



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Complejos organometálicos de Ru(II), Os(II) e
Ir(III) como potenciales agentes anticancerígenos
en quimioterapia y terapia fotodinámica*

AUTORA

Alba Hernández García

DIRECTORES

José Ruiz López

María Dolores Santana Lario

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Complejos organometálicos de Ru(II), Os(II) e
Ir(III) como potenciales agentes anticancerígenos
en quimioterapia y terapia fotodinámica*

AUTORA Alba Hernández García

DIRECTORES José Ruiz López
María Dolores Santana Lario

2025



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

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D^a. Alba Hernández García, habiendo cursado el Programa de Doctorado Química Básica y Aplicada de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Complejos organometálicos de Ru(II), Os(II) e Ir(III) como potenciales agentes anticancerígenos en quimioterapia y terapia fotodinámica

y dirigida por:

D.: José Ruiz López

D^a.: María Dolores Santana Lario

D.:

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.

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.

Murcia, a 05 de diciembre de 2024

(firma)

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

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

Código seguro de verificación: RUxFMt1D-DrRm3Pyy-F6hrMPMp-GVsVvqP9

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 marca el final a cuatro intensos años de esfuerzo, dedicación y sacrificio. Pero, sobre todo, ha sido un periodo de inmenso crecimiento personal y profesional. Me siento muy feliz de haber podido contribuir a la lucha contra esta enfermedad; una enfermedad que, cuando entra en tu casa, lo pone todo patas arriba y te hace ver la vida de otra manera. Quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado a lo largo de estos cuatro años. Gracias por escucharme, por ayudarme, y por quererme y valorarme como lo habéis hecho.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. José Ruiz López y a la Dra. María Dolores Santana Lario. Gracias, Pepe, por la confianza que siempre has depositado en mí, por el cariño de todos estos años y por abrirme las puertas de este maravilloso grupo, que elegiría una y mil veces más. Gracias Loes, por todo lo que has hecho por mí a lo largo de estos años, porque tu despacho siempre fue para mí un lugar seguro al que acudir. Por escuchar cada palabra, por tus consejos y ánimos y, sobre todo, por tu apoyo tanto a nivel personal como profesional. Todo lo que he logrado estos años ha sido gracias a vosotros y os estaré eternamente agradecida.

A los demás profesores del grupo de investigación: Natalia, Venancio, Concha y Consuelo. Por vuestra cercanía, por preocuparos tanto por mí, especialmente en los últimos meses y, sobre todo, por haberme hecho sentir siempre como en casa. Os echaré mucho de menos.

A los colaboradores de otros grupos de investigación que han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral: el Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa, la Dra. Delia Bautista del SAI de la Universidad de Murcia y el Prof. Dr. Vicente Marchán de la Universidad de Barcelona.

Al personal del Servicio Universitario de Instrumentación Científica y de Biología Molecular de la Universidad de Murcia, en especial a Diego Martínez y a Alejandro Torrecillas. Gracias por vuestra amabilidad, paciencia, cercanía, y constante predisposición para ayudarme siempre que lo he necesitado.

Reconocer a la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia por la financiación recibida para mis estudios de Doctorado, a través de la concesión de un contrato FPI 21426/FPI/20. También agradecer 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).

A mis compañeros de laboratorio: Fran, Pezhman, Marta, Ilona, María José, Enrique, Lorena, Rebeca y, en especial, a Antonio, Alicia e Isa, porque sois los pilares fundamentales de mi tesis. A Antonio por tu generosidad, por ser la persona más servicial y atenta del mundo, y por la amistad que me has regalado estos nueve años. A Alicia, por ser la mejor compañera de tesis que podría haber imaginado, por todos los buenos momentos que hemos compartido y por hablarnos con la mirada. No sé qué habríamos hecho la una sin la otra. A mi Isa, por aparecer en los últimos años de mi tesis, por tus abrazos, tu lealtad y por hacerme sentir siempre tan especial. Tú también lo eres para mí.

A María y Paco, por acogerme en vuestro grupo como una más desde el primer día, por dejarme disfrutar de vuestra amistad, que estoy segura que será por muchos años más. Al resto de compañeros del departamento, por las risas, el apoyo y el cariño. A mis compañeras de piso y a Juanito por escucharme cuando lo he necesitado.

A Sara y Ana, porque sois de lo mejor que me llevo de estos años. Por nuestros miércoles de Leyendas, por escuchar, por vuestros consejos y por vuestra honestidad. Espero poder seguir disfrutando de vuestra amistad durante muchos años más y que celebremos juntas cada uno de nuestros logros.

A mis amigas de toda la vida, porque sois la clara definición de amistad. Gracias por estar siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, por vuestra sinceridad, por escuchar sin juzgar, por ser mi refugio seguro y por celebrar mis logros como si fueran vuestros.

A mi familia, en especial a mis abuelos María y Juan. No tengo palabras suficientes para expresar lo importantes que sois para mí. Gracias por cuidarnos como lo habéis hecho, por estar tan orgullosos de mí y, sobre todo, gracias por quererme tanto como os quiero yo a vosotros.

A mis padres, por vuestro amor incondicional, por educarme en el amor y el respeto, y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles. Gracias por enseñarme el valor del trabajo duro y la perseverancia, por ser mis referentes y por enseñarme que, aunque la vida te ponga mil obstáculos en el camino, los superaremos juntos. A mi hermana, por enseñarme que, a pesar de las dificultades que te ponga la vida, puedes llegar a donde quieras si te lo propones. Este logro es tanto vuestro como mío, porque todo lo que soy es gracias a vosotros.

Soy muy afortunada de teneros, gracias de corazón.

A mis abuelos, María y Juan

A mis padres

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Abreviaturas	VII
Tabla de compuestos	XI
Capítulo 1: Introducción y objetivos	1
1.1. El cáncer en la actualidad.....	3
1.2. Quimioterapia	5
1.2.1. Primeros compuestos de platino.....	5
1.2.2. Primeros compuestos de rutenio como agentes quimioterapéuticos.....	8
1.2.3. Primeros complejos semi-sándwich de Ru(II) para el tratamiento del cáncer.....	10
1.2.4. Compuestos semi-sándwich de Os(II) para quimioterapia	12
1.2.5. Complejos octaédricos ciclometalados de Ru(II) y Os(II) para quimioterapia.....	14
1.3. Terapia fotodinámica	16
1.3.1. Primeros fotosensibilizadores en terapia fotodinámica	20
1.3.2. Compuestos de rutenio en terapia fotodinámica	22
1.3.3. Compuestos de iridio en terapia fotodinámica	26
1.3.4. Nanotransportadores y sistemas de autoentrega de fármacos	28
1.4. Objetivos	28
1.5. Bibliografía	30
Capítulo 2: Areno-complejos de Os(II) con ligandos derivados de 2-(1-(aril)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol efectivos frente a células madre de rhabdomyosarcoma	41
2.1. Introducción	43
2.2. Resultados y discusión	44
2.2.1. Síntesis de los nuevos compuestos.....	44
2.2.2. Caracterización de los nuevos complejos de osmio.....	45
2.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X.....	48
2.2.4. Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos.....	52
2.2.5. Estudios de estabilidad e hidrólisis de los compuestos preparados	54

2.2.6. Interacción con la seroalbúmina.....	57
2.3. Propiedades biológicas.....	62
2.3.1. Viabilidad celular.....	62
2.3.2. Acumulación celular.....	63
2.3.3. Localización celular.....	64
2.3.4. Potencial de membrana mitocondrial	66
2.3.5. Detección de la muerte celular.....	66
2.3.6. Generación de ROS.....	67
2.3.7. Efecto en el ciclo celular	68
2.3.8. Efecto antiproliferativo en esferoides RD.CD133- y RD.CD133+	69
2.4. Resumen.....	71
2.5. Bibliografía	71
Capítulo 3: Complejos ciclometalados de Os(II) con actividad antiproliferativa alteran la homeostasis del calcio en células cancerosas	75
3.1. Introducción.....	77
3.2. Resultados y discusión.....	78
3.2.1. Síntesis y caracterización de los proligandos.....	78
3.2.2. Síntesis de los complejos de Os(II).....	80
3.2.3. Caracterización de los nuevos complejos	82
3.2.4. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X	83
3.2.5. Espectroscopía de absorción UV/Vis	85
3.2.6. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad.....	87
3.2.7. Interacción con la seroalbúmina.....	88
3.3. Estudios biológicos.....	90
3.3.1. Viabilidad celular.....	91
3.3.2. Efecto antiproliferativo de los complejos en cultivos celulares 3D	93
3.3.3. Determinación de las especies reactivas de oxígeno intracelulares	93
3.3.4. Efecto sobre la hemostasis del calcio	94

3.3.5. Pruebas de fototoxicidad	97
3.4. Resumen	98
3.5. Bibliografía	99
Capítulo 4: Complejos octaédricos ciclometalados de Ru(II): fotosensibilizadores que desencadenan el daño de las membranas celulares y la oncosis en células cancerosas	103
4.1. Introducción	105
4.2. Resultados y discusión	106
4.2.1. Síntesis de los complejos de Ru(II).....	106
4.2.2. Caracterización de los nuevos complejos	107
4.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X...	109
4.2.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis	111
4.2.5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	112
4.2.6. Interacción con la seroalbúmina	113
4.2.7. Determinación de la generación de ROS en medios libres de células	116
4.3. Estudios biológicos	119
4.3.1. Viabilidad celular	119
4.3.2. Acumulación y distribución intracelular	121
4.3.3. Generación de ROS y estrés oxidativo	121
4.3.4. Evaluación morfológica.....	122
4.3.5. Mecanismo de muerte celular.....	124
4.3.6. Análisis de tinción TMRE y determinación de calcio intracelular	125
4.3.7. Estudios del mecanismo de permeabilización de la membrana	126
4.3.8. Estudios de la interacción de los compuestos con proteínas	127
4.4. Resumen	128
4.5. Bibliografía	128
Capítulo 5: Complejos ciclometalados de Ir(III) con ligandos derivados de 2-(5-ariltiofen-2-il)benzazol fototóxicos en células cancerosas por daño lisosomal y oncosis	133

5.1.	Introducción.....	135
5.2.	Resultados y discusión.....	136
5.2.1.	Síntesis y caracterización de los nuevos proligandos.....	136
5.2.2.	Síntesis de los complejos de Ir(III)	140
5.2.3.	Caracterización de los nuevos compuestos	141
5.2.4.	Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X ..	143
5.2.5.	Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos	147
5.2.6.	Estudios de estabilidad y fotoestabilidad.....	150
5.2.7.	Estudios del mecanismo de PDT en medio libre de células	152
5.3.	Propiedades biológicas.....	157
5.3.1.	Viabilidad celular.....	158
5.3.2.	Acumulación intracelular	159
5.3.3.	Producción intracelular de ROS	162
5.3.4.	Mecanismo de muerte celular	160
5.3.5.	Morfología celular y activación de la caspasa-3	162
5.3.6.	Expresión de porimina y permeabilidad de la membrana plasmática	163
5.3.7.	Distribución intracelular.....	164
5.3.8.	Efecto sobre los esferoides 3D	167
5.4.	Resumen.....	169
5.5.	Bibliografía	170
Capítulo 6: Complejos ciclometalados de Ir(III) con una diimina funcionalizada con un fragmento de cumarina: estudio de su potencial aplicación como fotosensibilizadores.....		175
6.1.	Introducción.....	177
6.2.	Resultados y discusión.....	179
6.2.1.	Síntesis de los complejos de Ir(III)	179
6.2.2.	Caracterización de los nuevos complejos	181
6.2.3.	Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos	182
6.2.4.	Estudios de estabilidad y fotoestabilidad.....	187

6.2.5. Estudios del mecanismo de PDT en medio libre de células	188
6.3. Estudios biológicos	194
6.3.1. Viabilidad celular	194
6.3.2. Acumulación intracelular.....	196
6.4. Resumen	197
6.5. Bibliografía	197
Capítulo 7: Conclusiones	201
Sección experimental	207
1. Materiales y reactivos	209
2. Síntesis	209
2.1. Capítulo 2.....	209
2.2. Capítulo 3.....	213
2.3. Capítulo 4.....	217
2.4. Capítulo 5.....	220
2.5. Capítulo 6.....	224
3. Instrumentación y técnicas espectroscópicas.....	228
3.1. Resonancia magnética nuclear.....	228
3.2. Análisis elemental.....	228
3.3. Espectrometría de masas.....	228
3.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis.....	229
3.5. Espectroscopía de emisión, rendimientos cuánticos de emisión y tiempos de vida media	229
3.6. Fuente de irradiación de luz.....	229
3.7. Microondas.....	229
4. Toma de datos de difracción de rayos X de monocristal y refinamiento de las estructuras cristalinas	229
4.1. Capítulo 2.....	230
4.2. Capítulo 3.....	230
4.3. Capítulo 4.....	230

4.4.	Capítulo 5	230
5.	Ensayos en medios libres de células	231
5.1.	Medidas de estabilidad y fotoestabilidad	231
5.2.	Hidrólisis por RMN	231
5.3.	Interacción con la HSA.....	232
5.4.	Fotooxidación del NADH.....	233
5.5.	Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete	234
5.6.	Estudio de generación de radicales hidroxilo	234
6.	Experimentos biológicos <i>in vitro</i> (Colaboración con el Prof. Dr. V. Brabec)	234
6.1.	Capítulo 2	234
6.2.	Capítulo 3	237
6.3.	Capítulo 4	241
6.4.	Capítulo 5	245
6.5.	Capítulo 6	249
7.	Bibliografía	250

ANEXOS

Anexo I	A1
Anexo II	A35
Anexo III	A61
Anexo IV	A89
Anexo V	A123

LISTADO DE ABREVIATURAS

4T1-luc2	Línea celular de mama que expresa la enzima luciferasa
A2780cis	Línea celular de cáncer de ovario resistente al cisplatino
A375	Línea celular de melanoma
ACQ	Extinción causada por agregación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIE	Emisión inducida por agregación
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Bip	Proteína de unión a la inmunoglobulina
bpy	2,2'-bipiridina
CDDP	Cisplatino
CF	Ciclofosfamida
Cg	Centroide del anillo
CHOP	Proteína Homóloga a C/EBP
COSY	Espectroscopía de correlación
Cp	Capacidad calorífica específica
CSC	Células madre cancerosas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diclorometano
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DE	Desviación estándar
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
dppn	benzo[i]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dppz	dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina

dpq	dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG2000	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EBSS	Solución salina equilibrada de Earle
Ero1-Lα	Enzima oxidoreductasa 1 Alfa del Retículo Endoplasmático
ESI-MS	Espectrometría de masas por ionización por electrospray
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonilcianuro- <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HCT116	Línea celular de cáncer de colon humano
HeLa	Línea celular de cáncer cervical humano
HMLER	Células epiteliales lumbinales mamarias humanas
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
HSA	Albúmina sérica humana
HSQC	Coherencia cuántica simple heteronuclear
hTERT	Células primarias humanas inmortalizadas mediante la expresión de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICT	Transferencia de carga intramolecular
INE	Instituto Nacional de Estadística
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
IR	Infrarrojo
IRE1α	Enzima 1 Requerida por Inositol Alfa

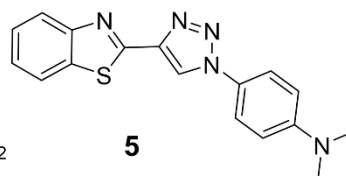
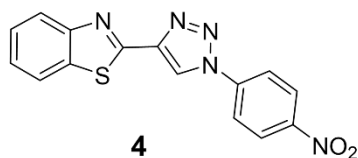
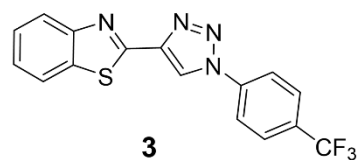
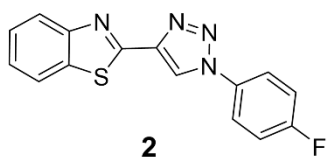
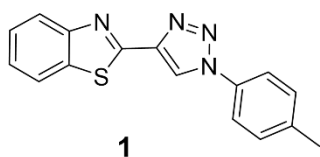
ISC	Cruce entre sistemas
LLCT	Transferencia de carga ligando-ligando
m/z	Relación masa-carga
MCF7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama triple negativo
MLCT	Transferencia de carga metal-ligando
MRC5	Línea celular de fibroblastos de pulmón sano
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
MW	Microondas
NAD⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido en su forma reducida
NIR	Infrarrojo cercano
NMSC	Cáncer de piel no melanoma
NOESY	Espectroscopía del Efecto Nuclear Overhauser
NSCLC	Línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas
OE33	Línea celular de cáncer de esófago
OMS	Organización mundial de la salud
OSCC	Carcinoma oral de células escamosas
PACT	Quimioterapia fotoactivada
Pbpn	4,9,16-triazadibenzo[a,c]naftaceno
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata humano
PDT	Terapia fotodinámica
phen	Fenantrolina
PI	Índice de fototoxicidad
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PNT1A	Células epiteliales de próstata sanas

PpIX	Protoporfirina IX
ppm	Partes por millón
ppy	Fenilpiridina
PS	Fotosensibilizador
PSN1	Línea celular de adenocarcinoma pancreático humano
PTA	1,2,5-triaza-7-fosfaafamantano
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qRT-PCT	PCR cuantitativo de transcripción inversa
RD	Rabdomiosarcoma
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio de cultivo “Roswell Park Memorial Institute”
RT-112	Línea celular de carcinoma de vejiga urinaria humana
SAI	Servicio de apoyo a la investigación
SI	Índice de selectividad, IC_{50} (línea sana) / IC_{50} (línea tumoral)
SK-MEL-28	Línea celular de melanoma humano
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TMRE	Éster etílico tetrametilrodamina
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
t_R	Tiempo de retención
TOF	Frecuencia de recambio
UV/Vis	Ultravioleta visible

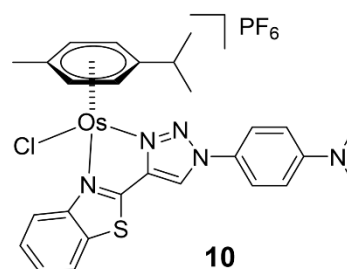
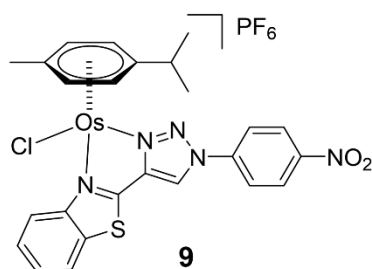
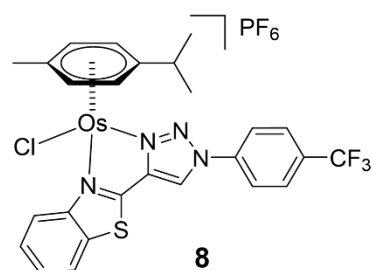
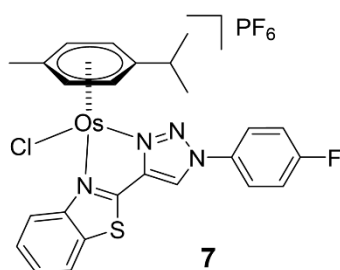
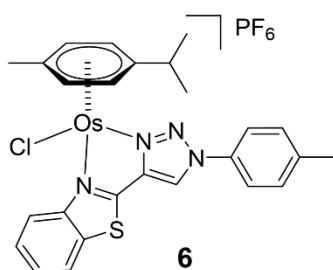
LISTADO DE COMPUESTOS

Capítulo 2

Ligandos N^N

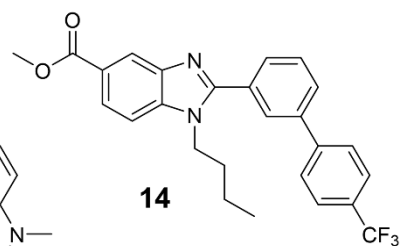
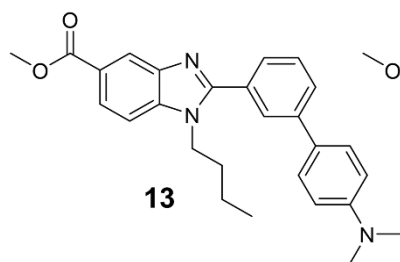
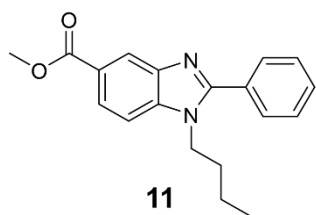


Areno complejos de Os(II)

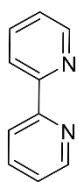


Capítulo 3

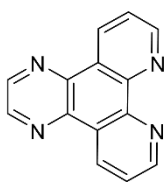
Proligandos HC^N



Ligandos N^N

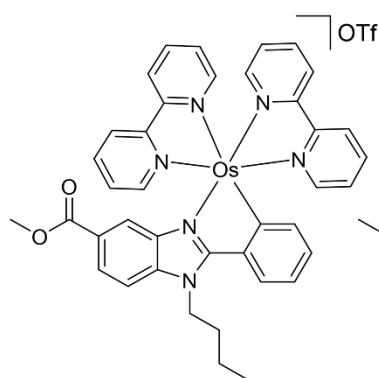


bpy

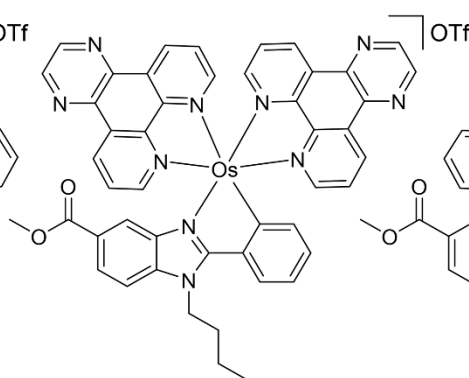


dpp

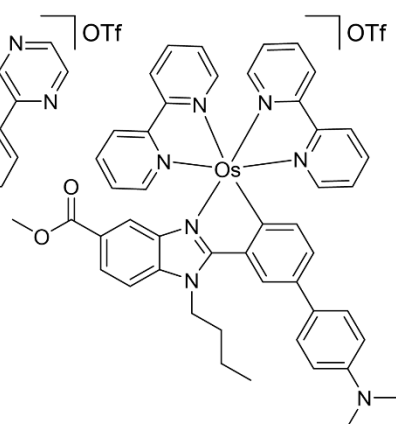
Complejos de Os(II)



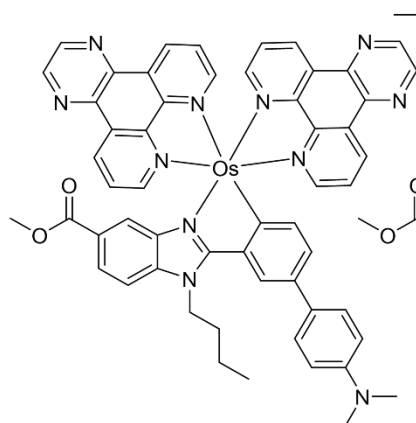
15



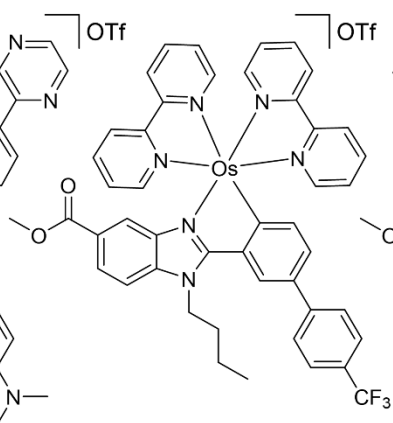
16



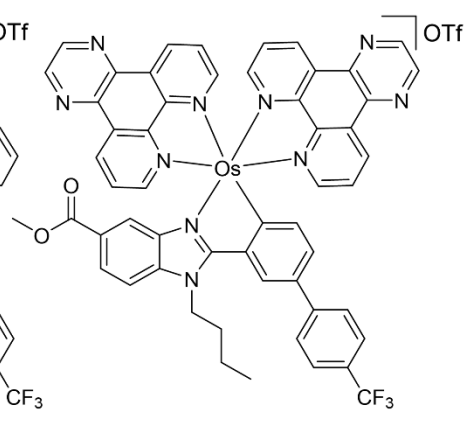
17



18



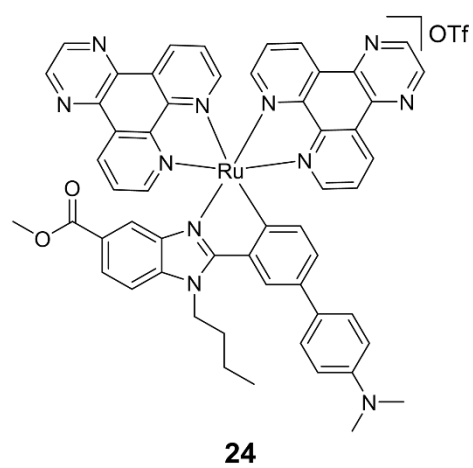
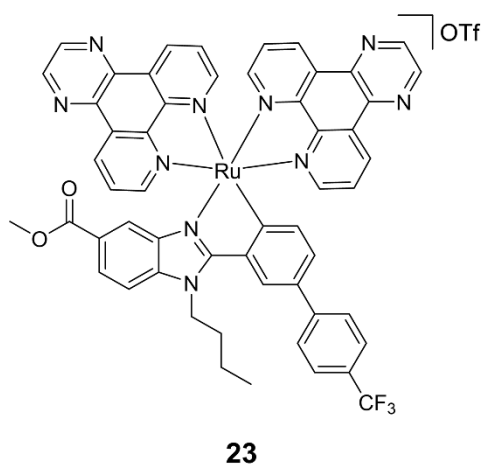
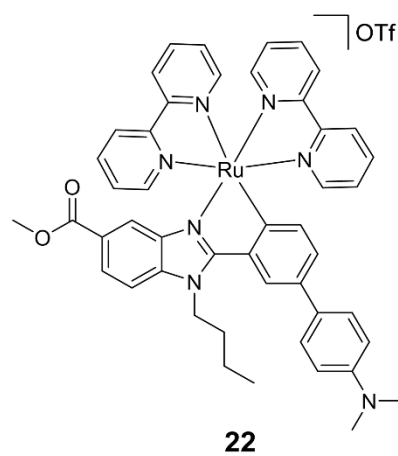
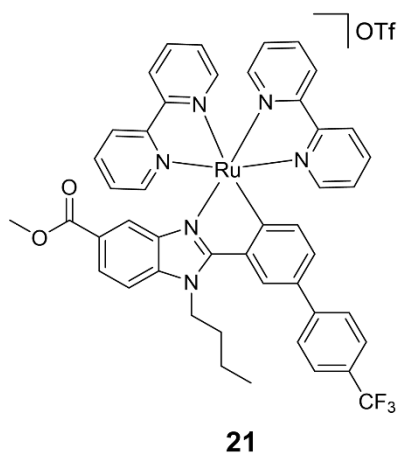
19



20

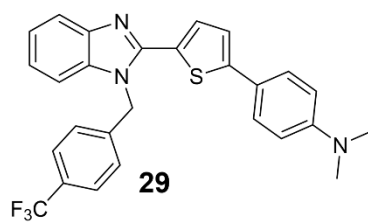
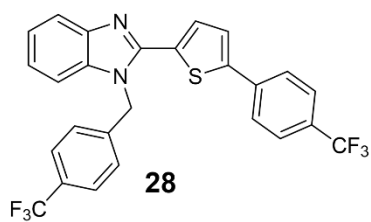
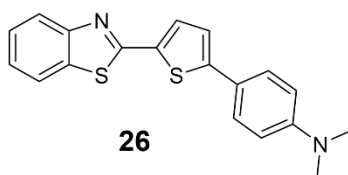
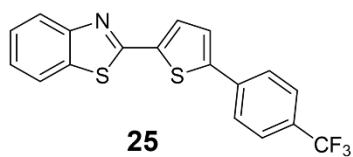
Capítulo 4

Complejos de Ru(II)

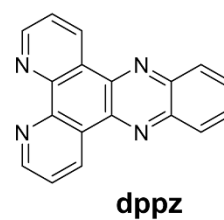


Capítulo 5

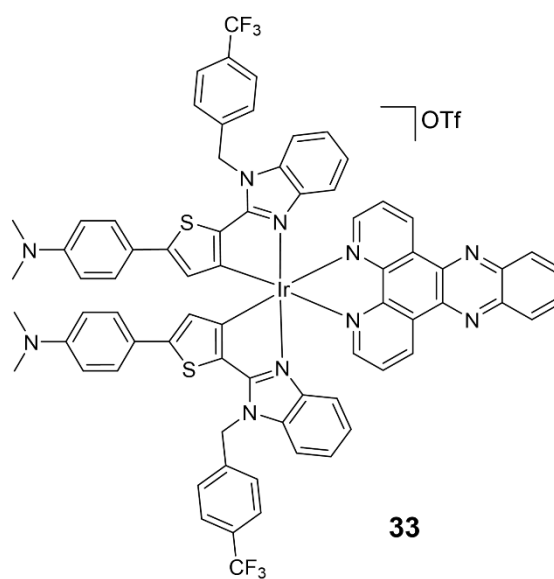
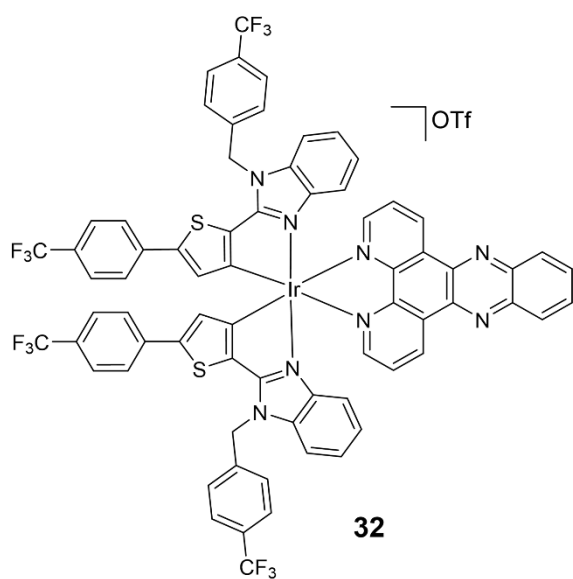
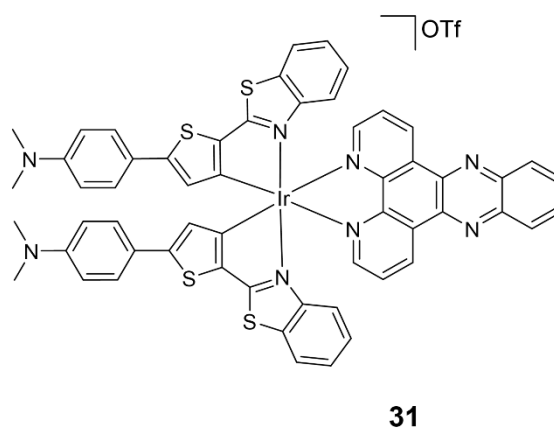
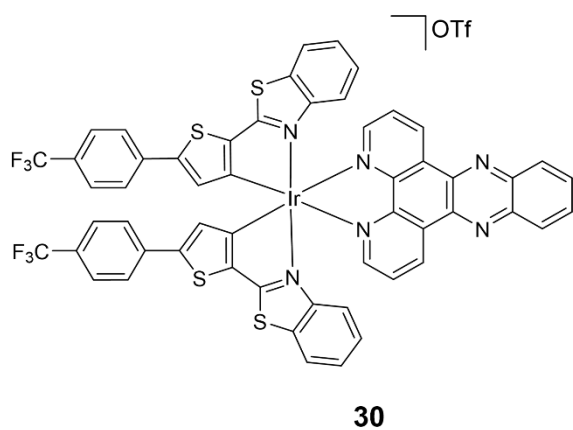
Proligandos HC^N



Ligando N^N

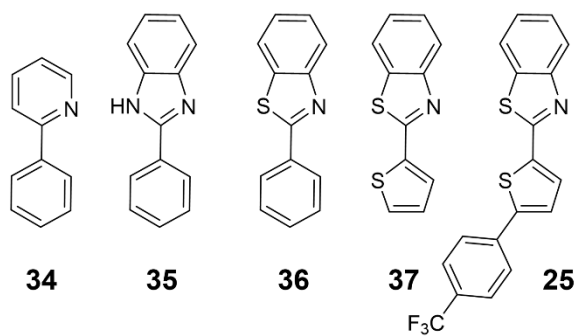


Complejos de Ir(III)

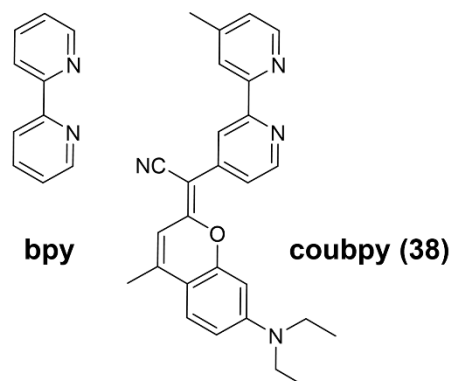


Capítulo 6

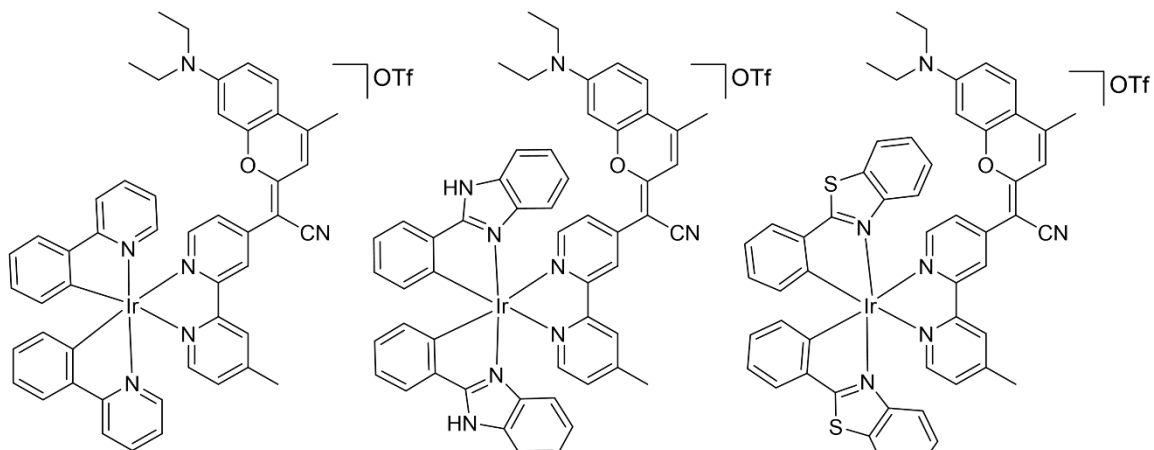
Proligandos HC^N



Ligandos N^N



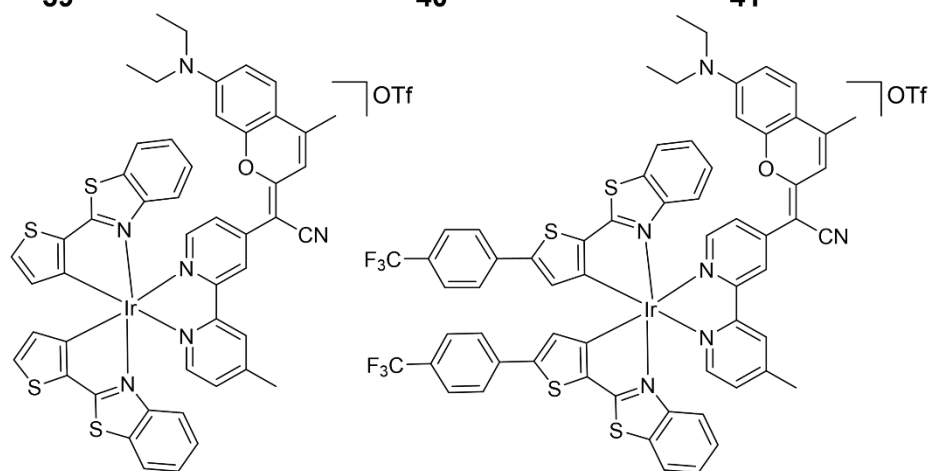
Complejos de Ir(III)



39

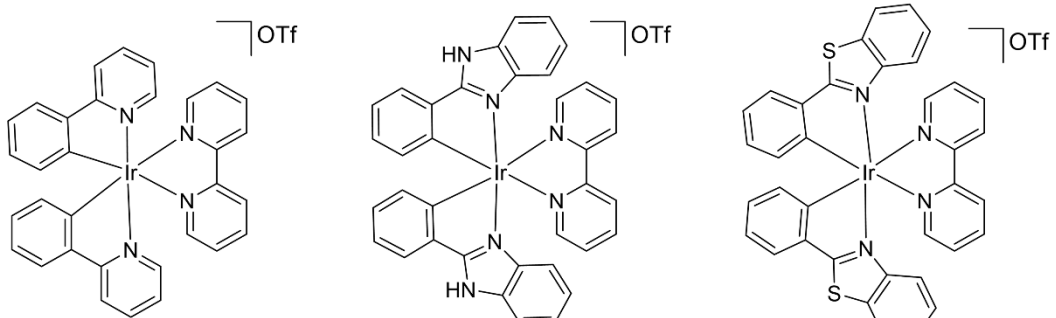
40

41



42

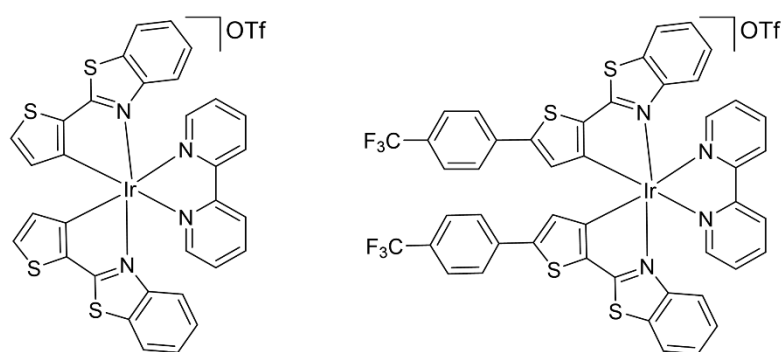
43



44

45

46



47

48

Capítulo 1

Introducción y objetivos

																18 VIIA 8A																													
2																																													
He Helium 4.003																																													
1 IA												2 IIA 2A																																	
H Hydrogen 1.008																																													
3 Li Lithium 6.941		4 Be Beryllium 9.012																																											
11 Na Sodium 22.990		12 Mg Magnesium 24.305																																											
19 K Potassium 39.099		20 Ca Calcium 40.078		3 IIIB 3B		4 IVB 4B		5 VB 5B		6 VIB 6B		7 VIIB 7B		8 VIII 8		9 VIII 9		10 VIII 10		11 IB 1B		12 IIB 2B		13 IIIA 3A		14 IVA 4A		15 VA 5A		16 VIA 6A		17 VIIA 7A		18 VIIA 8A											
21 Sc Scandium 44.956		22 Ti Titanium 47.867		23 V Vanadium 50.942		24 Cr Chromium 51.996		25 Mn Manganese 54.938		26 Fe Iron 55.845		27 Co Cobalt 58.933		28 Ni Nickel 58.693		29 Cu Copper 63.546		30 Zn Zinc 65.38		31 Al Aluminum 26.982		32 Si Silicon 28.086		33 P Phosphorus 30.974		34 S Sulfur 32.066		35 Cl Chlorine 35.453		36 Ar Argon 39.948															
37 Rb Rubidium 85.468		38 Sr Strontium 87.62		39 Y Yttrium 88.906		40 Zr Zirconium 91.224		41 Nb Niobium 92.906		42 Mo Molybdenum 95.95		43 Tc Technetium 98.907		44 Ru Ruthenium 98.906		45 Rh Rhodium 106.42		46 Pd Palladium 106.42		47 Ag Silver 107.868		48 Cd Cadmium 112.414		49 In Indium 114.818		50 Sn Tin 118.711		51 Sb Antimony 121.760		52 Te Tellurium 127.6		53 I Iodine 126.904		54 Xe Xenon 131.294											
55 Cs Cesium 132.905		56 Ba Barium 137.328		57-71 Lanthanide Series		72 Hf Hafnium 178.49		73 Ta Tantalum 180.948		74 W Tungsten 183.84		75 Re Rhenium 186.207		76 Os Osmium 190.23		77 Ir Iridium 192.22		78 Pt Platinum 195.085		79 Au Gold 196.967		80 Hg Mercury 200.592		81 Tl Thallium 204.383		82 Pb Lead 207.2		83 Bi Bismuth 208.980		84 Po Polonium 209		85 At Astatine 208.979		86 Rn Radon 222.0178											
87 Fr Francium 223.020		88 Ra Radium 226.025		89-103 Actinide Series		104 Rf Rutherfordium [261]		105 Db Dubnium [262]		106 Sg Seaborgium [266]		107 Bh Bohrium [264]		108 Hs Hassium [269]		109 Mt Meitnerium [278]		110 Ds Darmstadtium [281]		111 Rg Roentgenium [280]		112 Cn Copernicium [285]		113 Nh Nihonium [286]		114 Fl Flerovium [289]		115 Mc Moscovium [293]		116 Lv Livermorium [293]		117 Ts Tennessine [294]		118 Og Oganesson [294]											
57 La Lanthanum 138.905																		58 Ce Cerium 140.116		59 Pr Praseodymium 140.908		60 Nd Neodymium 144.24		61 Pm Promethium 144.913		62 Sm Samarium 150.36		63 Eu Europium 151.964		64 Gd Gadolinium 157.25		65 Tb Terbium 158.925		66 Dy Dysprosium 162.50		67 Ho Holmium 164.930		68 Er Erbium 167.259		69 Tm Thulium 168.934		70 Yb Ytterbium 173.055		71 Lu Lutetium 174.967	
89 Ac Actinium 227.028																		90 Th Thorium 232.038		91 Pa Protactinium 231.036		92 U Uranium 238.029		93 Np Neptunium 237.048		94 Pu Plutonium 244.064		95 Am Americium 243.061		96 Cm Curium 247.070		97 Bk Berkelium 247.070		98 Cf Californium 251.080		99 Es Einsteinium 252		100 Fm Fermium 257.095		101 Md Mendelevium 258.1		102 No Nobelium 259.108		103 Lr Lawrencium 262	

1.1. El cáncer en la actualidad

El cáncer es un término utilizado para describir un conjunto de más de cien enfermedades diferentes caracterizadas por el desarrollo de células anormales que se dividen y crecen descontroladamente, y que pueden propagarse a cualquier parte del cuerpo, dando lugar a un proceso conocido como metástasis (**Figura 1.1**).¹ Tradicionalmente, los cánceres se clasifican según el tejido del que proceden: los carcinomas surgen de células epiteliales y representan más del 80 % de los casos; los sarcomas derivan del tejido conectivo o conjuntivo; los linfomas se originan a partir del tejido linfático, mientras que las leucemias se originan en la médula ósea. Cada categoría contiene muchas divisiones basadas en la localización, el tipo específico de células y otras características histológicas.²

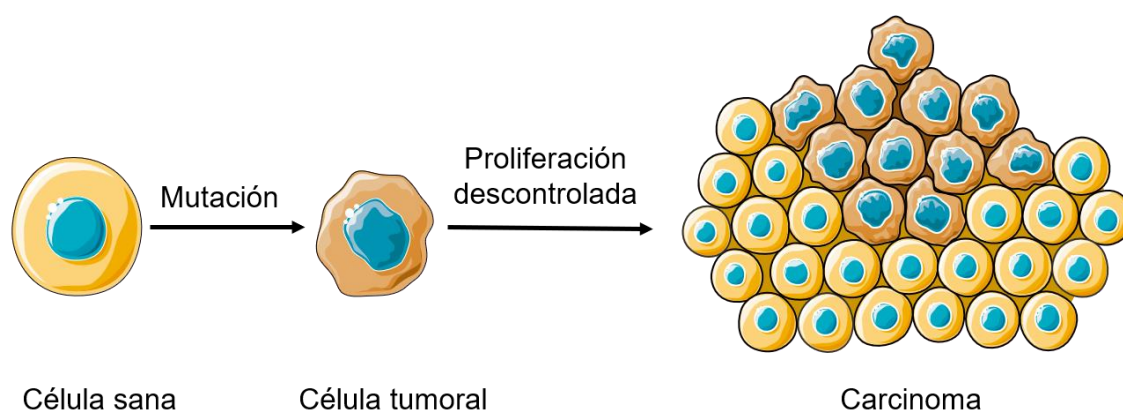


Figura 1.1. Proceso de formación de un carcinoma. Imagen adaptada de la bibliografía.¹

Según los datos recogidos en el Informe Mundial del Cáncer 2022 de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), se estima que, en el año 2022, se produjeron 20 millones de nuevos casos (incluidos los cánceres de piel no melanoma, NMSC) y 9,7 millones de muertes por cáncer (incluido el NMSC). Dichas estimaciones sugieren que uno de cada cinco hombres o mujeres desarrollará cáncer a lo largo de su vida, mientras que alrededor de uno de cada nueve hombres y una de cada doce mujeres fallecerán a causa de él.³ Cabe mencionar que en España, según los datos ofrecidos por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2022 se produjeron un total de 114828 muertes debidas al cáncer.⁴

Del total de casos investigados, el cáncer de pulmón fue el diagnosticado con mayor frecuencia en 2022, responsable de casi 2,5 millones de nuevos casos (representando el 12,4 % del total de casos), seguido del cáncer de mama (11,6 %), colorrectal (9,6 %), próstata (7,3 %) y estómago (4,9 %). En 2020, el cáncer de mama superó al de pulmón como el más común en el mundo,⁵ pero en 2022, el de pulmón volvió

a emerger, algo que la OMS atribuye al consumo persistente de tabaco en Asia, donde se diagnosticaron dos de cada tres casos.⁶ Por otro lado, el cáncer de pulmón también resultó ser la principal causa de muerte por cáncer (1,8 millones de muertes representando el 18,7 % del total de muertes por cáncer), seguido del colorrectal (900000 muertes, 9,3 %), el de hígado (760000 muertes, 7,8 %), el de mama (670000 muertes, 6,9 %) y el de estómago (660000 muertes, 6,8 %) (**Figura 1.2**).^{3,7} Cabe señalar que existe una distinción en cuanto al género, pues en las mujeres, el cáncer de mama es el más diagnosticado (25 % de casos) y una de las principales causas de muerte (16 %), mientras que, en los hombres, el de pulmón es el que presenta mayor incidencia en la mayoría de los países (14 % de casos).⁷

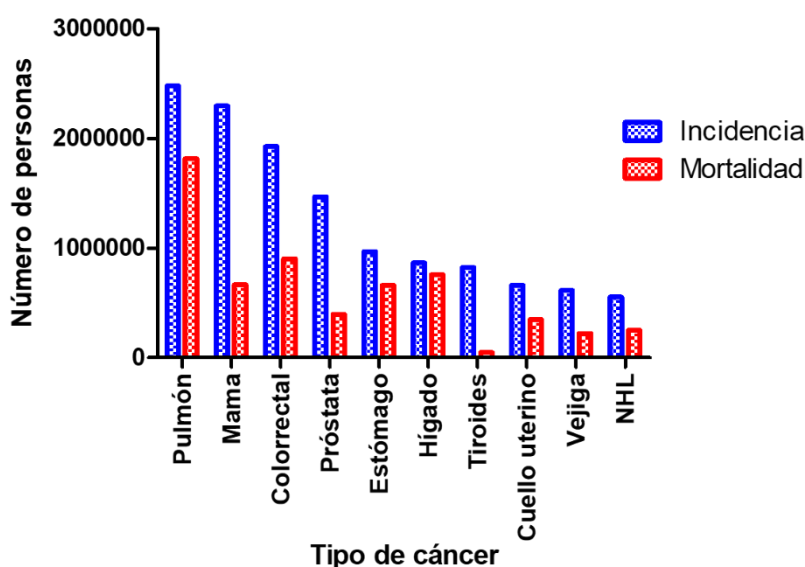


Figura 1.2. Incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más comunes a nivel mundial en 2022. Fuente: IARC. Global Cancer Observatory. Cancer Today.⁷

Sobre la base de los cambios previstos en el crecimiento y el envejecimiento de la población, y suponiendo que las tasas generales de cáncer se mantengan sin cambios, se prevé que, en el año 2050, se producirán más de 35 millones de nuevos casos, lo que supone un aumento de alrededor del 77 % respecto a los 20 millones estimados en 2022 (**Figura 1.3**). La transición demográfica es un factor clave para el aumento de la incidencia del cáncer, pues se estima que la población mundial alcanzará los 9700 millones de habitantes en 2050, en contraposición de los 8000 millones de 2022.⁸ Además, los tipos de cáncer más frecuentes continuarán siendo los de mama y de pulmón, con un aumento en la incidencia de un 135 y 86 %, respectivamente.

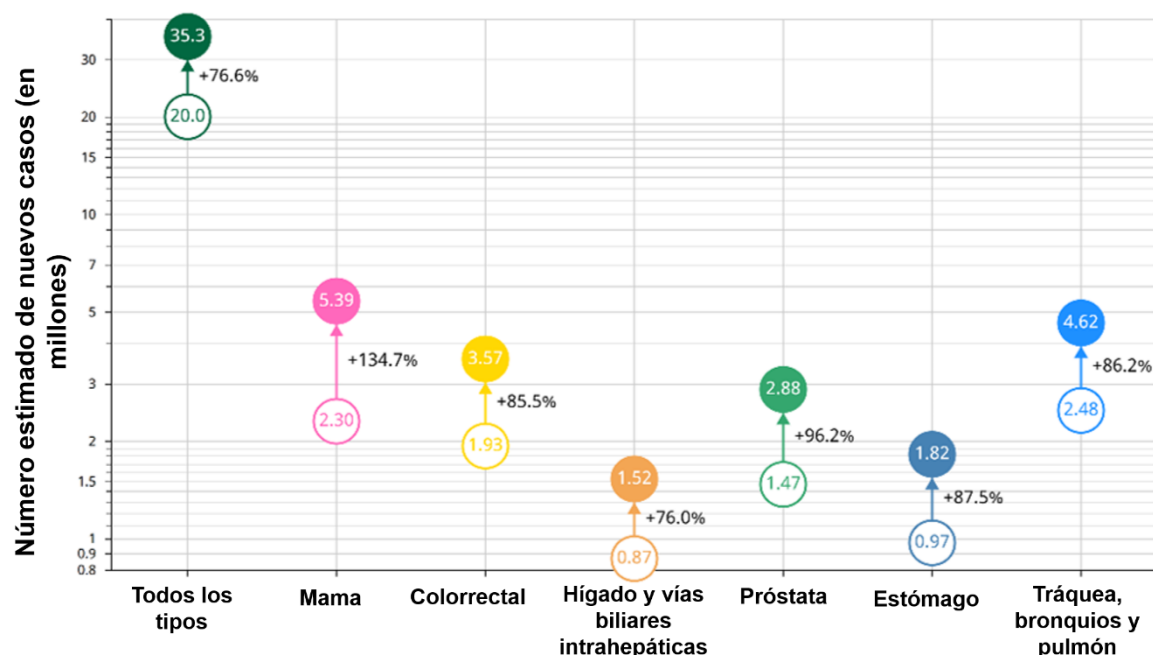


Figura 1.3. Número estimado de nuevos casos de cáncer desde 2022 a 2050. Fuente: IARC. Global Observatory. Cancer Tomorrow.⁷

Existen muchos tipos de tratamientos contra el cáncer, que dependen del tipo y de su grado de avance. Entre los enfoques clínicos más comunes para su tratamiento se encuentran: la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y la terapia dirigida con fármacos anticancerígenos.⁹

1.2. Quimioterapia

A principios del siglo XX, el químico alemán Paul Ehrlich se dedicó a desarrollar fármacos para tratar enfermedades. Ehrlich acuñó el término quimioterapia y lo definió como el uso de sustancias químicas para tratar enfermedades.¹⁰ Hoy día, el término quimioterapia se utiliza para referirse al tratamiento que emplea fármacos para detener el crecimiento de las células cancerosas, ya sea matándolas o impidiendo su división. La quimioterapia puede administrarse por vía oral, inyección o sobre la piel, en función del tipo y el estadio de cáncer que se esté tratando.¹¹

1.2.1 Primeros compuestos de platino

Los compuestos basados en platino constituyen un pilar fundamental en la terapia contra el cáncer, ya que se utilizan en cerca de la mitad de los pacientes que requieren quimioterapia.¹²

El cis-diamminodicloroplatino(II) o cisplatino (CDDP) fue sintetizado en 1844 por Michele Peryone, y llegó a conocerse como cloruro de Peryone.¹³ Sin embargo, no fue hasta 1969 cuando Barnett Rosenberg descubrió sus propiedades antineoplásticas para

el tratamiento del sarcoma 180 y la leucemia 1210 en ratones.^{14,15} En 1978, solo nueve años después de la publicación que describía su actividad anticancerígena, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer testicular, de ovario y de vejiga, convirtiéndose en el primer compuesto metálico aprobado para el tratamiento de dicha enfermedad.

Actualmente, el CDDP está aprobado para el tratamiento de un amplio espectro de tumores sólidos, entre los que se encuentran el testicular, de vejiga, ovario, colorrectal, pulmón y de cabeza y cuello.^{16,17} La actividad anticancerígena del CDDP se debe a múltiples mecanismos, aunque el más aceptado involucra cuatro pasos clave: acumulación en el interior celular, activación, unión al ADN y procesamiento celular de este, lo que conduce a la muerte celular.¹⁸ El CDDP penetra en el espacio intracelular por difusión pasiva a través de la membrana plasmática o por transporte activo, mediado por proteínas de membrana.^{19,20} Una vez en el interior, como consecuencia de la menor concentración de iones cloruro con respecto al plasma sanguíneo, se produce la sustitución de un ligando cloruro por una molécula de agua, siendo capaz de traspasar al interior del núcleo e interactuar con el ADN. El CDDP se une preferentemente a la posición N7 de la nucleobase guanina, formando mayoritariamente aductos intracatenarios.²¹ El daño en el ADN inducido por el cisplatino provoca la detención del ciclo celular en la etapa G2 y la activación de las proteínas caspasas que inducen la apoptosis.^{22,23}

Aunque su uso sigue siendo muy extendido en terapia, este fármaco presenta serias limitaciones. Entre ellas se encuentra su citotoxicidad, ya que afecta a los riñones (nefrotoxicidad), a los nervios periféricos (neurotoxicidad) y al oído interno (ototoxicidad).²⁴ Algunos tipos de cáncer, como el colorrectal y los de pulmón o próstata, son intrínsecamente resistentes a las terapias basadas en platino mientras que, otros tumores originalmente sensibles, como el cáncer de ovario, desarrollan quimiorresistencia.^{25,26}

A principios de la década de 1980, con el objetivo de reducir los efectos secundarios del cisplatino, se desarrollaron compuestos de platino de segunda generación. Entre ellos destaca el *cis*-diammino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino(II), conocido como carboplatino.²⁷ Este presenta un modo de acción similar al cisplatino, aunque tiene menor reactividad debido al ligando bidentado que sustituye a los aniones cloruro.²⁸ Fue aprobado en 1989 por la FDA para el tratamiento del cáncer de ovario, en combinación con paclitaxel.²⁹ Aunque no muestra nefrotoxicidad ni neurotoxicidad, afecta a la médula ósea provocando trombocitopenia²⁸ y, además, la mayoría de los tumores resistentes al cisplatino, tampoco responden a este tratamiento. Otro fármaco de segunda generación es el *cis*-diamminoglicolatoplatino(II), conocido como nedaplatino. Este tiene un perfil de

toxicidad mejorado en comparación con el cisplatino, pero solo ha sido aprobado en Japón (1995) para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, testículo, pulmón (de células pequeñas y no pequeñas) y esófago.^{30,31}

En cuanto a los fármacos de platino de tercera generación, los cuales se desarrollaron para superar la resistencia a los anteriores, destaca el oxaliplatino. Este complejo presenta en su estructura un ligando (1R,2R)-1,2-diaminociclohexano y el oxalato como grupo saliente. Fue aprobado por la FDA en 2002 para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico,³¹ en combinación con el 5-fluorouracilo y el ácido folínico (protocolo FOLFOX).^{32,33} Otros fármacos de tercera generación son el heptaplatino y el lobaplatino, aunque solo recibieron aprobación regional. El primero se aprobó en Corea del Sur (1999) para el tratamiento del cáncer gástrico y el segundo en China (2010) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, la leucemia mielógena crónica y el cáncer de pulmón de células pequeñas.³¹ En cuanto a la toxicidad del lobaplatino, su uso redujo la nefro-, neuro- y ototoxicidad, pero los efectos hematotóxicos resultaron significativos.

En la **Figura 1.4** se resumen los compuestos de platino utilizados clínicamente, junto al año en que recibieron la aprobación a nivel mundial o regional.

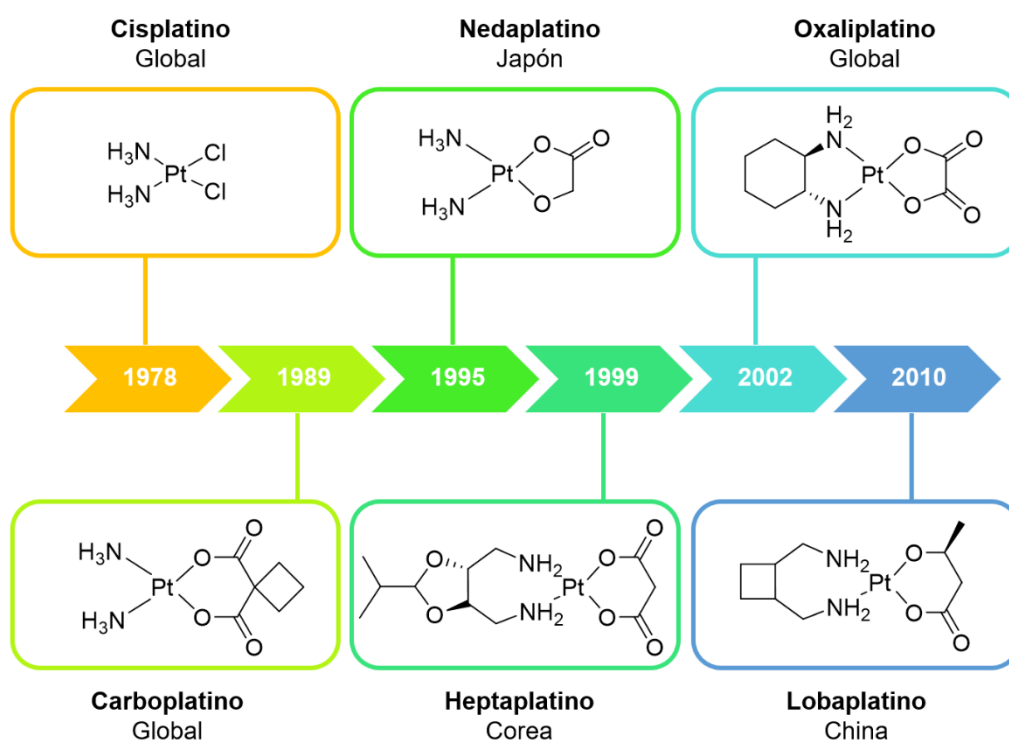


Figura 1.4. Compuestos de platino utilizados clínicamente junto al año en que recibieron la aprobación a nivel mundial o regional.

1.2.2 Primeros compuestos de rutenio como agentes quimioterapéuticos

Para superar los inconvenientes de los fármacos de platino, se han explorado nuevas estrategias. Una de ellas es el desarrollo de medicamentos basados en otros metales diferentes al platino, ya que pueden tener mecanismos de acción y perfiles de toxicidad distintos, ofreciendo así ventajas sobre los regímenes terapéuticos existentes. En este sentido, los agentes anticancerígenos de rutenio han resultado ser los candidatos más prometedores.³⁴

El rutenio y el osmio son metales del bloque d y, junto al hierro, miembros del grupo 8 de la tabla periódica. A pesar de que el osmio se descubrió antes que el rutenio, su química y su potencial como agente anticancerígeno se ha investigado en menor profundidad.³⁵ Inicialmente, los compuestos de rutenio y osmio se diseñaron para imitar el modo de acción de los agentes de platino, lo que se vio reflejado en el diseño y preparación de los primeros complejos de rutenio. En 1976, Mercer y col. prepararon el compuesto *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃], el cual exhibe una actividad antibacteriana contra la *Escherichia Coli* comparable a la del CDDP. Este descubrimiento produjo un incremento en el interés de los compuestos de rutenio como alternativa terapéutica a los de platino.³⁶

Más tarde, en 1986, Keppler y col. sintetizaron el compuesto *trans*-[RuCl₄(HIm)₂], conocido como KP418, donde HIm representa el imidazol.³⁷ El KP418 muestra actividad terapéutica contra la leucemia murina P388 y el melanoma B16, y los estudios posteriores realizados en un modelo de carcinoma colorrectal autóctono en ratas revelaron que causa una inhibición del crecimiento tumoral superior al 90 %. Sin embargo, también provoca una pérdida de peso corporal del 26 % y una mortalidad del 10 %.^{37,38} Para reducir los efectos secundarios, se preparó el compuesto KP1019, (ImH)[*trans*-RuCl₄(HInd)₂] donde HInd es indazol, el cual mantiene la eficacia con una inhibición del 95 % del volumen del tumor, sin ninguna mortalidad y sin pérdida de peso considerable (6 %). En 2006, el KP1019 completó un estudio preliminar de fase I, cuyos prometedores resultados demostraron que se obtiene una estabilización de la enfermedad en adenocarcinoma de colon y carcinomas de hígado, endometrio y lengua.^{39,40} Un inconveniente de este compuesto fue su baja solubilidad, lo que impidió la determinación de la dosis máxima tolerada. Por ello, se preparó su sal sódica, conocida como BOLD-100 (anteriormente NKP1339), que aumentó la solubilidad 30 veces y que se encuentra en la fase I/II de los ensayos clínicos.⁴¹ De los estudios de fase I finalizados en 2016 (NCT01415297) se determinó que dicho compuesto puede controlar parcialmente tumores endocrinos y que es parcialmente activo frente al cáncer de colon.⁴² Recientemente, BOLD-100, en combinación con el protocolo FOLFOX, ha superado la fase II de los ensayos clínicos (NCT04421820) para el tratamiento del cáncer de colon metastásico.⁴³

Además de inspirar el desarrollo de KP1019, KP418 también tuvo una influencia determinante en el campo de los complejos de rutenio que incorporan dimetilsulfóxido (DMSO). Esto dio lugar a la síntesis, por parte del grupo de investigación de Sava, del compuesto *trans*-[tetracloruro(*1H*-imidazolil)(κ -S-dimetilsulfóxido)rutenato(III)], conocido también como NAMI-A (Novel Anti-tumor Metastasis Inhibitor A). A diferencia de KP1019, NAMI-A demostró poseer propiedades antimetastásicas, inhibiendo la metástasis en el carcinoma de Lewis, el adenocarcinoma de mama TS/A, la leucemia P388 y el melanoma B16.^{44,45} Este compuesto fue el primer agente anticancerígeno basado en rutenio que entró en ensayos clínicos, finalizando la fase I en el año 2004.⁴⁶ Los resultados de esta fase indicaron que se produce la estabilización de la enfermedad en pacientes afectados por carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se investigó dicho compuesto en combinación con la gemcitabina como tratamiento de segunda línea para el NSCLC, en un estudio clínico de fase I/II. Sin embargo, fue descartado en 2011 porque resultó menos activo que la gemcitabina sola.⁴⁷

En la **Figura 1.5** se resumen los primeros compuestos de Ru(II) desarrollados para el tratamiento del cáncer, junto al año en que fueron sintetizados.

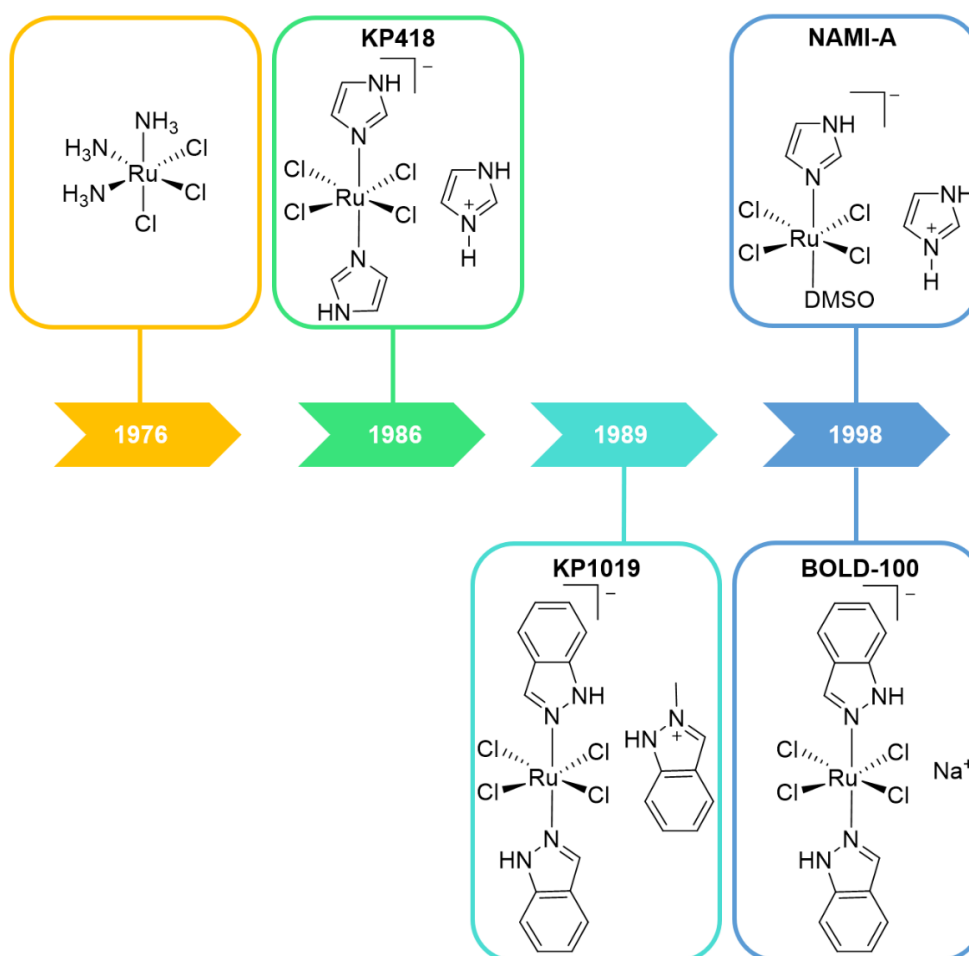


Figura 1.5. Primeros compuestos de Ru(II) desarrollados para el tratamiento del cáncer, junto a su fecha de preparación.

1.2.3 Primeros complejos semi-sándwich de Ru(II) para el tratamiento del cáncer

Los areno-complejos de Ru(II) son compuestos organometálicos que presentan una estructura de tipo semi-sándwich o “taburete de piano”. Su fórmula general es $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$, donde el areno representa el asiento del taburete y ocupa tres posiciones de coordinación, mientras que los ligandos representan las patas (**Figura 1.6**). Generalmente, el uso de un ligando quelato bidentado ($\text{L}=\text{Y}^{\wedge}\text{Z}$) es ventajosa para la actividad anticancerígena. Este tipo de estructura permite variaciones de los tres componentes principales (X, L y el areno), por lo que es posible modular las propiedades farmacológicas de los compuestos. El ligando bidentado contribuye a mejorar la estabilidad de los compuestos. Por otro lado, la naturaleza del areno puede influir en la captación celular y en las interacciones con posibles dianas. Además, el grupo saliente, que suele ser cloruro, puede ser importante para controlar el momento de activación del compuesto.^{34,48}

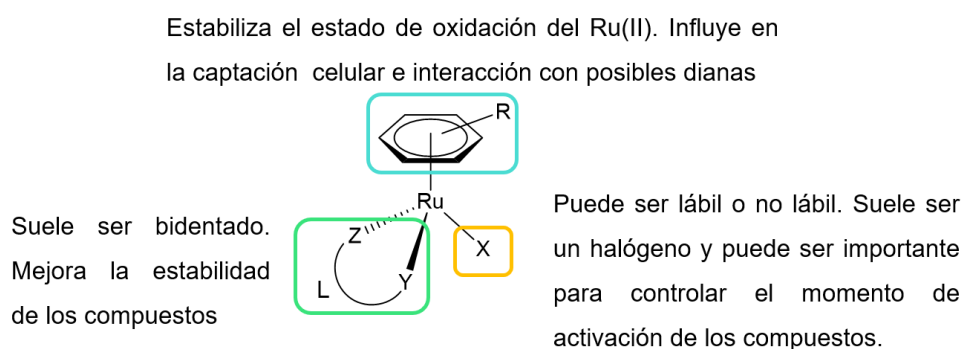


Figura 1.6. Estructura general de los areno-compuestos de Ru(II) de tipo semi-sándwich.^{34,48}

El inicio de la investigación de los areno-compuestos de rutenio para tratar el cáncer se remonta a 1992, cuando Tocher y col. observaron un incremento en la citotoxicidad del metronidazol al coordinarse a un fragmento de Ru(II) con dos ligandos cloruros y un ligando de benceno (**Figura 1.7**).⁴⁹ A raíz de este descubrimiento, los grupos de investigación de Dyson y de Sadler fueron pioneros en el desarrollo de nuevos compuestos de Ru(II) con este tipo de estructura.

El grupo de investigación liderado por Dyson ha desarrollado una serie de compuestos denominados RAPTA. Estos se caracterizan por contener: un ligando η^6 -areno, que estabiliza el estado de oxidación del Ru(II), un ligando monodentado PTA (1,2,5-triaza-7-fosfaadamantano) y dos ligandos cloruro relativamente lábiles (**Figura 1.7**). El ligando PTA, que posee propiedades anfífilas, confiere cierto grado de solubilidad a los complejos RAPTA.⁵⁰ Dentro de esta familia, los compuestos RAPTA-C y RAPTA-T que presentan el *p*-cimeno y el tolueno como ligando η^6 -coordinado, respectivamente, han sido

los más prometedores. Concretamente, RAPTA-C presenta propiedades antimetastásicas y una fuerte actividad antiangiogénica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, dicho complejo muestra actividad en células de carcinoma de ascitis de Ehrlich y en diferentes tumores primarios.^{51–54}

Paralelamente, el grupo de investigación de Sadler preparó los compuestos de tipo RAED (Rutenio-Areno-EtilenDiamina). De esta familia destaca el $[(\eta^6\text{-bip})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$, conocido como RM175, donde $\eta^6\text{-bip}$ es $\eta^6\text{-bifenilo}$ (**Figura 1.7**).⁵⁵ El RM175 muestra una actividad antiproliferativa comparable a la del carboplatino. En estudios realizados en modelos de cáncer de ovario *in vivo* (A2780 y A2780cis), este compuesto demostró que no presenta resistencia cruzada con el cisplatino y que tiene una mejor tolerabilidad a dosis más altas. Sin embargo, su actividad es aproximadamente la mitad que la del CDDP. El complejo RM175 también es activo frente al cáncer de mama y el NSCLC.⁵⁶

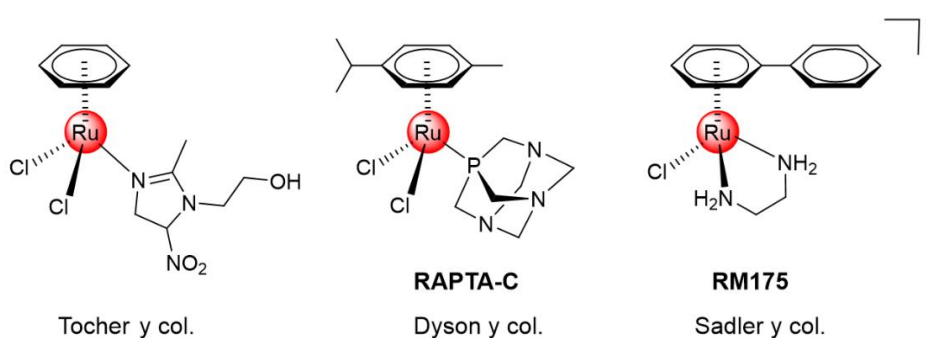


Figura 1.7. Estructura del compuesto preparado por Tocher y col. y los compuestos RAPTA-C y RM175.^{49,50,55}

Recientemente, Mukherjee y col. han descrito dos nuevas series de areno-complejos de Ru(II) que han presentado buenas propiedades como potenciales agentes antitumorales. Por un lado, han sintetizado compuestos de Ru(II) con ligandos N^N basados en mesalazina o en bases de Schiff 3-aminobenzoato eficaces contra las células madre cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés) del carcinoma oral de células escamosas (OSCC). Concretamente, el compuesto basado en el éster etílico de imidazolil-mesalazina (**Figura 1.8.A**) impidió con mayor eficacia el crecimiento de las CSC en esferoides tridimensionales de OSCC, y es el más eficaz en la disminución de la expresión de genes que controlan el estado de células madre (OCT4, SOX2, SOX9, etc.). Además, dichos complejos también inducen la diferenciación, dirigiéndose eficazmente a las CSC y eliminándolas.⁵⁷

Por otro lado, este mismo grupo de investigación ha preparado compuestos de Ru(II) con ligandos basados en metil y dimetilpirazolilbenzimidazol (**Figura 1.8.B**). Los compuestos han demostrado inhibir eficazmente la fosforilación y la translocación nuclear de NK-kB, un factor clave en la señalización proinflamatoria que contribuye a la

supervivencia celular, la proliferación, la metástasis y la angiogénesis. Esta inhibición conduce a la muerte celular por apoptosis en las células de cáncer de mama triple negativo (abreviado en inglés como TNBC). Asimismo, los estudios *in vivo* realizados en un modelo transgénico de pez cebra (Tg(fli1:GFP)) revelaron que los compuestos son selectivos, pues no muestran letalidad ni defectos teratogénicos o fenotípicos en el pez, incluso al utilizar una concentración de 50 μM .⁵⁸

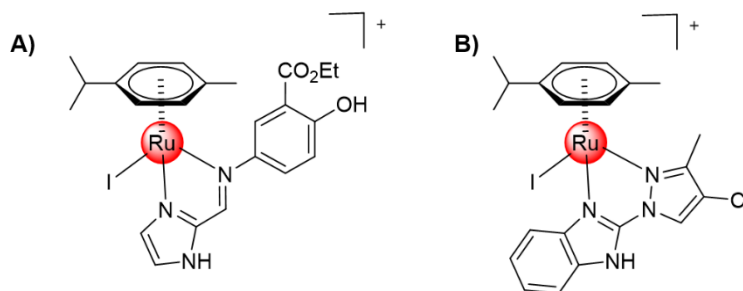


Figura 1.8. Estructura de los areno-complejos de Ru(II) preparados por Mukherjee y col. **A)** con un ligando basado en mesalazina⁵⁷; y **B)** con un ligando basado en metilpirazoliilbenzimidazol.⁵⁸

1.2.4 Compuestos semi-sándwich de Os(II) para quimioterapia

El descubrimiento de las propiedades anticancerígenas que presentaban algunos compuestos de rutenio propició el desarrollo e investigación de sus análogos en osmio. Previo a esto, existía un rechazo hacia la utilización de compuestos de osmio como fármacos debido a la toxicidad del tetraóxido de osmio. No obstante, tras realizar diversos estudios, se comprobó que estos poseen prometedoras propiedades anticancerígenas.⁵⁹ Los primeros compuestos de osmio en estudiarse fueron los análogos de rutenio RAPTA-C (2005),⁶⁰ RM175 (2006)⁶¹ y NAMI-A (2007).⁶²

Entre los areno-complejos de Os(II) que han suscitado interés destaca el sintetizado por Sadler y col., denominado como FY26. Este complejo se caracteriza por incorporar como ligando N[^]N la fenilazopiridina con un sustituyente *p*-dimetilamino, el yoduro como ligando monodentado, y el *p*-cimeno como η^6 -areno (**Figura 1.9**). Este compuesto, que es inerte frente a la hidrólisis, es marcadamente más potente que el CDDP y que su análogo de rutenio en diversas líneas celulares. De hecho, presenta citotoxicidad en el rango nanomolar frente al cáncer de ovario resistente al cisplatino (A2780cis), pulmón (A549), mama (MCF-7), colon (HCT-116), próstata (PC-3) y vejiga (RT-112). El FY26 puede ser activado catalíticamente por el glutatión celular, y provoca un aumento significativo del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) intracelulares en células cancerosas.⁶³ Estudios recientes demostraron que la generación de ROS es selectiva hacia las células cancerosas, en comparación con fibroblastos de ovario no cancerosos, así como *in vivo* en peces cebra.⁶⁴ En el año 2020, también se llevaron a cabo

estudios *in vivo* en ratones para determinar la farmacocinética y tolerabilidad del FY26 frente al cáncer hepático.⁶⁵

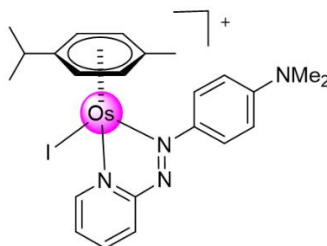


Figura 1.9. Estructura del compuesto FY26 sintetizado por Sadler y col.⁶³

Otro ejemplo destacable fue descrito por Brabec y col. (**Figura 1.10**), el cual presenta batofenantrolina como ligando bidentado N^N, dicloroacetato como ligando monodentado, y *p*-cimeno como η^6 -areno. Dicho complejo es citotóxico frente a un panel de líneas celulares tumorales, incluida las de TNBC. Además, se observó que tanto el compuesto de Os(II) como su análogo de Ru(II) poseen propiedades antimetastásicas en TNBC, y otros estudios mecanísticos revelaron que la oncosis parece ser su modo predominante de muerte celular.⁶⁶ Posteriormente, demostraron que el compuesto de Os(II) presenta una actividad citotóxica contra las CSC del cáncer de mama humano, que es superior a la de la salinomicina, un agente terapéutico tradicionalmente empleado contra las CSC.⁶⁷

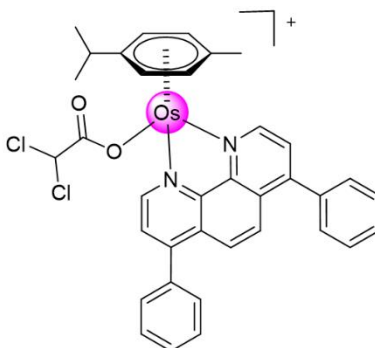


Figura 1.10. Areno-complejo de Os(II) preparado por Brabec y col.⁶⁶

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha preparado compuestos de Os(II) con estequiometría $[\text{Os}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{X}]^{0/+}$, donde el ligando $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ es 2-fenilpiridina o 4-(2-piridin)benzaldehído y el ligando monodentado (X) es cloruro, piridina o dimetilaminopiridina (**Figura 1.11**). El compuesto más activo de la serie es el que presenta el 4-(2-piridin)benzaldehído como $\text{C}^{\wedge}\text{N}$, y la dimetilaminopiridina como ligando monodentado. Los estudios *in vivo* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (cepa JK1466) demostraron que dicho compuesto reduce un 19 % el tamaño del tumor de ovario y que, en el rango de concentración utilizado, aumenta su esperanza de vida en un 17 %.⁶⁸

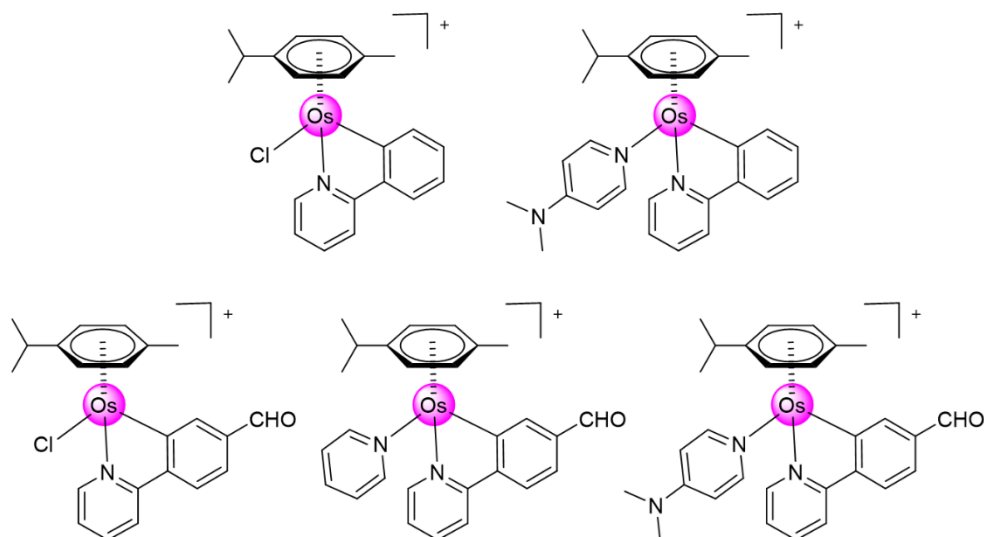


Figura 1.11. Compuestos de osmio con ligandos C[^]N preparados por nuestro grupo de investigación.⁶⁸

1.2.5 Complejos octaédricos ciclometalados de Ru(II) y Os(II) para quimioterapia.

Los compuestos ciclometalados son complejos metálicos que contienen un metalaciclo en el que, al menos, uno de los átomos dadores es un átomo de carbono sp^2 o sp^3 . En las últimas décadas, los compuestos de Ru(II) ciclometalados se han estudiado ampliamente en contextos biológicos. Estos suelen mostrar una mayor citotoxicidad frente a las células cancerosas en comparación con sus análogos no ciclometalados, lo que se atribuye a su mayor lipofilia, mayor captación celular y menor potencial redox Ru(III)/Ru(II). Esta última característica provoca interacciones citotóxicas con proteínas como las de las enzimas oxido-reductasas.^{69–71} Asimismo, estos compuestos presentan una serie de ventajas para utilizarse como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica, lo cual se detallará en el siguiente apartado.

Un ejemplo reciente de este tipo de compuestos se ilustra en la **Figura 1.12**. Fue descrito por Pan, Chao y col. y contiene los ligandos 1,10-fenantrolina y dipirido[3,2-a:2'-3'-c]fenazina (dppz) como ligandos auxiliares N[^]N, y la 7,8-benzoquinolina como ligando ciclometalado. Este compuesto se autoensambla en el medio acuoso y resulta eficaz para eliminar las células cancerosas resistentes a múltiples fármacos. Además, inhibe la respiración mitocondrial y la glucólisis de oxígeno en las células MDA-MB-231/Adr, así como aumenta el nivel de ROS y los daños en el ADN provocando la muerte celular por apoptosis. Los resultados *in vivo*, llevados a cabo en ratones xenoinjertados con células MDA-MB-231/Adr, revelaron que presenta un perfil de bioseguridad favorable, y que resulta eficaz para inhibir la proliferación de tumores resistentes a la doxorubicina.⁷²

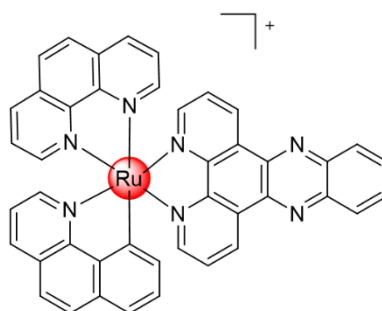


Figura 1.12. Compuesto ciclometalado de Ru(II) preparado por Pan, Chao y col.⁷²

Por su parte, Chao y col. han descrito un complejo ciclometalado de Ru(II) (**Figura 1.13**) que se localiza en el núcleo y las mitocondrias, y provoca daños en el ADN. Los estudios *in vitro* e *in vivo* confirmaron que la oncosis inducida provoca un aumento de los factores inflamatorios periféricos, lo que puede hacer que los macrófagos asociados a tumores activen la inmunidad innata. Además, los patrones asociados a los daños en las células tumorales estimulan la maduración de las células dendríticas, activando así una respuesta inmunitaria adaptativa impulsada por las células T. Así, estos compuestos inician la vía asociada a oncosis y combinan la inmunoterapia antitumoral innata y adaptativa, siendo este el primer ejemplo de ello.⁷³

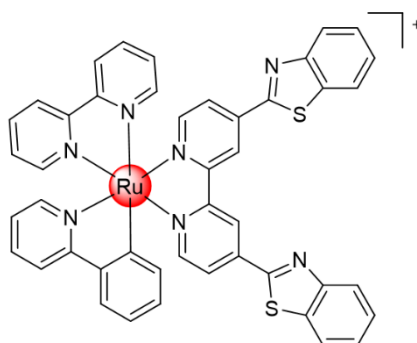


Figura 1.13. Compuesto de rutenio preparado por Chao y col. que induce la oncosis combinada con la inmunoterapia tumoral.⁷³

En cuanto a los complejos octaédricos ciclometalados de Os(II), son pocos los ejemplos descritos en la bibliografía⁷⁴ y, menos aún, los que detallan su aplicabilidad para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos más destacados fueron preparados por Gaiddon y col. e incluyen fenilpiridina y una o dos fenantrolinas como ligandos N^N auxiliares (**Figura 1.14**). Los complejos de osmio resultaron más activos que sus análogos de rutenio en la línea celular de cáncer de colon (HCT116), tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios mecanísticos revelaron que pueden inducir tanto la detención del ciclo celular en la fase

G0/G1, como la apoptosis. Además, al igual que los compuestos de rutenio, los de osmio inducen la vía de estrés del retículo endoplasmático (RE).⁷⁵

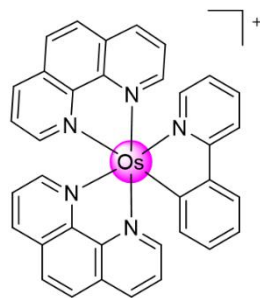


Figura 1.14. Compuesto ciclometalado de Os(II) sinterizado por Gaiddon y col.

Finalmente, cabe mencionar que también existen numerosos compuestos de rutenio de tipo polipiridilo y estequiometría $[\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{N}'^{\wedge}\text{N}')_2]^{2+}$ como potenciales agentes anticancerígenos. Sin embargo, por su importancia y aplicabilidad en terapia fotodinámica, se detallarán en el próximo apartado.

1.3. Terapia fotodinámica

A pesar de los logros alcanzados mediante la quimioterapia en el tratamiento del cáncer, los efectos secundarios asociados a ciertos tratamientos, junto al creciente número de resistencias a fármacos, recaídas y tumores metastásicos, han incrementado la búsqueda de nuevas modalidades de tratamiento terapéutico.⁷⁶ En este sentido, la terapia fotodinámica (PDT, por sus siglas en inglés) surge como una técnica alternativa o complementaria a la quimioterapia. Desde la antigüedad, la luz se ha empleado en el tratamiento de diversas enfermedades. Niels Finsen descubrió que la luz de una lámpara de arco de carbón podría utilizarse para tratar el *lupus vulgaris*, hallazgo por el que fue galardonado como premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1903. En 1900, Rabb, Tappeiner y col. describieron, por primera vez, la muerte celular inducida por la interacción de la luz con sustancias químicas. En 1904, Tappeiner y Jodlbauer identificaron el oxígeno como componente necesario en las reacciones de fotosensibilización y, en 1907, introdujeron el término “acción fotodinámica”.⁷⁷ Así, la PDT se estableció como método hace más de 100 años.

Por lo tanto, la PDT es un enfoque de tratamiento fotoquímico que implica una combinación de la luz y una sustancia química activada por la misma, denominada fotosensibilizador (PS, por sus siglas en inglés). Cada uno de estos elementos por sí solo no promueve una respuesta biológica. Sin embargo, tras la irradiación del PS se generan ROS que poseen propiedades citotóxicas.⁷⁸

En el ámbito clínico, los PSs suelen administrarse mediante aplicación tópica o intravenosa. En el segundo caso, el PS se distribuye de manera no específica a través del organismo. Tras un periodo de incubación, la región afectada se expone a una luz con una longitud de onda determinada, provocando la activación del PS y la consiguiente generación de ROS citotóxicas, que inducen la muerte de las células cancerosas (**Figura 1.15**). Cabe resaltar que este efecto se manifiesta exclusivamente en el tejido expuesto a la radiación, permitiendo así un método terapéutico altamente selectivo y preciso.^{79,80}

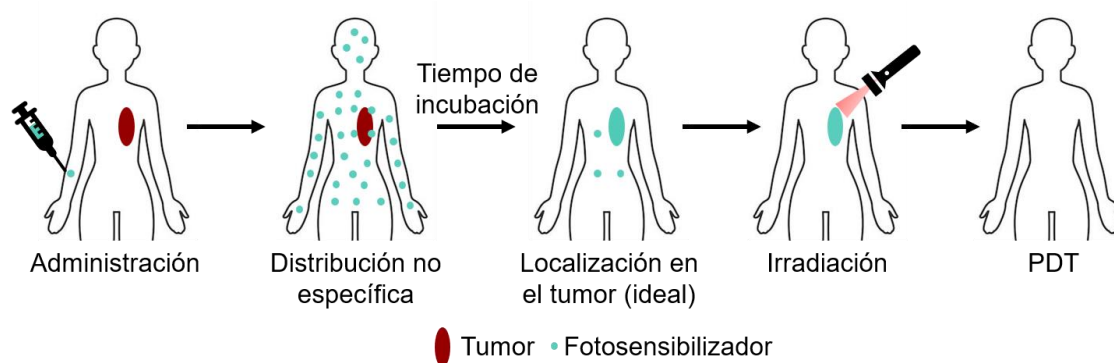


Figura 1.15. Representación de la terapia fotodinámica en clínica. Imagen adaptada.⁷⁶

En cuanto al mecanismo fotoquímico de la PDT (**Figura 1.16**), cuando se irradia el PS, la absorción de un fotón provoca la excitación del estado singlete fundamental (S_0) al estado singlete excitado (S_1). Posteriormente, puede regresar al estado fundamental emitiendo luz por fluorescencia, o experimentar un cruce entre sistemas (ISC, por sus siglas en inglés) hacia el estado triplete excitado (T_1). Como esta transición está prohibida por la regla del espín, el estado triplete tiene una vida relativamente larga (microsegundos). Así, el PS puede volver al estado fundamental emitiendo luz por fosforescencia o, gracias a su tiempo de vida más largo, interactuar con el entorno biológico mediante dos tipos de mecanismos. En el mecanismo de tipo I, se produce la transferencia de un protón o un electrón que provocan la oxidación de biomoléculas o del agua para generar ROS. Mientras que, en el mecanismo de tipo II, la energía se transfiere al oxígeno molecular (3O_2) para formar oxígeno singlete (1O_2), altamente citotóxico.^{76,81}

Por lo tanto, en los sistemas con alto contenido de oxígeno predominan las reacciones de tipo II, mientras que, cuando la cantidad de oxígeno es baja, el mecanismo de tipo I se ve favorecido. No obstante, las reacciones de tipo I y de tipo II pueden producirse simultáneamente, y la proporción entre ellas dependerá de la fotoquímica y fotofísica del PS, de la disponibilidad de sustratos moleculares y de la concentración de oxígeno molecular.^{82,83}

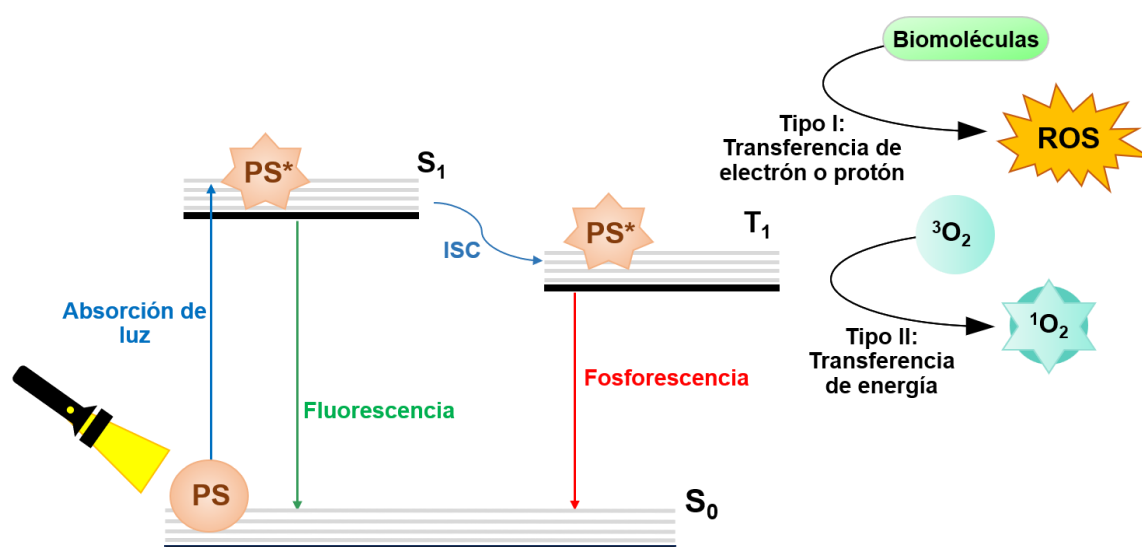


Figura 1.16. Diagrama de Jablonski simplificado con los mecanismos de generación de ROS en PDT. Imagen adaptada.⁷⁶

Por otro lado, un buen PS debe poseer una serie de características, tales como permanecer inactivo en la oscuridad y activarse al ser irradiado con una longitud de onda determinada.⁸⁰ El índice fototerapéutico (PI) es el parámetro que determina la relación entre la citotoxicidad en ausencia y presencia de luz, y cuanto mayor sea su valor, mayor será el potencial del agente fotosensibilizador para utilizarse en PDT. Asimismo, un PS ideal debería acumularse preferentemente en el tejido tumoral y ser eliminado rápidamente del tejido sano, lo cual maximiza la selectividad y eficacia del tratamiento y reduce los efectos colaterales adversos.^{77,84,85} Otras propiedades deseables en un PS incluyen: solubilidad en medios acuosos, excelente biocompatibilidad, alta fotoestabilidad y tiempos de vida largos del estado excitado, permitiendo así la interacción con el oxígeno molecular u otras biomoléculas.^{86,87} Por otra parte, es importante que exhiba absorción dentro del rango de la ventana fototerapéutica, comprendida entre 600 y 900 nm. La longitud de onda utilizada determina la profundidad de penetración en los tejidos, en virtud de las propiedades de absorción de sus constituyentes (**Figura 1.17**). De esta forma, las longitudes de onda azul y verde tienen una penetración limitada en el tejido debido a los efectos de dispersión de luz y a la absorción de los cromóforos biológicos, mientras que las longitudes de onda del rojo o infrarrojo cercano (600-900 nm) ofrecen una penetración significativamente mayor, facilitando el tratamiento de tumores profundos o de gran tamaño. No obstante, a pesar de la penetración de luz en el tejido, la longitud de onda utilizada debe responder a las características específicas del tejido tumoral y a la profundidad del tumor en cuestión.^{76,88}

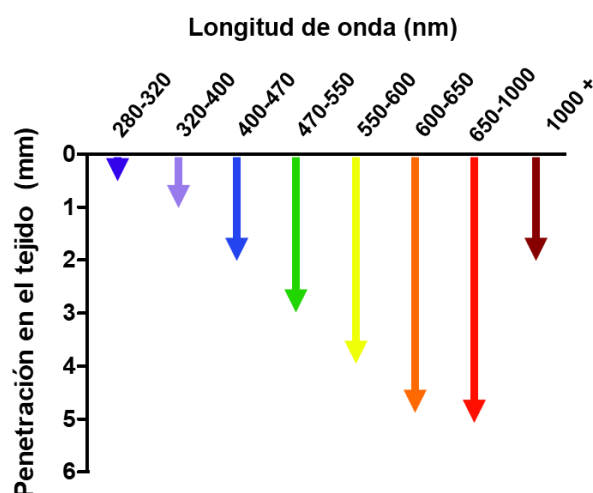


Figura 1.17. Profundidad de penetración de la luz de diferentes longitudes de onda en el tejido cutáneo. Imagen adaptada.⁸⁸

A pesar de las ventajas que ofrece la PDT, actualmente se emplea únicamente en el tratamiento de cánceres superficiales, en neoplasias de fácil acceso mediante endoscopios o fibras ópticas, o como coadyuvante en los procedimientos quirúrgicos de lesiones primarias.⁸⁹ Una de las razones por las que la PDT no se ha convertido en una modalidad de uso generalizado radica en que no puede aplicarse a cánceres metastásicos avanzados o diseminados, ya que la irradiación de todo el cuerpo humano resulta una tarea complicada con las tecnologías actuales disponibles. Además, la PDT presenta limitaciones en el tratamiento de tumores sólidos y voluminosos, puesto que estos contienen amplias subregiones con una concentración de oxígeno que oscila entre el 1 y el 2 %, lo que se conoce como hipoxia (**Figura 1.18**).⁸⁹ Las células hipóxicas suelen ser resistentes a la quimioterapia. En el caso de la PDT, la hipoxia representa una limitación importante debido a la falta de oxígeno disponible para el proceso de fotosensibilización.

Con el fin de generar fototoxicidad a pesar de la hipoxia, se han desarrollado diversas estrategias, como la oxigenación hiperbárica del tejido tumoral o el suministro de oxígeno a través de nanopartículas o perfluorocarbono.⁷⁶ Por otro lado, la quimioterapia fotoactivada (PACT, por sus siglas en inglés) emerge como una alternativa prometedora a la PDT, ya que su mecanismo es independiente de la concentración de oxígeno. La PACT se fundamenta en un profármaco que permanece inactivo en la oscuridad y que, al ser irradiado, se fragmenta generando las especies citotóxicas de manera controlada.⁹⁰ En el caso de la PDT, la investigación continúa centrándose en el desarrollo de nuevos PS que puedan superar la limitación de la hipoxia.

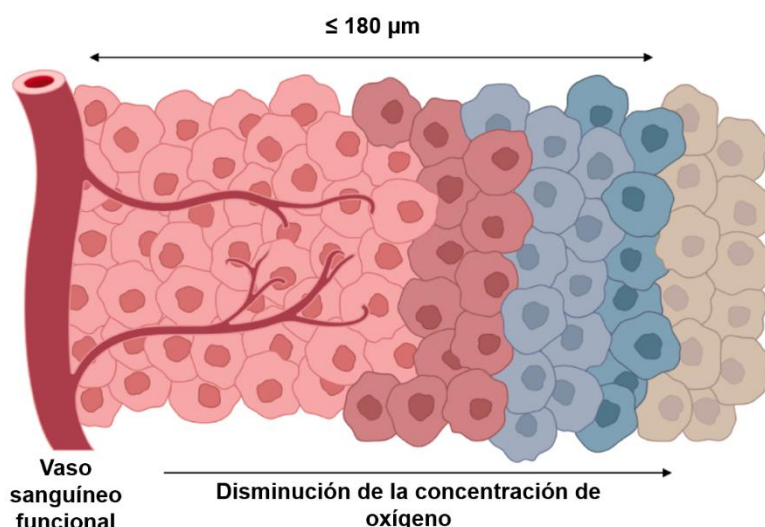


Figura 1.18. Regiones hipóxicas de un tumor. Imagen adaptada de la bibliografía.⁹¹

1.3.1. Primeros fotosensibilizadores en terapia fotodinámica

La mayoría de los PSs aprobados para el tratamiento del cáncer son porfirinas, compuestos que se estructuran en torno a un núcleo tetrapirrólico interconectado, característicamente hidrofóbico.⁸² La principal ventaja de estos compuestos radica en su elevado rendimiento cuántico para la producción de ROS. No obstante, presentan limitaciones significativas como: una baja absorción espectral en el IR o NIR, una selectividad limitada hacia las células tumorales y una baja estabilidad fotoquímica.⁹² Estas porfirinas constituyen la primera generación de PSs, e incluyen el derivado de la hematoporfirina (HpD) y su forma purificada, la Fotofrina® (**Figura 1.19**). La Fotofrina® representa el primer PS utilizado clínicamente y fue aprobado en 1993 en Canadá para el tratamiento del cáncer de vejiga.⁸⁰ Actualmente, se utiliza a nivel mundial para el tratamiento del cáncer de esófago, endobronquial y pulmón.⁷⁶ Ambos compuestos absorben luz alrededor de 630 nm y muestran un rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete elevado.⁹³

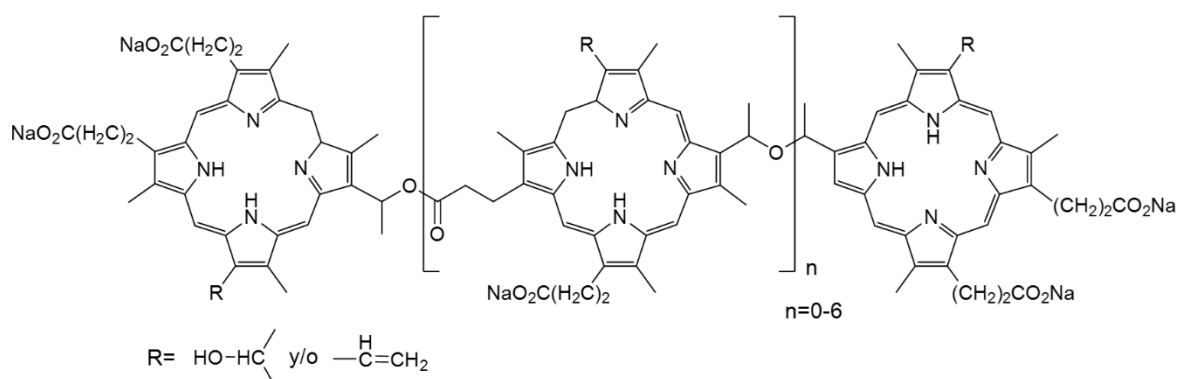


Figura 1.19. Estructura general de la Fotofrina®.⁸⁰

Los avances en la PDT propiciaron el desarrollo de la segunda generación de PS, que se desarrollaron para superar los inconvenientes de la primera generación y entre los que se incluyen estructuras modificadas de las porfirinas, como las ftalocianinas⁹⁴ y las clorinas. Un ejemplo de PS a base de clorina es la temoporfina (m-THPC, **Figura 1.20**), comercializada como Foscan® y aprobada en la Unión Europea (UE) para tratar el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. El ácido 5-aminolevulínico (5-ALA, **Figura 1.20**), que se convierte en protoporfirina IX (PpIX, **Figura 1.20**) al metabolizarse, es otro PS significativo de esta generación. La PpIX, un precursor natural para la síntesis de grupos hemo, se acumula preferentemente en células tumorales debido a su mayor dependencia de la glucólisis para la producción de energía (efecto Warburg).⁹⁵

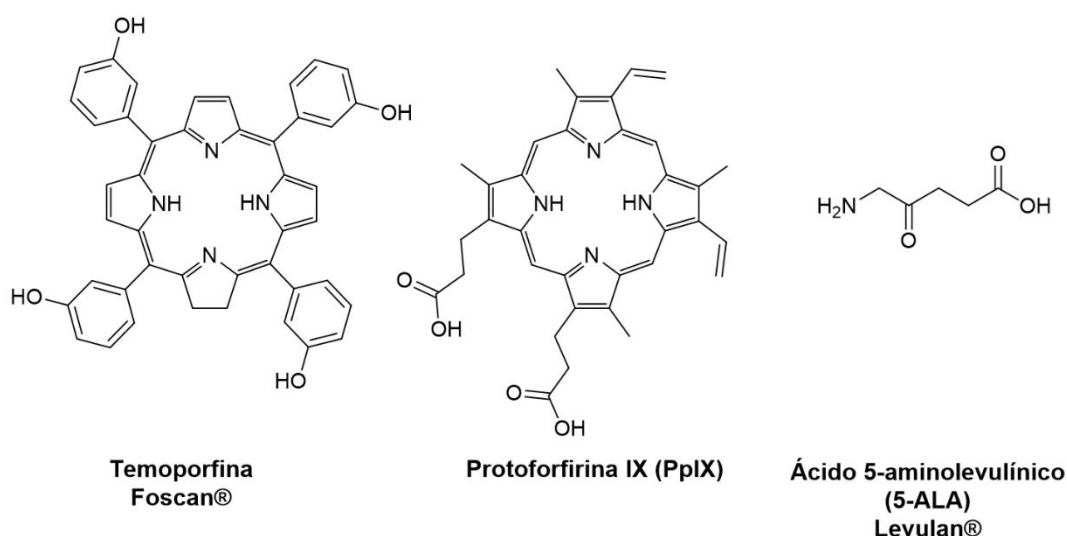


Figura 1.20. Estructura general de fotosensibilizadores de segunda generación.

Para superar algunas limitaciones de los PS utilizados en clínica, la investigación se centró en la incorporación de un ion metálico en la estructura tetrapirrólica, como Sn(IV) (Purlitina), Pd(II) (TOOKAD® soluble) y Lu(III) (Lutrin®) (**Figura 1.21**).^{95,96} Los metales pueden estabilizar la molécula y mejorar su estabilidad fotoquímica. Adicionalmente, los átomos pesados pueden influir positivamente en la eficiencia del cruce entre sistemas y, por tanto, mejorar la capacidad para generar ROS. En este sentido, destaca el complejo de paladio TOOKAD® soluble (Padelipofina/WST11), que ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer de próstata en Israel, México y la UE.^{76,97} El TOOKAD® presenta absorción a 763 nm siendo la penetración de la luz en el tejido 2-3 veces mayor que en el tratamiento con la Fotofrina®. Asimismo, es importante subrayar que el TOOKAD®, a diferencia de la mayoría de los PS utilizados clínicamente, actúa a través de un mecanismo tipo I.^{95,98}

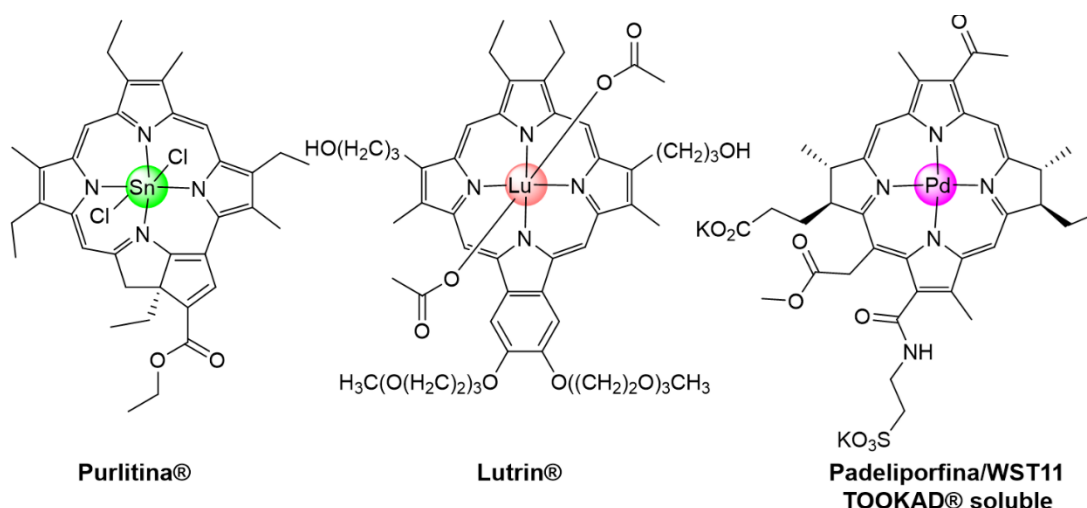


Figura 1.21. Estructura general de fotosensibilizadores que incorporan un ion metálico en su estructura.

Además de las estructuras de porfirina que contienen metales, se han investigado o se están investigando actualmente otros tipos de complejos metálicos que contienen Pt(II), Pt(IV), Os(II), Re(I), Ru(II) o Ir(III), cuyas propiedades y ejemplos característicos se detallan a continuación.

1.3.2. Compuestos de rutenio en terapia fotodinámica

Como se ha recogido en los apartados anteriores, los compuestos de rutenio no solo despertaron el interés como agentes quimioterapéuticos, sino también como prometedores agentes fotosensibilizadores en PDT. De hecho, el Ru(II) ha sido el metal más estudiado en PDT, y más concretamente, lo han sido los complejos polipiridilo de Ru(II) con estequiometría $[Ru(N^{\wedge}N)_2N'^{\wedge}N']^{2+}$.⁹⁹ Estos compuestos se caracterizan por un gran desplazamiento de Stokes, lo cual minimiza la interferencia entre la excitación y la emisión. Además, poseen elevada solubilidad en agua, en comparación con las porfirinas o las ftalocianinas, y exhiben un rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete alto, crucial para un buen PS en la PDT de tipo II. Asimismo, presentan una gran estabilidad química y fotoquímica, muestran largos tiempos de vida media del estado triplete excitado (3MLCT) tras la exposición a luz visible, y la elección de los ligandos auxiliares brinda la posibilidad de modular sus propiedades fotofísicas y biológicas.^{81,99,100}

El ejemplo más destacado de este tipo de compuestos es el TLD1433 preparado por McFarland y col. (**Figura 1.22**), el cual se encuentra actualmente en la fase II de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de vejiga no músculo-invasivo (NCT03945162). La estructura del compuesto se caracteriza por la presencia de un ligando imidazo[4,5-*f*]-1,10-fenantrolina modificado mediante la sustitución con tres anillos de tiofeno (IP-3T). Este ligando origina en el compuesto unos estados triplete excitados

(^3IL y $^3\text{ILCT}$) con elevados tiempos de vida, lo que conduce a una generación de ROS muy eficiente, tanto a través de un mecanismo de tipo I como de tipo II.^{87,101,102}

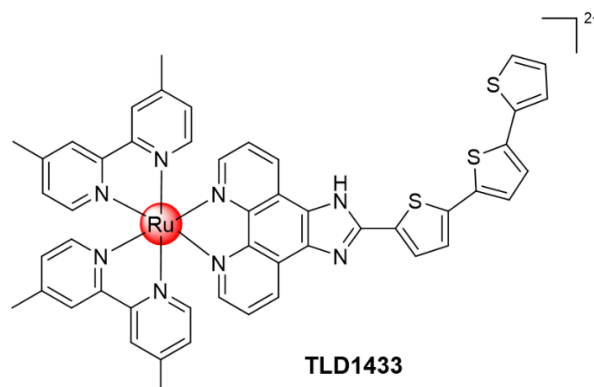


Figura 1.22. Estructura del compuesto TLD1433 sintetizado por McFarland y col.¹⁰²

El éxito del TLD1433 estimuló la investigación de nuevos compuestos de Ru(II) para ser estudiados como PS. En este sentido, el grupo de investigación de Gasser preparó nuevos compuestos de Ru(II) que muestran rendimientos cuánticos de oxígeno singlete prometedores y exhiben excelentes propiedades fotosensibilizantes frente a dos líneas celulares de cáncer de colon (CT26 y HT29), siguiendo un mecanismo que involucra la interrupción de la respiración mitocondrial. Concretamente, el compuesto $[\text{Ru}(\text{dppn})_2\text{phen}](\text{PF}_6)_2$ (**Figura 1.23**) destaca por sus elevados valores de PI en células CT26 con luz verde ($\lambda = 540 \text{ nm}$, $\text{PI} = 1666$), luz naranja ($\lambda = 595 \text{ nm}$, $\text{PI} = 53$) y luz roja ($\lambda = 620 \text{ nm}$, $\text{PI} = 133$).¹⁰³

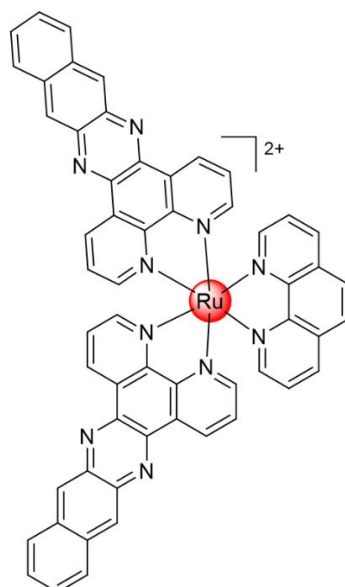


Figura 1.23. Estructura del compuesto preparado por Gasser y col.¹⁰³

Por otro lado, Zhao y col. publicaron recientemente nuevos compuestos heterolépticos de Ru(II), los cuales incorporan bases de Schiff (análogos de la iminopiridina

y iminoquinolina, **Figura 1.24**) con el propósito de desplazar la absorción al rojo. La sustitución de un ligando de bipyridina por la benzo[*i*]dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppn) como ligando auxiliar permite alcanzar estados excitados intraligando (^3IL) de larga duración y valores significativos de fotocitotoxicidad tras la irradiación con luz. Consecuentemente, estos compuestos exhiben valores de PI comprendidos entre 200 y 750 en las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y de hígado (HepG2), tras la irradiación con luz roja ($\lambda = 650 \text{ nm}$).¹⁰⁴

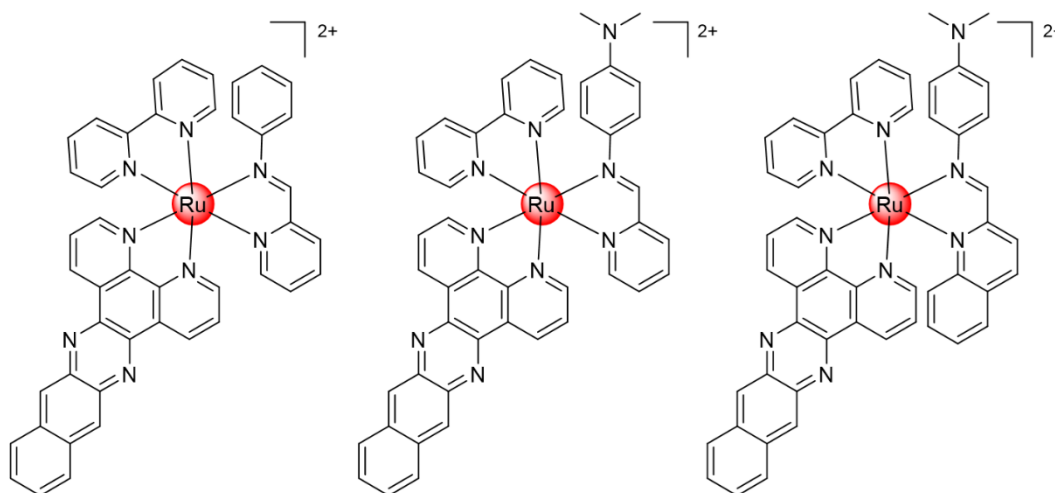


Figura 1.24. Compuestos preparados por Zhao y col. con ligandos dppn.¹⁰⁴

Como se ha expuesto anteriormente, los compuestos de Ru(II) que incorporan un ligando ciclometalado se caracterizan por su elevada lipofilia.⁷¹ Asimismo, la ciclometalación contribuye a la disminución de la energía del estado triplete de transferencia de carga metal-ligando ($^3\text{MLCT}$) y a la disminución del tiempo de vida del estado excitado de estos compuestos.¹⁰⁵ No obstante, el desplazamiento observado en la banda de absorción MLCT del compuesto ciclometalado, en comparación con su análogo polipiridilo, los convierte en prometedores PS en PDT pues, tal y como se ha señalado anteriormente, un PS ideal debería presentar absorción dentro del rango de la ventana fototerapéutica.^{71,105}

Aunque hasta la fecha se han descrito pocos fotosensibilizadores ciclometalados de rutenio, existen algunos ejemplos que han mostrado excelentes resultados. En este sentido, destacan dos series de compuestos preparados por McFarland y col. que resultaron eficaces como PS en el rango de luz visible. Por un lado, investigaron la influencia del aumento de conjugación π en el ligando ciclometalado y observaron que el compuesto con mayor conjugación, es decir, el 4,9,16-triazadibenzo[*a,c*]naftaceno (pbpn) como C^N (**Figura 1.25.A**), alcanza un valor de PI superior a 1400 en la línea SK-MEL-28 y mayor de 410 en la línea HL60, tras la irradiación con luz visible ($\lambda = 400\text{-}700 \text{ nm}$).¹⁰⁶ Por

otro lado, prepararon compuestos de estructura similar al TLD1433, pero con un ligando C[^]N π -extendido derivado de la benzo[h]imidazo[4,5-f]quinolona con grupos tienilo. El más activo contiene cuatro grupos tienilo en su estructura (**Figura 1.25.B**) y exhibe un valor de PI superior a 267 con luz visible y mayor de 25 con luz roja.¹⁰⁷

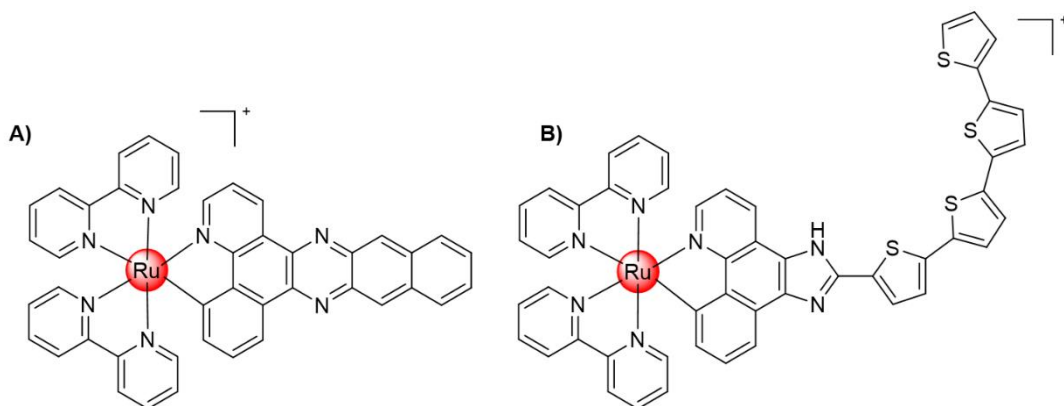


Figura 1.25. Estructuras de los compuestos preparados por McFarland y col.: A) con un ligando pbpn; B) con un ligando derivado de la benzo[h]imidazo[4,5-f]quinolona.^{106,107}

Uno de los ejemplos más recientes y fototóxicos ha sido descrito por Gasser y col., cuya fórmula es $[\text{Ru}(\text{appy})(\text{bphen})_2]\text{PF}_6$, donde appy es 4-amino-2-fenilpiridina y bphen es la batofenantrolina (**Figura 1.26**). Este compuesto presenta absorción hasta 725 nm, y los experimentos *in vitro* en la línea de adenocarcinoma de colon de ratón (CT-26) revelaron que no es tóxico en la oscuridad, pero que presenta una elevada fototoxicidad, con valores de PI mayores de 370 y de 150 al ser irradiados con luz de 670 nm y 740 nm, respectivamente. Este compuesto representa uno de los primeros ejemplos de rutenio como PS en el rango del NIR, sin utilizar absorción de dos fotones ni conjugarlo con fluoróforos absorbentes en el rojo, como BODIPYs o porfirinas.¹⁰⁵

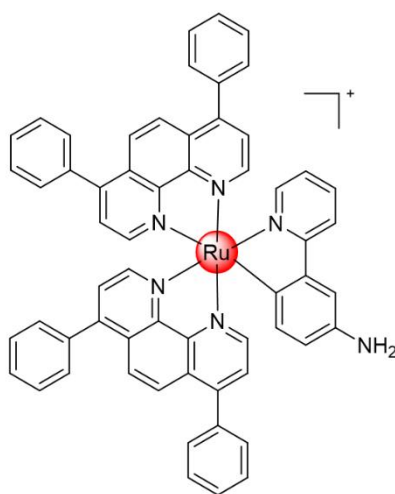


Figura 1.26. Estructura del compuesto preparado por Gasser y col.¹⁰⁵

1.3.3. Compuestos de iridio en terapia fotodinámica

Además de los compuestos de rutenio, los de iridio de tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ han sido ampliamente estudiados como PS debido a sus excelentes propiedades fotofísicas y fotoquímicas, que son similares a las que presentan los complejos polipiridilo de Ru(II) con tres ligandos $\text{N}^{\wedge}\text{N}$: grandes desplazamientos de Stokes, largos tiempos de vida de fosforescencia, alta estabilidad química y fotoquímica y, además, sus propiedades pueden ajustarse modificando los ligandos que presentan.¹⁰⁸ En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de prometedores agentes fotosensibilizadores con ligandos derivados del benzimidazol. Los compuestos no son tóxicos en la oscuridad y exhiben una elevada fototoxicidad bajo la exposición a la luz azul, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. El compuesto más prometedor de esta serie se ilustra en la **Figura 1.27**. En particular, este compuesto no sólo ostenta el valor de PI más alto, sino que también representa el primer complejo de iridio que se dirige selectivamente hacia las CSC, con potencial para inducir la muerte celular inmunogénica en ellas.¹⁰⁹

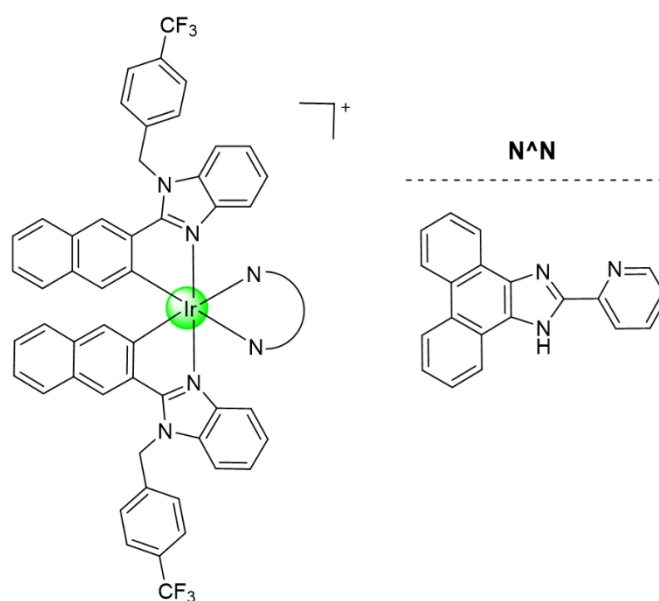


Figura 1.27. Estructura del compuesto de Ir(III) preparado por nuestro grupo de investigación.¹⁰⁹

Recientemente, Chao y col. han preparado compuestos de Ir(III) funcionalizados con 1-metil-4-fenilpiridinio (**Figura 1.28**). El derivado más prometedor se estudió en profundidad contra células de melanoma maligno humano. Se encontró que este complejo organometálico se acumula selectivamente en las mitocondrias de las células cancerosas, produciendo una mezcla de oxígeno singlete y aniones superóxido tras la irradiación con dos fotones a 720 nm. La generación del estrés oxidativo lleva a la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial y, por lo tanto, a la alteración de las fosforilaciones

oxidativas mitocondriales y los metabolismos de la glucólisis, desencadenando la muerte celular mediante la combinación de la muerte celular inmunogénica y la ferritinofagia.¹¹⁰

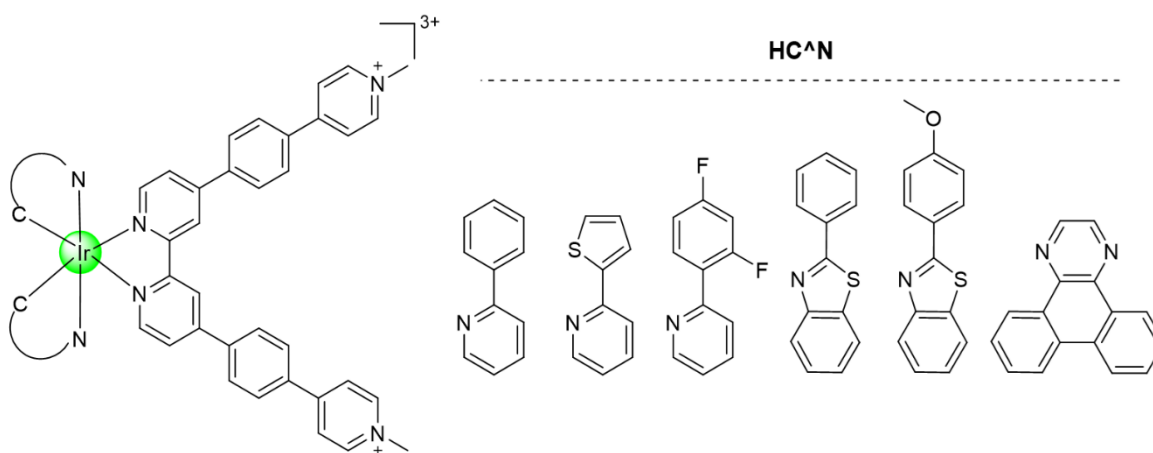


Figura 1.28. Estructura del compuesto preparado por Chao y col.¹¹⁰

Finalmente, el grupo de investigación de Gimeno, ha preparado recientemente compuestos de iridio con ligandos derivados de pirazolilo que presentan una doble funcionalidad, es decir, sirven como eficaces agentes quimioterapéuticos y fotosensibilizadores (**Figura 1.29**). Por un lado, las células A549 demostraron una mayor sensibilidad al tratamiento fototerapéutico, mientras que las células 4T1-luc2 mostraron una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico. Además, los resultados *in vivo* revelaron una toxicidad mínima y una eficacia notable frente a las células 4T1-luc2.¹¹¹

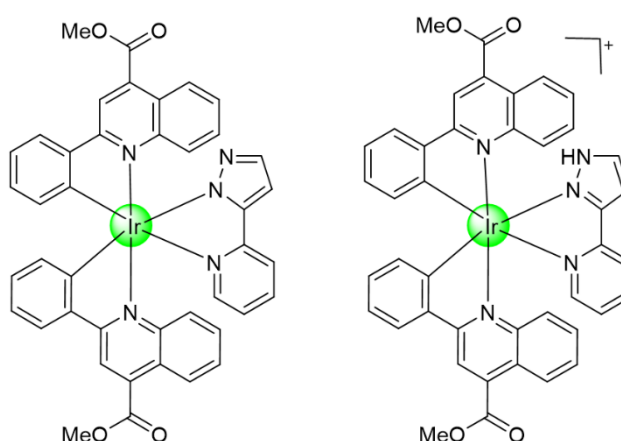


Figura 1.29. Compuestos preparados por Gimeno y col.¹¹¹

1.3.4. Nanotransportadores y sistemas de autoentrega de fármacos

Uno de los principales desafíos asociados con el uso de metalofármacos radica en su limitada capacidad de acumulación en los tumores y su rápida eliminación del organismo.¹¹² En consecuencia, la acumulación y liberación controlada de dichos fármacos ha suscitado un interés considerable en las últimas décadas, con el fin de mejorar su eficacia terapéutica.^{113,114} En este contexto, los nanosistemas se han propuesto como portadores eficientes para incrementar la concentración de metalofármacos en las células tumorales. Entre los enfoques más comunes se encuentran las estructuras metaloorgánicas,¹¹⁵ liposomas,^{116,117} micelas¹¹⁸ o nanocápsulas.¹¹⁹

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado nanocápsulas híbridas de poliuretano-poliurea (NC) que contienen un conjugado de Ir(III) y ftalocianina de cinc (ZnPc). El estudio de acumulación realizado por microscopía confocal demostró que el complejo encapsulado (Ir-ZnPc-NC) entra en el interior de células HeLa, mientras que el no encapsulado (Ir-ZnPc) permanece en el medio extracelular, lo que podría atribuirse a la escasa solubilidad acuosa de los compuestos. El complejo Ir-ZnPc-NC (**Figura 1.30**) exhibe una alta fototoxicidad en células HeLa, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, cuando se irradia con luz roja, alcanzando índices de fototoxicidad superiores a 83,3 y 90,9, respectivamente. Además, los estudios llevados a cabo con modelos celulares 3D confirmaron los efectos antitumorales de la especie encapsulada tras la exposición a la luz roja, demostrando así su potencial para tratar tumores hipóxicos profundamente arraigados.¹²⁰

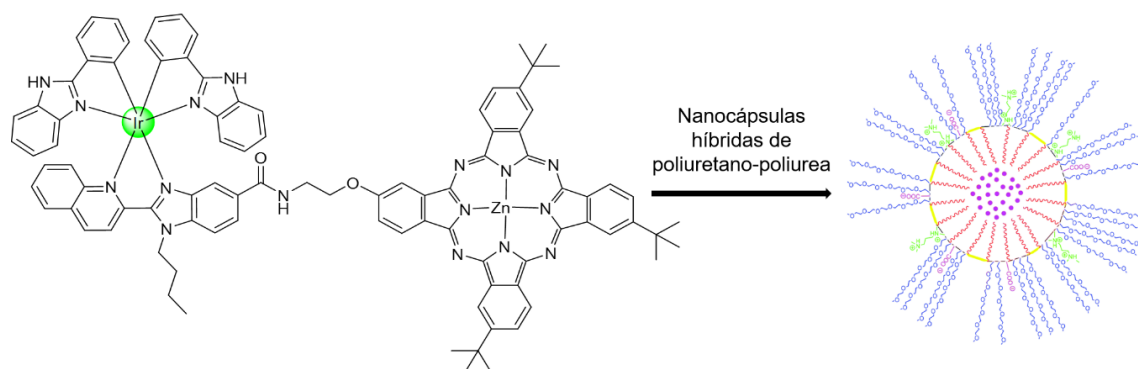


Figura 1.30. Estructura general del compuesto de Ir(III) conjugado a una ftalocianina de cinc (Ir-ZnPc) y su nanocápsula (Ir-ZnPc-NC).¹²⁰

1.4. Objetivos

Considerando los antecedentes previamente expuestos, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo explorar el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos para quimioterapia y terapia fotodinámica. Los objetivos generales de esta tesis abarcan el diseño racional y la síntesis de los compuestos, su caracterización, la determinación de sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas, el estudio de sus propiedades biológicas frente a células cancerosas, así como la identificación y el estudio del mecanismo de acción de los mejores candidatos.

