DMSO se marcaron con un asterisco.

Actividad antiinvasiva determinada mediante la monitorización en tiempo real del crecimiento celular

La actividad antiinvasora se monitorizó mediante el sistema *xCELLigence* (Roche). Este sistema permite monitorizar las células invasoras en tiempo real proporcionando datos más detallados sobre los efectos antimigratorios tras el tratamiento con los compuestos ensayados. Las células MDA-MB-231 se trataron en una placa de 6 pocillos con la concentración del $IC_{50,72h}$ de los compuestos ensayados. Tras 24 h de incubación, se tripsinizaron las células y se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en el pocillo superior del sistema de cámara sándwich. Antes de la siembra celular, la parte superior de la cámara sándwich se recubrió con matriz Geltrex (Gibco) y se dejó durante 1 h a 37 ºC para recubrir la superficie. Las células (cámaras superiores) se sembraron en un medio de cultivo sin FBS, suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina. Las cámaras inferiores se llenaron con el medio completo, suplementado con un 10% de FBS (quimioatrayente). Las muestras se monitorizaron continuamente cada 5 min durante 7 días adicionales. El tiempo de invasión celular se definió como el momento en el que las células invasoras superaban el índice celular (IC) por encima de cero. El periodo necesario para la invasión a través de la matriz de *geltrex* podría definir con mayor precisión los efectos antiinvasores de los compuestos ensayados sobre las células MDA-MB-231.

Cuantificación de vimentina por citometría de flujo

La cuantificación de la expresión de vimentina tras el tratamiento de las células MDA-MB-231 Vim RFP con los compuestos se determinó mediante citometría de flujo. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron durante la noche. A continuación, las células se trataron con la concentración de compuestos correspondiente al múltiplo respectivo de $IC_{50,72h}$ (0,25, 0,5, 1, 2×). Tras 72 h de incubación, se tripsinizaron las células y se analizaron en un citómetro de flujo *Cell Stream* (Luminex, EE.UU.). Los datos se procesaron utilizando el software de análisis *Cell Stream* o *FCS Express 7* (DeNovo software, CA). La fluorescencia procedente de la etiqueta Vim-RFP es proporcional a la expresión de vimentina en las células tratadas. Cada muestra analizada por citometría de flujo constaba de, al menos, 30000 eventos.

RT-qPCR de los gnes transcritos relacionados con EMT

Se sembraron células MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos a una densidad de $0,5\times10^6$ células/pocillo y se incubaron durante toda la noche. A continuación, se trataron con concentraciones equitóxicas de los compuestos correspondientes al $IC_{50,72h}$ y se incubaron durante 24 h. Se recogieron las células y se aisló el ARN total utilizando columnas de *ARN NucleoSpin*® (Machery Nagel, GE). Se llevó a cabo un análisis qPCR

de un solo paso que combinaba la transcripción inversa seguida de un ciclo térmico de amplificación utilizando *Luna® universal one-step RT-qPCR* (New England BioLabs, MA, EE.UU.). Los experimentos se realizaron a tiempo real en un *Illumina Eco PCR* (Illumina, CA, EE.UU.). El perfil térmico fue el siguiente: transcripción inversa durante 10 min a 55 ºC, desnaturalización inicial durante 1 min a 95 ºC, seguida de 43 ciclos térmicos de desnaturalización durante 10 s a 95 ºC y extensión durante 30 s a 60 ºC. Las secuencias de los primers fueron: B-actina-F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC, B-actina-R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT, Vim-F: AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA, Vim-R: ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT, E-Cadherina-F: GCCTCCTGAAAAGAGTGGAAG, E-Cadherina-R: TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG, N-Cadherina-F: CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC, N-Cadherina-R: GTAGGATCTCCGCCACTGATTC, B-Catenina-F: CACAAGCAGAGTGCTGAAGGTG, B-Catenina-R: GATTCCTGAGTCCAAAGACAG, SNAI1-F: TGCCCTCAAGATGCACATCCGA, SNAI1-R: GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC. Los primers purificados procedían de *Generi Biotech* (República Checa). Todas las ejecuciones incluyeron análisis de la curva de fusión y controles técnicos negativos sin plantilla para confirmar la amplificación específica de un solo producto. B-actina se empleó como control interno. La expresión relativa de ARNm se representa como un aumento del pliegue ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).[22]

Morfología de las células MDA-MB-231 tratadas y análisis cualitativo de la red de filamentos de vimentina determinado mediante microscopía confocal

Las células MDA-MB-231 Vim-RFP se sembraron en placas de Petri confocal de 35 mm (Mattek) a una densidad de $2{,}5\times10^5$ células y se incubaron durante la noche. A continuación, las células se trataron con los compuestos a la concentración correspondiente al $IC_{50,72h}$ y se incubaron durante 24 h más. Después, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% (10 min, t.a.), y se montaron con DAPI. Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal Leica SP8 SMD en el modo de deconvolución de luz.

Cuantificación morfológica de esferoides tumorales y cuantificación del potencial invasivo

Se sembraron células MDA-MB-231 en una matriz de agar en sándwich (gel inferior al 0,5%, gel superior que contiene células al 0,35%). En primer lugar, se cubrieron los pocillos de las placas de 24 pocillos con gel de agar al 0,5% y, a continuación, se resuspendieron las células MDA-MB-231 en matriz de agar al 0,35%. El protocolo detallado fue el siguiente: la disolución stock de gel de agar se preparó esterilizando en un autoclave 1 g de agar en 100 mL de PBS durante al menos un ciclo

de 20 min. Las placas de 24 pocillos se cubrieron con 1 mL de agar al 0,5% preparado tras mezclar la disolución de agar al 1% con medio de cultivo en una proporción 1:1. A continuación, la placa se cubrió con 1 mL de agar al 0,35%. A continuación, la placa se cubrió con 1 mL de agar al 0,35% compuesto por 0,35 mL de agar al 1% y 0,65 mL de medio de cultivo con 10^5 células MDA-MB-231. Tras la solidificación del gel, se cubrió la placa con 2 mL de medio de cultivo. La mezcla de la disolución de agar y los medios de cultivo se llevó a cabo después de que la primera se enfriara a aproximadamente 40 ºC para evitar daños por altas temperaturas. Las células se cultivaron durante 7 días más para generar esferoides y, a continuación, se trataron con los compuestos ensayados a la concentración equitóxica correspondiente al $IC_{50,72h}$ y se cultivaron durante 72 h más. Las muestras se fotografiaron en un microscopio de contraste de fases (Olympus CKX41) y las imágenes se procesaron y analizaron para los parámetros morfológicos en el software *ImageJ*.

Ensayo de cicatrización de heridas

Se sembraron células MDA-MB-231 Vim-RFP en placas Petri de confocal de 35 mm (Mattek) a una densidad de 3×10^5 células/placa y se incubaron durante la noche o durante 24–48 h más hasta alcanzar aproximadamente un 70% de confluencia. Se realizó un rayado (220 µm de anchura) bajo succión continua con la punta de la pipeta. Se lavaron las células y se sustituyó el medio por otro suplementado con los compuestos ensayados, aplicados a la concentración equitóxica ($IC_{50,72h}$). Las muestras se incubaron durante 24 h adicionales antes de su fijación con formaldehído al 3,7% (10 min, t.a.) y se montaron con antidifuminante (LifeSciences, ThermoFisher Scientific). Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal Leica SP8 SMD en el modo de deconvolución de luz. Las imágenes se analizaron utilizando el software *ImageJ*. Los límites de los arañazos se identificaron con el plugin *ImageJ* de la herramienta de cicatrización de heridas *IRM* o manualmente.

6.2. Capítulo 4

Medio de cultivo y línea celular

La línea celular de adenocarcinoma de cérvix, HeLa, se mantuvo en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con un 10% de FBS (Suero fetal bovino), L-glutamina, 1% penicilina – estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células se cultivaron en un incubador humidificado en una atmósfera al 5% en CO_2 a 310 K y se subcultivaron dos veces a la semana con las densidades adecuadas comprobando que no contenían micoplasma mediante el método estándar de tinción de ADN con *Hoechst*.

Determinación de la fototoxicidad

La fototoxicidad se determinó empleando el método de MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en la línea celular HeLa. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo en medio de cultivo y se incubaron durante 24 h. Se añadieron distintas diluciones de los complejos con un volumen final de 100 µL por pocillo y las células se incubaron durante 1 h, posteriormente, se irradiaron durante 1 h con un fotorreactor *EXPO-Panels* de Luzchem (Canadá) equipado con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm^2) o un fotorreactor *Well Plate Illuminator* de Luzchem (Canadá) de luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2) dentro de un incubador de CO_2. Posteriormente, se retiró el medio que contenía los compuestos y se renovó por medio fresco, que se incubó durante 46 h más. La temperatura fue de 310 K durante todo el experimento. Tras ese periodo, el medio se eliminó y se añadieron 50 µL de una disolución de MTT que se incubó 4 h. Por último, se añadió DMSO y se midió la absorbancia en un lector de microplacas *FLUOstar Omega*. Las curvas sigmoidales de los datos de concentración frente a viabilidad se procesaron con el software *SigmaPlot 14* y se calcularon los valores de IC_{50}. Para las muestras en oscuridad se realizó el mismo procedimiento en los mismos tiempos, pero sin la exposición a la luz.

6.3. Capítulo 5

Cepas de bacterias

S. aureus CECT 5190 (resistente a la meticilina, bacteria Gram-positiva), *A. baumannii* ATCC 17978 (bacteria Gram-negativa) y *P. aeruginosa* PAO1 (bacteria Gram-negativa) se mantuvieron en agar o caldo Mueller–Hinton a 37 °C mientras que *E. faecium* CECT 5253 (resistente a la vancomicina, bacteria Gram-positiva) se mantuvo en agar o caldo de soja tríptica.

Cálculo del MIC

Se determinó de acuerdo al método de microdilución de caldo en placa siguiendo los criterios de la CLSI (Procedimiento para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: *17th informational supplement M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute., 2012*) como se ha descrito previamente.[23] Los valores del MIC son la media de dos experimentos independientes con cuatro replicaciones.

Cálculo del MBC

Se determinó sembrando 10 µL de las disoluciones de muestra de cada pocillo sin crecimiento visible de las placas de determinación del MIC en placas de agar Mueller-Hinton y, a continuación, contando el número de colonias después de 20 h de incubación a 37 ºC. La concentración a la que no crecieron las colonias corresponde a los valores del MBC.

Acumulación del metal en la bacteria

Los inóculos bacterianos en fase logarítmica se ajustaron a 0,5 McFarland y después se diluyeron a 1:100 en tubos cónicos con 5 mL de MHB fresco y 1 µL del compuesto. Tras la incubación a 37 ºC y 120 rpm, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. El sedimento se lavó dos veces con solución salina de tampón fosfato y, finalmente, se resuspendió en 1 mL de PBS. Se utilizaron 20 µL para registrar la OD_{600} (densidad óptica bacteriana) con un lector de microplacas (Lector multimodo de imágenes celulares *Cytation 5, Biotek Instruments, EE.UU*.). A continuación, las muestras se diluyeron en 3 mL de agua MiliQ y se digirieron con HNO_3 al 65% durante 24 h antes del análisis con ICP/MS 8900 (Agilent Technologies). Los datos se presentan como la media de dos experimentos independientes con dos réplicas para cada condición ensayada.

7. Bibliografía

(1) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhloufi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7310–7327. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01194.

(2) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Yellol, G.; Zajac, J.; Donaire, A.; Vigueras, G.; Novohradsky, V.; Janiak, C.; Brabec, V.; Ruiz, J. Highly Potent Extranuclear-Targeted Luminescent Iridium(III) Antitumor Agents Containing Benzimidazole-Based Ligands with a Handle for Functionalization. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (98), 14165–14168. https://doi.org/10.1039/C6CC07909A.

(3) Ortega-Forte, E.; Hernández-García, S.; Vigueras, G.; Henarejos-Escudero, P.; Cutillas, N.; Ruiz, J.; Gandía-Herrero, F. Potent Anticancer Activity of a Novel Iridium Metallodrug via Oncosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79* (10), 510. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04526-5.

(4) Juris, A.; Campagna, S.; Bidd, I.; Lehn, J. M.; Ziessel, R. Synthesis and Photophysical and Electrochemical Properties of New Halotricarbonyl(Polypyridine)Rhenium(I) Complexes. *Inorg. Chem.* **1988**, *27* (22), 4007–4011. https://doi.org/10.1021/ic00295a022.

(5) Lo, K. K.-W.; Tsang, K. H.-K.; Sze, K.-S. Utilization of the Highly Environment-Sensitive Emission Properties of Rhenium(I) Amidodipyridoquinoxaline Biotin Complexes in the Development of Biological Probes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (4), 1714–1722. https://doi.org/10.1021/ic051266f.

(6) Betti, M.; Genesio, E.; Marconi, G.; Sanna Coccone, S.; Wiedenau, P. A Scalable Route to the SMO Receptor Antagonist SEN826: Benzimidazole Synthesis via Enhanced in Situ Formation of the Bisulfite–Aldehyde Complex. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18* (6), 699–708. https://doi.org/10.1021/op4002092.

(7) Novohradsky, V.; Vigueras, G.; Pracharova, J.; Cutillas, N.; Janiak, C.; Kostrhunova, H.; Brabec, V.; Ruiz, J.; Kasparkova, J. Molecular Superoxide Radical Photogeneration in Cancer Cells by Dipyridophenazine Iridium(III) Complexes. *Inorg. Chem. Front.* **2019**, *6* (9), 2500–2513. https://doi.org/10.1039/C9QI00811J.

(8) Huang, H.; Banerjee, S.; Qiu, K.; Zhang, P.; Blacque, O.; Malcomson, T.; Paterson, M. J.; Clarkson, G. J.; Staniforth, M.; Stavros, V. G.; Gasser, G.; Chao, H.; Sadler,

P. J. Targeted Photoredox Catalysis in Cancer Cells. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (11), 1041–1048. https://doi.org/10.1038/s41557-019-0328-4.

(9) Yoshikawa, N.; Yamabe, S.; Kanehisa, N.; Kai, Y.; Takashima, H.; Tsukahara, K. Synthesis, Characterization, and DFT Investigation of IrIII Tolylterpyridine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007* (13), 1911–1919. https://doi.org/10.1002/ejic.200600995.

(10) Chen, G.-Y.; Chang, B.-R.; Shih, T.-A.; Lin, C.-H.; Lo, C.-L.; Chen, Y.-Z.; Liu, Y.-X.; Li, Y.-R.; Guo, J.-T.; Lu, C.-W.; Yang, Z.-P.; Su, H.-C. Cationic IrIII Emitters with Near-Infrared Emission Beyond 800 Nm and Their Use in Light-Emitting Electrochemical Cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (21), 5489–5497. https://doi.org/10.1002/chem.201805902.

(11) Wang, C.; Lystrom, L.; Yin, H.; Hetu, M.; Kilina, S.; McFarland, S. A.; Sun, W. Increasing the Triplet Lifetime and Extending the Ground-State Absorption of Biscyclometalated Ir(III) Complexes for Reverse Saturable Absorption and Photodynamic Therapy Applications. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (41), 16366–16378. https://doi.org/10.1039/C6DT02416E.

(12) Behmadi, H.; Roshani, M.; Saadati, S. M. Synthesis of Phenanthrimidazole from 9,10-Phenanthraquinone and Aldehydes by Molecular Iodine as Catalyst. *Chinese Chem. Letters* **2009**, *20* (1), 5–8. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2008.09.047.

(13) Ballester, F. J.; Ortega, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Ruiz, J. Ru(II) Photosensitizers Competent for Hypoxic Cancers via Green Light Activation. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (71), 10301–10304. https://doi.org/10.1039/D0CC02417A.

(14) Jiang, Y.; Jia, S.; Li, X.; Sun, Y.; Li, W.; Zhang, W.; Xu, G. An Efficient NaHSO3-Promoted Protocol for Chemoselective Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles in Water. *Chem. Pap.* **2018**, *72* (5), 1265–1276. https://doi.org/10.1007/s11696-017-0367-5.

(15) Ye, R.-R.; Cao, J.-J.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Valproic Acid-Functionalized Cyclometalated Iridium(III) Complexes as Mitochondria-Targeting Anticancer Agents. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (60), 15166–15176. https://doi.org/10.1002/chem.201703157.

(16) Yellol, G. S.; Donaire, A.; Yellol, J. G.; Vasylyeva, V.; Janiak, C.; Ruiz, J. On the Antitumor Properties of Novel Cyclometalated Benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) Complexes. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (98), 11533. https://doi.org/10.1039/c3cc46239k.

(17) Karges, J.; Heinemann, F.; Jakubaszek, M.; Maschietto, F.; Subecz, C.; Dotou, M.; Vinck, R.; Blacque, O.; Tharaud, M.; Goud, B.; Viñuelas Zahínos, E.; Spingler, B.; Ciofini, I.; Gasser, G. Rationally Designed Long-Wavelength Absorbing Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (14), 6578–6587. https://doi.org/10.1021/jacs.9b13620.

(18) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Cryst C* **2015**, *71* (1), 3–8. https://doi.org/10.1107/S2053229614024218.

(19) Sheldrick, G. M. A Short History of SHELX. *Acta Cryst A* **2008**, *64* (1), 112–122. https://doi.org/10.1107/S0108767307043930.

(20) *Diamond - Crystal and Molecular Structure Visualization*. https://www.crystalimpact.com/diamond/ (accessed 2023-07-07).

(21) Bruker. Bruker; AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2001.

(22) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

(23) Busto, N.; Vigueras, G.; Cutillas, N.; García, B.; Ruiz, J. Inert Cationic Iridium(III) Complexes with Phenanthroline-Based Ligands: Application in Antimicrobial Inactivation of Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (25), 9653–9663. https://doi.org/10.1039/D2DT00752E.

ANEXOS

ANEXO I

ÍNDICE

1. Espectros de RMN A3

1.1. Compuesto 4 ..... A3

1.2. Compuesto 5 ..... A5

1.3. Compuesto 6 ..... A8

1.4. Compuesto 7 ..... A10

1.5. Compuesto 8 ..... A13

1.6. Compuesto 9 ..... A15

1.7. Compuesto 10 ..... A18

1.8. Compuesto 11 ..... A20

1.9. Compuesto 12 ..... A23

1.10. Espectros ^{13}C-RMN comparativos A25

2. Espectroscopia infrarroja (IR) A26

3. Espectrometría de masas A31

4. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) A34

5. Determinación de la estructura cristalina por rayos-X A37

5.1. Análisis de las posibles interacciones de apilamientos-π en 6 y 11 ..... A44

6. Propiedades fotofísicas A47

7. Estudios de estabilidad A48

7.1. Estabilidad en RPMI (5% DMSO) A51

8. Estudios biológicos A52

9. Bibliografía A55

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 4

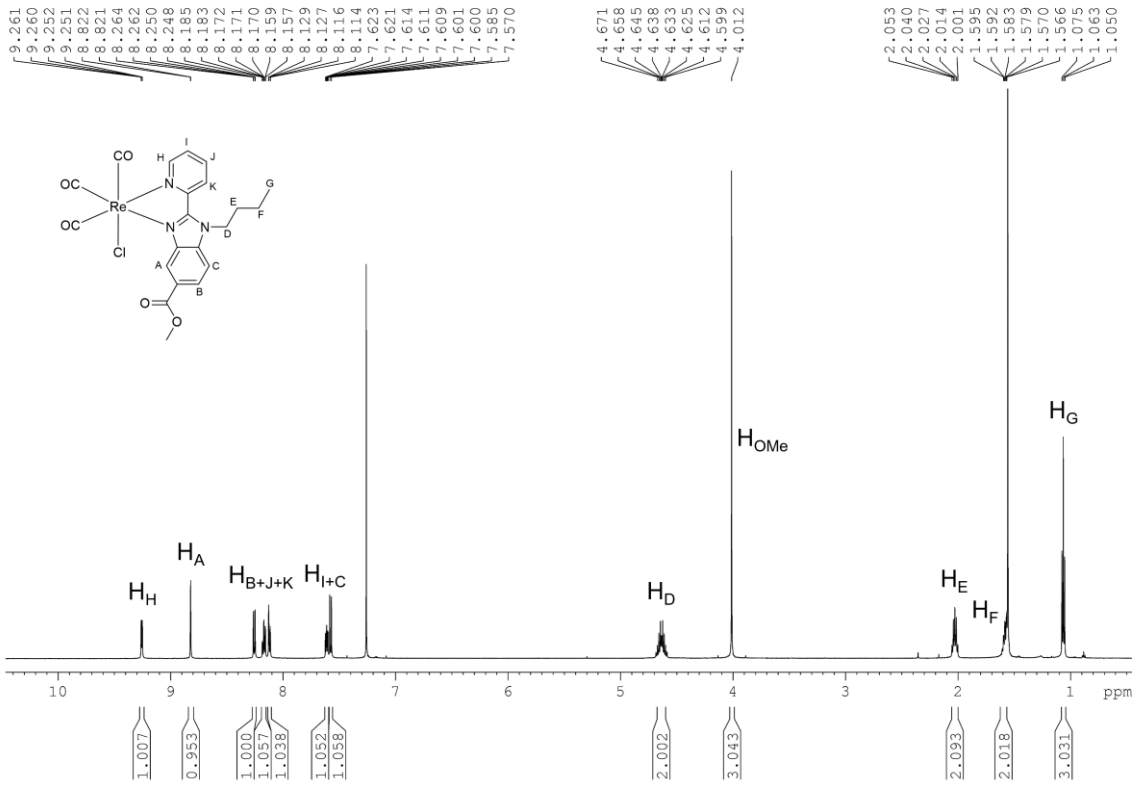


Figura A2.1. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **4** en $CDCl_3$.

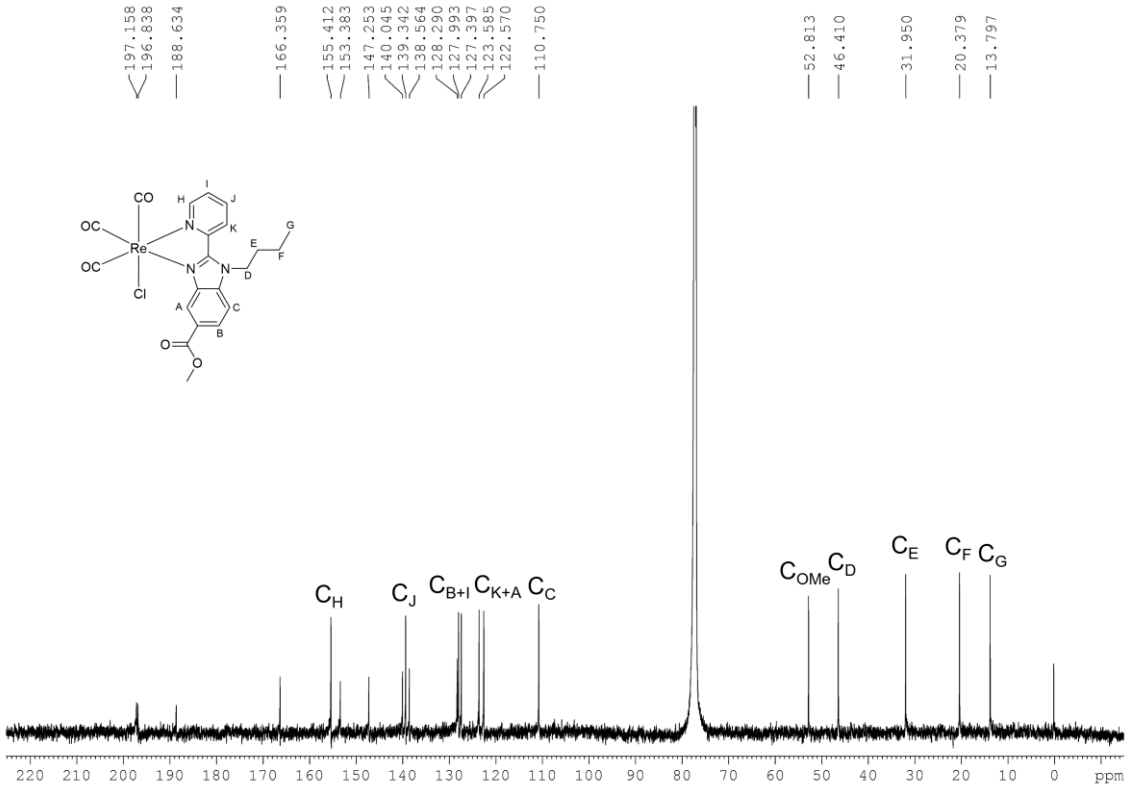


Figura A2.2. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **4** en $CDCl_3$.

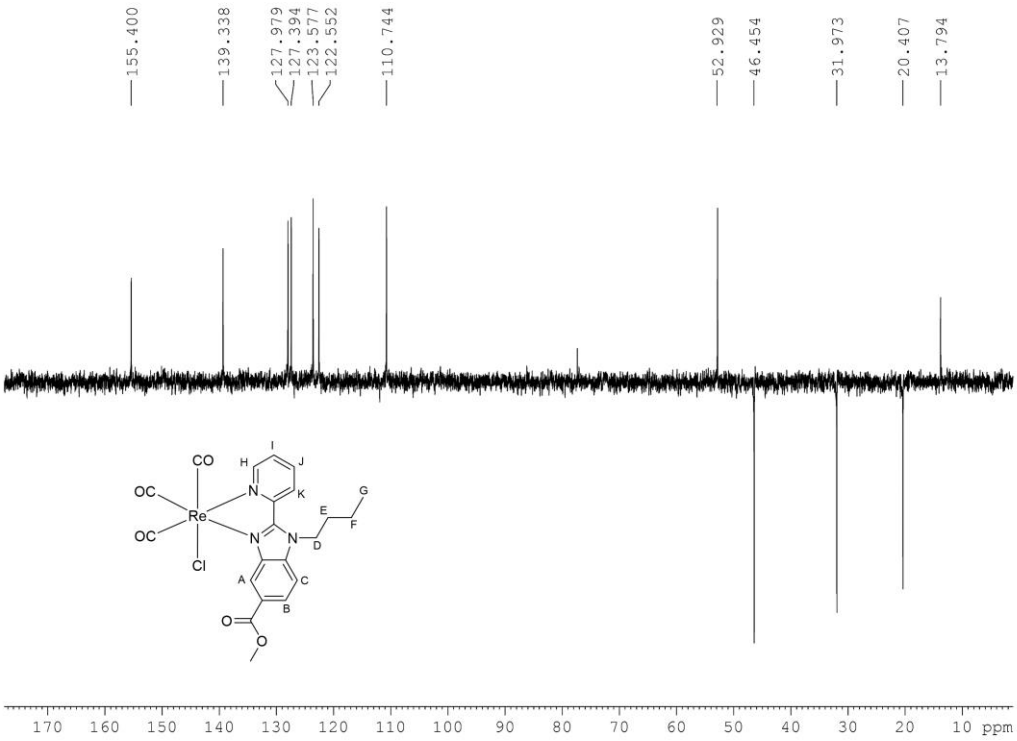


Figura A2.3. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **4** en $CDCl_3$.

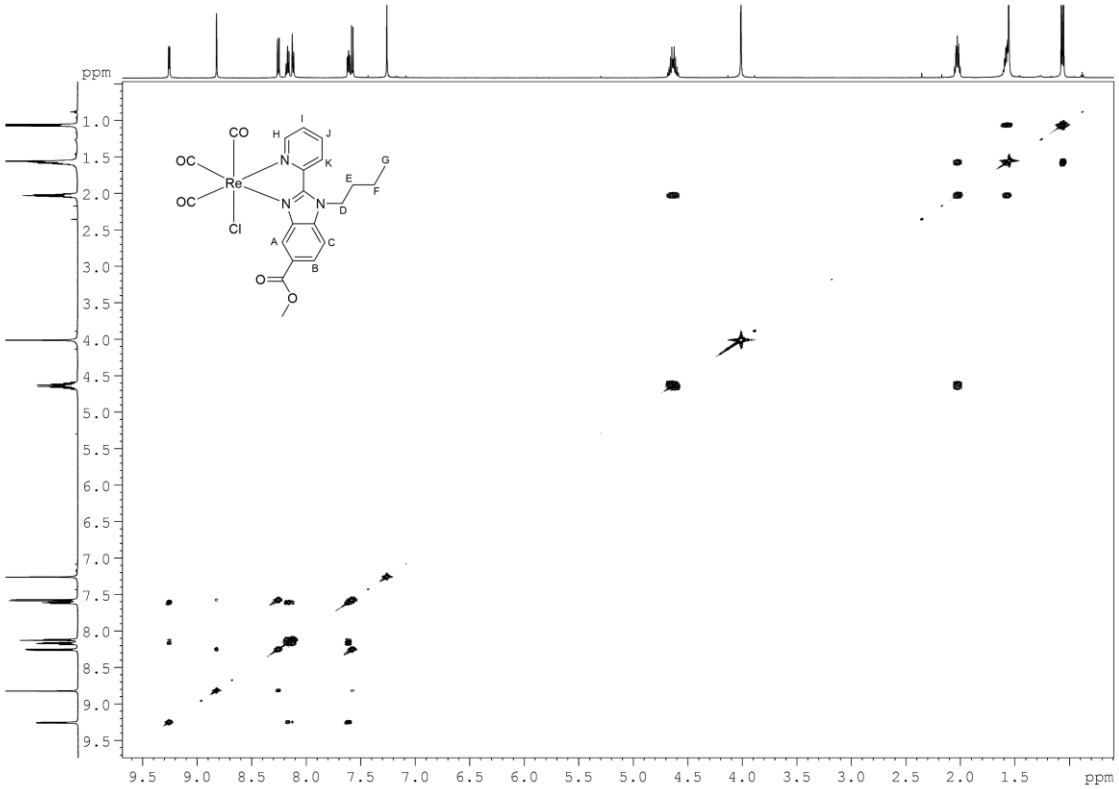


Figura A2.4. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **4** en $CDCl_3$.

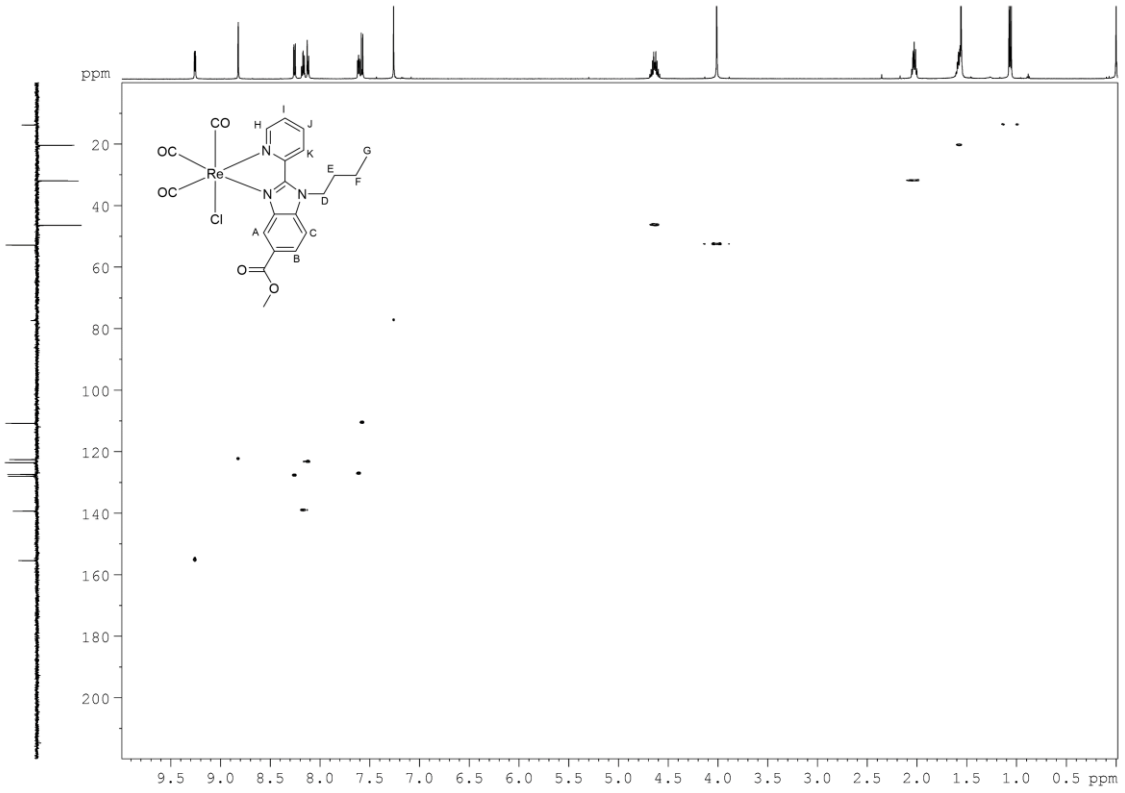


Figura A2.5. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **4** en $CDCl_3$.

1.2. Compuesto 5

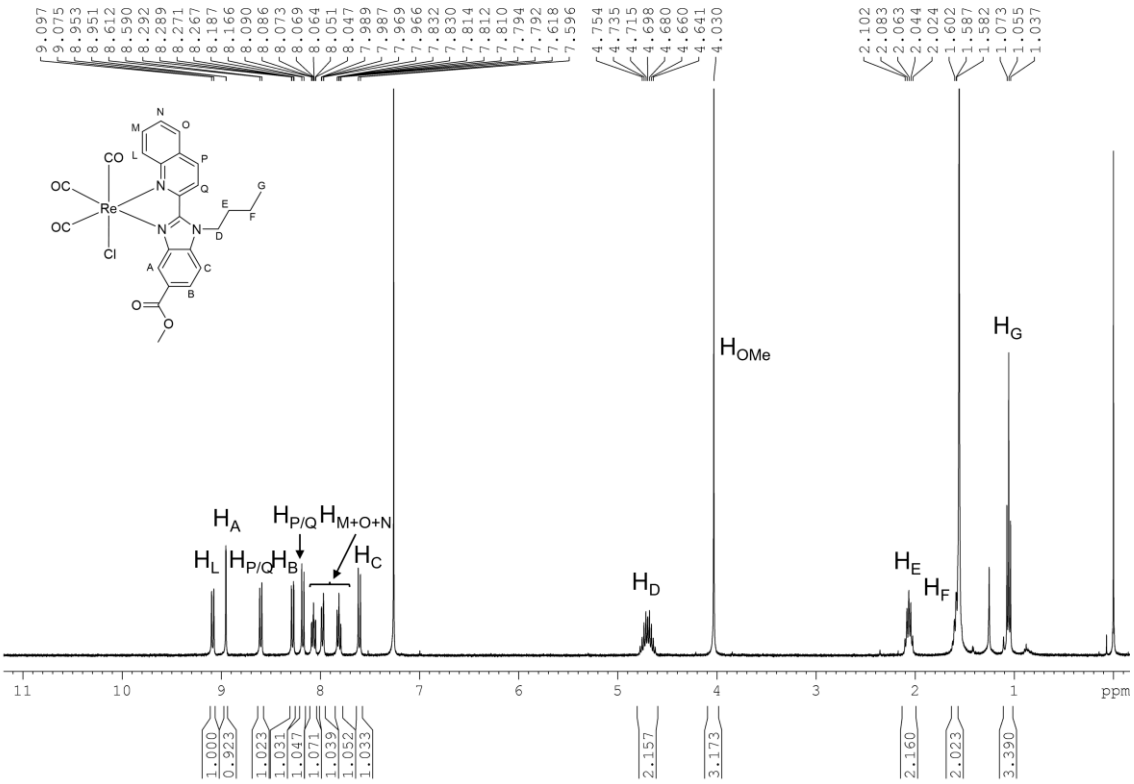


Figura A2.6. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **5** en $CDCl_3$.

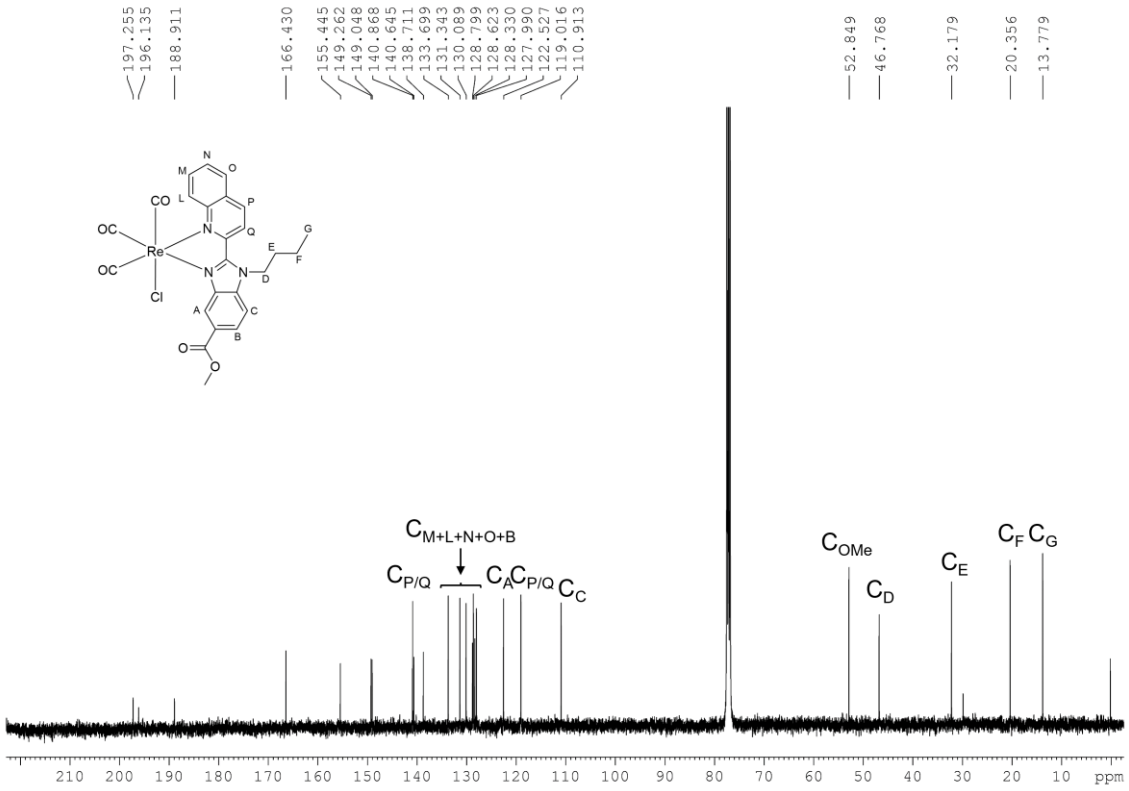


Figura A2.7. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **5** en $CDCl_3$.

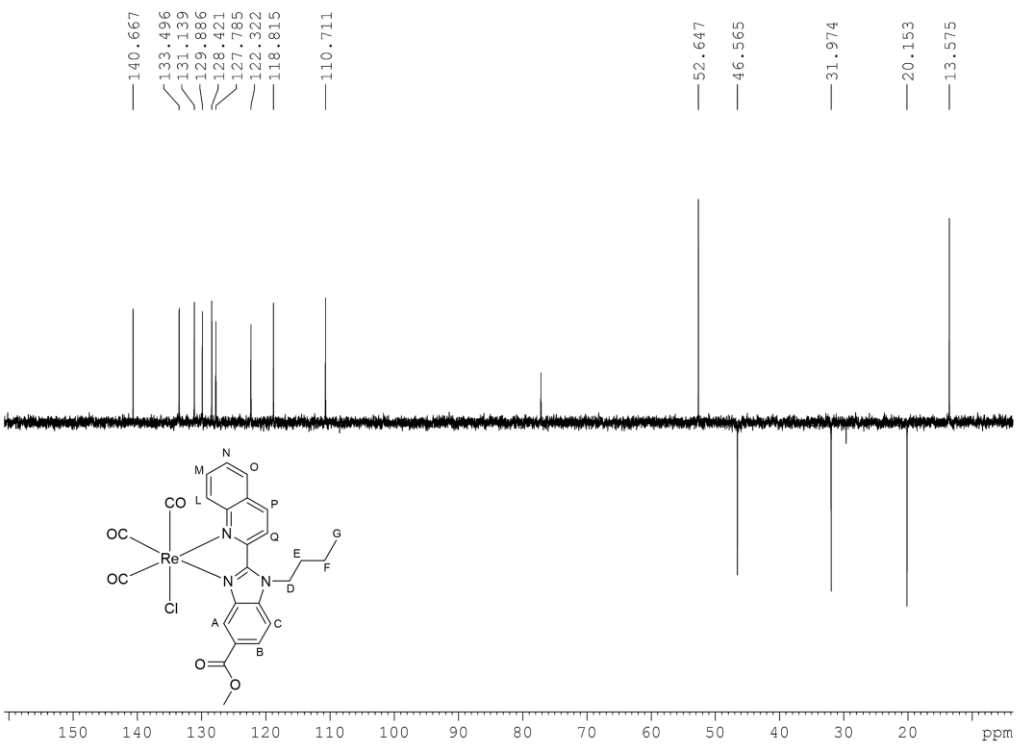


Figura A2.8. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **5** en $CDCl_3$.

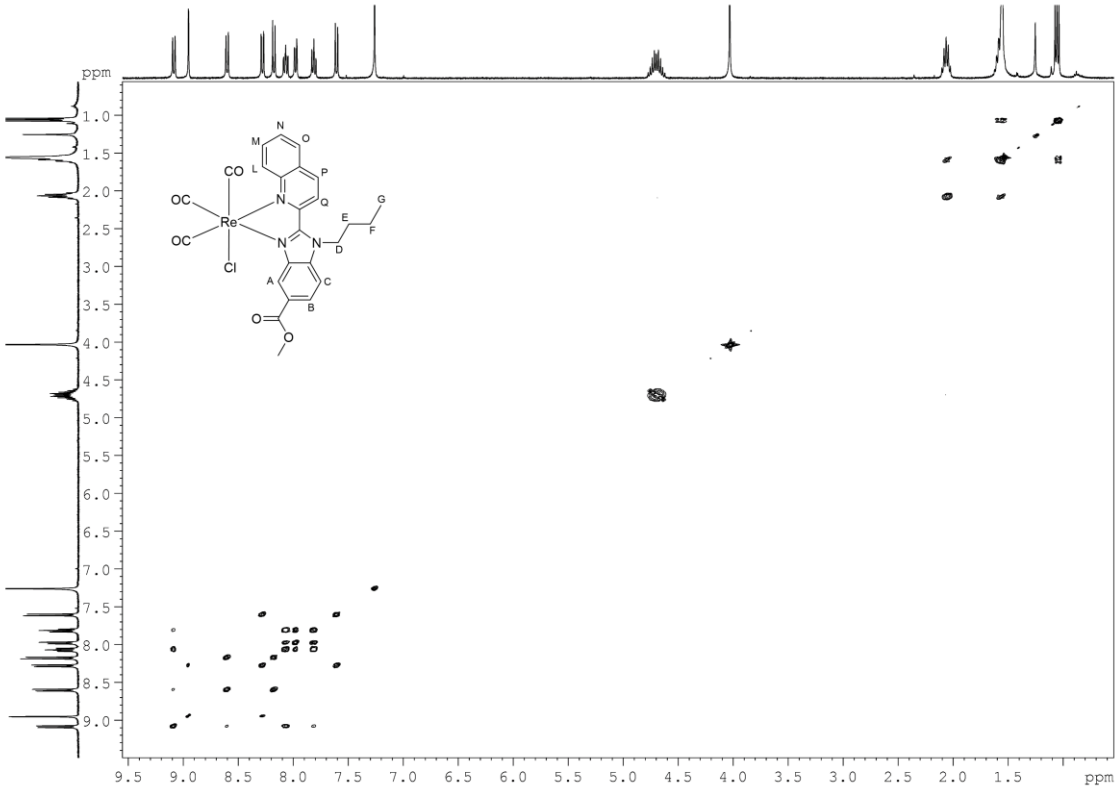


Figura A2.9. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **5** en $CDCl_3$.

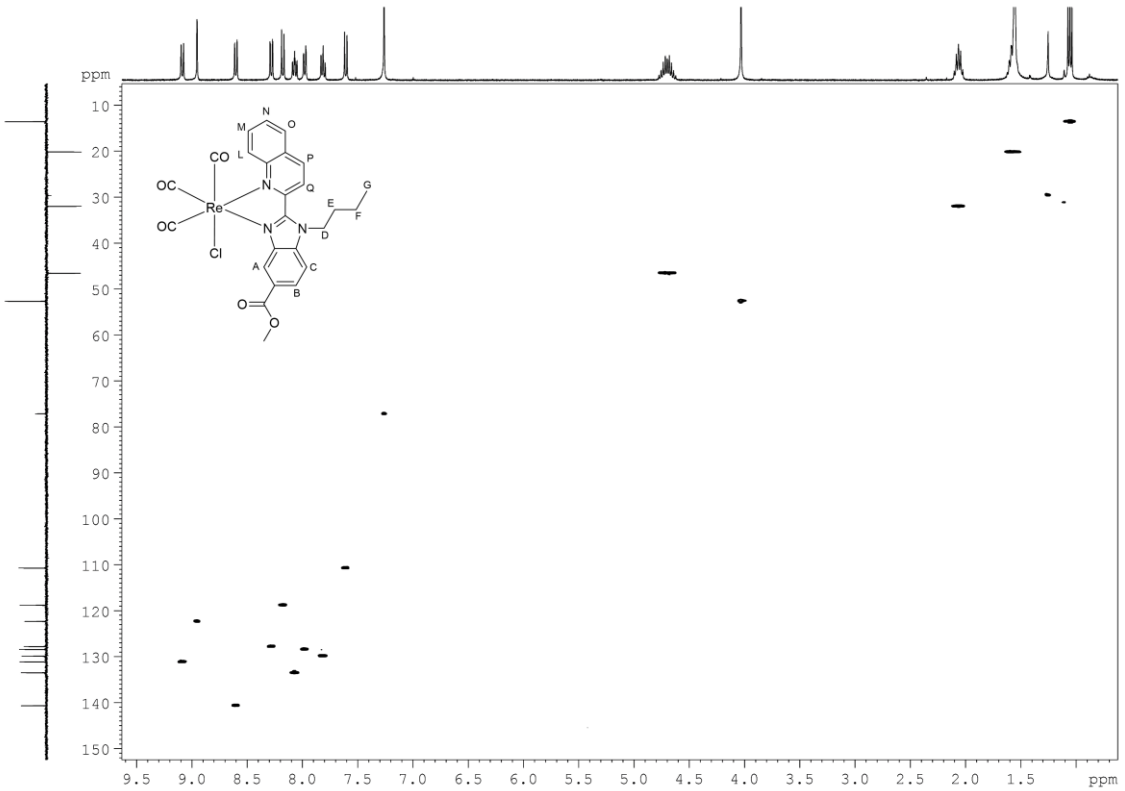


Figura A2.10. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **5** en $CDCl_3$.

1.3. Compuesto 6

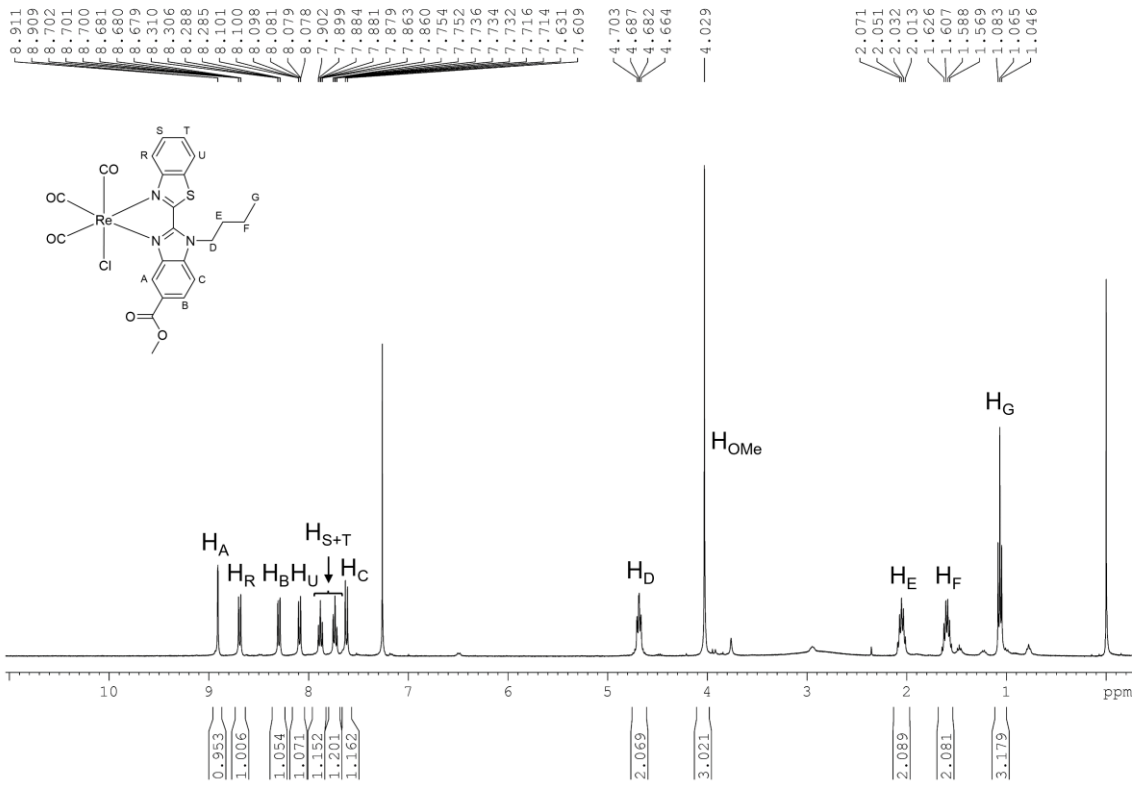


Figura A2.11. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **6** en $CDCl_3$.

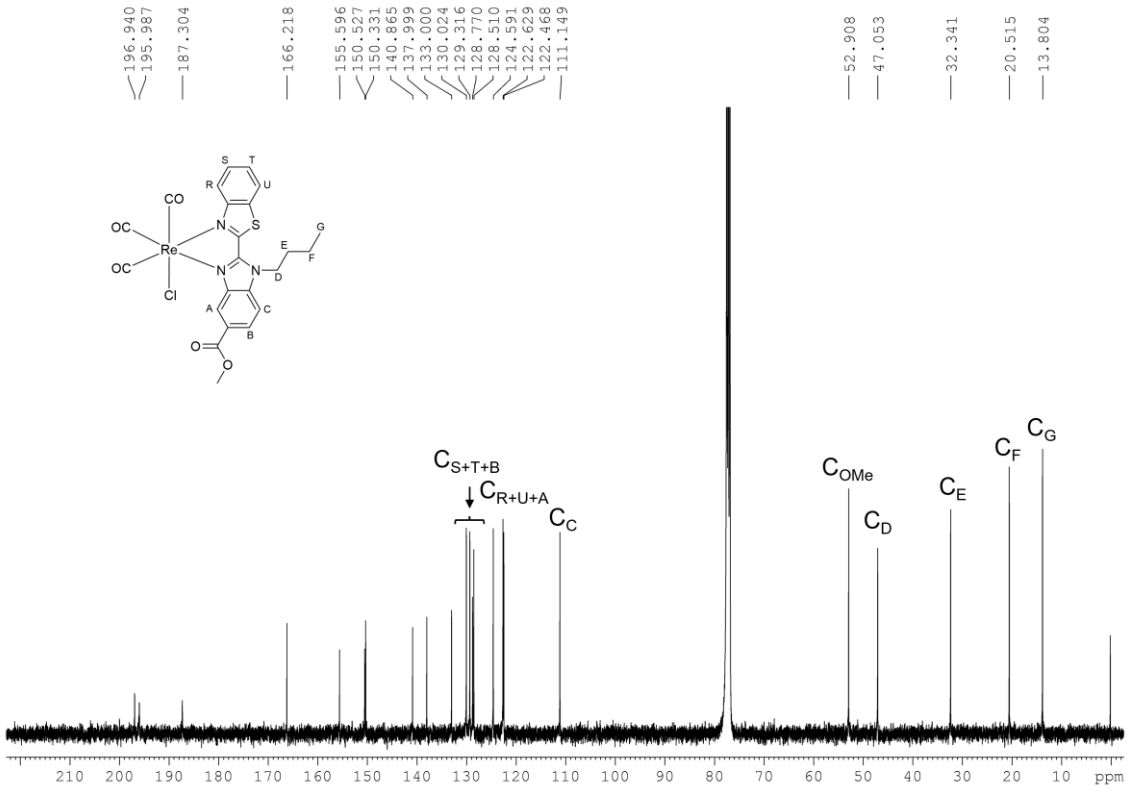


Figura A2.12. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **6** en $CDCl_3$.

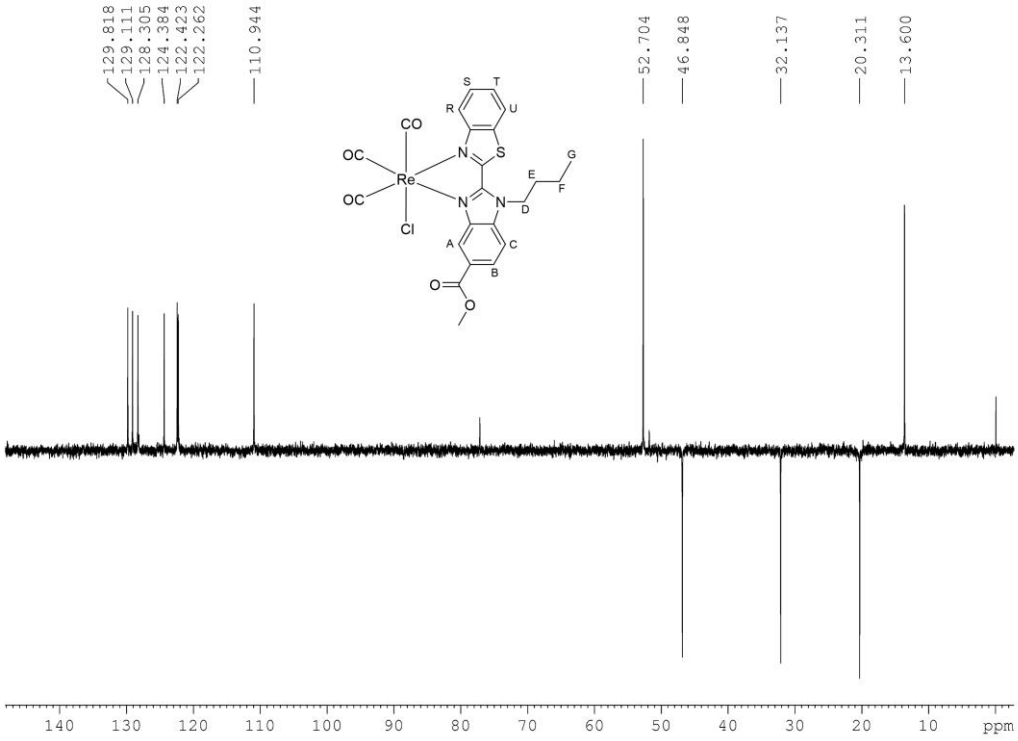


Figura A2.13. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **6** en $CDCl_3$.

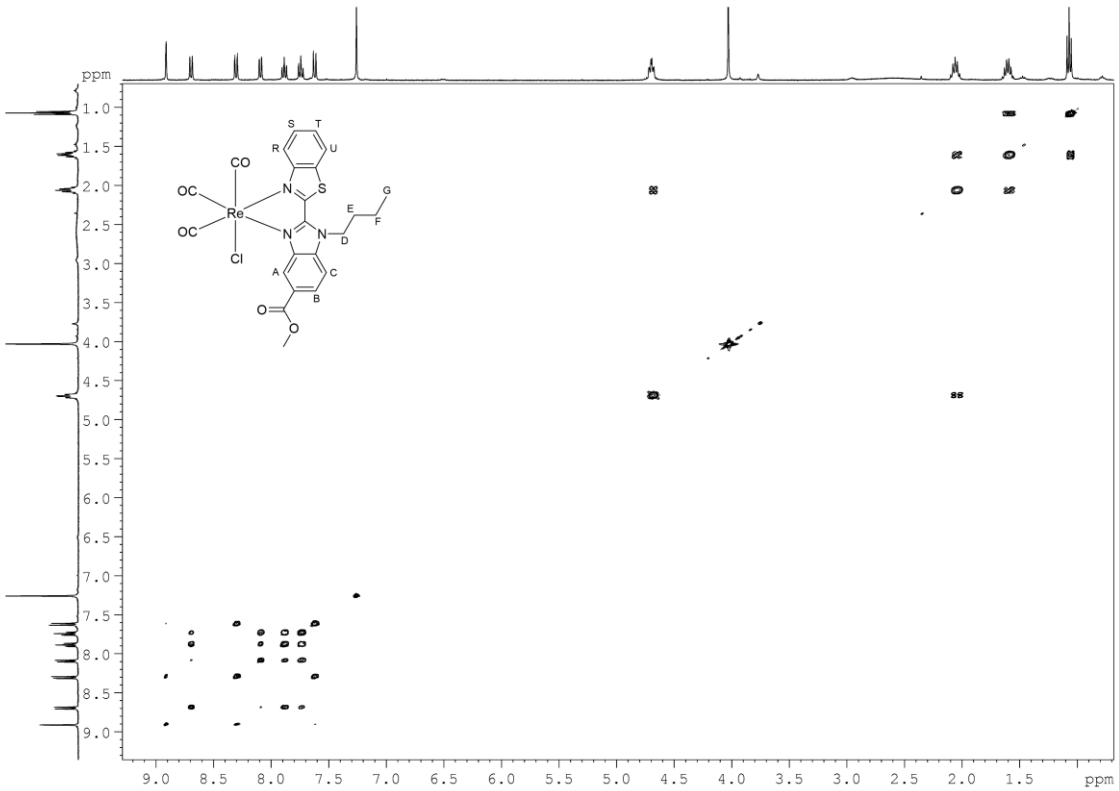


Figura A2.14. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **6** en $CDCl_3$.

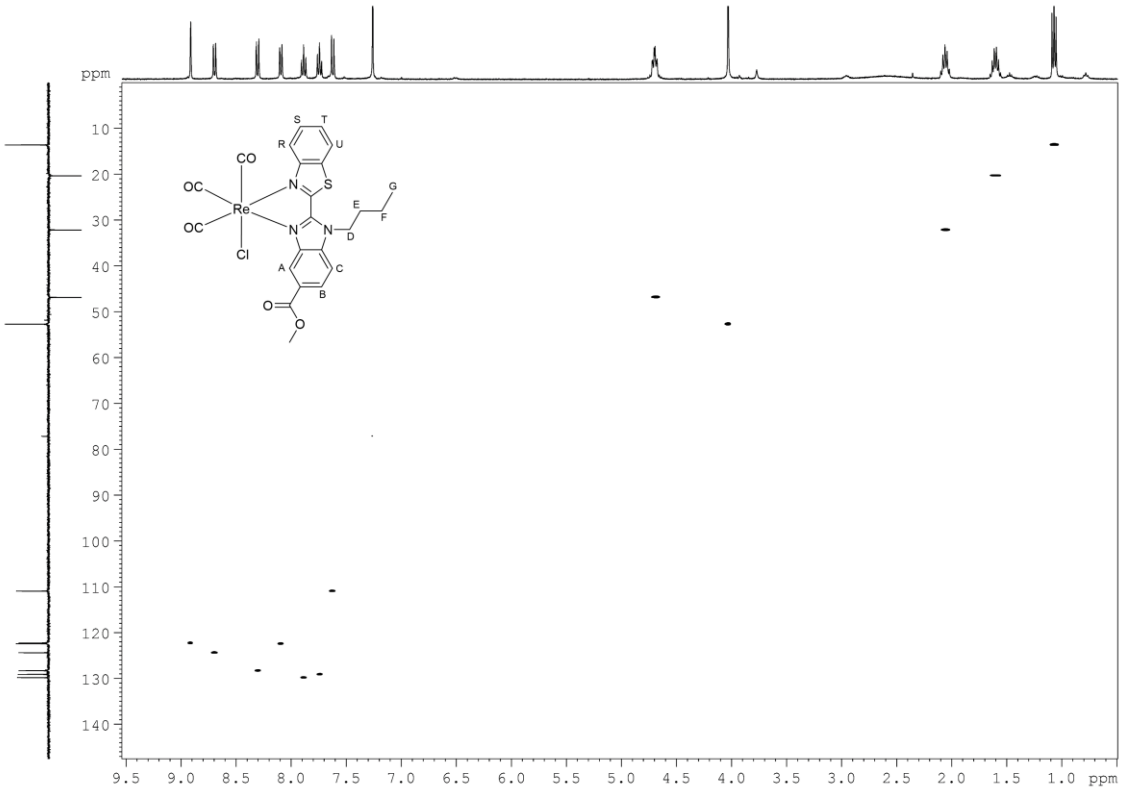


Figura A2.15. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **6** en $CDCl_3$.

1.4. Compuesto 7

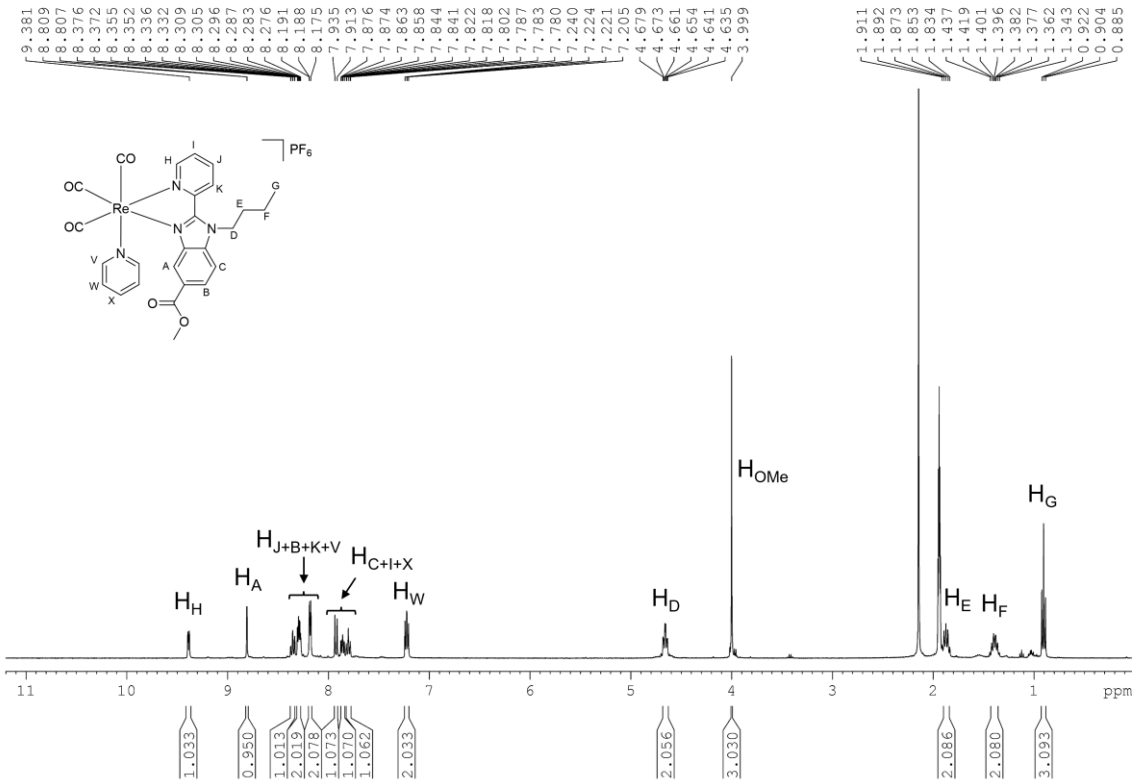


Figura A2.16. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **7** en CD_3CN.

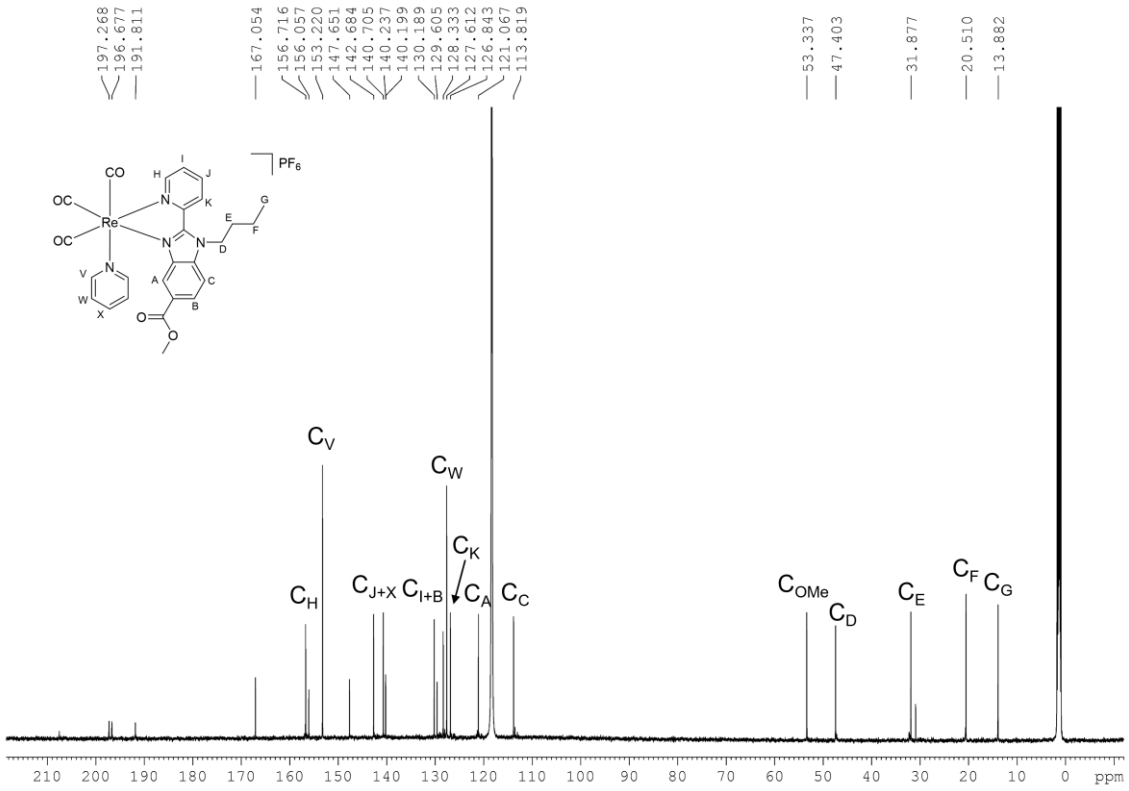


Figura A2.17. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **7** en CD_3CN.

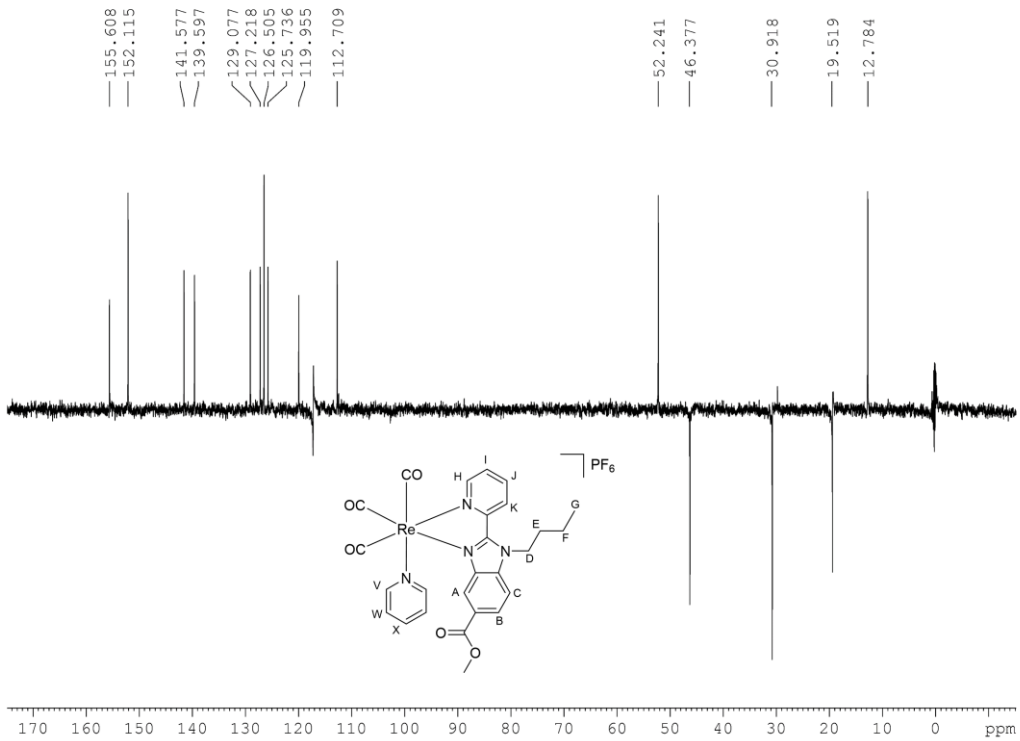


Figura A2.18. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **7** en CD_3CN.

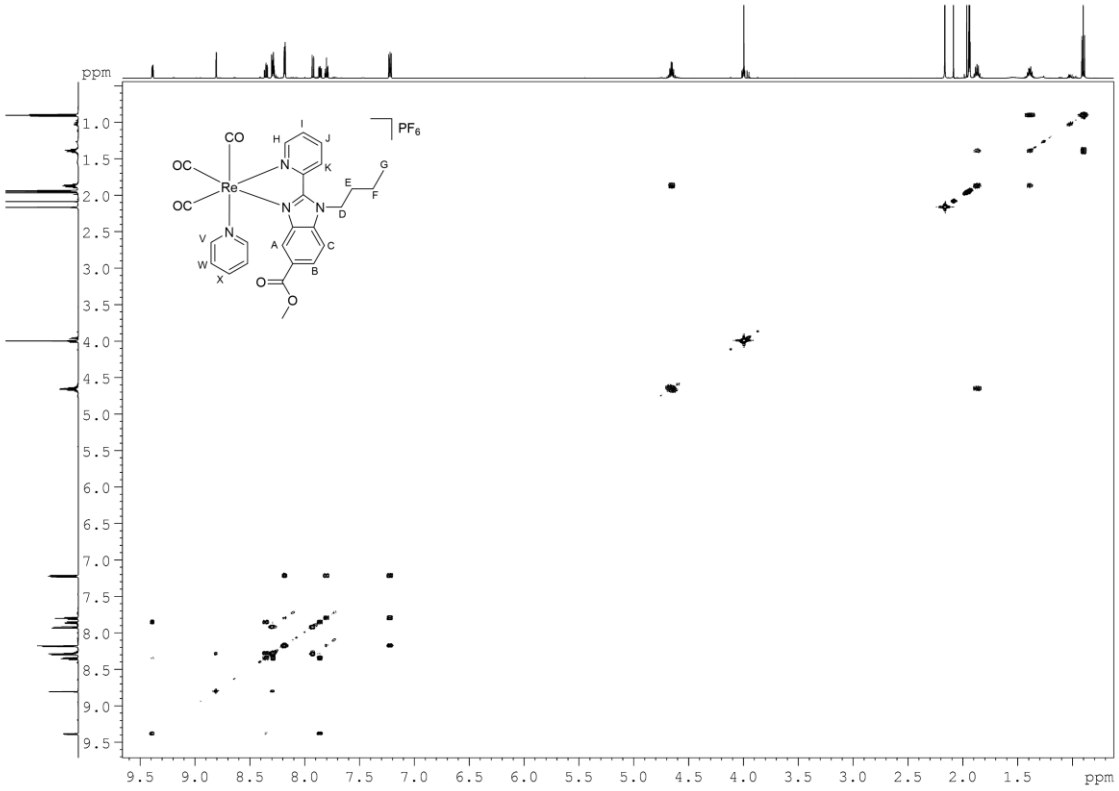


Figura A2.19. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **7** en CD_3CN.

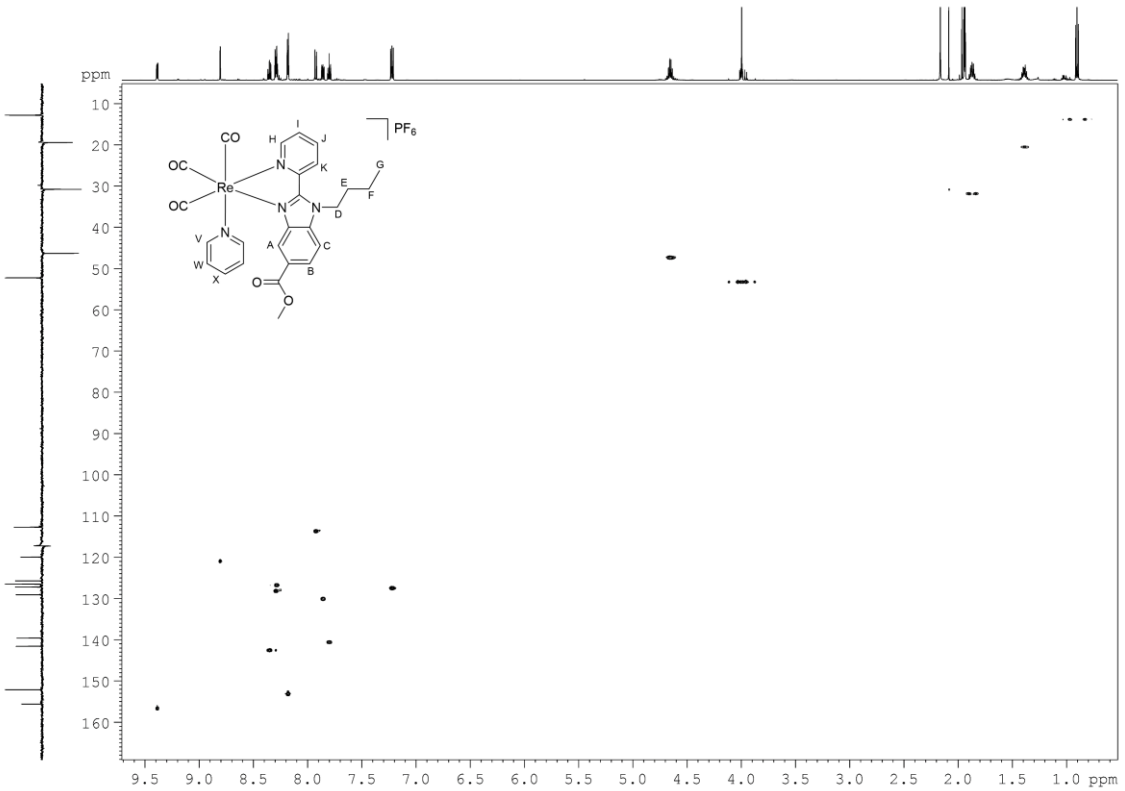


Figura A2.20. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **7** en CD_3CN.

1.5. Compuesto 8

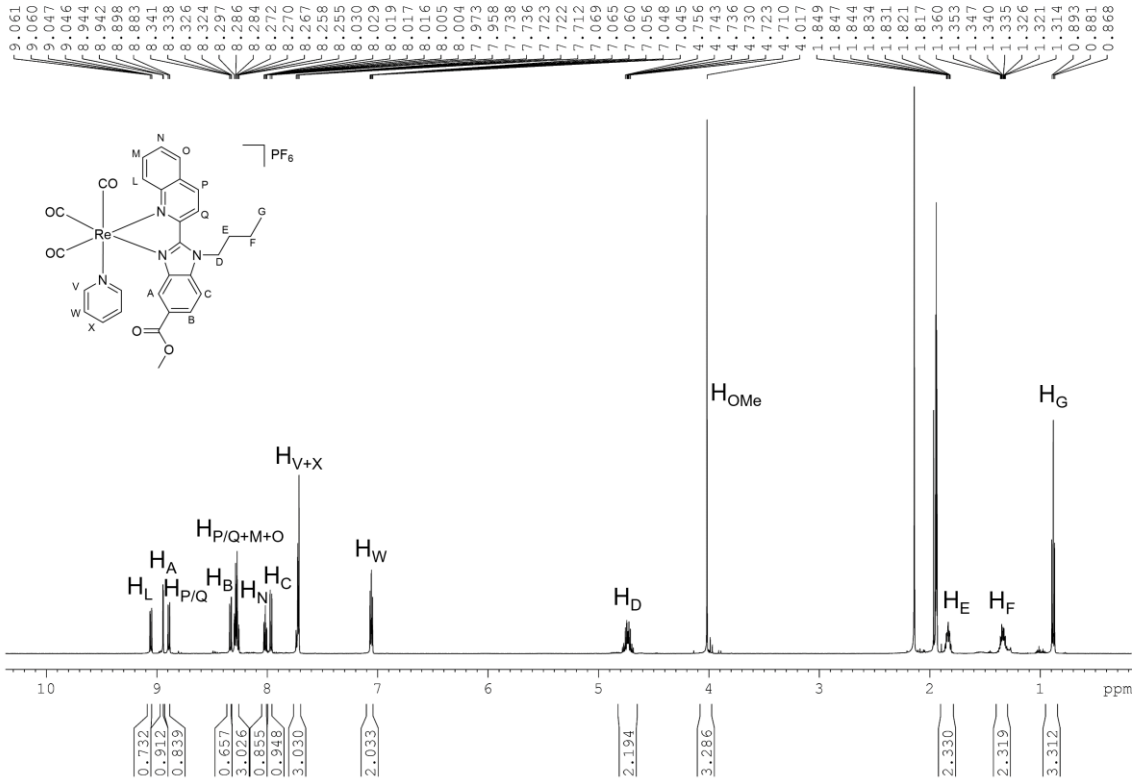


Figura A2.21. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **8** en CD_3CN.

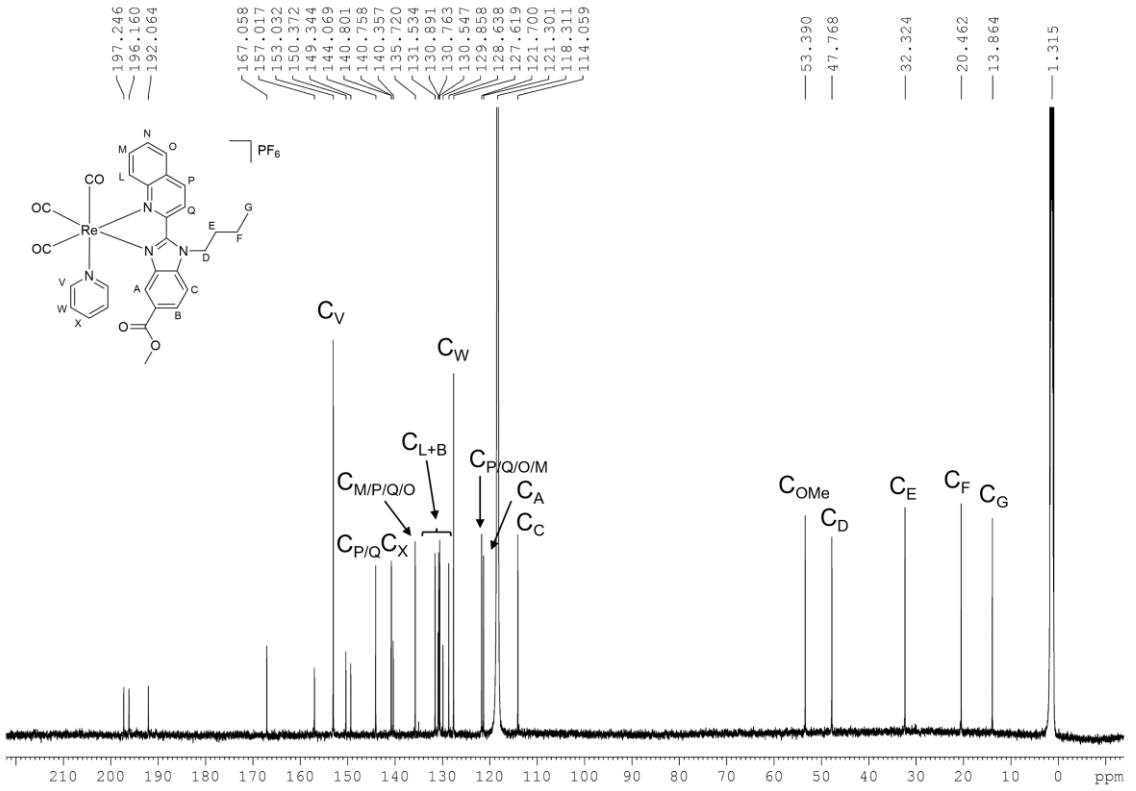


Figura A2.22. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **8** en CD_3CN.

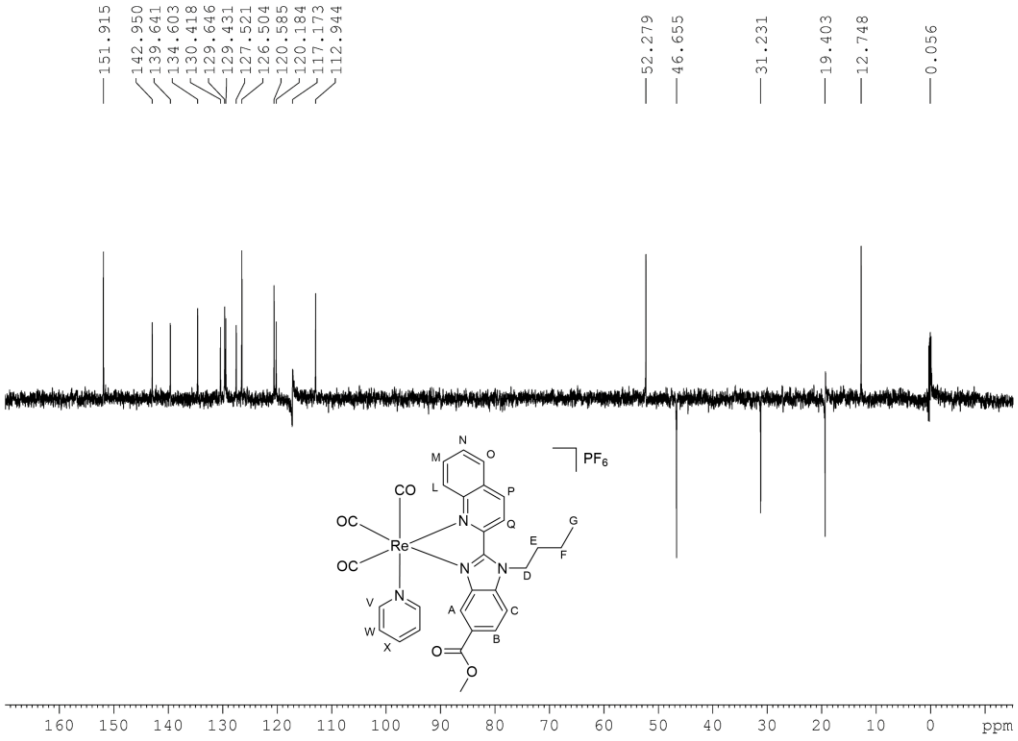


Figura A2.23. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **8** en CD_3CN.

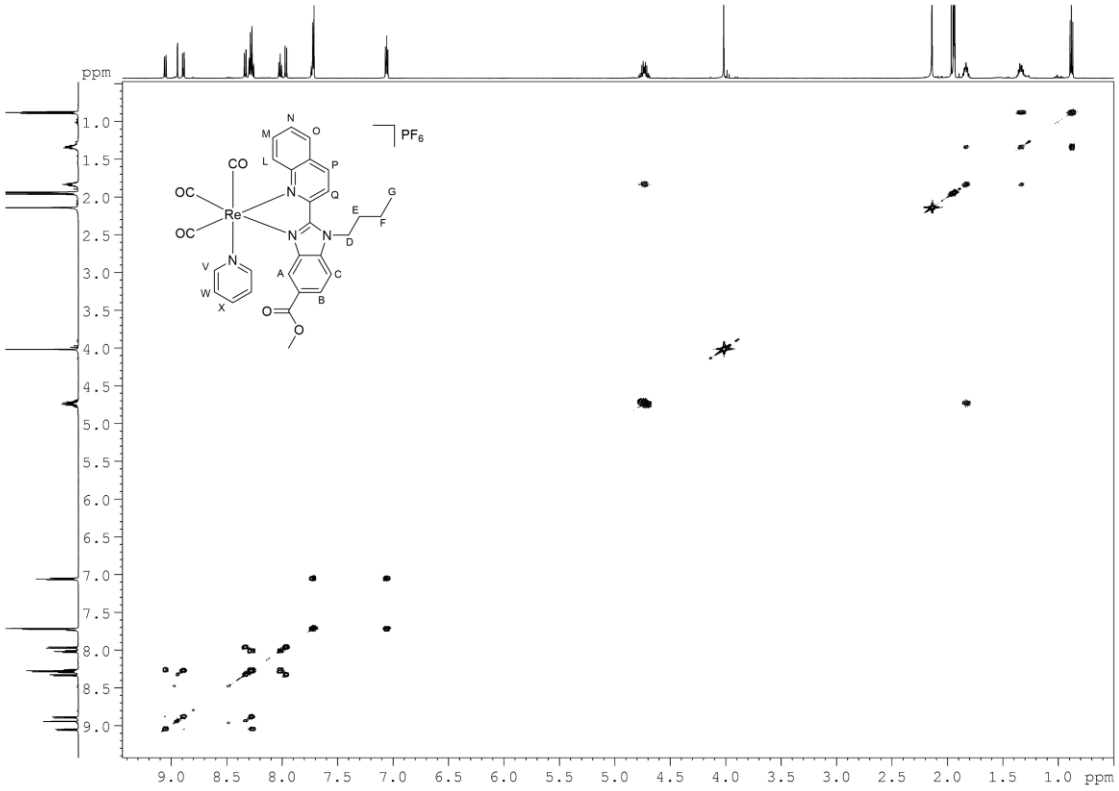


Figura A2.24. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **8** en CD_3CN.

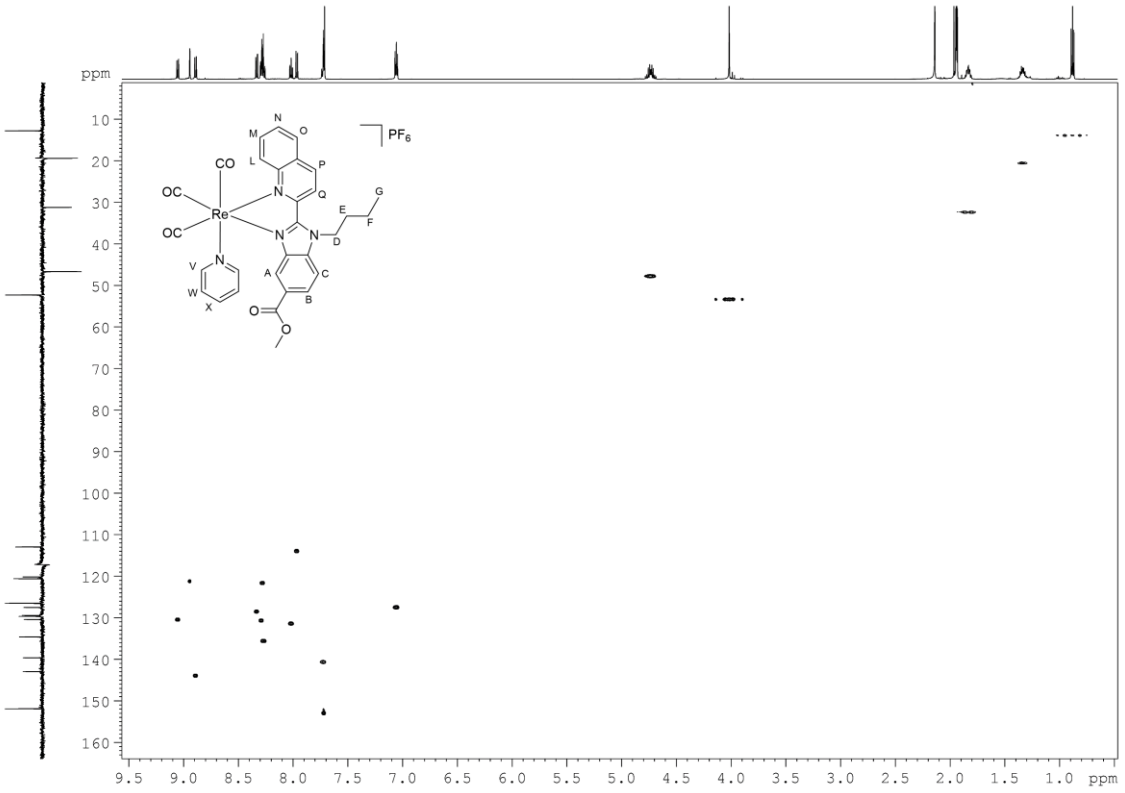


Figura A2.25. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **8** en CD_3CN.

1.6. Compuesto 9

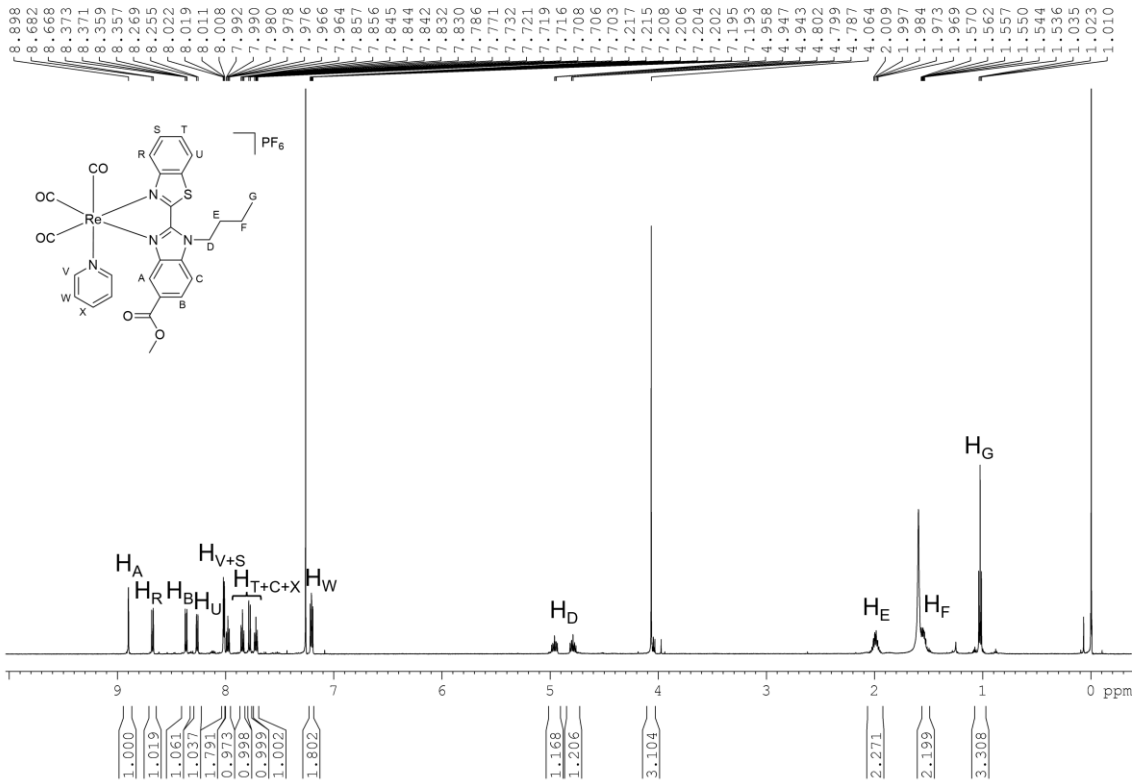


Figura A2.26. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **9** en $CDCl_3$.

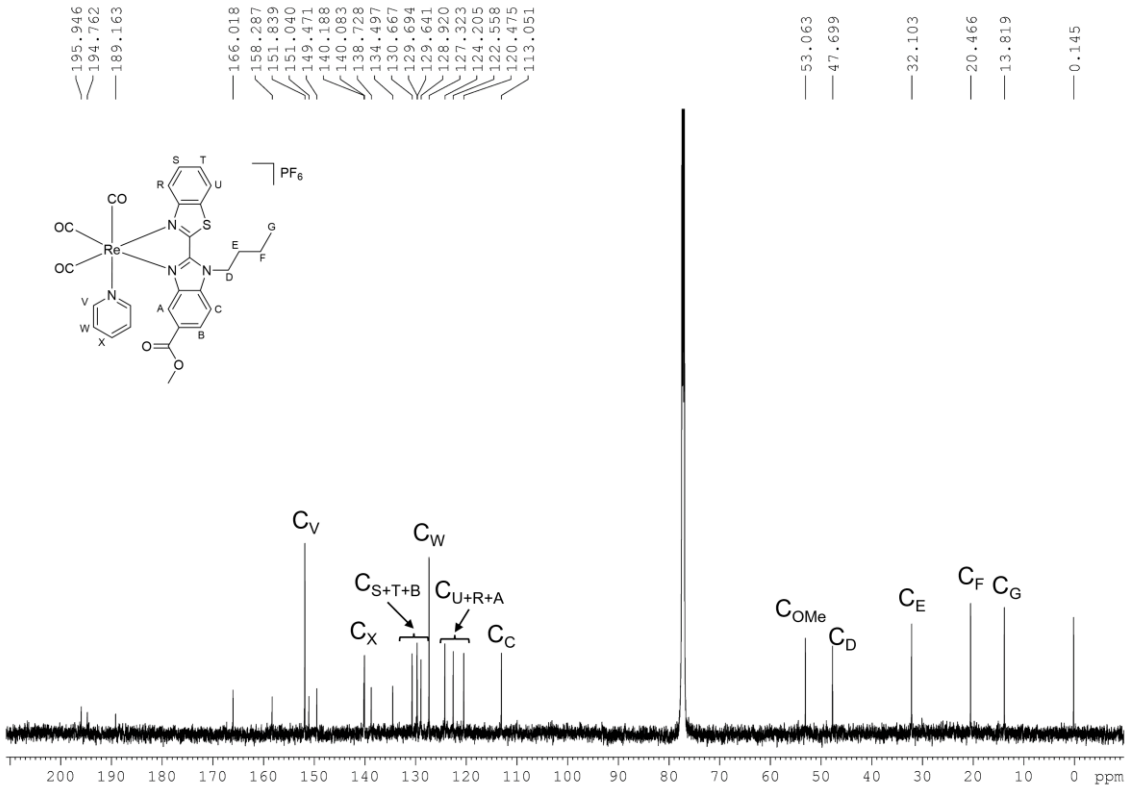


Figura A2.27. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **9** en $CDCl_3$.

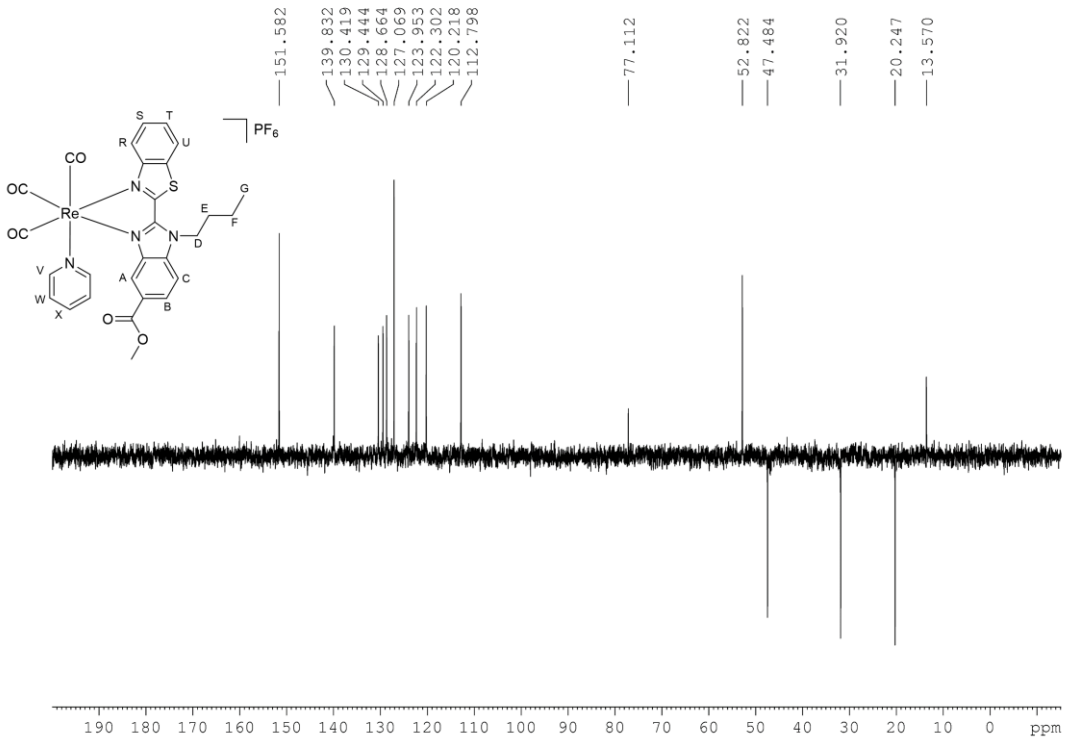


Figura A2.28. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **9** en $CDCl_3$.

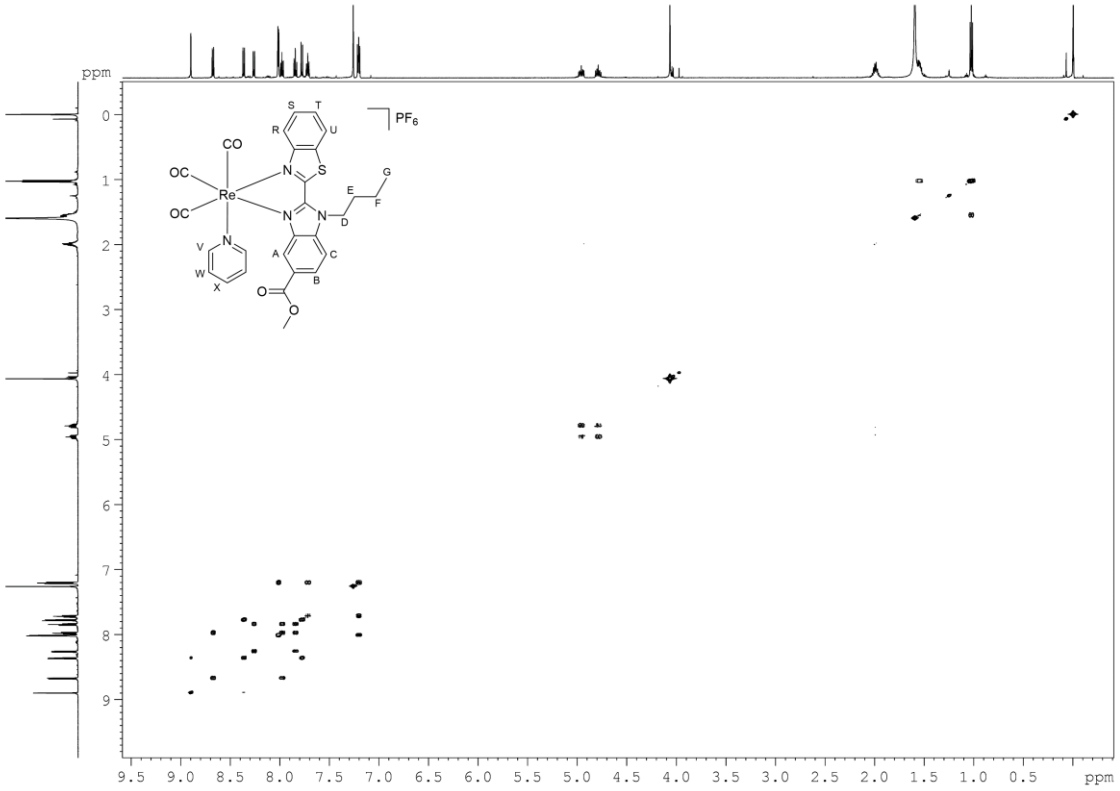


Figura A2.29. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **9** en $CDCl_3$.

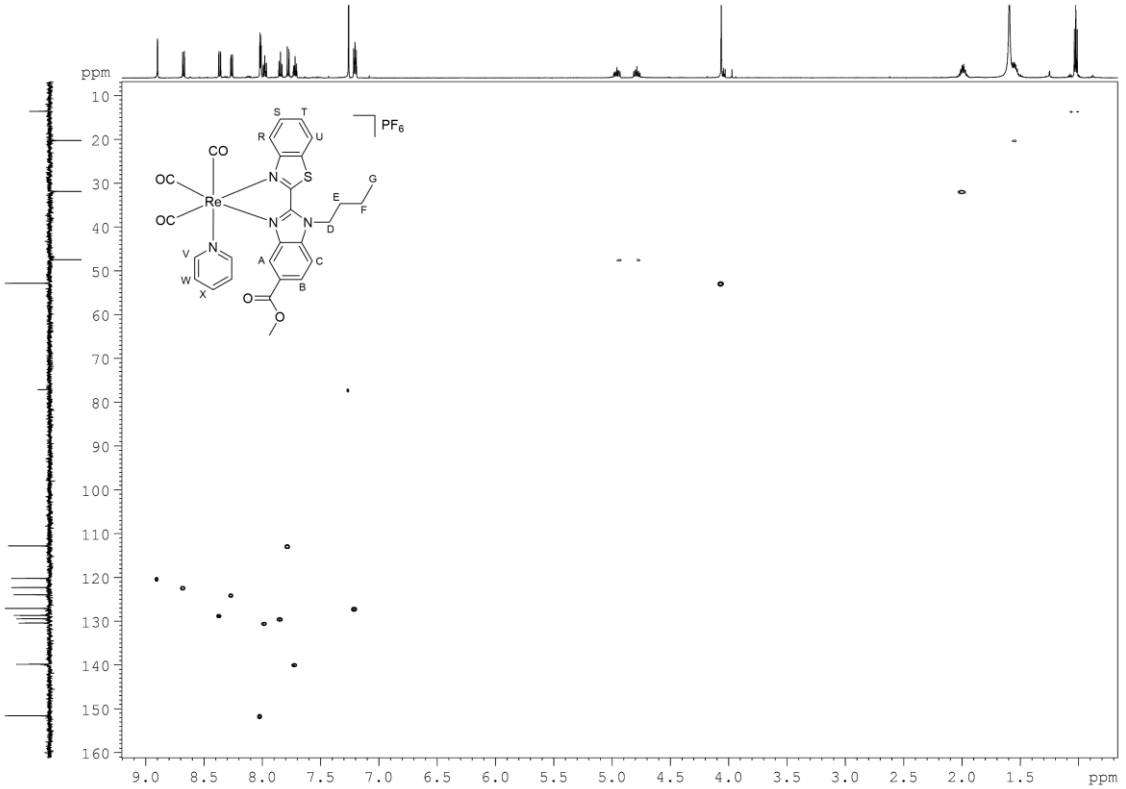


Figura A2.30. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **9** en $CDCl_3$.

1.7. Compuesto 10

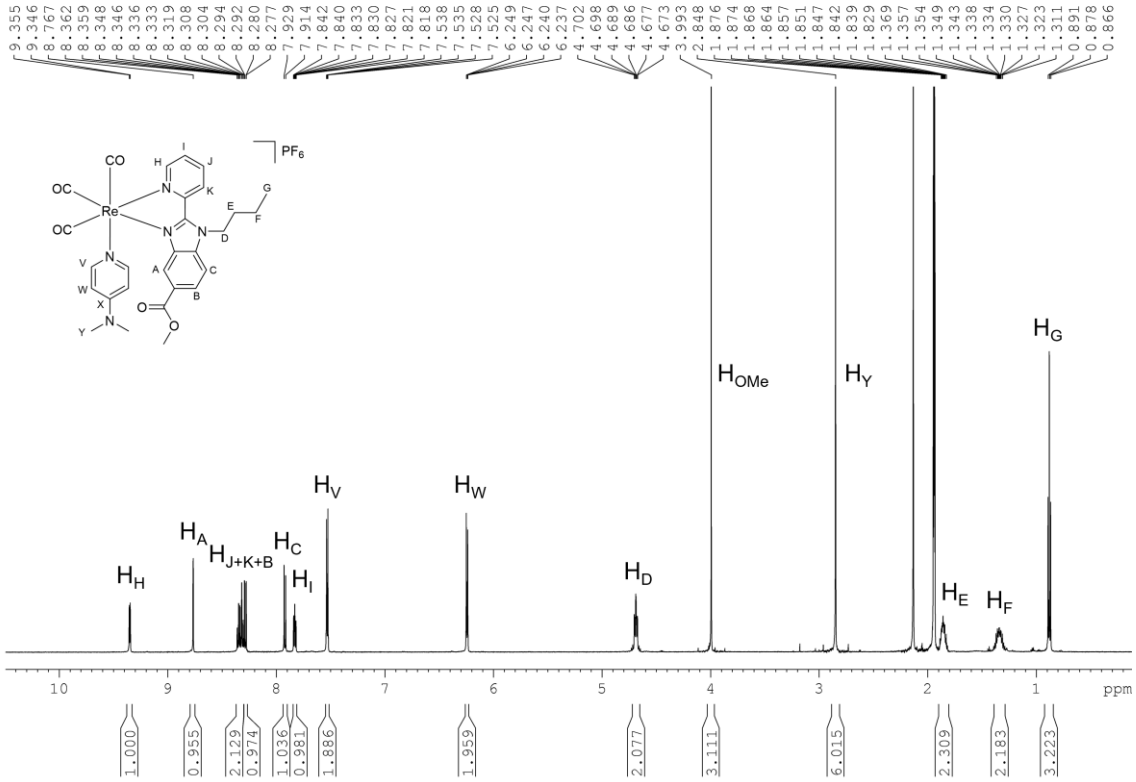


Figura A2.31. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **10** en CD_3CN.

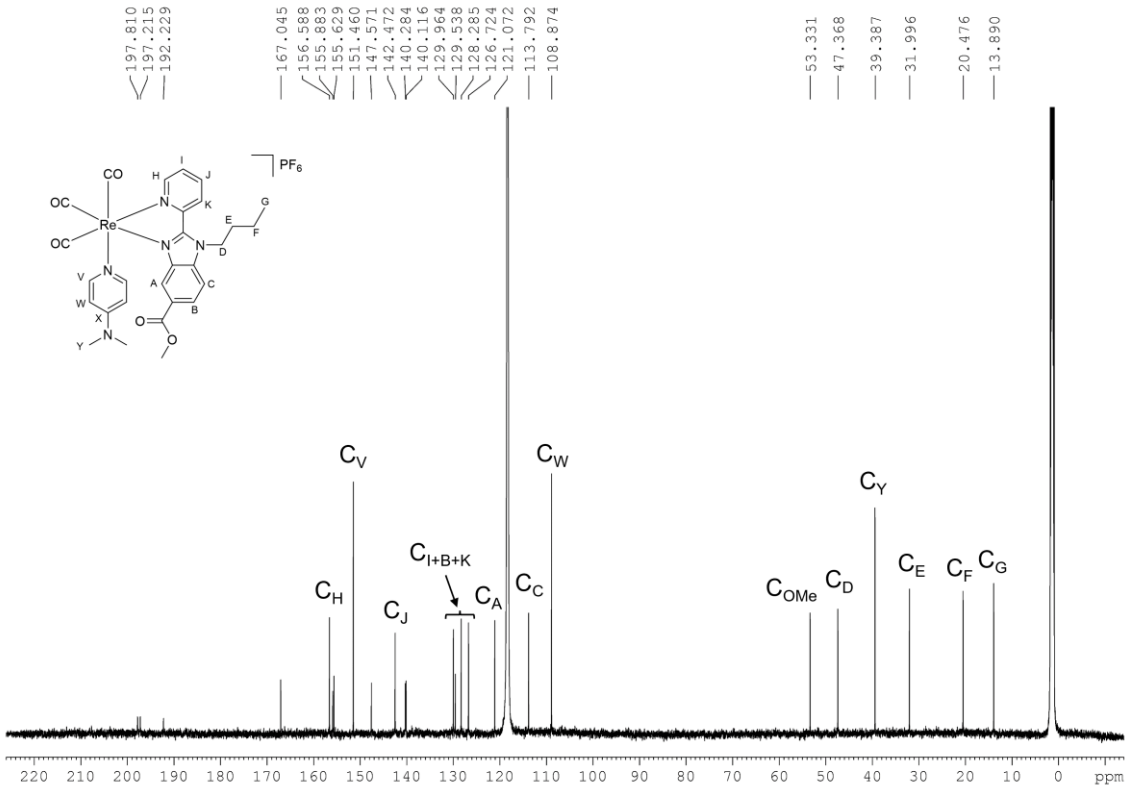


Figura A2.32. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **10** en CD_3CN.

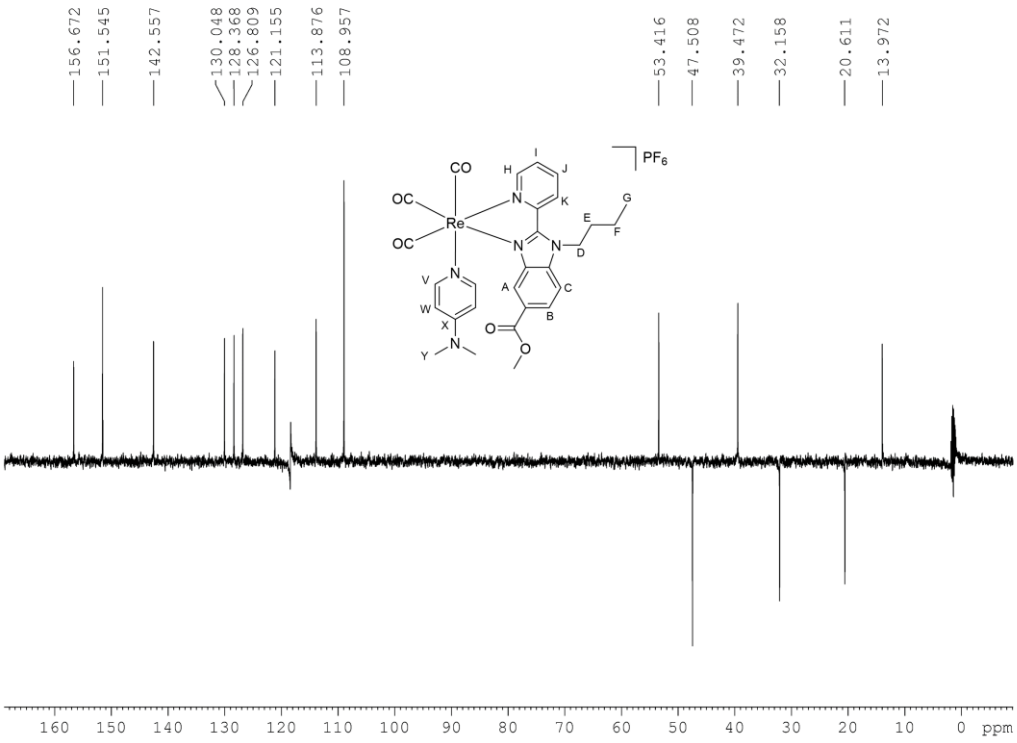


Figura A2.33. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **10** en CD_3CN.

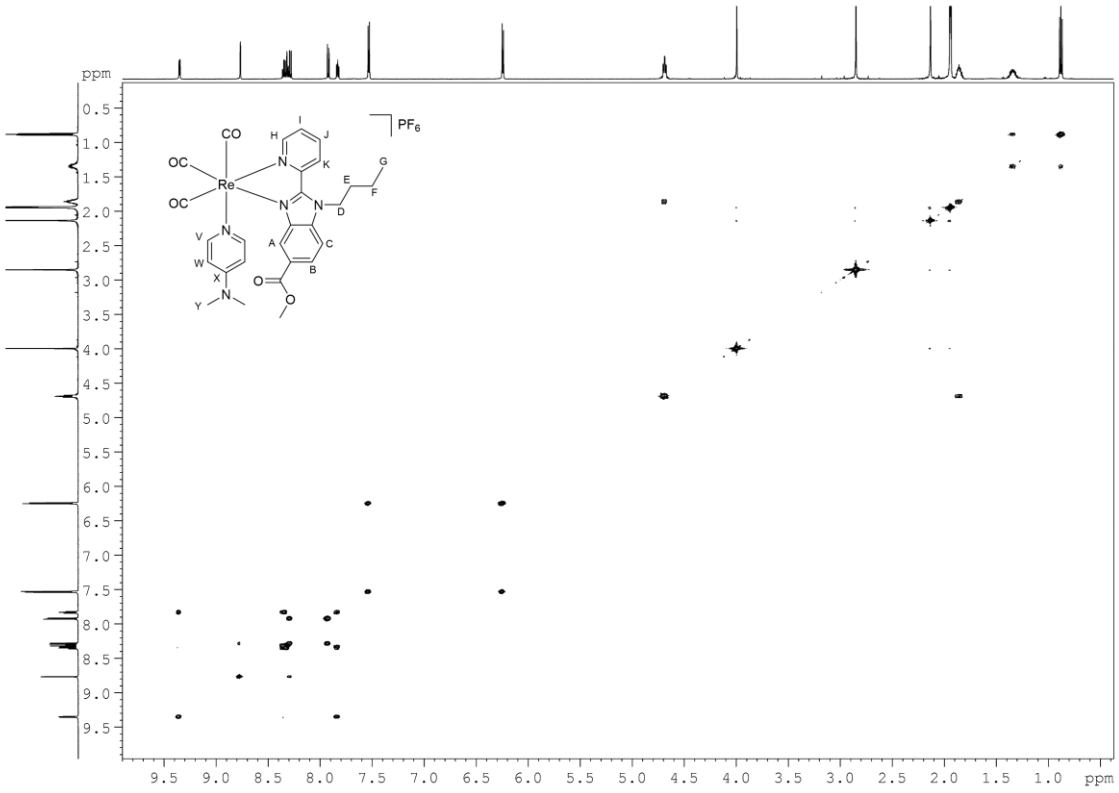


Figura A2.34. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 151 MHz del compuesto **10** en CD_3CN.

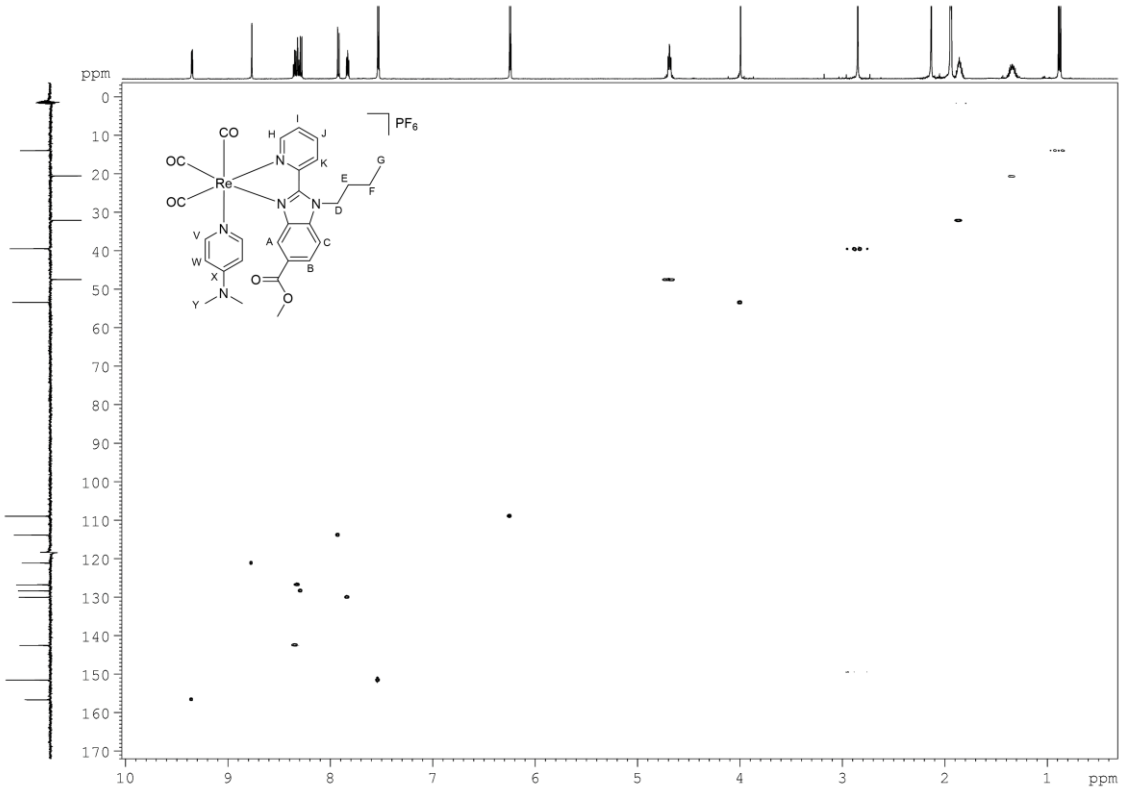


Figura A2.35. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **10** en CD_3CN.

1.8. Compuesto 11

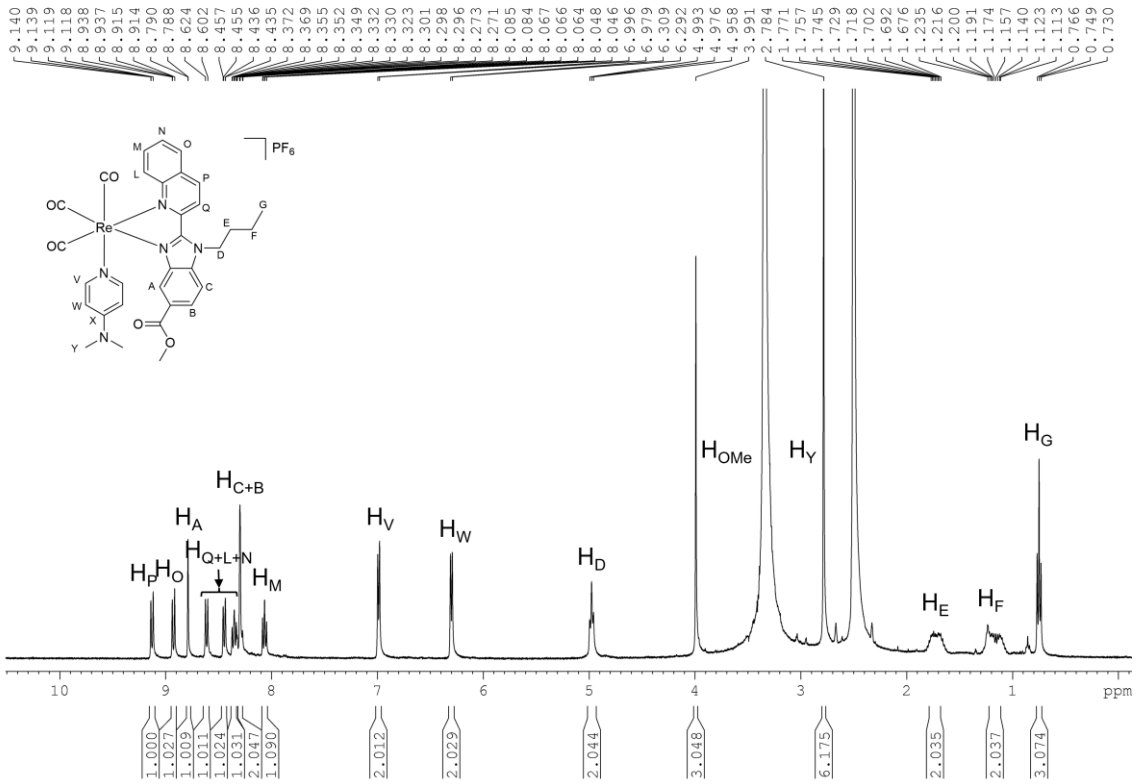


Figura A2.36. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **11** en DMSO-d_6.

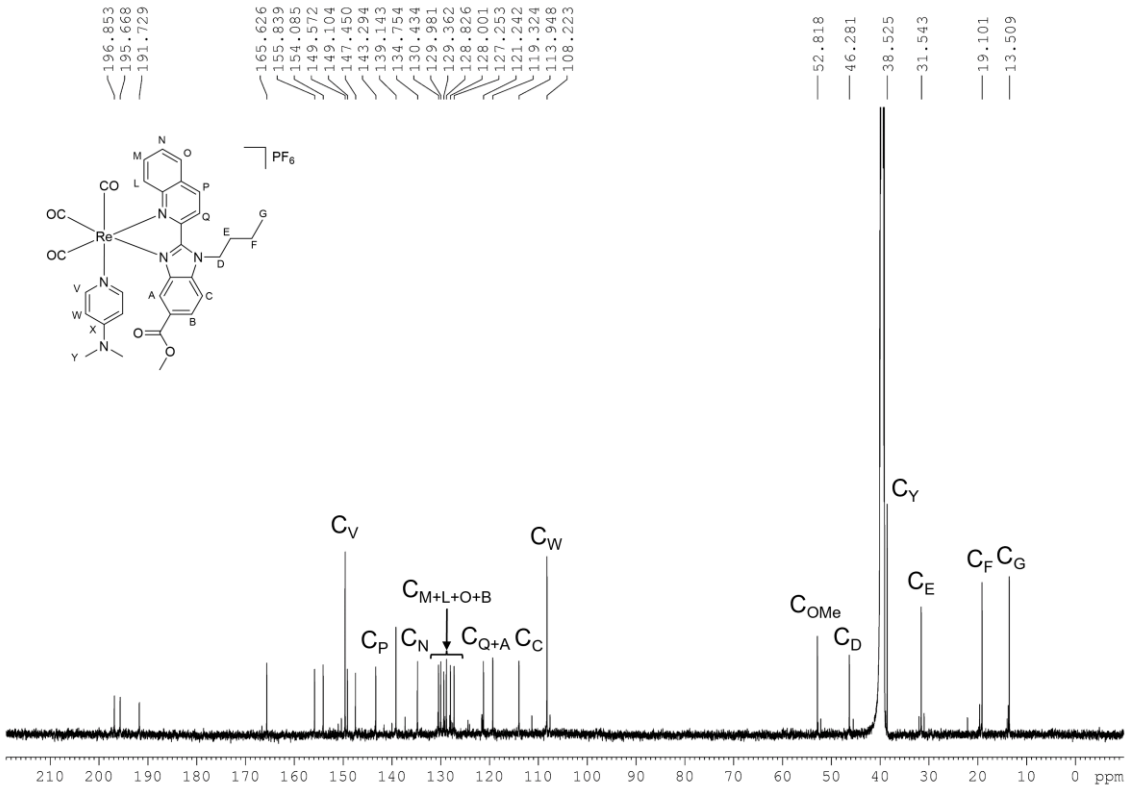


Figura A2.37. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **11** en DMSO-d_6.

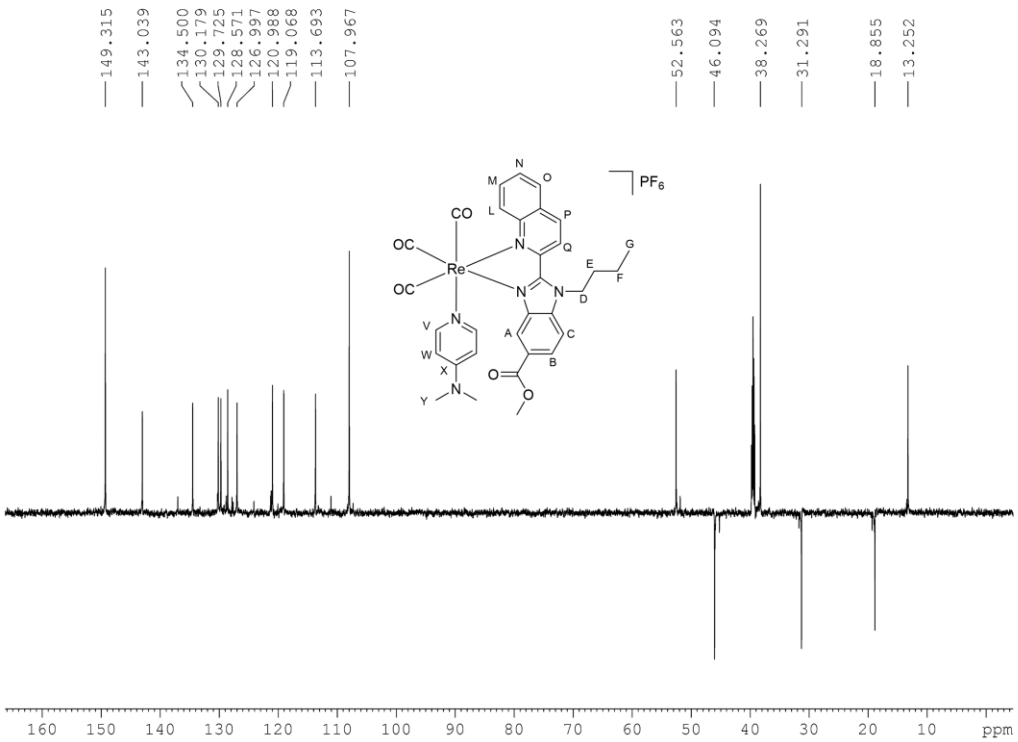


Figura A2.38. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **11** en DMSO-d_6.

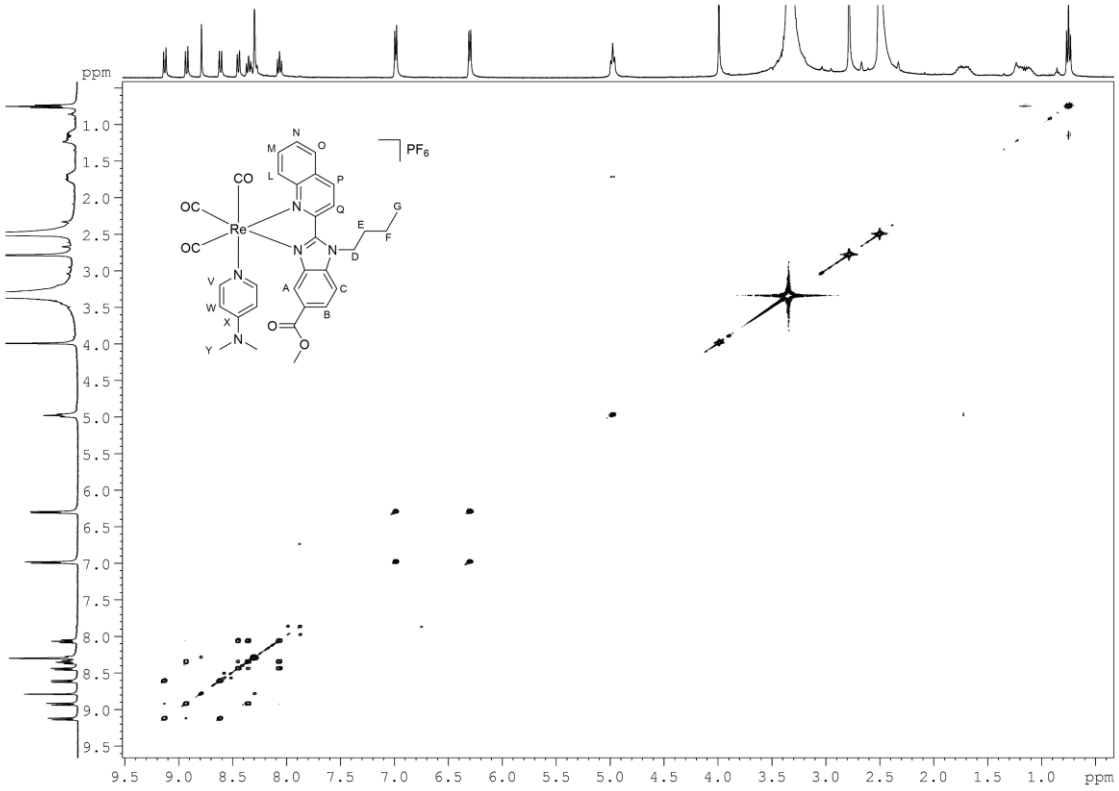


Figura A2.39. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **11** en DMSO-d_6.

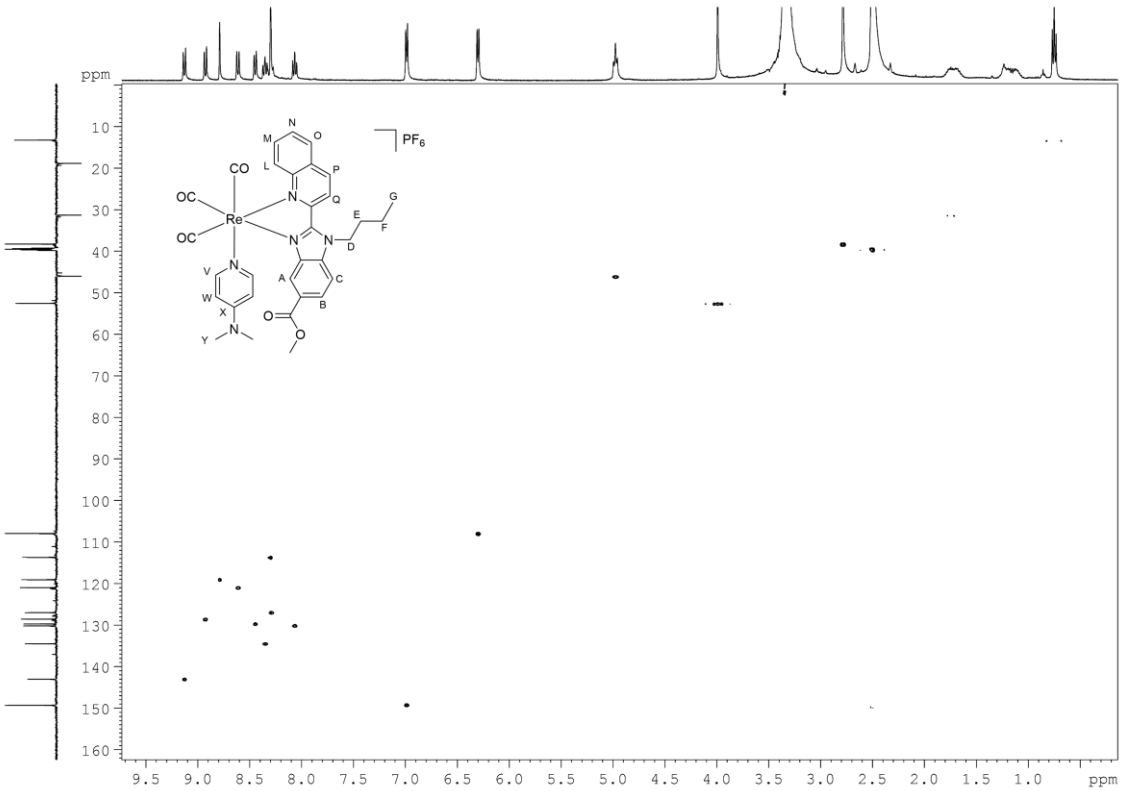


Figura A2.40. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **11** en DMSO-d_6.

1.9. Compuesto 12

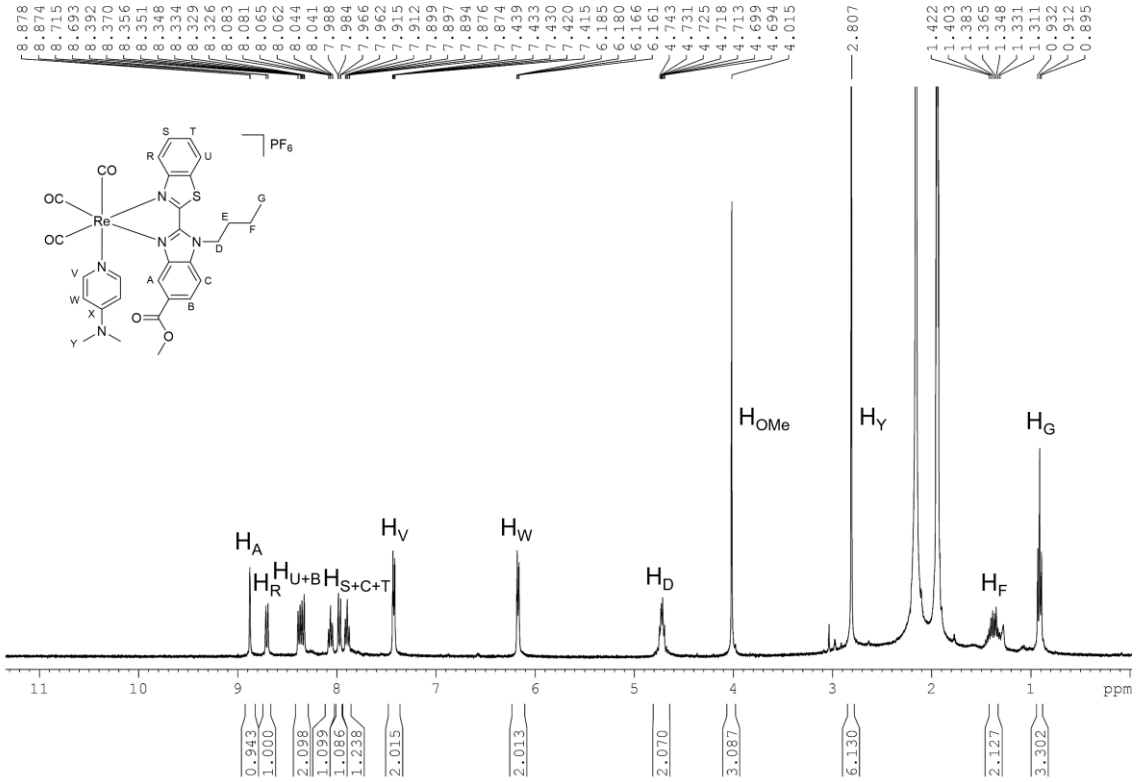


Figura A2.41. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **12** en CD_3CN.

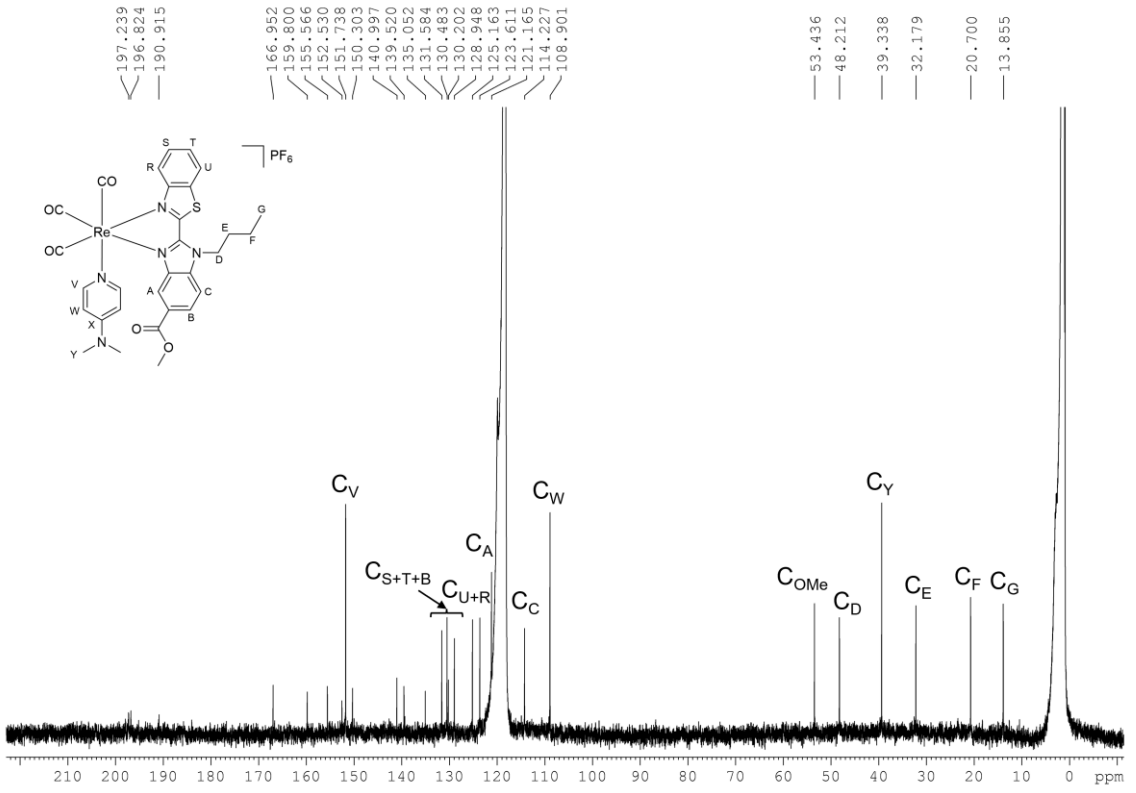


Figura A2.42. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **12** en CD_3CN.

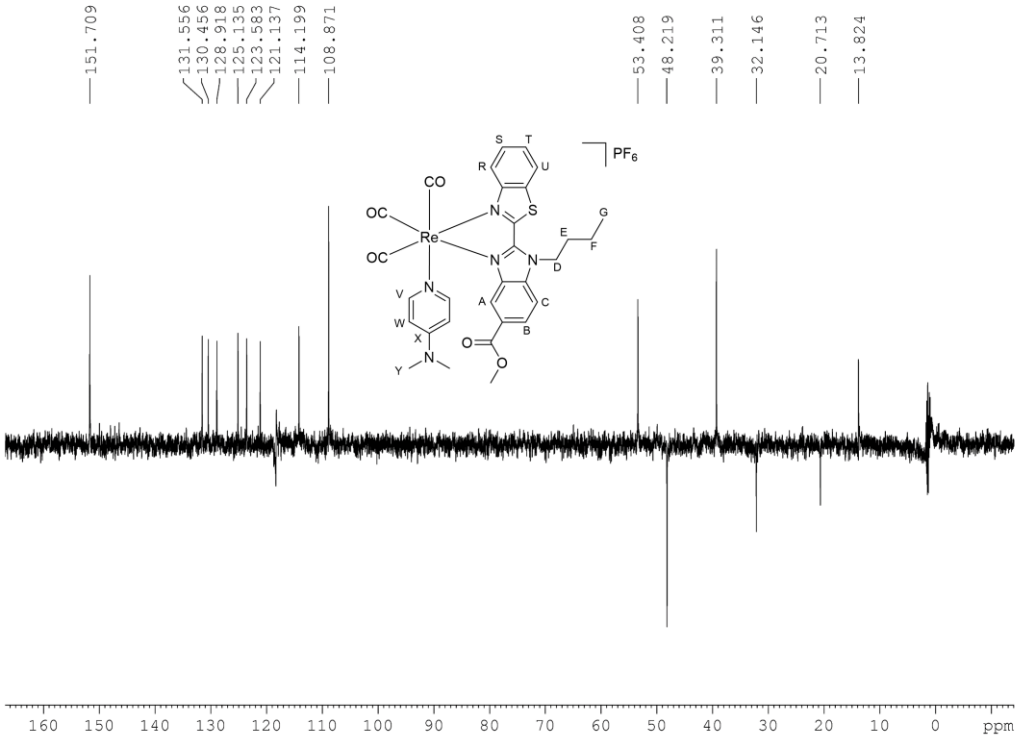


Figura A2.43. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **12** en CD_3CN.

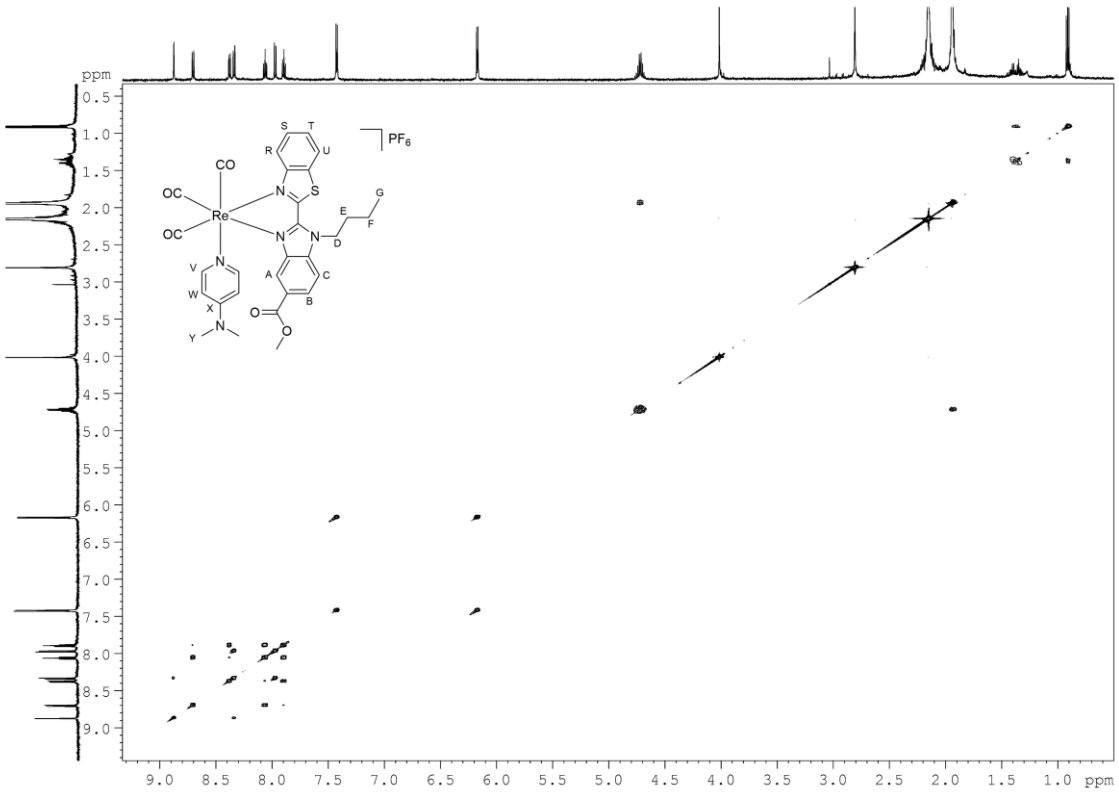


Figura A2.44. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **12** en CD_3CN.

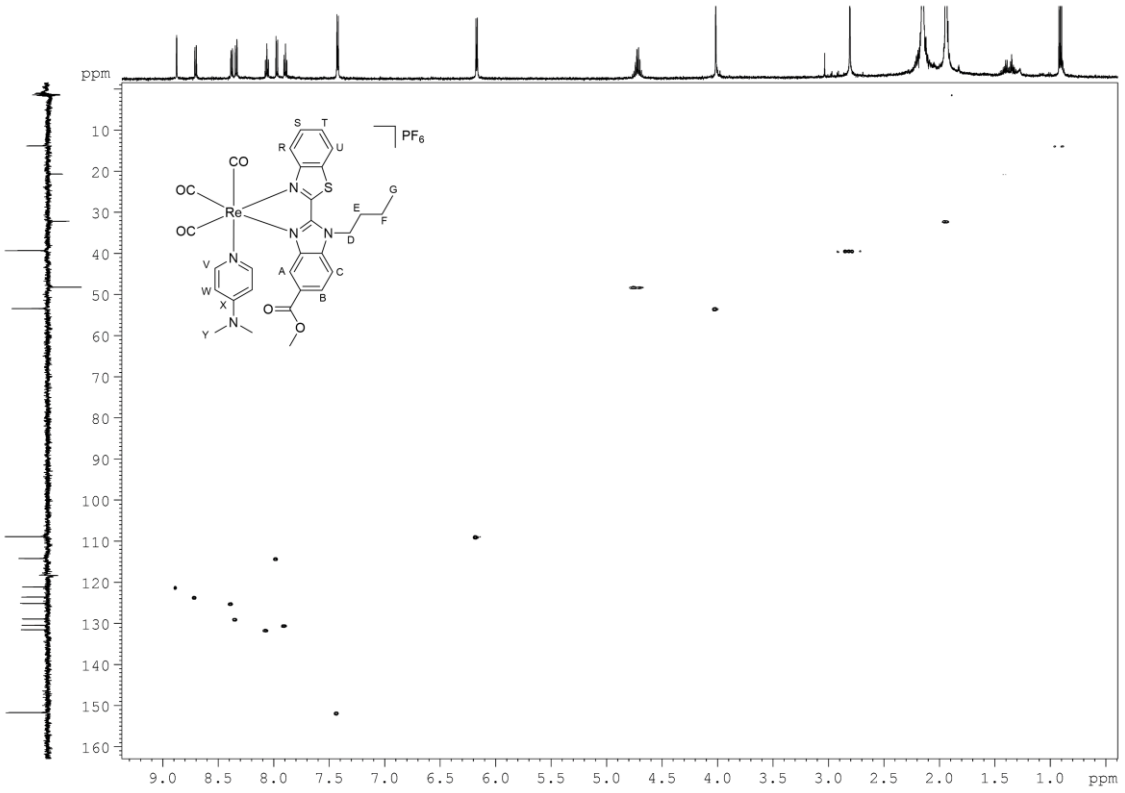


Figura A2.45. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **12** en CD_3CN.

1.10. Espectros ^{13}C-RMN comparativos

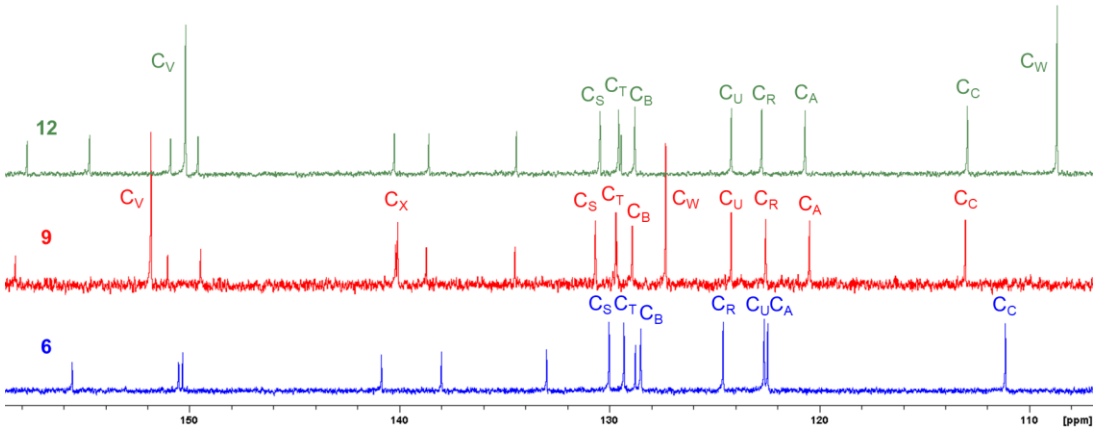


Figura A2.46. Comparación de la zona aromática de los espectros ^{13}C-RMN de los complejos **6**, **9** y **12**. En $CDCl_3$ a t.a., 151 MHz.

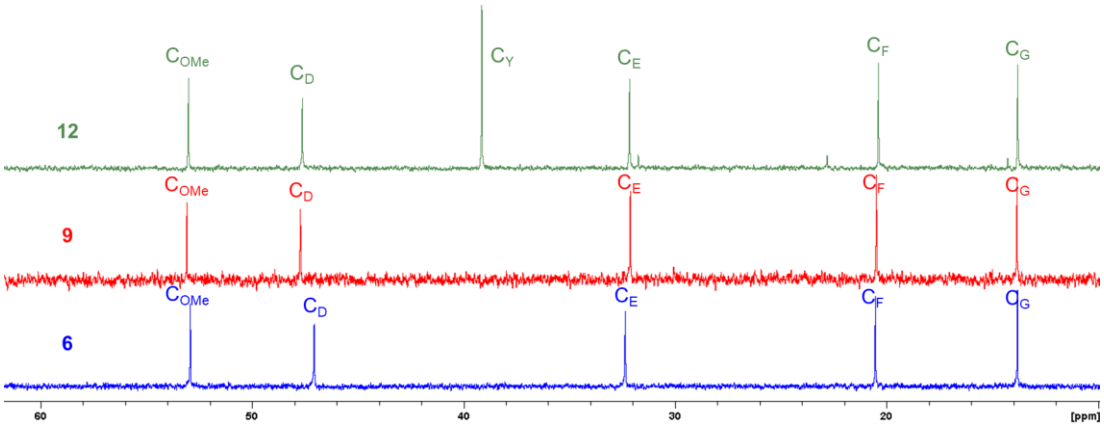


Figura A2.47. Comparación de la zona alifática de los espectros ^{13}C-RMN de los complejos **6**, **9** y **12**. En $CDCl_3$ a t.a., 151 MHz.

2. Espectroscopia infrarroja (IR)

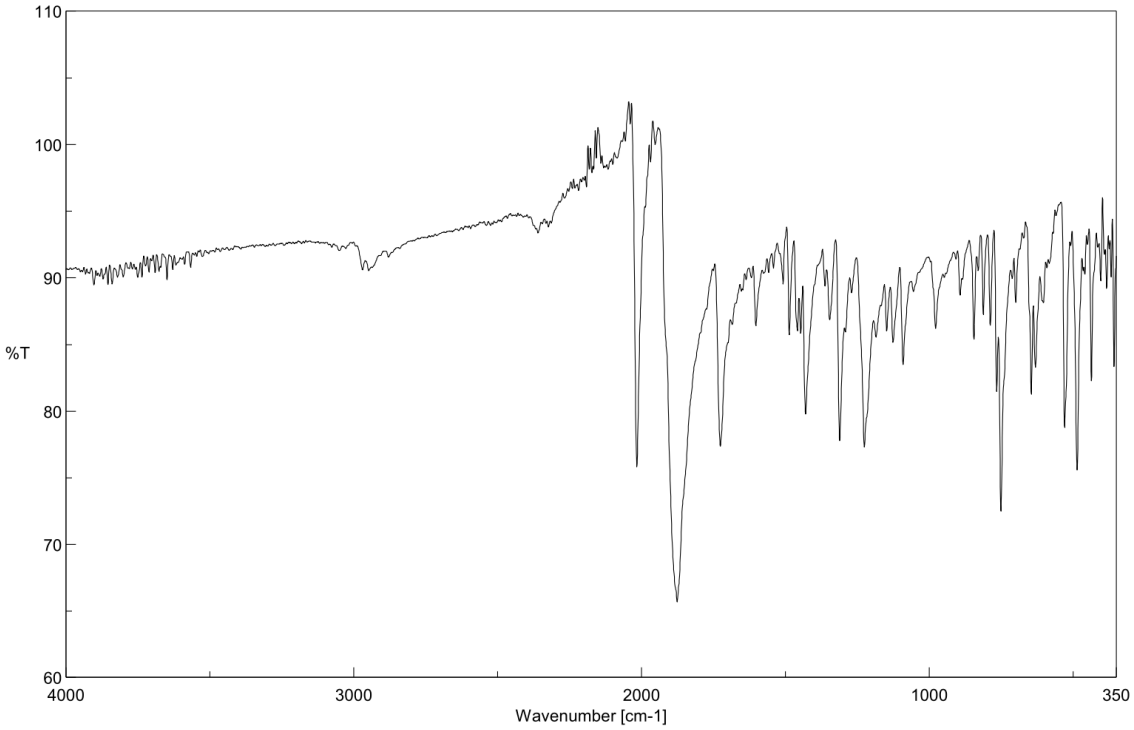


Figura A2.48. Espectro IR del compuesto **4**.

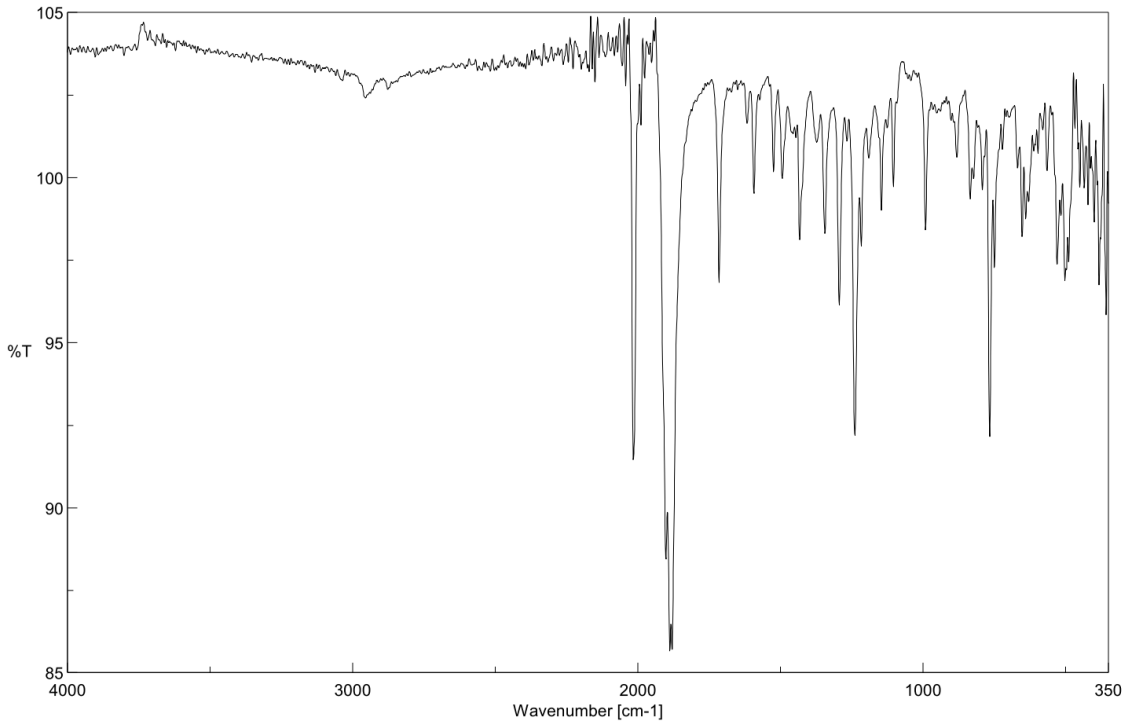


Figura A2.49. Espectro IR del compuesto **5**.

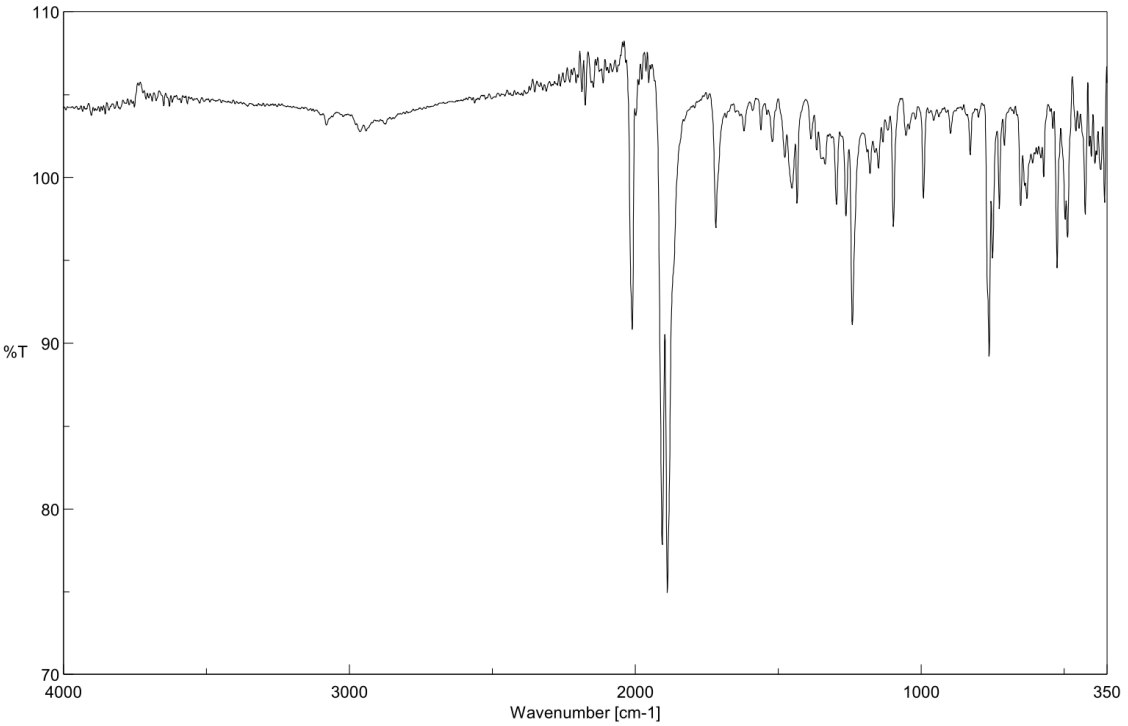


Figura A2.50. Espectro IR del compuesto **6**.

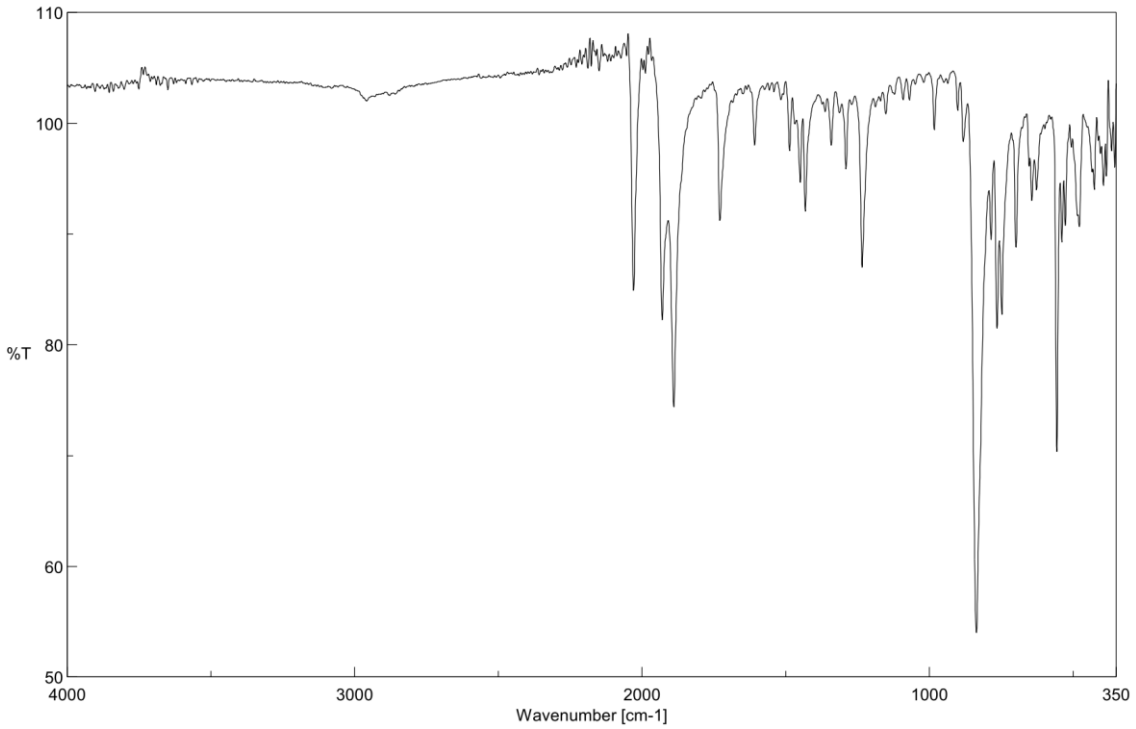


Figura A2.51. Espectro IR del compuesto **7**.

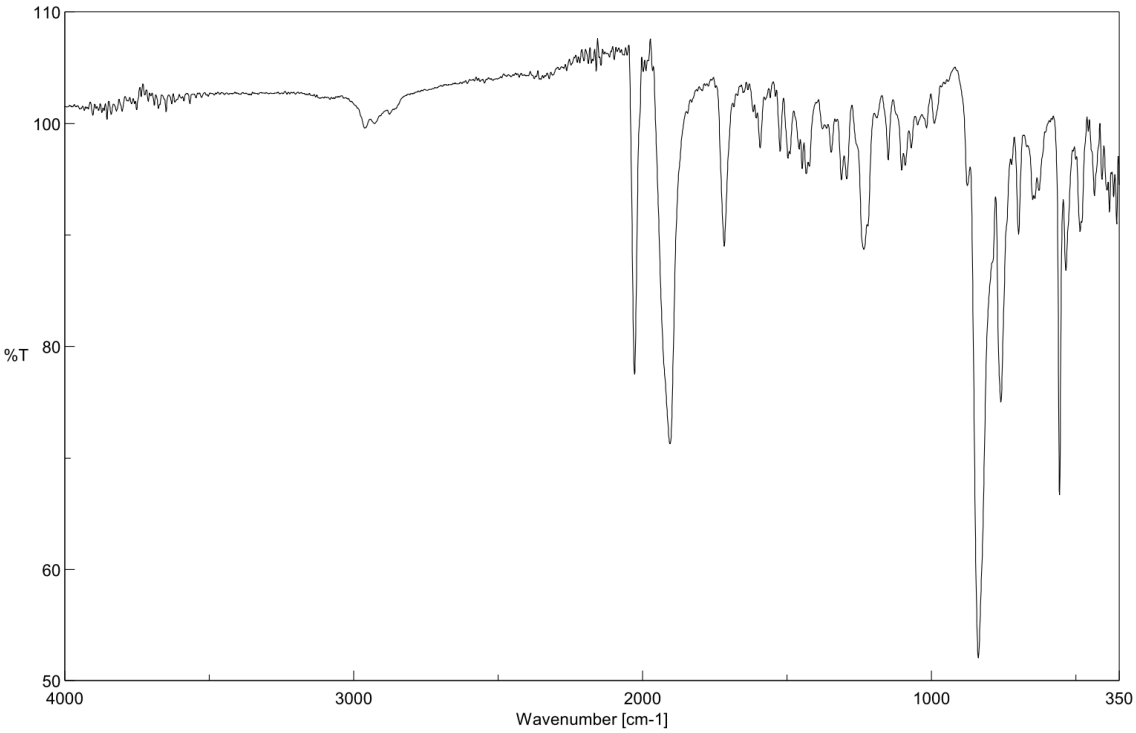


Figura A2.52. Espectro IR del compuesto **8**.

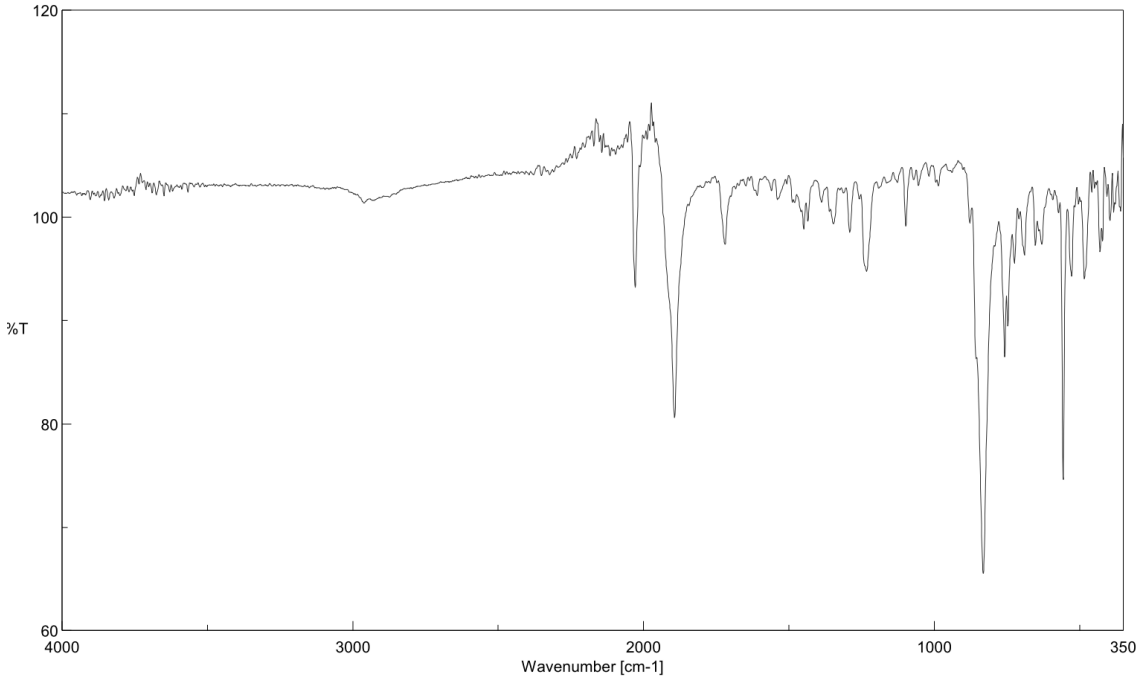


Figura A2.53. Espectro IR del compuesto **9**.

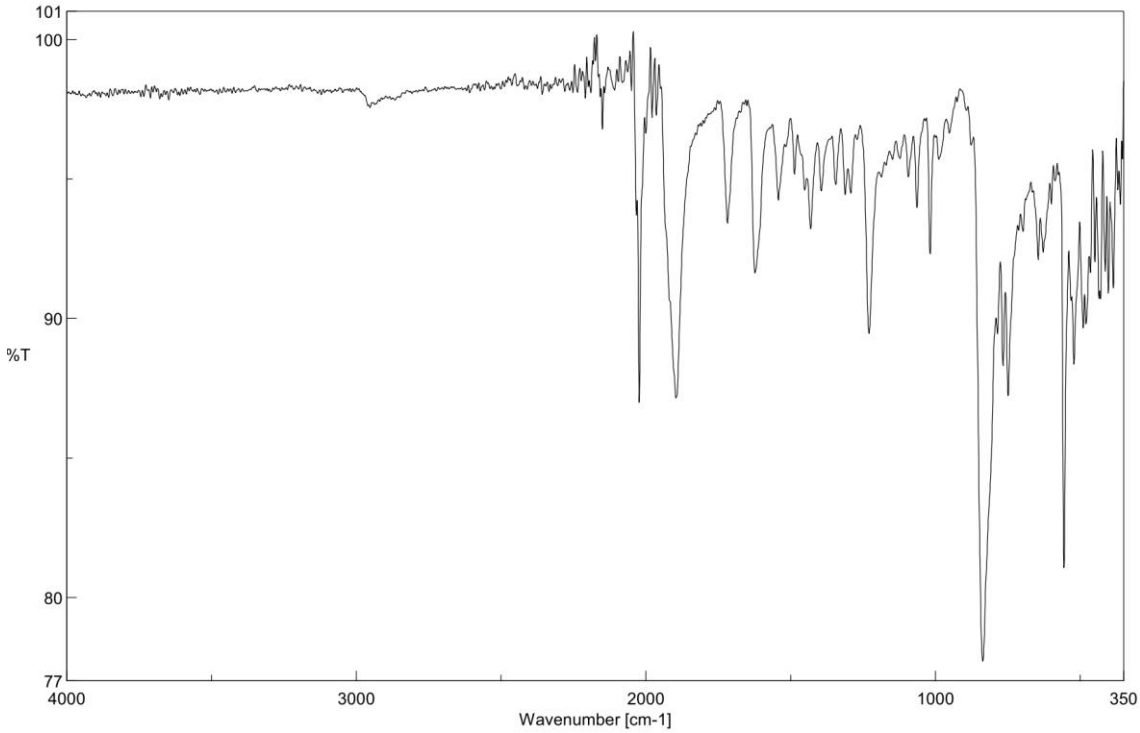


Figura A2.54. Espectro IR del compuesto **10**.

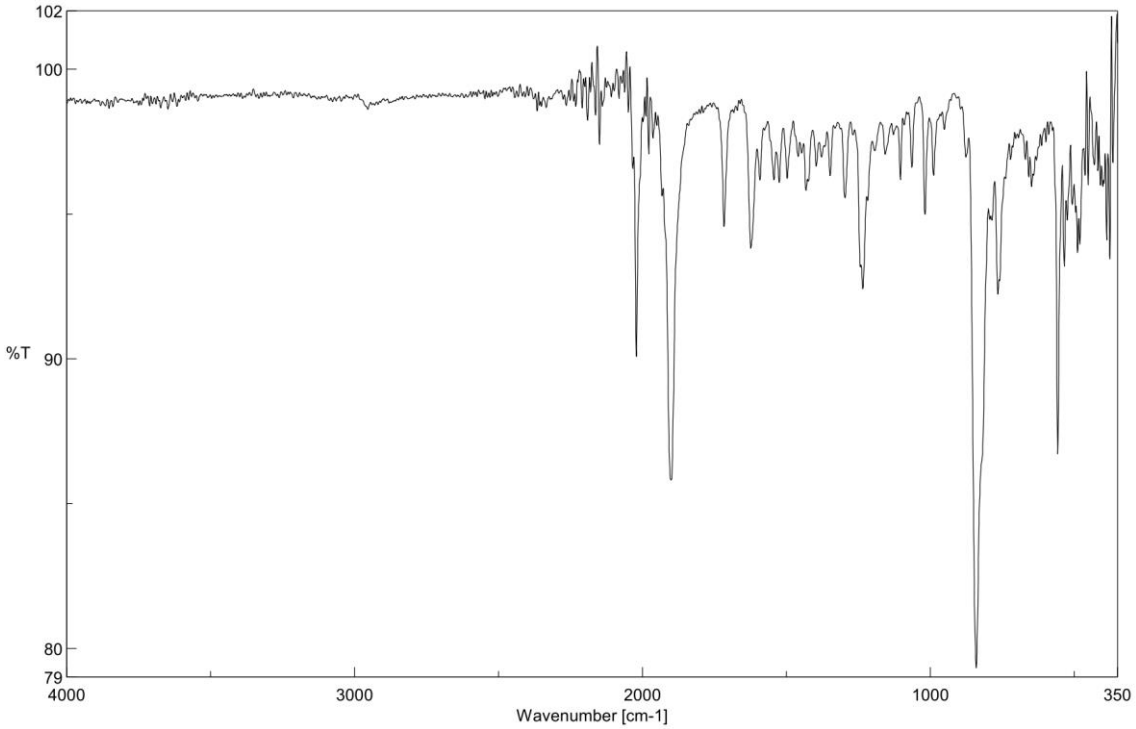


Figura A2.55. Espectro IR del compuesto **11**.

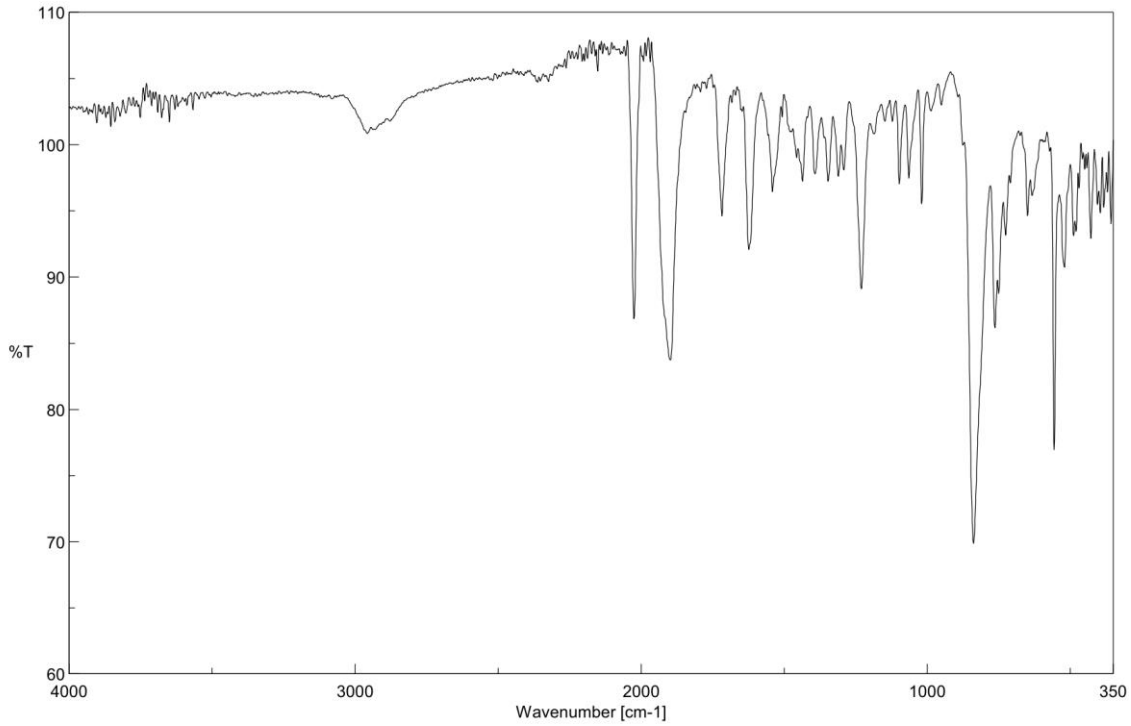


Figura A2.56. Espectro IR del compuesto **12**.

3. Espectrometría de masas

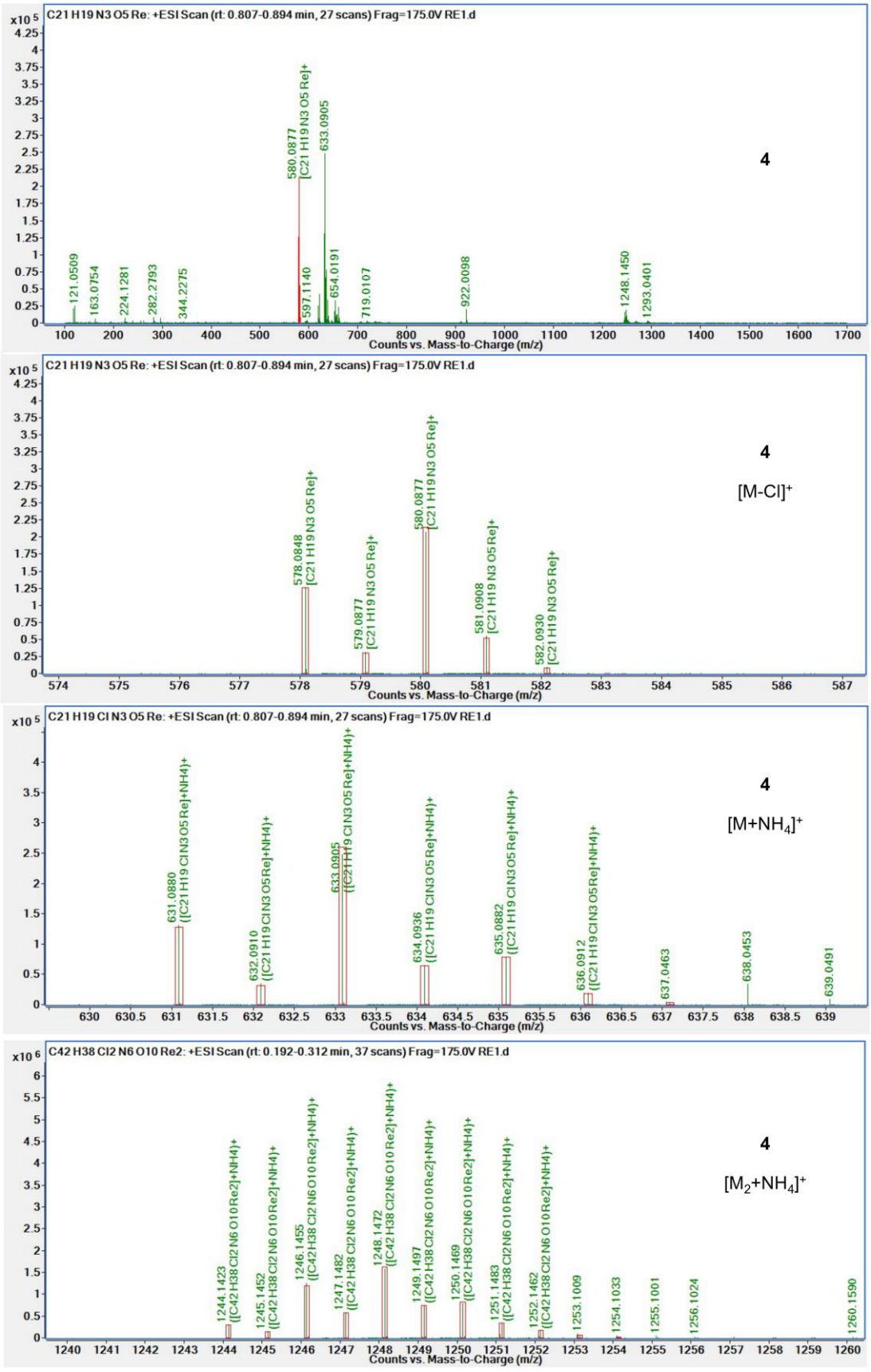


Figura A2.63. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **4** en ACN.

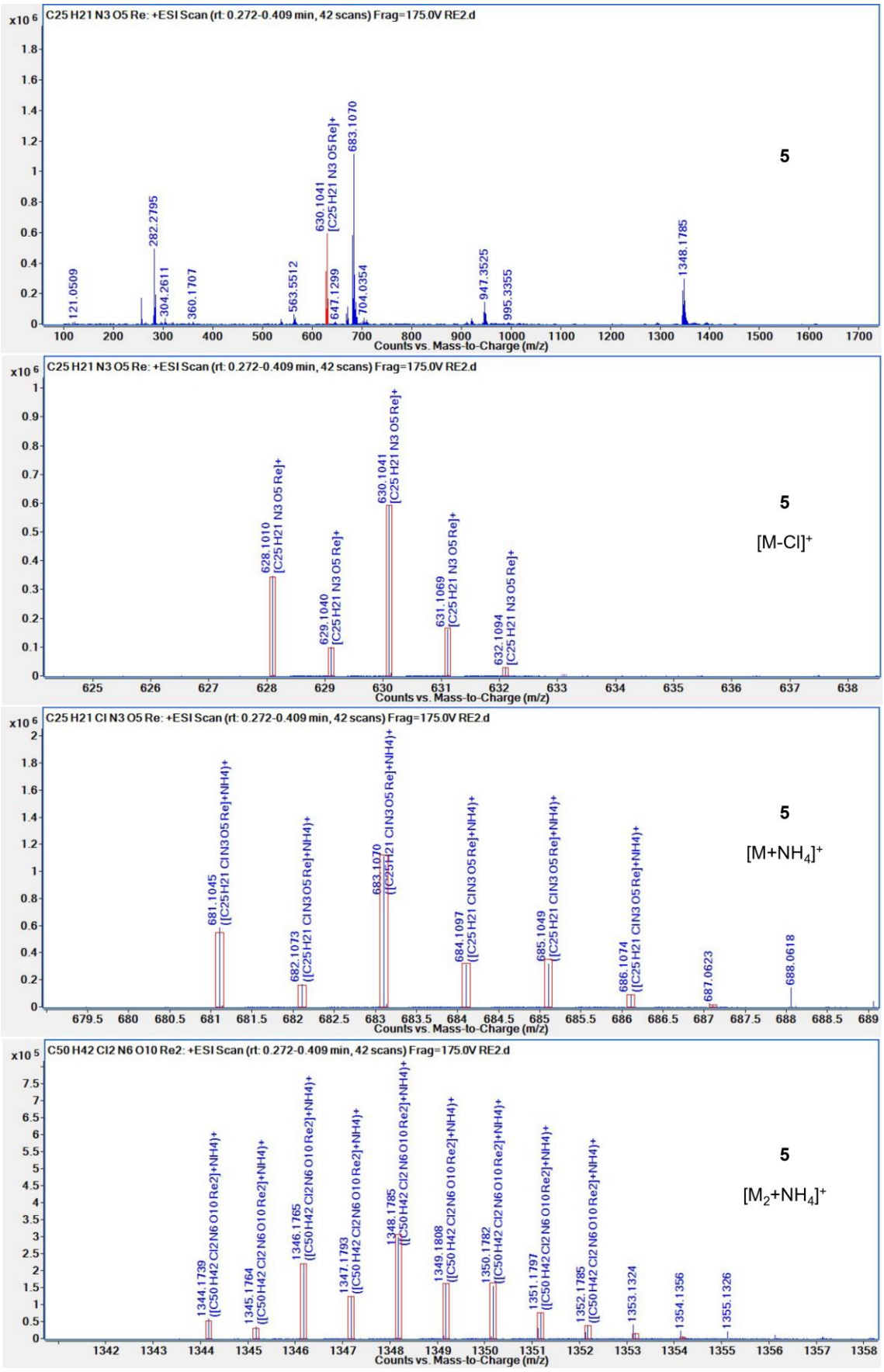


Figura A2.64. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **5** en ACN.

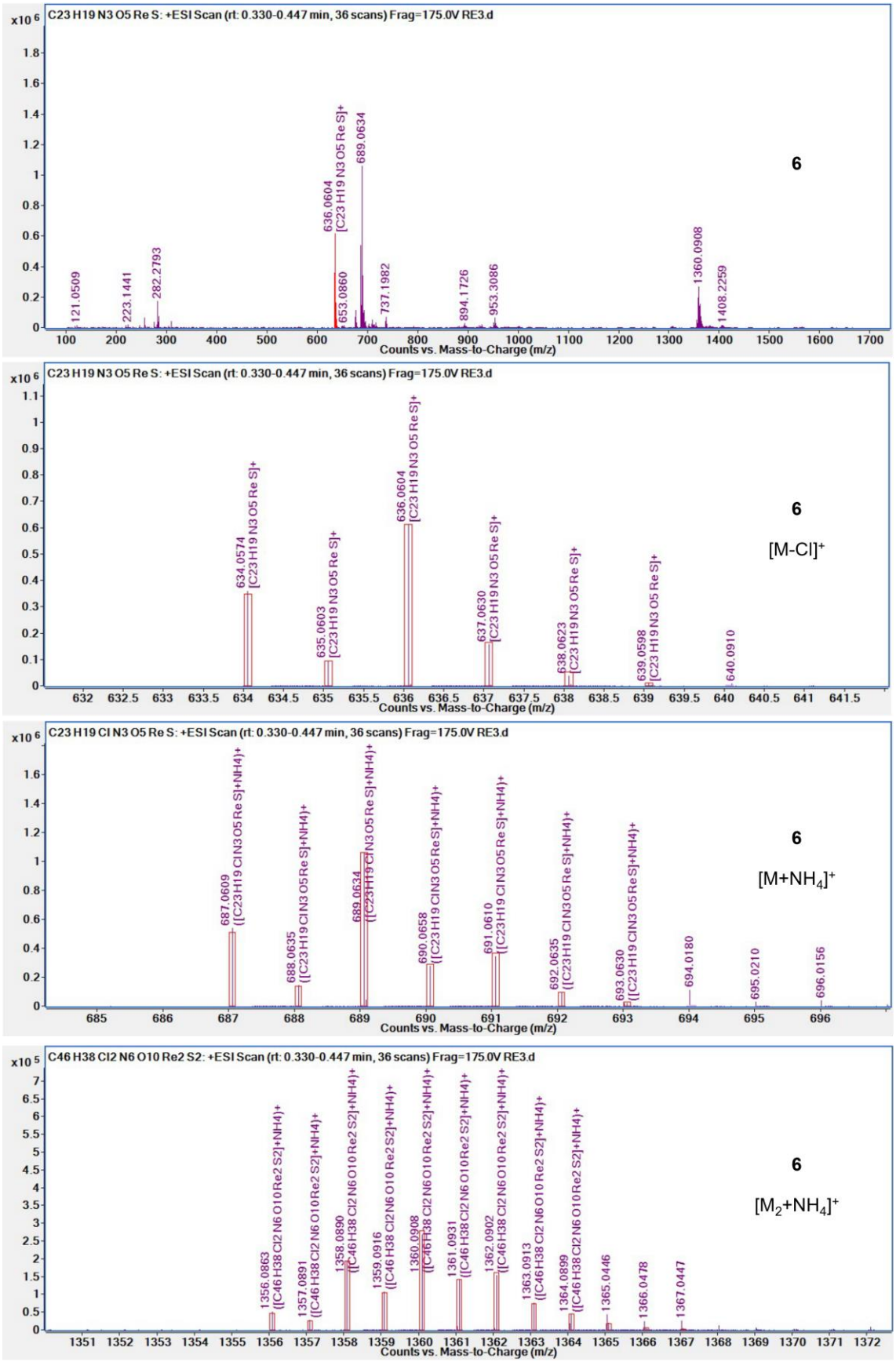


Figura A2.65. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **6** en ACN.

4. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

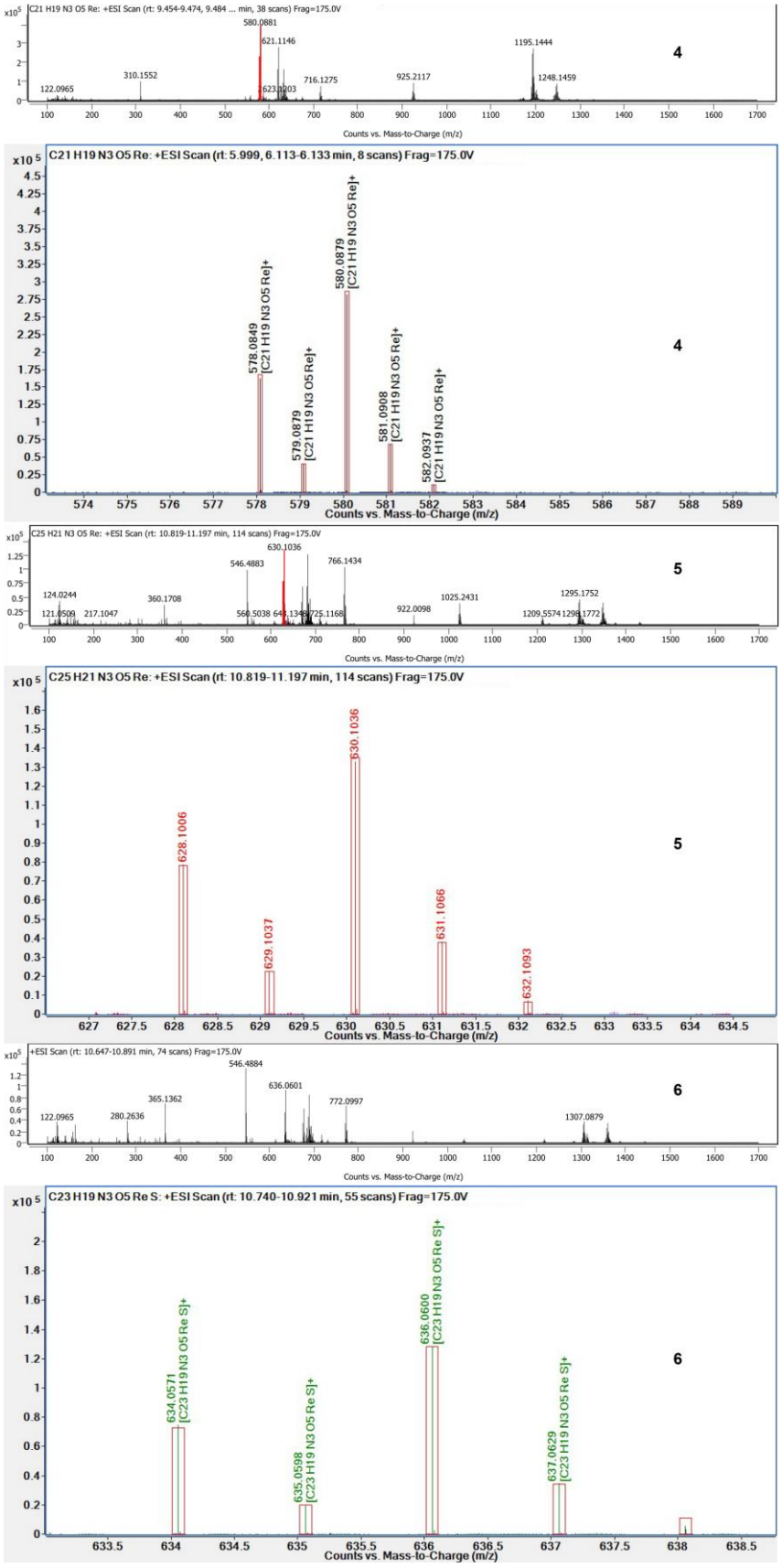


Figura A2.66. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~9–11 min de los cromatogramas de la **Figura 2.9** de los complejos **4**–**6** en ACN.

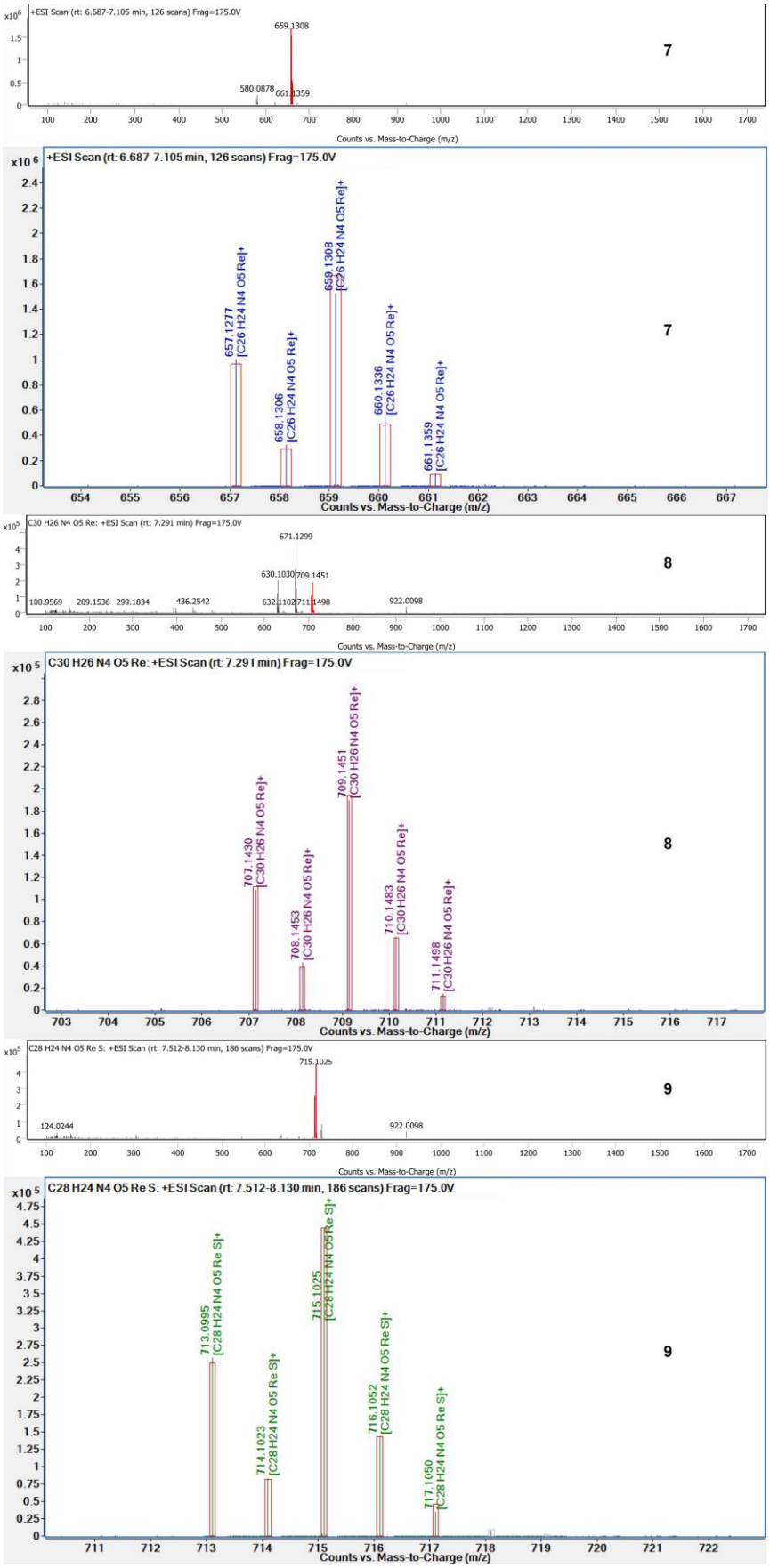


Figura A2.67. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~6–7 min de los cromatogramas de la **Figura 2.9** de los complejos **7**–**9** en ACN.

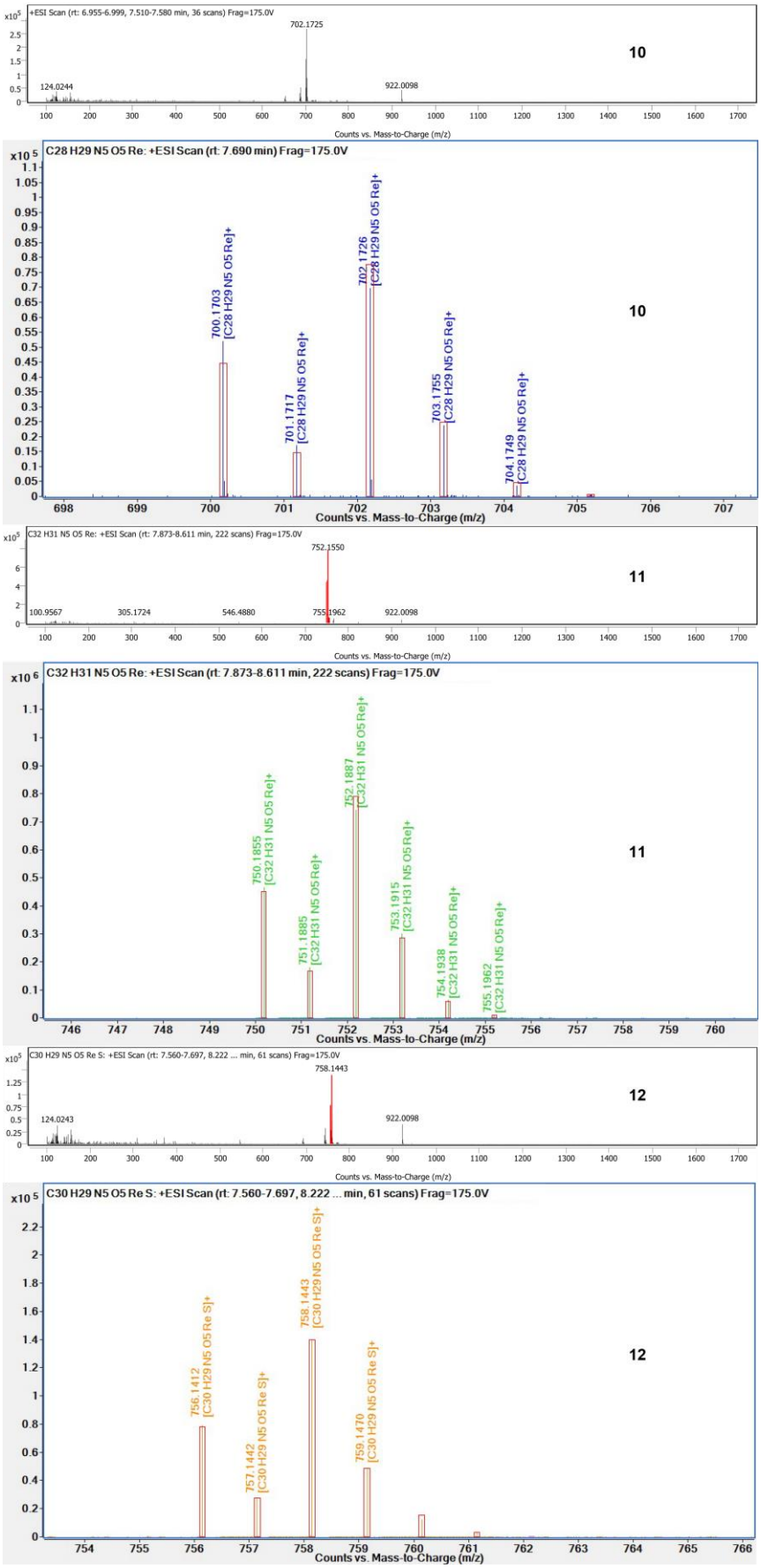


Figura A2.68. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~6–8 min de los cromatogramas de la **Figura 2.9** de los complejos **10**–**12** en ACN.

5. Determinación de la estructura cristalina por rayos-X

Los números de referencia CCDC son 2282513 para **6**, 2325369 para **6**·$CHCl_3$ y 2282514 para **11**.

Tabla A2.1a. Datos del cristal y detalles del refinamiento de la estructura para **6**.

Datos del cristal

$C_{23}H_{19}ClN_3O_5ReS$	D_x = 1.939 Mg m^{-3}
M_r = 671,12	Mo $K\alpha$ radiación, λ = 0,71073 Å
Ortorrómbico, *Pbcn*	Parámeros de celda a partir de 9484 reflexiones
a = 16,6417 (5) Å	θ = 2,5–28,7°
b = 20,7828 (5) Å	μ = 5,54 mm^{-1}
c = 13,2927 (4) Å	T = 100 K
V = 4597,4 (2) $Å^3$	Bloque, amarillo
Z = 8	0,16 × 0,09 × 0,05 mm
F(000) = 2608	

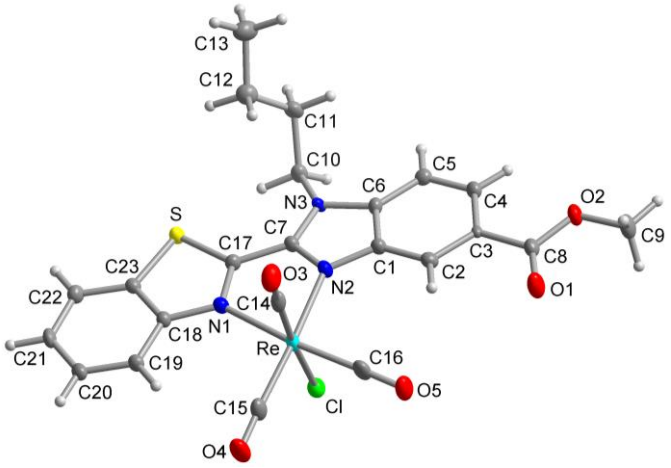
Recopilación de datos

Difractómetro Bruker D8 Quest CCD	5053 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$
Fuente de radiación: tubo sellado de foco fino	R_{int} = 0,030
ω y ϕ scans	θ_{max} = 28,7°, θ_{min} = 2,0°
Corrección de la absorción: multi-scan (*SADABS*; Krause, 2015)	h = -22→22
T_{min} = 0,648, T_{max} = 0,746	k = -28→28
96910 reflexiones medidas	l = -17→17
5945 reflexiones independientes	

Refinamiento

Refinamiento en F^2	Ubicación del sitio del átomo primario: métodos directos “invariantes de estructura”
Matriz de mínimos cuadrados: completa	Ubicación del sitio del átomo secundario: “Mapa de Fourier de diferencia”
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,0276 $R[F^2$, todos los datos] = 0,0374	Ubicación del sito de hidrógeno inferida de sitio vecinos
$wR[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,0567 $wR[F^2$, todos los datos] = 0,0661	Parámetros del átomo de H restringidos
S = 1,13	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0{,}0164P)^2 + 25{,}6488P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
5945 reflexiones	$(\Delta/\sigma)_{max}$ = 0,001
309 parámetros	$\Delta\rangle_{max}$ = 3,32 e $Å^{-3}$
0 restricciones	$\Delta\rangle_{min}$ = -0,83 e $Å^{-3}$

Tabla A2.1b. Distancias de enlaces seleccionadas (Å) y ángulos de enlace (º) para **6**. En la imagen se muestra la numeración de los átomos.