El trabajo se estructura en 7 capítulos, que incluyen la introducción (Cap. 1) y las conclusiones (Cap. 7). A continuación, se muestran los objetivos específicos del resto de los capítulos:

- **Capítulo 2.** Se abordará la síntesis y caracterización de complejos de Os(II) de tipo semi-sándwich con un ligando quelato N^N derivado de 2-(1-aryl)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol. En el ligando N^N se incorporarán sustituyentes electrodoadores o electroaceptores para modular sus propiedades químicas y biológicas. Se investigará el comportamiento y la estabilidad de los nuevos compuestos en medio acuoso, así como su interacción con la seroalbúmina. Finalmente, se evaluará el potencial de los nuevos agentes en quimioterapia frente a células madre cancerosas.
- **Capítulo 3.** Se desarrollarán nuevos compuestos octaédricos ciclometalados de Os(II) de estequiometría [Os(N^N)₂(C^N)](OTf) donde N^N representa la bipyridina o la dpq y donde C^N es un ligando basado en 2-arylbenzimidazol. Se investigarán sus propiedades de absorción y su estabilidad en medios acuosos, así como la interacción de los mismos con la HSA. Finalmente, se evaluarán sus propiedades biológicas en un panel de líneas celulares cancerosas y se analizará el mecanismo de acción de los candidatos más prometedores.
- **Capítulo 4.** Se desarrollarán complejos octaédricos de Ru(II) de estequiometría [Ru(N^N)₂(C^N)]OTf, análogos de los descritos en el Capítulo 3. Se estudiarán sus propiedades de absorción, así como se llevarán a cabo estudios de estabilidad en medios acuosos. Asimismo, se evaluará la interacción de estos complejos con la HSA y se investigará la generación de especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete y radicales hidroxilo, bajo irradiación con luz verde. Finalmente, se explorará el potencial de los compuestos como agentes fotosensibilizadores en PDT utilizando luz verde en un panel de líneas celulares, y se analizará el mecanismo de acción del mejor candidato de la serie.

- **Capítulo 5.** Se sintetizarán y caracterizarán nuevos compuestos de Ir(III) de estequiometría $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{OTf}$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ representa un ligando derivado de 2-(5-ariltiofen-2-il)benzazol y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ corresponde a la dppz. Se realizarán estudios de generación de ROS en medios libres de células, incluyendo la generación de oxígeno singlete y de radicales hidroxilo. También se evaluará su potencial aplicación como fotosensibilizadores en PDT utilizando la luz azul, investigando el mecanismo de acción del candidato más prometedor de la serie.
- **Capítulo 6.** Se prepararán nuevos compuestos de Ir(III) de estequiometría $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{OTf}$ donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ corresponde a la 2-fenilpiridina, 2-fenilbenzimidazol, 2-fenilbenzotiazol, 2-(2-tienil)benzotiazol y el 2-(5-(4-(trifluorometil)fenil)tiofen-2-il)benzo[d]tiazol y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ se refiere a la 2,2'-bipiridina o una bipiridina conjugada con un fragmento de cumarina. Se llevará a cabo un análisis detallado de la influencia de la cumarina en las propiedades fotofísicas de los compuestos, así como en la generación de ROS en medios libres de células tras la irradiación con luz azul, verde o roja. Finalmente, también se evaluarán sus propiedades biológicas como fotosensibilizadores con luz verde.

El campo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral es multidisciplinar, por lo que los resultados biológicos obtenidos, la preparación del ligando derivado de cumarina, así como la resolución de estructuras de rayos X han sido realizadas mediante colaboraciones. De esta manera, los estudios biológicos de los Capítulos 2, 3, 4 y 5 han involucrado la colaboración con el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de Brno de la República Checa, mientras que los del Capítulo 6 han sido realizados por Pezhman Ashoo, miembro de nuestro grupo de investigación. Por su parte, el ligando derivado de cumarina utilizado en el Capítulo 6 ha sido preparado por el grupo de investigación del Prof. Dr. Vicente Marchán del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Barcelona. Finalmente, la resolución de las estructuras cristalinas ha sido realizada por la Dra. Delia Bautista Cerezo, del Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia.

1.5. Bibliografía

- (1) ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica, 2019. <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla> (accessed 2024-05-20).
- (2) Carbone, A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers* **2020**, 12 (4), 980. <https://doi.org/10.3390/cancers12040980>.
- (3) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global

- cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **2024**, 74 (2), 136-165.
- (4) Instituto Nacional de Estadística. Defunciones por causas (lista reducida) por sexo y grupos de edad (7947). INE. <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=7947> (accessed 2024-05-20).
 - (5) 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: A Cancer J Clinicians* **2021**, 71 (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
 - (6) OECD (2021). Smoking among adults in Health at a Glance 2021: OECD Indicators. OECD Publishing, Paris, 2021. <https://doi.org/10.1787/611b5b35-en> (accessed 2024-05-20).
 - (7) International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/> (accessed 2024-05-20).
 - (8) United Nations. Population. United Nations. <https://www.un.org/en/global-issues/population> (accessed 2024-05-20).
 - (9) National Cancer Institute. Treatment for Cancer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment> (accessed 2024-05-20).
 - (10) DeVita, V. T., Jr.; Chu, E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, 68 (21), 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
 - (11) National Cancer Institute. Definition of Chemotherapy. *NCI Dictionary of Cancer Terms*. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chemotherapy> (accessed 2024-05-20).
 - (12) Galanski, M.; Jakupiec, M. A.; Keppler, B. K. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12 (18), 2075–2094. <https://doi.org/10.2174/0929867054637626>.
 - (13) Kauffman, G. B.; Pentimalli, R.; Doldi, S.; Hall, M. D. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platin. Met. Rev.* **2010**, 54 (4), 250–256. <https://doi.org/10.1595/147106710X534326>.
 - (14) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, 222 (5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
 - (15) Rosenberg, B.; VanCamp, L. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds. *Cancer Res.* **1970**, 30 (6), 1799–1802.
 - (16) Prestayko, A. W.; D'Aoust, J. C.; Issell, B. F.; Crooke, S. T. Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* **1979**, 6 (1), 17–39. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(79\)80057-2](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(79)80057-2).
 - (17) Galanski, M. S. Recent Developments in the Field of Anticancer Platinum Complexes. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2006**, 1 (2), 285–295. <https://doi.org/10.2174/157489206777442287>.
 - (18) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer. *Philos. Trans. R. Soc., A*. **2015**, 373 (2037), 20140185. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0185>.
 - (19) Gately, D. P.; Howell, S. B. Cellular Accumulation of the Anticancer Agent Cisplatin: A Review. *Br. J. Cancer* **1993**, 67 (6), 1171–1176.

- (20) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (5), 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>.
- (21) Sherman, S. E.; Lippard, S. J. Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug Interactions with DNA. *Chem. Rev.* **1987**, *87* (5), 1153–1181. <https://doi.org/10.1021/cr00081a013>.
- (22) 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>.
- (23) Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.
- (24) Oh, G.-S.; Kim, H.-J.; Shen, A.; Lee, S. B.; Khadka, D.; Pandit, A.; So, H.-S. Cisplatin-Induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press* **2014**, *12* (2), 55–65. <https://doi.org/10.5049/EBP.2014.12.2.55>.
- (25) Köberle, B.; Tomicic, M. T.; Usanova, S.; Kaina, B. Cisplatin Resistance: Preclinical Findings and Clinical Implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806* (2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>.
- (26) 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>.
- (27) Harrap, K. R. Preclinical Studies Identifying Carboplatin as a Viable Cisplatin Alternative. *Cancer Treat. Rev.* **1985**, *12* (Suppl A), 21–33. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(85\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90015-5).
- (28) 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>.
- (29) 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.; Gynecologic Oncology Group. 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. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21* (17), 3194–3200. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.153>.
- (30) Kuwahara, A.; Yamamori, M.; Nishiguchi, K.; Okuno, T.; Chayahara, N.; Miki, I.; Tamura, T.; Inokuma, T.; Takemoto, Y.; Nakamura, T.; Kataoka, K.; Sakaeda, T. Replacement of Cisplatin with Nedaplatin in a Definitive 5-Fluorouracil/Cisplatin-Based Chemoradiotherapy in Japanese Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* **2009**, *6* (6), 305–311.
- (31) 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>.
- (32) Giacchetti, S.; Perpoint, B.; Zidani, R.; Le Bail, N.; Faggiuolo, R.; Focan, C.; Chollet, P.; Llory, J. F.; Letourneau, Y.; Coudert, B.; Bertheaut-Cvitkovic, F.; Larregain-Fournier, D.; Le Rol, A.; Walter, S.; Adam, R.; Misset, J. L.; Lévi, F. Phase III Multicenter Randomized Trial of Oxaliplatin Added to Chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18* (1), 136–147. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.136>.
- (33) Rothenberg, M. L.; Oza, A. M.; Bigelow, R. H.; Berlin, J. D.; Marshall, J. L.; Ramanathan, R. K.; Hart, L. L.; Gupta, S.; Garay, C. A.; Burger, B. G.; Le Bail, N.;

- Haller, D. G. Superiority of Oxaliplatin and Fluorouracil-Leucovorin Compared with Either Therapy Alone in Patients with Progressive Colorectal Cancer after Irinotecan and Fluorouracil-Leucovorin: Interim Results of a Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21 (11), 2059–2069. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.126>.
- (34) Lee, S. Y.; Kim, C. Y.; Nam, T.-G. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, 14, 5375–5392. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S275007>.
- (35) Maksimoska, J.; Williams, D. S.; Atilla-Gokcumen, G. E.; Smalley, K. S. M.; Carroll, P. J.; Webster, R. D.; Filippakopoulos, P.; Knapp, S.; Herlyn, M.; Meggers, E. Similar Biological Activities of Two Isostructural Ruthenium and Osmium Complexes. *Chemistry* **2008**, 14 (16), 4816–4822. <https://doi.org/10.1002/chem.200800294>.
- (36) Durig, J. R.; Danneman, J.; Behnke, W. D.; Mercer, E. E. The Induction of Filamentous Growth in Escherichia Coli by Ruthenium and Palladium Complexes. *Chem. Biol. Interact.* **1976**, 13 (3–4), 287–294. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(76\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0009-2797(76)90081-8).
- (37) Keppler, B. K.; Rupp, W. Antitumor Activity of Imidazolium-Bisimidazole-Tetrachlororuthenate (III). A Representative of a New Class of Inorganic Antitumor Agents. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **1986**, 111 (2), 166–168. <https://doi.org/10.1007/BF00400758>.
- (38) Berger, M. R.; Garzon, F. T.; Keppler, B. K.; Schmähl, D. Efficacy of New Ruthenium Complexes against Chemically Induced Autochthonous Colorectal Carcinoma in Rats. *Anticancer. Res.* **1989**, 9 (3), 761–765.
- (39) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessler, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, a New Redox-Active Anticancer Agent--Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5 (10), 2140–2155. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890195>.
- (40) Lentz, F.; Drescher, A.; Lindauer, A.; Henke, M.; Hilger, R. A.; Hartinger, C. G.; Scheulen, M. E.; Dittrich, C.; Keppler, B. K.; Jaehde, U.; Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. Pharmacokinetics of a Novel Anticancer Ruthenium Complex (KP1019, FFC14A) in a Phase I Dose-Escalation Study. *Anticancer Drugs* **2009**, 20 (2), 97–103. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328322fbc5>.
- (41) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. *Chem. Sci.* **2014**, 5 (8), 2925–2932. <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>.
- (42) Burris, H. A.; Bakewell, S.; Bendell, J. C.; Infante, J.; Jones, S. F.; Spigel, D. R.; Weiss, G. J.; Ramanathan, R. K.; Ogden, A.; Von Hoff, D. Safety and Activity of IT-139, a Ruthenium-Based Compound, in Patients with Advanced Solid Tumours: A First-in-Human, Open-Label, Dose-Escalation Phase I Study with Expansion Cohort. *ESMO Open* **2016**, 1 (6), e000154. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000154>.
- (43) Spratlin, J. L.; O’Kane, G. M.; Oh, D.-Y.; Rha, S. Y.; McWhirter, E.; Elimova, E.; Kavan, P.; Choi, M. K.; Kim, D. W.; Goodwin, R. A.; Hecht, J. R.; Kim, S. T.; Koo, D.-H.; Halani, K.; McAllister, E. R.; Jones, M.; Snow, M.; Lemmerick, Y.; Spera, G.; Pankovich, J. BOLD-100-001 (TRIO039): A Phase 2 Study of BOLD-100 in Combination with FOLFOX in Patients with Advanced mCRC Previously Treated with FOLFOX/CAPOX—Efficacy and Safety Analysis. *JCO* **2024**, 42 (3_suppl), 143–143. https://doi.org/10.1200/JCO.2024.42.3_suppl.143.

- (44) Sava, G.; Gagliardi, R.; Cocchietto, M.; CLERICI, K.; Capozzi, I.; Marrella, M.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Milanino, R. Comparison of the Effects of the Antimetastatic Compound ImH[Trans-RuCl₄(DMSO)Im] (NAMI-A) on the Arthritic Rat and on MCa Mammary Carcinoma in Mice. *Pathol. Oncol. Res.* **1998**, *4* (1), 30–36. <https://doi.org/10.1007/BF02904692>.
- (45) Coluccia, M.; Sava, G.; Salerno, G.; Bergamo, A.; Pacor, S.; Mestroni, G.; Alessio, E. Efficacy of 5-FU Combined to Na[Trans-RuCl₄(DMSO)Im], A Novel Selective Antimetastatic Agent, on the Survival Time of Mice With P388 Leukemia, P388/DDP Subline and MCa Mammary Carcinoma. *Met. Based Drugs* **1995**, *2* (4), 195–199. <https://doi.org/10.1155/MBD.1995.195>.
- (46) Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-Trans-DMSO-Imidazole-Tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (11), 3717–3727. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>.
- (47) Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; van Werkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Phase I/II Study with Ruthenium Compound NAMI-A and Gemcitabine in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer after First Line Therapy. *Invest. New. Drugs* **2015**, *33* (1), 201–214. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>.
- (48) Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic Chemistry, Biology and Medicine: Ruthenium Arene Anticancer Complexes. *Chem. Commun.* **2005**, *38*, 4764–4776. <https://doi.org/10.1039/b508531b>.
- (49) Dale, L. D.; Tocher, J. H.; Dyson, T. M.; Edwards, D. I.; Tocher, D. A. Studies on DNA Damage and Induction of SOS Repair by Novel Multifunctional Bio-reducible Compounds. II. A Metronidazole Adduct of a Ruthenium-Arene Compound. *Anticancer Drug. Des.* **1992**, *7* (1), 3–14.
- (50) Murray, B. S.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. The Development of RAPTA Compounds for the Treatment of Tumors. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 86–114. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.014>.
- (51) Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J. In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (12), 4161–4171. <https://doi.org/10.1021/jm050015d>.
- (52) Chatterjee, S.; Kundu, S.; Bhattacharyya, A.; Hartinger, C.; Dyson, P. The Ruthenium(II)-Arene Compound RAPTA-C Induces Apoptosis in EAC Cells through Mitochondrial and P53-JNK Pathways. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0400-9>.
- (53) Weiss, A.; Berndsen, R. H.; Dubois, M.; Müller, C.; Schibli, R.; Griffioen, A. W.; Dyson, P. J.; Nowak-Sliwinska, P. In Vivo Anti-Tumor Activity of the Organometallic Ruthenium(II)-Arene Complex [Ru(η^6 -p-Cymene)Cl₂(Pta)] (RAPTA-C) in Human Ovarian and Colorectal Carcinomas. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (12), 4742–4748. <https://doi.org/10.1039/C4SC01255K>.
- (54) Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnières, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. Organometallic Ruthenium(II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (11), 3895–3902. <https://doi.org/10.1021/jm2002074>.
- (55) Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. In Vitro and in Vivo Activity and Cross Resistance Profiles of Novel Ruthenium (II) Organometallic Arene Complexes in Human Ovarian Cancer. *Br. J.*

- Cancer*, **2002**, 86 (10), 1652–1657. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600290>.
- (56) Guichard, S. M.; Else, R.; Reid, E.; Zeitlin, B.; Aird, R.; Muir, M.; Dodds, M.; Fiebig, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. Anti-Tumour Activity in Non-Small Cell Lung Cancer Models and Toxicity Profiles for Novel Ruthenium(II) Based Organo-Metallic Compounds. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71 (4), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.053>.
- (57) Kumari, P.; Ghosh, S.; Acharya, S.; Mitra, P.; Roy, S.; Ghosh, S.; Maji, M.; Singh, S.; Mukherjee, A. Cytotoxic Imidazolyl-Mesalazine Ester-Based Ru(II) Complexes Reduce Expression of Stemness Genes and Induce Differentiation of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J. Med. Chem.*, **2023**, 66 (20), 14061–14079. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01092>.
- (58) Chakraborty, A.; Ghosh, S.; Chakraborty, M. P.; Mukherjee, S.; Roy, S. S.; Das, R.; Acharya, M.; Mukherjee, A. Inhibition of NF- κ B-Mediated Proinflammatory Transcription by Ru(II) Complexes of Anti-Angiogenic Ligands in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **2024**, 67 (7), 5902–5923. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00169>.
- (59) Konkankit, C. C.; Marker, S. C.; Knopf, K. M.; Wilson, J. J. Anticancer Activity of Complexes of the Third Row Transition Metals, Rhenium, Osmium, and Iridium. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (30), 9934–9974. <https://doi.org/10.1039/C8DT01858H>.
- (60) Dorcier, A.; Ang, W. H.; Bolaño, S.; Gonsalvi, L.; Juillerat-Jeannerat, L.; Laurency, G.; Peruzzini, M.; Phillips, A. D.; Zanobini, F.; Dyson, P. J. In Vitro Evaluation of Rhodium and Osmium RAPTA Analogues: The Case for Organometallic Anticancer Drugs Not Based on Ruthenium. *Organometallics* **2006**, 25 (17), 4090–4096. <https://doi.org/10.1021/om060394o>.
- (61) Peacock, A. F. A.; Habtemariam, A.; Moggach, S. A.; Prescimone, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. Chloro Half-Sandwich Osmium(II) Complexes: Influence of Chelated N,N-Ligands on Hydrolysis, Guanine Binding, and Cytotoxicity. *Inorg. Chem.* **2007**, 46 (10), 4049–4059. <https://doi.org/10.1021/ic062350d>.
- (62) Cebrián-Losantos, B.; Krokhin, A. A.; Stepanenko, I. N.; Eichinger, R.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Keppler, B. K. Osmium NAMI-A Analogues: Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization, and Antiproliferative Properties. *Inorg. Chem.* **2007**, 46 (12), 5023–5033. <https://doi.org/10.1021/ic700405y>.
- (63) Fu, Y.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; van Rijt, S. H.; Healey, D. J.; Cooper, P. A.; Shnyder, S. D.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Organometallic Osmium Arene Complexes with Potent Cancer Cell Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (22), 8192–8196. <https://doi.org/10.1021/jm100560f>.
- (64) Coverdale, J. P. C.; Bridgewater, H. E.; Song, J.-I.; Smith, N. A.; Barry, N. P. E.; Bagley, I.; Sadler, P. J.; Romero-Canelón, I. In Vivo Selectivity and Localization of Reactive Oxygen Species (ROS) Induction by Osmium Anticancer Complexes That Circumvent Platinum Resistance. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (20), 9246–9255. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00958>.
- (65) Kumar, S. A.; Needham, R. J.; Abraham, K.; Bridgewater, H. E.; Garbutt, L. A.; Xandri-Monje, H.; Dallmann, R.; Perrier, S.; Sadler, P. J.; Lévi, F. Dose- and Time-Dependent Tolerability and Efficacy of Organo-Osmium Complex FY26 and Its Tissue Pharmacokinetics in Hepatocarcinoma-Bearing Mice. *Metallomics* **2020**, 13 (2), mfaa003. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfaa003>.
- (66) Pracharova, J.; Novohradsky, V.; Kostrhunova, H.; Štarha, P.; Trávníček, Z.; Kasparkova, J.; Brabec, V. Half-Sandwich Os(II) and Ru(II) Bathophenanthroline Complexes: Anticancer Drug Candidates with Unusual Potency and a Cellular Activity Profile in Highly Invasive Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Dalton Trans.*

- 2018**, 47 (35), 12197–12208. <https://doi.org/10.1039/C8DT02236D>.
- (67) Novohradsky, V.; Markova, L.; Kostrhunova, H.; Trávníček, Z.; Brabec, V.; Kasparkova, J. An Anticancer Os(II) Bathophenanthroline Complex as a Human Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammosphere Potent Agent That Kills Cells by Necroptosis. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 13327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49774-x>.
- (68) 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>.
- (69) Cuello-Garibo, J.-A.; James, C. C.; Siegler, M. A.; Hopkins, S. L.; Bonnet, S. Selective Preparation of a Heteroleptic Cyclometallated Ruthenium Complex Capable of Undergoing Photosubstitution of a Bidentate Ligand. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25 (5), 1260–1268. <https://doi.org/10.1002/chem.201803720>.
- (70) 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>.
- (71) 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>.
- (72) Li, J.; Zeng, L.; Wang, Z.; Chen, H.; Fang, S.; Wang, J.; Cai, C.-Y.; Xing, E.; Liao, X.; Li, Z.-W.; Ashby Jr, C. R.; Chen, Z.-S.; Chao, H.; Pan, Y. Cycloruthenated Self-Assembly with Metabolic Inhibition to Efficiently Overcome Multidrug Resistance in Cancers. *Adv. Mat.* **2022**, 34 (1), 2100245. <https://doi.org/10.1002/adma.202100245>.
- (73) Feng, T.; Tang, Z.; Shu, J.; Wu, X.; Jiang, H.; Chen, Z.; Chen, Y.; Ji, L.; Chao, H. A Cyclometalated Ruthenium(II) Complex Induces Oncosis for Synergistic Activation of Innate and Adaptive Immunity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63 (31), e202405679. <https://doi.org/10.1002/anie.202405679>.
- (74) Cerón-Camacho, R.; Roque-Ramires, M. A.; Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R. Cyclometalated Osmium Compounds and beyond: Synthesis, Properties, Applications. *Molecules* **2021**, 26 (6), 1563. <https://doi.org/10.3390/molecules26061563>.
- (75) Licon, C.; Delhorme, J.-B.; Riegel, G.; Vidimar, V.; Cerón-Camacho, R.; Boff, B.; Venkatasamy, A.; Tomasetto, C.; Gomes, P. da S. F. C.; Rognan, D.; Freund, J.-N.; Lagadec, R. L.; Pfeffer, M.; Gross, I.; Mellitzer, G.; Gaidon, C. Anticancer Activity of Ruthenium and Osmium Cyclometalated Compounds: Identification of ABCB1 and EGFR as Resistance Mechanisms. *Inorg. Chem. Front.* **2020**, 7 (3), 678–688. <https://doi.org/10.1039/C9QI01148J>.
- (76) 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>.
- (77) Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, 13 (9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.
- (78) Li, X.; Lee, S.; Yoon, J. Supramolecular Photosensitizers Rejuvenate Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47 (4), 1174–1188.

<https://doi.org/10.1039/C7CS00594F>.

- (79) 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>.
- (80) 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>.
- (81) 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>.
- (82) Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S.-G. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater. Res.* **2018**, *22* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
- (83) Lan, M.; Zhao, S.; Liu, W.; Lee, C.-S.; Zhang, W.; Wang, P. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (13), 1900132. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>.
- (84) Simões, J. C. S.; Sarpaki, S.; Papadimitroulas, P.; Therrien, B.; Loudos, G. Conjugated Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (23), 14119–14150. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00047>.
- (85) Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. Photodynamic Therapy of Cancer. Basic Principles and Applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10* (3), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0172-2>.
- (86) 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](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- (87) 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>.
- (88) 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>.
- (89) Yun, S. H.; Kwok, S. J. J. Light in Diagnosis, Therapy and Surgery. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41551-016-0008>.
- (90) Bonnet, S. Ruthenium-Based Photoactivated Chemotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (43), 23397–23415. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c01135>.
- (91) Worth, K. R.; Papandreou, I.; Hammond, E. M. How the Histological Structure of Some Lung Cancers Shaped Almost 70 Years of Radiobiology. *Br. J. Cancer* **2023**, *128* (3), 407–412. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02041-9>.
- (92) Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Castillejos, M. C.; Romero-Ben, E.; Rosales-Barrios, C.; Khair, N. Photodynamic Therapy: Photosensitizers and Nanostructures. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5* (10), 3788–3812.

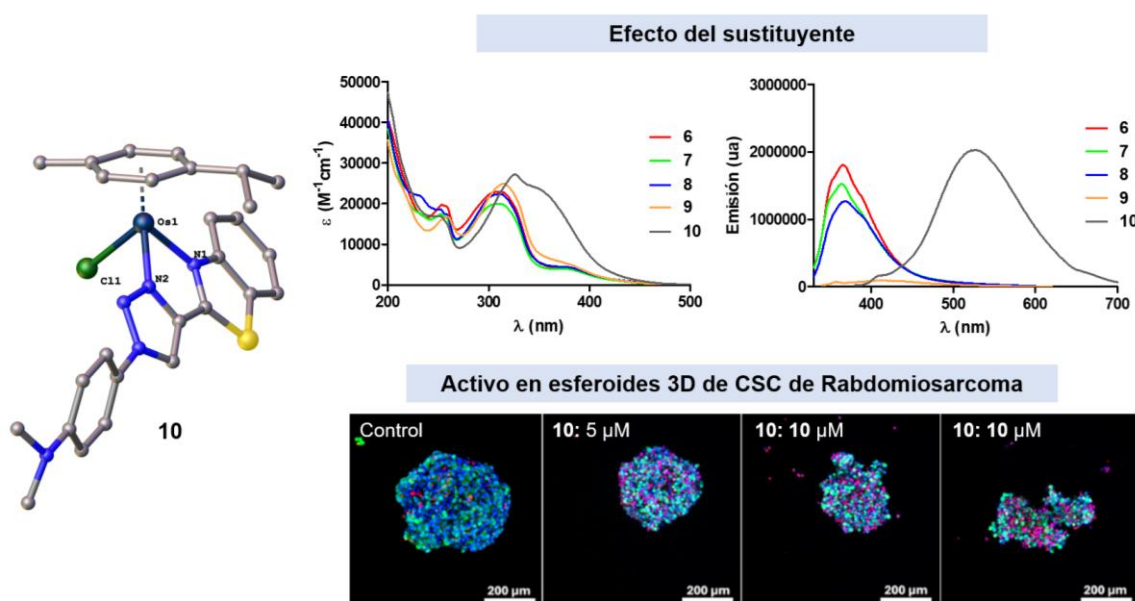
- <https://doi.org/10.1039/D0QM00922A>.
- (93) Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Therapy and Its Applications. *Oncotarget* **2017**, *8* (46), 81591–81603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20189>.
 - (94) Lo, P.-C.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Pandey, R. K.; Ng, 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>.
 - (95) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85* (5), 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
 - (96) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
 - (97) 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.; Benzaghrou, 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](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30661-1).
 - (98) Ashur, I.; Goldschmidt, R.; Pinkas, I.; Salomon, Y.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Scherz, A. Photocatalytic Generation of Oxygen Radicals by the Water-Soluble Bacteriochlorophyll Derivative WST11, Noncovalently Bound to Serum Albumin. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (28), 8027–8037. <https://doi.org/10.1021/jp900580e>.
 - (99) Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (11), 2727–2736. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00180>.
 - (100) Conti, L.; Macedi, E.; Giorgi, C.; Valtancoli, B.; Fusi, V. Combination of Light and Ru(II) Polypyridyl Complexes: Recent Advances in the Development of New Anticancer Drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *469*, 214656. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214656>.
 - (101) McFarland, S. A.; Mandel, A.; Dumoulin-White, R.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: The Future of Multimodal Oncology? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *56*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.10.004>.
 - (102) Shi, G.; Monro, S.; Hennigar, R.; Colpitts, J.; Fong, J.; Kasimova, K.; Yin, H.; DeCoste, R.; Spencer, C.; Chamberlain, L.; Mandel, A.; Lilge, L.; McFarland, S. A. Ru(II) Dyads Derived from α -Oligothiophenes: A New Class of Potent and Versatile Photosensitizers for PDT. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *282–283*, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.012>.
 - (103) Pozza, M. D.; Mesdom, P.; Abdullrahman, A.; Prieto Otoy, 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>.

- (104) Li, S.; Zhao, J.; Wang, X.; Xu, G.; Gou, S.; Zhao, Q. Design of a Tris-Heteroleptic Ru(II) Complex with Red-Light Excitation and Remarkably Improved Photobiological Activity. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (15), 11193–11204. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01860>.
- (105) 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>.
- (106) 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>.
- (107) McCain, J.; Colón, K. L.; Barrett, P. C.; Monro, S. M. A.; Sainuddin, T.; Roque III, J.; Pinto, M.; Yin, H.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Photophysical Properties and Photobiological Activities of Ruthenium(II) Complexes Bearing π -Expansive Cyclometalating Ligands with Thienyl Groups. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (16), 10778–10790. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01044>.
- (108) Jing, S.; Wu, X.; Niu, D.; Wang, J.; Leung, C.-H.; Wang, W. Recent Advances in Organometallic NIR Iridium(III) Complexes for Detection and Therapy. *Molecules* **2024**, *29* (1), 256. <https://doi.org/10.3390/molecules29010256>.
- (109) Viguera, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kosthunova, 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>.
- (110) Feng, T.; Tang, Z.; Karges, J.; Shu, J.; Xiong, K.; Jin, C.; Chen, Y.; Gasser, G.; Ji, L.; Chao, H. An Iridium(III)-Based Photosensitizer Disrupting the Mitochondrial Respiratory Chain Induces Ferritinophagy-Mediated Immunogenic Cell Death. *Chem. Sci.* **2024**, *15* (18), 6752–6762. <https://doi.org/10.1039/D4SC01214C>.
- (111) Redrado, M.; Romanos, E.; Benedi, A.; Canudo-Barreras, G.; Marzo, I.; Gimeno, M. C.; Fernández-Moreira, V. Synthetic Ease and Exceptional in Vivo Performance of Pyrazole-Based Cyclometallated Iridium Complexes. *Inorg. Chem. Front.* **2024**, *11* (6), 1828–1838. <https://doi.org/10.1039/D3QI02355A>.
- (112) Zhou, X.-Q.; Wang, P.; Ramu, V.; Zhang, L.; Jiang, S.; Li, X.; Abyar, S.; Papadopoulou, P.; Shao, Y.; Bretin, L.; Siegler, M. A.; Buda, F.; Kros, A.; Fan, J.; Peng, X.; Sun, W.; Bonnet, S. In Vivo Metallophilic Self-Assembly of a Light-Activated Anticancer Drug. *Nat. Chem.* **2023**, *15* (7), 980–987. <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01199-w>.
- (113) Barry, N. P. E.; Sadler, P. J. Challenges for Metals in Medicine: How Nanotechnology May Help to Shape the Future. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 5654–5659. <https://doi.org/10.1021/nn403220e>.
- (114) Wei, F.; Chen, Z.; Shen, X.-C.; Ji, L.; Chao, H. Recent Progress in Metal Complexes Functionalized Nanomaterials for Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2023**, *59* (46), 6956–6968. <https://doi.org/10.1039/D3CC01355C>.
- (115) Zhang, Y.; Fu, H.; Chen, S.; Liu, B.; Sun, W.; Gao, H. Construction of an Iridium(III)-Complex-Loaded MOF Nanoplatfrom Mediated with a Dual-Responsive Polycationic Polymer for Photodynamic Therapy and Cell Imaging. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (5), 762–765. <https://doi.org/10.1039/C9CC09357E>.

- (116) Ocaña-Arakachi, K.; Martínez-Herculano, J.; Jurado, R.; Llaguno-Munive, M.; García-Lopez, P. Pharmacokinetics and Anti-Tumor Efficacy of PEGylated Liposomes Co-Loaded with Cisplatin and Mifepristone. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (10), 1337. <https://doi.org/10.3390/ph16101337>.
- (117) Hu, H.; Chen, J.; Zhang, F.; Sheng, Z.; Yang, Y.; Xie, Y.; Zhou, L.; Liu, Y. Evaluation of Efficiency of Liposome-Entrapped Iridium(III) Complexes Inhibiting Tumor Growth In Vitro and In Vivo. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, (18), 12345-12356. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01026>.
- (118) Xiang, H.; Chen, H.; Tham, H. P.; Phua, S. Z. F.; Liu, J.-G.; Zhao, Y. Cyclometalated Iridium(III)-Complex-Based Micelles for Glutathione-Responsive Targeted Chemotherapy and Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (33), 27553–27562. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09506>.
- (119) Bonelli, J.; Ortega-Forte, E.; Viguera, G.; Bosch, M.; Cutillas, N.; Rocas, J.; Ruiz, J.; Marchán, V. Polyurethane–Polyurea Hybrid Nanocapsules as Efficient Delivery Systems of Anticancer Ir(III) Metallodrugs. *Inorg. Chem. Front.* **2022**, *9* (10), 2123–2138. <https://doi.org/10.1039/D1QI01542G>.
- (120) Bonelli, J.; Ortega-Forte, E.; Viguera, G.; Follana-Berná, J.; Ashoo, P.; Abad-Montero, D.; Isidro, N.; López-Corrales, M.; Hernández, A.; Ortiz, J.; Izquierdo-García, E.; Bosch, M.; Rocas, J.; Sastre-Santos, Á.; Ruiz, J.; Marchán, V. A Nanoencapsulated Ir(III)-Phthalocyanine Conjugate as a Promising Photodynamic Therapy Anticancer Agent. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (30), 38916–38930. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c05181>.

Capítulo 2

Areno-complejos de Os(II) con ligandos derivados de 2-(1-(aril)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol efectivos frente a células madre de rabdomiosarcoma



Los ensayos biológicos presentados en este capítulo han sido realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec, del Instituto de Biofísica de la República Checa.

2.1. Introducción

Las CSC constituyen una pequeña subpoblación de células tumorales con capacidad de autorrenovación, diferenciación y formación de tumores secundarios o terciarios.¹ Aunque los complejos de platino han tenido gran éxito en el tratamiento del cáncer, la quimioterapia convencional no es eficaz contra las CSC.² De hecho, se cree que estas son responsables de la recaída y la metástasis del cáncer.³ Por ello, es necesario desarrollar nuevas terapias y modalidades de tratamiento capaces de erradicar tanto las células cancerosas de rápido crecimiento como las CSC. En este contexto, Lippard y col. describieron un complejo de osmio(VI) (**Figura 2.1**), que representa el primer complejo basado en este metal con toxicidad selectiva contra poblaciones de células HMLER enriquecidas con CSC de mama.⁴ Las células HMLER son una línea celular derivada de células epiteliales mamarias humanas, modificadas para expresar ciertos oncogenes. Además, tal y como se menciona en el Capítulo 1, Brabec y col. han desarrollado recientemente un areno-complejo de Os(II) con batofenantrolina (**Figura 1.10**), que mostró mayor eficacia contra las células madre de cáncer de mama humano que la salinomicina, el fármaco utilizado clínicamente.^{5,6}

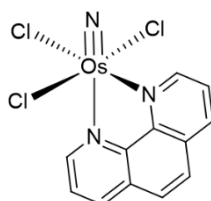
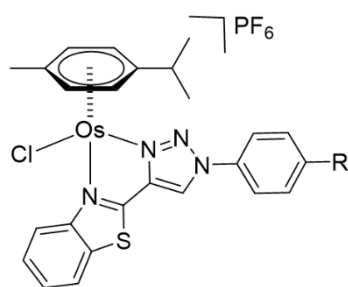


Figura 2.1. Estructura general del complejo de Os(VI) preparado por Lippard y col.⁴

Por otro lado, los heterociclos de benzotiazol y de 1,2,3-triazol son estructuras químicas presentes en diversos fármacos y moléculas biológicamente activas.⁷ Por ejemplo, un derivado del 2-aminobenzotiazol, conocido como BLZ945, se encuentra en fase I/II como tratamiento de segunda línea para el glioblastoma (NCT02829723).⁸ Además, estos heterociclos forman parte de la estructura de ligandos en complejos metálicos con actividad biológica, como ejemplifican ciertos complejos de Ru(II).^{9–11} De hecho, recientemente nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de derivados de 2-(1-aryl-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol con propiedades bioactivas,¹² así como una familia de complejos de Ru(II) fotoactivables que contienen dichos ligandos, y presentan fórmula general $[Ru(phen)_2(N^{\wedge}N)]^{2+}$.¹³

Por consiguiente, con el objetivo de estudiar nuevos complejos de Os(II) que incorporen fragmentos bioactivos y actúen contra CSC, en este capítulo se describe la síntesis y caracterización de nuevos compuestos de osmio de tipo $[Os(\eta^6-p-$

cimeno)(N[^]N)Cl]PF₆ (**Figura 2.2**). En ellos el ligando N[^]N se basa en un núcleo de benzotiazol y un fragmento de 1,2,3-triazol con distintos sustituyentes, con el fin de establecer una relación estructura-actividad. Asimismo, se describe el estudio de estabilidad e hidrólisis en medio acuoso, y su interacción con la seroalbúmina (HSA). A continuación, se presentan los resultados de los ensayos biológicos *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer, incluida la línea celular de rhabdomyosarcoma (RD), un tipo de sarcoma frecuente en la infancia y adolescencia. Finalmente, se analiza el mecanismo de acción del mejor candidato de la serie en células de RD, incluyendo el estudio de su eficacia contra células madre cancerígenas.



R = -CH₃ (**6**), -F (**7**), -CF₃ (**8**), -NO₂ (**9**), -NMe₂ (**10**)

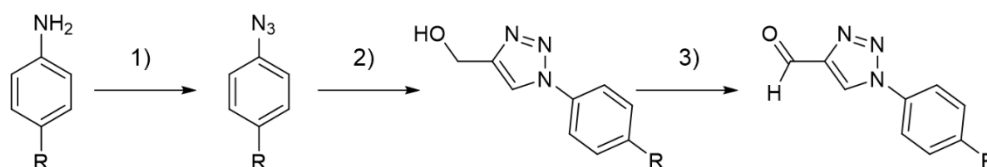
Figura 2.2. Estructura general de los complejos sintetizados en este capítulo.

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Síntesis de los nuevos compuestos

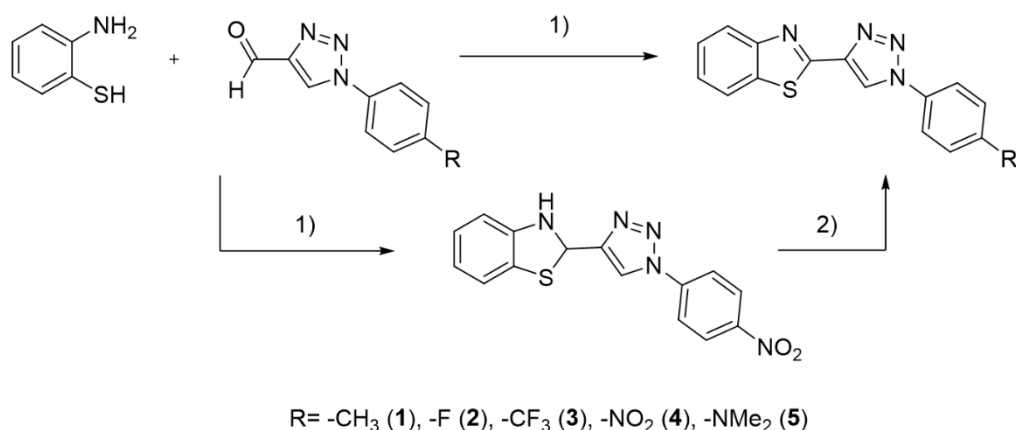
Síntesis de ligandos 2-(1-(aril)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol

En primer lugar, se prepararon los ligandos derivados de 2-(1-(aril)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol (**1-5**) que contienen sustituyentes con diferente naturaleza electroaceptora o electrodadora: metilo, flúor, trifluorometilo, nitro y dimetilamino, respectivamente. La ruta sintética se basa en un procedimiento descrito en la bibliografía que consta de cuatro etapas de reacción y que se resumen a continuación en los **Esquemas 2.1 y 2.2**.¹²



R = -CH₃ (**1**), -F (**2**), -CF₃ (**3**), -NO₂ (**4**), -NMe₂ (**5**)

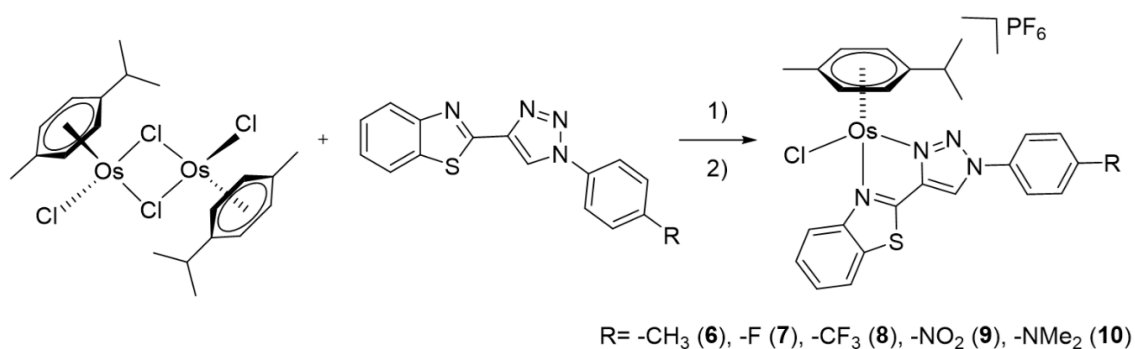
Esquema 2.1. Procedimiento de síntesis para los correspondientes aldehídos. **1)** i) NaNO₂, HCl (c), H₂O, 0 °C, 1 h; ii) NaN₃, H₂O, 0 °C, 15 min; iii) t.a., 2 h. **2)** Alcohol propargílico, CuSO₄·5H₂O (5 % mol), ascorbato de sodio (10 % mol), ^tBuOH /H₂O (1:1), t.a., 72 h. **3)** i) (COCl)₂, DMSO, CH₂Cl₂, -78 °C, atm., N₂, 15 min; ii) CH₂Cl₂, -78 °C, atm. N₂, 15 min; iii) Et₃N, atm N₂, -78 °C, 15 min, t.a., 24 h.



Esquema 2.2. Procedimiento de síntesis para la obtención de los compuestos **1-5**. **1)** TFA (5 % mol), EtOH, t.a., 24 h. **2)** DDQ, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h.

Síntesis de los nuevos areno-complejos de Os(II)

Los compuestos **6-10** se prepararon siguiendo el procedimiento descrito previamente en la bibliografía.¹⁴⁻¹⁶ En primer lugar, se preparó el dímero de osmio [OsCl(μ-Cl)(η⁶-*p*-cimeno)]₂ mediante la reacción del OsCl₃ con α-terpineno en etanol a 80 °C durante 24 h y bajo atmósfera de nitrógeno.^{17,18} Seguidamente, el dímero se hizo reaccionar con los ligandos correspondientes (**1-5**) en metanol a 65 °C y bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 h. Finalmente, se adicionó NH₄PF₆ para sustituir el contraión cloruro y se dejó reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente (**Esquema 2.3**).^{14,19}



Esquema 2.3. Procedimiento de síntesis para la obtención de los compuestos **6-10**. **1)** MeOH, 65 °C, 2 h, N₂. **2)** NH₄PF₆, MeOH, t.a, 24 h.

2.2.2. Caracterización de los nuevos complejos de osmio

Los nuevos complejos sintetizados se caracterizaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectros bidimensionales), RP-HPLC-MS, análisis elemental y espectrometría de masas.

Espectroscopía de RMN

Los espectros de los compuestos de Os(II) se registraron en acetonitrilo deuterado (CD₃CN) y las señales de protón se asignaron a partir de los espectros bidimensionales:

$[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY, $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY y $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC. Todos los espectros se recogen en las **Figuras A1.1-A1.26** del Anexo I. En la **Figura 2.3** aparece representada la numeración que se va a utilizar para la asignación de las resonancias de los espectros de ^1H -RMN.

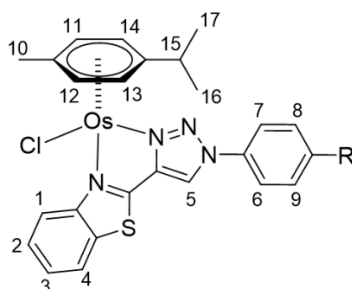


Figura 2.3. Numeración utilizada para asignar las resonancias de los espectros de ^1H -RMN.

Los espectros de ^1H -RMN de todos los complejos muestran resonancias aromáticas entre δ 9,5-6,0 ppm. También, en todos los casos se observan las señales alifáticas del anillo de *p*-cimeno: dos dobletes en torno a δ 0,9 y 1,0 ppm ($\text{H}_{16}+\text{H}_{17}$), un multiplete en torno a δ 2,5 ppm (grupo isopropilo, H_{15}) y un singlete en torno a δ 2,3 ppm (grupo metilo, H_{10}). Por su parte, en los espectros de los compuestos **6** y **10** se pueden observar las señales de protón correspondientes a los grupos alifáticos (-R), los cuales aparecen como singletes a δ 2,5 ppm (H_{Me} para **6**) y 3,0 ppm (H_{NMe_2} para **10**), respectivamente (**Figura 2.4**).

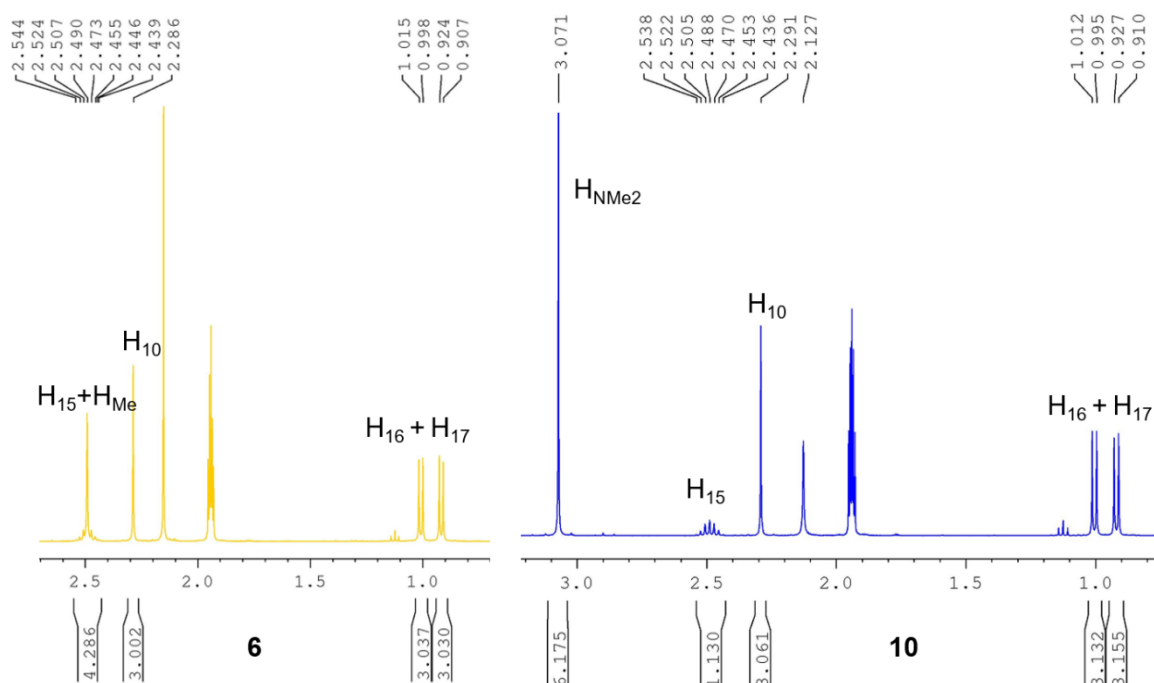


Figura 2.4. Espectros de ^1H -RMN donde se observan las señales correspondientes al grupo isopropilo y metilo del anillo de *p*-cimeno y las señales del grupo metilo del compuesto **6** y del dimetilamino del compuesto **10**.

Cabe mencionar que los cuatro protones aromáticos H_{11} - H_{14} son magnéticamente diferentes debido a la coordinación de los ligandos quelato $N^{\wedge}N$ **1-5**. La simetría C_{2v} de los complejos disminuye, y las señales correspondientes a los cuatro protones aromáticos del anillo de *p*-cimeno aparecen como cuatro dobletes distintos entre 6,2 y 6,5 ppm.

Por otro lado, es posible comparar la zona aromática de los compuestos **6-10** para estudiar la influencia de los distintos sustituyentes en los desplazamientos de las resonancias de protón del ligando $N^{\wedge}N$. En la **Figura 2.5** se puede observar que las señales de protón correspondientes al fenilo que contiene el sustituyente (H_{6+7} y H_{8+9}), así como la señal de protón del anillo de triazol (H_5) se ven claramente afectadas. Tomando como referencia el compuesto **6**, cuando el sustituyente es electroceptor ($-CF_3$ (**8**) y $-NO_2$ (**9**)) se produce un desplazamiento a campo bajo, mientras que si el sustituyente es electrodador ($-NMe_2$ (**10**)), se produce a campo alto por el apantallamiento que sufren. Por su parte, las resonancias de los protones aromáticos del anillo de *p*-cimeno (H_{11-14}), así como las del núcleo de benzotiazol (H_{1-4}) se ven muy poco afectadas.

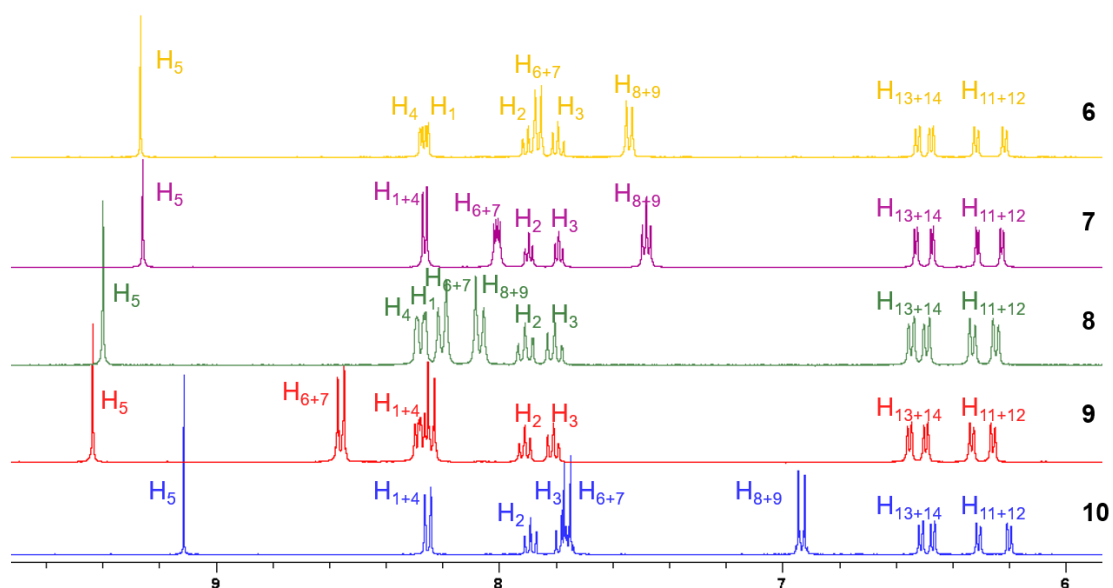


Figura 2.5. Superposición de la zona aromática de los espectros de 1H -RMN de **6-10** en CD_3CN .

Análisis elemental y cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS)

Con el fin de completar la caracterización estructural se obtuvieron los datos de análisis elemental, así como los espectros de masas en modo positivo mediante ESI-MS (**Figuras A1.27-A1.31**) y HPLC-MS (**Figuras A1.32 y A1.33**). Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas se resumen en la **Tabla 2.1**, confirmando de esta forma la estequiometría propuesta y una pureza superior al 95 % en todos los casos. De igual forma, para todos ellos, el espectro de masas obtenido muestra un pico mayoritario que se corresponde al ion molecular $[M-PF_6]^+$ cuyo perfil isotópico se ajusta con el esperado teóricamente.

Tabla 2.1. Valores de análisis elemental y de HPLC-MS obtenidos para los nuevos compuestos.

Compuesto	Análisis elemental ^a (%)				HPLC-MS ^a		
	C	H	N	S	t _R (min)	Fragmento	m/z
6	39,24	3,11	6,96	4,09	11,54	[M-PF ₆] ⁺	653,1226
	(39,17)	(3,29)	(7,03)	(4,02)			(653,1182)
7	37,43	2,70	6,89	3,93	10,93	[M-PF ₆] ⁺	657,0977
	(37,48)	(2,89)	(6,99)	(4,00)			(657,0931)
8	36,54	2,58	6,67	3,68	12,11	[M-PF ₆] ⁺	707,0938
	(36,69)	(2,72)	(6,58)	(3,77)			(707,0899)
9	36,42	2,68	8,47	3,74	10,89	[M-PF ₆] ⁺	684,0900
	(36,26)	(2,80)	(8,46)	(3,87)			684,0876
10	39,26	3,46	8,36	3,82	11,98	[M-PF ₆] ⁺	682,1460
	(39,25)	(3,54)	(8,48)	(3,88)			(682,1447)

^aValores calculados teóricamente entre paréntesis.

2.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

La estructura molecular de **8** y **10** se confirmó mediante difracción de rayos X de monocristal. En ambos casos, los monocristales se obtuvieron por difusión lenta de éter etílico en una disolución saturada de acetonitrilo durante 3 días a 5 °C. La toma de datos y el refinamiento de las estructuras cristalinas fue realizado por la Dra. Delia Bautista del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. En la **Figura 2.6** se muestran las estructuras cristalinas de los compuestos **8** y **10**, y en la **Tabla 2.2** se resumen parte de sus datos cristalográficos, incluyendo las dimensiones de la celdilla unidad. El resto de datos cristalográficos de las estructuras se recogen en las **Tablas A1.1-A1.2**.

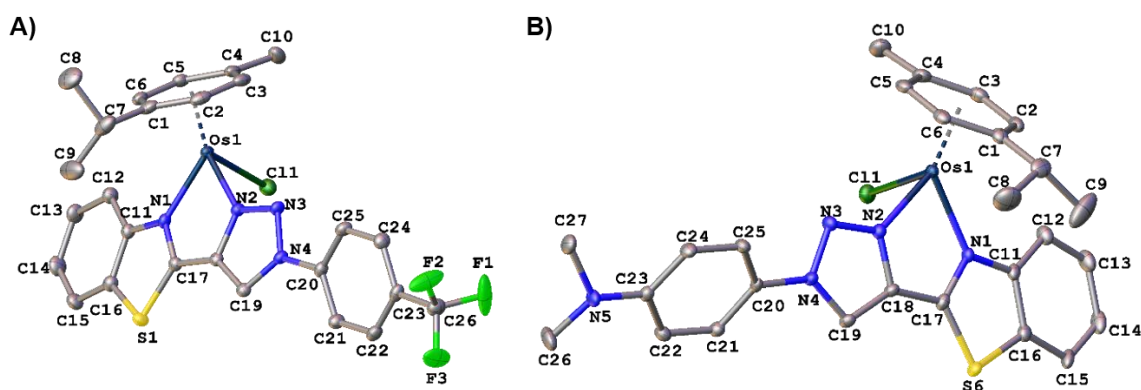


Figura 2.6. Estructuras cristalinas de los compuestos **8** (A) y **10** (B). Los elipsoides se han representado al 50 % de probabilidad y los átomos de hidrógeno y el contraíón se han omitido por claridad.

Tabla 2.2. Datos cristalográficos de los compuestos **8** y **10**.

8	Sistema cristalino	Ortorrómbico	Grupo espacial	Pbcn
	Fórmula empírica	C ₂₆ H ₂₃ ClF ₉ N ₄ OsPS	Z	8
	Dimensiones de la celdilla unidad^a			
	a (Å)	26,697(4)	α (°)	90
	b (Å)	9,8177(15)	β (°)	90
	c (Å)	21,815(3)	γ (°)	90
	Sistema cristalino	Ortorrómbico	Grupo espacial	Pccn
10	Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₉ ClF ₆ N ₅ OsPS	Z	8
	Dimensiones de la celdilla unidad^a			
	a (Å)	25,037(2)	α (°)	90
	b (Å)	10,6927(11)	β (°)	90
	c (Å)	21,7489(18)	γ (°)	90
	Sistema cristalino	Ortorrómbico	Grupo espacial	Pccn
	Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₉ ClF ₆ N ₅ OsPS	Z	8

^aLos valores entre paréntesis indican la desviación estándar de la medida.

Las estructuras cristalinas de ambos compuestos confirman la estructura molecular propuesta. Los complejos **8** y **10** presentan una geometría pseudo-octaédrica de tipo “taburete de piano”, que es característica de los complejos de tipo semi-sándwich. El ligando η^6 -*p*-cimeno se une al centro metálico a través de la nube π , los ligandos N^N-dadores presentan un modo de coordinación quelato bidentado (κ^2 -N,N), y el ligando cloruro ocupa la sexta posición de coordinación. En ambos casos, cristalizan con una estructura cuya celdilla unidad pertenece al sistema cristalino ortorrómbico, aunque presentan distintos grupos espaciales (Pbcn y Pccn para **8** y **10**, respectivamente). Por su parte, el número de unidades fórmulas de cada celdilla unidad (Z) es ocho en ambos casos. Cabe destacar que los átomos de flúor del grupo trifluorometilo (**8**) se encuentran desordenados en dos posiciones, con proporciones 56:44 (%). Por otro lado, las distancias de enlace Os-N (2,064-2,112 Å) y Os-Cl (2,3949 Å) se encuentran dentro del intervalo descrito para complejos de osmio de estructura similar,^{14,15} y no muestran diferencias significativas con un sustituyente u otro (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Distancias y ángulos de enlace característicos de las estructuras cristalinas de los complejos **8** y **10**.^a

Enlace		8	10
Distancia (Å)	Os-N1	2,112(2)	2,114(2)
	Os-N2	2,064(2)	2,072 (2)
	Os-Cl	2,3949(7)	2,3958(6)
	Os-C ₉ (<i>p</i> -cimeno)	1,6808(12)	1,6774(11)

Ángulo (°)	N2-Os-N1	75,15(8)	75,29(8)
	N1-Os-Cl	81,96(6)	82,61 (6)
	N2-Os-Cl	83,98(6)	83,05(6)

^aLos valores entre paréntesis indican la desviación estándar de la medida. C_g: centroide del plano.

Respecto a las interacciones intermoleculares e intramoleculares, en el compuesto **8** se observan interacciones por enlace de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno (H19) del anillo de triazol y dos átomos de flúor (F33 y F35) del anión hexafluorofosfato, mientras que en el complejo **10** se establecen diferentes enlaces de hidrógeno los cuales quedan recogidos en la **Tabla 2.4**. En la **Figura 2.7** se muestran las interacciones de hidrógeno que se encuentran en el compuesto **8**.

Tabla 2.4. Enlaces de hidrógeno observados en las estructuras de los compuestos **8** y **10**.

Comp.	D-H...A	d(D-H) (Å)	d(H...A) (Å)	d(D...A) (Å)	<(DHA) (°)
8	C(19)-H(19)...F(33) ^a	0,95	2,36	3,004(3)	124,5
	C(19)-H(19)...F(35) ^a	0,95	2,43	3,358(3)	164,4
10	C(19)-H(19)...F(6) ^b	0,95	2,44	3,176(3)	134,7
	C(25)-H(25)...Cl(1) ^c	0,95	2,73	3,683(3)	177,3
	C(26)-H(26C)...F(3) ^d	0,98	2,53	3,132(4)	119,8
	C(27)-H(27C)...F(6) ^e	0,98	2,49	3,316(3)	141,2

Transformación de simetría utilizada para generar los átomos equivalentes: ^a-x+1, -y+2, -z+1; ^b-x+3/2, -y+3/2, z; ^c-x+1, y-1/2, -z+3/2; ^dx-1/2, y+1/2, -z+1; ^ex-1/2, y-1/2, -z+1.

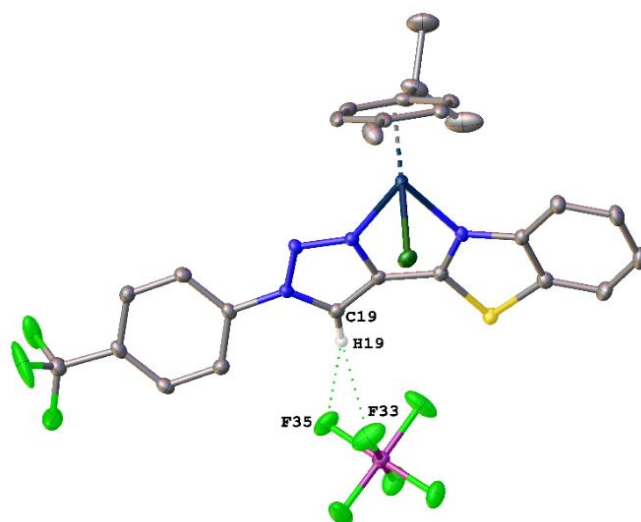


Figura 2.7. Interacciones de hidrógeno intermoleculares en la estructura cristalina de **8**. Los elipsoides se han representado al 50 % de probabilidad.

Por otro lado, el empaquetamiento del compuesto **10** está organizado por interacciones π - π , las cuales quedan recogidas en la **Tabla 2.5**. En la **Figura 2.8** se

muestran las interacciones π - π que se establecen entre el plano 2 (marrón) y el plano 3 (azul), así como las interacciones entre los planos 1 (rosas) localizados en los núcleos de benzotiazol.

Tabla 2.5. Parámetros geométricos de las interacciones π - π del compuesto **10**.

Interacción π - π^a	Distancia centroide-centroide (Å)	Ángulo plano-plano (°)	Desplazamiento
Plano 1- Plano 1	3,470(2)	1,60(12)	0,743
Plano 2- Plano 3	4,0157(14)	11,57(8)	2,304(4)/1,597(4)

^aPlano 1 (C11, C12, C13, C14, C15 y C16), Plano 2 (C1, C2, C3, C4, C5 y C6) y Plano 3 (C20, C21, C22, C23, C24 y C25).

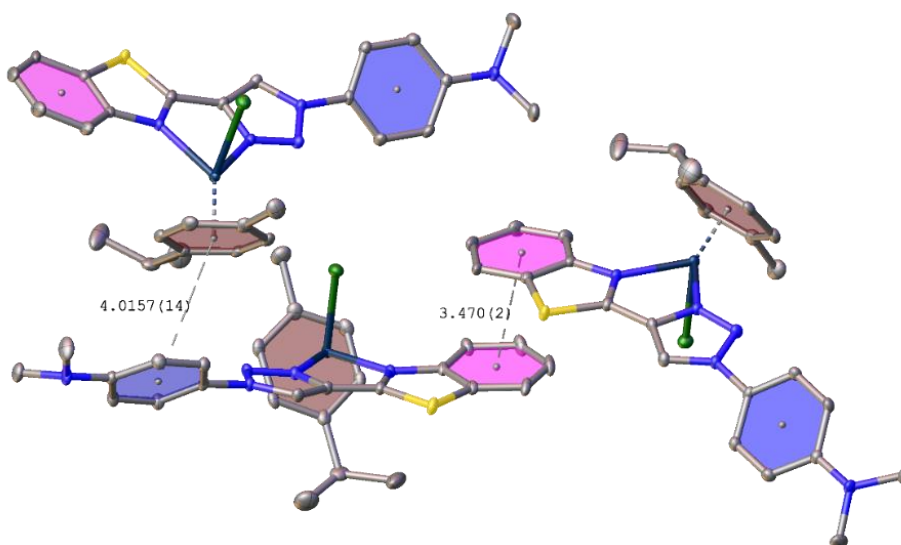


Figura 2.8. Interacciones intermoleculares π - π en la estructura del compuesto **10**.

Finalmente, el empaquetamiento de los compuestos **8** y **10** también está organizado por interacciones $C-H\cdots\pi$, que se recogen en la **Tabla 2.6** y se ilustran en la **Figura 2.9**. En ambos casos, las interacciones $C-H\cdots\pi$ se producen entre átomos de hidrógeno del grupo isopropilo y los planos del núcleo de benzotiazol del ligando $N^{\wedge}N$.

Tabla 2.6. Parámetros geométricos de las interacciones $C-H\cdots\pi$.

Compuesto	Interacción $C-H\cdots\pi$	Distancia $C-H\cdots Cg$ (Å)	Ángulo $C-H\cdots Cg$ (°)
8^a	C(9)-H(9B) $\cdots$ Plano 1	2,98	139
10^b	C(9)-H(9A) $\cdots$ Plano 1	2,95	137
	C(9)-H(9C) $\cdots$ Plano 4	2,94	164

^aPlano 1 (S1, C16, C11, N1, C17). ^bPlano 1 (C11, C12, C13, C14, C15 y C16) y Plano 4 (S6, C16, C11, N1, C17)

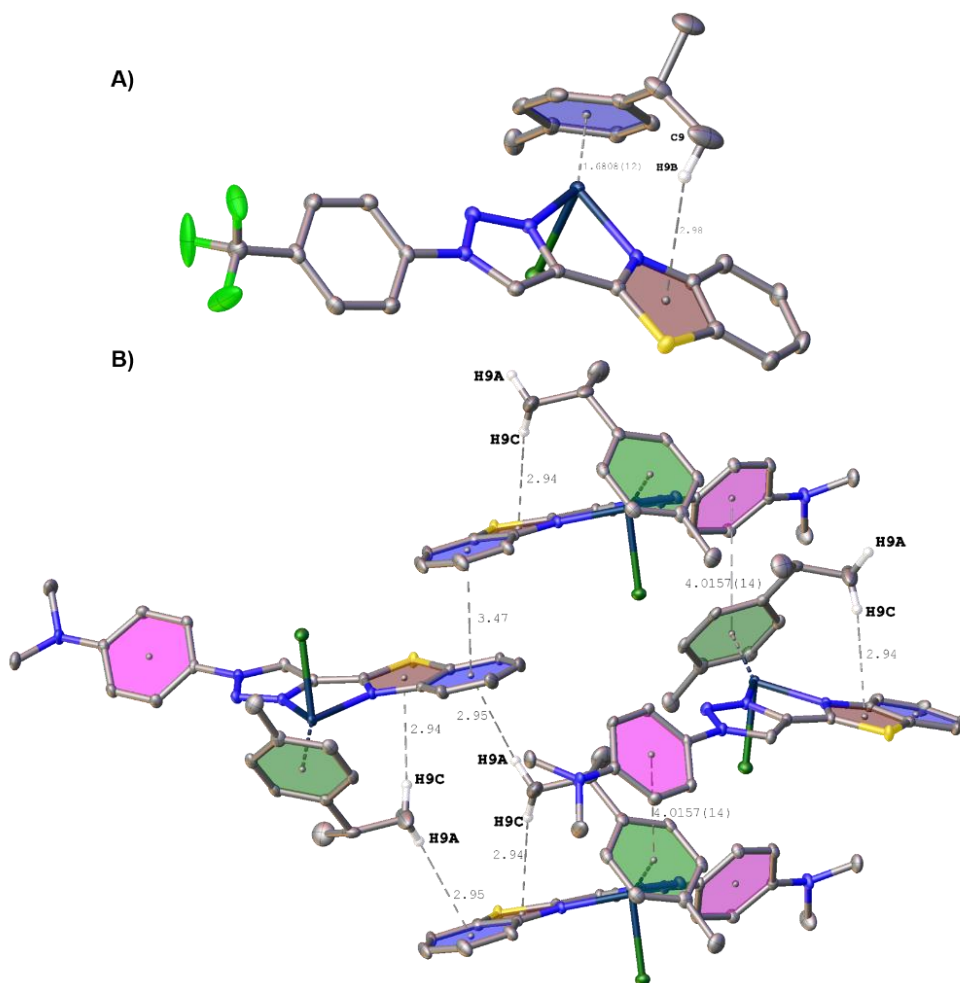


Figura 2.9. Interacciones intermoleculares CH... π en la estructura de los compuesto **8** (A) y del compuesto **10** (B).

2.2.4. Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos

Tras finalizar la caracterización estructural de los areno-complejos se investigaron sus propiedades fotofísicas en acetonitrilo y DMSO. En primer lugar, se registraron los espectros de absorción UV/Vis a una concentración de 50 μM a temperatura ambiente (**Figura 2.10**). Todos los compuestos presentan bandas de absorción intensas entre 260 y 330 nm con coeficientes de extinción de $\sim 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, correspondientes a transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ del sistema aromático de los ligandos *p*-cimeno y N[^]N quelato. La banda a $\sim 380 \text{ nm}$ y coeficiente de extinción de $\sim 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ puede asignarse a la transferencia de carga metal-ligando (MLCT). Cabe destacar que en el compuesto **10**, la banda de menor energía sufre desplazamiento batocrómico en comparación con el resto de los complejos sintetizados, debido al carácter dador de su sustituyente ($-\text{NMe}_2$).²⁰

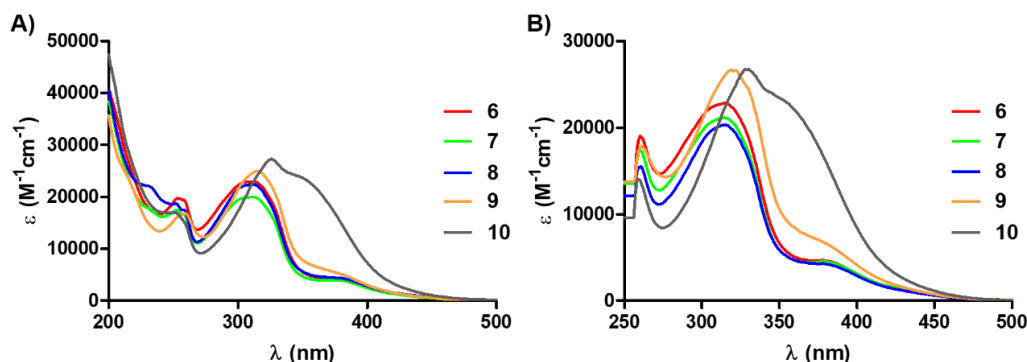


Figura 2.10. Espectro de absorción UV/Vis de los compuestos **6-10** (50 μM) en: **A)** acetonitrilo; y **B)** DMSO.

Los espectros de emisión se registraron en DMSO a una concentración de 50 μM y un ancho de emisión de 5 nm. Excepto el compuesto **9**, todos los complejos resultaron emisores en dicho disolvente, destacando el complejo **10** por presentar una banda de emisión intensa y ancha, cuyo máximo se encuentra desplazado a mayores longitudes de onda (529 nm) (**Figura 2.11.A**). Estos resultados de emisión son similares a los obtenidos para los ligandos libres.¹²

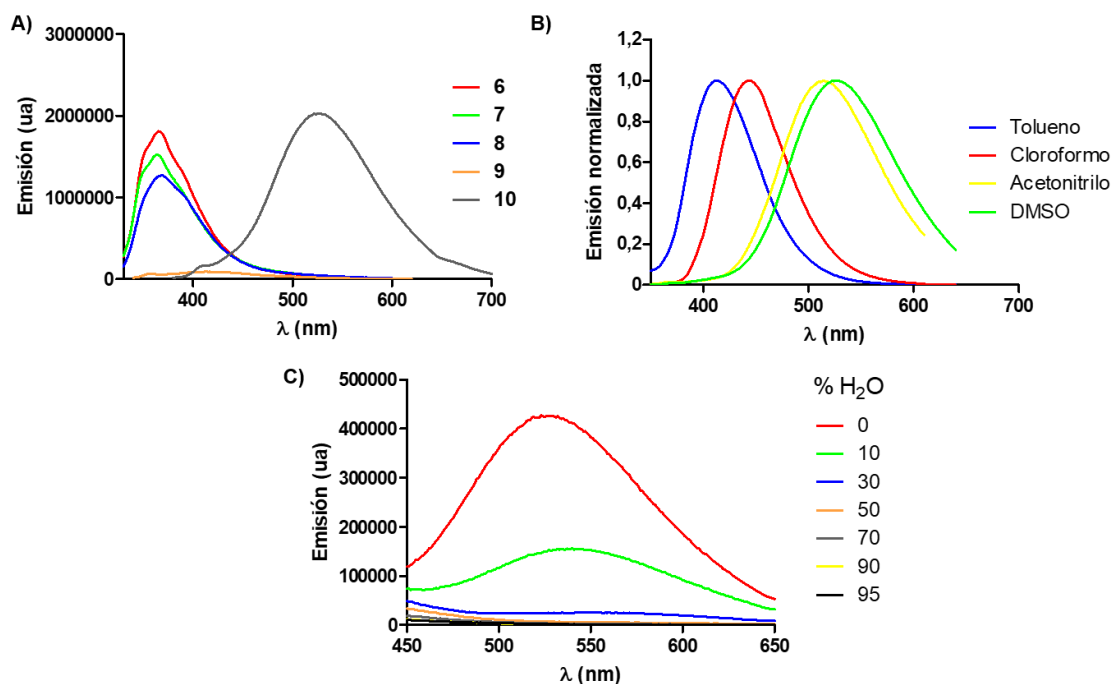


Figura 2.11. A) Espectros de emisión de los compuestos **6-8** ($\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm), **9** ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm) y **10** ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) en DMSO a t.a. Espectros de emisión de **10** (50 μM): **B)** en disolventes de distinta polaridad; y **C)** en mezclas DMSO/agua con diferentes f_w .

Para establecer el carácter de transferencia de carga intramolecular (ICT, por sus siglas en inglés) del estado excitado, se registraron los espectros de emisión de **10** en disolventes de distinta polaridad. Los disolventes utilizados y sus respectivos índices de polaridad entre paréntesis fueron: tolueno (2,1), cloroformo (4,1), acetonitrilo (5,8) y DMSO

(7,2). El complejo **10** muestra un fuerte comportamiento solvatofluorocrómico, pues al aumentar la polaridad del disolvente los máximos de emisión se desplazan al rojo: λ_{em} = 413, 445, 515 y 529 nm, respectivamente (**Figura 2.11.B**).²¹ Posteriormente, se evaluó la emisión del compuesto **10** en mezclas DMSO/agua con fracciones variables de agua (f_w). En la **Figura 2.11.C** se observa que el compuesto **10** muestra propiedades clásicas de extinción de la emisión causada por agregación (ACQ, por sus siglas en inglés), puesto que al 30 % de agua se ha producido la extinción completa de su emisión.^{22,23}

En la **Tabla 2.7** se recogen las longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y su coeficiente de extinción molar (ϵ), así como las longitudes de onda de las bandas de emisión de los nuevos compuestos (λ_{em}).

Tabla 2.7. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y coeficiente de extinción molar (ϵ) de los compuestos en acetonitrilo y DMSO, y longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) en DMSO.

Compuesto	Disolvente	λ_{abs} (nm) (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
6	CH ₃ CN	253 (19724), 311 (22952), 379 ^h (4298)	-	-
	DMSO	260 (19016), 314 (22810), 377 ^h (4684)	310	365
7	CH ₃ CN	252 (17458), 312 (19978), 380 ^h (3888)	-	-
	DMSO	260 (17372), 314 (21142), 378 ^h (4558)	310	364
8	CH ₃ CN	251 (18694), 311 (22430), 380 ^h (5114)	-	-
	DMSO	260 (15486), 315 (20336), 378 ^h (6406)	310	370
9	CH ₃ CN	259 (16842), 315 (24990), 388 ^h (3556)	-	-
	DMSO	261 (17880), 319 (26686), 382 ^h (6406)	320	412
10	CH ₃ CN	251 (17002), 326 (27296), 360 ^h (21758)	-	-
	DMSO	259 (14012), 328 (26770), 357 ^h (22538)	360	529

2.2.5. Estudios de estabilidad e hidrólisis de los compuestos preparados

Después de finalizar la caracterización estructural y fotofísica, y antes de evaluar sus propiedades biológicas, se llevaron a cabo estudios de estabilidad en diferentes condiciones. En primer lugar, se evaluó la estabilidad de los compuestos en DMSO, ya que es un disolvente empleado para introducirlos en el medio biológico. Además, los complejos tipo semi-sándwich presentan un ligando cloruro susceptible de ser sustituido por moléculas de disolvente.²⁰ Con este fin, se prepararon disoluciones de **6-10** en DMSO

a una concentración 50 μM y se registraron sus espectros de absorción UV/Vis a tiempo 0 y tras 48 h de incubación a temperatura ambiente. Asimismo, la estabilidad se estudió también mediante ^1H -RMN (1 mM) en las mismas condiciones. En ambos casos, se encontró que todos los compuestos son estables en las condiciones ensayadas, pues tanto los espectros de absorción como de ^1H -RMN permanecieron inalterados transcurridas 48 h (**Figura 2.12** para **6** y **Figuras A1.34-A1.38** para el resto).

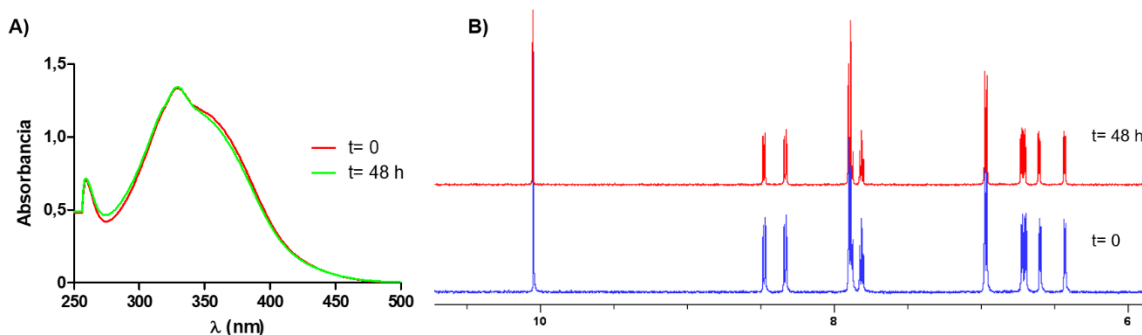


Figura 2.12. Estudio de estabilidad del compuesto **10** en DMSO a tiempo 0 y tras 48 h de incubación a t.a. mediante: **A)** UV/Vis (50 μM); **B)** ^1H -RMN (1 mM).

A continuación, se estudió el comportamiento de **6-10** en medio acuoso mediante ^1H -RMN. Para ello, se prepararon disoluciones de concentración 1 mM en una mezcla de $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ (1:2 v:v) y se registraron los espectros a tiempo 0 y tras 24 h de incubación a temperatura ambiente. En todos los casos se observa la desaparición de la señal de protón H_5 (**Figura 2.13** para **8** y **Figuras A1.39-A1.42** para el resto), lo cual puede atribuirse al intercambio de dicho protón por deuterio.

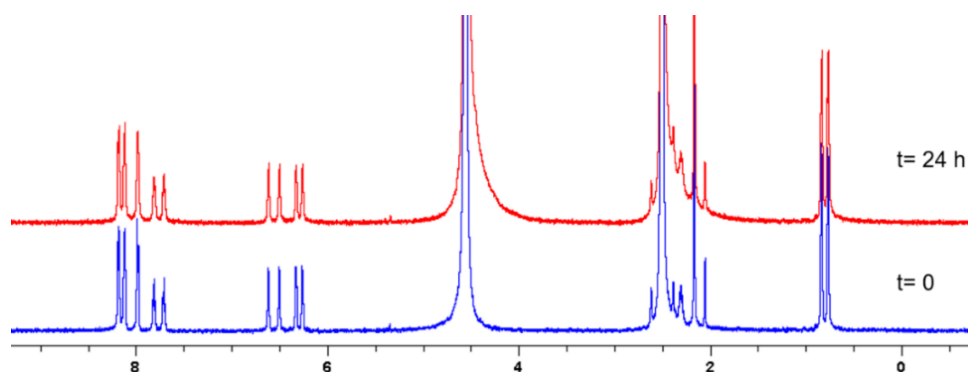


Figura 2.13. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **8** (1mM) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ (1:2 v:v) a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

Para averiguar si se produce el intercambio del protón por deuterio, se registró el espectro de ^1H -RMN del complejo **8** recién disuelto ($\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ 1:2) y después se eliminó el agua deuterada a presión reducida. Luego, se añadió agua mili-Q, se dejó agitar durante 2 h y se volvió a eliminar el agua. Finalmente, se añadió $\text{DMSO-}d_6$ y se registró de nuevo el espectro de ^1H -RMN. En la **Figura 2.14** se observa que la señal de protón H_5

reaparece, lo que permite confirmar que anteriormente se había producido el intercambio del protón por el deuterio. Con estos resultados es posible concluir que todos los compuestos permanecieron estables y no se hidrolizan en las condiciones anteriormente ensayadas.

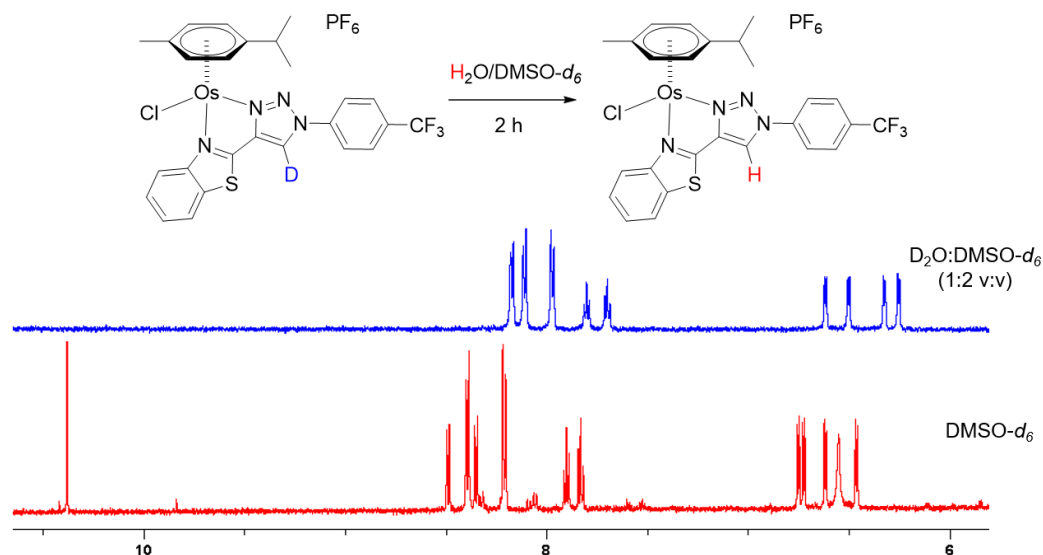


Figura 2.14. Estudio del intercambio del protón por deuterio en el compuesto **8** (1mM) mediante ¹H-RMN a t.a.

Finalmente, la hidrólisis también se estudió con un mayor porcentaje de agua mediante HPLC-MS. Para ello, se prepararon disoluciones de **6-10** en agua (5 % de DMSO) y se registraron los espectros de HPLC-MS a tiempo 0 y tras 48 h de incubación a temperatura ambiente. Los resultados revelan que los compuestos **6-9** apenas se hidrolizan (**Figura A1.43-A1.46**), mientras que el compuesto **10** (**Figura 2.15** y **Figura 2.16**) alcanza un 76 % de hidrólisis a las 24 h. El compuesto **10**, como se verá más adelante, es el mejor candidato de la serie (**Tabla 2.10**), por lo que se puede concluir que el proceso de hidrólisis juega un papel crucial en las propiedades citotóxicas de los nuevos complejos.

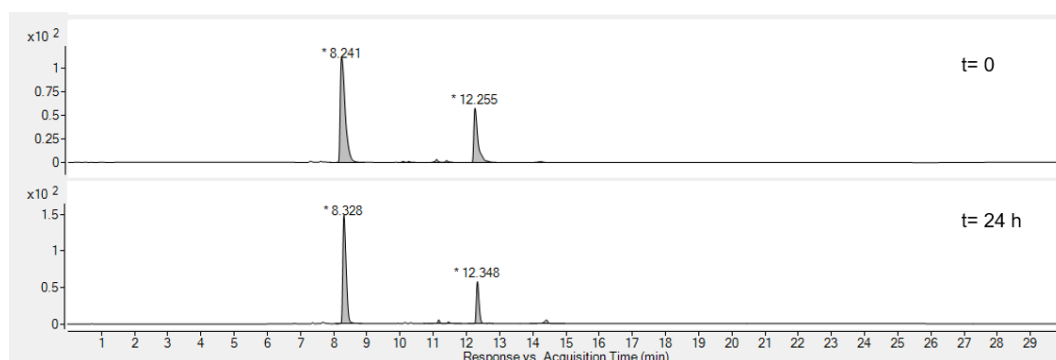


Figura 2.15. Cromatogramas del compuesto **10** (10 μM) en agua (5 % DMSO) a tiempos 0 y tras 24 h de incubación a t.a.

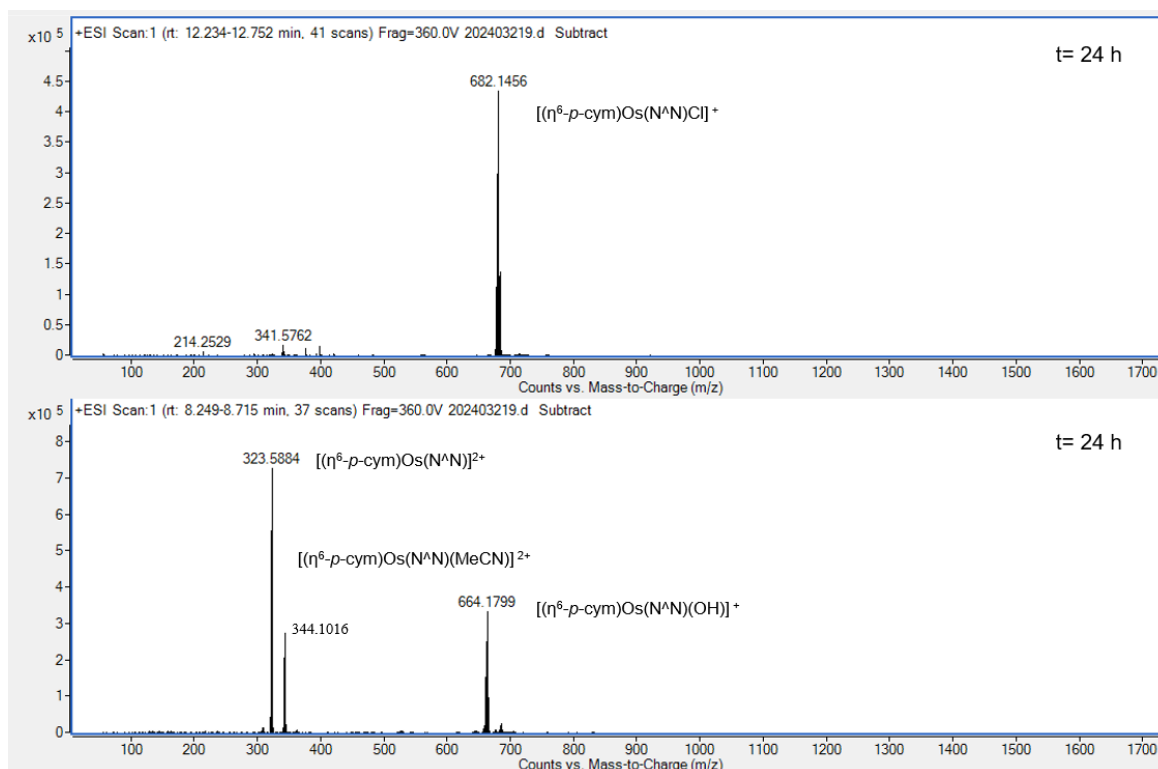


Figura 2.16. Espectros de masas de los picos mayoritarios del cromatograma de la **Figura 2.15** a las 24 h.

2.2.6. Interacción con la seroalbúmina

La HSA es una de las proteínas transportadoras más abundantes del plasma sanguíneo, que es capaz de unirse a casi todos los fármacos conocidos y desempeña un papel crucial en la regulación de la presión osmótica de la sangre.²⁴ Esta proteína está constituida por 585 residuos de aminoácidos, los cuales forman una única cadena y se organizan en tres subdominios. La mayor parte de las moléculas orgánicas interactúan a través de los sitios I y II de la HSA, que se localizan en los subdominios IIA y IIIA, respectivamente.²⁵ La fluorescencia de esta proteína se debe principalmente a los restos de triptófano y, en una proporción menor, a los residuos de tirosina y fenilalanina. Con el fin de determinar la posible interacción de los compuestos **6-10** con la proteína, se llevó a cabo una valoración mediante espectroscopía de fluorescencia.²⁶⁻²⁸ La HSA presenta un máximo de emisión a 350 nm cuando es excitada a 295 nm, y este pico disminuye cuando se une a una molécula pequeña. En consecuencia, se monitorizó el espectro de emisión de la HSA (2,7 μM) tras la adición de cantidades crecientes de los complejos (0-27 μM) a temperatura ambiente, tal y como se ilustra en la **Figura 2.17**.

Para analizar la desactivación de la fluorescencia, se aplicó la ecuación de Stern-Volmer (**Ecuación 2.1**), donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del compuesto, $[C]$ es la concentración del compuesto y K_{SV} es la constante de desactivación de Stern-Volmer.^{26,27}

$$\text{Ecuación 2.1. } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[C]$$

La gráfica de F_0/F frente a la concentración $[C]$ mostró linealidad para todos los complejos (**Figura 2.18** y **A1.47**), indicando así un único mecanismo de extinción. Los valores de K_{SV} se recogen en la **Tabla 2.8**.

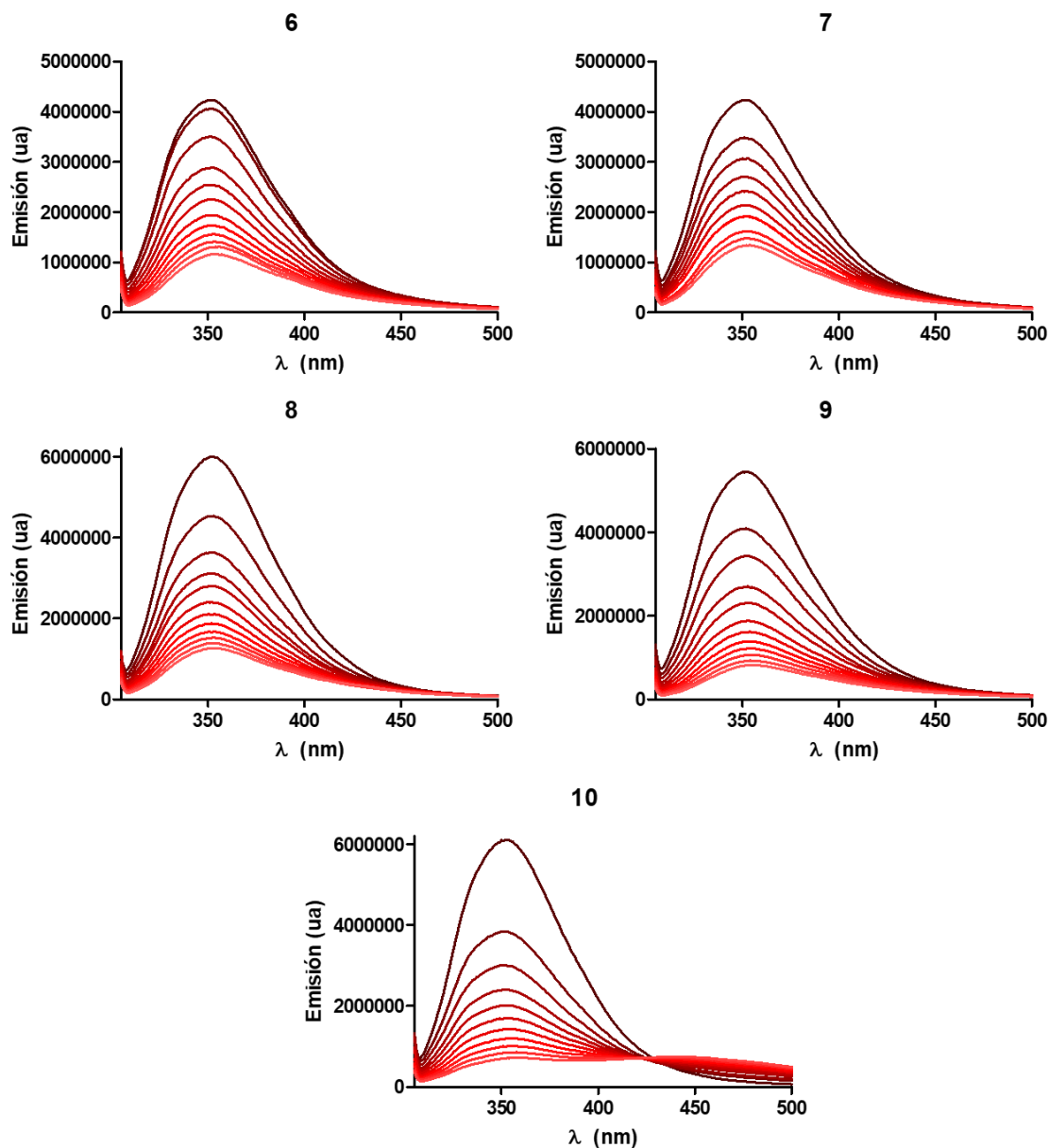


Figura 2.17. Espectro de emisión de la HSA (2,7 μ M) en presencia de cantidades crecientes de los complejos **6-10** (0-27 μ M). El aumento de la concentración se produce de arriba abajo.

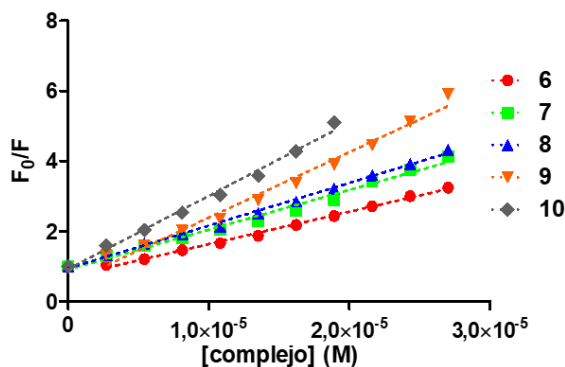


Figura 2.18. Gráficos de la ecuación de Stern-Volmer de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **6-10**.

A continuación, para tratar de establecer si el mecanismo de extinción se debe a un proceso estático o dinámico, se estudió la variación de la intensidad de absorción de la HSA en presencia de los complejos. El espectro de absorción de la HSA presenta dos bandas de absorción: una banda intensa a 210 nm debida a la estructura conformacional de la HSA, y una banda a 280 nm atribuible a los residuos aromáticos de la tirosina, el triptófano y la fenilalanina. En el contexto de un proceso dinámico, el compuesto afecta únicamente al estado excitado del fluoróforo, sin alterar el espectro de absorción. Por el contrario, en un proceso estático, se establece una interacción con el estado basal, resultando en la formación de un complejo que induce una modificación observable en el espectro de absorción.²⁹ En la **Figura 2.19** se observa que la adición de cada uno de los compuestos provoca una disminución drástica de la banda a 210 nm, con un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción, mientras que la segunda banda de absorción apenas se ve alterada. Se puede concluir que el posible mecanismo de extinción inducido por los complejos sería un mecanismo estático, tal y como viene descrito en la bibliografía.²⁹

Cuando el mecanismo estático es el que tiene lugar, se asume que el complejo interacciona, independientemente, en un conjunto de sitios de enlace equivalentes en la HSA. Los parámetros de enlace se pueden determinar de acuerdo con la ecuación de Scatchard (**Ecuación 2.2**) donde K_B es la constante de enlace y n el número de sitios de enlace por molécula de HSA.²⁹

$$\text{Ecuación 2.2. } \log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_B + n \log [C]$$

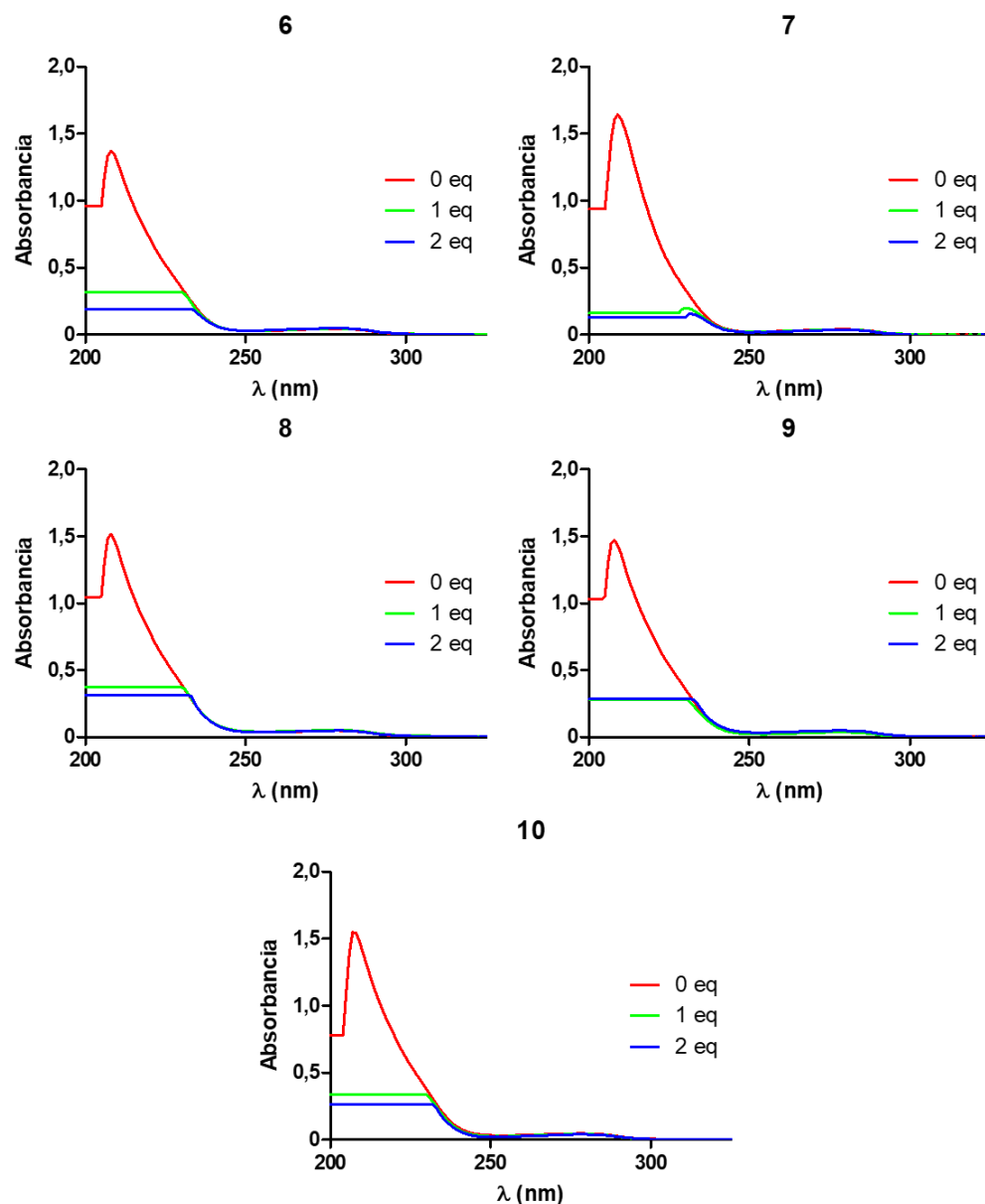


Figura 2.19. Espectro de absorción de la HSA (1 μ M) tras adicionar distintos equivalentes de los complejos **6-10**.

En la **Figura 2.20** se muestra el gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ respecto al $\log[C]$ para los complejos **6-10**.

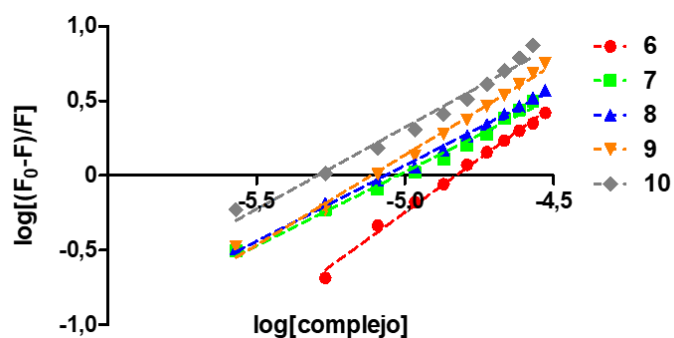


Figura 2.20. Gráficos de la ecuación de Scatchard de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **6-10**.

En la **Tabla 2.8** se recogen los valores de la constante de desactivación de la fluorescencia de Stern-Volmer (K_{SV}), la constante de enlace (K_B) de **6-10** con la HSA, así como el número de sitios de unión de los mismos con la HSA (n). Los altos valores de las constantes K_{SV} y la constante de enlace demuestran que los compuestos se enlazan eficazmente a un sitio de unión de la seroalbúmina. Además, gracias a la ecuación de Scatchard se llega a la conclusión de que solo se unen a un sitio de unión de la proteína ($n \sim 1$). Es necesario mencionar que **6** y **10** son los que presentan mayores valores de la constante de enlace ($\sim 2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) y, curiosamente, también resultaron ser los más activos (**Tabla 2.10**) y los que presentaban mayor acumulación (**Tabla 2.12**).

Tabla 2.8. Valores de K_{SV} , K_B y n obtenidos de la interacción de **6-10** con la HSA

Compuesto	$K_{SV} \cdot 10^5 (\text{M}^{-1})$	$K_B \cdot 10^5 (\text{M}^{-1})$	n
6	0,96	28,58	1,33
7	1,13	0,77	0,97
8	1,24	1,39	1,01
9	1,76	15,09	1,21
10	2,08	23,85	1,22

Tras conocer que todos los compuestos se unen eficazmente a la HSA y con el fin de identificar el sitio de unión de **6-10** a la proteína, se llevaron a cabo experimentos de competición. Para ello, se utilizaron la warfarina (WF) como marcador del sitio I y el ibuprofeno (IBU) como marcador del sitio II. La fluorescencia de la warfarina a $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$ aumenta considerablemente al unirse a la HSA, debido a su interacción con el Triptófano-214, y esta fluorescencia disminuye si un segundo compuesto compite por el mismo sitio de unión.^{27,30} Así, la unión de los complejos se evalúa monitorizando los espectros de fluorescencia de [HSA-WF] al añadir cantidades crecientes de cada uno de los complejos (0-25 μM). De igual forma, la valoración se realizó sobre una disolución que contenía al complejo [HSA-IBU]. En la **Figura 2.21**, así como en las **Figuras A1.48-A1.50** y en la **Tabla 2.9**, se observa que los compuestos **6-9** se unen preferentemente al sitio II de la HSA, pues las constantes de desactivación de la fluorescencia de SV son mayores en todos los casos. Sin embargo, el compuesto **10** se une indistintamente a los dos sitios de unión, sin mostrar preferencia por uno de ellos.

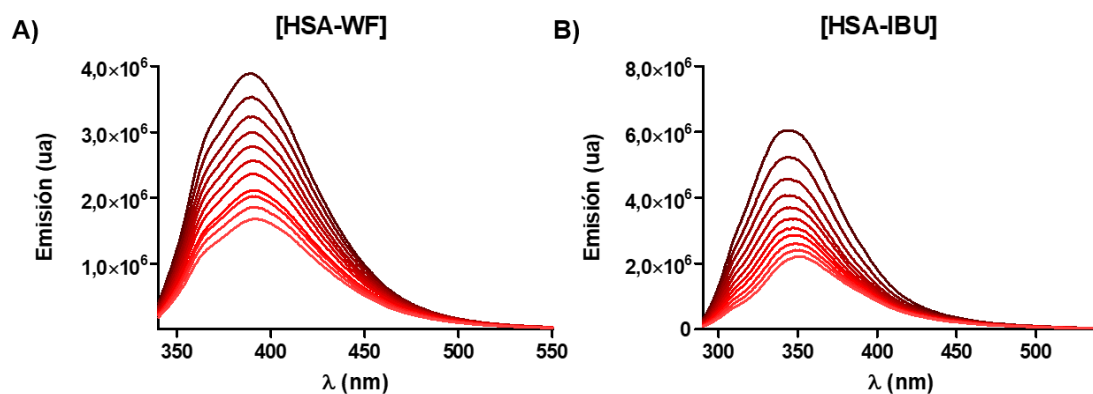


Figura 2.21. Espectro de emisión de HSA-WF (**A**) y HSA-IBU (**B**) en presencia de cantidades crecientes de **8**. $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $[\text{HSA-WF}] = 1:1 \text{ } \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $[\text{HSA-IBU}] = 1:1 \text{ } \mu\text{M}$. [Complejo **8**]: 0-25 μM . El incremento de concentración se produce de arriba abajo.

Tabla 2.9. Valores de la constante de Stern-Volmer en el desplazamiento de la warfarina o el ibuprofeno.

Compuesto	$K_{\text{SV}} \cdot 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	
	Desplazamiento WF	Desplazamiento IBU
6	0,38	0,69
7	0,49	0,59
8	0,48	0,68
9	0,82	0,94
10	1,15	1,11

2.3. Propiedades biológicas

Uno de los objetivos del presente capítulo fue evaluar el potencial de los nuevos areno-complejos de Os(II) en un panel de líneas celulares. Con este fin, el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa llevó a cabo los estudios *in vitro*.

2.3.1. Viabilidad celular

En primer lugar, se determinaron los valores de IC_{50} de **6-10** y del cisplatino en seis líneas celulares tumorales: rabdomiosarcoma (RD), cáncer de colon (HCT116), de páncreas (PSN1), de mama (MCF7), de mama triple negativo (MDA-MB-231) y cervical (HeLa). También en una línea sana de fibroblastos de pulmón (MRC5), tras un tratamiento de 72 h (**Tabla 2.10**). Es preciso señalar que el valor de IC_{50} se define como el valor mínimo de concentración que inhibe el crecimiento celular a la mitad. Los compuestos **6-9** mostraron una citotoxicidad media, con un IC_{50} comprendido entre 15 y 66 μM , siendo el complejo **6** el mejor de ellos, con un valor de 15 μM en células de rabdomiosarcoma (RD). El complejo más prometedor de la serie en todas las líneas celulares fue el complejo **10**,

con valores de IC_{50} que oscilan entre 4,3 y 8,3 μM , siendo su actividad comparable o, en algunos casos, mejor que la del cisplatino.

Tabla 2.10. Valores de IC_{50} (μM) obtenidos para un panel de células cancerosas tratadas con **6-9** tras 72 h de incubación, determinados mediante ensayo MTT.^a

Comp.	RD	HCT116	PSN1	MCF7	MDA-MB-231	HeLa	MRC5
6	15 $\pm$ 5	25 $\pm$ 2	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 8	27 $\pm$ 5	23 $\pm$ 1	91 $\pm$ 18
7	38 $\pm$ 3	53 $\pm$ 8	66 $\pm$ 5	42 $\pm$ 5	60 $\pm$ 16	46 $\pm$ 10	> 100
8	24 $\pm$ 6	34 $\pm$ 3	47 $\pm$ 2	45 $\pm$ 9	40 $\pm$ 1	43 $\pm$ 7	76 $\pm$ 12
9	43 $\pm$ 8	45 $\pm$ 9	43 $\pm$ 9	45 $\pm$ 4	44 $\pm$ 7	36 $\pm$ 7	69 $\pm$ 4
10	4 $\pm$ 1	6,6 $\pm$ 0,6	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3
CDDP	3,1 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,4	21 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	15 $\pm$ 3	9 $\pm$ 2

^aLos datos representan la media $\pm$ DE de, al menos, tres medidas independientes.

Además, los complejos resultaron selectivos hacia las células tumorales, siendo los índices de selectividad (SI, por sus siglas en inglés) del compuesto **10** notablemente superiores a los calculados para **6-9** (véase **Tabla 2.11**).

Tabla 2.11. Índices de selectividad (SI)^a.

Compuesto	RD	HCT116	PSN1	MCF7	MDA-MB-231	HeLa
6	6,07	3,64	3,37	3,37	3,37	3,96
7	>2,63	>1,89	>1,52	>2,38	>1,67	>2,17
8	3,17	2,24	1,62	1,69	1,90	1,77
9	1,60	1,53	1,60	1,53	1,57	1,92
10	10,47	6,82	6,34	7,03	7,38	5,42
Cisplatino	2,90	1,02	2,73	0,43	0,47	0,60

^aLos SI se han calculado como IC_{50} (MRC5)/ IC_{50} (línea celular indicada)

2.3.2. Acumulación celular

Los procesos que llevan a la muerte celular comienzan con la captación y acumulación de un compuesto dentro de la célula. Por esta razón, se determinaron las cantidades de osmio presentes en el interior de células RD tras un tratamiento de 5 horas con los complejos de osmio. Los resultados confirmaron que **6-10** se acumulan en estas células con distinta eficacia (**Tabla 2.12**). Según la absorción de osmio, los complejos se pueden ordenar de la siguiente manera: **10>6>8>7>9**, lo cual muestra una fuerte correlación con su actividad antiproliferativa (**Tabla 2.10**, columna RD).

Tabla 2.12. Acumulación de los compuestos **6-10** en células de rabdomiosarcoma. Las células se trataron a concentraciones de 50 μM durante 5 horas.

Compuesto	ng Os/ 10^6 células ^a
6	618 $\pm$ 20
7	128 $\pm$ 4
8	462 $\pm$ 26
9	62 $\pm$ 15
10	1645 $\pm$ 37

^aLos datos representan la media $\pm$ DE, n = 3

Con el fin de estudiar el mecanismo de acción en células tumorales, se escogió el compuesto **10** como el más característico de la serie, ya que mostró los valores de IC_{50} más bajos en células cancerosas y los mayores índices de selectividad. Para el estudio del mecanismo se seleccionó la línea celular de RD pues, como se ha mencionado en la introducción, es uno de los sarcomas más frecuentes en la infancia y en la adolescencia. Este tipo de cáncer es conocido por ser extremadamente agresivo y difícil de tratar, especialmente en casos metastásicos y recidivantes, donde las tasas de supervivencia son inferiores al 20 %.^{31,32} Además, esta línea celular fue la más sensible al tratamiento con los nuevos complejos de Os(II), especialmente con **10**.

2.3.3. Localización celular

Para conocer la localización celular, se aprovecharon las propiedades de fluorescencia del compuesto **10** (**Figura 2.11**). Las células se trataron **10** (12,9 μM) durante 3 h, y se realizaron imágenes de microscopía confocal ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 355/420\text{-}550$ nm). En la **Figura 2.22** se observa que la señal de fluorescencia del complejo se localizó principalmente en el citoplasma, como un débil fondo azul o como un discreto punteado que emanaba una fuerte señal. Además, se observa como algunas células adoptaron una morfología diferente: perdieron la forma alargada y adherida, y se volvieron redondeadas.

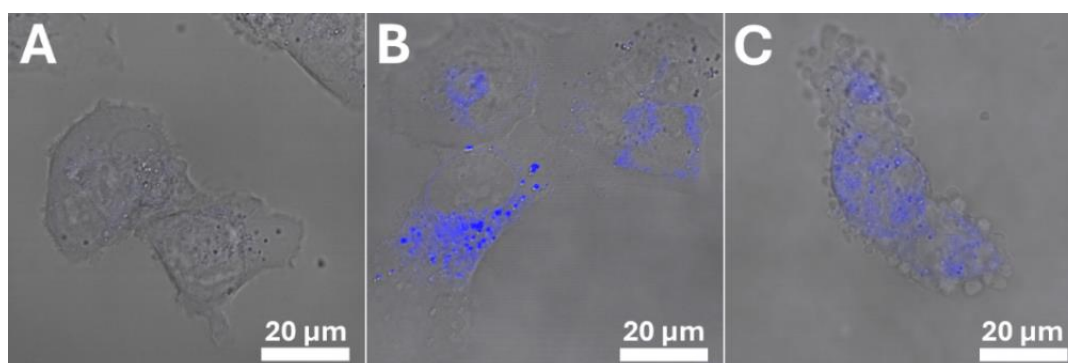


Figura 2.22. Localización del compuesto **10** en células RD. La señal de **10** (azul) se fusiona con el canal de campo claro. **A)** células no tratadas; **B)** y **C)** células tratadas con **10**.

Para identificar el orgánulo con el que se asocia el compuesto **10**, se realizó el ensayo de colocalización utilizando los colorantes Lyso-Tracker y ER-Tracker (**Figura A1.51**). El coeficiente de Pearson fue de $0,65 \pm 0,09$ con Lyso-Tracker y de $0,57 \pm 0,07$ con ER-Tracker, indicando una correlación moderada/débil en ambos casos.³³ Esto sugiere que dicho complejo no se acumula selectivamente en un orgánulo concreto, sino que se distribuye en varios, incluyendo el citoplasma. Esta amplia distribución podría permitir que el complejo afecte a múltiples dianas celulares simultáneamente, lo que supone una ventaja para sus efectos biológicos, ya que es mucho más difícil que las células desarrollen resistencia a múltiples mecanismos de acción. Asimismo, para determinar el grado de colocalización de **10** con las mitocondrias se utilizó el colorante MitoTracker, pero al añadir el complejo a las células teñidas desaparecía gradualmente la señal. Por ello, se realizó el ensayo con células teñidas con éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), obteniéndose un coeficiente de Pearson de $0,35 \pm 0,05$. A pesar de presentar una colocalización muy débil, en la **Figura 2.23** se puede observar que las mitocondrias experimentan cambios significativos en presencia de **10**. La característica red tubular de las células no tratadas (flecha amarilla) desaparece rápidamente al añadir el compuesto **10**, y aparecen esferas punteadas (flecha roja), que finalmente desaparecen con el tiempo.

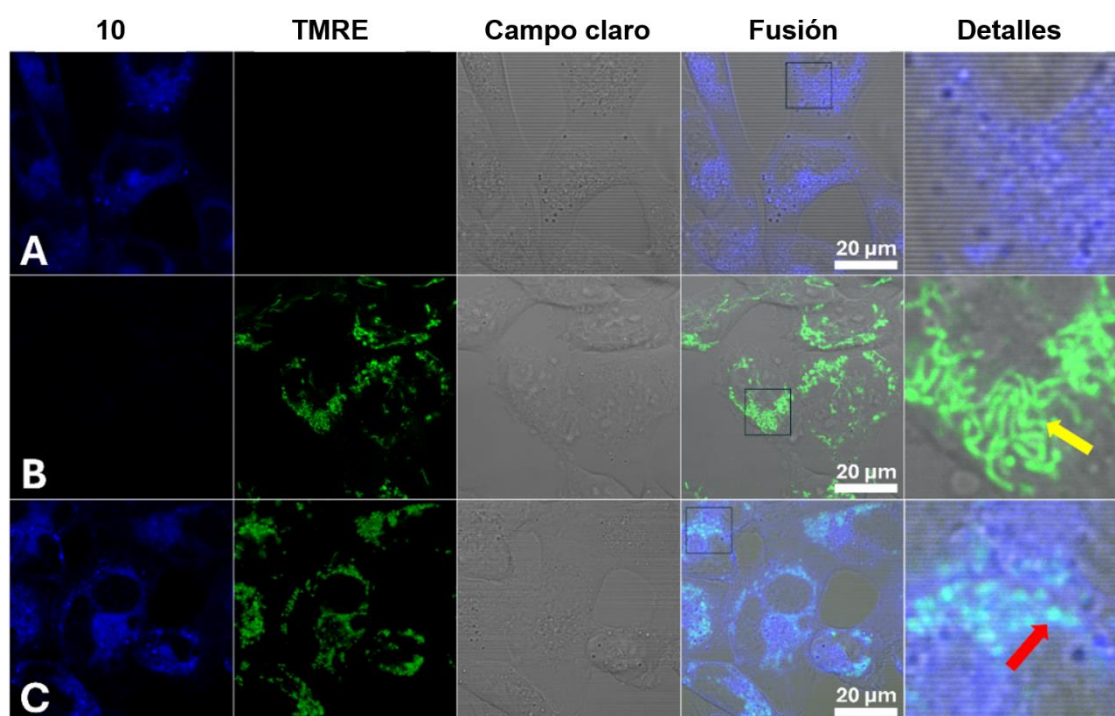


Figura 2.23. Colocalización del compuesto **10** y mitocondrias teñidas con TMRE en células RD. Las células se tiñeron con TMRE y luego se expusieron a **10** ($12,9 \mu\text{M}$) durante 1 h. **A)** Células expuestas solo al complejo **10**. **B)** Las células teñidas previamente con TMRE, no tratadas. **C)** Las células teñidas previamente con TMRE tratadas con **10**.

2.3.4. Potencial de membrana mitocondrial

Al comprobar que las mitocondrias se ven afectadas por el complejo **10**, se analizaron los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM). Por un lado, las células se tiñeron con TMRE y se analizaron después de la adición del complejo de osmio o la estaurosporina (control positivo). En la **Figura 2.24.A** se observa que el compuesto **10** provoca rápidamente la pérdida del PMM, mientras que el efecto de la estaurosporina es mucho menor. Por otro lado, las células RD se incubaron durante distintos periodos con diversas concentraciones de complejo y se tiñeron con TMRE. En la **Figura 2.24.B** se muestra que incluso a concentraciones inferiores al IC₅₀, se produce una pérdida significativa del PMM. El PMM disminuye en las dos primeras horas del tratamiento, y es proporcional a la concentración del compuesto. Estos resultados, junto con la información proporcionada por la microscopía confocal, indican que tras la exposición de las células RD al complejo **10**, las mitocondrias de algunas células pierden su potencial y su morfología característica.

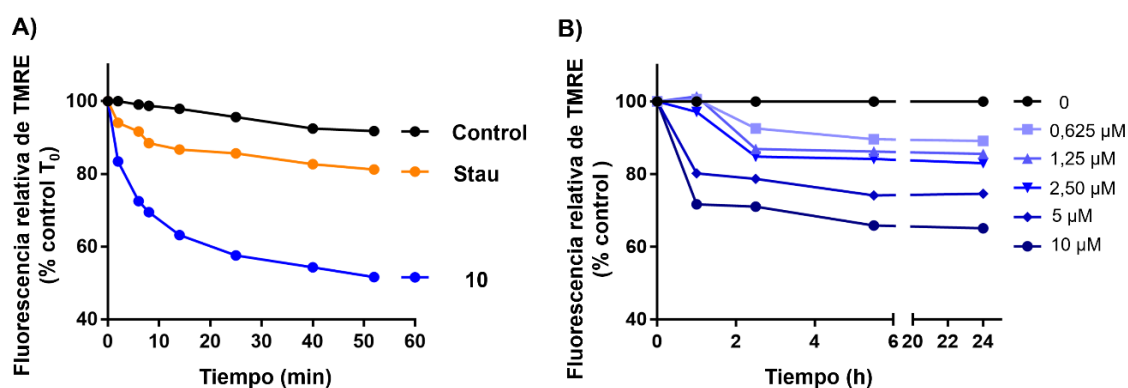


Figura 2.24. Pérdida de potencial de membrana mitocondrial. Fluorescencia TMRE relativa en el tiempo. **A)** Las células RD fueron teñidas previamente con TMRE (100 nM; 30 min) y permanecieron sin tratar (control) o se trataron con estaurosporina (2 µM) o con **10** (20 µM). Se realizó un análisis de citometría de flujo de la fluorescencia TMRE inmediatamente y otro varias veces al cabo de una hora. **B)** Las células RD se trataron con varias concentraciones de **10** durante 1, 2, 5,5 y 24 h, se tiñeron con TMRE y se analizaron con citometría de flujo.

2.3.5. Detección de la muerte celular

Análisis por citometría de flujo de la tinción con Anexina V/yoduro de propidio

Para determinar el mecanismo de muerte celular inducido por el complejo **10**, se realizó un análisis de citometría de flujo en células RD. Estas se trataron durante 24 h, y se tiñeron con Anexina V y yoduro de propidio. En la **Figura 2.25** se observa que, tras el tratamiento, la población celular se desplaza gradualmente del cuadrante inferior izquierdo (células vivas) al cuadrante inferior derecho (apoptosis temprana), y finalmente al cuadrante superior derecho, correspondiente a las células que están en apoptosis tardía o necrosis, independientemente de la dosis.

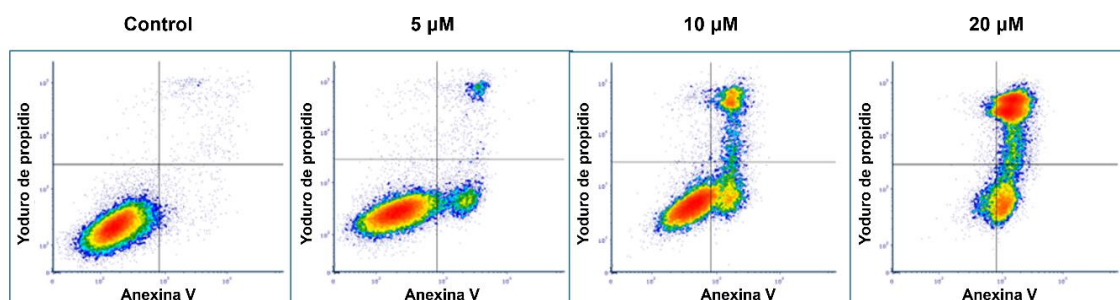


Figura 2.25. Análisis por citometría de flujo de la tinción dual de Anexina V/yoduro de propidio de células RD tratadas con **10** (5 μ M, 10 μ M o 20 μ M) o de células de control no tratadas.

Activación de la caspasa-3

Para caracterizar aún más el modo de muerte celular, se determinó la activación de la caspasa-3 en células RD tratadas con **10**. En la **Figura 2.26** se puede observar que el tratamiento de RD con el complejo de osmio produjo la activación de la caspasa-3 de forma dependiente de la concentración. Estos resultados apoyan el hallazgo de que dicho complejo induce la muerte celular apoptótica y la ejecuta en un grado significativo a través de una vía dependiente de la caspasa.

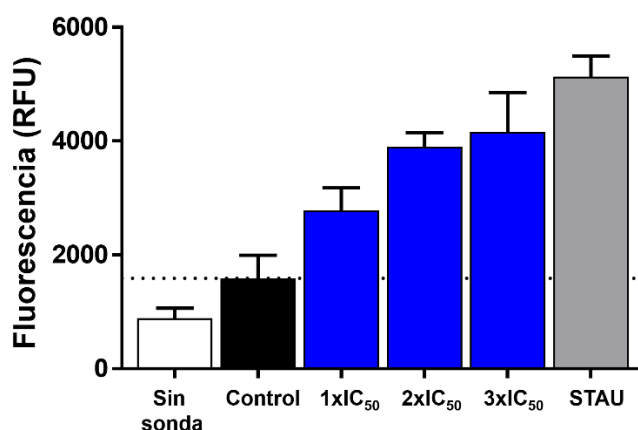


Figura 2.26. Activación de la caspasa-3 detectada con el reactivo CellEvent® Caspase3/7 Green Detection Reagent. Las células RD se trataron con **10** (1x, 2x y 3xIC₅₀) durante 24 h. Las células también se trataron con estaurosporina (2 μ M) durante 3 horas. Tras la tinción con el reactivo verde (30 min), las células se analizaron con citometría de flujo. Se analizaron 2×10^4 células por serie; el experimento se realizó dos veces. Los resultados se representan como la media $\pm$ DE. La prueba t de Student confirmó diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado para todas las muestras tratadas, con valores de $p \leq 0,01$ o $p \leq 0,001$.

2.3.6. Generación de ROS

En estudios previos se ha demostrado que los complejos de osmio pueden ejercer su actividad anticancerígena a través de la producción de ROS.³⁴ Por ello, se investigó la generación de ROS en células RD expuestas al compuesto **10** utilizando el reactivo CellROX Green. La **Figura 2.27** muestra que las células tratadas con **10** presentaron una fluorescencia elevada en comparación con el control no tratado, y que la producción de

ROS inducida fue dependiente de la concentración de complejo. Al utilizar una concentración equivalente a $3 \times \text{IC}_{50}$ se produjo aproximadamente el doble de ROS que en el control no tratado, mientras que la menadiona (control positivo) desencadenó ROS a un nivel significativamente superior. En conjunto, estos resultados indican que el complejo **10** induce una producción relativamente baja de ROS en células RD, lo que podría contribuir en cierta medida a su actividad anticancerígena.