Re—C16	1,908 (4)	O4—C15	1,151 (5)
Re—C15	1,921 (4)	O3—C14	1,135 (5)
Re—C14	1,928 (4)	O5—C16	1,156 (5)
Re—N2	2,152 (3)	N1—C17	1,324 (4)
Re—N1	2,208 (3)	N1—C18	1,393 (4)
Re—Cl	2,4707 (10)	N2—C7	1,323 (4)
S—C17	1,718 (3)	N2—C1	1,381 (4)
S—C23	1,736 (3)	N3—C7	1,358 (4)
O1—C8	1,199 (5)	N3—C6	1,399 (4)
O2—C8	1,341 (4)	N3—C10	1,473 (4)
O2—C9	1,441 (5)		
C16—Re—C15	85,95 (15)	C16—Re—Cl	89,64 (13)
C16—Re—C14	89,84 (16)	C15—Re—Cl	93,91 (14)
C15—Re—C14	90,67 (17)	C14—Re—Cl	175,34 (11)
C16—Re—N2	98,94 (13)	N2—Re—Cl	81,48 (8)
C15—Re—N2	173,21 (14)	N1—Re—Cl	84,53 (8)
C14—Re—N2	94,02 (13)	C17—S—C23	89,41 (16)
C16—Re—N1	171,04 (13)		
C15—Re—N1	101,20 (13)	O4—C15—Re	177,6 (4)
C14—Re—N1	95,41 (13)	O3—C14—Re	178,2 (3)
N2—Re—N1	73,50 (11)	O5—C16—Re	177,7 (4)

Tabla A2.1c. Datos del cristal y detalles del refinamiento de la estructura para **6**·$CHCl_3$.

Cuando los cristales de **6** crecen a partir de una disolución de cloroformo con difusión lenta de hexano o por evaporación del disolvente durante unos días, se obtienen como agujas muy pequeñas. Dos conjuntos de datos de dos fragmentos de aguja muy pequeños dieron la estructura de **6** como solvato de $CHCl_3$, uno de peor calidad del grupo espacial triclínico P-1 y otro algo mejor del grupo espacial monoclínico $P2_1/c$, cuyos datos se recogen a continuación.

Datos del cristal

$C_{23}H_{19}ClN_3O_5ReS·CHCl_3$	$F(000)$ = 1536
M_r = 790,49	D_x = 1,839 Mg m^{-3}
Monoclínico, $P2_1/c$	Cu $K\alpha$ radiación, λ = 1,54184 Å
a = 11,4025 (9) Å	Parámetros de celda a partir de 3643 reflexiones
b = 24,8750 (15) Å	θ = 3,9–67,6°
c = 10,1631 (7) Å	μ = 12,80 mm^{-1}
β = 97,960 (8)°	T = 150 K
V = 2854,9 (3) $Å^3$	Aguja, naranja claro
Z = 4	0,09 × 0,04 × 0,03 × 0,03 (radio) mm

Recopilación de datos

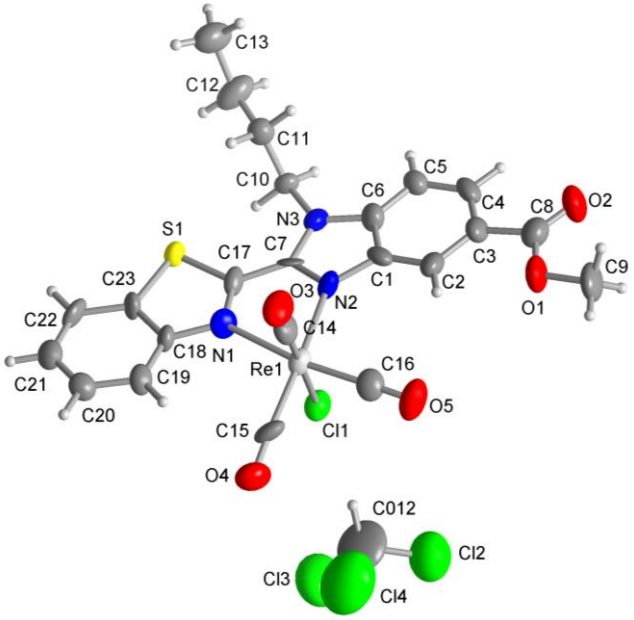
XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix difractómetro	5088 reflexiones independiente
Fuente de radiación: tubo sellado de rayos-X con microfoco, PhotonJet (Cu) X-ray Source	3142 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$
Espejo monocromador	R_{int} = 0,167
Resolución del detector: 10.0000 pixels mm^{-1}	θ_{max} = 67,1°, θ_{min} = 3,6°
ω scans	h = -13→13
Corrección de la absorción: para una esfera con *CrysAlis PRO* 1.171.41.90a (Rigaku Oxford Diffraction, 2020) Corrección de absorción esférica usando radios equivalentes y coeficientes de abosorción. Corrección empírica de la absorción usando armónicos esféricos, implementados en el algoritmo de escala SCALE3 ABSPACK.	k = -29→17
T_{min} = 0,630, T_{max} = 0,651	l = -12→10
21897 reflexiones medidas	

Refinamiento

Refinement on F^2	Localización de los H: deducida por la de los vecinos
Matriz de mínimos cuadrados: completa	Parámetros del átomo de H restringidos
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,0794 $R[F^2$, todos los datos] = 0,1394	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + 50{,}1027P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
$wR[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,1559	$(\Delta/\sigma)_{max} < 0{,}001$

$wR[F^2$, todos los datos] = 0,1852	
S = 1,04	$\Delta\rangle_{max}$ = 2,26 e Å^{-3}
5088 reflexiones	$\Delta\rangle_{min}$ = -2,09 e Å^{-3}
346 parámetros	Corrección de extinción: *SHELXL2017*/1 (Sheldrick 2017), $Fc^*=kFc[1+0,001xFc^2\lambda^3/\sin(2\theta)]^{-1/4}$
0 restricciones	Coeficiente de extinción: 0,00064 (8)
Ubicación del átomo primario: dual	

Tabla A2.1d. Distancias de enlaces seleccionadas (Å) y ángulos de enlace (º) para **6**·$CHCl_3$. En la imagen se muestra la numeración de los átomos.



Re1—Cl1	2,489 (4)	O3—C14	1,151 (19)
Re1—N1	2,215 (11)	O4—C15	1,164 (18)
Re1—N2	2,167 (12)	O5—C16	1,158 (18)
Re1—C14	1,899 (18)	N1—C17	1,299 (18)
Re1—C15	1,876 (17)	N1—C18	1,396 (18)
Re1—C16	1,896 (17)	N2—C1	1,410 (18)
S1—C17	1,746 (13)	N2—C7	1,321 (18)
S1—C23	1,769 (14)	N3—C6	1,379 (19)
O1—C8	1,35 (2)	N3—C7	1,383 (18)
O1—C9	1,47 (2)	N3—C10	1,490 (17)
O2—C8	1,19 (2)		
N1—Re1—Cl1	85,2 (3)	C15—Re1—C16	87,8 (7)
N2—Re1—Cl1	83,0 (4)	C16—Re1—Cl1	94,4 (5)
N2—Re1—N1	73,4 (4)	C16—Re1—N1	171,7 (6)
C14—Re1—Cl1	179,5 (5)	C16—Re1—N2	98,3 (6)

C14—Re1—N1	95,0 (5)	C16—Re1—C14	85,5 (7)
C14—Re1—N2	97,6 (6)	C17—S1—C23	88,4 (7)
C15—Re1—Cl1	88,4 (5)		
C15—Re1—N1	100,5 (6)	O3—C14—Re1	178,5 (15)
C15—Re1—N2	169,7 (6)	O4—C15—Re1	176,4 (13)
C15—Re1—C14	91,1 (7)	O5—C16—Re1	179,0 (16)

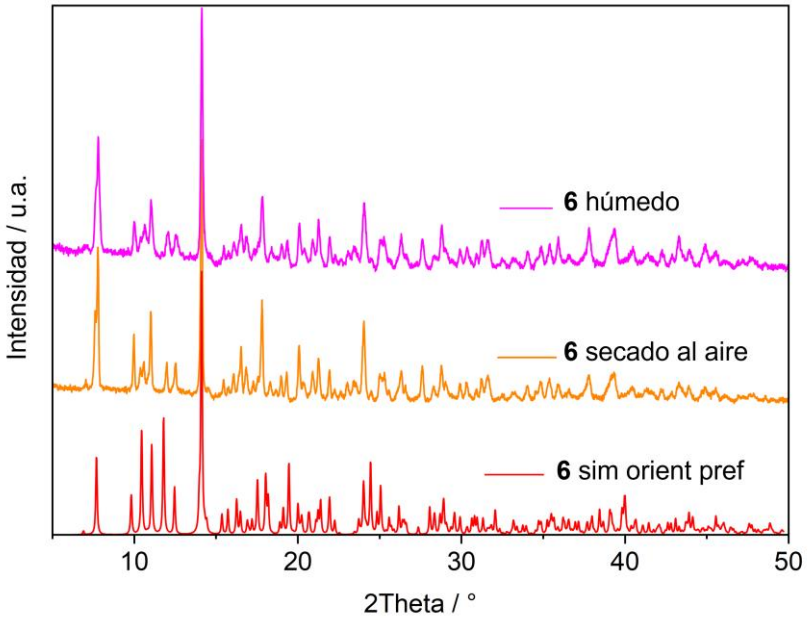


Figura A2.69. Patrones de difracción de rayos-X en polvo de pequeños cristales de aguja de **6** que crecieron a partir de una disolución en $CHCl_3$ y se midieron en estado húmedo y secados al aire a temperatura ambiente. El difractograma simulado se obtuvo a partir del conjunto de datos de rayos-X de monocristal de baja calidad del grupo espacial triclínico P-1 de **6**·$CHCl_3$, teniendo en también la orientación preferente de los cristales en forma de aguja a lo largo de 002 con factor March-Dollase de 0,6. En los difractogramas simulados los picos están ligeramente desplazados a mayores ángulos 2Theta debido a la menor temperatura (100 K) en los datos de la estructura cristalina. Una temperatura más baja suele provocar una contracción de las longitudes de enlace y de los parámetros de la celdilla unidad, lo que da lugar a reflexiones con mayores ángulos 2Theta.

Tabla A2.2a. Datos del cristal y detalles del refinamiento de la estructura para **11**.

Datos del cristal

$C_{32}H_{31}N_5O_5Re{\cdot}F_6P{\cdot}C_{0.275}H_{0.55}Cl_{0.55}{\cdot}0.79(CH_2Cl_2)$	D_x = 1.643 Mg m^{-3}
M_r = 987,23	Mo $K\alpha$ radiación, λ = 0,71073 Å
Ortorrómbico, *Pnna*	Parámetros de celda a partir de 9298 reflexiones
a = 21,5188 (18) Å	θ = 2,4–29,6°
b = 21,545 (2) Å	μ = 3,30 mm^{-1}
c = 17,2204 (14) Å	T = 100 K
V = 7983,8 (12) Å^3	Aguja, amarilla
Z = 8	0,33 × 0,05 × 0,02 mm
F(000) = 3894	

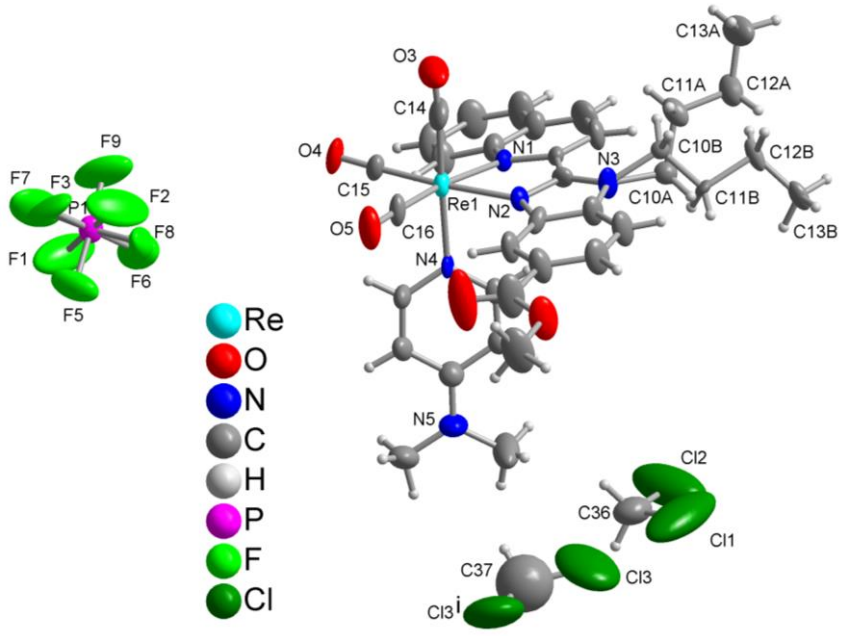
Recopilación de datos

Difractómetro Bruker D8 Quest CCD	7758 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$
Fuente de radiación: tubo sellado de enfoque fino	R_{int} = 0,038
ω y ϕ scans	θ_{max} = 26,4°, θ_{min} = 1,8°
Corrección de absorción: multi-scan (*SADABS*; Krause, 2015)	h = -26→26
T_{min} = 0,576, T_{max} = 0,746	k = -26→26
133853 reflexiones medidas	l = -21→21
8199 reflexiones independents	

Refinamiento

Refinamiento en F^2	0 restricciones
Matriz de mínimos cuadrados: completa	"Ubicación del sitio de hidrógeno inferida de sitios vecinos"
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,0818 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,0848	Parámetros del átomo de H restringidos
$wR[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0,1829 $wR[F^2$, todos los datos] = 0,1841	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0{,}0345P)^2 + 168{,}3022P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
S = 1,25	$(\Delta/\sigma)_{max} < 0{,}001$
8199 reflexiones	$\Delta\rangle_{max}$ = 2,64 e Å^{-3}
539 parámetros	$\Delta\rangle_{min}$ = -3,79 e Å^{-3}

Tabla A2.2b. Distancias de enlaces seleccionadas (Å) y ángulos de enlace (º) para **11**. En la imagen se muestra la numeración de los átomos.



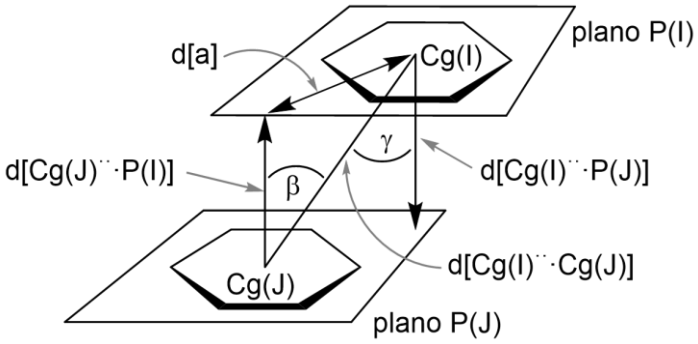
La estructura molecular del complejo **11** muestra también desorden en el grupo butilo y dos moléculas de CH_2Cl_2 (50% elipsoides térmicos; átomos de H con radios arbitrarios). Los átomos C10A, C10B y C37 sólo podrían ser refinados isotrópicamente. Transformación simétrica (i) - x+1/2, -y+1, z.

Re1—C16	1,889 (11)	N1—C18	1,372 (14)
Re1—C15	1,910 (10)	N1—C17	1,377 (12)
Re1—C14	1,915 (15)	N2—C7	1,322 (12)
Re1—N2	2,145 (8)	N2—C1	1,370 (13)
Re1—N4	2,202 (8)	N3—C7	1,347 (13)
Re1—N1	2,254 (8)	N3—C6	1,375 (14)
O1—C8	1,198 (17)	N3—C10A	1,51 (2)
O2—C8	1,342 (15)	N3—C10B	1,53 (2)
O2—C9	1,427 (16)	N4—C30	1,355 (13)
O3—C14	1,152 (17)	N4—C26	1,357 (12)
O4—C15	1,153 (13)	N5—C28	1,337 (15)
O5—C16	1,164 (14)	N5—C31	1,470 (19)
		N5—C32	1,480 (17)
C16—Re1—C15	85,3 (4)	C16—Re1—N1	171,9 (4)
C16—Re1—C14	88,5 (6)	C15—Re1—N1	102,5 (4)
C15—Re1—C14	87,7 (5)	C14—Re1—N1	94,1 (4)
C16—Re1—N2	99,4 (4)	N2—Re1—N1	72,9 (3)
C15—Re1—N2	175,1 (4)	N4—Re1—N1	86,1 (3)

C14—Re1—N2	90,9 (4)	N2—Re1—N4	86,9 (3)
C16—Re1—N4	91,0 (5)		
C15—Re1—N4	94,5 (4)	O3—C14—Re1	175,9 (11)
C14—Re1—N4	177,6 (5)	O4—C15—Re1	177,3 (11)
		O5—C16—Re1	176,9 (13)

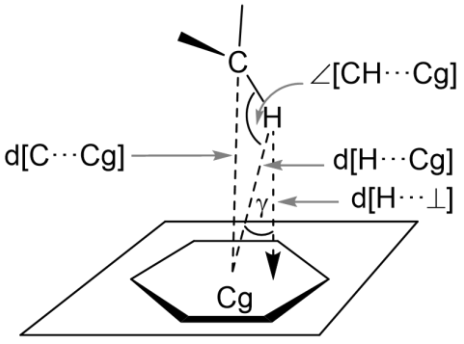
5.1. Análisis de las posibles interacciones de apilamientos-π en 6 y 11

Mediante el uso del programa PLATON[1,2] se encontraron para **6**: distancias centroide-centroide bastante cortas (< 3,8 Å), planos de anillos casi paralelos (alfa < 10º hasta ~0º o incluso exactamente 0º por simetría), pequeños ángulos de deslizamiento (β, γ < 25º) y desplazamientos verticales (deslizamiento < 1,5 Å) que se traducen en un considerable solapamiento de las áreas del plano arilo (**Esquema A2.1**, **Tabla A2.3** y **Figura A2.70**).[3,4]



Esquema A2.1. Representación gráfica de los parámetros usados para la descripción de las interacciones de tipo π-π.

Además, hay contactos menores de tipo C-H···O/Cl en **6** (**Tabla A2.4**) y algunos débiles C-H···π en **11** (**Tabla A2.6**). Los contactos intermoleculares C-H···π significativos comienzan por debajo de los 2,7 Å para las distancias (C-)H···centroide del anillo con H-perpendicular comenzando también por debajo de 2,6–2,7 Å y C-H··Cg > 145° (**Esquema A2.2**).[5–7]



Esquema A2.2. Representación gráfica de los parámetros usados para la descripción de las interacciones de tipo CH-π.[6]

Tabla A2.3. Análisis de posibles interacciones π-π para **6** (ver **Esquema A2.1** para la explicación).

```
================================================================================
Análisis de las interacciones con Cg-Cg Distancias <   4,0 Ang., Alpha < 20,000 º. and Beta < 60,0º.
================================================================================
- Cg(I)    = Número de plano I (= número de anillo en () arriba)
- Alpha    = Ángulo dihedro entre Planos I y J (Grados)
- Beta     = Ángulo Cg(I)-->Cg(J) or Cg(I)-->Me vector y normal al plano I (Grados)
- Gamma    = Ángulo Cg(I)-->Cg(J) vector y normal al plano J (Grados)
- Cg-Cg    = Distancia entre centroides de anillos (Ang.)
- CgI_Perp = Distancia perpendicular de Cg(I) en anillo J (Ang.)
- CgJ_Perp = Distancia perpendicular de Cg(J) en anillo I (Ang.)
- Deslizamiento = Distancia entre Cg(I) y proyección perpendicular de Cg(J) en anillo I (Ang).

Cg(I) Res(I)   Cg(J)  [   ARU(J)]      Cg-Cg    Alfa      Beta Gamma  CgI_Perp   CgJ_Perp  Deslizamiento

Cg(2)  [ 1] -> Cg(5)  [  4555,01]    3,693(2)  2,27(18)  23,5  22,3  3,4162(14)  3,3859(16)   1,474
Cg(4)  [ 1] -> Cg(4)  [  4655,01]    3,801(2)  7,13(18)  27,6  27,6  3,3685(15)  3,3685(15)   1,761
Cg(4)  [ 1] -> Cg(5)  [  3555,01]    3,590(2)  2,77(18)  22,0  22,8 -3,3102(16) -3,3292(15)   1,343
Cg(5)  [ 1] -> Cg(2)  [  4555,01]    3,693(2)  2,27(18)  22,3  23,5  3,3859(16)  3,4161(14)   1,402
Cg(5)  [ 1] -> Cg(4)  [  3455,01]    3,590(2)  2,77(18)  22,8  22,0 -3,3293(15) -3,3102(16)   1,390
Cg(5)  [ 1] -> Cg(5)  [  4555,01]    3,493(2)  2,68(18)  13,6  13,6  3,3944(16)  3,3944(16)   0,823
Cg(6)  [ 1] -> Cg(4)  [  3455,01]  3,8914(19)  3,41(15)  31,8  32,4 -3,2871(12) -3,3083(16)   2,049
Cg(6)  [ 1] -> Cg(5)  [  4555,01]  3,4110(19)  2,42(15)   3,1   3,1  3,4061(12)  3,4061(16)   0,184
Cg(6)  [ 1] -> Cg(6)  [  4555,01]  3,5962(16)  2,00(11)  18,6  18,6  3,4079(12)  3,4080(12)   1,148
Cg(7)  [ 1] -> Cg(5)  [  3555,01]  3,9836(19)  2,97(15)  32,9  34,1 -3,2987(12) -3,3459(15)   2,162

[  3455] = -1/2+X,1/2-Y,-Z
[  3555] = 1/2+X,1/2-Y,-Z
[  4555] = -X,Y,1/2-Z
[  4655] = 1-X,Y,1/2-Z

Cg2 = centroide del anillo S-N1-C17-C18-C23
Cg4 = centroide del anillo C1-C2-C3-C4-C5-C6
Cg5 = centroide del anillo C18-C19-C20-C21-C22-C23
Cg6 = centroide del anillo S-N1-C17-C18-C19-C20-C21-C22-C23
Cg7 = centroide del anillo N2-N3-C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7
```

Tabla A2.4. Análisis de interacciones intermoleculares C-H···X para **6**.

```
================================================================================
Análisis de los potenciales enlaces de hidrógeno y Esquemas con d(D...A) < R(D)+R(A)+0.50, d(H...A) <
R(H)+R(A)-0.12 Ang., D-H...A > 100.0 Grados

Nr Typ Res Dador --- H....Aceptor [    ARU  ]          D - H    H...A    D...A            D - H...A
--------------------------------------------------------------------------------------------------------
2      1 C(4)  --H(4)   ..Cl     [  3555,01]          0,95     2,63     3,410(3)         140
4      1 C(12) --H(12A) ..Cl     [  2555,01]          0,99     2,75     3,630(4)         148
5      1 C(22) --H(22)  ..O(1)   [  7555,01]          0,95     2,29     3,227(4)         169

:: Enlaces clásicos de hidrógeno no encontrados

Translación de ARU-Código a CIF y Código de posición equivalente
============================================================
   [  3555.] = [   4_555] = 1/2+x,1/2-y,-z
   [  7555.] = [   8_665] = 1/2-x,1/2+y,z
   [  2555.] = [   2_555] = 1/2-x,1/2-y,1/2+z
```

Tabla A2.5. Análisis de posibles interacciones π-π para **11** (ver **Esquema A2.1** para la explicación).

```
================================================================================
Análisis de las interacciones Cg-Cg Distancias <  4,0 Ang., Alfa < 20,000 º. y Beta < 60,0 º.
================================================================================
- Cg(I)    = Número de plano I (= número de anillo en () arriba)
- Alpha    = Ángulo dihedro entre planos I y J (Grados)
- Beta     = Ángulo Cg(I)-->Cg(J) or Cg(I)-->Me vector y normal al plano I (Grados)
- Gamma    = Ángulo Cg(I)-->Cg(J) vector y normal al plano J (Grados)
- Cg-Cg    = Distancia entre centroides de anillos (Ang.)
- CgI_Perp = Distancia perpendicular de Cg(I) en anillo J (Ang.)
- CgJ_Perp = Distancia perpendicular de Cg(J) en anillo I (Ang.)
- Deslizamiento = Distancia entre Cg(I) y proyección perpendicular de Cg(J) en anillo I (Ang).

Cg(I) Res(I)   Cg(J) [   ARU(J)]      Cg-Cg    Alpha  Beta Gamma    CgI_Perp    CgJ_Perp  Slippage

Cg(5)  [ 1] -> Cg(5)  [  3556,01]    3,903(8)   6,5(7)  22,6  22,6    3,605(6)    3,604(6)   1,498
Cg(6)  [ 1] -> Cg(6)  [  3555,01]    3,696(9)   6,5(8)  20,5  20,5    3,463(7)    3,463(7)   1,293

[  3556] = X,1/2-Y,3/2-Z
[  3555] = X,1/2-Y,1/2-Z

Cg5 = centroide del anillo C1-C2-C3-C4-C5-C6
Cg6 = centroide del anillo C18-C19-C20-C21-C22-C23
```

Tabla A2.6. Análisis de interacciones intermoleculares C-H···Cg(Anillo-Pi), (H···Cq < 3,0 Ang. – Gamma < 30,0 Deg) para **11** (ver **Esquema A2.2** para la explicación).

```
- Cg(J)   = Centro de gravedad del anillo J (Número de plano arriba)
- H-Perp  = Distancia perpendicular de H al plano del anillo J
- Gamma   = Ángulo entre vector Cg-H y anillo J normal
- C-H..Cg = C-H-Cg ángulo (grados)
- C..Cg   = Distancia de X a Cg (Angstrom)
- C-H, Pi = Ángulo del enlace X-H con el plano-Pi- (i.e.' Perpendicular = 90 grados, Paralelo = 0 gradis)

   X--H(I)    Res(I)   Cg(J) [   ARU(J)]      H..Cg     H-Perp    Gamma   X-H..Cg    X..Cg      X-H,Pi
C(20)  -H(20)  [ 1] -> Cg(4)  [  3555,01]     2,95      2,78      19,53     170     3,884(15)  81
C(36)  -H(36A) [ 3] -> Cg(5)  [  3556,01]     2,93      2,84      13,93     128     3,62(2)    50
C(36)  -H(36B) [ 3] -> Cg(6)  [  7555,01]     2,82      2,79       8,66     135     3,59(2)    53

[  3555] = X,1/2-Y,1/2-Z
[  3556] = X,1/2-Y,3/2-Z
[  7555] = -X,1/2+Y,1/2+Z

Cg4 = centroide del anillo N4-C26-C27-C28-C29-C30
Cg5 = centroide del anillo C1-C2-C3-C4-C5-C6
Cg6 = centroide del anillo C18-C19-C20-C21-C22-C23
```

6. Propiedades fotofísicas

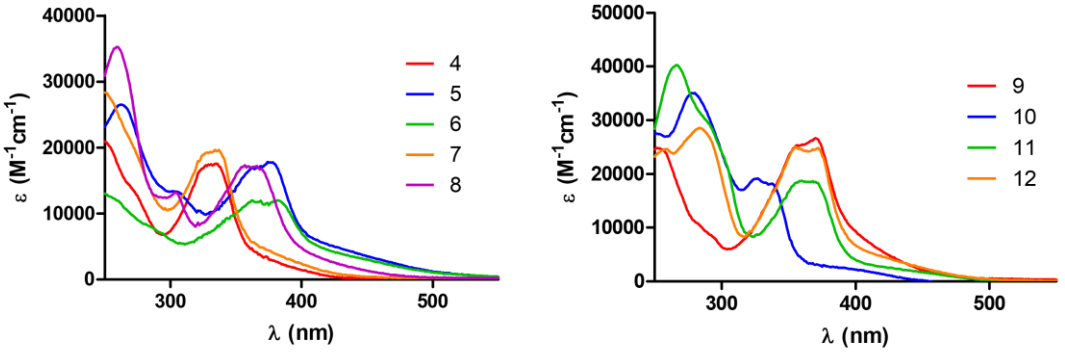


Figura A2.70. Espectros de absorción UV/Vis de **4**–**12** en agua (1% DMSO) en presencia de oxígeno, 10 µM a t.a..

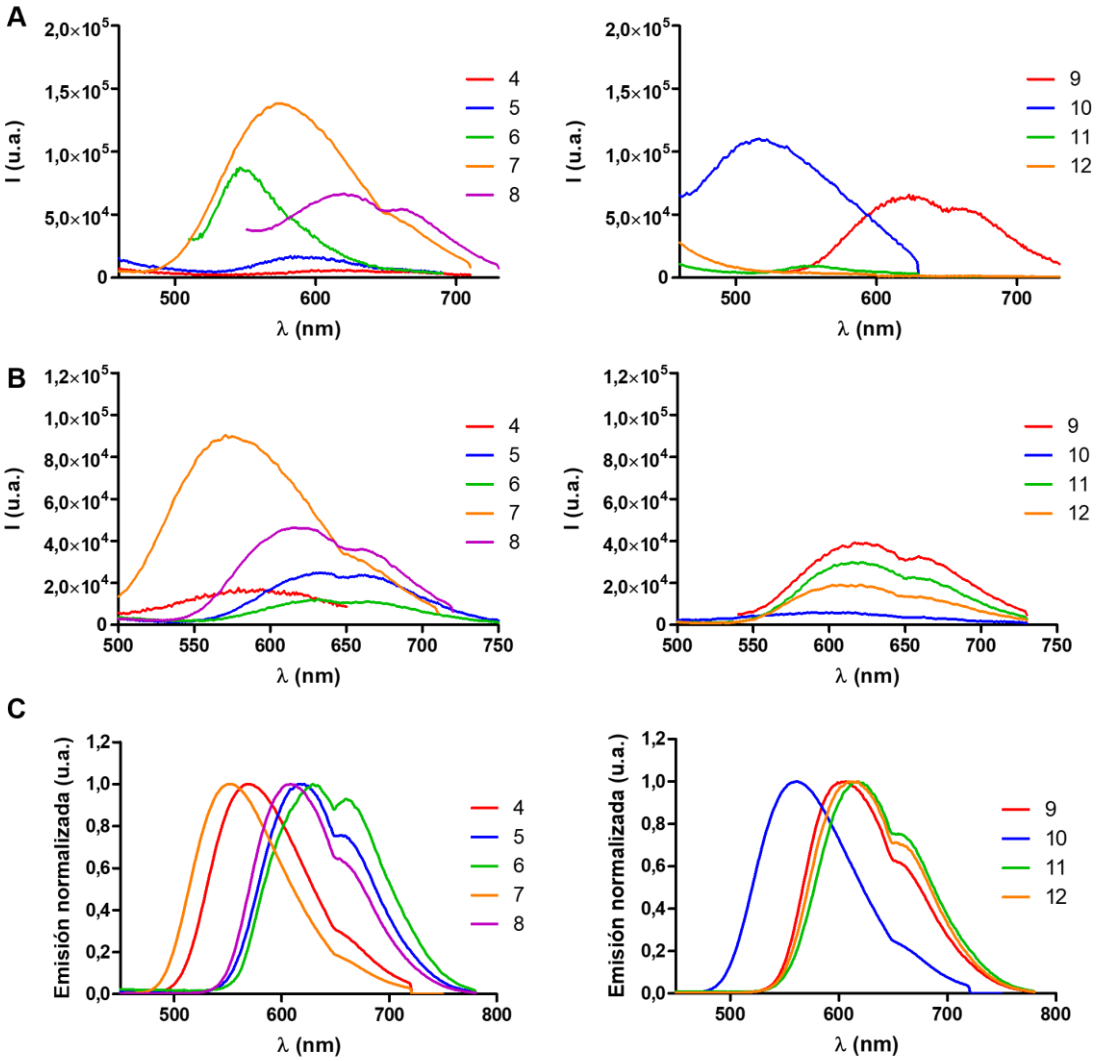


Figura A2.71. Espectros de emisión de **4**–**12** en presencia de oxígeno en (A) acetonitrilo, (B) agua (1% DMSO) y (C) estado sólido. $\lambda_{exc(max)}$ a la longitud de onda del máximo de absorción 330–380 nm, 10 µM para las disoluciones, a t.a.

7. Estudios de estabilidad

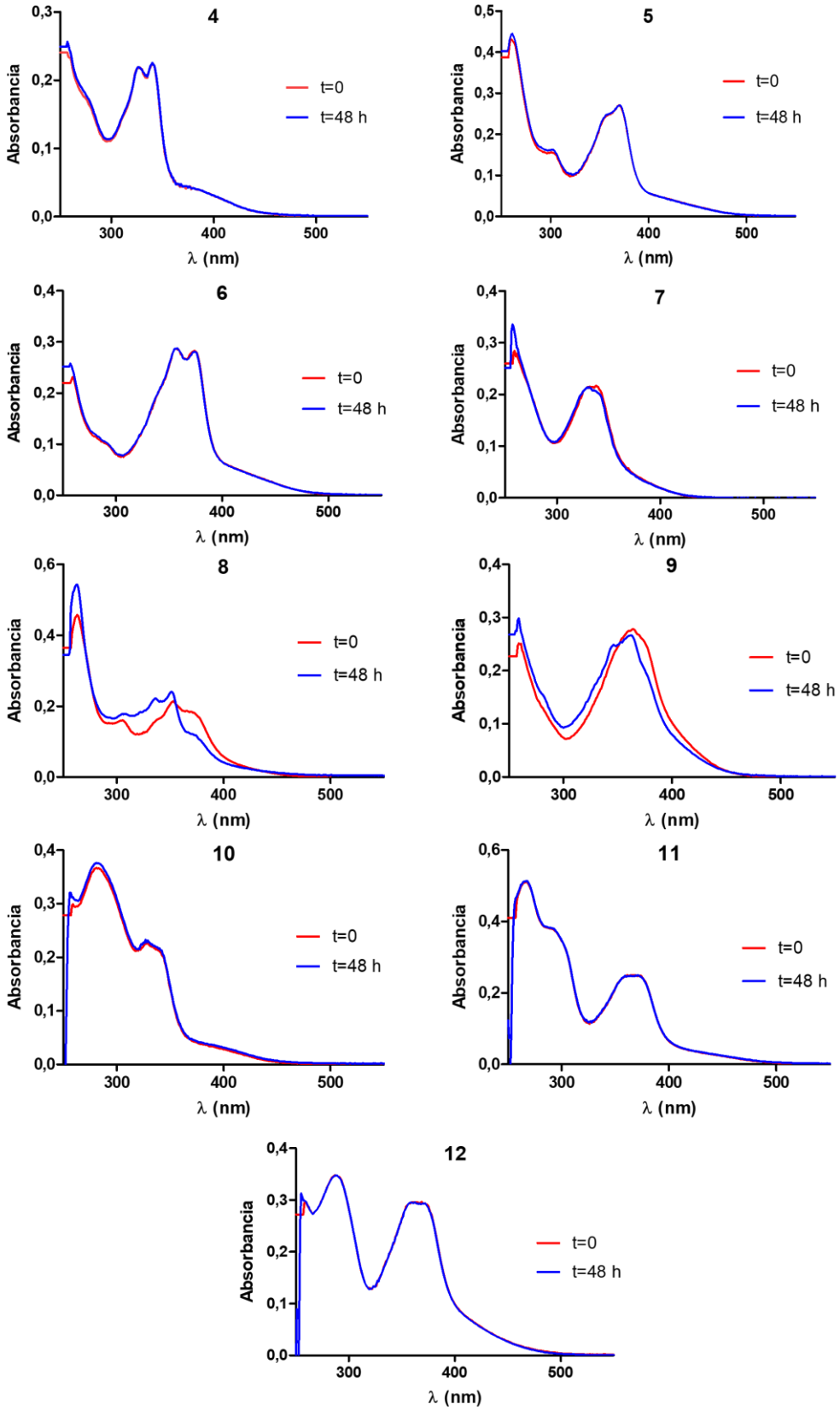


Figura A2.72. Espectro UV/Vis de los complejos (10 µM) en DMSO a t=0 y después de 48 h incubados a 37 ºC.

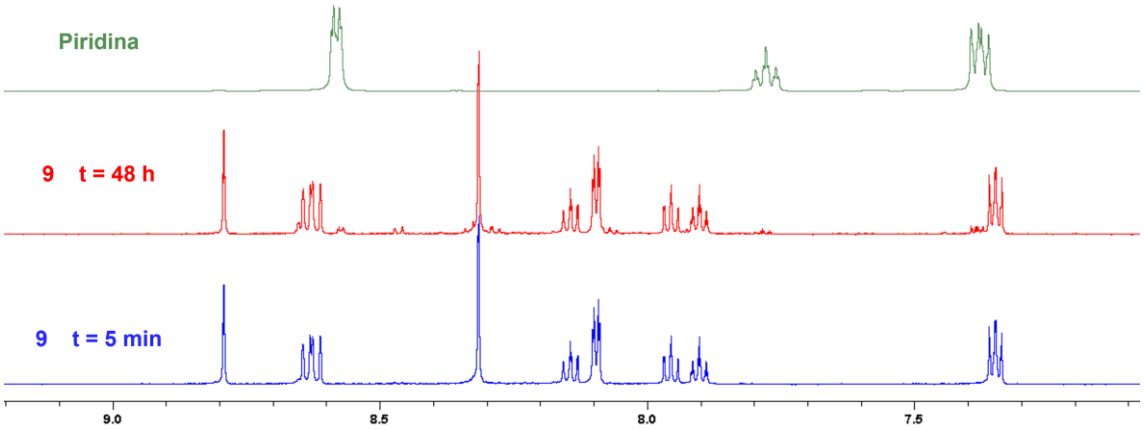


Figura A2.73. Evolución del espectro ^{1}H-RMN para **9** (1 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

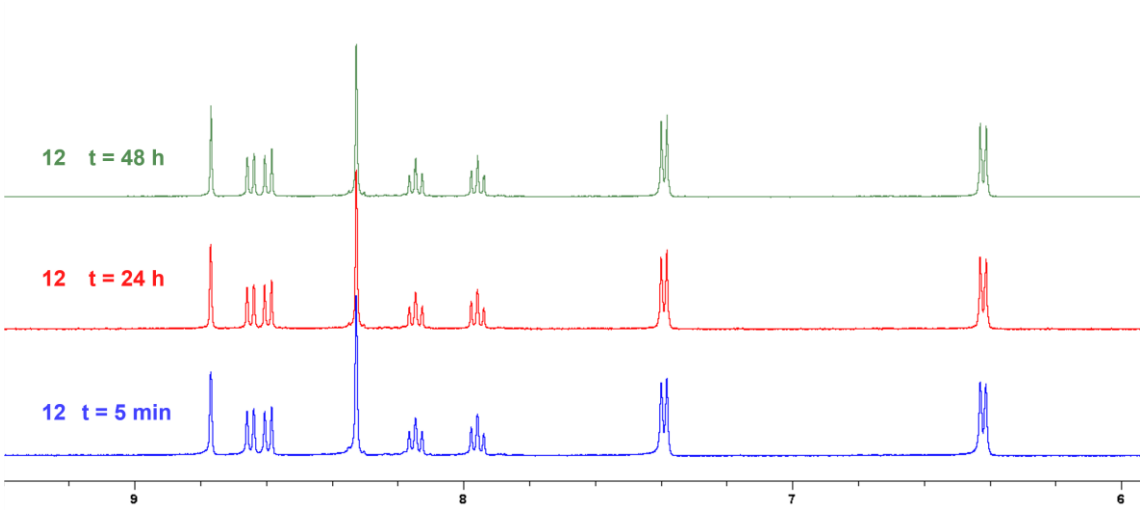


Figura A2.74. Evolución del espectro ^{1}H-RMN para **12** (1 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

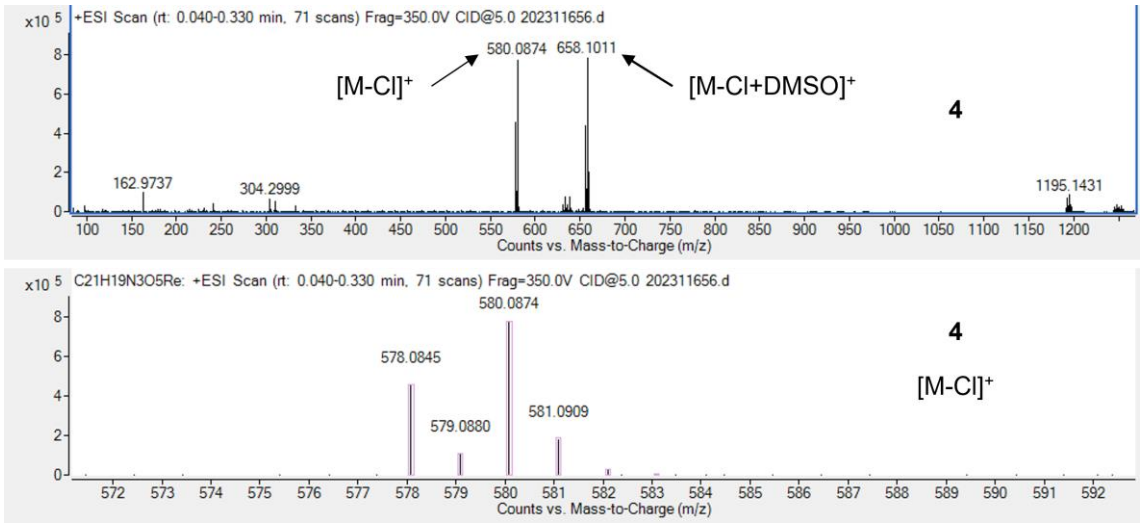


Figura A2.75. Espectro ESI-MS con modo ion. positiva del complejo **4** en DMSO.

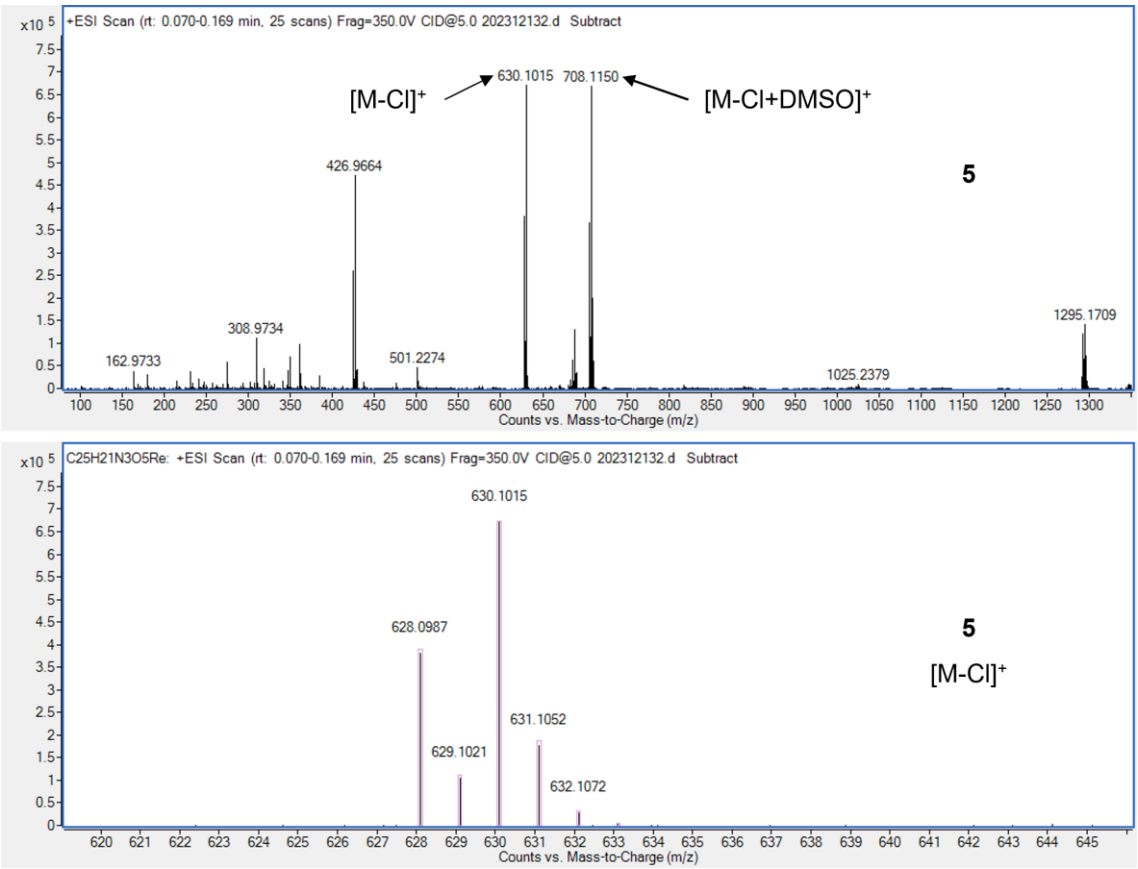


Figura A2.76. Espectro ESI-MS con modo ion. positiva del complejo **5** en DMSO.

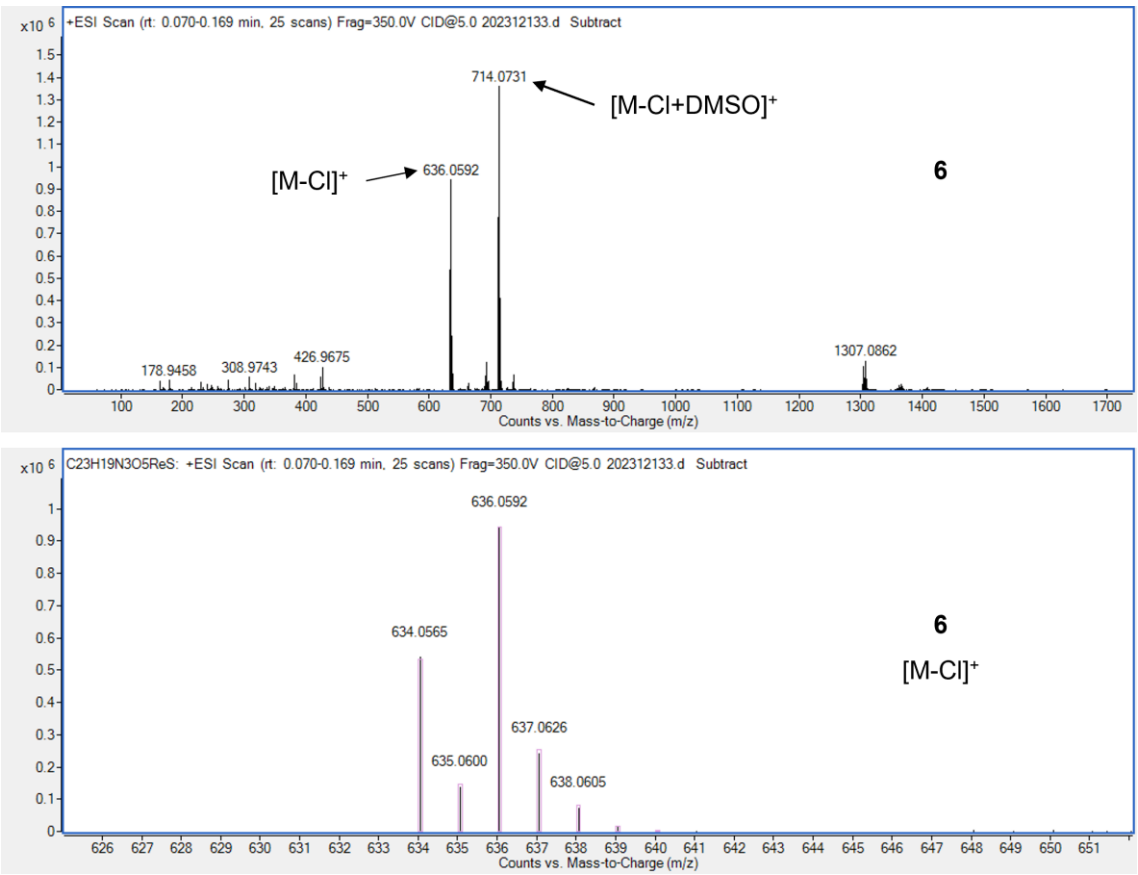


Figura A2.77. Espectro ESI-MS con modo ion. positiva del complejo **6** en DMSO.

7.1. Estabilidad en RPMI (5% DMSO)

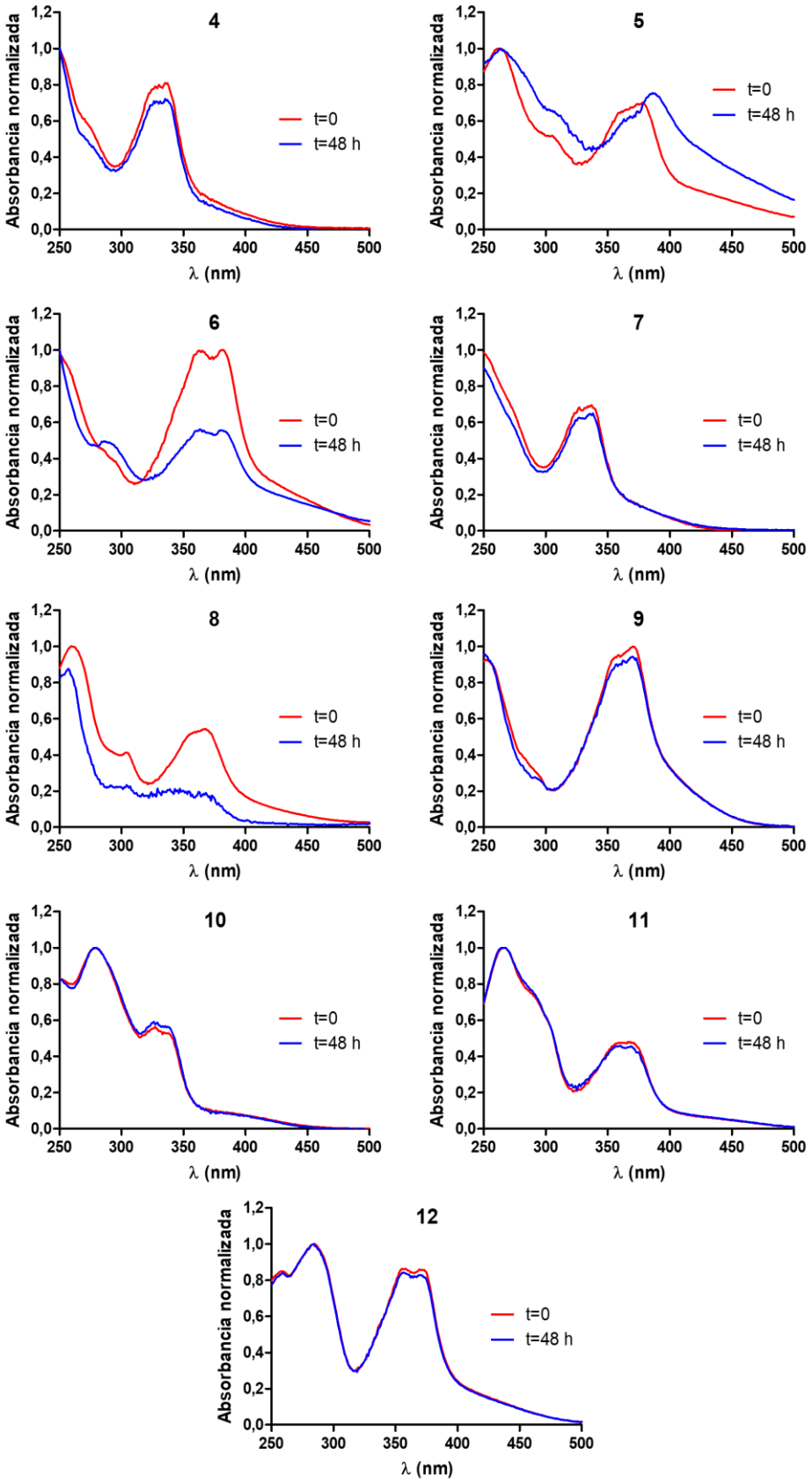


Figura A2.78. Espectro UV/Vis de los complejos (10 µM) en RPMI (5% DMSO) a t=0 y después de 48 h incubados a 37 ºC.

8. Estudios biológicos

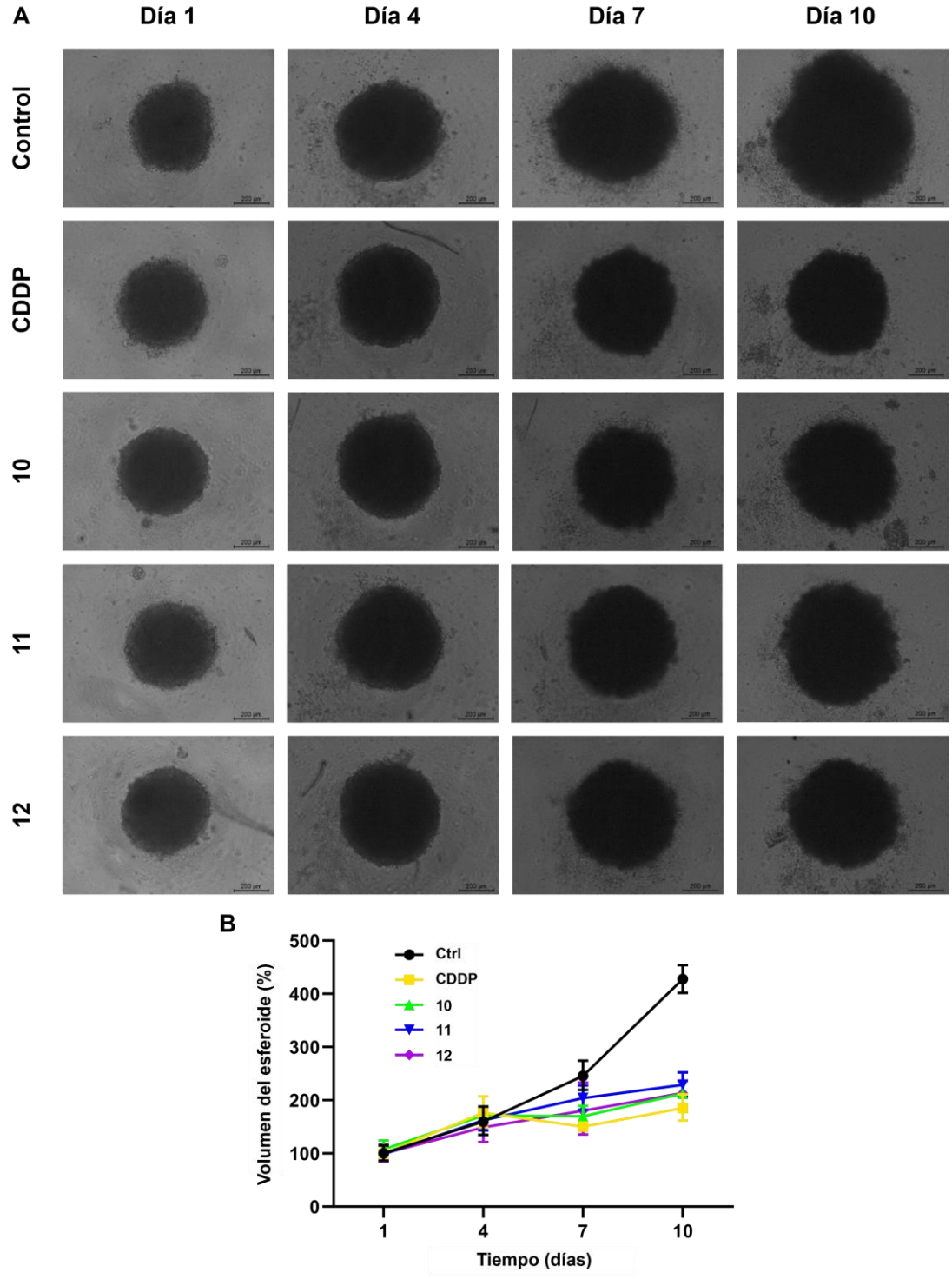


Figura A2.79. (A) Imágenes de microscopia representativas de los esferoides de células HeLa tratados con **10**–**12** y cisplatino a sus concentraciones del IC_{50} durante 2 h en los días 1, 4 y 7. Barra de escala: 200 µm. (B) Volumen normalizado de los esferoides multicelulares HeLa durante un periodo de 10 días.

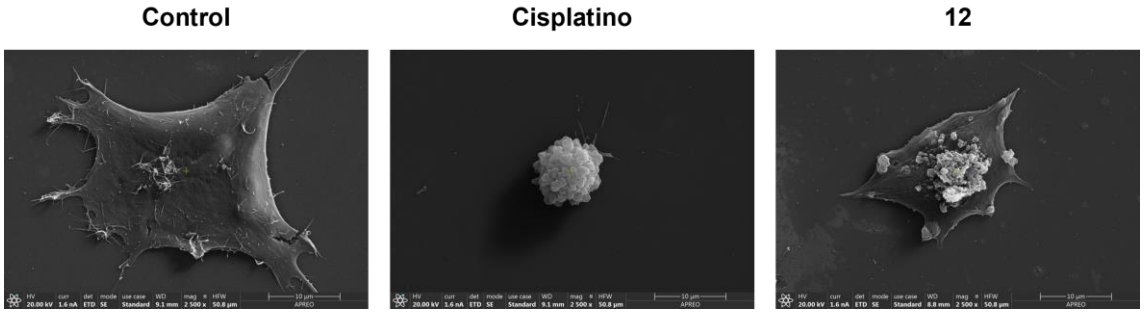


Figura A2.80. Imágenes de SEM de células A2780. Resultados obtenidos para cisplatino y **12** (apoptosis y piroptosis, respectivamente). Barra de escala 10 µm.

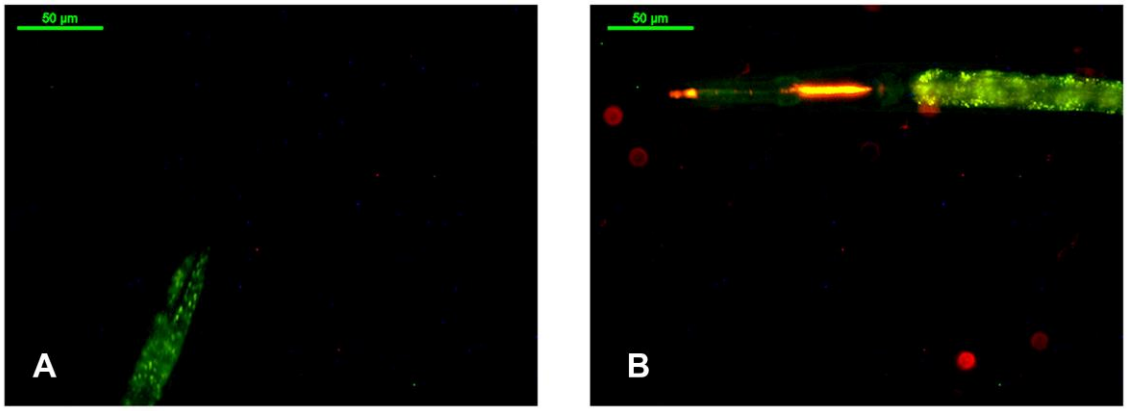


Figura A2.81. Ingestión y asimilación de **12** por parte de *C. elegans*. Imágenes representativas de los nematodos bajo microscopia de fluorescencia. (A) Animal control. (B) Nematodo tratado con **12** (150 µM). Barra de escala: 50 µm.

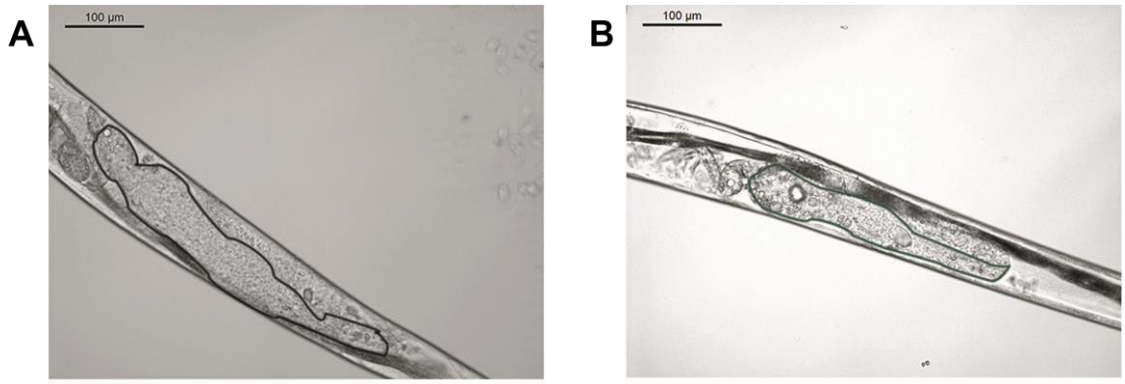


Figura A2.82. Efecto antitumoral de **12** en la cepa JK1466 de *C. elegans*. (A-B) Imágenes representativas de las gónadas de la cepa JK1466 de *C. elegans*. (A) Nematodo tratado con DMSO (control). (B) Animal tratado con **12** (150 µM). Barra de escala: 100 µm.

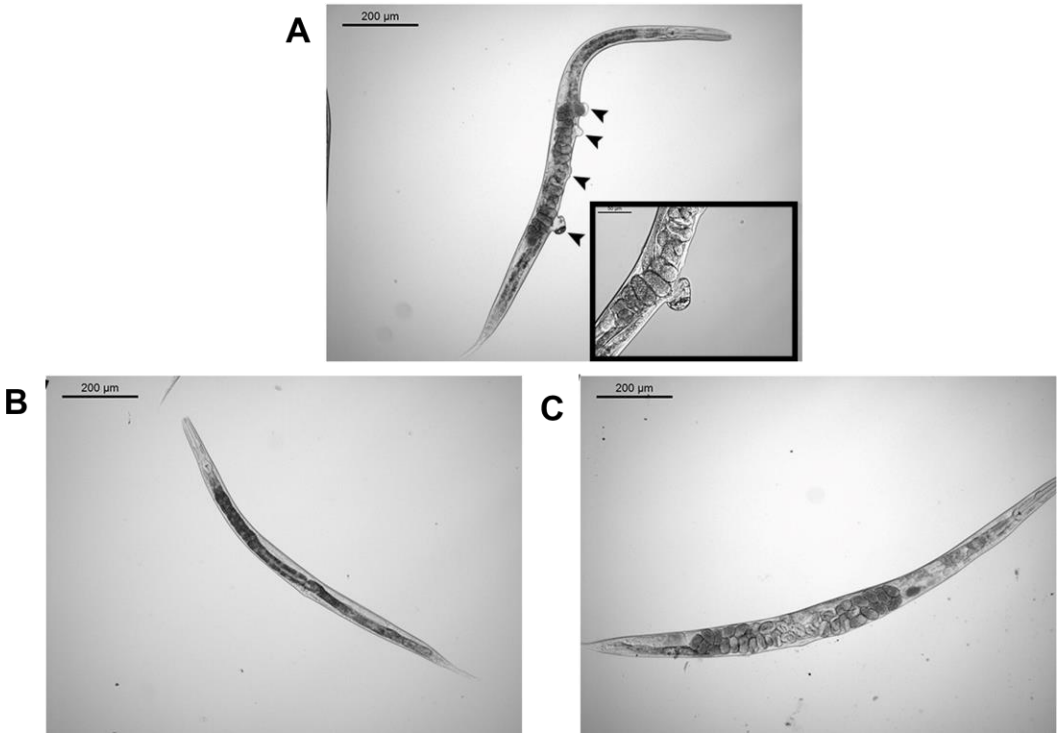


Figura A2.83. Efecto antitumoral de **12** en la cepa MT2124 de *C. elegans*. (A-C) Imágenes representativas de *C. elegans* MT2124. (A) Nematodo tratado con DMSO (control), las puntas de flecha marcan la vulva y pseudovulvas. En el recuadro se muestra una ampliación de la vulva saliente. (B) Animal tratado con cisplatino (50 µM). (C) Animal tratado con **12** (150 µM). Barra de escala: 200 µm.

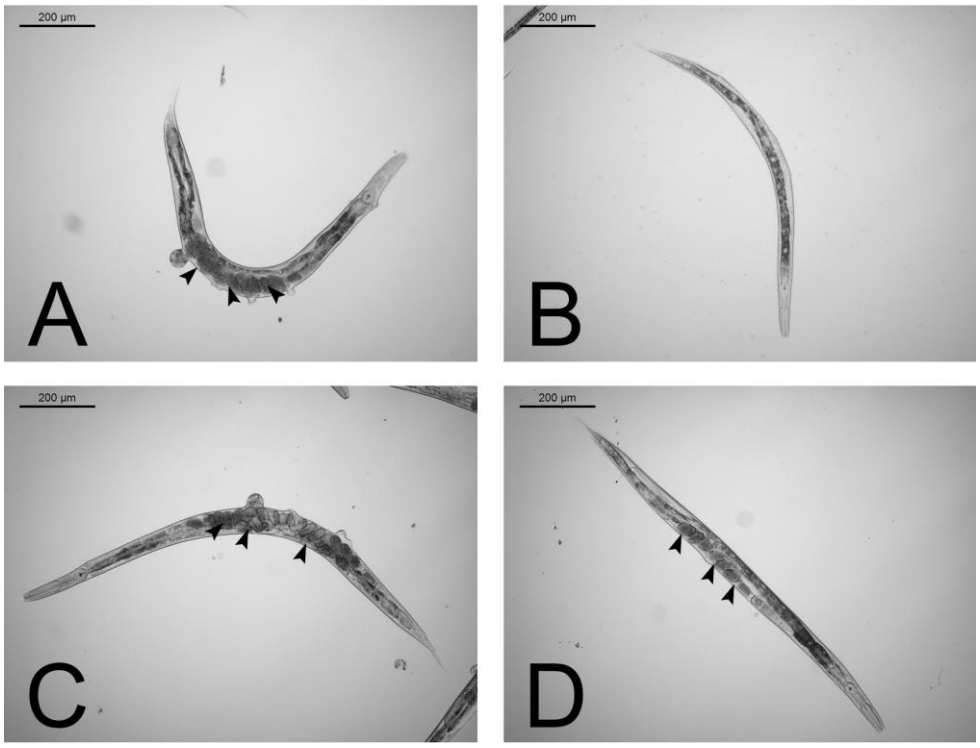


Figura A2.84. Efectos de **12** y cisplatino en el tamaño de *C. elegans* MT2124. (A-D) Imágenes representativas de *C. elegans* MT2124 tratados con los complejos durante 72 h. (A) Nematodo tratado con agua. Las puntas de flecha marcan los ovocitos y los huevos. (B) Animal tratado con cisplatino (100 µM). (C) Nematodo tratado con DMSO. (D) Gusano tratado con **12** (100 µM). Barra de escala: 200 µm.

9. Bibliografía

(1) Spek, A. L. Structure Validation in Chemical Crystallography. *Acta Cryst D* **2009**, *65* (2), 148–155. https://doi.org/10.1107/S090744490804362X.
(2) Spek, A. L. A Multipurpose Crystallographic Tool. *Utrecht, The Netherlands* **2005**.
(3) Yang, X.-J.; Drepper, F.; Wu, B.; Sun, W.-H.; Haehnel, W.; Janiak, C. From Model Compounds to Protein Binding: Syntheses, Characterizations and Fluorescence Studies of $[Ru^{II}(Bipy)(Terpy)L]^{2+}$ Complexes (Bipy= 2,2′-Bipyridine; Terpy = 2,2′:6′,2″-Terpyridine; L = Imidazole, Pyrazole and Derivatives, Cytochrome c). *Dalton Trans.* **2005**, No. 2, 256–267. https://doi.org/10.1039/B414999H.
(4) Janiak, C. A Critical Account on π–π Stacking in Metal Complexes with Aromatic Nitrogen-Containing Ligands †. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, No. 21, 3885–3896. https://doi.org/10.1039/b003010o.
(5) Nishio, M. The CH/π Hydrogen Bond in Chemistry. Conformation, Supramolecules, Optical Resolution and Interactions Involving Carbohydrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (31), 13873. https://doi.org/10.1039/c1cp20404a.
(6) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Honda, K.; Tsuboyama, S.; Suezawa, H. CH/π Hydrogen Bonds in Organic and Organometallic Chemistry. *CrystEngComm* **2009**, *11* (9), 1757. https://doi.org/10.1039/b902318f.
(7) Janiak, C.; Temizdemir, S.; Dechert, S.; Deck, W.; Girgsdies, F.; Heinze, J.; Kolm, M. J.; Scharmann, T. G.; Zipffel, O. M. Binary [Hydrotris(indazol-1-yl)borato]metal Complexes, M(Tp4Bo)2[1] with M = Fe, Co, Ni, Cu, and Zn: Electronic Properties and Solvent-Dependent Framework Structures through C−H···π Interactions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *2000* (6), 1229–1241. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(200006)2000:6<1229::AID-EJIC1229>3.0.CO;2-P.

ANEXO II

ÍNDICE

1. Espectros de RMN.....A59

1.1. Compuesto 16 .....A59

1.2. Compuesto 22 .....A62

1.3. Compuesto 23 .....A65

1.4. Compuesto 24 .....A69

1.5. Compuesto 25 .....A72

1.6. Compuesto 26 .....A76

1.7. Compuesto 27 .....A79

1.8. Compuesto 28 .....A82

1.9. Compuesto 29 .....A85

1.10. Compuesto 30.....A88

1.11. Valores de δ (ppm) para todas las señales de los distintos compuestos .A92

1.12. Espectros RMN ^{13}C comparativos.....A96

2. Espectrometría de masas A98

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS).....A104

4. Propiedades fotofísicas.....A107

5. Estudios de estabilidad A108

5.1. Estabilidad en presencia de biomoléculas A111

6. Estudio de hidrólisis.....A112

7. Estudios de agregación A114

8. Estudios biológicos A118

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 16

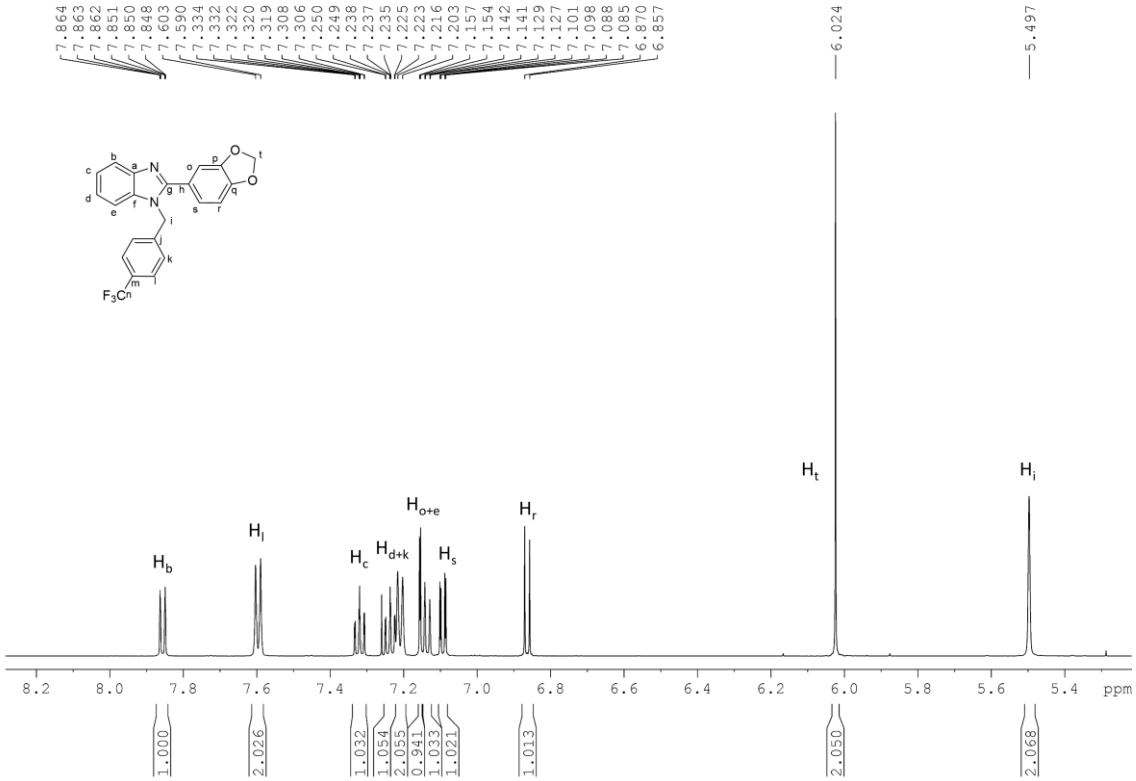


Figura A3.1. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **16** en $CDCl_3$.

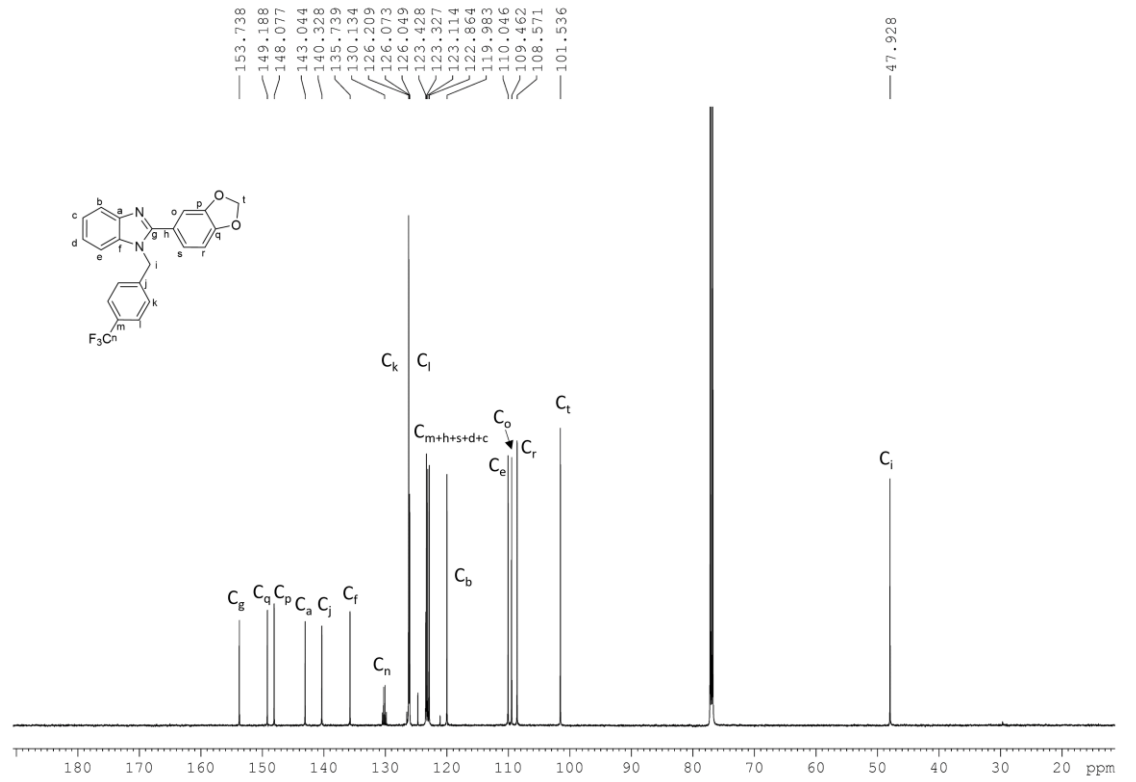


Figura A3.2. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **16** en $CDCl_3$.

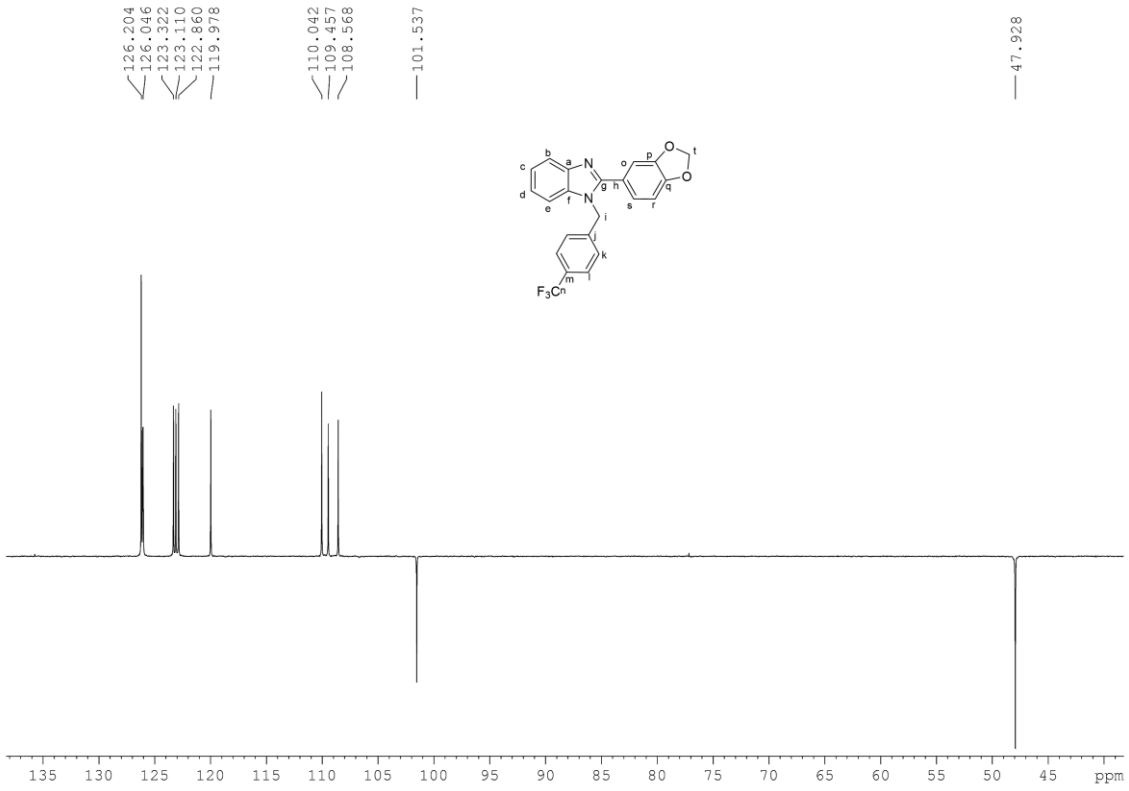


Figura A3.3. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **16** en $CDCl_3$.

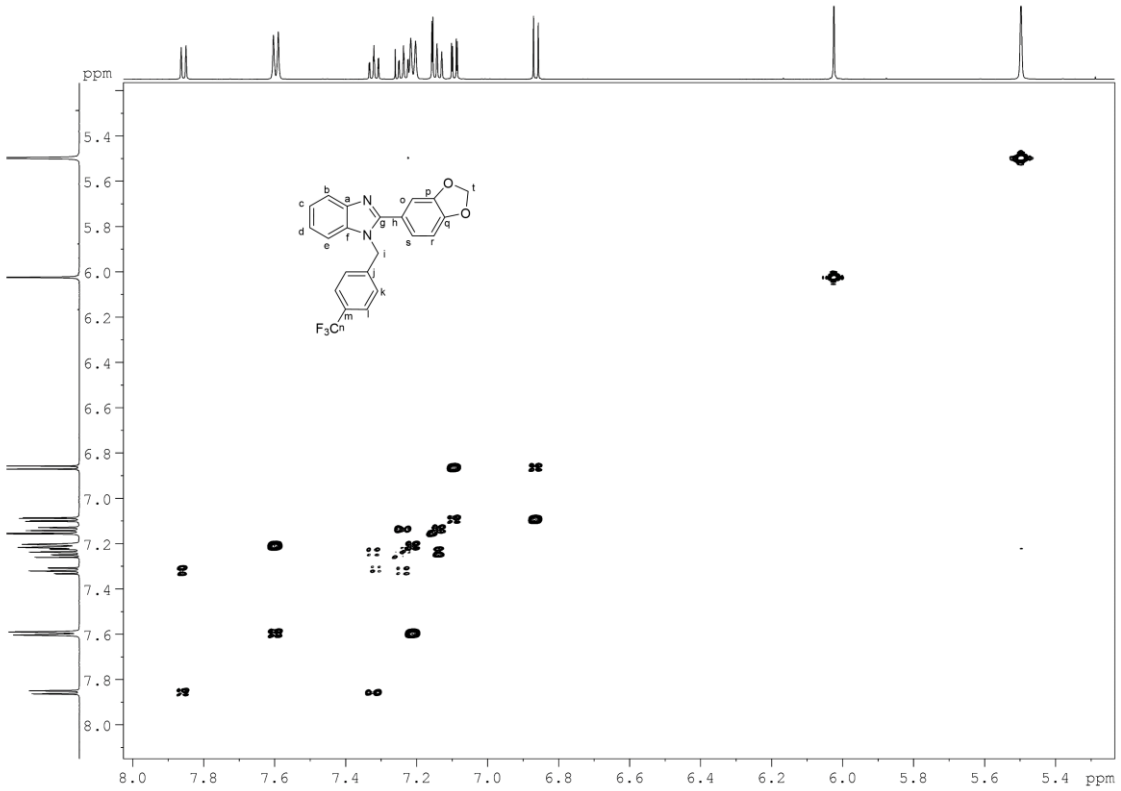


Figura A3.4. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **16** en $CDCl_3$.

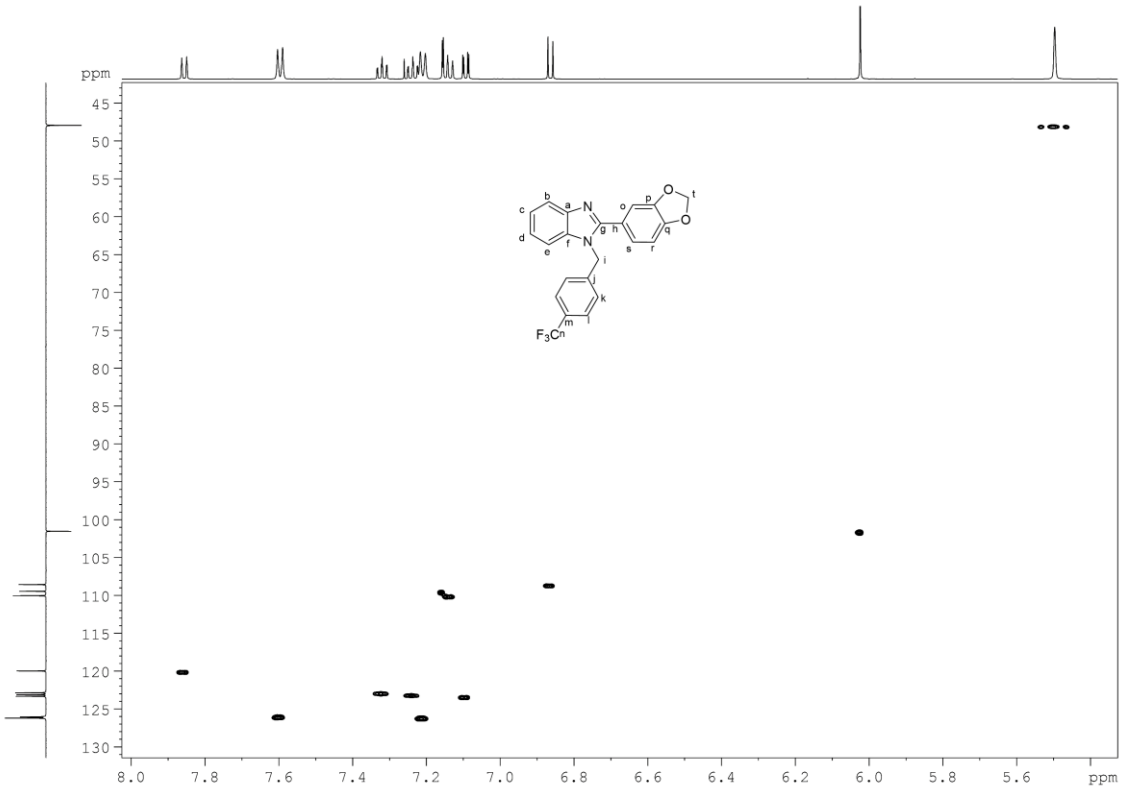


Figura A3.5. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **16** en $CDCl_3$.

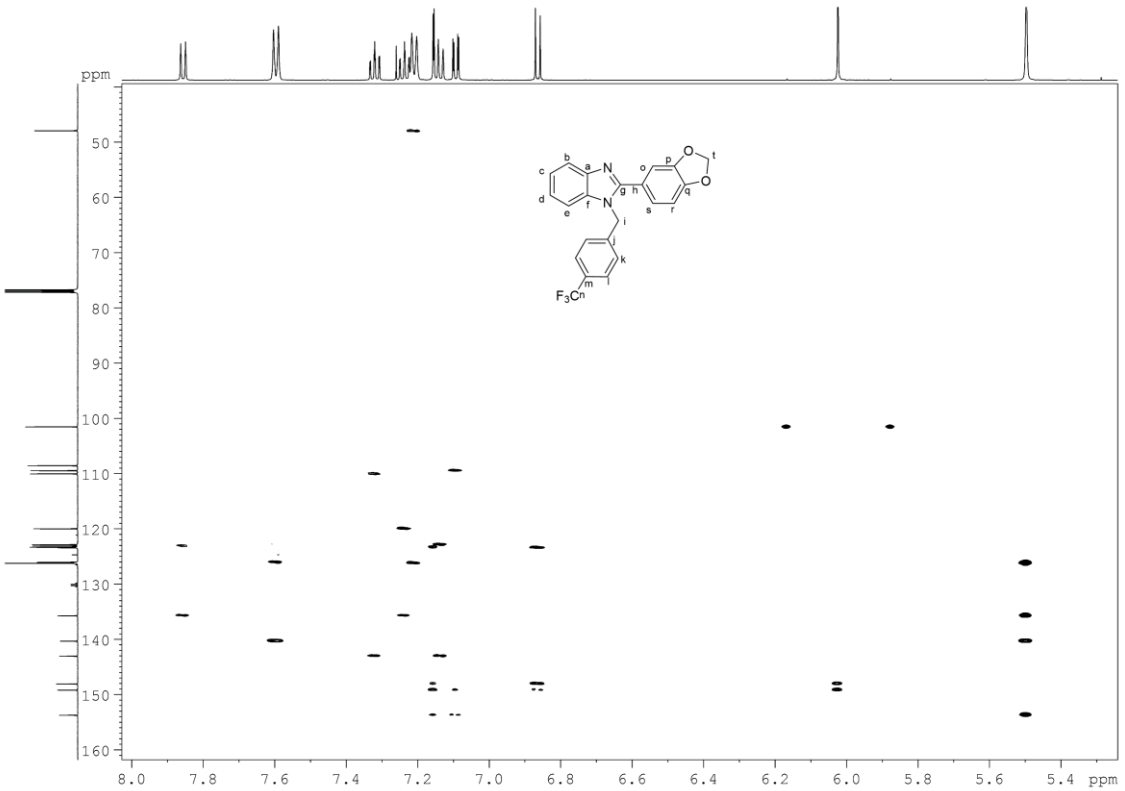


Figura A3.6. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **16** en $CDCl_3$.

1.2. Compuesto 22

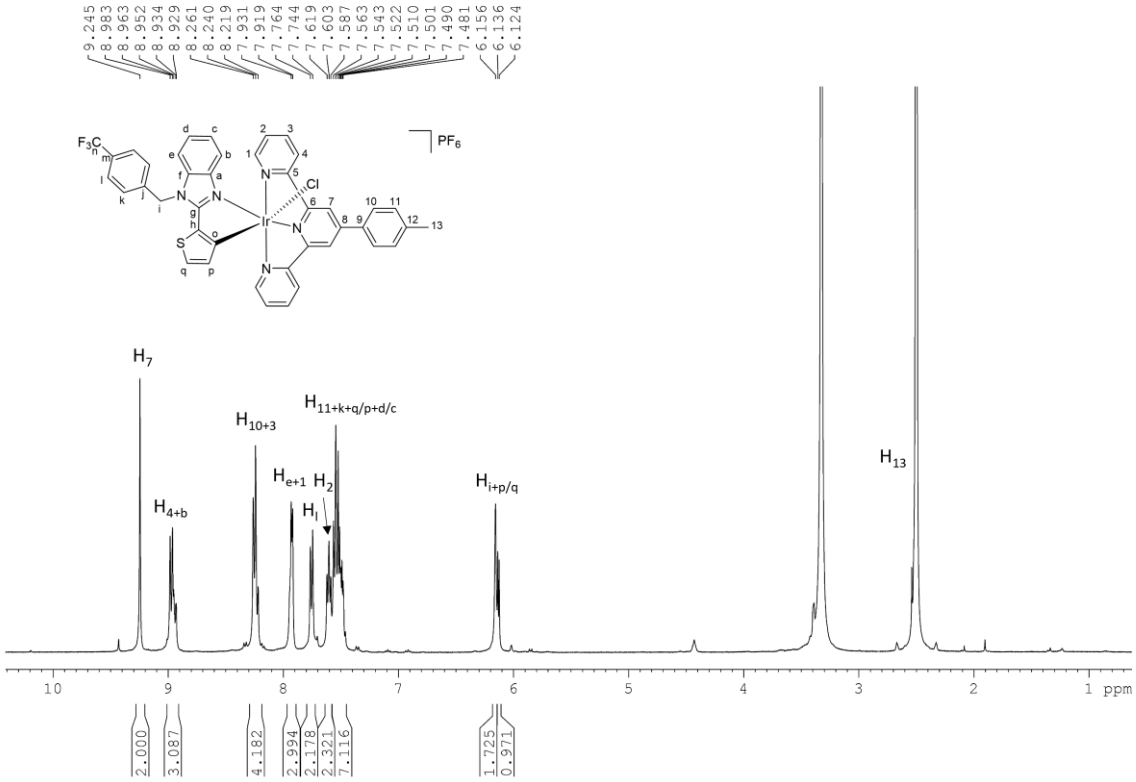


Figura A3.7. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **22** en DMSO-d_6.

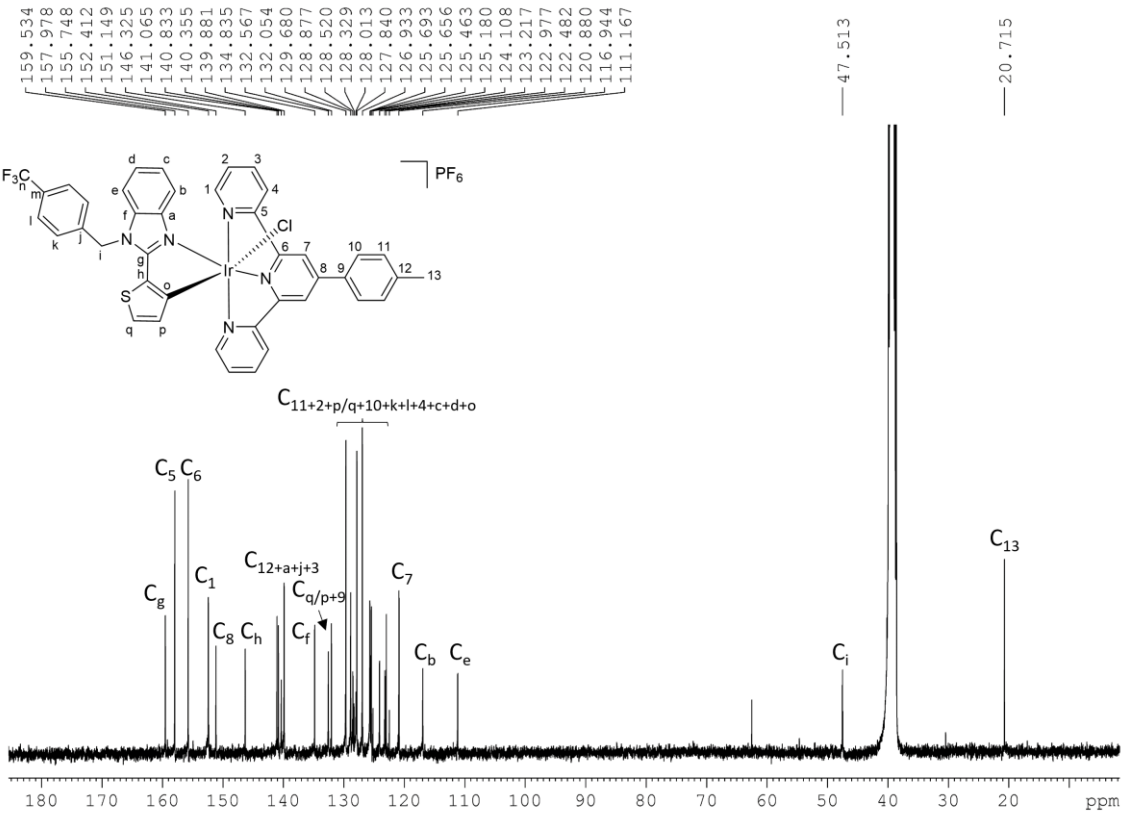


Figura A3.8. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **22** en DMSO-d_6.

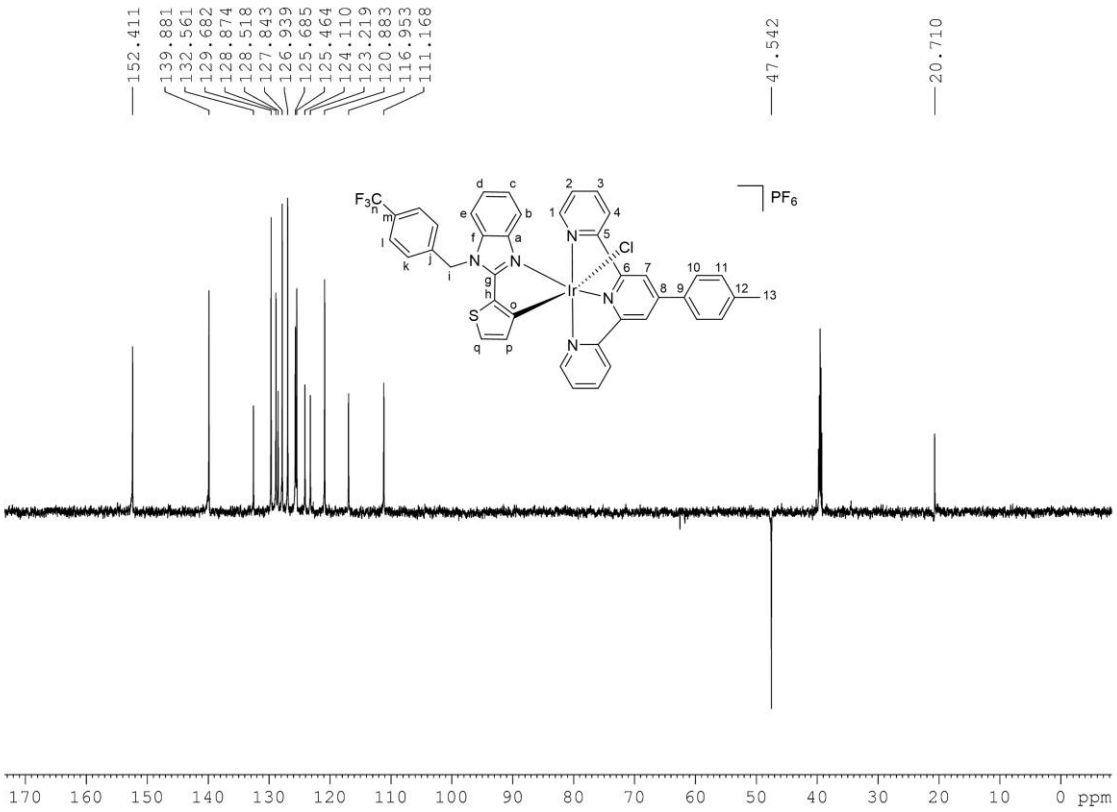


Figura A3.9. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **22** en DMSO-d_6.

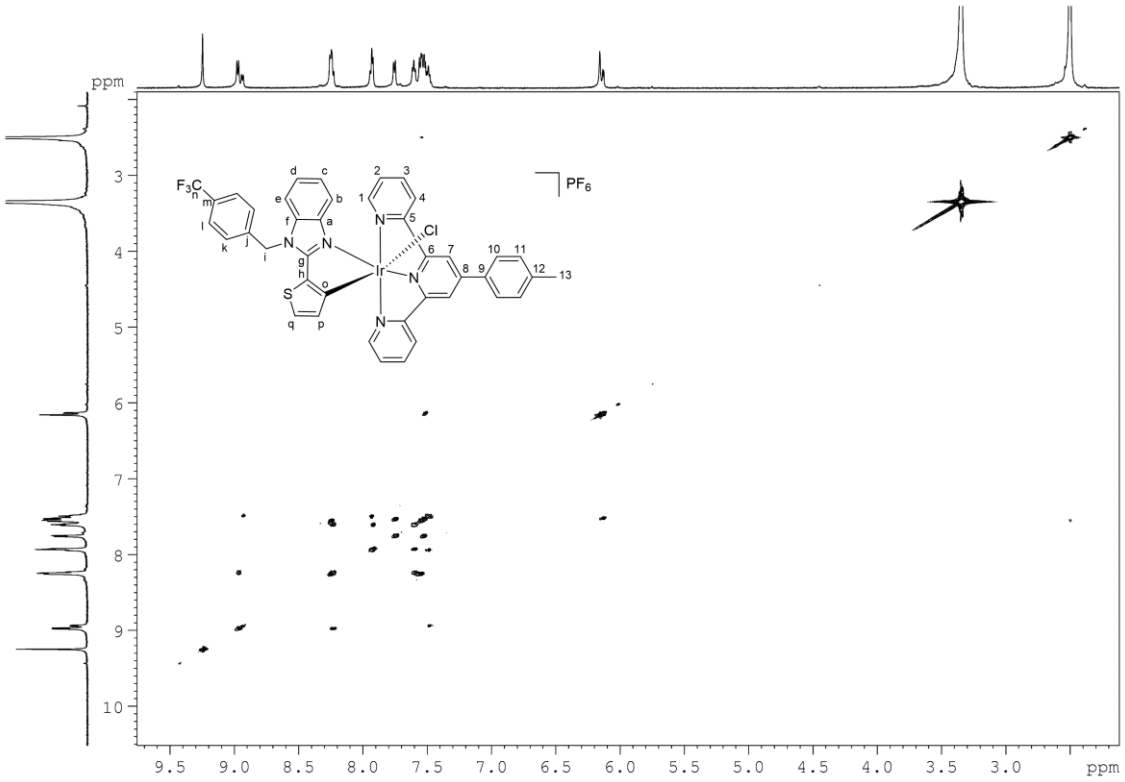


Figura A3.10. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **22** en DMSO-d_6.