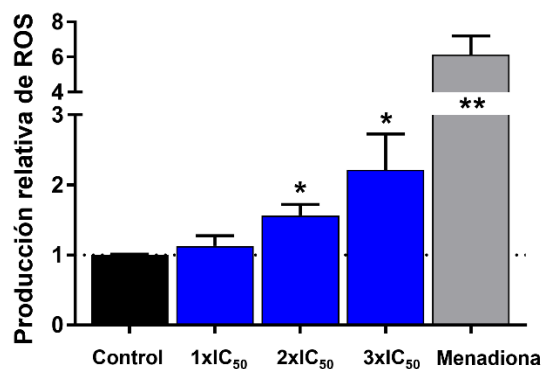


Figura 2.27. Producción de ROS. Cuantificación de ROS producidas en células RD expuestas al compuesto **10** y menadiona (control positivo). Las células se trataron con tres concentraciones de **10**: 4,3 μM , 8,6 μM y 12,9 μM durante 3 h o con 100 μM de menadiona durante 1 h. Las barras del gráfico muestran la fluorescencia relativa (frente al control no tratado) y representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes. Los resultados se sometieron a análisis estadístico mediante una prueba t de Student no emparejada, y las diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado se marcan con asteriscos: * $p \leq 0,05$ o ** $p \leq 0,01$.

2.3.7. Efecto en el ciclo celular

El tratamiento farmacológico a menudo afecta a la progresión del ciclo celular. A continuación, se analizó la perturbación del ciclo celular en células RD expuestas al compuesto **10** (Figura 2.28). Las células se trataron con **10** ($1 \times \text{IC}_{50}$ y $2 \times \text{IC}_{50}$) durante 24 h. Un análisis de la distribución de las células RD tratadas en distintas fases del ciclo celular muestra que un número significativo de células se detiene en la fase G1, en comparación con las células de control no tratadas. Mientras que el 40 % de las células no tratadas se encuentran en la fase G1, el 69 % y el 72 % de las células tratadas a las dos concentraciones, respectivamente, se encuentran en esta fase. El aumento de la población G1 se produce a expensas de las fases S y G2/M, especialmente de la fase S, donde solo hay un 18 % y un 13 % de células (frente al 41 % del control no tratado), respectivamente. Los resultados revelan que el compuesto **10** detiene las células RD en la fase G1 y reduce significativamente la proporción de células en la fase S.

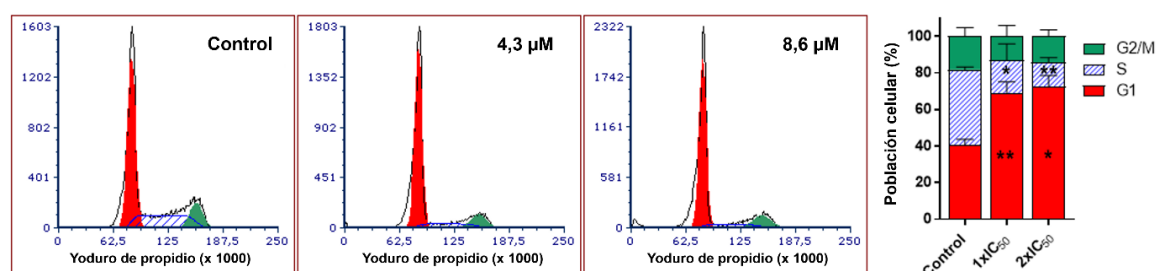


Figura 2.28. Distribución del ciclo celular. Las células RD se trataron con **10** a distintas concentraciones ($1xIC_{50}$ y $2xIC_{50}$) durante 24 h. Se utilizó yoduro de propidio como tinción nuclear. La última imagen muestra el gráfico de barras de poblaciones celulares (%) en fases individuales del ciclo celular. El gráfico muestra los resultados de 3 mediciones (Media $\pm$ DE). Los resultados se sometieron a un análisis estadístico mediante una prueba t de Student no apareada, y las diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado se marcan con asteriscos con $*p \leq 0,05$ o $**p \leq 0,01$.

2.3.8. Efecto antiproliferativo en esferoides RD.CD133- y RD.CD133+

Como se ha mencionado en la introducción del capítulo, en el tratamiento del cáncer existe una población de células conocida como CSC que, aunque representa una fracción celular pequeña, es extremadamente peligrosa.³⁵ Mientras que la mayoría de las células tumorales se eliminan eficazmente, las CSC logran escapar del tratamiento, actuando como un reservorio de células resistentes que pueden reiniciar tumores secundarios o terciarios. La ineficacia de los fármacos actuales para erradicar los tumores de forma permanente se debe, en gran medida, a su incapacidad para eliminar las CSC. Por lo tanto, es crucial identificar nuevos fármacos que puedan eliminar las CSC con la misma o mayor eficacia que las células diferenciadas.^{36–38}

En este capítulo se evaluó la eficacia de los nuevos compuestos en la inhibición del crecimiento y la viabilidad de células madre de RD, aisladas mediante la proteína transmembrana CD133, un marcador distintivo para seleccionar las CSC en el RD. Las células se clasificaron en grupos CD133+ (que expresan CD133) y CD133- (que no expresan CD133), y se cultivaron hasta formar rabdosferas. Luego, se trataron con **6-10**, y se midió la viabilidad con el ensayo CellTiter-Glo® 3D. La ciclofosfamida (CF), la salinomicina (Sal) y el cisplatino (CDDP) se incluyeron con fines comparativos.

Tabla 2.13. Valores de IC_{50} (μM) determinados en células RD.CD133+ y RD.CD133- mediante ensayo CellTiter-Glo® 3D.

IC_{50} (μM) ^{a,b}	6	7	8	9	10	CDDP	Sal	CF
RD.CD133-	19 $\pm$ 2	30 $\pm$ 6	24 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3	3,9 $\pm$ 1,2	12 $\pm$ 3	0,8 $\pm$ 0,2	592 $\pm$ 90
RD.CD133+	12 $\pm$ 4	27 $\pm$ 5	17 $\pm$ 2	45 $\pm$ 6	3,1 $\pm$ 0,8	15 $\pm$ 3	0,5 $\pm$ 0,1	455 $\pm$ 90

^aLos esferoides se trataron durante 72 h. ^bLos datos representan la media $\pm$ DE de, al menos, tres experimentos independientes.

En la **Tabla 2.13** se resumen los valores IC_{50} , donde se observa que los nuevos complejos de osmio mostraron una sensibilidad similar en ambas poblaciones de RD (CD133+ y CD133-).

Microscopía confocal de esferoides RD.CD133+

Finalmente, para visualizar el efecto del compuesto **10** en esferoides RD.CD133+, se tiñeron esferoides representativos tratados y no tratados con Calceína AM (etiqueta de células vivas), yoduro de propidio (tiñe las células con la integridad de la membrana alterada) y Hoechst 33258 (tiñe todos los núcleos celulares). En la **Figura 2.29** se puede observar que los esferoides expuestos al complejo de osmio difieren del control no tratado en tamaño, integridad e intensidad del yoduro de propidio. Las muestras tratadas son más pequeñas que el control, y la desintegración del esferoide es evidente en el caso de que la concentración aplicada sea 10 μ M. Por su parte, mientras que en el esferoide no tratado una pequeña parte de las células muestra positividad al yoduro de propidio, en los tratados se observa un marcado aumento del número de células con la integridad de la membrana perturbada.

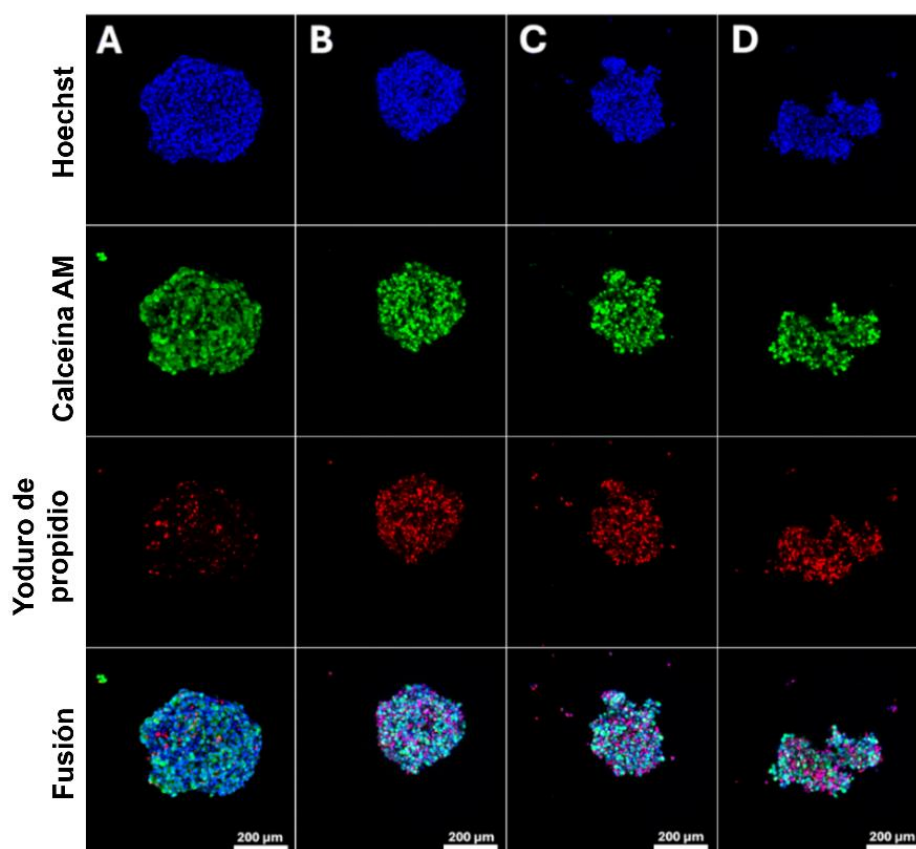


Figura 2.29. Microscopía confocal de esferoides de RD expuestos al compuesto **10**. Los esferoides se tiñeron con colorante Hoechst 33258 (Hoechst), Calceína AM y yoduro de propidio. **A**) Control no tratado; **B**) esferoide tratado con **10** (5 μ M, 72 h); **C** y **D**) esferoides tratados con **10** (10 μ M, 72 h). Las imágenes se obtuvieron como la proyección máxima de 10 z-stacks.

2.4. Resumen

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de cinco nuevos areno-complejos de Os(II) de tipo $[\text{Os}(p\text{-cimeno})(\text{N}^{\wedge}\text{N}')\text{Cl}]\text{PF}_6$, utilizando como ligando quelato $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ derivados de 2-(1-aryl)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol. Todos los compuestos han sido caracterizados mediante diversas técnicas estructurales, obteniéndose las estructuras cristalinas de **8** y **10**. Además, se han determinado sus propiedades fotofísicas, analizando la influencia del carácter electrodonador y electroaceptor del sustituyente -R en el ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$.

Se ha llevado a cabo el estudio de la estabilidad de los compuestos en diferentes condiciones. La estabilidad de los mismos en DMSO se confirmó mediante espectroscopía UV/Vis. Por su parte, el estudio de hidrólisis reveló que, cuando el porcentaje de agua es del 33 %, los compuestos no sufren hidrólisis; mientras que, cuando el porcentaje de agua se eleva al 95 %, el complejo **10** alcanza un porcentaje de hidrólisis del 76 %. También se ha analizado la interacción de los compuestos con la seroalbúmina, observándose diferencias significativas al modificar el sustituyente -R del ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$. Así, el compuesto **10** es el que más interacciona con la proteína.

Los estudios *in vitro* realizados en un panel de líneas celulares revelaron que los compuestos presentan citotoxicidad moderada frente a las células cancerosas, siendo el más activo el complejo **10**. El estudio de su mecanismo de acción en células de rabdomiosarcoma demostró que se acumula de forma inespecífica en los diversos orgánulos (lisosomas, retículo endoplasmático y mitocondrias) y provoca daño mitocondrial, alterando su morfología. El compuesto **10** induce la muerte celular de las células de RD por apoptosis y provoca la detención del ciclo celular en la fase G1. Finalmente, se estudiaron los complejos **6-10** en células madre cancerosas de RD en forma de esferoides 3D, encontrándose que son igual o más eficaces que en las células diferenciadas.

2.5. Bibliografía

- (1) Gupta, P. B.; Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A. Cancer Stem Cells: Mirage or Reality? *Nat. Med.* **2009**, *15* (9), 1010–1012. <https://doi.org/10.1038/nm0909-1010>.
- (2) Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (4), 275–284. <https://doi.org/10.1038/nrc1590>.
- (3) Battle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23* (10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- (4) Suntharalingam, K.; Lin, W.; Johnstone, T. C.; Bruno, P. M.; Zheng, Y.-R.; Hemann, M. T.; Lippard, S. J. A Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammospheres-Potent Osmium(VI) Nitrido Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (41), 14413–14416. <https://doi.org/10.1021/ja508808v>.

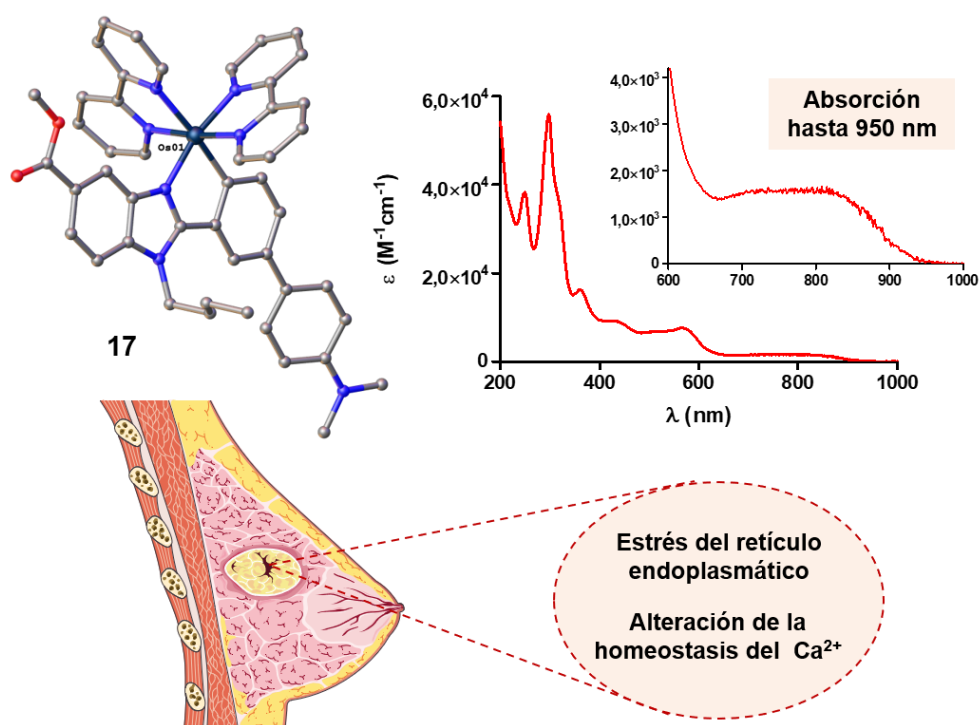
- (5) Pracharova, J.; Novohradsky, V.; Kostrhunova, H.; Štarha, P.; Trávníček, Z.; Kasparkova, J.; Brabec, V. Half-Sandwich Os(II) and Ru(II) Bathophenanthroline Complexes: Anticancer Drug Candidates with Unusual Potency and a Cellular Activity Profile in Highly Invasive Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (35), 12197–12208. <https://doi.org/10.1039/C8DT02236D>.
- (6) Novohradsky, V.; Markova, L.; Kostrhunova, H.; Trávníček, Z.; Brabec, V.; Kasparkova, J. An Anticancer Os(II) Bathophenanthroline Complex as a Human Breast Cancer Stem Cell-Selective, Mammosphere Potent Agent That Kills Cells by Necroptosis. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 13327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49774-x>.
- (7) Ammazalorso, A.; Carradori, S.; Amoroso, R.; Fernández, I. F. 2-Substituted Benzothiazoles as Antiproliferative Agents: Novel Insights on Structure-Activity Relationships. *European J. Med. Chem.* **2020**, 207, 112762. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112762>.
- (8) Alcazar, C. R. G. D.; Xu, V.; Lin, C.; Gil-Martin, M.; Naing, A.; Fan, L.; Yang, F.; Quinn, D.; Wu, J.; Quadt, C.; Mataraza, J. Abstract CT094: Targeting CSF1R with BLZ945 Results in Effective Peripheral and Tumor Immune Microenvironment Modulation in Advanced Solid Tumors and May Be Associated with Limited Efficacy in Recurrent Non-Mesenchymal Glioblastoma. *Cancer Res.* **2024**, 84 (7_Supplement), CT094. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2024-CT094>.
- (9) Lari, M.; Martínez-Alonso, M.; Busto, N.; Manzano, B. R.; Rodríguez, A. M.; Acuña, M. I.; Domínguez, F.; Albasanz, J. L.; Leal, J. M.; Espino, G.; García, B. Strong Influence of Ancillary Ligands Containing Benzothiazole or Benzimidazole Rings on Cytotoxicity and Photoactivation of Ru(II) Arene Complexes. *Inorg. Chem.* **2018**, 57 (22), 14322–14336. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02299>.
- (10) Lenis-Rojas, O. A.; Cabral, R.; Carvalho, B.; Friães, S.; Roma-Rodrigues, C.; Fernández, J. A. A.; Vila, S. F.; Sanchez, L.; Gomes, C. S. B.; Fernandes, A. R.; Royo, B. Triazole-Based Half-Sandwich Ruthenium(II) Compounds: From In Vitro Antiproliferative Potential to In Vivo Toxicity Evaluation. *Inorg. Chem.* **2021**, 60 (11), 8011–8026. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00527>.
- (11) Florindo, P. R.; Pereira, D. M.; Borralho, P. M.; Costa, P. J.; Piedade, M. F. M.; Rodrigues, C. M. P.; Fernandes, A. C. New $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{N}-\text{N})(\text{PPh}_3)][\text{PF}_6]$ Compounds: Colon Anticancer Activity and GLUT-Mediated Cellular Uptake of Carbohydrate-Appended Complexes. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (30), 11926–11930. <https://doi.org/10.1039/C6DT01571A>.
- (12) Ballester, F. J.; Ortega-Forte, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Barone, G.; Ruiz, J. Newly Synthesized Benzothiazolyl-1,2,3-Triazole Derivatives: Intramolecular Charge Transfer Tuning, Solvatofluorochromism and Antiproliferative Properties. *Dyes and Pigm.* **2023**, 209, 110905. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110905>.
- (13) Ballester, F. J.; Hernández-García, A.; Santana, M. D.; Bautista, D.; Ashoo, P.; Ortega-Forte, E.; Barone, G.; Ruiz, J. Photoactivatable Ruthenium Complexes Containing Minimal Straining Benzothiazolyl-1,2,3-Triazole Chelators for Cancer Treatment. *Inorg. Chem.* **2024**, 63 (14), 6202–6216. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c04432>.
- (14) Infante-Tadeo, S.; Rodríguez-Fanjul, V.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M. Osmium(II) Tethered Half-Sandwich Complexes: pH-Dependent Aqueous Speciation and Transfer Hydrogenation in Cells. *Chem. Sci.* **2021**, 12 (27), 9287–9297. <https://doi.org/10.1039/D1SC01939B>.
- (15) Fu, Y.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; van Rijt, S. H.; Healey, D. J.; Cooper, P. A.; Shnyder, S. D.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Organometallic Osmium Arene

- Complexes with Potent Cancer Cell Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (22), 8192–8196. <https://doi.org/10.1021/jm100560f>.
- (16) Rijt, S. H. van; Romero-Canelón, I.; Fu, Y.; D. Shnyder, S.; J. Sadler, P. Potent Organometallic Osmium Compounds Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis and S-Phase Cell Cycle Arrest in A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Metallomics* **2014**, *6* (5), 1014–1022. <https://doi.org/10.1039/C4MT00034J>.
 - (17) Spasyuk, D.; Vicent, C.; Gusev, D. G. Chemoselective Hydrogenation of Carbonyl Compounds and Acceptorless Dehydrogenative Coupling of Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (11), 3743–3746. <https://doi.org/10.1021/ja512389y>.
 - (18) Castarlenas, R.; Esteruelas, M. A.; Oñate, E. N-Heterocyclic Carbene–Osmium Complexes for Olefin Metathesis Reactions. *Organometallics* **2005**, *24* (18), 4343–4346. <https://doi.org/10.1021/om050569e>.
 - (19) Fu, Y.; Romero, M. J.; Habtemariam, A.; Snowden, M. E.; Song, L.; Clarkson, G. J.; Qamar, B.; Pizarro, A. M.; Unwin, P. R.; Sadler, P. J. The Contrasting Chemical Reactivity of Potent Isoelectronic Iminopyridine and Azopyridine Osmium(II) Arene Anticancer Complexes. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (8), 2485–2494. <https://doi.org/10.1039/C2SC20220D>.
 - (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) Slodek, A.; Zych, D.; Maroń, A.; Gawrecki, R.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Malarz, K.; Musioł, R. Phenothiazine Derivatives - Synthesis, Characterization, and Theoretical Studies with an Emphasis on the Solvatochromic Properties. *J. Mol. Liq.* **2019**, *285*, 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.102>.
 - (22) Zhuang, J.; Wang, B.; Chen, H.; Zhang, K.; Li, N.; Zhao, N.; Tang, B. Z. Efficient NIR-II Type-I AIE Photosensitizer for Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy through Synergistic Apoptosis–Ferroptosis. *ACS Nano* **2023**, *17* (10), 9110–9125. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c12319>.
 - (23) 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. *Sens. Actuators B Chem.* **2023**, *375*, 132898. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132898>.
 - (24) Belinskaia, D. A.; Voronina, P. A.; Shmurak, V. I.; Jenkins, R. O.; Goncharov, N. V. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (19), 10318. <https://doi.org/10.3390/ijms221910318>.
 - (25) Feroz, S. R.; Mohamad, S. B.; Bujang, N.; Malek, S. N. A.; Tayyab, S. Multispectroscopic and Molecular Modeling Approach To Investigate the Interaction of Flavokawain B with Human Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (23), 5899–5908. <https://doi.org/10.1021/jf301139h>.
 - (26) Kalaivani, P.; Prabhakaran, R.; Ramachandran, E.; Dallemer, F.; Paramaguru, G.; Renganathan, R.; Poornima, P.; Padma, V. V.; Natarajan, K. Influence of Terminal Substitution on Structural, DNA, Protein Binding, Anticancer and Antibacterial Activities of Palladium(II) Complexes Containing 3-Methoxy Salicylaldehyde-4(N) Substituted Thiosemicarbazones. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (8), 2486–2499. <https://doi.org/10.1039/C1DT11838B>.
 - (27) Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D. Novel Bis-C,N-Cyclometalated

- Iridium(III) Thiosemicarbazide Antitumor Complexes: Interactions with Human Serum Albumin and DNA, and Inhibition of Cathepsin B. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (2), 974–982. <https://doi.org/10.1021/ic302219v>.
- (28) Zhang, H.; Huang, X.; Zhang, M. Spectral Diagnostics of the Interaction between Pyridoxine Hydrochloride and Bovine Serum Albumin in Vitro. *Mol. Biol. Rep.* **2008**, 35 (4), 699–705. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9143-x>.
- (29) Devagi, G.; Dallemer, F.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R. Organometallic Ruthenium(II) Complexes Containing NS Donor Schiff Bases: Synthesis, Structure, Electrochemistry, DNA/BSA Binding, DNA Cleavage, Radical Scavenging and Antibacterial Activities. *J. Organomet. Chem.* **2018**, 854, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.10.036>.
- (30) Berić, J. D.; Stojanović, S. D.; Mrkalić, E. M.; Matović, Z. D.; Milovanović, D. R.; Sovrlić, M. M.; Jelić, R. M. Interaction of Haloperidol with Human Serum Albumin and Effect of Metal Ions on the Binding. *Monatsh. Chem.* **2018**, 149 (12), 2359–2368. <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2310-z>.
- (31) Egas-Bejar, D.; Huh, W. W. Rhabdomyosarcoma in Adolescent and Young Adult Patients: Current Perspectives. *Adolesc. Health Med. Ther.* **2014**, 5, 115–125. <https://doi.org/10.2147/AHMT.S44582>.
- (32) Dela Cruz, F. S. Cancer Stem Cells in Pediatric Sarcomas. *Front. Oncol.* **2013**, 3, 168. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00168>.
- (33) Moore, D. S.; Notz, W.; Fligner, M. A. *The Basic Practice of Statistics*, 6th ed.; W.H. Freeman and Co.: New York, 2013.
- (34) Coverdale, J. P. C.; Bridgewater, H. E.; Song, J.-I.; Smith, N. A.; Barry, N. P. E.; Bagley, I.; Sadler, P. J.; Romero-Canelón, I. In Vivo Selectivity and Localization of Reactive Oxygen Species (ROS) Induction by Osmium Anticancer Complexes That Circumvent Platinum Resistance. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (20), 9246–9255. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00958>.
- (35) Marx, J. Cancer's Perpetual Source? *Science* **2007**, 317 (5841), 1029–1031. <https://doi.org/10.1126/science.317.5841.1029>.
- (36) McDermott, S. P.; Wicha, M. S. Targeting Breast Cancer Stem Cells. *Mol. Oncol.* **2010**, 4 (5), 404–419. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.06.005>.
- (37) Kaiser, J. The Cancer Stem Cell Gamble. *Science* **2015**, 347 (6219), 226–229. <https://doi.org/10.1126/science.347.6219.226>.
- (38) Zhang, H.; Wu, H.; Zheng, J.; Yu, P.; Xu, L.; Jiang, P.; Gao, J.; Wang, H.; Zhang, Y. Transforming Growth Factor B1 Signal Is Crucial for Dedifferentiation of Cancer Cells to Cancer Stem Cells in Osteosarcoma. *Stem Cells* **2013**, 31 (3), 433–446. <https://doi.org/10.1002/stem.1298>.

Capítulo 3

Complejos ciclometalados de Os(II) con actividad antiproliferativa que alteran la homeostasis del calcio en células cancerosas



Los ensayos biológicos presentados en este capítulo han sido realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec, del Instituto de Biofísica de la República Checa.

3.1. Introducción

El éxito de los fármacos de platino propició el desarrollo e investigación de los compuestos de rutenio y osmio como alternativas prometedoras para el tratamiento del cáncer, gracias a sus intrínsecas propiedades fisicoquímicas.^{1,2} Hasta ahora se han diseñado numerosos compuestos de osmio con estructura tipo semi-sándwich, utilizando diferentes ligandos y tipos de enlaces.³⁻⁸ También se han preparado compuestos de osmio de tipo polipiridilo que han demostrado ser eficientes fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica.⁹⁻¹¹ Sin embargo, hasta la fecha, existen pocos ejemplos de complejos octaédricos ciclometalados con estequiometría $[\text{Os}(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]^+$.^{12,13} Entre estos destaca $[\text{Os}(\text{ppy})(\text{phen})_2]^+$, el cual induce estrés en el retículo endoplasmático.¹⁴

Con el fin de explorar las propiedades antiproliferativas y el mecanismo de acción de los compuestos de Os(II) del tipo $[\text{Os}(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]^+$, el presente capítulo se centra en la síntesis y caracterización de nuevos complejos con dicha estructura. En ellos el ligando $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ contiene un núcleo de benzimidazol, ampliamente utilizado por sus propiedades farmacológicas,¹⁵⁻¹⁷ mientras que el ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es la 2,2'-bipiridina (bpy) o la dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina (dpq) (**Figura 3.1**). El ligando $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ incorpora un grupo éster que permite posteriores funcionalizaciones y, además, se han introducido diferentes sustituyentes en el grupo arilo del ligando $\text{C}^{\wedge}\text{N}$, con el objetivo de establecer relaciones estructura-actividad.

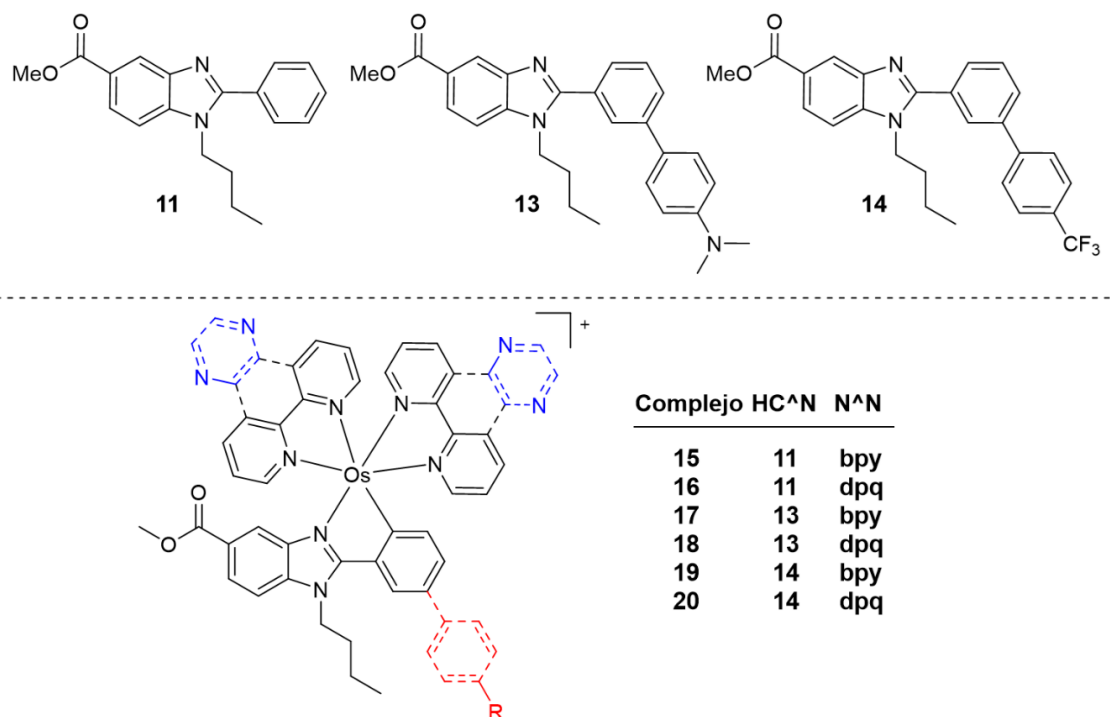


Figura 3.1. Estructura general de los complejos sintetizados en este capítulo.

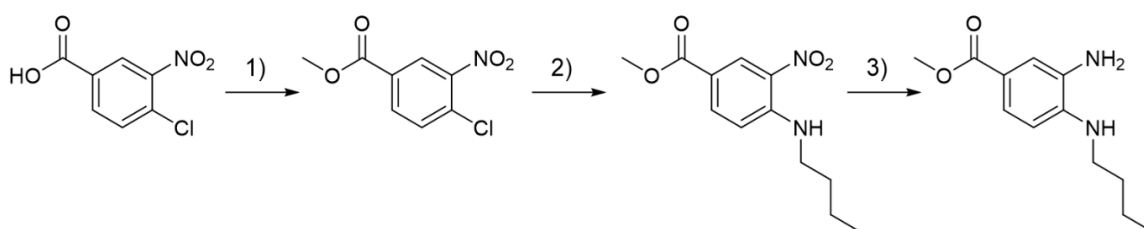
Finalmente, se presentan los resultados de la actividad antiproliferativa de los nuevos compuestos frente a un panel de células cancerosas humanas, y se describe su mecanismo de acción en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231).

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Síntesis y caracterización de los proligandos

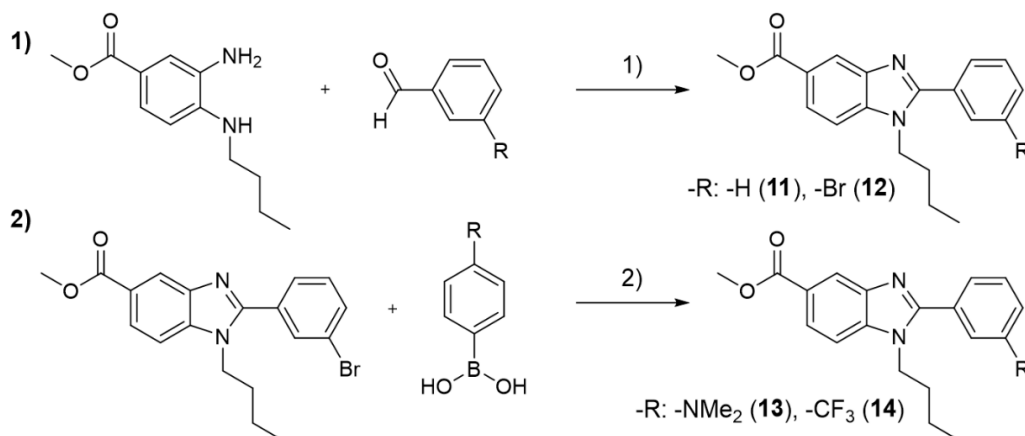
En primer lugar, se diseñaron y sintetizaron dos nuevos proligandos basados en núcleos de benzimidazol conjugados con un anillo de bifenilo que, a su vez, presenta sustituyentes dadores o retiradores de electrones (**13** y **14**, **Figura 3.1**). También, se preparó el proligando **11**, previamente descrito por nuestro grupo de investigación.^{17,18} Todos ellos presentan un grupo éster que permite su posterior funcionalización, por ejemplo para dirigirlos a una diana específica o para incluir un cromóforo orgánico.^{19,20}

Los proligandos se obtuvieron siguiendo varias etapas de reacción. Para la obtención de la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo se siguieron tres pasos de reacción (**Esquema 3.1**). La síntesis comienza con una esterificación de Fischer, seguida de una aminación y, en último lugar, una reacción de reducción para obtener la diamina empleada como precursora en la preparación de los proligandos.^{17,18}



Esquema 3.1. Procedimiento de síntesis de 3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo. Condiciones de reacción: **1)** H₂SO₄ (cat), MeOH, 65 °C, 24 h; **2)** BuNH₂, Et₃N, CH₂Cl₂, t.a., atm. N₂, 72 h; **3)** Zn (polvo), HCOONH₄, AcOEt/MeOH (4:1, v:v), 50 °C, atm. N₂, 48 h.

A continuación, se llevó a cabo una reacción de condensación mediante un procedimiento adaptado de la bibliografía²¹ entre la diamina obtenida y el correspondiente aldehído en una mezcla de agua:etanol 1:1 (v:v), en presencia de NaHCO₃ a 80 °C durante 24 h para obtener el proligando **11** y el intermedio **12** (Etapa 1, **Esquema 3.2**). Finalmente, se obtuvieron los proligandos **13** y **14** a través de una reacción de acoplamiento cruzado C-C de tipo Suzuki entre el intermedio **12** y el ácido borónico correspondiente (Etapa 2, **Esquema 3.2**), en una mezcla de tolueno:H₂O:EtOH 3:2:1 (v:v:v), en presencia de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) como catalizador a 120 °C durante 1 h en un microondas de reacción.



Esquema 3.2. Síntesis de los prolíandos HC^N de tipo benzimidazol. **1)** NaHSO₃, EtOH/H₂O, 80 °C, 18 h; **2)** K₂CO₃, [Pd(PPh₃)₄], 120 °C, MW, Tolueno:H₂O:EtOH 3:2:1 (v:v:v).

Los nuevos prolíandos se caracterizaron mediante diferentes técnicas: resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y carbono (¹³C-RMN) (**Figuras A2.1-A2.6**), análisis elemental y ESI-MS (**Figuras A2.18 y A2.19**).

Espectroscopía UV/Visible de absorción y de emisión

Por otra parte, se registraron los espectros de absorción UV/Vis y de emisión de los dos nuevos prolíandos (**13** y **14**) en acetonitrilo a una concentración de 10 µM. En la **Figura 3.2** se observa que el carácter dador de electrones del sustituyente dimetilamino (**13**) conduce a un pequeño desplazamiento batocrómico de la banda de menor energía del espectro de absorción, en comparación con su análogo del grupo trifluorometilo (**14**). Al comparar sus espectros de emisión, se observa que el compuesto **13** experimenta un desplazamiento batocrómico significativo respecto a **14**, alcanzando su máximo de emisión a 509 nm.

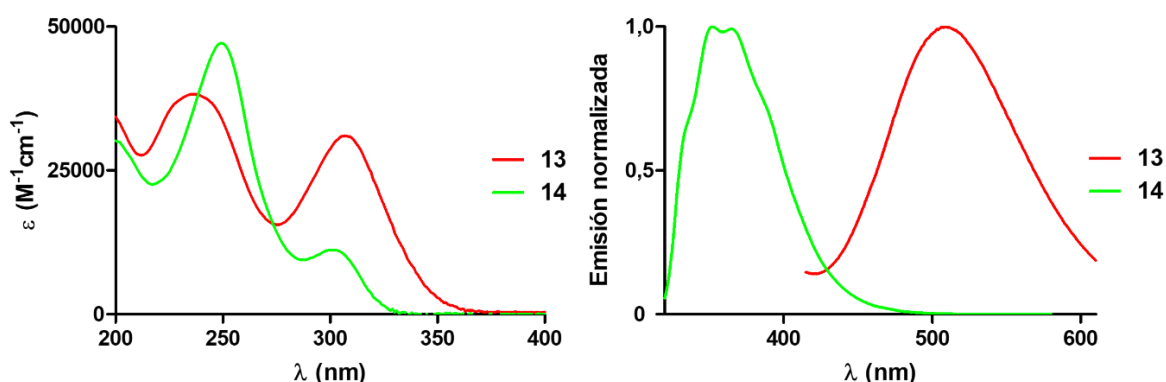


Figura 3.2. Espectros de absorción y emisión de los nuevos prolíandos **13** y **14**.

En la **Tabla 3.1** se recogen los valores de los máximos de las bandas de absorción (λ_{abs}) y su coeficiente de extinción molar (ϵ), las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y los máximos de emisión (λ_{em}) de los nuevos prolígandos.

Tabla 3.1. Propiedades fotofísicas de los prolígandos en acetonitrilo.

Ligando	λ_{abs} (nm) (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
13	237 (38290) 307 (31020)	315	509
14	249 (47150) 302 (11200)	300	352

Los espectros de emisión de los ligandos se registraron en disolventes de distinta polaridad con el fin de analizar la naturaleza del estado excitado. Los disolventes utilizados fueron: tolueno (2,1), cloroformo (4,1), acetonitrilo (5,8) y DMSO (7,2). En la **Figura 3.3** se puede observar que el ligando **13**, a diferencia del **14**, sufre un desplazamiento batocrómico de su máximo de emisión al aumentar la polaridad del disolvente. Este efecto solvatofluorocrómico se explica por el fuerte carácter ICT del estado excitado de este compuesto.^{22,23}

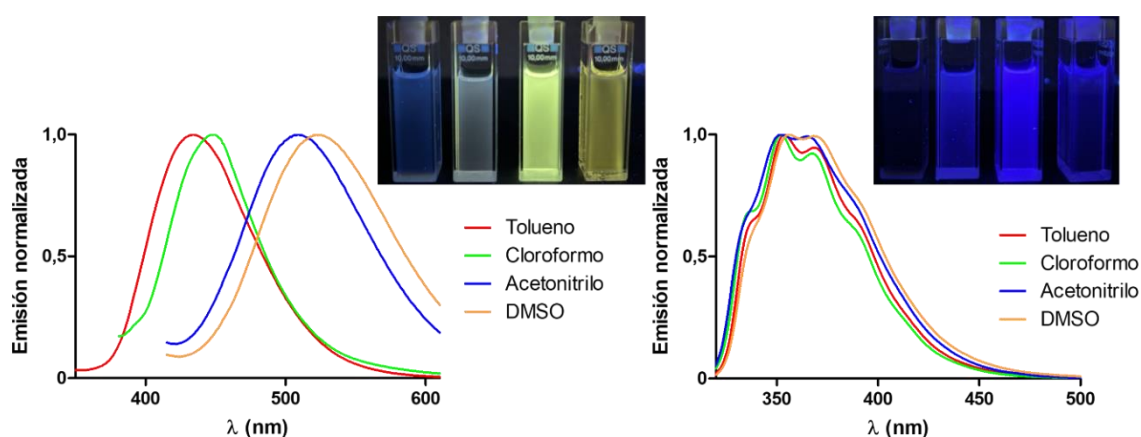
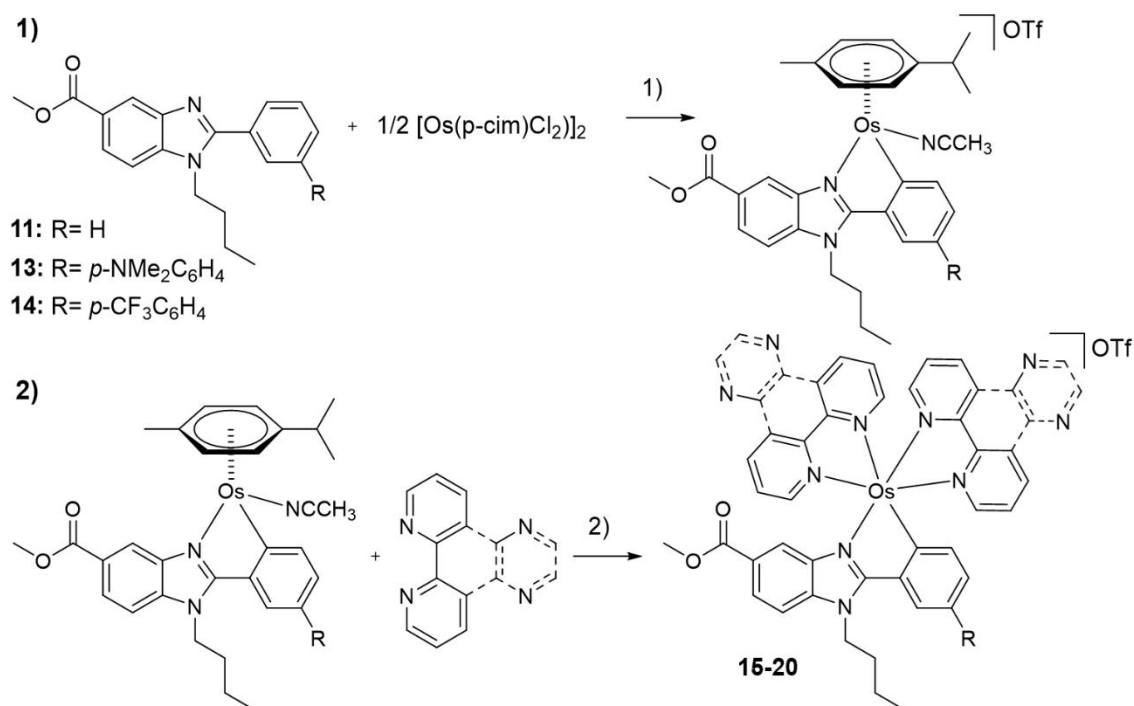


Figura 3.3. Espectros de emisión de los prolígandos **13** (izquierda) y **14** (derecha) en disolventes de distinta polaridad. **13**: λ_{ex} = 315 nm; **14**: λ_{ex} = 300 nm.

3.2.2. Síntesis de los complejos de Os(II)

Los complejos **15-20** se obtuvieron mediante un procedimiento de dos etapas adaptado de la bibliografía.¹⁷ En la primera etapa se hizo reaccionar el dímero de osmio [$\text{Os}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}(\mu\text{-Cl})_2$] con el prolígando HC^N correspondiente (**11**, **13-14**), en presencia de un exceso de triflato potásico y acetato potásico, en acetonitrilo a 80 °C durante 1 h bajo microondas (Etapa 1, **Esquema 3.3**). En la segunda etapa, se obtuvieron los complejos **15-20** mediante la reacción del intermedio $[\text{Os}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{CH}_3\text{CN})]^+$ con el ligando N^N (bpy o dpq) en metanol a 65 °C durante 30 minutos bajo microondas (Etapa 2, **Esquema 3.3**).



Esquema 3.3. Procedimiento de síntesis de los complejos **15-20**. Condiciones de reacción: **1)** KOAc, KOTf, CH₃CN, 80 °C, 1 h, MW. **2)** MeOH, 65 °C, 30 min, MW.

Con el fin de dilucidar la estructura del intermedio de reacción, se monitorizó la reacción del complejo **15** mediante ¹H-RMN en CD₃CN. En la **Figura 3.4**, se presentan los espectros de protón del dímero, el intermedio de reacción y el complejo **15**. En el espectro del intermedio aparecen las señales de los metilos correspondientes al anillo de *p*-cimeno como dos dobletes, debido a la pérdida de simetría. Además, la introducción de los ligandos de bipyridina provoca un desplazamiento a campo alto de la señal del grupo éster.

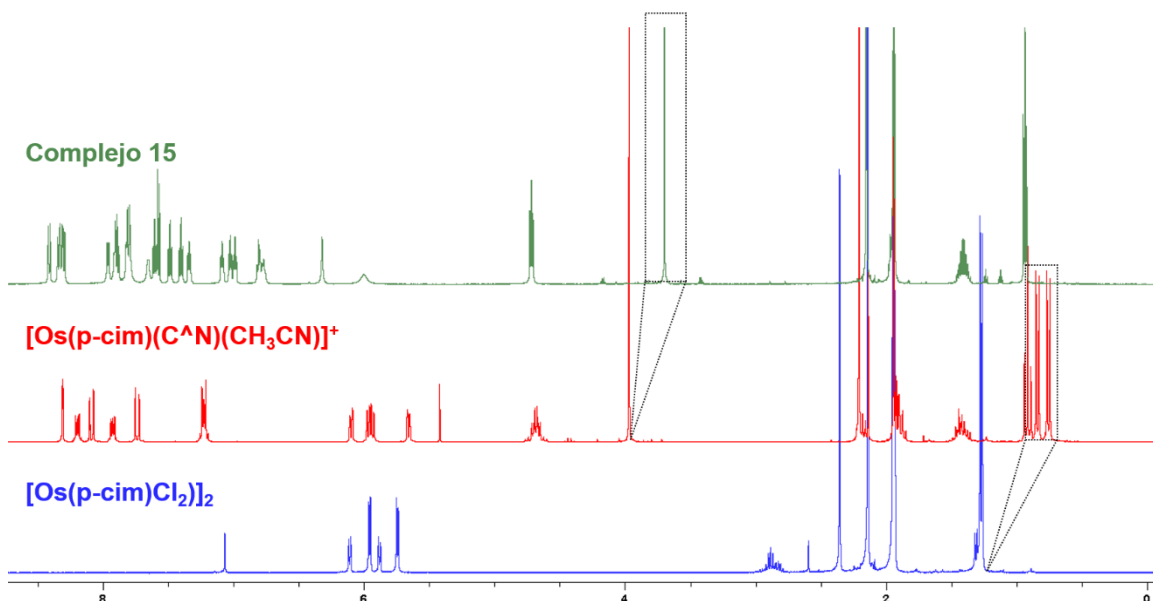


Figura 3.4. ¹H-RMN del complejo **15**, su intermedio de reacción y el dímero de osmio en CD₃CN.

3.2.3. Caracterización de los nuevos complejos

Todos los complejos sintetizados se caracterizaron mediante diferentes técnicas: espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, DEPT-135, ^{13}C -RMN), ESI-MS y análisis elemental (**Figuras A2.7-A2.17** y **Figuras A2.20-A2.25**).

Espectroscopía de RMN

Los espectros de ^1H -RMN de los monómeros de osmio muestran las señales características esperadas. A modo de ejemplo, en la **Figura 3.5**, se presenta el espectro del complejo **15** en CD_3CN a temperatura ambiente. En todos los compuestos, el metilo del grupo éster aparece como un singlete que integra tres protones alrededor de δ 3,75 ppm. El grupo butilo origina cuatro señales características: tres multipletes a δ 4,75, 2,0 y 1,45 ppm, y un triplete en torno a δ 0,95 ppm. Además de estas señales comunes, los espectros de los complejos **17** y **18**, que contienen el grupo dimetilamino en el ligando C^*N , muestran un singlete que integra a 6 protones en torno a δ 3,0 ppm.

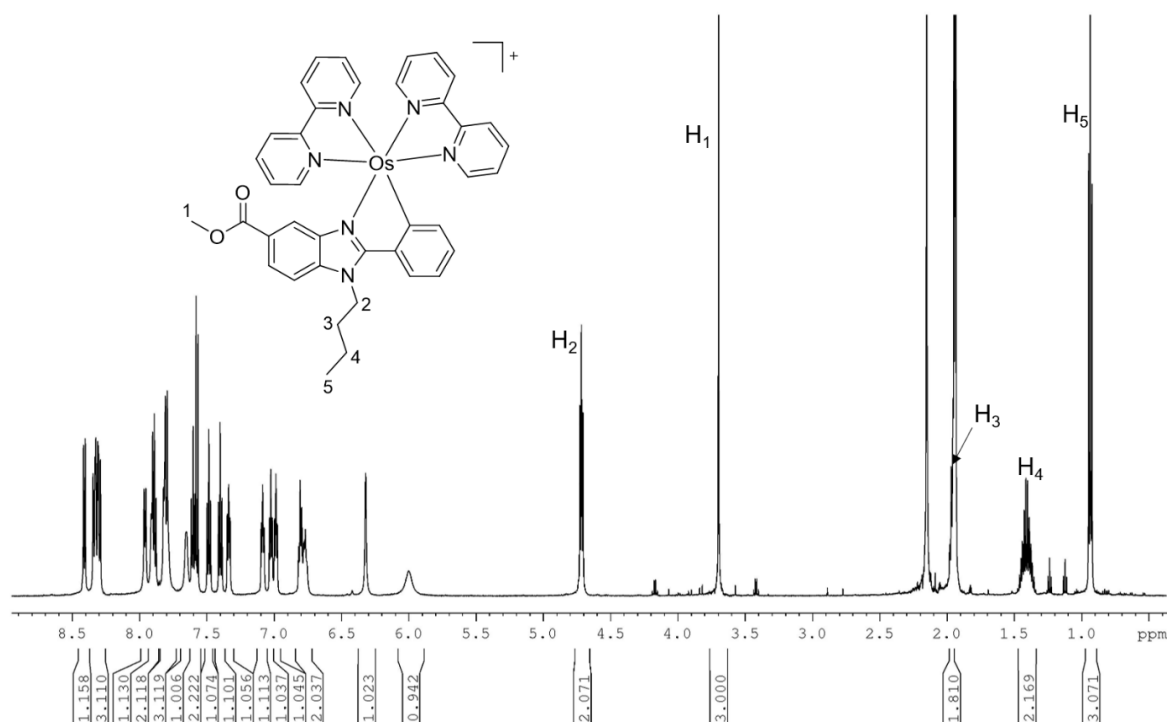


Figura 3.5. Espectro de ^1H -RMN de **15** en CD_3CN , en el que destacan las señales más características de estos complejos.

Espectrometría de masas y análisis elemental

Con el fin de completar la caracterización, se obtuvieron los datos de análisis elemental y los espectros de masas de los complejos mediante espectrometría de masas por inserción directa con ionización por electrospray en modo positivo (ESI+). En todos los casos, se observó un pico correspondiente al ion molecular y el cual muestra perfil

isotópico esperado. En la **Tabla 3.2** se recogen dichos datos, junto con los de análisis elemental, que son concordantes con las formulaciones propuestas y confirman la pureza superior al 95 %.

Tabla 3.2. Valores de masas y de análisis elemental obtenidos de los compuestos preparados.^a

Compuesto	Análisis elemental (%)				ESI-MS	
	C	H	N	S	Fragmento	m/z
15	50,14	3,86	8,52	3,41	[M-OTf] ⁺	811,2449
	(50,10)	(3,68)	(8,76)	(3,34)		(811,2431)
16	51,72	3,07	12,59	2,79	[M-OTf] ⁺	963,2564
	(51,88)	(3,17)	(12,61)	(2,84)		(963,2554)
17	53,49	4,06	9,13	3,13	[M-OTf] ⁺	930,3078
	(53,47)	(4,11)	(9,09)	(2,97)		(930,3166)
18	54,61	3,62	12,55	2,72	[M-OTf] ⁺	1082,3292
	(54,67)	(3,60)	(12,52)	(2,61)		(1082,3289)
19	51,11	3,39	7,36	2,96	[M-OTf] ⁺	955,2641
	(51,17)	(3,47)	(7,62)	(2,91)		(955,2618)
20	52,53	2,93	11,01	2,62	[M-OTf] ⁺	1107,2747
	(52,63)	(3,05)	(11,16)	(2,55)		(1107,2741)

^aValores teóricos calculados entre paréntesis

3.2.4. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

La estructura molecular del complejo **17** se confirmó mediante difracción de rayos X de monocristal. Los monocristales se obtuvieron a través de la difusión lenta de éter etílico en una disolución saturada del compuesto en diclorometano. La toma de datos y el refinamiento de la estructura cristalina fueron realizados por la Dra. Delia Bautista Cerezo, del SAI de la Universidad de Murcia. La **Figura 3.6** muestra la estructura cristalina, mientras que la **Tabla 3.3** recoge parte de los datos cristalográficos del complejo **17**, incluyendo las dimensiones de la celdilla unidad. El resto de los datos del análisis cristalográfico se encuentran recogidos en la **Tabla A2.1**.

La estructura de rayos X confirma de manera inequívoca la estequiometría propuesta. El complejo presenta una geometría octaédrica alrededor del átomo de osmio, con los cuatro átomos de nitrógeno de los dos ligandos bpy (N1-N4) y las dos posiciones restantes ocupadas por el ligando ciclometalado. Esta estructura cristalina es la primera que se obtiene para el osmio y esta estequiometría. Sin embargo, las distancias de enlace

Os-N_{bpy} (2,0334-2,1210 Å) y Os-C15 (2,048(2)) son similares a las observadas en complejos ciclometalados análogos de Ru(II).¹⁷ Asimismo, la influencia trans del átomo de C σ unido al metal se manifiesta en una mayor distancia del enlace Os-N2 (2,1210(18) Å) en comparación con el resto.

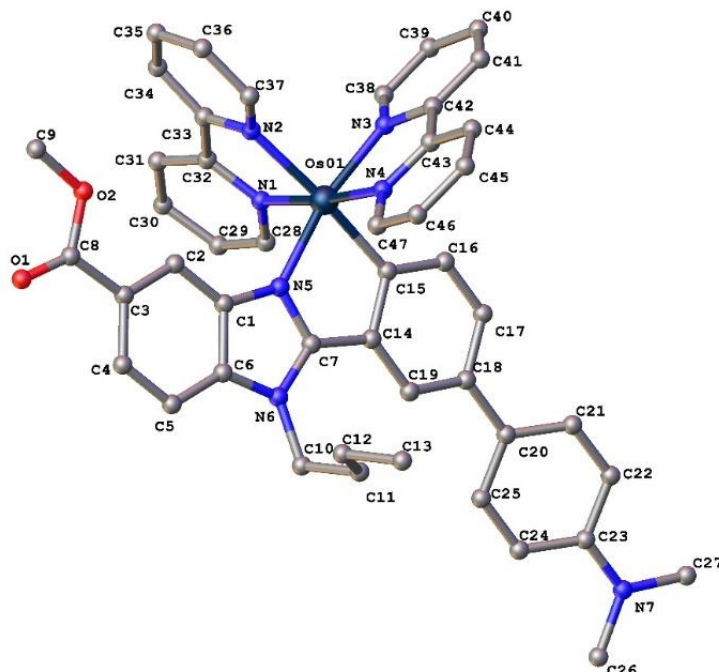


Figura 3.6. Estructura cristalina del compuesto **17**. Para mayor claridad se omiten los átomos de hidrógeno y el contraión. Distancias de enlace (Å): Os-N1: 2,0495(19); Os-N2: 2,1210(18); Os-N3: 2,0334(18); Os-N4: 2,040(2); Os-N5: 2,0727(18); Os-C15: 2,048(2). Ángulos (°): N(3)-Os(01)-N(4): 78,23(7); C(15)-Os(01)-N(5): 77,46(8); N(1)-Os(01)-N(2): 77,01(7).

Tabla 3.3. Datos cristalográficos del complejo **17**.

Sistema cristalino	Triclinico	Grupo espacial	P-1
Fórmula empírica	C ₄₈ H ₄₄ F ₃ N ₇ O ₅ OsS	Volumen (Å ³) ^a	2566,51(16)
Dimensiones de la celdilla unidad ^a			
a (Å)	13,5749(5)	α (°)	84,3400(10)
b (Å)	14,0139(5)	β (°)	71,0520(10)
c (Å)	16,0407(6)	γ (°)	62,2910(10)

^aLos valores entre paréntesis indican la desviación estándar de la medida.

En cuanto a las interacciones intra- e intermoleculares, la estructura cristalina del complejo **17** revela la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares entre el átomo de hidrógeno H(11A) del grupo butilo del benzimidazol y el átomo de oxígeno O(55) del anión triflato, así como entre el átomo de nitrógeno N(5) del anillo de benzimidazol y el hidrógeno H47 del anillo de bipyridina. De igual forma, el empaquetamiento en la estructura del complejo está organizado mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares, los cuales

se detallan en la **Tabla 3.4**. A modo ilustrativo, en la **Figura 3.7** se muestra el enlace de hidrógeno que se establece entre el átomo H39 del anillo de bipyridina de un catión y el átomo de oxígeno (O1) del grupo éster del catión vecino.

Tabla 3.4. Enlaces de hidrógeno observados en la estructura cristalina del complejo **17**.

D-H...A	d(D-H) (Å)	d(H...A) (Å)	d(D...A) (Å)	<(DHA) (°)
C(9)-H(9A)...F(49) ^a	0,98	2,62	3,497(4)	148,9
C(11)-H(11A)...O(55)	0,99	2,53	3,397(4)	146,2
C(34)-H(34)...O(53) ^b	0,95	2,35	3,239(3)	155,2
C(39)-H(39)...O(1) ^c	0,95	2,56	3,202(3)	125,5
C(41)-H(41)...O(55) ^d	0,95	2,63	3,506(4)	152,7
C(44)-H(44)...O(55) ^d	0,95	2,65	3,480(4)	145,8
C(47)-H(47)...N(5)	0,95	2,64	3,188(3)	117,1

Transformación de simetría utilizada para generar los átomos equivalentes: ^ax, y, z-1; ^b-x+1, -y+2, -z+1; ^cx, y-1, z; ^d-x+2, -y+1, -z+1.

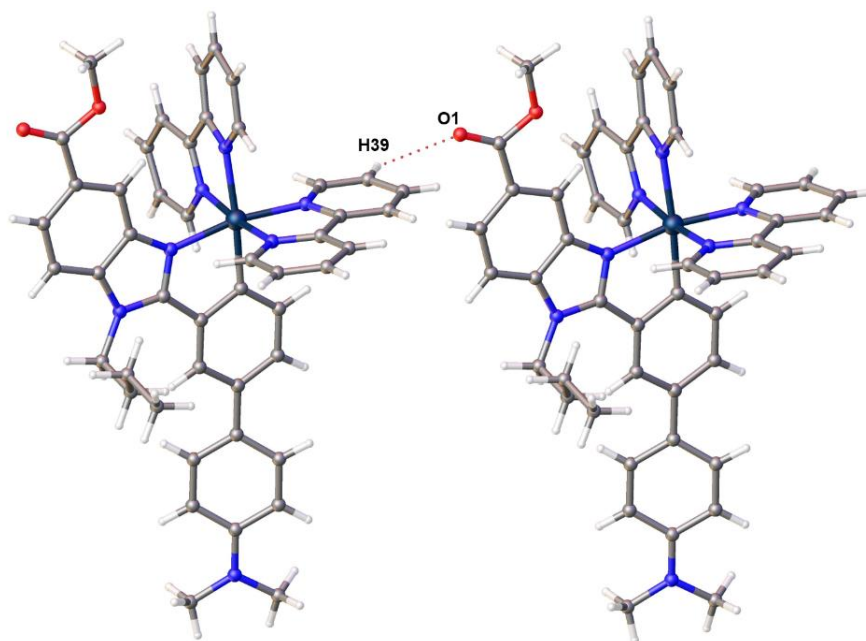


Figura 3.7. Interacciones C-H...O en el cristal de **17** indicadas con líneas discontinuas rojas. Se han omitido los contraiones por claridad.

3.2.5. Espectroscopía de absorción UV/Vis

Los espectros de absorción UV/Vis de los complejos **15-20** se registraron en DMSO y acetonitrilo a una concentración de 10 μM a temperatura ambiente (**Figura 3.8**).

Todos los complejos son absorbentes pancromáticos, tanto en DMSO como en acetonitrilo, ya que presentan absorción continua de 200 a 950 nm. Las bandas de absorción intensas entre 200 y 400 nm ($\epsilon \sim 120000\text{-}60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) pueden atribuirse a

transiciones electrónicas $\pi\text{-}\pi^*$ de los ligandos ciclometalados y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ -dadores. Las bandas de absorción moderadamente intensas en el rango visible (370-630 nm) podrían asignarse a transiciones de transferencia de carga metal-ligando (MLCT) permitidas por la regla espín, mientras que las bandas de absorción $^3\text{MLCT}$ débiles y anchas, y prohibidas por el espín, se observan en la región NIR (630-900 nm) como consecuencia del acoplamiento espín-órbita del átomo pesado de Os(II).^{24,25} Las modificaciones estructurales del ligando C[^]N tuvieron un efecto moderado en los espectros de absorción UV/vis de los complejos. Sin embargo, la presencia del ligando dpq produce un aumento en la intensidad de absorción de la banda MLCT, en comparación con sus análogos que contienen el ligando bpy.

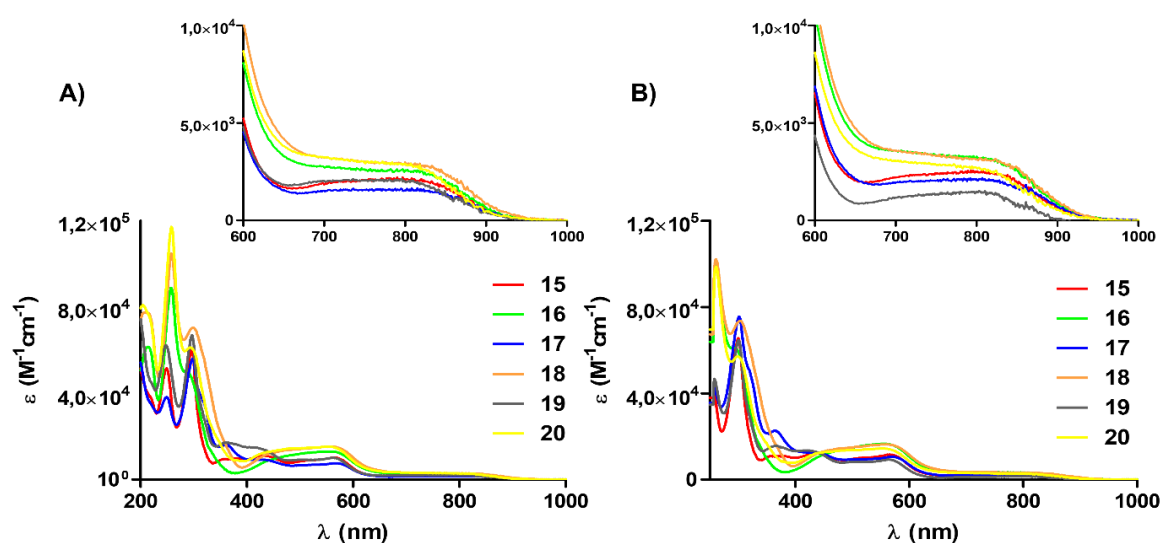


Figura 3.8. Espectros de absorción UV/Vis de **15-20** (10 μM) en: **A)** acetonitrilo y **B)** DMSO a temperatura ambiente. En ambos casos se muestra una ampliación de 600 a 1000 nm.

En la **Tabla 3.5** se recogen los máximos de absorción de los complejos y su coeficiente de extinción molar.

Tabla 3.5. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y coeficiente de extinción molar (ϵ) de los complejos en acetonitrilo y DMSO.

Comp.	Disolvente	λ_{abs} (nm) (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
15	CH ₃ CN	249 (51520), 296 (60490), 562 (10220)
	DMSO	258 (41530), 300 (65550), 373 (10920), 439 (12280), 566(11600)
16	CH ₃ CN	258 (88870), 288 (49920), 554 (13020)
	DMSO	261 (100620), 296 (60840), 558 (16560)
17	CH ₃ CN	249 (38270), 298 (55920), 360 (16250), 431 (9160), 567 (7590)
	DMSO	258 (42960), 302 (75550), 365 (22720), 455 ^h (11330), 568

		(10540)
18	CH ₃ CN	258 (104710), 299 (70410), 560 (15230)
	DMSO	261 (102130), 303 (73550), 460 ^h (13670), 569 ^h (16070), 584 (14610)
19	CH ₃ CN	248 (62200), 297 (66910), 361 (17210), 501 (9190), 563 (10060)
	DMSO	258 (46650), 300 (64640), 375 (15020), 438 ^h (12760), 568 ^h (9170)
20	CH ₃ CN	258 (117140), 293 (61250), 554 (5200)
	DMSO	261 (98620), 298 (57010), 438 ^h (12170), 563 ^h (14180)

3.2.6. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

Tras completar la caracterización estructural y espectroscópica de los nuevos complejos, y antes de examinar sus propiedades biológicas, se llevaron a cabo estudios de estabilidad y fotoestabilidad. En primer lugar, se investigó la estabilidad de los complejos (10 μ M) en DMSO tras 48 h a temperatura ambiente y en medio de cultivo DMEM (5 % DMSO), suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS). Para ello, se registró el espectro UV/Vis a tiempo inicial y tras 48 h de incubación a 37 °C. En la **Figura 3.9** y en las **Figuras A2.26-A2.27** se puede observar que todos los complejos son estables en las condiciones ensayadas, pues los espectros de absorción UV/Vis permanecen sin cambios significativos.

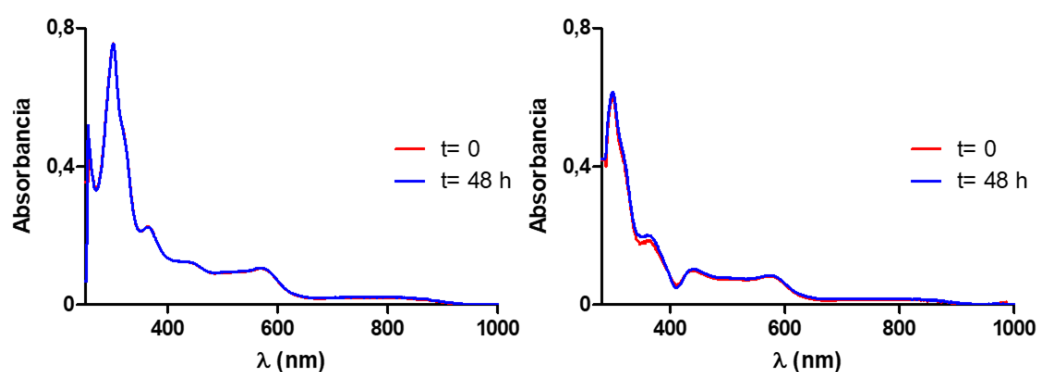


Figura 3.9. Espectro de absorción del complejo **17** DMSO (izquierda) a $t=0$ y 48 h y en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS (derecha) tras 48 h a 37 °C.

Además, con el fin de evaluar su posible aplicación en PDT, se comprobó la fotoestabilidad de los complejos mediante espectroscopía de absorción UV/Vis tras la irradiación con luz verde (520 nm, 2 mW/cm²) (**Figura 3.10** para **17** y **20** y **Figura A2.28** para el resto). En la **Figura 3.10** se puede observar que no se producen alteraciones en las bandas de absorción de ninguno de los compuestos, demostrando así su fotoestabilidad en dichas condiciones.

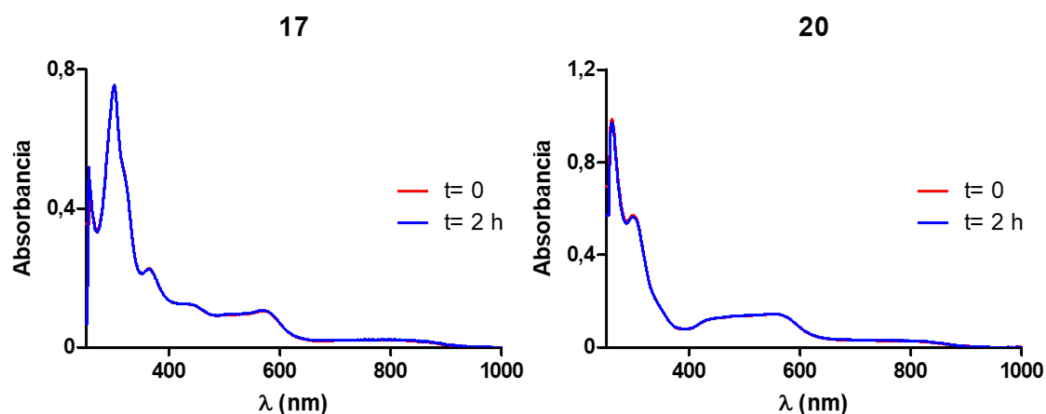


Figura 3.10. Espectros de absorción de los complejos **17** y **20** (10 μM) en DMSO a $t=0$ y a $t=2$ h tras irradiación de luz verde (520, 2,0 mW/cm^2).

3.2.7. Interacción con la seroalbúmina

A continuación, se llevó a cabo el estudio de la interacción de los complejos de osmio con la HSA. En primer lugar, y tal y como se realizó en el Capítulo 2, se investigó si los compuestos siguen un único mecanismo de extinción al interaccionar con la proteína.^{26,27} Para ello, se registró el espectro de emisión de la HSA (2,5 μM) tras la adición de cantidades crecientes de los complejos (0-25 μM ; **Figuras 3.11** y **A2.29**), y se aplicó la ecuación de Stern-Volmer (**Ecuación 2.1**). En la **Figura 3.13** se observa que, en todos los casos, la gráfica de F_0/F frente a la concentración presenta una relación lineal, lo que evidencia la existencia de un único mecanismo de extinción.²⁸

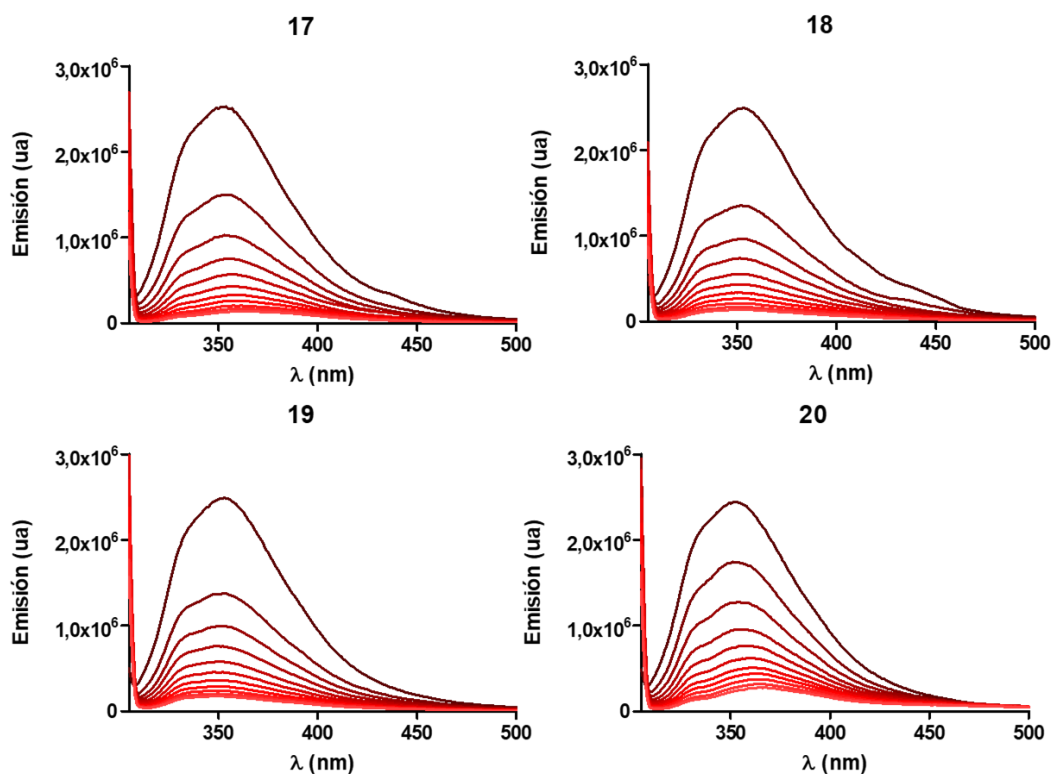


Figura 3.11. Espectro de emisión de la HSA (2,5 μM) en presencia de cantidades crecientes de los complejos **17-20** (0-25 μM). El aumento de la concentración se produce de arriba abajo.

Para determinar si el mecanismo de extinción es de naturaleza estática o dinámica, se estudió la variación del espectro de absorción de la HSA ($1\ \mu\text{M}$) en presencia de un equivalente de los complejos. En la **Figura 3.12** se observa que, en todos los casos, se produce una disminución de la banda a $210\ \text{nm}$ acompañada de un desplazamiento batocrómico, lo que indica que el mecanismo de extinción es estático. Esto sugiere que el compuesto interactúa con el estado basal de la HSA, formando un complejo que induce una modificación observable en el espectro de absorción.²⁸

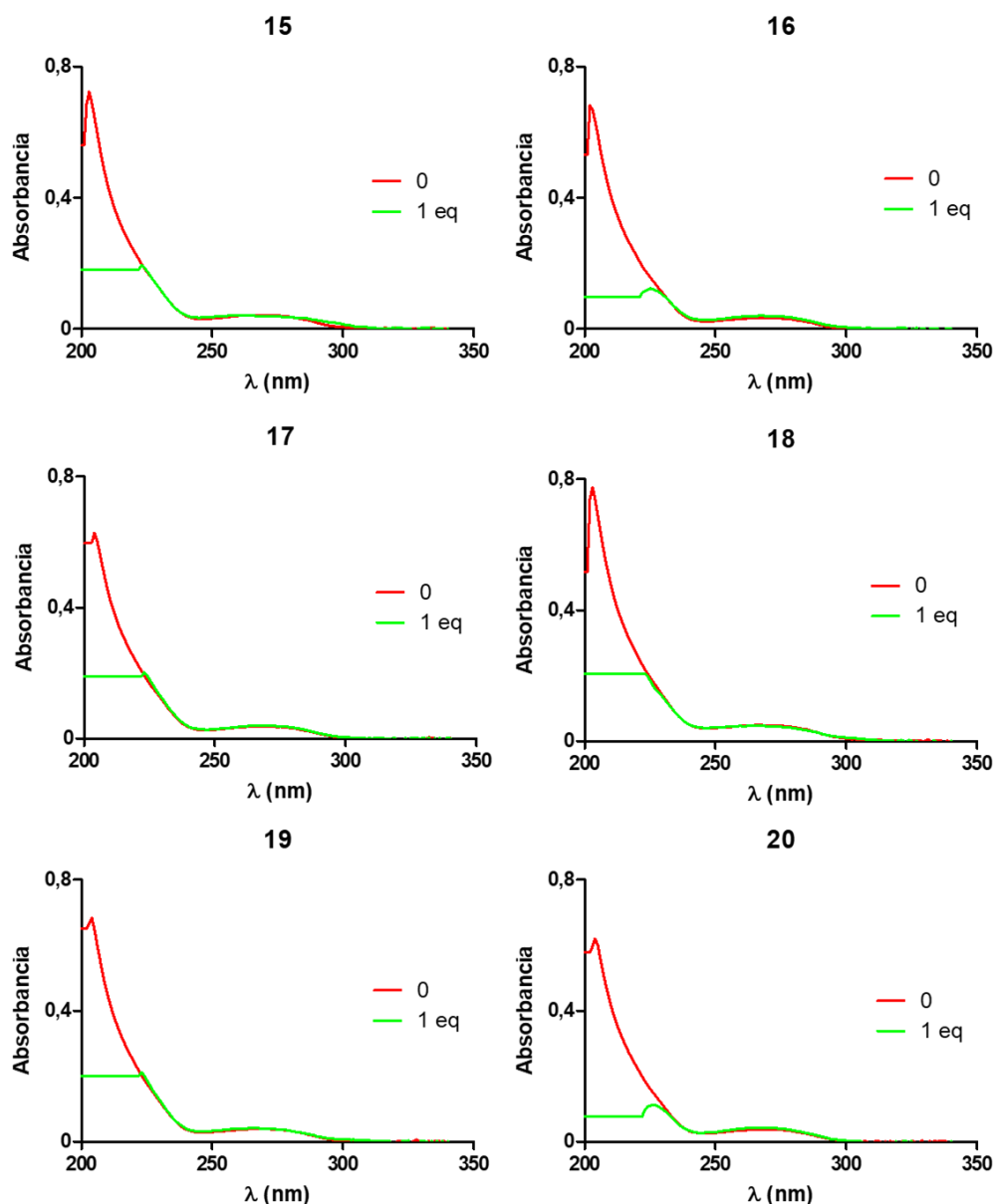


Figura 3.12. Espectro de absorción de la HSA ($1\ \mu\text{M}$) tras adicionar un equivalente de cada uno de los complejos **15-20**.

Finalmente, para conocer los parámetros de enlace de los complejos con la HSA, se aplicó la ecuación de Scatchard (**Ecuación 2.2**).²⁸ El gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ respecto al $\log[C]$ para los complejos **15-20** se muestra en la **Figura 3.13**. Por su parte, en la **Tabla**

3.6 se recogen los valores de la constante de extinción de la fluorescencia o constante de Stern-Volmer (K_{SV}), la constante de enlace (K_B) de los complejos **15-20** con la seroalbúmina, así como el número de sitios de unión (n).

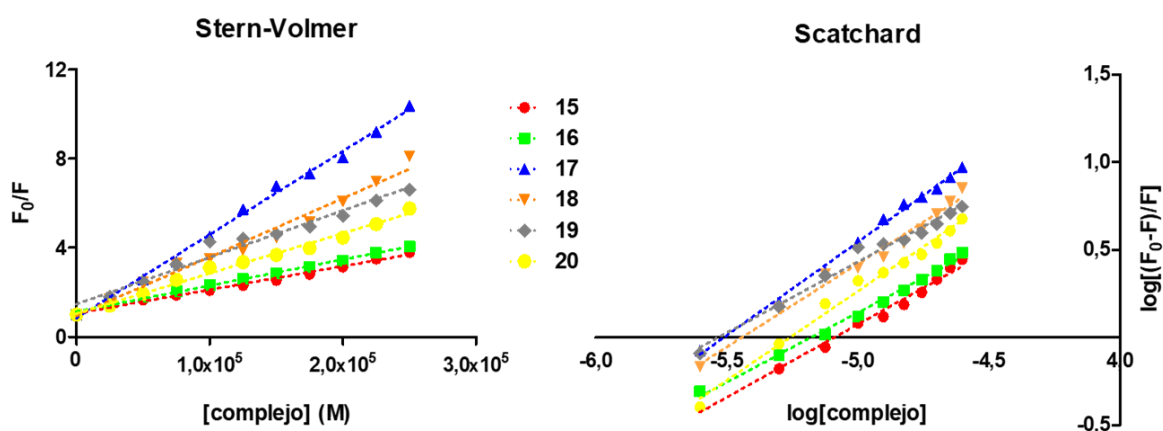


Figura 3.13. Representaciones de las ecuaciones de Stern-Volmer y Scatchard de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **15-20**.

Tabla 3.6. Valores de K_{SV} , K_B y n obtenidos de la interacción de **15-20** con la HSA.

Complejo	$K_{SV} (M^{-1}) \cdot 10^5$	$K_B (M^{-1}) \cdot 10^4$	n
15	1,06	1,35	0,81
16	1,16	1,32	0,79
17	3,74	73,9	1,06
18	2,63	14,6	0,95
19	2,10	3,02	0,81
20	1,79	2,18	1,02

El elevado valor de la constante de Stern-Volmer ($\sim 10^5$) sugiere que los complejos se unen efectivamente a la HSA. Al analizar los resultados se observa un mismo patrón para los complejos que contienen la bipyridina (**17**>**19**>**15**) y los que contienen la dpq (**18**>**20**>**16**). Resulta interesante mencionar que los complejos que presentan en su estructura el sustituyente electrodonador ($-NMe_2$) exhiben los mayores valores de dicha constante, seguidos de los complejos con el sustituyente electroaceptor ($-CF_3$) y, por último, los complejos sin sustituyente. Además, en los complejos con sustituyentes (**17-20**), el orden de los valores de la constante de Stern-Volmer y la constante de enlace (K_B) está directamente relacionado con su efectividad como agente antitumoral (**Tabla 3.7**).

3.3. Estudios biológicos

Uno de los objetivos del presente capítulo fue evaluar el potencial de los nuevos compuestos de Os(II) como agentes antitumorales. Para ello, se llevaron a cabo estudios

in vitro, los cuales fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa.

3.3.1. Viabilidad celular

Primero, se determinaron los valores IC_{50} de **15-20** y del cisplatino en las líneas tumorales HeLa, HCT116, MDA-MB-231, fibroblastos de pulmón sano (MRC5pd30) y células epiteliales de próstata sanas (PNT1A), tras 72 h en condiciones de oscuridad.

Tabla 3.7. Valores de IC_{50} (μM) obtenidos para **15-20** y CDDP en un panel de líneas celulares humanas, tras 72 h de incubación en la oscuridad determinado mediante ensayo MTT.^a

Complejo	HeLa	HCT116	MDA-MB-231	MRC5pd30	PNT1A
15	0,87 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,02
16	0,82 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01
17	0,58 $\pm$ 0,13	0,12 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,03
18	0,63 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02
19	0,74 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,01
20	1,09 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,15	0,57 $\pm$ 0,02
CDDP	14 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	2,4 $\pm$ 0,2

^aLos datos representan la media $\pm$ DE de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Los complejos presentan valores de IC_{50} del orden nanomolar, notablemente inferiores a los obtenidos con cisplatino. El complejo **17**, que contiene bpy como ligando N^N dador y el sustituyente *p*-NMe₂C₆H₄ en el ligando C^N, resultó ser el más potente de la serie. El complejo **20**, con dpq como ligando N^N y el sustituyente *p*-CF₃C₆H₄ en el ligando C^N, fue el menos activo en todas las líneas celulares, aunque marcadamente más potente que el cisplatino. Los estudios de viabilidad en células sanas revelaron que los complejos de osmio no fueron selectivos, sino que resultaron potentes tanto contra las células no cancerosas como contra las cancerosas.

El ensayo MTT mide el metabolismo celular en curso, pero no discrimina entre la citotoxicidad y efecto citostático. Para determinar si los complejos inhiben la proliferación celular o provocan su muerte, se realizó un ensayo de exclusión con azul tripán, que evalúa la citotoxicidad mediante la medición directa del número de células muertas o dañadas. Las células MDA-MB-231 se trataron con **17** o **20**, luego se cosecharon en determinados intervalos de incubación, se tiñeron con azul tripán y se contaron (**Figura 3.14**).

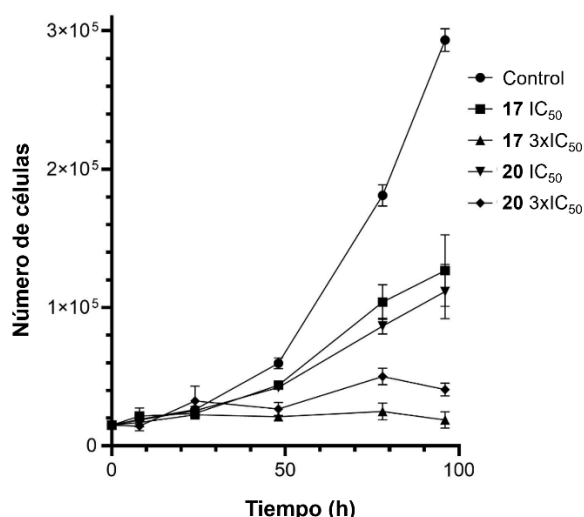


Figura 3.14. Perfil de crecimiento de células MDA-MB-231 no tratadas o tratadas con **17** o **20**. Las células se trataron con las concentraciones equitoxicas de los compuestos correspondientes a IC_{50,72h} o 3×IC_{50,72h}, determinadas mediante MTT.

Tal y como se indica en la **Figura 3.14**, los complejos inhibieron eficazmente la división celular y el crecimiento de la población celular, sin mostrar toxicidad significativa en las células MDA-MB-231 (**Figura A2.30**). Incluso después de 96 h de incubación, el número de células muertas fue relativamente bajo (10-20 %, **Figura A2.30**). Por lo tanto, se puede confirmar que los complejos no son tóxicos, sino fuertemente antiproliferativos. Aunque las células no estaban muertas, su morfología se vio afectada significativamente por el tratamiento con **17** y **20**, especialmente a tiempos más largos y/o concentraciones más altas (**Figura 3.15**).

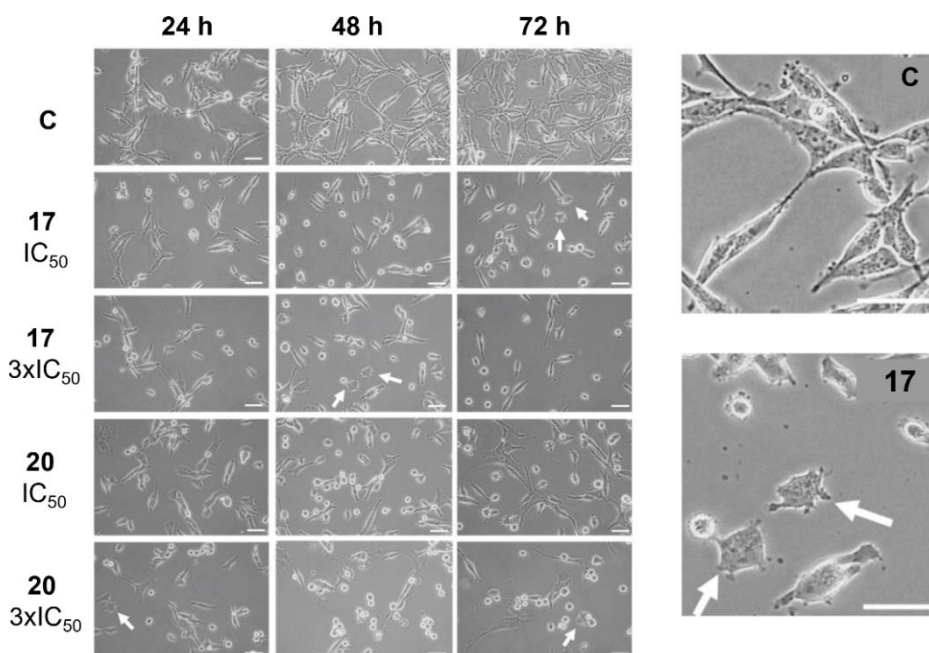


Figura 3.15. Imágenes de contraste de fases de MDA-MB-231 sin tratamiento (**C**) y con **17** o **20** a distintos tiempos y concentraciones. Para una mejor resolución, los dos paneles de la derecha muestran una sección ampliada de la imagen de las células no tratadas (**C**) y de las células tras el tratamiento con **17** (IC₅₀), ambas a las 72 h. La barra de escala representa 50 µm.

En la **Figura 3.15** se observa que las células no tratadas mostraban una morfología alargada y fusiforme con grandes lamelipodios salientes. Tras el tratamiento, las células adquieren una forma redondeada con lamelipodios más cortos.

3.3.2. Efecto antiproliferativo de los complejos en cultivos celulares 3D

Aunque los cultivos celulares en monocapa 2D son los más utilizados para evaluar la actividad biológica, los cultivos tridimensionales (3D) son un modelo más representativo para el cribado *in vitro* de fármacos contra el cáncer.^{29,30} Las células que crecen en cultivos 3D poseen características similares a los tumores *in vivo*, como: la hipoxia, la interacción célula-célula, la penetración del fármaco y la producción/deposición de la matriz extracelular.^{31,32} Por ello, se probó el efecto de **17** y **20** en cultivos 3D de células MDA-MB-231 (**Figuras 3.16** y **A2.31**).

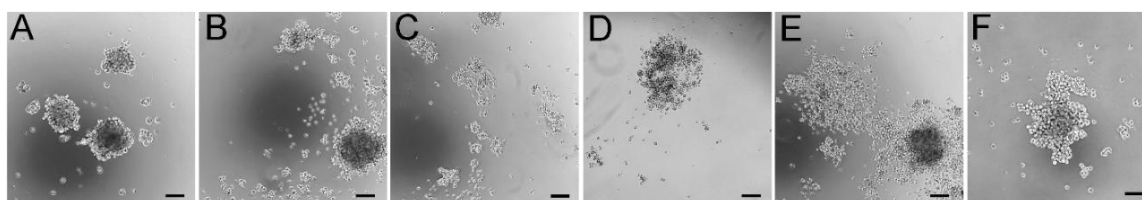


Figura 3.16. Esferoides de MDA-MB-231 sin tratar (**A**) o tratados con el complejo **17** a concentraciones de 0,62 μM (**B**), 1,25 μM (**C**), 2,5 μM (**D**), el complejo **20** a 2,5 μM (**E**) y cisplatino a 50 μM (**F**). Las barras de escala representan 100 μm .

Las mamoesferas MDA-MB-231 mostraron una mayor sensibilidad a los complejos de osmio en comparación con el cisplatino convencional, siendo el complejo **17** significativamente más potente que **20** (**Figura 3.16** y **Tabla 3.8**). Estos resultados confirman la tendencia de la actividad antiproliferativa observada en las células MDA-MB-231 cultivadas en monocapa 2D (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.8. Valores IC_{50} (μM) obtenidos para **17** y **20** en mamoesferas derivadas de MDA-MB-231, determinados mediante el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo 3D.

Complejo	IC_{50} (μM) ^a
17	0,82 $\pm$ 0,05
20	2,2 $\pm$ 0,1
CDDP	59 $\pm$ 6

^aLos datos representan valores medios $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

3.3.3. Determinación de las especies reactivas de oxígeno intracelulares

Generalmente, la actividad redox de los complejos de Os(II) se asocia con la formación de ROS en las células.³³ En este contexto, se han descrito previamente compuestos de osmio que inducen estrés oxidativo en células cancerosas.^{34–38} Por ello,

se investigó la generación de ROS por **17** y **20** mediante el ensayo CellROX Green. A diferencia del menadiol (control positivo), los niveles de ROS en las células expuestas a diferentes concentraciones de los complejos no fueron elevados (**Figura 3.17**). Esto sugiere que es improbable que la producción de ROS desempeñe un papel en la actividad biológica de los nuevos complejos.

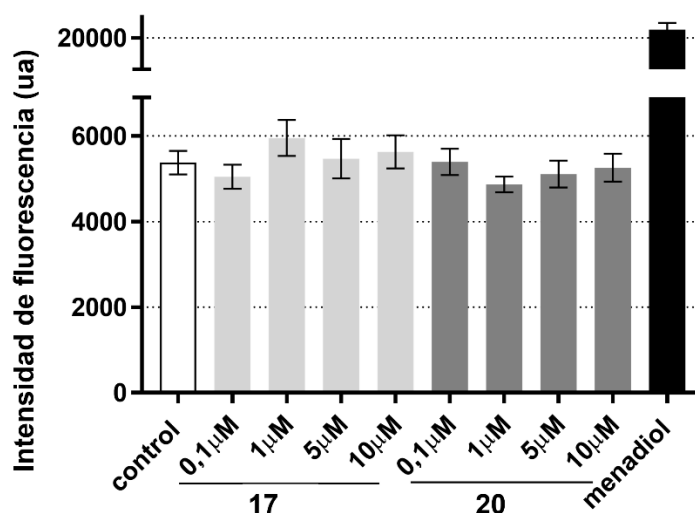


Figura 3.17. Niveles de ROS intracelulares en células MDA-MB-231. Las células se trataron con los complejos **17** y **20** en distintas concentraciones durante 2 h en oscuridad.

3.3.4. Efecto sobre la homeostasis del calcio

Los efectos biológicos deben estar relacionados con otro mecanismo diferente a la generación de ROS. Hasta la fecha, se han descrito varios compuestos de osmio y rutenio que inducen muerte celular a través de la activación de la vía del estrés del RE,^{14,39–41} lo que nos llevó a investigar la posibilidad de que los complejos de este capítulo también actuaran según este mecanismo.

El RE es un orgánulo celular crucial para la síntesis y maduración de péptidos, la síntesis de lípidos, la desintoxicación de sustancias químicas y el almacenamiento de calcio (Ca^{2+}).⁴² Los cambios en los niveles de Ca^{2+} se consideran un marcador fiable del estrés del RE,⁴³ ya que este estrés a menudo provoca la liberación de Ca^{2+} del lumen del RE.⁴⁴ La liberación de calcio del RE al citoplasma se estudió utilizando la sonda fluorescente sensible al calcio Fluo-4 AM. En **Figura 3.18** se puede observar que la incubación con los complejos de osmio provocó un aumento significativo de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , incluso tras un breve periodo de incubación (2 h). Además, este efecto dependió tanto de la concentración (**Figura 3.18A-B**) como del tiempo (**Figura 3.18C**), siendo el complejo **17** aproximadamente 10 veces más eficaz que el complejo **20**. Esto sugiere que la actividad de los complejos puede estar relacionada con la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} y la interrupción de su señalización.

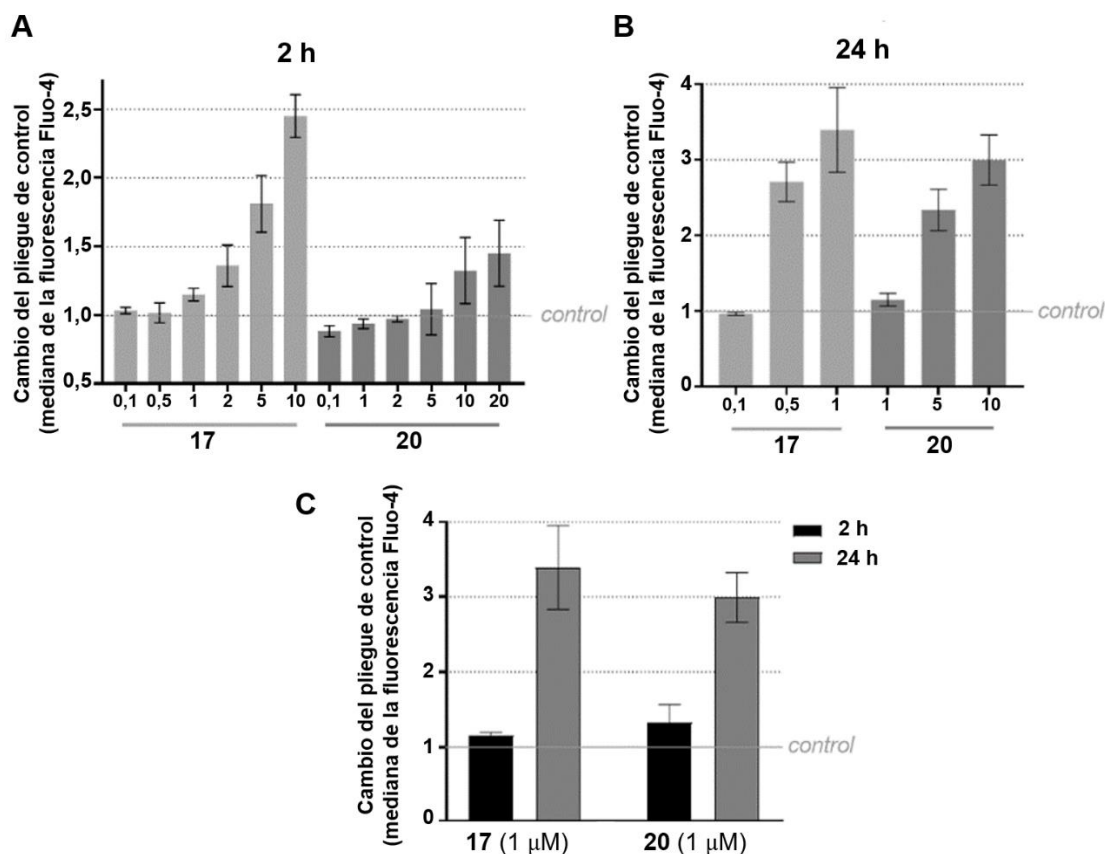


Figura 3.18. Nivel de calcio citoplasmático en células MDA-MB-231 tras su tratamiento con **17** y **20** a distintas concentraciones. Las células se trataron con los complejos durante 2 h (**A**) o 24 h (**B**) en la oscuridad. (**C**) Comparación de los valores obtenidos para concentraciones equipotentes de **17** y **20**. Los valores representan la intensidad de fluorescencia (mediana) en relación con el valor hallado para las células no tratadas.

Sin embargo, la elevación del Ca^{2+} citoplasmático podría estar relacionada con la interferencia en sistemas de homeostasis del calcio, distintos al RE. Para respaldar la hipótesis de que los complejos descritos en este capítulo inducen estrés en el RE, se realizó una PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR) de los biomarcadores de estrés de RE en células MDA-MB-231⁴⁴ tratadas con **17** y **20** ($3 \times \text{IC}_{50,72\text{h}}$). Se utilizó el gen GAPDH como control de referencia endógeno, y las muestras de células no tratadas como calibradores arbitrarios. En las **Figuras 3.19** y **A2.32**, se observa que la expresión de varios biomarcadores de esta vía (Bip, Ero1-L α , IRE1 α y CHOP) se vio afectada significativamente por los complejos de osmio, con niveles de ciertos ARNm entre 2,5-4,9, superiores a los encontrados en células no tratadas. El efecto dependió del tiempo de incubación, y fue muy similar para **17** y **20** en concentraciones equitóxicas (**Figura A2.32**).

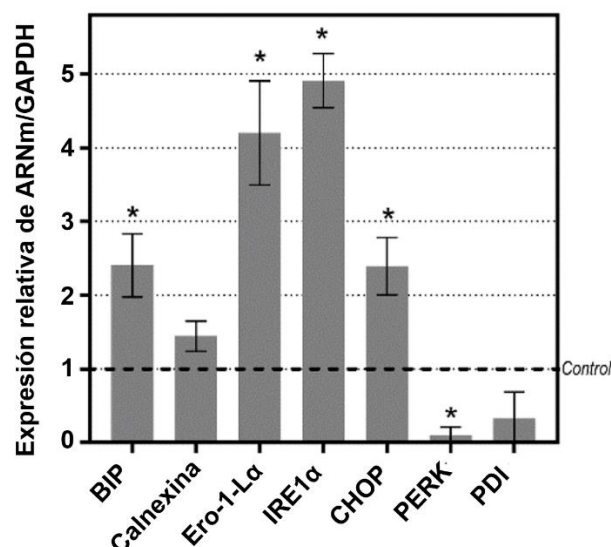


Figura 3.19. qRT-PCR de los marcadores de estrés del RE en células MDA-MB-231, tratadas con **17** durante 24 h. La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, los datos se sometieron a un análisis estadístico mediante la prueba t de Student, y se observó una diferencia significativa (* $p \leq 0,01$) con respecto a las muestras de control no tratadas (línea discontinua).

Para confirmar que los cambios en los niveles de ARNm se traducen en la producción de proteínas, se realizó un análisis de Western Blot. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de los marcadores de RE seleccionados, con un efecto dependiente tanto de la concentración como del tiempo (**Figuras 3.20 y A2.33**). Los análisis cuantitativos revelaron que Ire1 α y CHOP aumentaron drásticamente, y que los niveles de proteína en las células tratadas durante 24 h con concentraciones equitóxicas ($3 \times IC_{50}$) de **17** y **20** aumentaron unas 15-20 veces (Ire1 α), o incluso 130 veces (CHOP), en comparación con las células no tratadas. Esto sugiere que los complejos de osmio son inductores eficientes de, al menos, dos marcadores de estrés de RE.

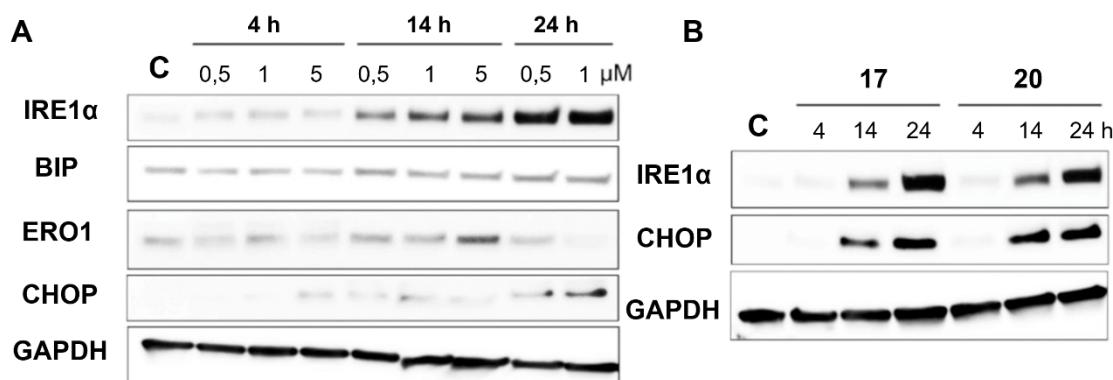


Figura 3.20. (A) Western Blot de marcadores de estrés de RE y GAPDH en células MDA-MB-231 no tratadas (C) o tratadas con el compuesto **17** a concentraciones de 0,5, 1 o 5 μM durante 4, 14 o 24 h. (B) Western Blot de marcadores de estrés de RE y GAPDH en células MDA-MB-231 no tratadas (C) o tratadas con **17** o **20** a $3 \times IC_{50,72h}$ durante 4, 14 y 24 h.

3.3.5. Pruebas de fototoxicidad

Finalmente, se evaluó la fototoxicidad de los complejos en las siguientes líneas celulares: HeLa, cáncer de esófago (OE33) y melanoma (A375). En la **Tabla 3.9** se presentan los valores de IC_{50} tanto en condiciones de oscuridad como tras la irradiación con luz verde en normoxia. La actividad de los compuestos **15-20** se incrementó con la irradiación, destacando el compuesto **15** como el más fotosensible ($PI \sim 4$). La fotopotenciación de estos compuestos podría representar una ventaja significativa, ya que no mostraron selectividad hacia las células tumorales (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.9. Valores IC_{50} (μM) en células cancerosas HeLa, OE33 y A375 tratadas con **15-20** en la oscuridad o tras irradiación con luz verde (1 h, $\lambda_{max} = 533$ nm, $7,7 \pm 0,3$ mW/cm²) en condiciones de normoxia (21 % O₂, 5 % CO₂).

Comp.	HeLa		OE33		A375	
	Osc.	Irrad.	Osc.	Irrad.	Osc.	Irrad.
15	2,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,21 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,02
16	0,8 $\pm$ 0,2	0,31 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,05
17	2,0 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,44 $\pm$ 0,08
18	1,0 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 1	3,3 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1
19	4,2 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,4	4 $\pm$ 1	2,0 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1
20	2,0 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,5	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3

^aLas células se trataron con **15-20** durante 1 h en la oscuridad, seguida de 1 h de irradiación (o sin irradiación). Se evaluó tras 70 h de incubación en medio libre de fármacos. Los resultados se expresan como valores medios $\pm$ DE de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

Los valores de IC_{50} también se determinaron en condiciones de hipoxia (3 % O₂) en células HeLa. Todos los complejos presentan actividades significativas (**Tabla 3.10**) y la irradiación también produjo fotopotenciación, aunque ligeramente inferior a la observada en condiciones de normoxia.

Tabla 3.10. Valores IC_{50} (μM) en células HeLa tratadas con **15-20** en la oscuridad o tras irradiación de luz verde (1 h, $\lambda_{max} = 533$ nm, $7,7 \pm 0,3$ mW/cm²) en condiciones de normoxia (21 % O₂, 5 % CO₂) o de hipoxia (3 % O₂, 5 % CO₂).

Complejo	HeLa (normoxia) ^a		HeLa (hipoxia) ^a	
	Osc.	Irrad.	Osc.	Irrad.
15	2,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4
16	0,8 $\pm$ 0,2	0,31 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
17	2,0 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,2

18	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,41 ± 0,04
19	4,2 ± 0,8	1,6 ± 0,4	3,4 ± 0,6	2,4 ± 0,4
20	2,0 ± 0,6	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,1 ± 0,2

^a Las células se trataron con **15-20** durante 1 h en la oscuridad, seguida de 1 h de irradiación (o sin irradiación). El ensayo se evaluó tras 70 h post-incubación en un medio libre de fármacos. Los resultados se expresan como valores medios ± DE de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

3.4. Resumen

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de seis complejos octaédricos de osmio(II) del tipo $[\text{Os}(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]\text{OTf}$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ es un ligando basado en benzimidazol con sustituyentes dadores o aceptores, y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es la bpy o dpq. Los compuestos se han caracterizado estructuralmente, obteniéndose la estructura cristalina del compuesto **17**, la primera descrita para este metal y esta estequiometría. Además, se han estudiado sus propiedades fotofísicas, revelando que todos los compuestos son absorbentes pancromáticos.

También se ha confirmado la estabilidad de los compuestos en condiciones de oscuridad, tanto en DMSO como en medio de cultivo, así como su fotoestabilidad tras la exposición a la luz verde. A su vez, se ha analizado la interacción de los compuestos con la HSA, revelando que aquellos que presentan el sustituyente electrodador ($-\text{NMe}_2$) muestran una mayor interacción con la proteína, siendo el compuesto **17** el más eficaz de la serie.

Finalmente, se ha evaluado la actividad antiproliferativa de los nuevos compuestos en líneas celulares de cáncer en monocapa 2D y en esferoides tumorales multicelulares 3D, tanto en condiciones de oscuridad como bajo irradiación con luz verde. Los resultados demostraron que los nuevos complejos de Os(II), especialmente el compuesto **17**, son significativamente más potentes que el cisplatino. Además, se investigó el mecanismo de acción de estos complejos, estableciéndose que, en condiciones de oscuridad, pueden activar la vía del estrés de RE en células cancerosas y alterar la homeostasis del calcio. Es importante destacar que algunos de los nuevos complejos de Os(II) mostraron una ligera fotoactivación en condiciones de hipoxia en células HeLa.

En resumen, este capítulo destaca el considerable y, en gran medida, inexplorado potencial de los complejos de osmio en la quimioterapia del cáncer, y proporciona indicios sobre el mecanismo y las dianas de los compuestos ciclometalados de osmio.

3.5. Bibliografía

- (1) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7 (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (2) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (1), 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>.
- (3) Infante-Tadeo, S.; Rodríguez-Fanjul, V.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M. Osmium(II) Tethered Half-Sandwich Complexes: pH-Dependent Aqueous Speciation and Transfer Hydrogenation in Cells. *Chem. Sci.* **2021**, 12 (27), 9287–9297. <https://doi.org/10.1039/D1SC01939B>.
- (4) Kralj, J.; Bolje, A.; Polančec, D. S.; Steiner, I.; Gržan, T.; Tupek, A.; Stojanović, N.; Hohloch, S.; Urankar, D.; Osmak, M.; Sarkar, B.; Brozovic, A.; Košmrlj, J. Half-Sandwich Ir(III) and Os(II) Complexes of Pyridyl-Mesoionic Carbenes as Potential Anticancer Agents. *Organometallics* **2019**, 38 (21), 4082–4092. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.9b00327>.
- (5) Pagliaricci, N.; Pettinari, R.; Marchetti, F.; Pettinari, C.; Cappellacci, L.; Tombesi, A.; Cuccioloni, M.; Hadji, M.; Dyson, P. J. Potent and Selective Anticancer Activity of Half-Sandwich Ruthenium and Osmium Complexes with Modified Curcuminoid Ligands. *Dalton Trans.* **2022**, 51 (35), 13311–13321. <https://doi.org/10.1039/D2DT02328H>.
- (6) Gatti, A.; Habtemariam, A.; Romero-Canelón, I.; Song, J.-I.; Heer, B.; Clarkson, G. J.; Rogolino, D.; Sadler, P. J.; Carcelli, M. Half-Sandwich Arene Ruthenium(II) and Osmium(II) Thiosemicarbazone Complexes: Solution Behavior and Antiproliferative Activity. *Organometallics* **2018**, 37 (6), 891–899. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00875>.
- (7) 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>.
- (8) Fu, Y.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; van Rijt, S. H.; Healey, D. J.; Cooper, P. A.; Shnyder, S. D.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Organometallic Osmium Arene Complexes with Potent Cancer Cell Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (22), 8192–8196. <https://doi.org/10.1021/jm100560f>.
- (9) Vinck, R.; Karges, J.; Tharaud, M.; Cariou, K.; Gasser, G. Physical, Spectroscopic, and Biological Properties of Ruthenium and Osmium Photosensitizers Bearing Diversely Substituted 4,4'-Di(Styryl)-2,2'-Bipyridine Ligands. *Dalton Trans.* **2021**, 50 (41), 14629–14639. <https://doi.org/10.1039/D1DT02083H>.
- (10) Mani, A.; Feng, T.; Gandioso, A.; Vinck, R.; Notaro, A.; Gourdon, L.; Burckel, P.; Saubaméa, B.; Blacque, O.; Cariou, K.; Belgaied, J.-E.; Chao, H.; Gasser, G. Structurally Simple Osmium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy in the Near Infrared**. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, 62 (20), e202218347. <https://doi.org/10.1002/anie.202218347>.
- (11) Lazic, S.; Kaspler, P.; Shi, G.; Monro, S.; Sainuddin, T.; Forward, S.; Kasimova, K.; Hennigar, R.; Mandel, A.; McFarland, S.; Lilge, L. Novel Osmium-Based Coordination Complexes as Photosensitizers for Panchromatic Photodynamic Therapy. *Photochem. and Photobiol.* **2017**, 93 (5), 1248–1258. <https://doi.org/10.1111/php.12767>.
- (12) Cerón-Camacho, R.; Morales-Morales, D.; Hernandez, S.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. Easy Access to Bio-Inspired Osmium(II) Complexes through Electrophilic

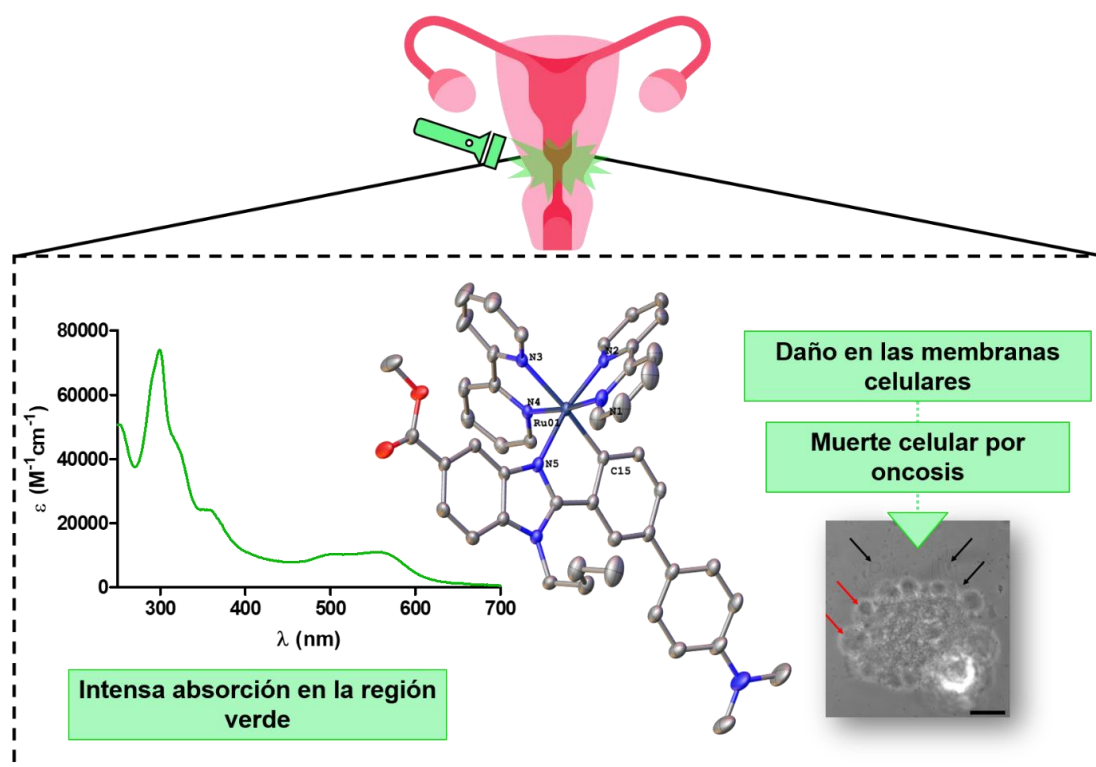
- Intramolecular C(Sp²)-H Bond Cyclometalation. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (11), 4988–4995. <https://doi.org/10.1021/ic800251t>.
- (13) Boff, B.; Gaidon, C.; Pfeffer, M. Cancer Cell Cytotoxicity of Cyclometalated Compounds Obtained with Osmium(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (5), 2705–2715. <https://doi.org/10.1021/ic302779q>.
 - (14) Licona, C.; Delhorme, J.-B.; Riegel, G.; Vidimar, V.; Cerón-Camacho, R.; Boff, B.; Venkatasamy, A.; Tomasetto, C.; Gomes, P. da S. F. C.; Rognan, D.; Freund, J.-N.; Lagadec, R. L.; Pfeffer, M.; Gross, I.; Mellitzer, G.; Gaidon, C. Anticancer Activity of Ruthenium and Osmium Cyclometalated Compounds: Identification of ABCB1 and EGFR as Resistance Mechanisms. *Inorg. Chem. Front.* **2020**, 7 (3), 678–688. <https://doi.org/10.1039/C9QI01148J>.
 - (15) Ortega, E.; Yellol, J. G.; Rothmund, M.; Ballester, F. J.; Rodríguez, V.; Yellol, G.; Janiak, C.; Schobert, R.; Ruiz, J. A New C,N-Cyclometalated Osmium(II) Arene Anticancer Scaffold with a Handle for Functionalization and Antioxidative Properties. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (79), 11120–11123. <https://doi.org/10.1039/C8CC06427J>.
 - (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), 11533–11535. <https://doi.org/10.1039/C3CC46239K>.
 - (17) 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>.
 - (18) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhlofi, 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) 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>.
 - (20) Novohradsky, V.; Rovira, A.; Hally, C.; Galindo, A.; Viguera, G.; Gandioso, A.; Svitelova, M.; Bresolí-Obach, R.; Kosthunova, H.; Markova, L.; Kasparkova, J.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Brabec, V.; Marchán, V. Towards Novel Photodynamic Anticancer Agents Generating Superoxide Anion Radicals: A Cyclometalated Ir(III) Complex Conjugated to a Far-Red Emitting Coumarin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58 (19), 6311–6315. <https://doi.org/10.1002/anie.201901268>.
 - (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) Ballester, F. J.; Ortega-Forte, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Barone, G.; Ruiz, J. Newly Synthesized Benzothiazolyl-1,2,3-Triazole Derivatives: Intramolecular Charge Transfer Tuning, Solvatochromism and Antiproliferative Properties. *Dyes and Pigm.* **2023**, 209, 110905. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110905>.
 - (23) Slodek, A.; Zych, D.; Maroń, A.; Gawecki, R.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Malarz, K.; Musioł, R. Phenothiazine Derivatives - Synthesis, Characterization, and Theoretical Studies with an Emphasis on the Solvatochromic Properties. *J. Mol. Liq.* **2019**, 285,

- 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.102>.
- (24) Zhang, P.; Wang, Y.; Qiu, K.; Zhao, Z.; Hu, R.; He, C.; Zhang, Q.; Chao, H. A NIR Phosphorescent Osmium(II) Complex as a Lysosome Tracking Reagent and Photodynamic Therapeutic Agent. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (91), 12341–12344. <https://doi.org/10.1039/C7CC07776A>.
 - (25) Irikura, M.; Tamaki, Y.; Ishitani, O. Development of a Panchromatic Photosensitizer and Its Application to Photocatalytic CO₂ Reduction. *Chem. Sci.* **2021**, 12 (41), 13888–13896. <https://doi.org/10.1039/D1SC04045F>.
 - (26) Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D. Novel Bis-C,N-Cyclometalated Iridium(III) Thiosemicarbazide Antitumor Complexes: Interactions with Human Serum Albumin and DNA, and Inhibition of Cathepsin B. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (2), 974–982. <https://doi.org/10.1021/ic302219v>.
 - (27) Kalaivani, P.; Prabhakaran, R.; Ramachandran, E.; Dallemer, F.; Paramaguru, G.; Renganathan, R.; Poornima, P.; Padma, V. V.; Natarajan, K. Influence of Terminal Substitution on Structural, DNA, Protein Binding, Anticancer and Antibacterial Activities of Palladium(II) Complexes Containing 3-Methoxy Salicylaldehyde-4(N) Substituted Thiosemicarbazones. *Dalton Trans.* **2012**, 41 (8), 2486–2499. <https://doi.org/10.1039/C1DT11838B>.
 - (28) Devagi, G.; Dallemer, F.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R. Organometallic Ruthenium(II) Complexes Containing NS Donor Schiff Bases: Synthesis, Structure, Electrochemistry, DNA/BSA Binding, DNA Cleavage, Radical Scavenging and Antibacterial Activities. *J. Organomet. Chem.* **2018**, 854, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorgchem.2017.10.036>.
 - (29) Zannoni, M.; Piccinini, F.; Arienti, C.; Zamagni, A.; Santi, S.; Polico, R.; Bevilacqua, A.; Tessei, A. 3D Tumor Spheroid Models for in Vitro Therapeutic Screening: A Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>.
 - (30) Thoma, C. R.; Zimmermann, M.; Agarkova, I.; Kelm, J. M.; Krek, W. 3D Cell Culture Systems Modeling Tumor Growth Determinants in Cancer Target Discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 69–70, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.03.001>.
 - (31) Kimlin, L. C.; Casagrande, G.; Virador, V. M. In Vitro Three-Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. *Mol. Carcinog.* **2013**, 52 (3), 167–182. <https://doi.org/10.1002/mc.21844>.
 - (32) Baker, B. M.; Chen, C. S. Deconstructing the Third Dimension – How 3D Culture Microenvironments Alter Cellular Cues. *J. Cell Sci.* **2012**, 125 (13), 3015–3024. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>.
 - (33) Zhang, P.; Huang, H. Future Potential of Osmium Complexes as Anticancer Drug Candidates, Photosensitizers and Organelle-Targeted Probes. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (42), 14841–14854. <https://doi.org/10.1039/C8DT03432J>.
 - (34) Kacsir, I.; Sipos, A.; Bényei, A.; Janka, E.; Buglyó, P.; Somsák, L.; Bai, P.; Bokor, É. Reactive Oxygen Species Production Is Responsible for Antineoplastic Activity of Osmium, Ruthenium, Iridium and Rhodium Half-Sandwich Type Complexes with Bidentate Glycosyl Heterocyclic Ligands in Various Cancer Cell Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (2), 813. <https://doi.org/10.3390/ijms23020813>.
 - (35) Maillet, A.; Yadav, S.; Loo, Y. L.; Sachaphibulkij, K.; Pervaiz, S. A Novel Osmium-Based Compound Targets the Mitochondria and Triggers ROS-Dependent Apoptosis in Colon Carcinoma. *Cell Death Dis.* **2013**, 4 (6), e653–e653. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.185>.
 - (36) Kandioller, W.; Balsano, E.; Meier, S. M.; Jungwirth, U.; Göschl, S.; Roller, A.;

- Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. Organometallic Anticancer Complexes of Lapachol: Metal Centre-Dependent Formation of Reactive Oxygen Species and Correlation with Cytotoxicity. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (32), 3348–3350. <https://doi.org/10.1039/C3CC40432C>.
- (37) Romero-Canelón, I.; Mos, M.; Sadler, P. J. Enhancement of Selectivity of an Organometallic Anticancer Agent by Redox Modulation. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (19), 7874–7880. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00655>.
- (38) Scalcon, V.; Top, S.; Lee, H. Z. S.; Citta, A.; Folda, A.; Bindoli, A.; Leong, W. K.; Salmain, M.; Vessi eres, A.; Jaouen, G.; Rigobello, M. P. Osmocenyl-Tamoxifen Derivatives Target the Thioredoxin System Leading to a Redox Imbalance in Jurkat Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 160, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.04.005>.
- (39) Gaidon, C.; Gross, I.; Meng, X.; Sidhoum, M.; Mellitzer, G.; Romain, B.; Delhorme, J.-B.; Venkatasamy, A.; Jung, A. C.; Pfeffer, M. Bypassing the Resistance Mechanisms of the Tumor Ecosystem by Targeting the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Using Ruthenium- and Osmium-Based Organometallic Compounds: An Exciting Long-Term Collaboration with Dr. Michel Pfeffer. *Molecules* **2021**, 26 (17), 5386. <https://doi.org/10.3390/molecules26175386>.
- (40) Suntharalingam, K.; Johnstone, T. C.; Bruno, P. M.; Lin, W.; Hemann, M. T.; Lippard, S. J. Bidentate Ligands on Osmium(VI) Nitrido Complexes Control Intracellular Targeting and Cell Death Pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (38), 14060–14063. <https://doi.org/10.1021/ja4075375>.
- (41) Chow, M. J.; Babak, M. V.; Tan, K. W.; Cheong, M. C.; Pastorin, G.; Gaidon, C.; Ang, W. H. Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway by Highly Cytotoxic Organoruthenium Schiff-Base Complexes. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, 15 (8), 3020–3031. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00003>.
- (42) Hetz, C. The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13 (2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>.
- (43) Lebeau, P. F.; Platko, K.; Byun, J. H.; Austin, R. C. Calcium as a Reliable Marker for the Quantitative Assessment of Endoplasmic Reticulum Stress in Live Cells. *J. Biol. Chem.* **2021**, 296, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100779>.
- (44) Deniaud, A.; Sharaf el dein, O.; Maillier, E.; Poncet, D.; Kroemer, G.; Lemaire, C.; Brenner, C. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Calcium-Dependent Permeability Transition, Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Oncogene* **2008**, 27 (3), 285–299. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210638>.

Capítulo 4

Complejos octaédricos ciclometalados de Ru(II): fotosensibilizadores que desencadenan el daño de las membranas celulares y la oncosis en células cancerosas



Los ensayos biológicos presentados en este capítulo han sido realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec, del Instituto de Biofísica de la República Checa.

4.1. Introducción

Tal y como se ha mencionado en el Capítulo 1, uno de los requisitos fundamentales de un buen fotosensibilizador es su capacidad para absorber dentro de la ventana fototerapéutica, dado que las longitudes de onda en este rango son más penetrantes y menos perjudiciales para los tejidos sanos.¹ En este sentido, destacan los complejos ciclometalados de Ru(II), ya que el carácter aniónico del ligando produce el desplazamiento de la banda de absorción MLCT hacia el rojo.^{2,3} La ciclometalación también reduce la energía de la banda de transferencia de carga metal-ligando (³MLCT) y acorta el tiempo de vida del estado excitado en este tipo de complejos.⁴ Sin embargo, tienden a ser fotoquímicamente más estables que sus análogos con un ligando N^N.^{5,6} Esta mayor fotoestabilidad, junto con su capacidad de absorción dentro de la ventana fototerapéutica, los convierte en potenciales agentes fotosensibilizadores para PDT con longitudes de onda menos energéticas y más penetrantes.

A pesar de las ventajas que presentan, los complejos ciclometalados de Ru(II) han sido bastante menos explorados que sus análogos con tres ligandos N^N para su aplicación en la terapia contra el cáncer. Algunos de los ejemplos más destacables ya se han mencionado en el Capítulo 1, y han sido descritos por los grupos de investigación de McFarland (**Figura 1.23**)⁷ y Gasser (**Figura 1.24**).⁶ Estos compuestos resultaron ser fotoactivables en el rojo y en el infrarrojo cercano, respectivamente. Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha desarrollado recientemente compuestos de Ru(II) de tipo $[Ru(C^N)(N^N)_2]^+$, que presentan actividad con luz verde en condiciones de hipoxia (2 % O₂).⁸ Este hecho es de suma importancia, ya que las células en estado de hipoxia se encuentran alejadas de los vasos sanguíneos, lo que reduce la acumulación del fotosensibilizador. Además, la eficacia de la PDT se ve reducida al disminuir la cantidad de oxígeno molecular disponible.⁹

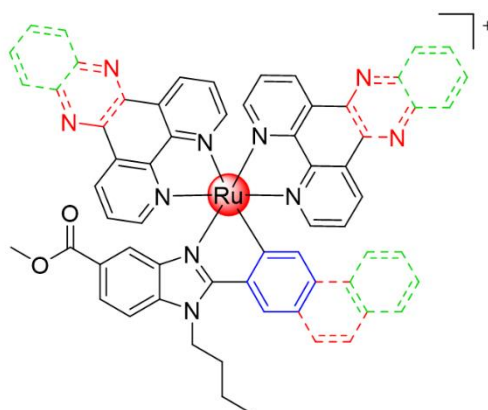


Figura 4.1. Estructura general de los compuestos preparados por nuestro grupo de investigación.⁸

Por todo ello, en el presente capítulo se detalla la síntesis y caracterización de nuevos complejos de Ru(II) con un ligando ciclometalado. Los nuevos compuestos, análogos a los de Os(II) descritos en el Capítulo 3, tienen una estructura de tipo $[Ru(C^{\wedge}N)(N^{\wedge}N)_2]^+$. El ligando $C^{\wedge}N$ presenta un fragmento de benzimidazol (**13** o **14**) con un grupo éster que puede ser útil para futuras funcionalizaciones (biomoléculas, cromóforos orgánicos, etc.), y un sustituyente butilo en el átomo de nitrógeno que mejora las propiedades lipofílicas, facilitando su entrada en las células. Además, también presenta un grupo $p\text{-CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$ o $p\text{-NMe}_2\text{C}_6\text{H}_4$ con el fin de estudiar cómo la modificación de la estructura afecta a su actividad. Por su parte, se han empleado como ligandos auxiliares $N^{\wedge}N$ bpy y dpq, siendo esta última la que mostró los mejores resultados en la serie de Ru(II) anteriormente preparada (**Figura 4.1**). Finalmente, se presentan los resultados obtenidos en distintas líneas celulares, tanto en condiciones de oscuridad como tras la irradiación con luz verde, así como el estudio del mecanismo de acción del mejor candidato.

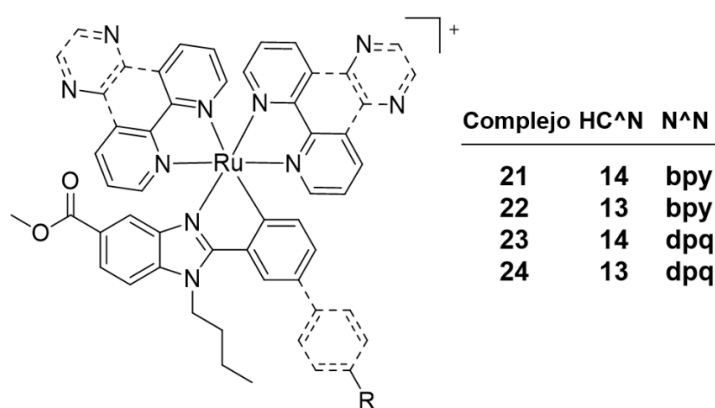
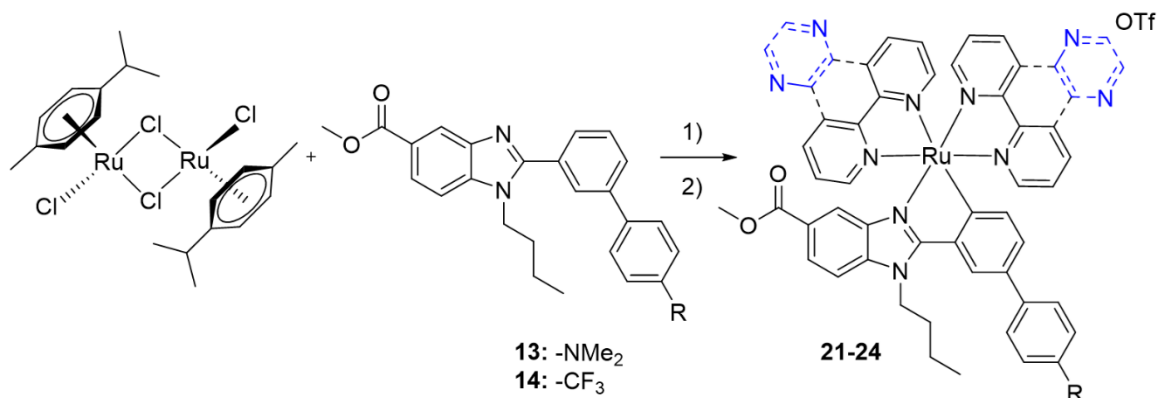


Figura 4.2. Estructura general de los nuevos compuestos preparados en el presente capítulo.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Síntesis de los complejos de Ru(II)

Los complejos **21-24** se obtuvieron mediante un procedimiento similar al utilizado en la síntesis de los complejos del Capítulo 3, con pequeñas modificaciones.^{8,10,11} En primer lugar, se hizo reaccionar el dímero de rutenio $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})Cl(\mu\text{-}Cl)]_2$ con el prolígando $HC^{\wedge}N$ correspondiente, en presencia de exceso de triflato potásico y acetato potásico, en acetonitrilo a 80 °C durante 1 h bajo microondas (MW). A continuación, los intermedios, sin purificación adicional, se hicieron reaccionar con bpy o dpq en metanol a 65 °C durante 7 h para obtener los complejos **21-24**.



Esquema 4.1. Procedimiento de síntesis de los complejos **21-24**. Condiciones de reacción: **1)** KOAc, KOTf, CH₃CN, 80 °C, MW, 1 h. **2)** bpy o dpq, MeOH, 65 °C, 7 h.

4.2.2. Caracterización de los nuevos complejos

Todos los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante diferentes técnicas: espectroscopía de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹⁹F-RMN y experimentos bidimensionales, **Figuras A3.1-A3.28** del Anexo III), HPLC-MS (**Figuras A3.19-A3.20**) y análisis elemental. En la **Figura 4.3** se puede observar la numeración utilizada para la asignación de las resonancias de protón en los espectros de RMN.

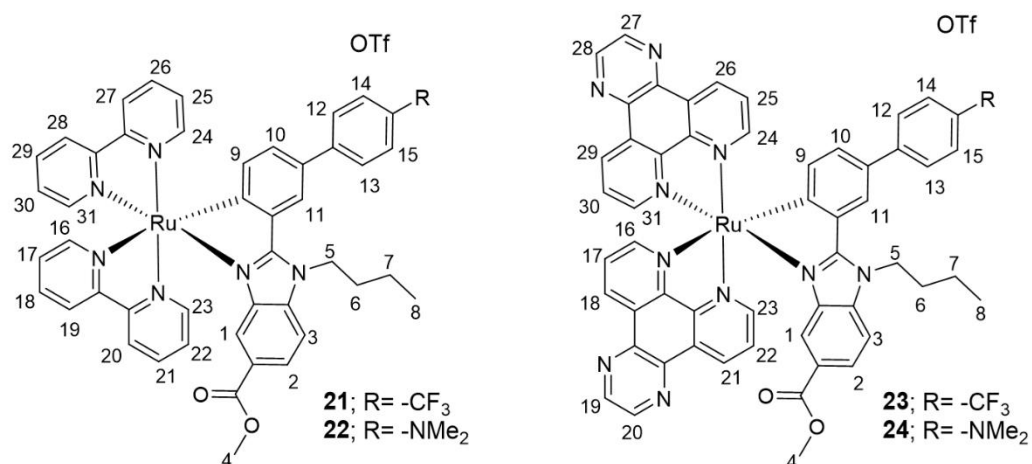


Figura 4.3. Numeración utilizada para la asignación de las señales por ¹H-RMN.

Los monómeros de rutenio presentan las señales características esperadas. En todos los casos se observaron las resonancias de los protones alifáticos correspondientes al grupo butilo ($\delta \sim 4,0, 1,95, 1,3$ y $0,9$ ppm) y al grupo éster ($\delta \sim 3,6$ ppm) de los ligandos basados en benzimidazol. Asimismo, la señal característica de los metilos del grupo -NMe₂ en los complejos **22** y **24** se observó en torno a $\delta 2,9$ ppm. En la **Figura 4.4** se muestra la región aromática de los espectros de ¹H-RMN de los complejos **21-24**, para facilitar su comparación.

En todos los compuestos se asignó el protón H_1 , como el adyacente al nitrógeno del núcleo de benzimidazol, y el hidrógeno H_9 , como el adyacente al carbono quelante del ligando $C^{\wedge}N$. Por otro lado, las señales $H_{12}+H_{13}$ y $H_{14}+H_{15}$ de los complejos **22** y **24** sufren un desplazamiento a campo alto en comparación con las señales de los complejos **21** y **23**, como consecuencia de la naturaleza electrodonadora del sustituyente. Esta naturaleza también afecta a las señales de los protones H_9 , H_{10} y H_{11} identificadas a partir de los experimentos $\{^1H-^1H\}$ -COSY y $\{^1H-^1H\}$ -NOESY. Además, la baja simetría del complejo, debida al ligando ciclometalado asimétrico, se traduce en la aparición de 16 señales diferentes debidas a los ligandos bpy y dpq. Estas señales se pudieron asignar a partir de los perfiles de acoplamiento en los espectros bidimensionales en los complejos y comparando estos perfiles entre los diferentes complejos de la serie (**Figura A3.29**). Cabe mencionar que las resonancias de protón H_{19} (en **21** y **22**) y H_{18} (en **23** y **24**) son las que se encuentran más desapantalladas, debido a la influencia trans del átomo de carbono.

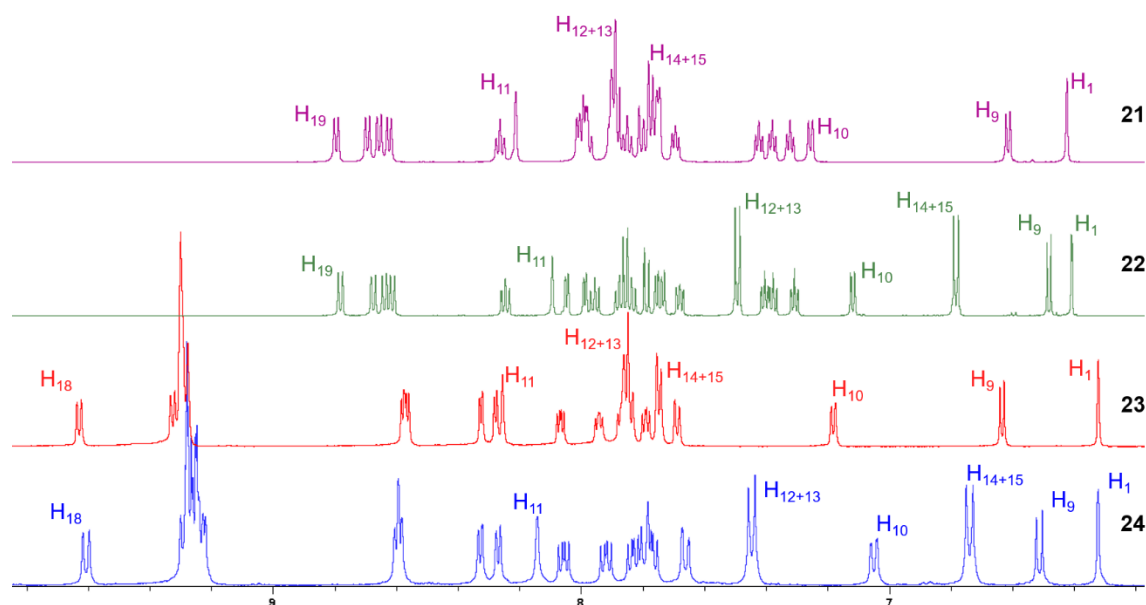


Figura 4.4. Apilamiento de los espectros de 1H -RMN (región aromática) para los compuestos **21-24** registrados en $DMSO-d_6$.

Para completar la caracterización estructural de los complejos se obtuvieron los datos de análisis elemental y los espectros de masas mediante HPLC-MS, donde los espectros de masas se obtuvieron en modo positivo. Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS (**Figura A3.20**), junto con el análisis elemental (**Tabla 4.1**), confirmaron la pureza superior al 95 % y la estequiometría propuesta. Todos los cromatogramas presentan un único pico, cuyo espectro de masas corresponde al ion molecular $[M-OTf]^+$ y presenta un perfil isotópico que concuerda con el teórico en todos los casos.

Tabla 4.1. Valores de HPLC-MS y de análisis elemental obtenidos para los compuestos preparados.

Compuesto	Análisis elemental ^a (%)				HPLC-MS ^a		
	C	H	N	S	t _R (min)	Fragmento	m/z
21	55,41	3,67	8,22	3,20	17,085	[M-OTf] ⁺	865,2087
	(55,67)	(3,78)	(8,29)	(3,13)			(865,2046)
22	58,38	4,36	9,96	3,40	15,226	[M-OTf] ⁺	840,2620
							(840,2594)
						[M-OTf+H] ⁺²	420,6348
							(420,6334)
23	56,51	3,10	12,02	2,75	18,946	[M-OTf] ⁺	1017,2231
	(56,65)	(3,28)	(12,01)	(2,75)			(1017,2174)
24	58,91	3,84	13,39	2,78	17,762	[M-OTf] ⁺	992,2748
	(58,94)	(3,89)	(13,50)	(2,81)			(992,2717)

^aValores teóricos entre paréntesis.

4.2.3. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

La estructura molecular del complejo **22** fue confirmada por difracción de rayos X de monocristal. Los monocristales se obtuvieron por difusión lenta de éter etílico en una disolución saturada del compuesto en diclorometano. La toma de datos y el refinamiento de la estructura cristalina fue realizada por la Dra. Delia Bautista Cerezo, del SAI de la Universidad de Murcia. En la **Figura 4.5** se muestra la estructura cristalina, y en las **Tablas 4.1** y **A3.1** se recogen los datos cristalográficos del complejo **22**, incluyendo las dimensiones de la celdilla unidad.

La estructura cristalina confirma inequívocamente la estequiometría propuesta. El complejo de rutenio presenta una geometría octaédrica distorsionada alrededor del átomo metálico. Tanto los ligandos de bipyridina como el ligando ciclometalado derivado de benzimidazol (**13**) se unen al centro metálico formando quelatos bidentados κ^2 -N,N y κ^2 -C,N. Las distancias de enlace Ru-N_{bpy} (2,035-2,138 Å) y Ru-C15 (2,039(3) Å) se encuentran en el rango observado previamente para complejos similares. Además, como ocurre en su análogo de osmio (compuesto **17**), la distancia de enlace Ru-N3 (2,138(3) Å), trans al Ru-C15, es mayor que la del resto de enlaces Ru-N_{bpy}, debido a la elevada influencia *trans* del átomo de carbono.^{8,12}

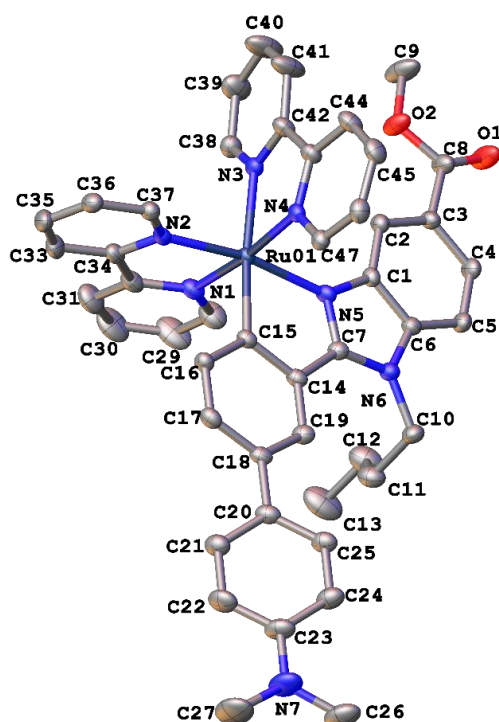


Figura 4.5. Estructura cristalina del compuesto **22**. Los átomos de hidrógeno, el contraión y las moléculas de disolvente (DCM, dietiléter y H₂O) se omiten para mayor claridad. Distancias de enlace (Å): Ru-N1: 2,040(3), Ru-N2: 2,035(3), Ru-N3: 2,138(3), Ru-N4: 2,059(3), Ru-N5: 2,076(3), Ru-C15: 2,039(3). Ángulos (°): C15-Ru-N5: 77,90(12), N3-Ru-N4: 77,43(11), N1-Ru-N2: 78,80(12).

Tabla 4.2. Datos cristalográficos del complejo **22**.

Sistema cristalino	Triclinico	Grupo espacial	P-1
Fórmula empírica	C ₄₇ H ₄₄ N ₇ O ₂ Ru·CF ₃ O ₃ S·1(CH ₂ Cl ₂)·0,5(C ₄ H ₁₀ O)·1,75[H ₂ O]		
Dimensiones de la celdilla unidad ^a			
a (Å)	13,5090(6)	α (°)	84,3410(10)
b (Å)	14,0322(7)	β (°)	73,105(2)
c (Å)	15,9709(6)	γ (°)	62,2960(10)

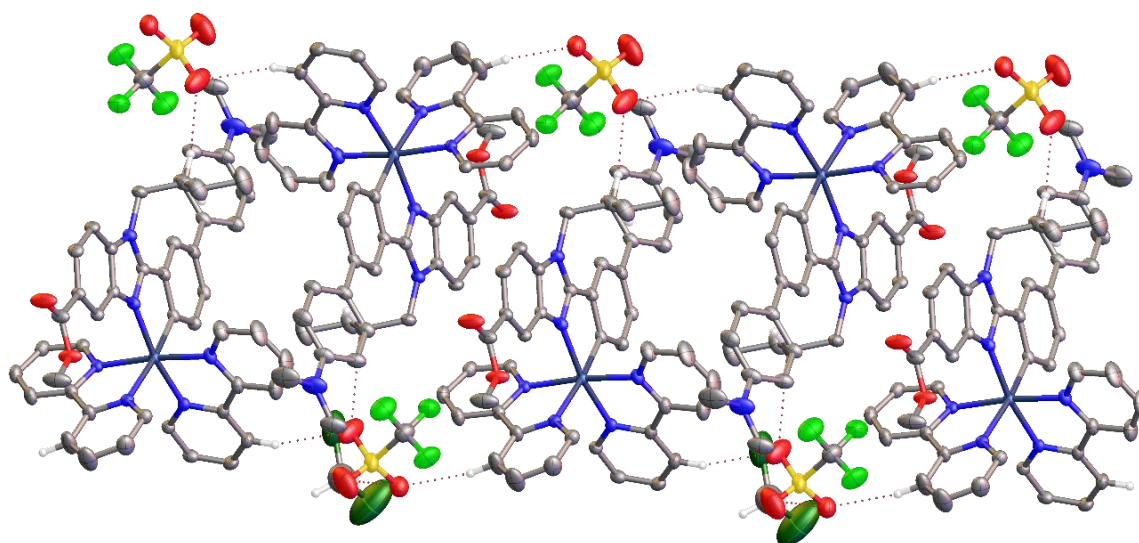
^aLos valores entre paréntesis indican la desviación estándar de la medida.

Respecto a las interacciones intra- e intermoleculares, en la estructura cristalina del complejo **22** se observan puentes de hidrógeno intramoleculares entre el átomo de hidrógeno H(41) de un anillo de bipyridina y el átomo de oxígeno O(96) del anión triflato. De igual forma, el empaquetamiento en la estructura del complejo está organizado por enlaces de hidrógeno intermoleculares, los cuales quedan recogidos en la **Tabla 4.3**. En la **Figura 4.6** se muestran las cadenas dobles paralelas que se forman en la dirección (1,-1,0), como consecuencia de la interacción intramolecular mencionada anteriormente y la interacción intermolecular que se produce entre el oxígeno O(98) del anión triflato y el hidrógeno (H11A) del grupo butilo de una molécula vecina.

Tabla 4.3. Enlaces de hidrógeno observados en la estructura cristalina del complejo **22**.

D-H...A	d(D-H) (Å)	d(H...A) (Å)	d(D...A) (Å)	<(DHA) (°)
C(11)-H(11A)...O(98) ^a	0,99	2,52	3,397(7)	147,3
C(34)-H(34)...O(98) ^b	0,95	2,53	3,405(6)	153,4
C(41)-H(41)...O(96)	0,95	2,38	3,273(6)	157,2
C(39)-H(39)...O(1) ^c	0,99	2,57	3,548(10)	171,0

Transformación de simetría utilizada para generar los átomos equivalentes: ^a-x+1, -y+2, -z+1; ^bx+1, y-1, z; ^c-x, -y+2, -z+1.

**Figura 4.6.** Dobles cadenas paralelas del compuesto **22** debido a interacciones C-H...O (indicadas con líneas discontinuas rojas).

4.2.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis

Los espectros de absorción UV/Vis de los complejos **21-24** (10 μM) se registraron en agua (1 % DMSO) y acetonitrilo (**Figura 4.7** y **Tabla 4.4**) a temperatura ambiente. Todos los compuestos presentan bandas agudas e intensas entre 260 y 340 nm, que pueden asignarse a transiciones electrónicas $\pi\text{-}\pi^*$ de los ligandos ciclometalados y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$. También se observan otras bandas anchas menos intensas entre 360 y 560, que pueden atribuirse a transiciones de transferencia de carga metal-ligando (MLCT). El hombro de menor energía de la banda MLCT puede relacionarse con la transferencia de carga $\text{Ru}\rightarrow\text{N}^{\wedge}\text{N}$, y el hombro de mayor energía de la banda MLCT, con la transferencia de carga $\text{Ru}\rightarrow\text{C}^{\wedge}\text{N}$.^{3,8,13} Estas transiciones de carga se caracterizan por un coeficiente de extinción entre 16000 y 10000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores más altos corresponden a los complejos **23** y **24**, que contienen el ligando dpq. A diferencia de los compuestos análogos de osmio del Capítulo 3, los de rutenio solo absorben hasta los 750 nm, lo que pone de manifiesto la influencia del átomo metálico en las propiedades de absorción.

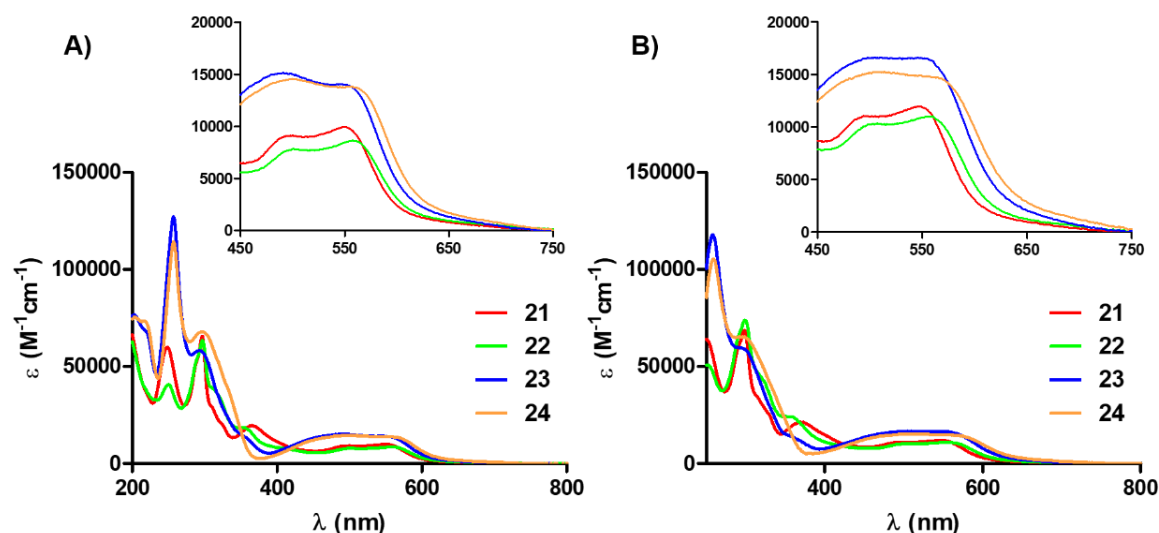


Figura 4.7. Espectros de absorción UV/Vis de **21-24** (10 μM) en **A)** acetonitrilo y **B)** agua (1 % DMSO) a temperatura ambiente. En ambos casos se muestra una ampliación de 450 a 750 nm.

En la **Tabla 4.4** se recogen los máximos de absorción de los complejos y su coeficiente de extinción molar.

Tabla 4.4. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y coeficiente de extinción molar (ϵ) de los complejos en acetonitrilo y agua (1 % DMSO).

Complejo	Disolvente	λ_{abs} (nm) (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
21	H ₂ O	298 (68710), 373 (21290), 494 (11060), 549 (11960)
	CH ₃ CN	297 (65610), 370 (19150), 500 (9130), 550 (9940)
22	H ₂ O	299 (73960), 351 (24340), 498 (10240), 560 (11020)
	CH ₃ CN	297 (63470), 351 (18520), 504 (7810), 558 (8630)
23	H ₂ O	258 (117870), 295 (59550), 494 (16480), 548 (16590)
	CH ₃ CN	257 (127210), 293 (58210), 498 (15080), 551 (14000)
24	H ₂ O	259 (10538), 296 (65380), 493 (15020), 562 (14760)
	CH ₃ CN	257 (114280), 302 (66860), 500 (14570), 554 (13810)

4.2.5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

Una vez finalizada la caracterización de los nuevos compuestos, se llevaron a cabo experimentos para comprobar su estabilidad y fotoestabilidad. Por un lado, se estudiaron las estabilidades de los complejos **21-24** en la oscuridad, tanto en DMSO- d_6 a temperatura ambiente mediante ^1H -RMN (**Figura 4.8.A** para **21** y **Figuras A3.32-A3.34**), como en medio de cultivo celular DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS a 37 °C mediante HPLC-MS (**Figura 4.8.C** para **21** y **Figuras A3.35-A3.38** para el resto). Los experimentos confirmaron la estabilidad de los complejos, ya que tanto los espectros de ^1H -RMN en DMSO- d_6 , como los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS

permanecen sin cambios significativos tras 48 h. Por otro lado, se comprobó la fotoestabilidad de los complejos mediante espectroscopía de absorción UV/Vis tras la irradiación con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$, $2,0 \text{ mW/cm}^2$). En las **Figuras 4.8.B y A3.39** se puede observar que los compuestos son fotoestables en las condiciones ensayadas, pues los espectros de absorción permanecen inalterados tras las 2 h de irradiación.

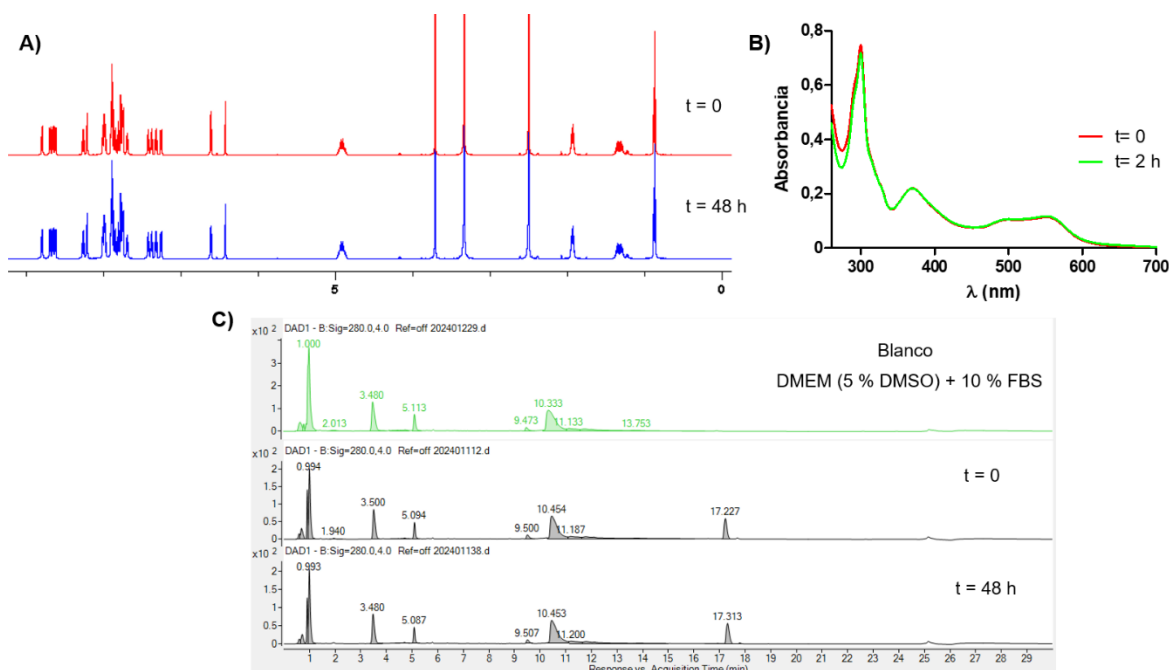


Figura 4.8. **A)** Espectros de ^1H -RMN de **21** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t = 0$ y tras 48 h a temperatura ambiente. **B)** Espectro de absorción UV/Vis de **21** en DMSO a $t = 0$ y tras 2 h de irradiación con luz verde ($\lambda = 520 \text{ nm}$, 2 mW/cm^2). **C)** Espectro de HPLC-MS en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS en la oscuridad a 37°C a tiempos 0 y 48 h.

4.2.6. Interacción con la seroalbúmina

Como se ha mencionado en los Capítulos 2 y 3, la HSA es una de las proteínas transportadoras más abundantes del plasma sanguíneo.¹⁴ Por ello, se llevó a cabo el estudio de interacción de los complejos de rutenio con dicha proteína mediante espectroscopía de emisión y de absorción UV/Vis.¹⁵ En primer lugar, y tal y como se realizó en los capítulos anteriores, se monitorizó el espectro de emisión de la HSA ($2,5 \mu\text{M}$) al ser excitada a 295 nm tras adicionar concentraciones crecientes de los complejos (0 - $25 \mu\text{M}$). En la **Figura 4.9** se puede observar que todos los compuestos de rutenio interaccionan eficazmente con la proteína, ya que la banda de emisión disminuye drásticamente en todos los casos. Para analizar la extinción de la fluorescencia se aplica la ecuación de Stern-Volmer (**Ecuación 2.1**), aunque a diferencia del comportamiento de los complejos de los capítulos anteriores, no muestra linealidad para ninguno de los compuestos (**Figura A3.40**). Este hecho informa de la existencia de más de un mecanismo de extinción.¹⁶

Alternativamente, se aplica la ecuación de Lineweaver-Burk (**Ecuación 3.1**) para obtener la constante de extinción de la fluorescencia (K_{LB}) (**Figura A3.41**).^{17,18}

$$\text{Ecuación 3.1. } \frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_{LB} \cdot F_0} \cdot \frac{1}{[C]}$$

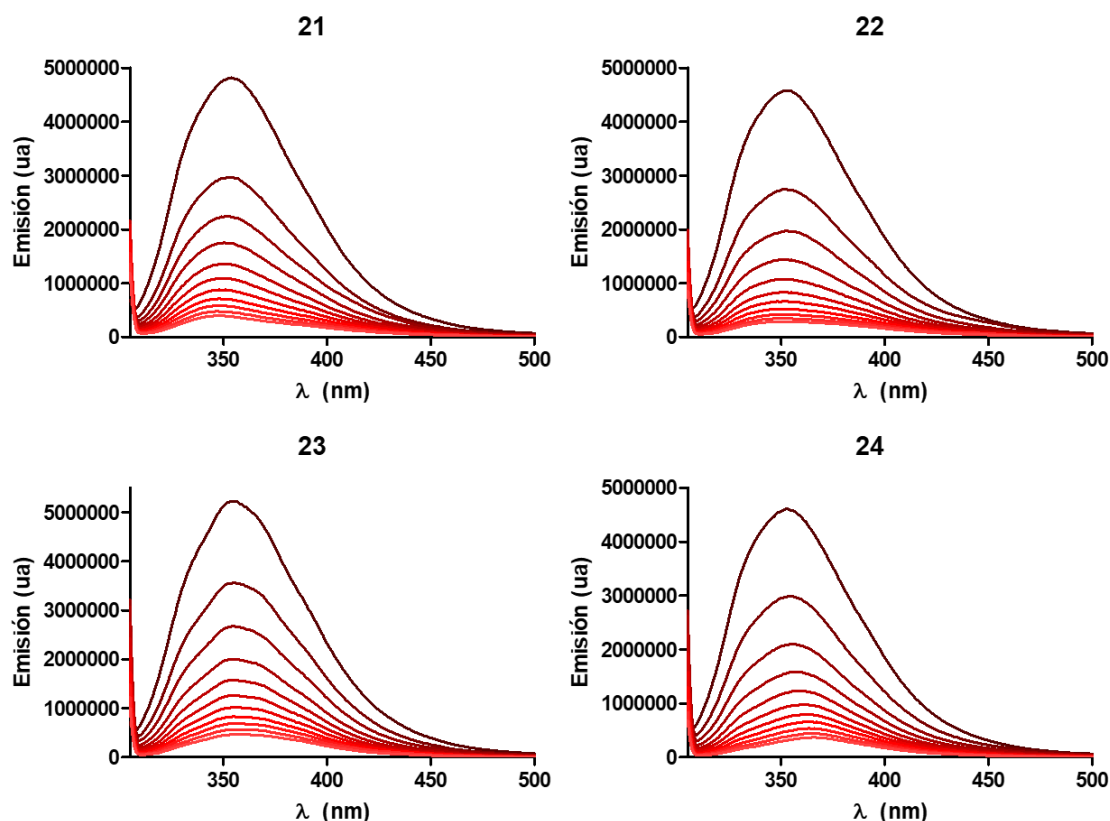


Figura 4.9. Espectro de emisión de la HSA (2,5 μM) en presencia de cantidades crecientes de los complejos **21-24** (0-25 μM). El aumento de la concentración se produce de arriba a abajo.

A continuación, con el fin de esclarecer si el mecanismo de extinción responde a un proceso estático o dinámico, se estudió la interacción de los compuestos con la HSA mediante espectroscopía de absorción UV/Vis. En la **Figura 4.10** se puede observar que el espectro de absorción de la HSA (1 μM) se ve alterado drásticamente al adicionar un equivalente de los distintos complejos de rutenio, produciéndose la disminución y el desplazamiento hacia el rojo de la primera banda de absorción. Estos hallazgos indican que los compuestos responden a un proceso estático en su interacción con la HSA.¹⁶

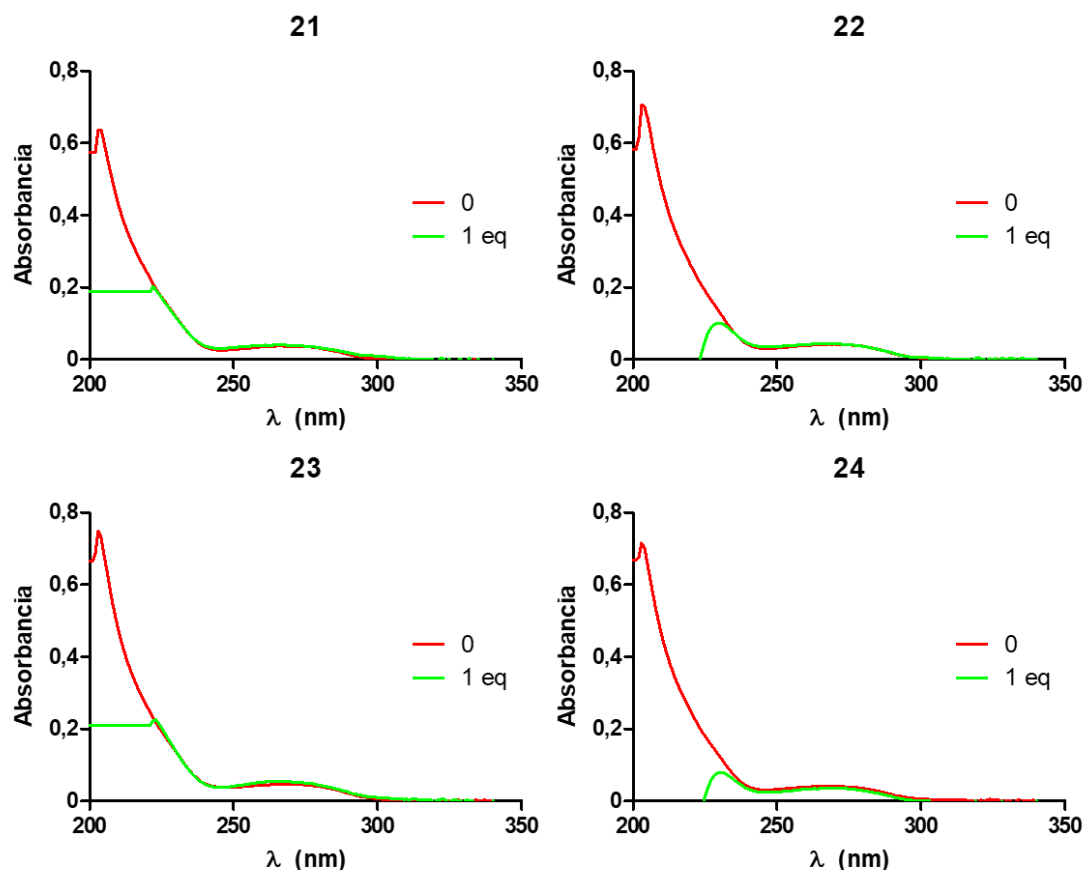


Figura 4.10. Espectro de absorción de la HSA (1 μM) tras adicionar un equivalente de los complejos **21-24**.

Por otro lado, cuando el proceso es estático, se aplica la ecuación de Scatchard (**Ecuación 2.2**) para conocer los parámetros de enlace: la constante de enlace y el número de sitios de unión de la HSA con los compuestos (**Figura A3.42**).¹⁶ En la **Tabla 4.5** se resumen los valores de la constante de desactivación de la fluorescencia de Lineweaver Burk (K_{LB}), la constante de enlace (K_B) de **21-24** con la HSA y el número de sitios de unión (n). El alto valor de las constantes de Lineweaver-Burk ($\sim 2 \cdot 10^5$) sugiere que todos los compuestos interaccionan eficazmente con la proteína.

Tabla 4.5. Valores de K_{LB} , K_B y n obtenidos de la interacción de **21-24** con la HSA.

Complejo	$K_{LB} (\text{M}^{-1}) \cdot 10^5$	$K_B (\text{M}^{-1}) \cdot 10^6$	n
21	2,02	6,16	1,26
22	2,49	12,96	1,31
23	1,79	6,12	1,28
24	2,06	6,11	1,26

4.2.7. Determinación de la generación de ROS en medios libres de células

Para que un compuesto actúe como fotosensibilizador en terapia fotodinámica, es fundamental que sea capaz de generar ROS cuando es irradiado con luz a una longitud de onda específica. Por ello, se realizaron diversos ensayos con los que evaluar la capacidad de los compuestos para generar ROS en medios libres de células.

Mecanismo tipo II. Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

En primer lugar, se investigó la capacidad de los compuestos **21-24** para producir oxígeno singlete, pues es la principal especie tóxica generada por un fotosensibilizador que funciona según el mecanismo tipo II.¹⁹ La producción de oxígeno singlete se evaluó espectroscópicamente en acetonitrilo mediante la disminución de la absorbancia del 1,3-difenilbenzofurano (DPBF) a 411 nm tras la irradiación con luz verde (520 nm, 0,5 mW/cm²) en presencia de **21-24** (4-7 μM) o en ausencia de compuestos (control negativo, **Figura A3.43**).²⁰⁻²² Para ello, se prepararon disoluciones de cada uno de los complejos y el DPBF en acetonitrilo, y se registró el espectro de absorción del DPBF tras irradiar con luz verde un intervalo de tiempo de 0 a 110 s.

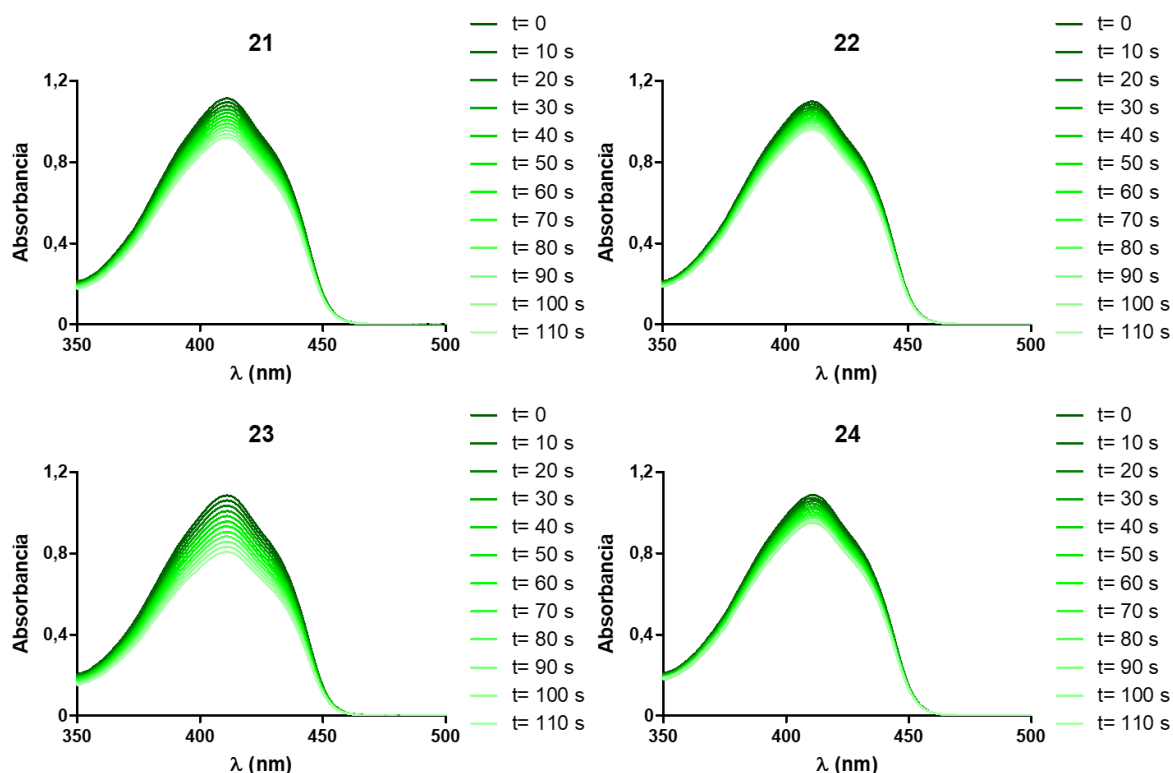


Figura 4.11. Espectro de absorción del DPBF en presencia de los complejos **21-24** tras la irradiación con luz verde (520 nm, 0,5 mW/cm²).

Para determinar los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete se utilizó $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (50 μM) como referencia, cuyo rendimiento cuántico es 0,57 en acetonitrilo (**Figura A3.43**).^{8,23} En la **Figura 4.11** se muestran los espectros de absorción del DPBF en presencia de **21-24** tras la irradiación, y en la **Figura 4.12** se muestra la representación de la variación de la absorbancia del DPBF a 411 nm frente al tiempo. De esta última gráfica se obtienen rectas cuya pendiente permite calcular los valores de los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete.

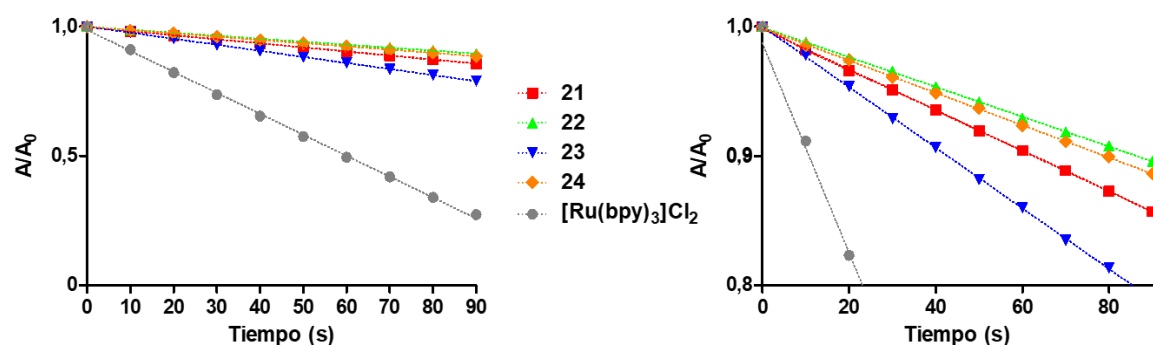


Figura 4.12. Representación de la absorbancia normalizada a 411 nm frente al tiempo de irradiación del DPBF en presencia de **21-24** y la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ con luz verde (520 nm, 0,5 mW/cm²). Se muestra una ampliación de 0,8 a 1,0 de la absorbancia normalizada.

Para calcular los valores de rendimientos cuánticos se utiliza la **Ecuación 4.1**, donde $\Phi_{\Delta r}$ es el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de la referencia, m_c y m_r son las pendientes de los complejos y la referencia, y $A_{\lambda c}$ y $A_{\lambda r}$ son las absorbancias de los complejos y de la referencia a la longitud de onda de irradiación (520 nm), respectivamente.^{8,23} En la **Tabla 4.6** se recogen los valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete obtenidos de todos los complejos, y se observa que los resultados son bajos en todos los casos. Además, los principales productores son **21** y **23** (~15 %), que contienen el grupo trifluorometilo en su estructura.

$$\text{Ecuación 4.1. } \Phi_{\Delta c} = \Phi_{\Delta r} \frac{m_c}{m_r} \frac{(1-10^{A_{\lambda r}})}{(1-10^{A_{\lambda c}})}$$

Tabla 4.6. Valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

Complejo	Rendimiento cuántico (Φ_{Δ})
21	0,13
22	0,078
23	0,15
24	0,093

Mecanismo tipo I. Generación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

A continuación, se investigó la capacidad de los nuevos compuestos para producir radicales hidroxilo, un ROS específico de tipo I que podría inhibir el crecimiento de las células tumorales hipóxicas. Este ensayo se llevó a cabo mediante un método espectroscópico basado en la oxidación de la sonda no fluorescente hidroxifenilfluoresceína (HPF) por el radical hidroxilo, dando lugar a un producto fluorescente.^{24,25} Para ello, se prepararon disoluciones de cada uno de los complejos y de la HPF en PBS (5 % DMF), y se registró el espectro de emisión de la HPF a tiempo inicial y tras irradiar con luz verde (520 nm, 2 mW/cm²) durante un intervalo de tiempo de 0-60 min. Como control negativo se registró el espectro de emisión de la HPF en ausencia de compuestos y tras irradiar con luz verde (**Figura A3.44**). En las **Figuras 4.13 y 4.14** se puede observar que **21** y **23** provocaron un aumento de la intensidad de fluorescencia, mientras que los espectros de emisión de la sonda en presencia de **22** y **24** no sufrieron cambios significativos en las condiciones ensayadas. Estos resultados nos permiten concluir que el sustituyente juega un papel importante en la generación de ROS (tanto de oxígeno singlete como de radicales hidroxilo) en medios libres de células.

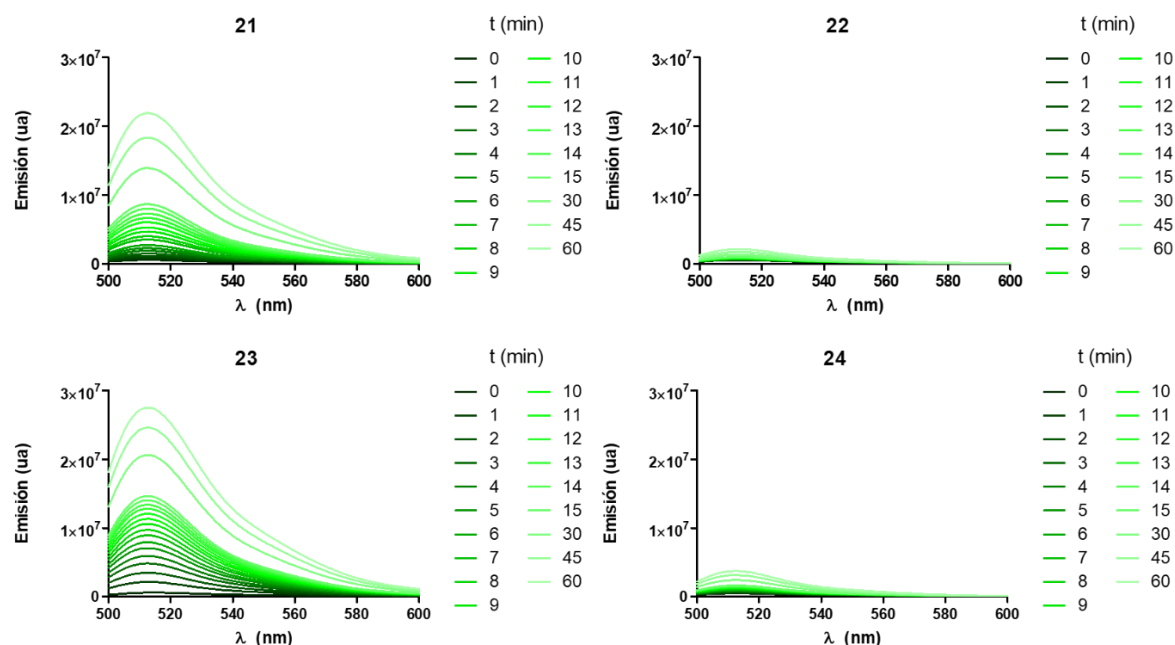


Figura 4.13. Espectro de emisión de la HPF en presencia de los complejos **21-24** tras la irradiación con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo.

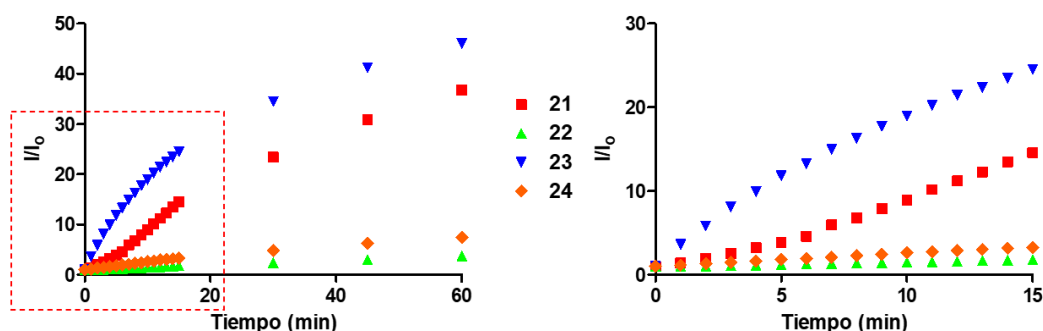


Figura 4.14. Espectro de emisión normalizada de la HPF frente al tiempo de irradiación en presencia de los complejos **21-24** tras la irradiación con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²).

4.3. Estudios biológicos

Uno de los objetivos del presente capítulo fue evaluar el potencial de los nuevos compuestos de Ru(II) como agentes fotosensibilizadores. Para ello, se llevaron a cabo estudios *in vitro*, los cuales fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec del Instituto de Biofísica de la República Checa.

4.3.1. Viabilidad celular

En primer lugar, se determinaron los valores IC₅₀ de los compuestos **21-24** y del cisplatino en las líneas celulares HeLa, OE33 y A375, tanto en oscuridad como tras irradiación con luz verde en normoxia. También se determinaron los valores de IC₅₀ en la línea celular sana de pulmón (MRC5pd30) tras 72 h de incubación en oscuridad (**Tabla 4.7**). Los complejos de rutenio muestran actividad antitumoral en la oscuridad, siendo los compuestos **23** y **24**, con ligandos dpq, más activos que **21** y **22**, con ligandos bpy. Esta actividad antiproliferativa se ve potenciada por la irradiación con luz verde, siendo estos complejos entre 2 y 13 veces más activos al ser irradiados que en oscuridad. Sin embargo, debido a que los complejos con ligandos bpy (**21** y **22**) muestran una menor toxicidad en la oscuridad, sus índices de fototoxicidad son superiores a los de los complejos con ligandos dpq (**23** y **24**) (**Tabla 4.8**).

Tabla 4.7. Valores de IC₅₀ obtenidos para células cancerosas tratadas con **21-24** irradiados con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²) y sin irradiar, determinados mediante ensayo MTT en condiciones de normoxia, tras 72 h de incubación en medio libre de fármacos.^a

Comp	HeLa		OE33		A375		MRC5pd30
	Osc.	Irrad.	Osc.	Irrad.	Osc.	Irrad.	Osc. 72 h
21	3,5 ±	0,31 ±	9,0 ±	0,7 ±	3,3 ±	0,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
	0,8	0,08	0,2	0,1	0,9		
22	4 ± 1	0,4 ± 0,1	4 ± 1	0,4 ±	1,6 ±	0,14 ±	0,8 ± 0,1
				0,1	0,3	0,04	

23	2,6 ± 0,8	0,71 ± 0,06	3,8 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,9 ± 0,3	0,5 ± 0,2	4,9 ± 0,4
24	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	3,2 ± 0,8	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,36 ± 0,09	2,3 ± 0,5
CDDP	15 ± 1	n.d.	10 ± 2	n.d.	12 ± 1	n.d.	7,8 ± 2,0

^aLos datos representan la media ± DE de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. n.d: no determinado.

Tabla 4.8. Valores de índices de fototoxicidad (PI).^a

Compuesto	HeLa	OE33	A375
21	11,3	12,9	8,2
22	10	10	11,4
23	3,7	3,8	3,8
24	2,4	1,77	1,9

^aLos PIs se han calculado como IC₅₀ (oscuridad)/IC₅₀ (tras la irradiación).

Además, se evaluó la actividad en células HeLa bajo condiciones de hipoxia (2 % O₂). Los compuestos también son significativamente activos en estas condiciones (**Tabla 4.9**), mostrando valores de IC₅₀ similares tanto normoxia como en hipoxia. Para los complejos **21** y **22**, la fotopotenciación en hipoxia produjo índices de fototoxicidad más bajos. En cambio, los complejos **23** y **24** mostraron fotoactividad similar en ambas condiciones, lo que sugiere que el oxígeno no desempeña un papel crucial en su mecanismo de fotoactivación.

Tabla 4.9. Valores de IC₅₀ obtenidos para células HeLa tratadas con **21-24** al ser irradiados con luz verde ($\lambda_{\text{máx}}$ = 545 nm, 2,2 mW/cm²) y sin irradiar, obtenidos mediante ensayo MTT en condiciones de normoxia o hipoxia.

Comp.	HeLa (normoxia) ^{a,b}			HeLa (hipoxia) ^{a,c}		
	Osc.	Irrad.	PI	Osc.	Irrad.	PI
21	3,5 ± 0,8	0,31 ± 0,08	11,3	3,5 ± 0,8	0,9 ± 0,3	3,9
22	4 ± 1	0,4 ± 0,1	10	6 ± 1	1,7 ± 0,3	3,5
23	2,6 ± 0,8	0,71 ± 0,06	3,7	2,1 ± 0,7	0,7 ± 0,1	3
24	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,4	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,2
CDDP	15 ± 1	n.d.	N/A	n.d.	n.d.	N/A

^aLos datos representan la media ± DE de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. ^b21 % O₂ + 5 % CO₂. ^c2 % O₂ + 5 % CO₂. n.d: no determinado, N/A= no aplica.

4.3.2. Acumulación y distribución intracelular

La acumulación intracelular de los complejos afecta a su actividad biológica. La cantidad de rutenio en el interior de células HeLa tratadas se determinó mediante ICP-MS (**Figura 4.15.A**). Los compuestos **21** y **22**, con ligandos bpy, mostraron una acumulación significativamente mayor, en comparación con los de dpq (**23** y **24**). Curiosamente, no se observó una correlación directa entre la acumulación y su actividad en la oscuridad. Con el fin de averiguar la localización de los compuestos en el interior celular, se realizó el fraccionamiento de células HeLa tratadas mediante el kit de fraccionamiento celular FractionPREP™. Como se muestra en la **Figura 4.15.B**, la mayor parte de rutenio (87-92 %) se asoció a una fracción de membrana, lo que concuerda con la alta lipofilia de los compuestos, una pequeña porción (~5-8 %) se localizó en el núcleo, mientras que las cantidades encontradas en el citosol y el citoesqueleto/ADN fueron insignificantes.

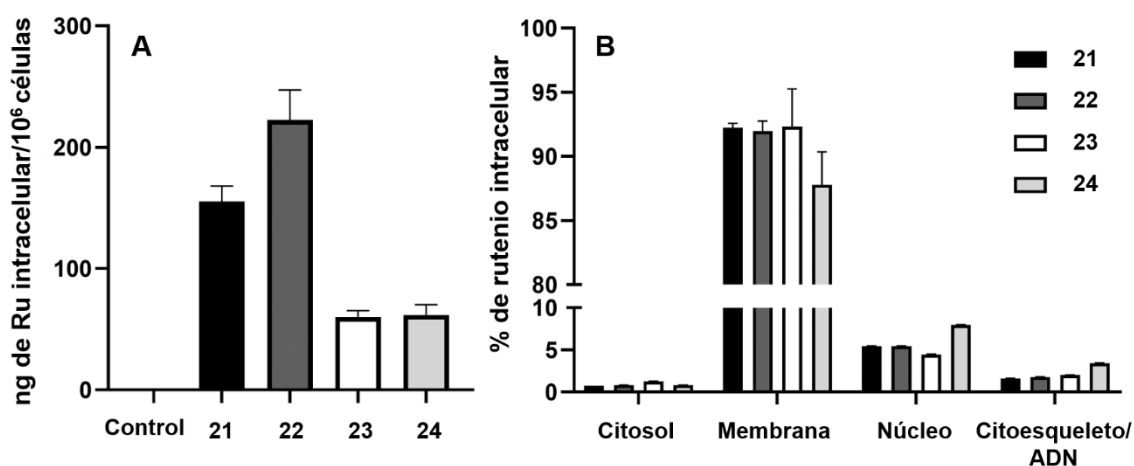


Figura 4.15. A). Acumulación de Ru en células HeLa. Las células se trataron con los compuestos **21-24** (5 μ M, 2 h, oscuridad, normoxia). **B).** Localización subcelular de Ru en células HeLa tratadas con **21-24** (5 μ M, 2 h, oscuridad, normoxia). Los datos de ambos paneles representan la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes, cada muestra medida por triplicado.

4.3.3. Generación de ROS y estrés oxidativo

Los valores de citotoxicidad obtenidos en condiciones de normoxia e hipoxia (**Tablas 4.7** y **4.9**) revelaron el importante papel del oxígeno en el mecanismo de fotopotenciación de los compuestos **21** y **22**. Por ello, es razonable sugerir que las ROS podrían desempeñar un papel esencial en el mecanismo de acción de estos complejos, similar a lo observado en compuestos similares.²⁶ La generación de ROS se determinó en células HeLa, tratadas con **21-24** (50, 200, 600 nM) tras irradiar con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²), a través del ensayo CellROX Green. En la **Figura 4.16.A** se observa que los compuestos **21** y **22** generan una mayor cantidad de ROS que **23** y **24**, lo cual es consistente con la dependencia de la actividad antiproliferativa de los complejos que contienen bpy respecto a la concentración de oxígeno (**Tabla 4.9**).

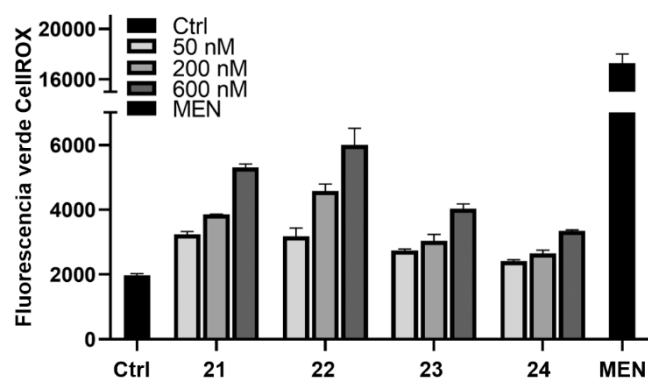


Figura 4.16. Cuantificación de ROS en células HeLa. Las células se trataron con **21-24** (50, 200, 600 nM) y se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm). La menadiona (100 μ M, 1 h) se utilizó como control positivo.

4.3.4. Evaluación morfológica

Para investigar el mecanismo de acción, se escogió el compuesto **21** por su mayor valor de PI (**Tabla 4.8**). Primero, se evaluó la morfología de las células HeLa tratadas con **21** (50, 200, 600 nM) durante 1 h en oscuridad y tras la irradiación con luz verde (1 h, $\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm). En la **Figura 4.17.A** se observa que las células no tratadas presentan la morfología poligonal de tipo epitelial, mientras que las tratadas con **21** muestran unas características morfológicas distintivas (**Figura 4.17.B-D**). A concentraciones bajas de **21**, se observan pequeñas burbujas en la membrana citoplasmática en una pequeña población de células (**Figura 4.17.B**), y a dosis más altas, grandes distorsiones de la membrana (**Figura 4.17.C-D**). Asimismo, las imágenes de microscopía confocal confirman la fuga del citoplasma (**Figura 4.17.E**, flechas negras), y la formación de burbujas de membranas (**Figura 4.17.E**, flechas rojas), lo que es indicativo de oncosis. La oncosis está causada por un rápido agotamiento del ATP o por daños graves en la membrana celular, que se manifiestan en el hinchamiento celular y la formación de burbujas en la membrana.

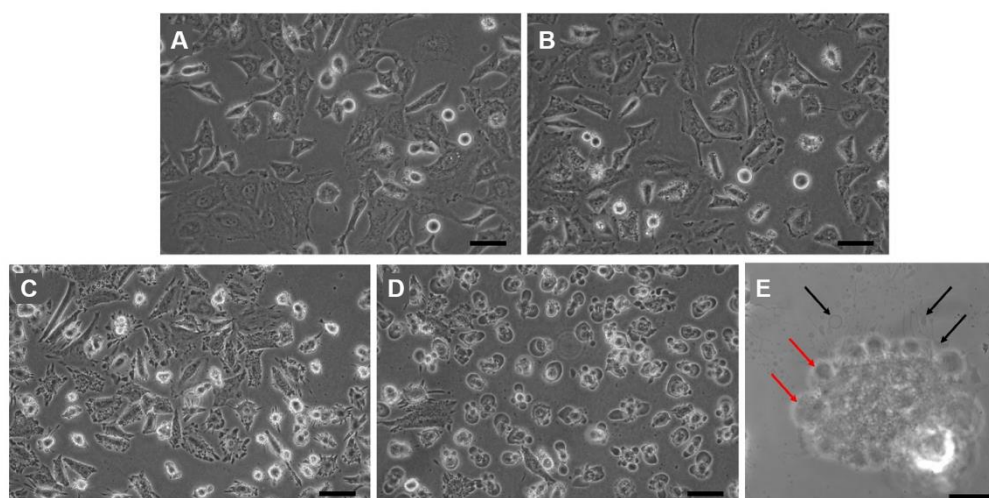


Figura 4.17. Morfología de células HeLa no tratadas e irradiadas (**A**) o tratadas con **21** a concentraciones **B**) 50 nM, **C**) 200 nM y **D**) 600 nM durante 1 h y posteriormente irradiadas con luz verde durante 1 h. **E**) Morfología de células HeLa tratadas con 200 nM de **21**.

Para apoyar los resultados obtenidos de la evaluación morfológica, se analizaron algunos marcadores típicos de la oncosis. La porimina es un receptor de superficie y desempeña un papel fundamental en la permeabilidad anormal de la membrana, lo que contribuye a la característica hinchazón de toda la célula durante la oncosis. Por tanto, la activación de la porimina se considera un indicador de la muerte celular oncótica.²⁷ La incubación de las células HeLa con **21**, con posterior irradiación, provocó claramente una expresión elevada de porimina, tanto por análisis Western Blot (**Figura 4.18.A**) como por microscopía confocal (**Figura 4.18.B** y **Figura A3.45**).

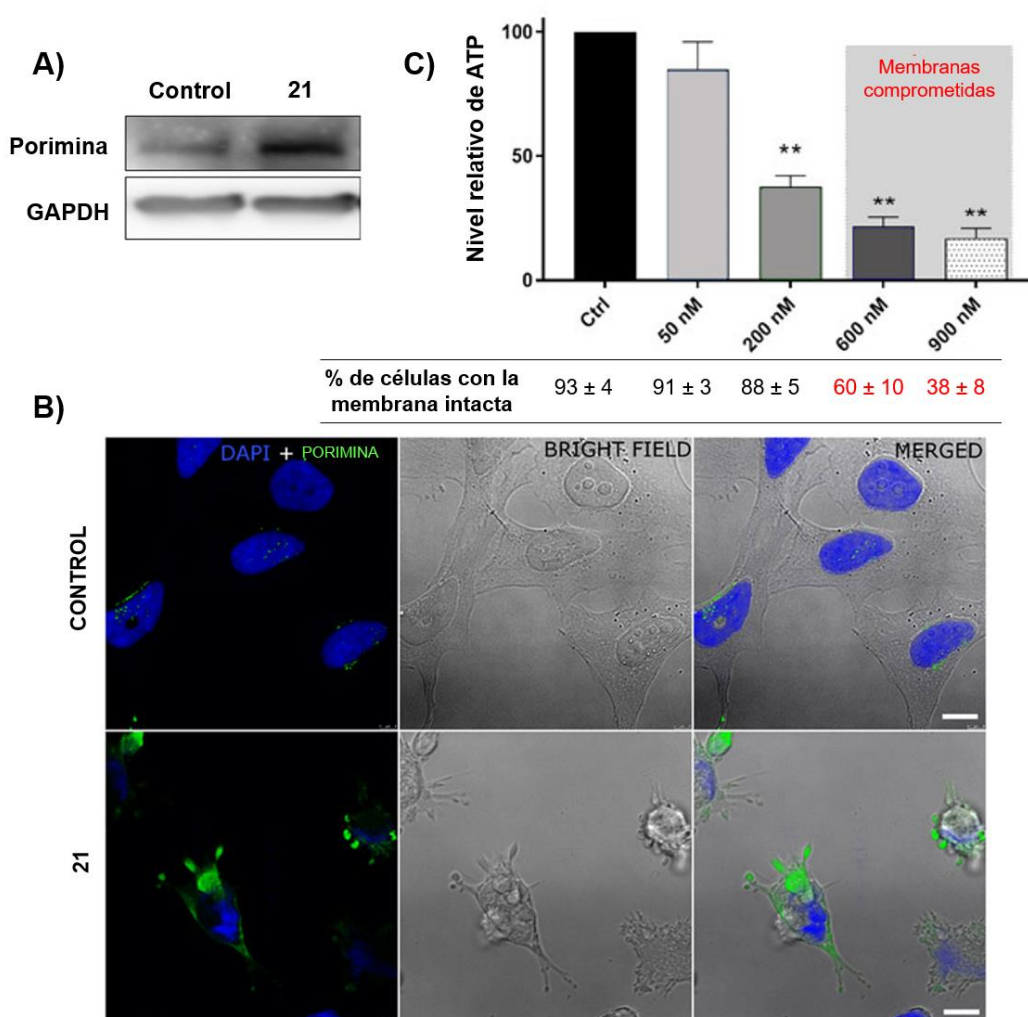


Figura 4.18. A) Análisis Western Blot de la expresión de porimina en HeLa. Las células no se trataron o se trataron con **21** (IC₅₀). Ambas muestras fueron irradiadas con luz verde y se dejaron recuperar durante 48 h en medios libres de compuestos. **B)** Tinción de inmunofluorescencia de células HeLa no tratadas o tratadas con **21** (IC₅₀) e irradiadas con luz verde, que muestra la localización de porimina en la membrana (fluorescencia verde) 4 h después de la irradiación. Los núcleos celulares están teñidos con DAPI. La barra de escala es 10 μm. **C)** Nivel de ATP intracelular en células HeLa tratadas con **21** o no tratadas e irradiadas. A continuación, las células se incubaron en el medio libre de fármacos durante 1 h. Los niveles de ATP intracelular se determinaron utilizando el reactivo CellTiter-Glo. La integridad de la membrana celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión con azul tripán. Significación estadística: $p \leq 0,001$.

Por otro lado, el nivel de ATP es un factor crítico en la oncosis.²⁸ Tras diversos procesos letales, la concentración intracelular de ATP disminuye rápidamente, especialmente en los procesos que conducen a la oncosis. En la mayoría de los mamíferos esta reducción conduce a la desenergización de la Na^+/K^+ ATPasa, aumentando la concentración de iones sodio y potasio, lo que provoca la entrada de agua e hinchazón celular.²⁹ Por ello, se comprobó el efecto del compuesto **21**, irradiado con luz, sobre el agotamiento de ATP intracelular. En la **Figura 4.18.C** se observa que el nivel de ATP en las células tratadas e irradiadas con **21** disminuye rápidamente, en comparación con las células de control. El efecto es notable, incluso a bajas concentraciones (50 y 200 nM) en periodos cortos (1 h). Así, el agotamiento del ATP y la expresión de porimina respaldan la oncosis como el principal mecanismo de la muerte celular inducida por **21** bajo irradiación.

4.3.5. Mecanismo de muerte celular

A continuación, para determinar el modo de muerte celular, se realizó la tinción con Anexina V/yoduro de propidio. El análisis por citometría de flujo (**Figura 4.19A**) revela que el tratamiento con el compuesto **21**, seguido de irradiación, aumentó una fracción de células en el cuadrante anexina V positiva y yoduro de propidio negativo. Anteriormente, se había demostrado que las células oncóticas, al igual que las apoptóticas, mostraban positividad de anexina V.^{30,31} Por tanto, las características morfológicas detalladas anteriormente son el principal factor discriminatorio para distinguir entre apoptosis y oncosis.³² En definitiva, el aumento de la positividad de la anexina V observado en las células HeLa tratadas con el compuesto **21**, junto a las características morfológicas (**Figura 4.17**), los marcadores de oncosis (**Figura 4.18**), así como con la no activación de las caspasas 3/7 (**Figura A3.46**) confirman la oncosis como mecanismo de muerte celular.

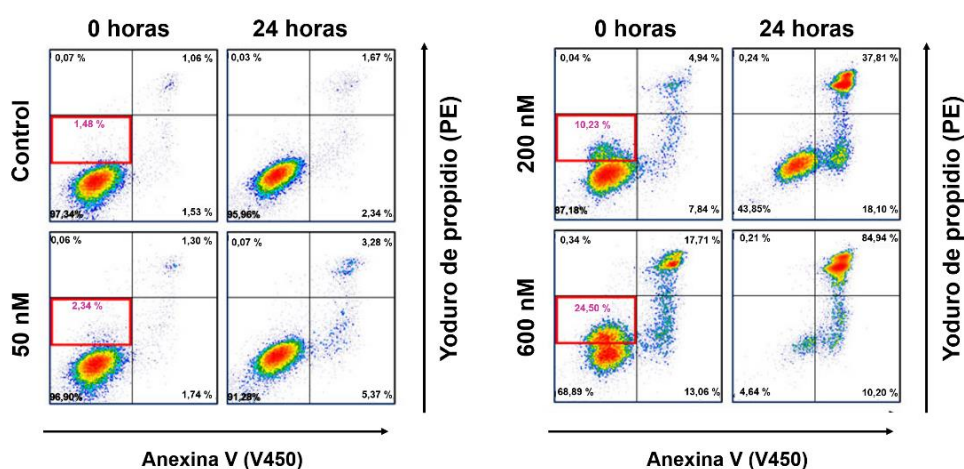


Figura 4.19. Diagrama de densidad representativo que indica la muerte celular determinada por el ensayo de anexina V/PI y citometría de flujo. Las células HeLa se trataron con **21** a las concentraciones indicadas con irradiación posterior (1 h, $\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). Las muestras se analizaron inmediatamente después de la irradiación (0) o 24 h después.

4.3.6. Análisis de tinción TMRE y determinación de calcio intracelular

Anteriormente, se demostró que los complejos **21-24** se acumulan preferentemente dentro de las membranas celulares (**Figura 4.15**). Además de la membrana citoplasmática, la fracción de membrana también incluye membranas que encapsulan orgánulos subcelulares, como las mitocondrias y el RE. Por ello, se realizaron más experimentos para averiguar si la fotoactividad del compuesto **21** también estaba relacionada con el daño a estas membranas intracelulares. Por un lado, para examinar si las membranas mitocondriales se veían afectadas se empleó un ensayo TMRE. La tinción TMRE fluorescente se acumula en las mitocondrias debido al potencial de membrana mitocondrial negativo. El mantenimiento de las membranas mitocondriales altamente polarizadas depende de que las membranas estén intactas, por lo que su permeabilización resultaría en una disipación del potencial de membrana. La intensidad de la fluorescencia TMRE en células HeLa tratadas con **21**, seguidas de irradiación, se midió mediante citometría de flujo, utilizando carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) como control positivo. Las células tratadas mostraron un potencial de membrana mitocondrial notablemente menor (**Figura 4.20A**), lo que sugiere una alteración de la membrana.

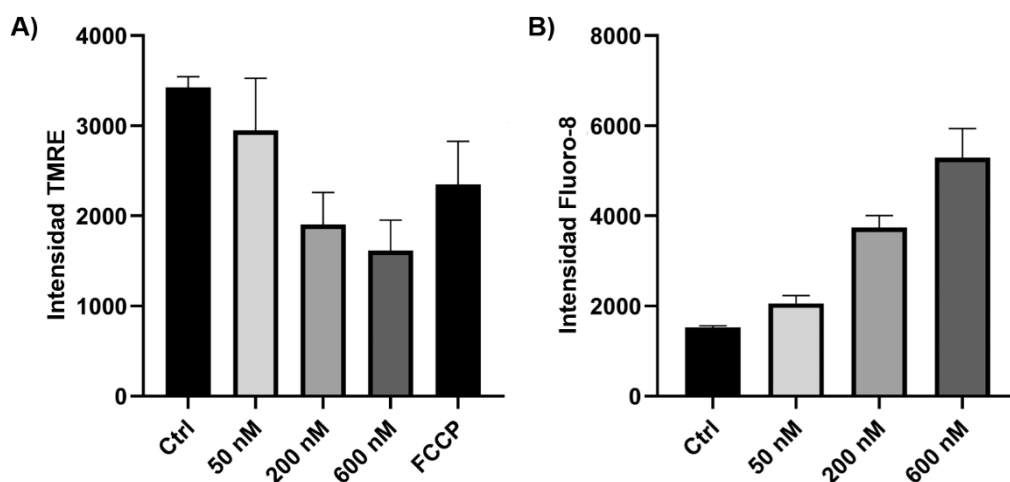


Figura 4.20. Efecto de **21** seguido de irradiación sobre el potencial de membrana mitocondrial (**A**) y la concentración de calcio intracelular (**B**). **A**) Intensidad de la fluorescencia TMRE como medida del potencial de membrana mitocondrial. Se incluyó FCCP (10 μ M) como control positivo. **B**). Intensidad de la señal de la sonda Fluo-8 sensible al Ca^{2+} . En ambos casos, las células HeLa se trataron con **21** (50, 200 y 600 nM) seguidas de irradiación (1 h, $\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²). Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo 3, el RE es un orgánulo celular que desempeña funciones esenciales en diversas respuestas celulares, puesto que almacena calcio (Ca^{2+}) y mantiene bajos los niveles de Ca^{2+} citoplasmático necesarios para la señalización celular. En consecuencia, la perturbación del RE conduce a niveles elevados

de Ca^{2+} citoplasmático. La liberación de calcio del RE al citoplasma se estudió utilizando la sonda fluorescente sensible al calcio Fluo-8 AM. La incubación con el compuesto **21**, seguida de irradiación, produjo un aumento significativo de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático de forma dosis-dependiente (**Figura 4.20B**). Así, los resultados confirmaron que las membranas intracelulares, como las del RE o las mitocondrias, pueden ser dañadas por el compuesto **21** al ser irradiado con luz verde.

4.3.7. Estudios del mecanismo de permeabilización de la membrana

Posteriormente, se realizaron experimentos adicionales para determinar si las membranas citoplasmáticas y/o intracelulares se permeabilizaban debido al daño directo del compuesto **21** a los componentes de la membrana (fosfolípidos y proteínas), o si era una respuesta celular posterior. Para ello, se utilizó un ensayo de fuga de liposomas basado en la extinción de la fluorescencia,^{33,34} que identifica el daño directo a los componentes lipídicos de la membrana. Se prepararon liposomas con DSPC 18:0, DOPC 18:1, colesterol y DSPE-PEG200 en proporciones molares 30:40:25:5, pues representa un modelo adecuado de membranas celulares.^{35,36} En los liposomas se encapsuló una concentración de carboxifluoresceína, una sonda fluorescente que aumenta su intensidad al liberarse por permeabilización o ruptura del liposoma. Como se muestra en la **Figura 4.21**, el tratamiento de los liposomas con **21** durante 2 h en la oscuridad produjo un ligero aumento de la fluorescencia. Sin embargo, si los liposomas se incubaban con **21** y se irradiaban durante 2 h con luz verde, se detectaba un notable aumento de la fluorescencia. Estos resultados sugieren que el compuesto **21** irradiado puede dañar los componentes lipídicos de las membranas celulares, contribuyendo significativamente a su fototoxicidad.

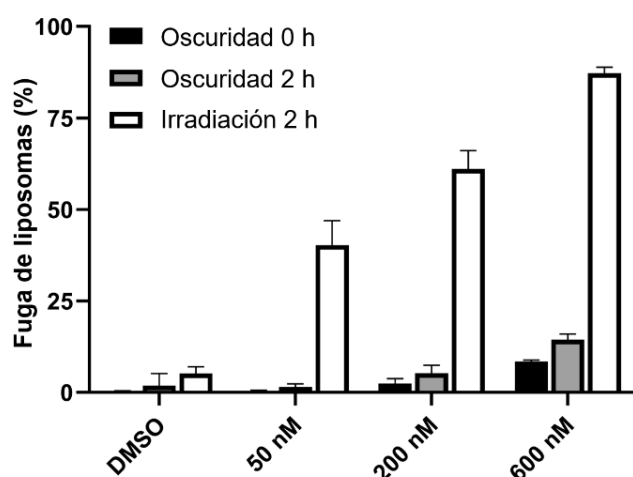


Figura 4.21. Ensayo de fuga de liposomas. Los liposomas se trataron con DMSO o **21** (50, 200, 600 nM) y se incubaron durante 2 h en la oscuridad o en condiciones de irradiación ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). La intensidad de fluorescencia resultante se normalizó con respecto a la fluorescencia máxima tras añadir un 10 % de Tritón X-100. Los datos representan la media $\pm$ DE de dos mediciones independientes.

4.3.8. Estudio de la interacción de los compuestos con proteínas

Finalmente, se evaluó el impacto de los compuestos sobre las proteínas, pues también están presentes en las membranas biológicas. Anteriormente, se demostró que **21-24** eran capaces de unirse a la HSA (Tabla 4.5) en medio libre de células. A continuación, se investigó si dichos complejos también eran capaces de interaccionar con proteínas en células cancerosas tratadas con ellos. Para medir la desnaturalización de proteínas en suspensiones de células enteras, se empleó la calorimetría diferencial de barrido (DSC), que mide la capacidad calorífica (C_p) de la muestra en relación con su temperatura. Las proteínas nativas suelen presentar altos valores de C_p , mientras que las desnaturalizadas muestran valores más bajos.

Previamente, se registraron los perfiles de DSC de células HeLa intactas, asociando picos con temperaturas de transición específicas a distintos componentes celulares.³⁷ Concretamente, los picos en el rango de temperaturas 40-70 °C se vincularon a proteínas citoplasmáticas y de membranas, mientras que aquellos a temperaturas de transición superiores corresponden a proteínas nucleares y ADN. Los perfiles DSC derivados de las células control y de las células tratadas con el compuesto **21** (Figura 4.22) mostraron distinciones en los picos asociados con las temperaturas de transición correspondientes a proteínas citoplasmáticas y de membrana.³⁸ Por otro lado, a temperaturas más altas (70-105 °C) se observó una variación mínima, lo que sugiere que el núcleo no es el objetivo de los complejos de este capítulo. Así pues, los resultados obtenidos mediante DSC confirman que el efecto fototóxico de **21** en células HeLa también consiste en el daño de los compartimentos proteicos de las células, y confirman que **21-24** se acumulan preferentemente en compartimentos ricos en membranas.

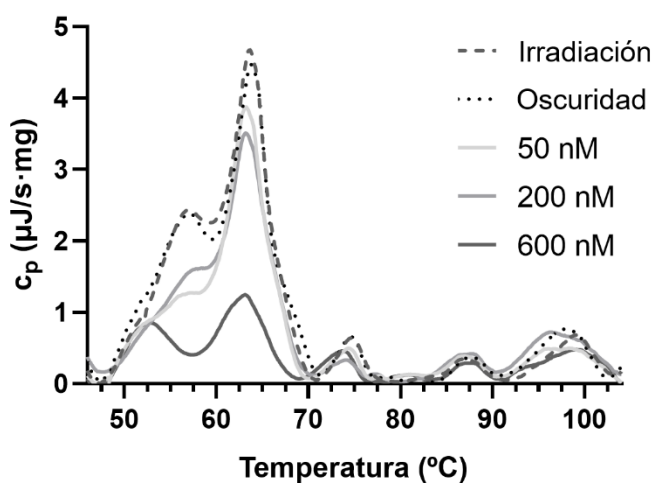


Figura 4.22. Relación entre la capacidad calorífica (C_p) y la temperatura en suspensiones de células enteras. Las células no tratadas irradiadas y no irradiadas se comparan con las células tratadas con **21** tras irradiación (1 h, $\lambda_{\text{máx}}$ = 545 nm, 2,2 mW/cm²).

4.4. Resumen

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de cuatro nuevos complejos de Ru(II), de tipo $[\text{Ru}(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]\text{OTf}$, donde los ligandos $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ son bpy o dpq y los ligandos $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ son derivados del 2-fenilbenzimidazol y presentan un sustituyente $p\text{-CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$ o $p\text{-Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ en la posición R_3 del anillo de fenilo. Además, el núcleo de benzimidazol presenta un grupo éster que permite futuras funcionalizaciones, lo que resulta crucial para modular las propiedades fotofísicas y biológicas de nuevas series de complejos octaédricos de rutenio.

Todos los complejos han sido caracterizados mediante diversas técnicas espectroscópicas. También se han estudiado sus espectros de absorción UV/Vis en distintos disolventes, y se ha comprobado la estabilidad de los nuevos compuestos en DMSO, medio de cultivo y tras la exposición a la luz verde. Asimismo, se demostró que los nuevos compuestos interaccionan con la HSA y que son capaces de generar oxígeno singlete tras la irradiación con luz verde en medios libres de células. Además, en estas últimas condiciones, **21** y **23** también producen de radicales hidroxilo.

Finalmente, se realizaron estudios de fototoxicidad en un panel de líneas celulares, siendo **21** el más fototóxico de la serie. Los compuestos **21-24** se acumulan en células HeLa, preferentemente en compartimentos ricos en membranas, y tras irradiar con luz verde producen ROS. Además, los estudios demostraron que **21**, tras la irradiación, conduce a la muerte celular a través de la oncosis y que es capaz de: alterar las membranas fosfolipídicas, provocar la despolarización de la membrana mitocondrial y la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas o de membrana.

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) 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>.
- (3) Muro-Small, M. L.; Yarnell, J. E.; McCusker, C. E.; Castellano, F. N. Spectroscopy and Photophysics in Cyclometalated Ru(II)-Bis(Bipyridyl) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012 (25), 4004–4011. <https://doi.org/10.1002/ejic.201200460>.
- (4) Huang, H.; Zhang, P.; Yu, B.; Chen, Y.; Wang, J.; Ji, L.; Chao, H. Targeting Nucleus DNA with a Cyclometalated Dipyrrophenazineruthenium(II) Complex. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (21), 8971–8983. <https://doi.org/10.1021/jm501095r>.
- (5) Ghosh, G.; Colón, K. L.; Fuller, A.; Sainuddin, T.; Bradner, E.; McCain, J.; Monroe, 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

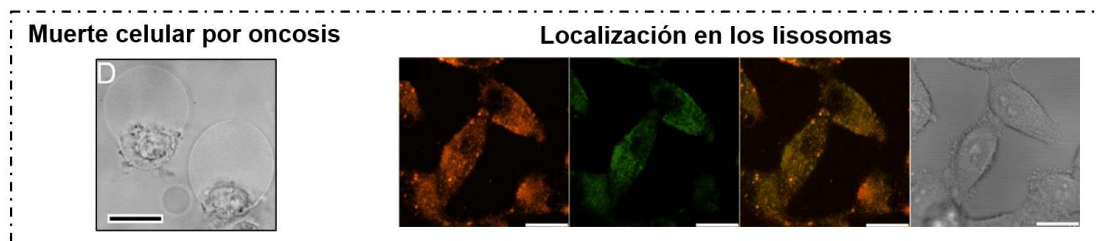
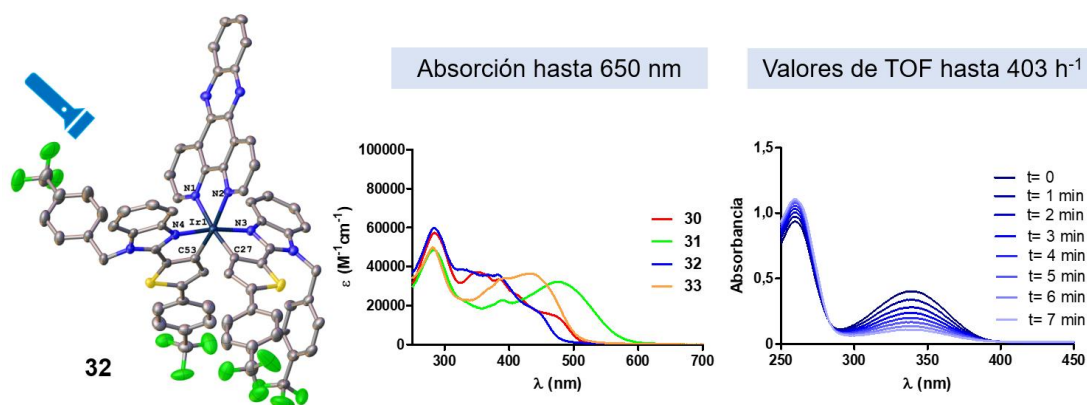
- Cytotoxic or Photocytotoxic Agents. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (13), 7694–7712. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00689>.
- (6) Martínez-Alonso, M.; Gandioso, A.; Thibaudeau, C.; Qin, X.; Arnoux, P.; Demeubayeva, N.; Guérineau, V.; Frochot, C.; Jung, A. C.; Gaidon, C.; Gasser, G. A Novel 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>.
 - (7) McCain, J.; Colón, K. L.; Barrett, P. C.; Monro, S. M. A.; Sainuddin, T.; Roque III, J.; Pinto, M.; Yin, H.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Photophysical Properties and Photobiological Activities of Ruthenium(II) Complexes Bearing π -Expansive Cyclometalating Ligands with Thienyl Groups. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (16), 10778–10790. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01044>.
 - (8) 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>.
 - (9) Jing, X.; Yang, F.; Shao, C.; Wei, K.; Xie, M.; Shen, H.; Shu, Y. Role of Hypoxia in Cancer Therapy by Regulating the Tumor Microenvironment. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9>.
 - (10) Cuello-Garibo, J.; James, C. C.; Siegler, M. A.; Hopkins, S. L.; Bonnet, S. Selective Preparation of a Heteroleptic Cyclometallated Ruthenium Complex Capable of Undergoing Photosubstitution of a Bidentate Ligand. *Chemistry* **2019**, *25* (5), 1260–1268. <https://doi.org/10.1002/chem.201803720>.
 - (11) Boff, B.; Ali, M.; Alexandrova, L.; Espinosa-Jalapa, N. Á.; Saavedra-Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. Rational Synthesis of Heteroleptic Tris(Chelate) Ruthenium Complexes [Ru(2-Ph-2'-Py)(L $\wedge$ L)(L' $\wedge$ L')]PF₆ by Selective Substitution of the Ligand Trans to the Ruthenated Phenyl Ring. *Organometallics* **2013**, *32* (18), 5092–5097. <https://doi.org/10.1021/om400611t>.
 - (12) Ertl, C. D.; Ris, D. P.; Meier, S. C.; Constable, E. C.; Housecroft, C. E.; Neuburger, M.; Zampese, J. A. Sticking and Patching: Tuning and Anchoring Cyclometallated Ruthenium(II) Complexes. *Dalton Trans.* **2014**, *44* (4), 1557–1570. <https://doi.org/10.1039/C4DT02797C>.
 - (13) 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>.
 - (14) Belinskaia, D. A.; Voronina, P. A.; Shmurak, V. I.; Jenkins, R. O.; Goncharov, N. V. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (19), 10318. <https://doi.org/10.3390/ijms221910318>.
 - (15) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhoulfi, 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>.
 - (16) Devagi, G.; Dallemer, F.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R. Organometallic Ruthenium(II) Complexes Containing NS Donor Schiff Bases: Synthesis, Structure, Electrochemistry, DNA/BSA Binding, DNA Cleavage, Radical Scavenging and Antibacterial Activities. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *854*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.10.036>.

- (17) Kalaivani, P.; Prabhakaran, R.; Ramachandran, E.; Dallemer, F.; Paramaguru, G.; Renganathan, R.; Poornima, P.; Padma, V. V.; Natarajan, K. Influence of Terminal Substitution on Structural, DNA, Protein Binding, Anticancer and Antibacterial Activities of Palladium(II) Complexes Containing 3-Methoxy Salicylaldehyde-4(N) Substituted Thiosemicarbazones. *Dalton Trans.* **2012**, 41 (8), 2486–2499. <https://doi.org/10.1039/C1DT11838B>.
- (18) Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D. Novel Bis-C,N-Cyclometalated Iridium(III) Thiosemicarbazide Antitumor Complexes: Interactions with Human Serum Albumin and DNA, and Inhibition of Cathepsin B. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (2), 974–982. <https://doi.org/10.1021/ic302219v>.
- (19) Alvarez, N.; Sevilla, A. Current Advances in Photodynamic Therapy (PDT) and the Future Potential of PDT-Combinatorial Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25 (2), 1023. <https://doi.org/10.3390/ijms25021023>.
- (20) Lv, Z.; Wei, H.; Li, Q.; Su, X.; Liu, S.; Zhang, K. Y.; Lv, W.; Zhao, Q.; Li, X.; Huang, W. Achieving Efficient Photodynamic Therapy under Both Normoxia and Hypoxia Using Cyclometalated Ru(II) Photosensitizer through Type I Photochemical Process. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (2), 502–512. <https://doi.org/10.1039/C7SC03765A>.
- (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) Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The Detection Sensitivity of Commonly Used Singlet Oxygen Probes in Aqueous Environments. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2020**, 204, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
- (23) 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>.
- (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>.
- (26) Novohradsky, V.; Yellol, J.; Stuchlikova, O.; Santana, M. D.; Kostrhunova, H.; Yellol, G.; Kasparkova, J.; Bautista, D.; Ruiz, J.; Brabec, V. Organoruthenium Complexes with C^N Ligands Are Highly Potent Cytotoxic Agents That Act by a New Mechanism of Action. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23 (61), 15294–15299. <https://doi.org/10.1002/chem.201703581>.
- (27) Ma, F.; Zhang, C.; Prasad, K. V.; Freeman, G. J.; Schlossman, S. F. Molecular Cloning of Porimin, a Novel Cell Surface Receptor Mediating Oncotic Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98 (17), 9778–9783. <https://doi.org/10.1073/pnas.171322898>.
- (28) Eguchi, Y.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis. *Cancer Res.* **1997**, 57 (10), 1835–1840.
- (29) Trump, B. E.; Berezsky, I. K.; Chang, S. H.; Phelps, P. C. The Pathways of Cell

- Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol. Pathol.* **1997**, 25 (1), 82–88. <https://doi.org/10.1177/019262339702500116>.
- (30) Lecoeur, H.; Prévost, M.C.; Gougeon, M.L. Oncosis Is Associated with Exposure of Phosphatidylserine Residues on the Outside Layer of the Plasma Membrane: A Reconsideration of the Specificity of the Annexin V/Propidium Iodide Assay. *Cytometry* **2001**, 44 (1), 65–72. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010501\)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010501)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q).
- (31) Fink, S. L.; Cookson, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **2005**, 73 (4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- (32) Balvan, J.; Křížová, A.; Gumulec, J.; Raudenska, M.; Sládek, Z.; Sedlackova, M.; Babula, P.; Svobodová, M.; Kizek, R.; Chmelik, R.; Masarik, M. Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PloS one* **2015**, 10, e0121674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121674>.
- (33) Aguilera, J.; Vazquez-Reyes, S.; Sun, J. A Fluorescence Dequenching-Based Liposome Leakage Assay to Measure Membrane Permeabilization by Pore-Forming Proteins. *Bio. Protoc.* **2021**, 11 (10), e4025. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4025>.
- (34) Júnior, N. G. O.; Cardoso, M. H.; Cândido, E. S.; van den Broek, D.; de Lange, N.; Velikova, N.; Kleijn, J. M.; Wells, J. M.; Rezende, T. M. B.; Franco, O. L.; de Vries, R. An Acidic Model Pro-Peptide Affects the Secondary Structure, Membrane Interactions and Antimicrobial Activity of a Crotalidin Fragment. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 11127. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29444-0>.
- (35) Velinova, M. J.; Staffhorst, R. W. H. M.; Mulder, W. J. M.; Dries, A. S.; Jansen, B. A. J.; de Kruijff, B.; de Kroon, A. I. P. M. Preparation and Stability of Lipid-Coated Nanocapsules of Cisplatin: Anionic Phospholipid Specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1663 (1–2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.03.002>.
- (36) Casares, D.; Escribá, P. V.; Rosselló, C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>.
- (37) Wei, F.; Kuang, S.; Rees, T. W.; Liao, X.; Liu, J.; Luo, D.; Wang, J.; Zhang, X.; Ji, L.; Chao, H. Ruthenium(II) Complexes Coordinated to Graphitic Carbon Nitride: Oxygen Self-Sufficient Photosensitizers Which Produce Multiple ROS for Photodynamic Therapy in Hypoxia. *Biomaterials* **2021**, 276, 121064. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121064>.
- (38) Lepock, J. R. Measurement of Protein Stability and Protein Denaturation in Cells Using Differential Scanning Calorimetry. *Methods* **2005**, 35 (2), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.002>.

Capítulo 5

Complejos ciclometalados de Ir(III) con ligandos derivados de 2-(5-ariltiofen-2-il)benzazol fototóxicos en células cancerosas por daño lisosomal y oncosis



Los ensayos biológicos presentados en este capítulo han sido realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec, del Instituto de Biofísica de la República Checa.

5.1. Introducción

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, los complejos octaédricos de iridio presentan las ventajas de una larga vida de fosforescencia y una notable fotoestabilidad.¹⁻
⁶ Estos pueden exhibir una amplia variedad de modos de acción alternativos a la apoptosis, tales como: ferroptosis, oncosis, necroptosis o paraptosis.⁷ En este sentido, Chao y col. fueron pioneros en el desarrollo de complejos de Ir(III) inductores de la oncosis (**Figura 5.1**). Estos se dirigen a las mitocondrias y muestran actividad citotóxica frente al cáncer de pulmón resistente al cisplatino.⁸ Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un complejo de Ir(III) con actividad citotóxica derivada de la oncosis en *Caenorhabditis elegans*, reduciendo el 41 % del volumen del tumor (**Figura 5.2.A**).⁹

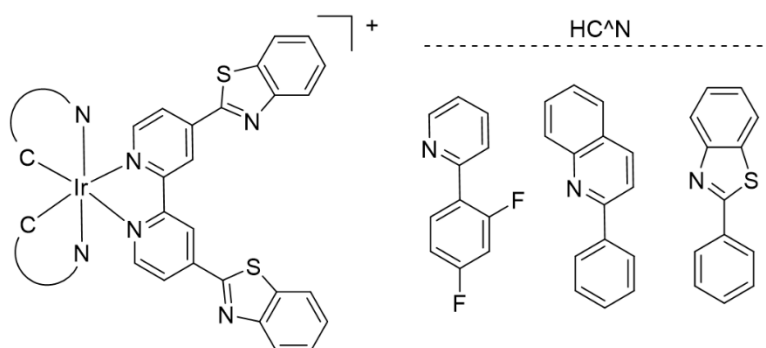


Figura 5.1. Compuestos de Ir(III) inductores de la oncosis preparados por Chao y col.⁸

Por otro lado, nuestro grupo también preparó compuestos de Ir(III) fotoactivables con luz azul, que incorporan en su estructura dppz como ligando N^N auxiliar y dos ligandos ciclometalados basados en 2-tienilbenzimidazol (**Figura 5.2.B**). Después de ser irradiados, generan ROS en células HeLa,¹⁰ y, además, el complejo con el ligando 2-(tiofen-2-il)-1-metilbenzimidazol es selectivo hacia las CSC.¹¹

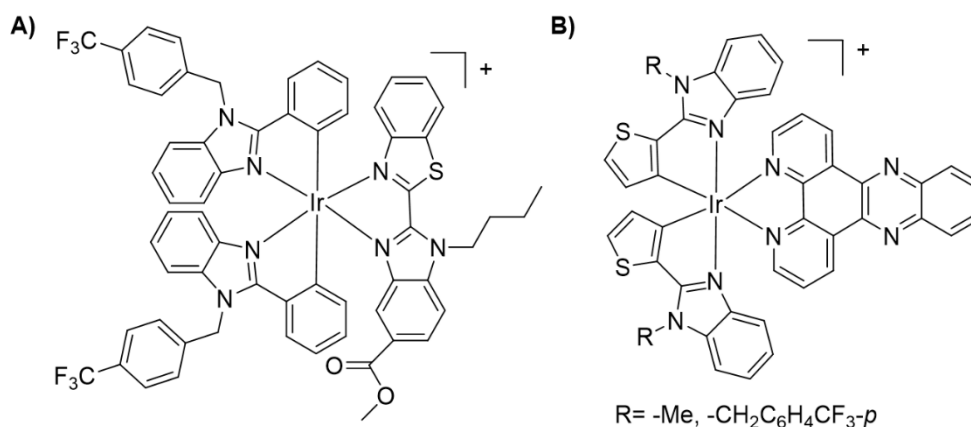


Figura 5.2. Complejos de Ir(III) preparados por nuestro grupo de investigación. **A)** Inductor de la oncosis; **B)** Fotoactivables con luz azul.^{10,11}

En el presente capítulo se detalla la síntesis y caracterización de cuatro nuevos complejos de Ir(III), del tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ es un ligando basado en benzimidazol o benzotiazol con un grupo tienilo sustituido (**25-26** y **28-29**) y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es la dppz (**Figura 5.3**). Se seleccionó la dppz como ligando auxiliar por sus excelentes resultados en la serie de fotosensibilizadores anteriormente mencionada.¹⁰ Asimismo, se analiza la capacidad de los compuestos para fotooxidar el NADH y fotogenerar oxígeno singlete y/o radicales hidroxilo en medios libres de células. Finalmente, se presentan los resultados biológicos obtenidos, tanto en modelos de cáncer 2D como 3D, así como el estudio del mecanismo de muerte celular.

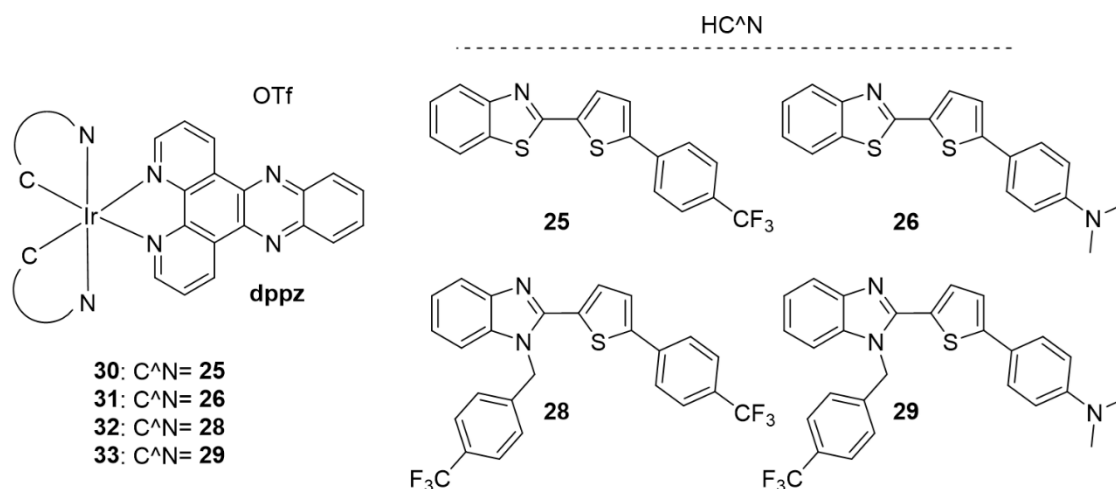


Figura 5.3. Estructura general de los nuevos compuestos preparados en el presente capítulo.

5.2. Resultados y discusión

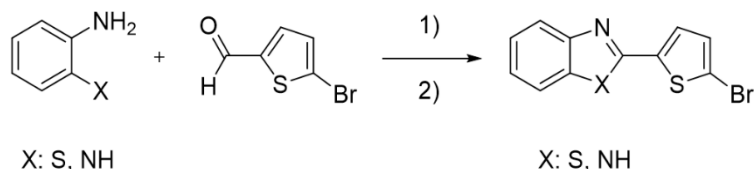
5.2.1. Síntesis y caracterización de los nuevos prolíandos

En primer lugar, se diseñaron y sintetizaron nuevos ligandos 2-(5-aryl-2-tiofenil)benzotiazoles (**25** y **26**) y 2-(5-aryl-2-tiofenil)-1-(4-trifluorometilbencil)-1*H*-benzo[*d*]imidazoles (**28** y **29**). La elección del grupo *p*-trifluorometilbencil en el átomo de nitrógeno del núcleo de benzimidazol se debe a que favorece una mayor lipofilia del ligando y del complejo.¹²

Síntesis de los nuevos prolíandos

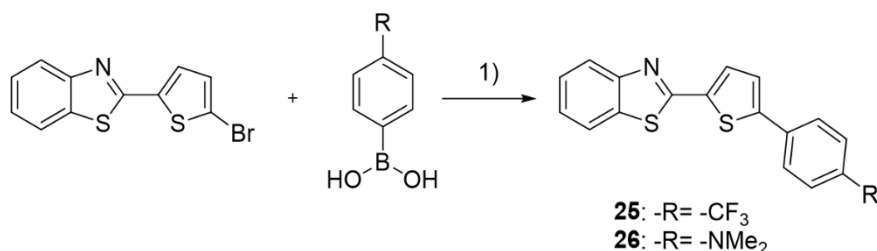
Los nuevos prolíandos **25-26** y **28-29** se prepararon mediante un procedimiento en varias etapas, siguiendo protocolos ligeramente modificados de la bibliografía.¹³⁻¹⁵ En ambos casos, la primera etapa consiste en la condensación entre 5-bromotiofeno-2-carbaldehído y *o*-aminotiofenol y fenilendiamina para obtener los intermedios 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[*d*]tiazol y 2-(5-bromotiofen-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol,

respectivamente. Para ello, se hizo reaccionar bisulfito sódico y el aldehído en agua durante 1 h a 80 °C. Posteriormente, se añadió *o*-aminotiofenol o fenilendiamina disuelto en etanol, dejando reaccionar la mezcla durante 18 h a 80 °C (**Esquema 5.1**).



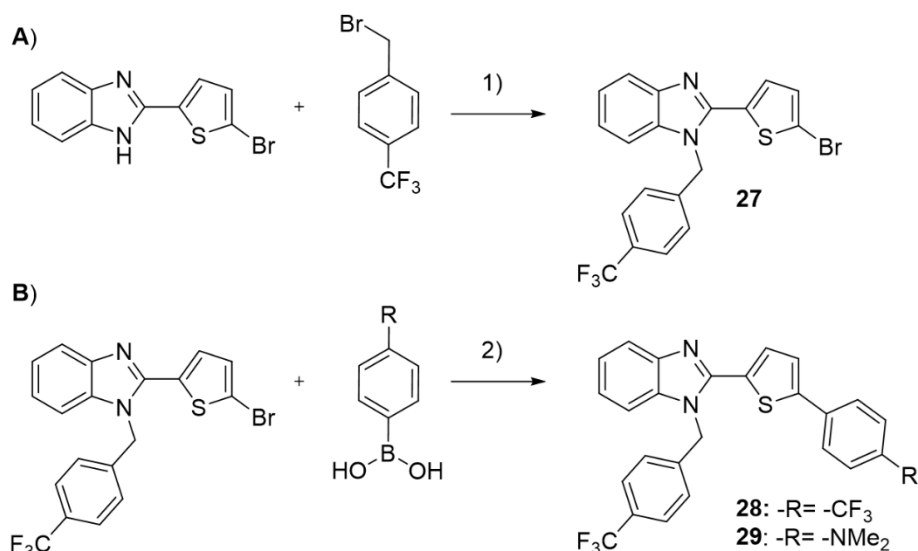
Esquema 5.1. Ruta sintética para la obtención de 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[d]tiazol y 2-(5-bromotiofen-2-il)-1*H*-benzo[d]imidazol. Condiciones de reacción. **1)** NaHSO₃, H₂O, 80 °C, 1 h. **2)** EtOH: H₂O (1:1 v:v), 80 °C, 18 h.

A continuación, los prolígandos **25** y **26** se prepararon mediante una reacción de acoplamiento cruzado C-C de tipo Suzuki-Miyaura entre 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[d]tiazol y el ácido borónico correspondiente. Se utilizó tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) como catalizador y la reacción se llevó a cabo en una mezcla de tolueno, agua y etanol (3:2:1 v:v:v) a 120 °C durante 1 h en un microondas de reacción (**Esquema 5.2**).



Esquema 5.2. Procedimiento de síntesis para la obtención de los prolígandos **25** y **26**. 1) K_2CO_3 , $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, $120\text{ }^\circ\text{C}$, MW, Tolueno: H_2O :EtOH 3:2:1 (v:v:v).

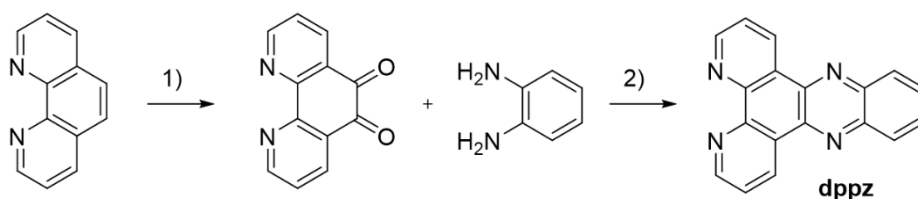
Por su parte, para obtener los prolígandos **28** y **29** se llevaron a cabo dos etapas de reacción adicionales. Primero, 2-(5-bromotiofen-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol se hizo reaccionar con bromuro de 4-trifluorometilbencilo, en presencia de Cs₂CO₃, en acetonitrilo durante 24 h a temperatura ambiente para obtener el intermedio **27**. Finalmente, los prolígandos **28** y **29** se obtuvieron mediante una reacción de Suzuki-Miyaura entre el intermedio **27** y el ácido borónico correspondiente, utilizando PdCl₂(PPh₃)₂ como catalizador en dioxano:agua (2:1 v:v). La reacción se llevó a cabo a 120 °C durante 1 h en un microondas de reacción (**Esquema 5.3**).



Esquema 5.3. Procedimiento de síntesis para la obtención de **28** y **29**. Condiciones de reacción: **1)** Cs_2CO_3 , CH_3CN , t.a, 24 h; **2)** $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, K_2CO_3 , Dioxano: H_2O (2:1 v:v), 120 °C, 1 h, MW.

Síntesis del ligando N[^]N

La preparación de la dppz se llevó a cabo mediante un protocolo en dos etapas descrito en la bibliografía.^{16,17} En la primera etapa se obtuvo la 1,10-fenantrolin-5,6-diona mediante la oxidación de la 1,10-fenantrolina, en presencia de bromuro de potasio, utilizando una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (2:1 v:v) a 100 °C durante 3 h. En la segunda etapa se llevó a cabo la condensación de la diona con *o*-fenilendiamina, en presencia de ácido trifluoroacético (TFA), a 100 °C en agua durante 24 h.



Esquema 5.4. Procedimiento de síntesis para la obtención de la dppz. Condiciones: **1)** KBr, $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (2:1 v:v), 100 °C, 3 h. **2)** TFA cat., H_2O , 100 °C, 24 h.

Todos los intermedios de reacción y los nuevos prolíandos (**25** y **27-29**) se caracterizaron utilizando distintas técnicas: espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y flúor (**Figuras A4.1-A4.11** del Anexo 4), así como espectrometría de masas ESI-MS por inserción directa en modo positivo (**Figuras A4.38-A4.41** del Anexo 4).

Espectroscopía UV/Visible de absorción y de emisión

Se registraron los espectros de absorción UV/Vis y de emisión de los prolígandos en acetonitrilo a una concentración de 50 μM . Cabe mencionar que el ligando **26** había sido publicado previamente como un cromóforo óptico.¹⁴ En la **Figura 5.4** se observa que el carácter dador de electrones del grupo dimetilamino (**26** y **29**) conduce a un desplazamiento batocrómico de los máximos de absorción y emisión, en comparación con sus análogos con el grupo trifluorometilo (**25** y **28**). Así, la longitud de onda de la banda de absorción menor energía se desplaza de 360 nm para **25** a 404 nm para **26**, y de 344 nm para **28** a 378 nm para **29**.

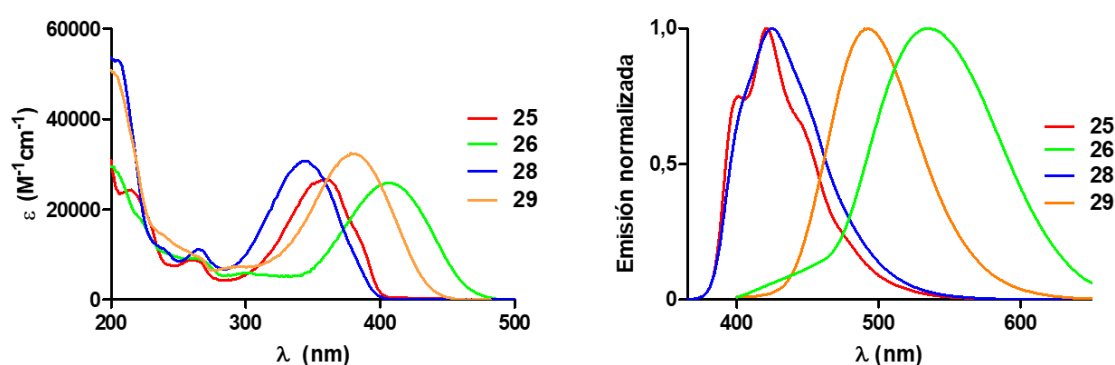


Figura 5.4. Espectros de absorción y emisión de los ligandos **25-26** y **28-29** (50 μM) en acetonitrilo.

En la **Tabla 5.1** se recogen los máximos de absorción y su coeficiente de extinción molar (ϵ), las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}), así como los rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{em}) de los ligandos (**25-26** y **28-29**) en acetonitrilo en presencia y ausencia de oxígeno.

Tabla 5.1. Propiedades fotofísicas de los nuevos prolígandos **25-26** y **28-29** en acetonitrilo.

Ligando	λ_{abs} (nm) (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Phi_{\text{em}}^{\text{a}}$	$\Phi_{\text{em}}^{\text{b}}$
25	360 (26560)	370	420	0,20	0,20
26	404 (25840)	380	535	0,96	0,86
28	344 (30710)	370	425	0,57	0,52
29	378 (32350)	370	490	0,95	0,83

^aMuestras burbujeadas con argón durante 30 minutos. ^bMuestras sin burbujear.

Con el fin de analizar la naturaleza del estado excitado de los ligandos, se registraron los espectros de emisión en disolventes de distinta polaridad. Tal y como se realizó para los ligandos en el Capítulo 3, se seleccionaron disolventes de menor a mayor índice de polaridad: tolueno (2,1), cloroformo (4,1), acetonitrilo (5,8) y DMSO (7,2). En la

Figura 5.5 se puede observar el efecto solvatofluorocrómico en la banda de emisión como consecuencia del carácter ICT del estado excitado que presentan los ligandos **26** y **29**,¹⁸ a diferencia de los ligandos **25** y **28** (**Figura A4.44**), cuyas longitudes máximas de emisión no se desplazan al aumentar la polaridad de disolvente. Este fenómeno es consecuencia del efecto pull-push que se produce entre el benzotiazol (aceptor) y el dimetilamino (dador).

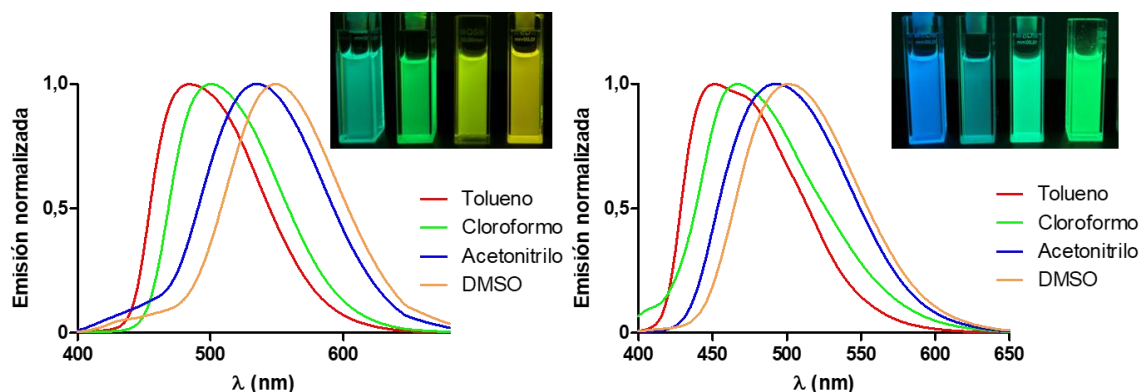
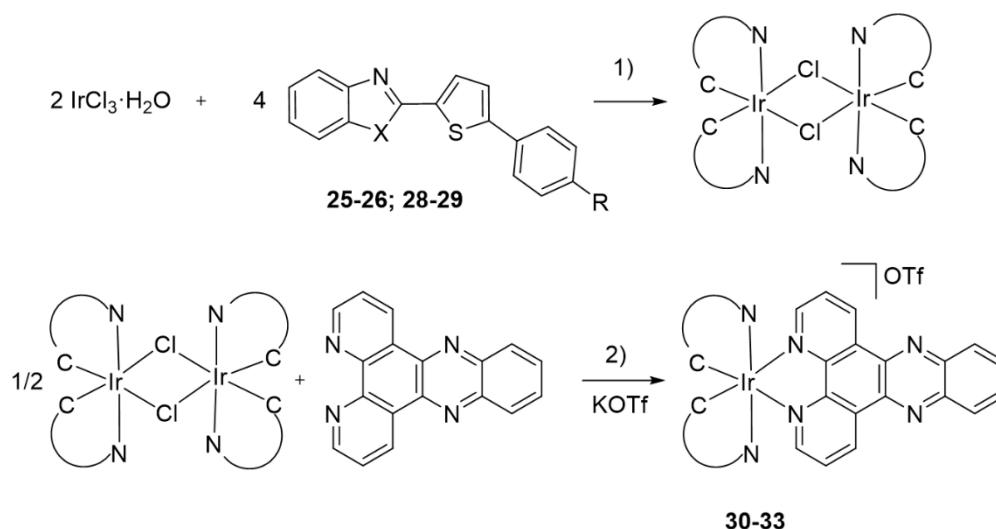


Figura 5.5. Emisión normalizada de los prolíngandos **26** (izquierda) y **29** (derecha) en disolventes de distinta polaridad. λ_{ex} : 380 nm (**26**) y 370 nm (**29**).

5.2.2. Síntesis de los complejos de Ir(III)

Los compuestos **30-33** se obtuvieron siguiendo un procedimiento de dos etapas descrito previamente en la bibliografía.^{4,19} En ambas etapas, las reacciones se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno. Primero, se hizo reaccionar $\text{IrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ con los prolíngandos correspondientes (**25-26**; **28-29**) en una mezcla de 2-etoxietanol y H_2O (3:1 v:v) a 110 °C durante 24 h. Por último, el dímero obtenido, sin purificación adicional, se hizo reaccionar con dppz en una mezcla de MeOH y DCM (3:2 v:v) a 58 °C, en presencia de KOTf, durante 24 h.



Esquema 5.5. Procedimiento de síntesis para los complejos de Ir(III). Condiciones de reacción: **1)** 2-etoxietanol: H_2O (3:1 v:v), 110 °C, 24 h, atm. N_2 ; **2)** MeOH:DCM (3:2 v:v), 58 °C, 24 h.

5.2.3. Caracterización de los nuevos compuestos

Los nuevos compuestos se caracterizaron mediante espectroscopía de RMN (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{19}F -RMN y espectros bidimensionales), análisis elemental y HPLC-MS.

Espectroscopía de RMN

Los compuestos de Ir(III) se registraron en cloroformo deuterado (CDCl_3) y las señales de protón se asignaron utilizando los espectros bidimensionales: $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -COSY, $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -NOESY y $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC, los cuales quedan recogidos en las **Figuras A4.12-A4.37** del Anexo 4. En la **Figura 5.6** se muestra la numeración que va a utilizar para la asignación de las señales de protón de los espectros de los compuestos **30-33**.

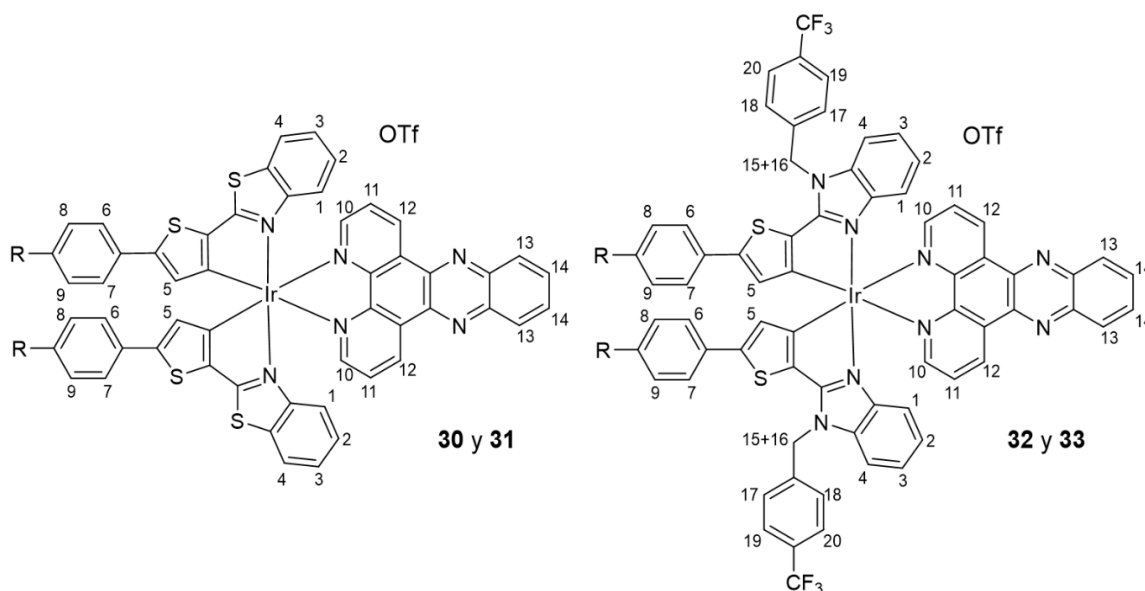


Figura 5.6. Numeración utilizada para la asignación de las señales de los espectros de RMN.

Los espectros de ^1H -RMN de todos los compuestos presentan resonancias aromáticas entre δ 10,00 y 5,60 ppm. En los espectros de **31** y **33** se observa la resonancia alifática correspondiente al grupo dimetilamino como un singlete a δ 2,95 ppm. En los espectros de los compuestos **32** y **33**, las resonancias alifáticas del grupo trifluorometilbencilo (H_{15+16}) aparecen como dos dobletes en torno a δ 5,90 y 6,00 ppm. La **Figura 5.7** muestra los espectros de ^1H -RMN de todos los compuestos en CDCl_3 a temperatura ambiente. Las resonancias correspondientes al ligando dppz (H_{10-14}) no se ven afectadas por las sustituciones en los ligandos ciclometalados, excepto la señal H_{10} que, por su proximidad espacial a H_1 , se ve influenciada por la presencia del núcleo de benzotiazol o benzimidazol. Por otro lado, las resonancias de los protones H_5 , H_{6+7} y, especialmente H_{8+9} , se ven fuertemente influenciadas por la presencia de los

sustituyentes, desplazándose a campo más alto cuando el sustituyente es $-NMe_2$, debido al apantallamiento que sufren como consecuencia de la naturaleza electrodadora de dicho grupo.

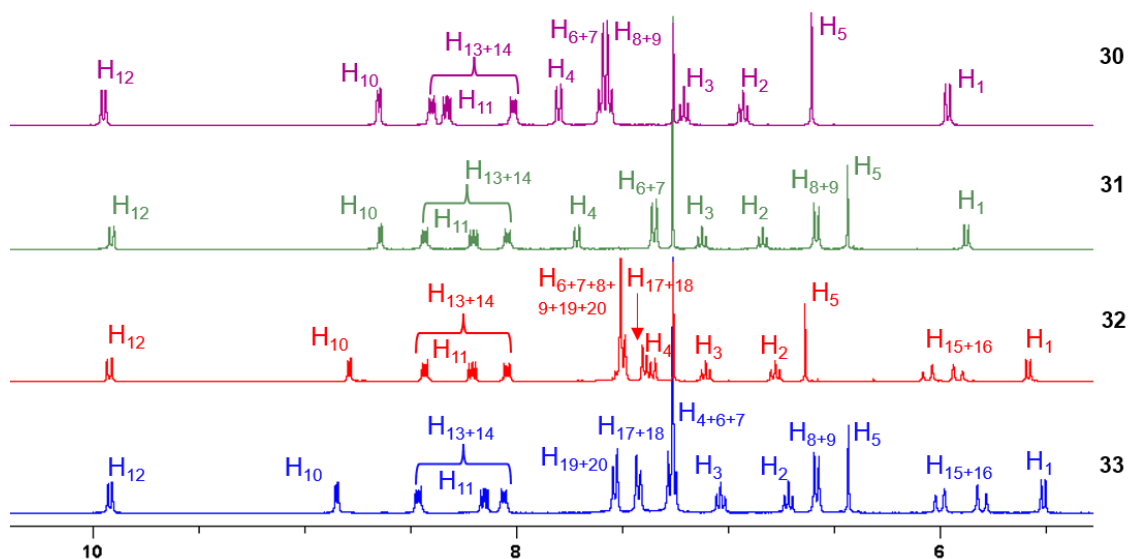


Figura 5.7. Superposición de la zona aromática de los espectros de 1H -RMN de **30-33** en $CDCl_3$, a t.a.

Por su parte, las señales de los grupos $-CF_3$ se detectaron mediante espectros de ^{19}F -RMN de los compuestos **30-33**. Como se observa en la **Figura 5.8**, el grupo $-CF_3$ perteneciente al contraión triflato aparece en torno a δ -79 ppm en todos los compuestos, mientras que los sustituyentes $-CF_3$ unidos a los anillos de fenilo aparecen en torno a δ -63 ppm. Cabe mencionar que la integración de los espectros de flúor también confirma la estequiometría y pureza de los nuevos compuestos.

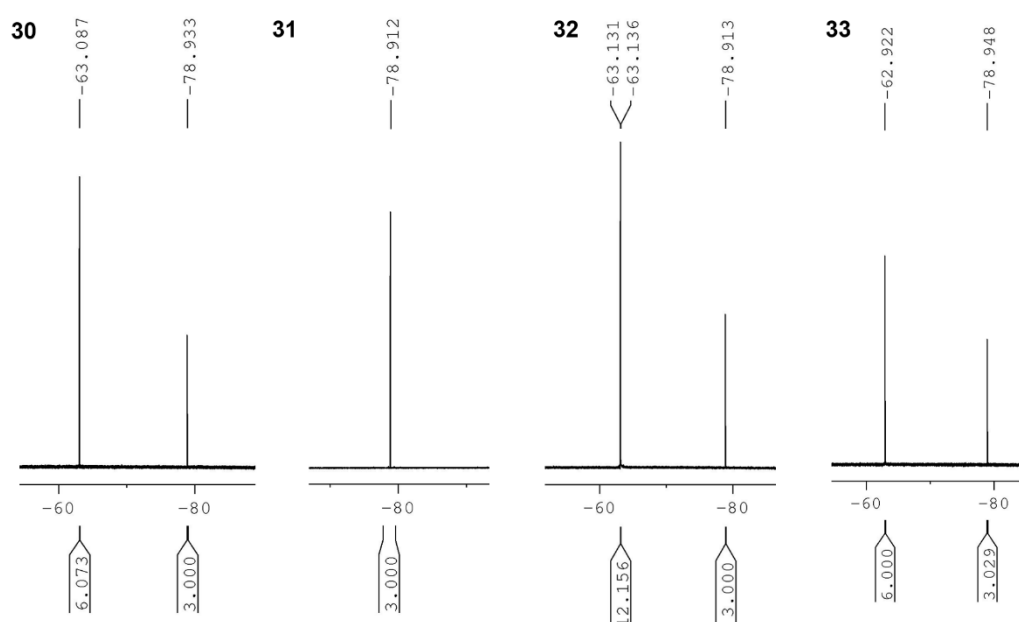


Figura 5.8. Espectros de ^{19}F -RMN de los compuestos **30-33** en CD_2Cl_2 , a t.a.

Análisis elemental y cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS)

Para completar la caracterización estructural de los compuestos de Ir(III), se obtuvieron los datos de análisis elemental y los espectros de masas en modo positivo mediante HPLC-MS. Los resultados obtenidos, tanto en los cromatogramas como en el análisis elemental (**Tabla 5.2** y **Figuras A4.42-A4.43**), confirmaron la pureza superior al 95 % y la estequiometría propuesta. En todos los casos, el espectro de masas obtenido corresponde al ion molecular $[M-OTf]^+$, cuyo perfil isotópico concuerda con el teórico.

Tabla 5.2. Valores de masas y de análisis elemental obtenidos para los compuestos preparados.

Compuesto	Análisis elemental ^a (%)				HPLC-MS ^a		
	C	H	N	S	t _R (min)	Fragmento	m/z
30	49,36	2,22	6,30	11,72	20,312	$[M-OTf]^+$	1195,0730
	(49,14)	(2,10)	(6,25)	(11,93)			(1195,0791)
31	52,83	3,27	8,73	12,59	20,919	$[M-OTf]^+$	1145,1808
	(52,89)	(3,11)	(8,66)	(12,38)			(1145,1888)
32	52,47	2,80	7,00	5,96	20,455	$[M-OTf]^+$	1477,2208
	(52,43)	(2,48)	(6,89)	(5,91)			(1477,2255)
33	55,88	3,41	8,90	6,12	21,039	$[M-OTf]^+$	1427,3304
	(55,81)	(3,54)	(8,79)	(6,04)			(1427,3351)

^aValores teóricos entre paréntesis.

5.2.4. Determinación de la estructura cristalina mediante difracción rayos X

La estructura molecular del complejo **32** se confirmó mediante difracción de rayos X de monocristal. Los monocristales se obtuvieron por difusión lenta de hexano en una disolución saturada de diclorometano durante 3 días a temperatura ambiente. La toma de datos y el refinamiento de la estructura fue realizada por la Dra. Delia Bautista, del SAI de la Universidad de Murcia. En la **Figura 5.9** se muestra la estructura cristalina, y en la **Tabla 5.3** se resumen sus datos cristalográficos, incluyendo las dimensiones de la celdilla unidad. El resto de datos cristalográficos quedan recogidos en la **Tabla A4.1** del Anexo 4.

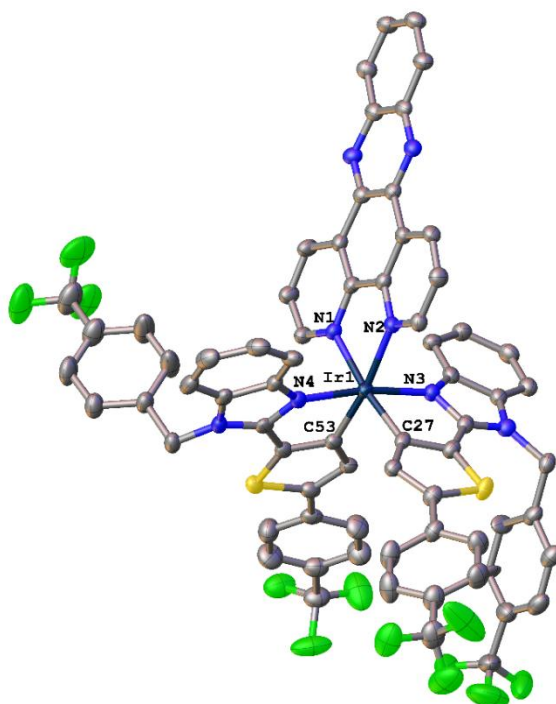


Figura 5.9. Estructura cristalina del compuesto **32**. Los elipsoides se han representado al 50 % de probabilidad y los átomos de hidrógeno, las moléculas de disolventes y el contraíón se han omitido por claridad. Distancias de enlace (Å): Ir-C27: 2,015(5), Ir-C53: 1,997(5), Ir-N4: 2,056(5), Ir-N1: 2,131(4), Ir-N2: 2,134(4), Ir-N3: 2,060(4). Ángulos (°): C53-Ir-N4: 95,2(2), C27-Ir-N3: 79,8(2) y N1-Ir-N2: 77,58(17).

Tabla 5.3. Datos cristalográficos de compuesto **32**.

Sistema cristalino	Triclínico	Grupo espacial	P-1
Fórmula empírica	C ₇₁ H ₄₀ F ₁₅ IrN ₈ O ₃ S ₃		
Dimensiones de la celdilla unidad ^a			
a (Å)	14,302(7)	α (°)	78,870(14)
b (Å)	15,809(7)	β (°)	66,395(15)
c (Å)	17,023(7)	γ (°)	68,46(2)

^aLos valores entre paréntesis indican la desviación estándar de la medida.