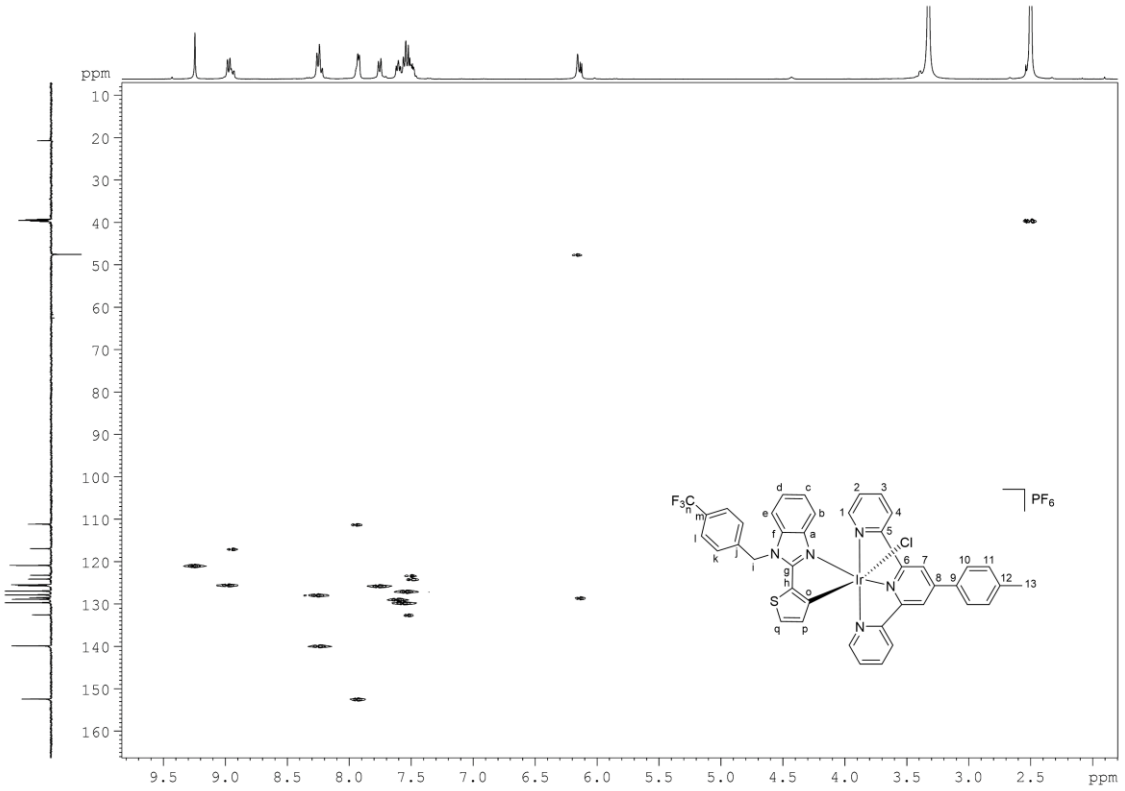


Figura A3.11. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **22** en DMSO-d_6.

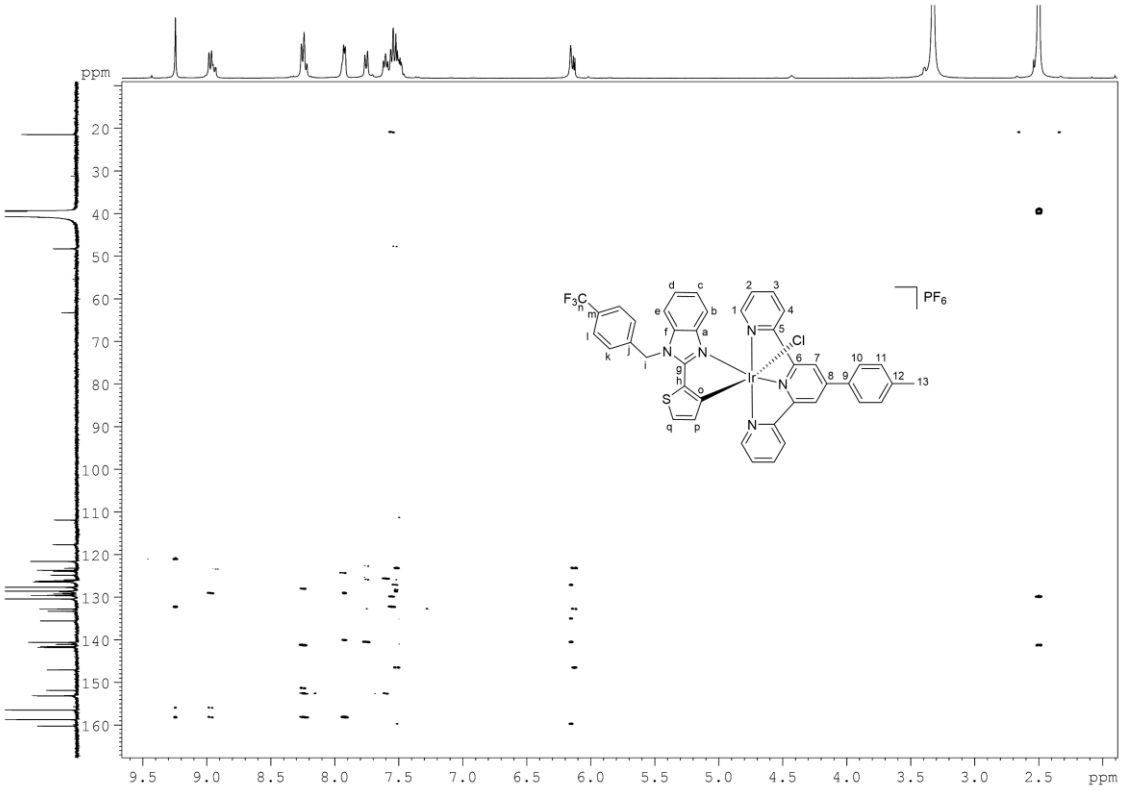


Figura A3.12. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **22** en DMSO-d_6.

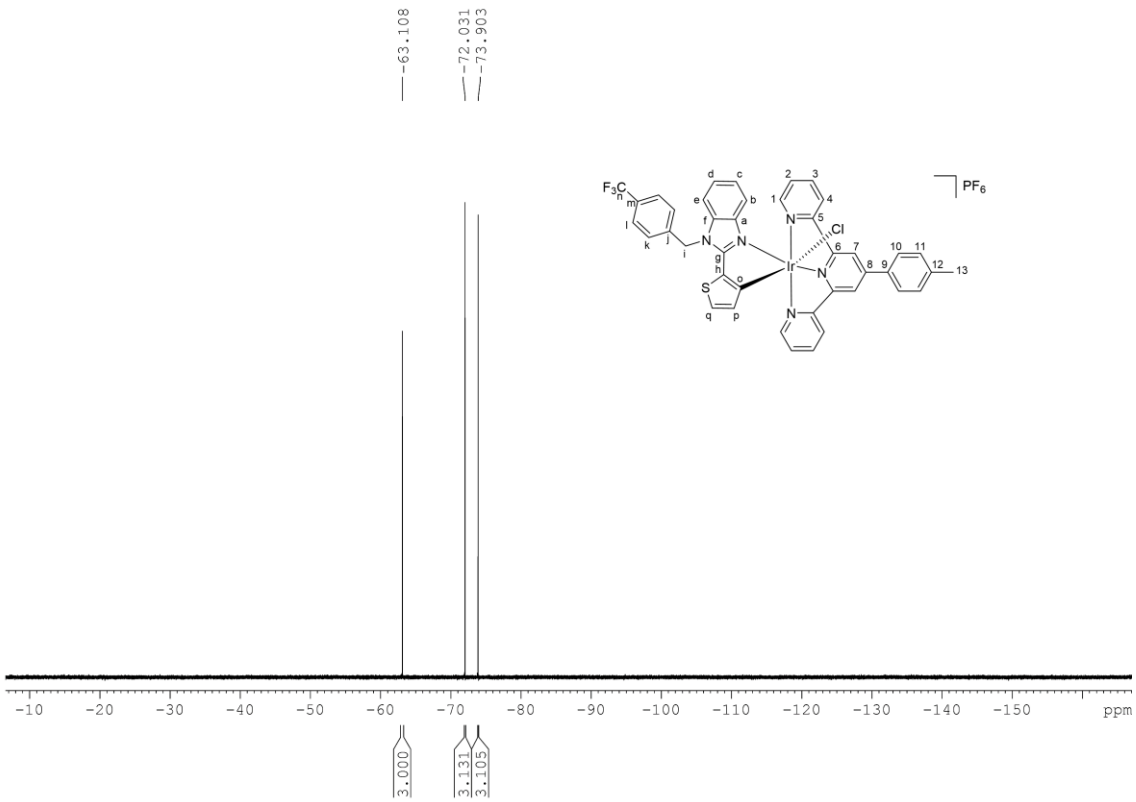


Figura A3.13. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **22** en DMSO-d_6.

1.3. Compuesto 23

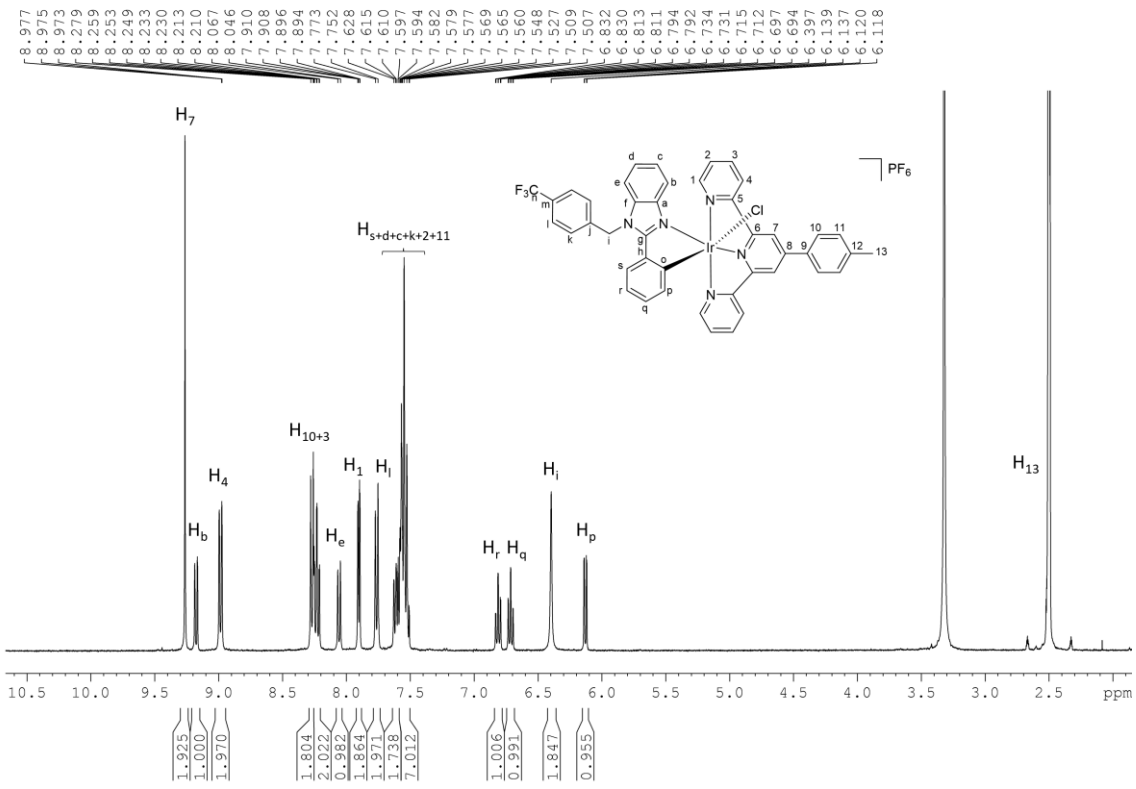


Figura A3.14. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **23** en DMSO-d_6.

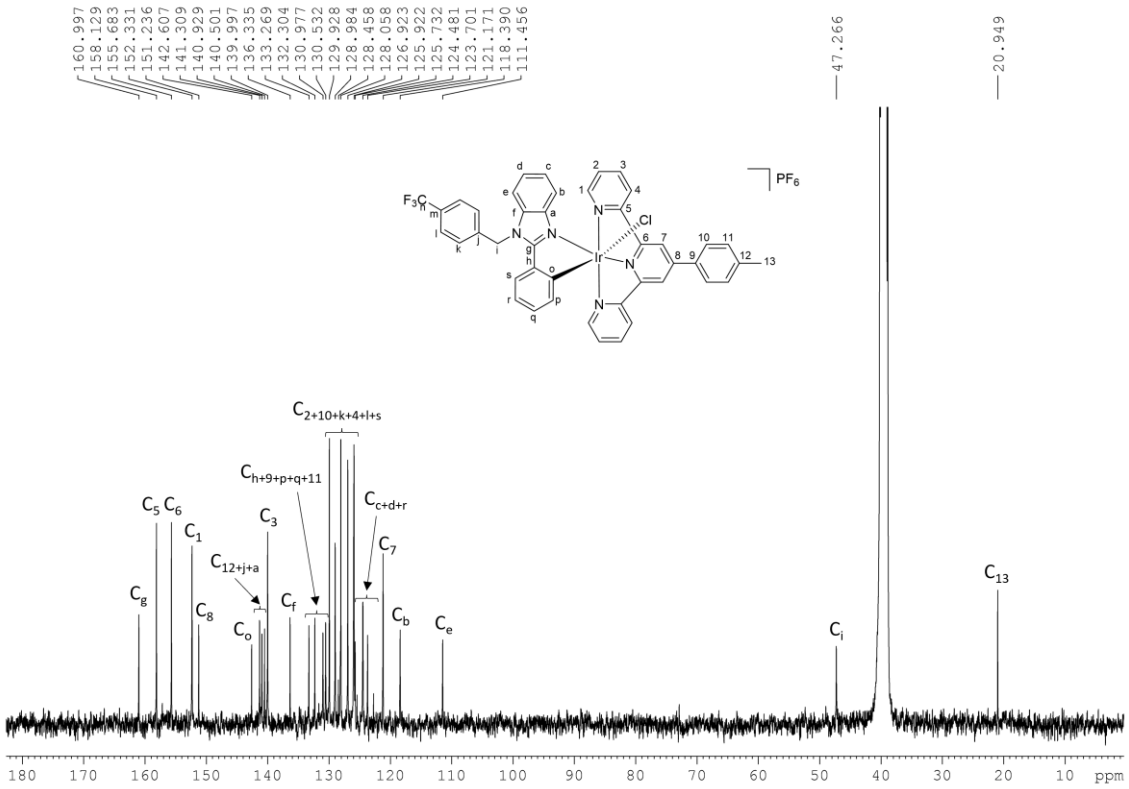


Figura A3.15. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **23** en DMSO-d_6.

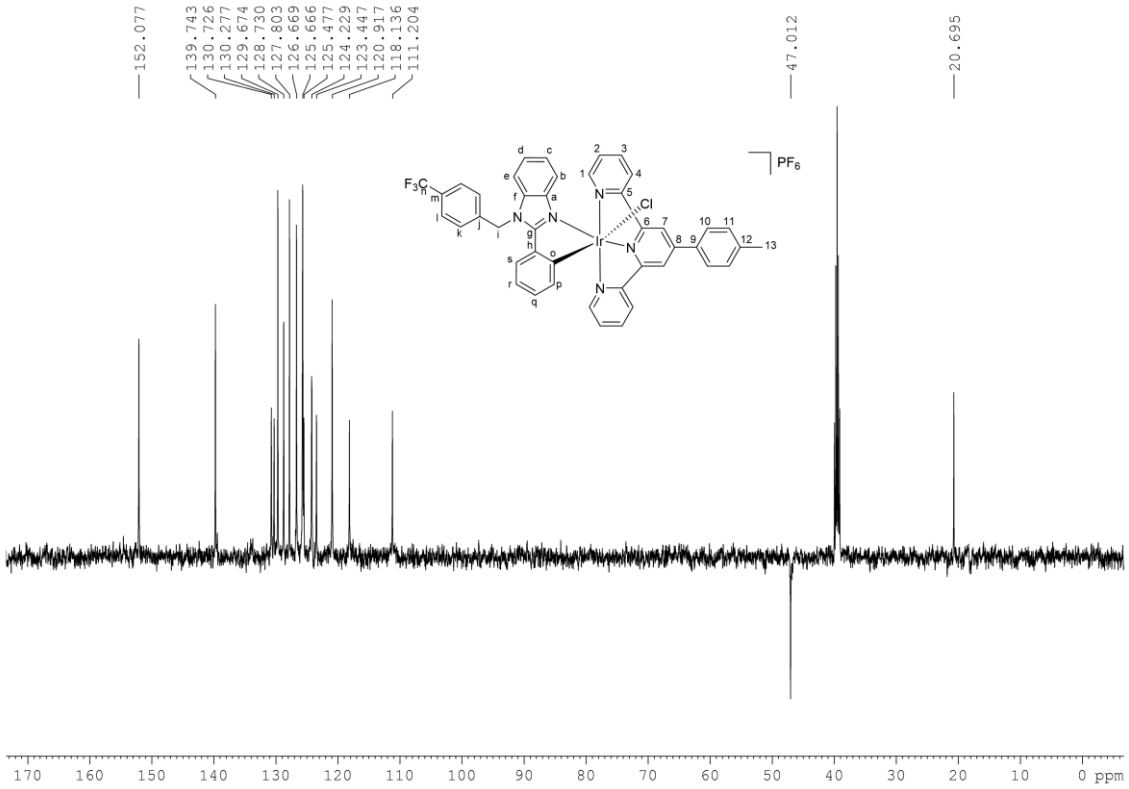


Figura A3.16. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **23** en DMSO-d_6.

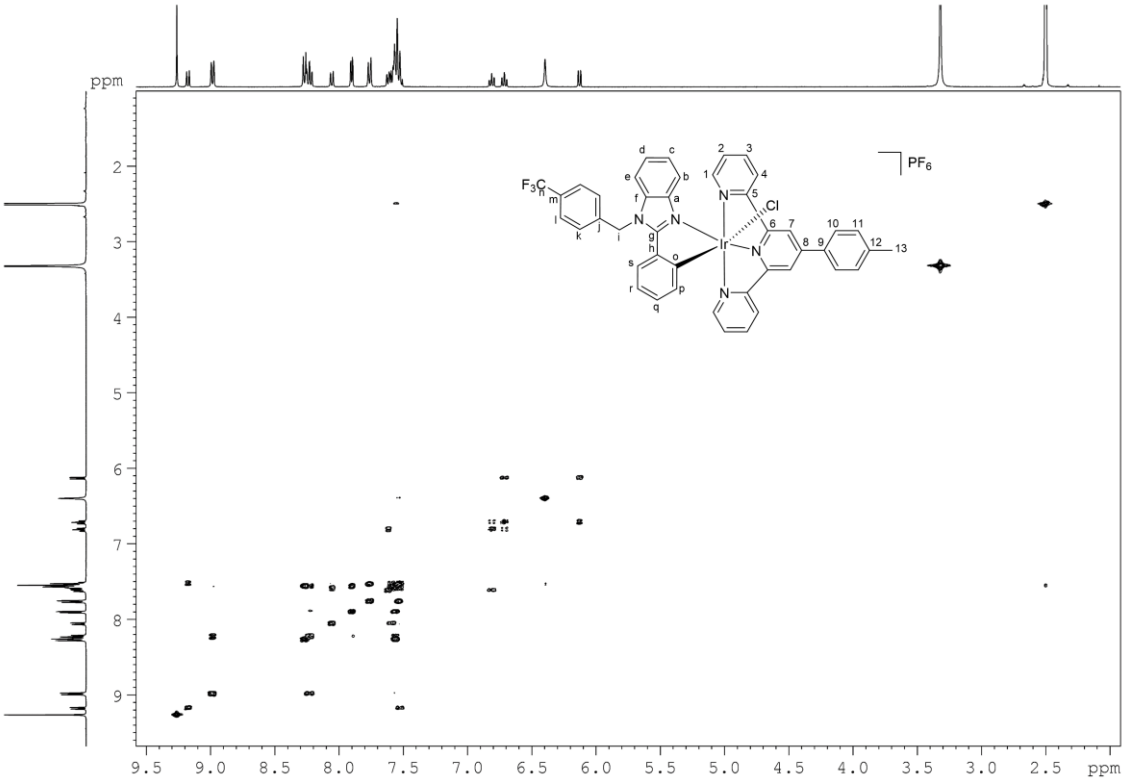


Figura A3.17. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **23** en DMSO-d_6.

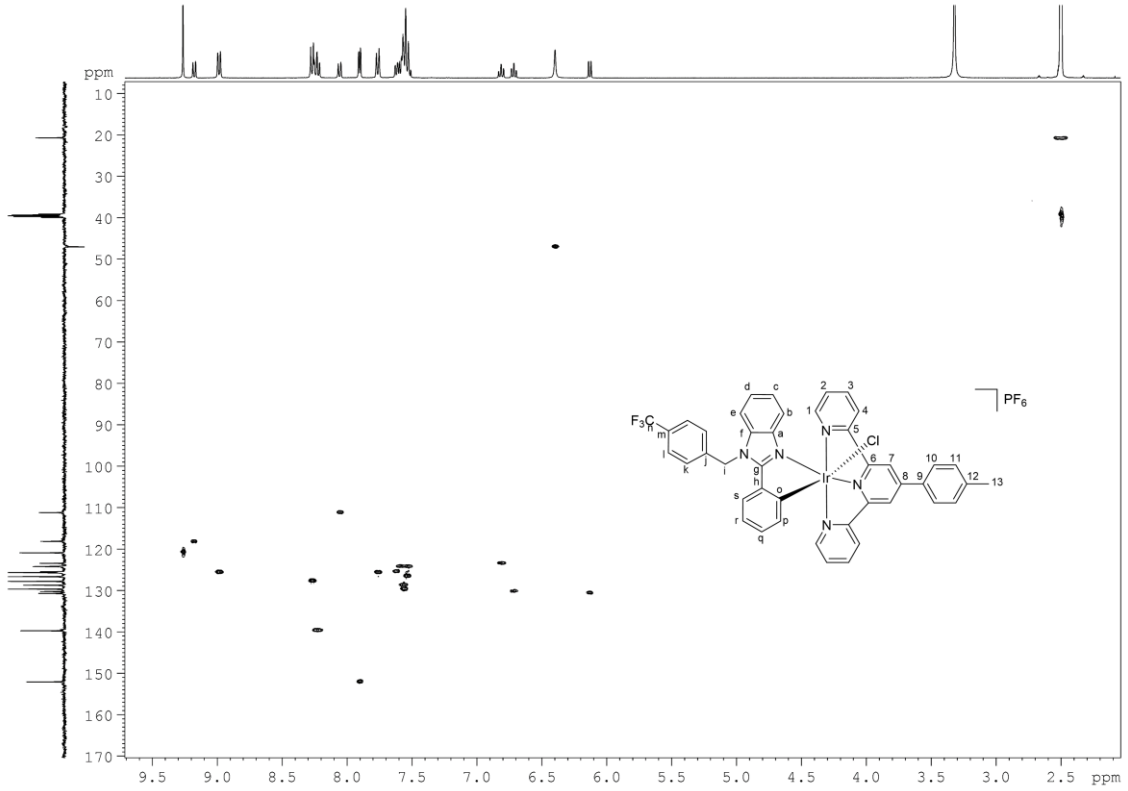


Figura A3.18. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **23** en DMSO-d_6.

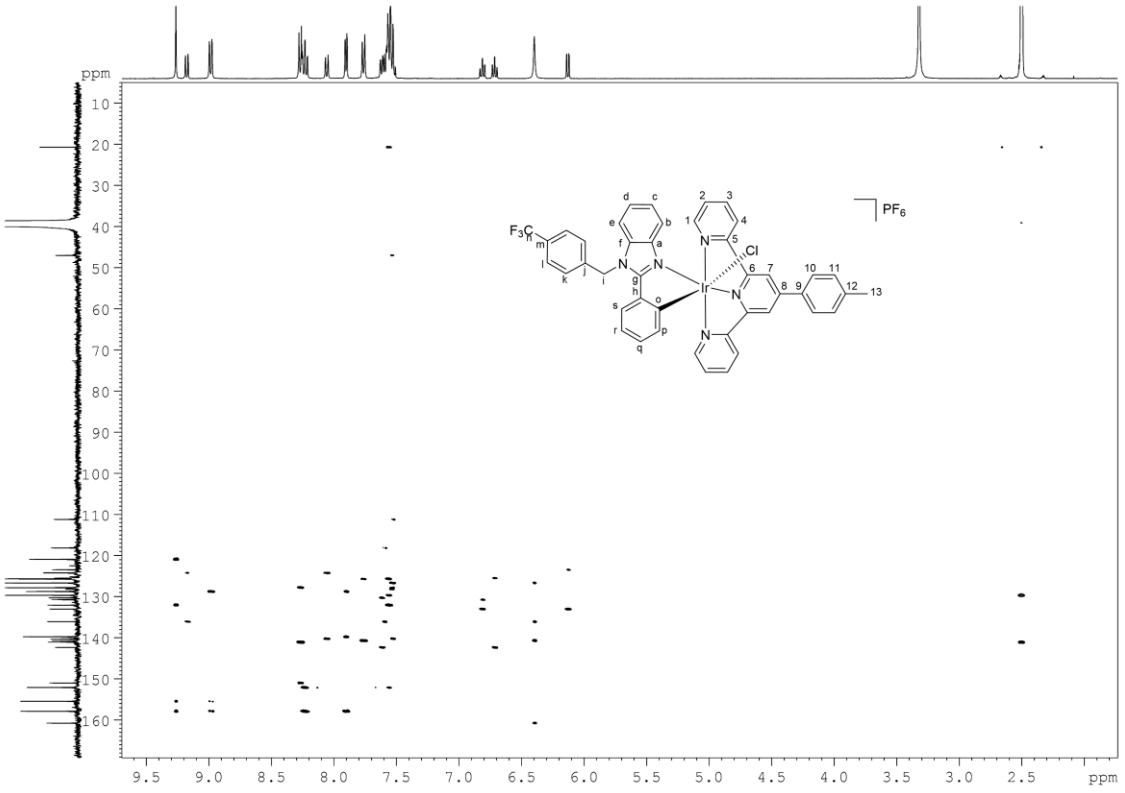


Figura A3.19. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **23** en DMSO-d_6.

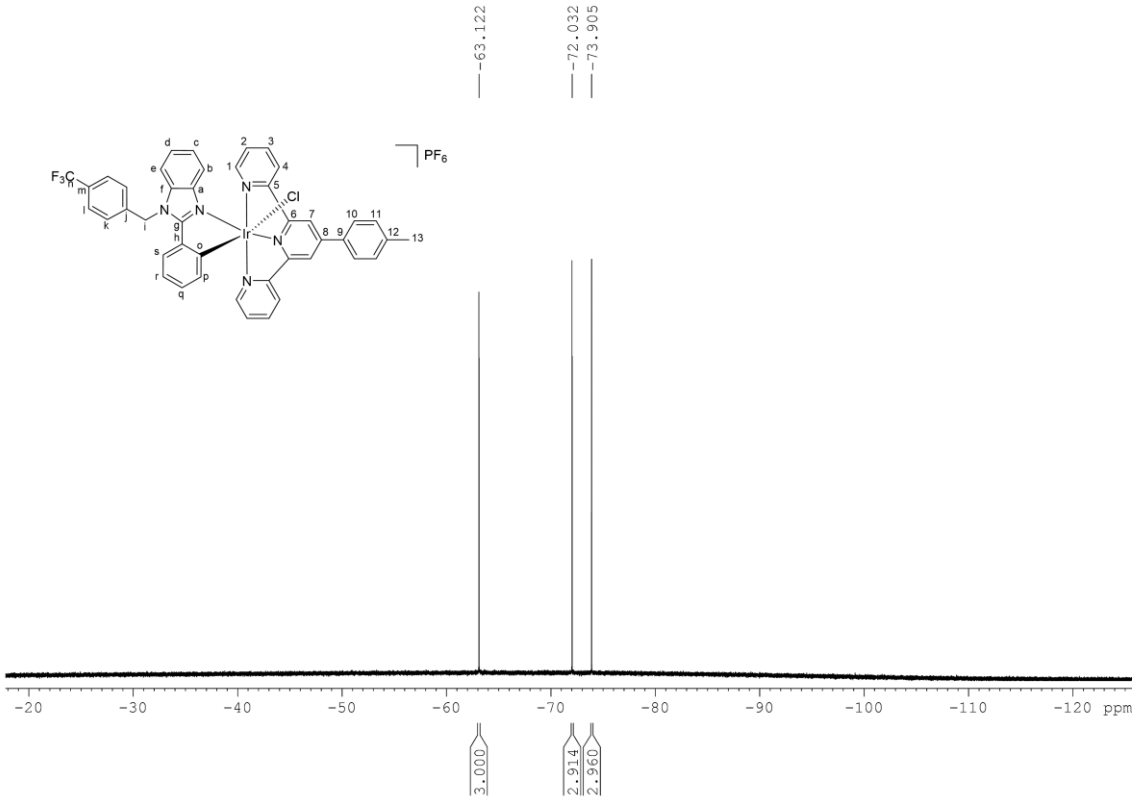


Figura A3.20. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **23** en DMSO-d_6.

1.4. Compuesto 24

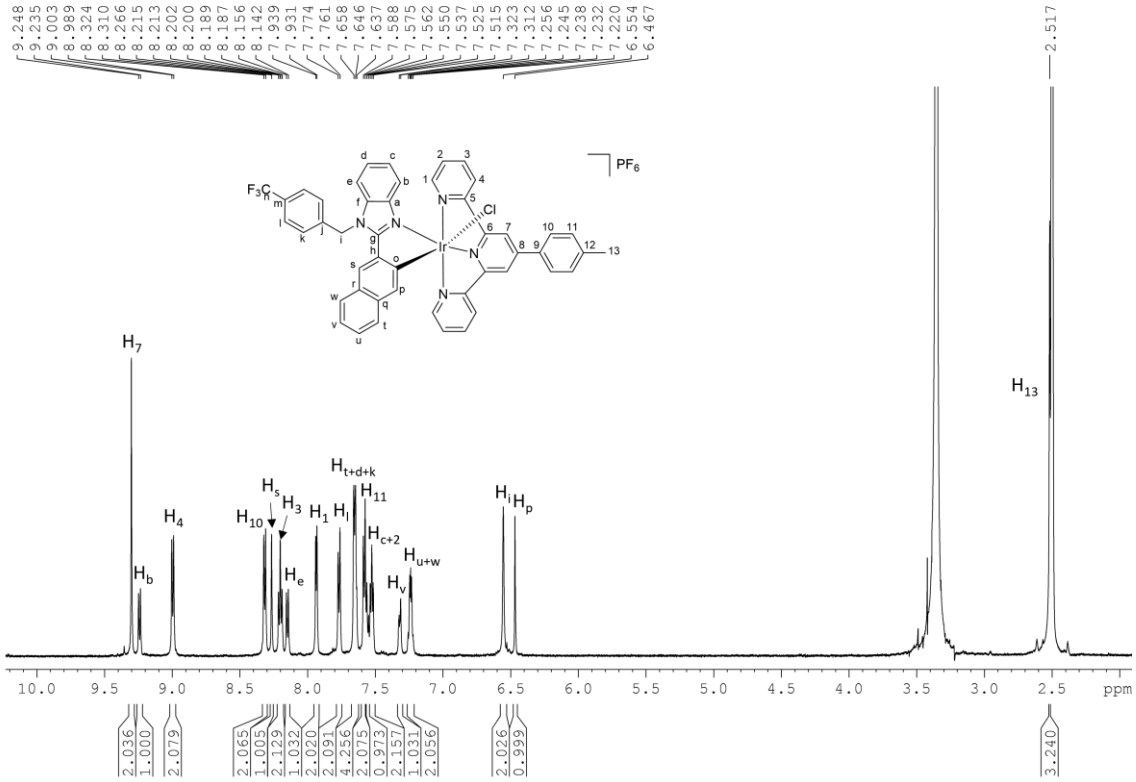


Figura A3.21. Espectro de ^{1}H-RMN 300 MHz del compuesto **24** en DMSO-d_6.

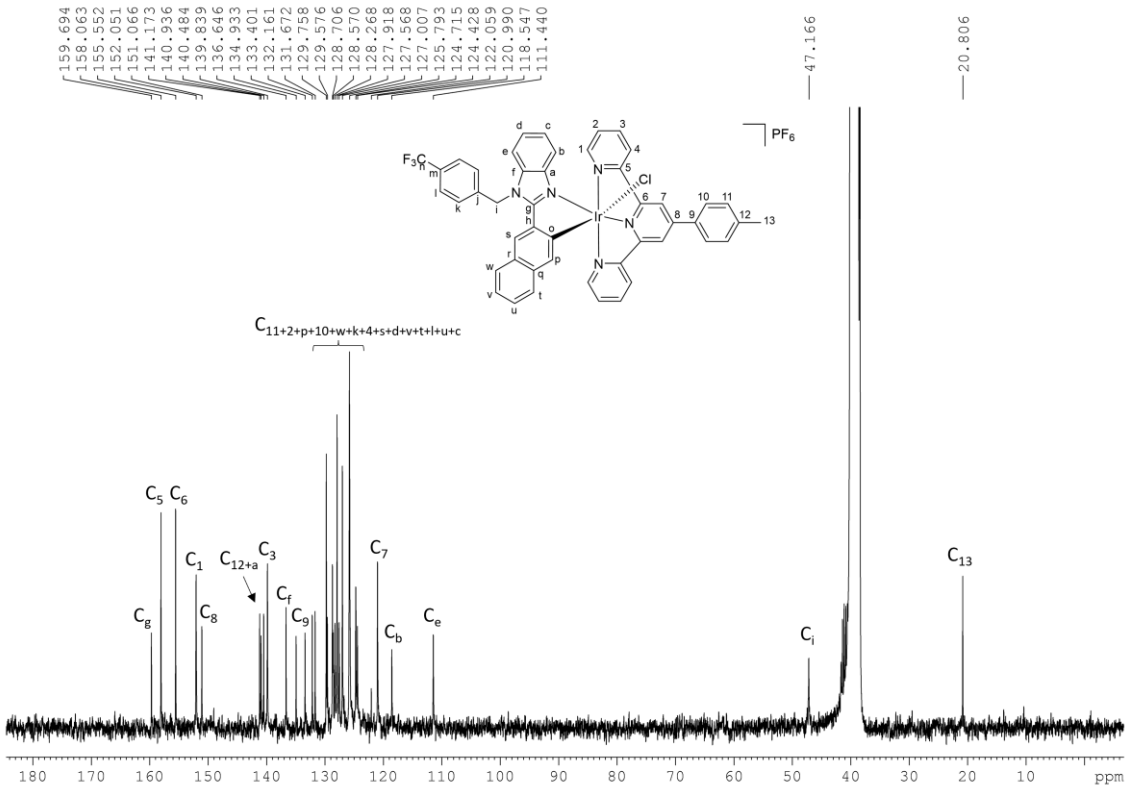


Figura A3.22. Espectro de ^{13}C-RMN 75 MHz del compuesto **24** en DMSO-d_6.

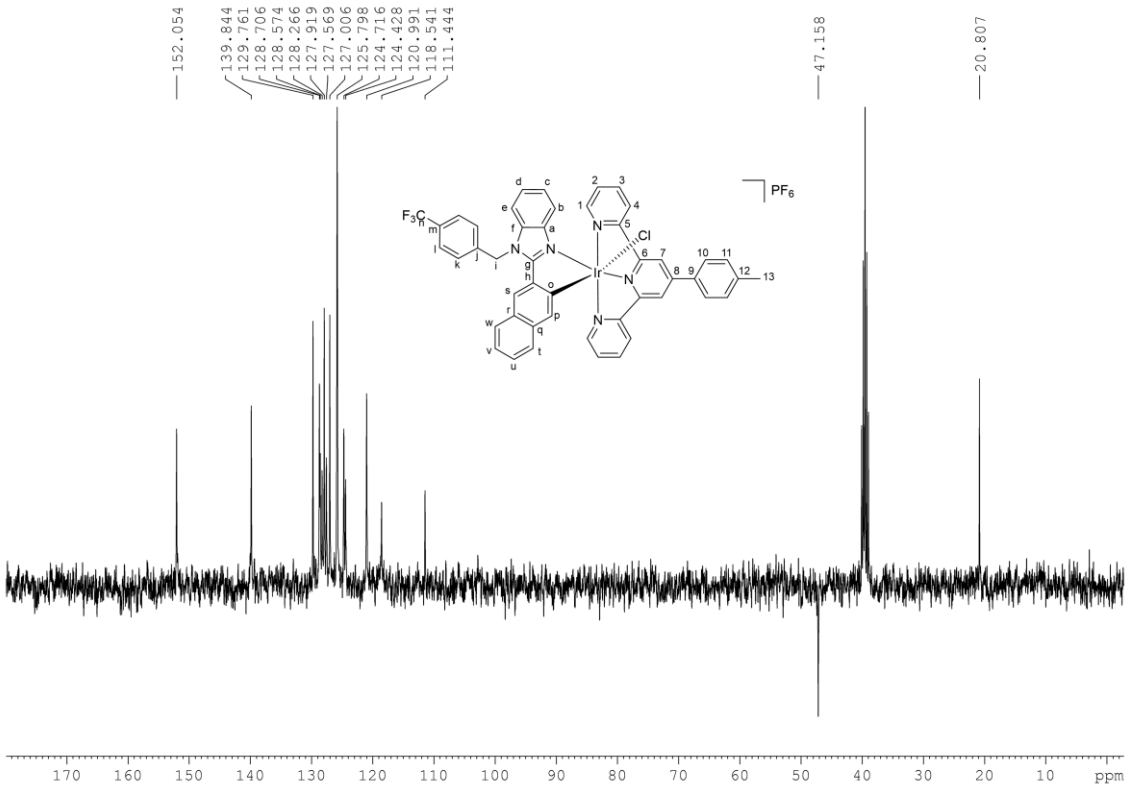


Figura A3.23. Espectro de 135-DEPT 75 MHz del compuesto **24** en DMSO-d_6.

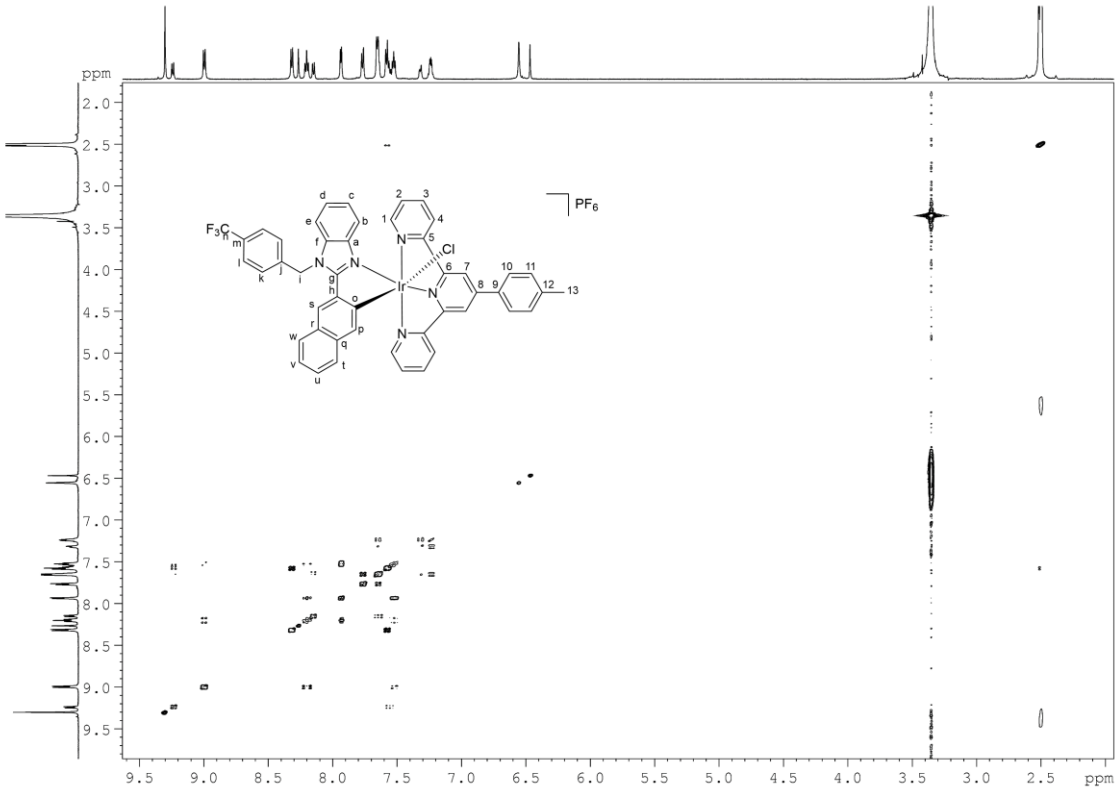


Figura A3.24. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 300 MHz del compuesto **24** en DMSO-d_6.

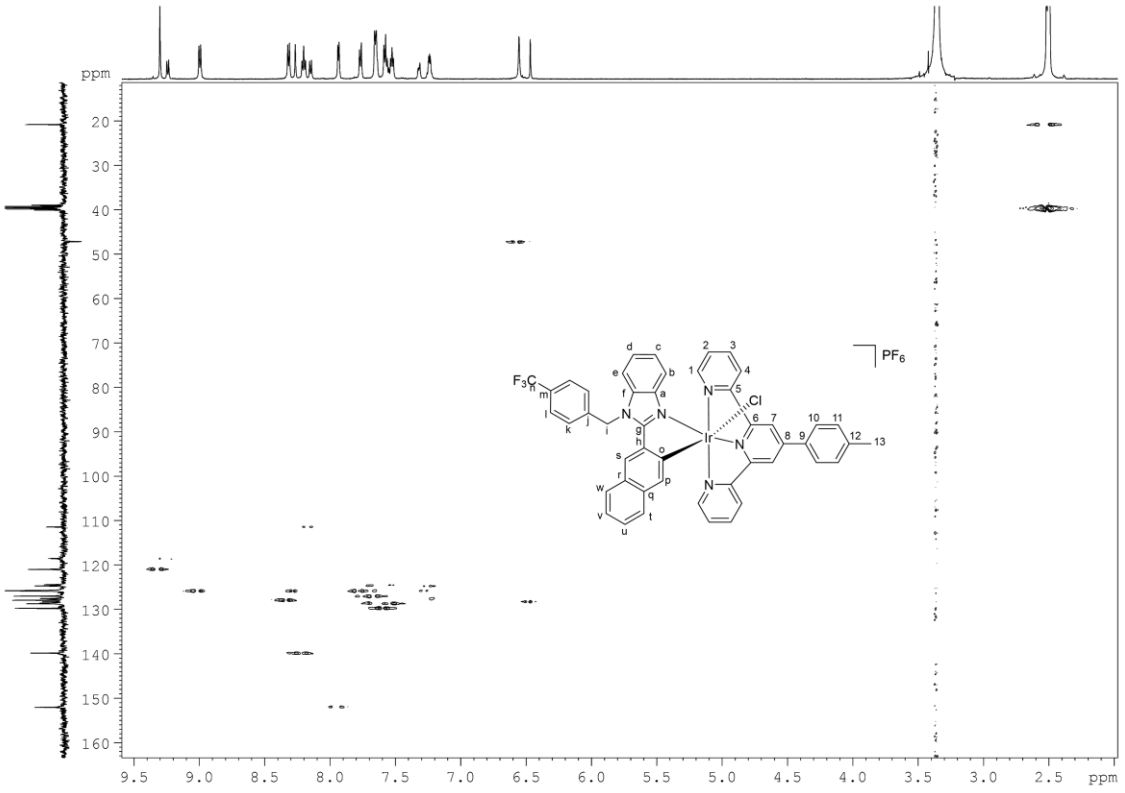


Figura A3.25. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 300 MHz) del compuesto **24** en DMSO-d_6.

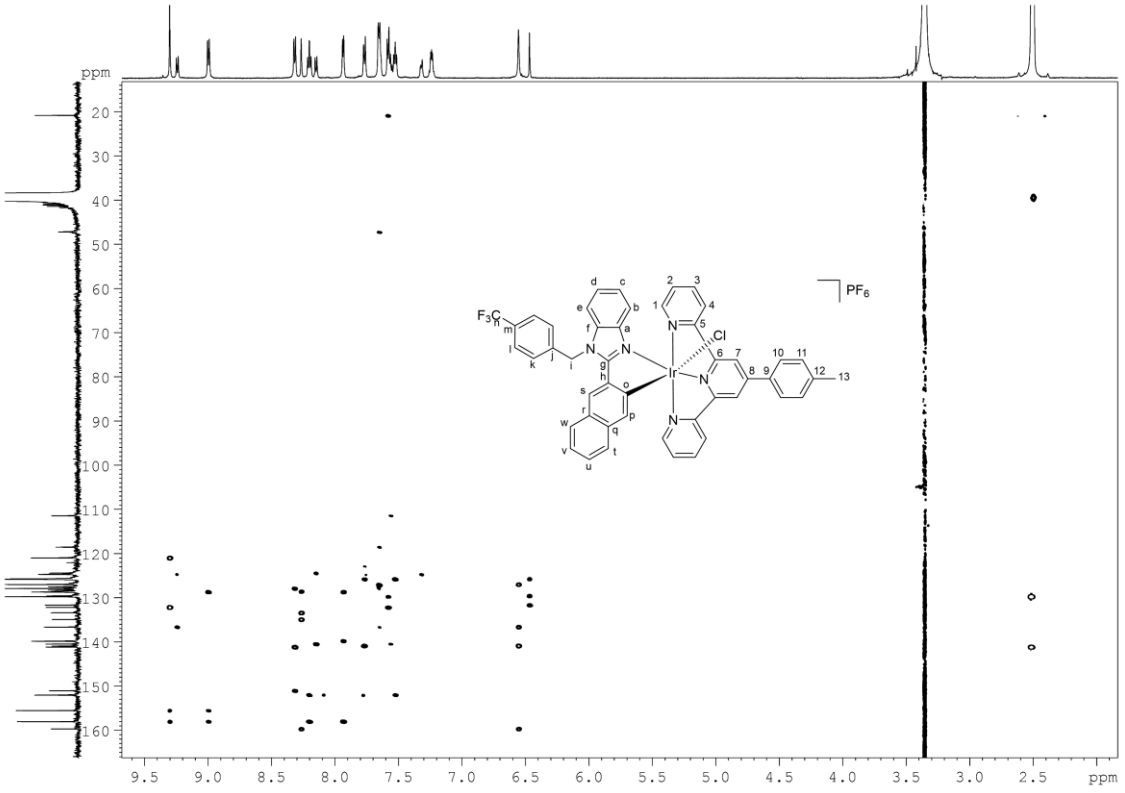


Figura A3.26. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 300 MHz) del compuesto **24** en DMSO-d_6.

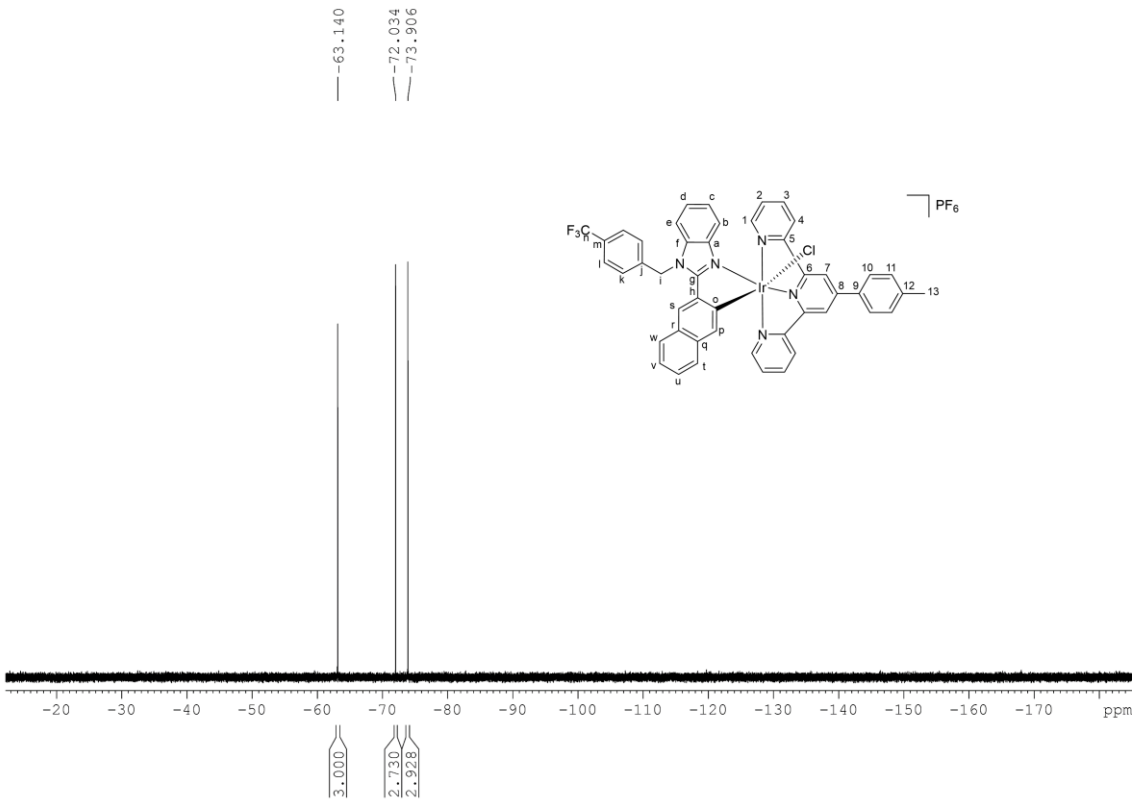


Figura A3.27. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **24** en DMSO-d_6.

1.5. Compuesto 25

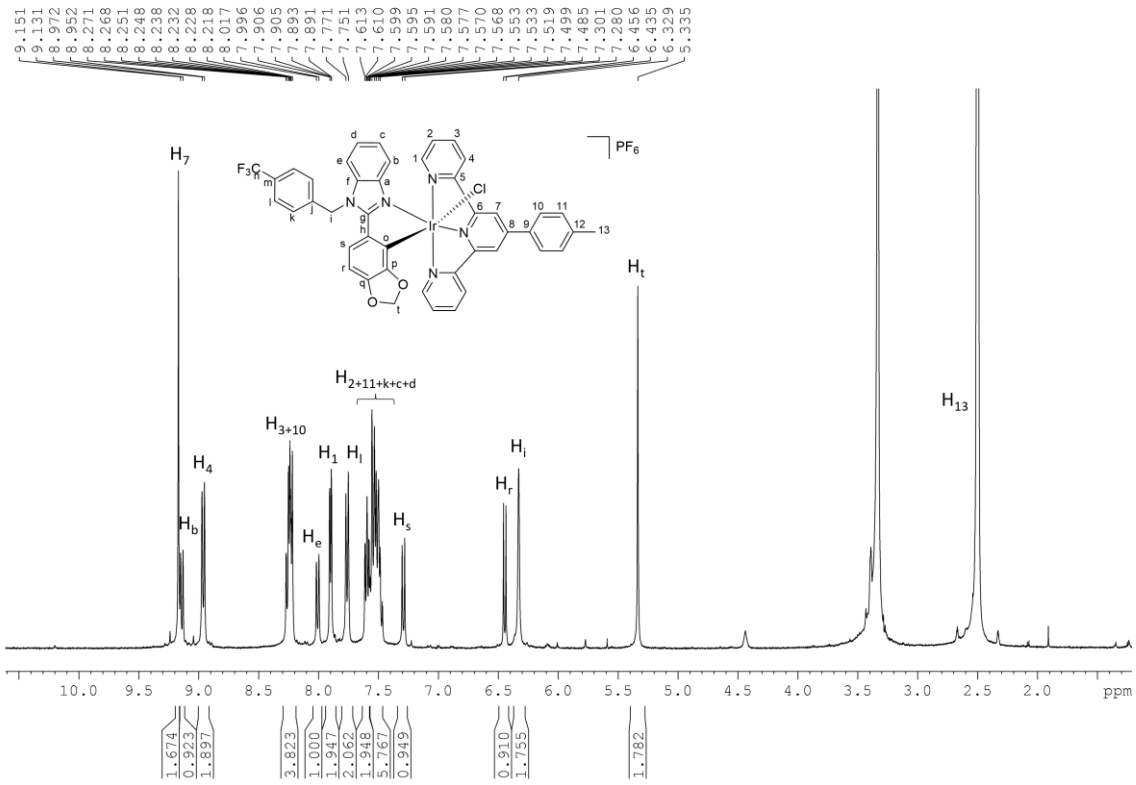


Figura A3.28. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **25** en DMSO-d_6.

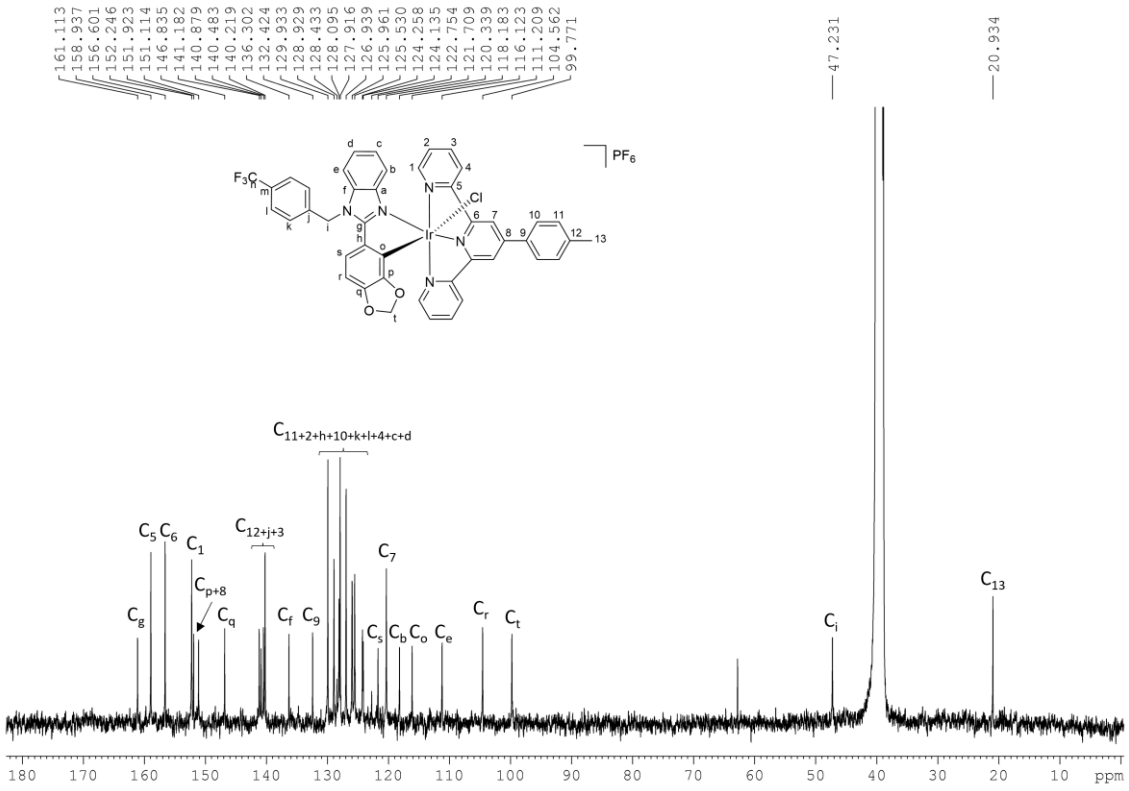


Figura A3.29. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **25** en DMSO-d_6.

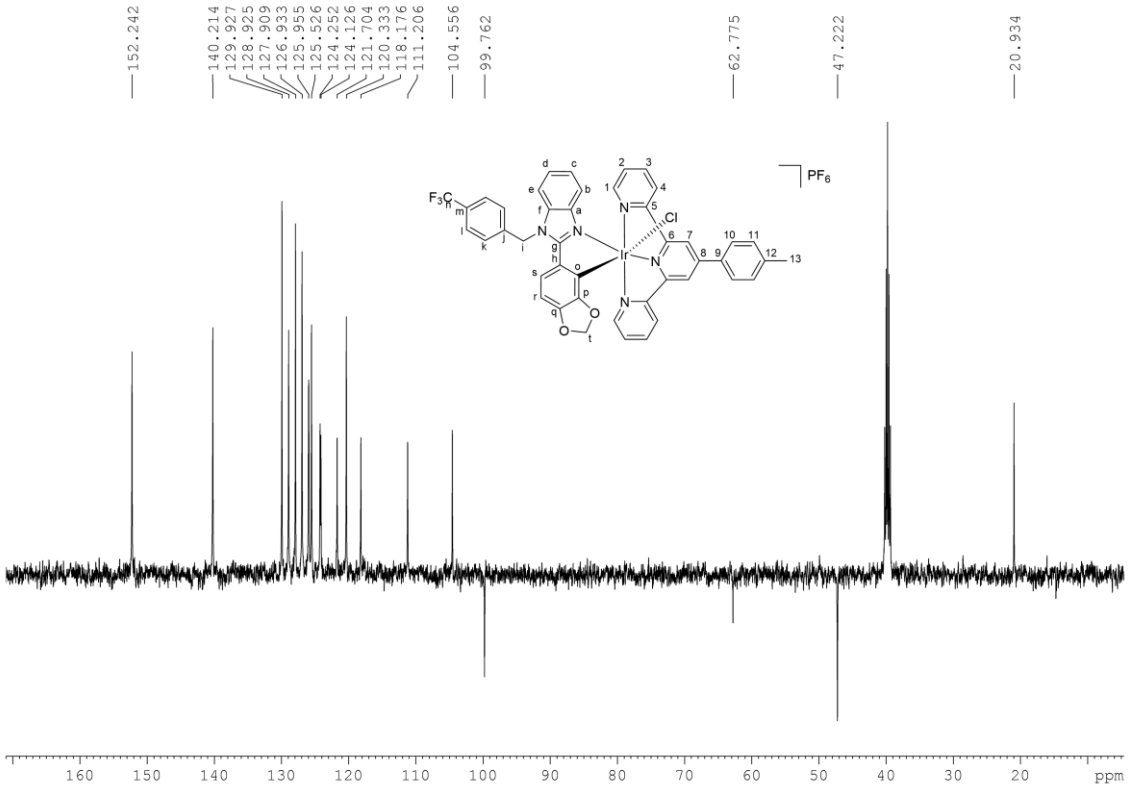


Figura A3.30. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **25** en DMSO-d_6.

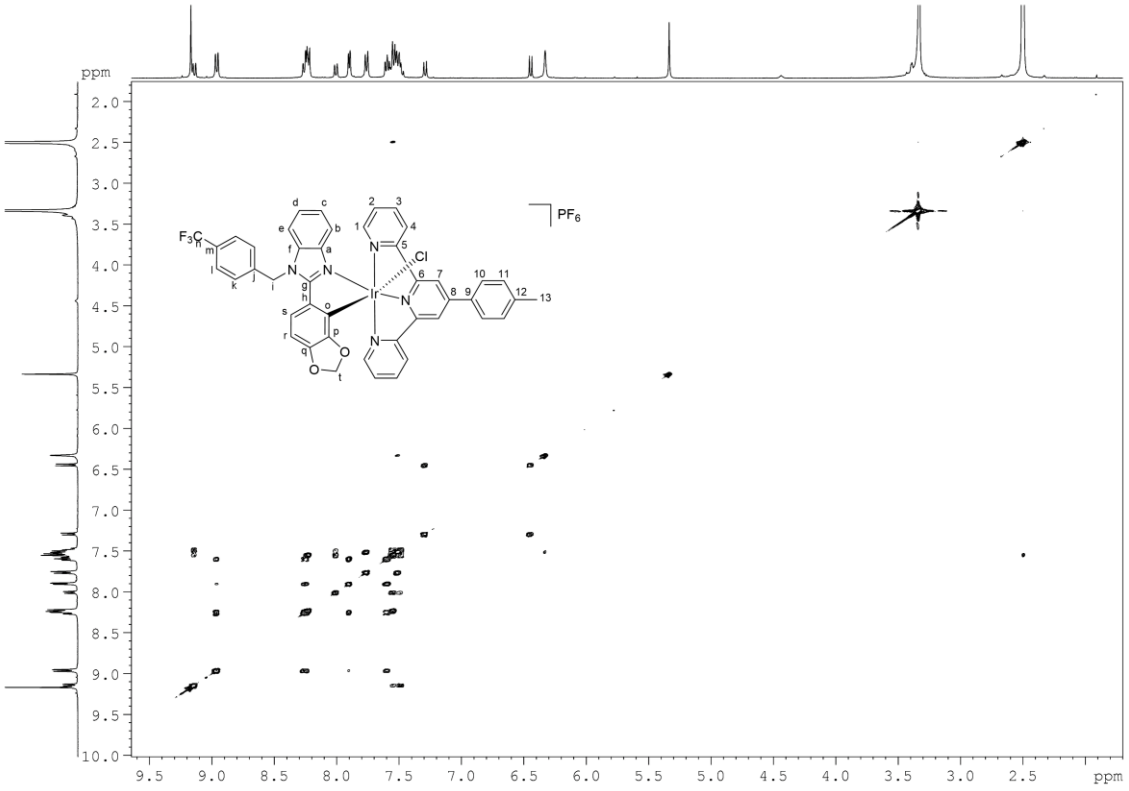


Figura A3.31. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **25** en DMSO-d_6.

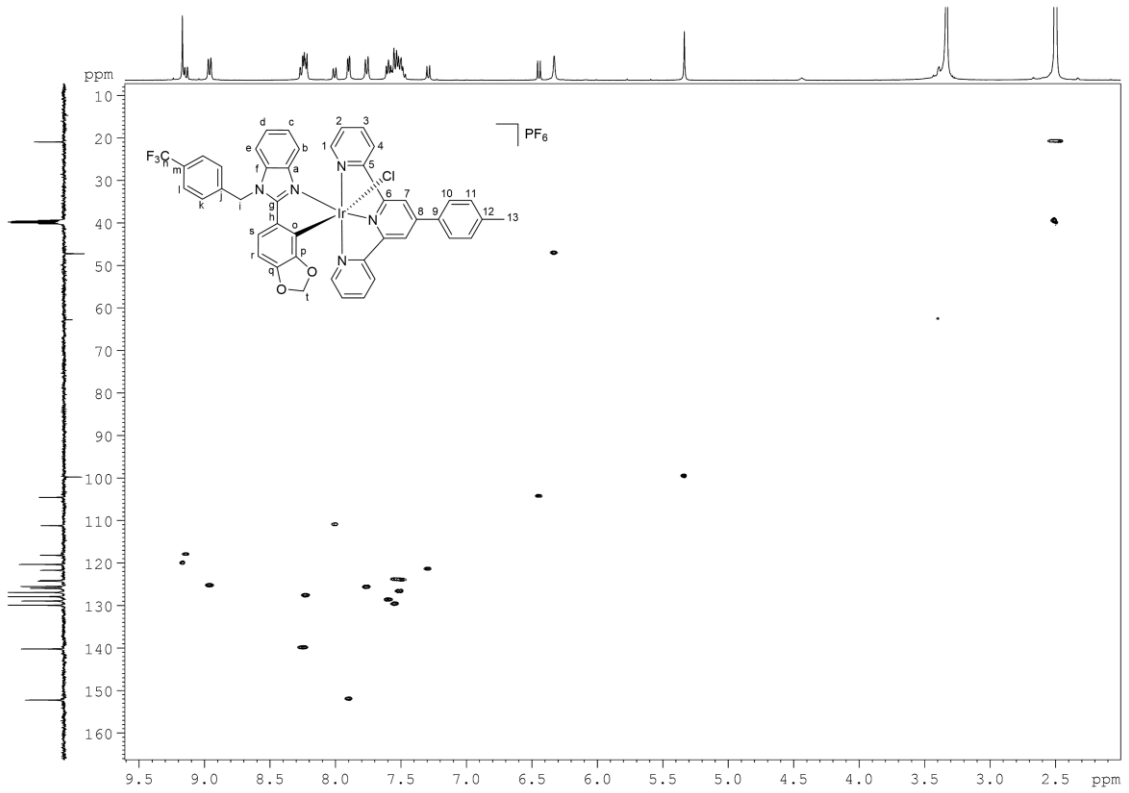


Figura A3.32. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **25** en DMSO-d_6.

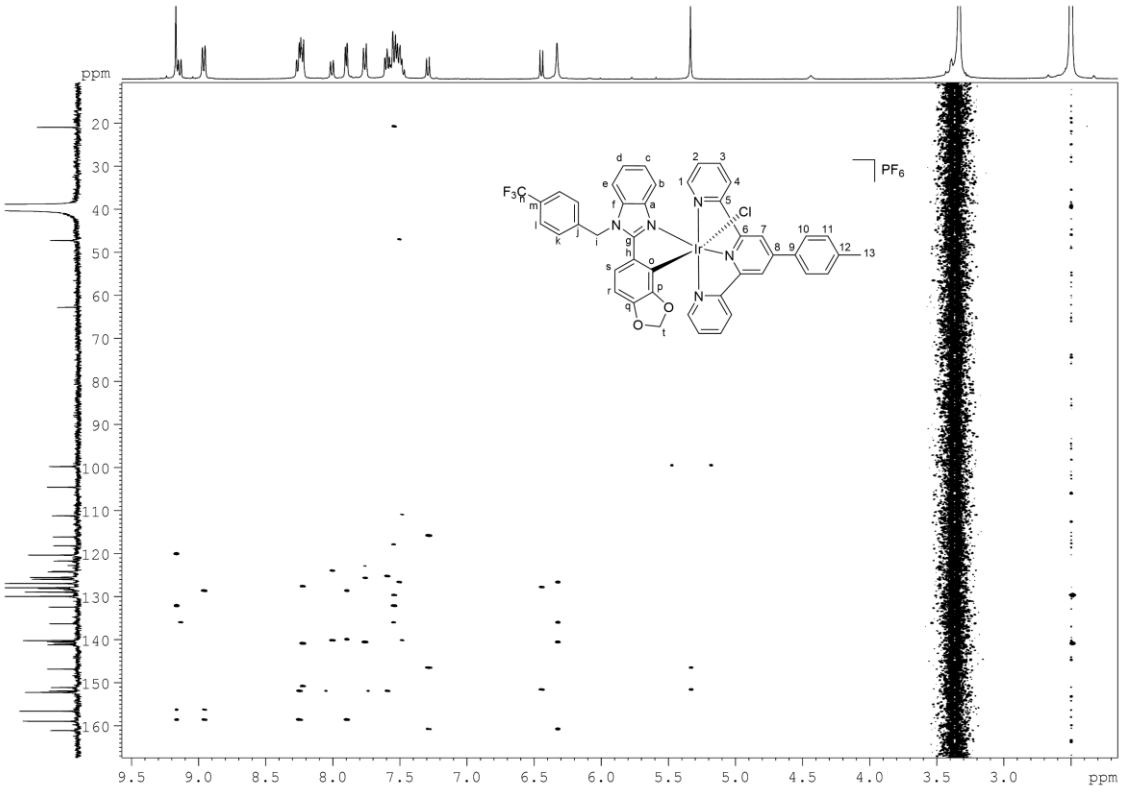


Figura A3.33. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **25** en DMSO-d_6.

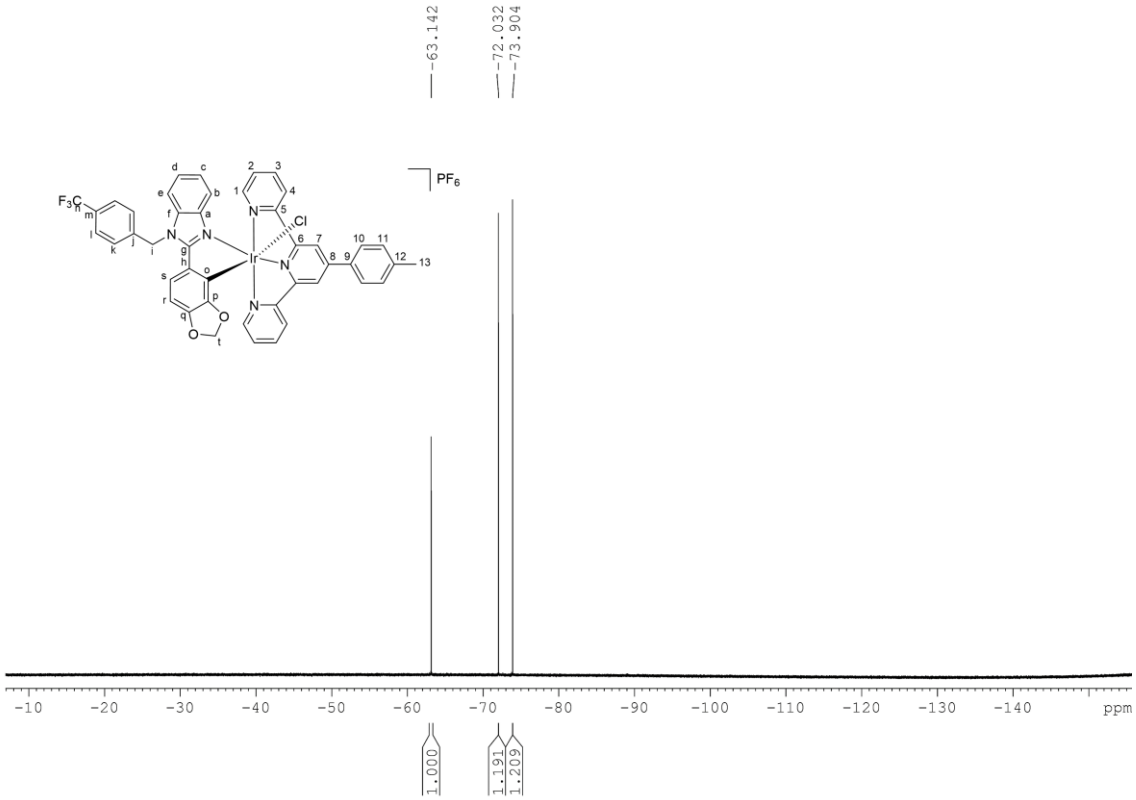


Figura A3.34. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **25** en DMSO-d_6.

1.6. Compuesto 26

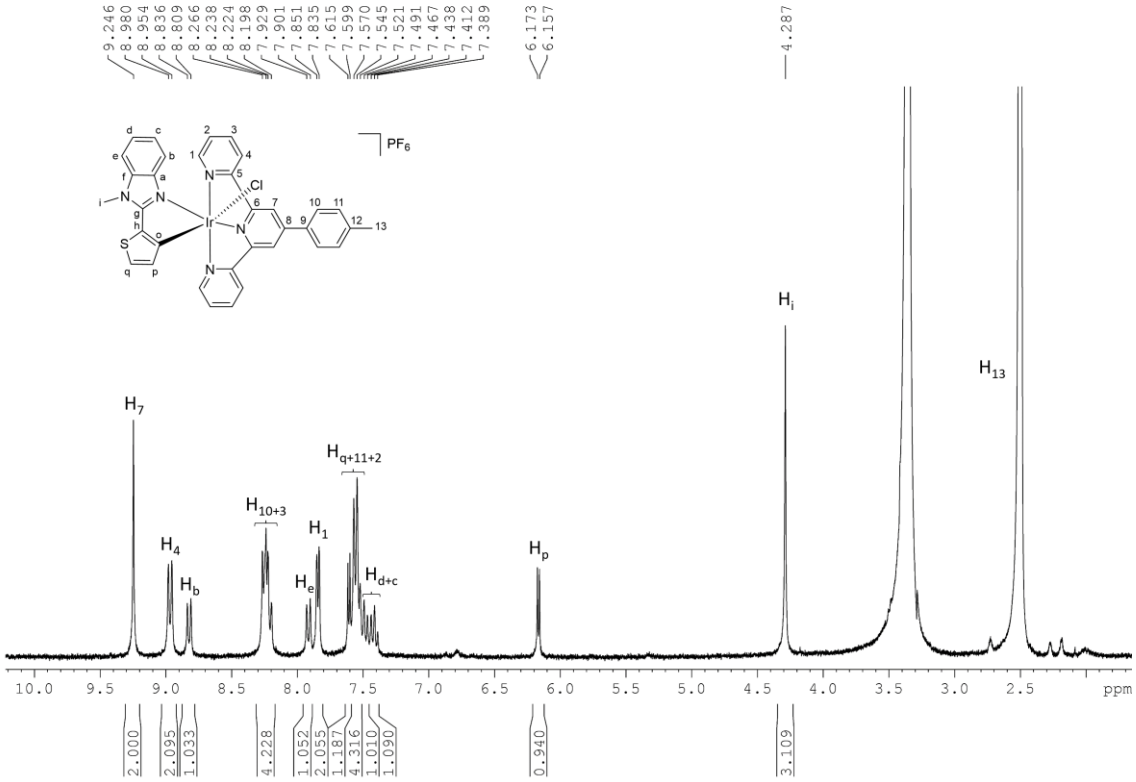


Figura A3.35. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **26** en DMSO-d_6.

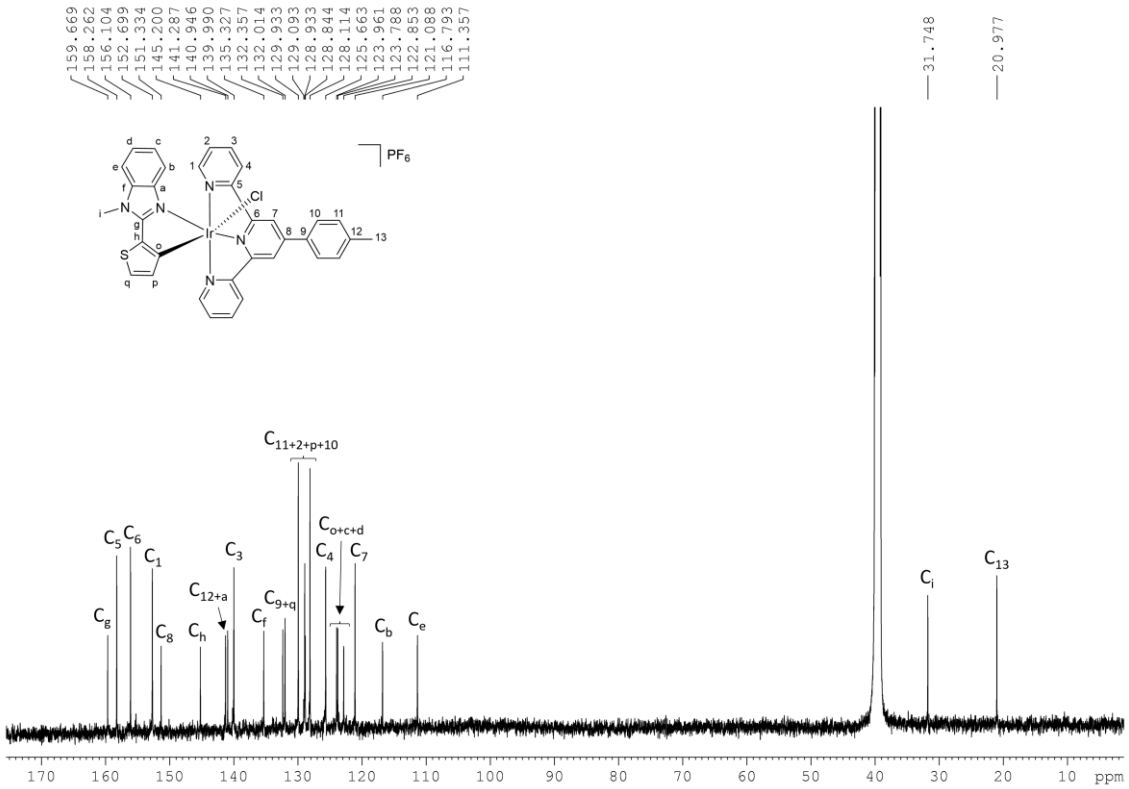


Figura A3.36. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **26** en DMSO-d_6.

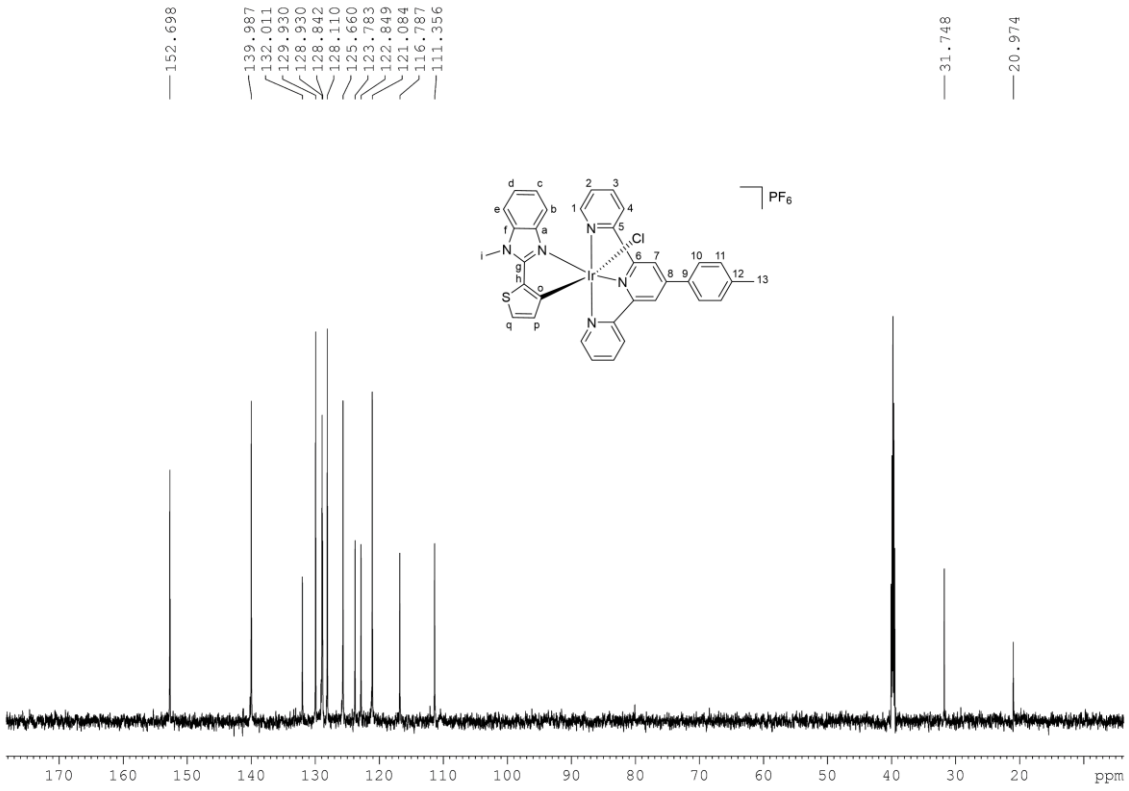


Figura A3.37. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **26** en DMSO-d_6.

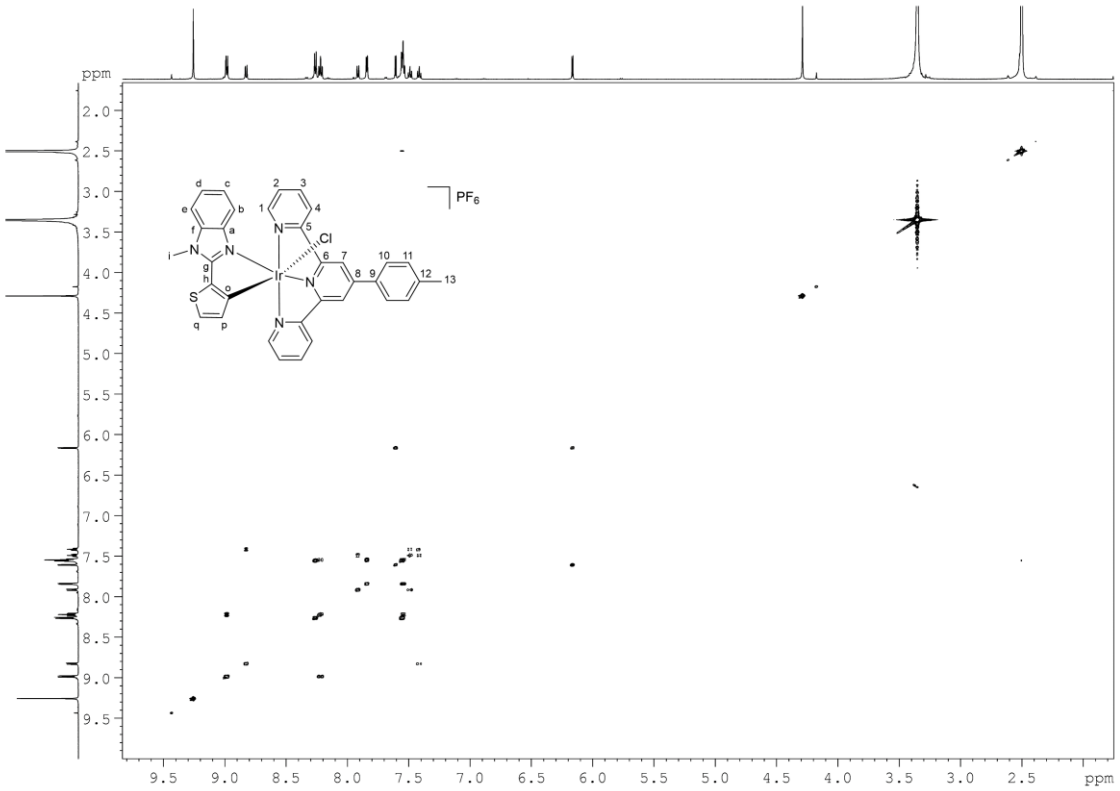


Figura A3.38. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **26** en DMSO-d_6.

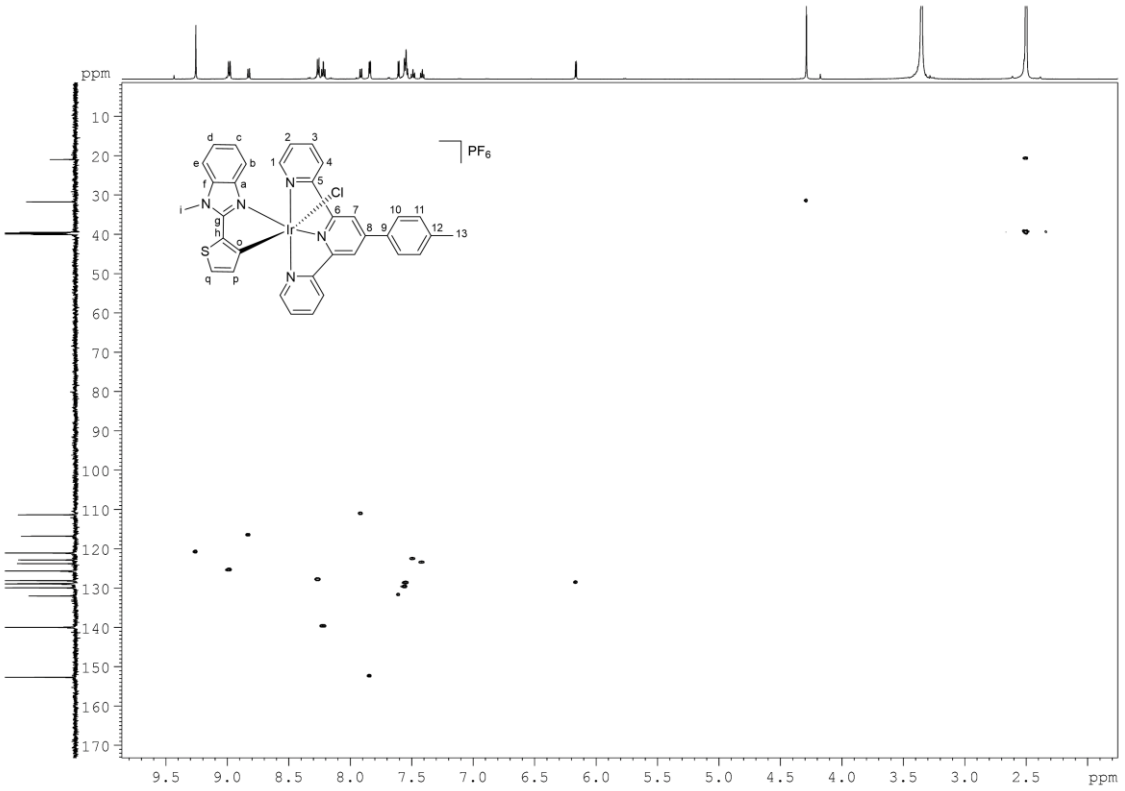


Figura A3.39. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **26** en DMSO-d_6.

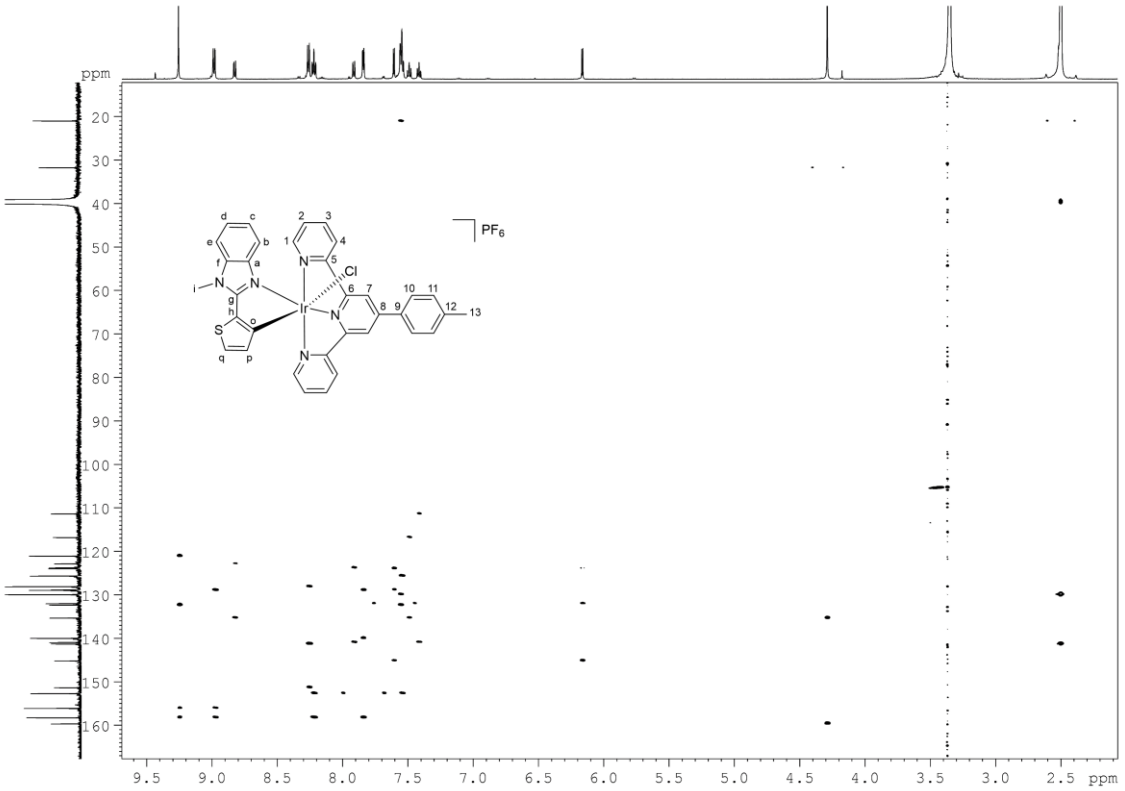


Figura A3.40. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **26** en DMSO-d_6.

1.7. Compuesto 27

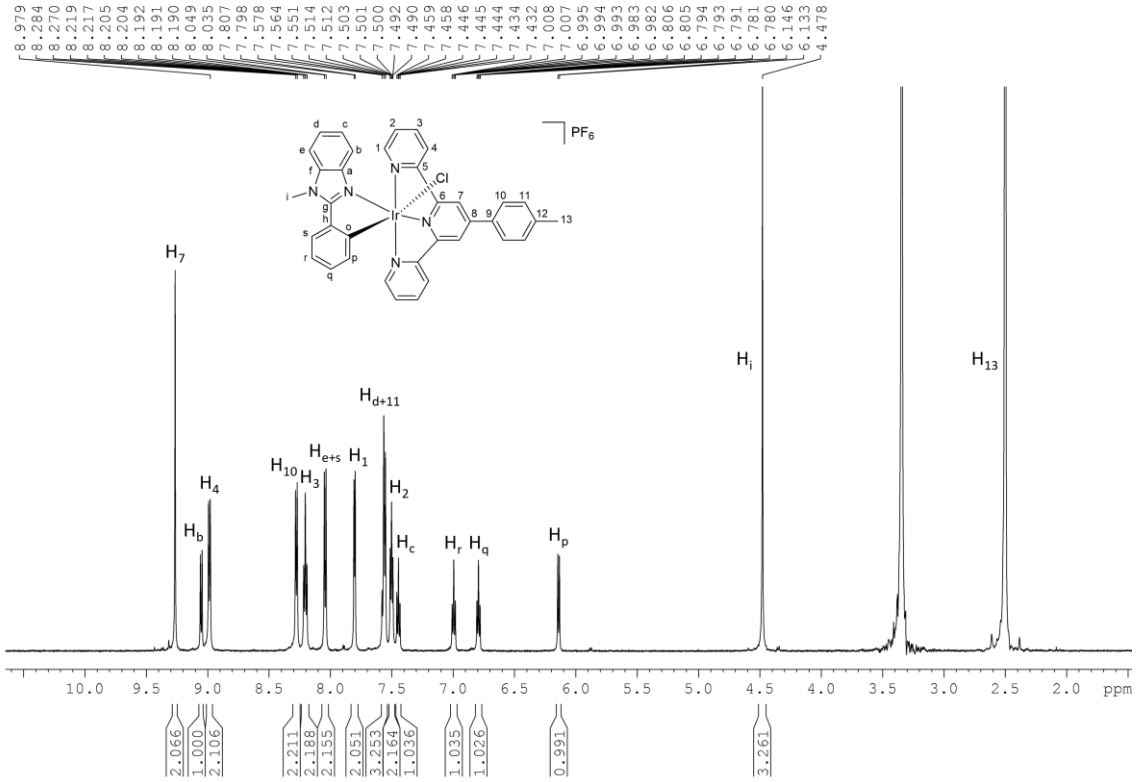


Figura A3.41. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **27** en DMSO-d_6.

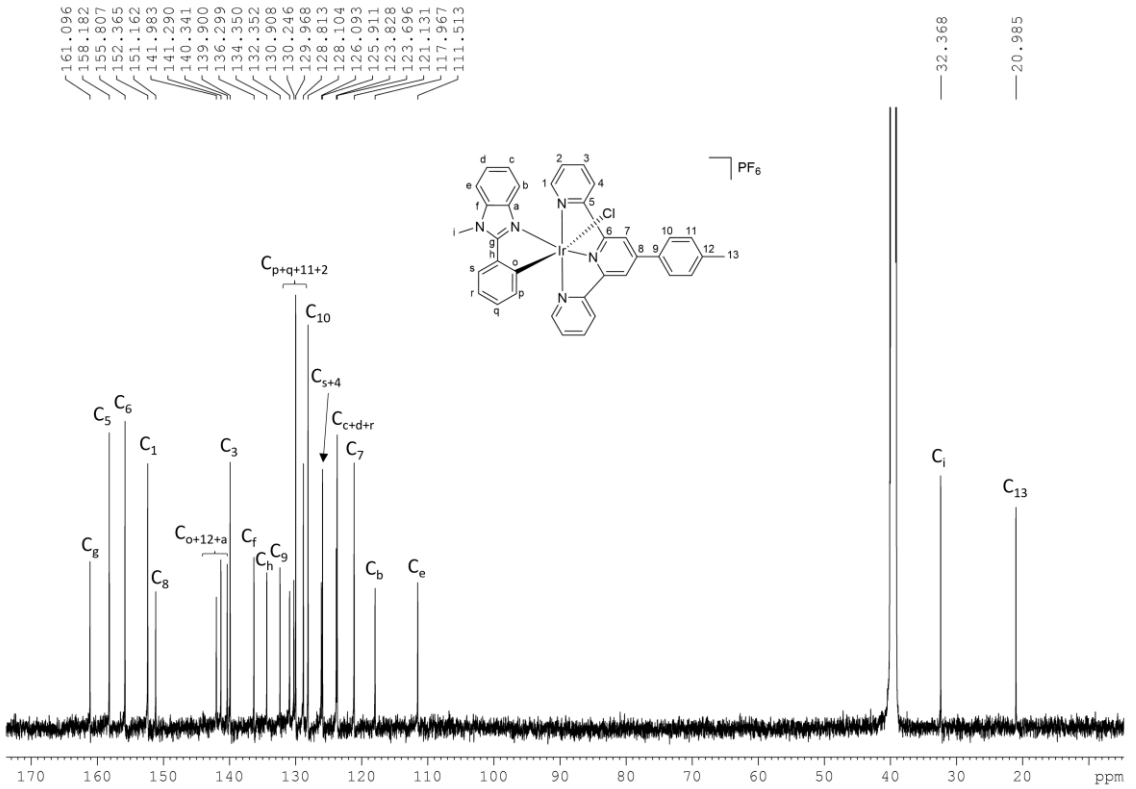


Figura A3.42. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **27** en DMSO-d_6.

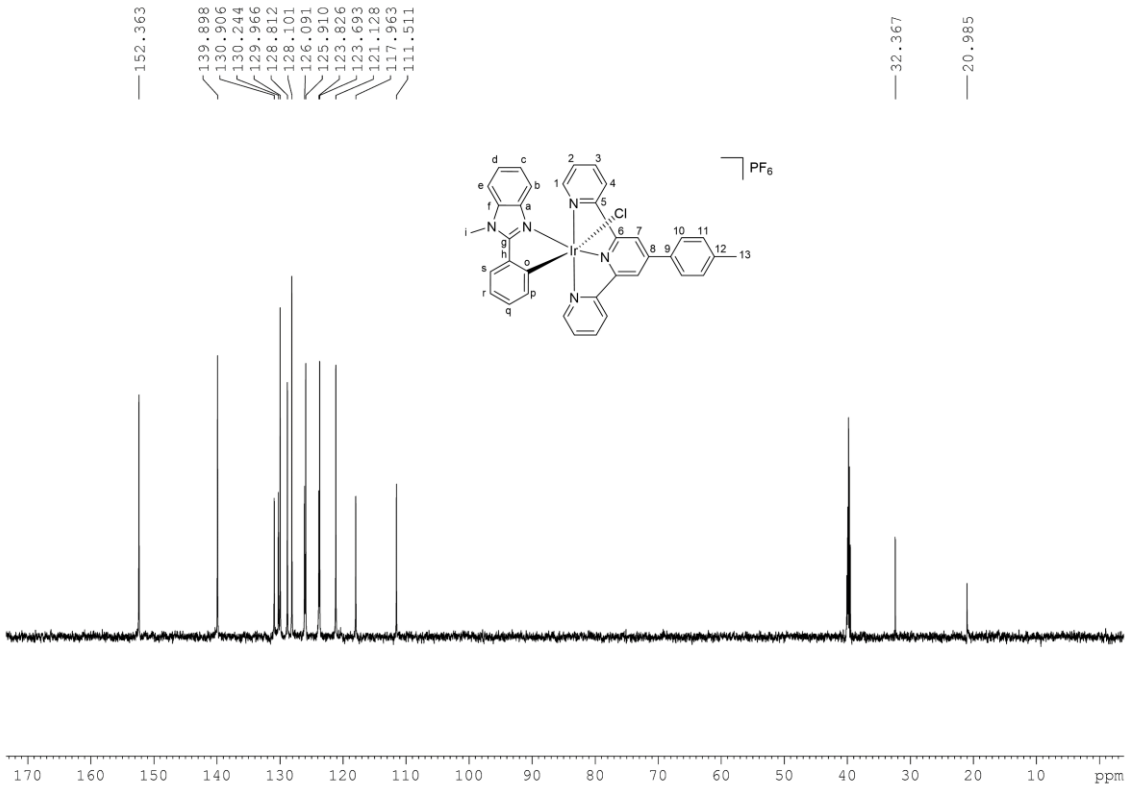


Figura A3.43. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **27** en DMSO-d_6.

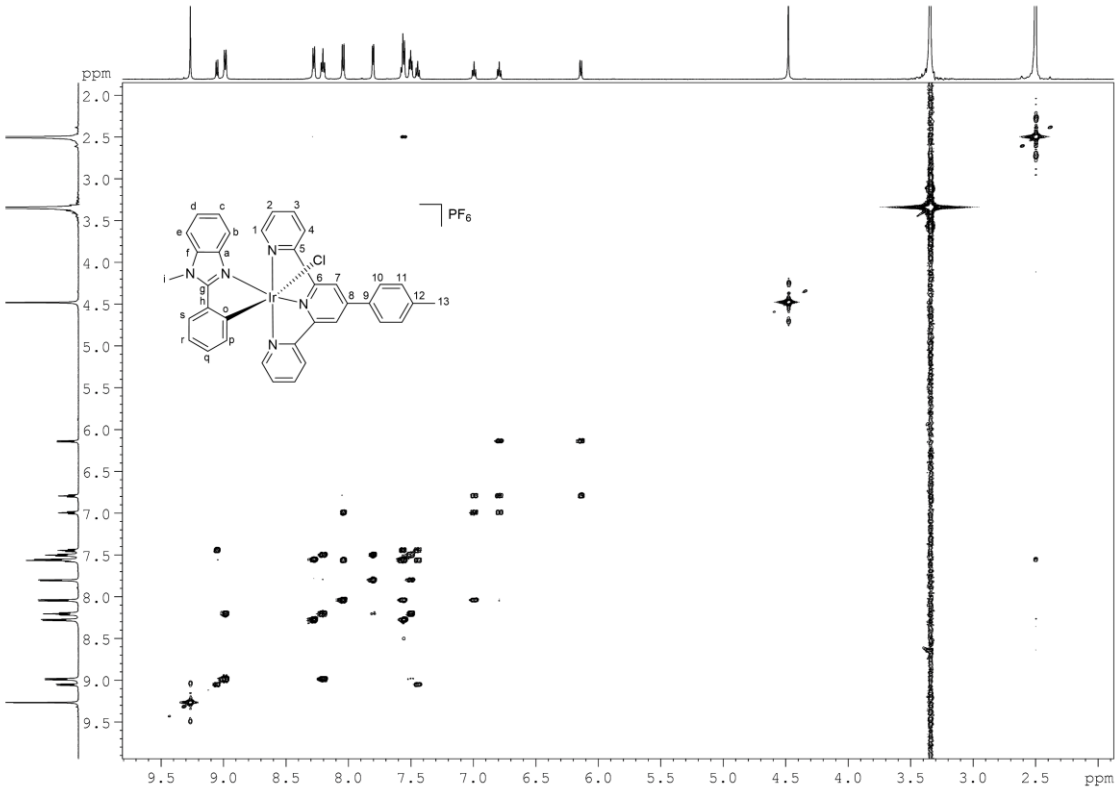


Figura A3.44. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **27** en DMSO-d_6.