La estructura de rayos X confirma la geometría propuesta. El átomo de iridio se encuentra en un entorno de coordinación octaédrica distorsionado, donde los ligandos ciclometalados presentan los dos enlaces Ir-C e Ir-N en una disposición cis y trans, respectivamente, como viene descrito en la bibliografía.^{10,19,20} Tanto los ligandos ciclometalados C^N como la dppz se unen al centro metálico formando quelatos bidentados κ^2 -C^N y κ^2 -N^N. Las distancias de enlace de los ligandos ciclometalados se encuentran dentro de los rangos esperados (~2 Å), mientras que las distancias entre el átomo metálico y los nitrógenos de la dppz son más largos debido a la influencia *trans* de los ligandos C^N.^{19,20}

Además de las importantes interacciones de Coulomb catión-anión, en la estructura cristalina de **32** se observan interacciones de hidrógeno intra e intermoleculares C-H...X (X= F, O, N y S), que quedan recogidas en la **Tabla 5.4**. En la **Figura 5.10** se muestran las interacciones intramoleculares entre el átomo de hidrógeno H(20) del carbono contiguo al nitrógeno del anillo de benzimidazol y el nitrógeno N(1) del anillo de dppz. Asimismo, se observa la interacción producida entre el hidrógeno H(62) del grupo -CH₂ del sustituyente trifluorometilbencilo del benzimidazol y el átomo de azufre S(56) del anillo de tiofeno del mismo ligando.

Tabla 5.4. Enlaces de hidrógeno observados en la estructura cristalina del complejo **32**.

D-H...A	d(D-H) (Å)	d(H...A) (Å)	d(D...A) (Å)	<(DHA) (°)
C(15)-H(15)...F(83 ^a) ^a	0,95	2,55	3,260(11)	131,8
C(16)-H(16)...O(81 ^a) ^b	0,95	2,43	3,253(13)	145,2
C(16)-H(16)...O(82 ^a) ^a	0,95	2,46	3,154(12)	129,8
C(20)-H(20)...N(1)	0,95	2,62	3,333(7)	132,3
C(62)-H(62B)...S(56)	0,99	2,74	3,459(7)	130,2

Transformación de simetría utilizada para generar los átomos equivalentes: ^a-x+1,-y+1,-z; ^bx+1,y,z.

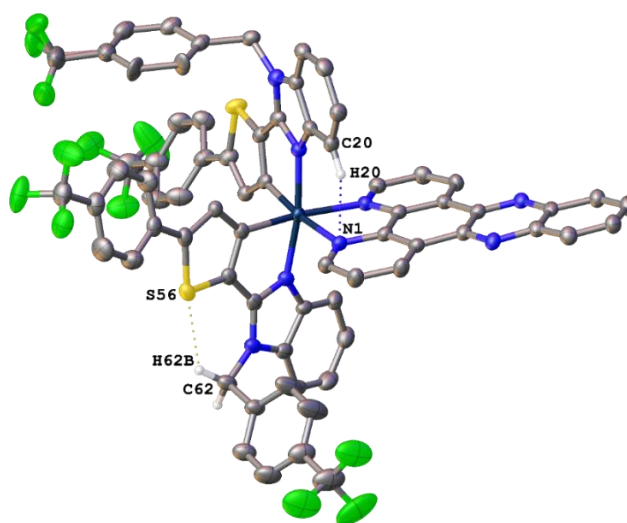


Figura 5.10. Interacciones de hidrógeno intramoleculares en la estructura cristalina de **32**. Los elipsoides se han representado al 50 % de probabilidad.

Por otro lado, el empaquetamiento de **32** también está organizado por interacciones π - π , las cuales se recogen en la **Tabla 5.5**. En la **Figura 5.11** se muestran las interacciones π - π que se establecen entre el plano 3 (rosa) y el plano 4 (verde), ambos de un ligando ciclometalado, así como las interacciones entre los planos 1 (amarillo) y 2 (azul) localizados en los anillos de dppz.

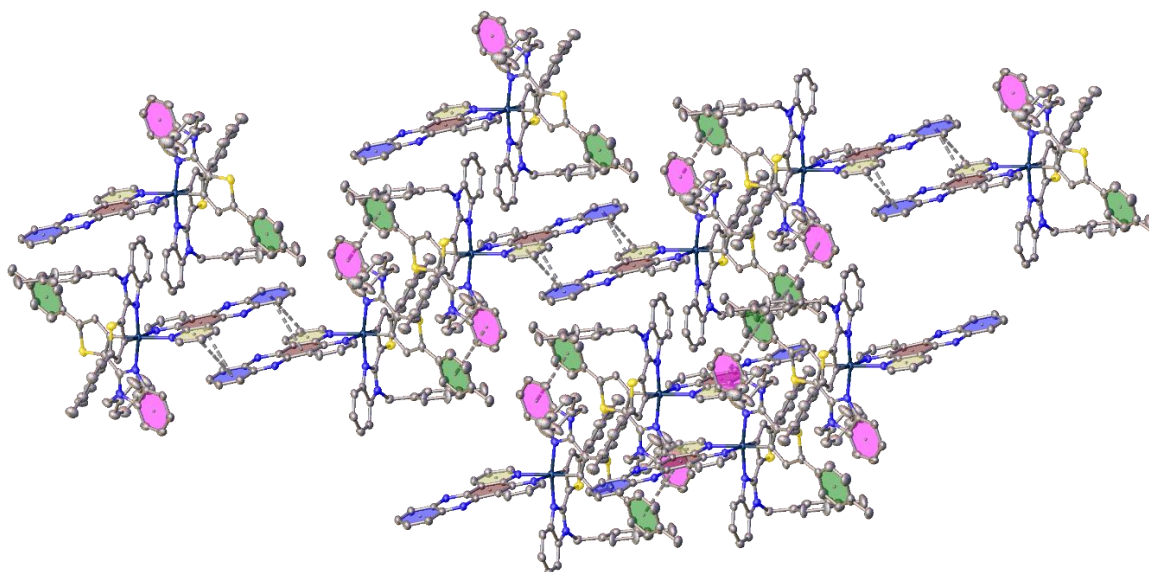


Figura 5.11. Interacciones intermoleculares π - π en la estructura del compuesto **32**.

Tabla 5.5. Parámetros geométricos de las interacciones π - π .

Interacción π - π ^a	Distancia centroide-centroide (Å)	Ángulo diedro (°)	Desplazamiento (Å)
Plano 1- Plano 2	3,772(4)	4,2(3)	1,668
Plano 3- Plano 4	3,878(5)	9,3(3)	1,965
Plano 4- Plano 2	3,853(5)	1,062	0,0(4)
Plano 4- Plano 4	3,862(4)	1,750	3,1(3)

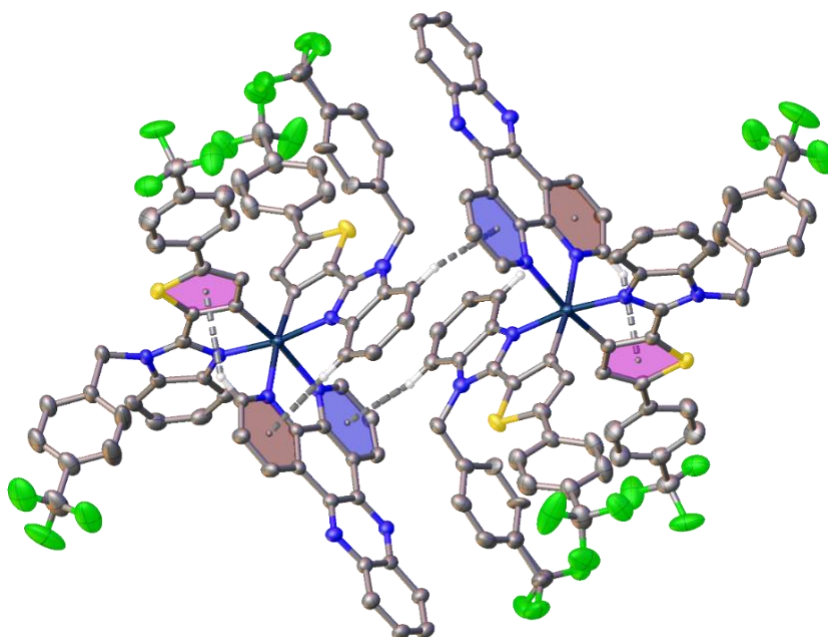
^aPlano 1 (C4, C5, C12, C13, C17 y C18), Plano 2 (C6, C7, C8, C9, C10 y C11), Plano 3 (C45, C50, C49, C48, C47 y C46) y Plano 4 (C56, C61, C60, C59, C58 y C57).

Asimismo, se observan interacciones de tipo $C-H \cdots \pi$, las cuales se detallan en la **Tabla 5.6** y se ilustran en la **Figura 5.12**. Entre las interacciones $C-H \cdots \pi$ intramoleculares se encuentran las que se establecen entre el C(1)-H(1) del anillo dppz (marrón) y el plano 6 (rosa), correspondiente al anillo de tiofeno de un ligando C^N. Por otro lado, se pueden ver interacciones entre el C(20)-H(20) del núcleo de benzimidazol de un ligando C^N y el plano 7, perteneciente al anillo de dppz. También se observa una interacción $C-H \cdots \pi$ intermolecular entre el C(23)-H(23) del anillo de benzimidazol de un ligando C^N y el plano 5 (azul) del anillo dppz de una molécula vecina. Esta última interacción da lugar a la formación de dímeros (**Figura 5.12**).

Tabla 5.6. Parámetros geométricos de las interacciones C-H... π .

Interacción C-H... π^a	Distancia C-H...Cg (Å)		Ángulo C-H...Cg (°)
	H...Cg	C...Cg	
C(1)-H(1)...Plano 6	2,73	3,520(7)	141
C(20)-H(20)...Plano 7	2,63	3,535(7)	160
C(23)-H(23)...Plano 5	2,58	3,448(7)	152

^aPlano 5 (N2, C17, C13, C14, C15 y C16), plano 6 (S56, C52, C53, C54 y C55) y plano 7 (N1, C1, C2, C3, C4 y C18). Cg: centroide del plano.

**Figura 5.12.** Interacciones intermoleculares C-H... π en la estructura del compuesto **32**.

5.2.5. Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos

Las propiedades fotofísicas de los compuestos se estudiaron en acetonitrilo y agua (1 % DMSO). En primer lugar, se registraron los espectros de absorción UV/Vis de todos los compuestos a una concentración 10 μ M (**Figura 5.13**). Todos los compuestos presentan bandas de absorción intensas por debajo de 350 nm, lo que podría atribuirse a las transiciones π - π^* centradas en el ligando permitidas por la regla de espín, y ubicadas en los ligandos C^N y dppz. A longitudes de onda más largas ($\lambda > 350$ nm), las bandas de absorción menos intensas podrían asignarse a bandas de transferencia de carga intraligando o ligando-ligando (LLCT o LL'CT) o a bandas de transferencia de carga metal-ligando permitidas por el espín (¹MLCT) y/o prohibidas por el espín (³MLCT),^{21,22} siendo estas últimas consecuencia del acoplamiento espín-órbita del átomo pesado de Ir(III) ($\zeta = 3909$ cm⁻¹), que permite un cruce entre sistemas rápido y eficaz.^{23–25}

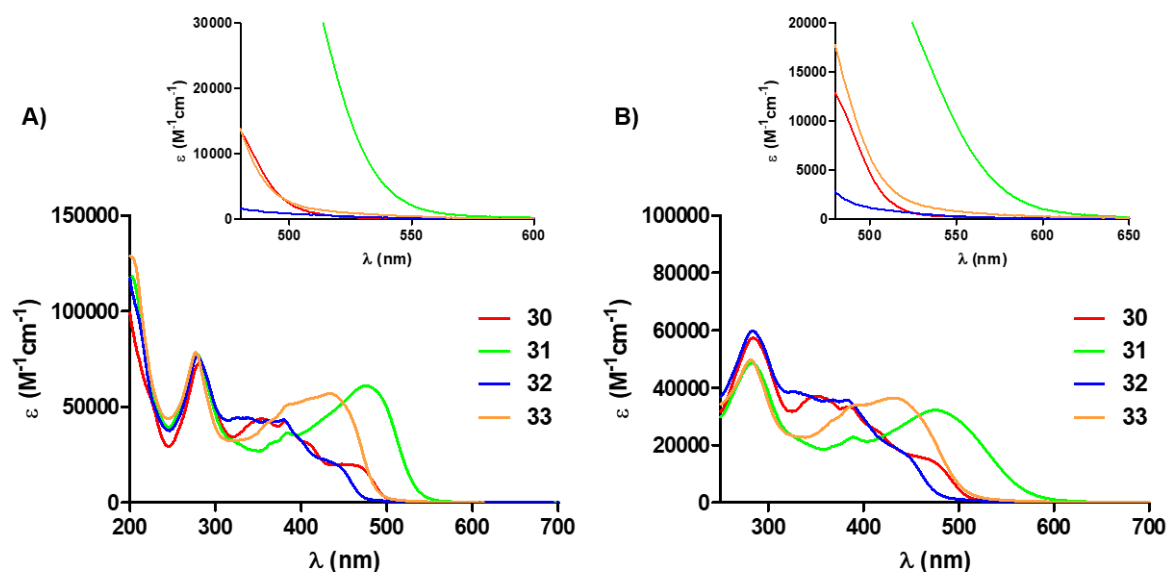


Figura 5.13. Espectro de absorción UV/Vis de los compuestos **30-33** en **A)** acetonitrilo y **B)** agua (1% DMSO).

En la **Figura 5.13** se puede observar que la introducción de un sustituyente dador de electrones, como el grupo dimetilamino, produce un aumento en la intensidad de absorción, así como un ligero desplazamiento batocrómico la banda de menor energía en los complejos **31** y **33**. De hecho, los complejos **31** y **33** muestran colas en sus espectros de absorción en agua hasta 600 y 640 nm, respectivamente. Este fenómeno resalta la significativa influencia de los ligandos C^N en las propiedades fotofísicas de los compuestos ciclometalados de Ir(III). En la **Tabla 5.7** se resumen los datos de absorción UV/Vis de los compuestos estudiados.

Tabla 5.7. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y coeficiente de extinción molar (ϵ) de los compuestos en acetonitrilo y agua (1 % DMSO).

Complejo	Disolvente	λ_{abs} (nm) (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)
30	CH ₃ CN	280 (72500), 355 (43850), 381 (42340), 473 ^h (17450)
	H ₂ O (1 % DMSO)	284 (57390), 347 (37080), 384 (33430), 479 ^h (13130)
31	CH ₃ CN	278 (78050), 384 (36390), 476 (61010)
	H ₂ O (1 % DMSO)	283 (48630), 389 (22780), 478 (32230)
32	CH ₃ CN	279 (76330), 379 (43330), 445 ^h (18810)
	H ₂ O (1 % DMSO)	284 (59840), 382 (35810), 448 ^h (15850)
33	CH ₃ CN	277 (78680), 388 ^h (51650), 434 (56980)
	H ₂ O (1 % DMSO)	281 (49760), 395 (34040), 433 (36390)

Los espectros de emisión de los compuestos de Ir(III) también se registraron en acetonitrilo a una concentración de 10 μM . En la **Figura 5.14.A** se observa que todos los compuestos son emisores en acetonitrilo, aunque sus rendimientos cuánticos son muy bajos ($<0,01$) en todos los casos. Cabe destacar que las bandas de emisión de los compuestos **31** y **33** son coincidentes con sus respectivos ligandos C^N (**26** y **29**), aunque son mucho menos intensas que las de los ligandos libres. Los tiempos de vida de **30** y **32** se ajustan a un modelo de desactivación monoexponencial, dando lugar a tiempos de vida en torno a 1 μs , lo que demuestra que la emisión se produce mediante fosforescencia, con valores dentro de los rangos encontrados en la bibliografía.²⁶ Por su parte, al excitar a 405 nm en agua, solo los compuestos **30** y **32**, con el sustituyente *p*-CF₃C₆H₄, dan lugar a emisiones de color rojo y naranja, respectivamente (**Figura 5.14.B**). Sin embargo, los compuestos **31** y **33**, con el sustituyente *p*-Me₂NC₆H₄, no son luminiscentes en agua, probablemente debido a su agregación (**Figura 5.15**).

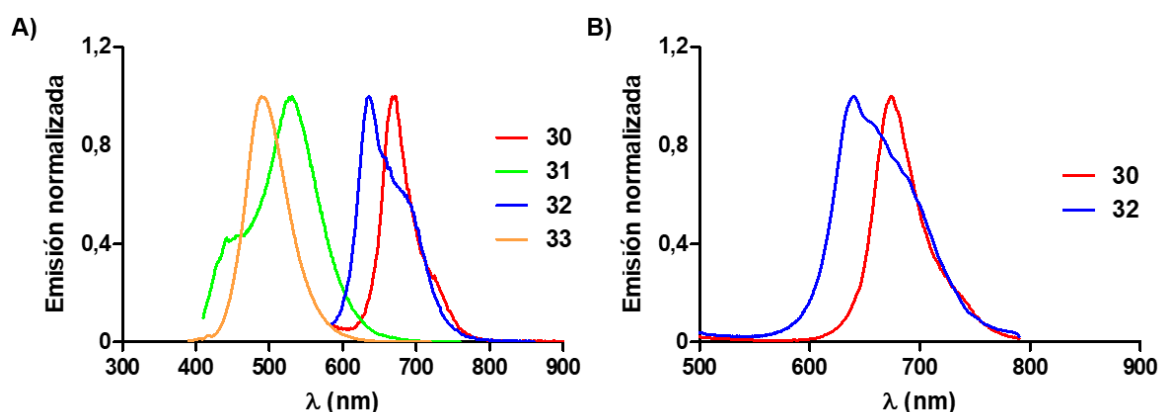


Figura 5.14. Espectros de emisión de los compuestos **30-33** (10 μM) en: **A)** acetonitrilo. λ_{ex} = 460 nm (**30**), 385 nm (**31**), 440 nm (**32**) y 370 nm (**33**); y **B)** agua (1 % DMSO). λ_{ex} = 405 nm.

En la **Tabla 5.8** se resumen los datos de emisión (longitud de onda de excitación, de emisión y tiempos de vida) de los complejos de este capítulo.

Tabla 5.8. Longitudes de onda de excitación (λ_{ex}), de emisión (λ_{em}) y tiempo de vida (τ_{em}) de los compuestos **30-33** en acetonitrilo.

Compuesto	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	τ_{em} (μs) ^a
30	460	672	1,02
31	385	531	n.d.
32	440	636	1,01
33	370	489	n.d.

^aTiempo de vida medido en ausencia de oxígeno. n.d.: no determinado.

A continuación, se evaluaron los efectos de emisión inducida por agregación (AIE) y extinción causada por agregación (ACQ) de los compuestos de Ir(III) en mezclas de DMSO/agua con fracciones volumétricas variables de agua (fw). En las **Figura 5.15.B** y **A4.45** se muestra que los compuestos **31** y **33**, que contienen el grupo dimetilamino, muestran propiedades ACQ clásicas, mientras que los compuestos **30** y **32**, con el sustituyente trifluorometilo, exhiben características ópticas típicas de AIE,²⁷ alcanzando la intensidad máxima de emisión con un 90% de agua. Este fenómeno podría indicar que los complejos **30** y **32** serían buenos agentes de diagnóstico, ya que podrían resultar emisores en el medio celular.

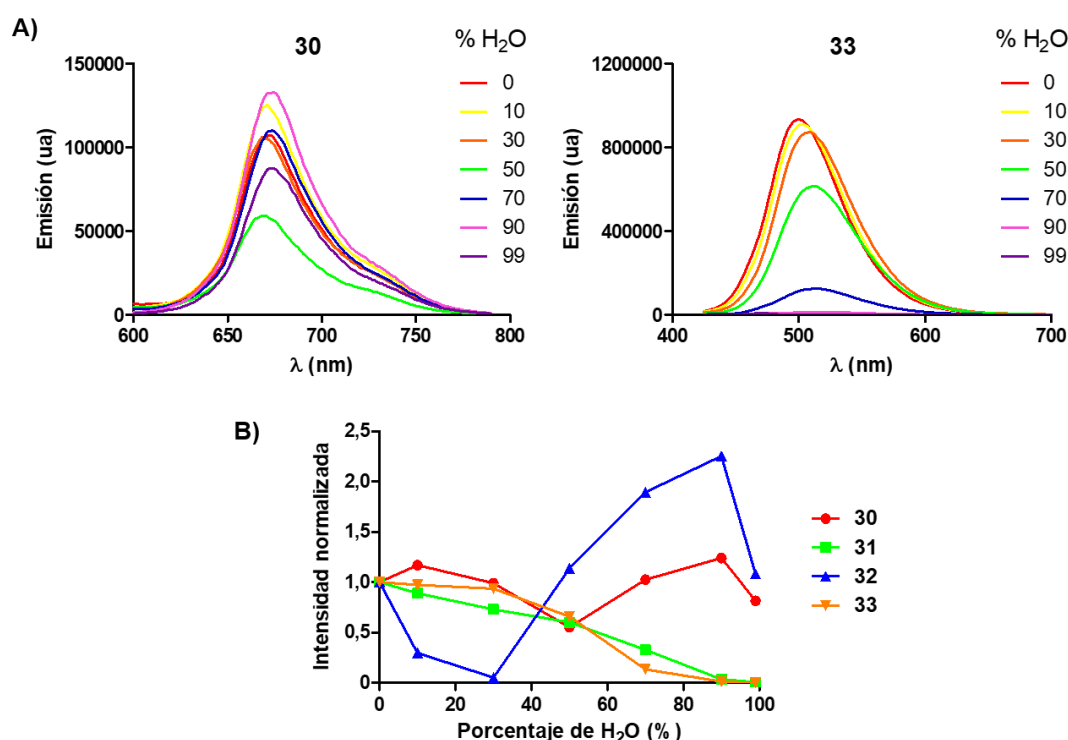


Figura 5.15. A) Espectros de emisión de los compuestos **30** y **33** (10 μ M) en distintos porcentajes de agua. **B)** Emisión normalizada en los máximos de emisión de **30-33** en función del porcentaje de agua.

5.2.6. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

Tras completar la caracterización estructural y fotofísica de los compuestos, se procedió a realizar estudios de estabilidad y fotoestabilidad antes de evaluar sus propiedades biológicas. La estabilidad de los compuestos en la oscuridad se verificó tanto en DMSO como en RPMI (5 % DMSO) a temperatura ambiente y a 37 $^{\circ}$ C, respectivamente. Para ello, se registraron los espectros de absorción de los compuestos (10 μ M) a tiempo inicial y tras 48 h de incubación. Todos los compuestos resultaron estables en las condiciones ensayadas, ya que sus espectros de absorción permanecieron inalterados (**Figura 5.16** para el compuesto **30** y **Figuras A4.46-A4.47** para los compuestos **31-33**).

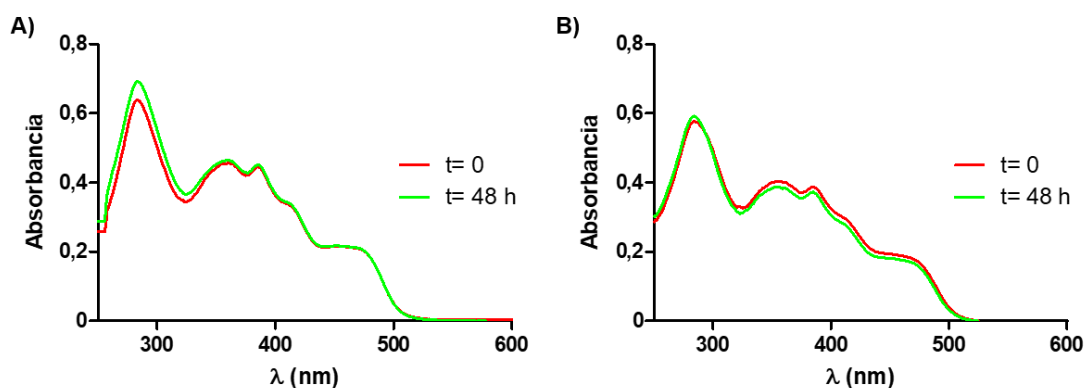


Figura 5.16. Espectros de absorción de **30** en: **A)** DMSO a tiempo 0 y tras 48 h a t.a.; **B)** en RPMI (5% DMSO) a tiempo 0 y tras 48 h a 37 °C.

Por su parte, para comprobar la fotoestabilidad de los compuestos y poder ser estudiados como PS para PDT, se registraron los espectros de absorción UV/Vis a tiempo inicial y tras 2 h de irradiación con luz azul (465, 4,0 mW/cm²). Además, la fotoestabilidad de los compuestos **30-33** se monitorizó mediante ¹H-RMN en DMSO-*d*₆ (1 mM) a tiempo inicial y tras 6 h de irradiación. En resumen, los resultados demostraron que todos los compuestos eran estables en las condiciones ensayadas, ya que tanto los espectros de absorción como los de ¹H-RMN permanecieron inalterados (**Figura 5.17** para **30** y **Figuras A4.49-A4.51** para **31-33**).

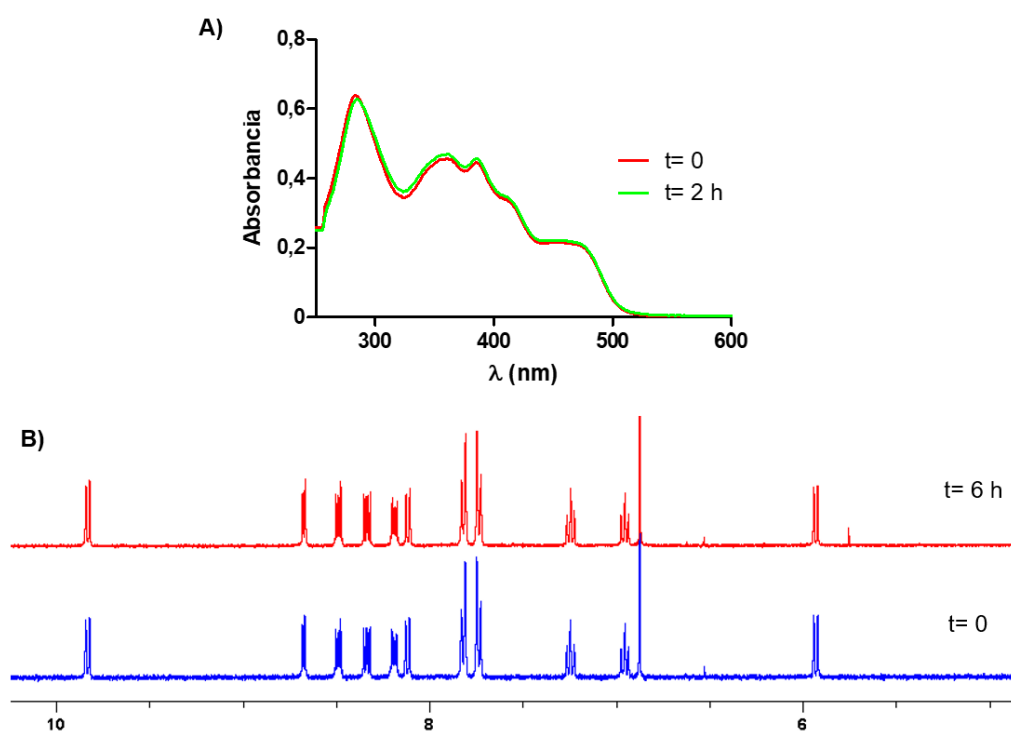


Figura 5.17. Estudios de fotoestabilidad de **30** en DMSO. **A)** Espectros de absorción a tiempos 0 y tras 2 h de irradiación (465 nm, 4,0 mW/cm²). **B)** ¹H-RMN en DMSO-*d*₆ a tiempos 0 y tras 6 h de irradiación (465 nm, 4,0 mW/cm²).

5.2.7. Estudios del mecanismo de PDT en medio libre de células

A continuación, se realizaron distintos ensayos para evaluar la capacidad de los compuestos **30-33** de generar ROS tras ser irradiados con luz a una longitud de onda específica. Este paso es crucial ya que, como se mencionó anteriormente, la generación de ROS es fundamental para que un compuesto actúe como PS en PDT.

Fotooxidación del NADH

En primer lugar, se evaluó la capacidad de los compuestos **30-33** para generar ROS al ser irradiados mediante un ensayo de fotooxidación de NADH. El NADH es un cofactor esencial en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial, ayudando a producir ATP y mantener el equilibrio redox celular. Este equilibrio redox es vital para la regulación de biomoléculas y diversos procesos metabólicos. En las células cancerosas, la oxidación de NADH a NAD^+ puede alterar este equilibrio, llevando a la muerte celular.²⁸⁻³⁰ Cabe mencionar que el NADH presenta un banda de absorción a $\lambda = 339 \text{ nm}$, mientras que el NAD^+ la presenta a $\lambda = 259 \text{ nm}$. Para llevar a cabo el experimento se prepararon disoluciones de los compuestos **30-33** ($1 \mu\text{M}$) y de NADH ($100 \mu\text{M}$) en PBS (5 % DMF). Posteriormente, se registraron los espectros de absorción del NADH tras irradiar la disolución con luz azul (465 nm , $4,0 \text{ mW/cm}^2$) a distintos intervalos de tiempo.

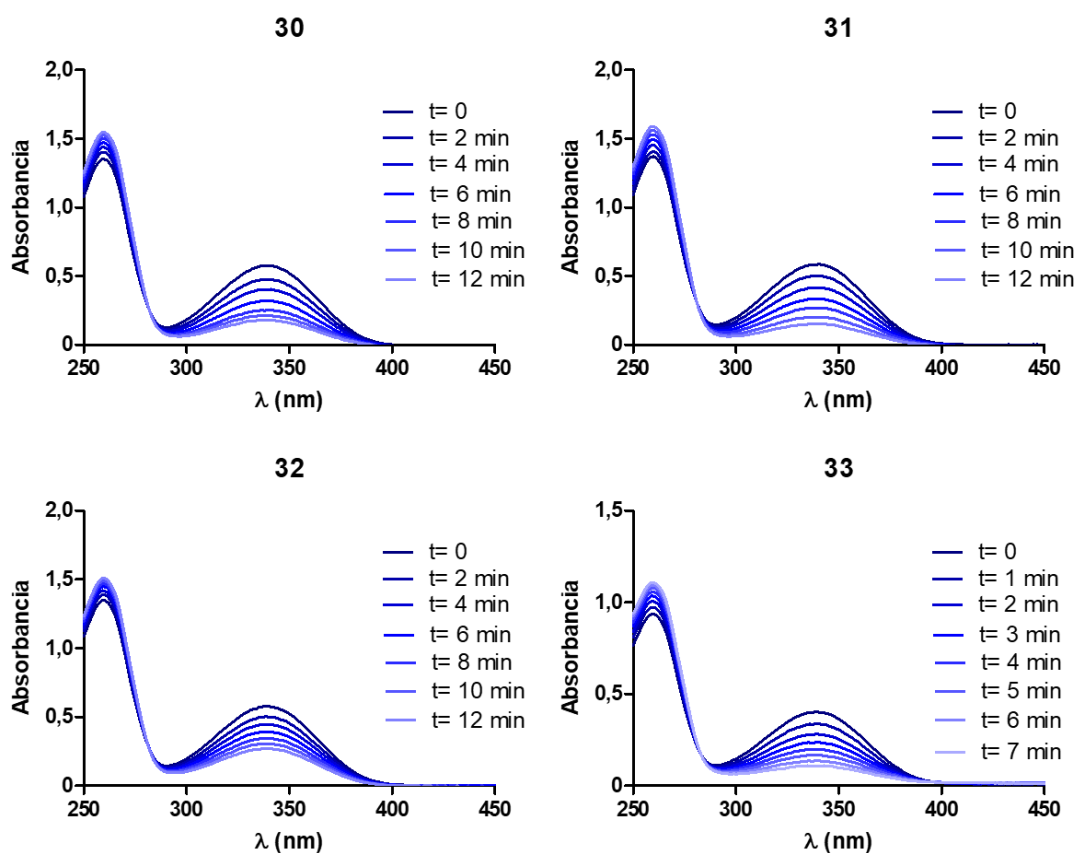


Figura 5.18. Fotooxidación del NADH en presencia de los compuestos **30-33** y tras irradiación con luz azul (465 nm , $4,0 \text{ mW/cm}^2$).

En la **Figura 5.18** se puede observar que todos los compuestos son capaces de producir ROS a una concentración muy baja tras su irradiación. Sin embargo, en ausencia de luz, los espectros UV/Vis del NADH permanecieron inalterados (**Figuras A4.52**). Como control negativo también se registró el espectro de absorción del NADH antes y después de 1 h de irradiación (**Figura A4.53**).

La fotooxidación del NADH por los compuestos **30-33** también se evaluó con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²), ya que todos presentaban absorción en esta región del espectro. Además, el compuesto **31** también se investigó con luz roja (620 nm, 15 mW/cm²). En las **Figuras 5.19** y **5.20** se observa que todos los compuestos fueron capaces de generar ROS bajo estas condiciones, destacando el compuesto **31** como el más eficaz en la fotooxidación del NADH con luz verde (520 nm), lo que concuerda con su mayor absorbancia a la longitud de onda de irradiación.

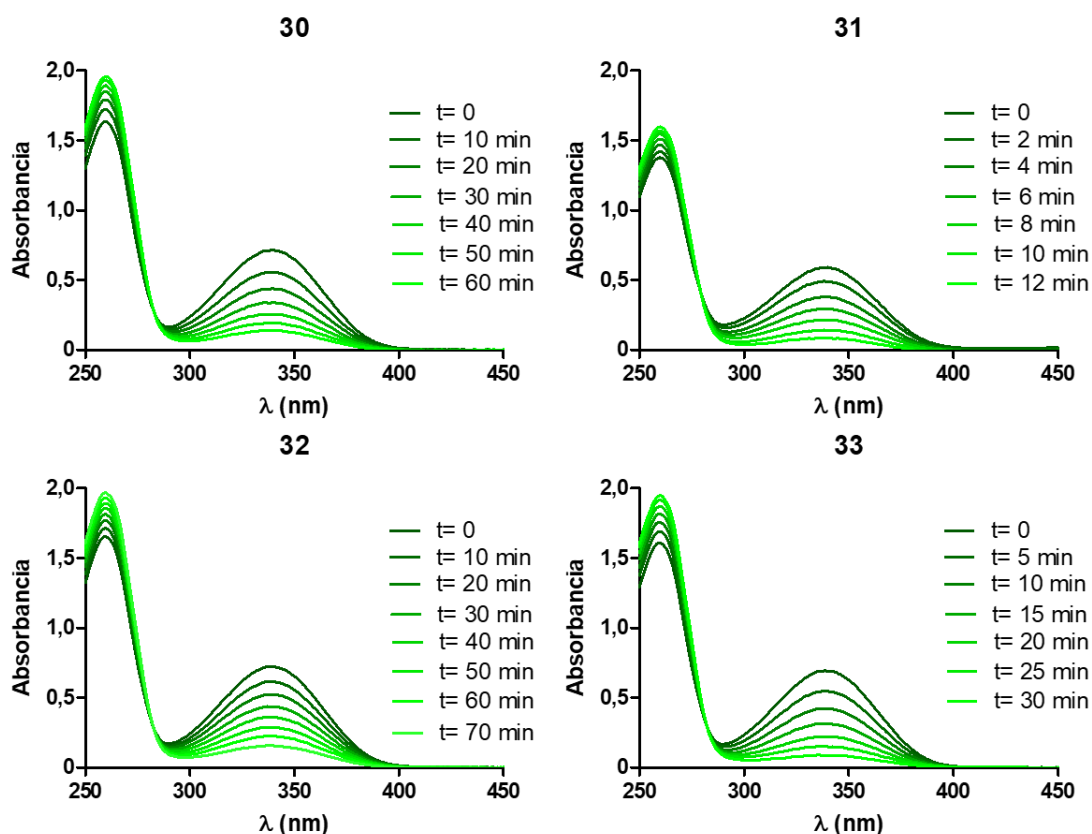


Figura 5.19. Fotooxidación del NADH en presencia de los compuestos **30-33** tras irradiación de luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²).

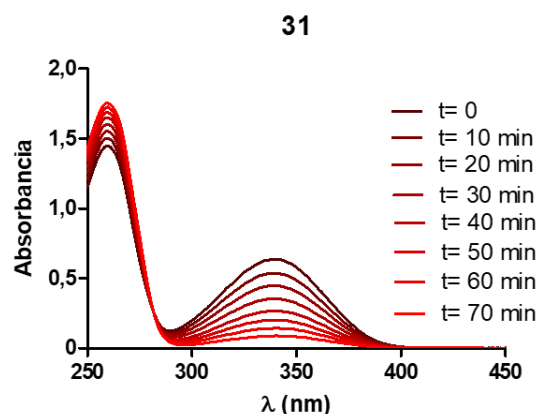


Figura 5.20. Fotooxidación del NADH en presencia del compuesto **31** tras la irradiación de luz roja (620 nm, 15 mW/cm²).

A partir de los cambios de absorbancia en $\lambda = 339$ nm, se calcularon los valores de la frecuencia de recambio (TOF, por sus siglas en inglés), definida como el número de moles de NADH que un mol de compuesto puede oxidar en un tiempo determinado. En la **Tabla 5.9** se recogen los valores de TOF de los compuestos en las condiciones ensayadas. Cabe destacar que la introducción del sustituyente dimetilamino mejora la capacidad de oxidar el NADH tras la irradiación con luz, en comparación con los derivados del grupo trifluorometilo. El compuesto **33** resultó ser el más activo y prometedor de la serie, con un valor de TOF de 403 h⁻¹.

Tabla 5.9. Valores de frecuencia de recambio (TOF) de los compuestos **30-33** en las condiciones ensayadas.

Compuesto	TOF (h ⁻¹)		
	$\lambda = 465$ nm ^a	$\lambda = 520$ nm ^b	$\lambda = 620$ nm ^c
30	307,3	18,2	n.d.
31	339,3	71,3	15,0
32	241,9	15,6	n.d.
33	403,1	38,9	n.d.

^aLa concentración de los compuestos es 1 μ M y la potencia de la luz 4,2 mW/cm². ^bLa concentración de los compuestos es 5 μ M y la potencia de la luz 2,0 mW/cm². ^cLa concentración de los compuestos es 5 μ M y la potencia de la luz 15 mW/cm². n.d.: no determinado.

Mecanismo tipo II. Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete (¹O₂)

Tras demostrar la capacidad de los compuestos para fotocatalizar la oxidación del NADH, se investigó el tipo específico de ROS que producen en medios libres de células. En primer lugar, se evaluó la capacidad de los compuestos **30-33** para generar oxígeno singlete, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4.^{31,32} Para ello, se prepararon

disoluciones de DPBF (50 μM) y los complejos, a concentración conocida ($A_{465} \sim 0,056$), en acetonitrilo. Al irradiar el DPBF con luz azul ($0,5 \text{ mW/cm}^2$), en presencia de los compuestos, se observó una disminución de la banda de absorción a 411 nm, atribuida a la apertura del anillo, como resultado de la generación de oxígeno singlete. En la **Figura 5.21** se muestran los espectros de absorción del DPBF en presencia de los compuestos **30-33** tras la irradiación. Representando la absorbancia normalizada del DPBF a 411 nm frente al tiempo de irradiación (**Figura 5.22**) se obtienen rectas cuya pendiente permite calcular el rendimiento cuántico de oxígeno singlete. Al igual que en el capítulo anterior, la referencia utilizada es el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, cuyo valor de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete es de 0,57 (**Figura A4.54**).¹⁷

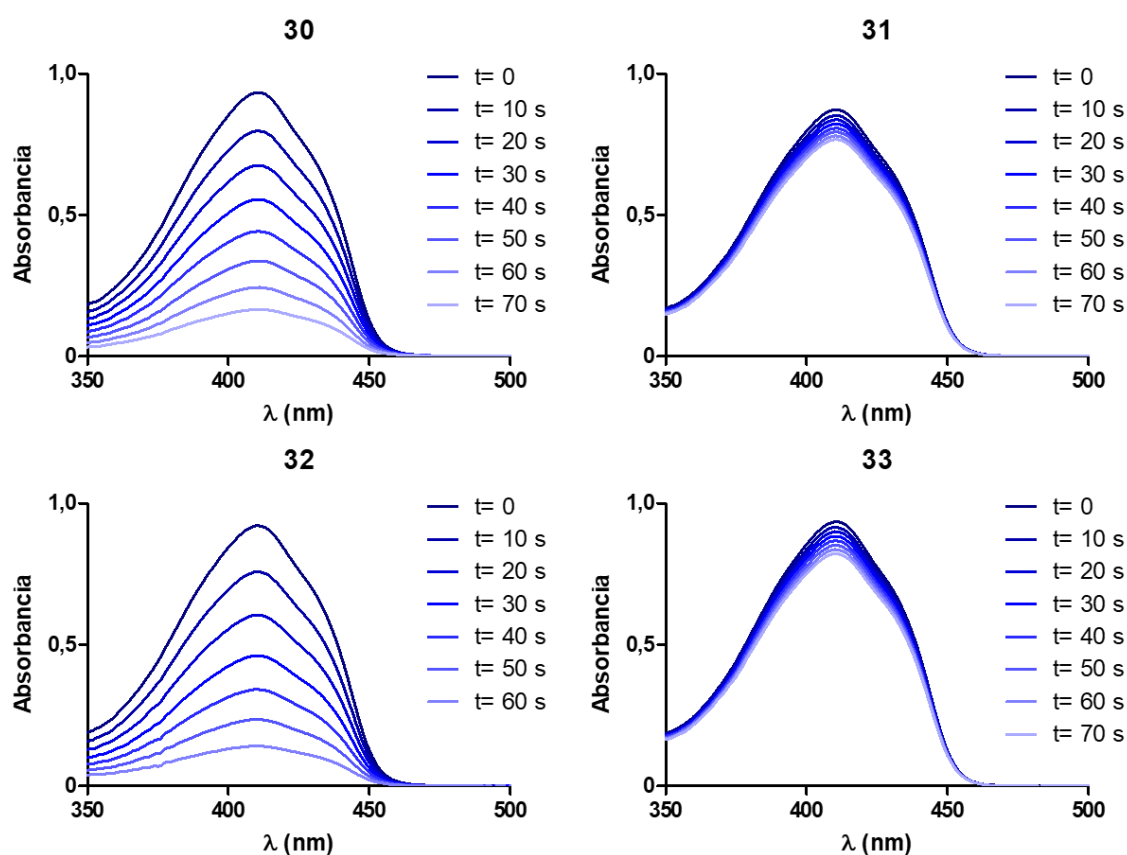


Figura 5.21. Espectro de absorción UV/Vis del DPBF en acetonitrilo en presencia de los complejos **30-33** tras la irradiación con luz azul (465 nm, $0,5 \text{ mW/cm}^2$).

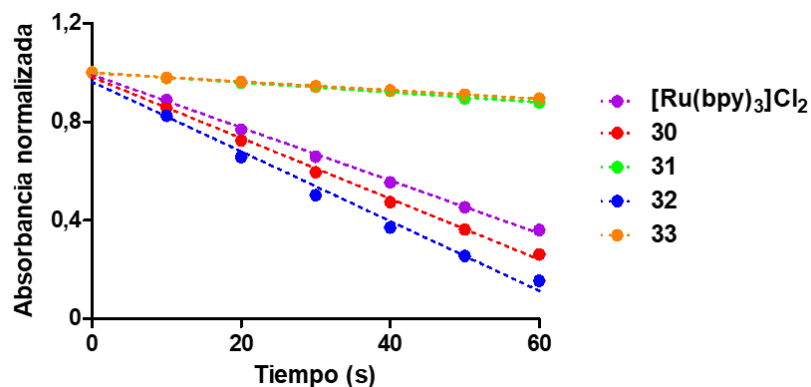


Figura 5.22. Representación de la absorbancia normalizada a 411 nm frente al tiempo de irradiación del DPBF en presencia de **30-33** y la referencia [Ru(bpy)₃]Cl₂ con luz azul (465 nm, 0,5 mW/cm²).

Finalmente, para determinar los rendimientos cuánticos se utilizó la **Ecuación 4.1**. Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 5.10**, donde se observa que los compuestos que contienen el grupo *p*-CF₃C₆H₄ (**30** y **32**) muestran un rendimiento cuántico de oxígeno singlete medio-alto (~65 %), mientras que los que presentan el grupo *p*-Me₂NC₆H₄ exhiben un rendimiento cuántico menor (~10 %). Este fenómeno, ya observado en los compuestos del Capítulo 4, demuestra nuevamente que la presencia de un sustituyente u otro influye drásticamente en la capacidad de los complejos para generar ROS específico de tipo II.

Tabla 5.10. Valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

Complejo	Rendimiento cuántico (Φ_{Δ})
30	0,63
31	0,10
32	0,69
33	0,09

Mecanismo tipo I. Generación de radicales hidroxilo ($\cdot$ OH)

Por otro lado, se investigó la capacidad de los compuestos para generar radicales hidroxilo, un tipo específico de ROS de tipo I, en PBS (5 % DMF), siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4.^{33,34} En la **Figura 5.23** se observa que, tras irradiar con luz azul en presencia de todos los compuestos sintetizados, aumenta la intensidad de fluorescencia de la HPF, lo que indica la generación de radicales hidroxilo. Como control negativo, se registró el espectro de emisión de la HPF tras irradiar con luz en ausencia de compuesto (**Figura A4.55**). Además, al representar la emisión normalizada respecto al tiempo de irradiación (**Figura 5.24**), se concluye que el compuesto **33** es el mayor productor de radicales hidroxilo en un medio libre de células, mientras que los compuestos

30-32 muestran resultados similares. Cabe destacar que **33** también es el más eficaz para oxidar el NADH en presencia de luz; sin embargo, su baja acumulación celular (**Tabla 5.14**) disminuye su efectividad como fotosensibilizador en células HeLa.

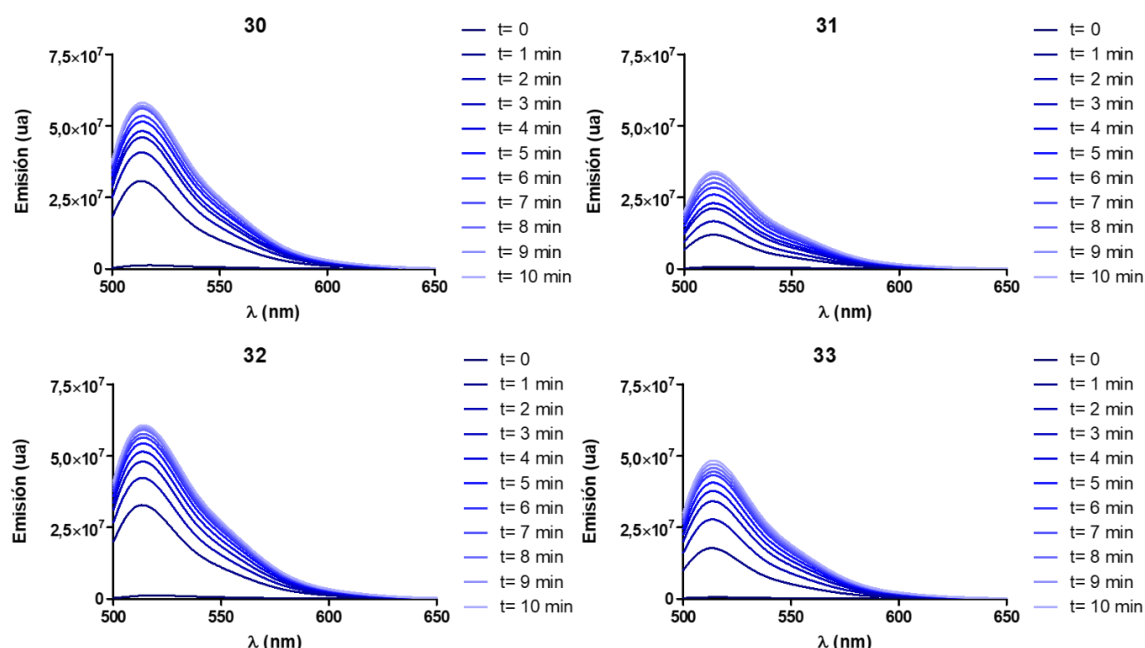


Figura 5.23. Espectro de emisión de la HPF en presencia de los complejos **30-33** tras la irradiación con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo.

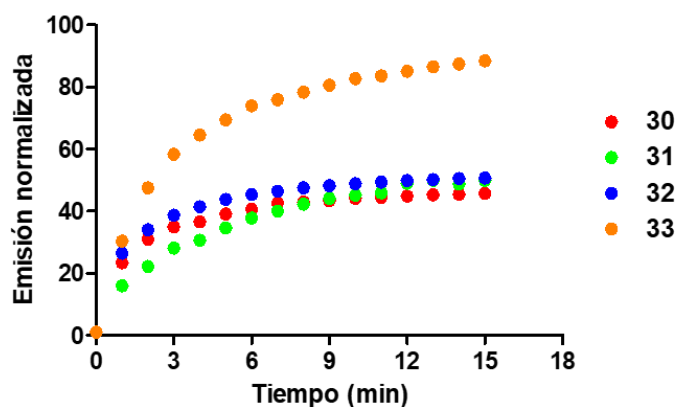


Figura 5.24. Espectro de emisión normalizada de la HPF a 514 nm en presencia de los complejos **30-33** tras la irradiación con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²) en PBS (5 % DMF) en un intervalo de tiempo.

5.3. Propiedades biológicas

Uno de los objetivos del presente capítulo fue evaluar el potencial de los nuevos compuestos de Ir(III) como fotosensibilizadores en PDT. Para ello, se llevaron a cabo estudios *in vitro*, los cuales fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Viktor Brabec, del Instituto de Biofísica de la República Checa.

5.3.1. Viabilidad celular

La actividad de los complejos **30-33** en presencia de luz se evaluó en células HeLa, A375 y HCT116 (**Tabla 5.11**). Los compuestos de iridio mostraron un efecto fototóxico significativo en las tres líneas celulares, con valores de IC_{50} en el rango submicromolar (**30** y **31**) o micromolar (**32** o **33**). En condiciones de oscuridad, no mostraron efecto sobre la viabilidad y la proliferación de las células HeLa y HCT116 ($>50 \mu M$). Por su parte, las células A375, aunque fueron más sensibles a **30** y **31**, dieron lugar a índices de fototoxicidad (PI) relevantes (**Tabla 5.12**). Además, se determinaron los valores de IC_{50} en células sanas de próstata hTERT EP156T y de pulmón MRC5 (**Tabla 5.11**), demostrando una actividad nula o muy baja de los compuestos frente a la proliferación de dichas células durante una exposición prolongada (48 h).

Tabla 5.11. Valores de IC_{50} (μM) obtenidos para células tratadas con los complejos de iridio, irradiadas con luz azul (1 h, $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 420 nm, $5,8 \pm 0,2$ mW/cm²) o sin irradiar.^a

Comp.	HeLa		HCT116		A375		hTERT	MRC5
	Osc.	Luz azul	Osc.	Luz azul	Osc.	Luz azul	Osc. ^b	Osc. ^b
30	>50	$0,31 \pm 0,02$	>50	$0,30 \pm 0,03$	43	$0,18 \pm 0,05$	39 ± 2	>50
31	>50	$0,71 \pm 0,1$	>50	$0,77 \pm 0,07$	47	$0,4 \pm 0,2$	47 ± 3	>50
32	>50	$1,22 \pm 0,09$	>50	$1,6 \pm 0,4$	>50	$0,9 \pm 0,1$	>50	>50
33	>50	$3,7 \pm 0,8$	>50	$3,4 \pm 0,9$	>50	$2,6 \pm 0,4$	>50	>50
CDDP	27 ± 3	23 ± 4	27 ± 7	19 ± 4	15 ± 2	14 ± 1	n.d.	$6,0 \pm 0,7$

^aLos datos se expresan como valores medios $\pm$ DE, $n \geq 6$. ^bLas células se incubaron con los compuestos durante 48 h en oscuridad. n.d.: no determinado.

Tabla 5.12. Valores de índices de fototoxicidad (PI).^a

Compuesto	HeLa	HCT116	A375
30	$>161,3$	$>166,7$	238,9
31	$>70,4$	$>64,9$	117,5
32	$>41,0$	$>31,3$	$>55,6$
33	$>13,5$	$>14,7$	$>19,2$
CDDP	1,2	1,4	1,1

^aLos PIs se han calculado como IC_{50} (oscuridad)/ IC_{50} (tras la irradiación).

Por otro lado, se determinó el IC₅₀ de **31** en células HeLa tras irradiar con luz verde o roja. En la **Tabla 5.13** se puede observar que el compuesto **31** es fotoactivable tanto con luz verde como roja, aunque su fotoactividad es menor en comparación con la azul, lo cual concuerda con la menor absorción del complejo en esas longitudes de onda. Pese a eso, los valores de IC₅₀ se encuentran en rango micromolar, lo que confirma la posibilidad de utilizar longitudes de onda más largas para activar este complejo.

Tabla 5.13. Valores de IC₅₀ y PI obtenidos mediante ensayo MTT para células HeLa tratadas con el compuesto **31** e irradiadas con luz azul, verde o roja^a.

Tipo de luz	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Potencia (mW/cm ²)	IC ₅₀ (μM)	PI ^b
Azul	420	5,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	70,4
Verde	545	2,3 ± 0,1	4,3 ± 0,8	11,6
Roja	613	2,0 ± 0,1	8,5 ± 0,9	5,9

^aLos datos se expresan como valores medios ± DE, n ≥ 4. ^aLos PIs se han calculado como IC₅₀ (oscuridad)/IC₅₀ (tras la irradiación).

A continuación, se realizaron experimentos adicionales para describir el mecanismo de acción de los compuestos. Se seleccionaron las células HeLa con fines comparativos,¹⁰ y se eligió el compuesto **30** como representante de la serie, ya que mostró los mayores índices de fototoxicidad en las tres líneas celulares ensayadas.

5.3.2. Acumulación intracelular

Como se mencionó en capítulos anteriores, un requisito esencial para que un fármaco ejerza un efecto biológico es su capacidad para penetrar en las células y acumularse en su interior. Para evaluar la captación y acumulación de los complejos, se determinó el contenido de iridio intracelular mediante ICP-MS en las células HeLa tratadas con los compuestos (3 μM) durante 2 h. Los complejos se pueden ordenar según su captación celular de la siguiente manera: **30** ≈ **31** > **32** > **33** (**Tabla 5.14**), lo cual se puede correlacionar muy bien con su fotoeficacia (**Tabla 5.11**).

Tabla 5.14. Acumulación de **30-33** en las células HeLa. Las células se trataron con los complejos investigados (3 μM, 2 h, oscuridad, 37 °C).

Compuesto	ng Ir/10 ⁶ células ^a
30	138 ± 13
31	127 ± 6
32	100 ± 3
33	30 ± 5

^aLos datos se expresan como valores medios ± DE, n = 3.

Al comparar los dos derivados de benzotiazol se observa que tanto la acumulación del compuesto **30** como su fotoeficacia son superiores a las del **31**, que contiene el grupo dimetilamino. Se encontraron observaciones similares al comparar los dos derivados de benzimidazol (**32** y **33**). Por otra parte, la fotoactivación de los complejos que contienen benzotiazol (**30** y **31**) en células HeLa fue mayor que la de los que contienen benzimidazol (**32** y **33**). Así, el complejo **30** se presenta como el candidato más prometedor de la serie para su estudio como PS en PDT.

5.3.3. Producción intracelular de ROS

Recientemente se ha demostrado que varios compuestos de iridio con estructuras similares a las de **30-33** presentan fototoxicidad, lo que se atribuye a su capacidad para inducir la producción de ROS bajo irradiación de luz azul.^{10,11} Con el fin de comprobar si los compuestos **30-33** también generan ROS a nivel intracelular, se empleó el ensayo CellROX, donde se determinó la intensidad de fluorescencia a 660 nm para medir la concentración de ROS en células HeLa. En la **Figura 5.25** se puede observar que, tras la irradiación, el nivel de ROS intracelular en las células tratadas con los compuestos aumentó significativamente, siendo los compuestos **30** y **33** el más y el menos efectivo, respectivamente. Estos resultados se correlacionan con los datos de fototoxicidad (**Tabla 5.11**), lo que sugiere que la fotoactividad de los compuestos se atribuye a la generación de ROS intracelular y a su capacidad para acumularse en las células (**Tabla 5.14**).

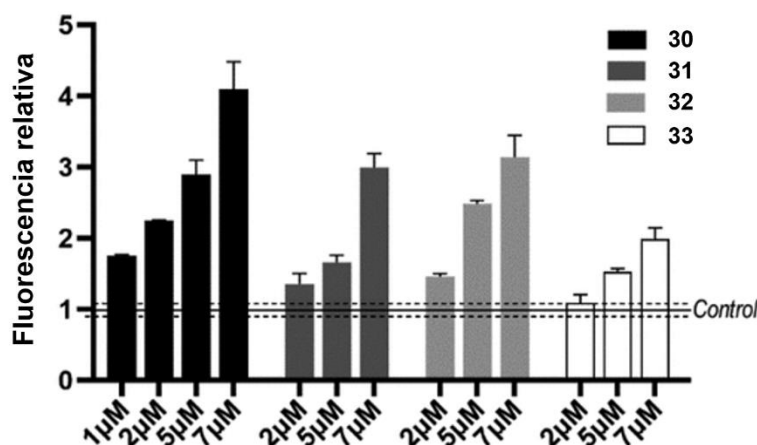


Figura 5.25. Generación de ROS en las células HeLa pretratadas con **30-33** e irradiadas, según lo detectado por el ensayo CellROX. Los datos se normalizaron para las células irradiadas de control (sin tratar) y se representan como valores medios $\pm$ DE de dos medidas independientes.

5.3.4. Mecanismo de muerte celular

A continuación, se investigó el tipo de muerte celular mediante tinción dual con yoduro de propidio y anexina V conjugada a Pacific Blue, 24 h después de la irradiación de las células. La **Figura 5.26** muestra que el tratamiento de células HeLa con los

compuestos, seguido de irradiación, aumentó significativamente la población de células anexina V positivas/yoduro de propidio negativas (cuadrante inferior derecho) y las células en las últimas etapas de la muerte (positivas para ambos marcadores). Al emplear concentraciones equitóxicas, el compuesto **30** demostró ser significativamente más eficaz en la eliminación de células, en comparación con los otros tres compuestos, logrando una mortalidad del 83 % de la población celular. Para que el compuesto **30** presentara una efectividad similar a la de los complejos **31** y **32** fue necesario utilizar el compuesto **30** a una concentración inferior ($0,18 \mu\text{M}$) (**Figura 5.26C**). Estos resultados evidencian una clara diferencia en la eficacia de los complejos para inducir la muerte en células cancerosas, siendo el compuesto **30** el más rápido en actuar.

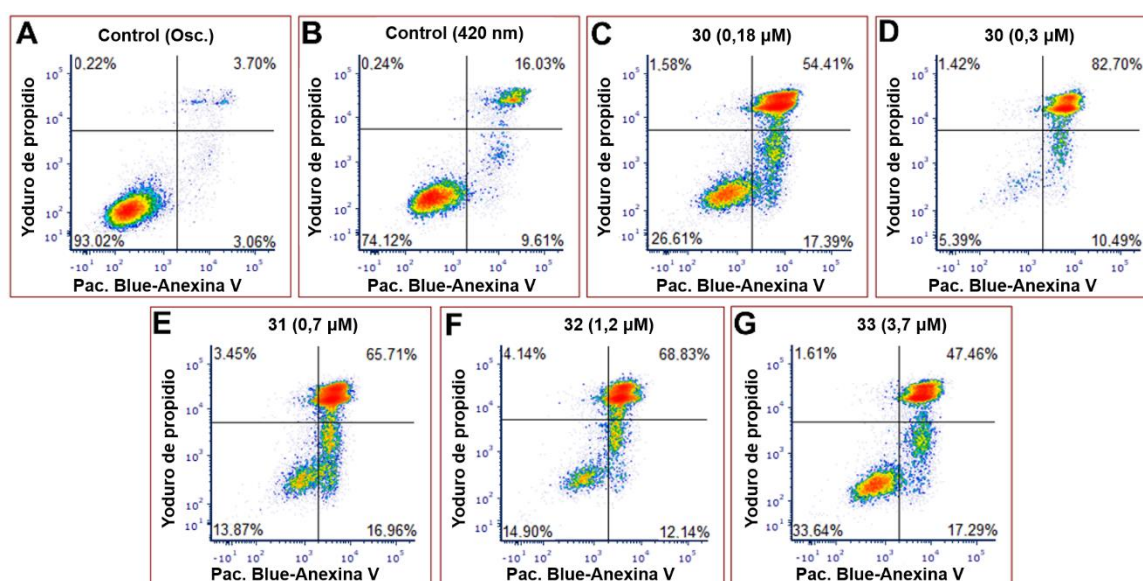


Figura 5.26. Detección del modo de muerte celular mediante tinción con anexina V y yoduro de propidio, utilizando citometría de flujo. Las células HeLa se incubaron durante 1 h con la concentración equitóxica de complejos de Ir (IC_{50} , 72 h), se irradiaron durante 1 h y, a continuación, se recuperaron durante 24 h en medios libres de compuestos. También se incluyeron en el experimento células de control no tratadas (no irradiadas e irradiadas).

La apoptosis se caracteriza por un cambio en la estructura de la membrana plasmática consistente en la exposición superficial de la fosfatidilserina, mientras que la integridad de la membrana permanece intacta. La externalización de la fosfatidilserina se detecta gracias a su afinidad por la anexina V.³⁵ Sin embargo, también se han encontrado ejemplos en los que la fosfatidilserina se expone en la superficie de las células cancerosas antes de que la membrana celular se vea afectada, lo que sugiere que esta característica no es exclusiva de la apoptosis.^{36,37} Con el fin de esclarecer el tipo de muerte celular, se realizaron experimentos adicionales para distinguir entre la apoptosis y la oncosis.

5.3.5. Morfología celular y activación de la caspasa-3

La apoptosis y la oncosis comparten varias características, como la translocación de la fosfatidilserina a la superficie exterior y fragmentación del ADN.³⁷ Por ello, las alteraciones morfológicas inducidas en las células tratadas proporcionan una evidencia inequívoca del modo de muerte celular.³⁸ Como se mencionó en el Capítulo 4, la oncosis se caracteriza por: la inflamación celular, la cariólisis, la aglutinación de la cromatina nuclear, la formación de ampollas citoplasmáticas libres de orgánulos y el aumento de la permeabilidad de la membrana.^{39,40} A diferencia de la oncosis, la apoptosis depende de la caspasa-3 y se acompaña de la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos y la gemación.⁴¹ En las **Figuras 5.27** y **A4.56** se observa la alteración morfológica de las células con los compuestos **30-33** (IC_{50}) irradiados. La característica más destacada fue la vacuolización del citoplasma. Las células aparecen hinchadas y redondeadas, y carecen de orgánulos (**Figura 5.27B-E**) y, además, se evidencia la formación de ampollas en el citoplasma (**Figura 5.27F**). Por lo tanto, la morfología celular sugiere que, tras la irradiación, los complejos inducen una muerte celular similar a la oncosis.

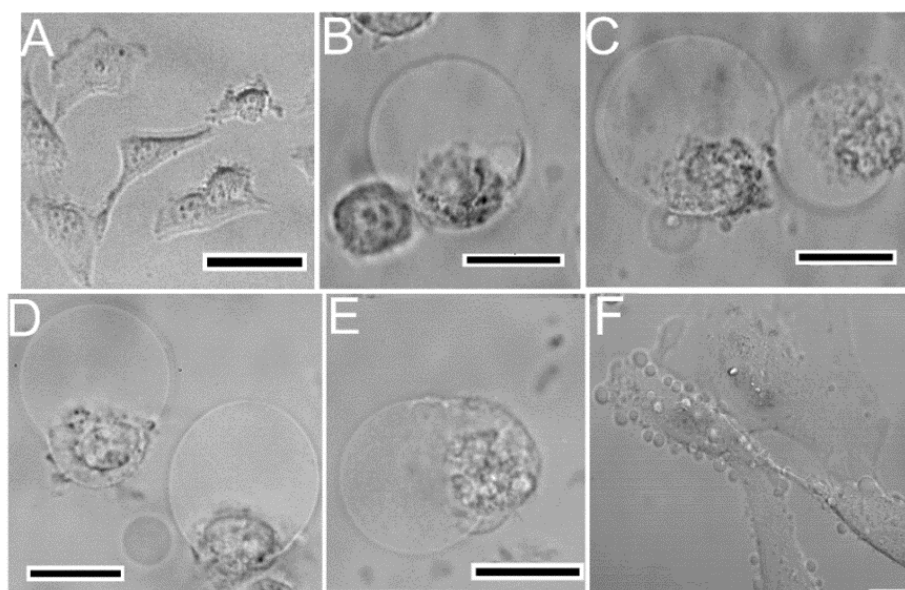


Figura 5.27. Morfología de las células HeLa (A-E). Las células no se trataron (A) o se trataron durante 1 hora con **30** (B, 0,3 μ M), **31** (C, 0,7 μ M), **32** (D, 1,2 μ M) o **33** (E, 3,7 μ M), se irradiaron y se incubaron en medio libre de compuestos durante 2 h. Las barras de escala son 50 μ m. (F) Imagen confocal de la membrana plasmática. Las células HeLa se incubaron con **30** (0,3 μ M) y la imagen se tomó tras 15 min de irradiación. La barra de escala es 15 μ m.

A continuación, se realizó un ensayo de activación de la caspasa-3 utilizando el reactivo CellEvent®Caspase 3/7 para determinar si la apoptosis es el mecanismo de muerte celular. Las células HeLa tratadas con los compuestos **30-33** ($IC_{50,72h}$) se mantuvieron en la oscuridad o se irradiaron con luz (**Figura A4.57**). Tras 2 h de

recuperación, se tiñeron con el reactivo de detección y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron una cantidad insignificante de células apoptóticas en las células tratadas, mientras que el tratamiento con estaurosporina aumentó significativamente. Por lo tanto, se concluye nuevamente que la apoptosis no es el mecanismo de muerte celular.

5.3.6. Expresión de porimina y permeabilidad de la membrana plasmática

Como se mencionó en el Capítulo 4, la porimina es responsable de la permeabilidad anormal de la membrana y la inflamación celular durante la oncosis.³⁹ Sin embargo, la **Figura 5.28.A** muestra que la expresión de porimina no aumentó significativamente tras la incubación e irradiación de las células con los compuestos **30-33**. Esto podría deberse al corto tiempo de exposición (1 h de irradiación y 2 h de recuperación), insuficiente para activar la expresión y reubicación de las proteínas recién formadas de la membrana celular. No obstante, durante este corto periodo se observó la hinchazón celular (**Figura 5.27**), lo que sugiere que dicha hinchazón está provocada por un mecanismo independiente de las poriminas.

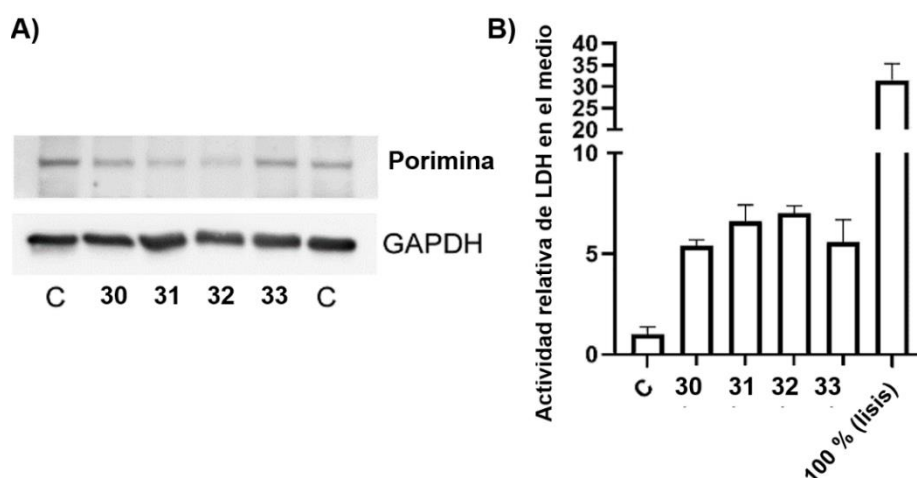


Figura 5.28. A) Análisis Western Blot del contenido celular de porimina. **B)** Resultados del ensayo de fuga de LDH. Los datos representan una media y un intervalo de confianza del 95 % de dos experimentos independientes. Las células HeLa se incubaron con los complejos (IC_{50}), se irradiaron (1 h) y se dejaron recuperar en medio libre de compuestos (2 h).

Para investigar cómo se hincharon las células, se realizó un experimento adicional. Durante la oncosis la membrana celular se vuelve permeable,³⁹ y para evaluar esta permeabilidad, se realizó el ensayo de fuga de lactato deshidrogenasa (LDH), que mide la integridad de la membrana celular. Tras el tratamiento y la irradiación de las células, se observó un aumento significativo de las señales de LDH en los medios (aproximadamente de 5 a 8 veces, **Figura 5.28.B**), lo que indica un incremento en la permeabilidad de la membrana celular. Sin embargo, la membrana celular no se desintegró por completo,

como se observó al comparar con una muestra de células sometidas a lisis completa. Por lo tanto, el incremento del volumen celular puede estar relacionado con el aumento de permeabilidad de la membrana,⁸ inducido por el daño directo a esta como consecuencia de la fotoactividad de los compuestos de iridio.

5.3.7. Distribución intracelular

A continuación, se aprovecharon las propiedades fluorescentes de los compuestos **30** y **32** para revelar su localización intracelular. Las células HeLa se trataron con **30** y **32**, y se incubaron durante 5 h en la oscuridad. Posteriormente, se eliminaron los medios que contenían los complejos y las muestras se analizaron por microscopía confocal de barrido láser ($\lambda_{\text{máx}} = 405 \text{ nm}$, 450-750 nm). Los resultados mostraron que ambos complejos se localizan mayoritariamente fuera del núcleo celular, asociándose en su mayoría con el citoplasma (**Figura 5.29**, paneles **1A** y **2A**), por lo que el ADN no es su principal diana.

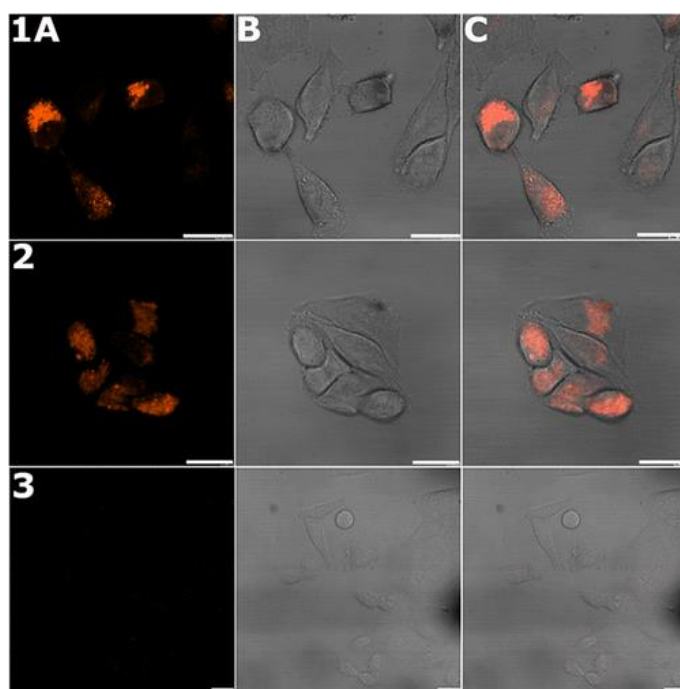


Figura 5.29. Localización celular de los compuestos en las células HeLa. Las muestras se trataron durante 5 horas con **30** (2,5 μM , panel 1) o **32** (2,5 μM , panel 2) en la oscuridad o no se trataron (panel 3). Canales: **A**) Señal de fluorescencia, **B**) campo claro, **C**) superposición del campo claro y los canales fluorescentes. Barra de escala: 20 μm .

El objetivo celular específico de los complejos se determinó mediante un ensayo de colocación utilizando LysoTracker y MitoTracker. En la **Figura 5.30** se observa que la señal del LysoTracker muestra una buena correlación con las de los compuestos, obteniéndose coeficientes de correlación de $0,76 \pm 0,07$ y $0,8 \pm 0,1$ para **30** y **32**, respectivamente (**Tabla A4.2**). Por su parte, la señal de MitoTracker muestra una correlación considerablemente menor (**Figura A4.58**).

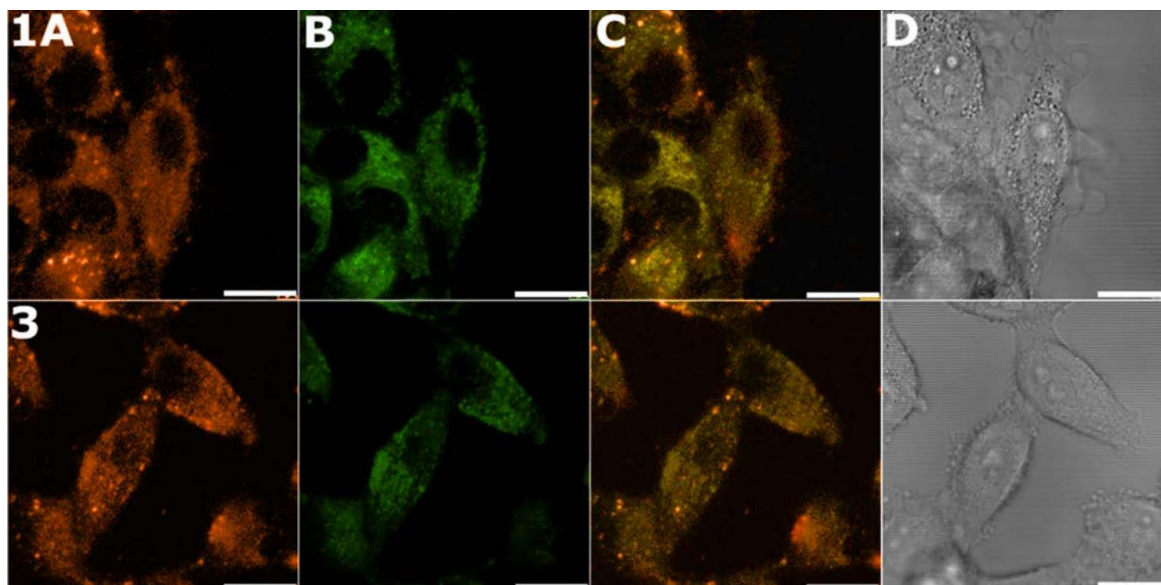


Figura 5.30. Colocalización de **30** (panel 1) y **32** (panel 3) con lisosomas en células HeLa determinada mediante microscopía confocal. Las células se trataron con 2 μM de los compuestos ensayados y se incubaron durante 3 h antes de la tinción con LysoTracker®Green. Canales: **A)** señal de fluorescencia procedente de los compuestos de iridio, **B)** fluorescencia de LysoTracker®, **C)** superposición de la fluorescencia procedente de los compuestos y de LysoTracker®, **D)** canal de campo claro. La barra de escala indica 20 μm .

Al realizar experimentos de colocalización, se observó que la intensidad y la ubicación de la señal originada con el LysoTracker cambiaban con el tiempo. Inicialmente, la señal se localizó en los lisosomas, debido a su acumulación en el ambiente ácido de los mismos (**Figura 5.31**, paneles "0 min"). Poco después de la irradiación, se produjo la translocación del LysoTracker desde los lisosomas al citosol, resultando en un patrón de tinción difusa en el citosol (**Figura 5.31**, paneles "15 min"). Este fenómeno fue característico de las células tratadas, ya que, en las no tratadas, la señal del LysoTracker permanecía en los lisosomas independientemente del tiempo de análisis. Esto puede interpretarse considerando que la irradiación de los compuestos provoca la permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación del contenido lisosomal desde el lumen al citosol, causando la acidificación del citoplasma. Esta conclusión se apoya en el hecho de que la monitorización de la liberación de sustancias acumuladas selectivamente en los lisosomas (como los LysoTrackers) es uno de los ensayos estándar para detectar la permeabilización de la membrana lisosomal.⁴²⁻⁴⁴

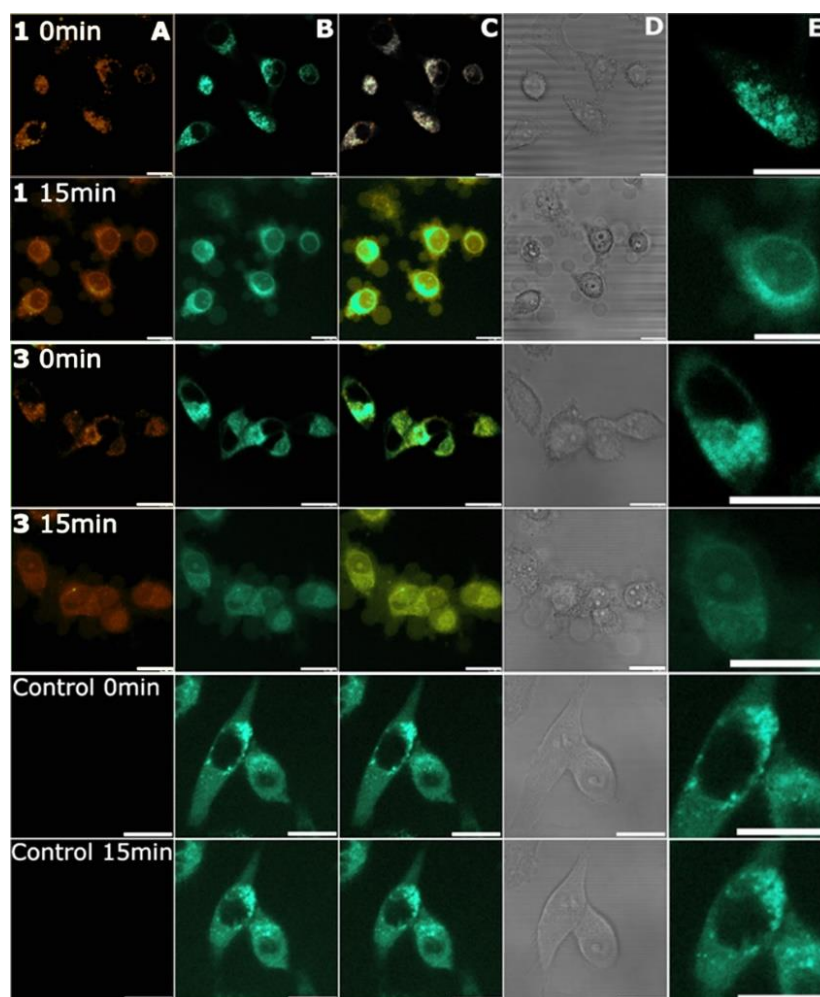


Figura 5.31. Seguimiento a intervalos de tiempo y colocación de los compuestos de iridio **30** (panel 1) y **32** (panel 3) con lisosomas en células HeLa, determinados mediante microscopía confocal. Las células se trataron con los compuestos (2 μ M) y se incubaron durante 3 h antes de teñir con LysoTracker. Canales: **A**) señal de fluorescencia procedente de los compuestos de iridio, **B**) señal de fluorescencia procedente de LysoTracker® Green DND-26, **C**) superposición de ambos canales de fluorescencia, **D**) canal de campo claro, **E**) detalles recortados del canal LysoTracker para una determinación más precisa de los cambios en la morfología lisosomal. La barra de escala indica 20 μ m.

Las células cancerosas en rápida división dependen de una función lisosomal eficaz. Durante la transformación y progresión del cáncer se producen cambios drásticos en el volumen, composición y distribución celular de los lisosomas, lo que promueve el crecimiento invasivo de los tumores,⁴⁵ haciendo que las células cancerosas sean más sensibles a la alteración de los lisosomas. Además, las células cancerosas resistentes a la apoptosis aún pueden sufrir muerte celular lisosomal.⁴⁵ Por lo tanto, el ataque a los lisosomas y la inducción de la muerte celular dependiente de lisosomas representan estrategias terapéuticas prometedoras para el tratamiento del cáncer.^{42,46–48} Desde este punto de vista, los compuestos ofrecen un potencial interesante, principalmente porque la desintegración de los lisosomas y los efectos celulares subsiguientes pueden ser desencadenados explícitamente por la luz en el lugar del tumor.

5.3.8. Efecto sobre los esferoides 3D

Los cultivos celulares tridimensionales (3D) se consideran un modelo más representativo para la evaluación de fármacos contra el cáncer.^{49–51} Los efectos de los compuestos **30** y **32** en cultivos 3D se evaluaron en células HeLa. Los esferoides se trataron con los compuestos **30** o **32** durante 5 h, se lavaron, se transfirieron a placas confocales y se irradiaron con láser de 405 nm (1 mW) durante 5 min o se mantuvieron en la oscuridad. Posteriormente, los esferoides se cultivaron durante otras 24 h y se tiñeron con calceína AM y yoduro de propidio. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal y se analizaron para determinar la fluorescencia del yoduro de propidio como una medida de la proporción de células muertas en cada esferoide.

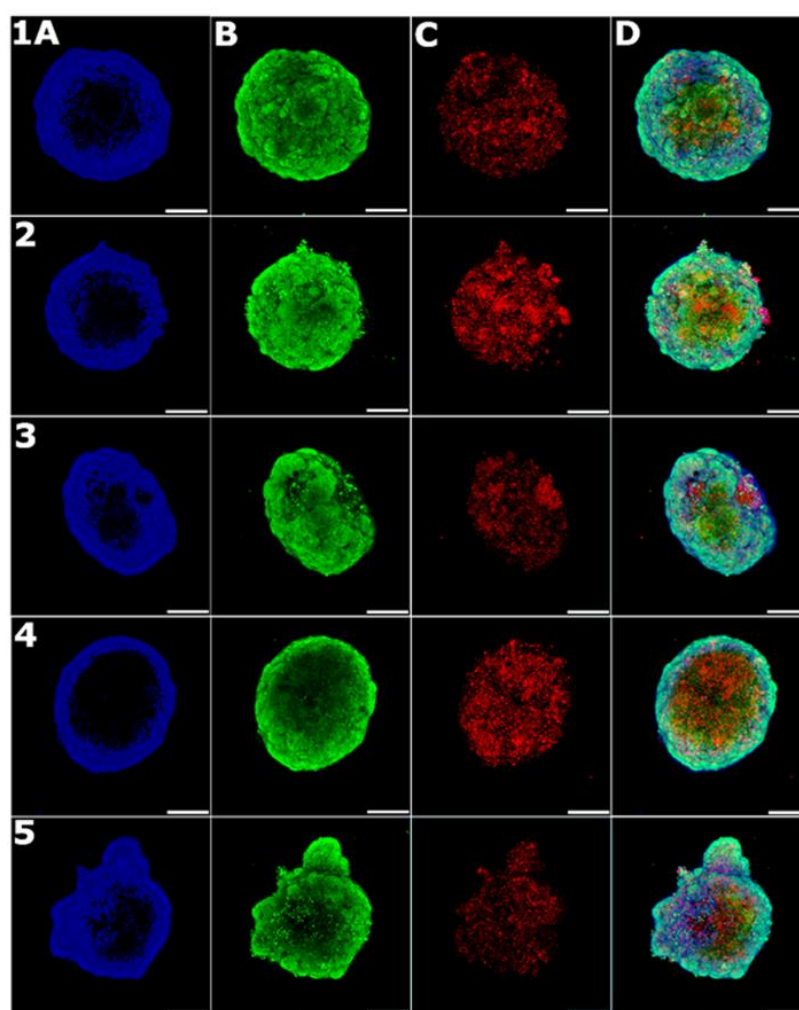


Figura 5.32. Análisis de los esferoides HeLa en microscopía confocal. Los esferoides se tiñeron con **A)** colorante Hoechst 33258, **B)** calceína AM y **C)** yoduro de propidio. Los canales fusionados aparecen en el panel D. Muestras: 1) control sin tratar; 2 y 3) células tratadas con **30** (2 μ M), 4 y 5) células tratadas con **32** (2 μ M). Las muestras de los paneles 1, 2 y 4 se irradiaron durante 5 min con luz láser azul (405 nm) 24 h antes del análisis. Las muestras 3 y 5 se mantuvieron en la oscuridad. Las imágenes representan dos experimentos independientes; cada imagen se obtuvo como la proyección máxima de 10 z-stacks. La barra de escala representa 200 μ m.

Para una evaluación cuantitativa, se utilizó la tinción Hoechst con el fin de definir los contornos de los esferoides en todas las muestras.^{49,52,53} En la **Figura 5.32** se muestran las imágenes más representativas. La irradiación de los esferoides pretratados con los complejos **30** y **32** aumentó la fluorescencia del yoduro de propidio (**Figura 5.32** y **Tabla 5.15**), lo que indica un número elevado de células muertas en el volumen del esferoide. Este aumento fue del 58 % y 48 % para los esferoides tratados con los complejos **30** o **32**, respectivamente, en comparación con el control irradiado no tratado (**Tabla 5.15**). En contraste, los cambios en la fluorescencia del yoduro de propidio fueron insignificantes cuando las muestras tratadas se mantuvieron sin irradiar.

Tabla 5.15. Análisis de la intensidad media de fluorescencia de yoduro de propidio. Se analizó la intensidad de fluorescencia en la proyección máxima de los z-stacks obtenidas en microscopía confocal.

Muestra	Intensidad de fluorescencia media (u.a.)
Control - Irradiado	$8,3 \pm 0,4$
Control - Oscuridad	$8,0 \pm 0,4$
30 - Irradiado	$13,1 \pm 0,5$
30 - Oscuridad	$9,1 \pm 0,2$
32 - Irradiado	$12,3 \pm 0,7$
32 - Oscuridad	$9,5 \pm 0,3$

Los datos demuestran que los complejos de iridio son capaces de inducir la muerte celular, incluso en esferoides 3D, aunque el efecto es menos pronunciado que el observado en las células 2D. En la **Figura 5.33** se muestra como el compuesto **30**, tras un tratamiento corto de 5 h, se localiza principalmente en la capa superficial del esferoide. Esto puede representar un factor limitante que podría restringir la fotoactividad de los compuestos de iridio probados en el experimento anterior.

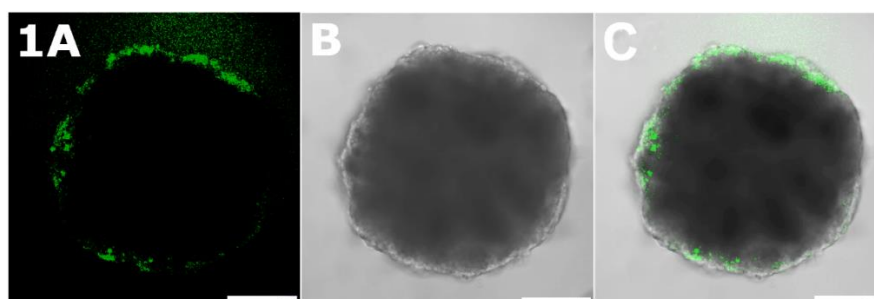


Figura 5.33. Acumulación de **30** en un esferoide HeLa. Las células se trataron con 2 μM del complejo y se incubaron durante 5 horas antes del análisis en el microscopio confocal. Canales: **A)** Fluorescencia procedente del complejo **30**, **B)** campo claro, **C)** superposición de la fluorescencia y el canal de campo claro. Barras de escala: 200 μm .

5.4. Resumen

En el presente capítulo se ha descrito la síntesis y caracterización de una serie de complejos octaédricos de Ir(III), de tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{OTf}$, donde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es la dppz y $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ son cuatro ligandos ciclometalados distintos: 2-(5-ariltiofen-2-il)benzotiazoles (**25** y **26**) y 2-(5-ariltiofen-2-il)-1-(4-(trifluorometil)bencil)-1*H*-benzo[d]imidazoles (**28** y **29**). Todos los compuestos han sido caracterizados mediante diversas técnicas espectroscópicas y se han investigado sus propiedades fotofísicas en agua (1 % DMSO) y acetonitrilo.

Asimismo, se ha evaluado la estabilidad de los compuestos en DMSO y medio de cultivo celular RPMI (5% DMSO), así como su fotoestabilidad tras la exposición a luz azul durante 6 h. Además, se han investigado sus propiedades como fotosensibilizadores en medios libres de células, demostrando que los compuestos descritos en este capítulo son capaces de oxidar fotocatalíticamente el NADH al ser irradiados con luz azul, verde e incluso roja en el caso del compuesto **31**. Los compuestos también son capaces de generar oxígeno singlete y radicales hidroxilo en medios libres de células tras la irradiación con luz azul.

En cuanto a las propiedades biológicas, los compuestos exhiben una elevada fototoxicidad tras la irradiación con luz azul, siendo el compuesto **30** el más activo en células HeLa ($\text{PI} > 160$). Este complejo también presenta la mayor acumulación y generación de ROS fotoinducida en dicha línea celular. Es importante resaltar que todos los compuestos, en condiciones de oscuridad, muestran una toxicidad muy baja en células humanas no cancerosas, lo que demuestra su biocompatibilidad. Los compuestos **30-33** se acumulan en las membranas de orgánulos intracelulares, particularmente en los lisosomas y, tras ser irradiados, inducen una fuga del contenido lisosomal hacia el citoplasma. Esto puede causar la permeabilización de la membrana celular, conduciendo a una muerte celular por oncosis.

Finalmente, aunque los compuestos de iridio investigados muestran una fotoactividad elevada en cultivos celulares 2D, los efectos sobre los esferoides 3D son menos prometedores. Esto puede deberse a una menor penetración de los complejos en las capas profundas del esferoide, lo que podría estar relacionado con la alta lipofilicidad o la agregación de los compuestos, dificultando la penetración en el espacio intercelular.

5.5. Bibliografía

- (1) Shen, J.; Rees, T. W.; Ji, L.; Chao, H. Recent Advances in Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes Containing Nanosystems for Cancer Treatment and Bioimaging. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *443*, 214016. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214016>.
- (2) Rovira, A.; Ortega-Forte, E.; Hally, C.; Jordà-Redondo, M.; Abad-Montero, D.; Viguera, G.; Martínez, J. I.; Bosch, M.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Marchán, V. Exploring Structure–Activity Relationships in Photodynamic Therapy Anticancer Agents Based on Ir(III)-COUPY Conjugates. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (12), 7849–7867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00189>.
- (3) Tang, S.; Li, Q.; Wang, M.; Yang, R.; Zeng, L.; Li, X.; Wang, R.; Zhang, H.; Ren, X.; Zhang, D.; Gao, F. Bleeding the Excited State Energy to the Utmost: Single-Molecule Iridium Complexes for In Vivo Dual Photodynamic and Photothermal Therapy by an Infrared Low-Power Laser. *Adv Health. Mat.* **2023**, 2301227. <https://doi.org/10.1002/adhm.202301227>.
- (4) Viguera, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kostrehunova, 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>.
- (5) Bevernaegie, R.; Doix, B.; Bastien, E.; Diman, A.; Decottignies, A.; Feron, O.; Elias, B. Exploring the Phototoxicity of Hypoxic Active Iridium(III)-Based Sensitizers in 3D Tumor Spheroids. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (46), 18486–18491. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b07723>.
- (6) Huang, C.; Liang, C.; Sadhukhan, T.; Banerjee, S.; Fan, Z.; Li, T.; Zhu, Z.; Zhang, P.; Raghavachari, K.; Huang, H. In-vitro and In-vivo Photocatalytic Cancer Therapy with Biocompatible Iridium(III) Photocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (17), 9474–9479. <https://doi.org/10.1002/anie.202015671>.
- (7) Peng, K.; Zheng, Y.; Xia, W.; Mao, Z.-W. Organometallic Anti-Tumor Agents: Targeting from Biomolecules to Dynamic Bioprocesses. *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52* (8), 2790–2832. <https://doi.org/10.1039/D2CS00757F>.
- (8) Guan, R.; Chen, Y.; Zeng, L.; Rees, T. W.; Jin, C.; Huang, J.; Chen, Z.-S.; Ji, L.; Chao, H. Oncosis-Inducing Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (23), 5183–5190. <https://doi.org/10.1039/C8SC01142G>.
- (9) Ortega-Forte, E.; Hernández-García, S.; Viguera, 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>.
- (10) Novohradsky, V.; Viguera, G.; Pracharova, J.; Cutillas, N.; Janiak, C.; Kostrehunova, 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>.
- (11) Markova, L.; Novohradsky, V.; Kasparkova, J.; Ruiz, J.; Brabec, V. Dipyridophenazine Iridium(III) Complex as a Phototoxic Cancer Stem Cell Selective, Mitochondria Targeting Agent. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *360*, 109955. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109955>.
- (12) Pracharova, J.; Viguera, G.; Novohradsky, V.; Cutillas, N.; Janiak, C.; Kostrehunova, H.; Kasparkova, J.; Ruiz, J.; Brabec, V. Exploring the Effect of Polypyridyl Ligands on the Anticancer Activity of Phosphorescent Iridium(III) Complexes: From

- Proteosynthesis Inhibitors to Photodynamic Therapy Agents. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (18), 4607–4619. <https://doi.org/10.1002/chem.201705362>.
- (13) 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>.
- (14) Zajac, M.; Hrobárik, P.; Magdolen, P.; Foltínová, P.; Zahradník, P. Donor– π -Acceptor Benzothiazole-Derived Dyes with an Extended Heteroaryl-Containing Conjugated System: Synthesis, DFT Study and Antimicrobial Activity. *Tetrahedron* **2008**, *64* (46), 10605–10618. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.08.064>.
- (15) Novohradsky, V.; Marco, A.; Markova, L.; Cutillas, N.; Ruiz, J.; Brabec, V. Ir(III) Compounds Containing a Terdentate Ligand Are Potent Inhibitors of Proliferation and Effective Antimetastatic Agents in Aggressive Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (14), 9766–9783. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00586>.
- (16) 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>.
- (17) 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>.
- (18) Slodek, A.; Zych, D.; Maroń, A.; Gawecki, R.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Malarz, K.; Musioł, R. Phenothiazine Derivatives - Synthesis, Characterization, and Theoretical Studies with an Emphasis on the Solvatochromic Properties. *J. Mol. Liq.* **2019**, *285*, 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.102>.
- (19) Cao, J.-J.; Tan, C.-P.; Chen, M.-H.; Wu, N.; Yao, D.-Y.; Liu, X.-G.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Targeting Cancer Cell Metabolism with Mitochondria-Immobilized Phosphorescent Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 631–640. <https://doi.org/10.1039/C6SC02901A>.
- (20) He, L.; Li, Y.; Tan, C.-P.; Ye, R.-R.; Chen, M.-H.; Cao, J.-J.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Cyclometalated Iridium(III) Complexes as Lysosome-Targeted Photodynamic Anticancer and Real-Time Tracking Agents. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (10), 5409–5418. <https://doi.org/10.1039/C5SC01955A>.
- (21) Bezzubov, S. I.; Kiselev, Y. M.; Churakov, A. V.; Kozyukhin, S. A.; Sadovnikov, A. A.; Grinberg, V. A.; Emets, V. V.; Doljenko, V. D. Iridium(III) 2-Phenylbenzimidazole Complexes: Synthesis, Structure, Optical Properties, and Applications in Dye-Sensitized Solar Cells. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (3), 347–354. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501068>.
- (22) Scattergood, P. A.; Ranieri, A. M.; Charalambou, L.; Comia, A.; Ross, D. A. W.; Rice, C. R.; Hardman, S. J. O.; Heully, J.-L.; Dixon, I. M.; Massi, M.; Alary, F.; Elliott, P. I. P. Unravelling the Mechanism of Excited-State Interligand Energy Transfer and the Engineering of Dual Emission in $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ Complexes. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (3), 1785–1803. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03003>.
- (23) Redrado, M.; Miñana, M.; Coogan, M. P.; Concepción Gimeno, M.; Fernández-Moreira, V. Tunable Emissive Ir(III) Benzimidazole-quinoline Hybrids as Promising Theranostic Lead Compounds. *ChemMedChem* **2022**, *17* (18), e202200244. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200244>.

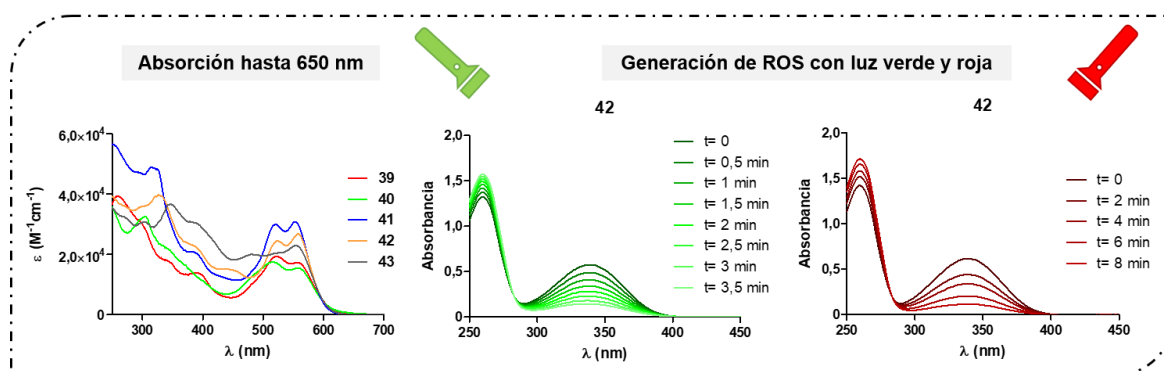
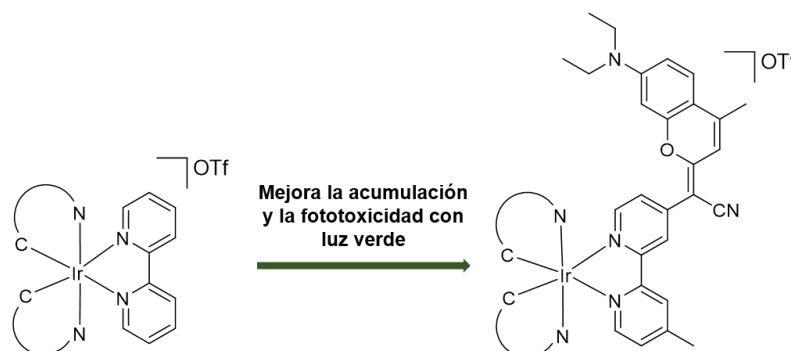
- (24) Millán, G.; Nieddu, M.; López, I. P.; Ezquerro, C.; Berenguer, J. R.; Larráyo, I. M.; Pichel, J. G.; Lalinde, E. A New Family of Luminescent Iridium Complexes: Synthesis, Optical, and Cytotoxic Studies. *Dalton Trans.* **2023**, 52 (19), 6360–6374. <https://doi.org/10.1039/D3DT00028A>.
- (25) 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. *Mater. Today Chem.* **2021**, 22, 100563. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100563>.
- (26) Lo, K. K.-W. Luminescent Rhenium(I) and Iridium(III) Polypyridine Complexes as Biological Probes, Imaging Reagents, and Photocytotoxic Agents. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48 (12), 2985–2995. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00211>.
- (27) Zhuang, J.; Wang, B.; Chen, H.; Zhang, K.; Li, N.; Zhao, N.; Tang, B. Z. Efficient NIR-II Type-I AIE Photosensitizer for Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy through Synergistic Apoptosis–Ferroptosis. *ACS Nano* **2023**, 17 (10), 9110–9125. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c12319>.
- (28) Titov, D. V.; Cracan, V.; Goodman, R. P.; Peng, J.; Grabarek, Z.; Mootha, V. K. Complementation of Mitochondrial Electron Transport Chain by Manipulation of the NAD⁺/NADH Ratio. *Science* **2016**. <https://doi.org/10.1126/science.aad4017>.
- (29) Chiarugi, A.; Dölle, C.; Felici, R.; Ziegler, M. The NAD Metabolome — a Key Determinant of Cancer Cell Biology. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12 (11), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrc3340>.
- (30) Murphy, M. P.; Hartley, R. C. Mitochondria as a Therapeutic Target for Common Pathologies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17 (12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>.
- (31) Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The Detection Sensitivity of Commonly Used Singlet Oxygen Probes in Aqueous Environments. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **2020**, 204, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
- (32) Lv, Z.; Wei, H.; Li, Q.; Su, X.; Liu, S.; Zhang, K. Y.; Lv, W.; Zhao, Q.; Li, X.; Huang, W. Achieving Efficient Photodynamic Therapy under Both Normoxia and Hypoxia Using Cyclometalated Ru(II) Photosensitizer through Type I Photochemical Process. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (2), 502–512. <https://doi.org/10.1039/C7SC03765A>.
- (33) 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>.
- (34) 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>.
- (35) Van Engeland, M.; Nieland, L. J. W.; Ramaekers, F. C. S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P. M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **1998**, 31 (1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R).
- (36) Lecœur, H.; Prévost, M.-C.; Gougeon, M.-L. Oncosis Is Associated with Exposure of Phosphatidylserine Residues on the Outside Layer of the Plasma Membrane: A Reconsideration of the Specificity of the Annexin V/Propidium Iodide Assay. *Cytometry* **2001**, 44 (1), 65–72. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010501\)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010501)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q).

- (37) Fink, S. L.; Cookson, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **2005**, 73 (4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- (38) Trump, B. E.; Berezsky, I. K.; Chang, S. H.; Phelps, P. C. The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol. Pathol.* **1997**, 25 (1), 82–88. <https://doi.org/10.1177/019262339702500116>.
- (39) Weerasinghe, P.; Buja, L. M. Oncosis: An Important Non-Apoptotic Mode of Cell Death. *Experimental and Molecular Pathology* **2012**, 93 (3), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.018>.
- (40) Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am. J. Pathol.* **1995**, 146 (1), 3–15.
- (41) Vossenkamper, A.; Warnes, G. Flow Cytometry Reveals the Nature of Oncotic Cells. *IJMS* **2019**, 20 (18), 4379. <https://doi.org/10.3390/ijms20184379>.
- (42) Wang, F.; Gómez-Sintes, R.; Boya, P. Lysosomal Membrane Permeabilization and Cell Death. *Traffic* **2018**, 19 (12), 918–931. <https://doi.org/10.1111/tra.12613>.
- (43) Jing, Y.; Kobayashi, M.; Vu, H. T.; Kasahara, A.; Chen, X.; Pham, L. T.; Kurayoshi, K.; Tadokoro, Y.; Ueno, M.; Todo, T.; Nakada, M.; Hirao, A. Therapeutic Advantage of Targeting Lysosomal Membrane Integrity Supported by Lysophagy in Malignant Glioma. *Cancer Sci.* **2022**, 113 (8), 2716–2726. <https://doi.org/10.1111/cas.15451>.
- (44) Barral, D. C.; Staiano, L.; Guimas Almeida, C.; Cutler, D. F.; Eden, E. R.; Futter, C. E.; Galione, A.; Marques, A. R. A.; Medina, D. L.; Napolitano, G.; Settembre, C.; Vieira, O. V.; Aerts, J. M. F. G.; Atakpa-Adaji, P.; Bruno, G.; Capuozzo, A.; De Leonibus, E.; Di Malta, C.; Escrevente, C.; Esposito, A.; Grumati, P.; Hall, M. J.; Teodoro, R. O.; Lopes, S. S.; Luzio, J. P.; Monfregola, J.; Montefusco, S.; Platt, F. M.; Polishchuck, R.; De Risi, M.; Sambri, I.; Soldati, C.; Seabra, M. C. Current Methods to Analyze Lysosome Morphology, Positioning, Motility and Function. *Traffic* **2022**, 23 (5), 238–269. <https://doi.org/10.1111/tra.12839>.
- (45) Santos, S. A. C. S.; Persechini, P. M.; Henriques-Santos, B. M.; Bello-Santos, V. G.; Castro, N. G.; Costa De Sousa, J.; Genta, F. A.; Santiago, M. F.; Coutinho-Silva, R.; Savio, L. E. B.; Kurtenbach, E. P2X7 Receptor Triggers Lysosomal Leakage Through Calcium Mobilization in a Mechanism Dependent on Pannexin-1 Hemichannels. *Front. Immunol.* **2022**, 13, 752105. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.752105>.
- (46) Cao, M.; Luo, X.; Wu, K.; He, X. Targeting Lysosomes in Human Disease: From Basic Research to Clinical Applications. *Sig. Transduct. Target Ther.* **2021**, 6 (1), 379. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00778-y>.
- (47) Piao, S.; Amaravadi, R. K. Targeting the Lysosome in Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, 1371 (1), 45–54. <https://doi.org/10.1111/nyas.12953>.
- (48) Zhu, S.; Yao, R.; Li, Y.; Zhao, P.; Ren, C.; Du, X.; Yao, Y. Lysosomal Quality Control of Cell Fate: A Novel Therapeutic Target for Human Diseases. *Cell Death Dis* **2020**, 11 (9), 817. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03032-5>.
- (49) Zanoni, M.; Piccinini, F.; Arienti, C.; Zamagni, A.; Santi, S.; Polico, R.; Bevilacqua, A.; Tesei, A. 3D Tumor Spheroid Models for in Vitro Therapeutic Screening: A Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>.
- (50) Riedl, A.; Schleder, M.; Pudelko, K.; Stadler, M.; Walter, S.; Unterleuthner, D.; Unger, C.; Kramer, N.; Hengstschläger, M.; Kenner, L.; Pfeiffer, D.; Krupitza, G.; Dolznig, H. Comparison of Cancer Cells Cultured in 2D vs 3D Reveals Differences

- in AKT/mTOR/S6-Kinase Signaling and Drug Response. *J. Cell Sci.* **2016**, jcs.188102. <https://doi.org/10.1242/jcs.188102>.
- (51) Wadman, M. FDA No Longer Has to Require Animal Testing for New Drugs. *Science* **2023**, 379 (6628), 127–128. <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>.
- (52) 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>.
- (53) Sirenko, O.; Mitlo, T.; Hesley, J.; Luke, S.; Owens, W.; Cromwell, E. F. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. *Assay Drug Dev. Technol.* **2015**, 13 (7), 402–414. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.655>.

Capítulo 6

Complejos ciclometalados de Ir(III) con una diimina funcionalizada con un fragmento de cumarina: estudio de su potencial aplicación como fotosensibilizadores



El ligando N[^]N utilizado en este capítulo ha sido preparado por el grupo de investigación del Prof. Dr. Vicente Marchán y los ensayos biológicos han sido realizados por Pezhman Ashoo, miembro de nuestro grupo de investigación.

6.1. Introducción

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, uno de los grandes retos de la PDT se relaciona con el desarrollo de nuevos fotosensibilizadores que absorban luz en la ventana fototerapéutica. Los complejos octaédricos de iridio, a pesar de mostrar excelentes propiedades fotofísicas, tienden a absorber en la región azul del espectro electromagnético, que es menos penetrante y más dañina para los tejidos.¹⁻³ Para abordar esta cuestión, recientemente se han diseñado nuevas estrategias de funcionalización con el fin de ampliar la ventana fototerapéutica de los fotosensibilizadores de Ir(III) a la región roja/infrarroja cercana: acoplamiento con fluoróforos orgánicos,⁴ conjugación con compuestos porfirinoides⁵ y el uso de ligandos π -extendidos o con fragmentos dador-aceptor.⁶

Las cumarinas son reconocidas por sus amplias propiedades farmacológicas, entre las que se incluyen su actividad antibiótica, antivírica y anticancerígena.^{7,8} Además, estos fluoróforos pueden ser modificados fácilmente, introduciendo sustituyentes que produzcan un desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción y emisión, o aumentos en la transferencia de carga intramolecular.⁹ Estas estrategias pueden ser aprovechadas para desarrollar nuevos agentes para PDT cuando se conectan a complejos metálicos.¹⁰ En este sentido, Zhao y col. descubrieron que la unión de moléculas de cumarina a complejos de Ir(III) y Ru(II), a través de un ligando imidazo-fenantreno, daba lugar a complejos con una intensa absorción de luz visible y a estados excitados tripletes de larga duración.^{11,12} Por otro lado, Marchán y col., en colaboración con nuestro grupo de investigación, han desarrollado recientemente un agente PDT de tipo I basado en la conjugación de un complejo de Ir(III) a una cumarina COUPY (**Figura 6.1**), que muestra una elevada acumulación celular en el citoplasma de células HeLa y una elevada fototoxicidad con luz verde y azul, incluso en condiciones de hipoxia.¹³

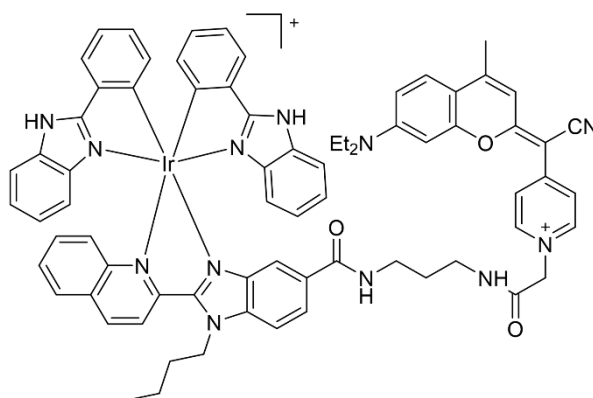


Figura 6.1. Estructura del primer conjugado Ir(III)-COUPY preparado por Marchán y col., en colaboración con nuestro grupo de investigación.¹³

Posteriormente, Marchán, Ruiz y col. prepararon nuevos conjugados entre fluoróforos COUPY y un complejo de Ir(III), con el fin de encontrar una relación estructura-actividad biológica. Los resultados revelaron que todos los compuestos muestran una excelente fototoxicidad con luz verde frente a células cancerosas, especialmente frente a las células de cáncer de ovario resistente al cisplatino, tanto en modelos 2D como 3D. En concreto, se identificaron tres compuestos prometedores (**Figura 6.1** como conjugado progenitor y **Figura 6.2**), los cuales contienen el mismo fluoróforo, y presentan altos valores de PI en células A2780cis en condiciones normales de oxígeno. Es importante señalar que la incorporación de espaciadores condujo a una mejora de los valores de PI de los conjugados en hipoxia ($>131,6$ y $>147,1$), en comparación con el progenitor ($>65,8$), así como una baja toxicidad en la oscuridad.¹⁴

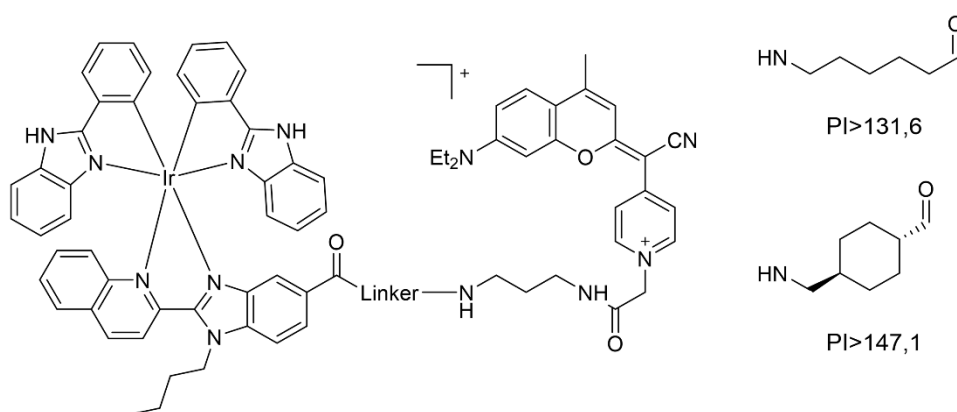


Figura 6.2. Conjugados Ir(III)-COUPY de segunda generación preparados por Marchán y col., en colaboración con nuestro grupo de investigación.

Por ello, en el presente capítulo nos propusimos la síntesis y caracterización de nuevos complejos de Ir(III) del tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, donde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es un ligando bipyridina-cumarina (COUBPY, **38**) (**Figura 6.3**), que permite que el cromóforo orgánico esté integrado en la esfera de coordinación del metal. Además, se han preparado sus análogos con el ligando 2,2'-bipyridina con el fin de encontrar una relación estructura-actividad de los nuevos complejos. A continuación, se presentan los resultados de los experimentos realizados para evaluar la fotoxidación del NADH y la fotogeneración de oxígeno singlete y/o radicales hidroxilo por parte de los compuestos en medios libres de células, utilizando luces de distinta longitud de onda. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos de los compuestos de Ir(III) como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica con luz verde en células de melanoma y de cáncer cervical.

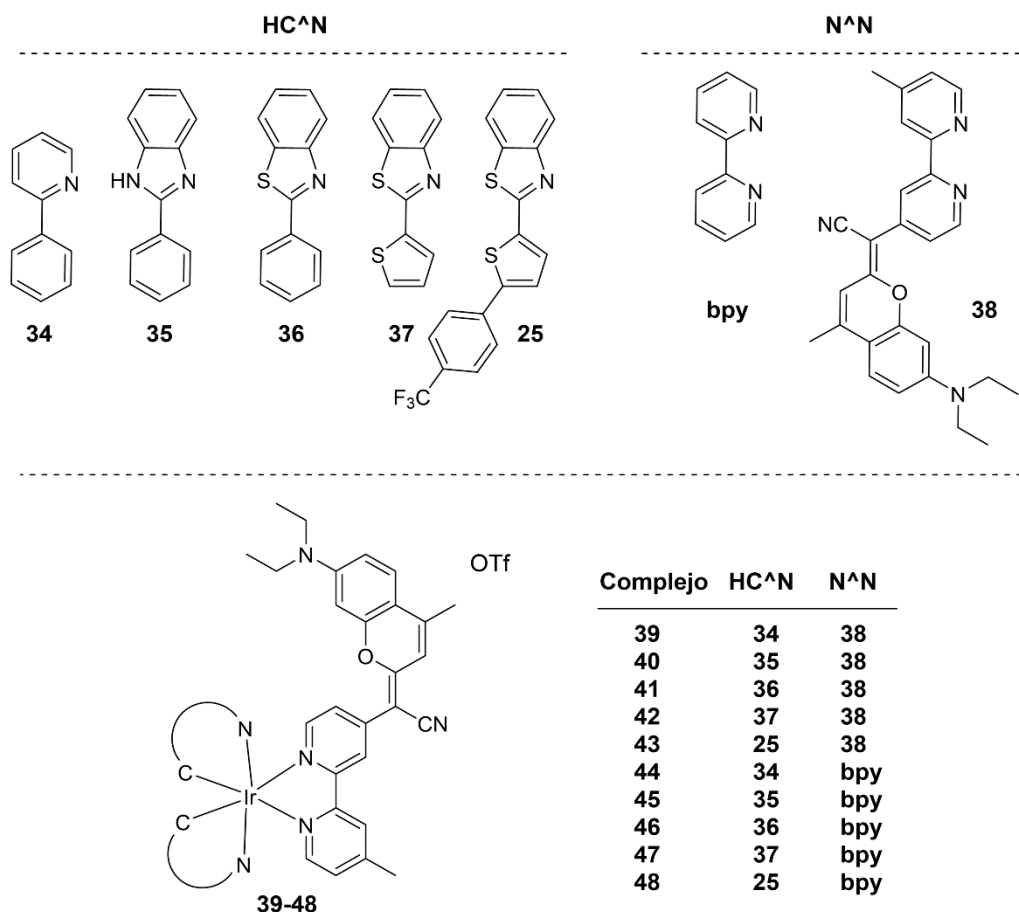


Figura 6.3. Estructura general de los nuevos compuestos preparados en este capítulo.

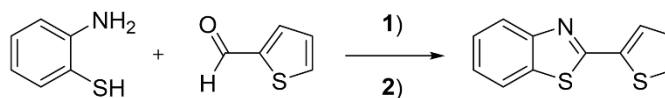
6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Síntesis de los complejos de Ir(III)

En primer lugar, es pertinente señalar que tres de los ligandos ciclometalados utilizados en este capítulo son comerciales: 2-fenilpiridina (**34**), 2-fenilbenzimidazol (**35**) y 2-fenilbenzotiazol (**36**). El ligando 2-(2-tienil)benzotiazol (**37**) había sido previamente descrito; sin embargo, en este capítulo, se ha preparado siguiendo una ruta sintética modificada respecto a la bibliografía.¹⁵ Asimismo, se ha utilizado el ligando **25**, cuya síntesis se detalla en el Capítulo 5, dado que mostró los resultados más prometedores de los fotosensibilizadores de iridio de la serie anterior (compuesto **30**).

Síntesis del proligando **37**

La preparación del ligando 2-(tiofen-2-il)benzo[d]tiazol (**37**) consiste en una reacción de condensación entre *o*-aminotiofenol y tiofeno-2-carbaldehído, en presencia de bisulfito sódico, en una mezcla EtOH:H₂O (1:1 v:v) durante 18 h a 80 °C (**Esquema 6.1**).

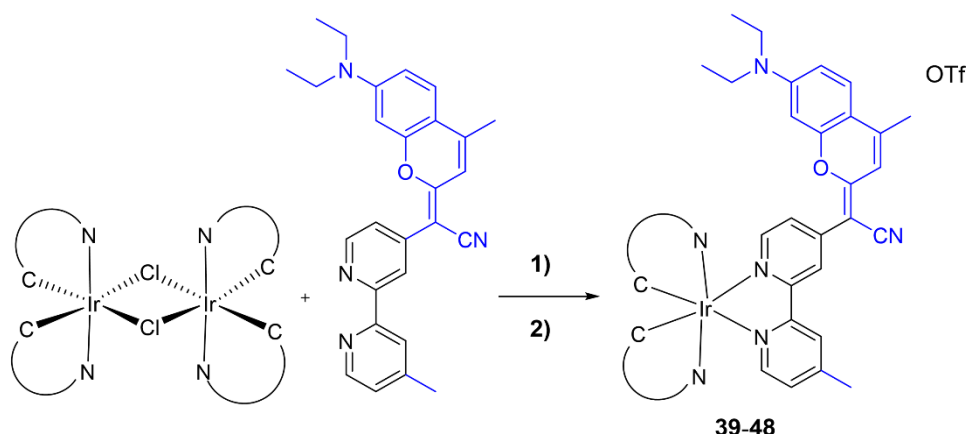


Esquema 6.1. Ruta sintética utilizada para la obtención del proligando **37**. Condiciones de reacción: **1)** NaHSO₃, H₂O, 80 °C, 1 h. **2)** EtOH:H₂O (1:1 v:v), 80 °C, 18 h.

Síntesis de los complejos de Ir(III)

Para la síntesis de los complejos de Ir(III), se ha utilizado como ligando auxiliar N[^]N un ligando basado en 2,2'-bipiridina (bpy) que incorpora un cromóforo tipo cumarina (**38**), el cual ha sido preparado por el grupo de investigación del Prof. Dr. Vicente Marchán. Además, se han preparado sus análogos con el ligando comercial 2,2'-bipiridina con fines comparativos, para así investigar la influencia del nuevo ligando basado en cumarina en las propiedades fotofísicas y biológicas. Es importante señalar que dos de los complejos que contienen la bpy (**44** y **46**), concretamente los que contienen los ligandos ciclometalados **34** y **36**, habían sido anteriormente descritos por sus interesantes propiedades ópticas.^{16,17}

Al igual que los del capítulo anterior, los complejos **39-48** se prepararon mediante un procedimiento de dos etapas descrito previamente en la bibliografía.^{3,18} En primer lugar, se obtuvieron los dímeros de iridio, [Ir(C[^]N)₂(μ-Cl)]₂, haciendo reaccionar el IrCl₃·H₂O con los proligandos correspondientes (**25** y **34-37**) en una mezcla 2-etoxietanol:H₂O (3:1 v:v) a 110 °C durante 24 h. En la segunda etapa, cada dímero se hizo reaccionar con la bipiridina o el ligando **38** en una mezcla MeOH:DCM (3:2 v:v) a 58 °C, en presencia de KOTf, durante 24 h.



Esquema 6.2. Procedimiento de síntesis para los complejos de iridio. Condiciones de reacción: **1)** 2-etoxietanol:H₂O (3:1 v:v), 110 °C, 24 h, atm N₂; **2)** MeOH:DCM (3:2 v:v), 58 °C, 24 h.

6.2.2. Caracterización de los nuevos complejos

Los nuevos compuestos se caracterizaron mediante diversas técnicas: RMN (^1H -RMN y ^{13}C -RMN), análisis elemental y HPLC-MS. Los espectros de RMN se registraron en $\text{DMSO}-d_6$ o CDCl_3 , los cuales quedan recogidos en las **Figuras A5.1-5.18** del Anexo V. Los espectros de ^1H -RMN de **39-43** muestran resonancias alifáticas en torno a δ 1,1, 2,4, 2,55 y 3,45 ppm, correspondientes a los protones alifáticos del ligando COUBPY (**38**). A modo de ejemplo, en la **Figura 6.4** se muestra el espectro de ^1H -RMN del compuesto **42** con las señales características mencionadas.

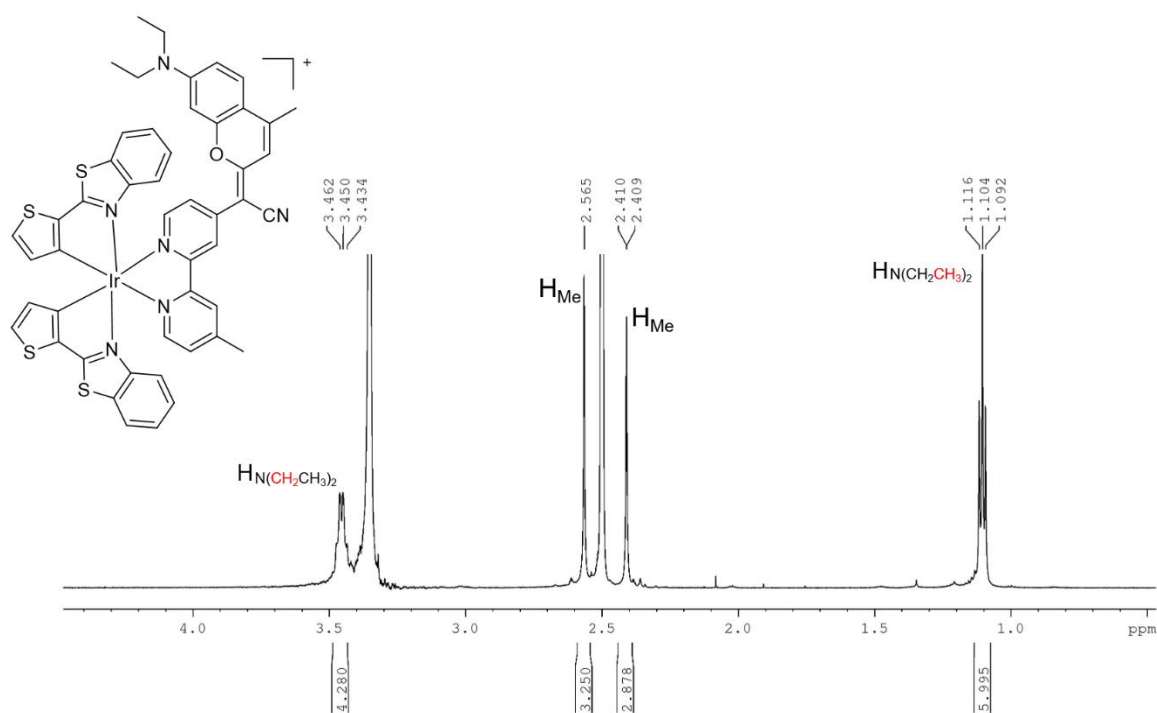


Figura 6.4. Zona alifática del espectro de ^1H -RMN del compuesto **42**.

Para concluir con la caracterización estructural, se obtuvieron los espectros de masas de **39-48** mediante HPLC-MS (**Figuras A5.19-A5.22**), así como los valores de análisis elemental. Ambas técnicas confirmaron la estequiometría propuesta y aseguraron una pureza superior al 95 % en todos los casos (**Tabla 6.1**). Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-MS muestran un único pico cuyo espectro de masas, registrado en modo positivo, corresponde al ion molecular $[\text{M}-\text{Cl}]^+$, el cual presenta el perfil isotópico del átomo de iridio, y es concordante con el teórico en todos los casos. Cabe destacar que, antes de registrar las medidas de HPLC-MS y realizar el análisis elemental, el contraión triflato fue sustituido por cloruro. Esta sustitución del contraión atiende a criterios de solubilidad en el medio de cultivo biológico.

Tabla 6.1. Valores obtenidos de análisis elemental y HPLC-MS para compuestos **39-48**.

Compuesto	Análisis elemental ^a (%)				t _R (min)	HPLC-MS ^a	
	C	H	N	S		Fragmento	m/z
39	61,10 (61,40)	4,50 (4,42)	8,80 (8,77)	N/A	16,527	[M-Cl] ⁺	923,3084 (923,3049)
						[M-Cl+H] ²⁺	462,1587 (462,1558)
40	61,14 (61,41)	4,43 (4,28)	10,90 (10,81)	N/A	16,302	[M-Cl] ⁺	1001,3290 (1001,3267)
						[M-Cl+H] ²⁺	501,1682 (501,1667)
41	59,14 (59,45)	4,05 (3,95)	7,75 (7,85)	5,89 (5,99)	17,807	[M-Cl] ⁺	1035,2533 (1035,2491)
						[M-Cl+H] ²⁺	518,1305 (518,1297)
42	54,24 (54,35)	3,58 (3,54)	7,72 (7,76)	11,81 (11,85)	18,025	[M-Cl] ⁺	1047,1643 (1047,1619)
43	55,27 (55,19)	3,31 (3,23)	6,02 (6,13)	9,30 (9,36)	20,268	[M-Cl] ⁺	1335,2033 (1335,1993)
44	55,27 (55,52)	3,51 (3,49)	8,05 (8,09)	N/A	12,101	[M-Cl] ⁺	657,1658 (657,1625)
45	56,08 (56,13)	3,55 (3,40)	10,62 (10,91)	N/A	12,590	[M-Cl] ⁺	735,1859 (735,1848)
46	53,75 (53,75)	3,25 (3,01)	6,88 (6,97)	7,82 (7,97)	14,350	[M-Cl] ⁺	769,1079 (769,1072)
47	46,74 (47,08)	2,62 (2,47)	6,69 (6,86)	15,82 (15,71)	14,457	[M-Cl] ⁺	781,0211 (781,0200)
48	50,08 (50,02)	2,39 (2,37)	5,12 (5,07)	11,50 (11,61)	19,294	[M-Cl] ⁺	1069,0559 (1069,0568)

^aValores teóricos entre paréntesis. N/A: no aplica**6.2.3. Propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos**

Las propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos de iridio se estudiaron en acetonitrilo y en agua (1 % DMSO).

Espectroscopía de absorción UV/Visible

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción de **39-48** a una concentración de 10 μM a temperatura ambiente (**Figura 6.5** y **Tablas 6.2** y **A5.1**). Todos los compuestos presentan las bandas típicas de este tipo de complejos, las cuales se detallaron en el Capítulo 5. En consecuencia, exhiben bandas de absorción intensas por debajo de 350 nm, atribuidas a las transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ permitidas por el espín y centradas en los ligandos $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$. Las bandas de absorción menos intensas y de menor energía ($\lambda > 350$ nm) podrían asignarse a bandas centradas en los ligandos o de transferencia de carga (LLCT), y/o a bandas de transferencia de carga metal-ligando permitidas por el espín ($^1\text{MLCT}$) o prohibidas por el espín ($^3\text{MLCT}$). Estas últimas son consecuencia del acoplamiento espín-órbita del átomo pesado de Ir(III) ($\zeta = 3909\text{ cm}^{-1}$).¹⁹⁻²¹

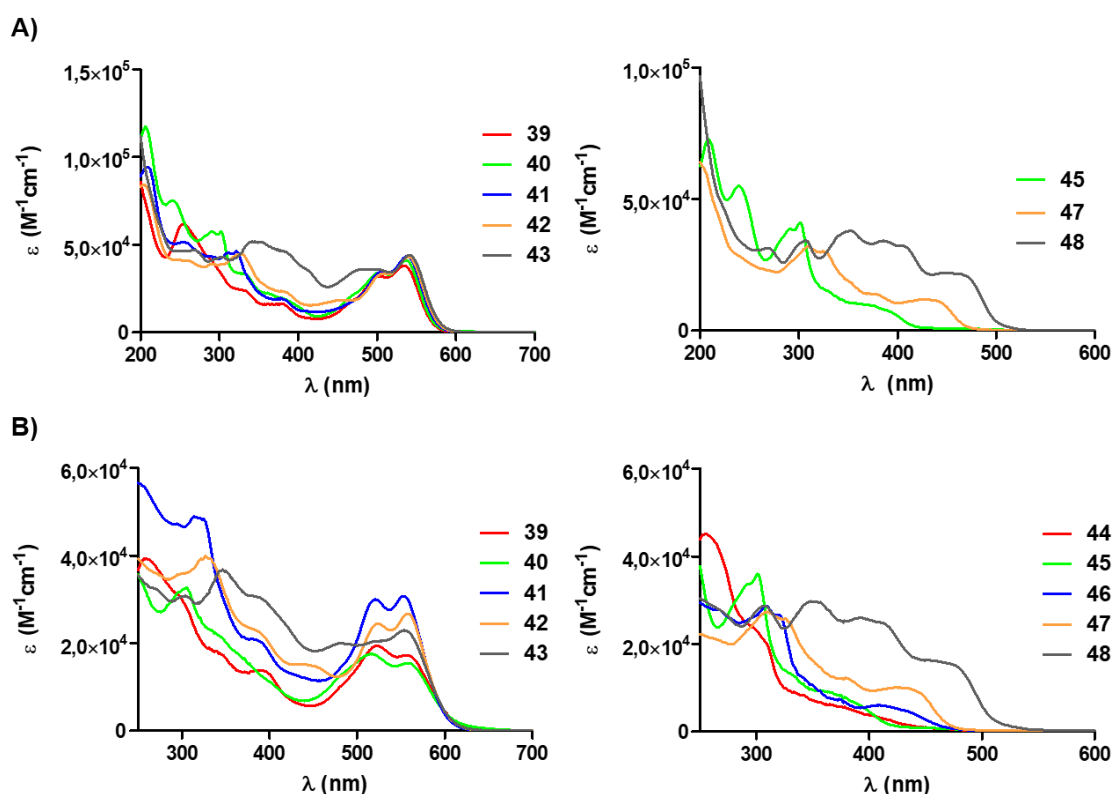


Figura 6.5. Espectro de absorción UV/Vis de los compuestos **39-48** (10 μM) en: **A)** acetonitrilo; y **B)** agua (1 % DMSO).

En la **Figura 6.5** y en la **Tabla 6.2** se observa que los complejos que contienen ligandos $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ con un mayor grado de conjugación π (**45-48** vs **44**) muestran mayor valor de coeficiente de extinción molar, especialmente en la región de 300-500 nm. Además, la capacidad de absorción de luz de **47** y **48** es mayor que la de **44-46**, debido a la sustitución del anillo de fenilo en los ligandos **34**, **35** y **36** por el núcleo de tiofeno, que es más rico en electrones. Por otra parte, al comparar los espectros de absorción del proligando **25**, el

ligando N[^]N **38** y el complejo **43** (**Figura 6.6**), se puede concluir que las bandas de absorción situadas alrededor de 505 y 540 nm en el complejo de iridio corresponden a bandas de transferencia de carga metal-ligando, atribuibles al ligando N[^]N (**38**). Por esta razón, las bandas mencionadas se observan en todos los compuestos con el ligando bipyridina-cumarina y presentan valores de coeficientes de extinción molar que varían entre 35000 y 40000 M⁻¹cm⁻¹.

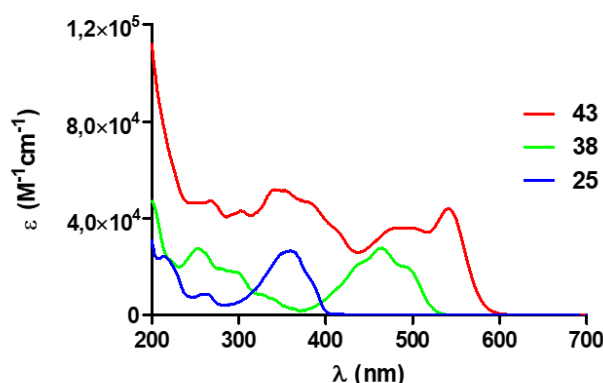


Figura 6.6. Espectro de absorción UV/Vis del compuesto **43**, junto a su prolígando C[^]N (**25**) y el ligando COUBPY (**38**) en acetonitrilo.

En resumen, las modificaciones estructurales implementadas en los complejos de iridio a través de los ligandos C[^]N ejercieron una influencia moderada sobre sus propiedades fotofísicas. Sin embargo, la introducción del fragmento cumarina en el ligando N[^]N desplazó significativamente las propiedades de absorción de todos los compuestos de iridio sintetizados (**39-43**), permitiendo alcanzar la región verde y roja del espectro. Este hecho destaca el importante papel de los cromóforos derivados de cumarina en el diseño futuro de nuevos fotosensibilizadores que puedan absorber en estas regiones del espectro UV/Vis.

Espectroscopía de emisión

A continuación, se registraron los espectros de emisión de los compuestos **39-48** en acetonitrilo, a una concentración de 10 μM, a temperatura ambiente (**Figura 6.7** y **Tabla 6.2**). En los complejos que contienen bpy, la emisión se ve influenciada por el ligando C[^]N, con máximos de emisión que varían entre 524 nm y 669 nm para los complejos **46** y **48**, respectivamente. En cuanto a los rendimientos cuánticos de emisión, los valores fluctúan considerablemente, desde 0,36 (**47**) hasta <0,01 (**48**), y los tiempos de vida también muestran una amplia variabilidad, entre 280 ns (**44**) y 4940 ns (**47**). Estos valores de tiempo de vida se encuentran dentro del rango descrito en la bibliografía para este tipo de compuestos.²²⁻²⁴

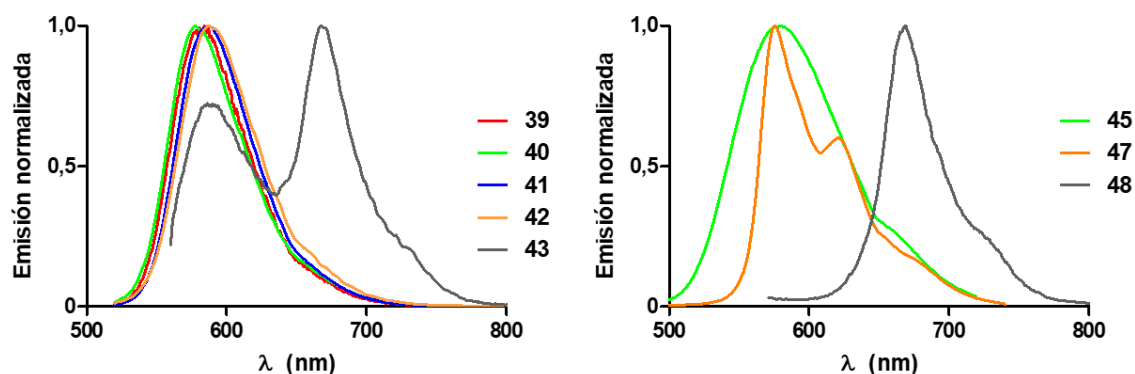


Figura 6.7. Espectro de emisión de los compuestos **39-48** (10 μ M) en acetonitrilo. λ_{ex} = 500 nm (**39-42**), 540 nm (**43**), 370 nm (**45**), 380 nm (**47**) y 470 nm (**48**).

Cabe señalar que todos los compuestos con el ligando bipyridina-cumarina (**38**), es decir, **39-43**, exhiben una banda de emisión cuyo máximo se encuentra alrededor de 585 nm, independientemente del ligando C^N, aunque con tiempos de vida que varían en un amplio rango, desde 266 ns (**43**) hasta 2360 ns (**41**). El compuesto **43** presenta, además, otra banda de emisión a 668 nm, coincidente con la observada en los complejos **48** y **30** (Capítulo 5), tanto en longitud de onda (~669 nm) como en tiempo de vida (~1 μ s) y rendimiento cuántico (<0,01), y atribuible a la presencia del ligando **25** en dichos compuestos. Para investigar la naturaleza de las bandas de emisión de los complejos con cumarina (**39-43**), se registraron sus espectros de emisión en agua (1 % DMSO) a una concentración 10 μ M. Como se observa en la **Figura 6.8** y en la **Tabla A5.1**, el uso de un disolvente más polar que el acetonitrilo conduce a un desplazamiento batocrómico de la banda de emisión de hasta 100 nm en el caso del compuesto **40**. Estos hallazgos sugieren que la banda de emisión presenta un carácter ³MLLCT en el estado triplete más bajo.²⁵ Además, en la mayoría de los casos, se observa la aparición de un hombro en la banda de emisión. Estos resultados evidencian que la banda observada en acetonitrilo a 585 nm en los complejos **39-42** se debe a una transferencia de carga que involucra a ambos tipos de ligandos (N^N y C^N), mientras que en el compuesto **43**, solo involucra al ligando N^N.

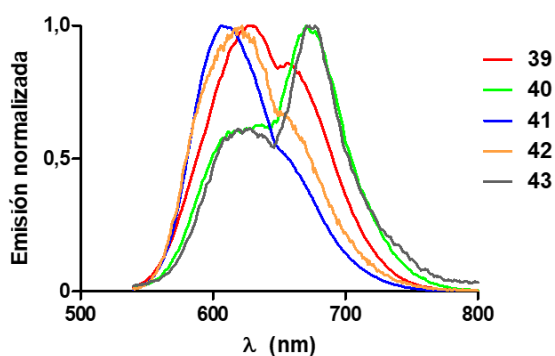


Figura 6.8. Espectro de emisión de los compuestos **39-43** (10 μ M) en agua (1 % DMSO). λ_{ex} = 520 nm.

En la **Tabla 6.2** se resumen los datos del estudio fotofísico de los complejos **39-48** en acetonitrilo: longitud de onda de excitación, de emisión, tiempos de vida y rendimiento cuántico de emisión.

Tabla 6.2. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y emisión (λ_{em}) de los complejos **39-48**, tiempos de vida (τ_{em}) y rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{em}) en acetonitrilo.

Comp.	λ_{abs} , nm (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	τ_{em} , ns ^a	Φ_{em} ^a
39	254 (61740), 332 (24050), 372 (16280), 503 (31970), 534 (38040)	500	584	778	<0,01
40	206 (117330), 240 (75300), 290 (57480), 302 (57520), 336 ^h (32270), 503 (34230), 536 (41070)	500	578	1350 (21 %) 186 (79%)	<0,01
41	208 (94460), 254 (51410), 311 (45430), 321 (46450), 378 (19660), 506 (34550), 538 (43390)	500	588	2360	<0,01
42	204 (84210), 264 ^h (40480), 292 (39000), 328 (44760), 451 ^h (18470), 508 (33440), 539 (43140)	500	587	1750	<0,01
43	266 (47100), 302 (43120), 345 (51770), 499 (35980), 541 (44030)	540	586 668	266 (82 %) 10 (18 %) 1230	<0,01 <0,01
44^b	254 (41080), 310 (18100), 373 (4970)	380	586	280	0,11
45	208 (72760), 239 (55160), 292 (38590), 302 (41160), 380 ^h (8920)	380	580	633	0,17
46^b	270 (31735), 309 (28953), 409 (6882)	365	524, 560 ^h	n.d.	0,03
47	309 (32000), 325 (30170), 377 (13970), 427 (11900)	370	575 621 ^h	4940	0,36
48	269 (31470), 307 (34230), 352 (38060), 386 (34190), 405 (32290), 450 ^h (22030)	470	669	1240	<0,01

^aTiempos de vida y rendimientos cuánticos de emisión medidos en ausencia de oxígeno. ^bValores obtenidos de la bibliografía.^{17,26,27} n.d.: no determinado.

6.2.4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

Tras finalizar la caracterización estructural y previo al estudio de las propiedades biológicas *in vitro*, se llevaron a cabo los estudios de estabilidad y fotoestabilidad de los nuevos complejos. En primer lugar, se estudió la estabilidad en DMSO, pues como se ha mencionado en los capítulos anteriores, es el disolvente utilizado para introducir los compuestos en el medio celular. Para ello, se registraron los espectros de ^1H -RMN a tiempo inicial y tras 48 h de incubación a temperatura ambiente (**Figura 6.9** para **42** y **47**, y **Figuras A5.23-A5.30** para el resto). En todos los casos, los espectros permanecen inalterados, confirmando así la estabilidad de los complejos en las condiciones ensayadas. A continuación, se verificó la estabilidad en medio de cultivo RPMI (5 % DMSO) tras 48 h de incubación a 37 °C, mediante espectroscopía de absorción UV/Vis (**Figura 6.9** para **42** y **47**, y **Figuras A5.31-A5.32** para el resto).

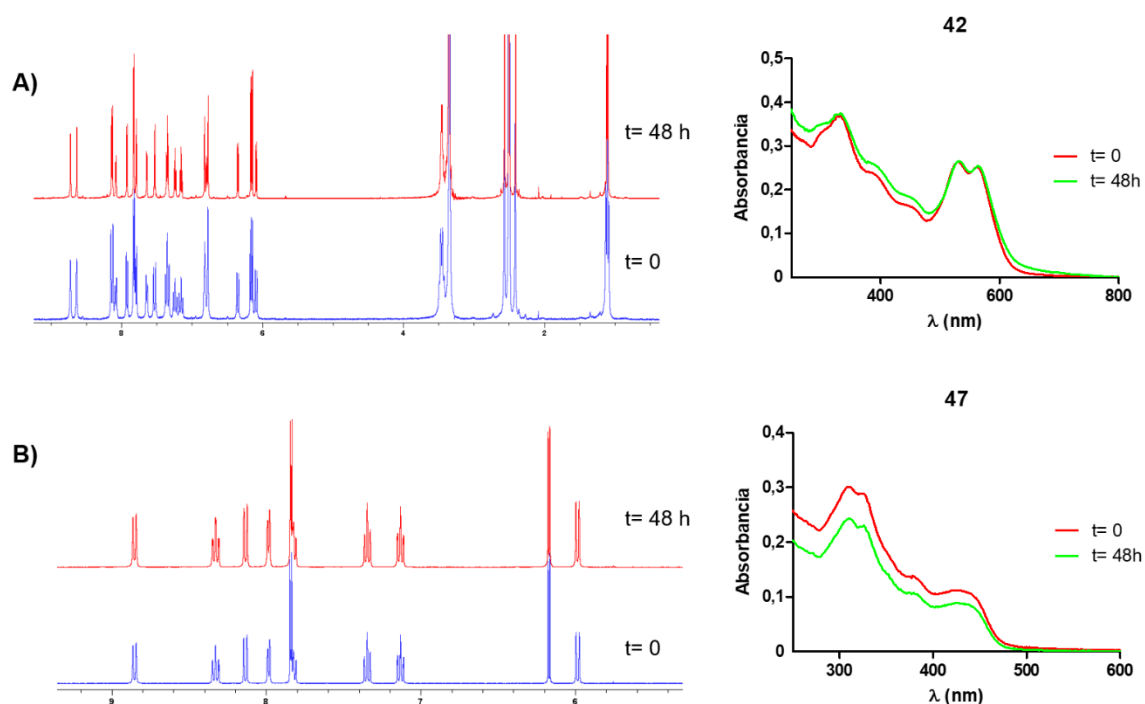


Figura 6.9. Estudios de estabilidad de los compuestos **42** (A) y **47** (B) en DMSO mediante ^1H -RMN tras 48 h de incubación a t.a., y en RPMI (5 % DMSO) mediante espectroscopía de absorción UV/Vis tras 48 h de incubación a 37 °C.

Por su parte, la fotoestabilidad de los compuestos **39-43** se evaluó con luz verde (520 nm, 1,8 mW/cm²), mientras que los compuestos **44-48** se estudiaron con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²). En ambos casos, se disolvieron en DMSO a una concentración 10 μM y se registraron los espectros de absorción UV/Vis al inicio y después de 2 h de irradiación a la longitud de onda indicada. Los resultados, presentados en las **Figuras 6.10, A5.33 y A5.34**, muestran que todos los complejos son estables en las condiciones

ensayadas, ya que los espectros de absorción permanecen inalterados en todos los casos.

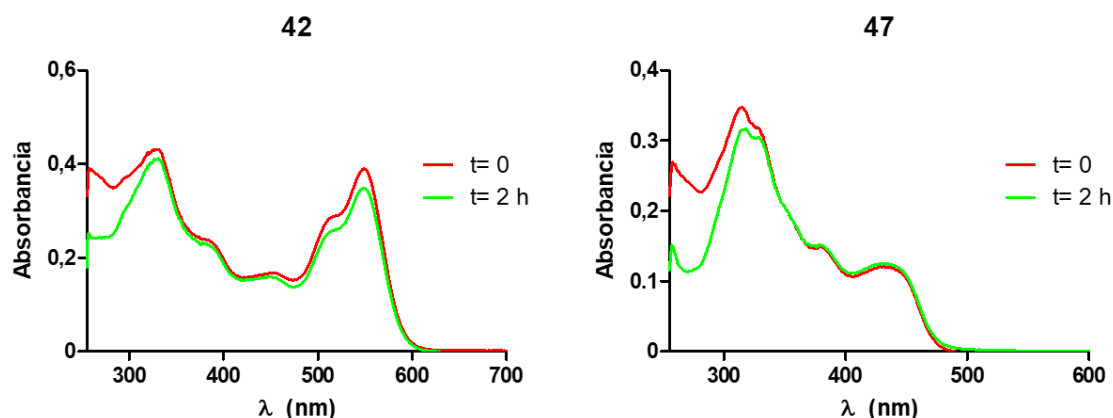


Figura 6.10. Espectros de absorción de los compuestos **42** y **47** (10 μM) en DMSO, a tiempo 0 y tras 2 h de irradiación con luz verde (**42**, 520 nm, 1,8 mW/cm^2) y luz azul (**47**, 465 nm, 4,0 mW/cm^2).

6.2.5. Estudios del mecanismo de PDT en medio libre de células

Como se ha mencionado a lo largo de los capítulos, para que un compuesto funcione eficazmente como fotosensibilizador en terapia fotodinámica, es esencial que tenga la capacidad de generar ROS cuando se irradia con luz de una longitud de onda específica.

Fotooxidación del NADH

Tal y como se describió en el Capítulo 5, se evaluó la capacidad de los compuestos **39-48** para generar ROS en presencia de luz de distinta longitud de onda. En primer lugar, se estudiaron con luz verde, puesto que los complejos **39-43** presentan unos valores altos de coeficiente de extinción en dicha región del espectro electromagnético (**Tabla 6.2**). Para ello, se prepararon disoluciones de **39-48** (5 μM) y de NADH (100 μM) en PBS (5 % DMF), y se registraron los espectros de absorción del NADH tras irradiar la disolución con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm^2) a distintos intervalos de tiempo (**Figuras 6.11**, **A5.36** y **A5.37**). En la **Figura 6.11** y la **Tabla 6.3** se puede observar que todos los compuestos que contienen el fragmento de cumarina son capaces de generar ROS en estas condiciones, mientras que de los que presentan el ligando bipyridina, solo el complejo **48** es capaz de generarlas. Las diferencias más destacables se observaron cuando el ligando C^N es 2-fenilpiridina, puesto que el valor de TOF aumenta de 0 a 292 h^{-1} al incorporar el fragmento de cumarina en el ligando N^N.

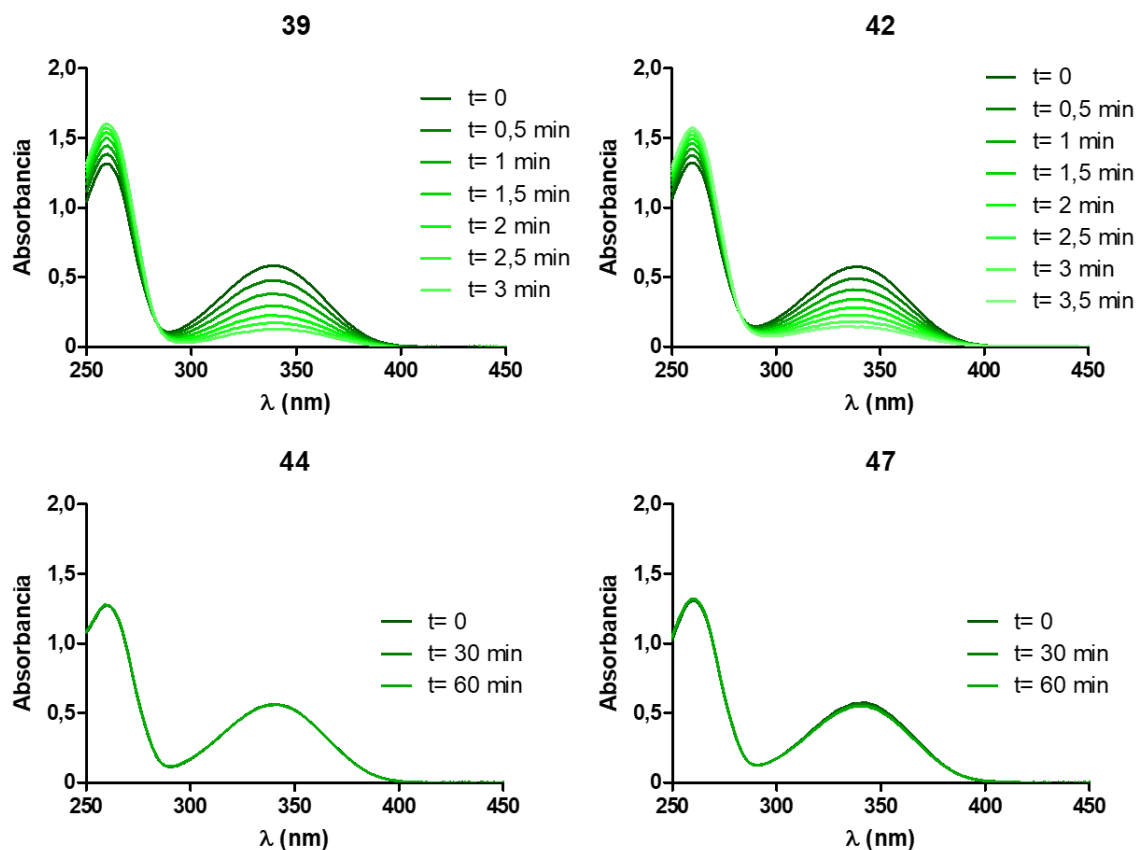


Figura 6.11. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **39**, **42**, **44** y **47** (5 μM) tras irradiar con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm^2).

Por otro lado, para verificar la capacidad de **44-48** para generar ROS con una luz más energética, se estudió la fotooxidación del NADH en presencia de dichos complejos tras irradiar con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm^2). En las **Figuras 6.12** y **A5.38** se observa que todos los complejos generan ROS en estas condiciones y en la **Tabla 6.3** se presentan los valores de TOF, que oscilan entre 0,45 y 49,89 h^{-1} . Por su parte, se evaluó la fotooxidación del NADH en presencia de los compuestos **39-43** utilizando luz roja (620 nm, 15 mW/cm^2), ya que, a diferencia de sus análogos sin funcionalizar, muestran absorción en dicha región del espectro UV/Vis (**Figura 6.5**). La eficacia para generar ROS se ve afectada al utilizar esta luz menos energética, lo que está directamente relacionado con su menor capacidad de absorción en dicha región del espectro electromagnético (**Figura 6.12** para **39** y **42**, y **Figura A5.39** para el resto).

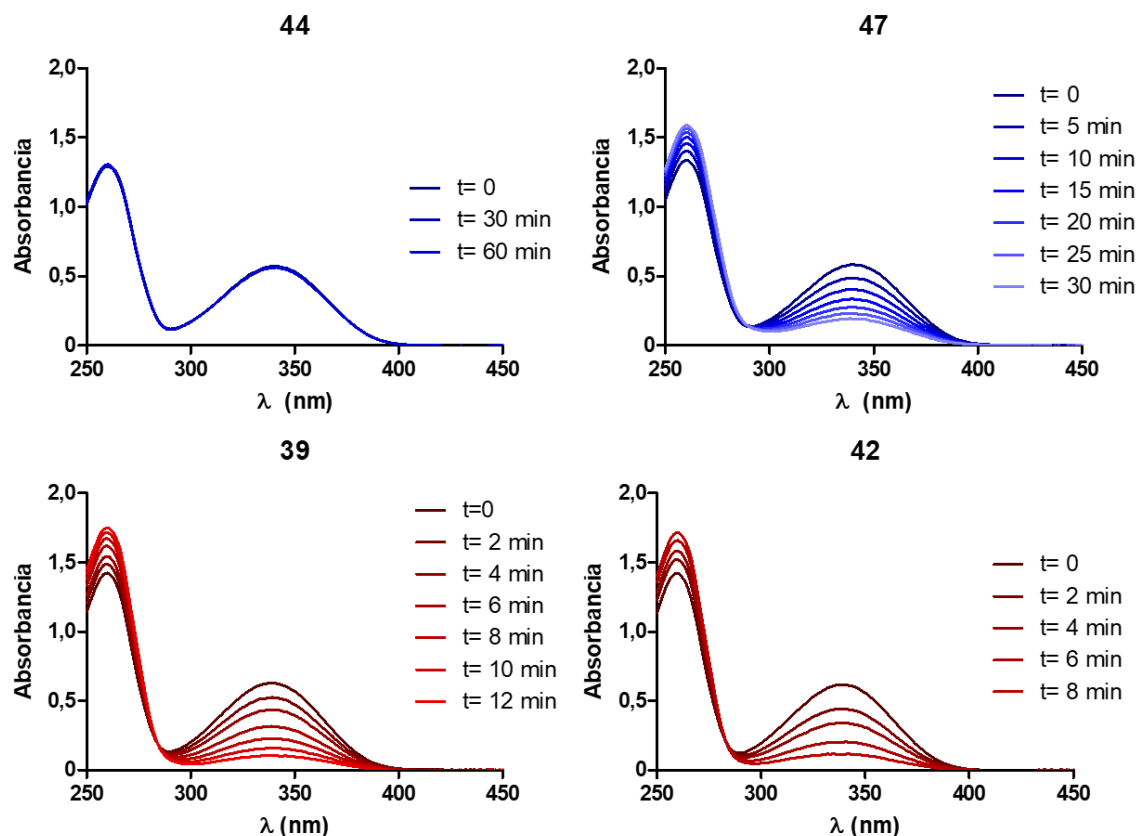


Figura 6.12. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **44** y **47** (5 μM) tras irradiar con luz azul (4 mW/cm^2), y de los compuestos **39** y **42** (5 μM) tras irradiación con luz roja (15 mW/cm^2).

Tabla 6.3. Valores de frecuencia de recambio (TOF) de los compuestos **39-48**.

Compuesto	TOF (h^{-1})		Compuesto	TOF (h^{-1})	
	$\lambda = 620 \text{ nm}^a$	$\lambda = 520 \text{ nm}^b$		$\lambda = 465 \text{ nm}^c$	$\lambda = 520 \text{ nm}^b$
39	84,35	292,09	44	0,45	0
40	9,42	29,79	45	7,04	0,50
41	126,61	242,12	46	18,98	0,73
42	121,47	237,90	47	25,07	0,75
43	19,19	54,80	48	49,89	3,57

^aPotencia luz roja: 15 mW/cm^2 . ^bPotencia luz verde: 2 mW/cm^2 . ^cPotencia luz azul: 4 mW/cm^2 .

Mecanismo tipo II. Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

A continuación, se investigó el tipo específico de ROS que producen los compuestos en medio libre de células, con el fin de esclarecer el mecanismo de fotoactivación. Primero, se calcularon los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de **39-43** tras la irradiación con luz verde (520 nm) en acetonitrilo, siguiendo el método indirecto descrito en capítulos anteriores. De esta forma, se prepararon disoluciones de

DPBF (50 μM) en presencia de **39-43**, y se registraron sus espectros de absorción tras irradiar con luz en un intervalo de tiempo dado (**Figura 6.13** y **A5.40**). En cuanto a los complejos con 2,2'-bipiridina (**44-48**), su capacidad de generación de oxígeno singlete se estudió con luz azul (**Figura 6.13** y **A5.41**). Cabe mencionar que la concentración de los complejos se ajustó de forma que la absorbancia a la longitud de irradiación fuese similar a la del patrón.

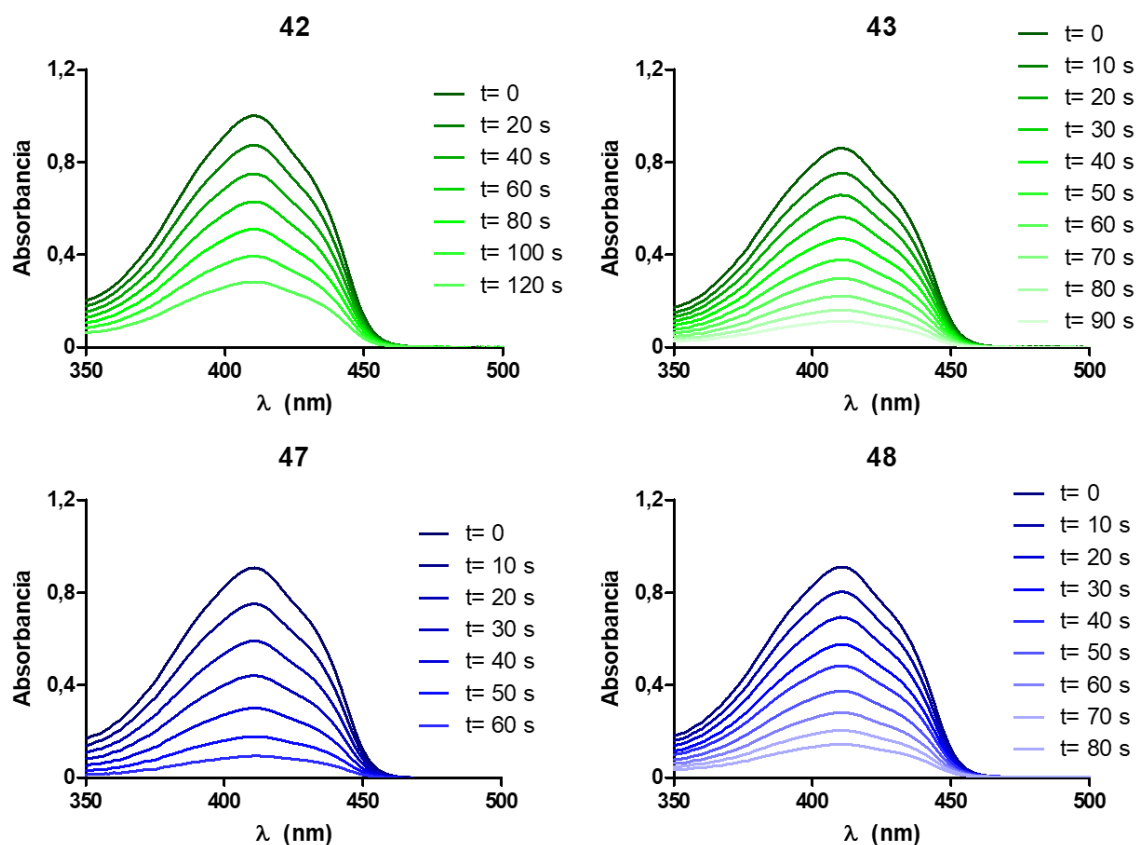


Figura 6.13. Espectro de absorción del DPBF en acetonitrilo aireado presencia de **42-43** y **47-48** tras la irradiación con luz verde (0,5 mW/cm² para **42** y **43**) o azul (0,5 mW/cm² para **47** y **48**).

En la **Figura 6.14** se muestra la variación de la absorbancia del DPBF a 411 nm frente al tiempo de irradiación. De esta gráfica se obtienen rectas cuyas pendientes permiten calcular los rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singlete, utilizando la **Ecuación 4.1**. Para calcular el rendimiento cuántico, se utilizó [Ru(bpy)₃]Cl₂ como referencia ($\Phi_{\Delta} = 0,57$). En la **Tabla 6.4** se presentan los valores de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete para los complejos **39-48**. De los compuestos con cumarina (**39-43**) destacan **42** y **43**, que contienen el fragmento de tienilo en su estructura y presentan valores de rendimiento cuántico de 0,46 y 0,79, respectivamente. Por otro lado, en los complejos **44-48** se puede observar una fuerte correlación con los valores obtenidos en los tiempos de vida (**Tabla 6.2**), donde el complejo **47** es el que posee un mayor rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (0,95) y de tiempo de vida

(4,94 μ s). Además, en los estudios *in vitro*, dicho complejo es el más fototóxico de los complejos sin funcionalizar (**44-48**). Estos hallazgos sugieren que, a diferencia de los complejos **39-43**, los análogos con bpy siguen preferentemente el mecanismo tipo II de la PDT al fotoactivarse.

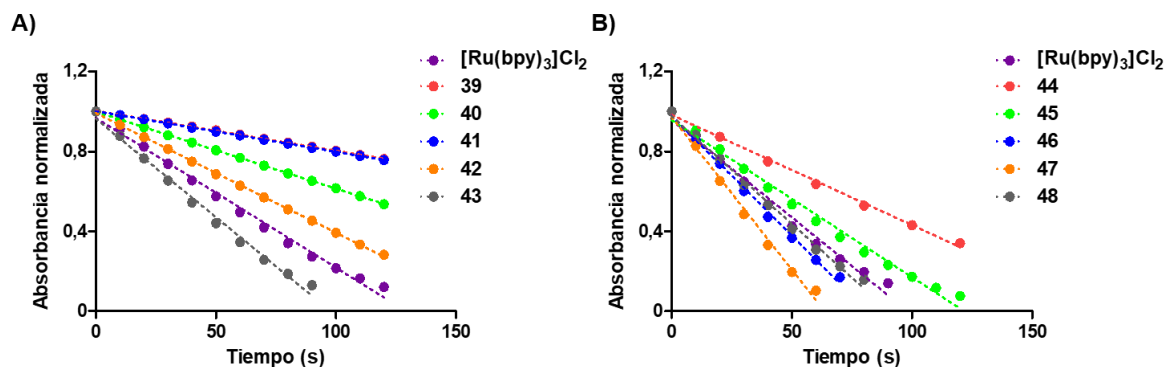


Figura 6.14. Representación de la absorbancia normalizada a 411 nm frente al tiempo de irradiación del DPBF en presencia de los compuestos **39-48** y la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ con luz verde.

Tabla 6.4. Valores de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ) de los compuestos **38-47** en las condiciones ensayadas.

Compuesto	Φ_Δ^a	Compuesto	Φ_Δ^b
39	0,31	44	0,38
40	0,16	45	0,50
41	0,15	46	0,75
42	0,46	47	0,95
43	0,79	48	0,67

^aPotencia luz verde: 0,5 mW/cm². ^bPotencia luz azul: 0,5 mW/cm².

Mecanismo tipo I. Generación de radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$

Por otro lado, se investigó la capacidad de los compuestos para generar radicales hidroxilo, un tipo específico de ROS de tipo I, en PBS (5 % DMF), siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 4. Para ello, se prepararon disoluciones de HPF (10 μM) en presencia de los compuestos **39-48** (10 μM), y se registró el espectro de emisión a tiempo inicial y tras la irradiación con luz verde en un intervalo de tiempo de 0-10 minutos. En las **Figuras 6.15** y **A5.42** se observa que todos los compuestos con cumarina (**39-43**) son capaces de generar radicales hidroxilo bajo estas condiciones. Sin embargo, entre los compuestos que contienen bpy, solo el complejo **48** es capaz de generar dicha especie citotóxica, posiblemente debido a su mayor absorción en la región verde del espectro electromagnético (**Figura 6.15** para **44** y **47**, y **Figura A5.43** para el resto).

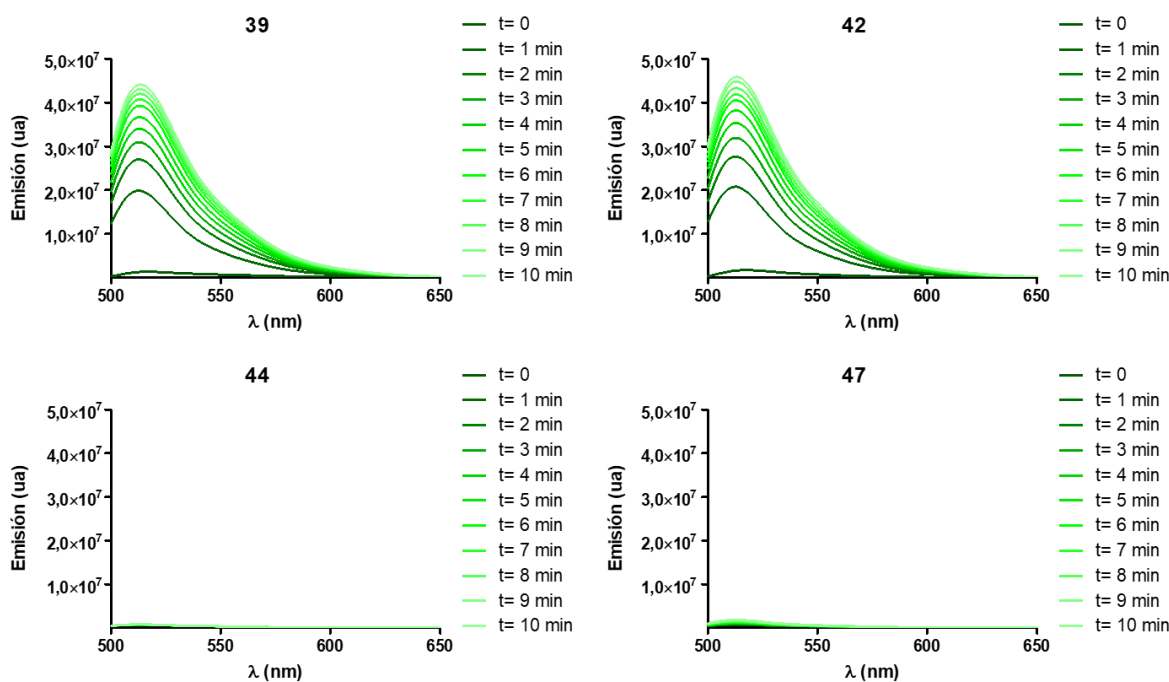


Figura 6.15. Espectro de emisión de la HPF en presencia de los complejos **39**, **42**, **44** y **47** tras irradiar con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo de 0-10 min.

La generación de radicales hidroxilo por parte de los compuestos con bpy (**44-48**) también se estudió con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²). En las **Figuras 6.16** y **A5.44** se observa que todos ellos, excepto el complejo **44**, son capaces de generar radicales hidroxilo en estas condiciones, lo que nuevamente pone de manifiesto que la luz verde no es adecuada para activar estos compuestos, ya que no absorben en dicha región del espectro UV/Visible.

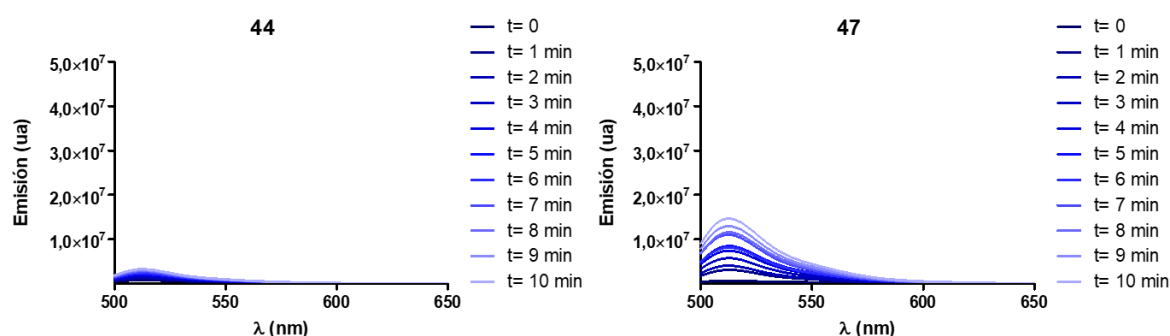


Figura 6.16. Espectro de emisión de la HPF (10 μM) en presencia de los complejos **44** y **47** (10 μM) tras irradiar con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo de 0-10 min. λ_{ex} : 490 nm.

En la **Figura 6.17** se muestra la representación de la emisión normalizada respecto al tiempo de irradiación, lo que permite concluir que de los complejos **39-43**, **41** es el mayor productor de radicales hidroxilo, mientras que de los complejos **44-48**, el compuesto **48** es el único capaz de generar esta especie citotóxica con ambas luces.

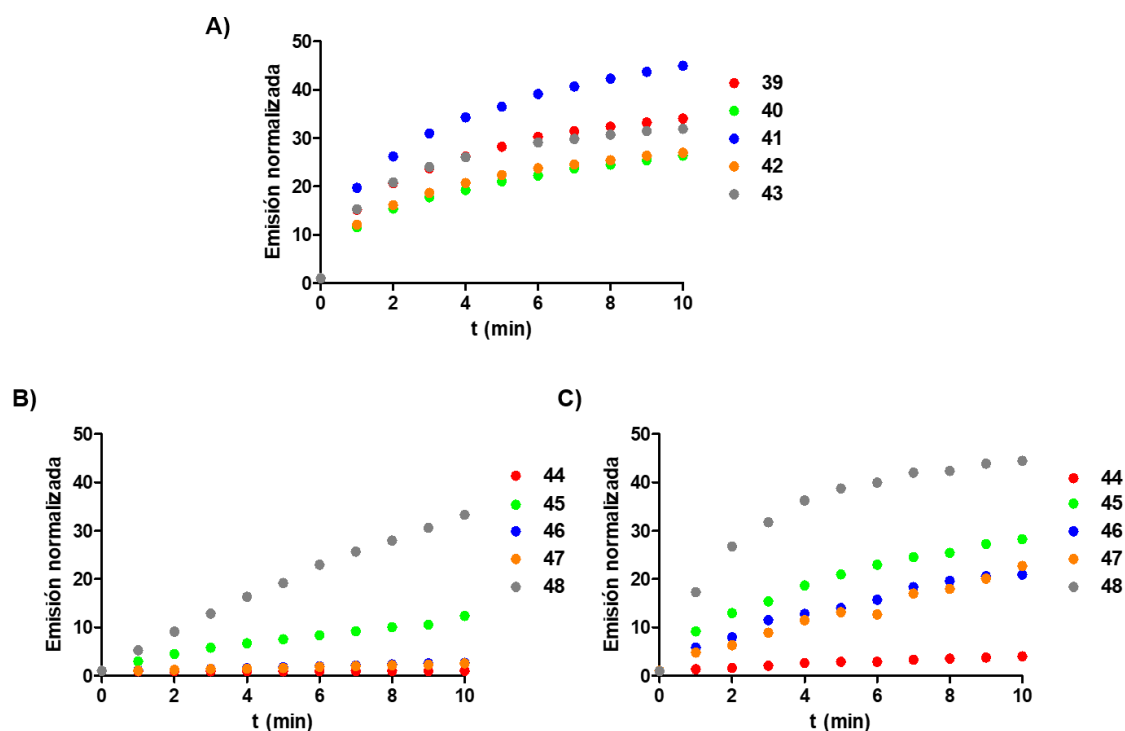


Figura 6.17. Emisión normalizada de la HPF a 514 nm frente al tiempo de exposición a la luz en presencia de los complejos **39-48**. **A** y **B**) Luz verde (520, 2,0 mW/cm² y **C**) luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²).

6.3. Estudios biológicos

Uno de los objetivos del presente capítulo fue evaluar el potencial de los nuevos compuestos de Ir(III) como agentes fotosensibilizadores. Para ello, se llevaron a cabo estudios *in vitro*, los cuales fueron realizados por Pezhman Ashoo, miembro de nuestro grupo de investigación.

6.3.1. Viabilidad celular

La actividad de los complejos **39-48** se evaluó en células HeLa y A375, tanto en oscuridad como tras la irradiación de luz verde. En condiciones de oscuridad, los compuestos muestran un efecto citotóxico muy variado sobre la viabilidad y proliferación de las células A375 y HeLa, ya que los compuestos **40** y **43** no muestran citotoxicidad en ausencia de luz, mientras que el compuesto **39** presenta un IC₅₀ en el rango submicromolar. Tras irradiar con luz verde, todos los compuestos muestran una actividad citotóxica potenciada, con valores de IC₅₀ en el rango nanomolar o micromolar. Los compuestos más prometedores de la serie son **40** y **42**, con valores de PI >200 y >64 en células A375, respectivamente. Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos para los compuestos **39-43** con sus análogos que contienen bipyridina (**44-48**), se observa que los valores de PI son mayores en todos los casos. Esto indica que la cumarina desempeña un papel crucial en las propiedades biológicas de los complejos de iridio.

Tabla 6.5. Valores de IC₅₀ (μM) obtenidos para células tratadas con los complejos de iridio, irradiadas con luz verde (1 h, λ_{máx} = 520 nm, 1,3 mW/cm²) o sin irradiar.^a

Compuesto	A375			HeLa		
	Oscuridad	Luz verde	PI	Oscuridad	Luz verde	PI
39	0,103 ± 0,006	0,009 ± 0,003	11,4	0,111 ± 0,007	0,010 ± 0,002	11,1
40	>100	0,5 ± 0,2	> 200	>100	0,8 ± 0,2	>125
41	3,3 ± 1,0	0,097 ± 0,017	34,0	1,6 ± 0,3	0,085 ± 0,015	18,8
42	4,8 ± 0,5	0,075 ± 0,007	64,0	2,1 ± 0,5	0,095 ± 0,012	22,1
43	>100	9,3 ± 0,9	>10,8	>100	6,4 ± 0,7	>15,6
44	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,5	0,8	19,7 ± 5,4	13,6 ± 4,5	1,4
45	3,4 ± 0,7	0,98 ± 0,16	3,7	>100	19,4 ± 9,2	>5,2
46	0,30 ± 0,09	0,082 ± 0,010	3,7	1,9 ± 0,4	0,300 ± 0,055	6,3
47	0,50 ± 0,06	0,093 ± 0,007	5,4	2,5 ± 0,2	0,146 ± 0,011	17,1
48	15,3 ± 3,2	3,9 ± 0,2	3,9	17,5 ± 4,0	2,7 ± 0,3	6,5

^aLos datos se expresan como valores medios ± DE de, al menos, tres medidas independientes.

Asimismo, se determinaron los valores de IC₅₀ de **39-43** en células A375 y HeLa tras la irradiación con luz roja (λ_{máx} = 620 nm, 15 mW/cm²). En la **Tabla 6.6** se observa que todos los compuestos también se fotoactivan con luz roja, aunque su fotoactividad es menor en comparación con la verde. Esto se debe a la menor absorción de los complejos en esa longitud de onda, lo que limita su capacidad de activación. Pese a esto, el compuesto **42** muestra un valor de PI relevante. Este hallazgo abre la posibilidad de utilizar una longitud de onda más larga para activar este complejo, lo que podría tener aplicaciones importantes en tratamientos que requieren una penetración más profunda de la luz en los tejidos.

Tabla 6.6. Valores de IC₅₀ (μM) obtenidos para células tratadas con los complejos de iridio, irradiadas con luz roja (1 h, λ_{máx} = 620 nm, 15 mW/cm²) o sin irradiar.^a

Compuesto	A375			HeLa		
	Oscuridad	Luz roja	PI	Oscuridad	Luz roja	PI
39	0,103 ± 0,006	0,028 ± 0,003	3,8	0,111 ± 0,007	0,026 ± 0,003	4,3

40	>100	7,7 ± 08	13,0	>100	12,0 ± 1,9	8,3
41	3,3 ± 1,0	0,588 ± 0,049	5,6	1,6 ± 0,3	0,131 ± 0,013	12,2
42	4,8 ± 0,5	0,123 ± 0,007	39,0	2,1 ± 0,5	0,127 ± 0,014	16,5
43	>100	10,9 ± 2,4	9,17	>100	6,4 ± 0,7	>15,6

^aLos datos se expresan como valores medios ± DE de, al menos, tres medidas independientes.

6.3.2. Acumulación intracelular

A continuación, se evaluó la acumulación intracelular de los nuevos complejos de iridio en células de melanoma, puesto que la captación celular es fundamental para que un fármaco ejerza su actividad citotóxica. Para ello, se determinó el contenido de iridio intracelular mediante ICP-MS en células tratadas con los compuestos durante 1 h a una concentración de 10 μM (**Figura 6.18**).

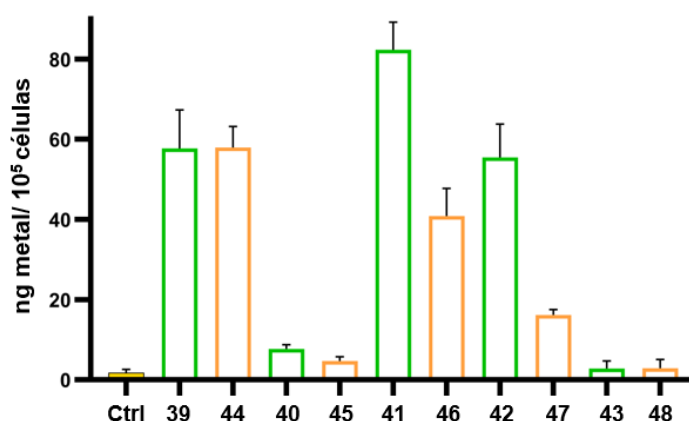


Figura 6.18. Acumulación intracelular de iridio en células A375 tratadas con los compuestos **39-48** (10 μM) durante 1 h. La acumulación de Pt en cisplatino se utilizó como control positivo. Los datos de la concentración de iridio intracelular se representan como la media ± DE de dos ensayos independientes.

En todos los casos el fragmento de cumarina mejora la acumulación de los complejos en el interior celular. Además, se observa una diferencia significativa en la acumulación intracelular según el ligando C^N, siendo los compuestos que contienen los ligandos 2-fenilpiridina y 2-fenilbenzotiazol los que se acumulan con mayor facilidad. En resumen, la captación celular de los compuestos **39-43** sigue el siguiente orden: **41** > **39** ≈ **42** > **40** > **43**. Es importante señalar que los dos compuestos que menos se acumulan en las células (**40** y **43**) son los que presentan un IC₅₀ mayor en condiciones de oscuridad (>100 μM).

6.4. Resumen

En el presente capítulo se ha descrito la síntesis y caracterización de una serie de complejos octaédricos de Ir(III), de tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{OTf}$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ corresponde a los ligandos 2-fenilpiridina, 2-fenilbenzimidazol, 2-fenilbenzotiazol, 2-(2-tienil)benzotiazol y 2-(5-(4-(trifluorometil)fenil)tiofen-2-il)benzotiazol, preparado en el Capítulo 5. Todos los compuestos se han caracterizado mediante diversas técnicas espectroscópicas y se han investigado sus propiedades fotofísicas en acetonitrilo.

Se ha demostrado la estabilidad de los compuestos en DMSO y medio de cultivo RPMI (5 % DMSO) en oscuridad, y su fotoestabilidad bajo luz verde (**39-43**) o azul (**44-48**). También se ha investigado su eficacia como fotosensibilizadores en medios libres de células, demostrando que los compuestos con cumarina (**39-43**) son capaces de oxidar el NADH bajo la irradiación con luz verde y roja, mientras que de sus análogos con bipyridina, solo el compuesto **48** es capaz de oxidar el NADH con luz verde. Además, se ha comprobado mediante métodos espectroscópicos que todos los conjugados con cumarina (**39-43**) generan diferentes tipos de ROS, como oxígeno singlete y radicales hidroxilo, cuando se irradian con luz verde. Esto podría ayudar a superar las limitaciones de los fotosensibilizadores convencionales en entornos con bajo contenido de oxígeno. Los compuestos con 2,2'-bipyridina también son capaces de generar ambos tipos de ROS, aunque lo hicieron con luz azul.

Por su parte, los complejos exhiben una fototoxicidad muy variada al irradiar con luz verde, destacando los complejos **40** y **42** como los más prometedores de la serie en células A375, con valores de PI >200 y 64, respectivamente. El complejo **42** también muestra un valor de PI relevante al ser irradiado con luz roja (PI= 39). Es importante resaltar que la introducción del fragmento de cumarina mejora tanto la captación intracelular de los complejos como su fotoeficacia al tratar células cancerosas.

6.5. 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) Jones, C.; Martinez-Alonso, M.; Gagg, H.; Kirby, L.; Weinstein, J. A.; Bryant, H. E. Photostable Iridium(III) Cyclometallated Complex Is an Efficient Photosensitizer for Killing Multiple Cancer Cell Lines and 3D Models under Low Doses of Visible Light. *J. Med. Chem.* **2024**, *67* (18), 16157–16164. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00869>.
- (3) Vigueras, G.; Markova, L.; Novohradsky, V.; Marco, A.; Cutillas, N.; Kosthunova, 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>.
- (4) Liang, G.; Montesdeoca, N.; Tang, D.; Wang, B.; Xiao, H.; Karges, J.; Shang, K. Facile One-Pot Synthesis of Ir(III) Bodipy Polymeric Gemini Nanoparticles for Tumor Selective NIR Photoactivated Anticancer Therapy. *Biomaterials* **2024**, *309*, 122618. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122618>.
 - (5) Bonelli, J.; Ortega-Forte, E.; Vigueras, G.; Follana-Berná, J.; Ashoo, P.; Abad-Montero, D.; Isidro, N.; López-Corrales, M.; Hernández, A.; Ortiz, J.; Izquierdo-García, E.; Bosch, M.; Rocas, J.; Sastre-Santos, Á.; Ruiz, J.; Marchán, V. A Nanoencapsulated Ir(III)-Phthalocyanine Conjugate as a Promising Photodynamic Therapy Anticancer Agent. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2024**, *16* (30), 38916–38930. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c05181>.
 - (6) Zhao, J.; Yan, K.; Xu, G.; Liu, X.; Zhao, Q.; Xu, C.; Gou, S. An Iridium(III) Complex Bearing a Donor–Acceptor–Donor Type Ligand for NIR-Triggered Dual Phototherapy. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31* (11), 2008325. <https://doi.org/10.1002/adfm.202008325>.
 - (7) Carneiro, A.; Matos, M. J.; Uriarte, E.; Santana, L. Trending Topics on Coumarin and Its Derivatives in 2020. *Molecules* **2021**, *26* (2), 501. <https://doi.org/10.3390/molecules26020501>.
 - (8) Al-Warhi, T.; Sabt, A.; Elkaeed, E. B.; Eldehna, W. M. Recent Advancements of Coumarin-Based Anticancer Agents: An up-to-Date Review. *Bioorg. Chem.* **2020**, *103*, 104163. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104163>.
 - (9) Fan, Y.; Wu, Y.; Hou, J.; Wang, P.; Peng, X.; Ge, G. Coumarin-Based near-Infrared Fluorogenic Probes: Recent Advances, Challenges and Future Perspectives. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *480*, 215020. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215020>.
 - (10) Yadav, A. K.; Upadhyay, A.; Bera, A.; Kushwaha, R.; Mandal, A. A.; Acharjee, S.; Kunwar, A.; Banerjee, S. Anticancer Profile of Coumarin 6-Based Ir(III) Photocatalysts under Normoxia and Hypoxia by ROS Generation and NADH Oxidation. *Inorg. Chem. Front.* **2024**, *11* (17), 5435–5448. <https://doi.org/10.1039/D4QI01601G>.
 - (11) Photodynamic Effect of Light-Harvesting, Long-Lived Triplet Excited State Ruthenium(II)-Polyimine-Coumarin Complexes: DNA Binding, Photocleavage and Anticancer Studies. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.123>.
 - (12) Sun, J.; Wu, W.; Guo, H.; Zhao, J. Visible-Light Harvesting with Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Long-Lived 3IL Excited States and Their Application in Triplet–Triplet–Annihilation Based Upconversion. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011* (21), 3165–3173. <https://doi.org/10.1002/ejic.201100501>.
 - (13) Novohradsky, V.; Rovira, A.; Hally, C.; Galindo, A.; Vigueras, G.; Gandioso, A.; Svitelova, M.; Bresolí-Obach, R.; Kostrhunova, H.; Markova, L.; Kasparkova, J.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Brabec, V.; Marchán, V. Towards Novel Photodynamic Anticancer Agents Generating Superoxide Anion Radicals: A Cyclometalated Ir(III) Complex Conjugated to a Far-Red Emitting Coumarin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (19), 6311–6315. <https://doi.org/10.1002/anie.201901268>.
 - (14) Rovira, A.; Ortega-Forte, E.; Hally, C.; Jordà-Redondo, M.; Abad-Montero, D.; Vigueras, G.; Martínez, J. I.; Bosch, M.; Nonell, S.; Ruiz, J.; Marchán, V. Exploring Structure–Activity Relationships in Photodynamic Therapy Anticancer Agents Based on Ir(III)-COUPY Conjugates. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (12), 7849–7867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00189>.

- (15) 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>.
- (16) Kim, J. I.; Shin, I.-S.; Kim, H.; Lee, J.-K. Efficient Electrogenerated Chemiluminescence from Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1614–1615. <https://doi.org/10.1021/ja043721x>.
- (17) Wu, Y.; Jing, H.; Dong, Z.; Zhao, Q.; Wu, H.; Li, F. Ratiometric Phosphorescence Imaging of Hg(II) in Living Cells Based on a Neutral Iridium(III) Complex. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (16), 7412–7420. <https://doi.org/10.1021/ic102082k>.
- (18) Cao, J.-J.; Tan, C.-P.; Chen, M.-H.; Wu, N.; Yao, D.-Y.; Liu, X.-G.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Targeting Cancer Cell Metabolism with Mitochondria-Immobilized Phosphorescent Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 631–640. <https://doi.org/10.1039/C6SC02901A>.
- (19) Redrado, M.; Miñana, M.; Coogan, M. P.; Concepción Gimeno, M.; Fernández-Moreira, V. Tunable Emissive Ir(III) Benzimidazole-quinoline Hybrids as Promising Theranostic Lead Compounds. *ChemMedChem* **2022**, *17* (18), e202200244. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200244>.
- (20) Millán, G.; Nieddu, M.; López, I. P.; Ezquerro, C.; Berenguer, J. R.; Larráyo, I. M.; Pichel, J. G.; Lalinde, E. A New Family of Luminescent Iridium Complexes: Synthesis, Optical, and Cytotoxic Studies. *Dalton Trans.* **2023**, *52* (19), 6360–6374. <https://doi.org/10.1039/D3DT00028A>.
- (21) Scattergood, P. A.; Ranieri, A. M.; Charalambou, L.; Comia, A.; Ross, D. A. W.; Rice, C. R.; Hardman, S. J. O.; Heully, J.-L.; Dixon, I. M.; Massi, M.; Alary, F.; Elliott, P. I. P. Unravelling the Mechanism of Excited-State Interligand Energy Transfer and the Engineering of Dual Emission in $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ Complexes. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (3), 1785–1803. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03003>.
- (22) Lo, K. K.-W. Luminescent Rhenium(I) and Iridium(III) Polypyridine Complexes as Biological Probes, Imaging Reagents, and Photocytotoxic Agents. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (12), 2985–2995. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00211>.
- (23) Insights into the Anticancer Photodynamic Activity of Ir(III) and Ru(II) Polypyridyl Complexes Bearing β -Carboline Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *276*, 116618. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116618>.
- (24) Redrado, M.; Romanos, E.; Benedi, A.; Canudo-Barreras, G.; Marzo, I.; Gimeno, M. C.; Fernández-Moreira, V. Synthetic Ease and Exceptional *in Vivo* Performance of Pyrazole-Based Cyclometallated Iridium Complexes. *Inorg. Chem. Front.* **2024**, *11* (6), 1828–1838. <https://doi.org/10.1039/D3QI02355A>.
- (25) Choroba, K.; Palion-Gazda, J.; Penkala, M.; Rawicka, P.; Machura, B. Tunability of Triplet Excited States and Photophysical Behaviour of Bis-Cyclometalated Iridium(III) Complexes with Imidazo[4,5-*f*][1,10]Phenanthroline. *Dalton Trans.* **2024**. <https://doi.org/10.1039/D4DT01996B>.
- (26) Alrawashdeh, L. R.; Cronin, M. P.; Woodward, C. E.; Day, A. I.; Wallace, L. Iridium Cyclometalated Complexes in Host–Guest Chemistry: A Strategy for Maximizing Quantum Yield in Aqueous Media. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (13), 6759–6769. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01037>.
- (27) Cao, R.; Jia, J.; Ma, X.; Zhou, M.; Fei, H. Membrane Localized Iridium(III) Complex Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (9), 3636–3644. <https://doi.org/10.1021/jm4001665>.

Capítulo 7

Conclusiones

1. Se han desarrollado nuevos complejos semisándwich de Os(II), de tipo $[\text{Os}(p\text{-cimeno})(\text{N}^{\wedge}\text{N}')\text{Cl}]\text{PF}_6$, utilizando como ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}'$ un quelato derivado de 2-(1-aril)-1,2,3-triazol-4-il)benzotiazol. Las estructuras moleculares de los complejos **8** y **10** obtenidas mediante difracción de rayos X confirman las estequiometrias propuestas. Las propiedades fotofísicas ponen de manifiesto la influencia de los sustituyentes electrodonadores o electroretiradores en las bandas de absorción y de emisión de los compuestos. En particular, el compuesto **10** destaca por su mayor intensidad de absorción en la banda de menor energía y por presentar una emisión desplazada hacia longitudes de onda más largas en comparación con los demás complejos de la serie. Todos los compuestos son estables en DMSO y en una mezcla DMSO:H₂O (2:1), aunque el complejo **10** se hidroliza presencia de un 95% de agua. Los complejos interaccionan con la seroalbúmina, siendo el que contiene el sustituyente electrodonador (-NMe₂, **10**) el que presenta mayor afinidad por la proteína. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* llevados a cabo en diversas líneas celulares indicaron que el complejo **10** es el más activo de la serie. Este se acumula de forma inespecífica en diversos orgánulos, induce el daño mitocondrial, y provoca la detención del ciclo celular en la fase G1. Finalmente, los complejos muestran citotoxicidad en CSC de rabdomiosarcoma en forma de esferoides 3D, comparable o incluso superior a la observada en células diferenciadas.
2. Se han preparado y caracterizado nuevos complejos octaédricos de Os(II), del tipo $[\text{Os}(\text{C}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]\text{OTf}$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ representa un ligando basado en fenilbenzimidazol con un sustituyente dador (-NMe₂), aceptor (-CF₃) o sin sustituyente, y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ corresponde a 2,2'-bipiridina o dipirido(3,2-f:2',3'-h)quinoxalina. La estructura molecular de **17** es la primera descrita para este metal y estequiometría, y confirma la estequiometría propuesta. Todos los complejos son absorbentes pancromáticos y son estables en medio de cultivo y en DMSO, tanto en condiciones de oscuridad como tras la irradiación con luz verde. Además, son capaces de interaccionar eficazmente con la seroalbúmina, siendo el complejo **17** el que destaca por su mayor afinidad por la proteína. Se ha evaluado la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer 2D y 3D en condiciones de oscuridad y todos ellos presentan mayor toxicidad que el cisplatino. En concreto, el complejo **17** destaca por ser el más activo de la serie. En cuanto al mecanismo de acción, los complejos activan la vía del estrés del retículo endoplásmico en células cancerosas y alteran la homeostasis del calcio.

3. Se ha desarrollado y caracterizado una nueva serie de complejos de Ru(II) del tipo $[Ru(C^N)(N^N)_2]OTf$, análogos de los preparados en el capítulo anterior. Todos los complejos absorben luz hasta los 750 nm, son estables en distintos medios, fotoestables tras la irradiación con luz verde e interaccionan eficazmente con la seroalbúmina. Asimismo, los estudios de generación de ROS en medios libres de células indican que los compuestos son capaces de generar oxígeno singlete tras la irradiación con luz verde, aunque con valores de rendimientos cuánticos de oxígeno singlete bajos. Además, los compuestos **21** y **23**, con el sustituyente $-CF_3$, son también capaces de generar radicales hidroxilo tras la irradiación. La fototoxicidad de los complejos se evaluó en un panel de líneas celulares, destacando **21** como el más fototóxico de la serie. En cuanto al mecanismo de acción en células HeLa, los complejos de rutenio se acumulan en compartimentos ricos en membranas y producen ROS tras la irradiación con luz verde. El complejo **21**, tras la irradiación, induce la muerte celular mediante oncosis, altera las membranas fosfolípicas, provoca la despolarización de la membrana mitocondrial, así como la desnaturalización de las proteínas de membrana.

4. Se han sintetizado y caracterizado nuevos complejos octaédricos de Ir(III), de tipo $[Ir(C^N)_2(N^N)]OTf$, donde N^N es la dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina y C^N son cuatro ligandos ciclometalados derivados de benzotiazol o N-[(trifluorometil)bencil]-1H-benzo[d]imidazol. La introducción del sustituyente dador de electrones ($-NMe_2$) provoca un aumento en la intensidad de absorción, así como un ligero desplazamiento batocrómico de la banda de menor energía, en comparación con sus análogos con el sustituyente retirador de electrones ($-CF_3$). Todos los complejos son estables en medio de cultivo y en DMSO, tanto en condiciones de oscuridad como tras la irradiación con luz azul, y son capaces de oxidar catalíticamente el NADH y de generar oxígeno singlete y radicales hidroxilo en medios libres de células tras la irradiación con luz azul. La fototoxicidad de los compuestos fue evaluada con luz azul en distintas líneas celulares, destacando el complejo **30** como el más fototóxico en células HeLa ($PI > 160$). En cuanto a su mecanismo de acción, se acumulan preferentemente en los lisosomas y, tras la irradiación, inducen una fuga del contenido lisosomal hacia el citoplasma. Esto provoca la permeabilización de la membrana celular y conduce a la muerte celular por oncosis.

5. Se han sintetizado y caracterizado nuevos complejos octaédricos de Ir(III), de tipo $[Ir(C^N)_2(N^N)]OTf$ donde C^N es 2-fenilpiridina, 2-fenilbenzimidazol, 2-

fenilbenzotiazol, 2-(2-tienil)benzotiazol o 2-(5-(4-(trifluorometil)fenil)tiofen-2-il)benzotiazol y N^N es un ligando basado en 2,2'-bipiridina, sustituido con un fragmento de cumarina. Además, se han preparado también los análogos con el ligando 2,2'-bipiridina con fines comparativos. La introducción del fragmento de cumarina en el N^N modifica las propiedades fotofísicas de los complejos, especialmente la absorción. Todos los compuestos resultaron estables en medio de cultivo y en DMSO, tanto en oscuridad como bajo luz verde (**39-43**) o azul (**44-48**). Los nuevos compuestos son capaces de oxidar el NADH bajo la irradiación con luz verde y roja, mientras que, entre sus análogos con 2,2'-bipiridina, solo el compuesto **48** puede hacerlo bajo luz verde. Los complejos **39-43** también producen oxígeno singlete y radicales hidroxilo cuando se exponen a la luz verde. Finalmente, los estudios de fototoxicidad con luz verde en células HeLa y A375 revelaron que los nuevos complejos son fototóxicos. En particular, los complejos **40** y **42** destacan como los más prometedores en células A375, con valores de índices de fototoxicidad mayor de 200 y de 64, respectivamente. Además, el complejo **42** muestra un valor de PI significativo al ser irradiado con luz roja (PI=39), lo que sugiere la posibilidad de utilizar luces menos energéticas y más penetrantes para su fotoactivación.

Sección experimental

1. Materiales y reactivos

Los disolventes acetonitrilo, hexano, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, diclorometano, tolueno, dioxano, 2-etoxietanol y éter etílico fueron adquiridos a través de LabBox o de Scharlab (Barcelona, España). El metanol y etanol fueron adquiridos en J. Baker, y los disolventes deuterados a través de Euriso-top.

El nitrato de sodio, ácido clorhídrico, azida de sodio, alcohol propargílico, sulfato de cobre pentahidratado, ascorbato de sodio, terbutanol, cloruro de oxalilo, trietilamina, ácido trifluoroacético, α -terpineno, hexafluorofosfato de amonio, ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico, butilamina, zinc en polvo, formiato de amonio, ácido sulfúrico, bisulfito de sodio, benzaldehído, 3-bromobenzaldehído, carbonato de potasio, tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0), ácido 4-(N,N-dimetilamino)fenilborónico, ácido 4-(trifluorometil)fenilborónico, acetato de potasio, triflato de potasio, 5-bromotiofeno-2-carbaldehído, *o*-aminotiofeno, *o*-fenilendiamina, bromuro de 4-trifluorometilbencilo, diclorurobis(trifenilfosfina)paladio(II), carbonato de cesio, 1,10-fenantrolina, bromuro de potasio, 2-fenilpiridina, 2-fenilbenzimidazol, 2-fenilbenzotiazol, tiofeno-2-carboxaldehído y 2,2'-bipiridina fueron adquiridos a través de Merck (Madrid, España). El $\text{OsCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, el dímero de rutenio ($[\{\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Cl}(\mu\text{-Cl})\}_2]$) y el $\text{IrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fueron adquiridos a través de Johnson Matthey.

Las células RD y MRC5pd30 se adquirieron de ATCC (Manassas, VA, USA), las células HCT-116 y MCF-7 fueron suministradas por el Prof. Dr. Keppler de la universidad de Viena (Austria). Las células HeLa, PSN1, MDA-MB-231, MRC-5pd30, OE33 y A375 se adquirieron en la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC, Salisbury, Reino Unido). Los medios RPMI 1640 y DMEM, así como el FBS y la gentamicina se adquirieron en Biosera (Boussens, France). El PBS para los ensayos biológicos se obtuvo de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

2. Síntesis

2.1. Capítulo 2

Síntesis de los ligandos 2-(1-aryl)-1H-1,2,3-triazol-4-il)benzo[d]tiazoles 1-5

Los ligandos N^AN se obtuvieron siguiendo un procedimiento de cuatro etapas, descrito previamente en la bibliografía (**Esquemas 2.1 y 2.2.**).^{1,2} En primer lugar, la anilina correspondiente (10 mmol) se añadió sobre 10 mL de una disolución acuosa de ácido clorhídrico 6 M a 0 °C. A continuación, se añadieron (gota a gota) 20 mL de una disolución de nitrito de sodio (15 mmol) y se dejó reaccionar a 0 °C durante 1 h. Finalmente, se añadieron 30 mL de una disolución acuosa de azida de sodio (20 mmol) y la mezcla se

Sección experimental

dejó reaccionar primero durante 15 min a 0 °C y, después, durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, se llevó a cabo una extracción con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica se concentró a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía líquida, utilizando sílice como fase estacionaria y AcOEt/hexano (1:1 v:v) como eluyente.

En la segunda etapa, la azida correspondiente (8 mmol) se hizo reaccionar con alcohol propargílico (8,8 mmol), en presencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 % mol, 0,4 mmol) y ascorbato de sodio (8,8 mmol), en 16 mL de una mezcla $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v:v) bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 72 h. A continuación, se llevó a cabo una extracción con DCM (3x100 mL), la fase orgánica se recogió y se evaporó el disolvente. El crudo se purificó por cromatografía líquida en sílice con la mezcla AcOEt/hexano (4:1 v:v) como eluyente.

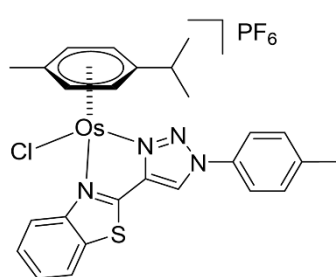
En la tercera etapa, se realizó una oxidación de Swern de los alcoholes obtenidos. Para ello, se disolvió cloruro de oxalilo (13 mmol) en 50 mL de DCM seco, en atmósfera de nitrógeno, y después la mezcla se enfrió a -78 °C. A continuación, se añadió el respectivo alcohol, disuelto en 100 mL de DCM y enfriado a -78 °C bajo atmósfera de nitrógeno, sobre la mezcla, con ayuda de una cánula de teflón, y se dejó reaccionar 15 min a dicha temperatura. Seguidamente, se añadió la trietilamina (50 mmol) y la mezcla se dejó reaccionar durante 15 min a -78 °C y, después, durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadieron 150 mL de una disolución saturada de NaHCO_3 y se llevó a cabo una extracción con DCM (3 x 100 mL). La fase orgánica se llevó a sequedad y se recristalizó con AcOEt/hexano.

En la última etapa se llevó a cabo una reacción de condensación entre el aldehído correspondiente (1 mmol) y el 2-aminotiofenol (1,1 mmol), en presencia de ácido trifluoroacético (0,25 mmol), empleando 100 mL de EtOH, a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con 5 mL de EtOH obteniéndose los compuestos **1-3** y **5** puros. En el caso del aldehído con el sustituyente $-\text{NO}_2$, el producto de reacción (intermedio) se disolvió en 150 mL de DCM a 0 °C y se añadió la DDQ (2,2 mmol) disuelta en 100 mL de DCM. La mezcla se dejó reaccionar a 0 °C durante 2 h. La fase orgánica se lavó con agua mediante una extracción (3 x 100 mL) y se llevó a sequedad. Finalmente, el crudo se lavó con metanol y éter etílico seco, obteniendo el compuesto **4** puro.

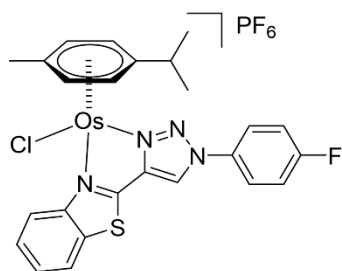
Síntesis de los complejos de osmio de tipo semisándwich 6-10

En primer lugar, se preparó el dímero de osmio mediante un protocolo descrito anteriormente.³ El $\text{OsCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,43 mmol, 0,5 g) y el α -terpineno (15 mmol, 2,72 mL) se

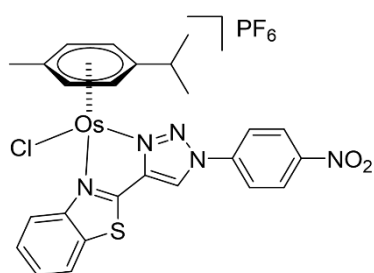
disolvieron en 25 mL de EtOH seco, y la mezcla se dejó reaccionar a 80 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción, esta mezcla se concentró a presión reducida y el precipitado resultante se filtró, obteniéndose un sólido marrón puro.³ Para la obtención de los complejos de osmio, se disolvieron el dímero de osmio (79 mg, 0,1 mmol) y el ligando N^N correspondiente (0,2 mmol) en 10 mL de MeOH seco bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 h. Pasado este tiempo, se añadió el NH₄PF₆ (42,38 mg, 0,26 mmol) y se dejó reaccionar 1 h a temperatura ambiente (**Esquema 2.3**). Los productos finales precipitaron como sólidos amarillos, que se filtraron y lavaron con éter etílico seco, y se dejaron secar a vacío.



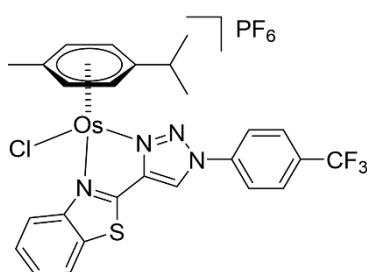
6: 53 %. ¹H RMN (401 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ (ppm): 9,26 (s, 1H), 8,30 – 8,23 (m, 2H), 7,92 – 7,83 (m, 3H), 7,79 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 1,1 Hz, 1H), 7,56 – 7,51 (m, 2H), 6,55 – 6,50 (m, 1H), 6,47 (dd, *J* = 5,8, 1,1 Hz, 1H), 6,35 – 6,28 (m, 1H), 6,25 – 6,18 (m, 1H), 2,49 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 1,01 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0,92 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ (ppm): 160,3, 150,2, 144,6, 142,9, 134,7, 134,5, 131,7, 130,3, 129,4, 126,3, 125,2, 124,1, 122,2, 98,6, 97,5, 79,8, 76,1, 74,0, 73,0, 32,1, 23,0, 22,1, 21,3, 19,2. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., [M-PF₆]⁺ = 653,1182 m/z; exp.: 653,1226 m/z. Anal. Calc. para C₂₆H₂₆ClF₆N₄OsPS: %C, 39,17; %H, 3,29; %N, 7,03; %S, 4,02. Experimental: %C, 39,24; %H, 3,11; %N, 6,96; %S, 4,09.



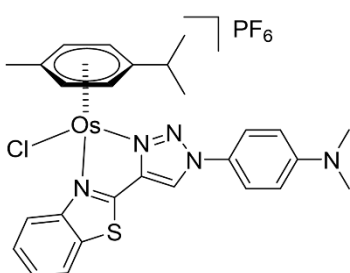
7: 82 %. ¹H RMN (600 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ (ppm): 9,25 (s, 1H), 8,28 – 8,24 (m, 2H), 8,04 – 7,97 (m, 2H), 7,89 (ddd, *J* = 8,5, 7,1, 1,2 Hz, 1H), 7,81 – 7,76 (m, 1H), 7,51 – 7,44 (m, 2H), 6,53 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 6,47 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 6,31 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 6,22 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 2,50 (sept, *J* = 6,9 Hz, 1H), 2,28 (s, 3H), 1,02 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0,92 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H). ¹³C RMN (151 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 165,5, 163,8, 160,2, 150,2, 144,8, 134,7, 133,2, 133,1, 130,3, 129,4, 126,4, 125,2, 125,0, 124,9, 124,1, 98,6, 97,7, 79,8, 76,1, 74,1, 73,2, 32,1, 23,0, 22,1, 19,2. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., [M-PF₆]⁺ = 657,0931 m/z; exp.: 657,0977 m/z. Anal. Calc. para C₂₅H₂₃ClF₇N₄OsPS: %C, 37,48; %H, 2,89; %N, 6,99; %S, 4,00. Experimental: %C, 37,43; %H, 2,70; %N, 6,67; %S, 3,93.



8: 62 %. ^1H RMN (300 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ (ppm): 9,40 (s, 1H), 8,31 – 8,28 (m, 1H), 8,28 – 8,24 (m, 1H), 8,20 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 8,11 – 8,04 (m, 2H), 7,90 (ddd, J = 8,5, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,80 (ddd, J = 8,2, 7,2, 1,1 Hz, 1H), 6,54 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 6,49 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 6,33 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 6,24 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 2,50 (sept, J = 6,8 Hz, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,02 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,93 (d, J = 6,9 Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 160,0, 150,2, 145,0, 139,4, 134,7, 133,0, 132,6, 130,4, 129,5, 128,7, 128,6, 128,6, 128,5, 126,4, 125,2, 124,1, 122,9, 98,7, 97,8, 79,8, 76,2, 74,2, 73,2, 32,0, 23,0, 22,1, 19,1. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ = 707,0899 m/z; exp.: 707,0938 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{ClF}_9\text{N}_4\text{OsPS}$: %C, 36,69; %H, 2,72; %N, 6,58; %S, 3,77. Experimental: %C, 36,54; %H, 2,58; %N, 6,67; %S, 3,68.



9: 71 %. ^1H RMN (401 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ (ppm): 9,43 (s, 1H), 8,63 – 8,49 (m, 2H), 8,31 – 8,25 (m, 2H), 8,25 – 8,21 (m, 2H), 7,91 (ddd, J = 8,4, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 7,81 (ddd, J = 8,3, 7,2, 1,1 Hz, 1H), 6,55 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 6,49 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 6,33 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 6,25 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 2,51 (sept, J = 6,9 Hz, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,03 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,93 (d, J = 6,9 Hz, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 159,9, 150,2, 149,8, 145,2, 140,7, 134,8, 130,4, 129,6, 126,8, 126,5, 125,3, 124,2, 123,2, 98,8, 98,0, 79,9, 76,3, 74,3, 73,4, 32,1, 23,0, 22,1, 19, 2. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ = 684,0876 m/z; exp.: 684,0900 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClF}_6\text{N}_5\text{O}_2\text{OsPS}$: %C, 36,26; %H, 2,80; %N, 8,46; %S, 3,87. Experimental: %C, 36,42; %H, 2,68; %N, 8,47; %S, 3,74.



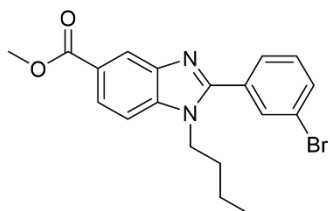
10: 79 %. ^1H RMN (401 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ (ppm): 9,11 (s, 1H), 8,29 – 8,21 (m, 2H), 7,89 (ddd, J = 8,6, 7,3, 1,2 Hz, 1H), 7,81 – 7,73 (m, 3H), 6,96 – 6,90 (m, 2H), 6,51 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 6,47 (d, J = 5,8, 1H), 6,30 (d, J = 5,7, 1H), 6,19 (d, J = 5,7, 1H), 3,07 (s, 6H), 2,49 (sept, J = 6,8 Hz, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,00 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,92 (d, J = 6,9 Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 160,5, 153,0, 150,2, 144,3, 134,5, 130,2, 129,3, 125,5, 125,2, 125,0, 124,0, 123,2, 113,1, 98,6, 97,3, 79,7, 75,9, 73,9, 72,9, 40,5, 32,1, 22,9, 22,2, 19,2. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ = 682,1447 m/z; exp.: 682,1460 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClF}_6\text{N}_5\text{O}_2\text{OsPS}$: %C, 39,25; %H, 3,46; %N, 8,48; %S, 3,88. Experimental: %C, 39,26; %H, 3,46; %N, 8,36; %S, 3,82.

2.2. Capítulo 3

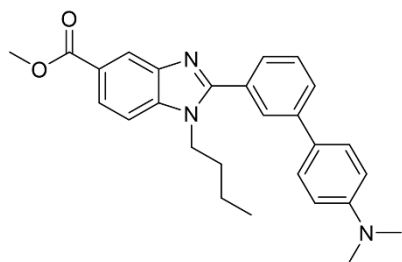
Síntesis de los prolígandos HC[^]N

En primer lugar, para la síntesis de los prolígandos se obtuvo la diamina (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo), de acuerdo con el método de la bibliografía (**Esquema 3.1**).⁴ La síntesis del prolígando **11** se llevó a cabo mediante un procedimiento previamente descrito con ligeras modificaciones.⁵ Se disolvieron bisulfito de sodio (637 mg, 6 mmol) y benzaldehído (318 mg, 3 mmol) en 10 mL de agua y se dejó reaccionar a 90 °C durante 1 h. A continuación, la diamina (220 mg, 3 mmol) disuelta en 10 mL de etanol se añadió a la disolución y se dejó reaccionar a 90 °C durante 18 h. Una vez finalizada la reacción, se evaporó el etanol bajo presión reducida, y se realizó una extracción con diclorometano (3x10mL). Finalmente, se llevó a sequedad obteniendo un aceite naranja puro.

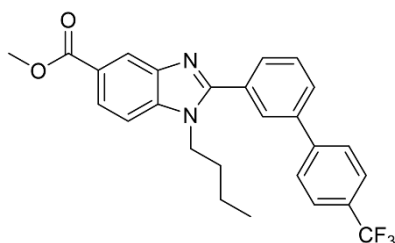
La síntesis de los prolígandos **13** y **14** se llevó a cabo en dos etapas (**Esquema 3.2**). La primera consiste en una reacción de condensación entre (3-amino-4-(butilamino)benzoato de metilo) y 3-bromobenzaldehído, siguiendo el mismo procedimiento que para el prolígando **11**, pero obteniendo un sólido blanco puro (**12**) al precipitar con hexano. En la segunda etapa, se llevó a cabo una reacción de acoplamiento cruzado C-C de tipo Suzuki-Miyaura, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la bibliografía.⁶ Para ello, se hizo reaccionar el intermedio bromo derivado (1 mmol, 387 mg) y el ácido borónico correspondiente (1 mmol), en presencia de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,05 mmol, 58 mg) y carbonato de potasio (3 mmol, 414 mg), en 6 mL de una mezcla tolueno:H₂O:EtOH 3:2:1 (v:v:v) bajo condiciones de microondas a 120 °C durante 1 h. Posteriormente, se añadieron agua y DCM, y se llevó a cabo una extracción con este último (3x15 mL de DCM). Por último, la fase orgánica se llevó a sequedad y se empleó hexano para precipitar, obteniendo un sólido blanco puro en ambos casos.



12: 47 %. ¹H RMN (401 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,54 – 8,49 (m, 1H), 8,03–8,07 (m, 1H), 7,89–7,92 (m, 1H), 7,62– 7,68 (m, 2H), 7,47 – 7,40 (m, 2H), 4,30 – 4,20 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 1,87 – 1,74 (m, 2H), 1,24–1,32 (m, 2H), 0,89 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167,7, 153,8, 142,8, 138,9, 133,2, 132,5, 132,3, 130,4, 127,9, 124,9, 124,7, 123,0, 122,6, 110,0, 52,2, 44,9, 32,0, 20,0, 13,6. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., [M+H]⁺= 387,0708 m/z; exp.: 387,0713 m/z. Anal. Calc. para C₁₉H₁₉BrO₂: %C, 58,93; %H, 4,95; %N, 7,23. Experimental: %C, 58,86; %H, 4,87; %N, 7,16.



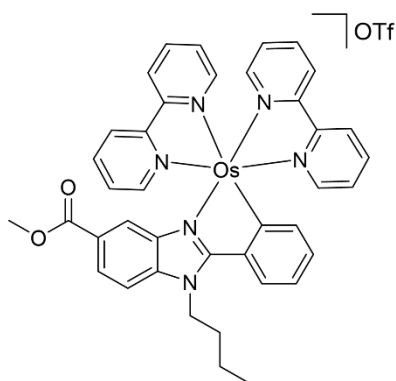
13: 62 %. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,54–8,56 (m, 1H), 8,02–8,08 (m, 1H), 7,87–7,92 (m, 1H), 7,77–7,68 (m, 1H), 7,61–7,54 (m, 4H), 7,45 (dd, $J = 8,6, 0,7$ Hz, 1H), 6,87–6,77 (m, 2H), 4,29 (t, $J = 7,66$ Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,01 (s, 6H), 1,88–1,76 (m, 2H), 1,22–1,33 (m, 2H), 0,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167,6, 155,4, 149,9, 142,0, 138,5, 129,4, 128,4, 128,0, 127,4, 126,9, 125,2, 124,8, 121,9, 113,4, 110,2, 77,5, 52,3, 45,1, 41,0, 31,9, 20,1, 13,7. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 428,2380$ m/z; exp.: 425,2339 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$: %C, 75,85; %H, 6,84; %N, 9,83. Experimental: %C, 75,71; %H, 6,83; %N, 9,72.



14: 53 %. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,53–8,56 (m, 1H), 8,03–8,09 (m, 1H), 7,92–8,01 (m, 1H), 7,80–7,77 (m, 1H), 7,77–7,73 (m, 4H), 7,72 (t, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,46 (dd, $J = 8,5, 0,7$ Hz, 1H), 4,35–4,25 (m, 2H), 3,97 (s, 3H), 1,95–1,73 (m, 2H), 1,23–1,35 (m, 2H), 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167,6, 154,9, 143,7, 142,7, 140,5, 138,9, 131,0, 129,5, 128,9, 128,7, 128,4, 127,5, 125,9, 125,9, 124,7, 124,5, 122,4, 109,9, 52,1, 44,8, 31,9, 19,9, 13,5. Masas ESI-MS (modo positivo): calc., $[\text{M}+\text{H}]^+ = 453,1780$ m/z; exp.: 453,1790 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{F}_3\text{O}_2$: %C, 69,02; %H, 5,12; %N, 6,19. Experimental: %C, 69,06; %H, 5,15; %N, 5,98 (%).

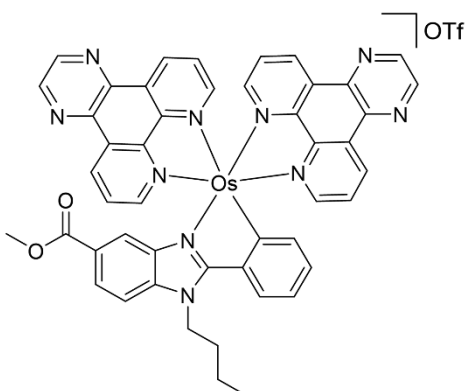
Síntesis de los complejos **15-20**

La síntesis de los complejos ciclometalados de osmio consta de dos etapas (**Esquema 3.3**). En primer lugar, se disolvieron el dímero de osmio $[\text{Os}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ (0,1 mmol, 61 mg), acetato potásico (0,6 mmol, 59 mg), triflato potásico (0,4 mmol, 75,3 mg) y el proligando correspondiente **11**, **13** o **14** (0,2 mmol) en 6 mL de acetonitrilo y se agitaron a 80 °C durante 1 h en un microondas. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto bruto se utilizó sin purificación adicional. En segundo lugar, el producto bruto y el ligando N^N correspondiente (bpy o dpq, 0,4 mmol) se disolvieron en 6 mL de metanol y la mezcla se dejó en agitación a 65 °C durante 30 min en el microondas. El disolvente se eliminó y el sólido bruto se purificó mediante cromatografía líquida utilizando alúmina como fase estacionaria y un gradiente de DCM: CH_3CN (9:1 v:v) a DCM: CH_3CN (1:1 v:v) como eluyente. Finalmente, los complejos de osmio se recrystalizaron con DCM/hexano para obtener sólidos violetas puros.



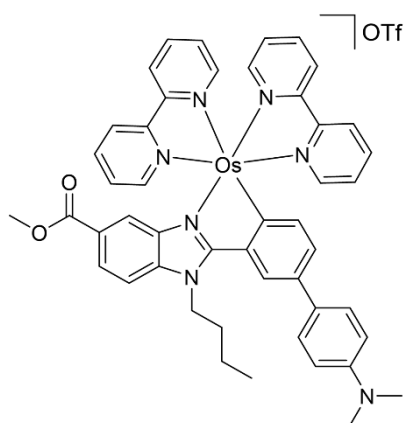
15: 22 %. ^1H RMN (600 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 8,43–8,39 (m, 1H), 8,36–8,28 (m, 3H), 7,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,93–7,86 (m, 2H), 7,85–7,74 (m, 3H), 7,69–7,62 (m, 1H), 7,63–7,55 (m, 2H), 7,51–7,45 (m, 1H), 7,42–7,37 (m, 1H), 7,35–7,31 (m, 1H), 7,10–7,06 (m, 1H), 7,04–7,00 (m, 1H), 7,00–6,96 (m, 1H), 6,81–6,73 (m, 2H), 6,32 (s, 1H), 6,07–5,91 (m, 1H), 4,71 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,70 (s, 3H), 2,01–1,91 (m, 2H), 1,45–1,33 (m, 2H), 0,93 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (151 MHz, CD_3CN) δ (ppm):

167,8, 167,2, 163,0, 161,4, 159,7, 155,3, 151,9, 151,6, 150,6, 141,5, 140,6, 136,6, 134,4, 134,1, 133,9, 129,9, 128,6, 128,4, 128,0, 126,3, 125,9, 125,1, 124,5, 124,4, 124,3, 124,1, 123,3, 121,1, 117,0, 111,6, 52,3, 45,8, 32,4, 20,6, 14,1. Masas ESI-MS (modo positivo, CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 811,2431$ m/z; exp.: 811,2449 m/z. . Anal. Calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_5\text{F}_3\text{SO}_3$: %C, 50,10; %H, 3,68; %N, 8,76; %S, 3,34. Experimental: %C, 50,14; %H, 3,86; %N, 8,52; %S, 3,41.



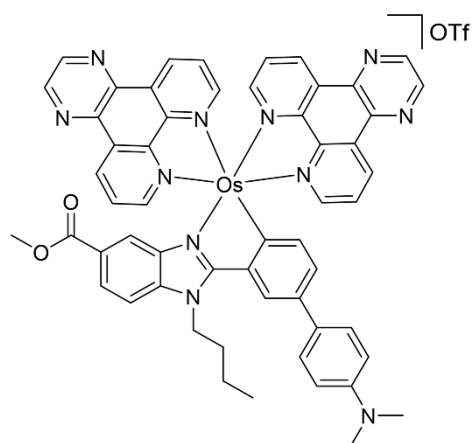
16: 25 %. ^1H RMN (401 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 9,31–9,28 (m, 1H), 9,14–9,09 (m, 3H), 9,08–9,05 (m, 1H), 8,97–8,93 (m, 1H), 8,90–8,86 (m, 1H), 8,81–8,78 (m, 1H), 8,52–8,49 (m, 1H), 8,49–8,46 (m, 1H), 8,34–8,31 (m, 1H), 8,21–8,17 (m, 1H), 7,97–7,93 (m, 1H), 7,72–7,66 (m, 2H), 7,58–7,54 (m, 1H), 7,52–7,45 (m, 2H), 7,39–7,35 (m, 1H), 6,90–6,85 (m, 1H), 6,72–6,67 (m, 1H), 6,33–6,30 (m, 2H), 4,72 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,60 (s, 3H), 2,02–

1,95 (m, 2H), 1,50–1,37 (m, 2H), 0,94 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (151 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 177,2, 167,8, 166,9, 156,9, 155,5, 154,2, 153,8, 153,3, 153,2, 152,5, 152,1, 147,2, 147,2, 147,1, 141,7, 141,4, 141,3, 141,2, 141,0, 140,4, 137,4, 136,4, 132,3, 131,1, 130,9, 130,8, 130,7, 130,7, 130,0, 129,9, 129,5, 128,3, 128,0, 127,9, 127,1, 125,9, 124,9, 122,4, 117,0, 111,7, 52,3, 45,9, 32,4, 20,7, 14,1. Masas ESI-MS (modo positivo, CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 963,2554$ m/z; exp.: 963,2564 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{48}\text{H}_{35}\text{N}_{10}\text{O}_5\text{F}_3\text{SO}_3$: %C, 51,88; %H, 3,17; %N, 12,61; %S, 2,84. Experimental: %C, 50,72; %H, 3,07; %N, 12,59; %S, 2,79.



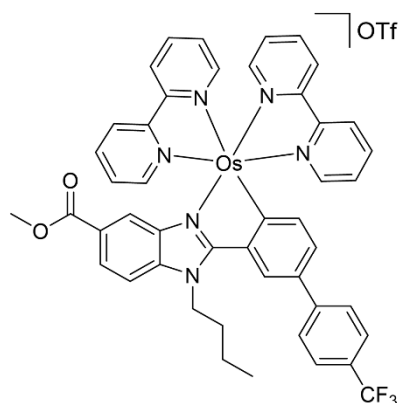
17: 22 %. ^1H RMN (401 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 8,48–8,39 (m, 2H), 8,38–8,30 (m, 2H), 8,19 (s, 1H), 7,98–7,87 (m, 2H), 7,84–7,78 (m, 1H), 7,76 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,66–7,55 (m, 3H), 7,54–7,48 (m, 1H), 7,48–7,40 (m, 2H), 7,39–7,31 (m, 3H), 7,19–7,08 (m, 2H), 7,06–6,95 (m, 2H), 6,82 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 6,23–6,16 (m, 1H), 5,72–5,44 (m, 1H), 4,78 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,03 (s, 6H), 2,09–1,97 (m, 2H), 1,52–1,39 (m, 2H), 0,97 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). Masas ESI-MS (modo positivo,

CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 930,3166$ m/z; exp.: 930,3078 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_5\text{F}_3\text{SO}_3$: %C, 53,47; %H, 4,11; %N, 9,09; %S, 2,97. Experimental: %C, 53,49; %H, 4,06; %N, 9,13; %S, 3,13.

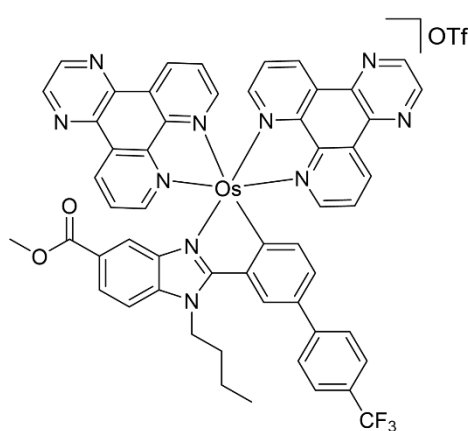


18: 19 %. ^1H RMN (401 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 9,35–9,31 (m, 1H), 9,17–9,09 (m, 4H), 9,01–8,98 (m, 1H), 8,95–8,91 (m, 1H), 8,90–8,86 (m, 1H), 8,61–8,57 (m, 1H), 8,52–8,48 (m, 1H), 8,37–8,33 (m, 1H), 8,24–8,19 (m, 1H), 8,12–8,07 (m, 1H), 7,77–7,67 (m, 2H), 7,66–7,59 (m, 1H), 7,58–7,49 (m, 2H), 7,46–7,36 (m, 3H), 6,98–6,91 (m, 1H), 6,81–6,73 (m, 2H), 6,36–6,28 (m, 2H), 4,80 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 3,61 (s, 3H), 2,93 (s, 6H), 2,12–2,01

(m, 2H), 1,57–1,40 (m, 2H), 0,98 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 155,9, 152,3, 149,9, 146,3, 146,2, 146,1, 140,7, 140,5, 140,4, 140,3, 140,1, 139,4, 131,4, 130,1, 129,9, 129,8, 129,7, 129,2, 129,0, 127,3, 127,1, 127,0, 126,8, 125,0, 123,9, 116,0, 112,9, 110,7, 51,3, 45,1, 39,8, 31,4, 19,8, 13,1. Masas ESI-MS (modo positivo, CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 1082,3289$ m/z; exp.: 1082,3292 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{56}\text{H}_{44}\text{N}_{11}\text{O}_5\text{F}_3\text{SO}_3$: %C, 54,67; %H, 3,6; %N, 12,52; %S, 2,61. Experimental: %C, 54,61; %H, 3,62; %N, 12,55; %S, 2,72.



19: 29 %, ^1H RMN (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 8,85–8,56 (m, 4H), 8,33–8,17 (m, 1H), 8,12–8,00 (m, 1H), 7,97–7,68 (m, 10H), 7,68–7,59 (m, 2H), 7,58–7,50 (m, 2H), 7,36–7,28 (m, 1H), 7,26–7,16 (m, 3H), 6,49–5,88 (m, 2H), 5,02–4,87 (m, 2H), 3,69 (s, 3H), 1,98–1,91 (m, 2H), 1,46–1,26 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7,4$ z, 3H). Masas ESI-MS (modo positivo, CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 955,2618$ m/z; exp.: 955,2641 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{47}\text{H}_{38}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_5\text{SO}_3$: %C, 51,17; %H, 3,47; %N, 7,62; %S, 2,91. Experimental: %C, 51,11; %H, 3,39; %N, 7,36; %S, 2,96.



20: 20 %. ^1H -RMN (600 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 9,37–9,33 (m, 1H), 9,17–9,10 (m, 4H), 9,06–9,01 (m, 1H), 9,00–8,96 (m, 1H), 8,95–8,88 (m, 1H), 8,55–8,51 (m, 1H), 8,50–8,43 (m, 1H), 8,34–8,30 (m, 1H), 8,23–8,17 (m, 2H), 7,78–7,69 (m, 6H), 7,66–7,60 (m, 1H), 7,59–7,53 (m, 2H), 7,47–7,40 (m, 1H), 7,08–7,02 (m, 1H), 6,42–6,29 (m, 2H), 4,82 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H), 3,61 (s, 3H), 2,11–2,02 (m, 2H), 1,54–1,41 (m, 2H), 0,96 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). Masas

ESI-MS (modo positivo, CH_3CN): calc., $[\text{M}]^+ = 1107,2741$ m/z; exp.: 1107,2747 m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{55}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{F}_6\text{O}_5\text{SO}_3$: %C, 52,63; %H, 3,05; %N, 11,16; %S, 2,55. Experimental: %C, 52,53; %H, 2,93; %N, 11,01; %S, 2,62.

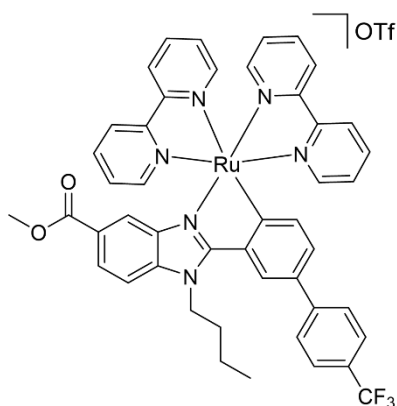
2.3. Capítulo 4

Síntesis de los compuestos de rutenio 21-24

La síntesis de los complejos de rutenio se desarrolló en dos etapas (**Esquema 4.1**).⁷ Primero, se disolvieron el dímero de rutenio $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ (0,1 mmol, 61 mg), acetato potásico (0,6 mmol, 59 mg), triflato potásico (0,4 mmol, 75,3 mg) y el prolígando correspondiente **12** o **13** (0,2 mmol), cuya síntesis se detalla en el Capítulo 3, en 6 mL de acetonitrilo. La mezcla se dejó reaccionar a 80 °C durante 1 h en un microondas de reacción. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto bruto se utilizó sin purificación adicional.

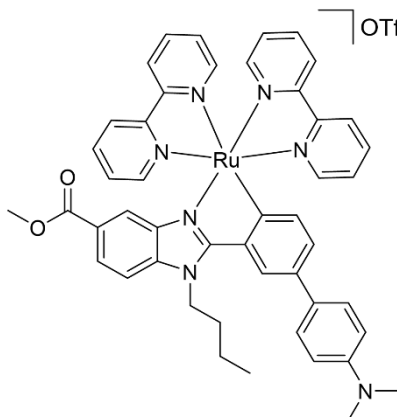
En la segunda etapa, el producto bruto de la etapa anterior y el ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ correspondiente (bpy o dpq, 0,4 mmol) se disolvieron en metanol y la mezcla se dejó en agitación a 65 °C durante 7 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida, y el sólido bruto se purificó mediante cromatografía líquida utilizando alúmina como fase estacionaria

y un gradiente de DCM:CH₃CN (9:1 v:v) a DCM:CH₃CN (1:1 v:v) como eluyente. Finalmente, los complejos de rutenio se recrystalizaron con en diclorometano y hexano para obtener sólidos puros rojos.



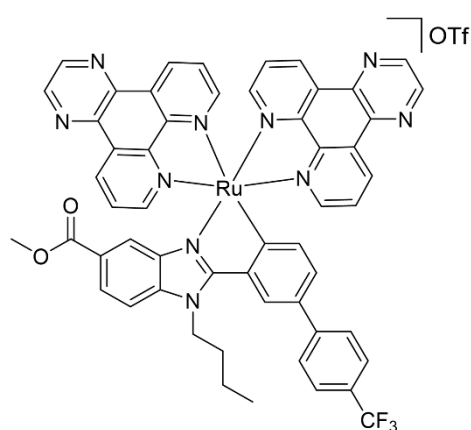
21: 23 %. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K) δ (ppm): 8,82–8,75 (m, 1H), 8,77–8,67 (m, 1H), 8,67–8,63 (m, 1H), 8,63–8,59 (m, 1H), 8,29–8,23 (m, 1H), 8,21 (s, 1H), 8,03–7,95 (m, 3H), 7,93–7,87 (m, 4H), 7,86–7,82 (m, 1H), 7,82–7,79 (m, 1H), 7,79–7,76 (m, 2H), 7,76–7,73 (m, 2H), 7,72–7,67 (m, 1H), 7,44–7,40 (m, 1H), 7,39–7,35 (m, 1H), 7,35–7,30 (m, 1H), 7,27–7,23 (m, 1H), 6,63–6,59 (m, 1H), 6,42 (s, 1H), 5,00–4,85 (m, 2H), 3,71 (s, 3H), 1,99–1,87 (m, 2H), 1,41–1,25 (m, 2H), 0,87 (t, *J*

= 7,4 Hz, 3H). ¹³C RMN (151 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K, δ ppm): 200,1, 165,7, 161,2, 157,3, 157,2, 156,3, 155,3, 153,4, 150,5, 149,9, 149,0, 144,8, 140,4, 139,5, 137,2, 136,8, 136,3, 134,9, 134,1, 133,9, 130,9, 127,1, 126,9, 126,8, 126,6, 126,6, 126,5, 126,5, 125,7, 125,7, 125,3, 124,1, 123,8, 123,6, 123,5, 123,5, 123,5, 123,4, 123,4, 121,7, 119,6, 115,8, 111,4, 51,7, 44,6, 30,9, 19,3, 13,6. ¹⁹F RMN (377 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K) δ (ppm): -60,67, -77,75. Anal. Calc. para C₄₇H₃₈F₆N₆O₅SRu: %C, 55,67; %H, 3,78; %N, 8,29; %S, 3,13. Experimental: %C, 55,41; %H, 3,67; %N, 8,22; %S, 3,20.

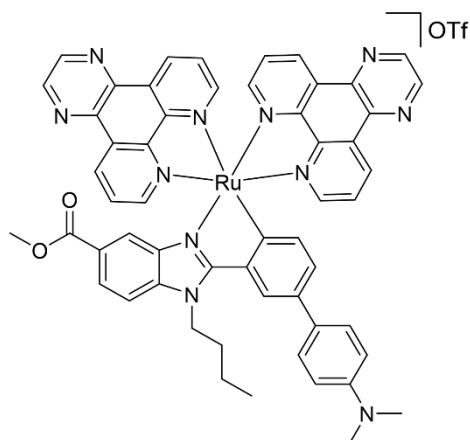


22: 25% (50 mg). ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K) δ (ppm): 8,80–8,75 (m, 1H), 8,69–8,66 (m, 1H), 8,65–8,62 (m, 1H), 8,62–8,59 (m, 1H), 8,26–8,22 (m, 1H), 8,09 (s, 1H), 8,06–8,03 (m, 1H), 8,00–7,97 (m, 1H), 7,97–7,93 (m, 1H), 7,90–7,81 (m, 3H), 7,79–7,77 (m, 1H), 7,77–7,74 (m, 1H), 7,74–7,72 (m, 1H), 7,70–7,66 (m, 1H), 7,49 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,42–7,39 (m, 1H), 7,39–7,36 (m, 1H), 7,33–7,28 (m, 1H), 7,14–7,09 (m, 1H), 6,78 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,49–6,46 (m, 1H), 6,41

(s, 1H), 4,92–4,80 (m, 2H), 3,71 (s, 3H), 2,92 (s, 6H), 1,98–1,89 (m, 2H), 1,43–1,27 (m, 2H), 0,89 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H). ¹³C RMN(151 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K) δ (ppm): 194,8, 165,7, 161,6, 157,4, 157,3, 156,3, 155,4, 153,4, 150,5, 149,9, 149,3, 149,1, 140,5, 139,5, 136,7, 135,9, 134,7, 133,9, 133,6, 133,1, 128,5, 127,1, 126,9, 126,6, 126,5, 126,4, 126,0, 124,1, 123,5, 123,4, 123,4, 123,3, 122,4, 121,7, 119,6, 115,7, 112,8, 111,3, 51,7, 44,7, 31,0, 19,4, 13,6. ¹⁹F RMN (377 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K, δ ppm): -77,74. Anal. Calc. para C₄₈H₄₄F₃N₇O₅SRu: %C, 58,29; %H, 4,48; %N, 9,91; %S, 3,24. Experimental: %C, 58,38; %H, 4,36; %N, 9,96; %S, 3,40.



23: 30 %. ^1H RMN (600 MHz, CD_3CN , 298 K) δ (ppm): 9,59–9,56 (m, 1H), 9,30–9,27 (m, 1H), 9,27–9,21 (m, 2H), 9,15–9,11 (m, 3H), 9,10–9,08 (m, 1H), 8,62–8,59 (m, 1H), 8,52–8,49 (m, 1H), 8,41–8,38 (m, 1H), 8,24–8,22 (m, 1H), 8,21–8,18 (m, 1H), 7,90–7,86 (m, 1H), 7,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,75–7,71 (m, 3H), 7,71 – 7,64 (m, 2H), 7,63–7,59 (m, 1H), 7,56 (d, $J = 8,6$, 1H), 7,12 (dd, $J = 7,9$, 1,9 Hz, 1H), 6,70 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,44–6,42 (m, 1H), 4,79 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,61 (s, 3H), 2,12–1,99 (m, 2H), 1,53–1,40 (m, 2H), 0,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CD_3CN , 298 K) δ (ppm): 198,85, 167,0, 162,7, 157,1, 154,2, 153,6, 152,9, 151,6, 151,3, 150,5, 149,3, 147,29, 147,27, 147,20, 147,18, 146,2, 138,2, 133,1, 131,4, 130,7, 130,5, 130,4, 127,8, 127,7, 127,4, 127,3, 127,2, 127,1, 126,79, 126,77, 125,8, 124,9, 124,7, 118,3, 117,6, 111,7, 52,3, 46,2, 32,3, 20,8, 14,1. ^{19}F RMN (377 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K, δ ppm): -60,71, -77,77. Anal. Calc. para $\text{C}_{55}\text{H}_{38}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_5\text{SRu}$: %C, 56,65; %H, 3,28; %N, 12,01; %S, 2,75. Experimental: %C, 56,51; %H, 3,10; %N, 12,02; %S, 2,75.



24: 26 %. ^1H RMN (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) δ (ppm): 9,61 (dd, $J = 8,2$, 1,4 Hz, 1H), 9,32 – 9,21 (m, 7H), 8,63–8,54 (m, 2H), 8,33 (dd, $J = 5,4$, 1,3 Hz, 1H), 8,27 (dd, $J = 5,5$, 1,3 Hz, 1H), 8,14 (s, 1H), 8,06 (dd, $J = 8,2$, 5,1 Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,3$, 5,5 Hz, 1H), 7,87–7,73 (m, 3H), 7,66 (dd, $J = 8,6$, 1,6 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,05 (dd, $J = 7,9$, 1,7 Hz, 1H), 6,74 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,51 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 4,88 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,60 (s, 3H), 2,89 (s, 6H), 2,05–1,89 (m, 2H), 1,49–1,25 (m, 2H), 0,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) δ (ppm): 193,1, 165,6, 161,7, 155,7, 152,8, 152,6, 152,5, 150,2, 149,8, 149,3, 148,9, 147,8, 146,5, 146,4, 140,7, 139,6, 139,5, 139,5, 139,4, 139,3, 136,8, 136,1, 133,5, 131,9, 130,2, 129,3, 129,1, 128,9, 128,8, 128,7, 128,6, 128,3, 126,9, 126,8, 126,6, 126,5, 126,2, 124,1, 123,5, 122,5, 122,3, 119,1, 115,7, 112,8, 111,3, 51,7, 44,8, 31,1, 19,5, 13,7. ^{19}F RMN (377 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K, δ ppm): -77,75. Anal. Calc. para $\text{C}_{56}\text{H}_{44}\text{F}_3\text{N}_{11}\text{O}_5\text{SRu}$: %C, 58,94; %H, 3,89; %N, 13,50; %S, 2,81. Experimental: %C, 58,91; %H, 3,84; %N, 13,39; %S, 2,78.

2.4. Capítulo 5

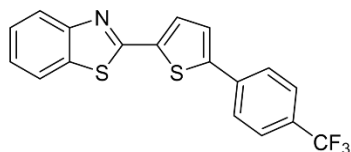
Síntesis de los intermedios 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[d]tiazol y 2-(5-bromotiofen-2-il)-1H-benzo[d]imidazol

En primer lugar, los intermedios 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[d]tiazol y 2-(5-bromotiofen-2-il)-1H-benzo[d]imidazol se prepararon siguiendo un procedimiento descrito previamente en la bibliografía con ligeras modificaciones (**Esquema 5.1**).⁵ El bisulfito de sodio (1,05 g, 10 mmol) y el 5-bromotiofeno-2-carbaldeído (542 µL, 5 mmol) se disolvieron en 10 mL de agua, y la mezcla se dejó agitar a 80 °C durante 1 h. A continuación, se disolvieron o-aminotiofenol (0,55 mL, 5 mmol) u o-fenilendiamina (540 mg, 5 mmol) en 10 mL de etanol y la mezcla se dejó reaccionar a 80 °C durante 18 horas. Finalizada la reacción, se evaporó el etanol bajo presión reducida y se llevó a cabo una extracción con diclorometano (3x15 mL). Finalmente, la fase orgánica se llevó a sequedad y, en ambos casos, se utilizó hexano para precipitar sólidos puros blancos.

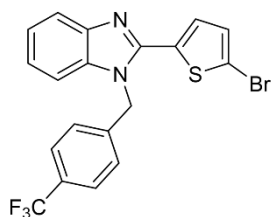
Síntesis de los prolíandos HC^N

Para la síntesis de los ligandos **25** y **26** se disolvieron 2-(5-bromotiofen-2-il)benzo[d]tiazol (1 mmol, 296,23 mg), tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,05 mmol, 58 mg), carbonato de potasio (414,6 mg, 3 mmol) y ácido 4-trifluorometilfenilborónico (285 mg, 1,5 mmol) o ácido 4-(N,N-dimetilamino)fenilborónico, respectivamente, en 6 mL de una mezcla tolueno:H₂O:EtOH (3:2:1 v:v:v) en un microondas a 120 °C durante 1 h (**Esquema 5.2**). Posteriormente, se añadieron agua y diclorometano, y se llevó a cabo una extracción con este último disolvente (3x15 mL de DCM). Finalmente, la fase orgánica se llevó a sequedad y se utilizó hexano para precipitar, obteniéndose un sólido puro de color verde brillante (**25**) y un sólido puro de color amarillo (**26**).

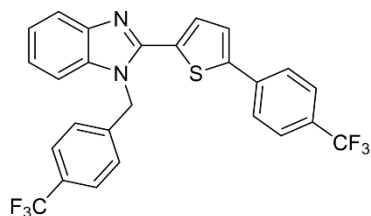
Por su parte, el 2-(5-bromotiofen-2-il)-1-(4-(trifluorometil)bencilo)-1H-benzo[d]imidazol (**27**) se sintetizó siguiendo un procedimiento previamente descrito (**Esquema 5.3.A**).^{8,9} Se disolvieron 2-(5-bromotiofen-2-il)-1H-benzo[d]imidazol (180 mg, 0,65 mmol), bromuro de 4-trifluorometilbencilo (161 mg, 0,67 mmol) y Cs₂CO₃ (410 mg, 1,26 mmol) en acetonitrilo, y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez terminada la reacción, se filtró sobre celita y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El compuesto **27** se precipitó y lavó con hexano, obteniéndose un sólido blanco puro. Para la preparación de los ligandos **28** y **29**, se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito anteriormente, pero utilizando diclorurobis(trifenilfosfina)paladio(II) como catalizador y dioxano:H₂O (4:2 v:v) como mezcla de disolventes (**Esquema 5.3.B**).



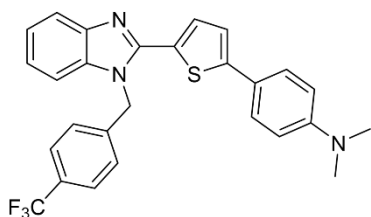
25: 61 %. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 8,05 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,91–7,84 (m, 1H), 7,77 (d, $J = 8,0$, 2H), 7,68 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 3,9$, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,44–7,36 (m, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3 , δ ppm) 160,92, 153,88, 146,12, 137,82, 137,07, 134,93, 129,56, 126,76, 126,30, 126,27, 126,22, 125,61, 125,35, 123,24, 121,66. ^{19}F RMN (377 MHz, DMSO, 298 K, δ ppm): –61,10. Masas ESI-MS (modo positivo, CHCl_3): calc., $[\text{M}]^+ = 362,0285$ m/z; exp: 362,0279 (M+H) $^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NS}_2$: %C, 59,82; %H, 2,79; %N, 3,88; %S, 17,74. Experimental: %C, 59,43; %H, 2,76; %N, 3,70; %S, 17,32.



27: 63 %. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 7,85 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,61 (d, $J = 8,1$, 2H), 7,33 (ddd, $J = 8,2$, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,30 – 7,25 (m, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,22 – 7,17 (m, 2H), 7,03 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 5,61 (s, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 146,9, 143,1, 140,0, 136,0, 133,6, 131,0, 128,0, 126,5, 126,46, 126,43, 126,41, 126,30, 123,99, 123,57, 120,33, 116,62, 109,8, 47,9. Masas ESI-MS (modo positivo, CHCl_3): calc., $[\text{M}]^+ = 435,9851$ m/z; exp: 436,9935 (M+H) $^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{S}$: %C, 52,19; %H, 2,77; %N, 6,41; %S, 7,33. Experimental: %C, 52,28; %H, 2,61; %N, 6,35; %S, 7,28.



28: 36 %. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 7,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,67–7,59 (m, 4H), 7,39–7,31 (m, 2H), 7,31–7,24 (m, 3H), 7,23–7,18 (m, 1H), 5,68 (s, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 147,4, 145,6, 143,1, 139,9, 136,7, 136,2, 132,4, 130,6, 130,3, 130,2, 129,9, 128,4, 126,3, 126,3, 126,2, 126,1, 126,1, 126,0, 125,1, 123,8, 123,4, 120,2, 109,7, 47,9. ^{19}F RMN (377 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): –62,66, –62,70. Masas ESI-MS (modo ion. pos., CHCl_3): calc., $[\text{M}]^+ = 503,1011$ m/z; exp: 503,1018 (M+H) $^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}$: %C, 62,15; %H, 3,21; %N, 5,58; %S, 6,38. Experimental: %C, 62,13; %H, 3,20; %N, 5,49; %S, 6,32.



29: 82 %. ^1H -RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 7,86 (d, $J = 8,0$, 1H), 7,61 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,54–7,45 (m, 2H), 7,31 (ddt, $J = 8,1$, 7,0, 1,2 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,26–7,21 (m, 2H), 7,19–7,13 (m, 2H), 7,08 (dd, $J = 3,9$, 1,1 Hz, 1H), 6,76–6,67 (m, 2H), 5,66 (s, 2H), 2,99 (s, 6H). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 150,5, 149,1, 148,3, 143,2, 140,2, 136,2, 128,5, 128,3, 127,0, 126,3, 126,2, 126,2, 123,2, 123,1, 121,5,

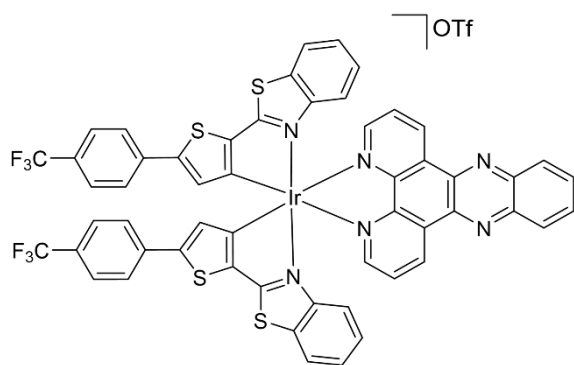
121,4, 119,9, 112,4, 109,5, 47,9, 40,3. ^{19}F -RMN (377 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): -62,63. Masas ESI-MS (modo ion. pos., CHCl_3): calc., $[\text{M}]^+ = 477,15$ m/z; exp: 478,16 $(\text{M}+\text{H})^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_3\text{S}$: %C, 67,91; %H, 4,64; %N, 8,80; %S, 6,71. Experimental: %C, 67,52; %H, 4,55; %N, 8,76; %S, 6,65.

Síntesis del ligando N^N (dppz)

Para la síntesis de este ligando se utilizó el procedimiento descrito en la bibliografía (**Esquema 5.4**).^{7,10} Se disolvieron 1,10-fenantrolina-5,6-diona (3 mmol, 630 mg) y *o*-fenilendiamina (3,15 mmol, 340 mg) en 60 mL de etanol. A continuación, se añadieron 200 μL de ácido trifluoroacético, y la mezcla se dejó en agitación a temperatura de reflujo durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se filtró el precipitado y se lavó con etanol frío, obteniéndose un sólido puro blanquecino.

Síntesis de los complejos de iridio 30-33

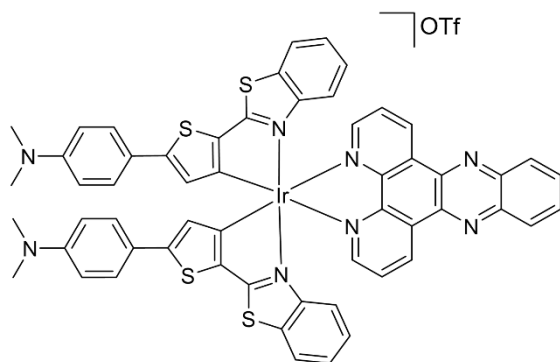
En primer lugar, se prepararon los dímeros de iridio $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\mu\text{-Cl})]_2$, tal y como viene descrito en la bibliografía (**Esquema 5.5**).⁹ El $\text{IrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mg, 0,16 mmol) y los prolígandos correspondientes **26-29** (0,35 mmol) se disolvieron en 8 mL de una mezcla 2-etoxietanol: H_2O (3:1 v:v), y se dejó en agitación bajo atmósfera de nitrógeno a 110 °C durante 24 h. Una vez terminada la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y los precipitados de color naranja se filtraron y lavaron con agua. Los productos se utilizaron en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. En segundo lugar, el correspondiente dímero de iridio (1 eq), la dppz (2,1 eq) y el triflato de potasio (2,5 eq) se disolvieron en 10 mL de una mezcla MeOH:DCM (3:2 v:v), y se dejó en agitación a 58 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y se llevó a cabo una columna cromatográfica, utilizando alúmina como fase estacionaria y una mezcla DCM: CH_3CN (1:1 v:v) como eluyente. Finalmente, los compuestos de iridio se recrystalizaron con DCM y hexano, obteniéndose los compuestos **30-33** puros.



30: 37 %. ^1H RMN (401 MHz, CD_3CN , 298 K) δ (ppm): 9,62–9,59 (m, 2H), 8,67–8,63 (m, 2H), 8,35–8,32 (m, 2H), 8,11–8,05 (m, 2H), 8,04–8,00 (m, 2H), 7,92–7,89 (m, 2H), 7,57 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 7,52 (d, $J = 8,4$ Hz, 4H), 7,21–7,19 (m, 2H), 6,93–6,91 (m, 2H), 6,85–6,83 (d, $J = 0,8$ Hz, 2H), 6,06 – 5,96 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CD_3CN , 298

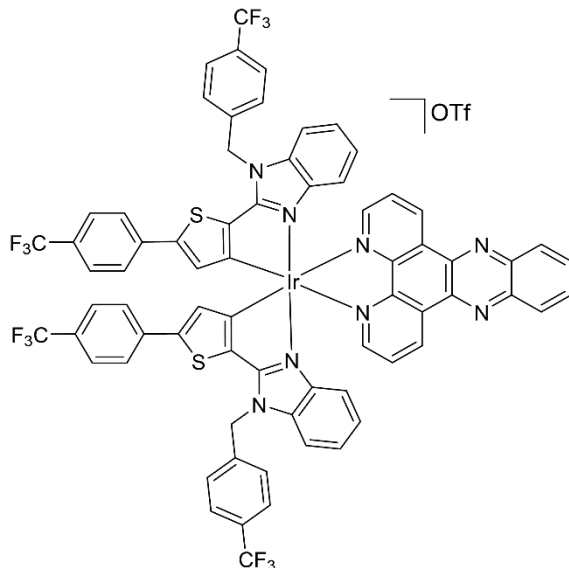
K) δ (ppm): 173,5, 158,5, 153,2, 151,3, 149,6, 149,0, 142,4, 139,1, 136,2, 135,6, 133,9, 132,3, 131,6, 130,5, 129,8, 129,4, 129,2, 129,1, 128,3, 127,8, 126,3, 125,6, 125,6, 125,5,

125,5, 125,1, 125,0, 123,6, 122,4, 116,2. ^{19}F RMN (377 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K) δ (ppm): -63,09, -78,93. Masas ESI-MS (modo ion. pos. CH_3CN): calc., $[\text{M-OTf}]^+ = 1195,0792$ m/z; exp: 1195,0796 $[\text{M-OTf}]^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{55}\text{H}_{28}\text{F}_9\text{IrN}_6\text{O}_3\text{S}_5$: %C, 49,14; %H, 2,10; %N, 6,25; %S, 11,93. Experimental: %C, 49,36; %H, 2,22; %N, 6,30; %S, 11,72.



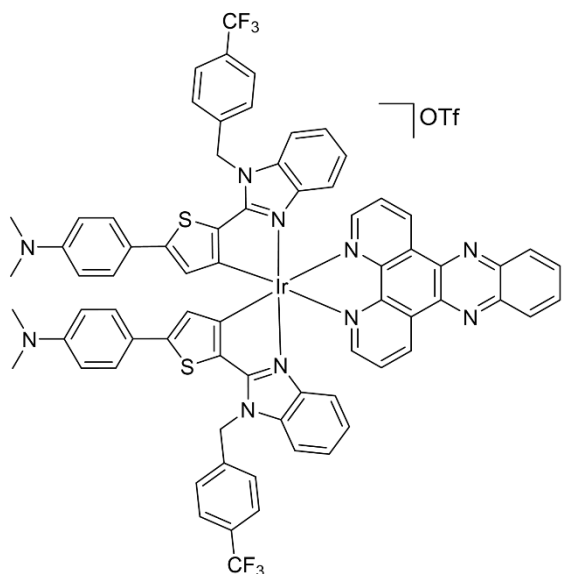
31: 24 %. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 9,91 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 2H), 8,64 (dd, $J = 5,2, 1,5$ Hz, 2H), 8,43 (dd, $J = 6,6, 3,4$ Hz, 2H), 8,20 (dd, $J = 8,3$ Hz, 5,3 Hz, 2H), 8,07–8,00 (m, 2H), 7,71 (d, $J = 8,2$, 2H), 7,35 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 7,16–7,09 (m, 2H), 6,87–6,80 (m, 2H), 6,58 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 6,44 (s, 2H), 5,88 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 2,96

(s, 12H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, δ ppm): 161,6, 158,1, 154,0, 152,0, 150,4, 144,2, 139,9, 137,5, 133,6, 132,1, 131,8, 130,9, 129,3, 128,9, 128,7, 126,9, 125,5, 124,5, 116,3, 113,0, 41,1. ^{19}F RMN (377 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K, δ ppm): -78,91. Masas ESI-MS (modo ion., pos., CH_3CN): calc., $[\text{M-OTf}]^+ = 1145,1888$ m/z; exp: 1145,1893 $[\text{M-OTf}]^+$ m/z. Anal. Calc., para $\text{C}_{57}\text{H}_{40}\text{F}_3\text{IrN}_8\text{O}_3\text{S}_5$: %C, 52,89; %H, 3,11; %N, 8,66; %S, 12,38. Experimental: %C, 52,83; %H, 3,27; %N, 8,73; %S, 12,59.