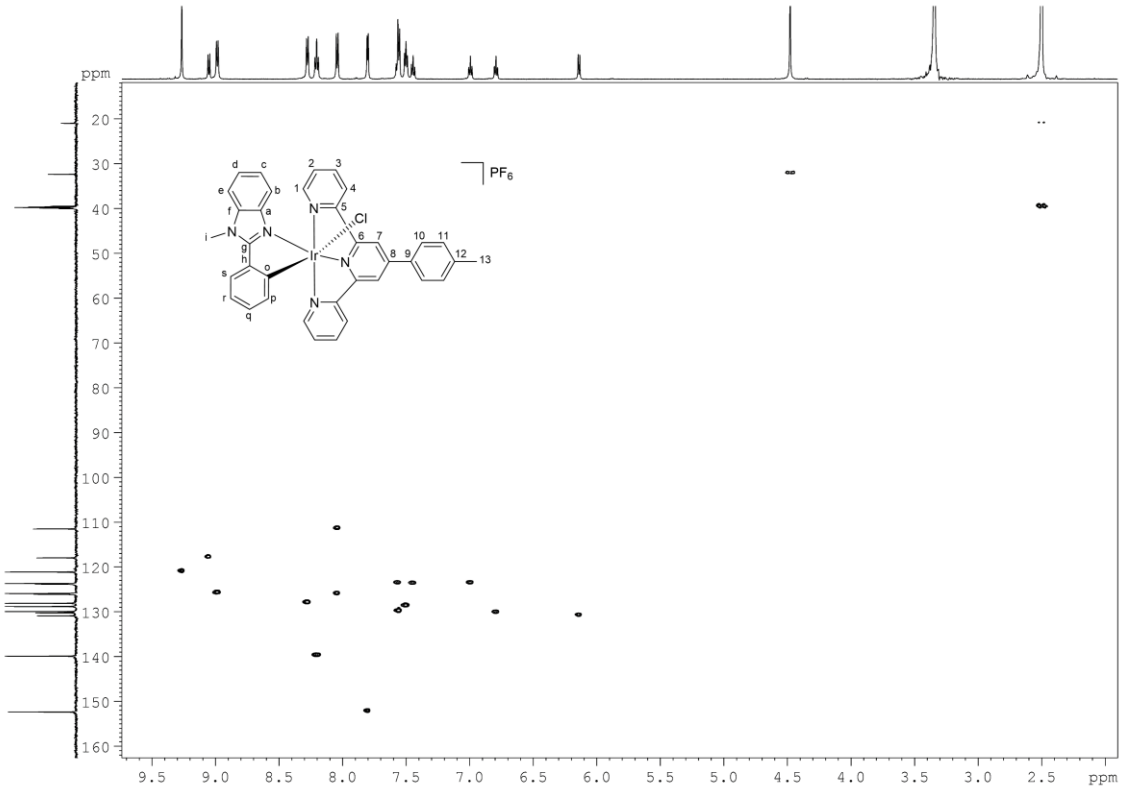


Figura A3.45. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **27** en DMSO-d_6.

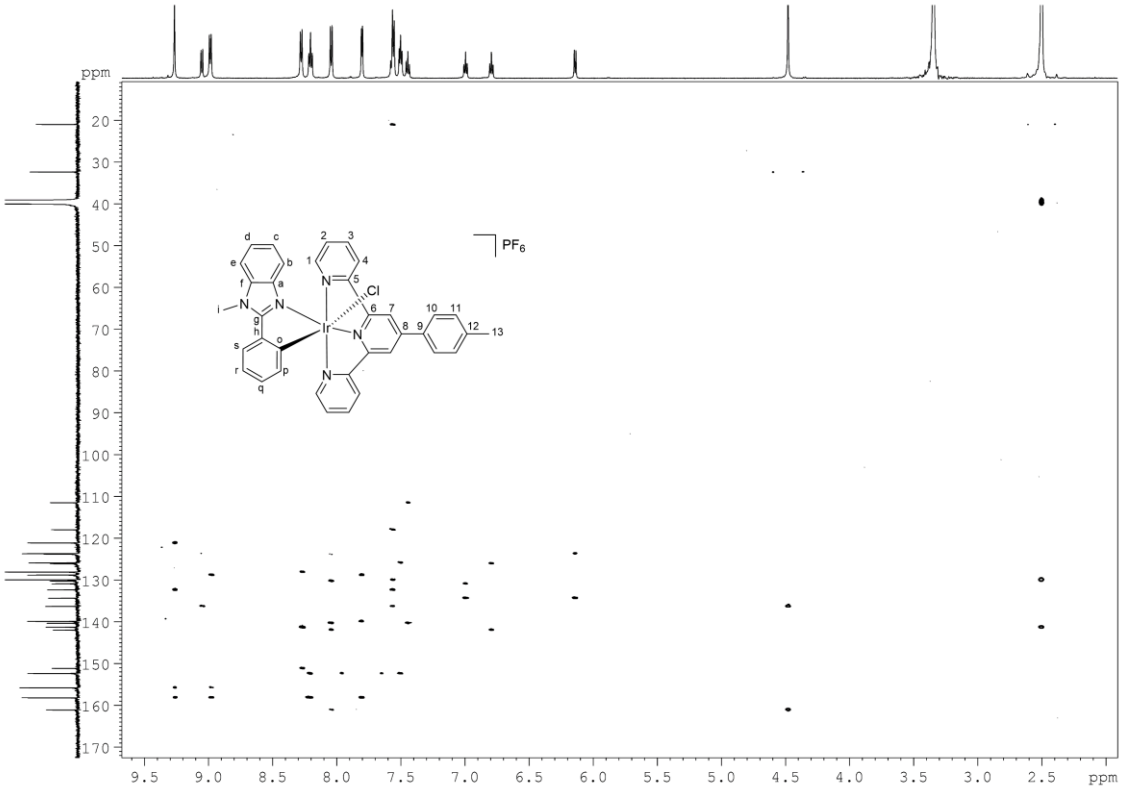


Figura A3.46. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **27** en DMSO-d_6.

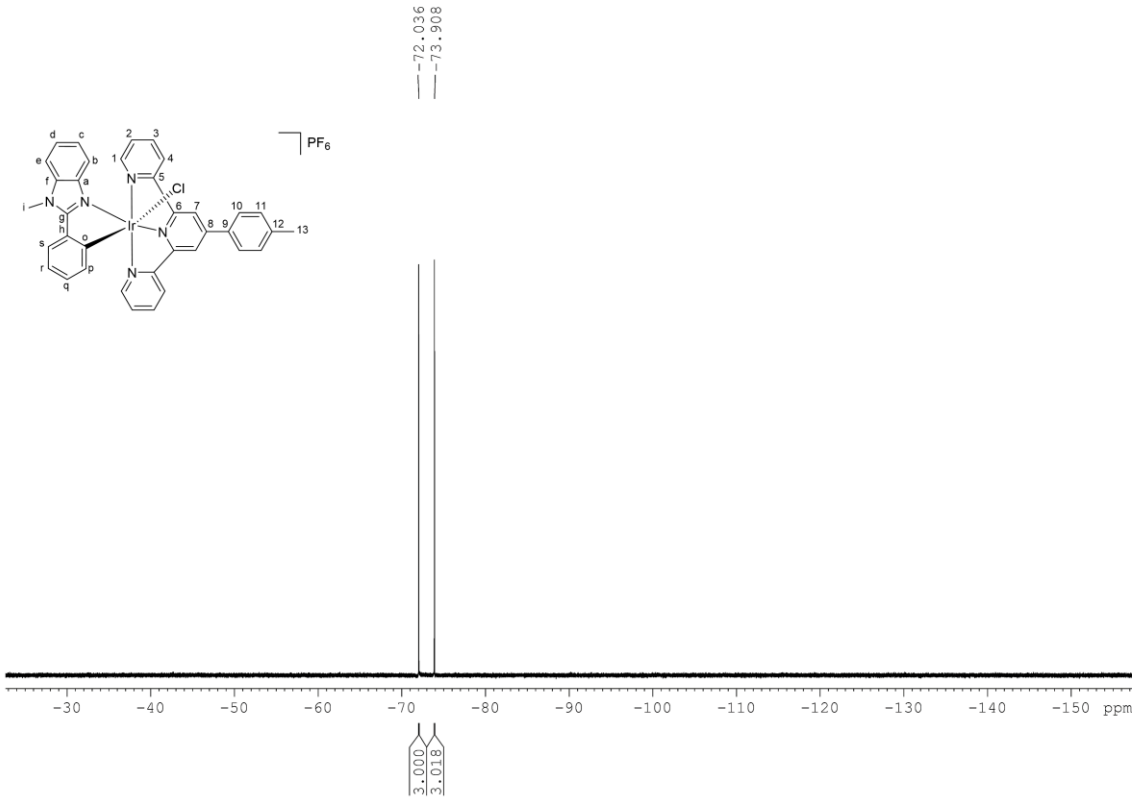


Figura A3.47. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **27** en DMSO-d_6.

1.8. Compuesto 28

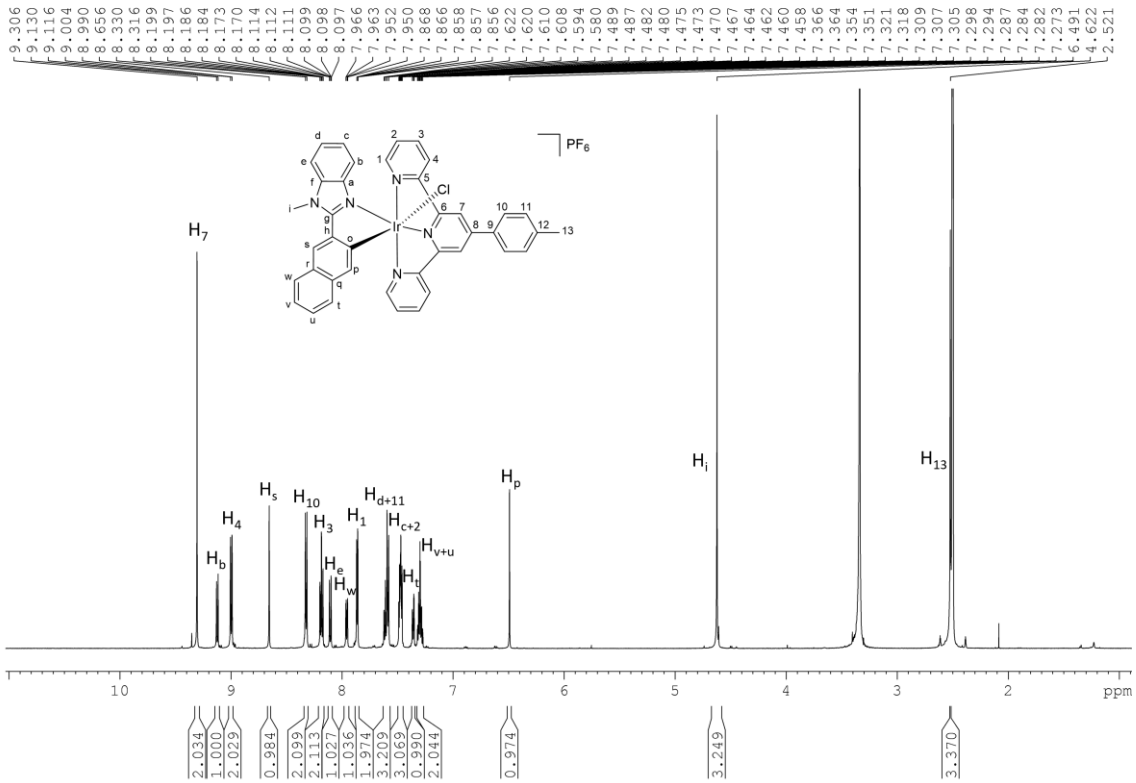


Figura A3.48. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **28** en DMSO-d_6.

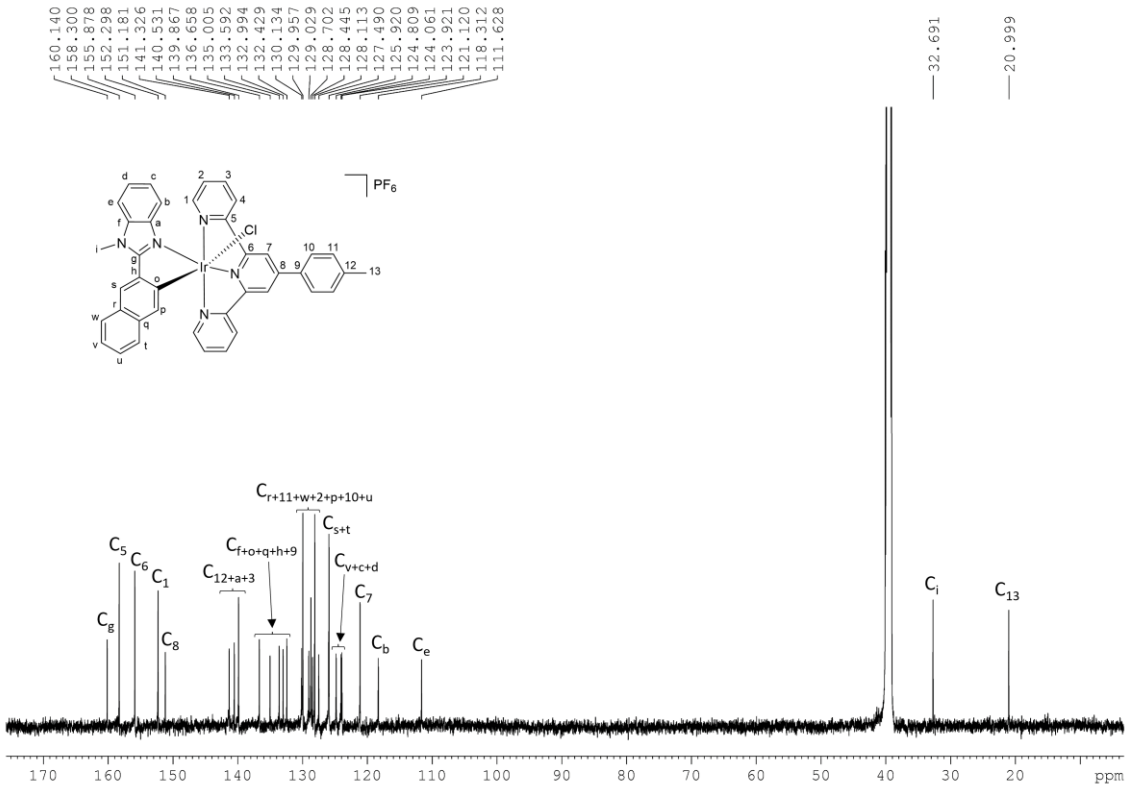


Figura A3.49. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **28** en DMSO-d_6.

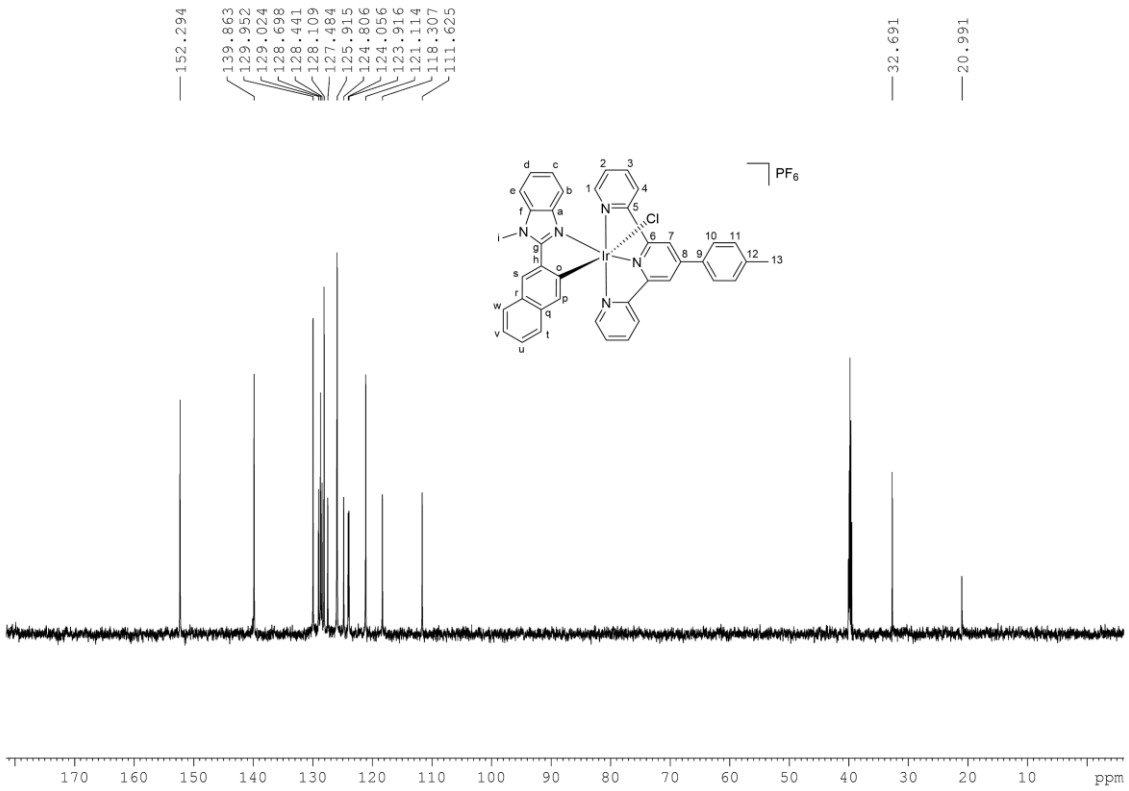


Figura A3.50. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **28** en DMSO-d_6.

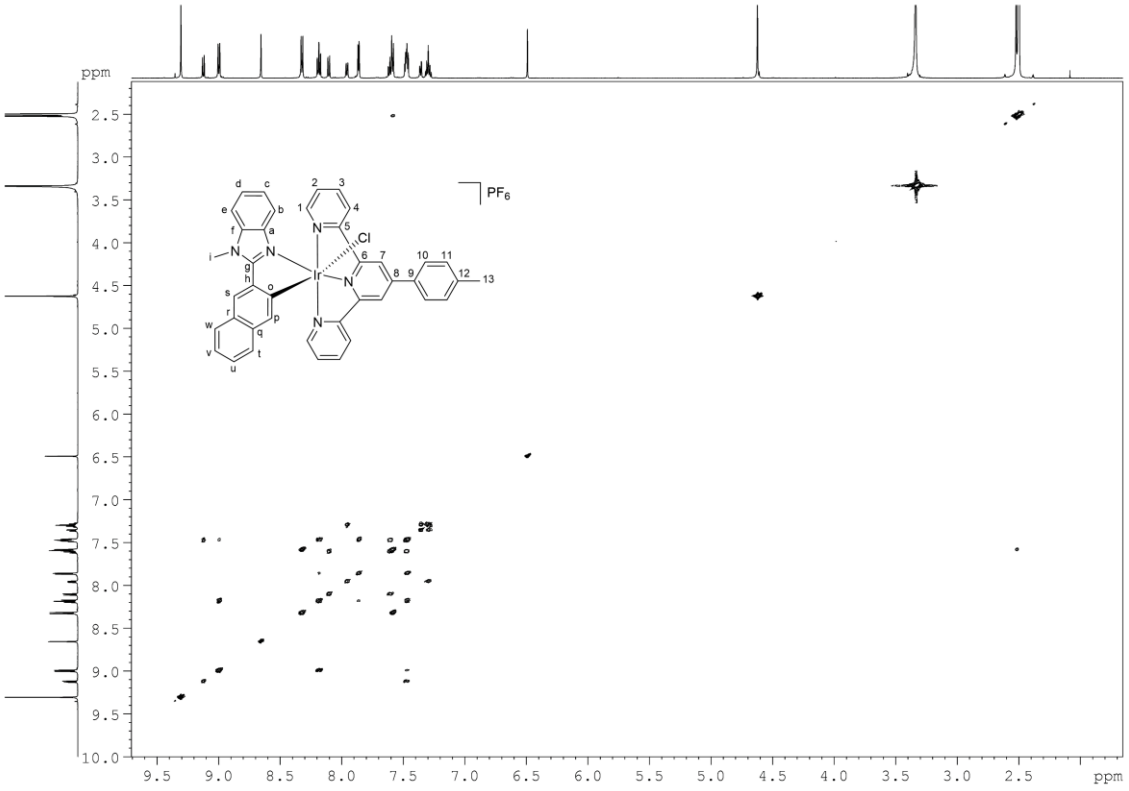


Figura A3.51. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **28** en DMSO-d_6.

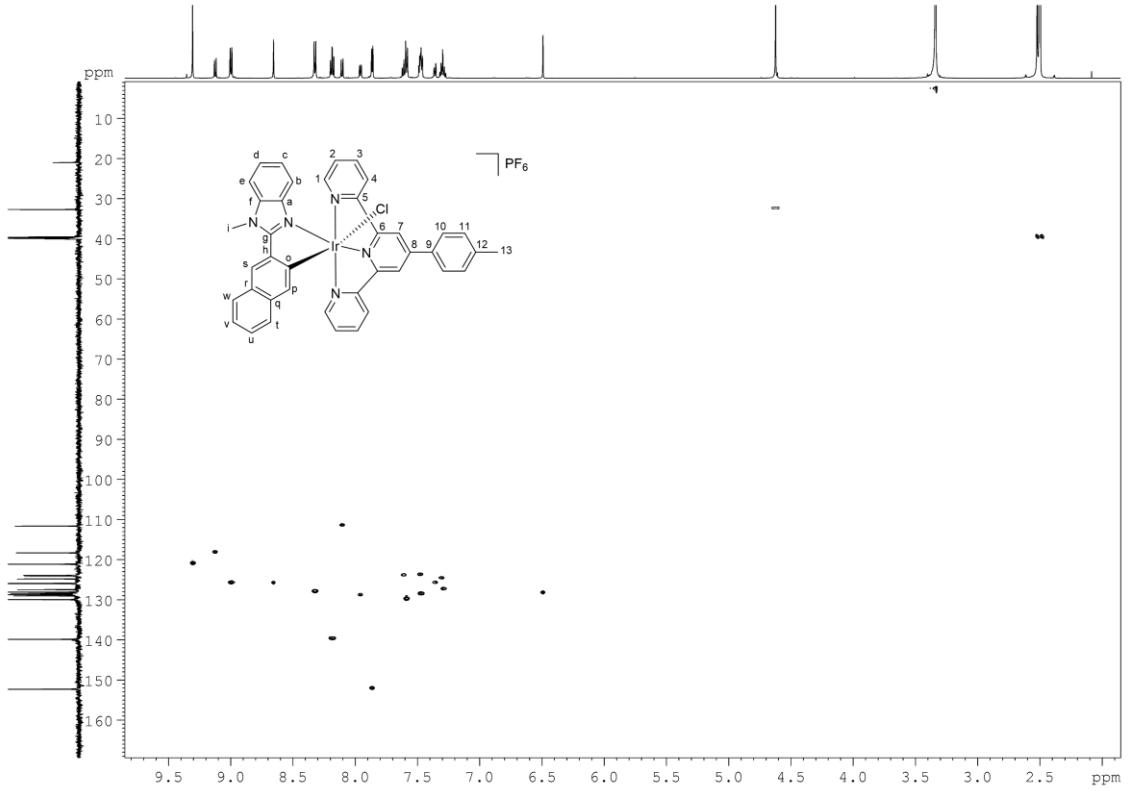


Figura A3.52. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **28** en DMSO-d_6.

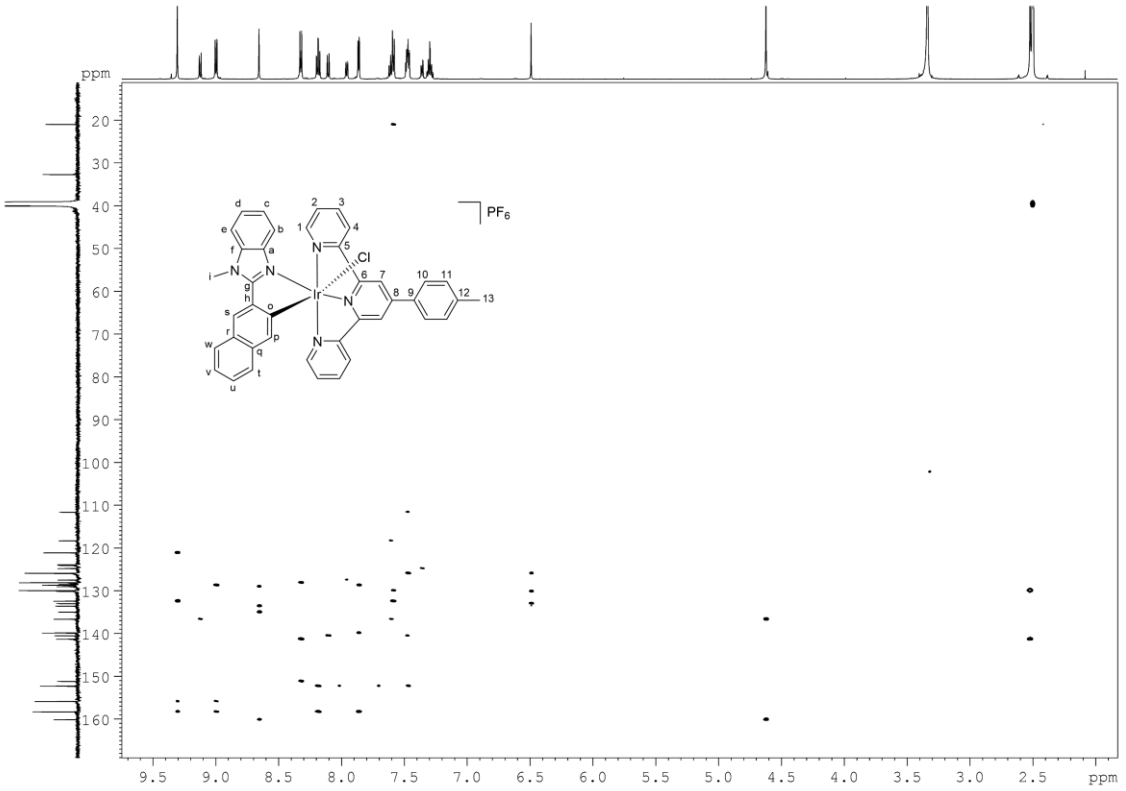


Figura A3.53. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **28** en DMSO-d$_6$.

1.9. Compuesto 29

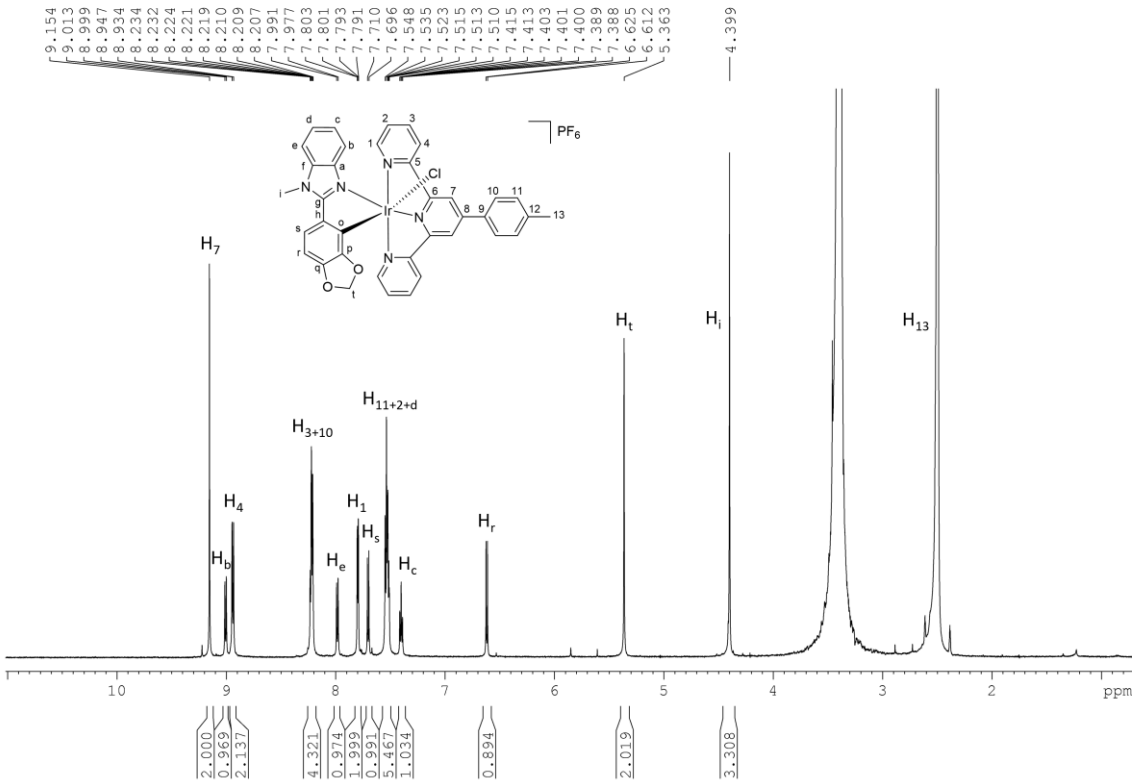


Figura A3.54. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **29** en DMSO-d$_6$.

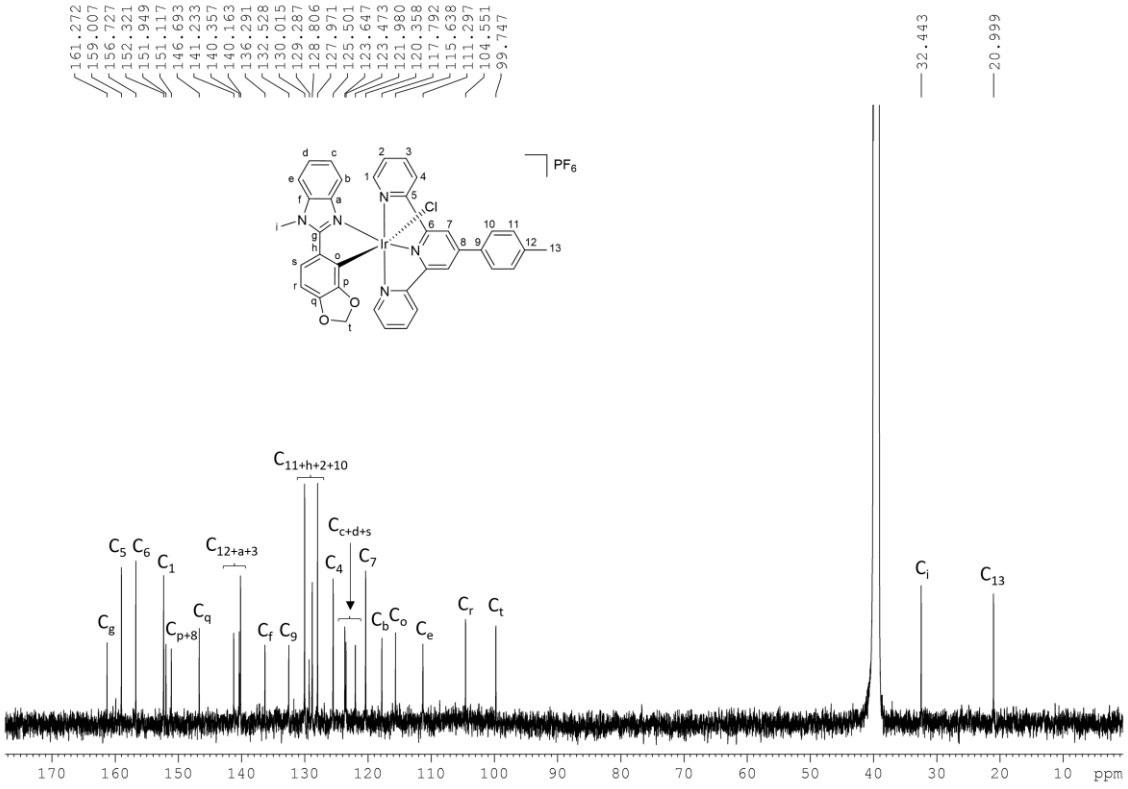


Figura A3.55. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **29** en DMSO-d_6.

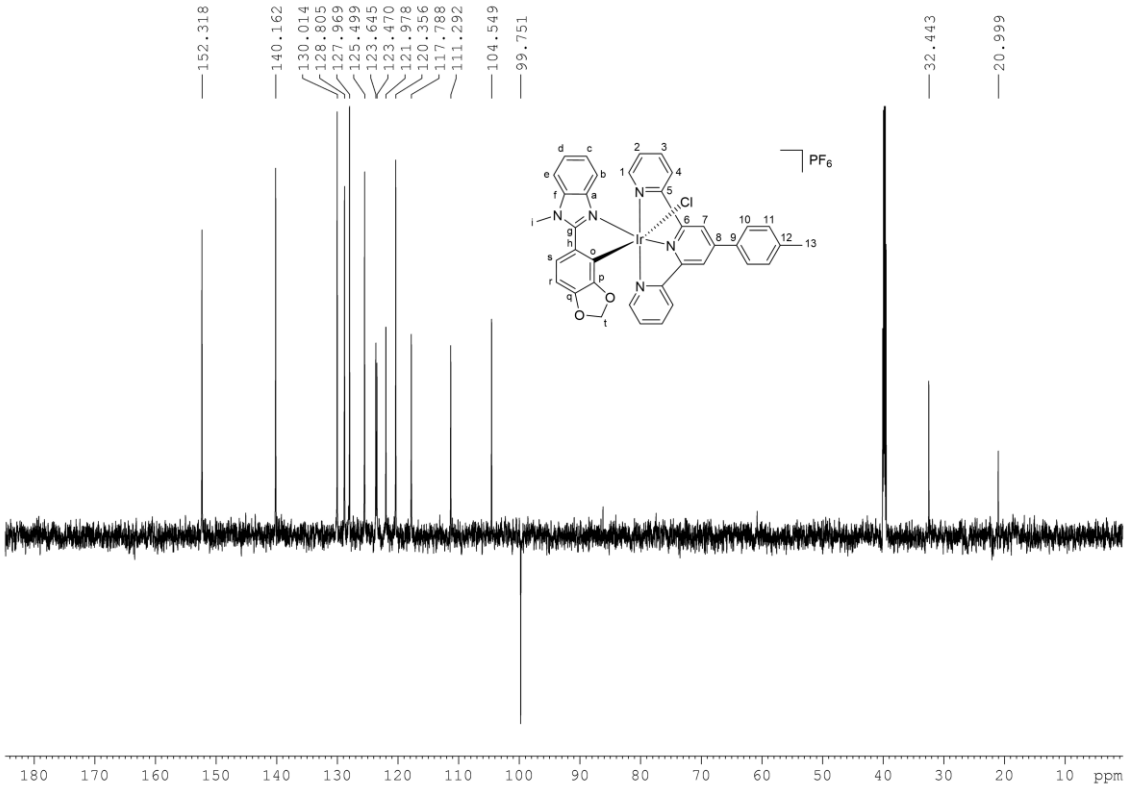


Figura A3.56. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **29** en DMSO-d_6.

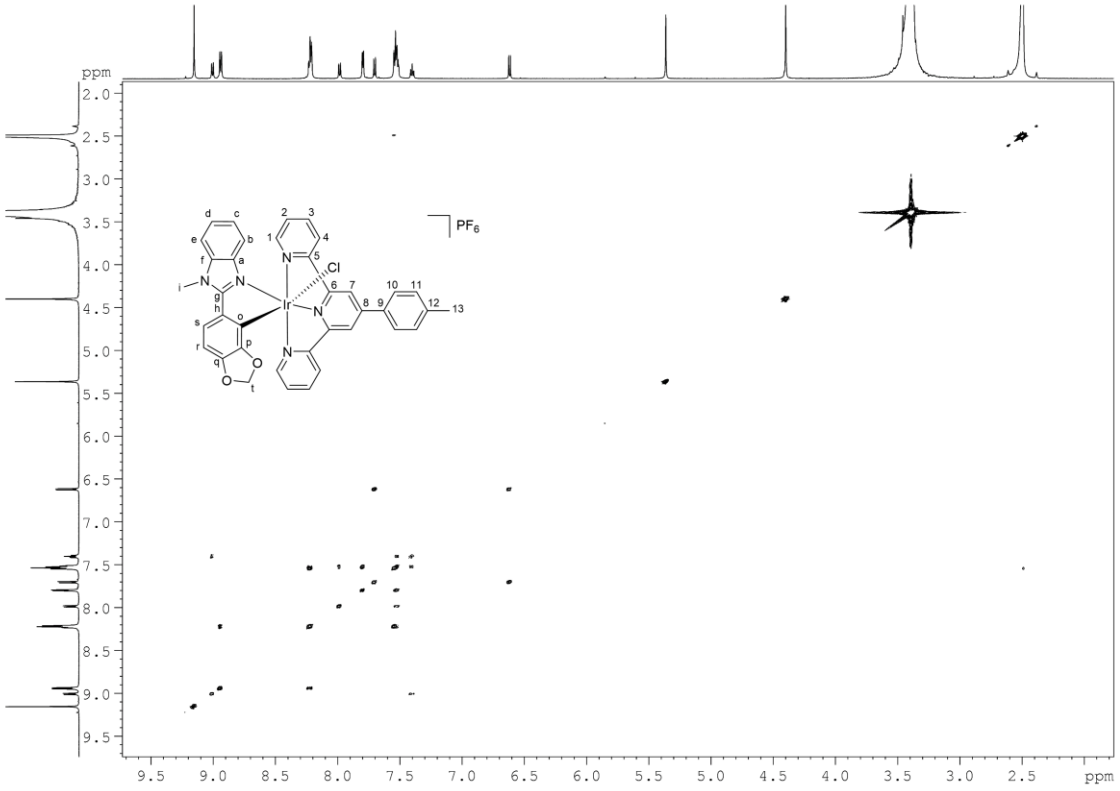


Figura A3.57. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **29** en DMSO-d_6.

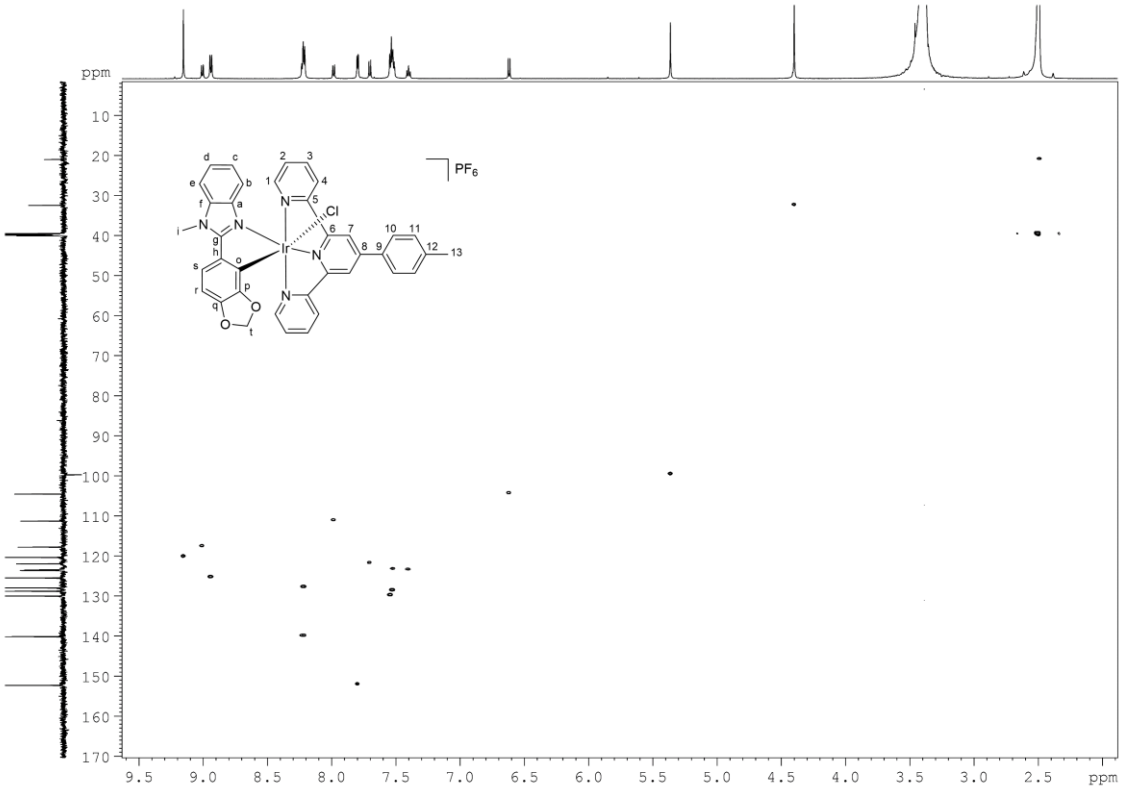


Figura A3.58. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **29** en DMSO-d_6.

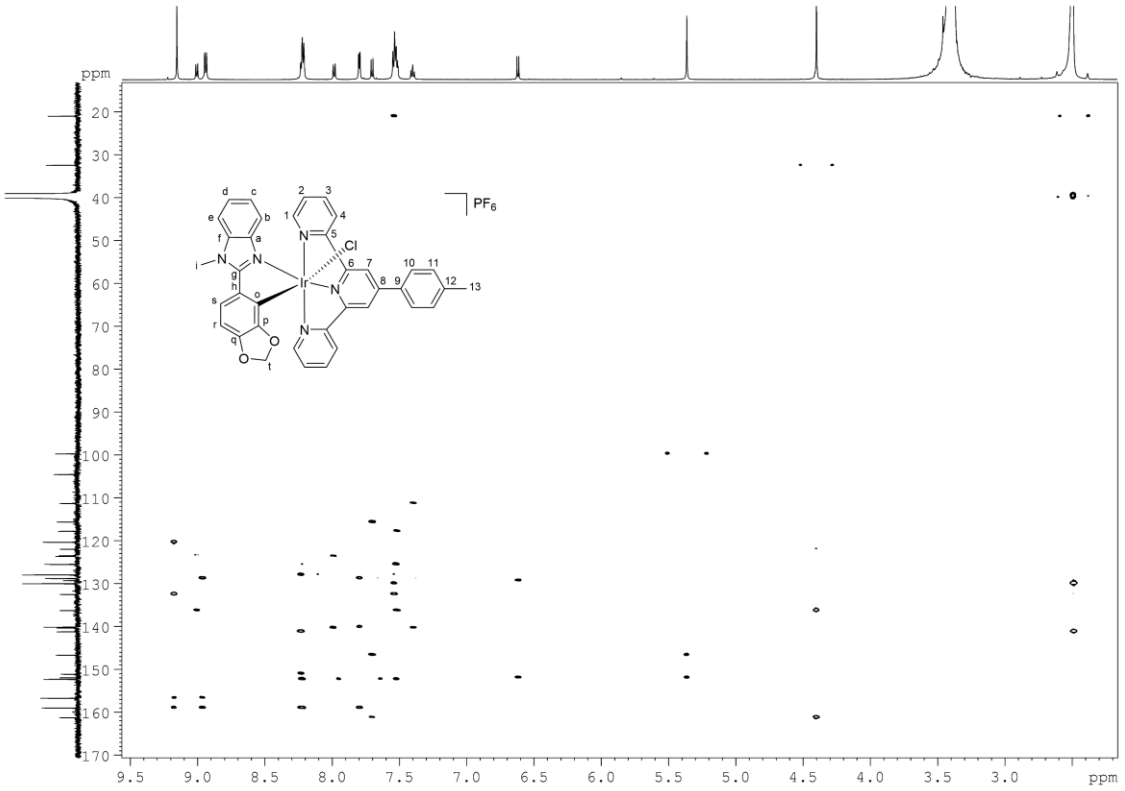


Figura A3.59. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **29** en DMSO-d$_6$.

1.10. Compuesto 30

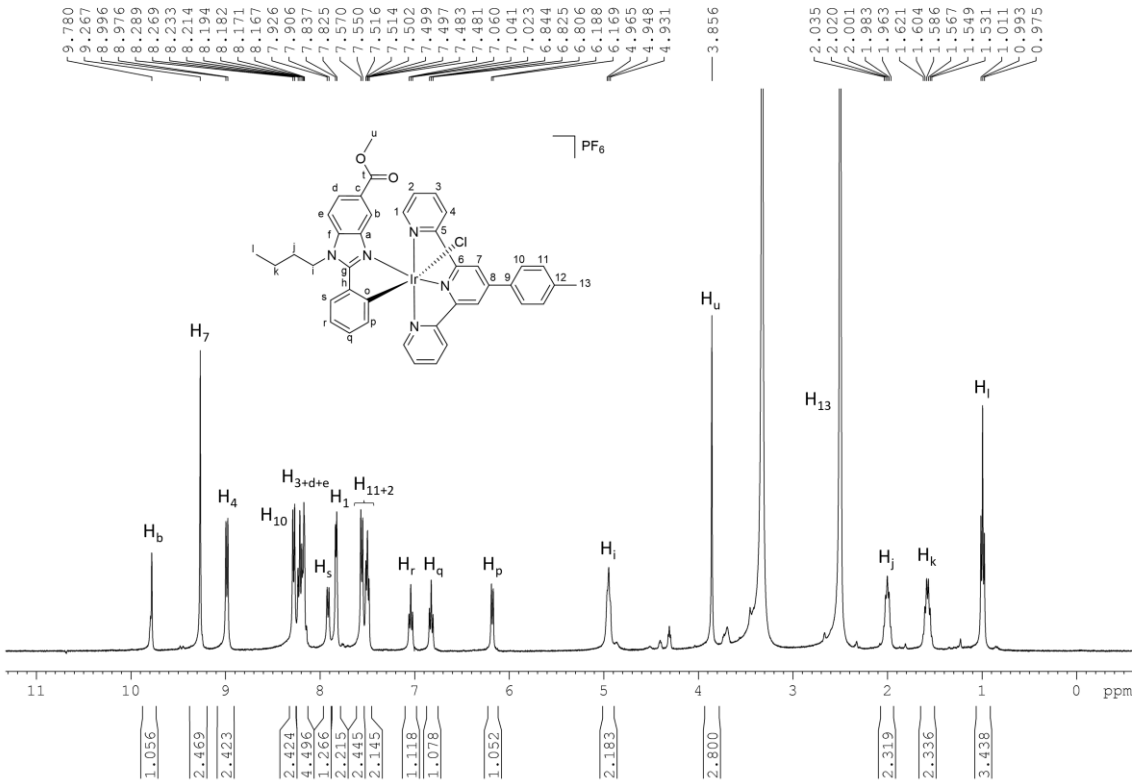


Figura A3.60. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **30** en DMSO-d$_6$.

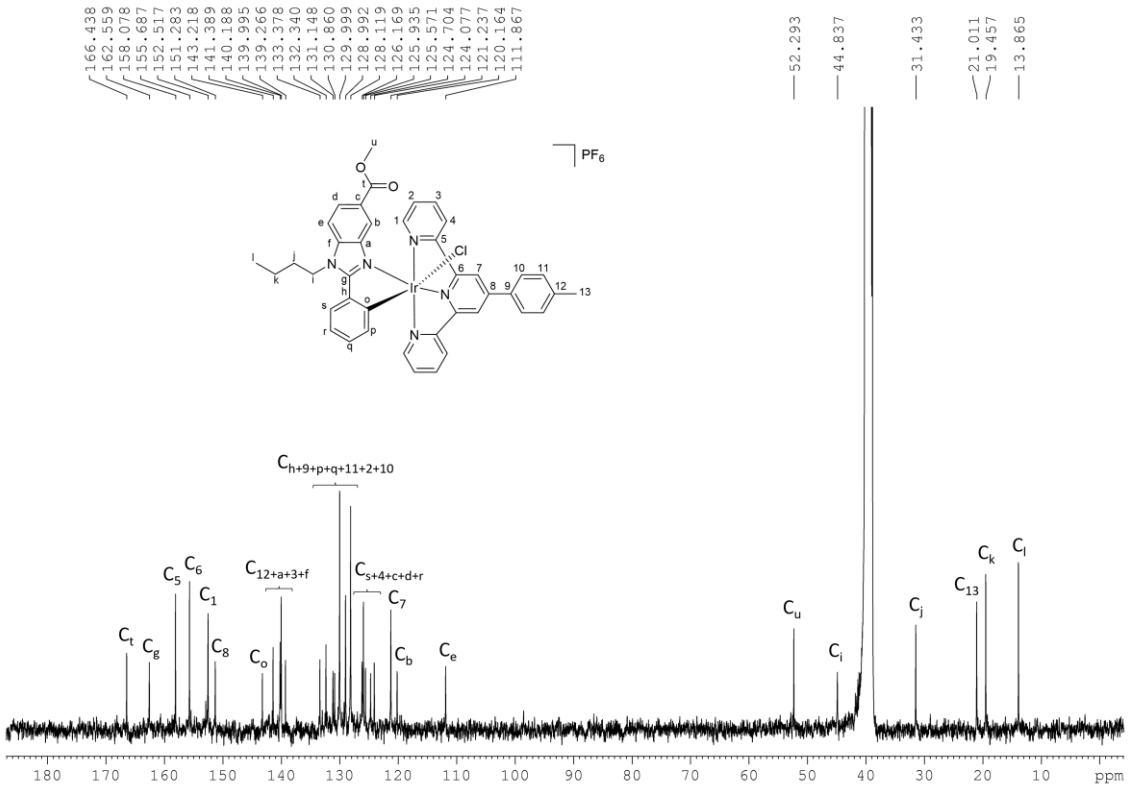


Figura A3.61. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **30** en DMSO-d_6.

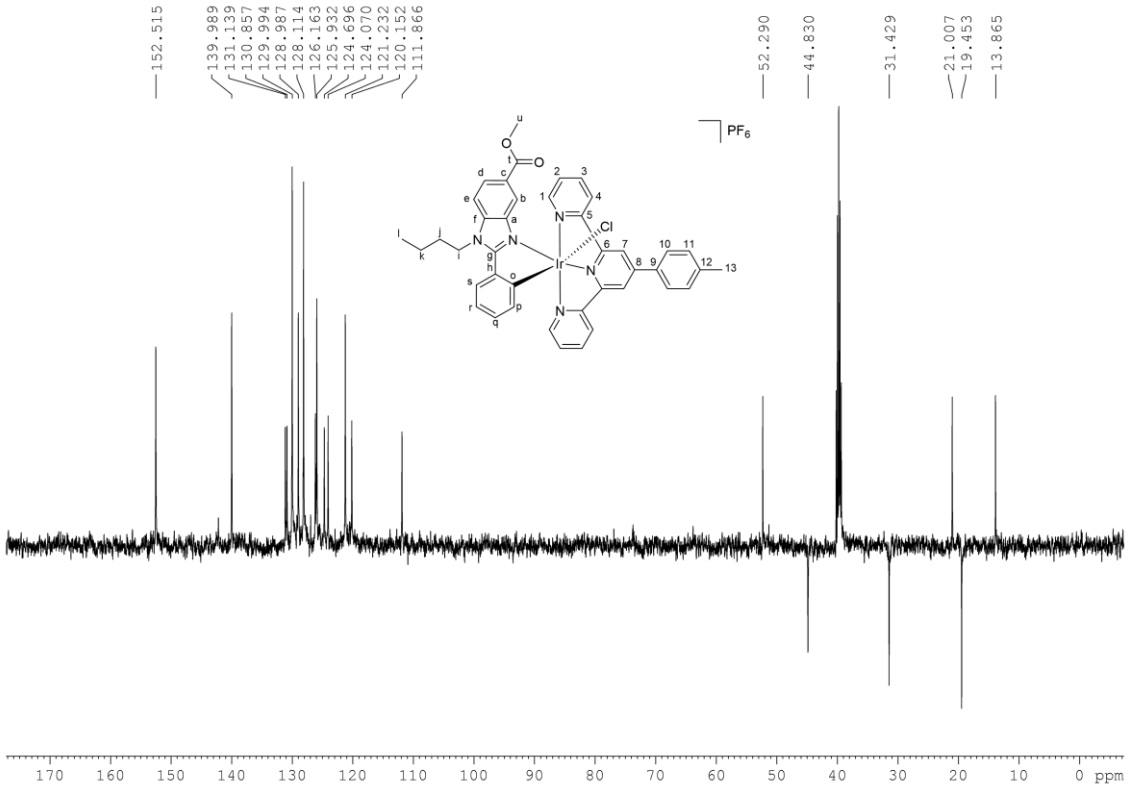


Figura A3.62. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **30** en DMSO-d_6.

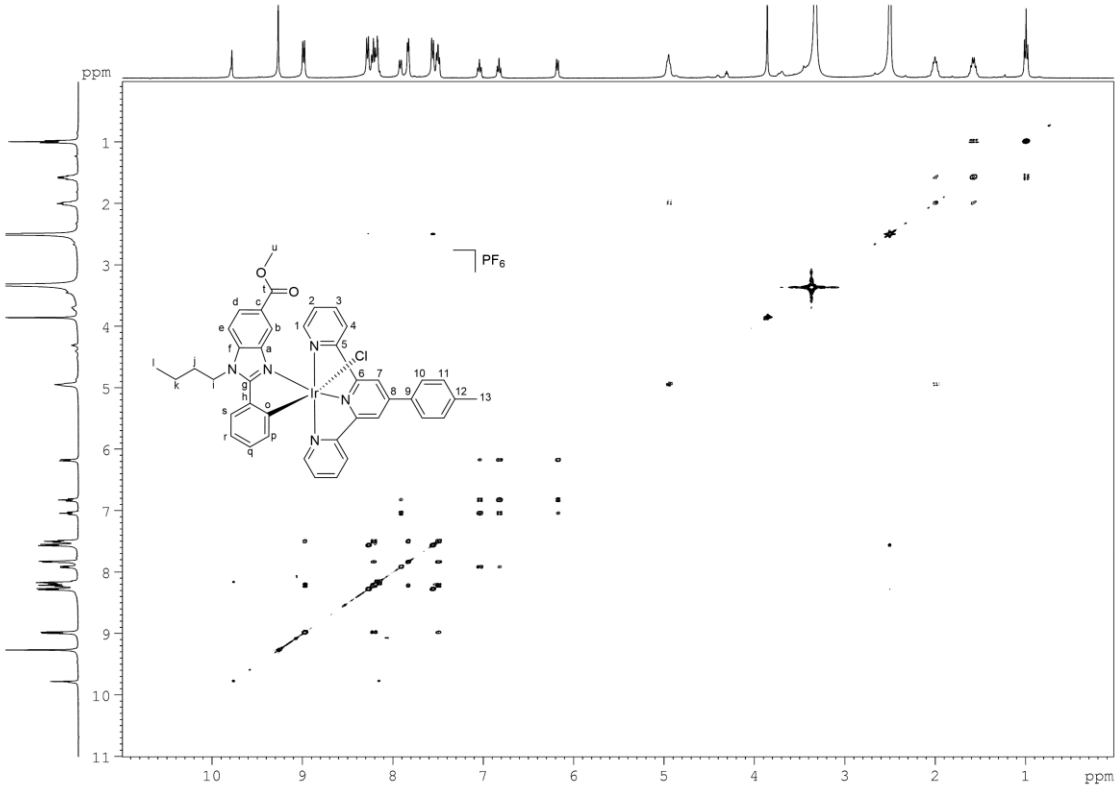


Figura A3.63. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **30** en DMSO-d_6.

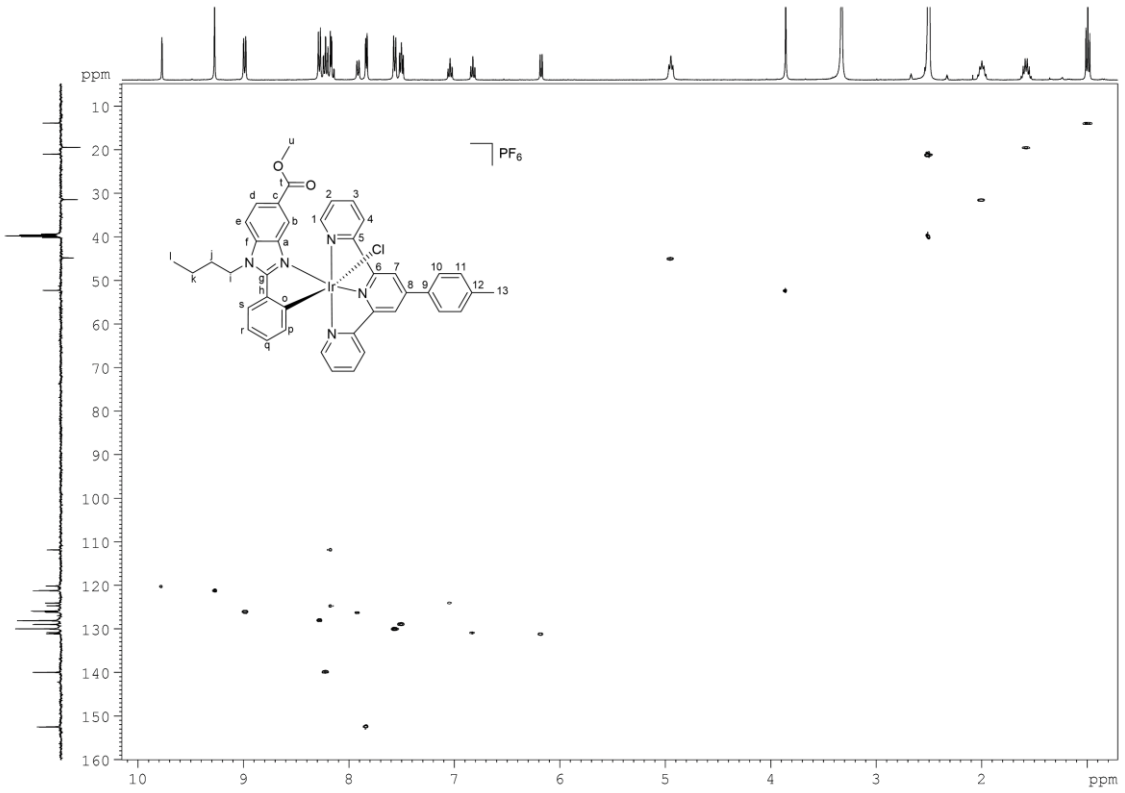


Figura A3.64. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **30** en DMSO-d_6.

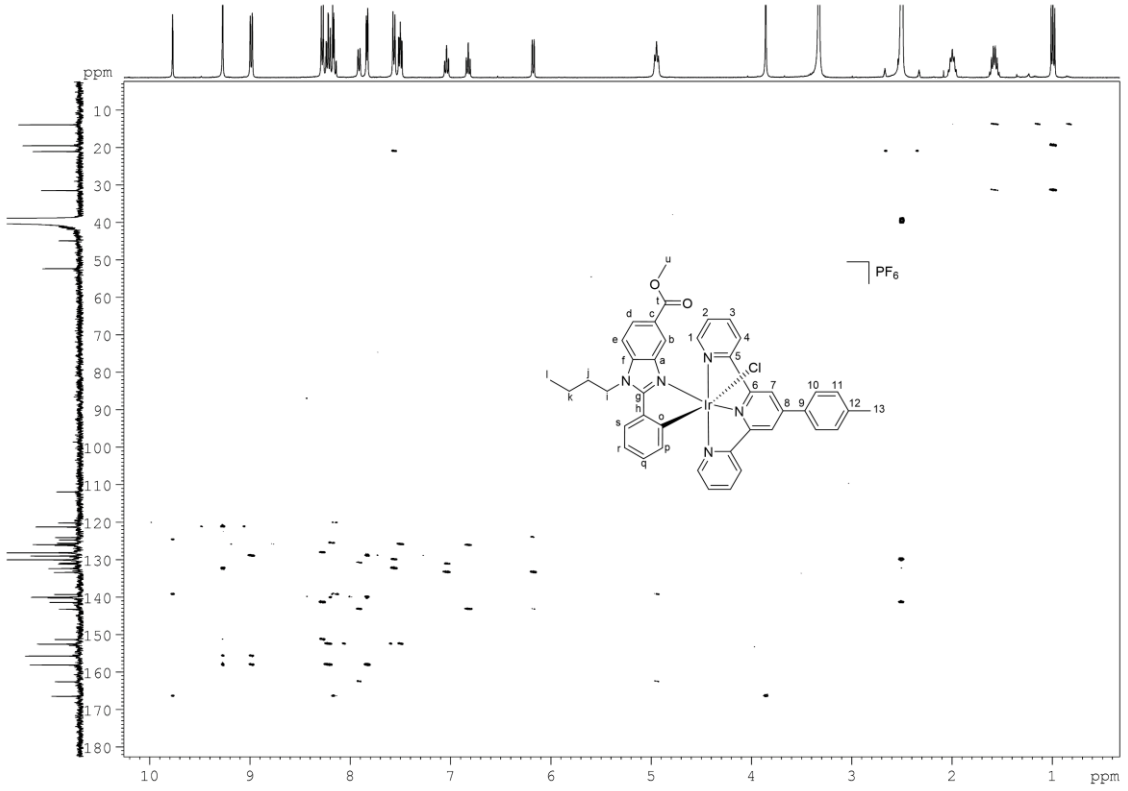


Figura A3.65. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HMBC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **30** en DMSO-d$_6$.

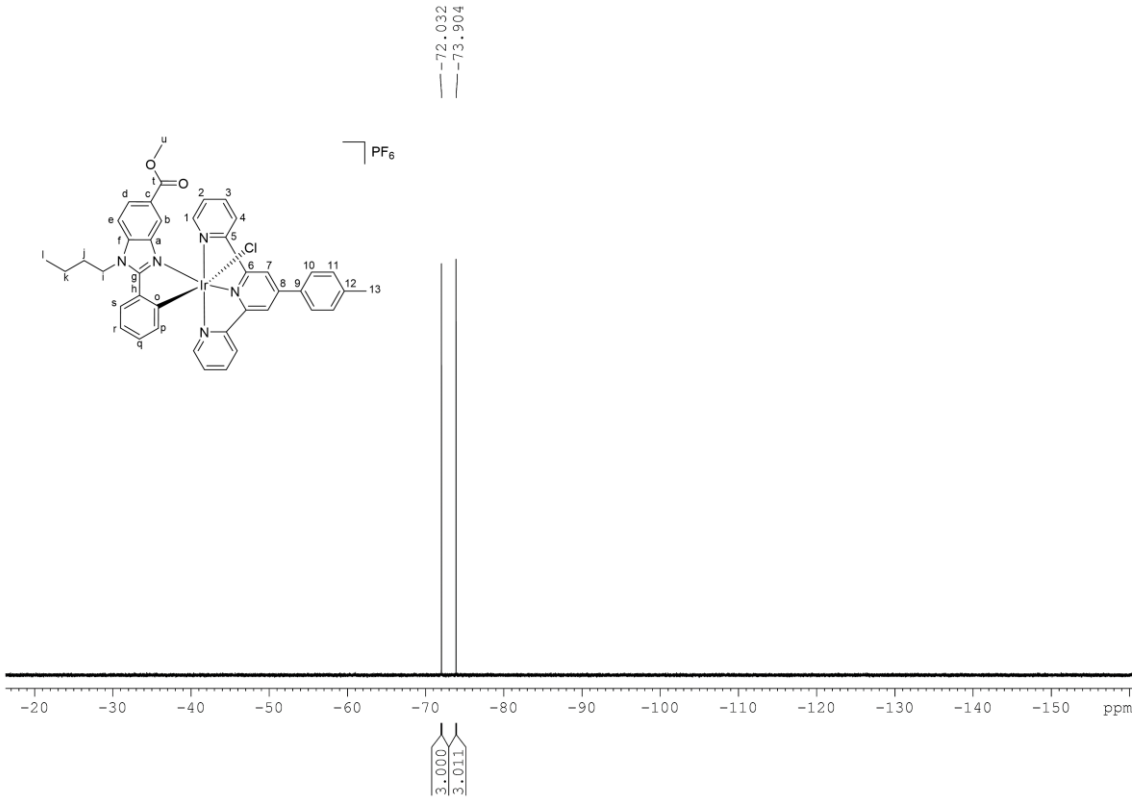


Figura A3.66. Espectro de ^{19}F-RMN 377 MHz del compuesto **30** en DMSO-d$_6$.

1.11. Valores de δ (ppm) para todas las señales de los distintos compuestos

Tabla A3.1. Valores de δ (ppm) obtenidos por ^{1}H-RMN del proligando **16** y los complejos **22**–**25** en DMSO-d_6.

	16	**22**	**23**	**24**	**25**
	^{1}H	**^{1}H**	**^{1}H**	**^{1}H**	**^{1}H**
a	-	-	-	-	-
b	7,86	8,94	9,17	9,24	9,14
c	7,32	7,57-7,42	7,58-7,50	7,55	7,57-7,46
d	7,23	7,57-7,42	7,58-7,50	7,65	7,57-7,46
e	7,13	7,93	8,05	8,15	8,01
f	-	-	-	-	-
g	-	-	-	-	-
h	-	-	-	-	-
i	5,50	6,16	6,40	6,55	6,33
j	-	-	-	-	-
k	7,21	7,57-7,42	7,58-7,50	7,65	7,57-7,46
l	-	7,75	7,76	7,77	7,76
m	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	-
o	7,16	-	-	-	-
p	-	6,13	6,13	6,47	-
q	-	7,57-7,42	6,71	-	-
r	6,86	-	6,81	-	6,45
s	7,09	-	7,62	8,27	7,29
t	6,03	-	-	7,65	5,33
u	-	-	-	7,24	-
v	-	-	-	7,32	-
w	-	-	-	7,24	-
OMe	-	-	-	-	-
1	-	7,93	7,90	7,94	7,90
2	-	7,61	7,58-7,50	7,52	7,60
3	-	8,22	8,23	8,20	8,29-8,19
4	-	8,98	8,98	9,00	8,96
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	9,25	9,27	9,30	9,17
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	8,26	8,27	8,32	8,29-8,19
11	-	7,57-7,42	7,58-7,50	7,58	7,57-7,46
12	-	-	-	-	-
13	-	2,50	2,50	2,52	2,50

Tabla A3.2. Valores de δ (ppm) obtenidos por ^{1}H-RMN de los complejos **26**–**30** en DMSO-d_6.

	26	**27**	**28**	**29**	**30**
	^{1}H	**^{1}H**	**^{1}H**	**^{1}H**	**^{1}H**
a	-	-	-	-	-
b	8,83	9,05	9,12	9,00	9,77
c	7,41	7,45	7,50-7,45	7,40	-
d	7,49	7,56	7,62	7,56-7,49	8,19-8,13
e	7,91	8,04	8,11	7,98	8,19-8,13
f	-	-	-	-	-
g	-	-	-	-	-
h	-	-	-	-	-
i	4,29	4,48	4,62	4,40	4,95
j	-	-	-	-	2,00
k	-	-	-	-	1,58
l	-	-	-	-	0,99
m	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	-
o	-	-	-	-	-
p	6,16	6,14	6,49	-	6,18
q	7,61	6,80	-	-	6,82
r	-	7,00	-	6,62	7,04
s	-	8,04	8,66	7,70	7,92
t	-	-	7,36	5,36	-
u	-	-	7,33-7,26	-	-
v	-	-	7,33-7,26	-	-
w	-	-	7,96	-	-
OMe	-	-	-	-	3,86
1	7,84	7,80	7,86	7,80	7,83
2	7,57-7,52	7,50	7,50-7,45	7,56-7,49	7,49
3	8,22	8,20	8,19	8,25-8,19	8,22
4	8,98	8,99	9,00	8,94	8,99
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	9,26	9,27	9,31	9,15	9,27
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	8,26	8,28	8,32	8,25-8,19	8,28
11	7,57-7,52	7,56	7,59	7,56-7,49	7,56
12	-	-	-	-	-
13	2,50	2,50	2,52	2,50	2,50

Tabla A3.3. Valores de δ (ppm) obtenidos por ^{13}C-RMN del proligando **16** y de los complejos **22**–**25** en DMSO-d_6.

	16	**22**	**23**	**24**	**25**
	^{13}C	**^{13}C**	**^{13}C**	**^{13}C**	**^{13}C**
a	143,2	140,9	140,3	140,5	140,5
b	120,2	117,0	118,2	118,6	118,2
c	123,1	124,1	124,3	124,4	124,3
d	123,3	123,2	124,2	125,8	124,1
e	110,2	111,2	111,2	111,4	111,2
f	135,9	134,8	136,1	136,7	136,3
g	135,9	159,5	160,8	159,7	161,1
h	123,6	146,4	133,0	131,7	128,1
i	48,1	47,6	47,0	47,2	47,2
j	140,5	140,4	140,7	140,9	140,9
k	126,4	126,9	126,7	127,0	126,9
l	126,3	125,7	125,7	125,8	125,9
m	125,0	128,3	128,2	128,6	128,4
n	130,4	122,5	125,2	122,1	122,8
o	109,7	123,0	142,4	133,4	116,1
p	148,3	128,5	130,7	128,3	151,9
q	149,4	132,6	130,3	134,9	146,8
r	18,8	-	123,4	129,6	104,6
s	123,5	-	125,5	125,8	121,7
t	101,7	-	-	125,8	99,8
u	-	-	-	124,70	-
v	-	-	-	125,80	-
w	-	-	-	127,60	-
OMe	-	-	-	-	-
1	-	152,4	152,1	152,1	152,3
2	-	128,9	128,8	128,7	128,9
3	-	139,9	139,8	139,8	140,2
4	-	125,5	125,7	125,8	125,5
5	-	158,0	157,9	158,1	158,9
6	-	155,8	155,4	155,6	156,6
7	-	120,9	120,9	121,0	120,3
8	-	151,2	151,0	151,1	151,1
9	-	132,1	132,1	132,2	132,4
10	-	127,9	127,8	127,9	127,9
11	-	129,7	129,7	129,8	129,9
12	-	141,1	141,1	141,2	141,2
13	-	20,7	20,7	20,8	20,9

Tabla A3.4. Valores de δ (ppm) obtenidos por ^{13}C-RMN de los complejos **26**–**30** en DMSO-d_6.

	26	**27**	**28**	**29**	**30**
	^{13}C	**^{13}C**	**^{13}C**	**^{13}C**	**^{13}C**
a	141,0	140,3	140,5	140,4	140,2
b	116,8	118,0	118,3	117,8	120,2
c	123,8	123,8	124,1	123,7	125,6
d	122,9	123,7	123,9	123,5	124,7
e	111,4	111,5	111,6	111,3	111,9
f	135,3	136,3	136,7	136,3	139,3
g	159,7	161,1	160,1	161,3	162,6
h	145,2	134,4	133,0	129,3	133,4
i	31,8	32,4	32,7	32,4	44,8
j	-	-	-	-	31,4
k	-	-	-	-	19,5
l	-	-	-	-	13,9
m	-	-	-	-	-
n	-	-	-	-	-
o	124,0	142,0	135,0	115,6	143,2
p	128,8	130,9	128,4	152,0	131,2
q	132,0	130,3	133,6	146,7	130,9
r	-	123,7	130,1	104,6	124,1
s	-	126,1	126,0	122,0	126,2
t	-	-	125,9	99,8	166,4
u	-	-	127,50	-	-
v	-	-	124,80	-	-
w	-	-	129,00	-	-
OMe	-	-	-	-	52,3
1	152,7	152,4	152,3	152,3	152,5
2	128,9	128,8	128,7	128,8	129,0
3	140,0	139,9	139,9	140,2	140,0
4	125,7	125,9	125,9	125,5	125,9
5	158,3	158,2	158,3	159,0	158,1
6	156,1	155,8	155,9	156,7	155,7
7	121,1	121,1	121,1	120,4	121,2
8	151,3	151,2	151,2	151,1	151,3
9	132,4	132,4	132,4	132,5	132,3
10	128,1	128,1	128,1	128,0	128,1
11	129,9	130,0	130,0	130,0	130,0
12	141,3	141,3	141,3	141,2	141,4
13	21,0	21,0	21,0	21,0	21,0

1.12. Espectros ^{13}C-RMN comparativos

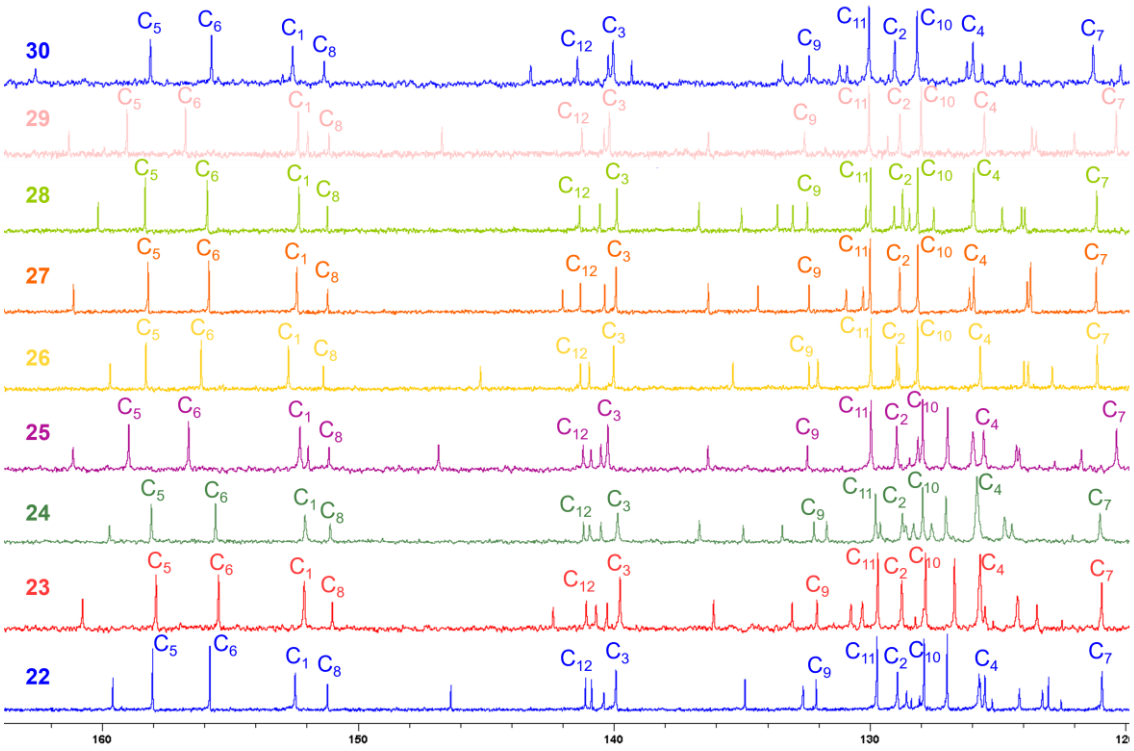


Figura A3.67. Ampliación zona aromática de los espectros ^{13}C-RMN de todos los complejos con el fin de estudiar las señales $C_{1\text{-}12}$ (el resto se han omitido por claridad), en DMSO-d_6, a t.a., 151 MHz.

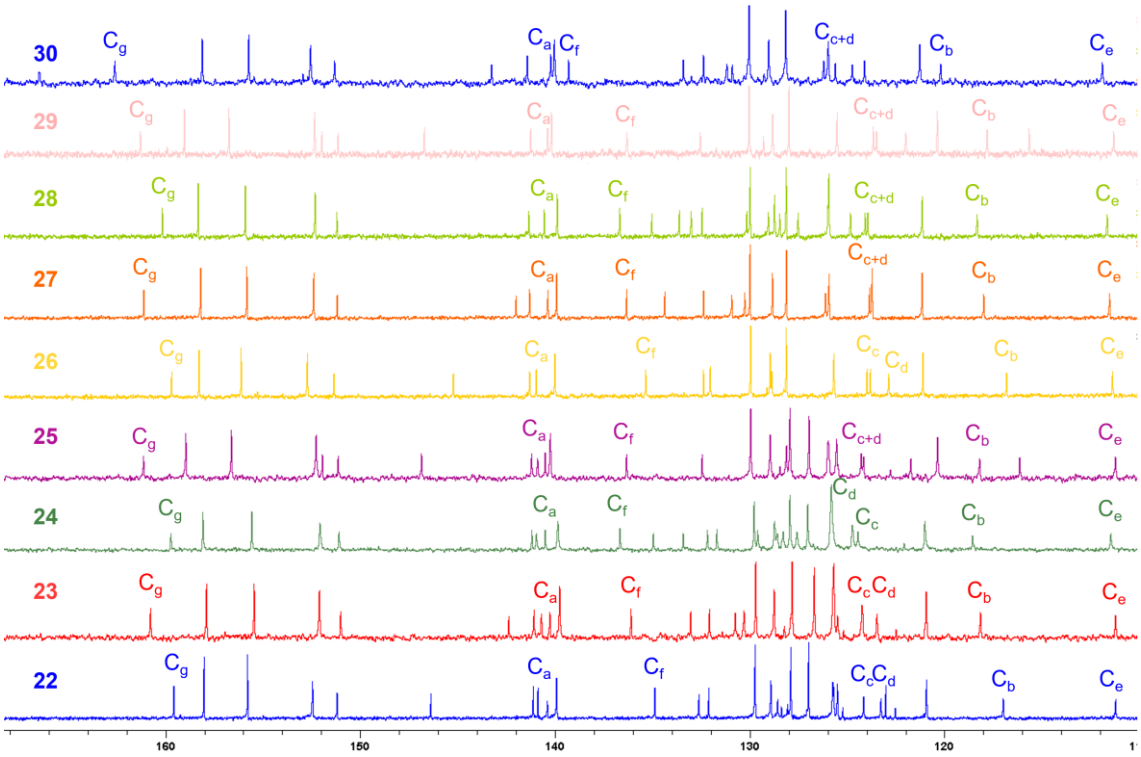


Figura A3.68. Ampliación zona aromática de los espectros ^{13}C-RMN de todos los complejos con el fin de estudiar las señales $C_{a\text{-}g}$ (el resto se han omitido por claridad), en DMSO-d_6, a t.a., 600 MHz.

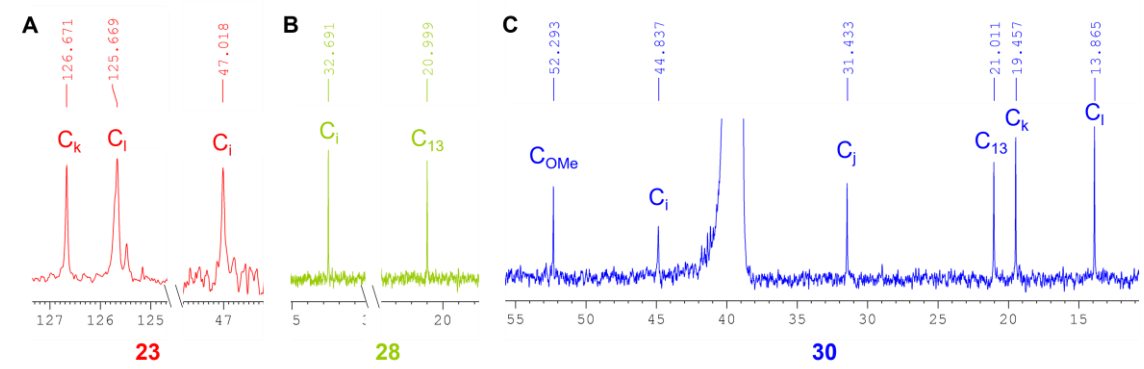


Figura A3.69. Señales del ^{13}C-RMN características de los distintos tipos de compuestos: (A) Carbonos C_l, C_k y C_i del complejo **23**; (B) Carbonos C_i y C_{13} del complejo **28**; (C) Carbonos C_i, C_{OCH3}, C_j, C_k y C_l del complejo **30**.

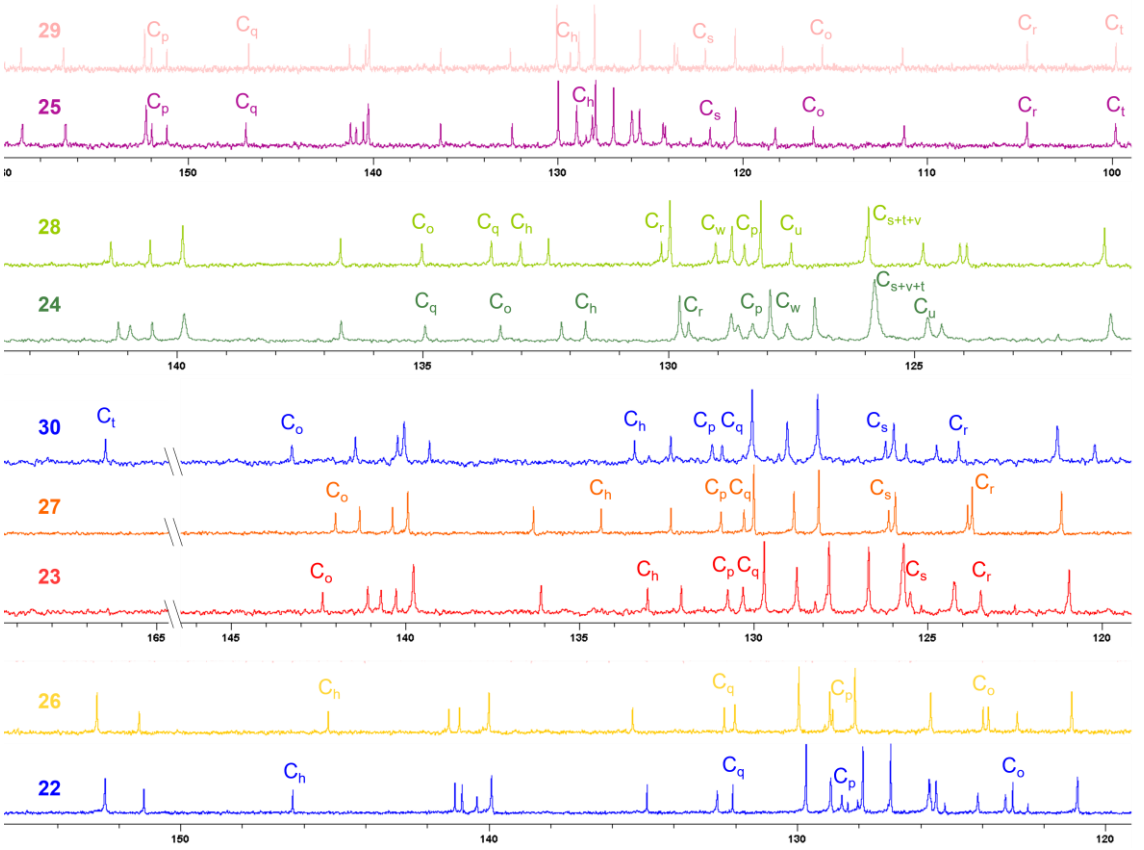


Figura A3.70. Ampliación zona aromática de los espectros ^{13}C-RMN de los distintos pares de complejos con el fin de estudiar las señales $C_{o\text{-}w}$ del ligando C^N, en DMSO-d_6, a t.a., 151 MHz.

2. Espectrometría de masas

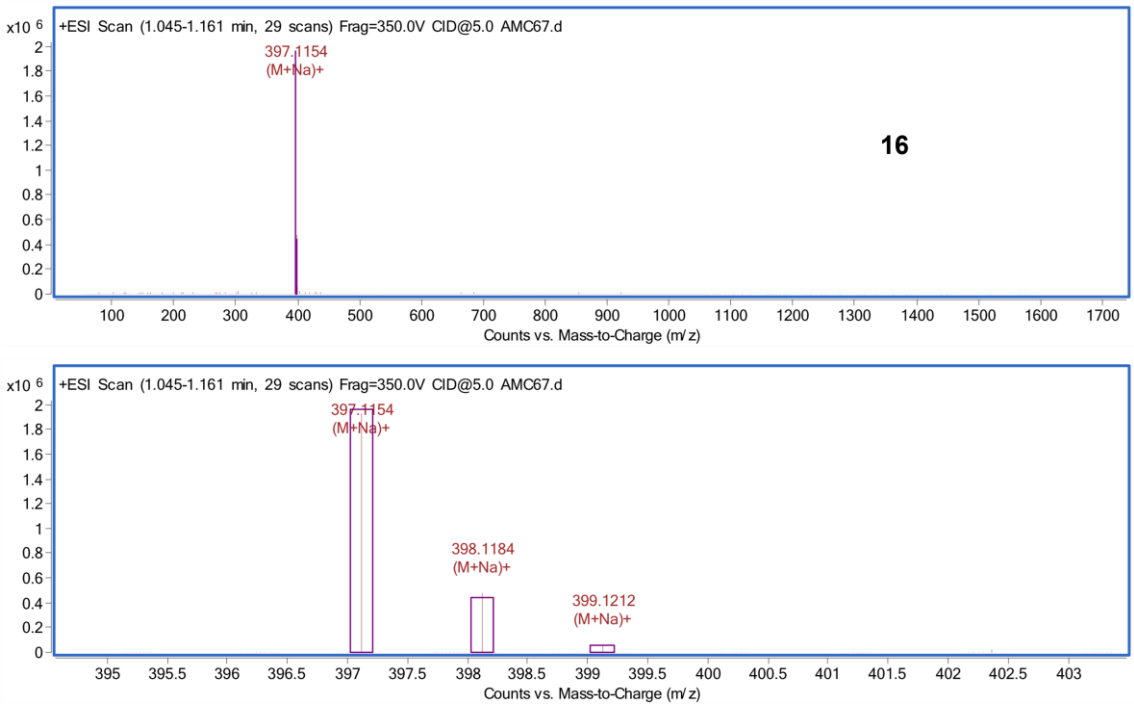


Figura A3.71. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **16** en DMSO.

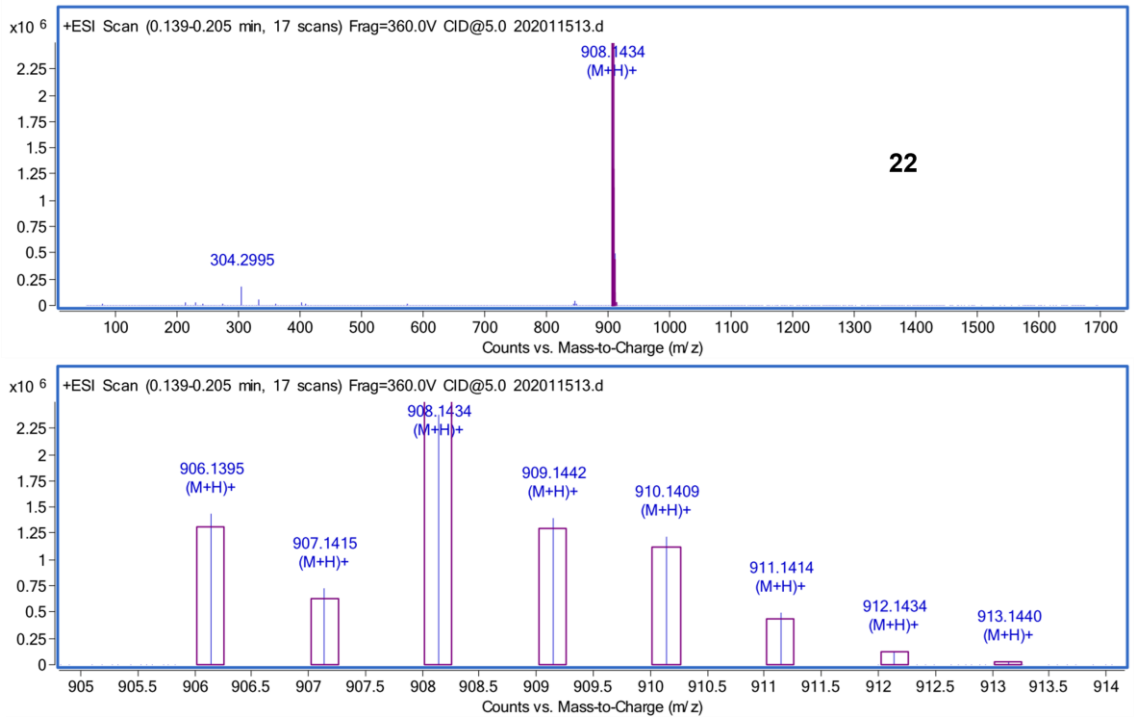


Figura A3.72. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **22** en DMSO.

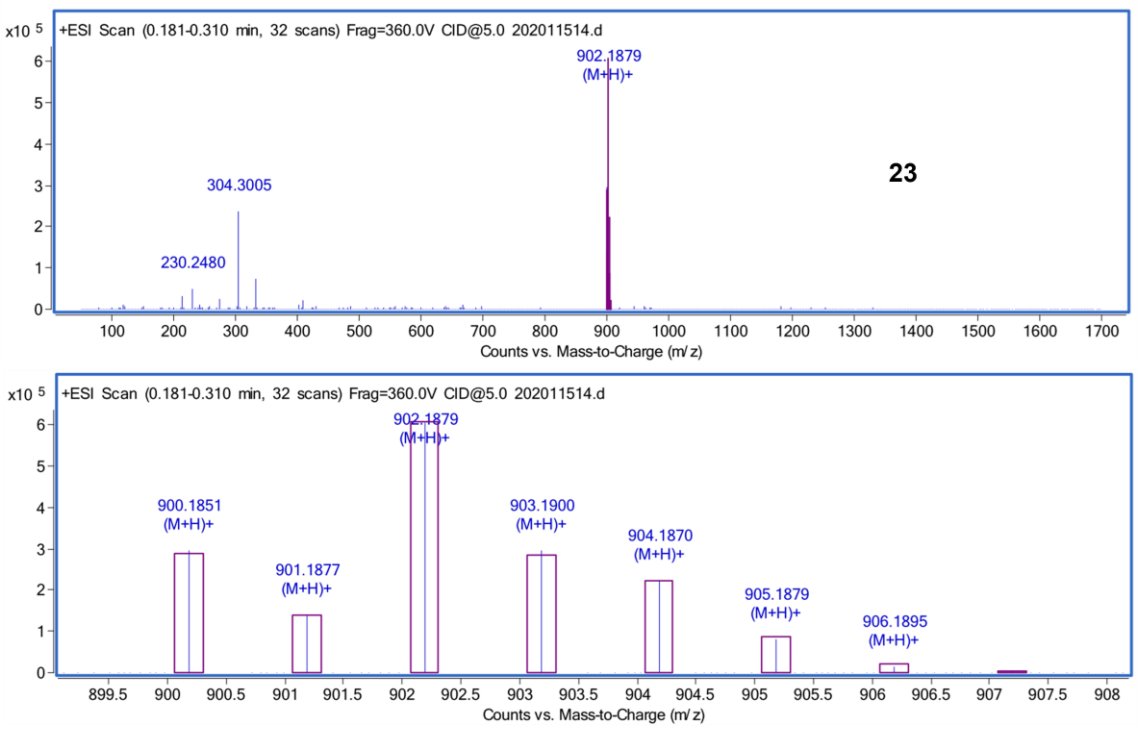


Figura A3.73. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **23** en DMSO.

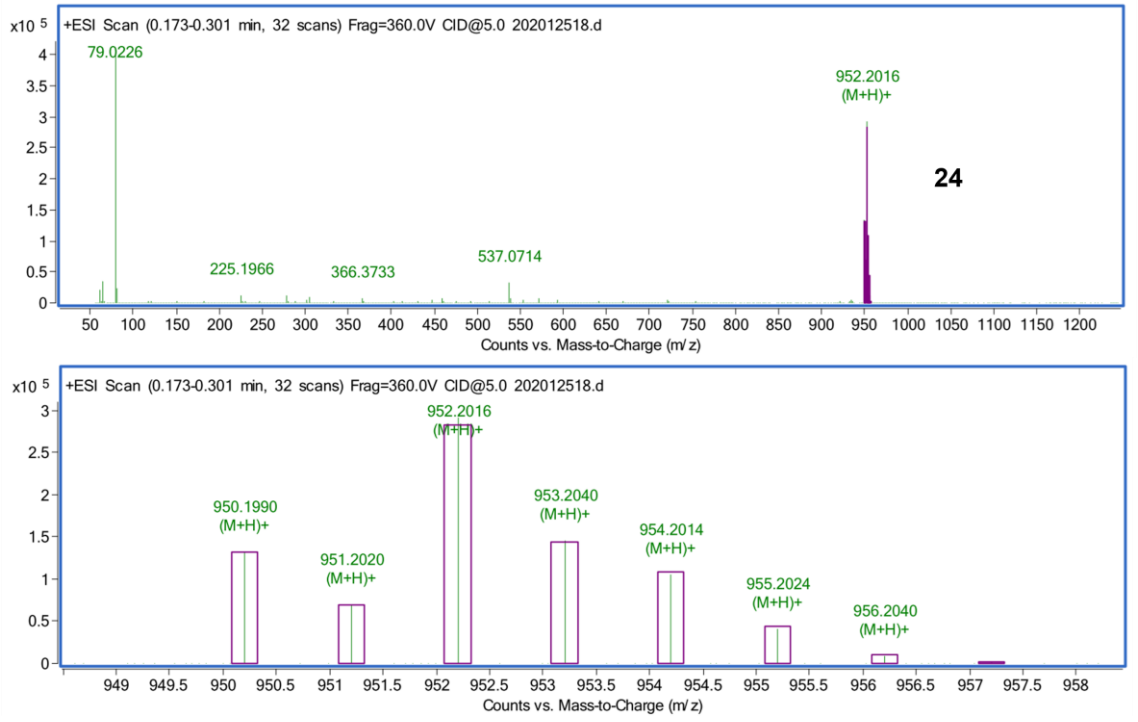


Figura A3.74. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **24** en DMSO.

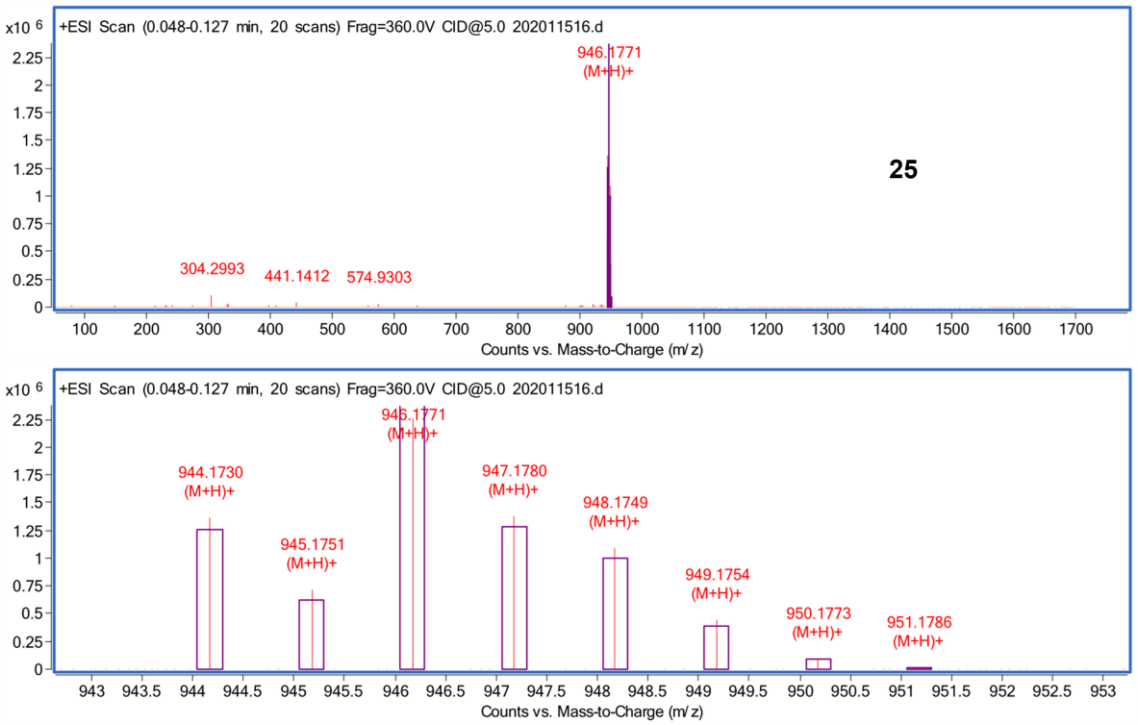


Figura A3.75. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **25** en DMSO.

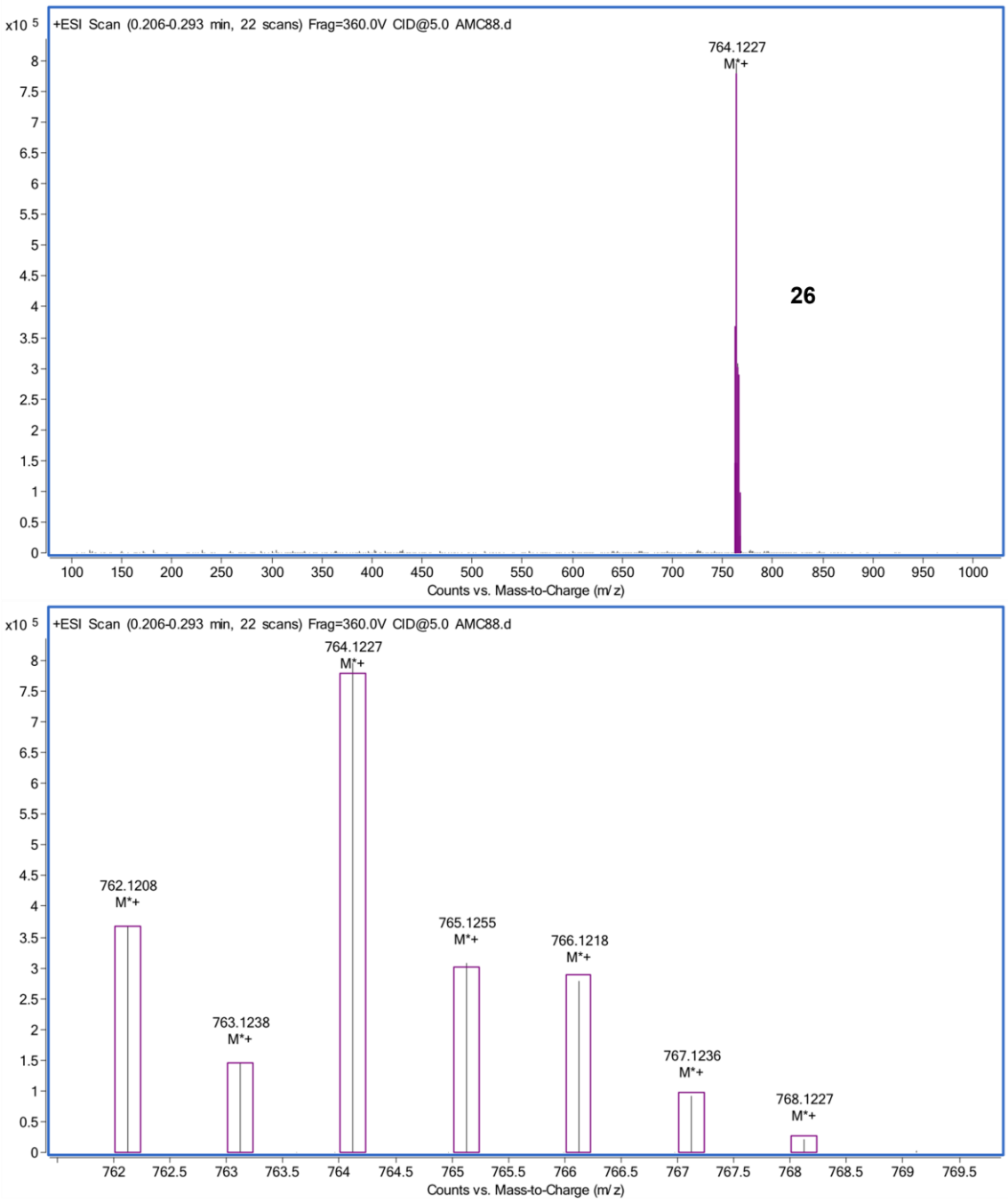


Figura A3.76. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **26** en DMSO.