32: 44 %. ^1H -RMN (401 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 9,92 (dd, $J = 8,3, 1,5$ Hz, 2H), 8,79 (dd, $J = 5,2, 1,5$ Hz, 2H), 8,46–8,42 (m, 2H), 8,21 (dd, $J = 8,2, 5,2$ Hz, 2H), 8,07–8,03 (m, 2H), 7,54–7,48 (m, 12H), 7,41–7,37 (m, 4H), 7,36–7,33 (m, 2H), 7,11 (ddd, $J = 8,3, 7,4, 1,0$ Hz, 2H), 6,78 (ddd, $J = 8,4, 7,4, 1,0$ Hz, 2H), 6,64 (s, 2H), 6,06 (d, $J = 17,1$ Hz, 2H), 5,92 (d, $J = 17,1$ Hz, 2H), 5,60–5,56 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3 , 298 K) δ (ppm): 161,2, 156,8, 153,9, 150,4, 150,2, 143,1, 140,1, 139,1,

139,0, 136,4, 136,1, 133,8, 132,7, 131,0, 130,7, 130,5, 130,2, 129,9, 128,8, 128,0, 127,1, 126,3, 126,2, 126,2, 125,9, 125,9, 125,1, 125,0, 124,8, 123,8, 123,6, 122,4, 122,3, 112,5, 111,5, 48,8. ^{19}F RMN (377 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K) δ (ppm): -63,13, -63,14, -78,91. Masas ESI-MS (modo ion., pos., CH_3CN): calc., $[\text{M-OTf}]^+ = 1477,2255$ m/z; exp: 1477,2277 $[\text{M-OTf}]^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{71}\text{H}_{40}\text{F}_{15}\text{IrN}_8\text{O}_3\text{S}_3$: %C, 52,43; %H, 2,48; %N, 6,89; %S, 5,91. Experimental: %C, 52,47; %H, 2,80; %N, 7,00; %S, 5,96.



33: 32%. ^1H RMN (401 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9,92 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 2H), 8,85 (dd, $J = 5,2, 1,5$ Hz, 2H), 8,46 (dd, $J = 6,6, 3,4$ Hz, 2H), 8,15 (dd, $J = 8,2, 5,2$ Hz, 2H), 8,08–8,02 (m, 2H), 7,53 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H), 7,42 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H), 7,31–7,21 (m, 4H), 7,07–6,99 (m, 2H), 6,75–6,67 (m, 2H), 6,64–6,52 (m, 4H), 6,43 (s, 2H), 6,00 (d, $J = 16,9$ Hz, 2H), 5,80 (d, $J = 16,9$ Hz, 2H), 5,51 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 2,95 (s, 12H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 162,1, 158,7, 154,2, 154,1, 151,0, 150,7, 143,3, 140,7, 139,4,

139,3, 135,8, 133,8, 132,7, 130,7, 130,0, 127,9, 127,33, 127,31, 126,43, 126,39, 125,3, 124,4, 122,8, 120,9, 119,5, 112,2, 111,1, 48,7, 40,3. ^{19}F RMN (377 MHz, CD_2Cl_2 , 298K, δ ppm): -62.92, -78.95. Masas ESI-MS (modo ion. pos.): calc., $[\text{M-OTf}]^+ = 1427,3351$ m/z; exp: 1427,3363 $[\text{M-OTf}]^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{73}\text{H}_{52}\text{F}_9\text{IrN}_{10}\text{O}_3\text{S}_3$: %C, 55,61; %H, 3,32; %N, 8,88; %S, 6,10. Experimental: %C, 55,88; %H, 3,41; %N, 8,90; %S, 6,12.

2.5. Capítulo 6

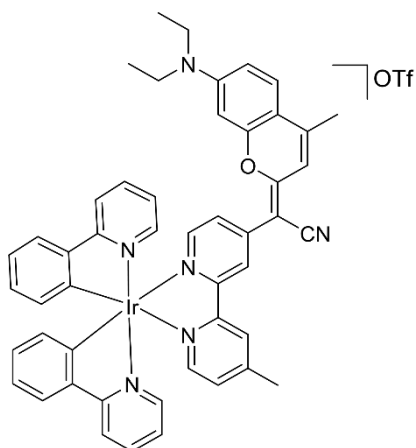
Síntesis del prolígando 2-(tiofen-2-il)benzo[d]tiazol (37)

El ligando **37** se preparó siguiendo un procedimiento descrito previamente en la bibliografía con ligeras modificaciones (**Esquema 6.1**).⁵ Se disolvieron bisulfito de sodio (1,05 g, 10 mmol) y tiofeno-2-carbaldehído (459 μL , 5 mmol) en 10 mL de agua y la mezcla se dejó en agitación a 80 °C durante 1 h. A continuación, se añadió *o*-aminotiofenol (0,55 mL, 5 mmol) disuelto en 10 mL de etanol y la mezcla se dejó reaccionar a 80 °C durante 18 horas. Finalizada la reacción, se evaporó el etanol bajo presión reducida y se llevó a cabo una extracción con diclorometano (3x15 mL). Finalmente, se llevó a sequedad y se precipitó con hexano para obtener un sólido blanco puro.

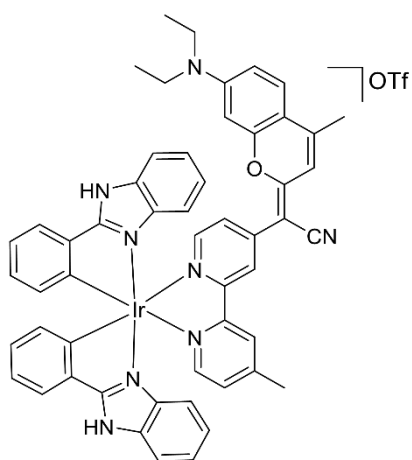
Síntesis de los complejos de iridio 39-48

En primer lugar, se prepararon los dímeros de iridio $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\mu\text{-Cl})_2]$, tal y como viene descrito en la bibliografía (**Esquema 6.2**).⁹ El $\text{IrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mg, 0,16 mmol) y los prolíngandos correspondientes (**34-37** y **25**) (0,35 mmol) se disolvieron en 8 mL de una mezcla 2-etoxietanol: H_2O (3:1 v:v), y la mezcla se dejó en agitación bajo atmósfera de nitrógeno a 110 °C durante 24 h. Una vez terminada la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y los precipitados de color amarillo-naranja se filtraron y lavaron con agua. Los productos se utilizaron en la siguiente reacción sin purificación adicional. A

continuación, el correspondiente dímero de iridio (1 eq), la bpy o el ligando **38** (2 eq) y el triflato de potasio (2,5 eq) se disolvieron en 10 mL de una mezcla MeOH:DCM (3:2 v:v) y se dejó agitar a 58 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y se realizó una columna cromatográfica, utilizando alúmina como fase estacionaria y una mezcla DCM:CH₃CN (1:1 v:v) como eluyente. Finalmente, los compuestos de iridio se recrystalizaron con DCM y hexano, obteniéndose los compuestos **39-48** puros. Los valores de análisis elemental y los espectros de HPLC-MS se obtuvieron tras sustituir el triflato por el cloruro como contraión, previo al estudio biológico.



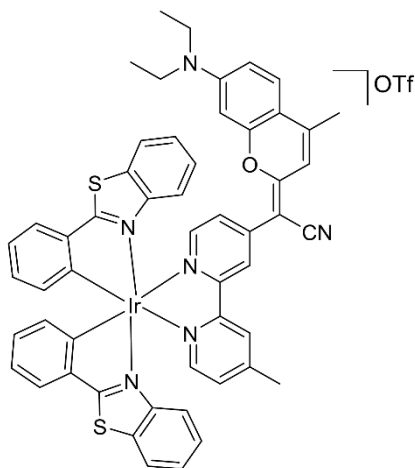
39: 40 %. ¹H RMN (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,77-8,69 (m, 1H), 8,65-8,58 (m, 1H), 8,34-8,22 (m, 2H), 8,06-7,99 (m, 1H), 7,99-7,88 (m, 4H), 7,85 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 7,60-7,48 (m, 2H), 7,26-7,14 (m, 2H), 7,01 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 6,96 – 6,86 (m, 3H), 6,86 – 6,74 (m, 2H), 6,19 (dd, *J* = 11,0, 7,4 Hz, 2H), 3,47 (q, *J* = 7,7 Hz, 4H), 2,52 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 1,12 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 167,0, 166,9, 165,0, 155,1, 154,9, 154,4, 151,4, 151,2, 151,1, 150,7, 149,8, 149,0, 148,8, 143,9, 143,7, 138,7, 138,6, 131,2, 131,0, 130,2, 129,3, 126,4, 125,3, 125,1, 125,0, 124,0, 123,9, 123,5, 122,2, 122,1, 120,0, 119,8, 119,1, 118,9, 110,6, 110,5, 109,6, 97,2, 78,6, 43,9, 20,9, 18,2, 12,5. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., [M-Cl]⁺ = 923,3049 m/z; exp: 923,3084 [M-Cl]⁺ m/z. Anal. Calc. para C₄₉H₄₂ClIrN₆O: %C, 61,40; %H, 4,42; %N, 8,77. Experimental %C, 61,10; %H, 4,50; %N, 8,80.



40: 37 %. ¹H RMN (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13,89 (s, 2H), 8,78-8,72 (m, 1H), 8,65-8,60 (m, 1H), 8,10 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,02 (dd, *J* = 6,1, 2,1 Hz, 1H), 7,96 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,90-7,84 (m, 2H), 7,64 – 7,58 (m, 1H), 7,58 – 7,54 (m, 1H), 7,53-7,48 (m, 1H), 7,27-7,19 (m, 2H), 7,07 – 6,89 (m, 4H), 6,87 – 6,73 (m, 5H), 6,24 (dd, *J* = 14,9, 7,5 Hz, 2H), 5,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 5,72 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 3,47 – 3,40 (m, 4H), 2,55 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,09 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 164,9, 164,3, 164,2, 156,2, 156,1, 154,3, 151,2, 151,1, 150,8, 150,7, 150,1, 148,6, 143,5, 139,4, 139,3, 134,2, 133,2, 133,2, 132,7, 132,6, 130,4, 128,9, 126,3, 124,7, 124,3, 123,6, 123,5, 123,2, 123,2, 122,3,

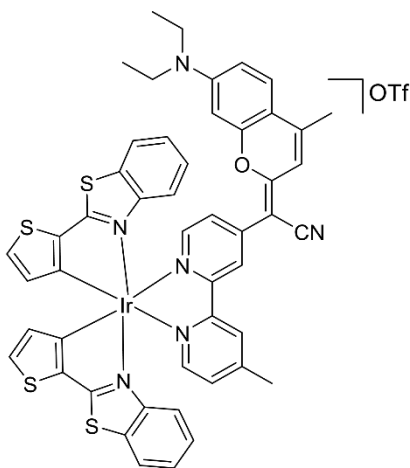
Sección experimental

121,9, 121,9, 119,1, 118,8, 113,1, 112,9, 110,5, 110,5, 109,6, 97,1, 79,0, 78,6, 54,9, 43,9, 20,9, 18,1, 12,4. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[M-Cl]^+ = 1001,3267$ m/z; exp: 1001,3290 $[M-Cl]^+$ m/z. Anal. Calc. para $C_{53}H_{44}ClIrN_8O$: %C, 61,41; %H, 4,28; %N, 10,81. Experimental %C, 61,14; %H, 4,43; %N, 10,90.



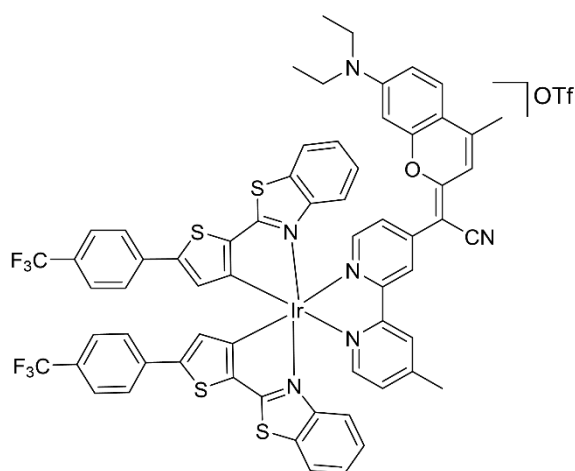
41: 32 %. 1H RMN (401 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,74-8,69 (m, 1H), 8,67-8,62 (m, 1H), 8,24 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 8,08 (dd, $J = 6,2, 2,1$ Hz, 1H), 8,04 – 7,95 (m, 3H), 7,86 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,64 – 7,58 (m, 1H), 7,54 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,48 – 7,39 (m, 2H), 7,32-7,25 (m, 1H), 7,23-7,16 (m, 1H), 7,15-7,07 (t, $J = 7,6$, 2H), 6,92 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,84 – 6,75 (m, 3H), 6,45 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,29 (dd, $J = 13,8, 7,6$ Hz, 2H), 6,19 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 3,51 – 3,40 (m, 4H), 2,55 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO) δ (ppm):

181,2, 181,1, 165,2, 155,8, 155,6, 154,4, 152,2, 151,2, 150,8, 150,0, 149,4, 149,1, 148,7, 144,3, 140,1, 132,7, 132,6, 132,1, 131,3, 131,3, 129,6, 128,3, 128,1, 127,1, 127,0, 126,4, 126,1, 126,0, 125,2, 124,7, 123,6, 123,0, 123,0, 119,4, 118,7, 117,2, 116,9, 110,7, 110,5, 109,7, 97,1, 78,5, 43,9, 21,0, 18,2, 12,4. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[M-Cl]^+ = 1035,2491$ m/z; exp: 1035,2533 $[M-Cl]^+$ m/z. Anal. Calc. para $C_{53}H_{42}ClIrN_6OS_2$: %C, 59,45; %H, 3,95; %N, 7,85; %S, 5,99. Experimental %C, 59,14; %H, 4,05; %N, 7,75; %S, 5,89.



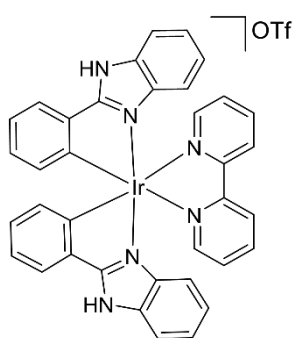
42: 30 %. 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,74-8,70 (m, 1H), 8,65 – 8,62 (m, 1H), 8,15 – 8,11 (m, 2H), 8,08 (dd, $J = 6,3, 2,2$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,82 (dd, $J = 4,7, 2,2$ Hz, 2H), 7,79 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,66 – 7,62 (m, 1H), 7,53 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,38-7,32 (m, 2H), 7,26-7,21 (m, 1H), 7,17-7,12 (m, 1H), 6,84-6,75 (m, 3H), 6,37 – 6,33 (m, 1H), 6,15 (dd, $J = 13,5, 4,7$ Hz, 2H), 6,11 – 6,07 (m, 1H), 3,49 – 3,43 (m, 4H), 2,57 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO) δ (ppm): 174,0, 173,9, 165,2, 160,0,

159,6, 155,8, 155,6, 154,4, 152,4, 151,2, 150,3, 149,8, 149,2, 148,9, 144,4, 136,2, 132,1, 132,0, 131,9, 131,8, 131,2, 131,2, 129,6, 128,2, 128,0, 126,4, 125,2, 125,1, 125,0, 124,6, 123,5, 121,8, 119,6, 119,3, 118,7, 116,0, 115,7, 110,7, 110,5, 109,7, 97,1, 78,5, 43,9, 21,0, 18,2, 12,4. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[M-Cl]^+ = 1047,1619$ m/z; exp: 1047,1643 $[M-Cl]^+$ m/z. Anal. Calc. para $C_{49}H_{38}ClIrN_6OS_4$: %C, 54,35; %H, 3,54; %N, 7,76; %S, 11,85. Experimental %C, 54,24; %H, 3,58; %N, 7,72; %S, 11,81.



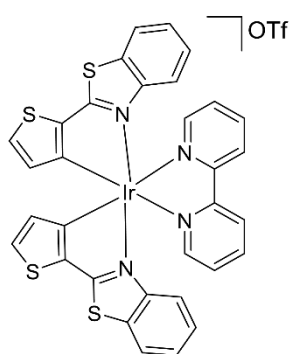
43: 35 % ^1H RMN (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 8,77-8,74 (m, 1H), 8,67-8,62 (m, 1H), 8,21-8,14 (m, 2H), 8,08-8,05 (m, 2H), 8,00 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,82-7,75 (m, 4H), 7,74 – 7,68 (m, 4H), 7,67 – 7,62 (m, 1H), 7,59 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,37 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,24 (ddd, $J = 8,6, 7,4, 1,3$ Hz, 1H), 7,14 (ddd, $J = 8,5, 7,2, 1,3$ Hz, 1H), 6,89 – 6,74 (m, 5H), 6,34 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 3,46 (q, $J = 7,6$ Hz, 4H),

2,57 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO) δ (ppm): 173,3, 173,2, 165,3, 160,6, 160,2, 155,8, 155,6, 154,3, 152,6, 151,2, 150,7, 150,6, 150,3, 149,9, 149,4, 148,9, 144,6, 136,3, 133,4, 131,7, 131,6, 130,0, 129,3, 129,7, 128,8, 128,5, 128,2, 128,0, 126,8, 126,4, 126,1, 125,2, 124,9, 124,7, 123,7, 123,1, 119,3, 118,6, 116,0, 115,7, 110,8, 110,5, 109,7, 97,1, 78,4, 43,9, 21,0, 18,2, 12,4. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[\text{M}-\text{Cl}]^+ = 1335,1993$ m/z; exp: 1335,2033 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{63}\text{H}_{44}\text{ClIrF}_6\text{N}_6\text{OS}_4$: %C, 55,19; %H, 3,23; %N, 6,13; %S, 9,36. Experimental %C, 55,27; %H, 3,31; %N, 6,02; %S, 9,30.



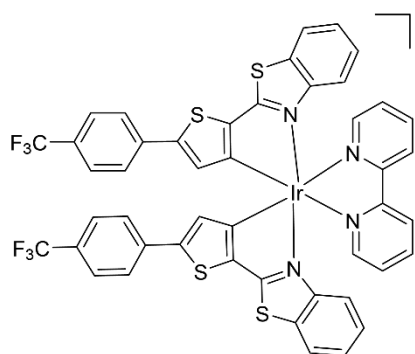
45: 42 %. ^1H RMN (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 13,92 (s, 2H), 8,85 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 8,33-8,24 (m, 2H), 8,15 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 7,88 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,75 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,23 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,04 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 6,92 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,88 – 6,80 (m, 2H), 6,24 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 5,60 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 164,25, 156,5, 151,02, 150,4, 139,5, 139,2, 134,1, 133,2, 132,6, 130,5, 128,4, 124,3, 123,6, 123,3, 122,1, 113,2, 112,7.

Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[\text{M}-\text{Cl}]^+ = 735,1848$ m/z; exp: 735,1859 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ m/z. Anal. Calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{26}\text{ClIrN}_6$: %C, 56,13; %H, 3,40; %N, 10,91. Experimental %C, 56,08; %H, 3,55; %N, 10,62.



47: 23 %. ^1H RMN (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 8,88-8,82 (m, 2H), 8,33 (dt, $J = 7,9, 1,6$ Hz, 2H), 8,17 – 8,10 (m, 2H), 8,01-7,96 (m, 2H), 7,87 – 7,78 (m, 4H), 7,35 (ddd, $J = 8,3, 7,3, 1,1$ Hz, 2H), 7,13 (ddd, $J = 8,5, 7,3, 1,3$ Hz, 2H), 6,17 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 6,01-5,96 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ (ppm): 174,1, 159,2, 156,0, 150,8, 148,7, 140,6, 136,3, 132,1, 131,8, 131,2, 129,1, 128,0, 125,1, 124,8, 124,7, 115,5. Masas HPLC-MS (modo ion. pos.): calc., $[\text{M}-\text{Cl}]^+ = 781,0200$ m/z; exp: 781,0211

[M-Cl]⁺ m/z. Anal. Calc. para C₃₂H₂₀ClIrN₄S₄: %C, 47,08; %H, 2,47; %N, 6,86; %S, 15,71. Experimental %C, 46,74; %H, 2,62; %N, 6,69; %S, 15,82.



48: 20 %. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9,12 – 9,01 (m, 2H), 8,30 (dt, J = 7,9, 1,6 Hz, 2H), 8,15 – 8,11 (m, 2H), 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,61 – 7,51 (m, 10H), 7,36-7,31 (m, 2H), 7,12-7,07 (m, 2H), 6,49 (s, 2H), 6,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173,3, 160,0, 157,0, 152,6, 150,7, 149,2, 141,2, 136,5, 133,7, 131,4, 130,9, 130,7, 129,4, 128,8, 128,4, 126,8, 126,5, 126,1, 126,1,

125,8, 123,7, 116,5. Masas HPLC-MS (modo ion, pos.): calc., [M-Cl]⁺ = 1069,0568 m/z; exp: 1069,0559 [M-Cl]⁺ m/z. Anal. Calc. para C₄₆H₂₆ClF₆IrN₄S₄: %C, 50,02; %H, 2,37; %N, 5,07; %S, 11,61. Experimental %C, 50,08; %H, 2,39; %N, 5,12; %S, 11,50.

3. Instrumentación y técnicas espectroscópicas

3.1. Resonancia Magnética nuclear

Los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y ¹⁹F-RMN, así como los espectros bidimensionales ([¹H-¹H]-COSY, [¹H-¹³C]-HSQC, [¹H-¹³C]-HMBC y [¹H-¹H]-NOESY) se registraron en los espectrómetros de RMN Bruker AC 300E, Bruker AV 400 y Bruker AV 600. Los desplazamientos químicos se referenciaron respecto a las impurezas de los disolventes deuterados.¹¹

3.2. Análisis elemental

El análisis elemental de C, H, N y S se llevó a cabo en un microanalizador Carlo Erba Modelo EA 1108, con un software EAGER 200.

3.3. Espectrometría de masas

Los espectros de ESI-MS y HPLC-MS de los compuestos se registraron en un equipo Agilent HPLC 1290 Series II + Agilent iFunnel 6550 QTOF AJS Dual ESI utilizando una columna Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1x100, 1,8 μm. El flujo empleado fue de 0,4 mL/min y en la **Tabla E.1** se muestra el gradiente utilizado para el análisis.

Tabla E.1. Método para el análisis de RP-HPLC-MS.

Tiempo (min)	H ₂ O + 0,1 % ácido fórmico	CH ₃ CN + 0,1 % ácido fórmico
0-2	80	20
24-25	0	100
26-30	80	20

Los espectros de masas se registraron en modo de ionización positivo y, en todos los casos, muestran una distribución isotópica muy próxima a la calculada experimentalmente para la formulación esperada de los respectivos compuestos.

3.4. Espectroscopía de absorción UV/Vis

Los espectros de absorción UV/Vis se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda 750 S, con un software operativo.

3.5. Espectroscopía de emisión, rendimientos cuánticos de emisión y tiempos de vida media

Los espectros de emisión se registraron en un espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3-22 modular con una lámpara de xenón de 450 W, dos monocromadores de doble rendija y un fotomultiplicador TBX-04. Para las medidas, registradas a 298 K, se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm.

Los tiempos de vida de emisión se determinaron mediante un controlador IBH FluoroHub TCSPC y un diodo de pulso NanoLED, siendo la incertidumbre de ± 10 %. El NanoLED empleado en los capítulos 5 y 6 fue el de 372 nm.

Los rendimientos cuánticos de emisión se midieron en un espectrómetro de rendimiento cuántico PL absoluto Hamamatsu C11347, siendo la incertidumbre de ± 5 %. Antes de la medida las disoluciones se burbujearon con argón durante 30 min.

3.6. Fuente de irradiación de luz

En los experimentos de irradiación en medios libres de células se utilizó un fotorreactor EXPO Panels equipado con lámparas de luz azul ($\lambda = 465$ nm) o verde ($\lambda = 520$ nm) o un fotorreactor Well Plate Illuminator de luz roja ($\lambda = 620$ nm), ambos adquiridos a través de Luzchem (Canadá). Para determinar las potencias de irradiación se utilizó una consola compacta medidora de potencia y energía digital de 4" (PM100D) de Thorlabs (EEUU), equipada con un sensor de potencia fotodiodo estándar (200-1100 nm, 50 nW-50 mW).

3.7. Microondas

Las reacciones de microondas se realizaron en viales de 10 mL, en el reactor de síntesis Monowave 50 (315 mW) de Anton Paar.

4. Toma de datos de difracción de rayos X de monocristal y refinamiento de las estructuras cristalinas

Los cristales se montaron en aceite inerte en fibra de vidrio y las intensidades se registraron a baja temperatura (100 K) en un difractómetro Bruker, utilizando radiación Mo

K α monocromática ($\lambda=0,71073$ Å). Las correcciones de absorción se basaron en barridos múltiples (programa SADABS),¹² las estructuras se refinaron anisotrópicamente utilizando SHELXL-2018¹³ y los átomos de hidrógeno se incluyeron utilizando grupos metilo rígidos o un modelo de equitación.

4.1. Capítulo 2

Los monocristales de los complejos **8** y **10**, adecuados para difracción de rayos X, se obtuvieron por difusión lenta de éter etílico en una disolución saturada de los complejos en acetonitrilo. El sustituyente -CF₃ del ligando N[^]N en el complejo **8** está desordenado en dos posiciones (44:56 %).

4.2. Capítulo 3

Los monocristales de **17**, adecuados para difracción de rayos X, se obtuvieron por difusión lenta de hexano en una disolución saturada del compuesto en diclorometano. La estructura contiene regiones de densidad de electrones residuales mal resueltas. Esto no pudo modelarse adecuadamente, por lo que se "eliminó" utilizando el programa SQUEEZE, que forma parte del sistema PLATON.¹⁴ El volumen de huecos por celda era de 539 Å³, con un recuento de electrones huecos por celda de 160. El disolvente adicional no se tuvo en cuenta al calcular los parámetros derivados de la misma, como el peso de la fórmula empírica porque la naturaleza del disolvente era incierta.

4.3. Capítulo 4

Los monocristales de **22**, adecuados para difracción de rayos X, se obtuvieron por difusión lenta de éter etílico en una disolución saturada del compuesto en diclorometano. La estructura contiene regiones mal resueltas de densidad electrónica residual; esto no pudo modelarse adecuadamente, por lo que se "eliminó" utilizando el programa SQUEEZE, que forma parte del sistema PLATON.¹⁴ El volumen de huecos por celda era de 125 Å³, con un recuento de electrones huecos por celda de 35. Esto es coherente con la presencia de 1,75 H₂O por unidad asimétrica, lo que supone 35 electrones por celda unitaria. Sin embargo, esta asignación de contenido de disolvente debe interpretarse con cautela. El sustituyente del ligando C[^]N -COOMe está desordenado en dos posiciones, aproximadamente 80:20%. En el cristal, las moléculas están unidas mediante enlaces de hidrógeno no clásicos C-H...O, que conducen a la formación de cadenas dobles en la dirección [1,-1,0].

4.4. Capítulo 5

Los monocristales de **32**, adecuados para la difracción de rayos X, se obtuvieron por difusión lenta de hexano en una disolución saturada del compuesto en diclorometano.

La estructura contiene regiones mal resueltas de densidad electrónica residual. Esto no pudo modelarse adecuadamente, por lo que se "eliminó" utilizando el programa SQUEEZE, que forma parte del sistema PLATON.¹⁴ El volumen de huecos por celda era de 322 Å³, con un recuento de electrones huecos por celda de 150. Este disolvente adicional no se tuvo en cuenta al calcular los parámetros derivados, como el peso de la fórmula, porque la naturaleza del disolvente era incierta. Tres de los cuatro sustituyentes CF₃ están desordenados en dos posiciones, aprox. 66:44%, 82:18% y 90:10% cada uno. Para estos sustituyentes se utilizaron comandos SHELXL apropiados, como SADI y RIGU.

5. Ensayos en medios libres de células

5.1. Medidas de estabilidad y fotoestabilidad

La estabilidad en DMSO y medio de cultivo (1 % DMSO), así como la fotoestabilidad de los compuestos se evaluó por espectroscopía de absorción UV/Vis, utilizando disoluciones de concentración 50 µM (Capítulo 2) o 10 µM (Capítulos 3-6). Además, en el Capítulo 5 se comprobó la fotoestabilidad por ¹H-RMN a una concentración de 1 mM.

Para los estudios de estabilidad, los espectros se registraron a tiempo 0 y tras 48 horas de incubación a 37 °C, mientras que, para la fotoestabilidad, los espectros se registraron a tiempo 0 y tras 2 horas de irradiación con luz a una potencia determinada (Tabla E. 2).

Tabla E. 2. Potencias empleadas para el estudio fotoestabilidad de cada capítulo.

Capítulo	λ (nm)	Potencia (mW/cm ²)
3	520	2,0
4	520	2,0
5	465	4,0
6	465	4,0
	520	2,0

5.2. Hidrólisis por RMN

Los experimentos de hidrólisis se realizaron por ¹H-RMN. Los complejos **6-10** (1 mM) se disolvieron en una mezcla DMSO-*d*₆:D₂O (2:1 v:v) y se registraron los espectros a tiempo inicial y tras 24 h de incubación a temperatura ambiente. Los estudios de hidrólisis también se llevaron a cabo por HPLC-MS disolviendo los complejos **6-10** (10 µM) en H₂O_{mQ} (5 % DMSO) y registrando los espectros a tiempo inicial y tras 24 h de incubación a temperatura ambiente.

5.3. Interacción con la HSA

En primer lugar, se preparó la disolución madre de HSA, disolviendo la HSA sólida en 100 mL de tampón 50 mM de Tris-HCl con 100 mM de NaCl a un pH de 7,4. La concentración de dicha disolución se determinó utilizando su coeficiente de extinción molar a 278 nm ($\epsilon_{278} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁴

Por un lado, los análisis cualitativos de la interacción entre los compuestos de los Capítulos 2-4 y la HSA se determinaron mediante espectroscopía de absorción UV/Vis. Para ello, se registraron los espectros de la HSA (1 μM) tras la adición de equivalentes de los compuestos (0-1 equivalentes).

Por otro lado, los análisis cuantitativos de la interacción de los compuestos y la HSA se realizaron mediante valoración fluorimétrica. Para ello, se valoró una porción de 3 mL de una disolución acuosa de proteína (2,7 μM en el Capítulo 2 y 2,5 μM en los Capítulos 3 y 4) mediante adiciones sucesivas de solución de cada complejo (0-10 equivalentes). Tras cada adición, la mezcla se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. A continuación, se midió la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$. La anchura de la rendija de excitación y emisión se fijó en 5 nm, y los espectros de fluorescencia de emisión se registraron en el intervalo de longitudes de onda $\lambda = 305\text{-}570 \text{ nm}$. Con el fin de obtener las constantes de extinción se aplicaron las ecuaciones de Stern-Volmer o Lineweaver-Burk.¹⁵⁻¹⁷ La constante de Stern-Volmer se obtiene al representar gráficamente F_0/F frente a la concentración del compuesto $[C]$ (**Ecuación E.1**).

$$\text{Ecuación E.1: } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}}[C]$$

Donde K_{SV} es la constante de desactivación de Stern-Volmer, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del compuesto y $[C]$ es la concentración del compuesto.

Por su parte, la constante de Lineweaver-Burk se obtiene al representar gráficamente $F_0/(F_0-F)$ frente a la inversa de la concentración del compuesto $1/[C]$ (**Ecuación E.2**).¹⁸⁻²⁰

$$\text{Ecuación E.2: } \frac{1}{F_0-F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{K_{\text{LB}} \cdot F_0} \cdot \frac{1}{[C]}$$

Donde K_{LB} es la constante de desactivación de Lineweaver-Burk (M^{-1}), F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del compuesto y $[C]$ es la concentración del compuesto.

Finalmente, la ecuación de Scatchard permite obtener el número de sitios de unión a los que se une el compuesto en la HSA y la constante de enlace (**Ecuación E.3**).²¹

$$\text{Ecuación E.3: } \log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_B + n \log [C]$$

Donde K_B es la constante de enlace a un sitio de unión, n es el número de sitio por HSA, $[C]$ es la concentración del complejo, y F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del compuesto, respectivamente.

Experimentos competitivos de marcadores de sitio realizados en el Capítulo 2.

Mediante técnicas de valoración por fluorescencia, se cuantificaron los estudios de localización de la unión entre los complejos y la HSA en presencia de dos marcadores de sitio (ibuprofeno y warfarina).^{4,22}

Warfarina como marcador del sitio I. La warfarina se utilizó como marcador del sitio I en los estudios de desplazamiento. Para empezar, se prepararon mezclas equimolares de proteína y warfarina (1:1 μM), se mezclaron completamente y se dejaron equilibrar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se valoró una alícuota de 3 mL de dicha disolución mediante adiciones sucesivas de cantidades crecientes de los complejos **6-10** (0-25 μM). Tras cada adición, las disoluciones resultantes se mezclaron completamente y se dejaron reposar durante 20 minutos. Se eligió una longitud de onda de excitación de 320 nm. Las anchuras de las rendijas de emisión y excitación se ajustaron a 5 nm, y el intervalo de longitudes de onda en el que se registraron los espectros de fluorescencia de emisión fue de 340-550 nm.

Ibuprofeno como marcador del sitio II. El procedimiento fue el mismo que en el experimento anterior, pero utilizando ibuprofeno como marcador del sitio II. Se eligió una longitud de onda de excitación de 280 nm, las anchuras de las rendijas de emisión y excitación se ajustaron a 5 nm, y el intervalo de longitudes de onda en el que se registraron los espectros de fluorescencia de emisión fue de 290-540 nm.

5.4. Fotooxidación del NADH

La reacción entre los complejos de iridio de los capítulos 5 y 6 y el NADH se monitorizó mediante espectroscopía de absorción UV/Vis en oscuridad y tras irradiación con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²), luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²) o luz roja (620 nm, 15 mW/cm²). Para ello, se preparó una disolución de NADH (100 μM) en PBS (5% DMF), en presencia del respectivo compuesto (1 o 5 μM), y se registró el espectro de absorción UV/Vis a diferentes tiempos.

El número de recambio (TOF) se calculó dividiendo la concentración de NADH oxidado entre la concentración del compuesto utilizada y el tiempo de reacción. La concentración de NADH se obtuvo utilizando el coeficiente de extinción molar a 339 nm ($\epsilon_{339} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).²³

5.5. Determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete

Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete de los compuestos de los Capítulos 4, 5 y 6 se determinaron siguiendo un procedimiento adaptado de la bibliografía.^{7,24} Para ello, se prepararon disoluciones de DPBF de concentración 50 μM en acetonitrilo, en presencia de los complejos a concentración conocida o de la referencia $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ ($\Phi_{\Delta}=0,57$ en acetonitrilo). La fotólisis del DPBF se monitorizó cada diez segundos mediante espectroscopía de absorción UV/Vis (350-500 nm) tras irradiar con luz azul (465 nm, 0,5 mW/cm²; Capítulos 5 y 6) o luz verde (520, 0,5 mW/cm²; Capítulos 4 y 6).

Finalmente, se representó la absorbancia del DPBF a 411 frente a los tiempos de irradiación, obteniéndose rectas cuyas pendientes permitieron obtener los valores de rendimientos cuánticos de oxígeno singlete a través de la **Ecuación E.4**.

$$\text{Ecuación E.4} \quad \Phi_{\Delta s} = \Phi_{\Delta r} \frac{m_c}{m_r} \frac{(1-10^{A_{\lambda r}})}{(1-10^{A_{\lambda c}})}$$

Donde $\Phi_{\Delta r}$ es el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de la referencia, m_c y m_r son las pendientes de los complejos y la referencia, y $A_{\lambda c}$ y $A_{\lambda r}$ son las absorbancias de los complejos y de la referencia a la longitud de onda de irradiación (465 o 520 nm), respectivamente.

5.6. Estudio de generación de radical hidroxilo

La generación de radicales hidroxilo por parte de los complejos se determinó mediante espectroscopía de emisión. Para ello, se prepararon disoluciones de los compuestos (10 μM) y la sonda no fluorescente HPF (10 μM) en PBS (5 % DMF). A continuación, las muestras se irradiaron con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²; Capítulo 5 y 6) o con luz verde (520, 2,0 mW/cm²; Capítulos 4 y 6), y se registró la evolución de los espectros de emisión de la HPF ($\lambda_{\text{ex}}=490$ nm) con el tiempo. La anchura de las rendijas de excitación y emisión fue de 3 nm, y los espectros de fluorescencia de emisión se registraron en el intervalo de longitudes de onda $\lambda=500$ -600 nm.

6. Experimentos biológicos *in vitro* (Colaboración con el Prof. Dr. V. Brabec)

6.1. Capítulo 2

Líneas celulares

Las células RD y PSN1 se cultivaron en medio RPMI 1640, y las demás células se cultivaron en medio DMEM (alto contenido en glucosa, 4,5 g/L). Ambos medios se complementaron con gentamicina (50 mg/mL) y 10 % de FBS inactivado por calor. El medio para las células MRC5 se suplementó, además, con un 1 % de aminoácidos no

esenciales. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada (37 °C y 5 % CO₂) y se subcultivaron dos veces por semana.

Actividad antiproliferativa

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos un día antes del tratamiento a una densidad adecuada de 2·10³ células/pocillo (RD, HCT116, PSN1), 3·10³ células/pocillo (MCF7, MDA-MB-231, HeLa) y 5·10³ células/pocillo (MRC5). Las células se trataron con los compuestos sintetizados en medio DMEM o RPMI. Tras 72 h de tratamiento, se realizó el ensayo MTT (0,125 mg/mL, 3-4 h). A continuación, se retiró el medio y se sustituyó por 100 µL de DMSO. La absorbancia se registró a 570 nm.

Acumulación celular

Las células RD se sembraron en placas de Petri a una densidad de 2·10⁶ células/placa y se incubaron durante la noche. Después, se trataron con los compuestos durante 5 h a una concentración de 50 µM y, tras el tratamiento, se recogieron, lavaron, contaron y precipitaron. Los pellets celulares se lisaron con el sistema de digestión de microondas con ácido (HCl) y el contenido metálico se midió mediante ICP-MS.

Localización celular

Las células RD se sembraron en placas confocales (35 mm) a una densidad de 1,5·10⁵ células/placa y se incubaron durante la noche. Se añadió el complejo **10** (o DMF) a la concentración indicada, y las células se visualizaron con un microscopio confocal Leica CM SP5. La fluorescencia de **10** se obtuvo utilizando un láser UV ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=355/400-485$ nm).

Los estudios de colocación se realizaron en condiciones similares. Las células se tiñeron previamente con LysoTracker (75 nM, 37 °C, 2 h), ER-Tracker (1 µM/HBSS, 37 °C, 30 min) o TMRE (0,1 µM, 37 °C, 30 min) y después se añadió **10** a las concentraciones indicadas, para visualizarlas después por microscopía confocal (Leica CM SP5). Se aplicó un barrido secuencial (**10** - $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=355/400-485$ nm; LysoTracker - $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=504/511-585$ nm; ER-Tracker ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=587/615-660$ nm); o TMRE - $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=549/574-620$ nm).

Pérdida del potencial de membrana mitocondrial

Tinción TMRE previa al tratamiento. Las células RD se cultivaron en una placa de Petri, se cosecharon con tripsinización, se tiñeron con TMRE (100 nM, 37 °C, 30 min) en DMEM y, a continuación, se alicuotaron en tres partes. La primera permaneció sin tratar, la segunda se trató con estaurosporina (2 µM) y la tercera se trató con **10** (20 µM). El análisis por citometría de flujo se realizó inmediatamente y varias veces en el plazo de una hora.

Tinción TMRE posterior al tratamiento. Las células RD se cultivaron en una placa de 6 pocillos y se trataron con las concentraciones indicadas de **10**. Tras los periodos indicados (1 - 24 h), se tiñeron con TMRE y se analizaron por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo de la tinción con Annexin V/yoduro de propidio

Las células RD se trataron con **10** a las concentraciones indicadas durante 24 h. Tras el tratamiento, las células se tripsinizaron, lavaron y resuspendieron en tampón de unión a Anexina V, que contenía Anexina V (dilución 1:20) y yoduro de propidio (10 µg/mL). Las células se analizaron en el citómetro de flujo BD FACS Verse y se evaluaron con FCS Express 6.

Activación de la caspasa-3

La activación de la caspasa-3 se detectó con el reactivo CellEvent® Caspase3/7 Green Detection Reagent. Las células RD se trataron con el complejo **10** a las concentraciones indicadas durante 24 h, o estaurosporina (2 µM) durante 3 horas. Tras la tinción con el reactivo verde (10 µM, 37 °C, 30 min), se analizaron por citometría de flujo.

Detección de ROS

Las células RD se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/pocillo y se incubaron durante 16 h. A continuación, se expusieron a los compuestos ensayados o a la menadiona (control positivo, 100 µM) durante 24 h a las concentraciones indicadas. Se añadieron 5 µM de reactivo CellROX®Green a las células, y se incubaron durante otros 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las células se recogieron, se lavaron con PBS y se analizaron con un citómetro de flujo (BD FACS Verse). Finalmente, los datos se analizaron con FCS Express 6.

Ciclo celular

Las células RD se sembraron en placas de 6 pocillos ($3 \cdot 10^5$ células/pocillo) y se incubaron durante 24 h. A continuación, se trataron con los compuestos probados a las concentraciones indicadas durante 24 h. Después de cosecharlas y lavarlas, se precipitaron (250 g, 3 min) y los gránulos se resuspendieron en etanol. Al día siguiente, se enjuagaron dos veces con PBS y se tiñeron con yoduro de propidio (50 µg/mL con 100 µg/mL RNasa A) en solución de Vindel (10 mM Tris-Cl (pH=8,0), 10 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100) durante 30 min a 37 °C. Los perfiles del ciclo celular se registraron utilizando el citómetro de flujo FACS Verse y los datos se analizaron con FCS Express 6.

Preparación de células de rhabdomyosarcoma enriquecidas con CSC (RD.CD133+)

Se utilizaron anticuerpos marcadores de CSC con CD133/1-APC (Miltenyi Biotec, Reutlingen, Alemania) para teñir las células RD CD133-positivas (10 min, 4 °C). A continuación, se lavaron y se acoplaron con microperlas anti-APC (15 min, 4 °C). Tras otro lavado, se clasificaron magnéticamente en una columna LS, utilizando imanes en un soporte MACS. Seguidamente, se eluyeron las fracciones CD133- y CD133+.

Rabdosferas 3D

Se sembraron células RD.CD133- y RD.CD133+ clasificadas en placas de 96 pocillos en forma de U de fijación ultrabaja a una densidad de 800 células/pocillo. Las células se cultivaron durante 4 días en un medio de no diferenciación DMEM/F12 Ham suplementado con un 2 % de B27, factor de crecimiento de fibroblastos (10 ng/mL), factor de crecimiento epidérmico (20 ng/mL) y 0,4 % de albúmina de suero bovino.

Efecto citotóxico/antiproliferativo en esferoides RD.CD133- y RD.CD133+

Los esferoides se trataron con una serie de concentraciones de los compuestos ensayados durante 72 horas. Tras este periodo, se realizó el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo®, y la luminiscencia resultante se midió con un lector de microplacas SPARK®. Los valores IC₅₀ corresponden a un efecto de inhibición del 50% frente al control.

Microscopía confocal de esferoides RD.CD133

Los esferoides RD.CD133+ representativos se transfirieron a placas confocales (MatTek) y se tiñeron con Calceína AM (2 µM) y yoduro de propidio (8 µg/mL) a 37 °C durante 2 h. Se añadió Hoechst 33342 (20 µg/mL) para definir la forma de los esferoides. Las imágenes confocales se registraron con el microscopio confocal de barrido láser Leica SP8 SMD, y las intensidades de fluorescencia del canal de calceína AM y del canal de yoduro de propidio se midieron con el software ImageJ.

6.2. Capítulo 3

Líneas celulares

Las células PSN1, OE33 y PNT1A se cultivaron en medio RPMI, y todas las demás se mantuvieron en medio DMEM (alto contenido en glucosa, 4,5 g/L). Ambos medios se suplementaron con gentamicina (50 µg/mL) y un 10 % de FBS inactivado por calor. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂, y se subcultivaron periódicamente para mantener una densidad de siembra adecuada.

Actividad antiproliferativa en 2D

La actividad antiproliferativa de los compuestos **15-20** se determinó mediante un ensayo MTT. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, con una densidad de $5 \cdot 10^3$ células por pocillo, en 100 μ L de medio y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ durante toda la noche. Posteriormente, se trataron con los compuestos en el rango de concentración 0-100 μ M y se incubaron durante 72 h. Tras esto, se agregaron 20 μ L de una disolución de MTT diluida (1,25 mg/mL en PBS) y se incubaron a 37 °C y al 5 % de CO₂ durante 4 h. Finalmente, se eliminó el medio y se añadió DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm, utilizando un lector de microplacas (*Spark Tecan, Schoeller*). Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado.

Actividad antiproliferativa en 3D

La actividad de los compuestos **15-20** también se determinaron en el cultivo celular 3D de MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con fijación ultrabaja y una densidad de 5000 células/pocillo en medio Ham DMEM/F12 suplementado con un factor de crecimiento epidérmico (20 ng/mL), BSA (1,5 mg/mL) y un 2 % de suplemento B-27, y se dejaron crecer durante 4 días. Los esferoides resultantes se trataron con los compuestos durante 72 horas, se controlaron y transfirieron a una placa negra. Se añadió el reactivo CellTiter-Glo 3D y se incubó durante 30 minutos. Este reactivo de ensayo 3D mide el ATP como indicador de viabilidad y genera una señal de luminiscencia que se mide con un lector Tecan SPARK. Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir de las curvas dosis-respuesta, cuyos valores se determinaron a través del ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo 3D, de acuerdo al protocolo del fabricante.

Ensayo de exclusión de azul tripán

Las células MDA-MB-231, sembradas en placas de 24 pocillos en medio DMEM, se trataron con los compuestos de osmio y se incubaron a 37 °C al 5 % de CO₂. En ciertos intervalos de incubación, las células se recogieron, se tiñeron con azul tripán y se contaron utilizando el contador celular automatizado BioRad TC10.

Determinación de ROS intracelular

Las ROS intracelulares se cuantificaron en células MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo. Tras 2 días se trataron con los complejos (0,1, 1, 5 o 10 μ M) o menadiol (100 μ M) durante 2 h. Tras la incubación, se recogieron, se añadió el reactivo CellROS (5 μ M) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se lavaron con PBS y se midió la intensidad de

fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) empleando un citómetro de flujo Cell Stream (Amnis).

Determinación del nivel de Ca^{2+}

La liberación de calcio del RE al citoplasma se estudió utilizando la sonda fluorescente sensible al calcio Fluoro-4 AM. Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo. Tras dos días, se trataron con los compuestos **17**, **20** o ionomicina ($5 \mu\text{M}$) durante 2 o 24 h. Posteriormente, se recogieron, se tiñeron con Fluoro-4-AM ($5 \mu\text{M}$) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C . Luego, se lavaron con PBS y se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) mediante un citómetro de flujo Cell Stream (Amnis).

qRT-PCR de los marcadores del estrés del RE

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo y se incubaron durante la noche. A continuación, se trataron con los compuestos **17** y **20** (a distintas concentraciones) durante 4, 14 o 24 h. Después del lavado, se cosecharon y se aisló el ARN total utilizando columnas de ARN NucleoSpin (Marchery Nagel, GE). Se aplicó una qPCR de un solo paso que combina la transcripción inversa seguida de un ciclo térmico de amplificación, utilizando Luna[®] Universal one-step R-qPCR (New England BioLabs, MA, EEUU). El perfil térmico fue el siguiente: transcripción inversa durante 10 min a 55°C , desnaturalización inicial durante 1 min a 95°C , seguida de 43 ciclos térmicos de desnaturalización durante 10 s a 95°C y extensión durante 30 s a 60°C . Las secuencias de los primers fueron: GAPDH-F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG; GAPDH-R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA; BiP(GRP78)-F: CTGTCCAGGCTGGTGTGCTCT; BiP(GRP78)-R: CTTGGTAGGCACCACTGTGTTC; Calnexin-F: GCTGGTTAGATGATGAGCCTGAG; Calnexin-R: ACACCACATCCAGGAGCTGACT; ERO1A-F: GAAGGCTGTTCTTCAGTGGACC; ERO1A-R: CCCTTGTAACCAGTGTAGCGCT; IRE1-F: CCGAACGTGATCCGCTACTTCT; IRE1-R: CGCAAAGTCCTTCTGCTCCACA; DDIT3(CHOP)-F: GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT; DDIT3(CHOP)-R: CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG; PERK-F: GTCCCAAGGCTTTGGAATCTGTC; PERK-R: CCTACCAAGACAGGAGTTCTGG; PDIA2-F: GCTGCTGTTTGTCAACCAGACG; PDIA2-R: CCTCAGCCTTGAGTCCAAAGTAC.

Los primers purificados se obtuvieron de Generi Biotech (República Checa). GAPDH se utilizó como control interno. La expresión relativa del ARNm se representa como un aumento del doble ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

Experimentos de inmunotransferencia

Las células MDA-MB-231 se sembraron a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo, se cultivaron durante la noche y se incubaron con los complejos **17** y **20** (a diversas concentraciones) durante 4, 14 o 24 h. Tras lavarlas con PBS, las células se rasparon en PBS frío y se precipitaron. A continuación, los gránulos se lisaron con tampón RIPA suplementado con inhibidores de la proteinasa, siguiendo las recomendaciones del fabricante (1 h en hielo), y los extractos se limpiaron por centrifugación (15000 rpm/10 min). Las proteínas que contenían los sobrenadantes se combinaron con tampón de carga Laemmli 2× (125 mM Tris-HCl, 20 % de glicerol, 10 % de 2-mercaptoetanol, 4 % de SDS y 0,004 % de azul de bromofenol) y se calentaron a 95 °C durante 10 min. Se utilizó SDS-PAGE al 4-20 % para resolver las proteínas. Tras transferirlas a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), se detectaron utilizando los anticuerpos apropiados: BiP (C50B12) de conejo, Calnexina (C5C9) de conejo, anticuerpo Ero1- α 3264, IRE1 α (14C10) de conejo, PDI (C81H6) de conejo, CHOP (L63F7) de ratón, PERK (D11A8) de conejo, GAPDH producido en ratón, anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con HRP, y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Se utilizó reactivo SignalFire ECL (A + B) como sustrato para HRP, y la luminiscencia se registró con Amersham Imager 680. Las densidades de las imágenes se evaluaron con el software de análisis de imágenes Aida.

Ensayo de fototoxicidad

La actividad fototóxica de los complejos se determinó frente a células HeLa, OE33 y A375. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^3$ (HeLa, A375) o $5,5 \cdot 10^3$ (OE33) células por pocillo en 100 μ L de medio, y se cultivaron en condiciones de normoxia (21 % O₂, 5 % CO₂) o hipoxia (3 % O₂, 5 % CO₂) en un incubador humidificado. Tras una noche de incubación, se retiró el medio, se añadió el compuesto a analizar diluido en una solución salina equilibrada de Earle (EBSS) y se incubaron las células durante 1 h en la oscuridad. Tras el periodo de incubación, se irradiaron durante 1 h con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 533$ nm) o se dejaron en la oscuridad. Posteriormente, se eliminó el EBSS y las células se volvieron a colocar en la incubadora en un medio de cultivo libre de fármacos. Su actividad metabólica se determinó 70 h después de la irradiación, mediante un ensayo MTT estándar (absorbancia medida a 570 nm). Los valores de IC₅₀ se obtuvieron a partir de curvas de supervivencia celular de concentración-respuesta. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se realizaron, al menos, tres experimentos independientes.

6.3. Capítulo 4

Líneas celulares

Las líneas celulares HeLa, A375, OE33 y MRC5pd30 se cultivaron en medio DMEM (alto contenido en glucosa, 4,5 g/L), suplementado con gentamicina (50 µg/mL) y un 10 % de FBS inactivado por calor. El medio para las células MRC5pd30 también se suplementó con un 1 % de aminoácidos no esenciales. Todas las células se cultivaron como monocapas adherentes en una incubadora humidificada a 37 °C, bajo una atmósfera con un 5 % de CO₂, y se subcultivaron dos veces por semana con una densidad de siembra adecuada.

Actividad antiproliferativa

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^3$ células por pocillo en un medio de cultivo y se incubaron durante la noche. Después, se trataron e irradiaron con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²) o se dejaron en la oscuridad. Tras el tratamiento, se incubaron durante 70 h en un medio libre de fármacos. A continuación, se añadió la solución de MTT (125 µg/mL) y se incubó durante 4 h a 37 °C. Se eliminó el medio y se añadieron 100 µL de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm.

Acumulación celular

La acumulación celular de los complejos **21-24** se determinó en células HeLa. Para ello, se cubrió una placa de Petri (100 mm) con células y se incubó hasta que estas ocuparon aproximadamente el 80 % del área de crecimiento. A continuación, el medio de crecimiento se sustituyó por EBSS con los compuestos de rutenio (5 µM) durante 2 h. Las células se lavaron con PBS frío, se tripsinizaron y los gránulos celulares se enjuagaron también con PBS. Después, dichas células se contaron, se mineralizaron añadiendo 200 µL de HCl al 35 %, y se incubaron durante una semana. A continuación, las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final de 1500 µL y el contenido de rutenio se evaluó mediante ICP-MS.

Distribución subcelular

La distribución subcelular de los complejos **21-24** se determinó en células HeLa. Las células se prepararon igual que para los experimentos de acumulación. Tras cosechar las células por tripsinización, el sedimento se dividió en cuatro fracciones (citósólica, membrana/partícula, nuclear y citoesquelética) utilizando el kit de fraccionamiento celular FractionPREP (*BioVision*, K270), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada fracción se liofilizó, se resuspendió en 200 µL de HCl al 35 % y se mineralizó durante, al

menos, una semana. A continuación, las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final de 1500 μL y el contenido de rutenio se evaluó mediante ICP-MS.

Determinación de ROS intracelular

Las células HeLa se sembraron en una placa de 96 pocillos, a una densidad de $4 \cdot 10^4$ células por pocillo, y se dejaron adherir durante una noche. A continuación, se trataron con los complejos (50, 200, 600 nM) y se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). Después, se lavaron con PBS y se tiñeron con 5 μM de CellROX Green (*Invitrogen*, C10444) en PBS durante 30 min a 37°C . La menadiona (100 μM) se utilizó como control positivo de la inducción de ROS durante 1 h en medio de cultivo. Tras la tinción, las células se lavaron con PBS y se cosecharon por tripsinización. Finalmente, la fluorescencia se midió mediante citometría de flujo (*BD FACSverse*).

Evaluación morfológica

Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos, a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo en medio de cultivo, y se incubaron durante la noche. A continuación, se trataron con **21** a distintas concentraciones (50 nM, 200 nM y 600 nM), seguidas de 1 h de irradiación ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). A continuación, las células se fotografiaron utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41 equipado con una cámara Canon EOS 1200D. El detalle de las células HeLa tratadas con 200 nM de **21** se adquirió con un microscopio confocal Olympus FV10i. Para la cuantificación del tamaño celular, las células tratadas se cosecharon por tripsinización y se analizaron por citometría de flujo (*BD FACSverse*).

Nivel intracelular de ATP. Las células HeLa se trataron con **21** y se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). Tras 1 h de recuperación en medio libre de compuestos, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se contaron. Se utilizó el ensayo de exclusión con azul tripán para evaluar la integridad de la membrana celular. Los niveles de ATP intracelular se determinaron utilizando el reactivo CellTiter-Glo® 3D.

Western blotting. Las células HeLa se trataron con **21** y se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). A continuación, se eliminó el complejo que contenía EBSS y las células se incubaron en medio libre de fármacos durante 48 h. Después, se rasparon, se lavaron con PBS, se precipitaron por centrifugación y se lisaron durante 40 min con tampón RIPA frío suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo, ortovanadato sódico e inhibidores de proteasas, según el protocolo del fabricante (*Santa Cruz Biotechnology, INC.*). Los extractos resultantes se aclararon (15000g; 10 min), se combinaron con $2 \times$ tampón LBS (4 % de dodecil sulfato sódico; 10 % de 2-mercaptoetanol; 20 % de glicerol; 0,125 M Tris-HCl y 0,004 % de azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 min a 95°C . Las muestras

se separaron mediante SDS-PAGE (4-15 %; Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels) y se transfirieron a una membrana de PVDF, y la porimina y la GAPDH se detectaron utilizando anticuerpos primarios específicos: Anti-Porimin (G2) (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-377295), anticuerpo Anti-GAPDH y anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (HRP). Tras añadir el sustrato (SignalFire™), se registró la luminiscencia con el Amersham Imager 680.

Inmunotinción de porimina. Las células HeLa se trataron o no con el complejo **21** (IC_{50}) y se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$, $2,2 \text{ mW/cm}^2$). Tras 4 h de recuperación en medio libre de compuestos, se fijaron con paraformaldehído (4%) sobre vidrio microscópico y se permeabilizaron (0,1 % TRITON X-100). Después, se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario Porimin G-2 (sc-377295, Santa Cruz). Posteriormente, se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario con un colorante fluorescente (ab150113, Abcam) durante 1 h. Se lavó el exceso de colorante y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP5.

Ensayo Anexina V-Yoduro de propidio

La integridad de la membrana y su exposición a la fosfatidilserina en el lado extracelular de la membrana se midieron mediante la doble tinción con Anexina V-Yoduro de propidio. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10^5 , $1,5 \cdot 10^5$ o $2,5 \cdot 10^5$ células por placa, para evaluarlas después de 2 días, 1 día o de forma inmediata, respectivamente. Tras una noche de incubación, las células se trataron con **21** a distintas concentraciones (50, 200 y 600 nM), y se irradiaron con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$). A continuación, se cultivaron en un medio libre de fármacos hasta el momento del análisis. Todas las células se recogieron y se resuspendieron en una disolución de tinción, compuesta por: 1x tampón de unión de Anexina V (*BD Pharmingen*), 1x Anexina V conjugada con Pacific Blue y yoduro de propidio (10 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, las células se dejaron incubar durante 15 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo (*BD FACSverse*).

Tinción con TMRE

Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos, a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo, y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron con **21** a distintas concentraciones (50, 200, 600 nM), seguidas de irradiación ($\lambda_{\text{máx}} = 545 \text{ nm}$). A continuación, las células se cosecharon por tripsinización y se resuspendieron en 200 μL de disolución de TMRE (10 nM) en medio de cultivo. Tras 30 min de tinción a 37°C , se lavaron con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Como control positivo se utilizó FCCP (10 μM).

Determinación intracelular de calcio

La determinación del nivel de calcio intracelular se determinó en células HeLa utilizando la sonda Fluo-8 AM. Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo. Tras una noche de incubación, las células se trataron con el compuesto **21** (50, 200, 600 nM) en PBS durante 1 h y se irradiaron con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm). A continuación, se tiñeron con Fluo-8 AM (5 μ M) disuelto en PBS durante 30 min a 37 °C. Tras la tinción, las células se recogieron por tripsinización, el precipitado se resuspendió en PBS y se analizó por citometría de flujo (BD FACSverse).

Ensayo de fuga de liposomas

Los liposomas, que contenían carboxifluoresceína (tinción fluorescente), se prepararon utilizando el método de hidratación de película fina seguido de extrusión. Los lípidos se disolvieron en cloroformo hasta una concentración final de 25 mg/mL. A continuación, se mezclaron 2,925 mg de DSPC 18:0, 3,9 mg de DOPC 18:1, 1,225 mg de colesterol y 1,95 mg de DSPE-PEG2000 para formar una mezcla con proporciones molares de 30:40:25:5, respectivamente. La mezcla se incubó durante 5 min a 65 °C, se transfirió a un matraz de 50 mL con 3 mL de cloroformo, y el disolvente orgánico se evaporó a 65 °C bajo una atmósfera de N₂. La película lipídica seca se hidrató con 0,5 mL de carboxifluoresceína 100 mM disuelta en PBS. La solución se sonicó 3x3 s, se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló a temperatura ambiente 5 veces. Se formaron liposomas uniformes por extrusión a través de una membrana de 200 nm 10 veces y, finalmente, se dializaron en PBS utilizando una membrana de diálisis de 8 kDa durante una noche. A continuación, los liposomas se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 25 μ g/mL, y se incubaron con el compuesto **21** (50, 200, 600 nM) o un volumen equivalente de DMSO durante 0 o 120 min en la oscuridad, o tras ser irradiados con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²). La fluorescencia se midió utilizando el espectrómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm), y se normalizó a la fluorescencia máxima tras la adición de Triton X-100 al 10 % (1/100 de volumen).

Experimentos de calorimetría diferencial de barrido

Las células Hela se sembraron en una placa Petri de 100 mm, a una densidad de $4 \cdot 10^6$ células por pocillo, en medio de cultivo y se dejaron adherir durante la noche. A continuación, se trataron con **21** (50, 200 y 600 nM) y se irradiaron con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, 2,2 mW/cm²). Posteriormente, se lavaron con PBS, se recogieron y se resuspendieron en 1 mL de PBS filtrado. Se utilizó una fracción de la muestra para cuantificar las proteínas mediante el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, 500-0002), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, la muestra se desgasificó y se

cargó en el calorímetro diferencial de barrido Nano DSC (*TA Instruments, EE.UU.*). Todas las muestras se escanearon de 25 a 115 °C con una velocidad de escaneo de 1 °C/min. La curvatura intrínseca de la línea de base se corrigió restando un barrido en blanco de PBS. Asimismo, la línea de base calculada se restó de los datos corregidos.

6.4. Capítulo 5

Líneas celulares

Las células A375, HeLa, HCT116 y MRC5pd30 se cultivaron en DMEM (alto contenido en glucosa, 4,5 g/L) suplementado con gentamicina (50 mg/mL) y un 10 % de FBS inactivado por calor. Los medios para las células MRC5 se enriquecieron, además, con un 1 % de aminoácidos no esenciales. Las disoluciones madre de los complejos de iridio se prepararon en DMSO y se diluyeron en EBSS o DMEM, siendo la concentración final de DMSO en los experimentos biológicos no superior al 1 %.

Ensayo de fototoxicidad

La actividad fototóxica de los complejos **30-33** se determinó frente a células HeLa, A375 y HCT116. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de $5 \cdot 10^3$ células por pocillo, en 100 μ L de DMEM, y se cultivaron durante toda la noche en una incubadora humidificada. A continuación, se retiró el medio, se añadieron los compuestos sintetizados diluidos en EBSS y se incubaron durante 1 h en la oscuridad. Las células de control se incubaron con EBSS sin complejos y con la misma concentración de DMSO que en las células tratadas con los complejos de iridio. Posteriormente, las células se irradiaron ($\lambda_{\text{máx}} = 420$ nm) o se dejaron en la oscuridad durante 1 h. Seguidamente, se eliminó el medio EBSS con los complejos de iridio, y las células se cultivaron durante 72 h en un medio DMEM libre de fármacos. El número de células se determinó mediante un ensayo MTT. Los valores IC_{50} se obtuvieron a partir de curvas dosis-respuesta y el índice de fototoxicidad (PI) se calculó como cociente de IC_{50} (oscuridad)/ IC_{50} (irradiado).

Acumulación intracelular

La acumulación celular de **30-33** se determinó en células HeLa. Las células se trataron con los complejos de iridio a concentraciones equimolares (3 μ M) durante 2 h a 37 °C, y el nivel de iridio acumulado se midió mediante ICP-MS.

Determinación intracelular de ROS

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de $1 \cdot 10^4$ células por pocillo, se trataron con los compuestos probados en EBSS a las concentraciones equimolares indicadas y se irradiaron durante 1 h ($\lambda_{\text{máx}} = 420$ nm). A continuación, se retiró el EBSS con el compuesto de iridio, se lavaron las células con PBS, se cosecharon por

Sección experimental

tripsinización, se añadió el reactivo CellROSDep Deep Red (5 μM) y estas células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se lavaron con PBS y se analizó la intensidad de fluorescencia (λ_{ex} = 640 nm, λ_{em} = 660 nm) mediante citometría de flujo (*BD FACS Verse*). Los datos se analizaron con FCS Express 6.

Detección de la muerte celular

Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos, a una densidad de $1,5 \cdot 10^5$ células por pocillo, se dejaron en reposo toda la noche, se trataron con las concentraciones indicadas de complejos de iridio y, a continuación, se irradiaron durante 1 h con luz azul ($\lambda_{\text{máx}}$ = 420 nm). Posteriormente, se eliminó el EBSS y las células se incubaron durante 22 h más en medio libre de fármacos. Después, las células se recogieron por tripsinización, se lavaron en PBS (4 °C) y se tiñeron con yoduro de propidio (1 $\mu\text{g/mL}$) y Anexina V PacificBlue (5 μL por 100 μL de suspensión celular) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la tinción, las células se analizaron mediante citometría de flujo (*BD FACSVerse*) y los datos se analizaron utilizando el software Express 6. El experimento se llevó a cabo por triplicado y se realizaron, al menos, tres experimentos independientes.

Microscopía confocal

Las células HeLa se sembraron en placas de cultivo confocal con fondo de cristal de 35 mm, a una densidad de $1,5 \cdot 10^5$ células por placa, y se incubaron durante toda la noche. A continuación, se trataron con los compuestos **30** y **32** (2,5 μM) en un medio libre de rojo de fenol y se incubaron durante 5 h. Tras la incubación, se lavaron con PBS y se incubaron en un medio de cultivo libre de fármacos. Posteriormente, las muestras se analizaron en un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP5. Los complejos de iridio se excitaron a 405 nm y la emisión se detectó en el rango de 450-750 nm.

Ensayo de actividad de la caspasa-3/7

La activación de la caspasa-3 se detectó utilizando el kit de citómetro de flujo CellEvent™ Caspase-3/7 Green (*Thermo Fisher Scientific*). Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos, a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo, se trataron con los compuestos **30-33** y se irradiaron como se ha descrito previamente (1 h de incubación en la oscuridad y 1 h de irradiación a 420 nm). Tras 2 h de recuperación en medio libre de fármacos, las células se tiñeron con el reactivo CellEvent Caspase 3/7, según el protocolo del fabricante, y la señal de fluorescencia se analizó por citometría de flujo.

Experimentos de inmunotransferencia

Las células HeLa se trataron con los compuestos **30-33**, y se irradiaron como se ha descrito anteriormente (1 h de tratamiento en la oscuridad y 1 h de irradiación). Tras la irradiación, se eliminaron los complejos y las células se incubaron en medio libre de células durante 2 h. A continuación, se rasparon, se lavaron con PBS, se centrifugaron y se lisaron durante 40 min con tampón RIPA frío, suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo, ortovanadato sódico y cóctel de inhibidores de proteasas, según el protocolo del fabricante (*Santa Cruz Biotechnology, INC.*). Los extractos resultantes se aclararon, se combinaron con 2 × tampón LBS (dodecil sulfato sódico (SDS) al 4 %, 2-mercaptoetanol al 10 %, glicerol al 20 %, Tris.HCl 0,125 M y azul de bromofenol al 0,004 %) y se calentaron durante 5 min a 95 °C. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE (4-15 %) y se transfirieron a una membrana de PVDF. La porimina y la GAPDH se detectaron utilizando anticuerpos primarios específicos: Anti-Porimin (G2) (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-377295), anticuerpo Anti-GAPDH (Sigma Aldrich, G8795; 1 200) y anticuerpos secundarios: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (*Abcam*, ab205718; 1:1000) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (HRP) (*ThermoFisher Scientific*, 32430). Tras añadir el sustrato SignalFire™ ECL Reagent A+B, se registró la luminiscencia con el Amersham™ Imager 680. La evaluación cuantitativa se realizó con el software de imagen Aida.

Ensayo de integridad de la membrana

Las células HeLa se sembraron en una placa de 6 pocillos, a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células por pocillo, se trataron con los compuestos del Capítulo 5 (**30-33**) y se irradiaron como se ha descrito anteriormente (1 h de preincubación en la oscuridad y 1 h de irradiación a 420 nm). Tras 2 h de recuperación en medio libre de células, se extrajo el medio (10 µL) y se transfirió a una placa negra de 96 pocillos. Para determinar la actividad de LDH en el medio, se utilizó el ensayo de integridad de membrana homogéneo CytoTox-ONE™ (*Promega*), según el protocolo del fabricante.

Localización intracelular

Las células HeLa se sembraron en placas de Petri de 35 mm (*Mattek*) a una densidad de $1,5 \cdot 10^5$ células por placa, y se incubaron durante la noche. A continuación, las células se trataron con 2 µM de los compuestos de iridio y se incubaron durante 3 h. Después, las muestras se tiñeron con MitoTracker Red FM o LysoTracker Green DND-26 (*Thermo Fisher Scientific*). Las muestras teñidas con MitoTracker se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % antes del escaneado, mientras que las teñidas con LysoTracker se escanearon bajo incubación continua a 37 °C y un 5 % de CO₂. Los estudios de colocalización se analizaron en el microscopio confocal Leica CM SP5, y el procesamiento

posterior de las imágenes y los cálculos de los coeficientes de colocación de Pearson se realizaron con el software ImageJ.

- *Detalles de la exploración para la colocación mitocondrial.* Los compuestos analizados se excitaron con un láser azul de 405 nm (1 mW), mientras que la sonda MitoTracker Red FM se excitó mediante supercontinuum WLL a 600 nm (0,2 mW). Las muestras se excitaron secuencialmente en el modo de conmutación de fotogramas para eliminar un posible solapamiento de la fluorescencia. Las ventanas de detección fueron de 600-650 nm para los compuestos de iridio analizados y de 650-700 nm para la sonda MitoTracker Red FM.
- *Detalles de la exploración para la colocación lisosomal.* La irradiación inicial con láser de luz azul de 405 nm fue de 5 s a una potencia de 3 mW. A continuación, los compuestos analizados se excitaron con un láser azul de 405 nm (1 mW), o la sonda LysoTracker Green DND-26, que se excitó mediante supercontinuum WLL a 488 nm (0,2 mW). Las muestras se excitaron secuencialmente en el modo de conmutación de fotogramas para eliminar posibles solapamientos de fluorescencia. Las ventanas de detección fueron de 600-650 nm para los compuestos de iridio analizados y de 500-550 nm para la sonda LysoTracker. Las imágenes se adquirieron cada 5 min y las imágenes para el tiempo 0 min se obtuvieron inmediatamente después de la primera irradiación. Se utilizaron controles no tratados para comprobar la no superposición del barrido confocal de fluorescencia y el impacto de la irradiación de luz azul de 405 nm en la morfología lisosomal, celular y subcelular.

Irradiación de esferoides y análisis con microscopía confocal

Las células HeLa se sembraron en placas de forma de U de 96 pocillos de fijación ultrabaja (*Corning*), a una densidad de 5000 células por pocillo, en el medio de formación 3D: medio DMEM/F-12 suplementado con factores de crecimiento y de formación de esferoides: 2 % B27, factor de crecimiento epidérmico (EGF, 20 ng/mL), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2, 10 ng/mL) y albúmina sérica bovina (BSA, 0,15 %). Tras 72 h de incubación, los esferoides preformados se transfirieron como esferas individuales a Matrigel incrustado (30 min de incrustación) y se mantuvieron durante 24 h en un medio de cultivo de formación 3D. A continuación, los esferoides se trataron con los compuestos de iridio a una concentración de 2 μ M durante 5 h, y se lavaron y transfirieron a placas de Petri confocales de 35 mm (*Mattek*) y se irradiaron con luz láser de 405 nm durante 5 min a una potencia final de 1 mW. Los esferoides se cultivaron durante otras 24 h y, tras este periodo, se procesaron para su posterior tinción con Hoechst 33258 (20 μ g/mL), calceína AM (2 μ M) y PI (8 μ g/mL) durante 2 h. Las muestras se visualizaron en

un microscopio confocal Leica CM SP5 en 10 barridos z-stack. Las imágenes se procesaron mediante el software ImageJ.

Para la detección de la localización en cultivo 3D de células Hela, se llevó a cabo el procedimiento anteriormente descrito. En este caso, los esferoides se trataron con los compuestos probados a una concentración de 2 μM durante 5 h y, seguidamente, se lavaron y transfirieron a placas de Petri confocales de 35 mm (*Mattek*). El compuesto **30** se excitó con un láser azul de 405 nm (1 mW) y la ventana de detección se ajustó de 500 a 550 nm. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Leica CM SP5 y las imágenes se procesaron utilizando el software ImageJ.

6.5. Capítulo 6

Líneas celulares

Las células A375 y Hela se mantuvieron en medio de cultivo completo: DMEM suplementado con un 10 % de FBS, L-glutamina, 1 % penicilina y 1 % de aminoácidos no esenciales. Todas las células se cultivaron como monocapas adherentes en una incubadora humidificada a 37 °C, bajo una atmósfera con un 5 % de CO₂, y se subcultivaron dos veces por semana con una densidad de siembra adecuada.

Ensayo de fototoxicidad

La actividad fototóxica de los complejos **39-48** se determinó frente a células HeLa y A375. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de $5 \cdot 10^3$ células por pocillo, en 100 μL de medio de cultivo, y se cultivaron durante toda la noche en una incubadora humidificada. A continuación, se retiró el medio y se añadieron los compuestos sintetizados diluidos en DMEM (Rango de 100 μM a 0,05 μM) y se incubaron durante 1 h en la oscuridad. Posteriormente, se retiró el medio con los compuestos y las células se irradiaron con luz verde ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$, 1,3 mW/cm²), luz roja ($\lambda_{\text{máx}} = 620 \text{ nm}$, 15 mW/cm²) o se dejaron en la oscuridad durante 1 h en medio libre de compuestos. Todas las placas de cultivo celular sometidas a la irradiación incluyeron controles no tratados para verificar que la viabilidad celular no se veía afectada por la luz. Seguidamente, las células se recuperaron durante 24 h en un medio DMEM libre de fármacos. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y se agregaron 50 μL de una disolución MTT diluida y se incubaron a 37 °C y al 5 % de CO₂ durante 2 h. Finalmente, se eliminó el medio y se añadió DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm, utilizando el lector de microplacas (*Omega*). Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado

Acumulación intracelular

La acumulación celular de **39-48** se determinó en células A375. Las células A375 se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $4 \cdot 10^5$ células/pocillo y se incubaron durante la noche. Después, se trataron con los compuestos **39-48** durante 1 h a una concentración de 10 μ M y, tras el tratamiento, se recogieron, y se contaron. Los pellets celulares se lisaron con el sistema de digestión con ácido (HNO_3 Suprapur® al 30 %) y el contenido metálico se midió mediante ICP-MS (Agilent 7900).

7. Bibliografía

- (1) Ballester, F. J.; Ortega-Forte, E.; Bautista, D.; Santana, M. D.; Barone, G.; Ruiz, J. Newly Synthesized Benzothiazolyl-1,2,3-Triazole Derivatives: Intramolecular Charge Transfer Tuning, Solvatofluorochromism and Antiproliferative Properties. *Dyes and Pigm.* **2023**, 209, 110905. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110905>.
- (2) Boechat, N.; Ferreira, V. F.; Ferreira, S. B.; Ferreira, M. de L. G.; da Silva, F. de C.; Bastos, M. M.; Costa, M. dos S.; Lourenço, M. C. S.; Pinto, A. C.; Krettli, A. U.; Aguiar, A. C.; Teixeira, B. M.; da Silva, N. V.; Martins, P. R. C.; Bezerra, F. A. F. M.; Camilo, A. L. S.; da Silva, G. P.; Costa, C. C. P. Novel 1,2,3-Triazole Derivatives for Use against Mycobacterium Tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) Strain. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (17), 5988–5999. <https://doi.org/10.1021/jm2003624>.
- (3) Spasyuk, D.; Vicent, C.; Gusev, D. G. Chemoselective Hydrogenation of Carbonyl Compounds and Acceptorless Dehydrogenative Coupling of Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (11), 3743–3746. <https://doi.org/10.1021/ja512389y>.
- (4) Yellol, J.; Pérez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhlofi, 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>.
- (5) 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>.
- (6) Sharma, A. K.; Gowdahalli, K.; Krzeminski, J.; Amin, S. Microwave-Assisted Suzuki Cross-Coupling Reaction, a Key Step in the Synthesis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Metabolites. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (23), 8987–8989. <https://doi.org/10.1021/jo701665j>.
- (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) Viguera, 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>.
- (9) Novohradsky, V.; Viguera, 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>.
- (10) 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>.
 - (11) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
 - (12) Bruker (2001). Program Name. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
 - (13) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with *SHELXL*. *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, 71 (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
 - (14) Spek, A. L. *PLATON SQUEEZE*: A Tool for the Calculation of the Disordered Solvent Contribution to the Calculated Structure Factors. *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, 71 (1), 9–18. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024929>.
 - (15) Samari, F.; Hemmateenejad, B.; Shamsipur, M.; Rashidi, M.; Samouei, H. Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt(II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins: A Spectroscopic Approach. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (6), 3454–3464. <https://doi.org/10.1021/ic202141g>.
 - (16) Ibrahim, N.; Ibrahim, H.; Kim, S.; Nallet, J.-P.; Nepveu, F. Interactions between Antimalarial Indolone-N-Oxide Derivatives and Human Serum Albumin. *Biomacromolecules* **2010**, 11 (12), 3341–3351. <https://doi.org/10.1021/bm100814n>.
 - (17) Shang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Dong, S. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study. *Langmuir* **2007**, 23 (5), 2714–2721. <https://doi.org/10.1021/la062064e>.
 - (18) He, L.; Wang, X.; Liu, B.; Wang, J.; Sun, Y. Binding of Dioxopromethazine Hydrochloride with Human Serum Albumin and Its Effect on the Conformation of the Protein. *J. Solution Chem.* **2012**, 41 (10), 1853–1865. <https://doi.org/10.1007/s10953-012-9905-5>.
 - (19) Deepa, S.; Mishra, A. K. Fluorescence Spectroscopic Study of Serum Albumin–Bromadiolone Interaction: Fluorimetric Determination of Bromadiolone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38 (3), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.023>.
 - (20) Zhang, H.; Huang, X.; Zhang, M. Spectral Diagnostics of the Interaction between Pyridoxine Hydrochloride and Bovine Serum Albumin in Vitro. *Mol. Biol. Rep.* **2008**, 35 (4), 699–705. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9143-x>.
 - (21) Devagi, G.; Dallemer, F.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R. Organometallic Ruthenium(II) Complexes Containing NS Donor Schiff Bases: Synthesis, Structure, Electrochemistry, DNA/BSA Binding, DNA Cleavage, Radical Scavenging and Antibacterial Activities. *J. Organomet. Chem.* **2018**, 854, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.10.036>.
 - (22) Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D. Novel Bis-C,N-Cyclometalated Iridium(III) Thiosemicarbazide Antitumor Complexes: Interactions with Human Serum Albumin and DNA, and Inhibition of Cathepsin B. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (2), 974–982. <https://doi.org/10.1021/ic302219v>.

- (23) 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>.
- (24) 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>.

ANEXOS

Anexo I

ÍNDICE

1. Espectros de RMN	A3
1.1. Compuesto 6	A3
1.2. Compuesto 7	A5
1.3. Compuesto 8	A7
1.4. Compuesto 9	A10
1.5. Compuesto 10	A13
2. Espectrometría de masas	A16
3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS)	A21
4. Determinación de la estructura cristalina por rayos X.....	A22
5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	A24
6. Interacción con la seroalbúmina	A30
7. Propiedades biológicas	A33

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 6

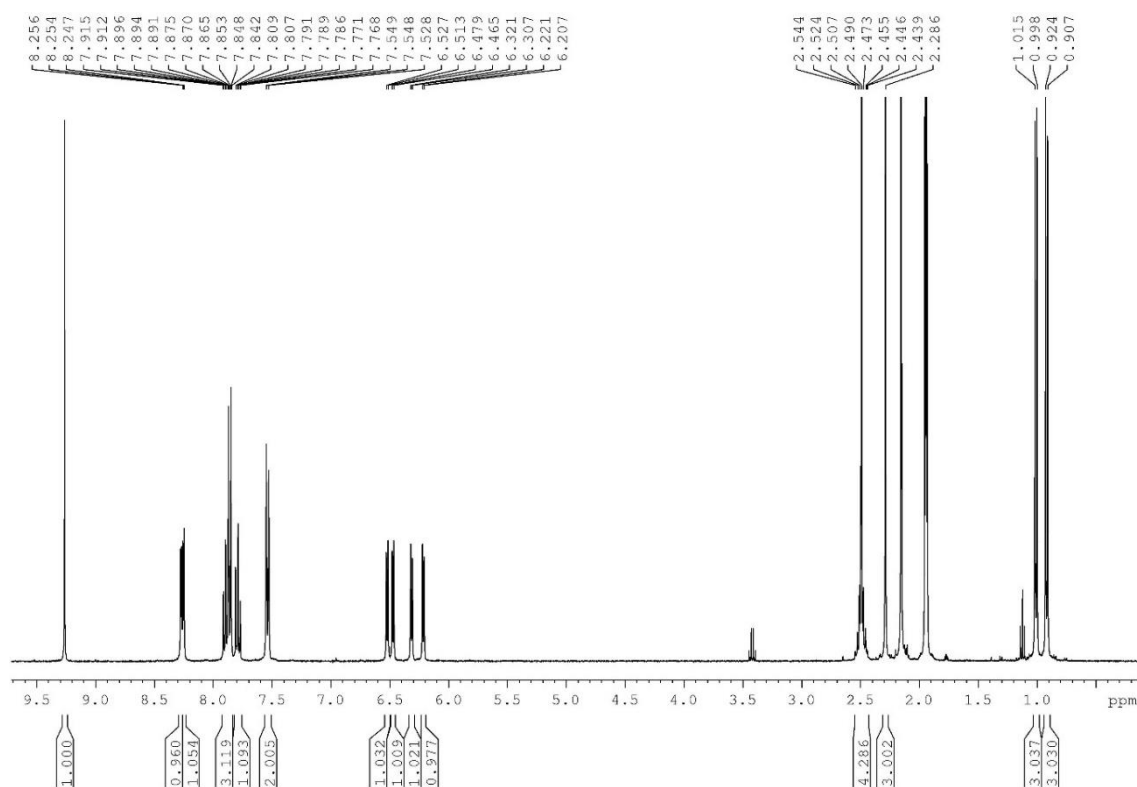


Figura A1.1. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 6 en CD₃CN.

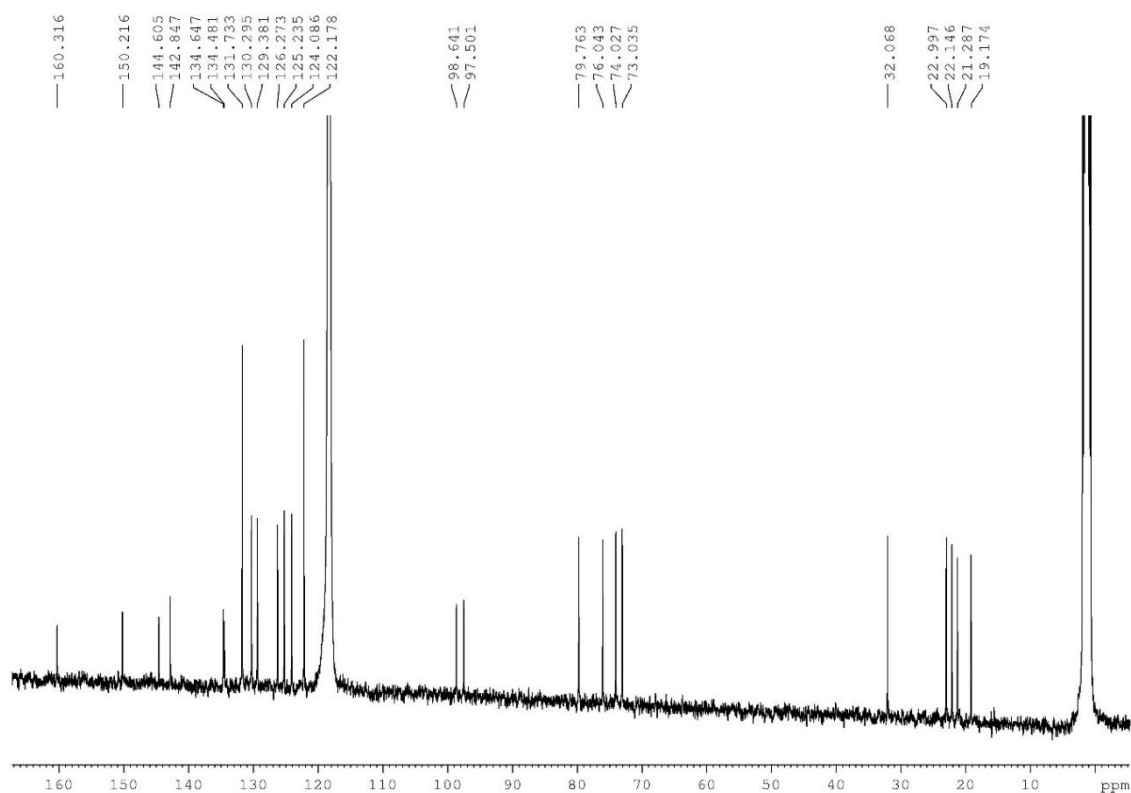


Figura A1.2. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 6 en CD₃CN.

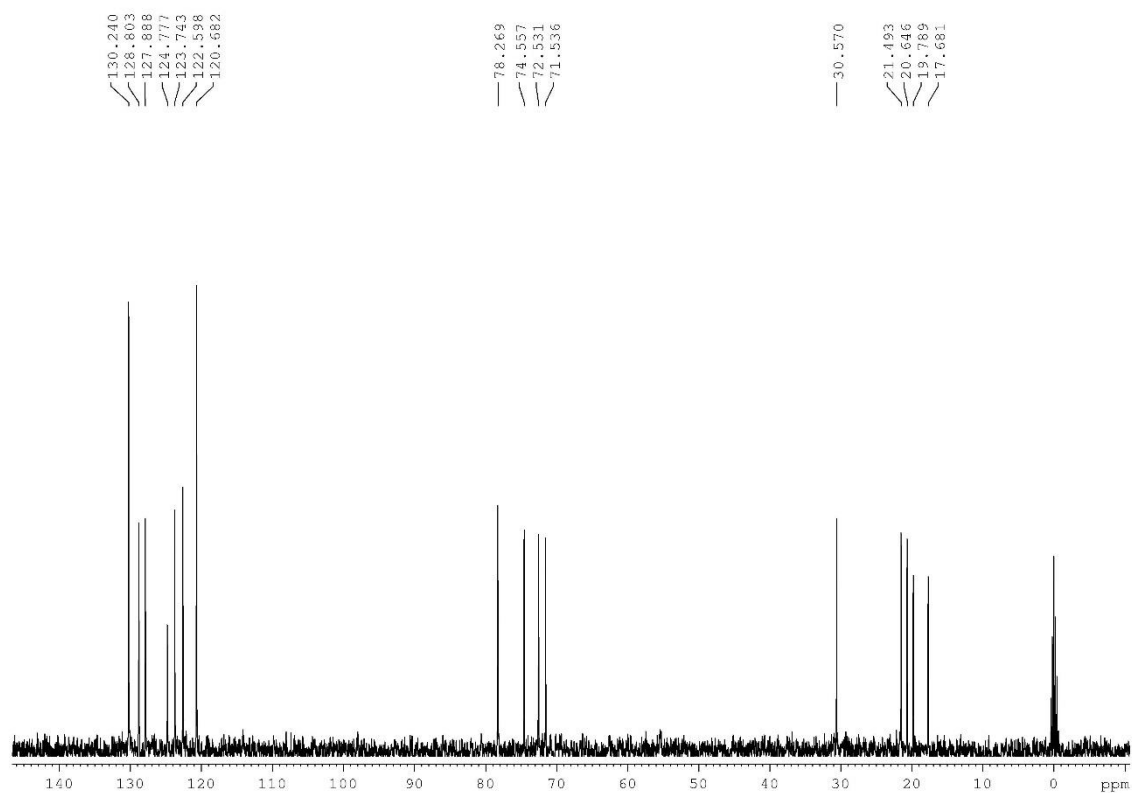


Figura A1.3. Espectro de DEPT-135 del compuesto **6** en CD₃CN.

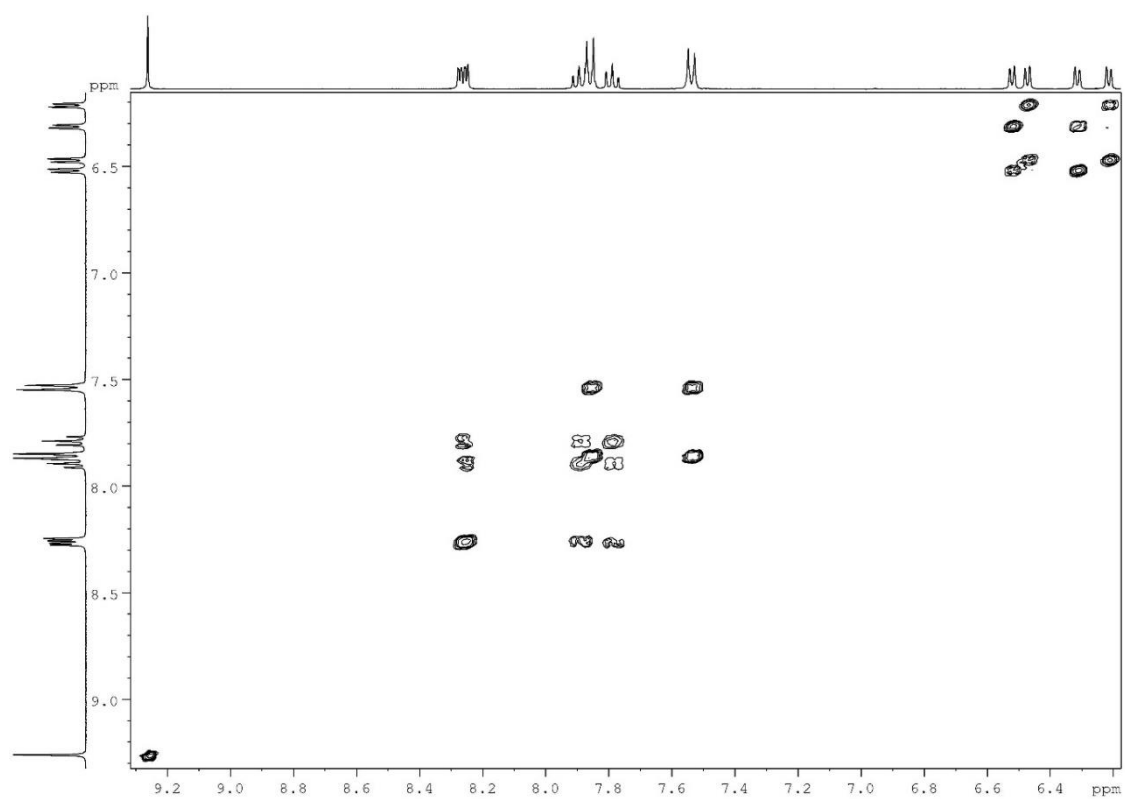


Figura A1.4. Espectro de [¹H-¹H]-COSY del compuesto **6** en CD₃CN.

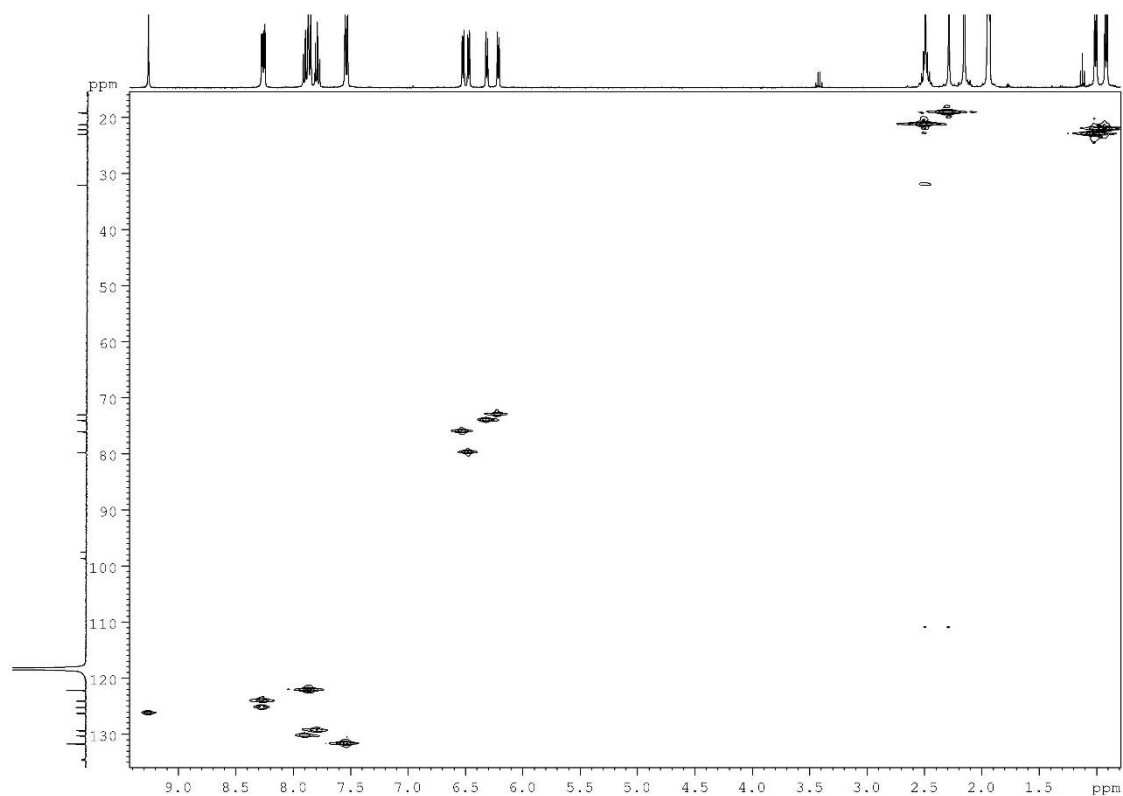


Figura A1.5. Espectro de $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HMQC del compuesto **6** en CD_3CN .

1.2. Compuesto 7

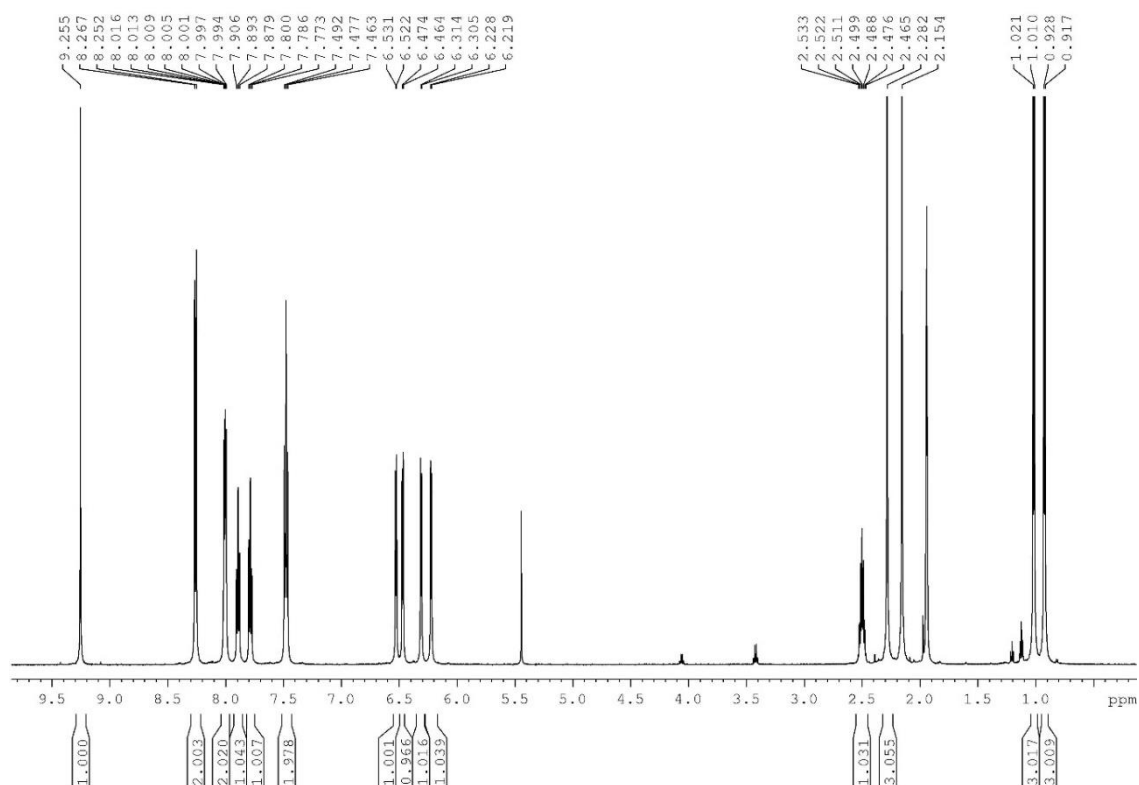


Figura A1.6. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **7** en CD_3CN .

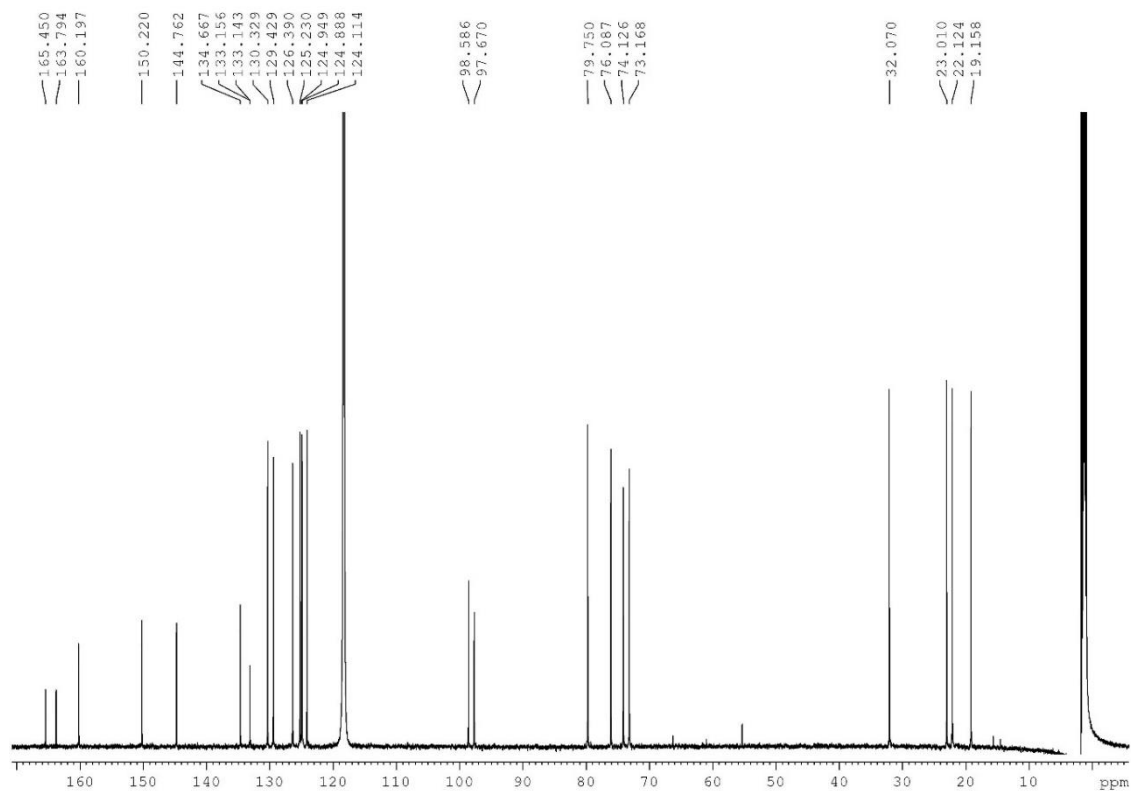


Figura A1.7. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **7** en CD_3CN .

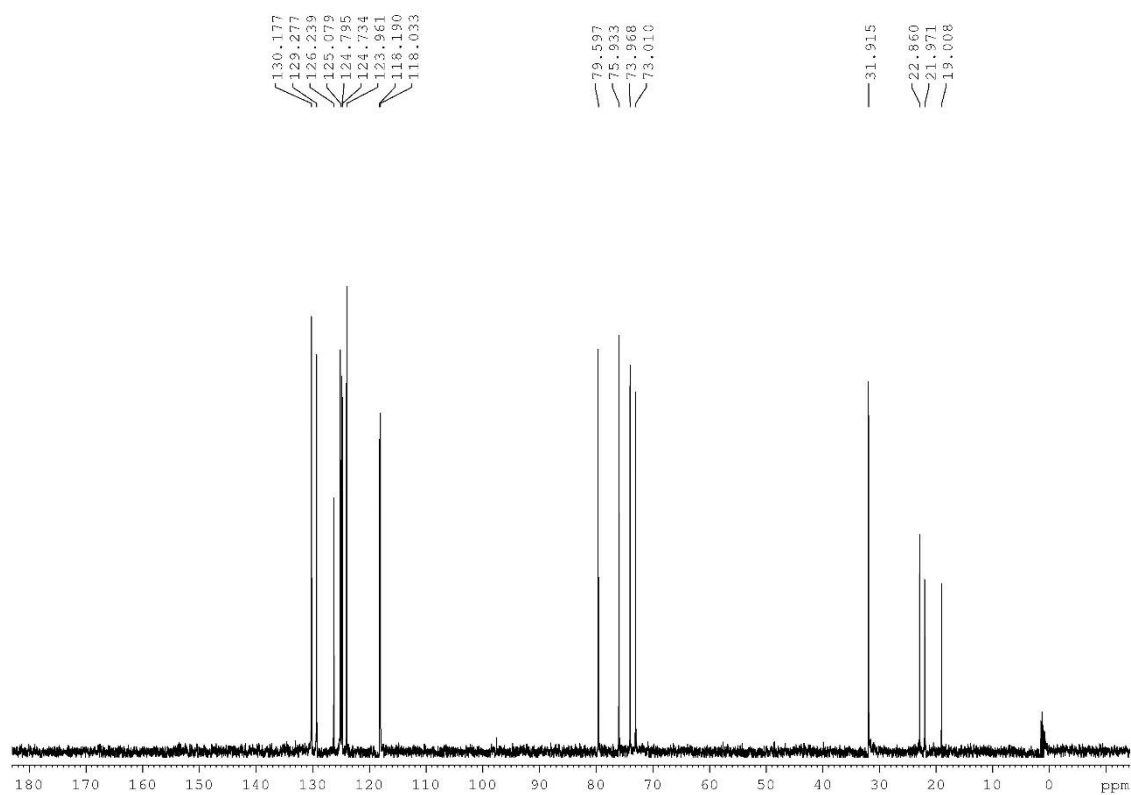


Figura A1.8. Espectro de DEPT-135 del compuesto **7** en CD_3CN .

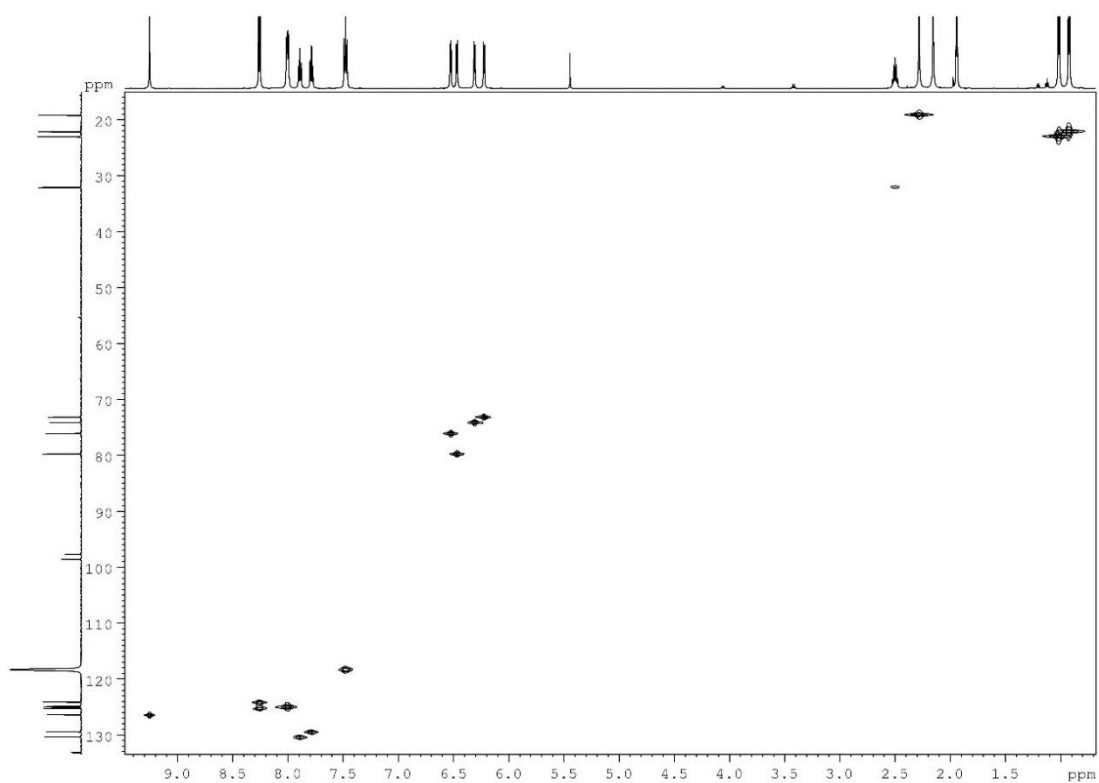


Figura A1.9. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HMQC del compuesto **7** en CD_3CN .

1.3. Compuesto **8**

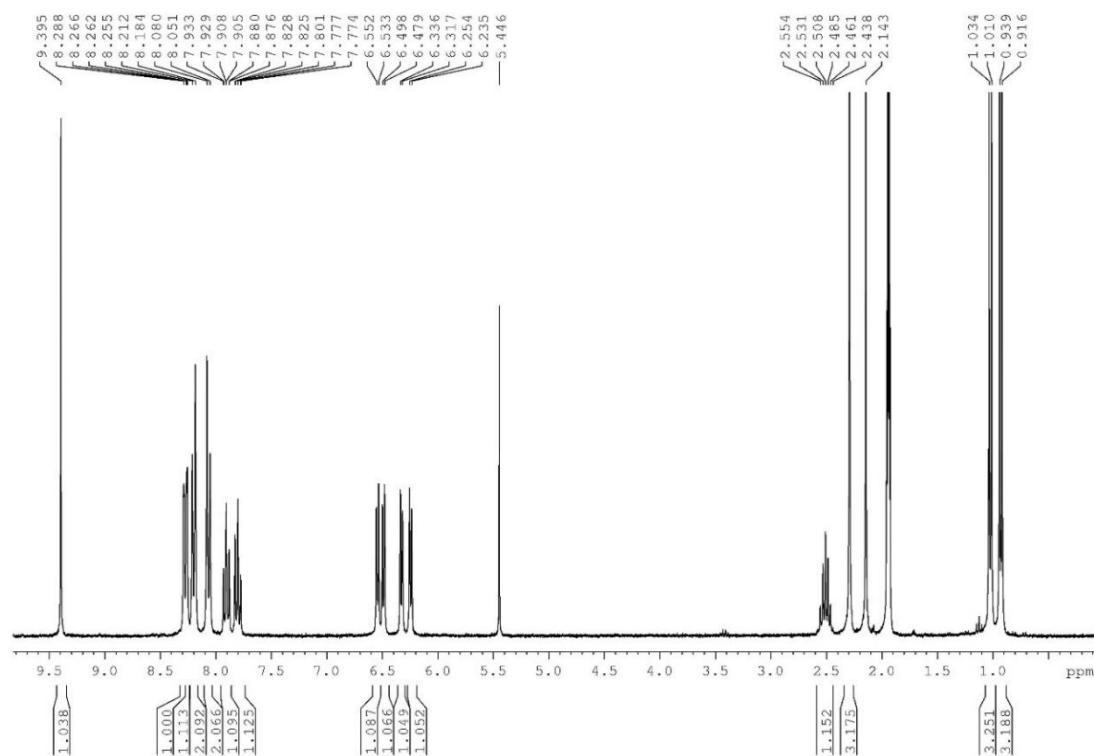


Figura A1.10. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **8** en CD_3CN .

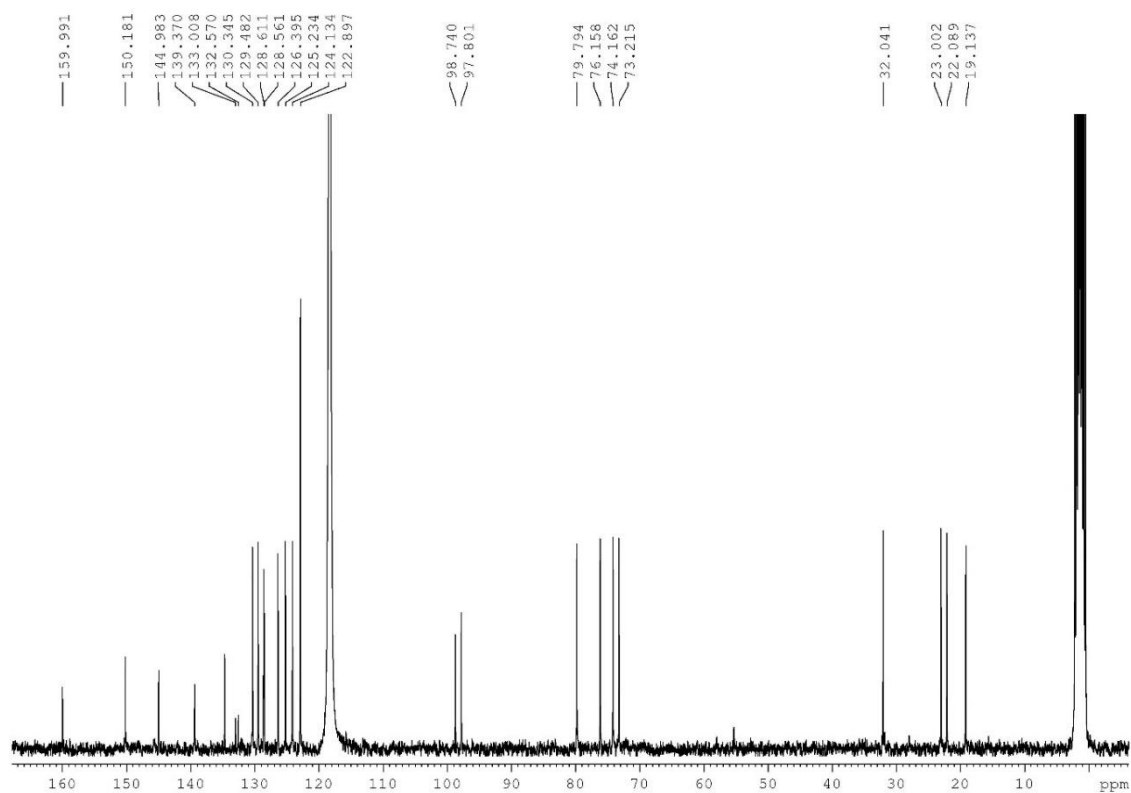


Figura A1.11. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **8** en CD_3CN .

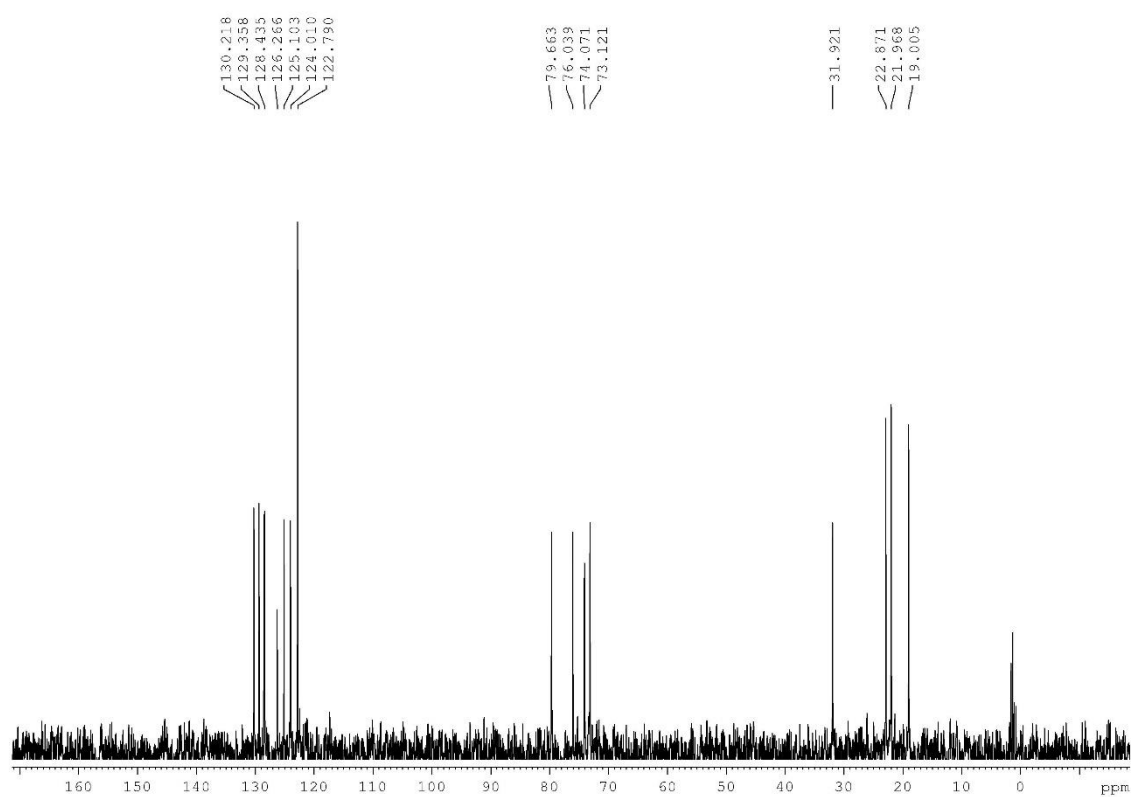


Figura A1.12. Espectro de DEPT-135 del compuesto **8** en CD_3CN .

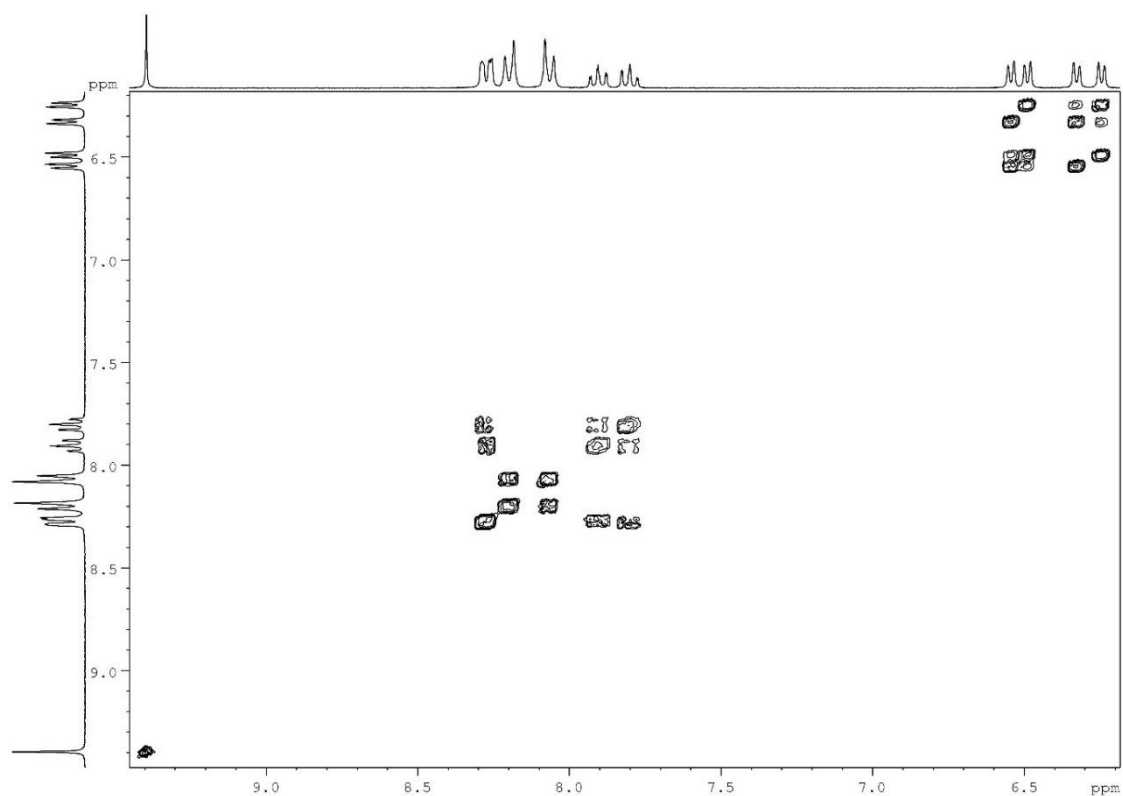


Figura A1.13. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **8** en CD_3CN .

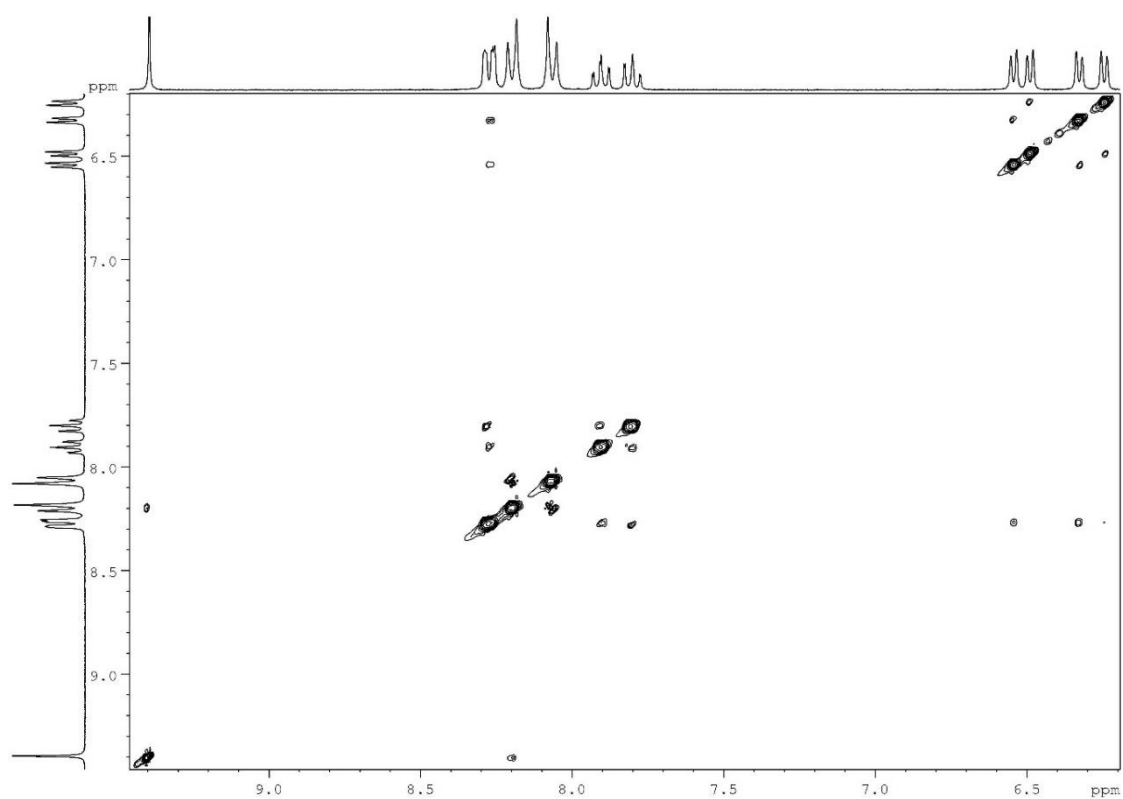


Figura A1.14. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **8** en CD_3CN .

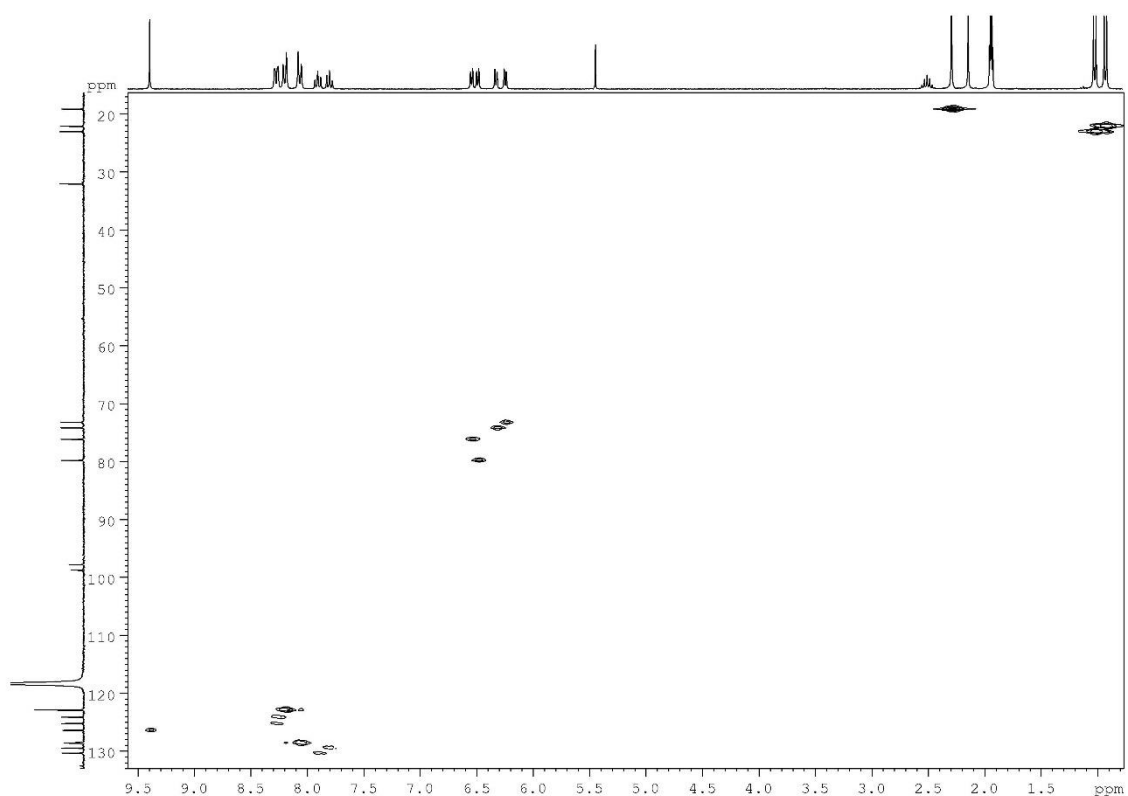


Figura A1.15. Espectro de $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HMQC del compuesto **8** en CD_3CN .

1.4. Compuesto **9**

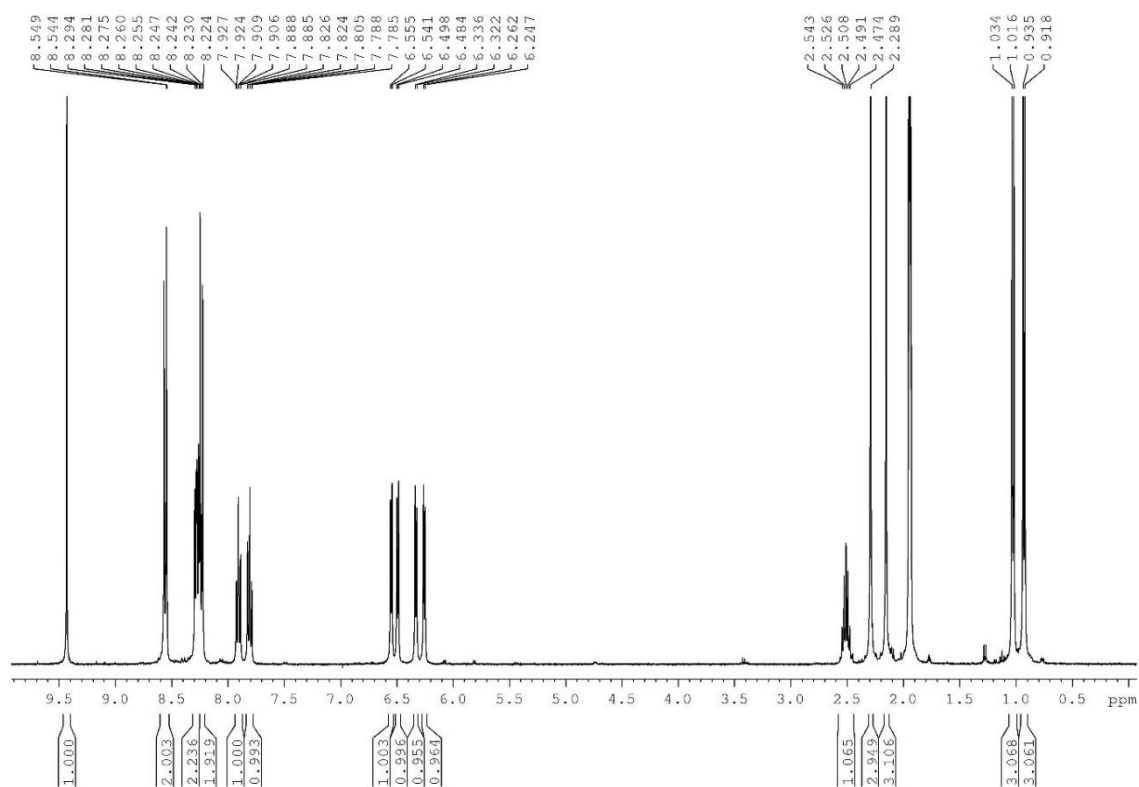


Figura A1.16. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **9** en CD_3CN .