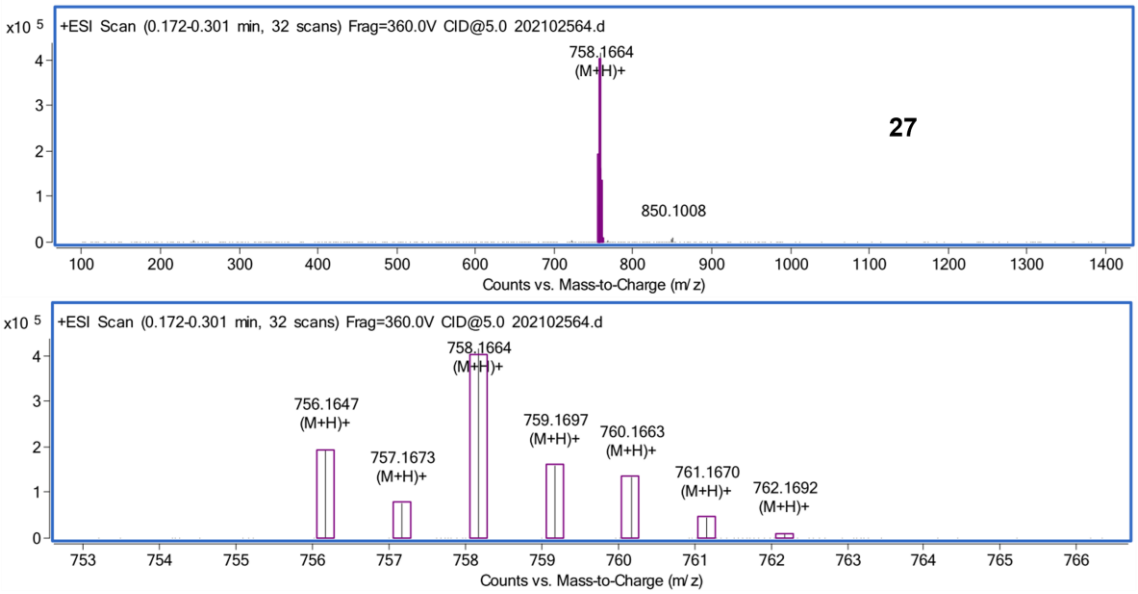


Figura A3.77. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **27** en DMSO.

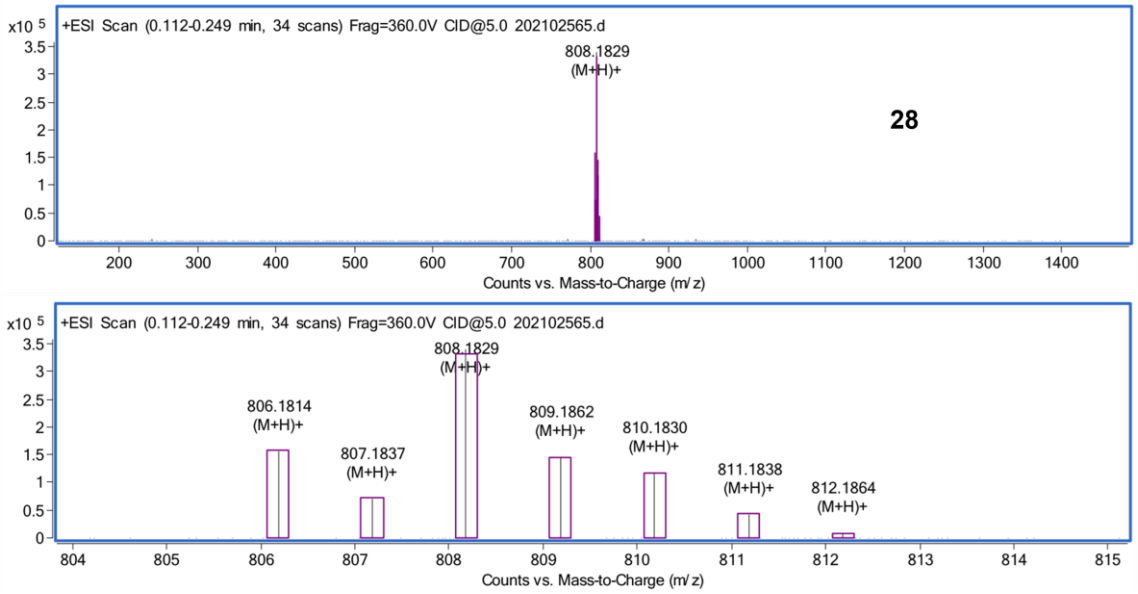


Figura A3.78. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **28** en DMSO.

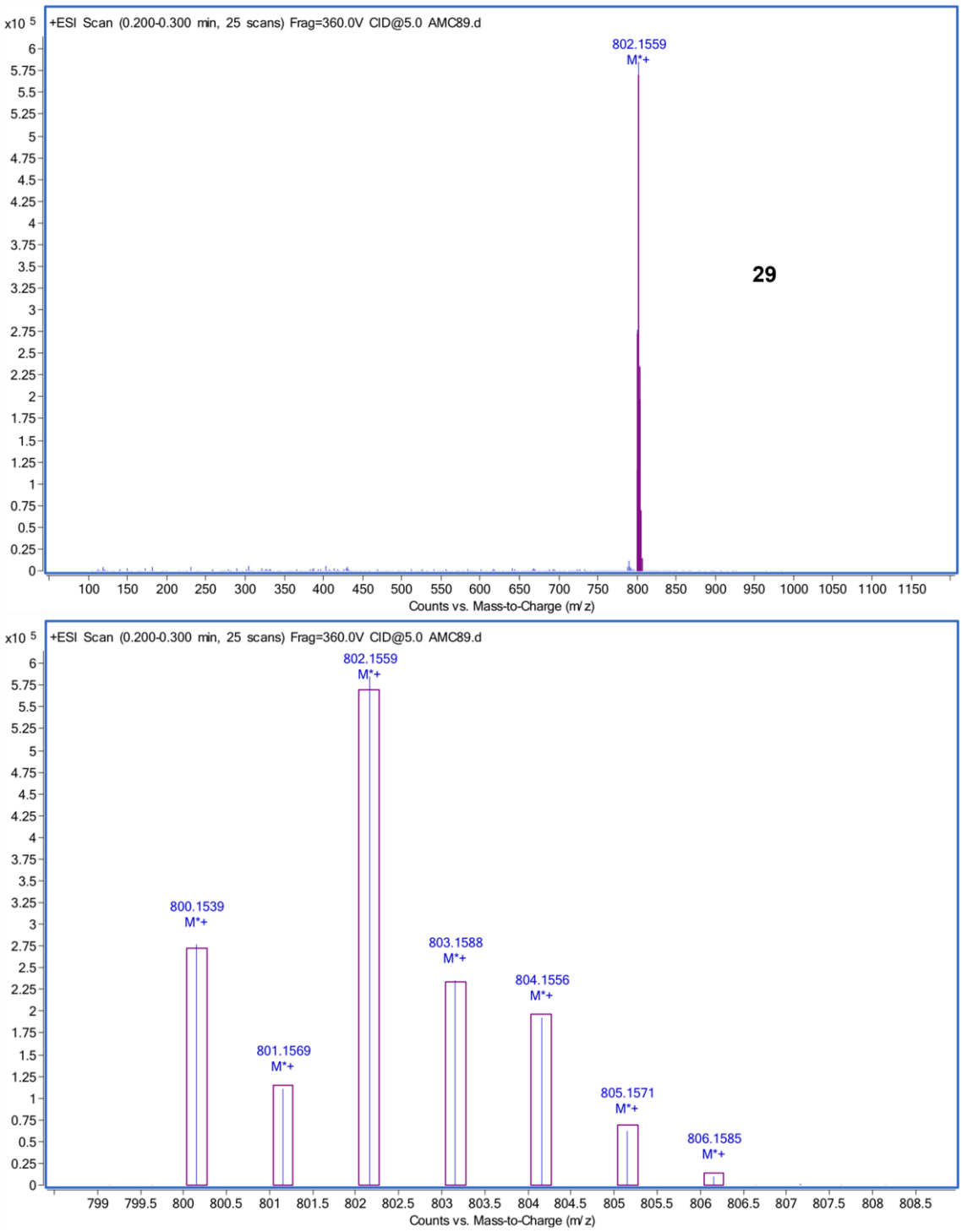


Figura A3.79. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **29** en DMSO.

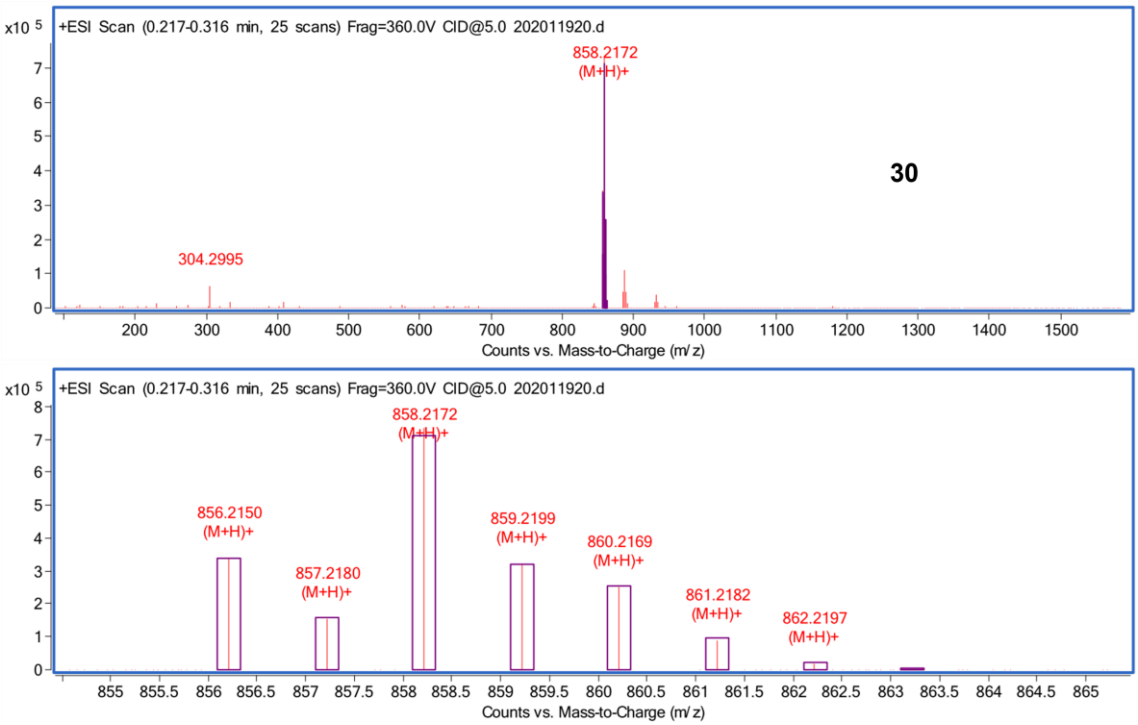
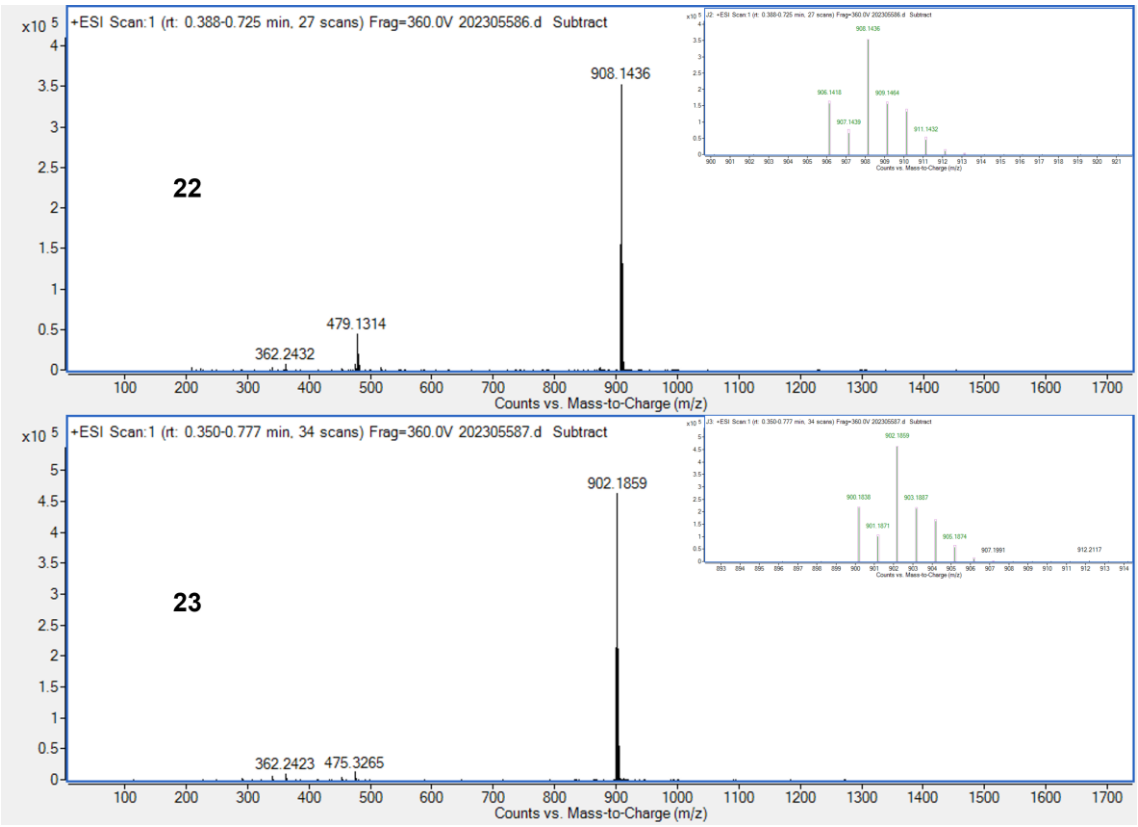
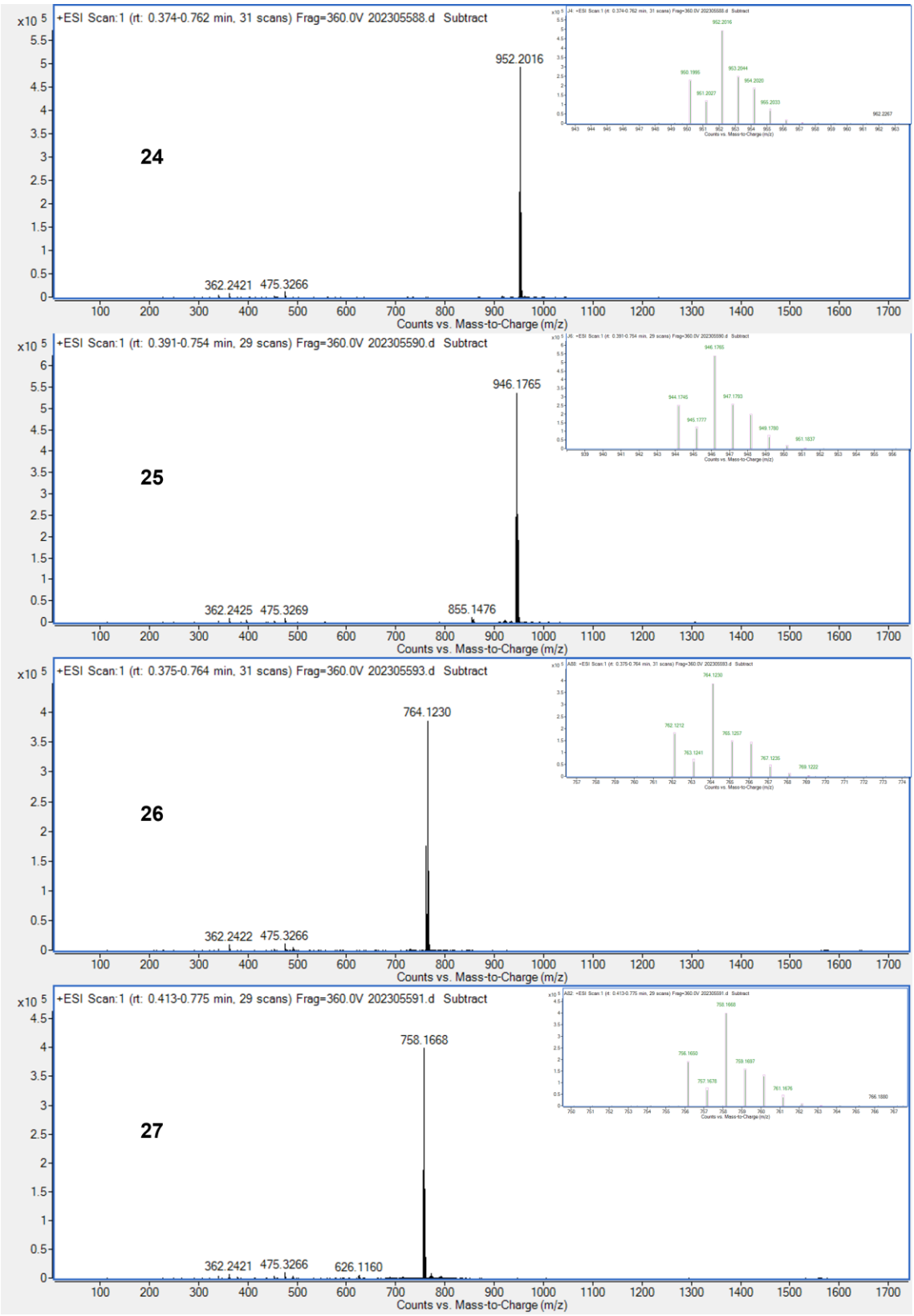


Figura A3.80. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **30** en DMSO.

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)




+ESI Scan:1 (rt: 0.374-0.762 min, 31 scans) Frag=360.0V 202305588.d Subtract
952.2016
24
362.2421
475.3266
+ESI Scan:1 (rt: 0.391-0.754 min, 29 scans) Frag=360.0V 202305590.d Subtract
946.1765
25
362.2425
475.3269
855.1476
+ESI Scan:1 (rt: 0.375-0.764 min, 31 scans) Frag=360.0V 202305593.d Subtract
764.1230
26
362.2422
475.3266
+ESI Scan:1 (rt: 0.413-0.775 min, 29 scans) Frag=360.0V 202305591.d Subtract
758.1668
27
362.2421
475.3266
626.1160
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

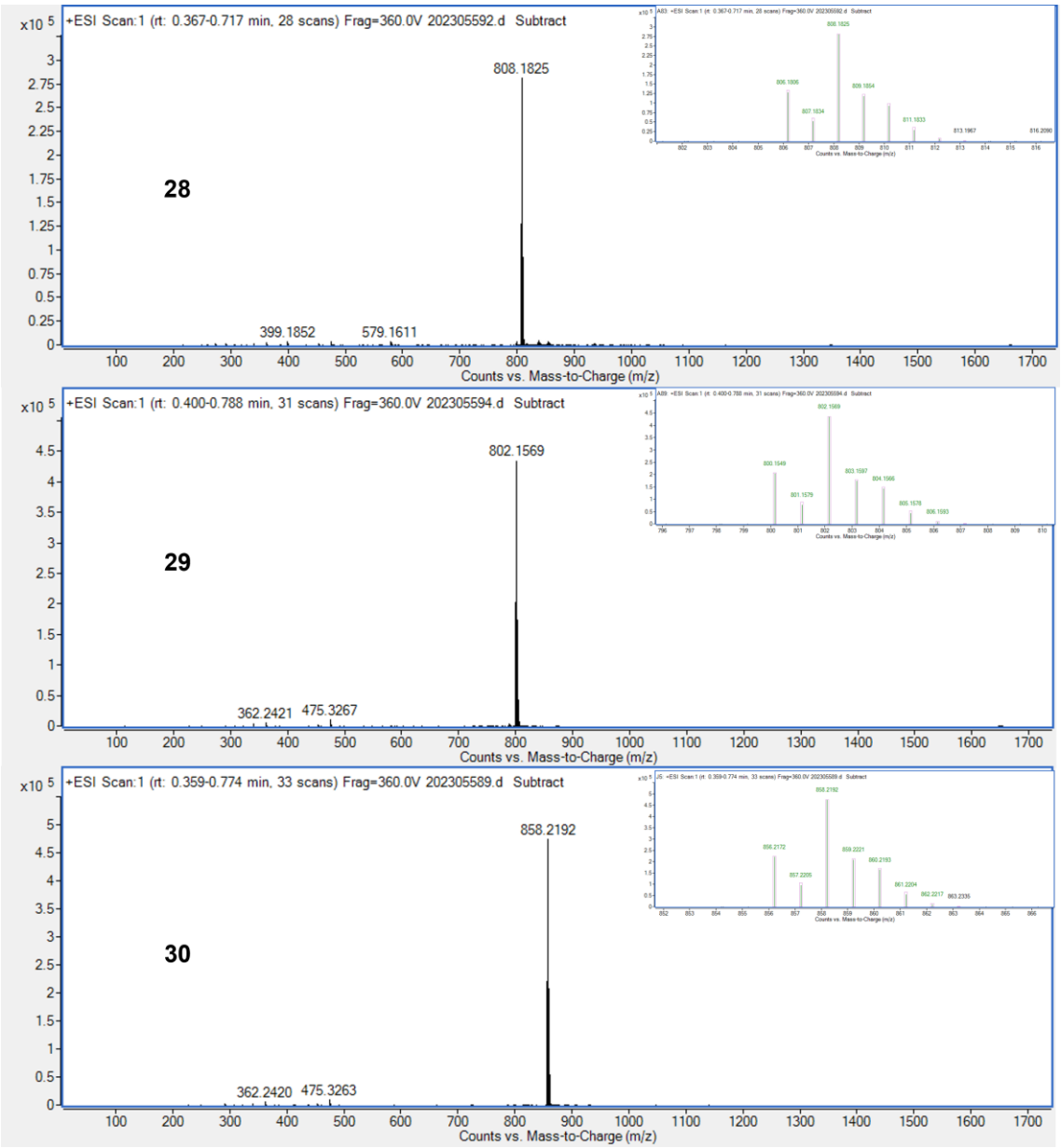


Figura A3.81. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~0,4 min de los cromatogramas de la **Figura 3.8** de todos los complejos en DMSO.

4. Propiedades fotofísicas

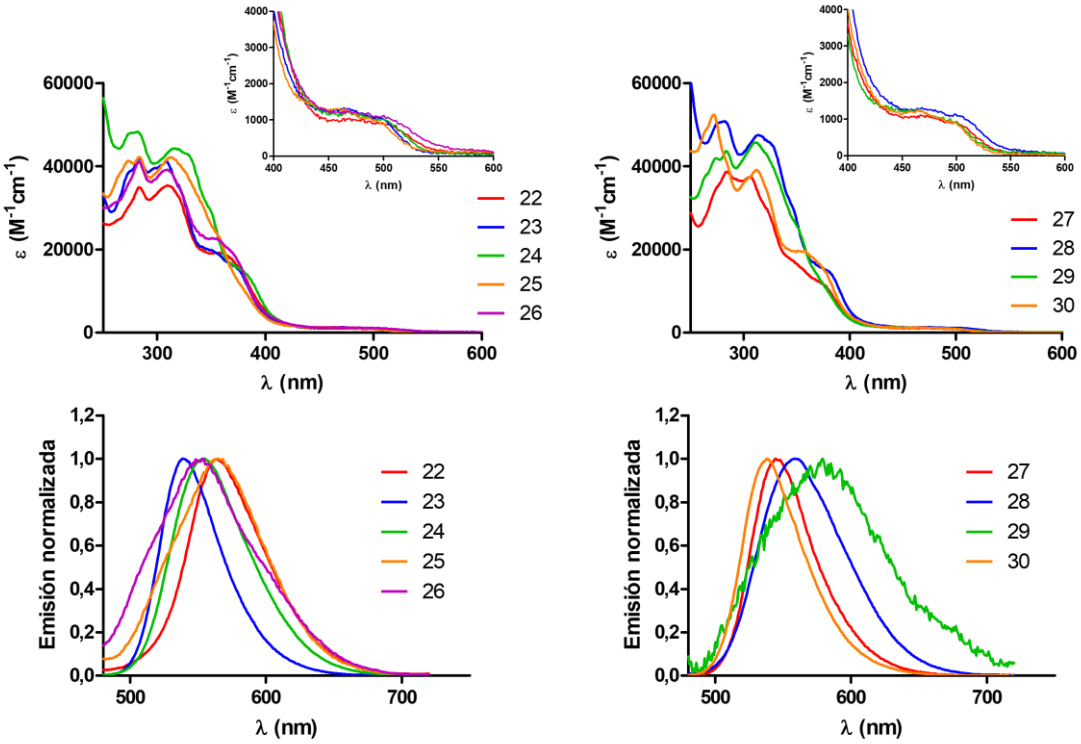


Figura A3.82. Espectros de absorción UV/Vis (arriba) y espectros de emisión normalizados (abajo) de **22**–**30** en agua (1% DMSO) en presencia de oxígeno (λ_{exc} = 405 nm, 10 μM). En los espectros de absorción se muestra una ampliación de la región 400–600 nm.

5. Estudios de estabilidad

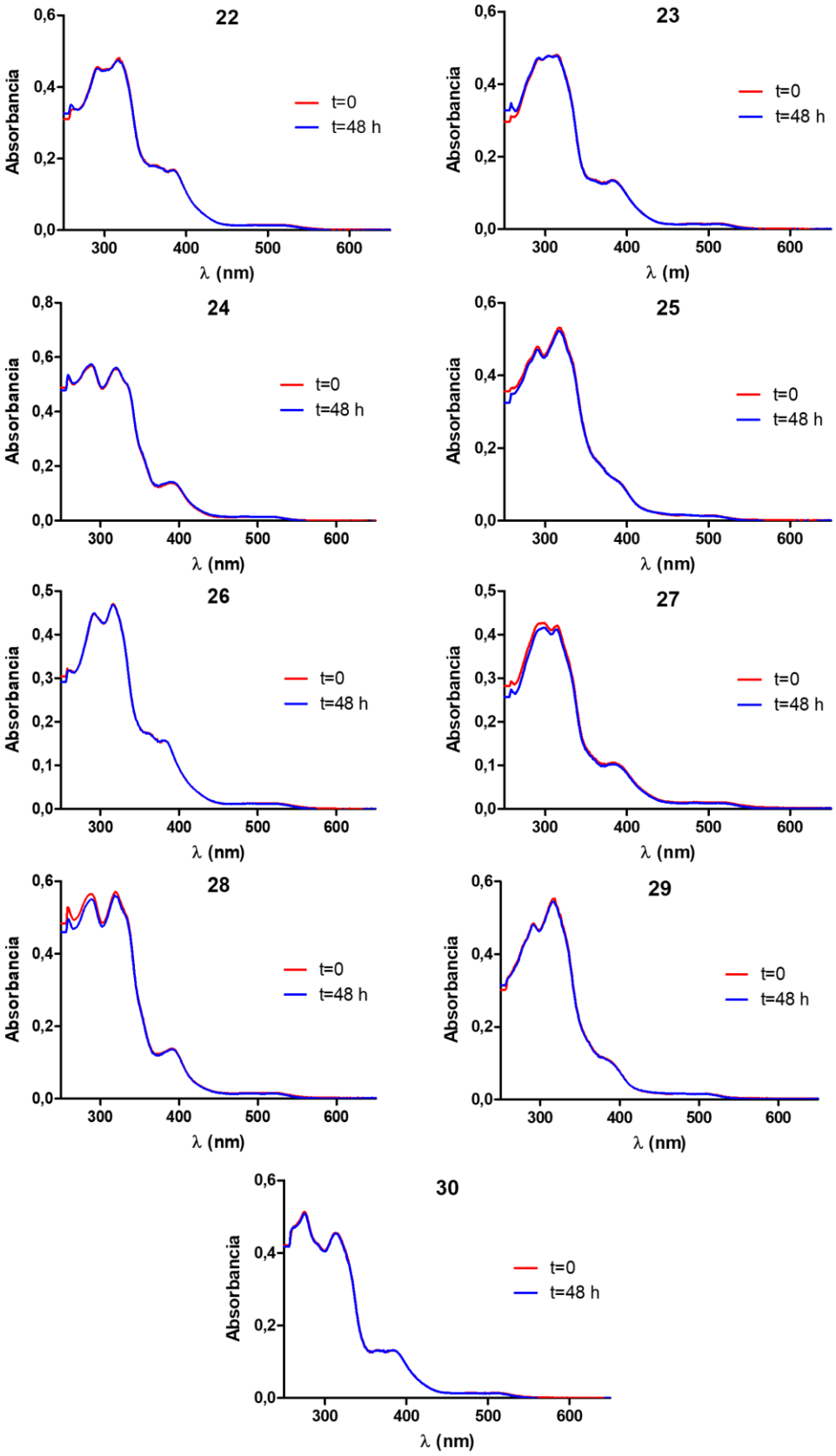


Figura A3.83. Espectro UV/Vis de los complejos (10 µM) en DMSO a t=0 y después de 48 h incubados a 37 ºC.

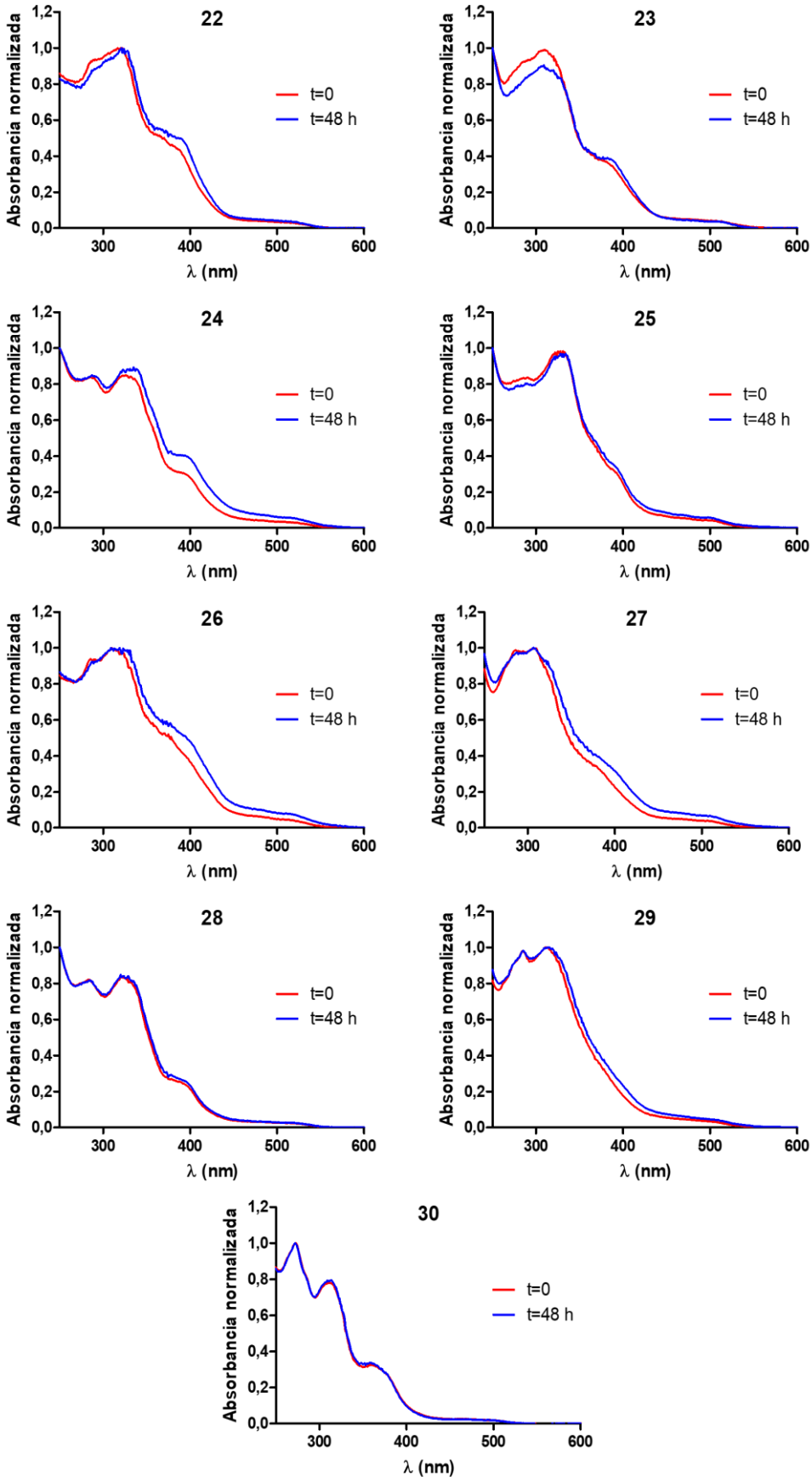


Figura A3.84. Espectro UV/Vis de los complejos (10 μM) en RPMI (5% DMSO) a t=0 y después de 48 h incubados a 37 ºC.

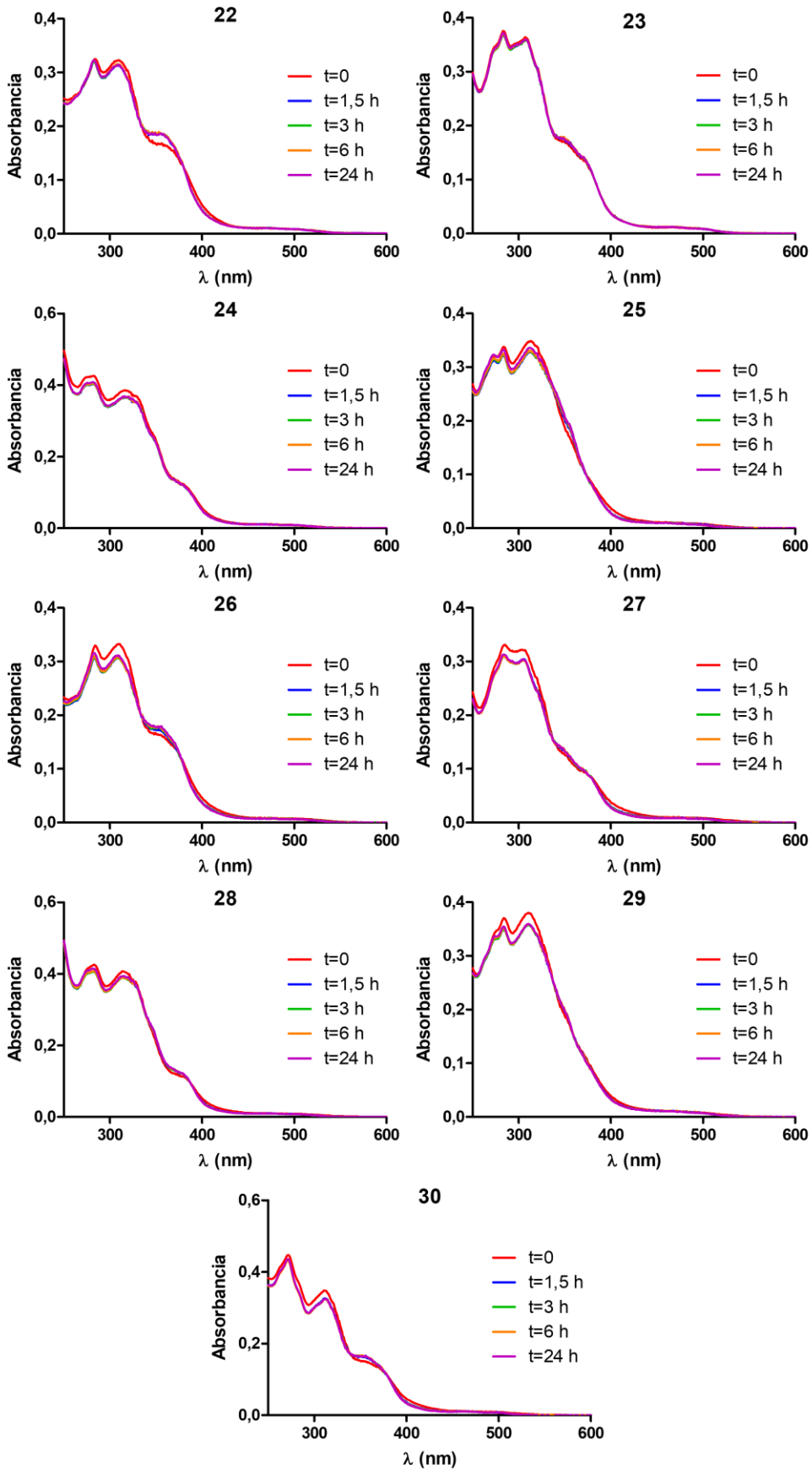


Figura A3.85. Evolución de los espectros UV/Vis de los complejos (10 μM) en agua (1% DMSO) a diferentes tiempos.

5.1. Estabilidad en presencia de biomoléculas

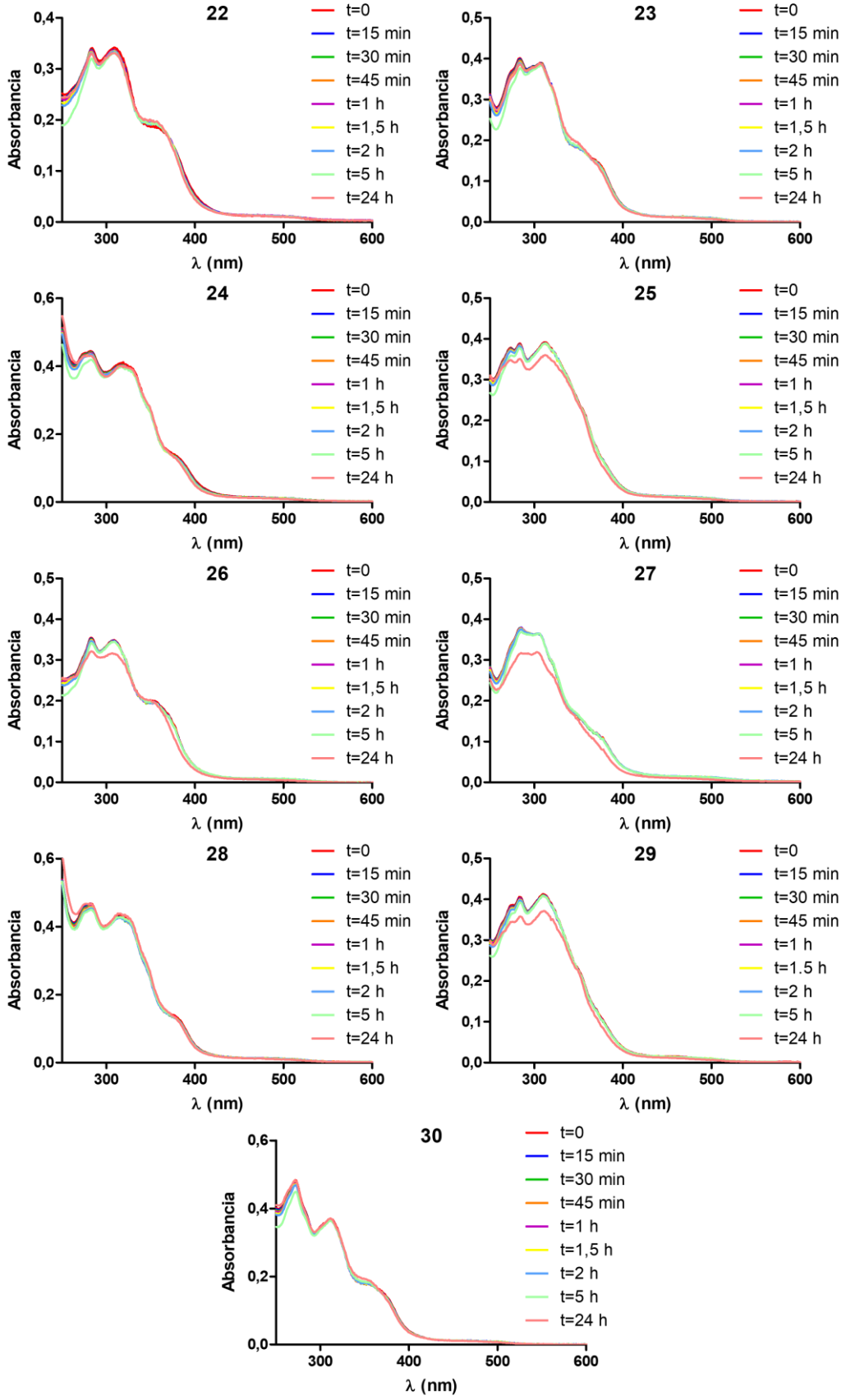


Figura A3.86. Evolución de los espectros UV/Vis de los complejos (10 μM) en presencia de GSH (10 mM) en agua (1% DMSO) a diferentes tiempos.

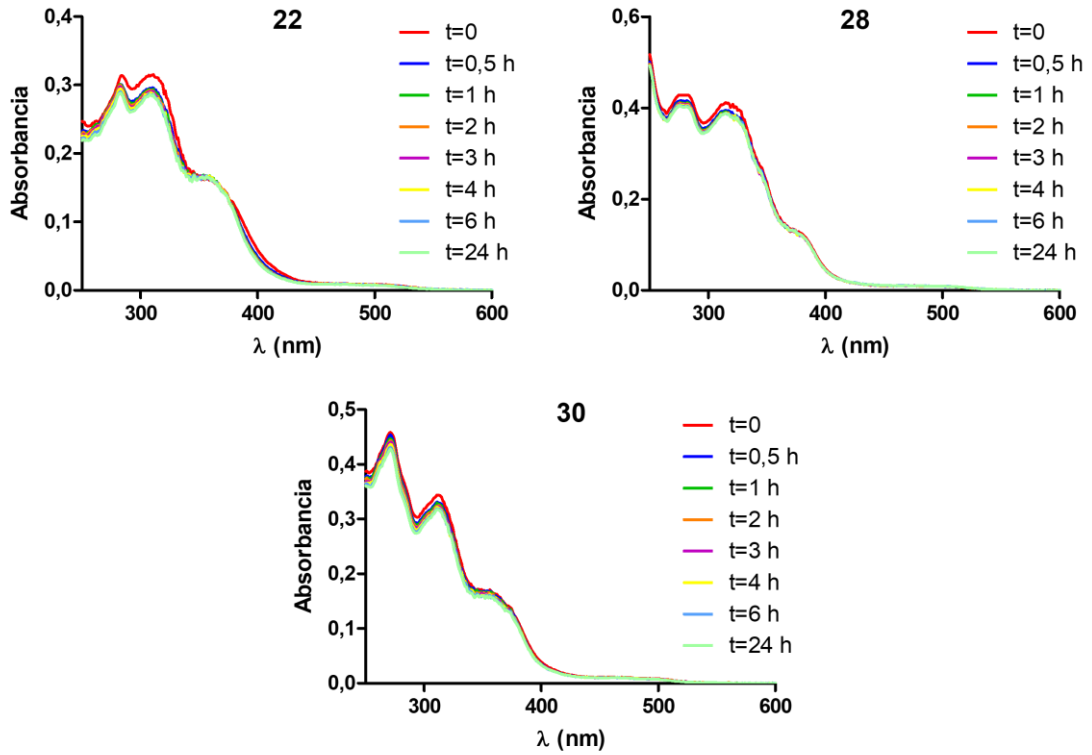


Figura A3.87. Evolución de los espectros UV/Vis de los complejos (10 μM) en presencia de NADH (100 μM) en agua (1% DMSO) a diferentes tiempos.

6. Estudio de hidrólisis

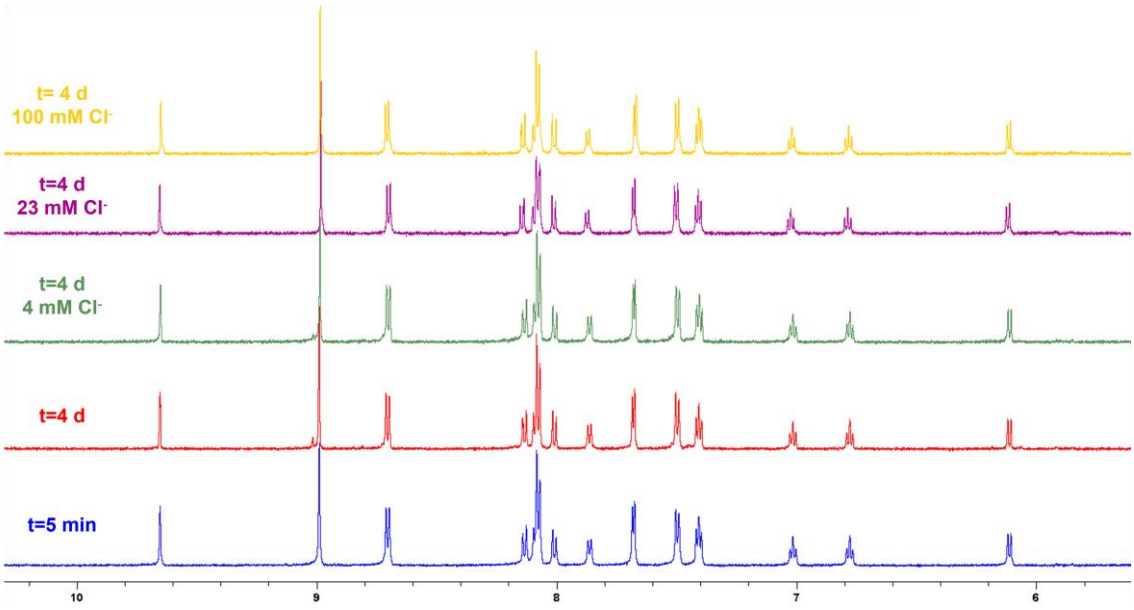


Figura A3.88. Estudio de hidrólisis del complejo **30** (1 mM) en DMSO-d_6 (30% D_2O) por ^{1}H-RMN, 600 MHz, a t.a.: tras 5 min (línea azul), 4 días (línea roja), tras 4 días y la adición de Cl^- 4 mM (línea verde), 23 mM (línea morada) y 100 mM (línea amarilla).

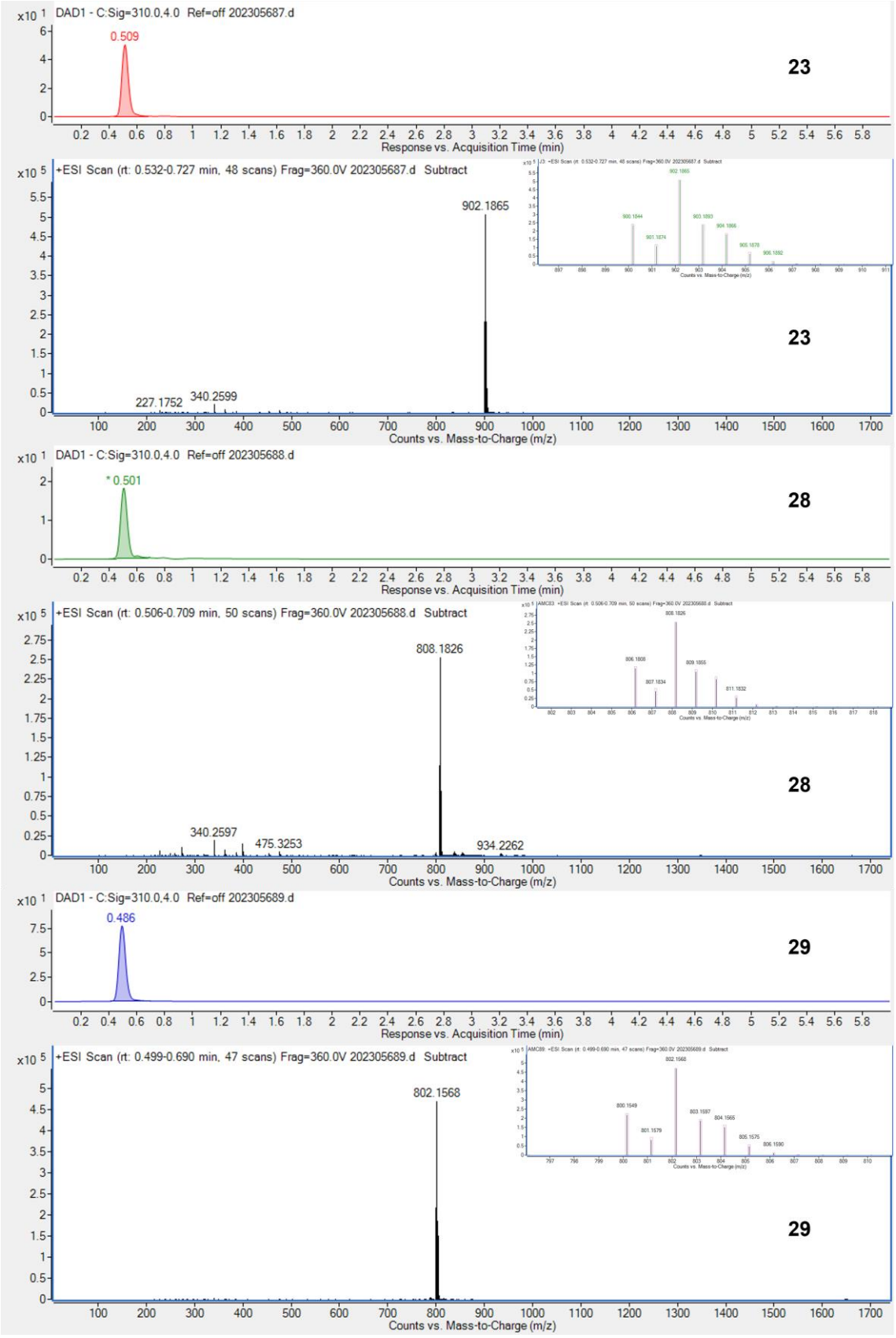


Figura A3.89. Cromatogramas de HPLC de los complejos **23**, **28** y **29** (detector UV 310 nm) usando acetonitrilo:agua (80:20) como fase móvil en modo isocrático (0,1% ácido fórmico) y el espectro de masas correspondiente, mostrando el pico $[M\text{-}PF_6]^+$.

7. Estudios de agregación

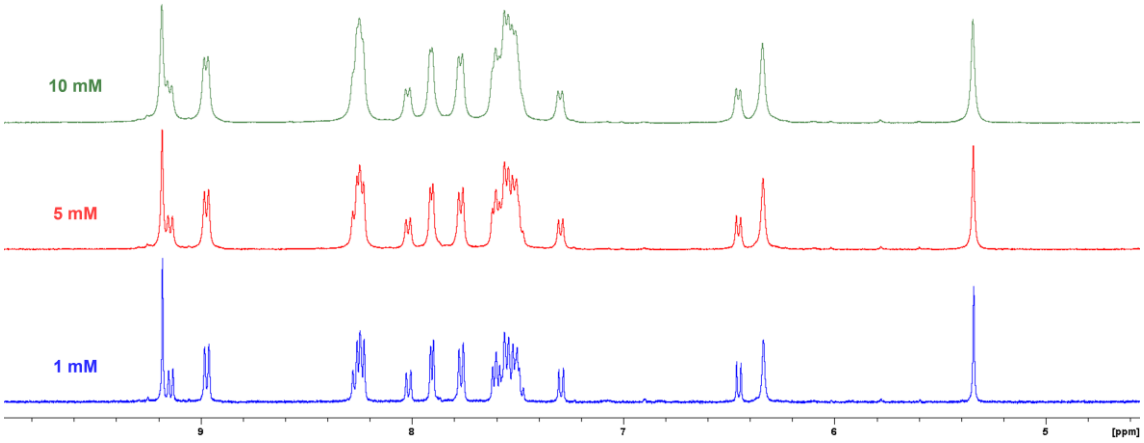


Figura A3.90. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **25** a distintas concentraciones (1, 5 y 10 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

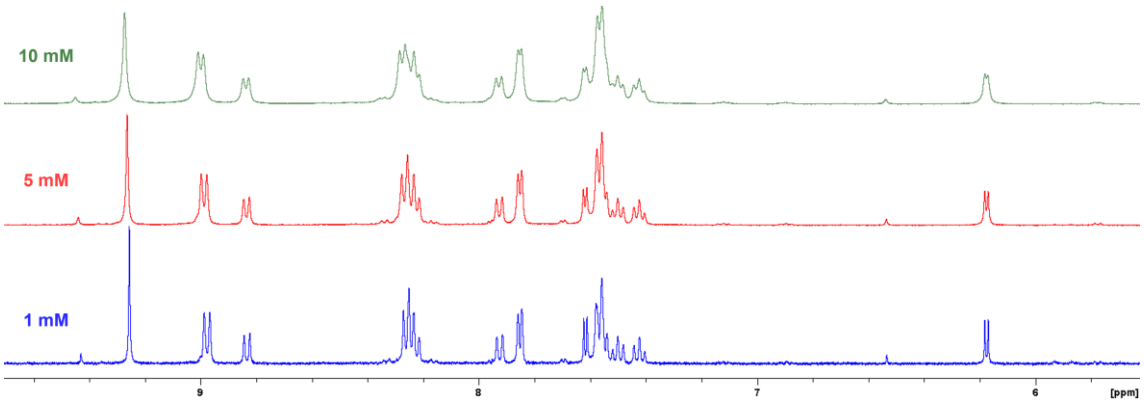


Figura A3.91. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **26** a distintas concentraciones (1, 5 y 10 mM) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

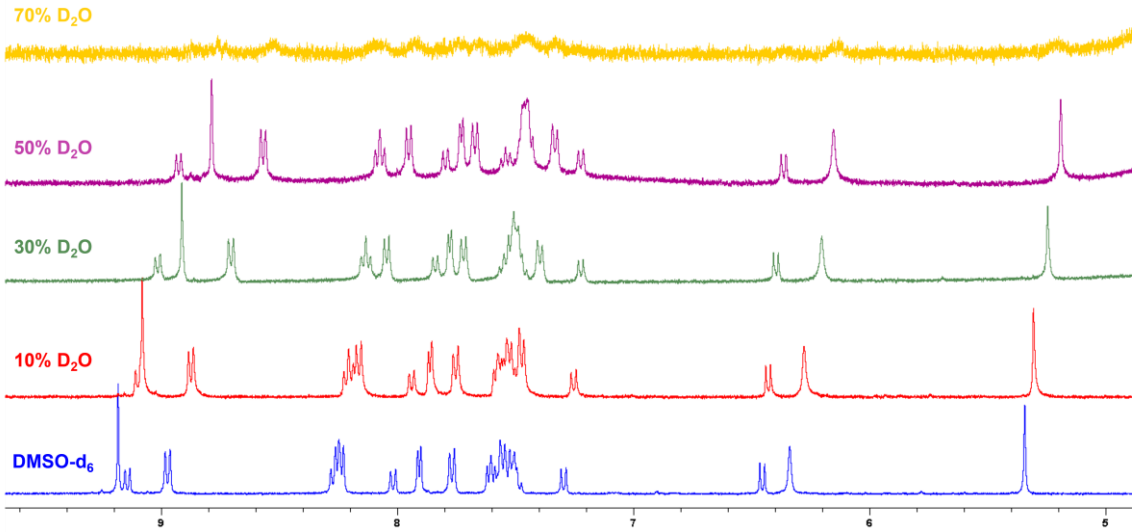


Figura A3.92. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **25** a distintos porcentajes de D_2O (0, 10, 30, 50 y 70%) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

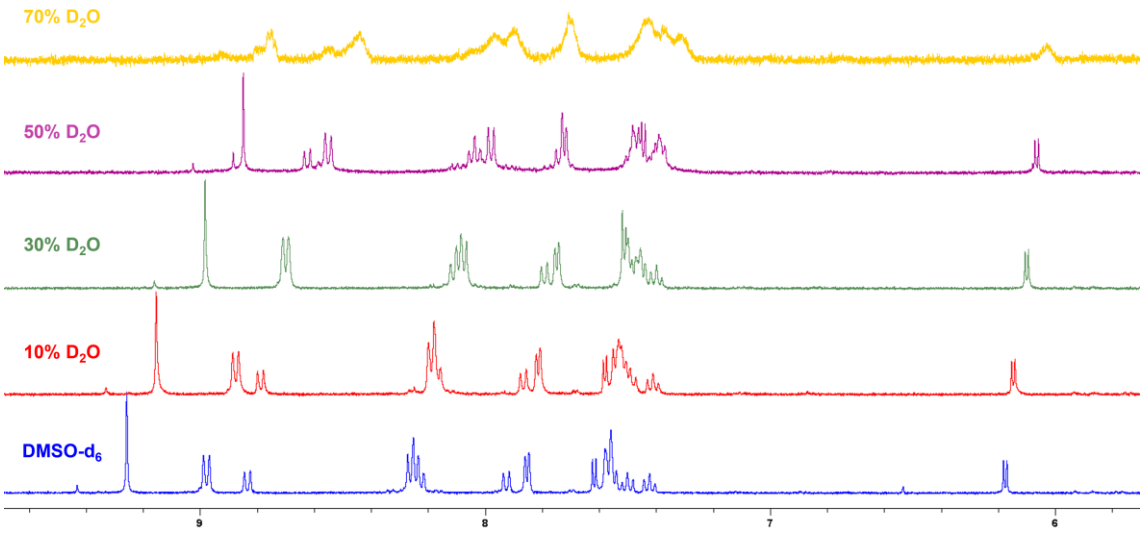


Figura A3.93. Espectros de ^{1}H-RMN del complejo **26** a distintos porcentajes de D_2O (0, 10, 30, 50 y 70%) en DMSO-d_6, a t.a., 400 MHz.

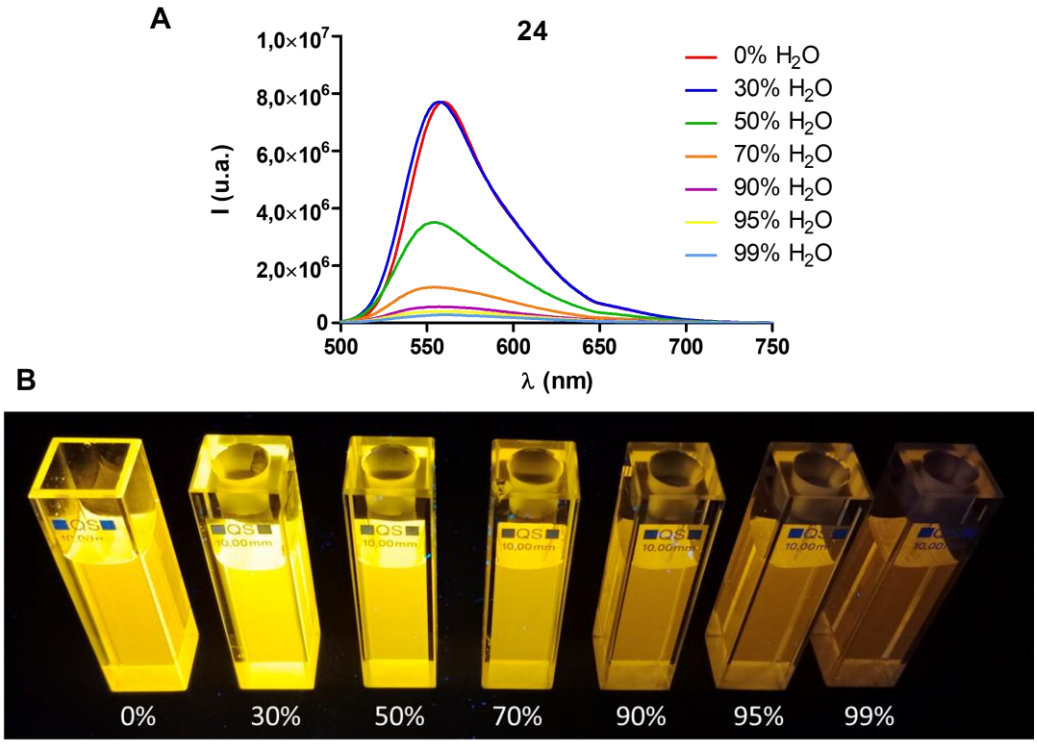


Figura A3.94. (A) Espectros de emisión del complejo **24** (10 µM) a distintos porcentajes de agua en DMSO. (B) Fotografía de las cubetas conteniendo del experimento bajo una lámpara de 365 nm.

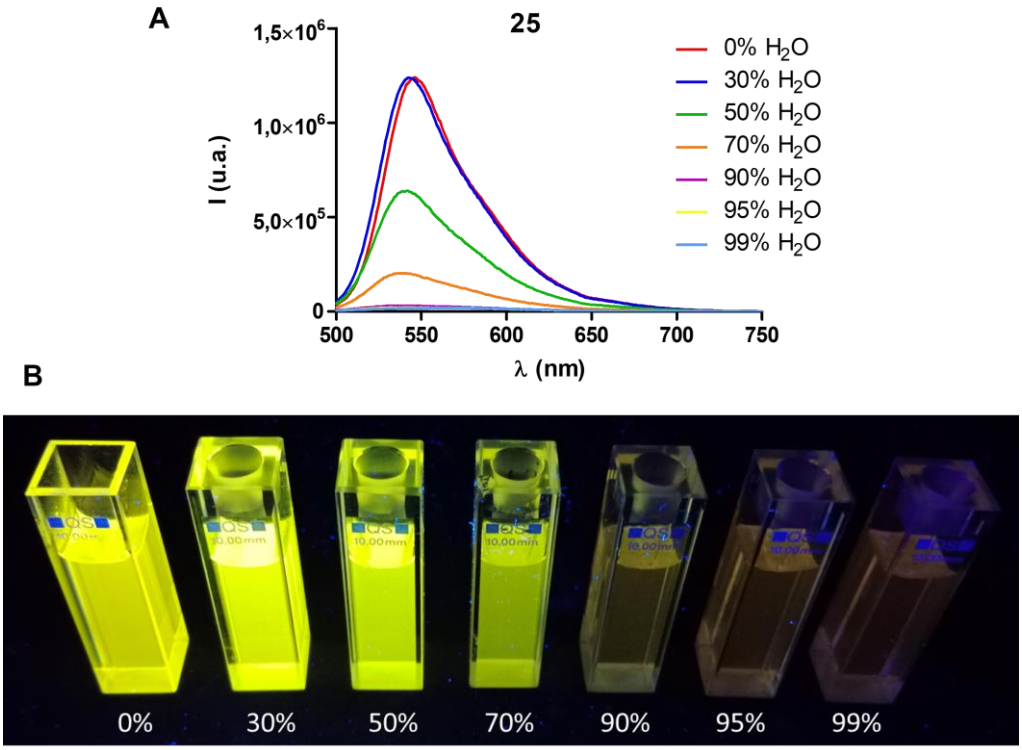


Figura A3.95. (A) Espectros de emisión del complejo **25** (10 µM) a distintos porcentajes de agua en DMSO. (B) Fotografía de las cubetas conteniendo del experimento bajo una lámpara de 365 nm.

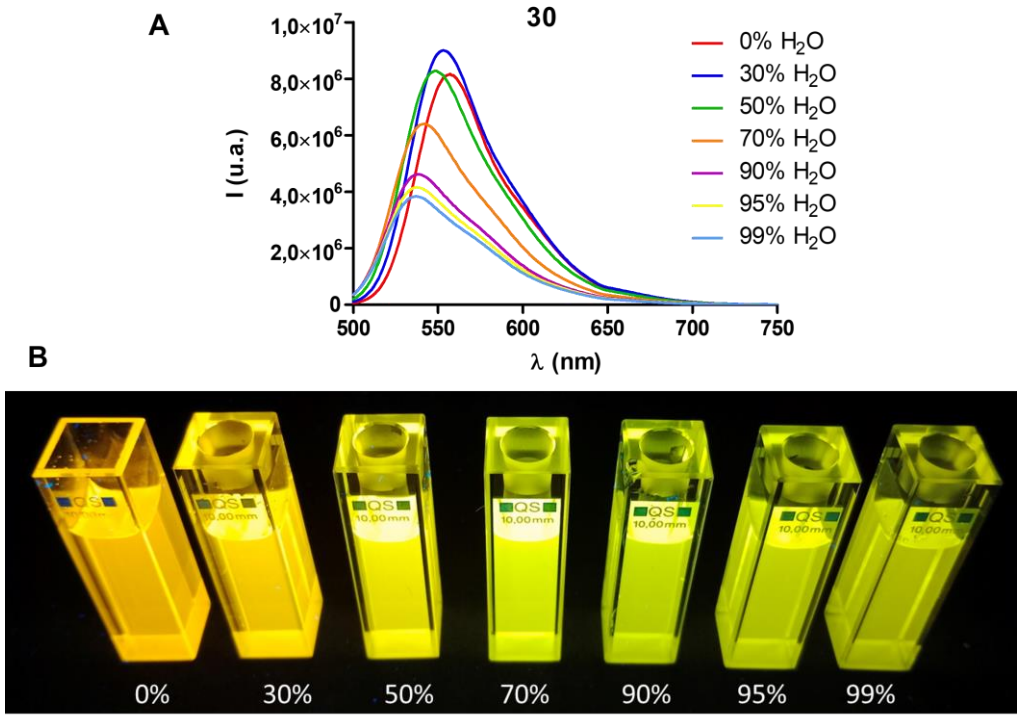


Figura A3.96. (A) Espectros de emisión del complejo **30** (10 µM) a distintos porcentajes de agua en DMSO. (B) Fotografía de las cubetas conteniendo del experimento bajo una lámpara de 365 nm.

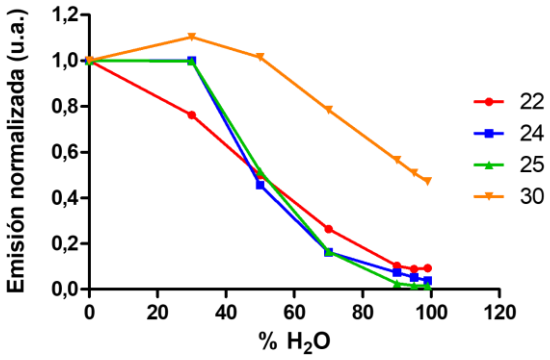
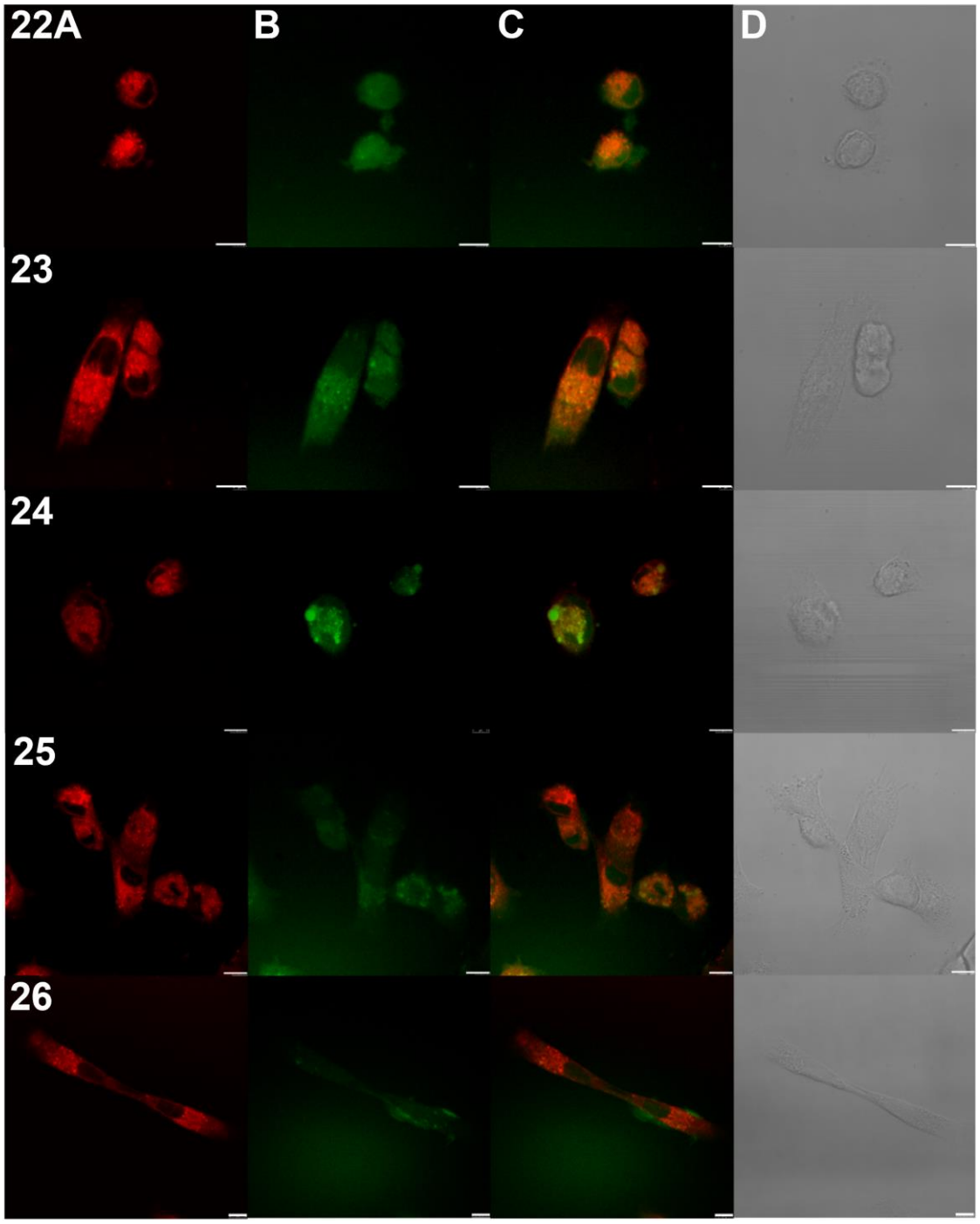


Figura A3.97. Evolución de la intensidad de emisión con los distintos porcentajes de agua en DMSO para los complejos **22**, **24**, **25** y **30** (10 µM) a distintos porcentajes de agua.

8. Estudios biológicos



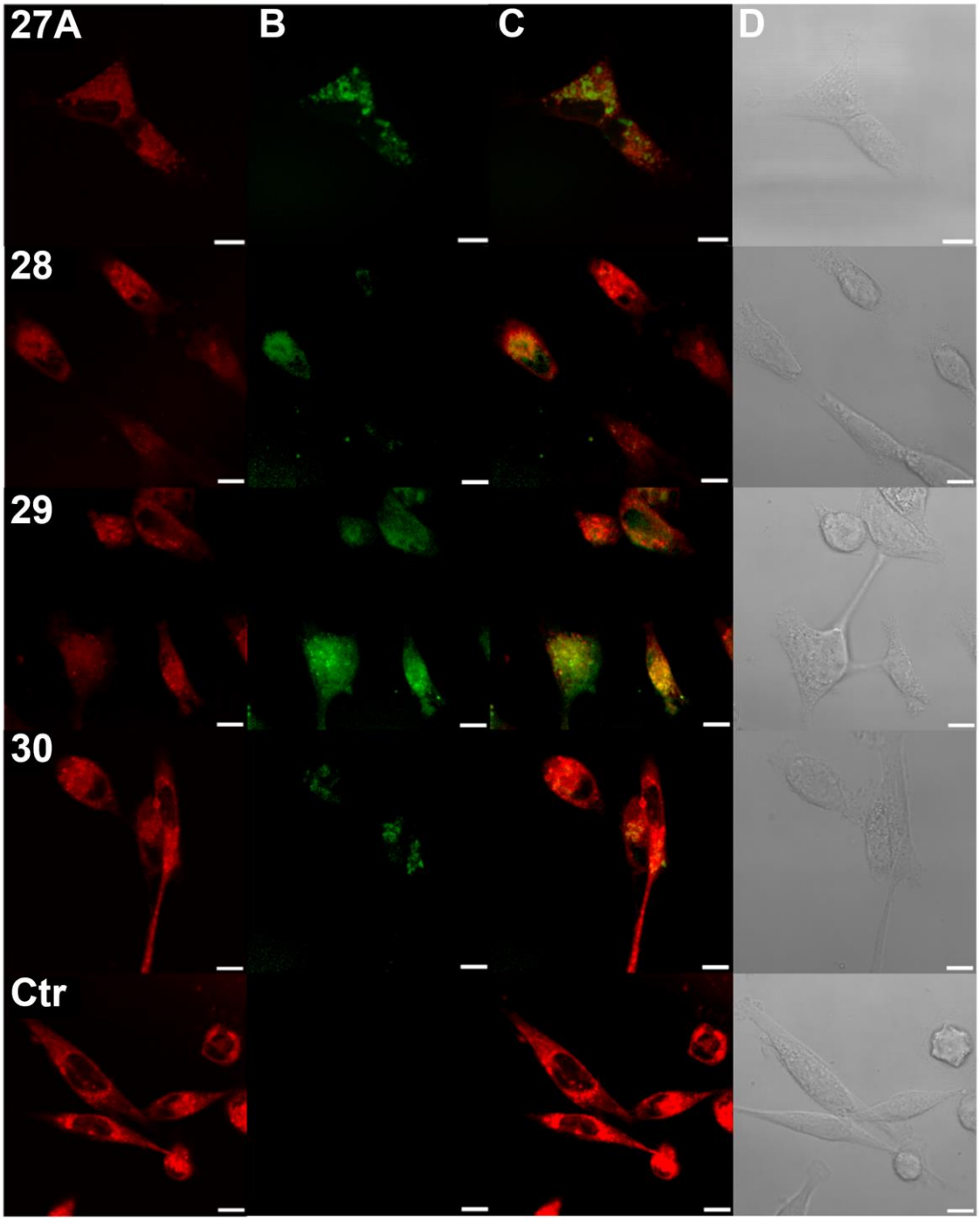


Figura A3.98. Estudio de colocalización de los complejos en células MDA-MB-231. Las muestras fueron tratadas con los compuestos a una concentración 5 µM durante 5 h y teñidas con MitoTracker™ Rojo. A: Fluorescencia del MitoTracker™ Rojo, B: fluorescencia de los complejos, C: superposición de la fluorescencia observada en A y B, D: campo brillante. La barra de escala representa 10 µm.

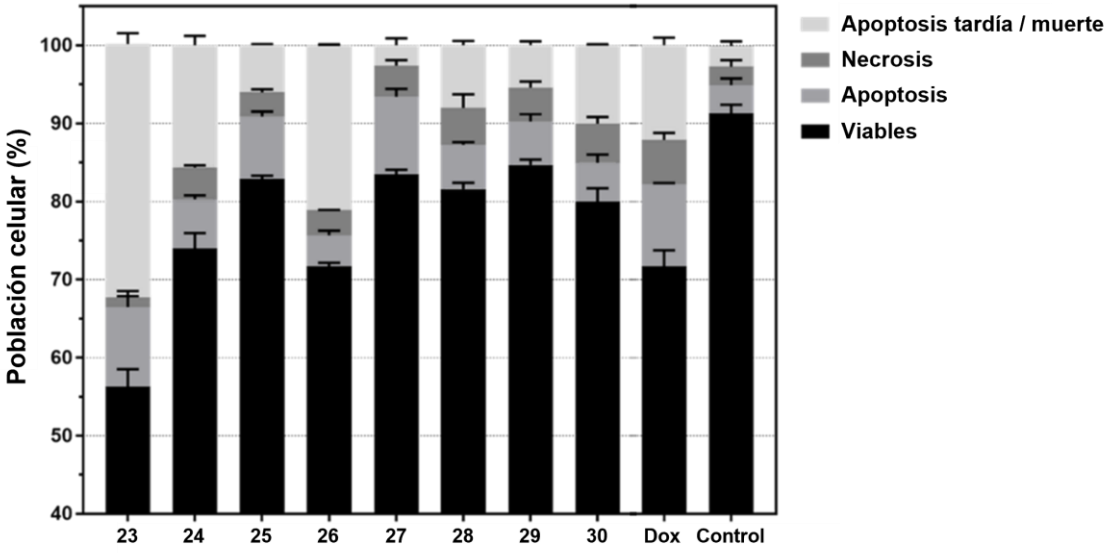


Figura A3.99. Análisis cuantitativo de muerte celular en MDA-MB-231 inducida por **23**–**30** o doxorrubicina a concentraciones equitóxicas correspondientes a 2x$IC_{50,72h}$ determinado por citometría de flujo usando el ensayo de anexina V/ioduro de propidio. Las barras de error son las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

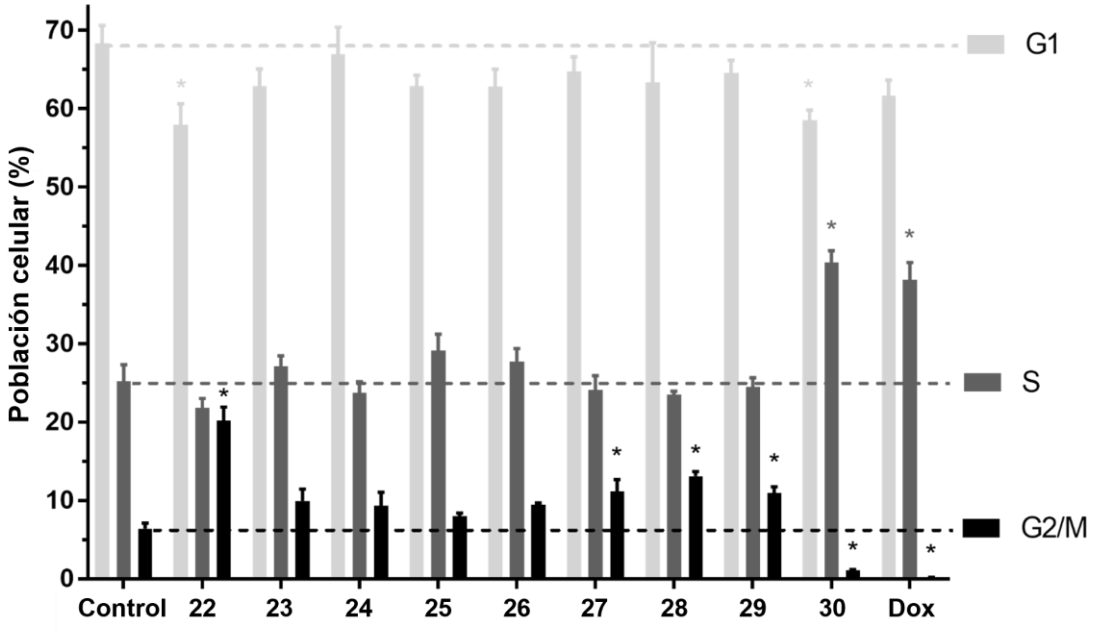


Figura A3.100. Análisis del ciclo celular de MDA-MB-231. Las células fueron tratadas durante 24 h con concentraciones de complejos correspondientes a 2x$IC_{50,72h}$. Los datos se analizaron mediante un Test-t de Student, y las diferencias significativas ($p < 0,01$) respecto al control están marcadas con un asterisco. Las líneas discontinuas horizontales indican la distribución de cada fase del ciclo determinada en los controles.

.

ANEXO III

ÍNDICE

1. Espectros de RMN A123

1.1. Compuesto 33 ..... A123

1.2. Compuesto 35 ..... A124

1.3. Compuesto 36 ..... A126

1.4. Compuesto 37 ..... A127

1.5. Compuesto 38 ..... A129

1.6. Compuesto 39 ..... A130

2. Espectrometría de masas A132

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS) A138

4. Estructura cristalina A140

5. Espectroscopia de absorción UV/Vis A141

6. Estudios de estabilidad A142

7. Generación de oxígeno singlete ($^1O_2$) A146

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 33

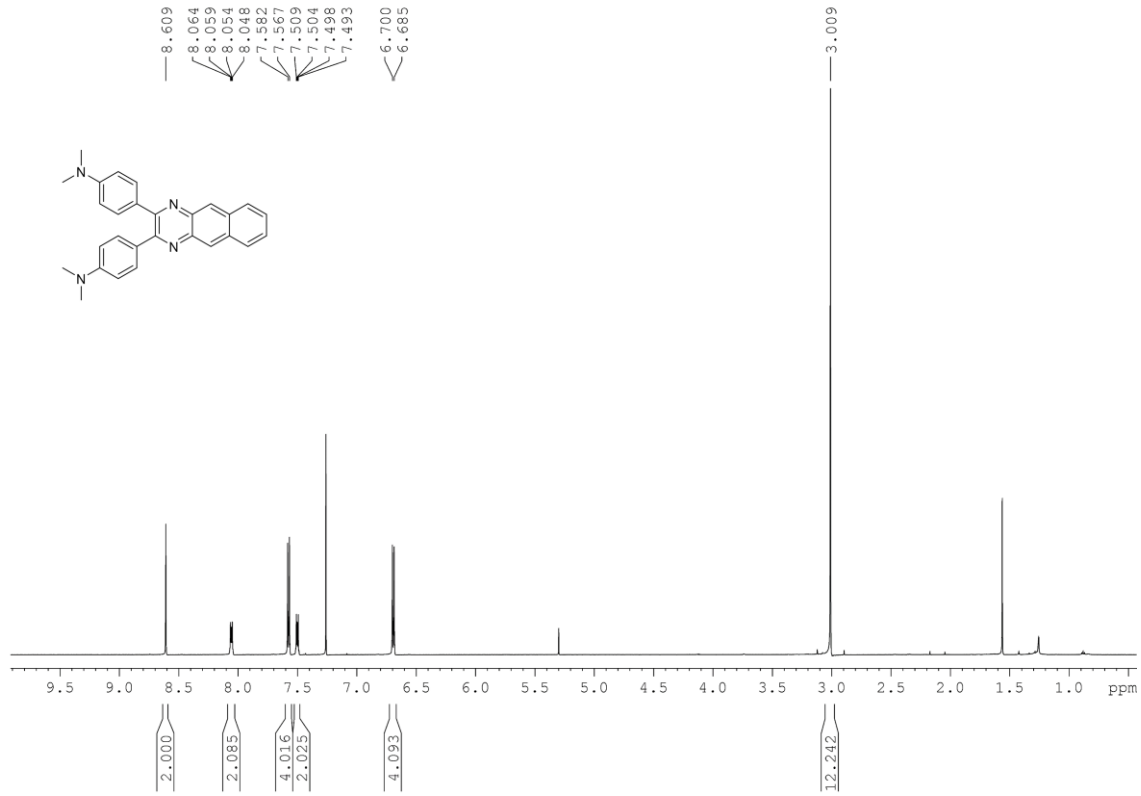


Figura A4.1. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **33** en $CDCl_3$.

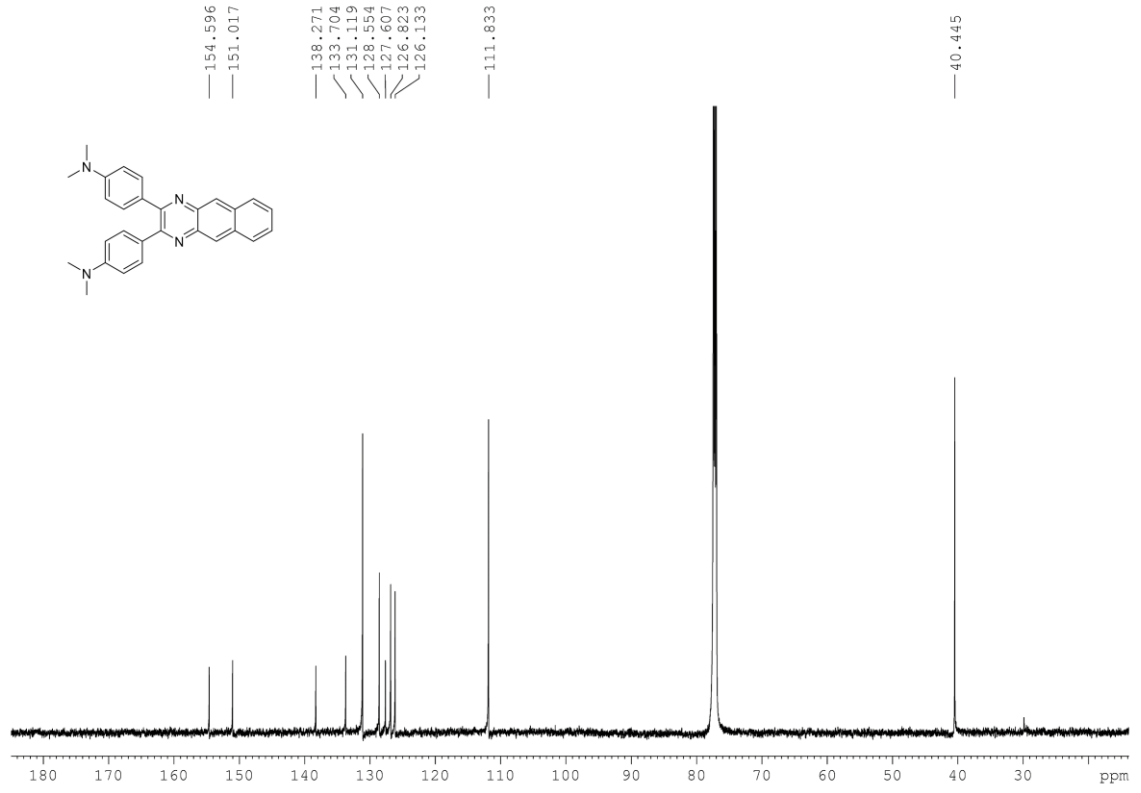


Figura A4.2. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **33** en $CDCl_3$.

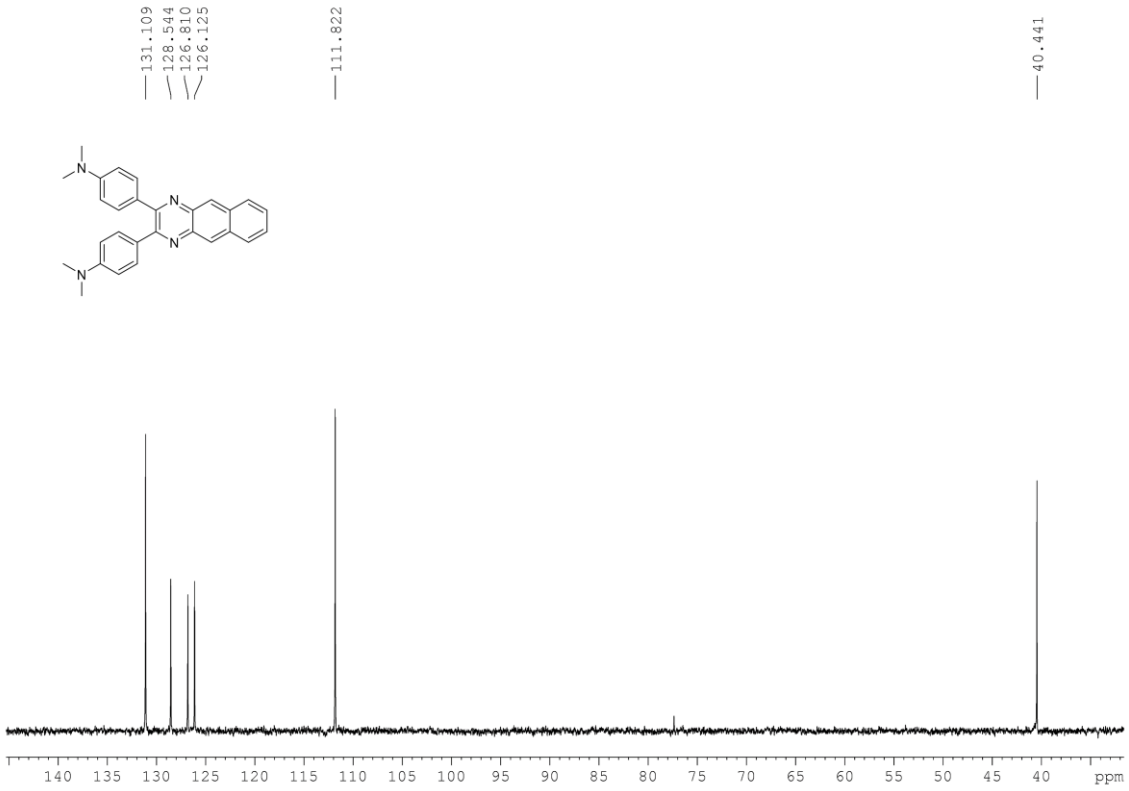


Figura A4.3. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **33** en $CDCl_3$.

1.2. Compuesto 35

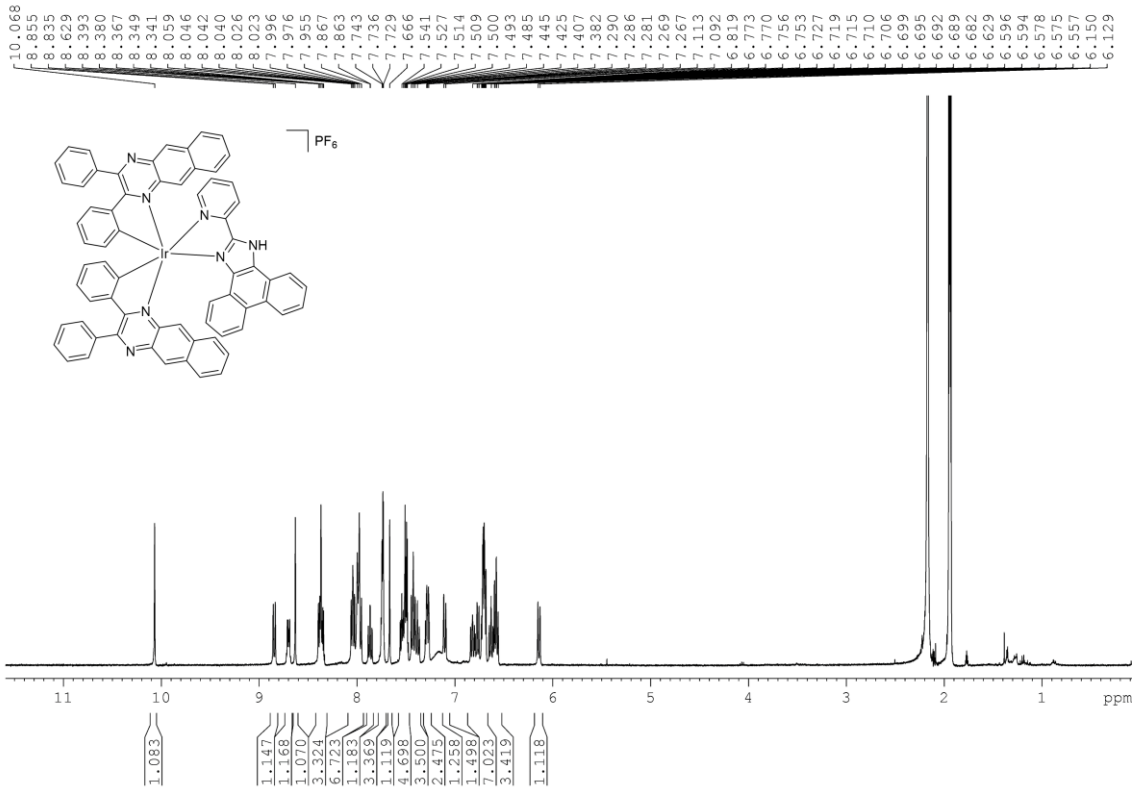


Figura A4.4. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **35** en CD_3CN.

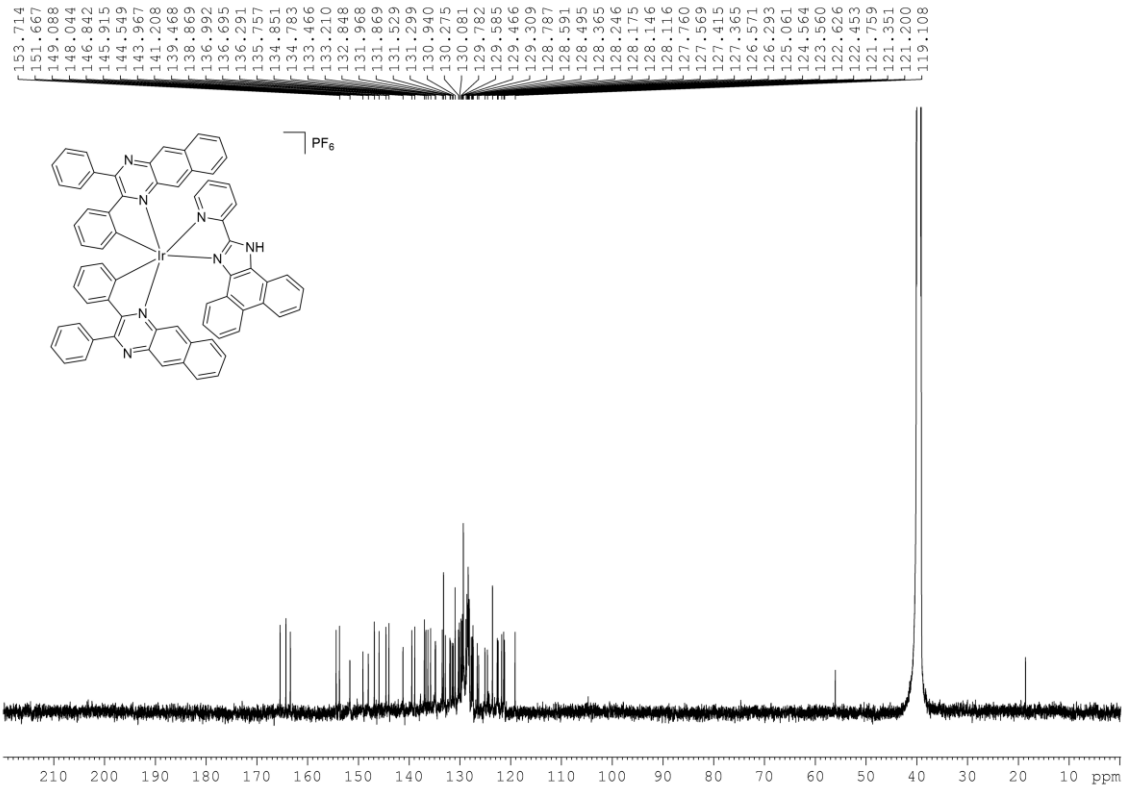


Figura A4.5. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **35** en DMSO-d_6.

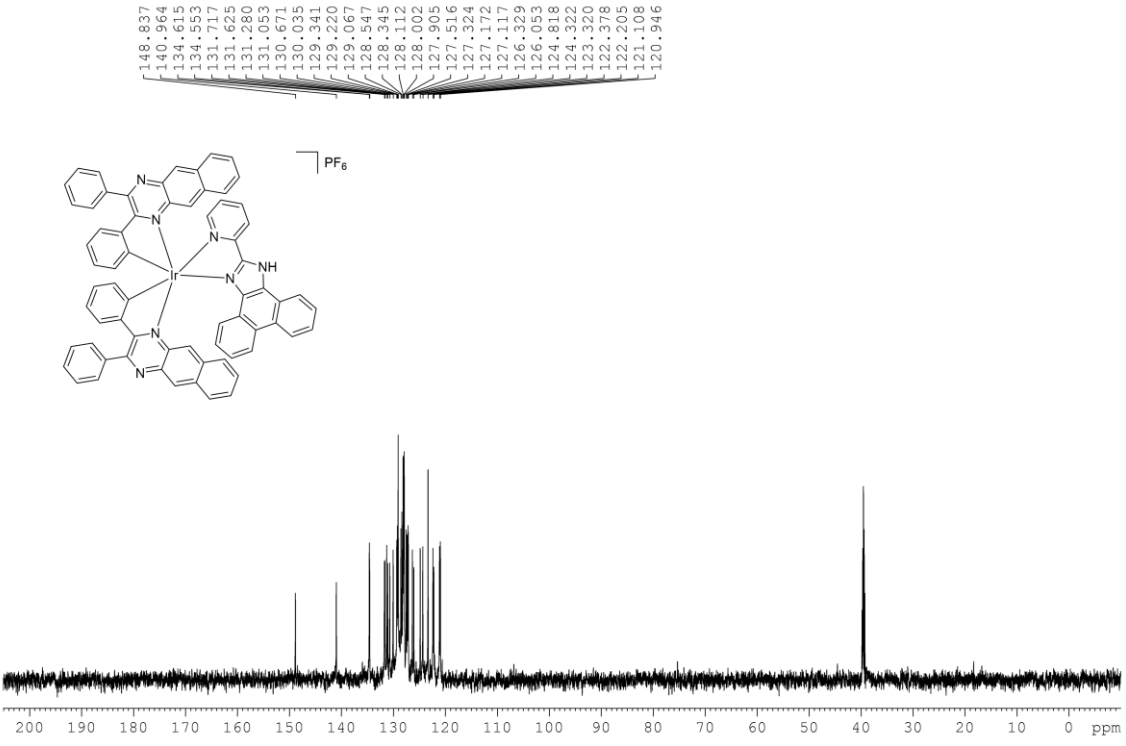


Figura A4.6. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **35** en DMSO-d_6.

1.3. Compuesto 36

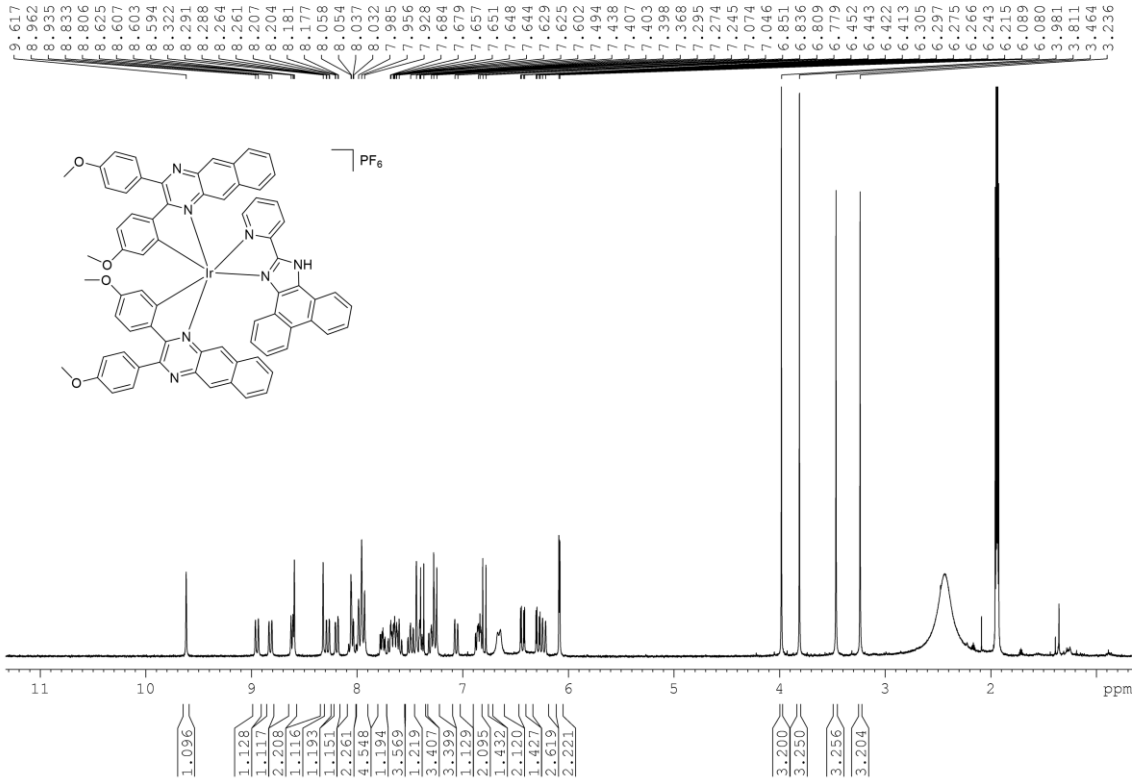


Figura A4.7. Espectro de ^{1}H-RMN 300 MHz del compuesto **36** en CD_3CN.

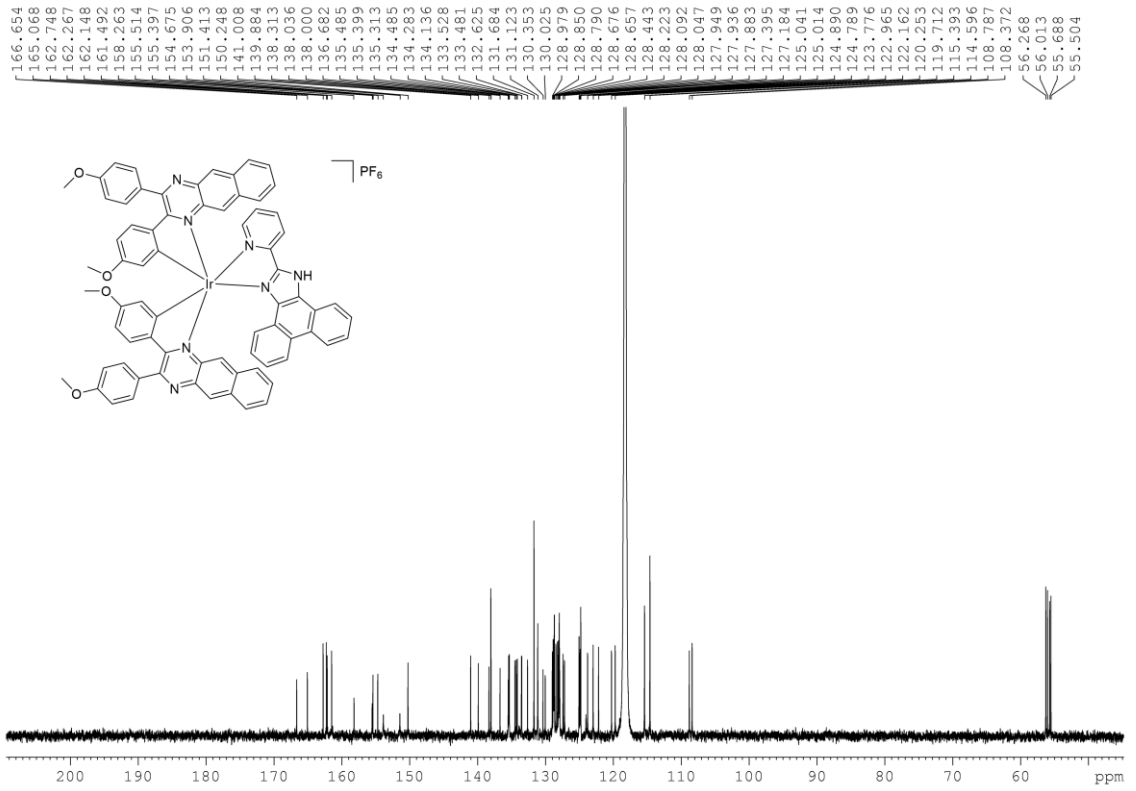


Figura A4.8. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **36** en CD_3CN.

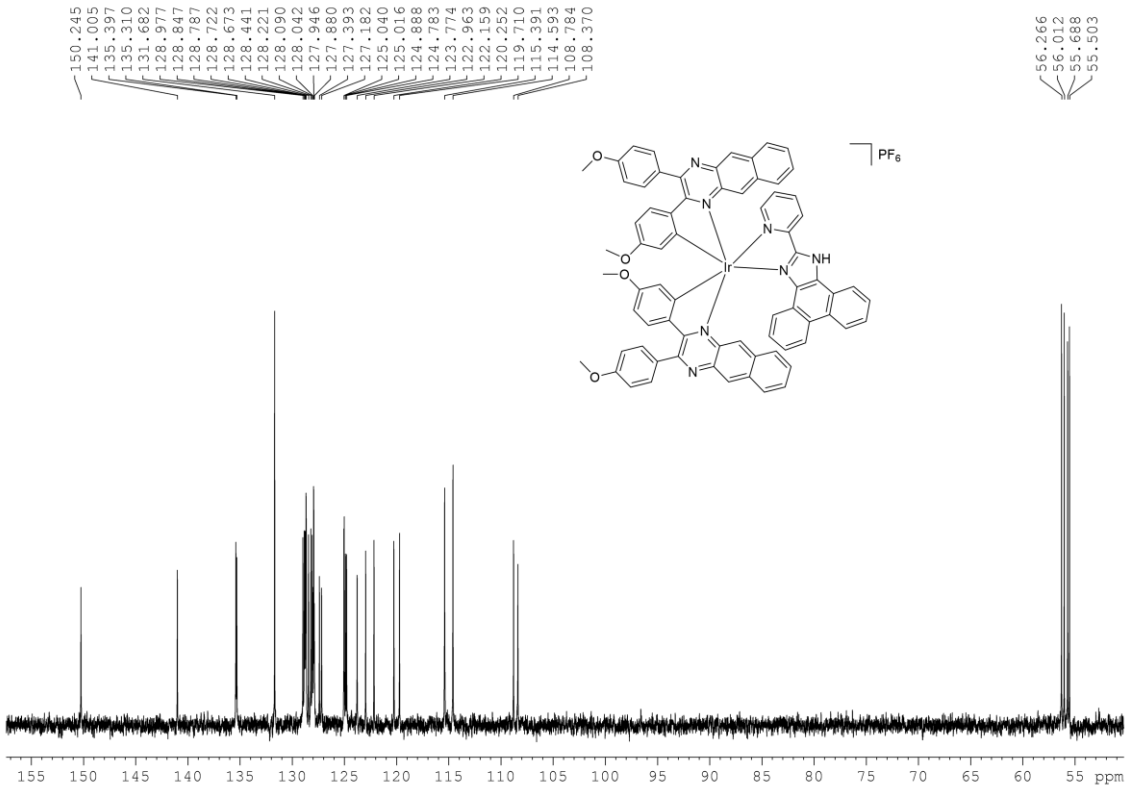


Figura A4.9. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **36** en CD_3CN.

1.4. Compuesto 37

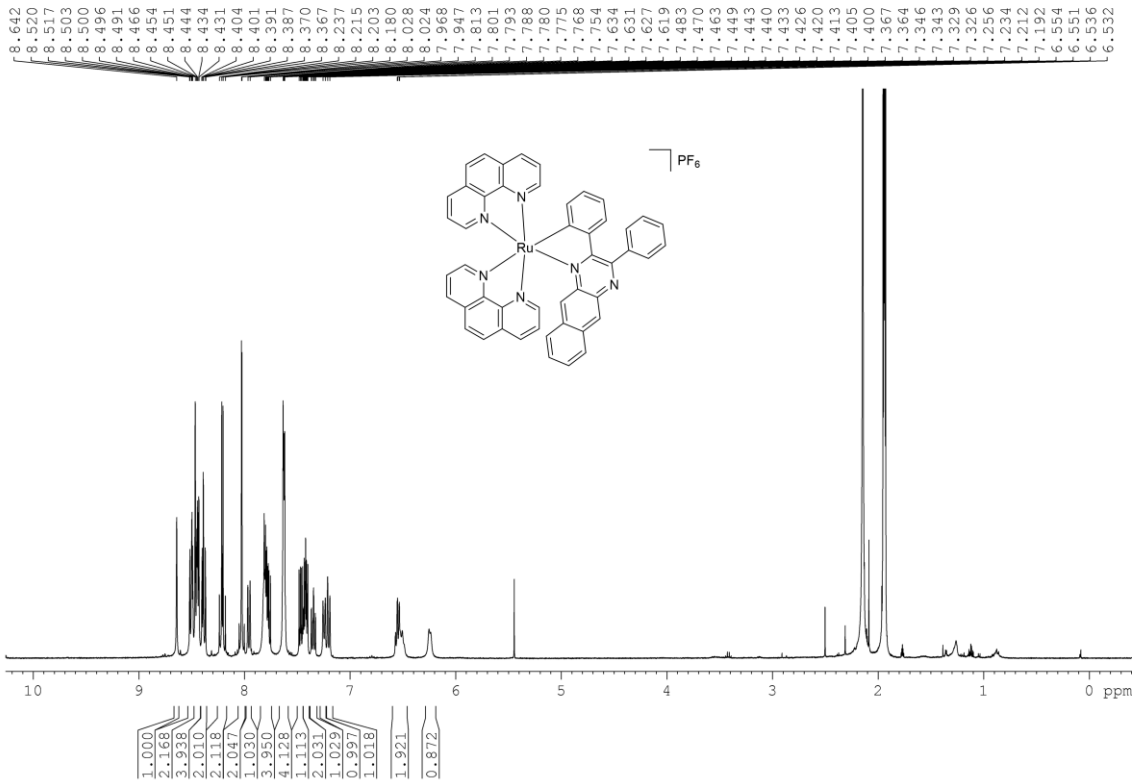


Figura A4.10. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **37** en CD_3CN.

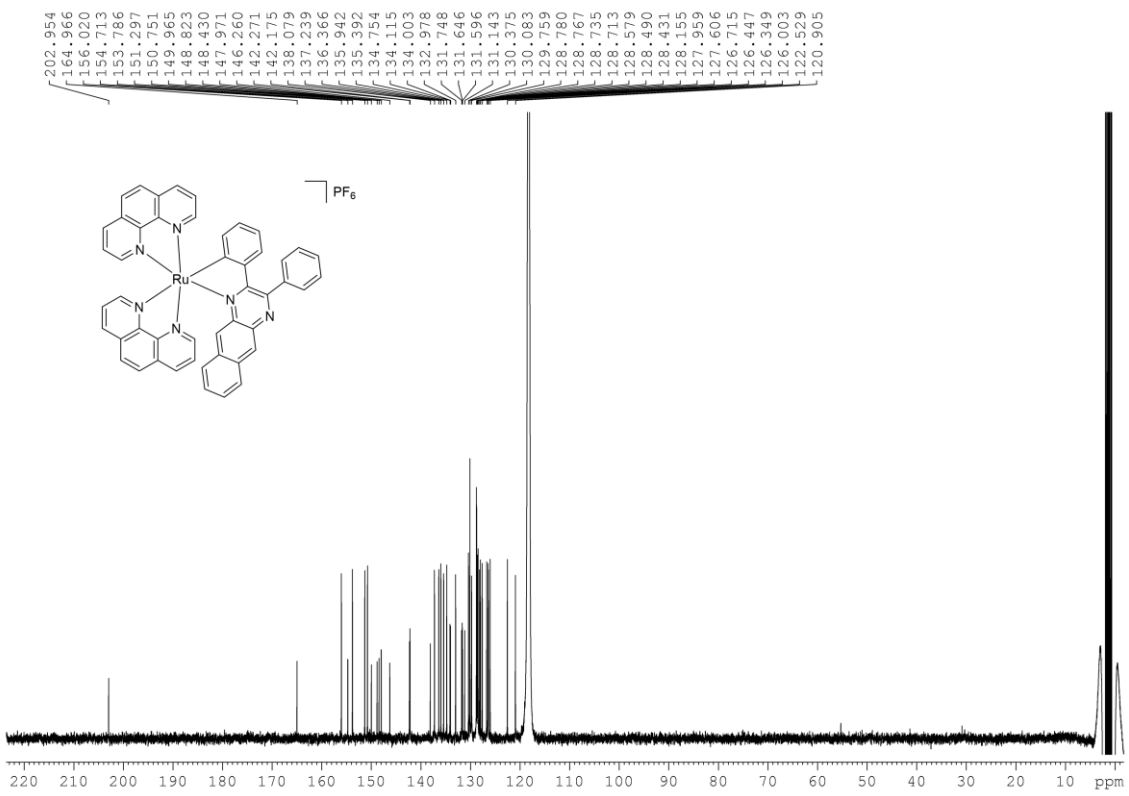


Figura A4.11. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **37** en CD_3CN.

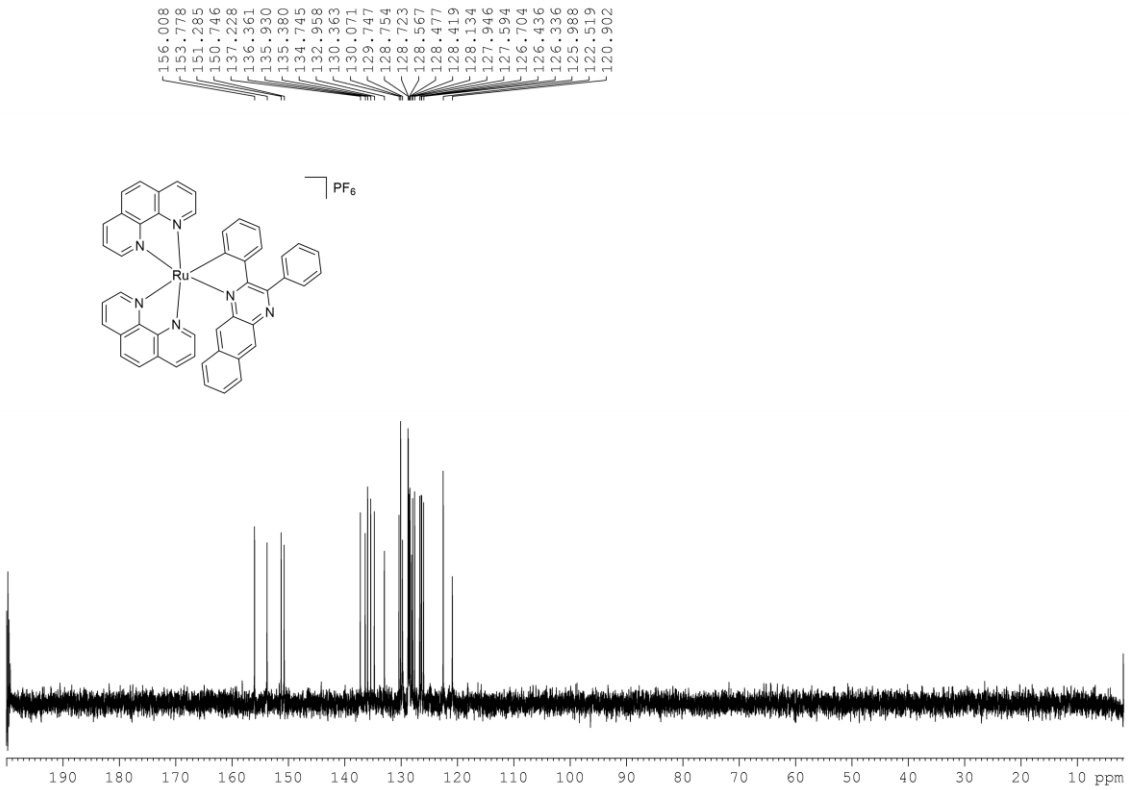


Figura A4.12. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **37** en CD_3CN.

1.5. Compuesto 38

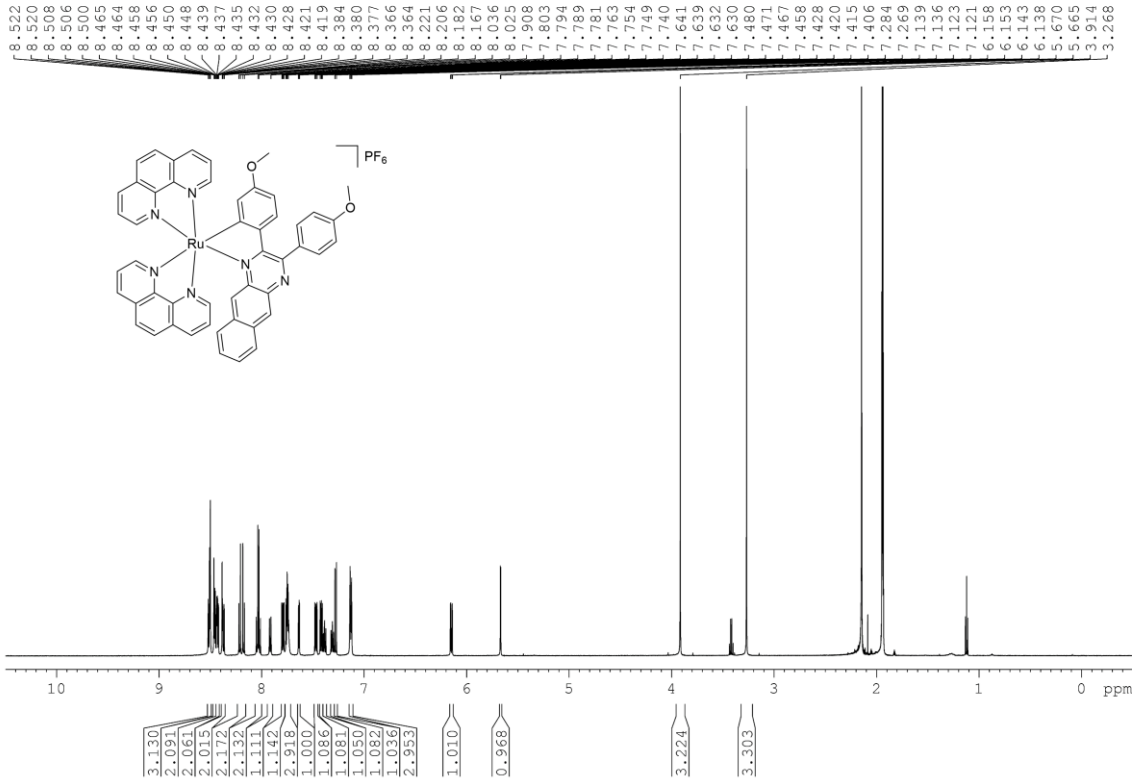


Figura A4.13. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **38** en CD_3CN.

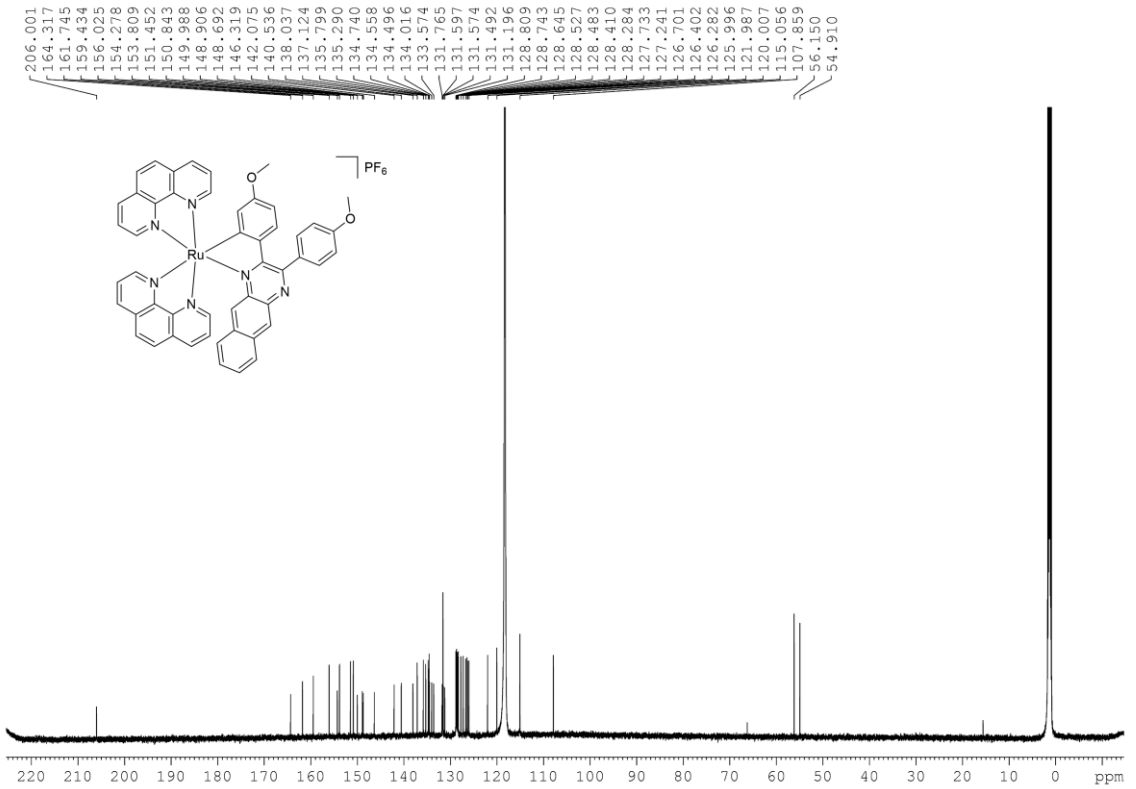


Figura A4.14. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **38** en CD_3CN.

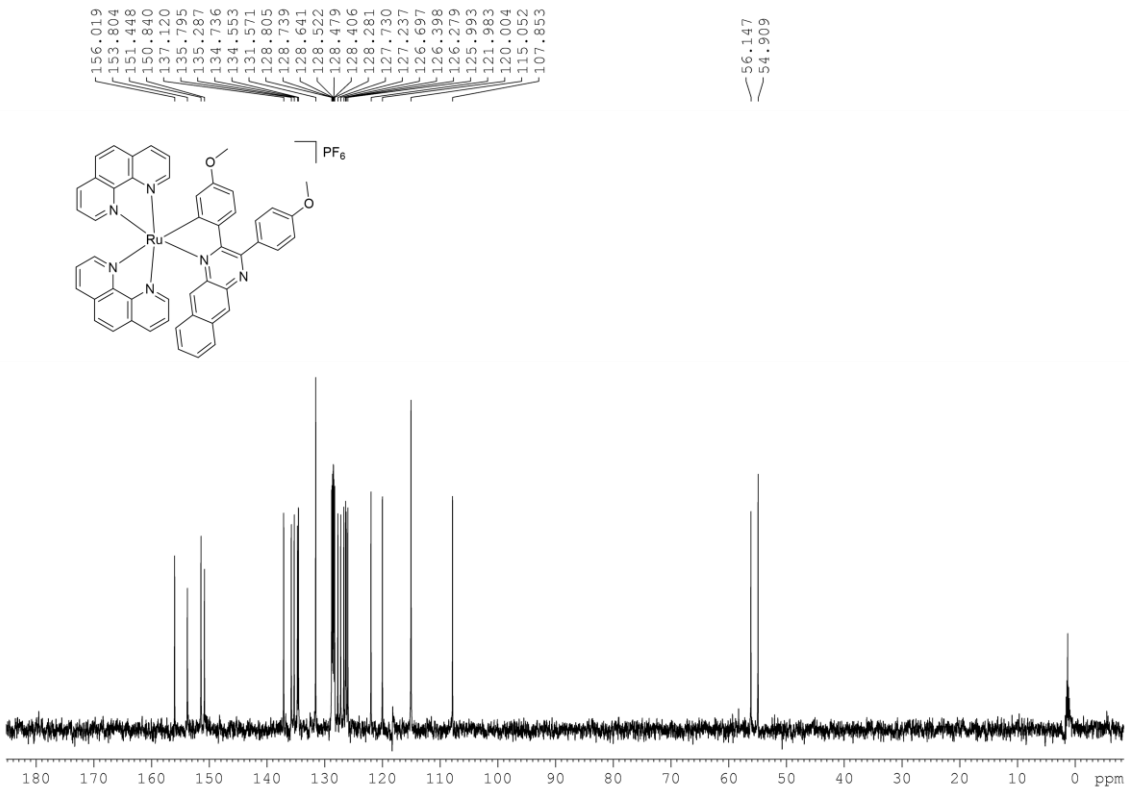


Figura A4.15. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **38** en CD_3CN.

1.6. Compuesto 39

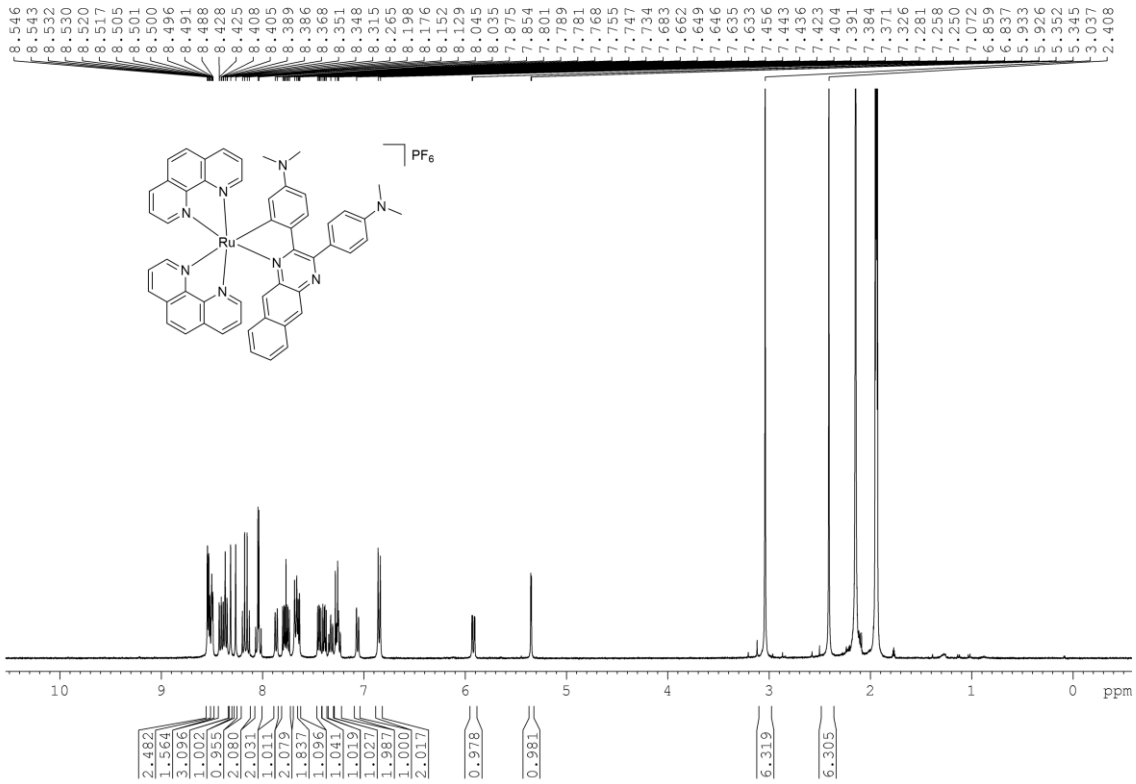


Figura A4.16. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **39** en CD_3CN.

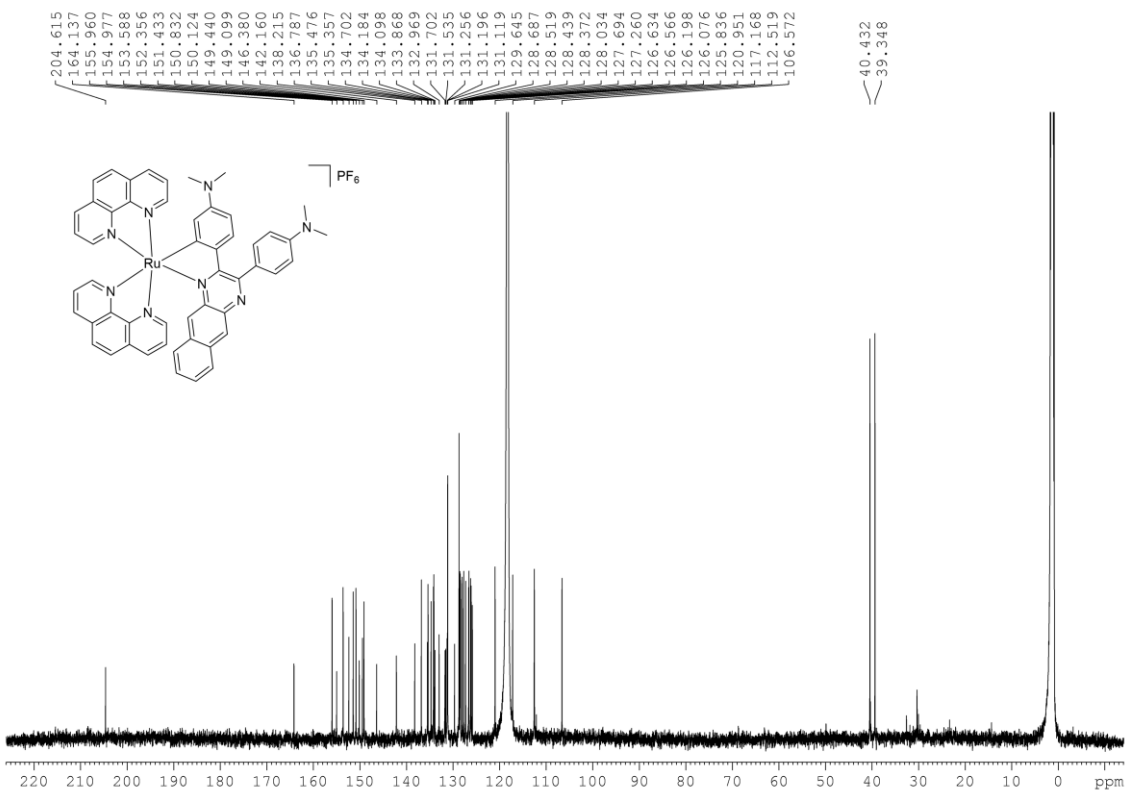


Figura A4.17. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **39** en CD_3CN.

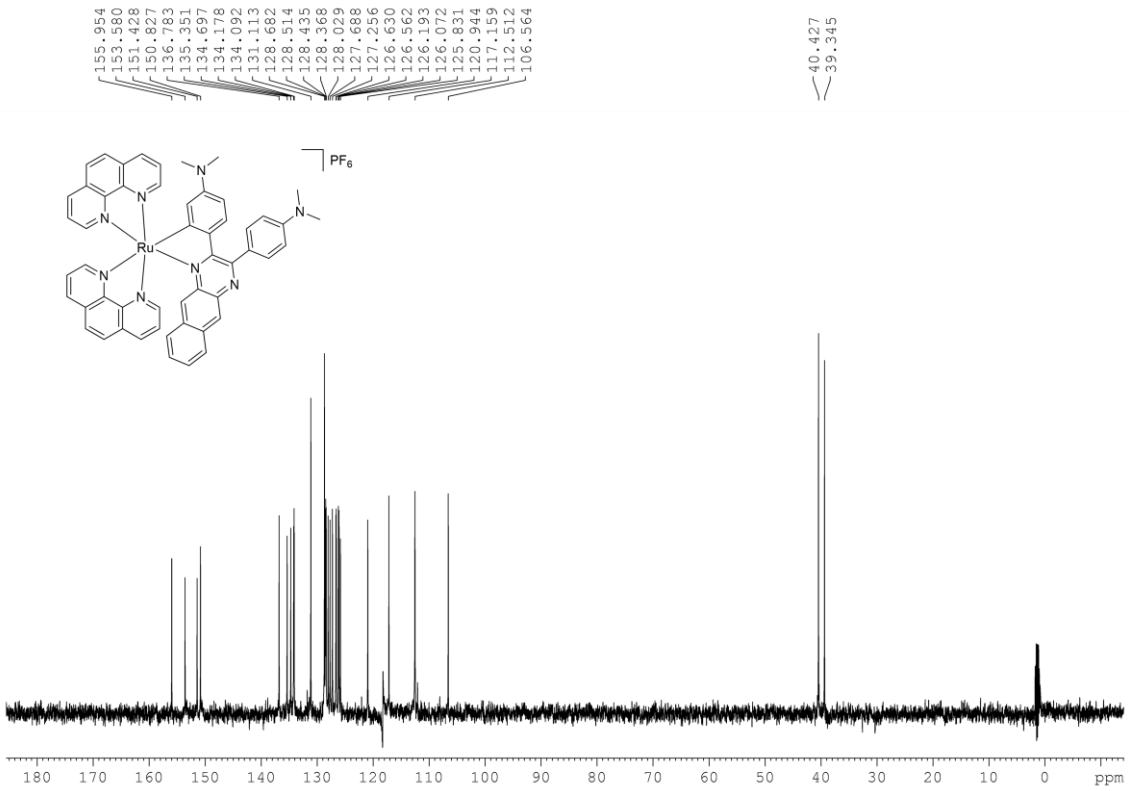


Figura A4.18. Espectro de 135-DEPT 151 MHz del compuesto **39** en CD_3CN.

2. Espectrometría de masas

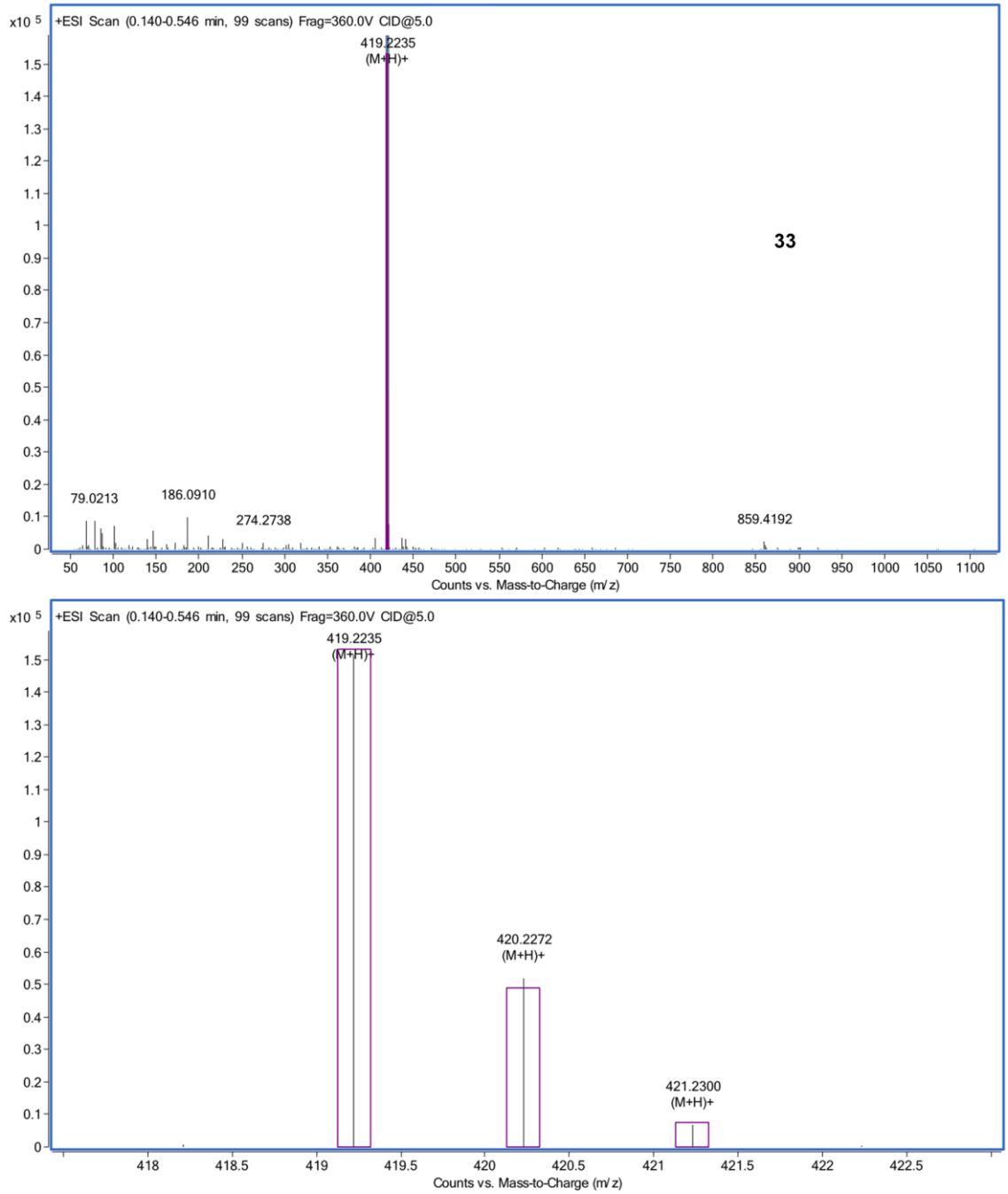


Figura A4.19. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **33** en ACN.

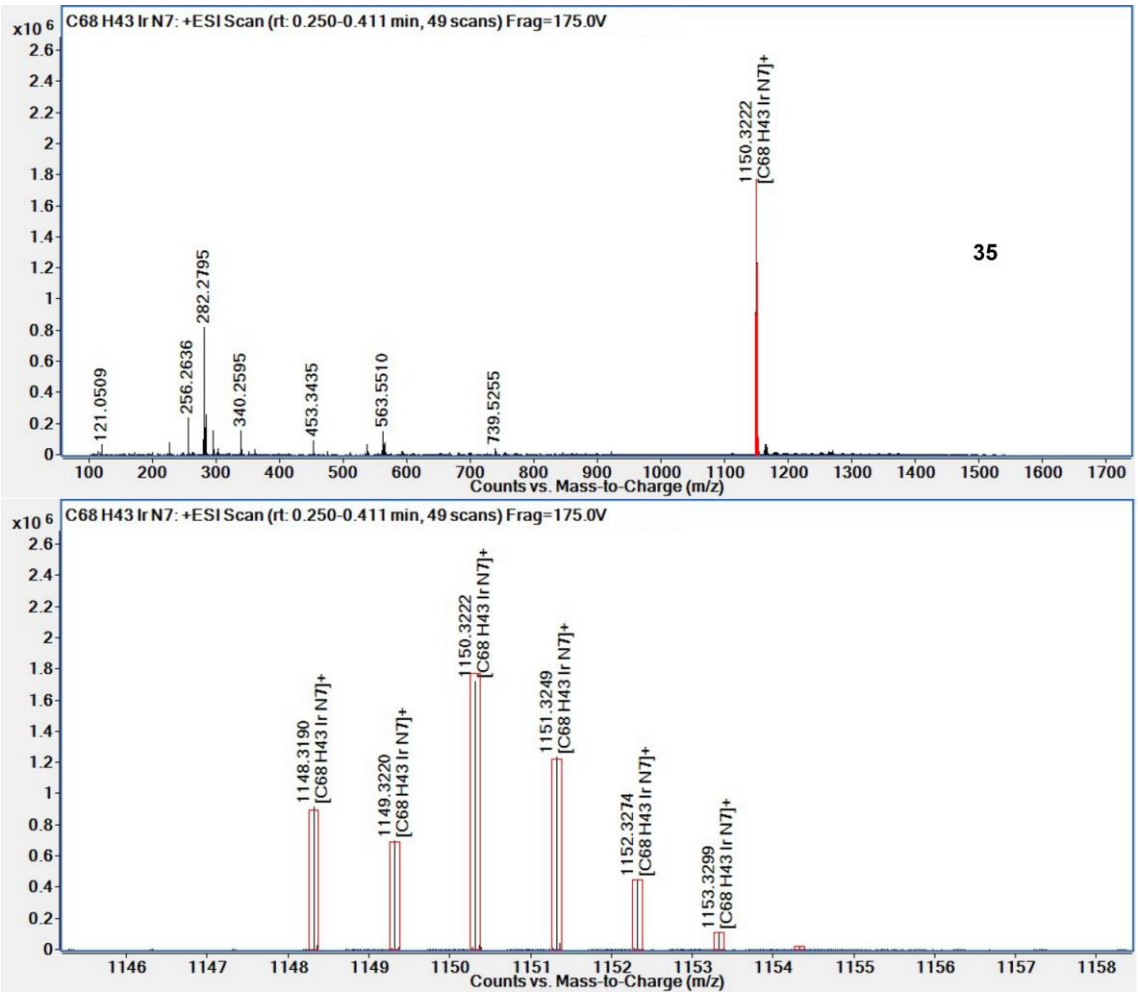


Figura A4.20. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **35** en ACN.

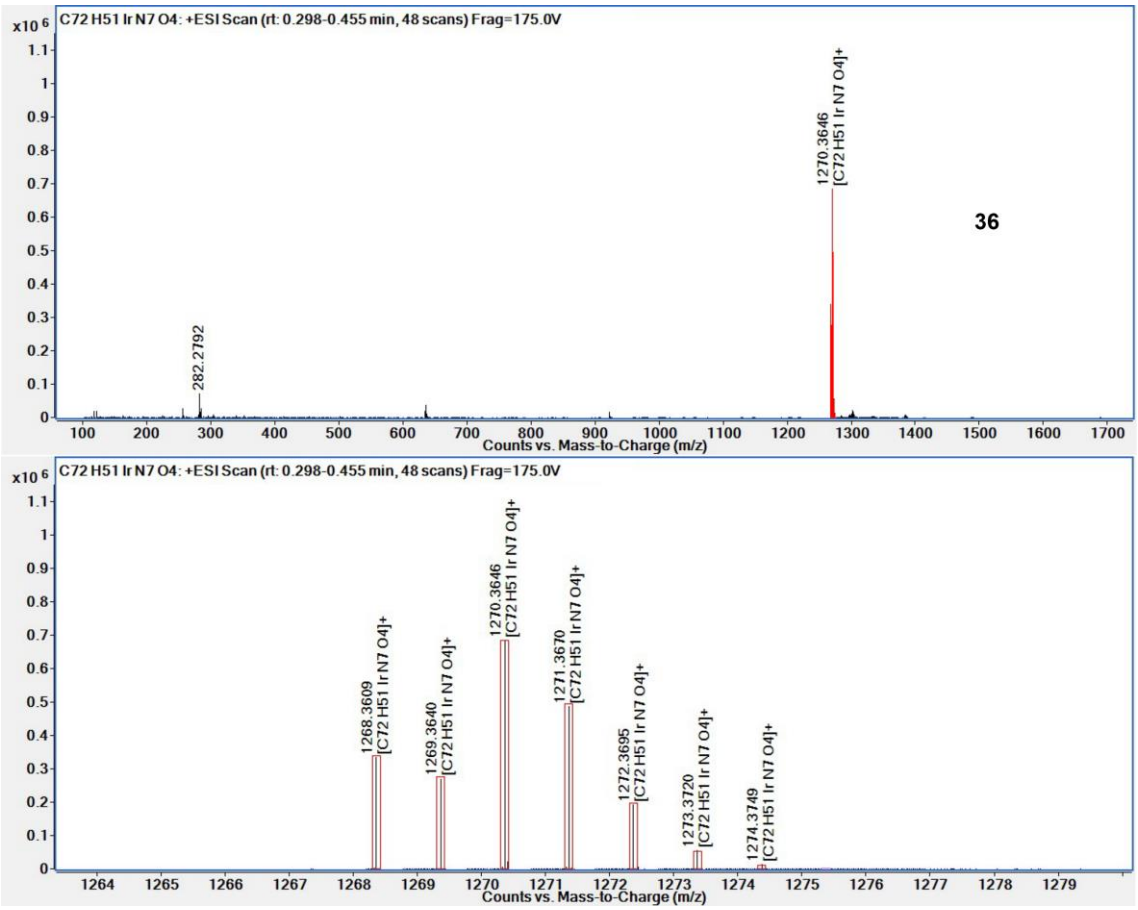


Figura A4.21. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **36** en ACN.

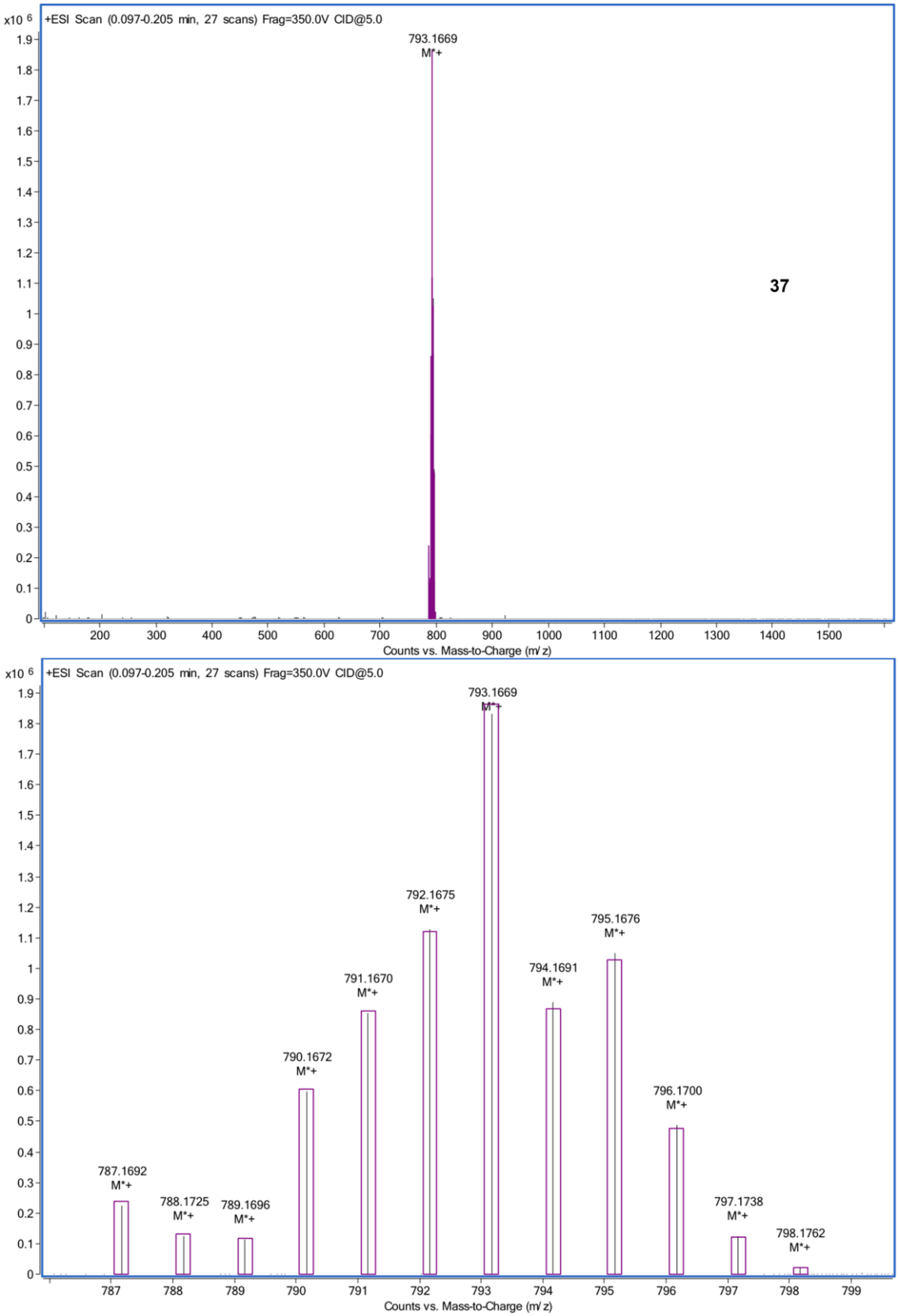


Figura A4.22. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **37** en ACN.

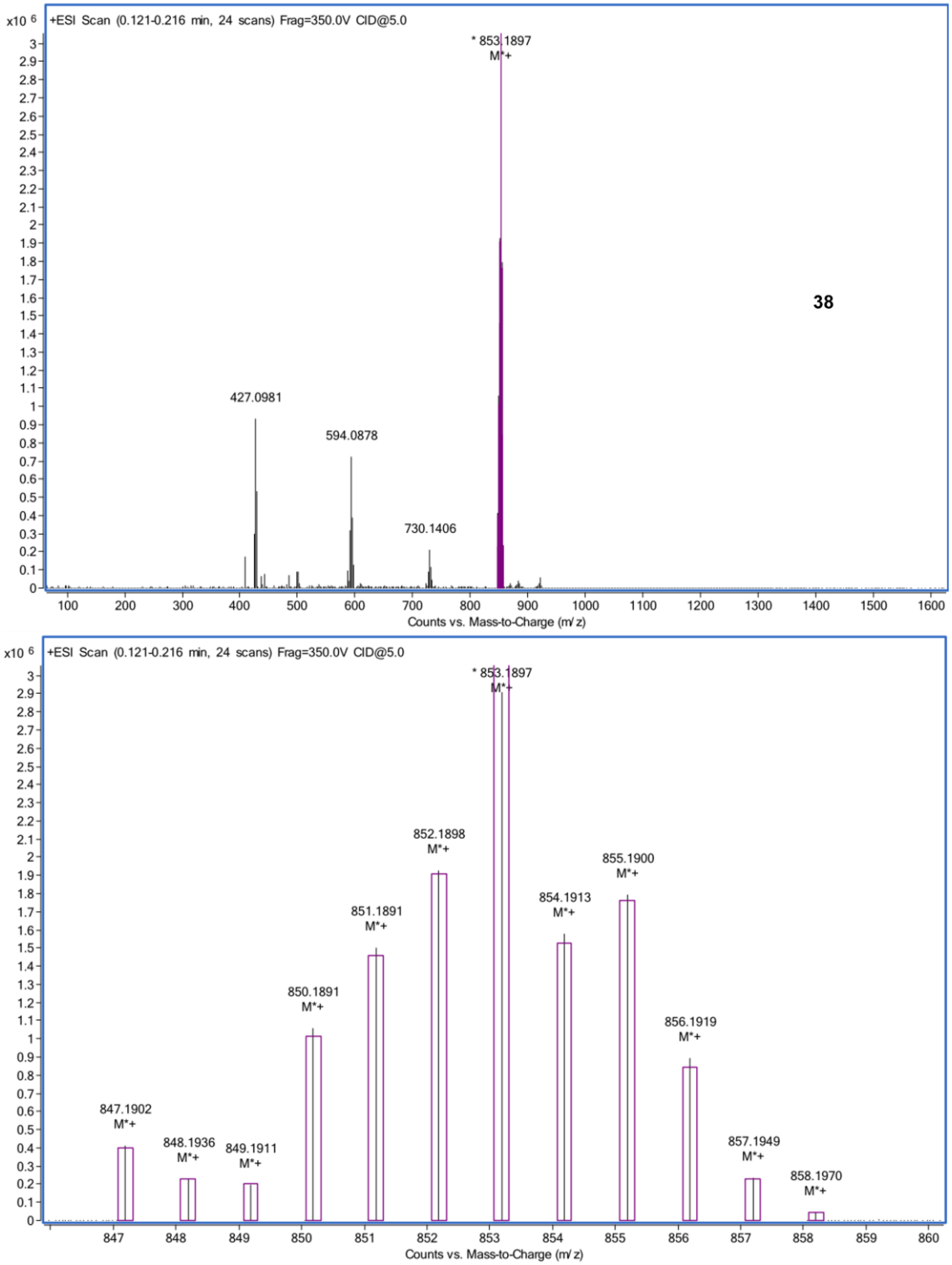


Figura A4.23. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **38** en ACN.

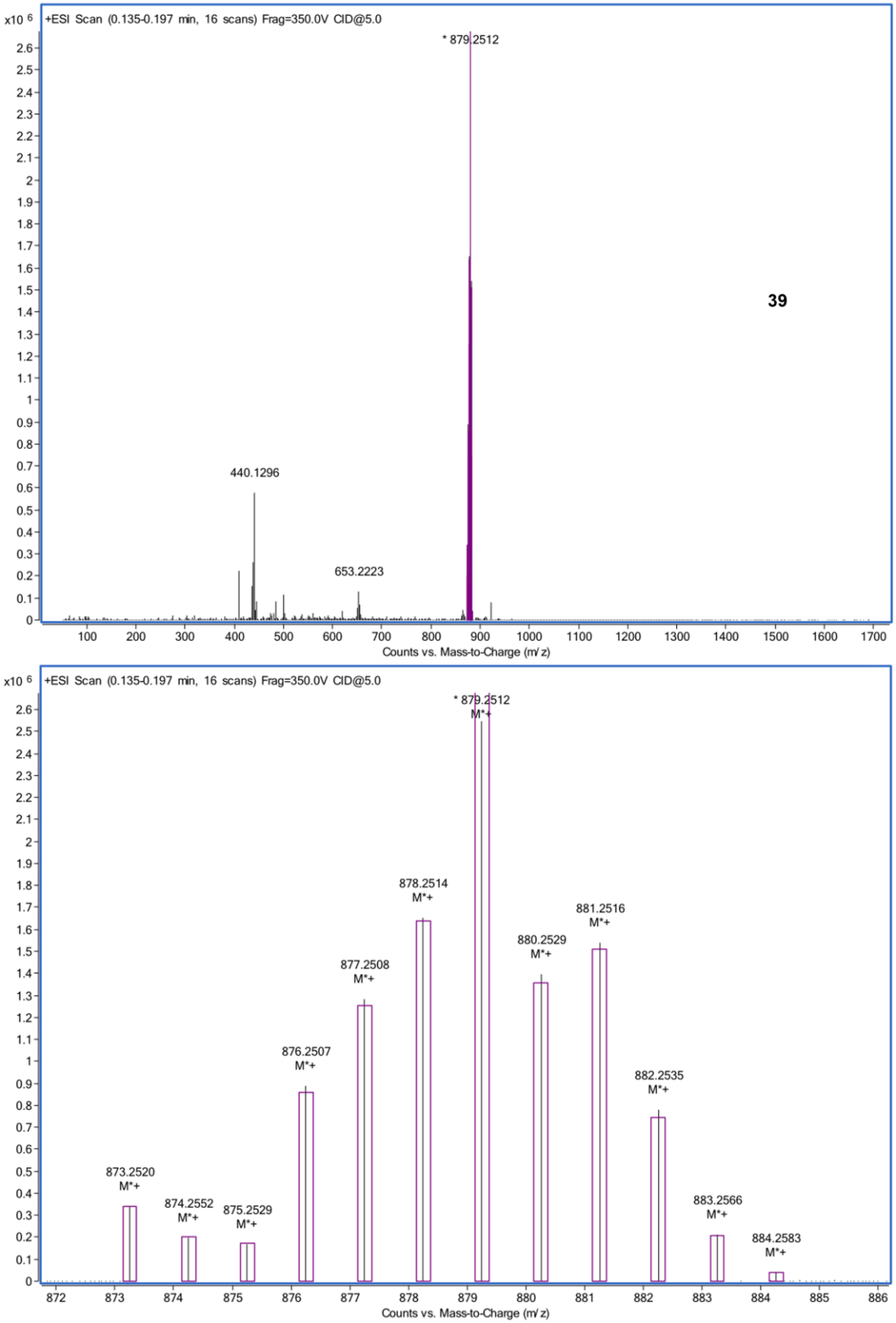


Figura A4.24. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **39** en ACN.

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

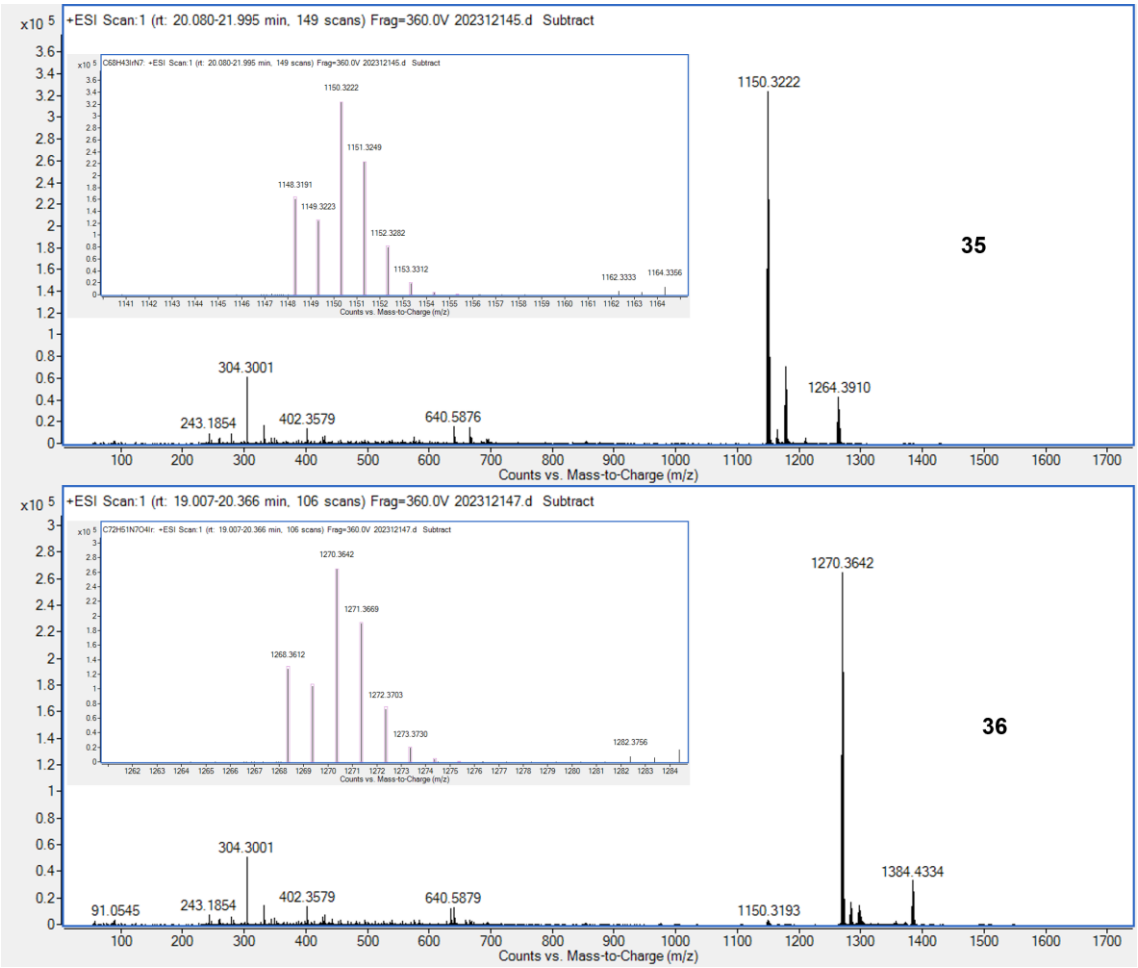


Figura A4.25. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~19–20 min de los cromatogramas de la **Figura 4.4** de los complejos **35**–**36** en ACN.

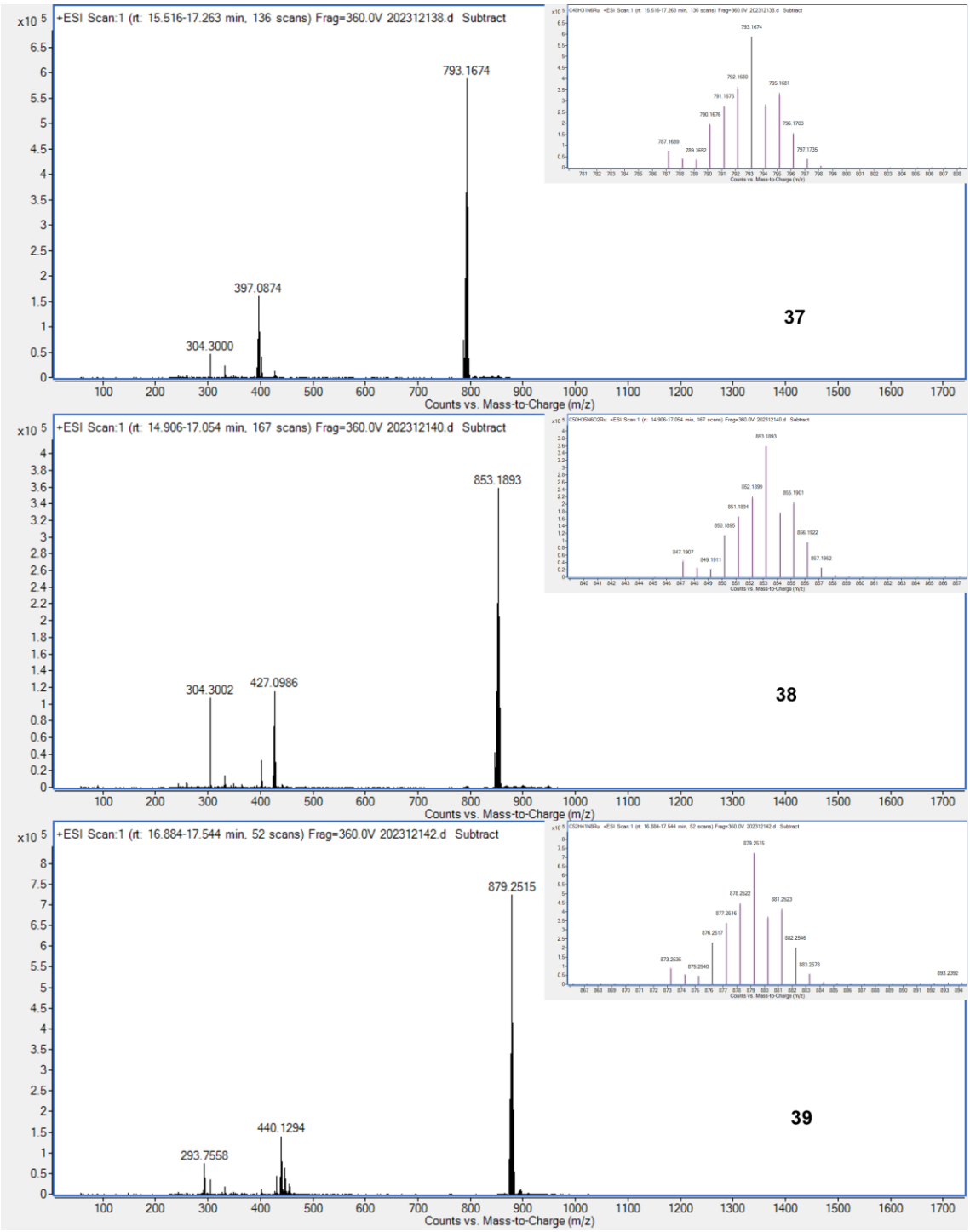


Figura A4.26. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del pico a ~16–17 min de los cromatogramas de la **Figura 4.4** de los complejos **37**–**39** en ACN.

4. Estructura cristalina

Tabla A4.1. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura para AMC14_0msp_a.

Código de identificación	AMC14_RMN_0msp_a	
Fórmula empírica	C24,50 H16,50 Cl F3 N3 P0,50 Ru0,50	
Masa fórmula	511,38	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	a = 12,3082(18) Å	α= 82,486(5)°.
	b = 12,9969(19) Å	β= 71,564(6)°.
	c = 15,014(2) Å	γ = 65,822(5)°.
Volumen	2078,7(5) $Å^3$	
Z	4	
Densidad (calculada)	1,634 Mg/m^3	
Coeficiente de absorción	0,617 mm^{-1}	
F(000)	1032	
Tamaño cristal	0,160 x 0,140 x 0,010 mm^3	
Rango de Theta para la toma de datos	1,895 a 28,325°	
Rangos del índice	-16<=h<=16 -17<=k<=17, -20<=l<=20	
Reflexiones realizadas	98901	
Reflexiones independientes	10365 [R(int) = 0,0406]	
Integridad de Theta = 25,242°	100,0 %	
Corrección absorción	Semiempírica de equivalentes	
Máx. y mín. transmisión	0,7457 y 0,6557	
Método de refinamiento	Matriz de mínimos cuadrados completa F^2	
Datos / restricciones / parámetros	10365 / 50 / 614	
Buen de ajuste F^2	1,113	
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0414, wR2 = 0,0888	
R índices (todos los datos)	R1 = 0,0535, wR2 = 0,0997	
Mayor diferencia pico-hueco	1,298 y -0,638 $e.Å^{-3}$	

5. Espectroscopia de absorción UV/Vis

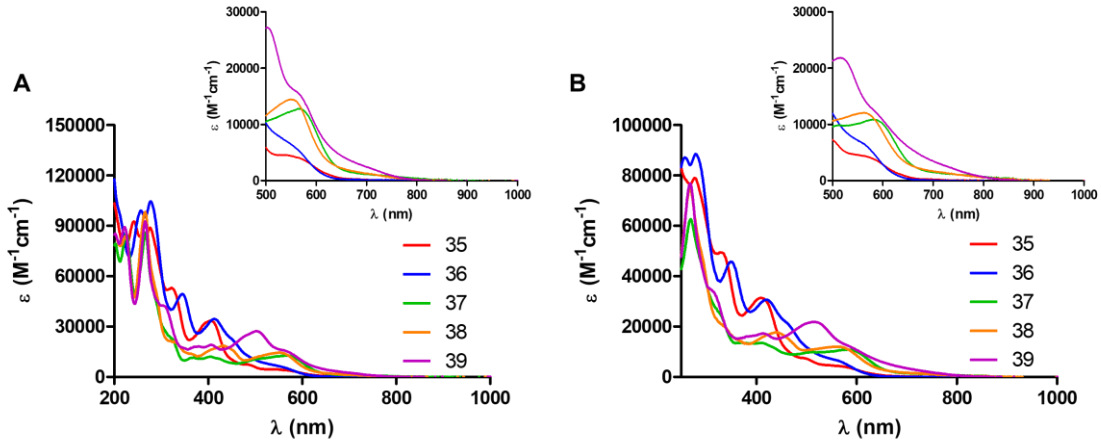


Figura A4.27. Espectros de absorción UV/Vis de todos los complejos en (A) ACN y (B) agua (1% DMSO), a t.a., 10 μM, en presencia de oxígeno. Se muestra una ampliación de la región 500–1000 nm.

6. Estudios de estabilidad

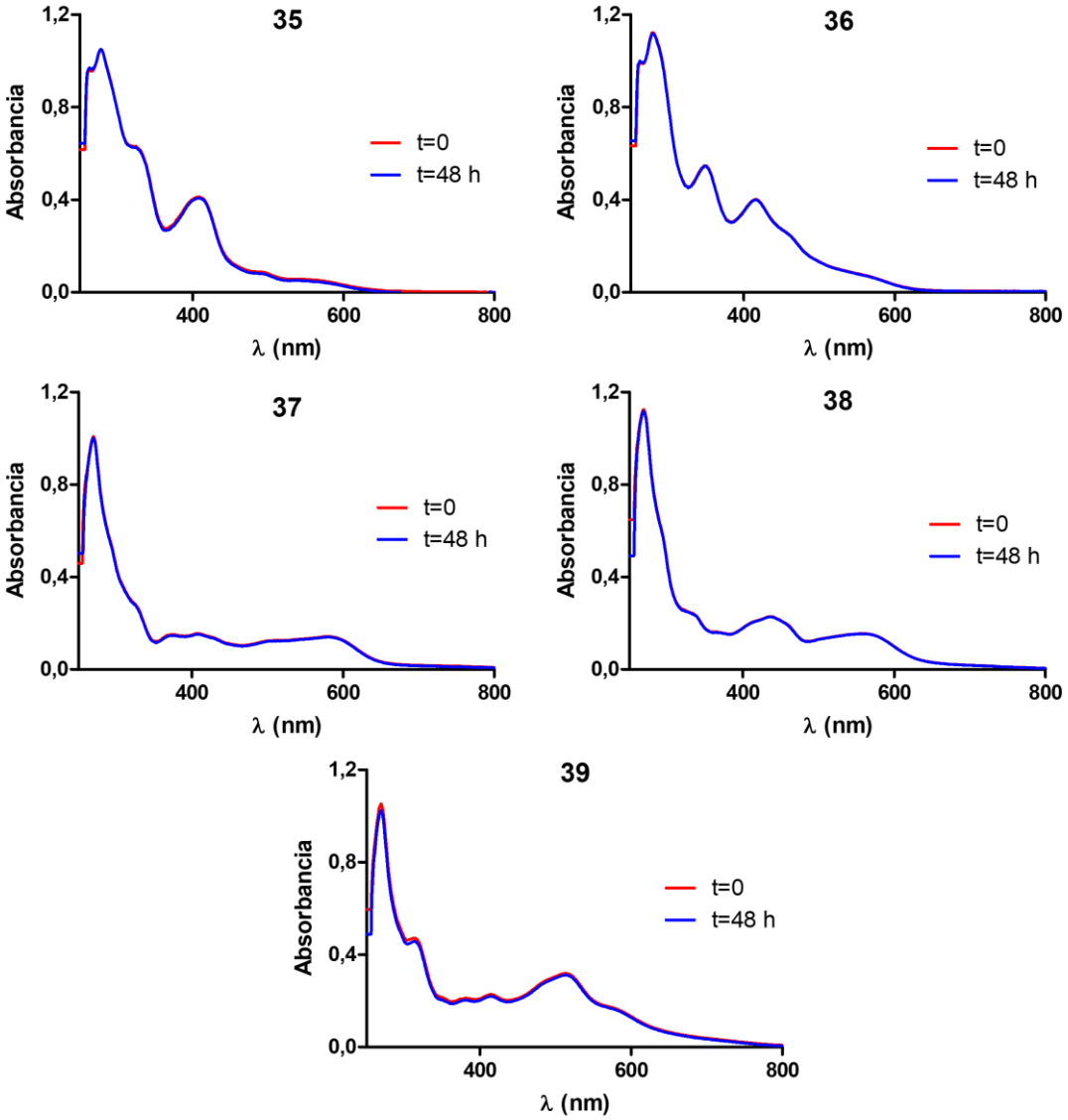


Figura A4.28. Estudio de estabilidad de los complejos en DMSO por UV/Vis, a 37 ºC, 10 µM.

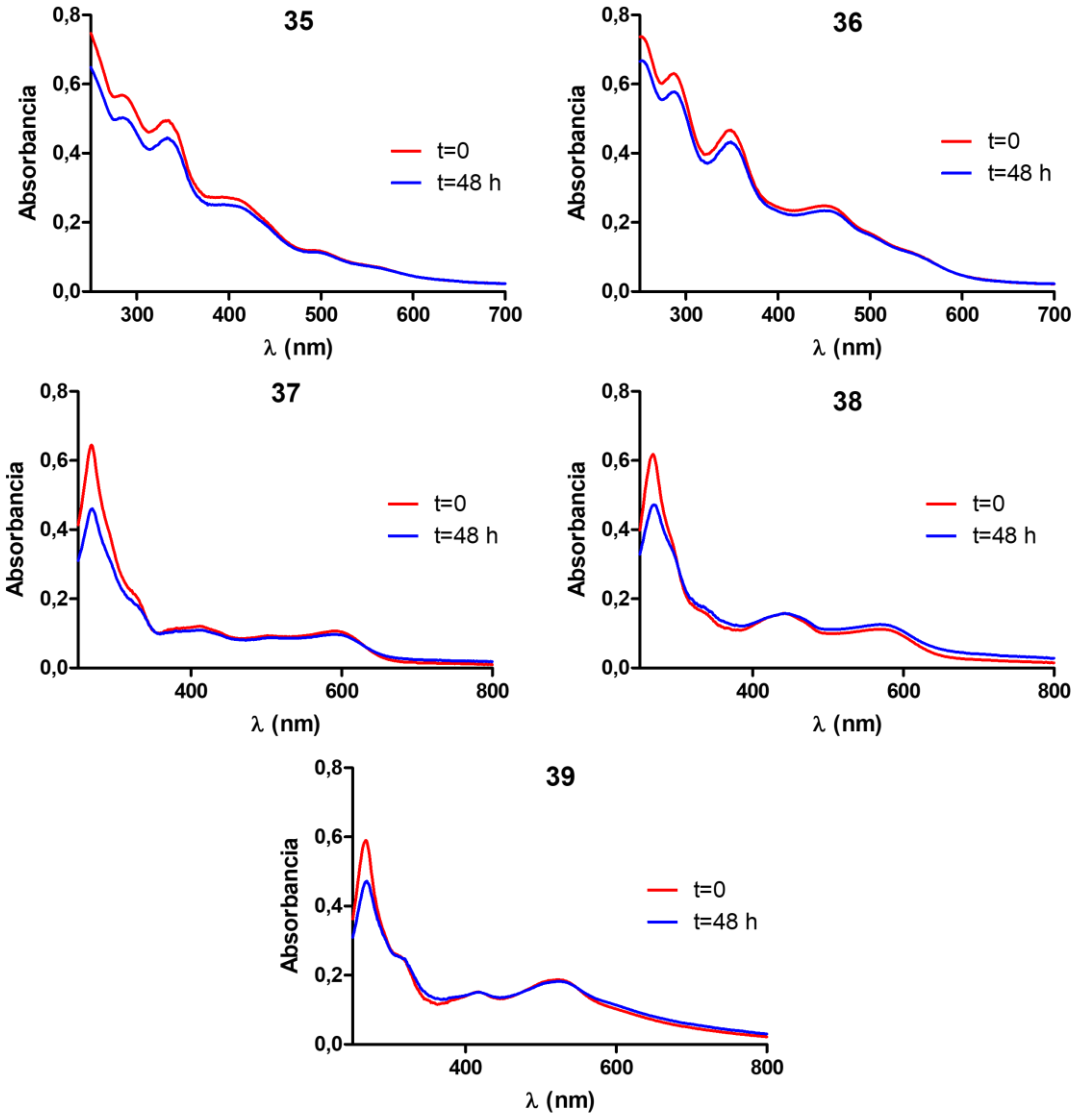


Figura A4.29. Estudio de estabilidad de los complejos en RPMI (5% DMSO) por UV/Vis, a 37 ºC, 10 µM.

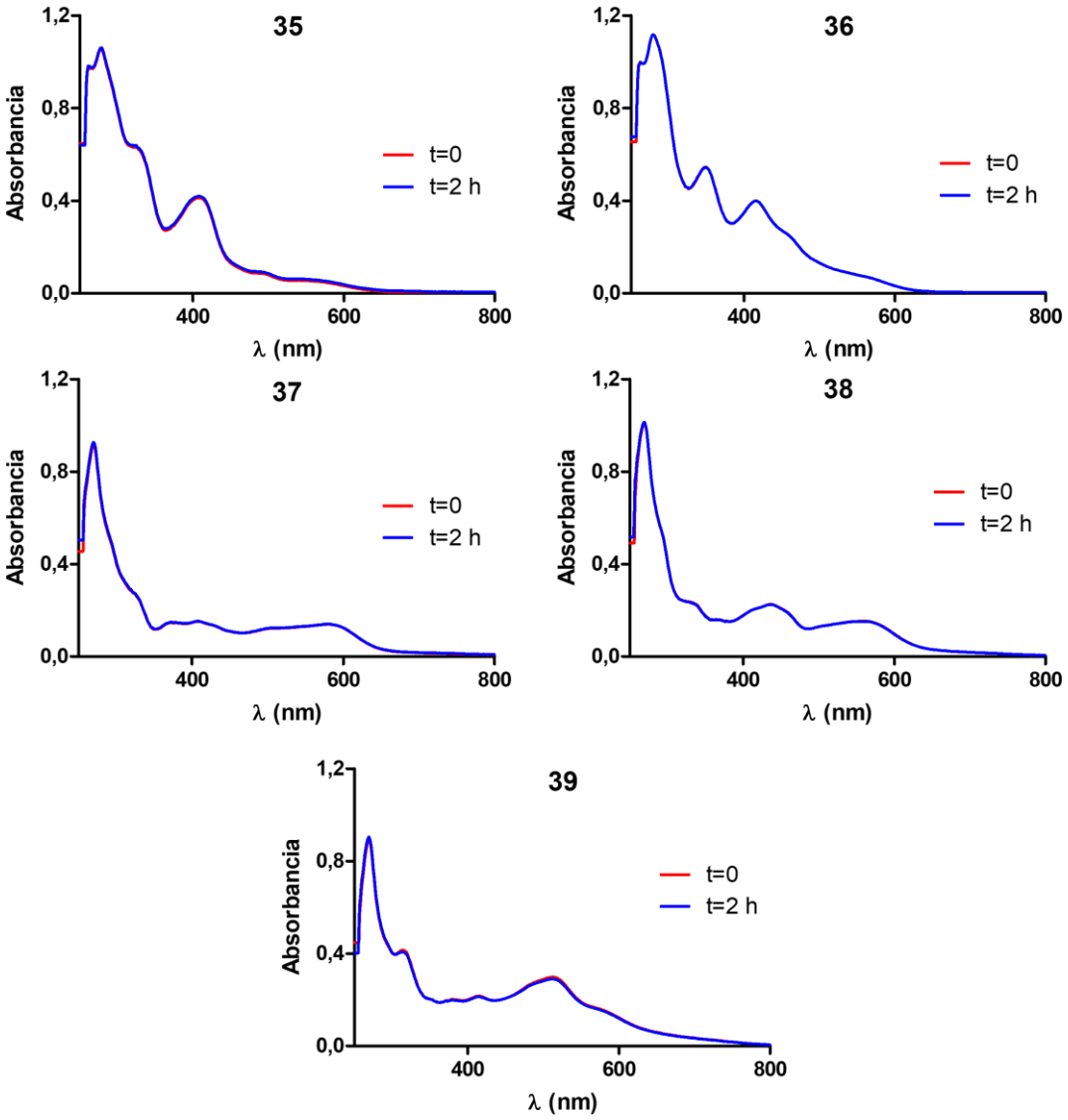


Figura A4.30. Estudio de fotoestabilidad de los complejos **35**–**39** en DMSO por UV/Vis tras irradiar con luz azul (465 nm, 5 mW/cm^2), a t.a., 10 µM.

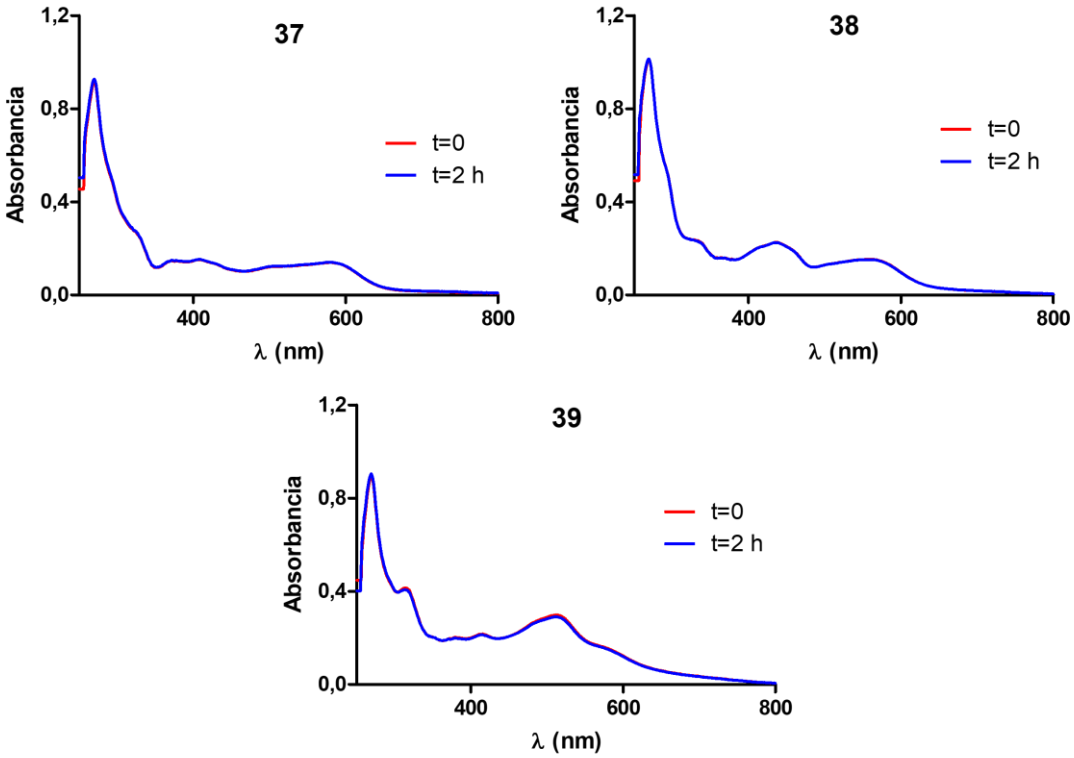


Figura A4.31. Estudio de fotoestabilidad de los complejos **37**–**39** en DMSO por UV/Vis tras irradiar con luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2), a t.a., 10 µM.

7. Generación de oxígeno singlete ($^1O_2$)

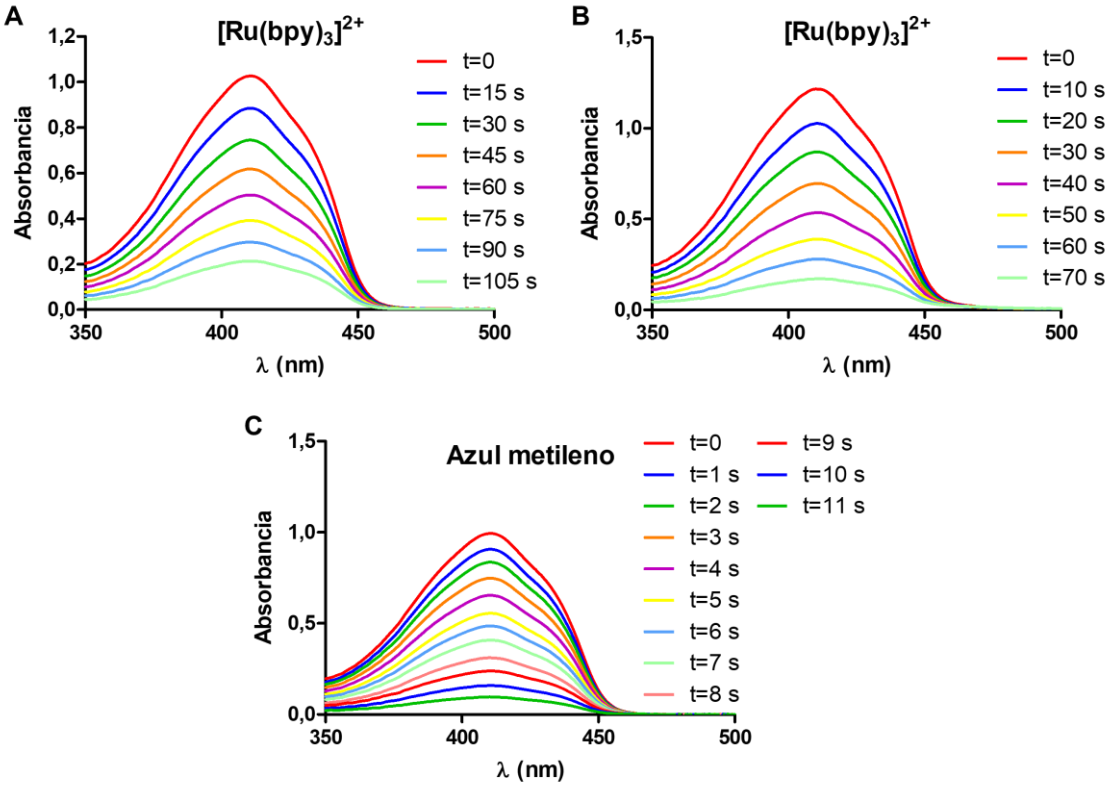


Figura A4.32. Evolución de los espectros de la DPBF en presencia de las referencias (A) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (2,5 µM) y luz azul (465 nm, 0,7 mW/cm^2), (B) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (50 µM) y luz verde (520 nm, 0,8 mW/cm^2) y (C) Azul de metileno (1 µM) y luz roja (620 nm, 5,06 mW/cm^2).

ANEXO IV

ÍNDICE

1. Espectros de RMN A149

1.1. Compuesto 40 ..... A149

1.2. Compuesto 41 ..... A151

1.3. Compuesto 42 ..... A153

1.4. Compuesto 43 ..... A155

1.5. Compuesto 44 ..... A157

1.6. Compuesto 45 ..... A160

1.7. Espectros ^{13}C-RMN comparativos A162

2. Espectrometría de masas A164

3. Estructura cristalina A168

4. Estudios de estabilidad A169

4.1. Estabilidad en DMF A169

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 40

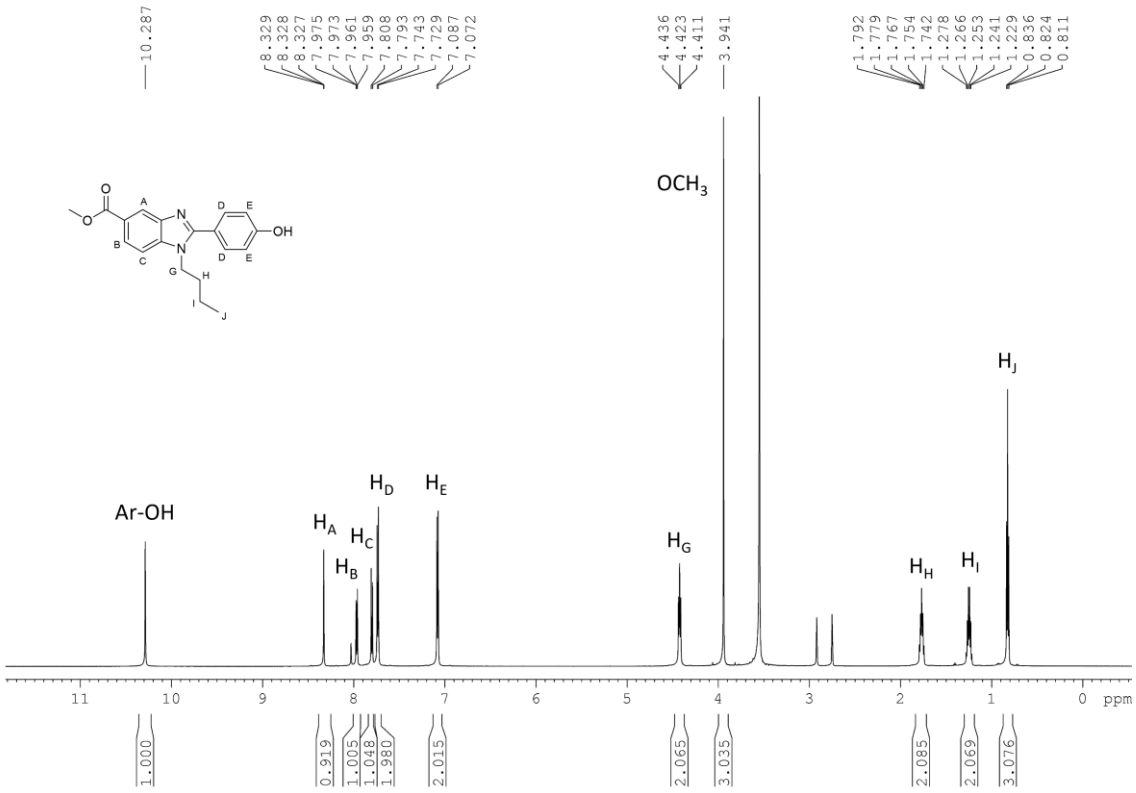


Figura A5.1. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **40** en DMF-d_7.

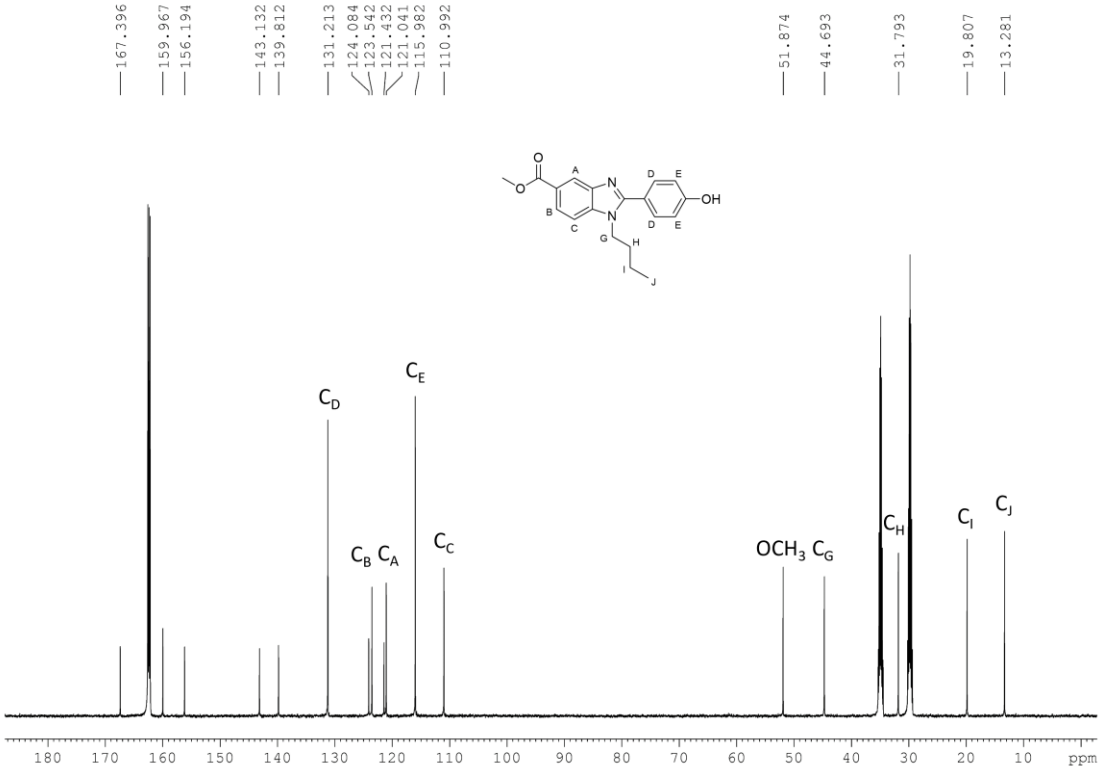


Figura A5.2. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **40** en DMF-d_7.

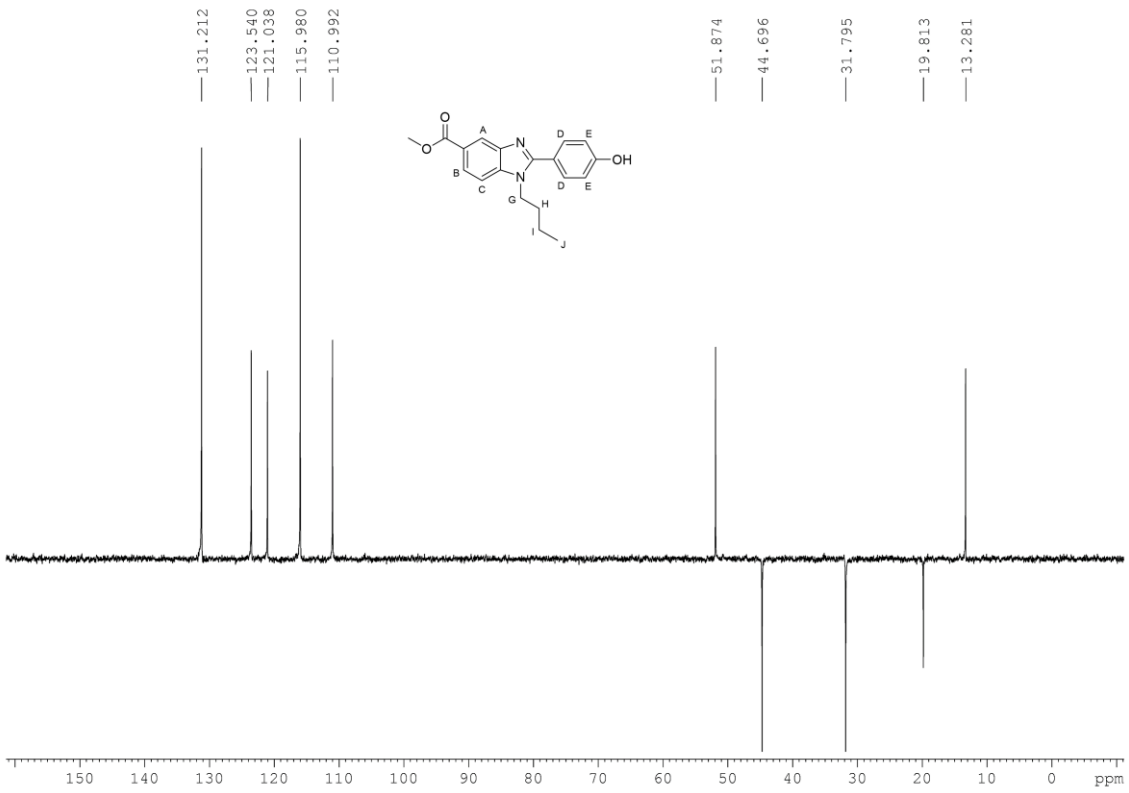


Figura A5.3. Espectro de 135-DEPT 101 MHz del compuesto **40** en DMF-d_7.

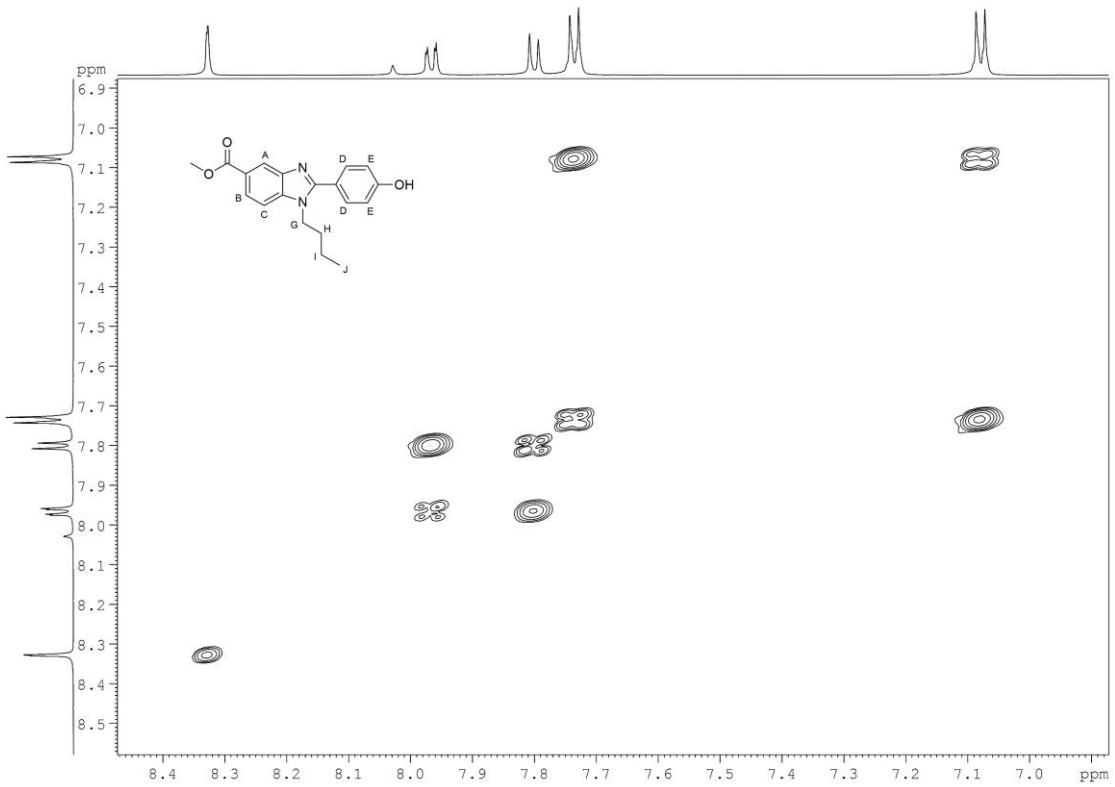


Figura A5.4. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **40** en DMF-d_7.

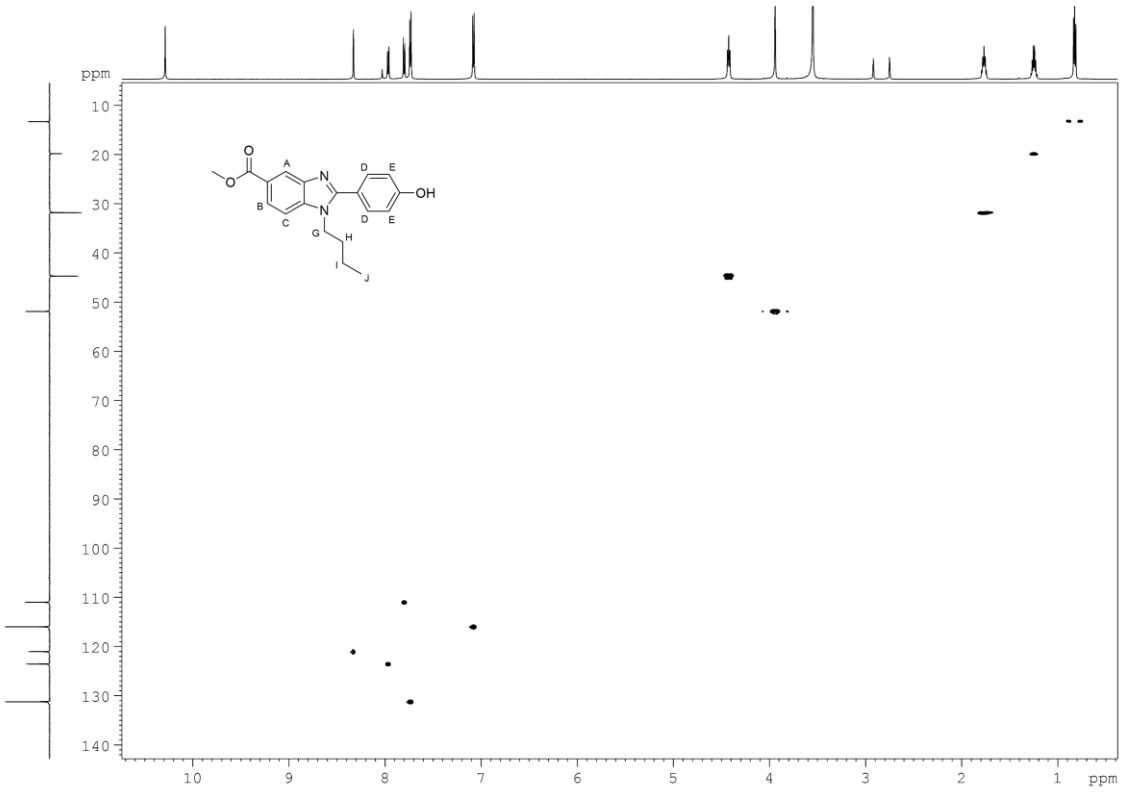


Figura A5.5. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **40** en DMF-d_7.

1.2. Compuesto 41

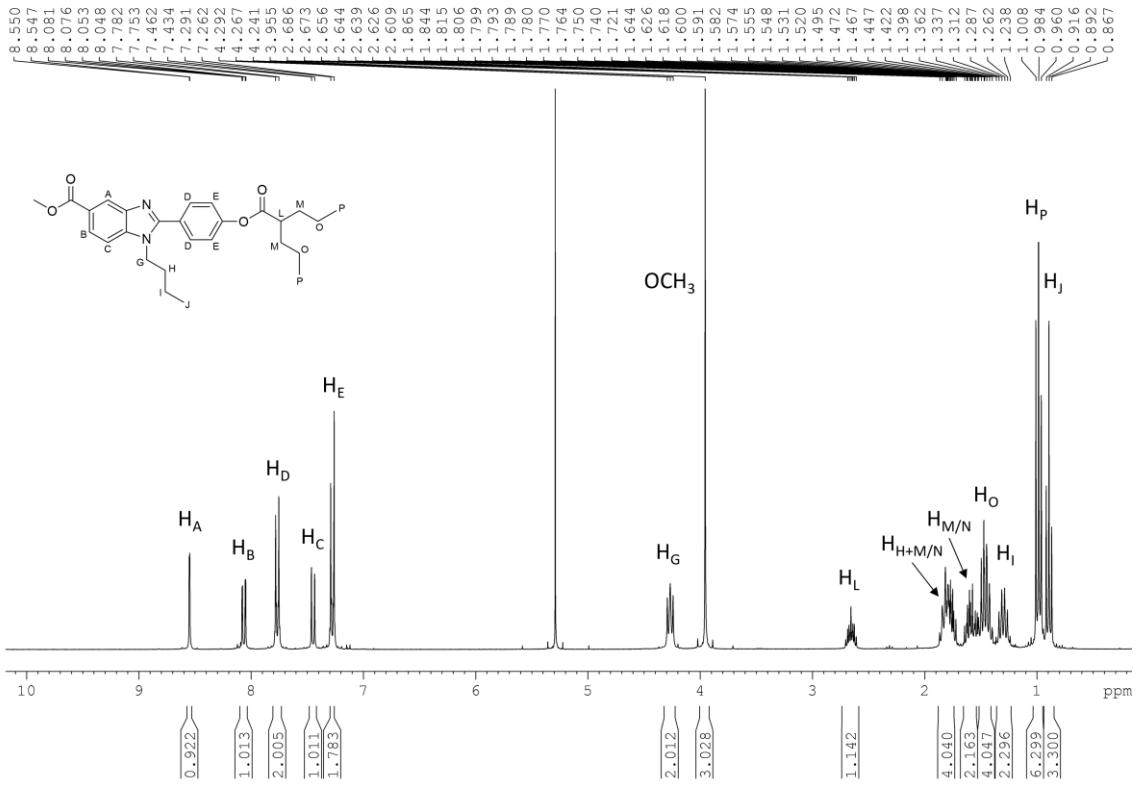


Figura A5.6. Espectro de ^{1}H-RMN 300 MHz del compuesto **41** en $CDCl_3$.

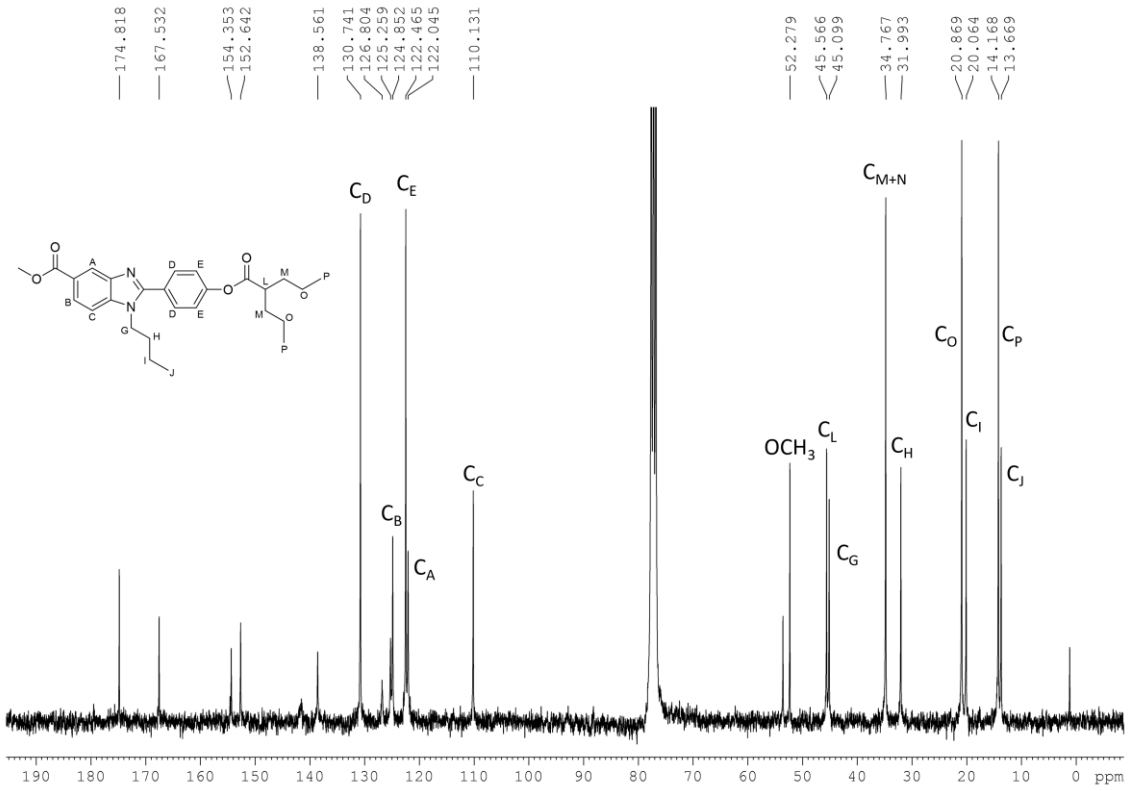


Figura A5.7. Espectro de ^{13}C-RMN 75 MHz del compuesto **41** en $CDCl_3$.

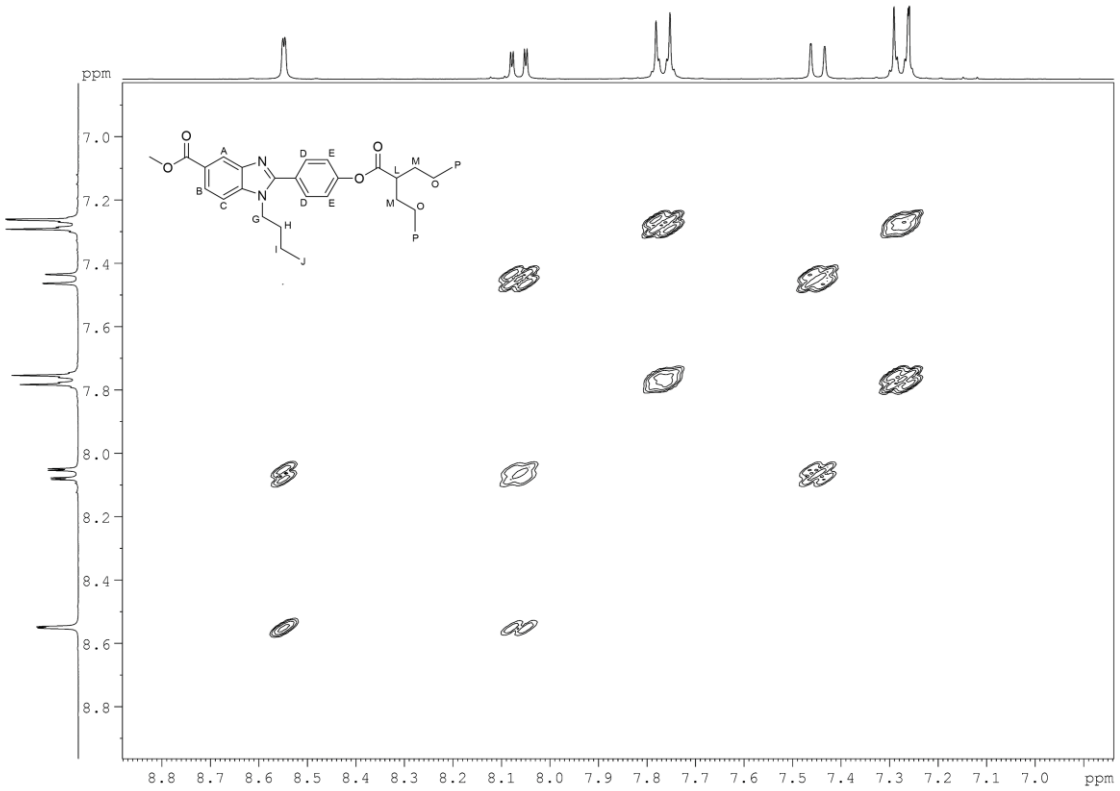


Figura A5.8. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 300 MHz del compuesto **41** en $CDCl_3$.

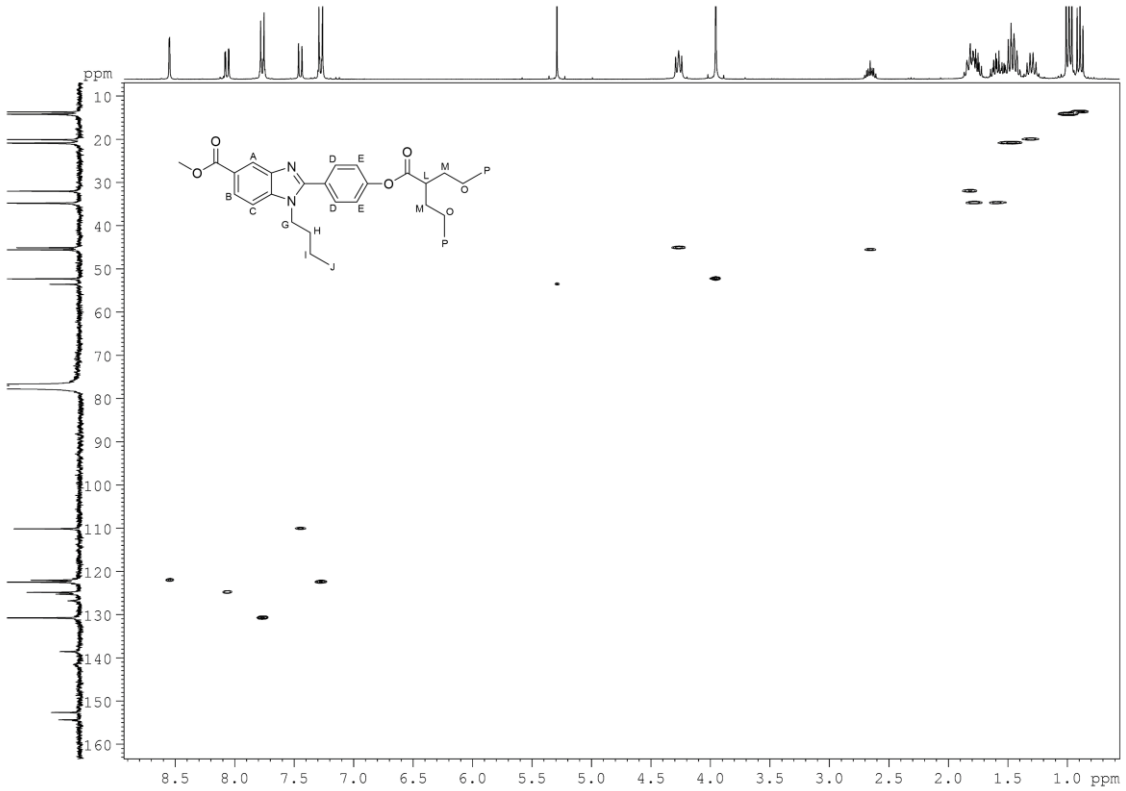


Figura A5.9. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 300 MHz) del compuesto **41** en $CDCl_3$.

1.3. Compuesto 42

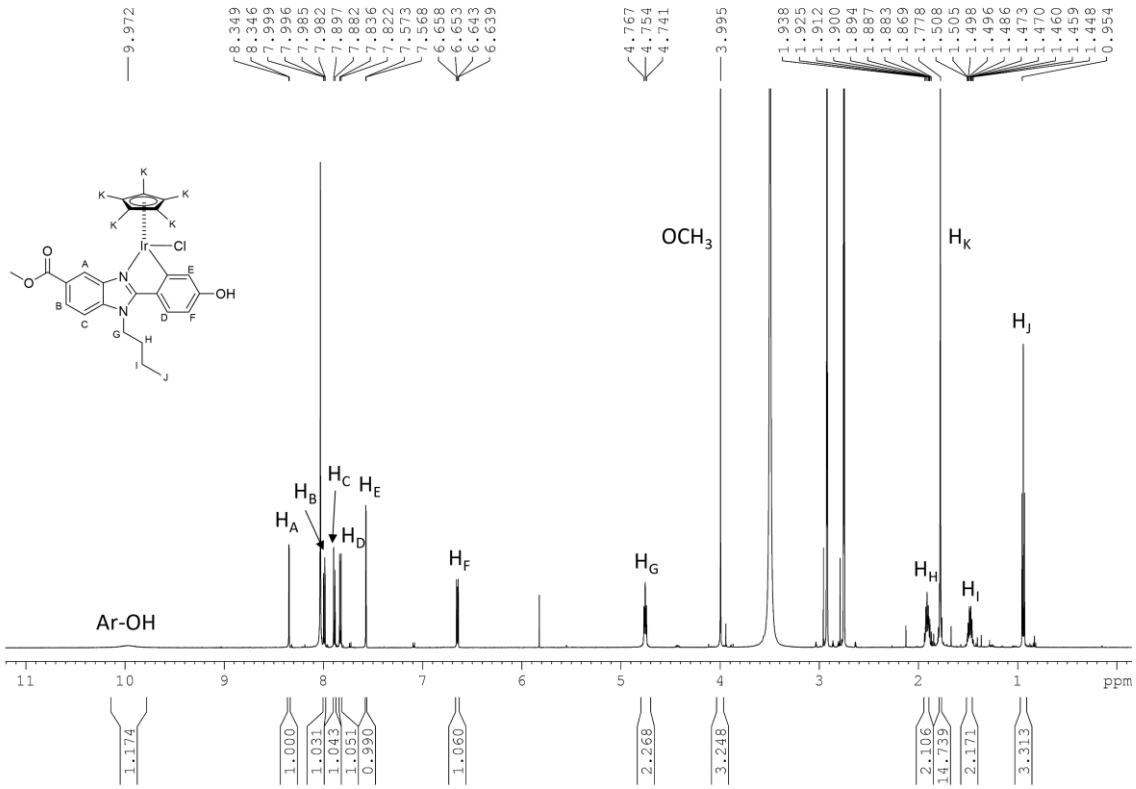


Figura A5.10. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **42** en DMF-d_7.

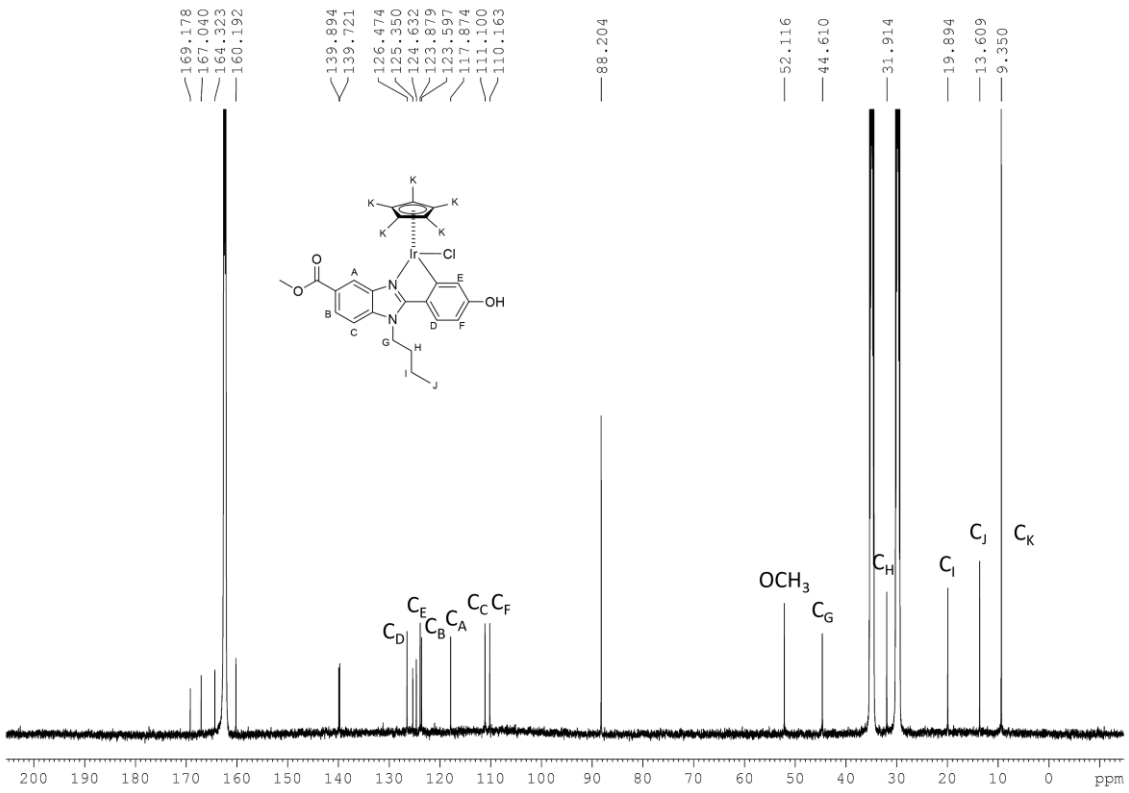


Figura A5.11. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **42** en DMF-d_7.

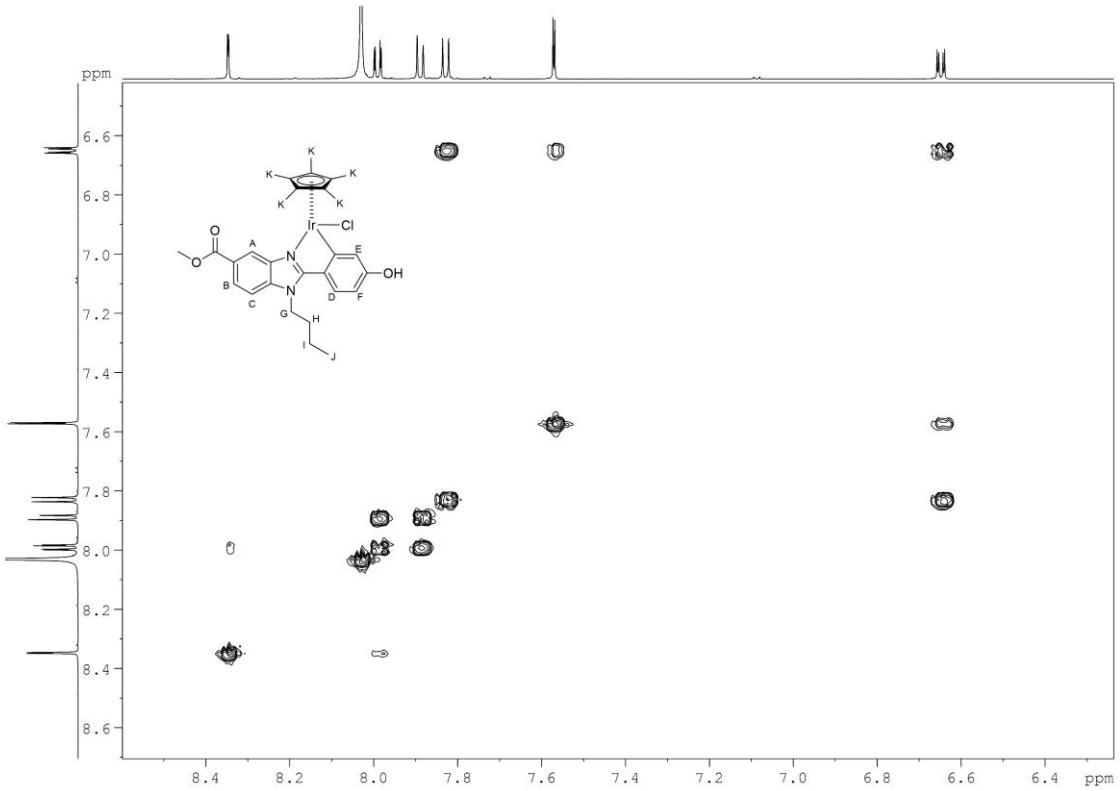


Figura A5.12. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **42** en DMF-d_7.

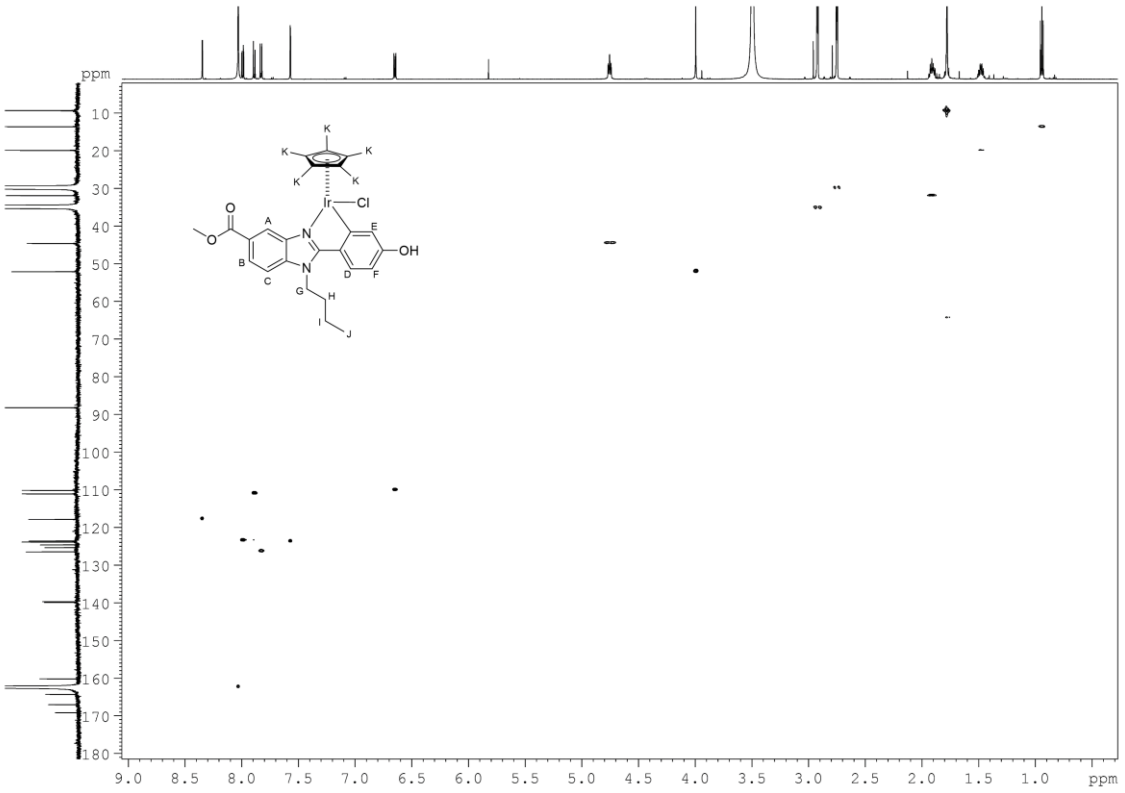


Figura A5.13. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **42** en DMF-d_7.

1.4. Compuesto 43

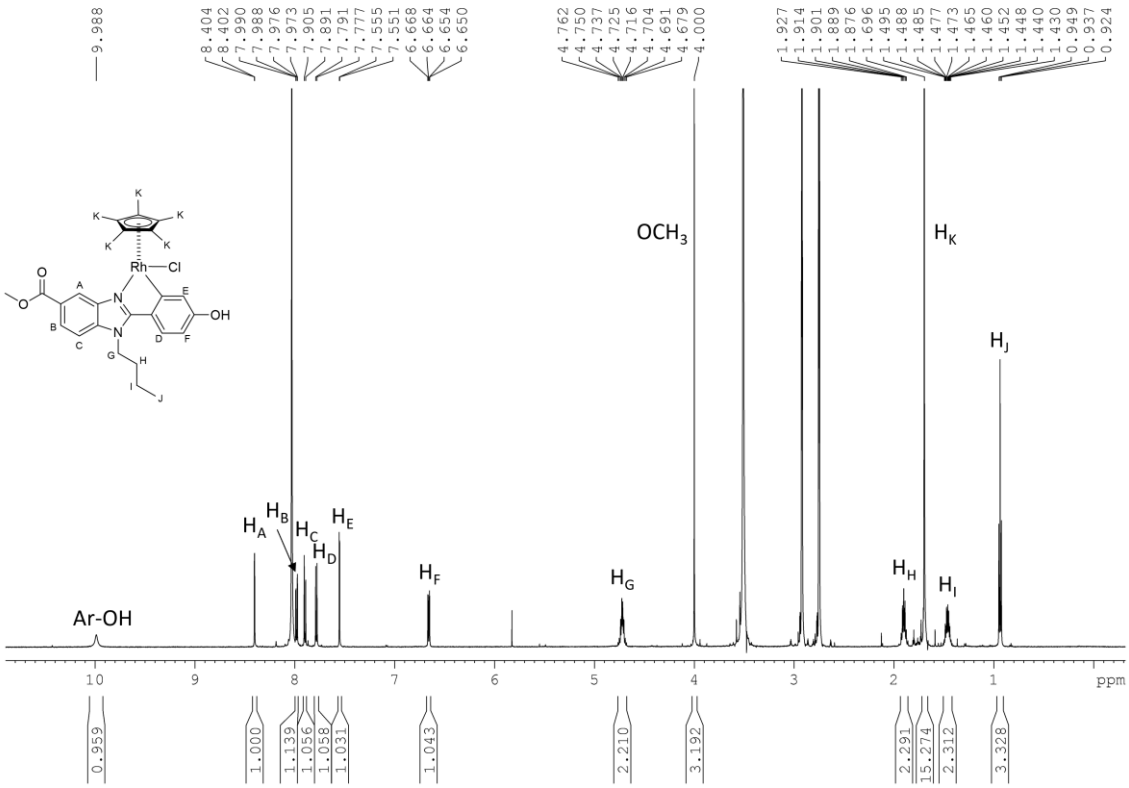


Figura A5.14. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **43** en DMF-d_7.

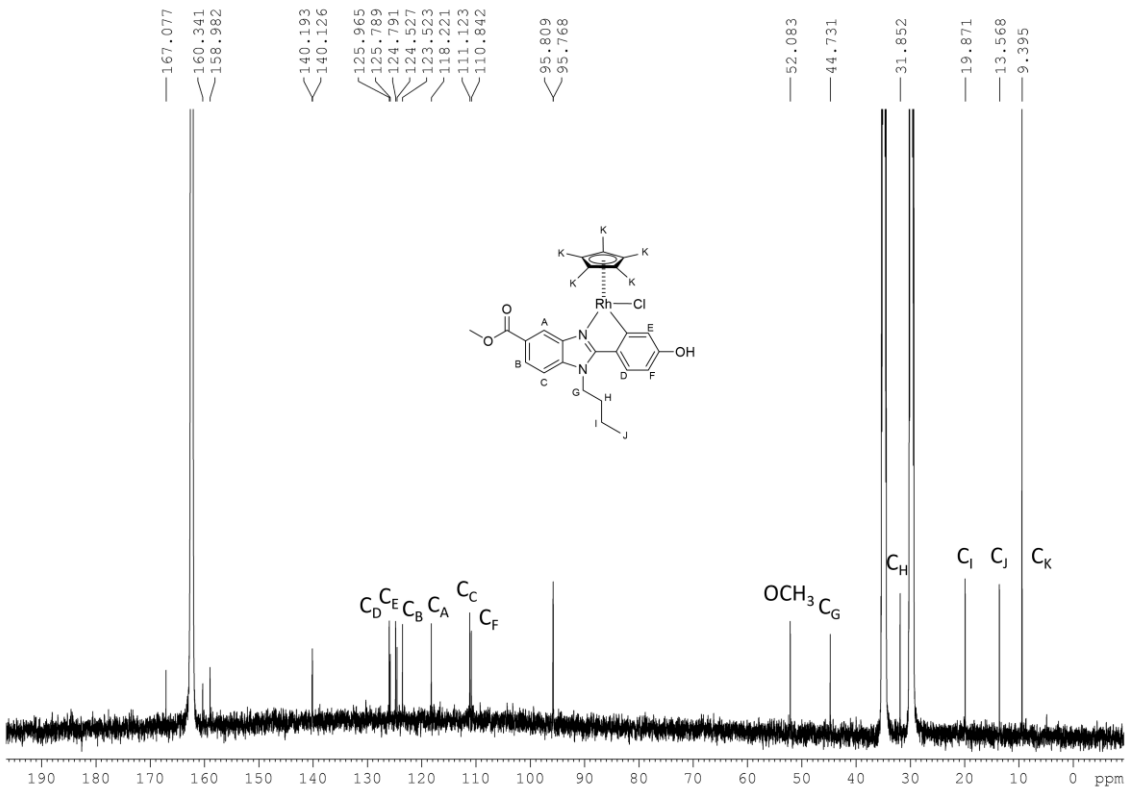


Figura A5.15. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **43** en DMF-d_7.

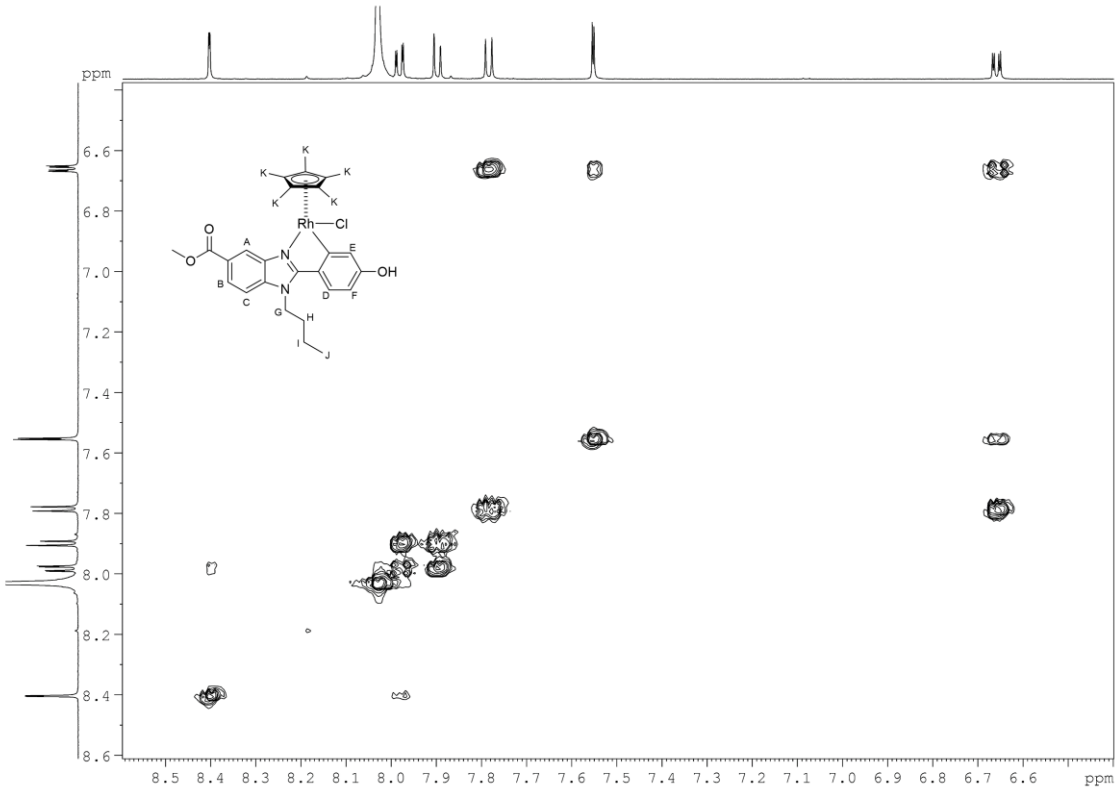


Figura A5.16. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **43** en DMF-d_7.

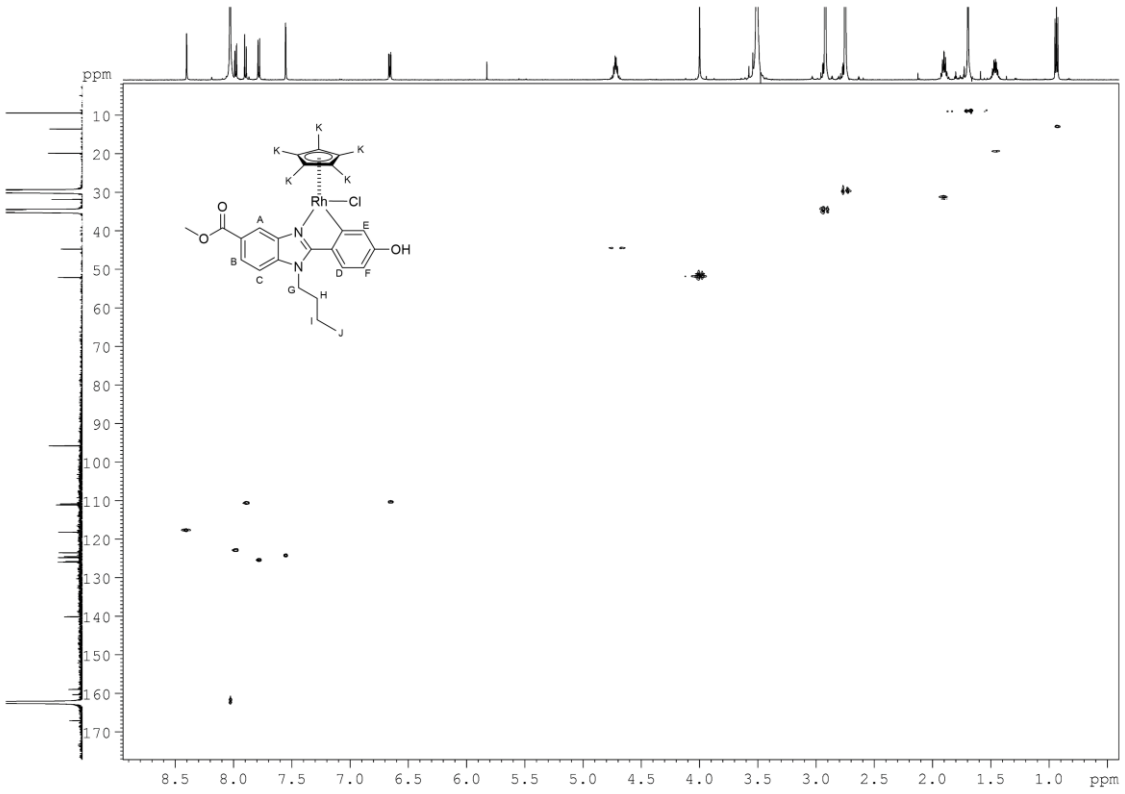


Figura A5.17. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **43** en DMF-d_7.

1.5. Compuesto 44

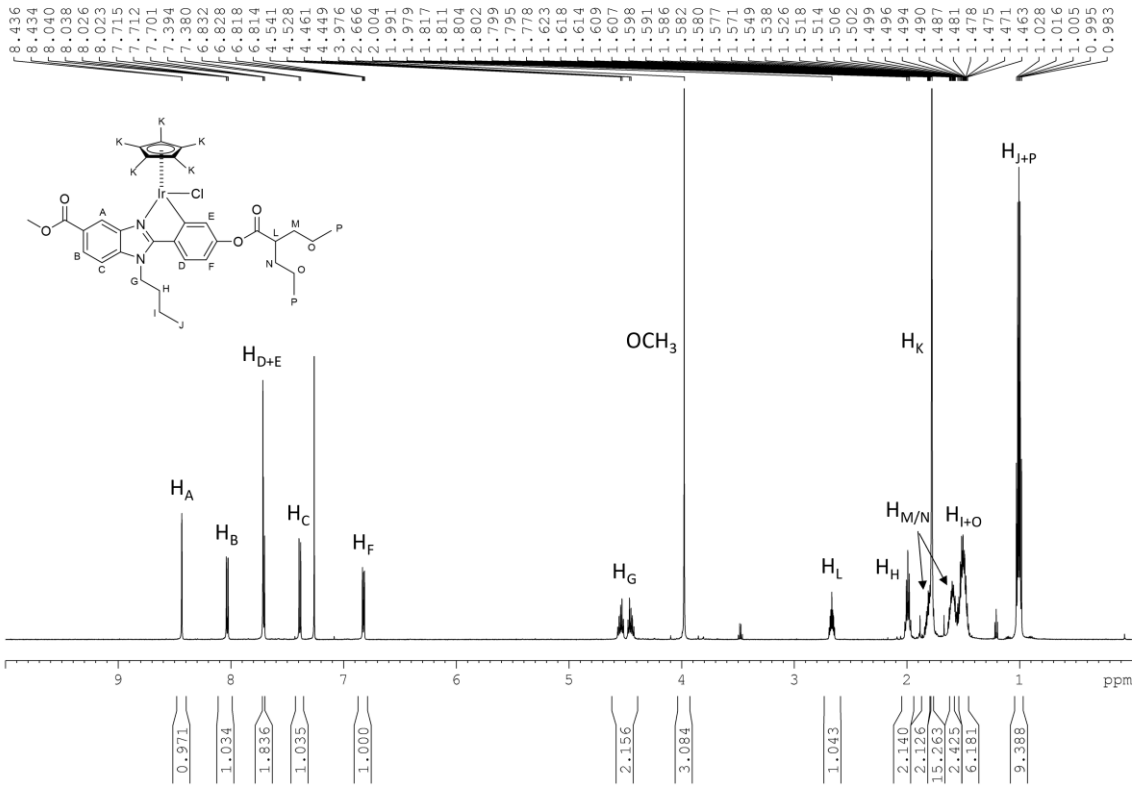


Figura A5.18. Espectro de ^{1}H-RMN 600 MHz del compuesto **44** en $CDCl_3$.

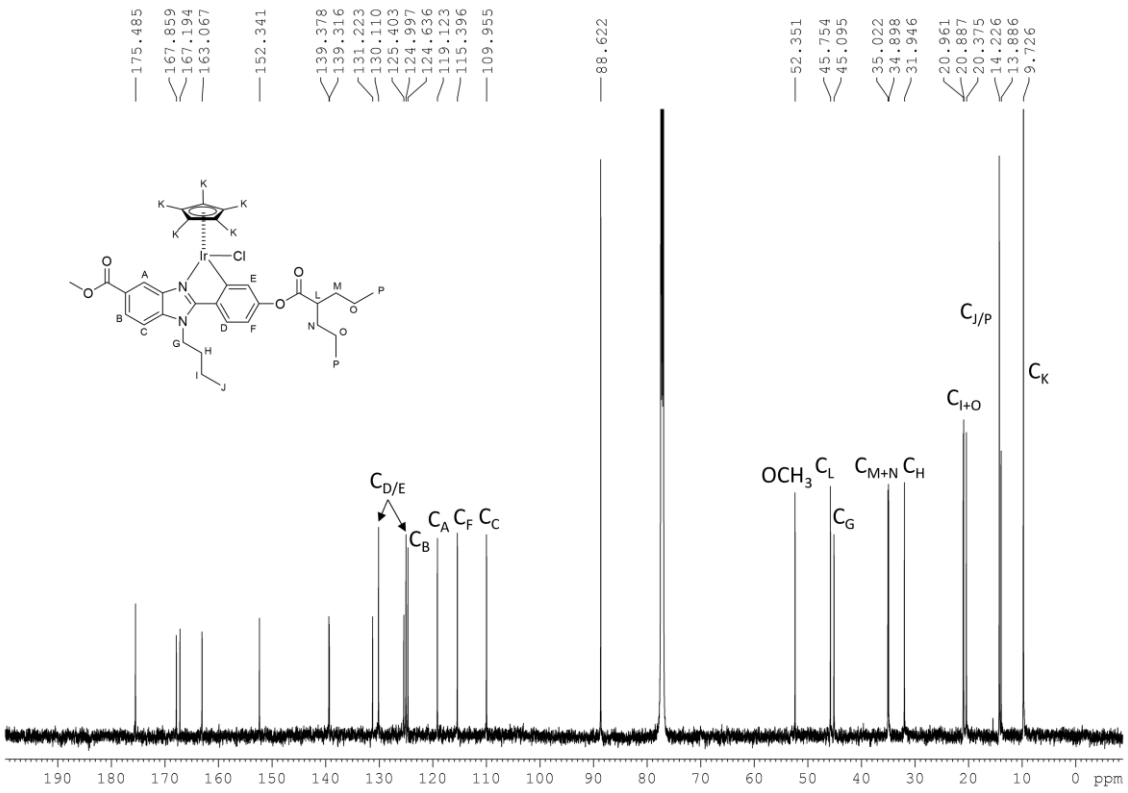


Figura A5.19. Espectro de ^{13}C-RMN 151 MHz del compuesto **44** en $CDCl_3$.

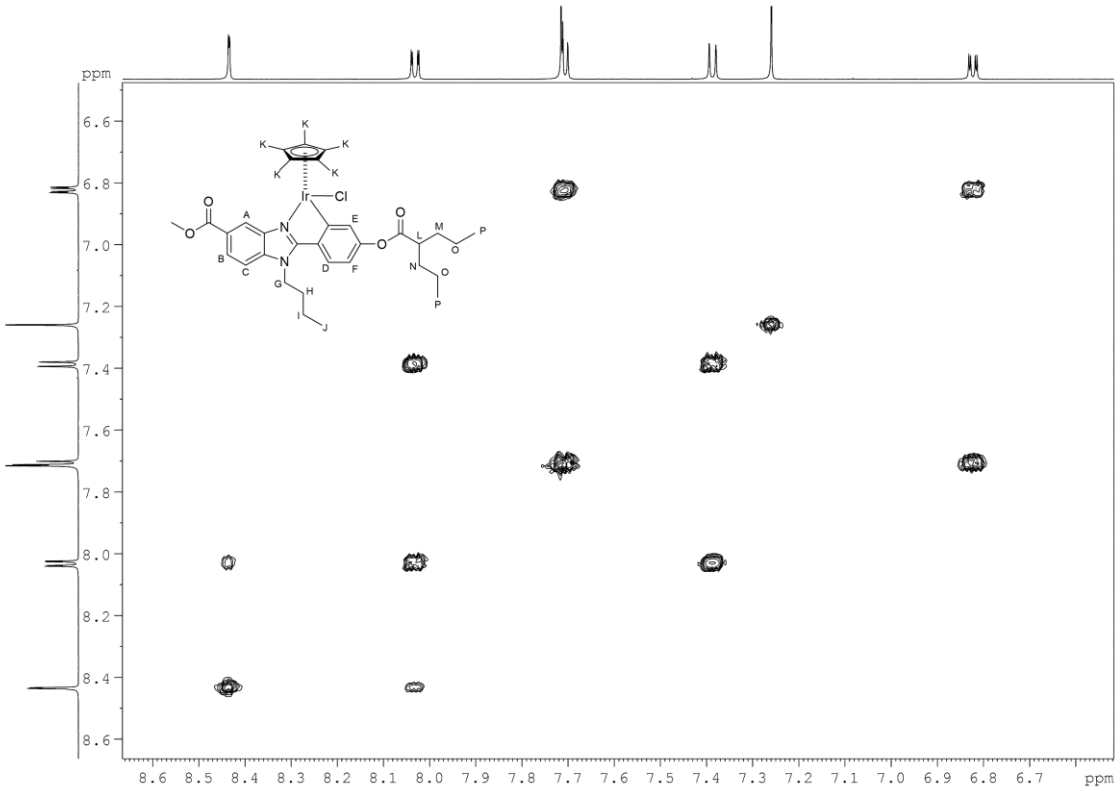


Figura A5.20. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 600 MHz del compuesto **44** en $CDCl_3$.

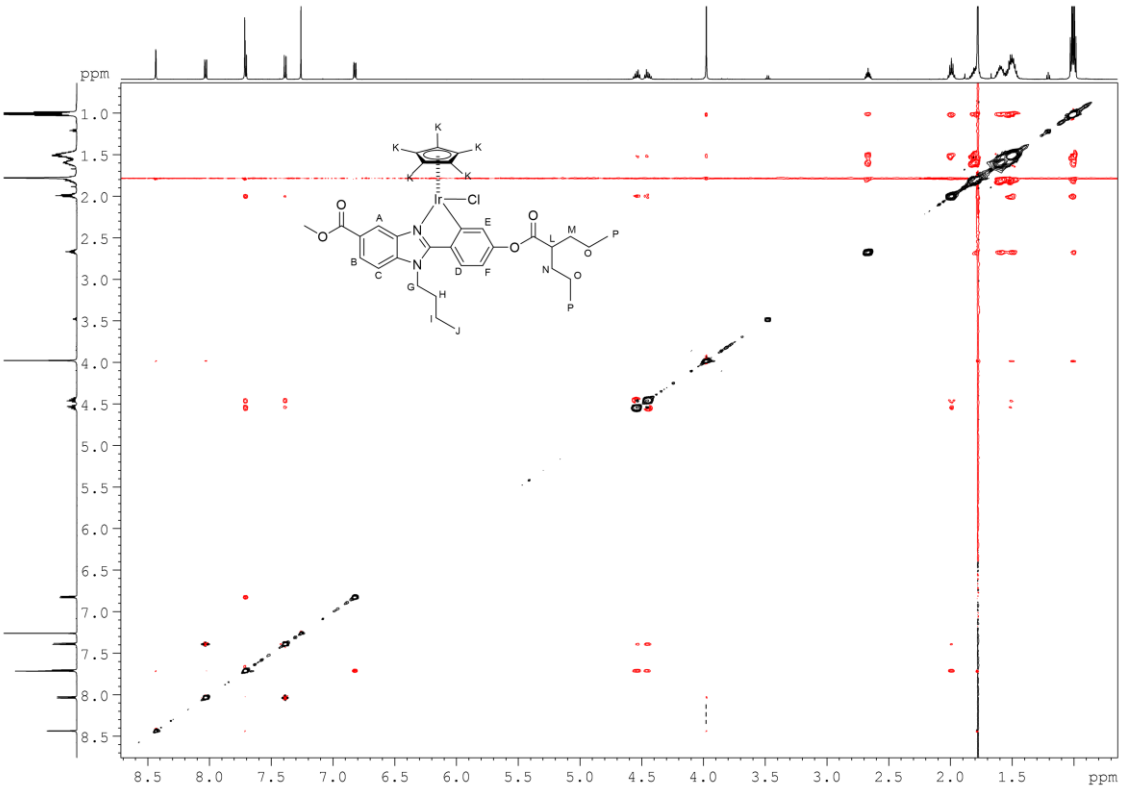


Figura A5.21. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-NOESY 600 MHz del compuesto **44** en $CDCl_3$.

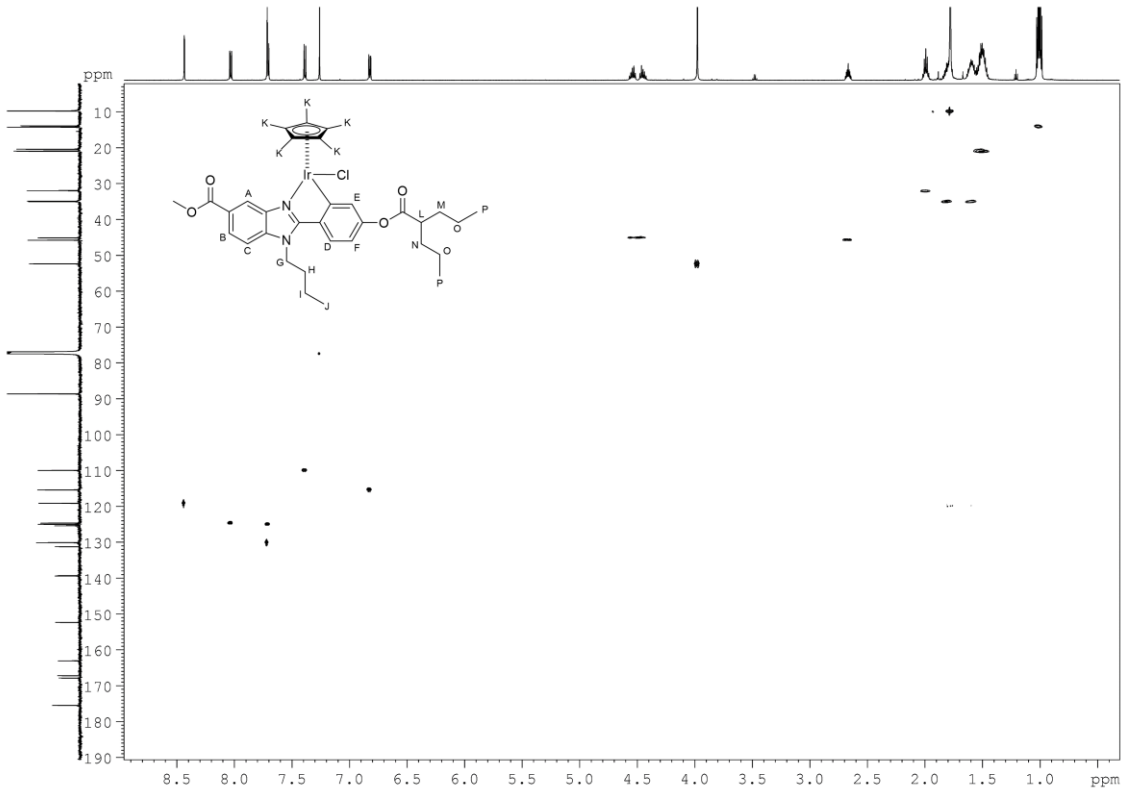


Figura A5.22. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 600 MHz) del compuesto **44** en $CDCl_3$.

1.6. Compuesto 45

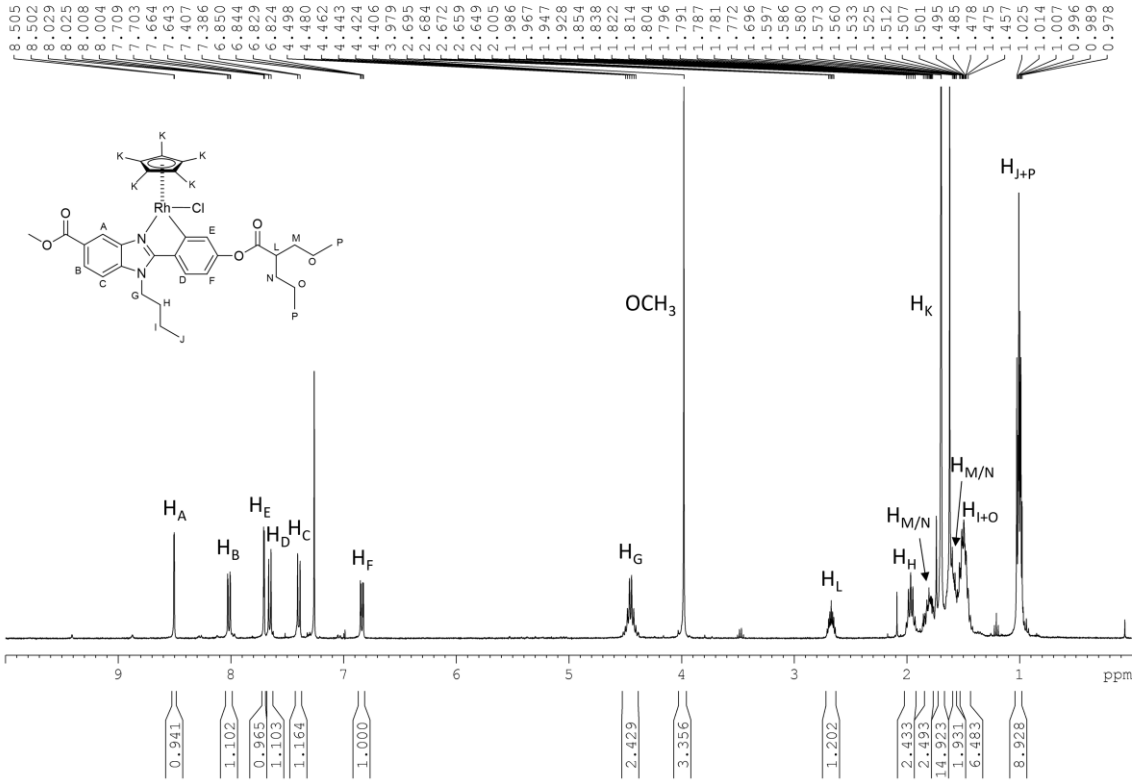


Figura A5.23. Espectro de ^{1}H-RMN 400 MHz del compuesto **45** en $CDCl_3$.

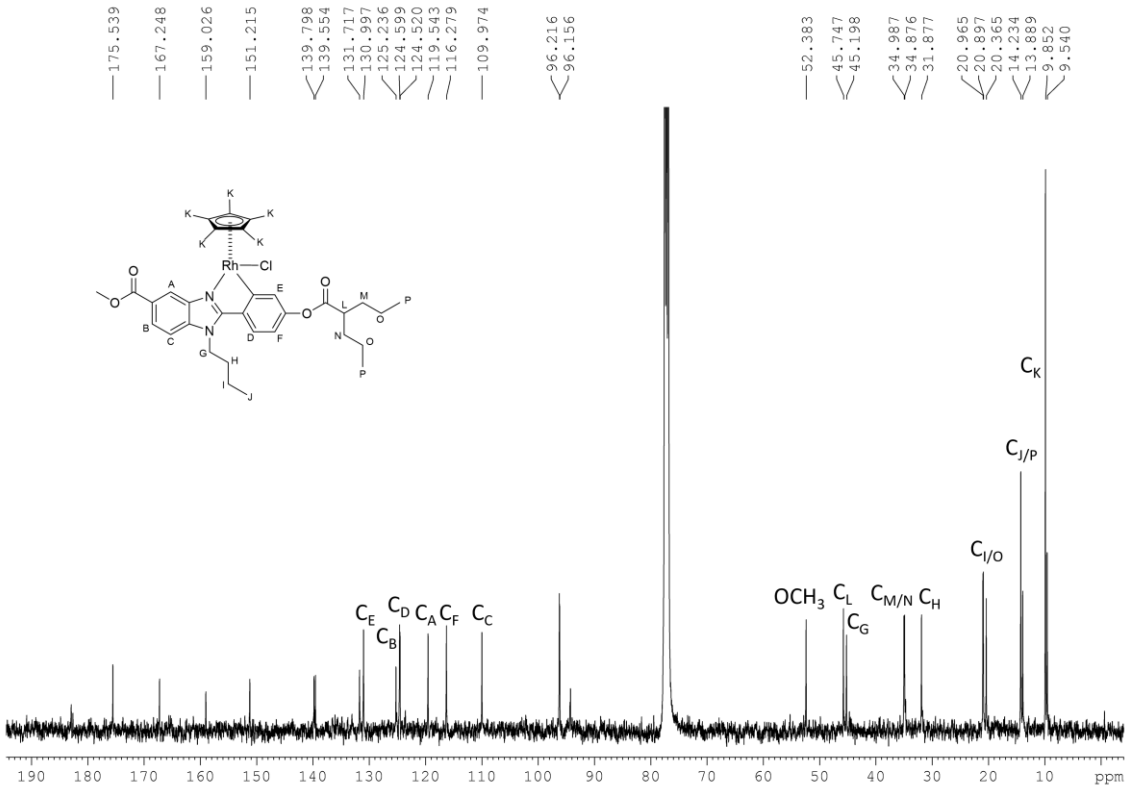


Figura A5.24. Espectro de ^{13}C-RMN 101 MHz del compuesto **45** en $CDCl_3$.

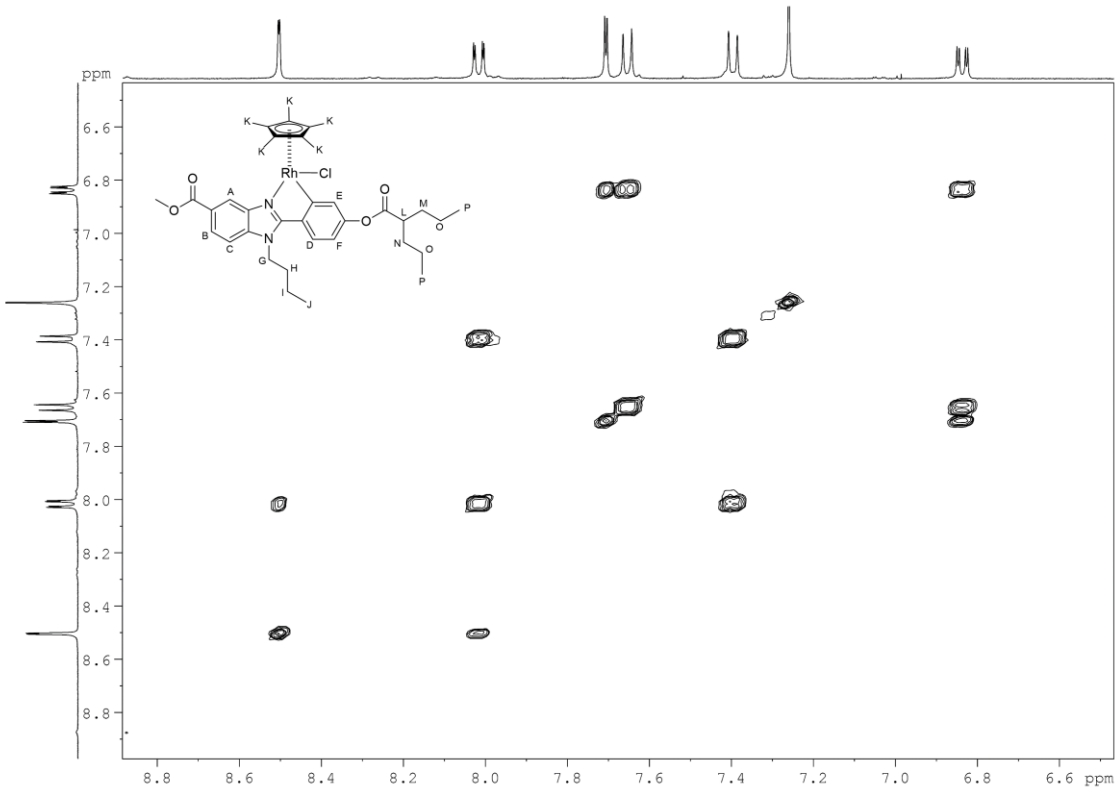


Figura A5.25. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-COSY 400 MHz del compuesto **45** en $CDCl_3$.

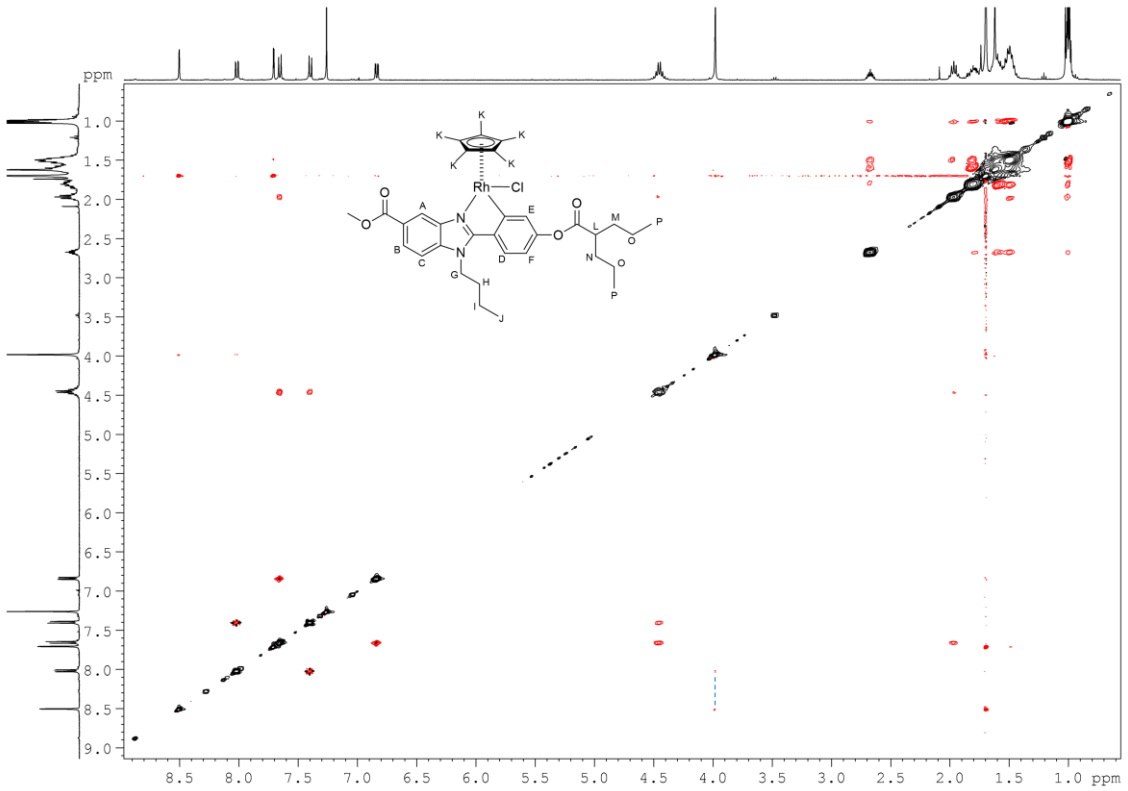


Figura A5.26. Espectro de [^{1}H-^{1}H]-NOESY 400 MHz del compuesto **45** en $CDCl_3$.

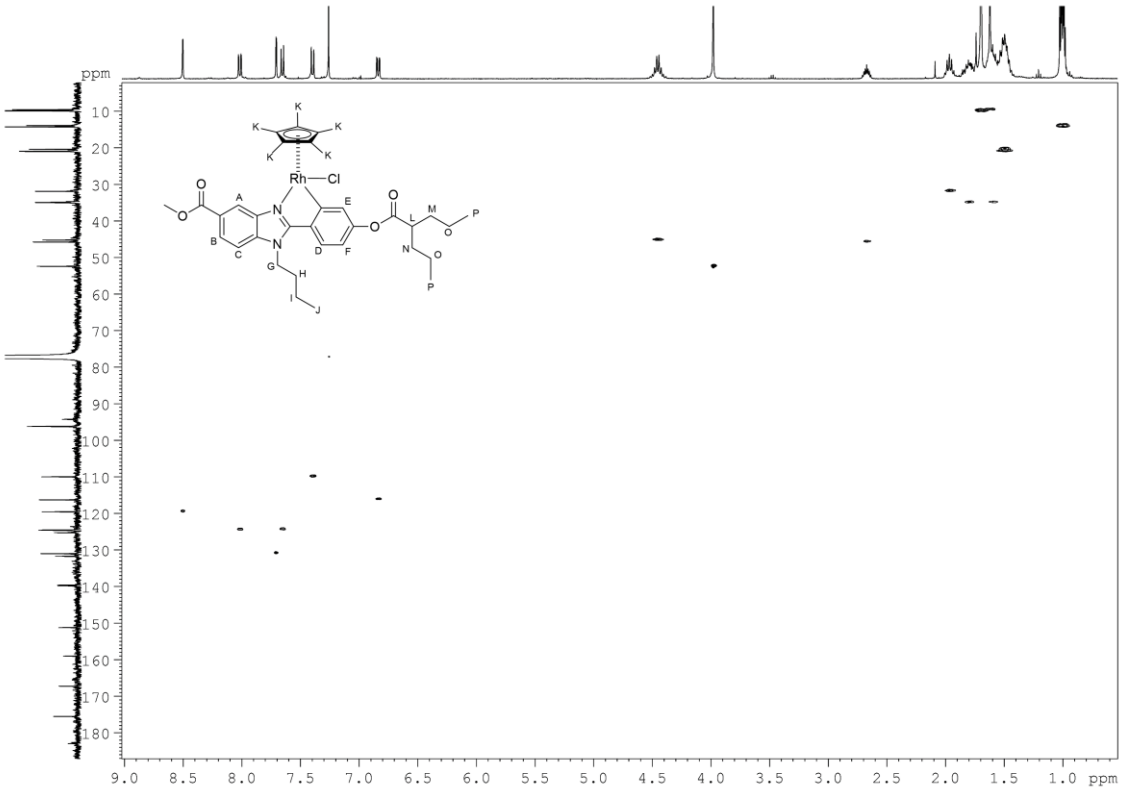


Figura A5.27. Espectro de [^{1}H-^{13}C]-HSQC (^{1}H, 400 MHz) del compuesto **45** en $CDCl_3$.

1.7. Espectros ^{13}C-RMN comparativos

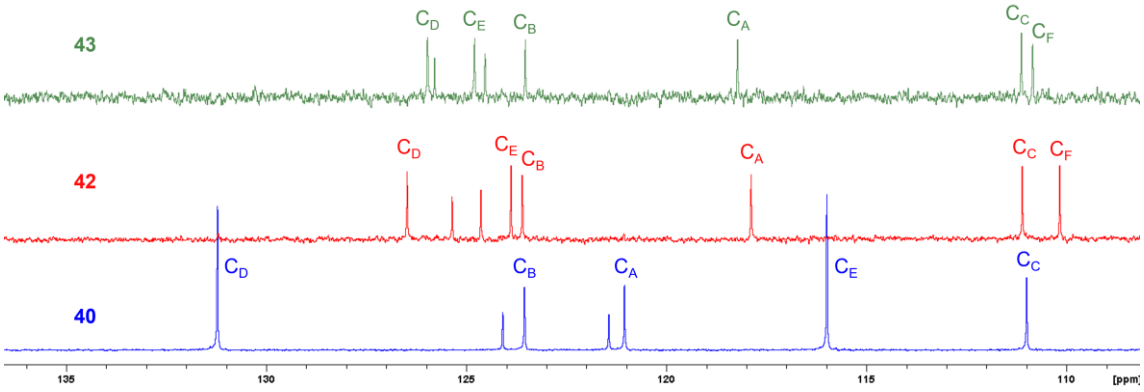


Figura A5.28. Comparación de la región aromática de los espectros de ^{13}C-RMN del proligando **40** y los complejos **42** y **43**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 151 MHz.

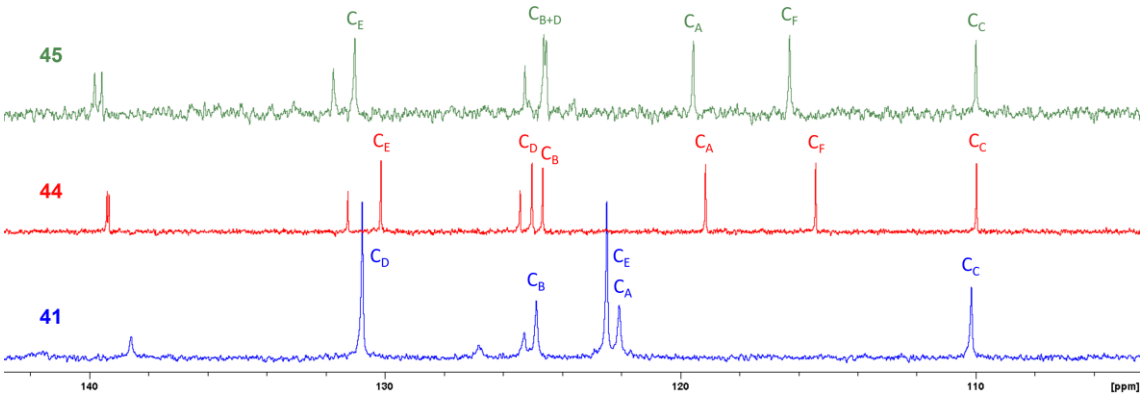


Figura A5.29. Comparación de la región aromática de los espectros de ^{13}C-RMN del proligando **41** y los complejos **44** y **45**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 151 MHz.

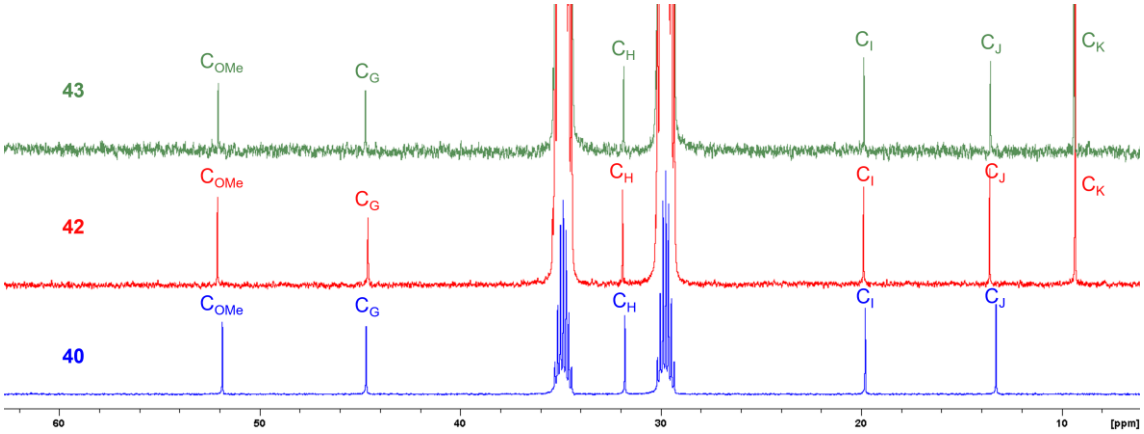


Figura A5.30. Comparación de la región alifática de los espectros de ^{13}C-RMN del proligando **40** y los complejos **42** y **43**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 151 MHz.

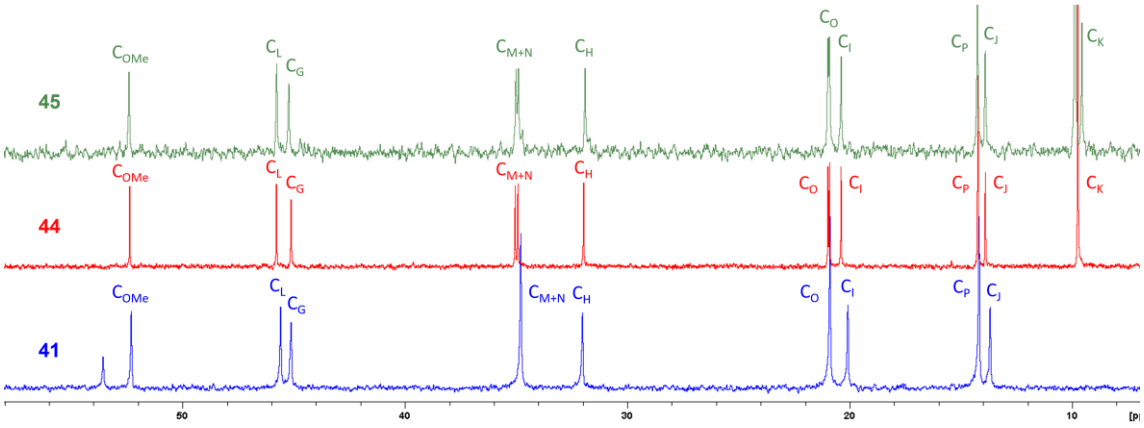


Figura A5.31. Comparación de la región alifática de los espectros de ^{13}C-RMN del proligando **41** y los complejos **44** y **45**, registrados en DMF-d_7 a t.a., 151 MHz.

2. Espectrometría de masas

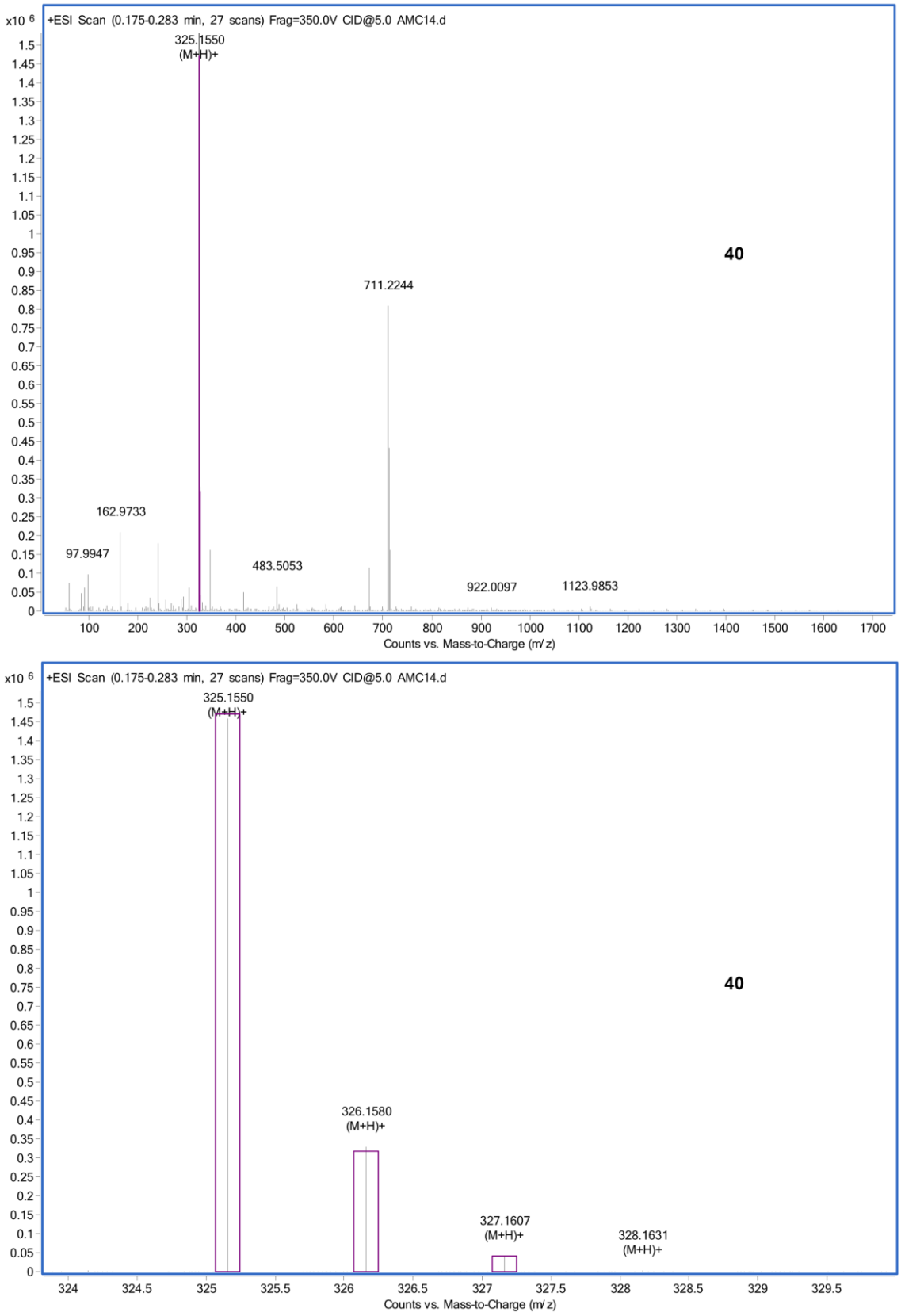


Figura A5.32. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **40** en DMF.

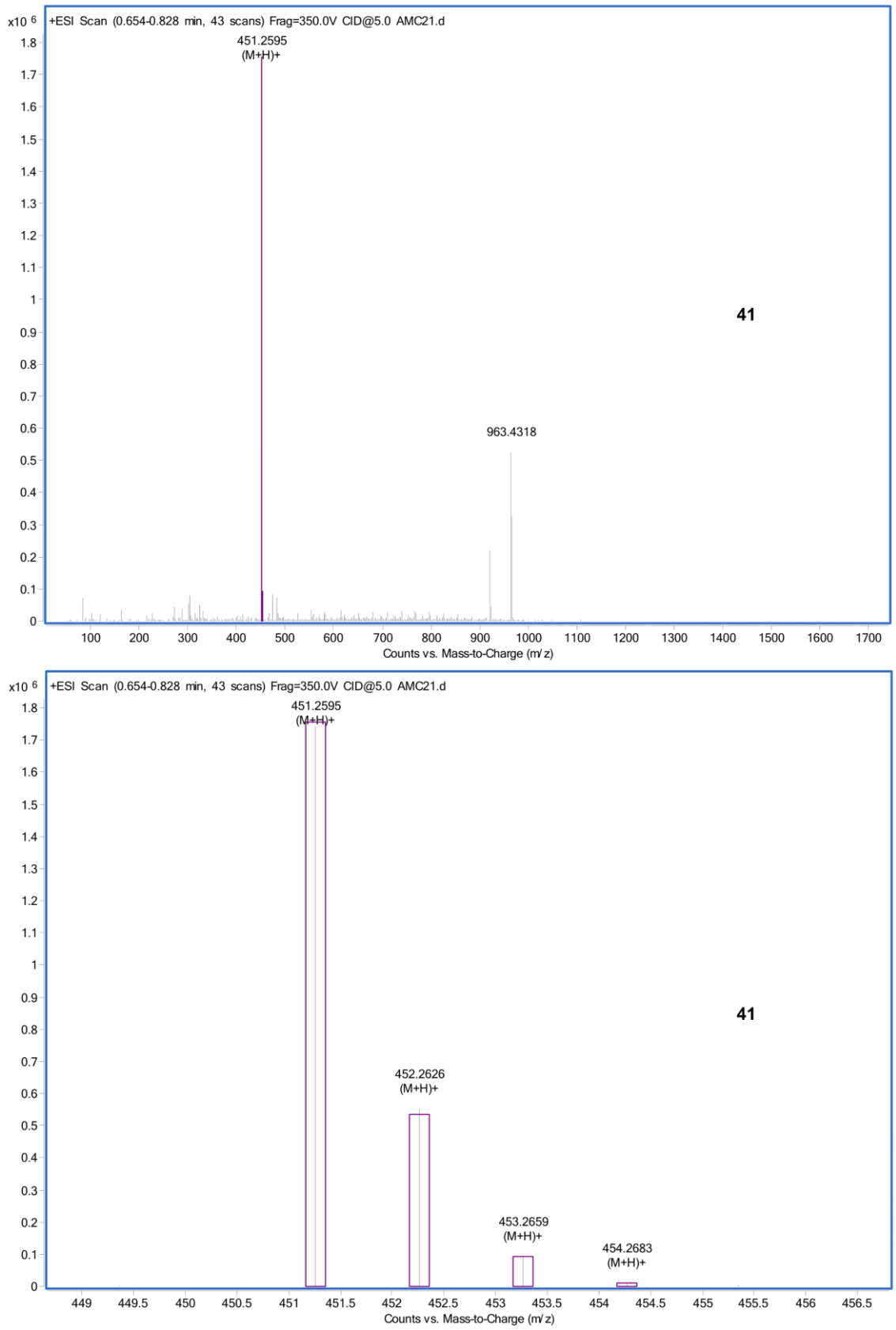


Figura A5.33. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **41** en DMF.

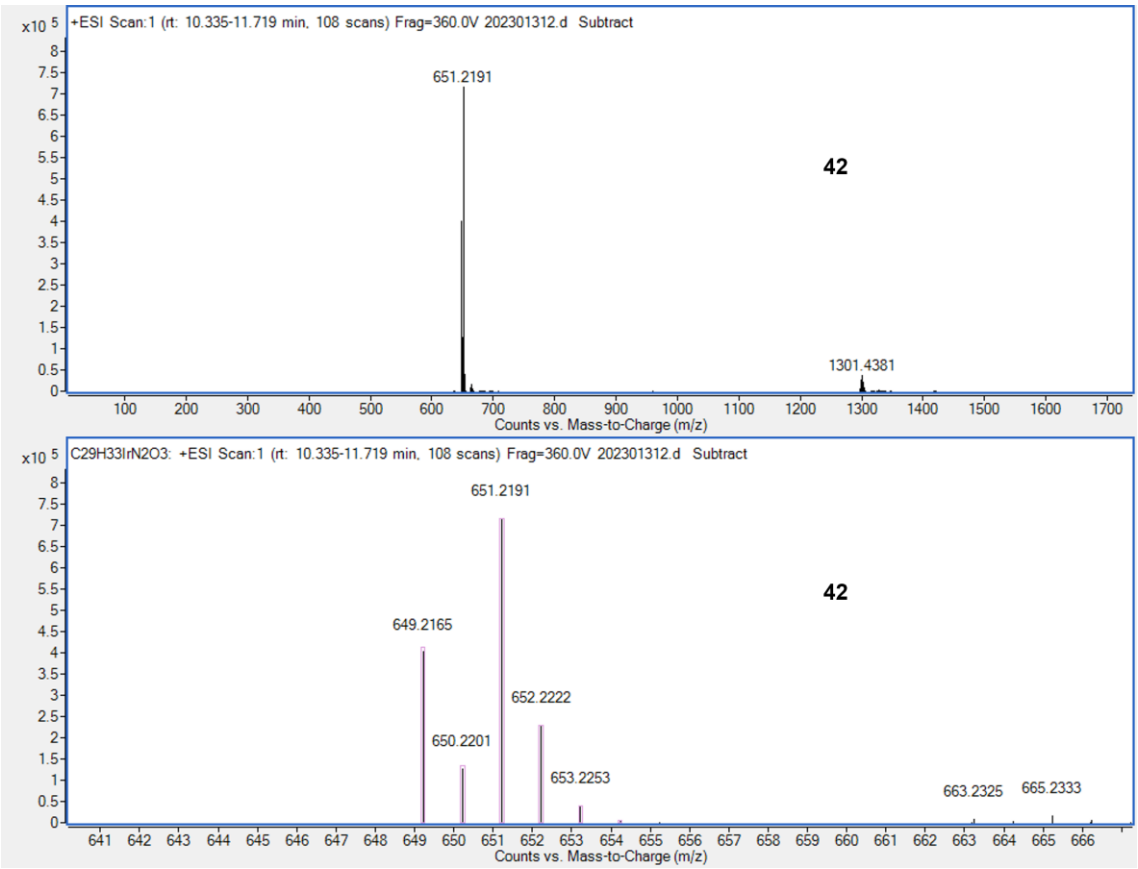


Figura A5.34. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **42** en DMF.

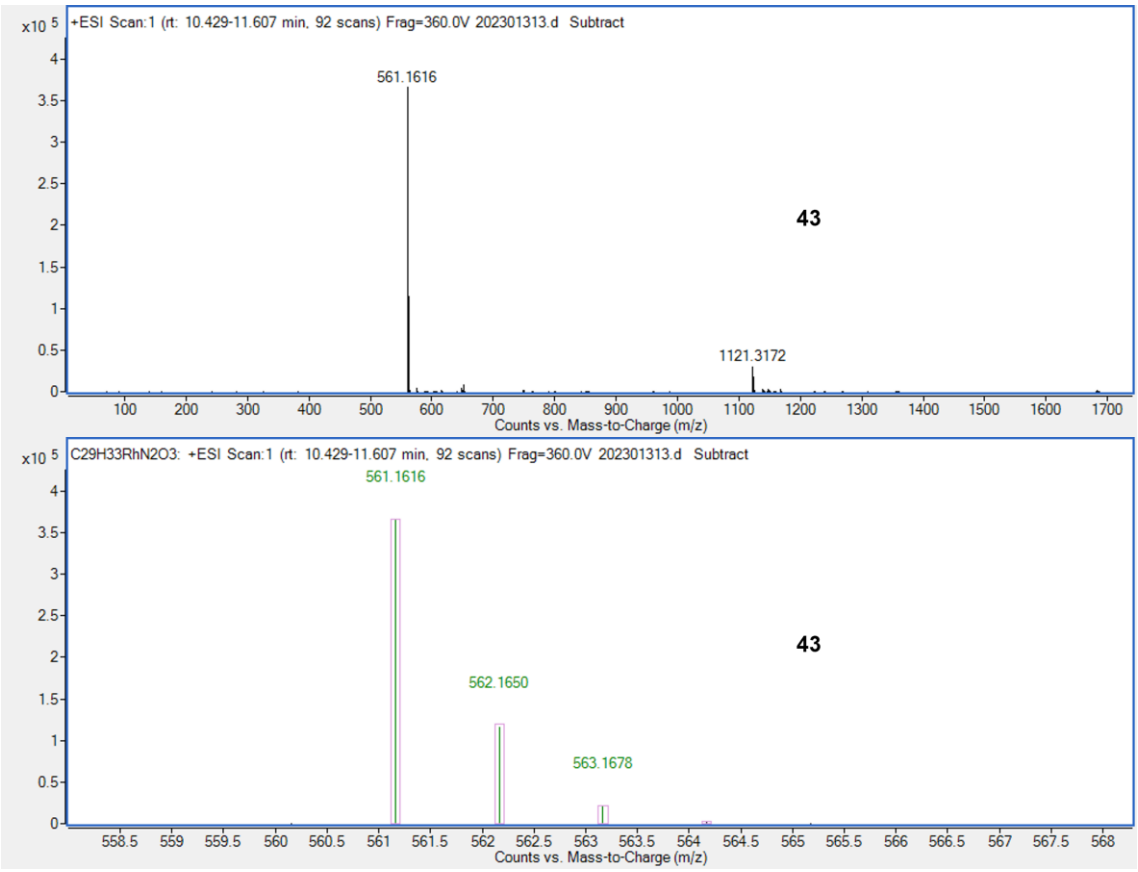


Figura A5.35. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **43** en DMF.

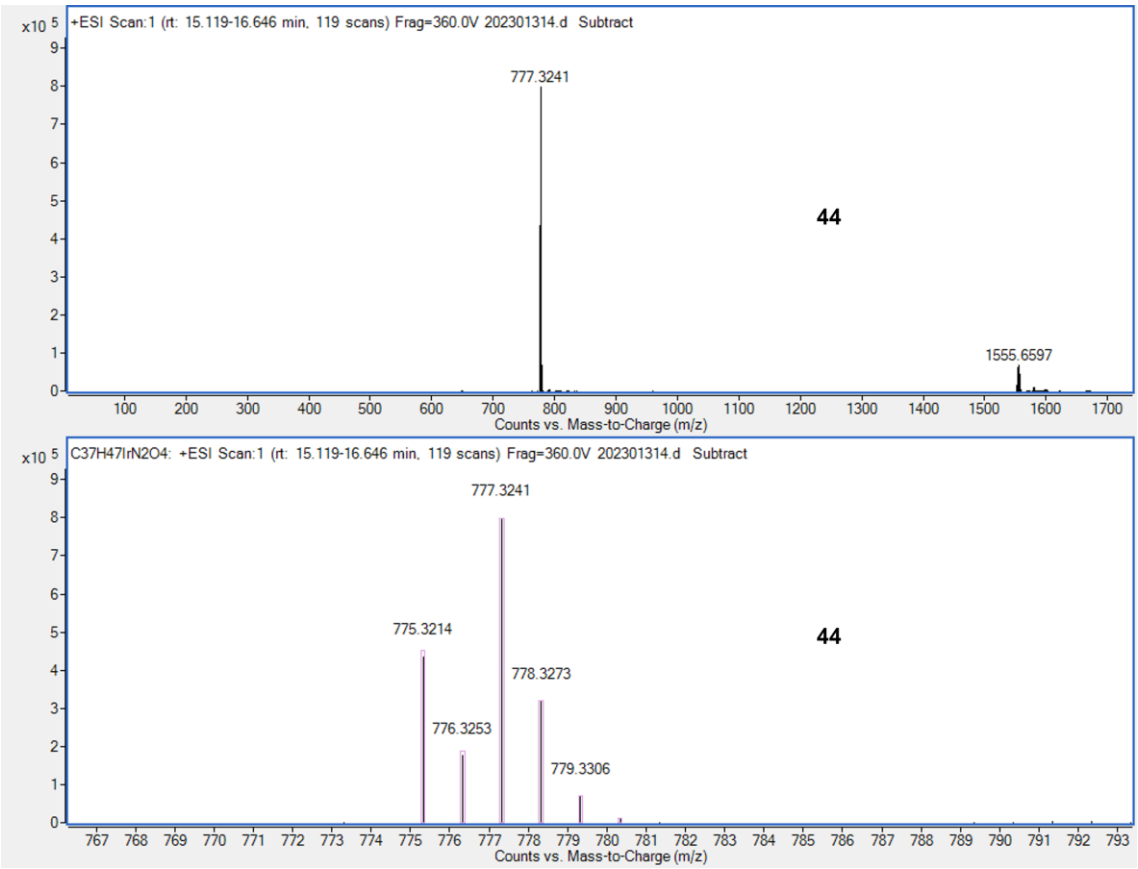


Figura A5.36. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **44** en DMF.

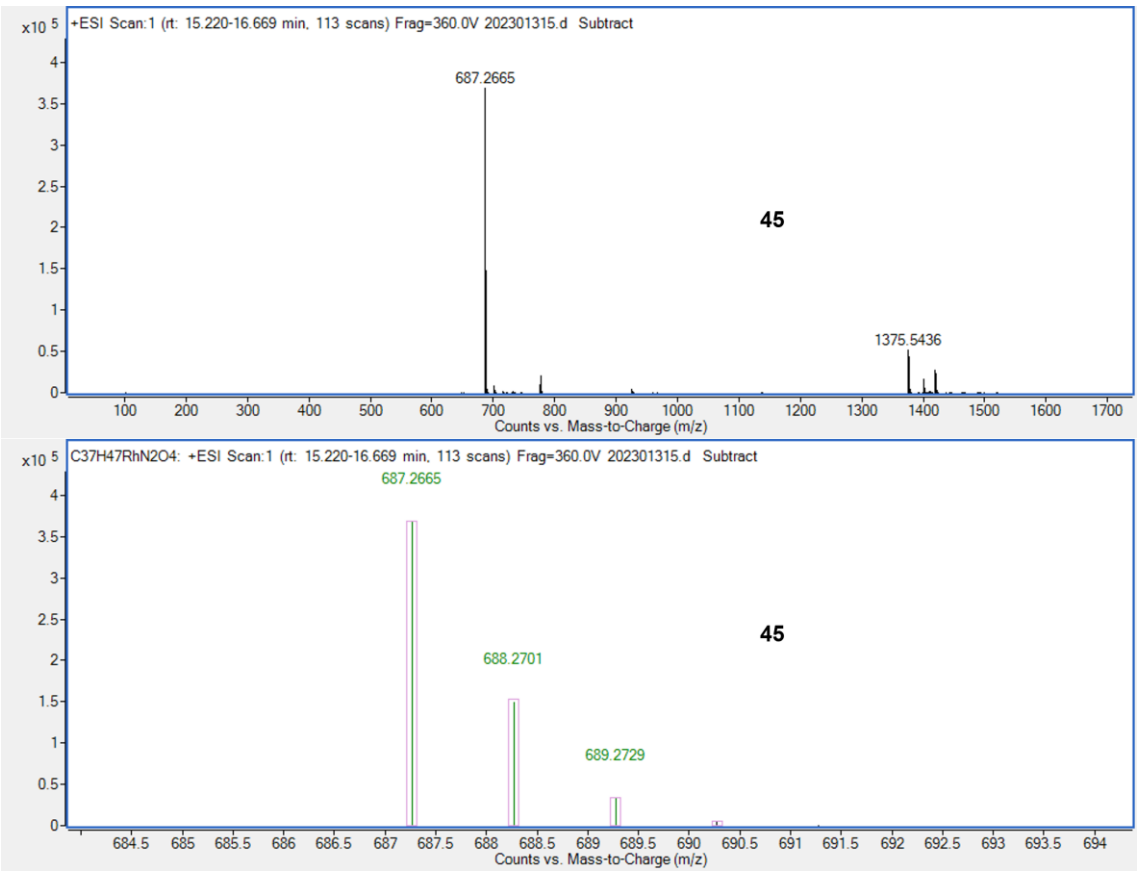


Figura A5.37. Espectro ESI-MS modo ion. positiva del compuesto **45** en DMF.

3. Estructura cristalina

Tabla A5.1. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura para AMC_23_0msp_a.

Código de identificación	AMC_23_0msp_a	
Fórmula empírica	C37 H48 Cl N2 O4 Rh	
Masa fórmula	723,13	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	a = 10,8394(5) Å	α= 105,159(2)°
	b = 11,3065(6) Å	β= 94,760(2)°
	c = 14,4856(7) Å	γ = 90,872(2)°
Volumen	1706.35(15) $Å^3$	
Z	2	
Densidad (calculada)	1,407 Mg/m^3	
Coeficiente de absorción	0,620 mm^{-1}	
F(000)	756	
Tamaño cristal	0,240 x 0,220 x 0,090 mm^3	
Rango de Theta para la toma de datos	1,867 a 30,619°	
Rangos del índice	-15<=h<=15, -16<=k<=16, -20<=l<=20	
Reflexiones realizadas	154428	
Reflexiones independientes	10495 [R(int) = 0,0316]	
Integridad de Theta = 25,242°	100,0 %	
Corrección absorción	Semiempírica de equivalentes	
Máx. y mín. transmisión	0,746 and 0,6997	
Método de refinamiento	Matriz de mínimos cuadrados completa F^2	
Datos / restricciones / parámetros	10495 / 0 / 415	
Buen de ajuste F^2	1,219	
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0260, wR2 = 0,0561	
R índices (todos los datos)	R1 = 0,0311, wR2 = 0,0612	
Mayor diferencia pico-hueco	1,298 y -0,638 $e.Å^{-3}$	

4. Estudios de estabilidad

4.1. Estabilidad en DMF

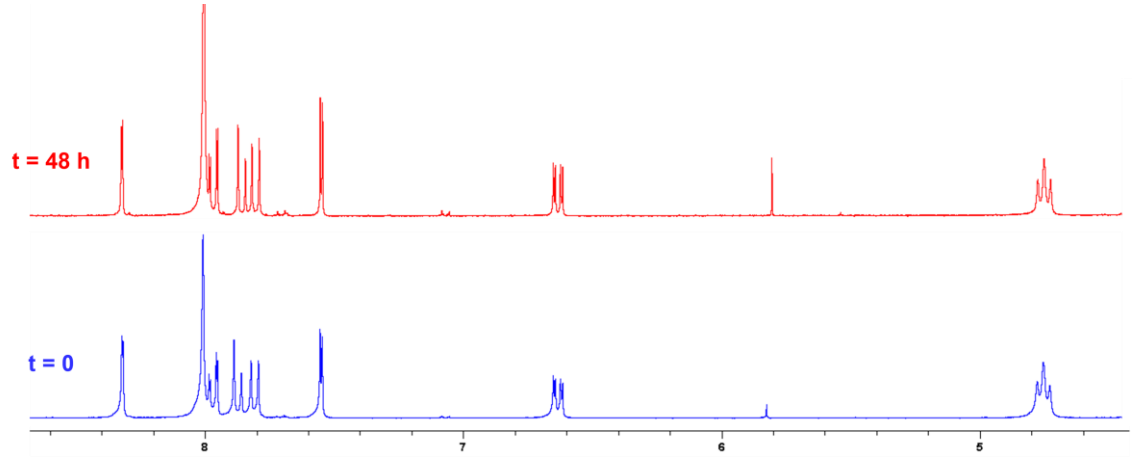


Figura A5.38. Estudio de estabilidad del complejo **42** en DMF-d_7 por ^{1}H-RMN a t=0 y 48 h a t.a., 400 MHz.

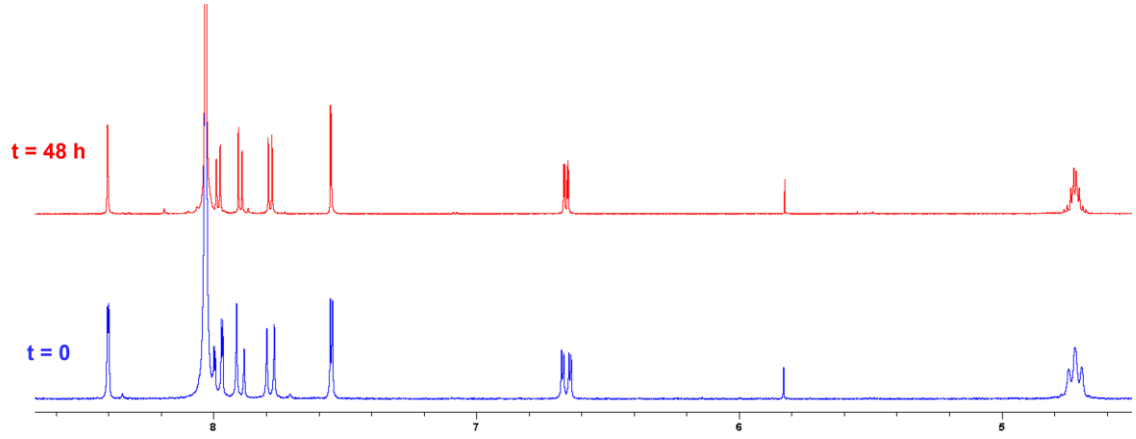


Figura A5.39. Estudio de estabilidad del complejo **43** en DMF-d_7 por ^{1}H-RMN a t=0 y 48 h a t.a., 400 MHz.

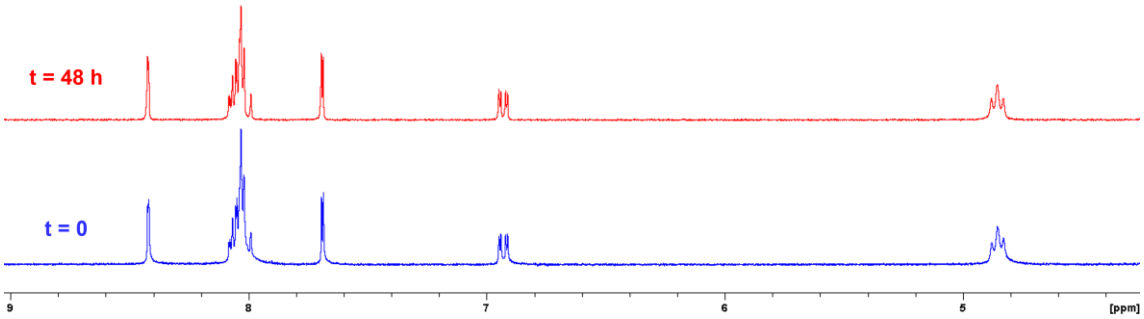


Figura A5.40. Estudio de estabilidad del complejo **44** en DMF-d_7 por ^{1}H-RMN a t=0 y 48 h a t.a., 400 MHz.

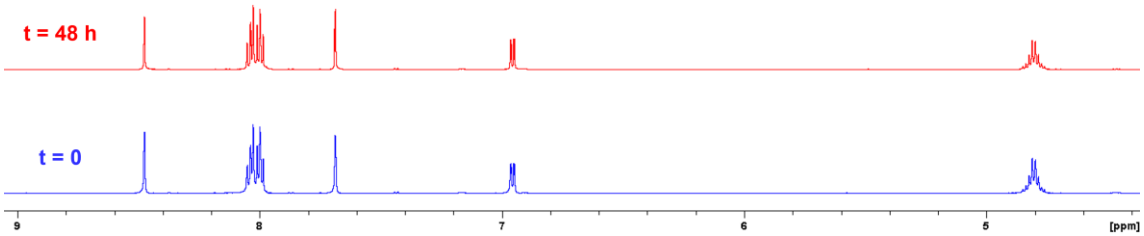


Figura A5.41. Estudio de estabilidad del complejo **45** en DMF-d_7 por ^{1}H-RMN a t=0 y 48 h a t.a., 400 MHz.