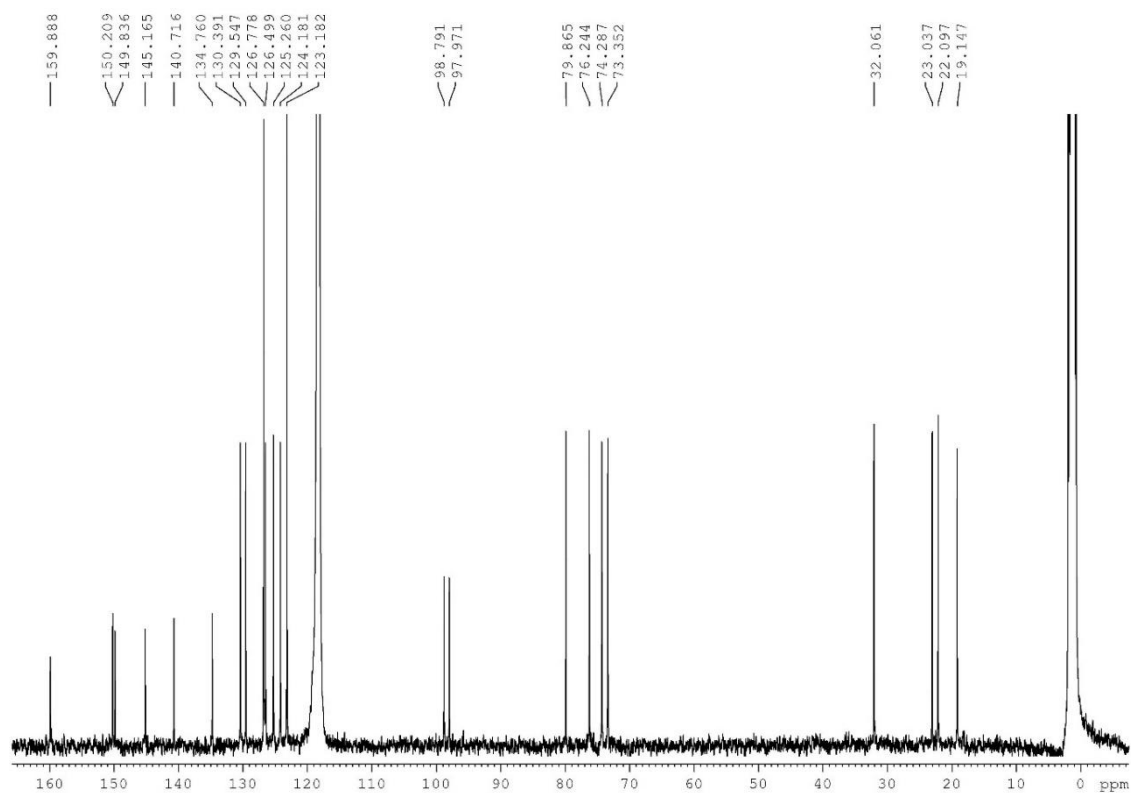


Figura A1.17. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **9** en CD_3CN .

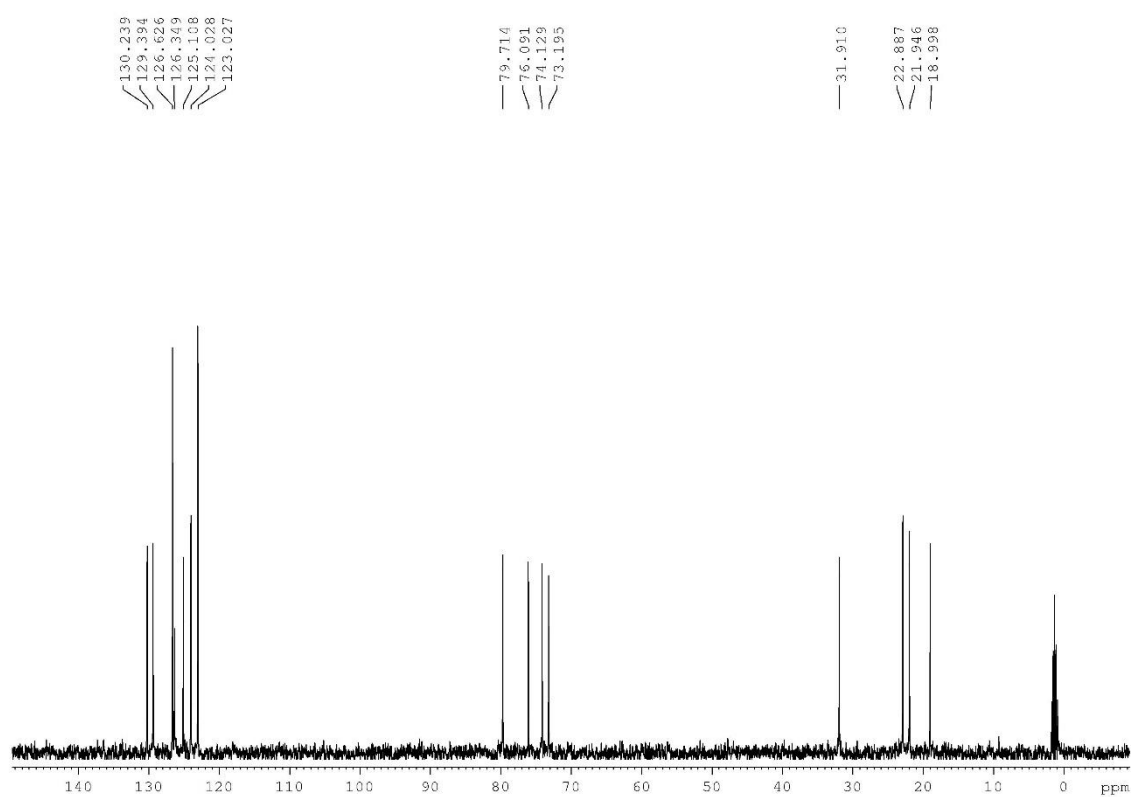


Figura A1.18. Espectro de DEPT-135 del compuesto **9** en CD_3CN .

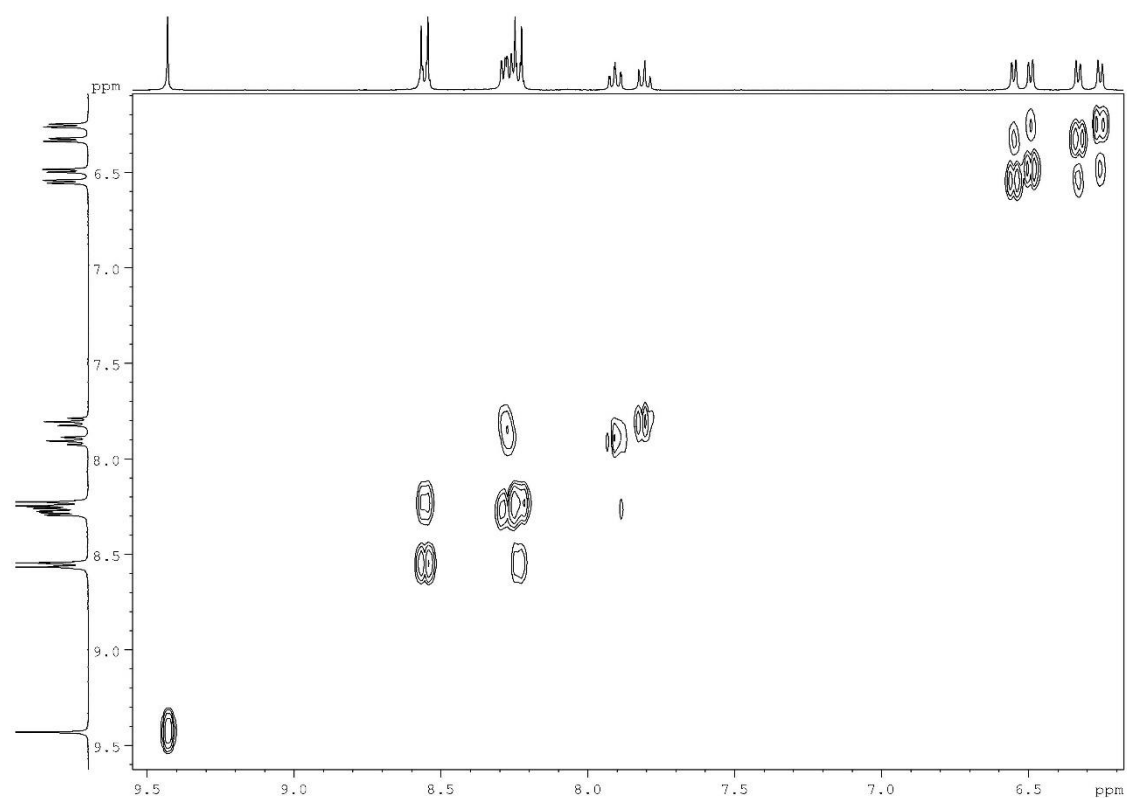


Figura A1.19. Espectro de [^1H - ^1H]-COSY del compuesto **9** en CD_3CN .

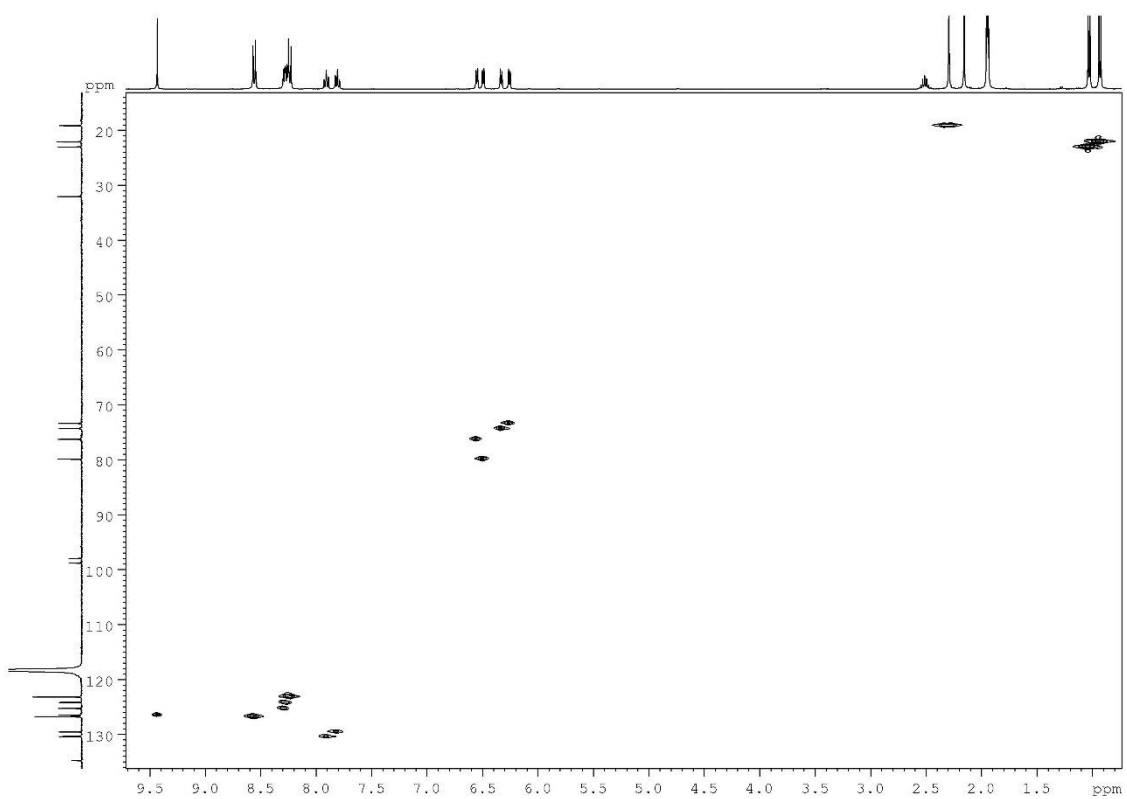
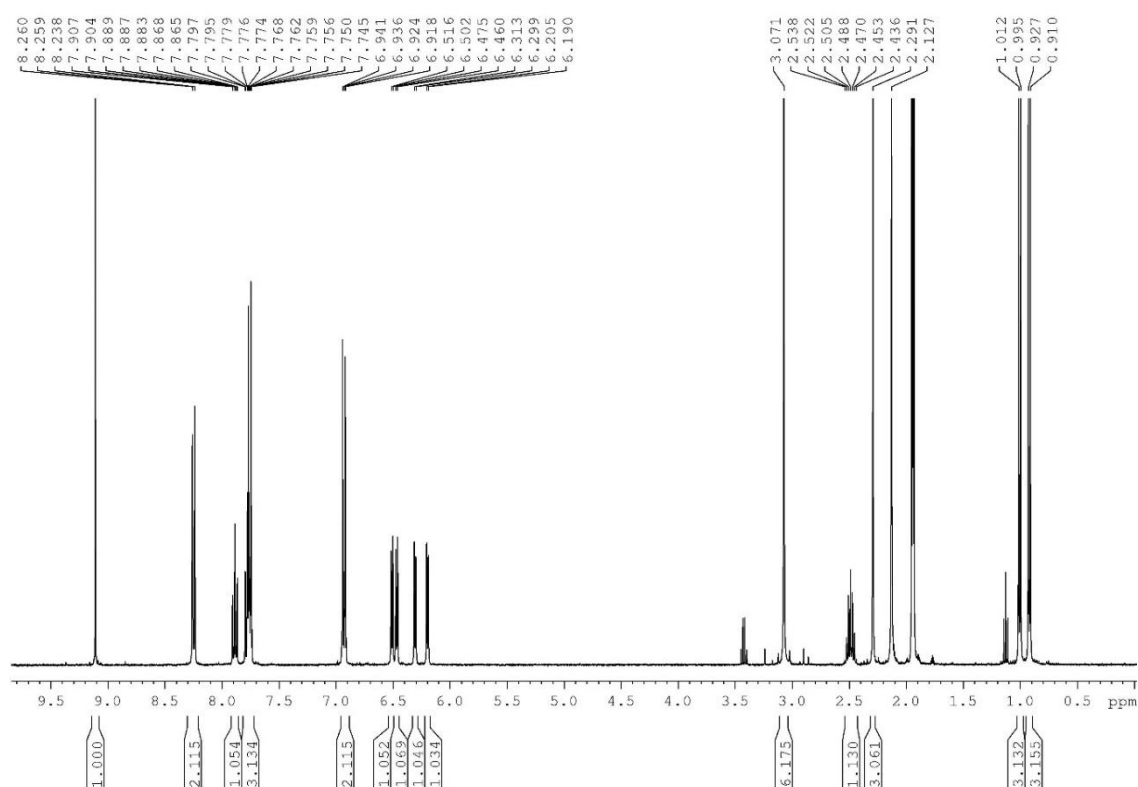
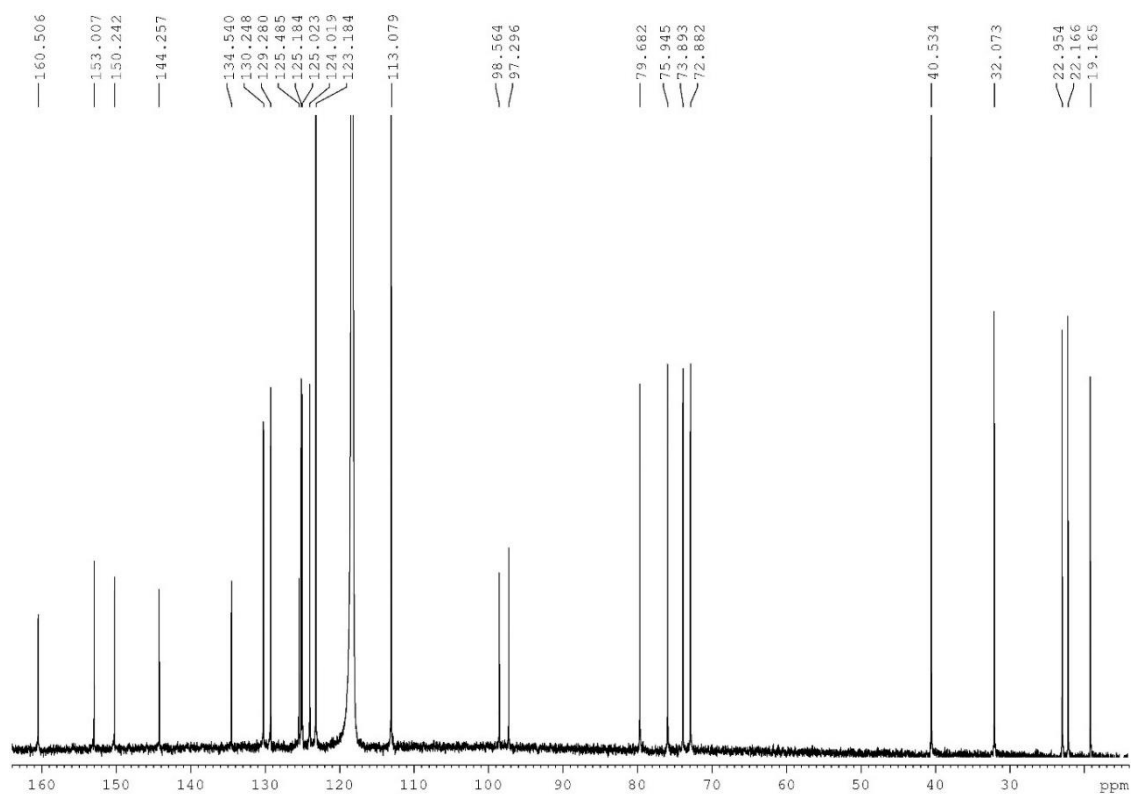


Figura A1.20. Espectro de [^1H - ^{13}H]-HMQC del compuesto **9** en CD_3CN .

1.5. Compuesto 10

Figura A1.21. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 10 en CD₃CN.Figura A1.22. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 10 en CD₃CN.

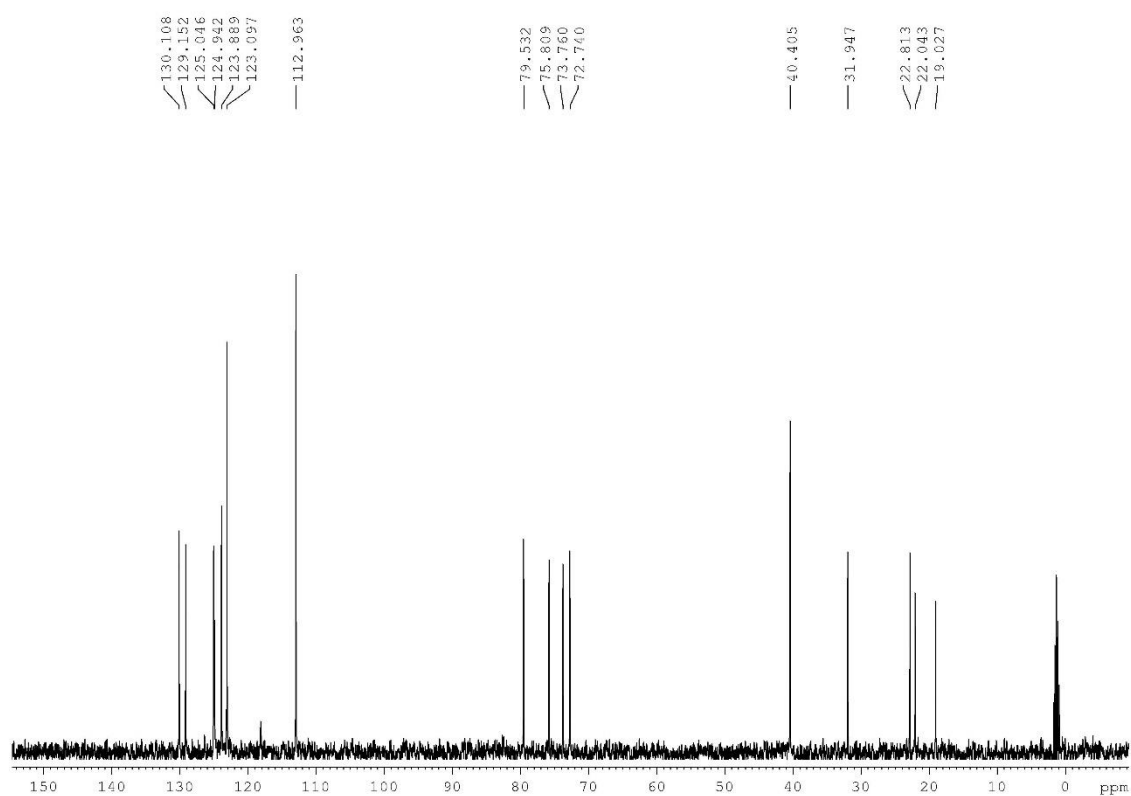


Figura A1.23. Espectro de DEPT-135 del compuesto **10** en CD_3CN .

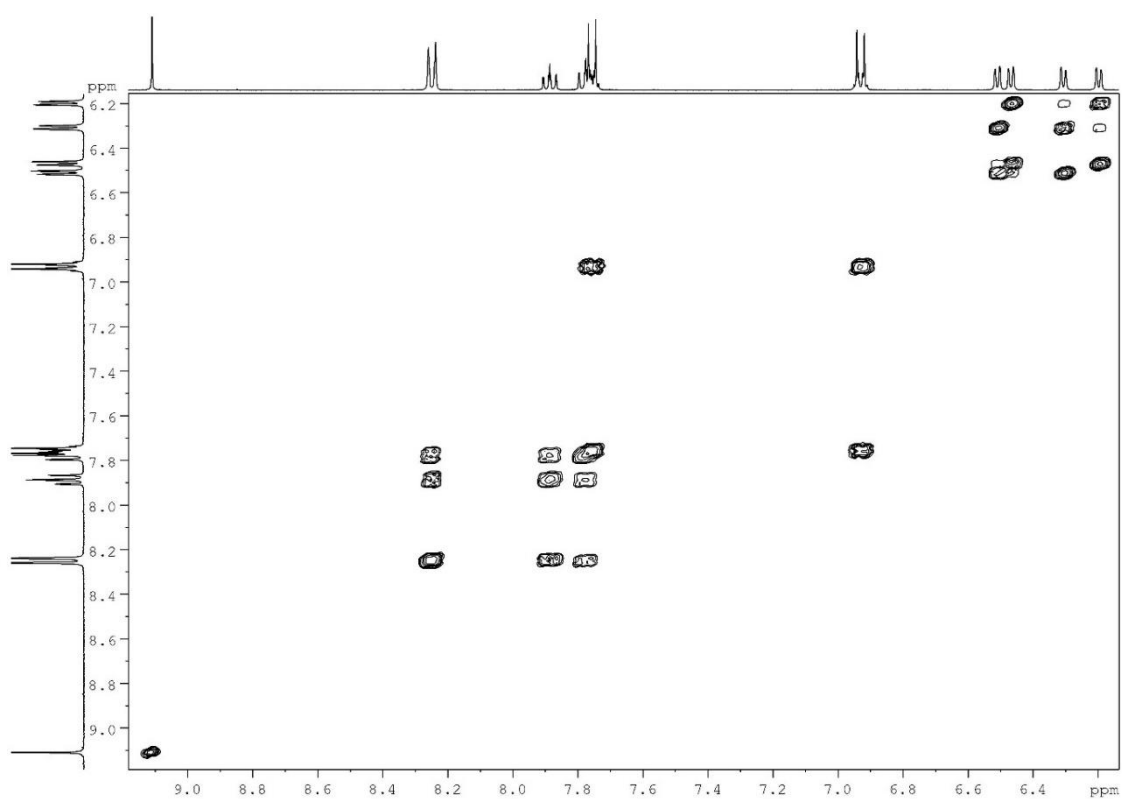


Figura A1.24. Espectro de $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **10** en CD_3CN .

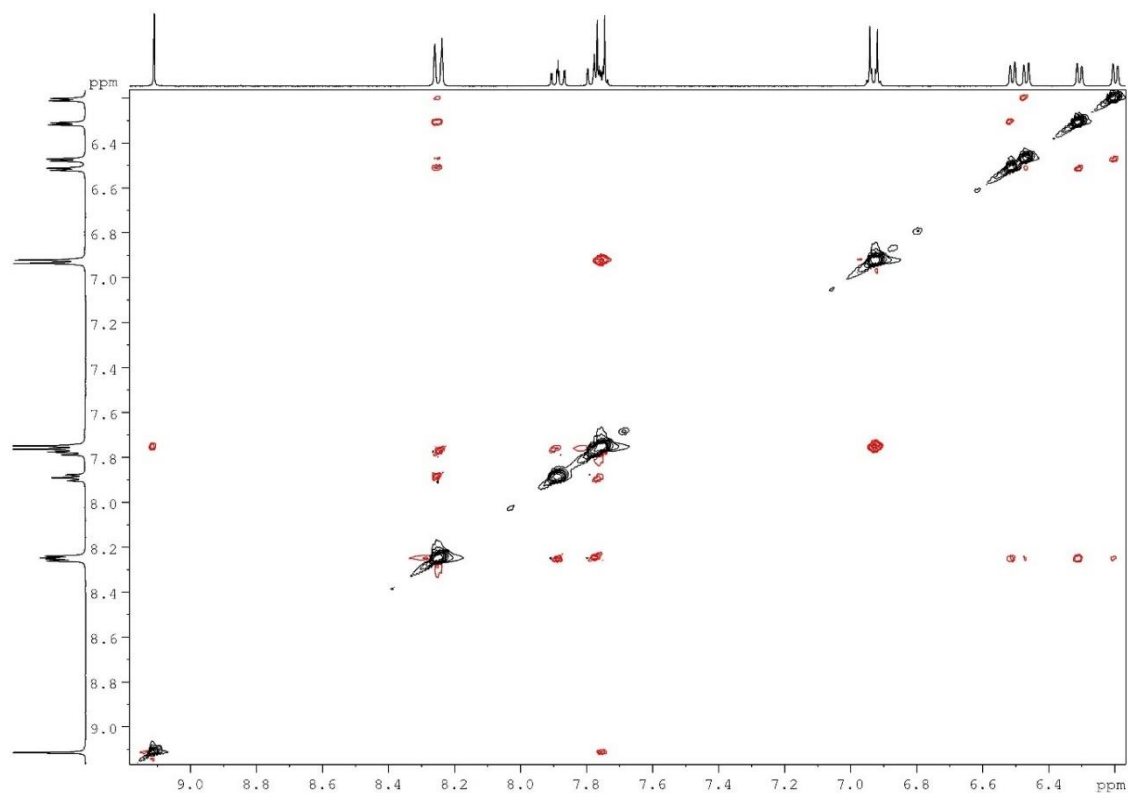


Figura A1.25. Espectro de $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **10** en CD_3CN .

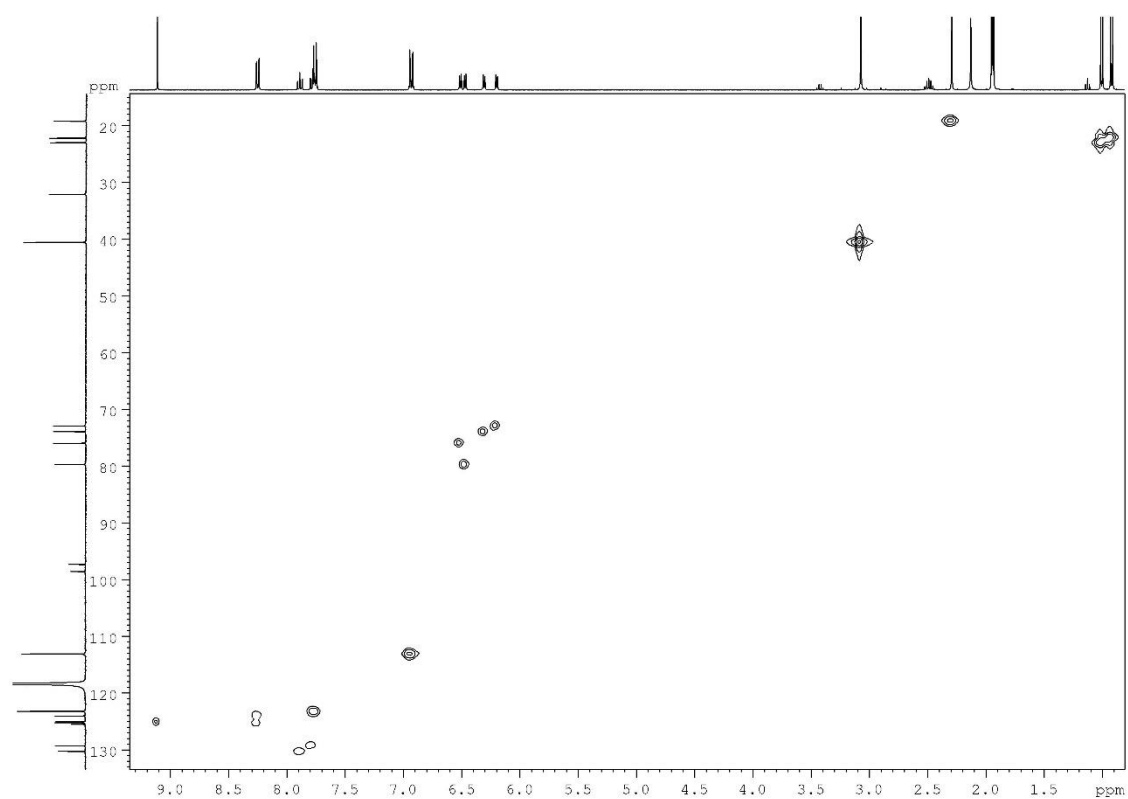


Figura A1.26. Espectro de $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HMQC del compuesto **10** en CD_3CN .

2. Espectrometría de masas

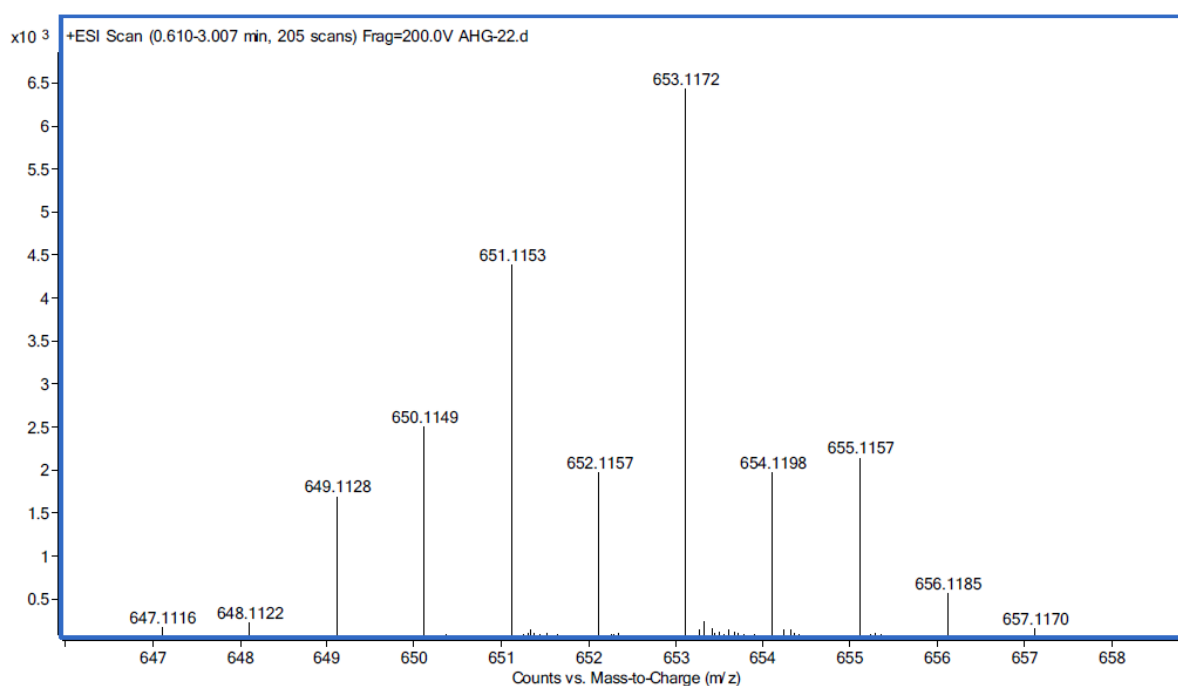
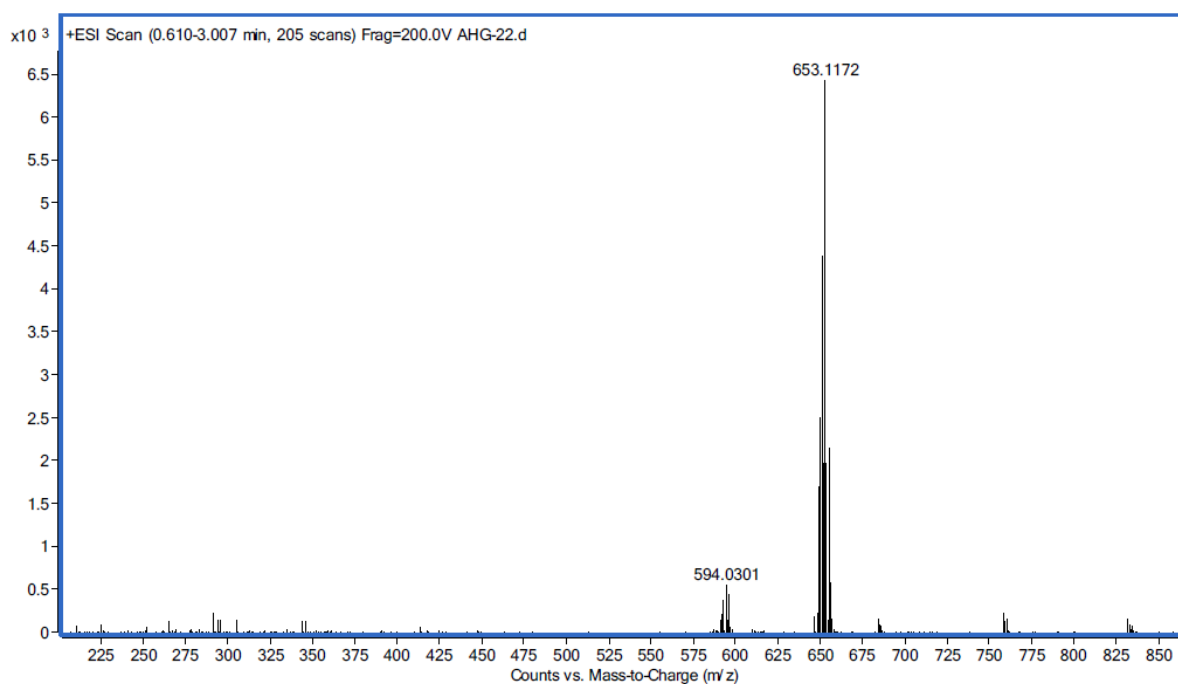


Figura A1.27. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **6**.

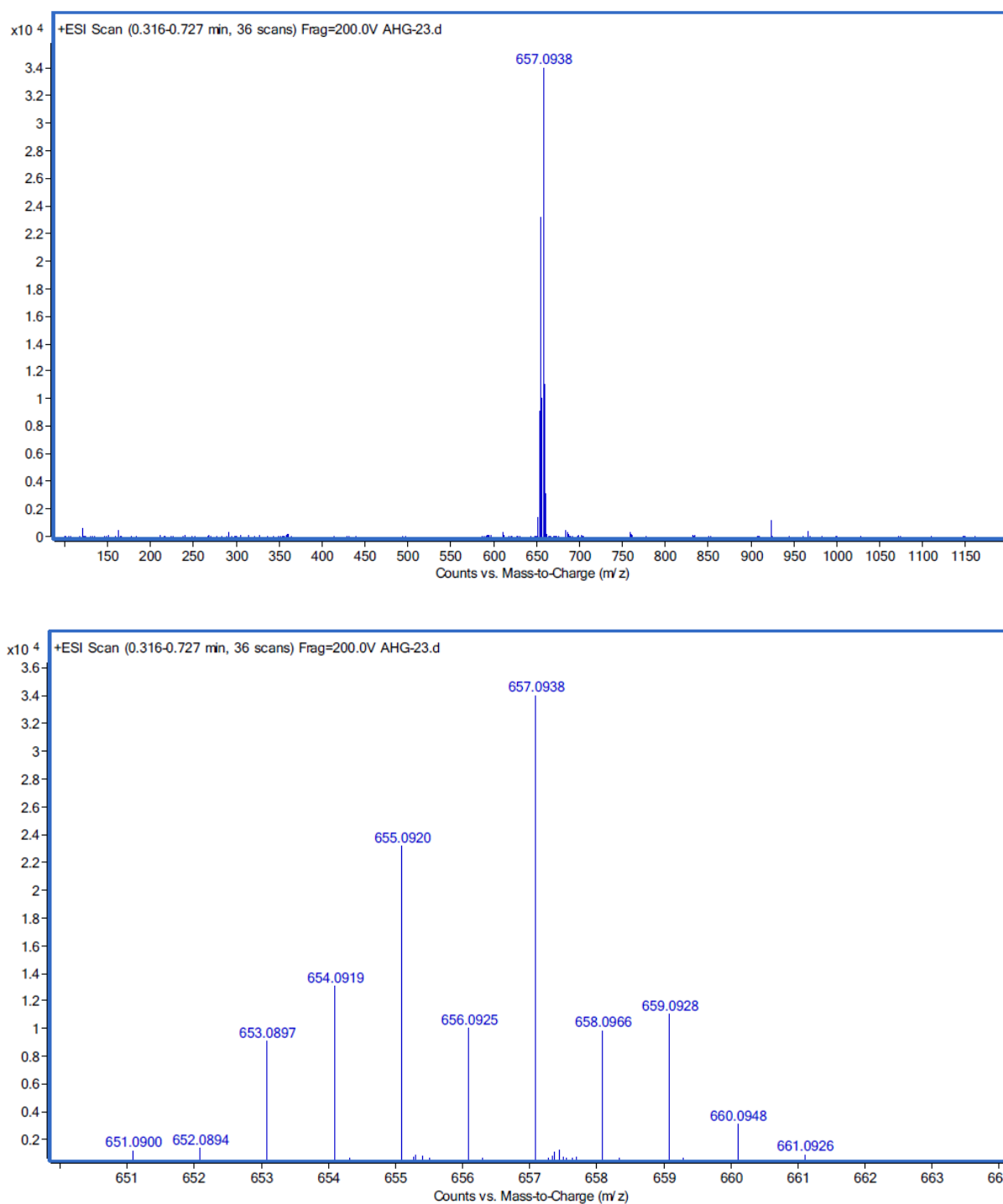


Figura A1.28. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto 7.

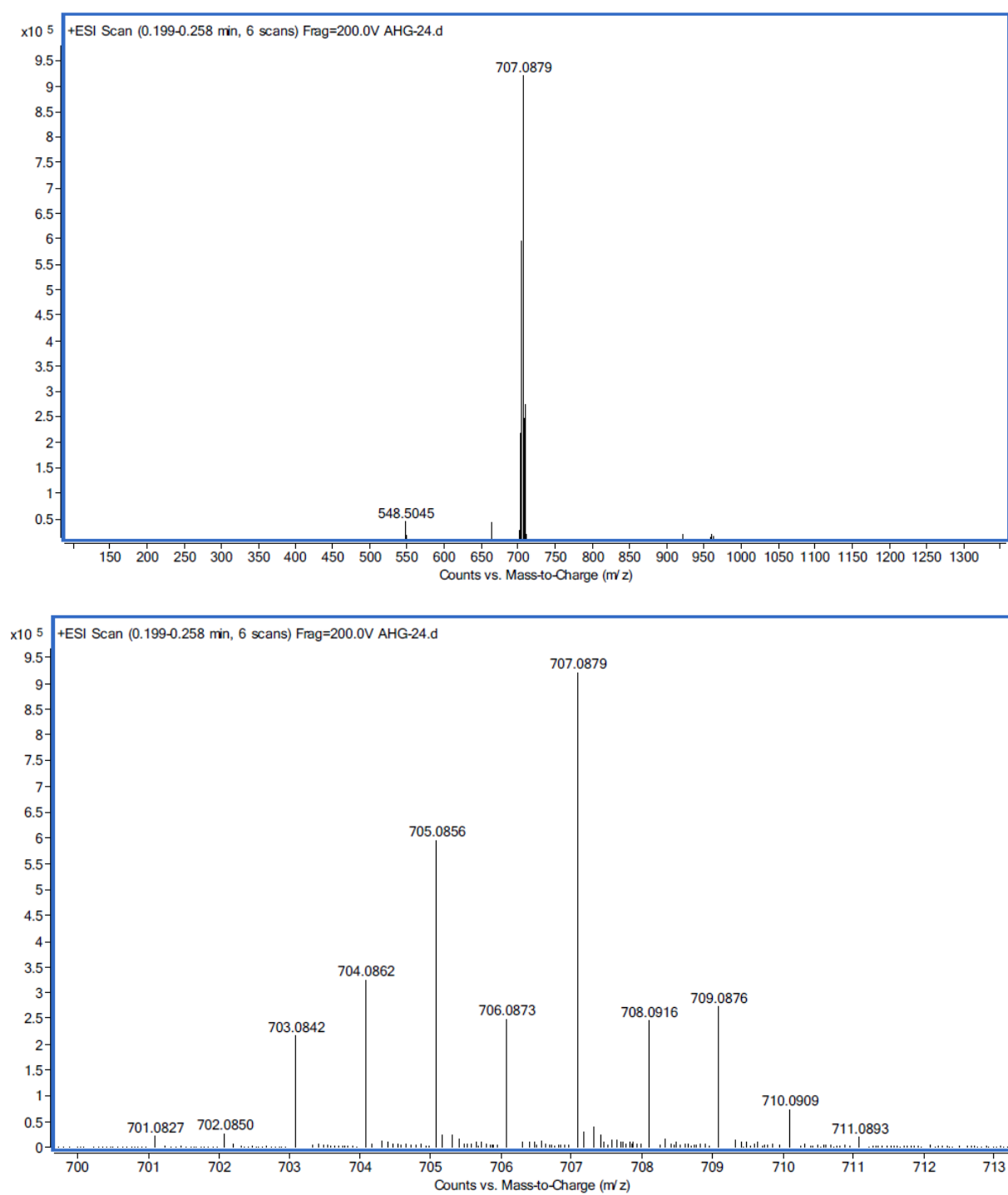


Figura A1.29. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **8**.

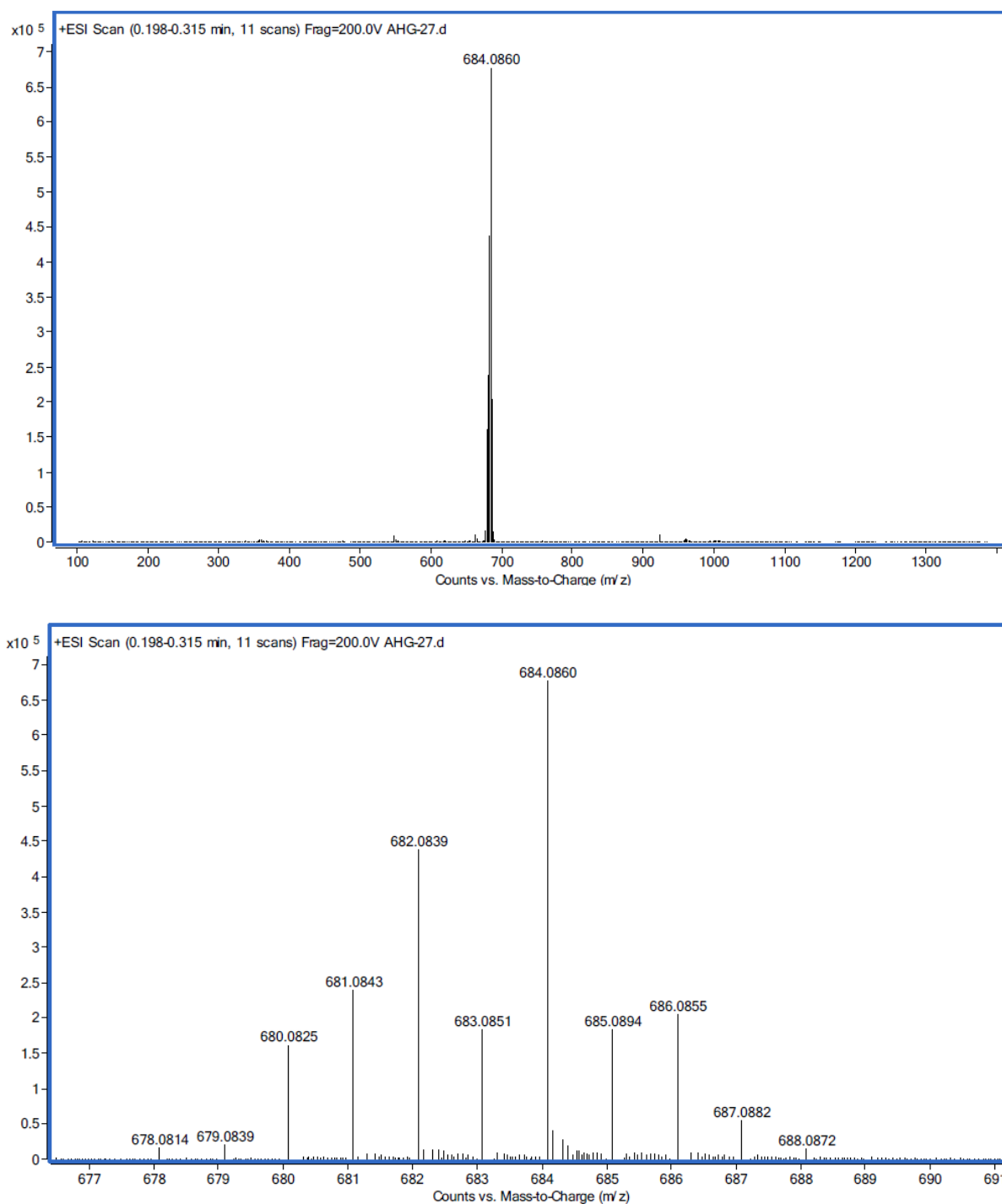


Figura A1.30. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **9**.

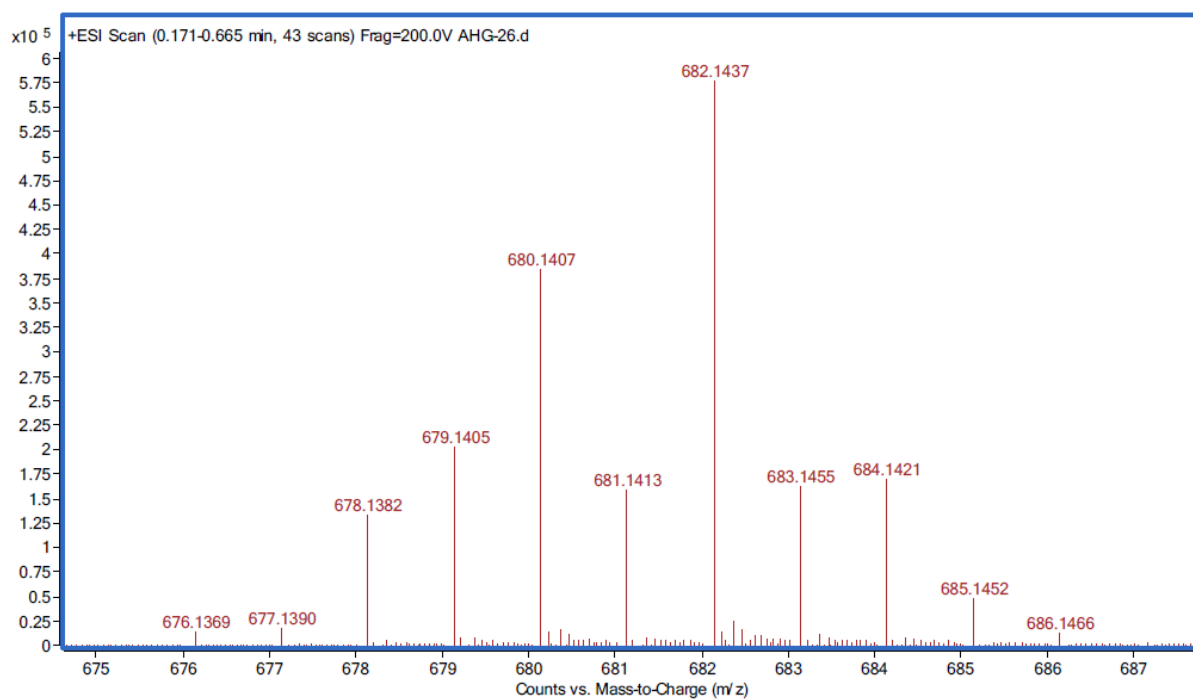
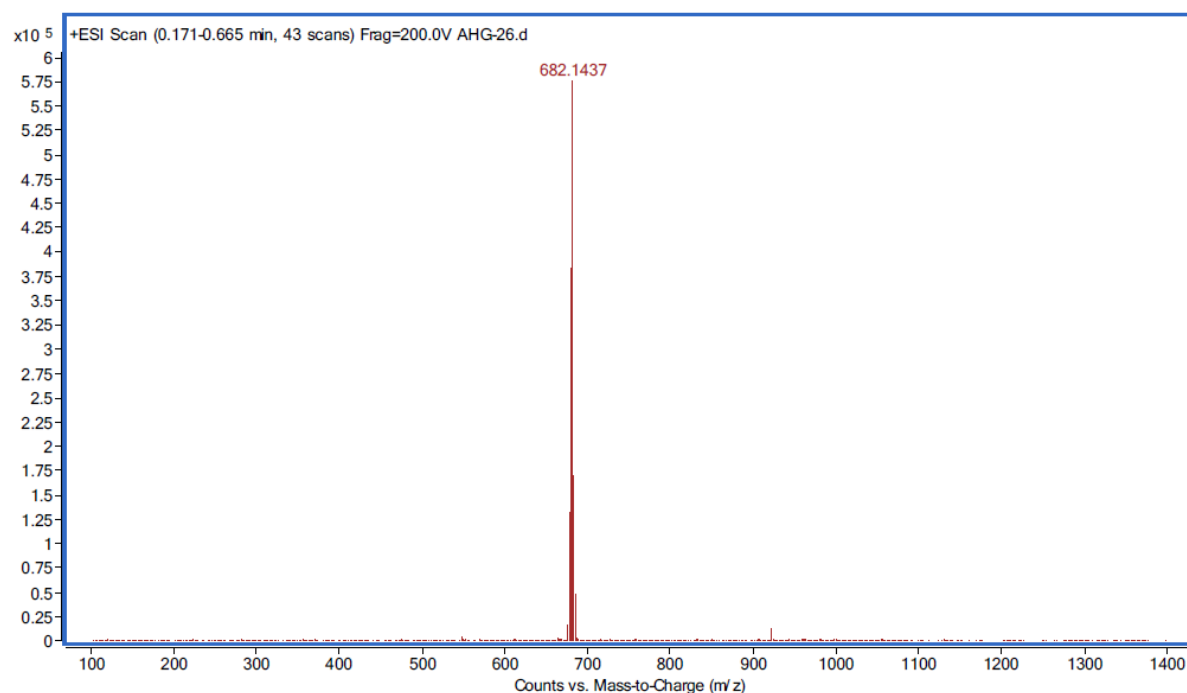


Figura A1.31. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **10**.

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS)

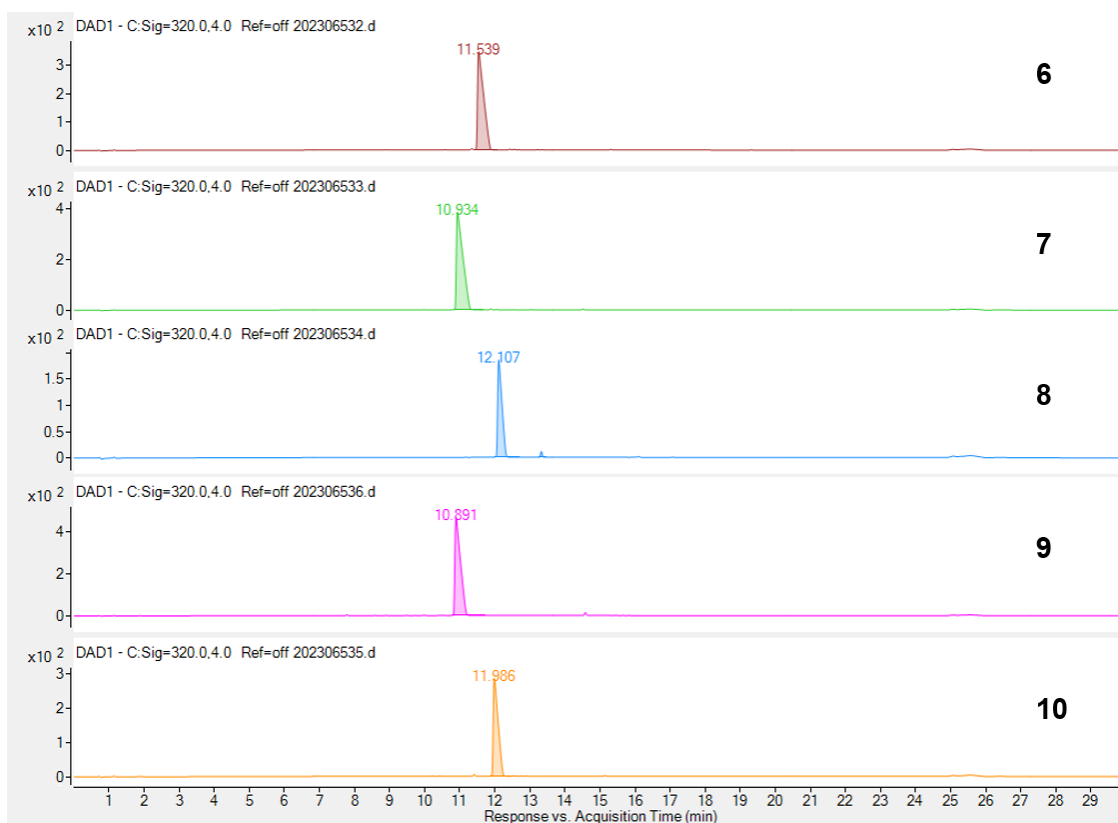
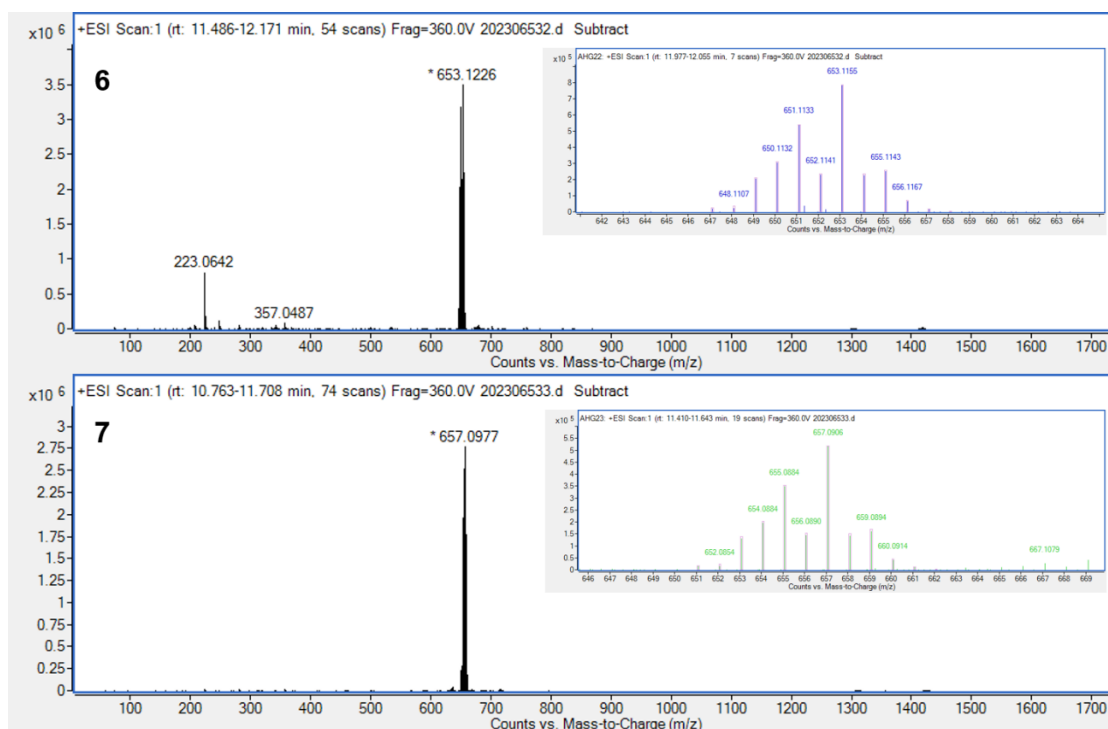


Figura A1.32. Cromatogramas de los compuestos **6-10** disueltos en CH_3CN con detección UV a 320 nm.



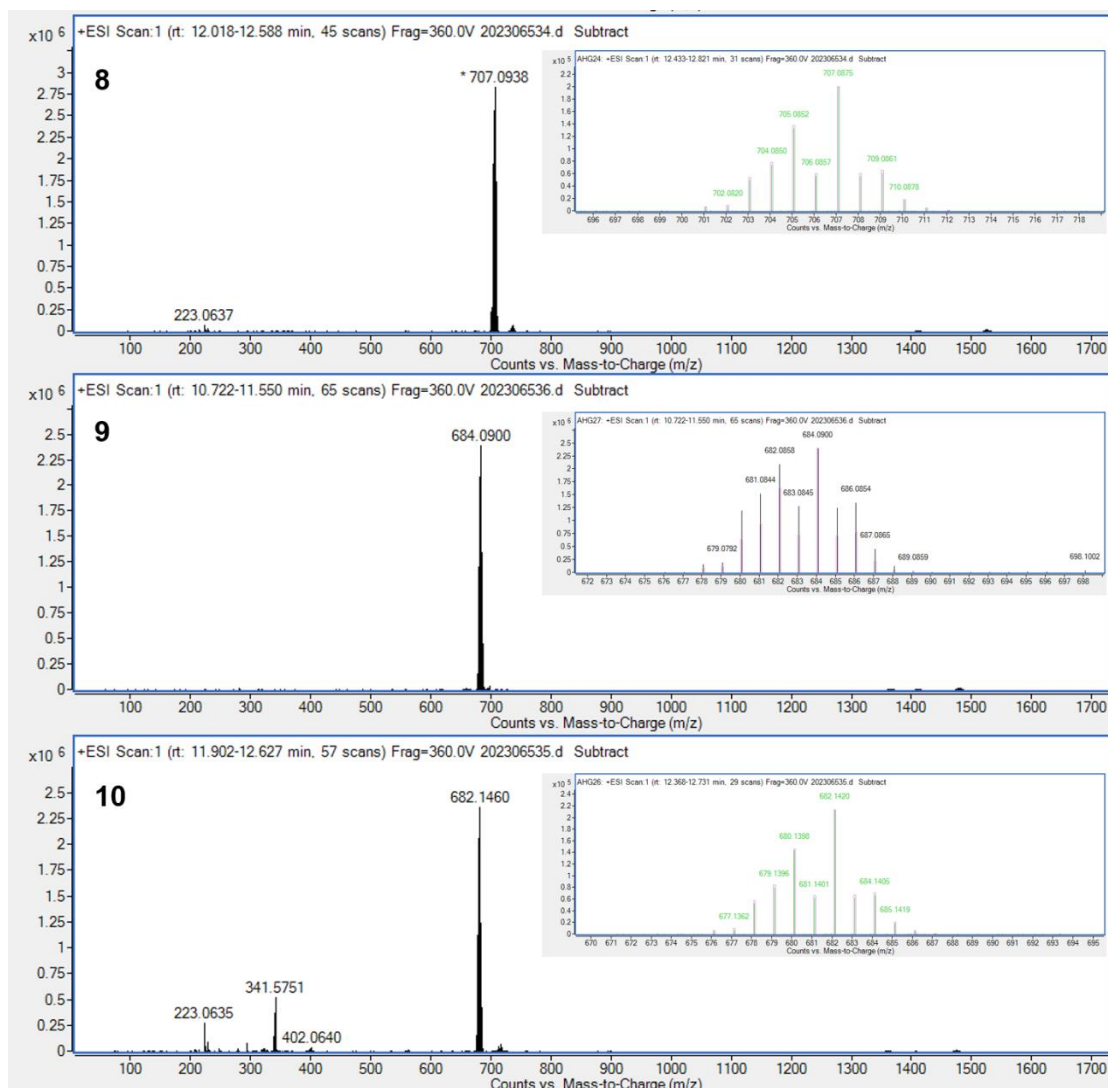


Figura A1.33. Espectro de masas de los picos a 10-12 min de los cromatogramas de la **Figura A1.32**.

4. Determinación de la estructura cristalina por rayos X

El número de referencia CCDC para el compuesto **17** es 2226215.

Tabla A2.1. Datos cristalográficos del compuesto **17**.

Fórmula empírica	$C_{48}H_{44}F_3N_7O_5OsS$	
Peso molecular	1078,16	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclinico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	$a = 13,5749(5)$ Å	$\alpha = 84,3400(10)^\circ$
	$b = 14,0139(5)$ Å	$\beta = 72,0520(10)^\circ$
	$c = 16,0407(6)$ Å	$\gamma = 62,2910(10)^\circ$

Volumen	2566,51(16) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1,395 Mg/m ³
Coeficiente de absorción	2,584 mm ⁻¹
F(000)	1080
Tamaño del cristal	0,120 x 0,080 x 0,020 mm ³
Rango theta para la recogida de datos	1,877 a 27,103°
Rangos de índices	-17<=h<=17, -17<=k<=17, -20<=l<=20
Reflexiones recogidas	103395
Reflexiones independientes	11300 [R(int) = 0,0301]
Integridad de Theta = 25,242°	99,9 %
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa F ²
Datos / restricciones / parámetros	11300 / 0 / 590
Buen ajuste de F²	1,119
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0205, wR2 = 0,0521
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0231, wR2 = 0,0540
Mayor diferencia pico-hueco	1,294 y -0,798 eÅ ⁻³

Tabla A1.1. Datos cristalográficos del compuesto 10.

Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₉ ClF ₆ N ₅ OsPS	
Peso molecular	826,23	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Ortorrómbico	
Grupo espacial	Pccn	
Dimensiones celdilla unidad	a = 25,037(2) Å	α = 90°
	b = 10,6927(11) Å	β = 90°
	c = 21,7489(18) Å	γ = 90°
Volumen	5822,4(9) Å ³	
Z	8	
Densidad (calculada)	1,885 Mg/m ³	
Coeficiente de absorción	4,666 mm ⁻¹	
F(000)	3232	
Tamaño del cristal	0,240 x 0,200 x 0,120 mm ³	
Rango theta para la recogida de datos	1,873 a 30,523°	
Rangos de índices	-35<=h<=35, -15<=k<=15, -30<=l<=31	

Reflexiones recogidas	139131
Reflexiones independientes	8896 [R(int) = 0,0871]
Integridad de Theta = 26,000°	100,0 %
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa F ²
Datos / restricciones / parámetros	8896 / 0 / 384
Buen ajuste de F ²	1,043
Índices R finales [I>2sigma(I)]	C
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0392, wR2 = 0,0528
Mayor diferencia pico-hueco	0,767 and -0,837 eÅ ⁻³

5. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

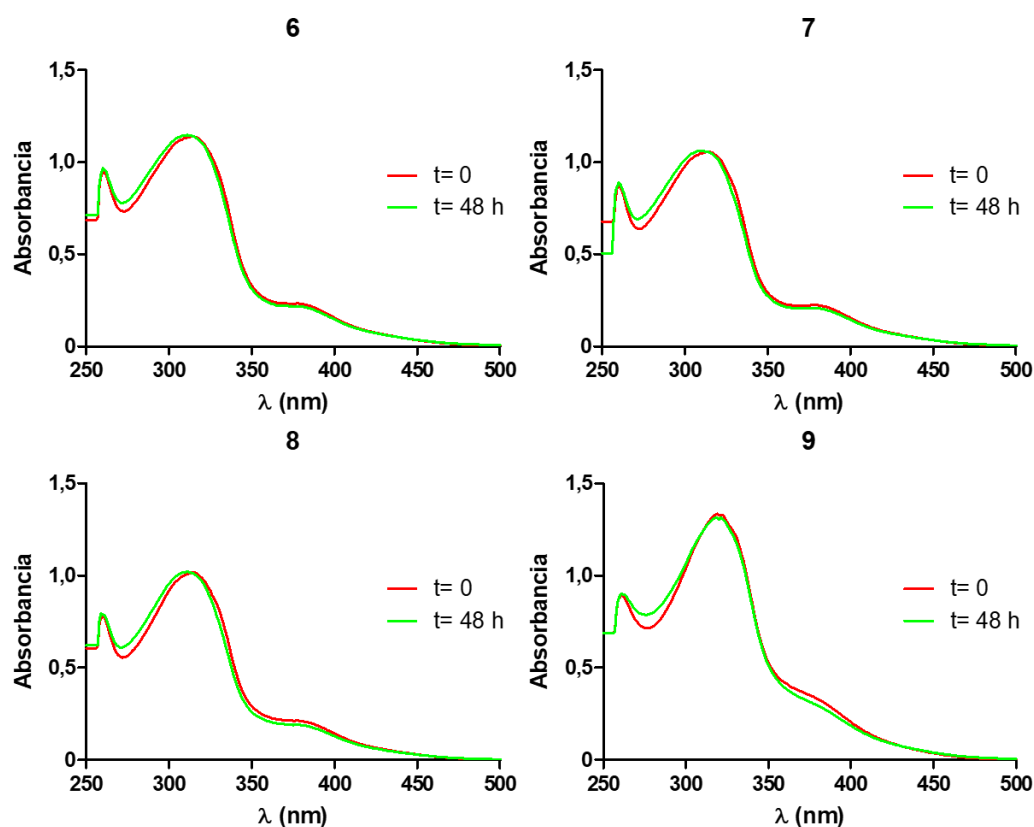


Figura A1.34. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **6-9** (50 μ M) en DMSO a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

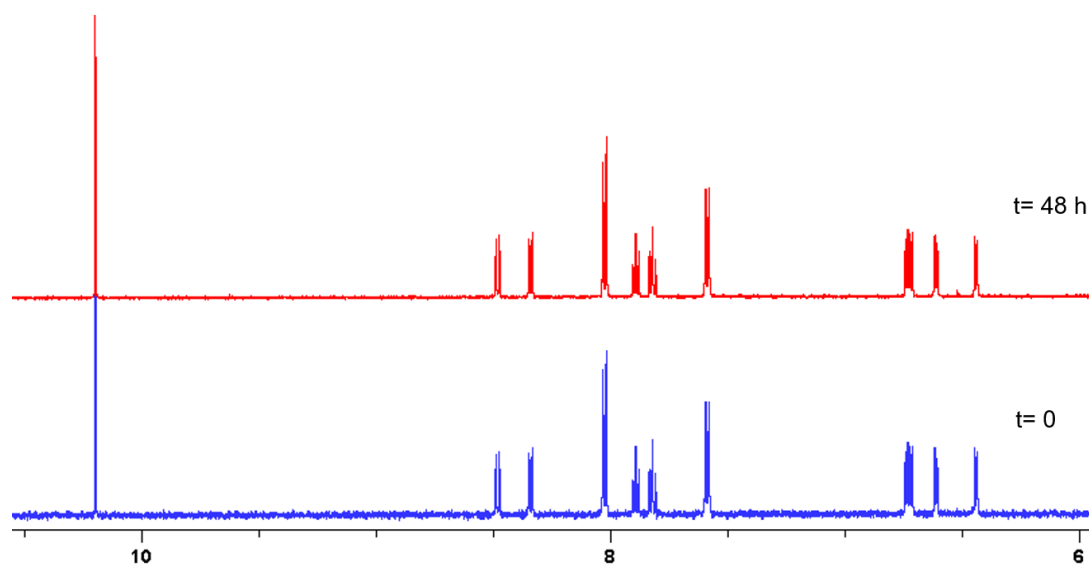


Figura A1.35. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **6** (1 mM) en $\text{DMSO}-d_6$ a $t = 0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

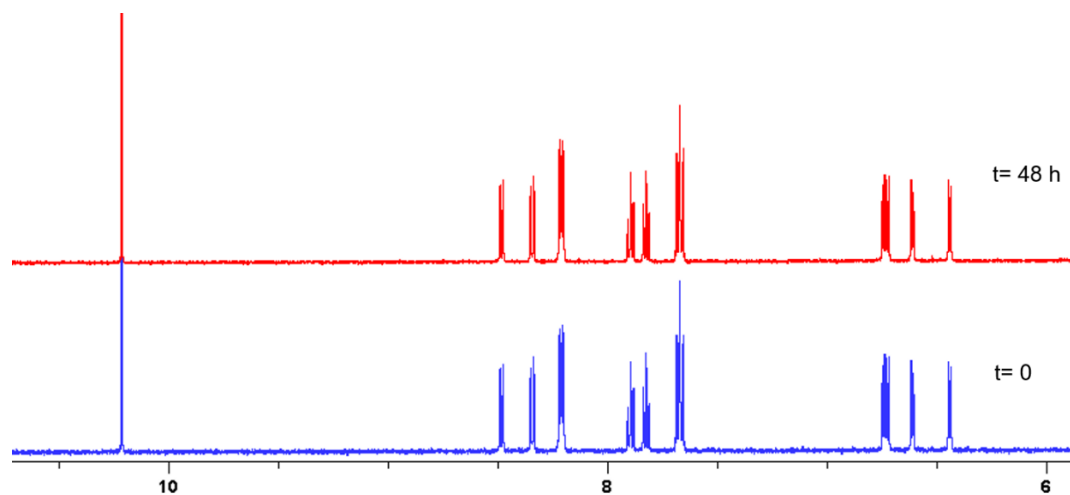


Figura A1.36. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **7** (1 mM) en $\text{DMSO}-d_6$ a $t = 0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

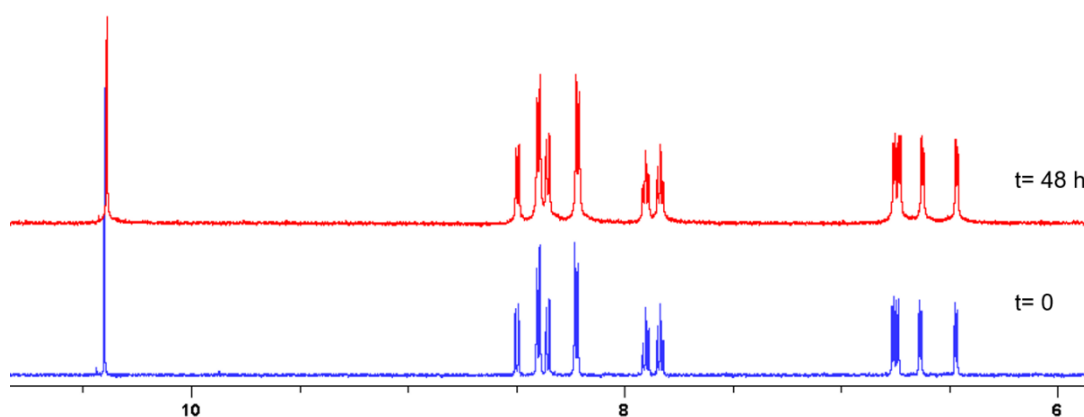


Figura A1.37. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **8** (1 mM) en $\text{DMSO}-d_6$ a $t = 0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

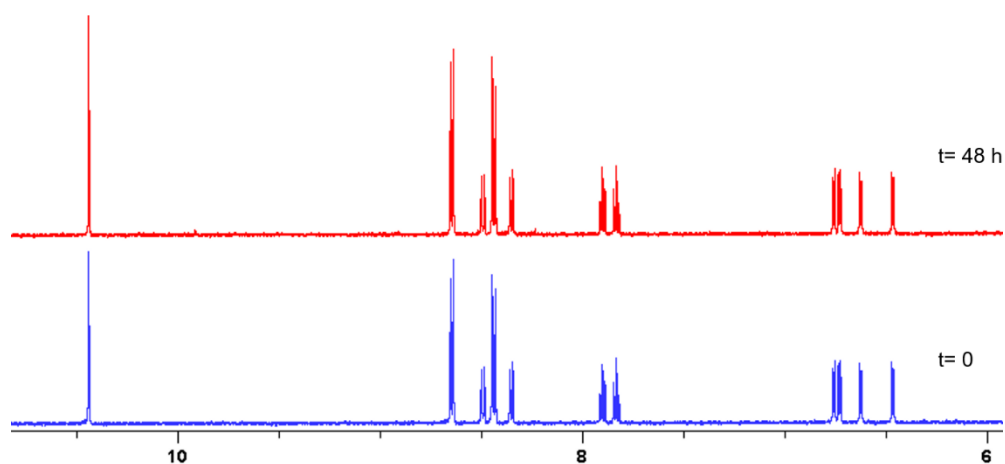


Figura A1.38. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **9** (1 mM) en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

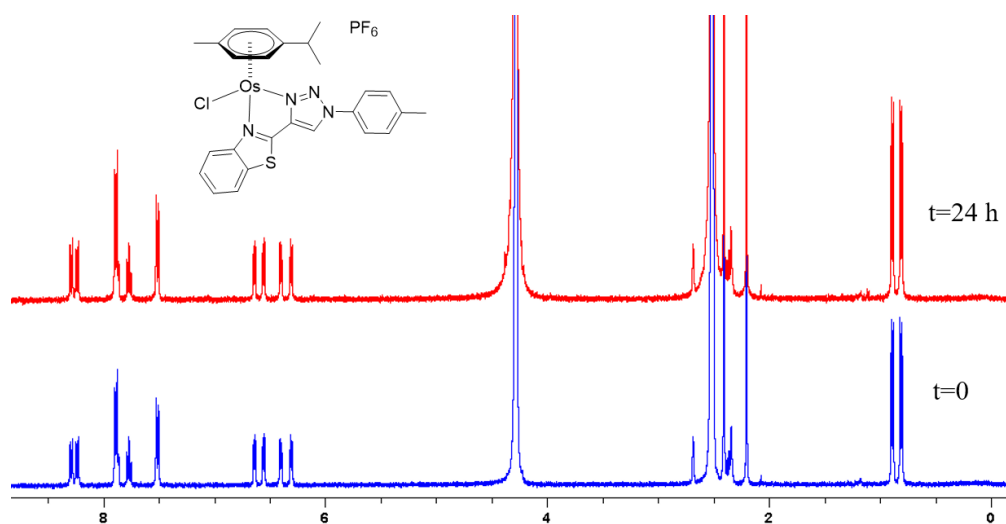


Figura A1.39. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **6** (1 mM) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ (1:2 v:v) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

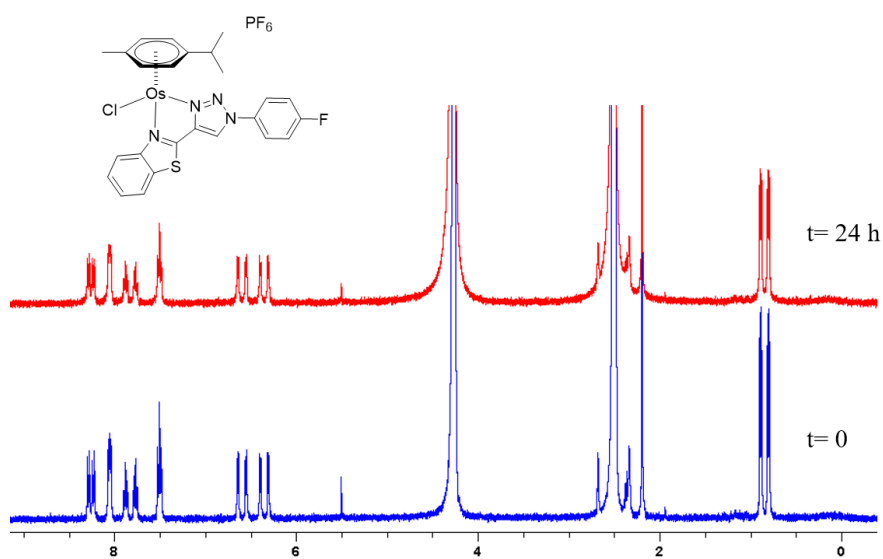


Figura A1.40. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **7** (1 mM) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ (1:2 v:v) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

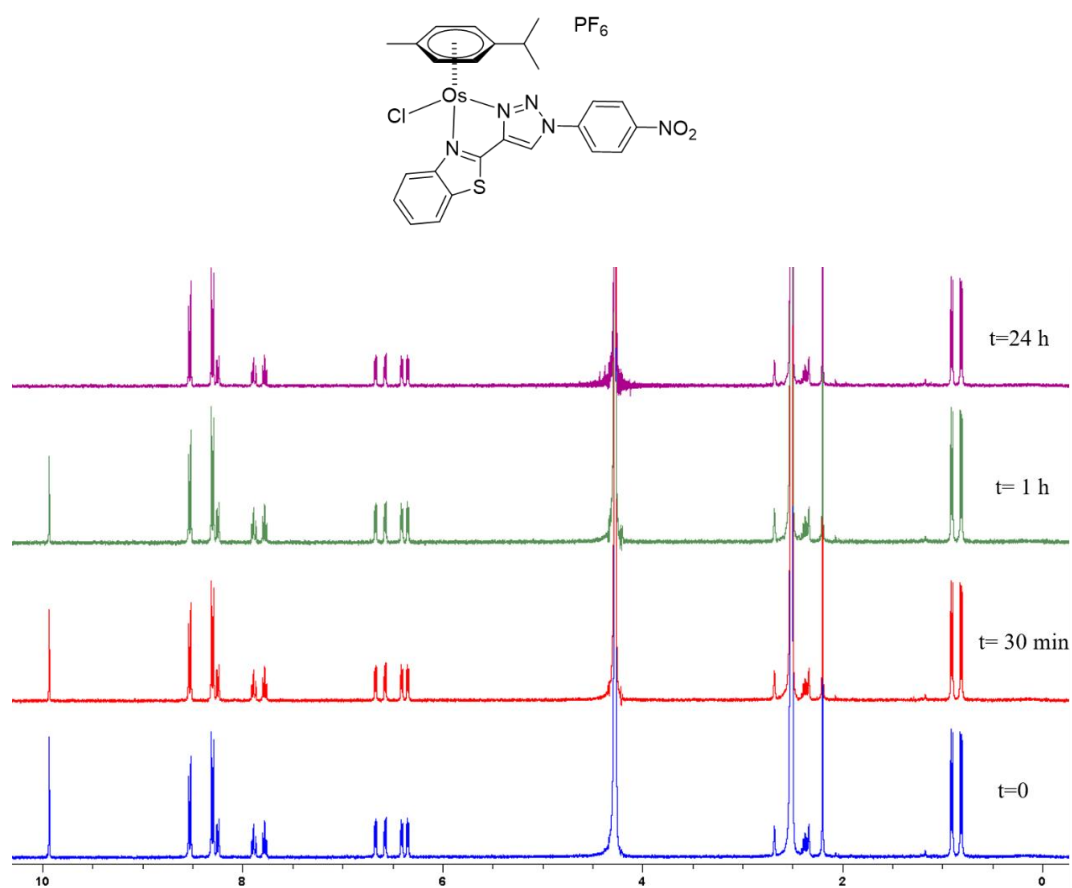


Figura A1.41. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **9** (1 mM) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ (1:2 v:v) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

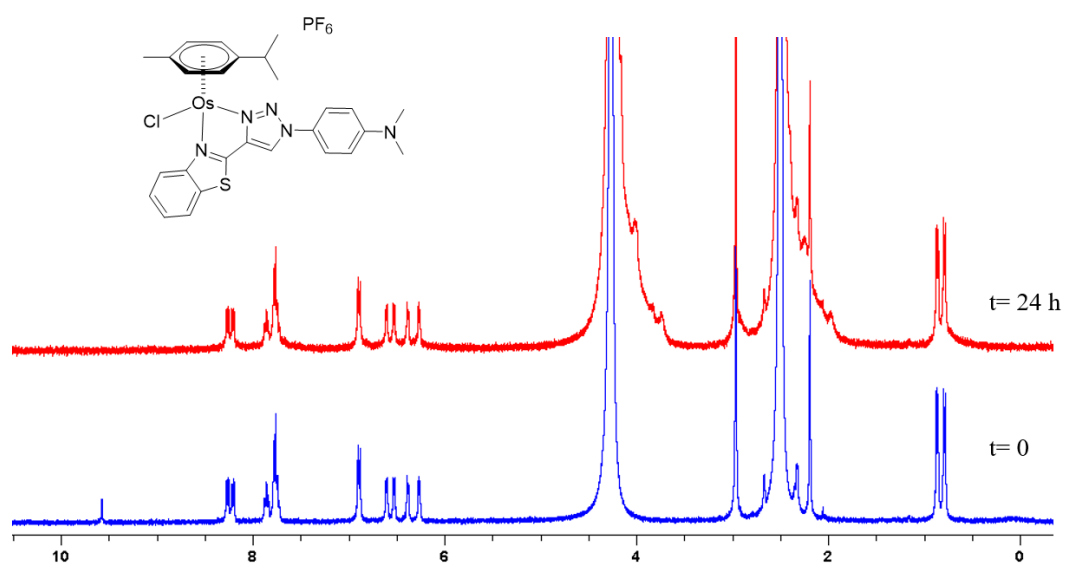


Figura A1.42. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **10** (1 mM) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ (1:2 v:v) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

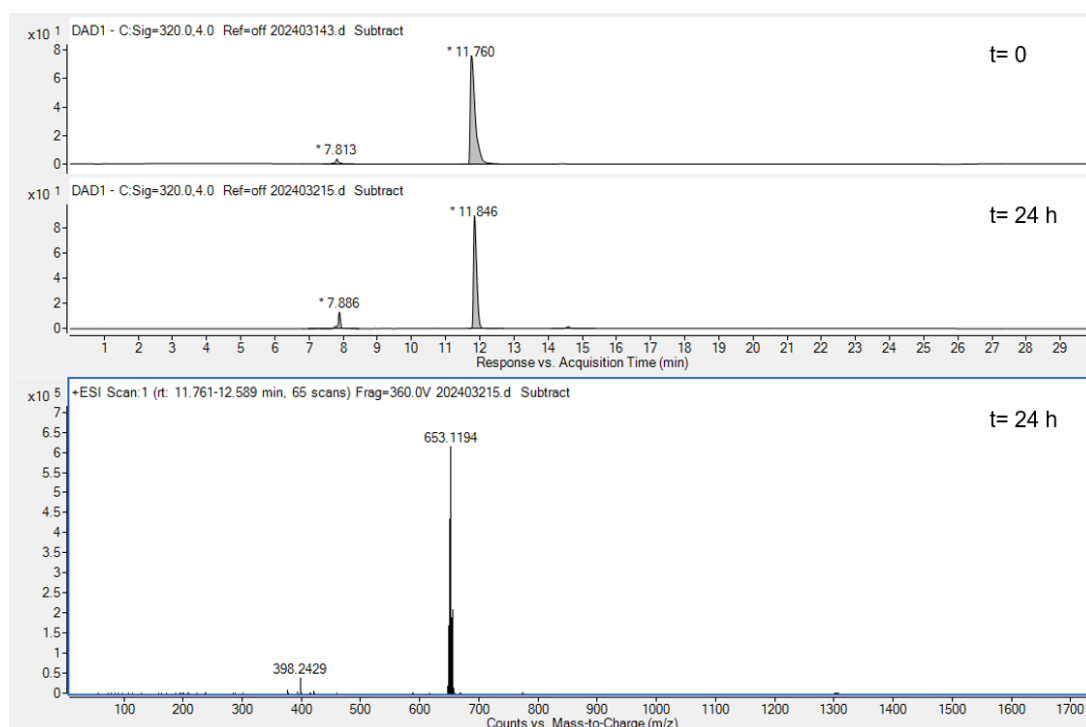


Figura A1.43. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **6** (10 μ M) disuelto en agua (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

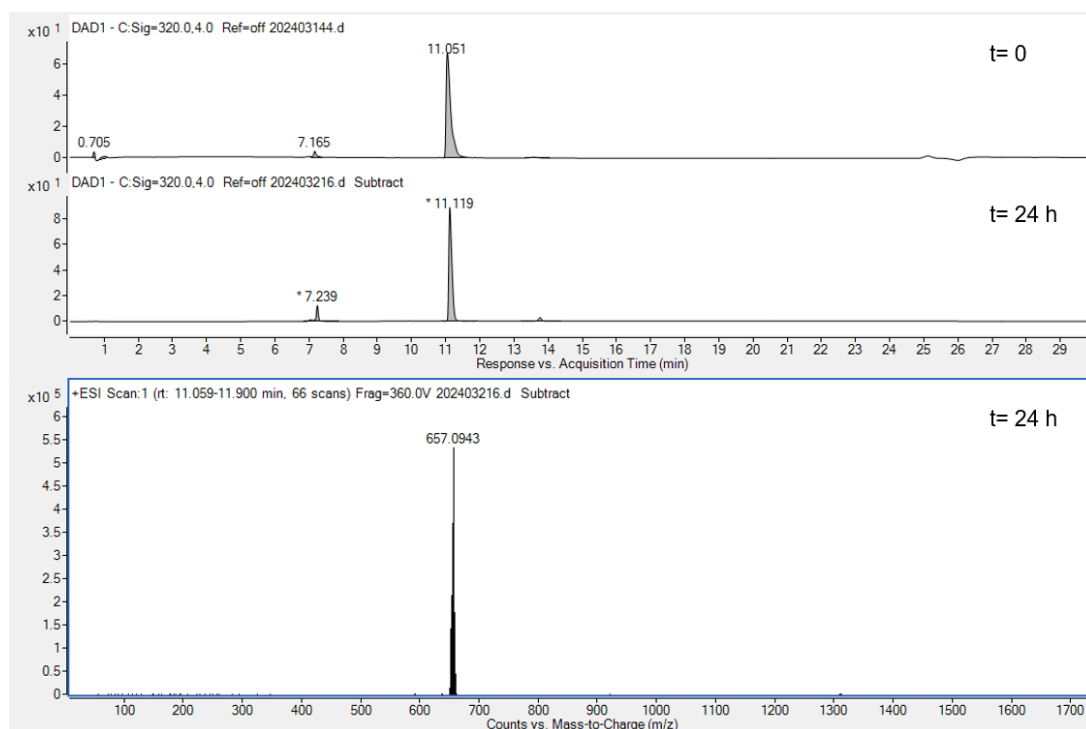


Figura A1.44. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **7** (10 μ M) disuelto en agua (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

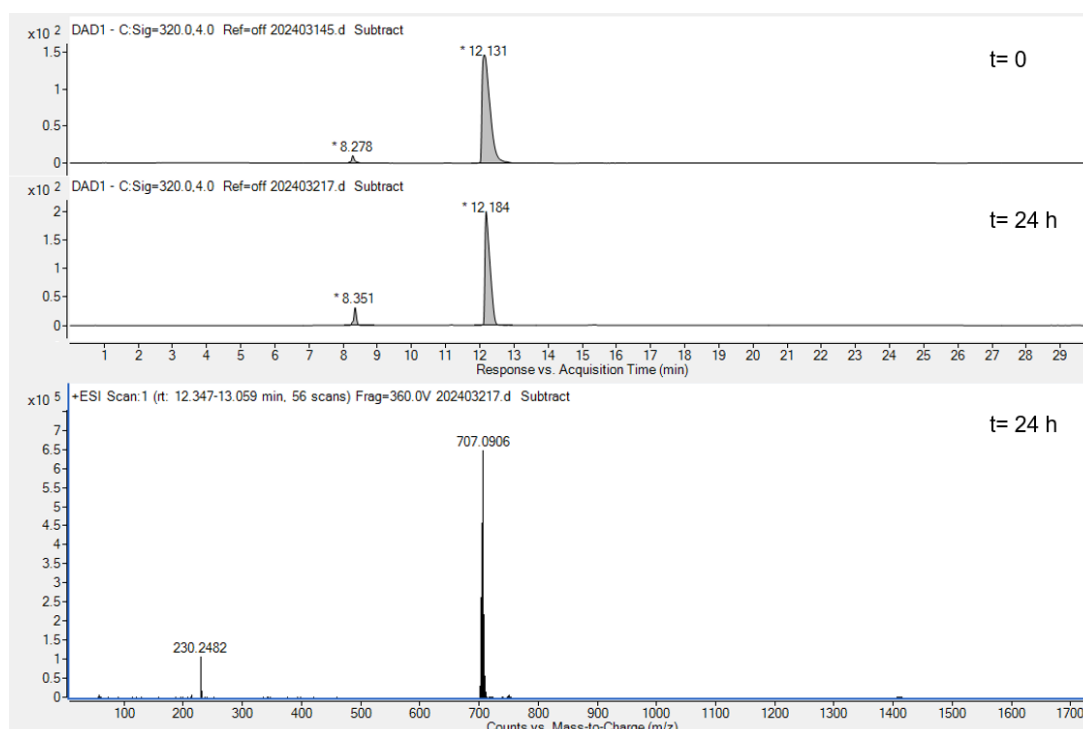


Figura A1.45. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **8** (10 μ M) disuelto en agua (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

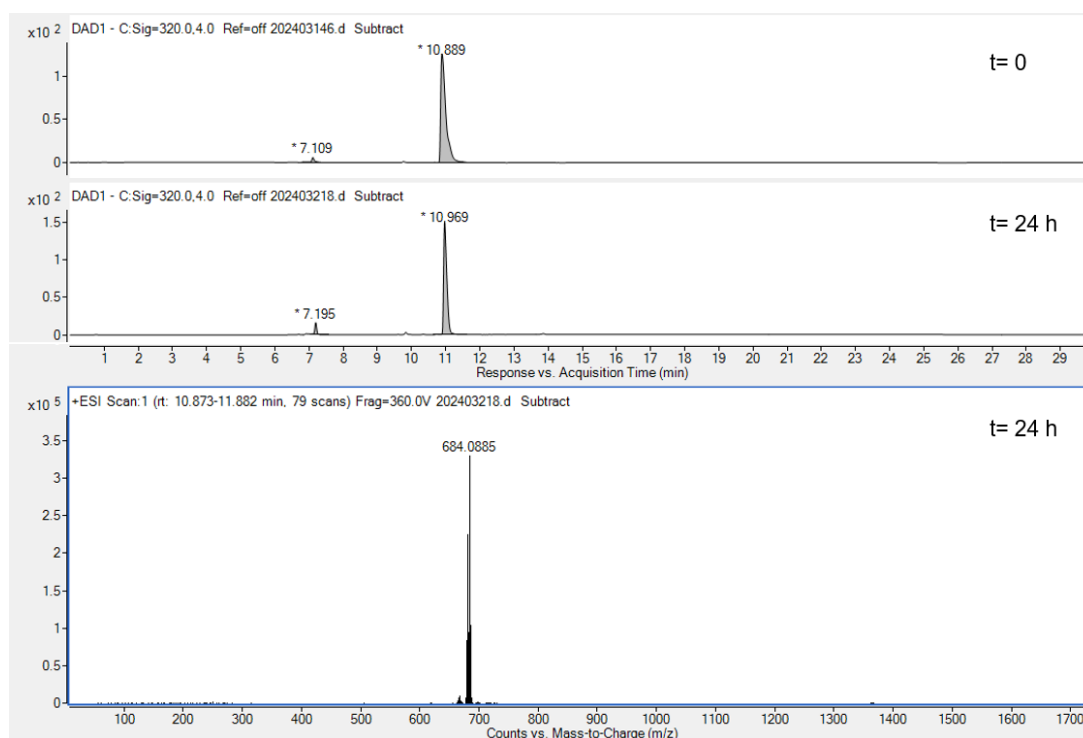


Figura A1.46. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **9** (10 μ M) disuelto en agua (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 24 h de incubación a t.a.

6. Interacción con la seroalbúmina

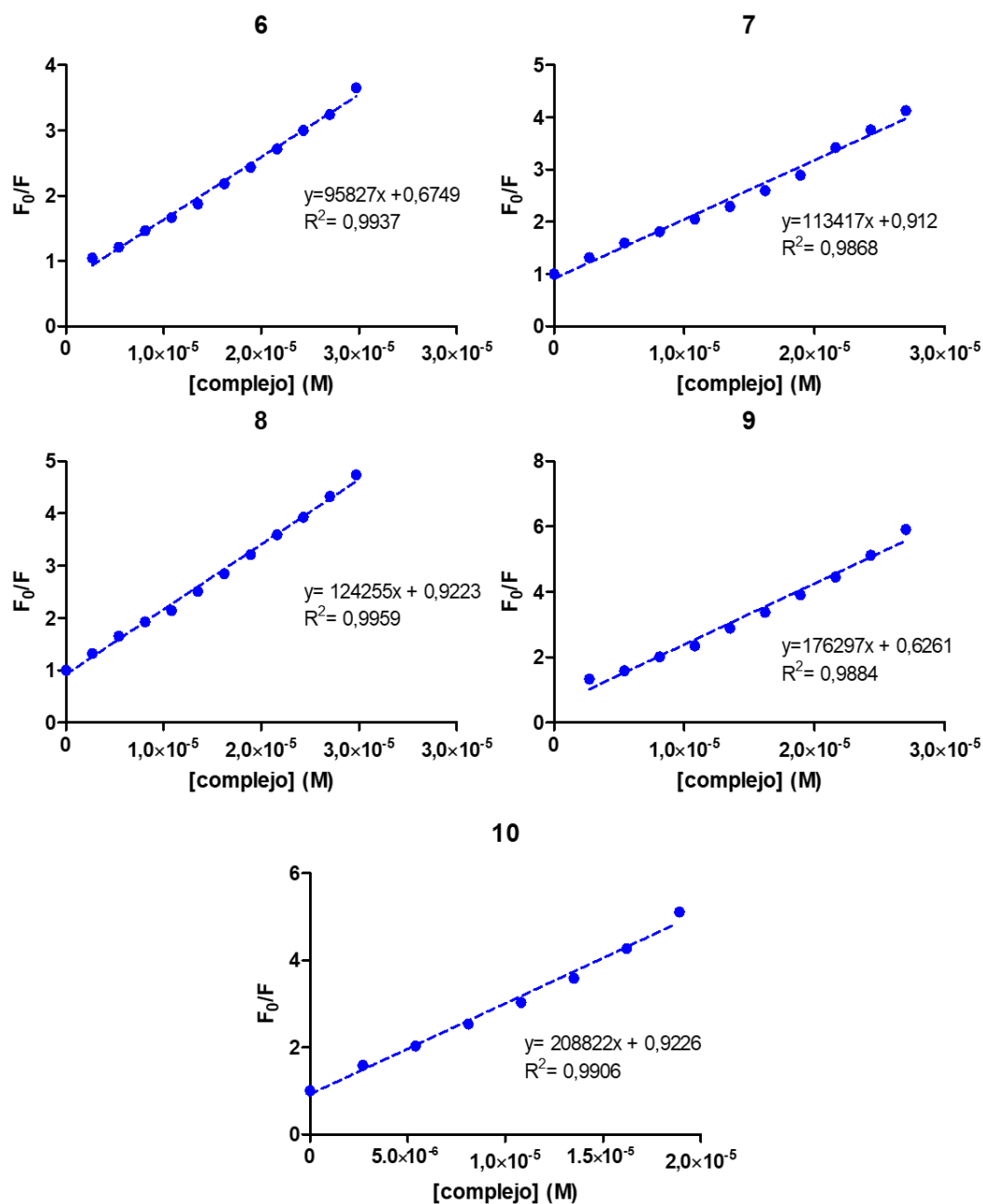


Figura A1.47. Curvas de Stern-Volmer de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **6-10**.

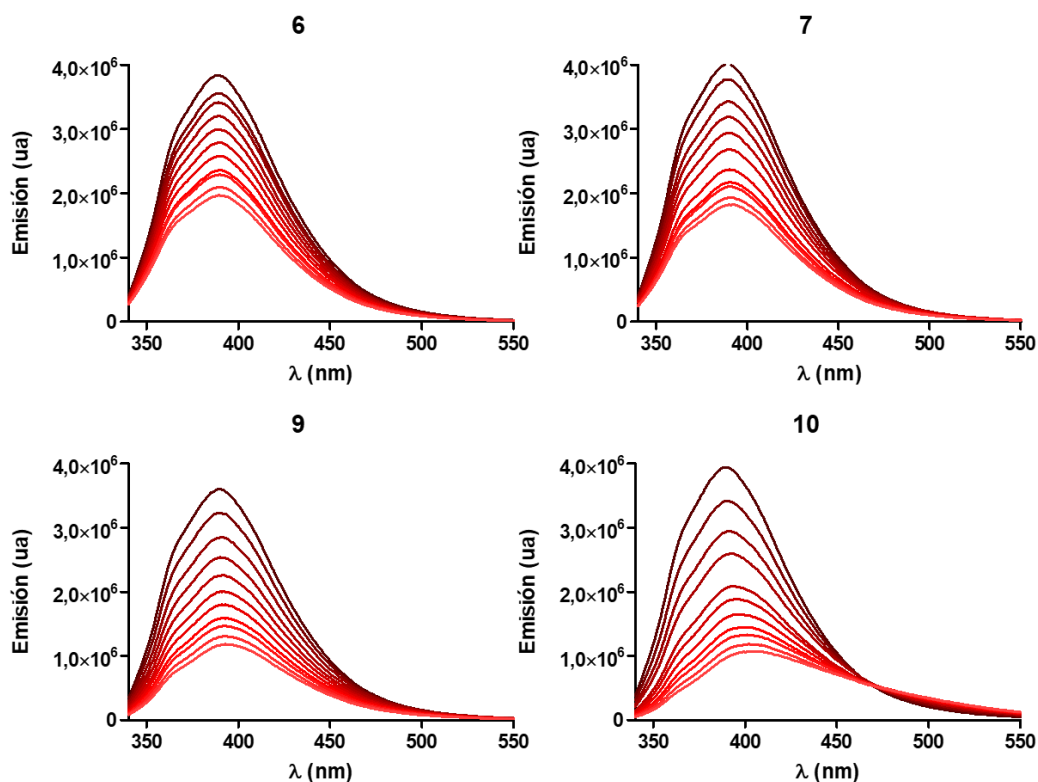


Figura A1.48. Espectro de emisión de HSA-WF en presencia de cantidades crecientes de los compuestos **6-10**. $\lambda_{ex}= 320$ nm. [HSA-WF]= 1,0:1,0 μ M. [Complejos]: 0-15 μ M. El incremento de concentración se produce de arriba abajo.

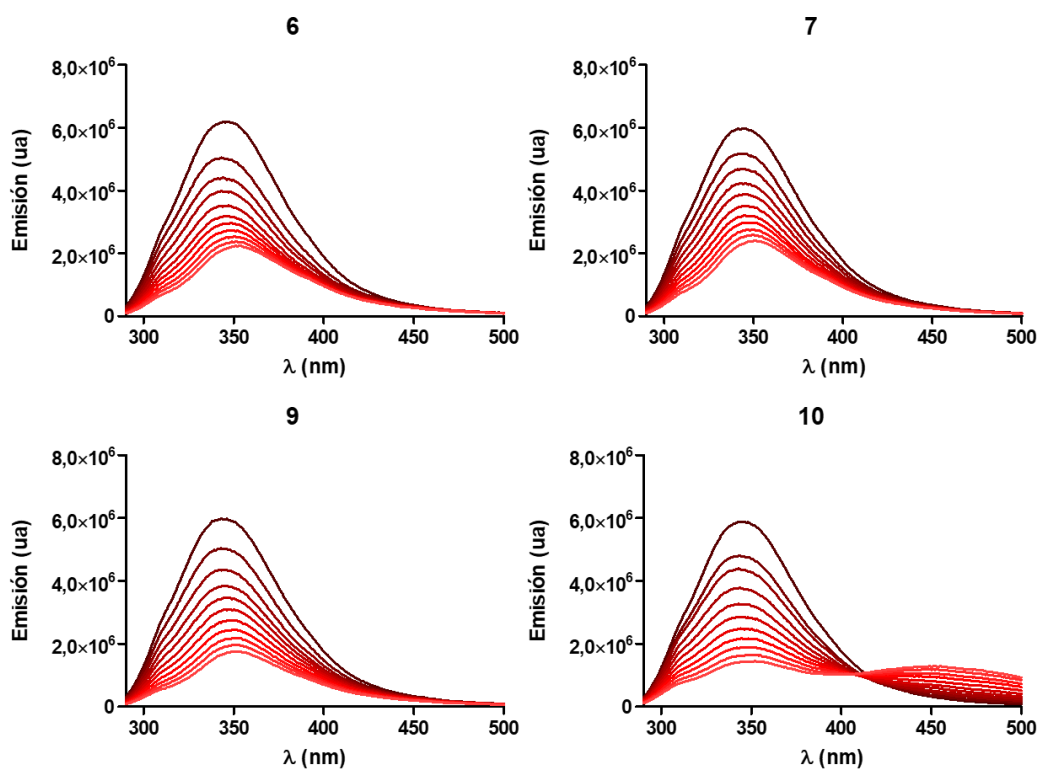


Figura A1.49. Espectro de emisión de HSA-IBU en presencia de cantidades crecientes de los compuestos **6-10**. $\lambda_{ex}= 340$ nm. [HSA-IBU]= 1,0:1,0 μ M. [Complejos]: 0-15 μ M. El incremento de concentración se produce de arriba abajo.

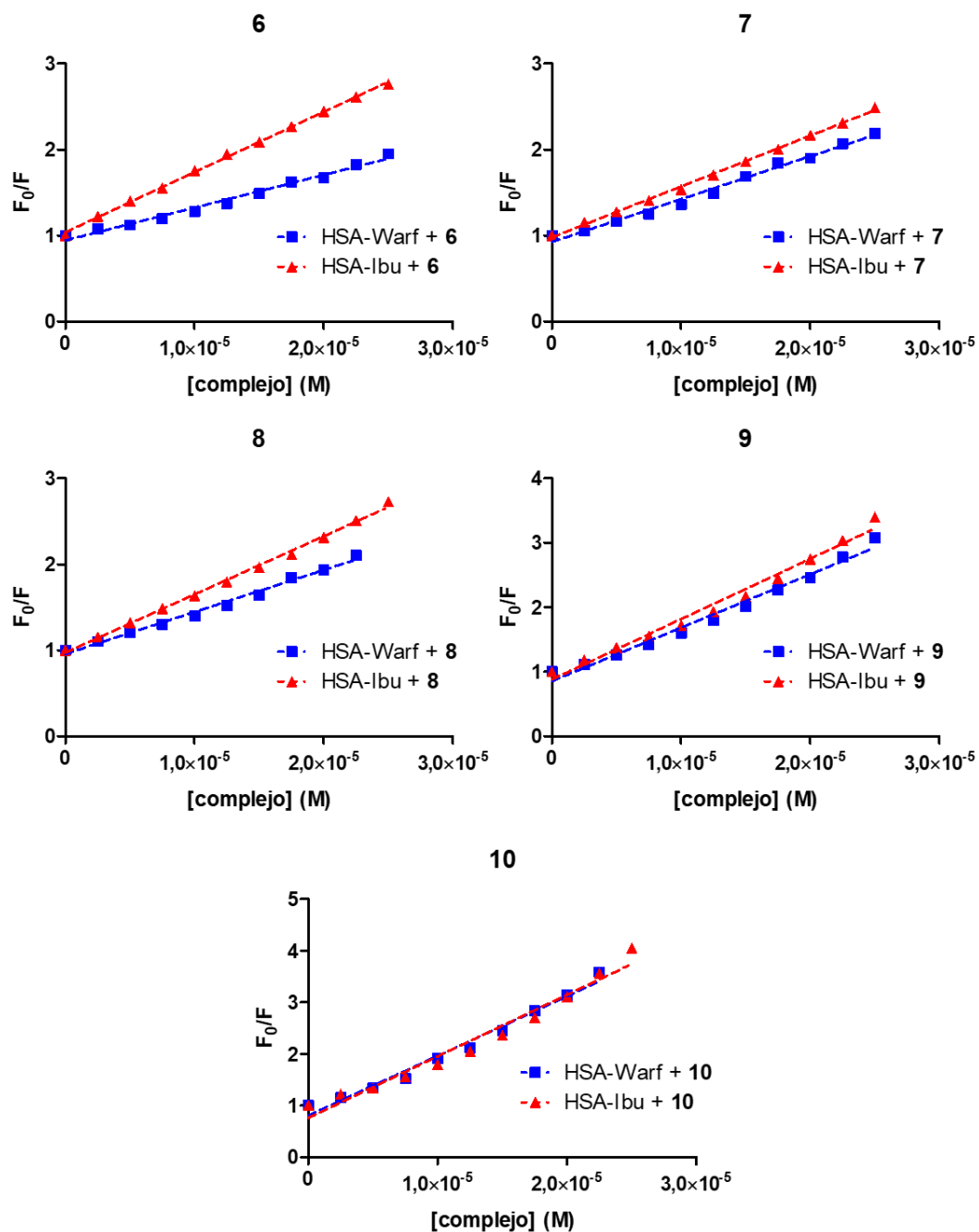


Figura A1.50. Gráficos de la ecuación de Stern-Volmer de la extinción de la fluorescencia de los complejos [HSA-WF] y [HSA-IBU] en presencia de los compuestos **6-10**. λ_{ex} = 320 nm, [HSA-WF]= 1,0:1,0 μM ; λ_{ex} = 340 nm, [HSA-IBU]= 1,0:1,0 μM . [Complejos **6-10**]: 0-25 μM .

7. Propiedades biológicas

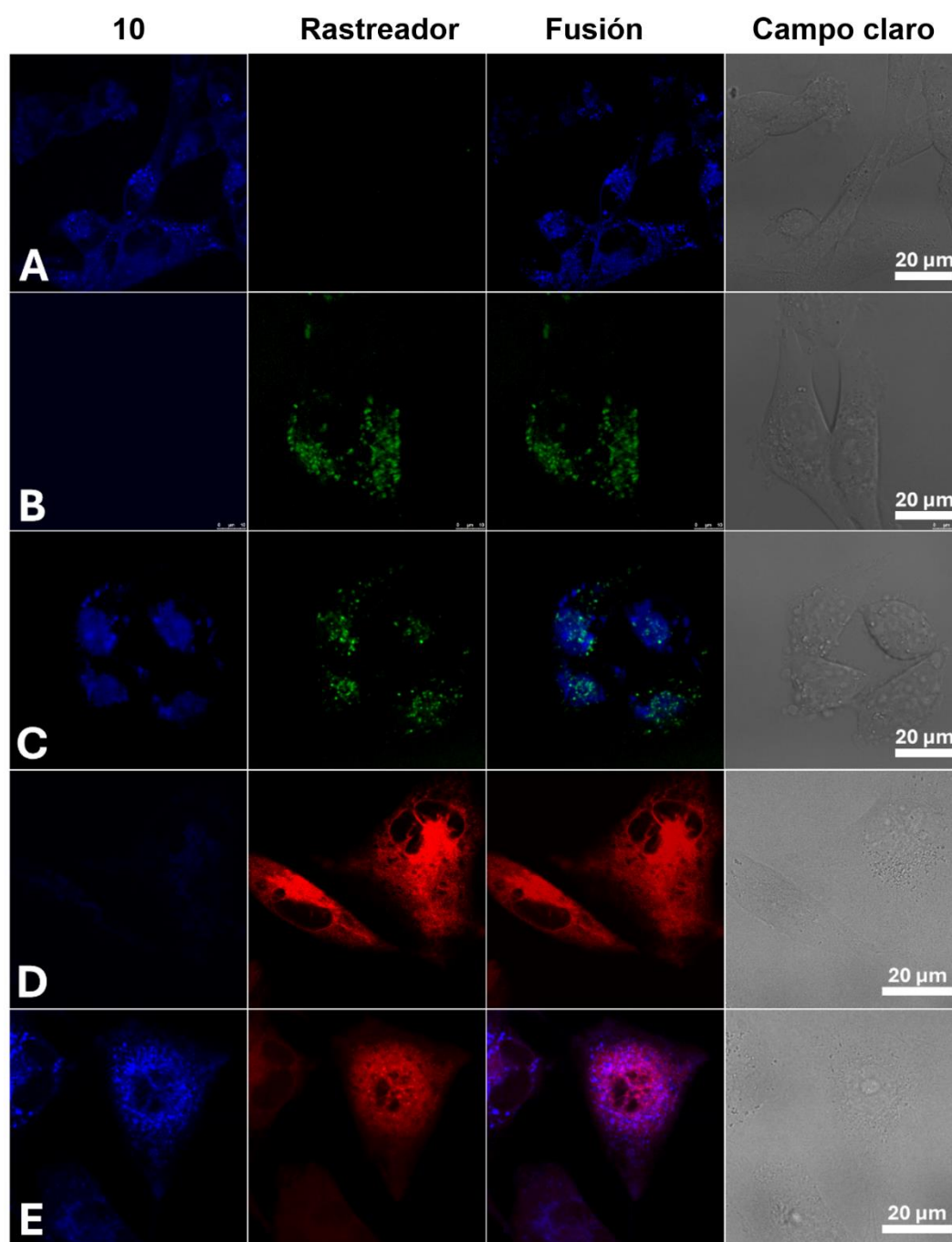


Figura A1.51. Colocalización del compuesto **10** en células de rabdomiosarcoma con liposomas y retículo endoplásmico. Las células fueron teñidas previamente con Lyso-Tracker o ER-Tracker y luego expuestas al compuesto **10** (12,9 μ M) durante 1 h. Compuesto **10** (Azul) - la señal de **10**; Tracker - la señal de Lyso-Tracker (B, C) o ER-Tracker (D, E); Merge - la señal fusionada de **10** y el tracker específico; Brightfield - canal de campo claro. (A) - Células expuestas solo al compuesto **10**; (B) - células expuestas solo a Lyso-Tracker; (C) - células expuestas al compuesto **10** y Lyso-Tracker; (D) - células expuestas solo a ER-Tracker; (E) - células expuestas al compuesto **10** y ER-Tracker.

Anexo II

ÍNDICE

1. Espectros de RMN	A37
1.1. Compuesto 12	A37
1.2. Compuesto 13	A38
1.3. Compuesto 14	A39
1.4. Compuesto 15	A40
1.5. Compuesto 16	A41
1.6. Compuesto 17	A42
1.7. Compuesto 18	A43
1.8. Compuesto 19	A44
1.9. Compuesto 20	A45
2. Espectrometría de masas (HR-MS).....	A45
3. Determinación de la estructura cristalina por rayos X.....	A53
4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	A54
5. Interacción con la seroalbúmina	A56
6. Propiedades biológicas	A57

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 12

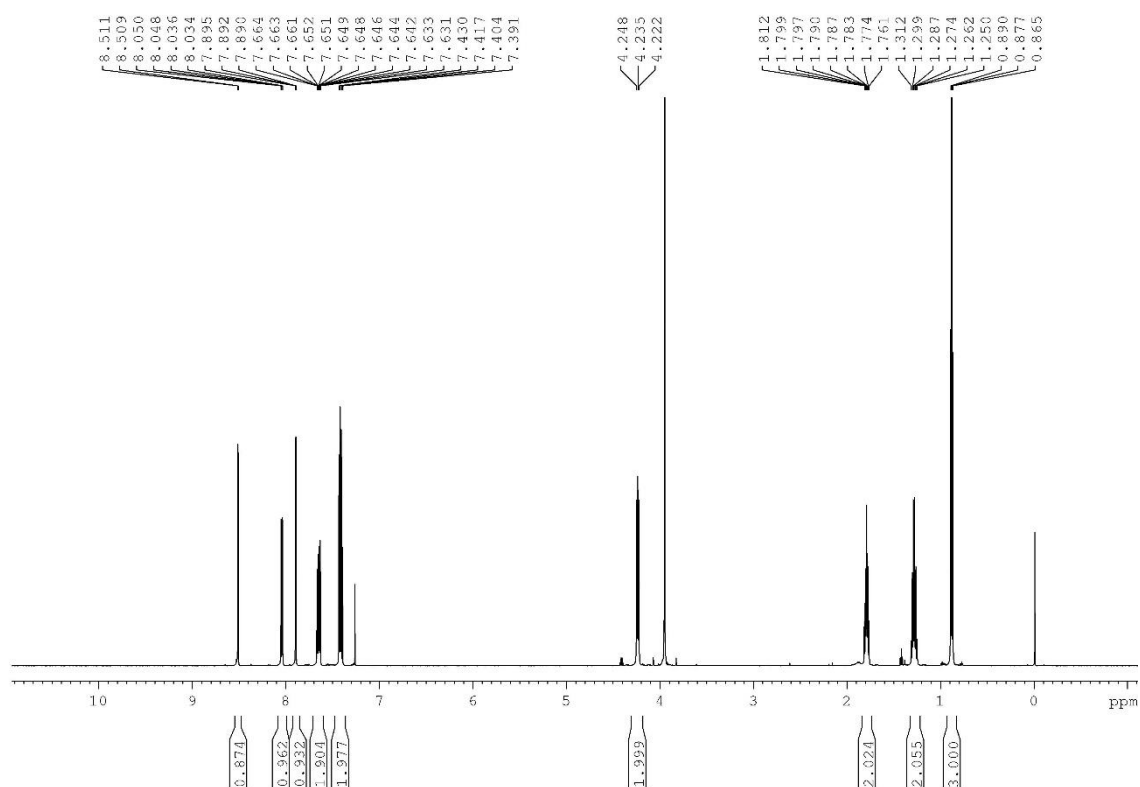


Figura A2.1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **12** en CDCl_3 .

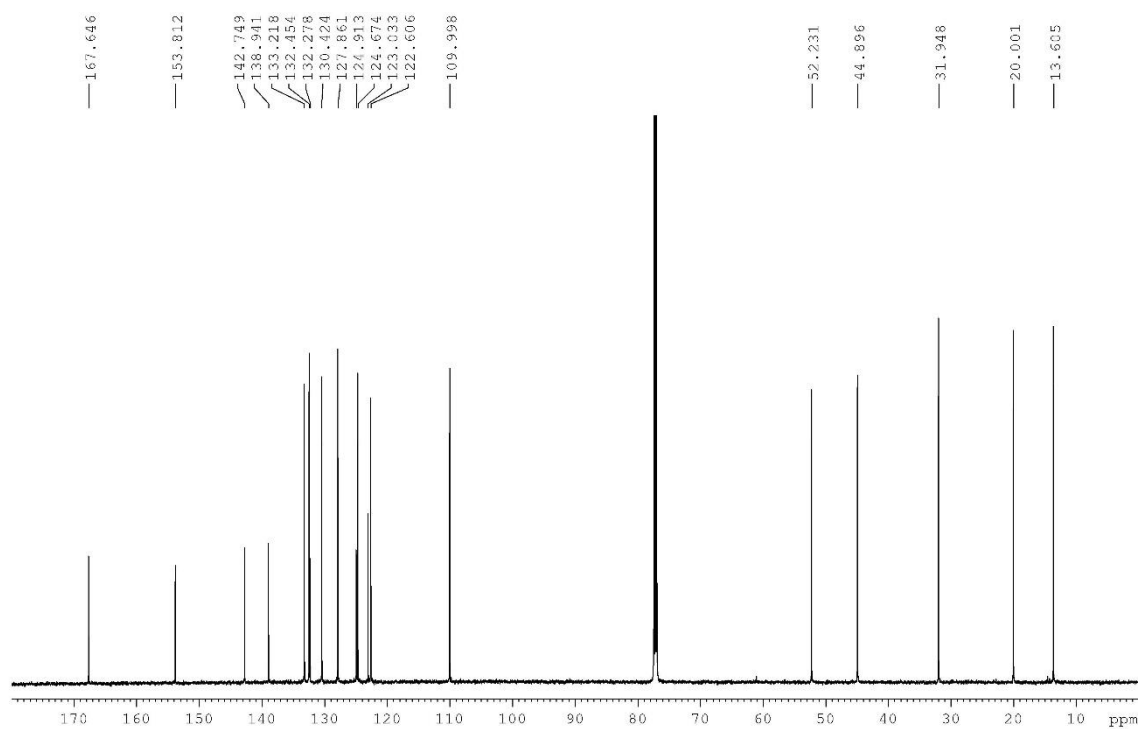


Figura A2.2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **12** en CDCl_3 .

1.2. Compuesto 13

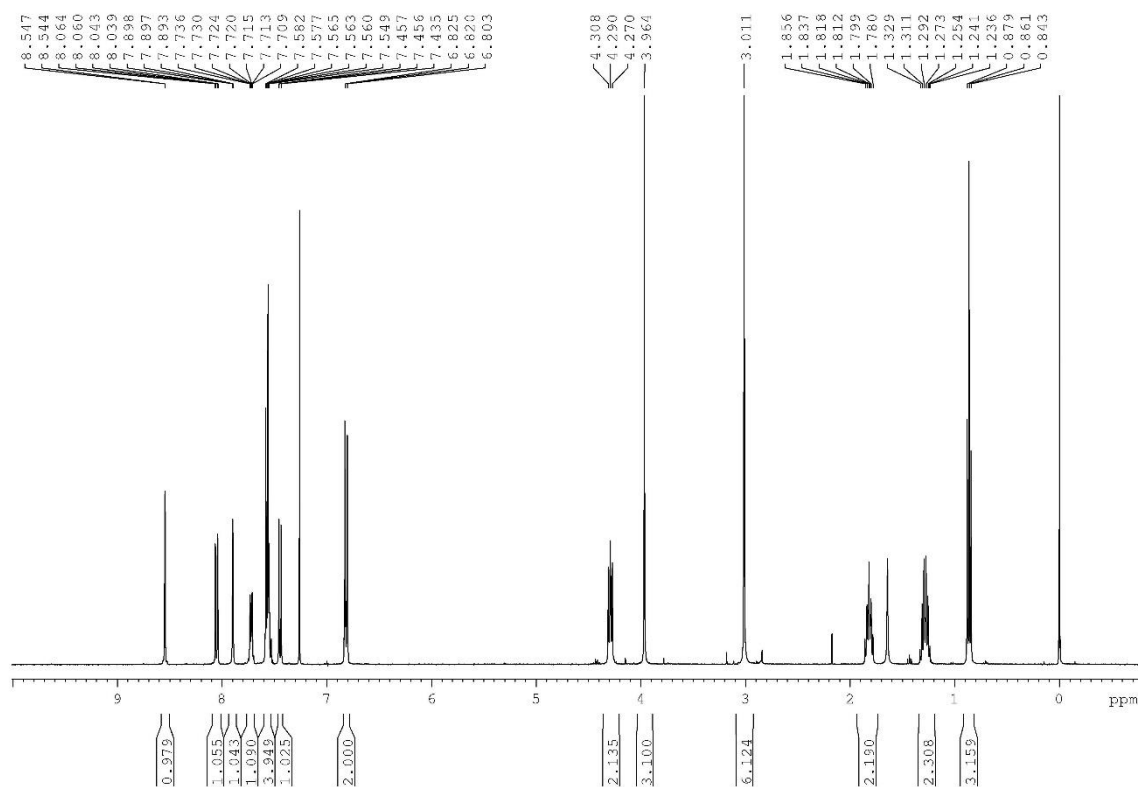


Figura A2.3. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **13** en CDCl_3 .

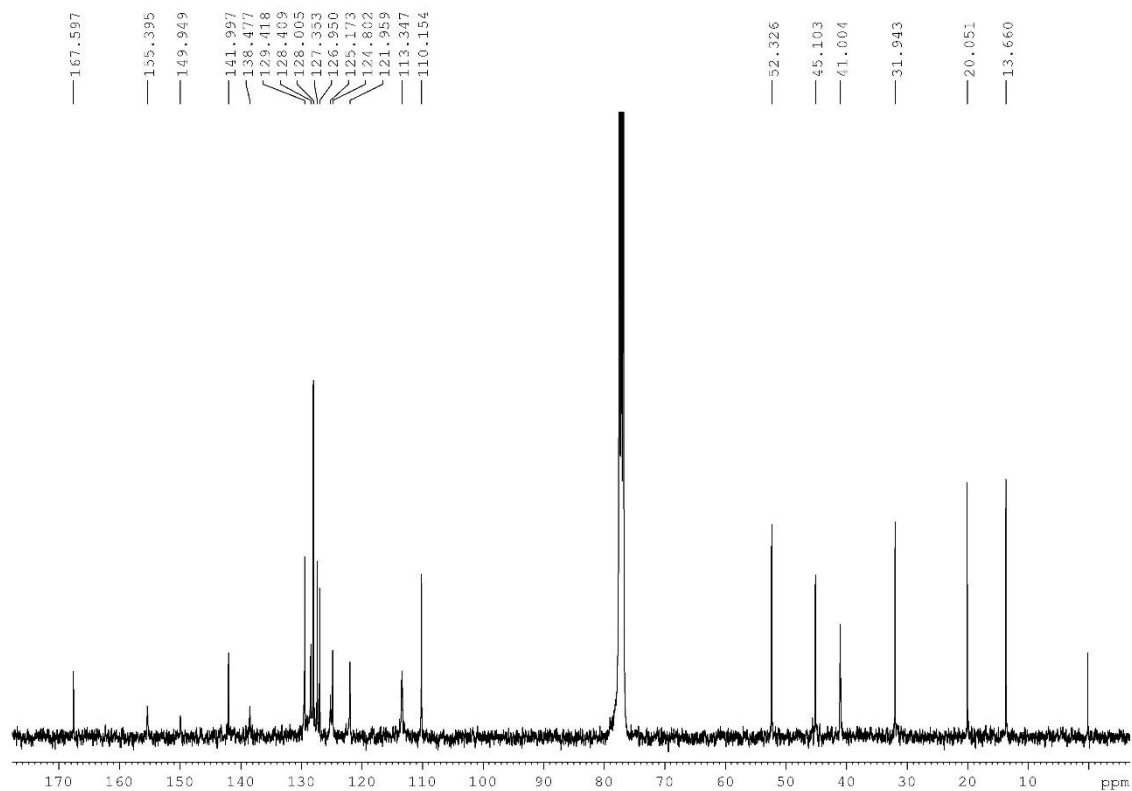
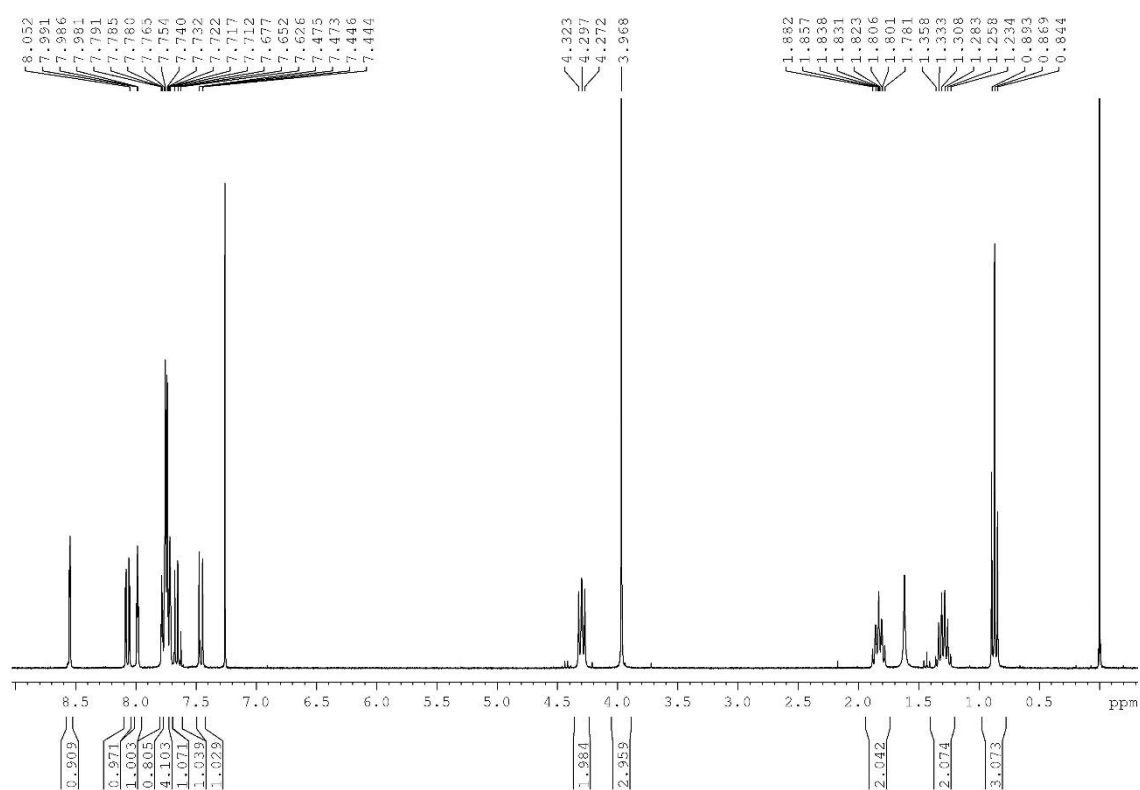
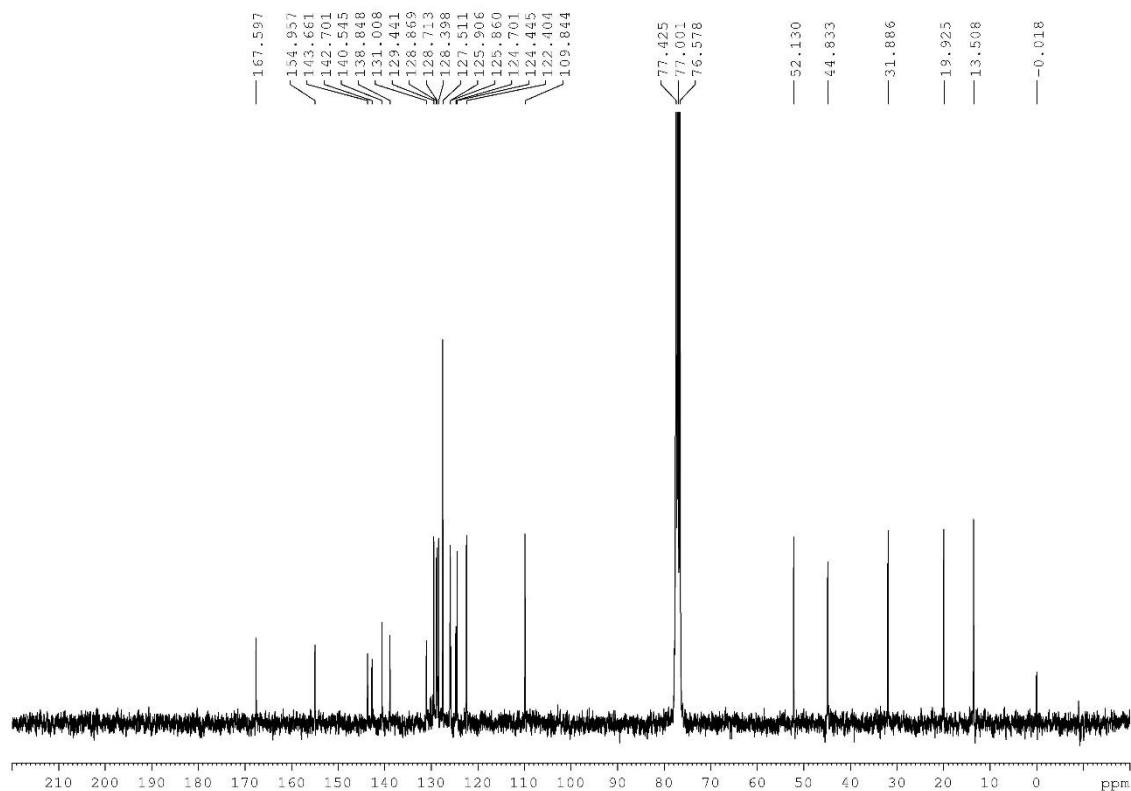


Figura A2.4. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **13** en CDCl_3 .

1.3. Compuesto 14

Figura A2.5. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 14 en CDCl₃.Figura A2.6. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 14 en CDCl₃.

1.4. Compuesto 15

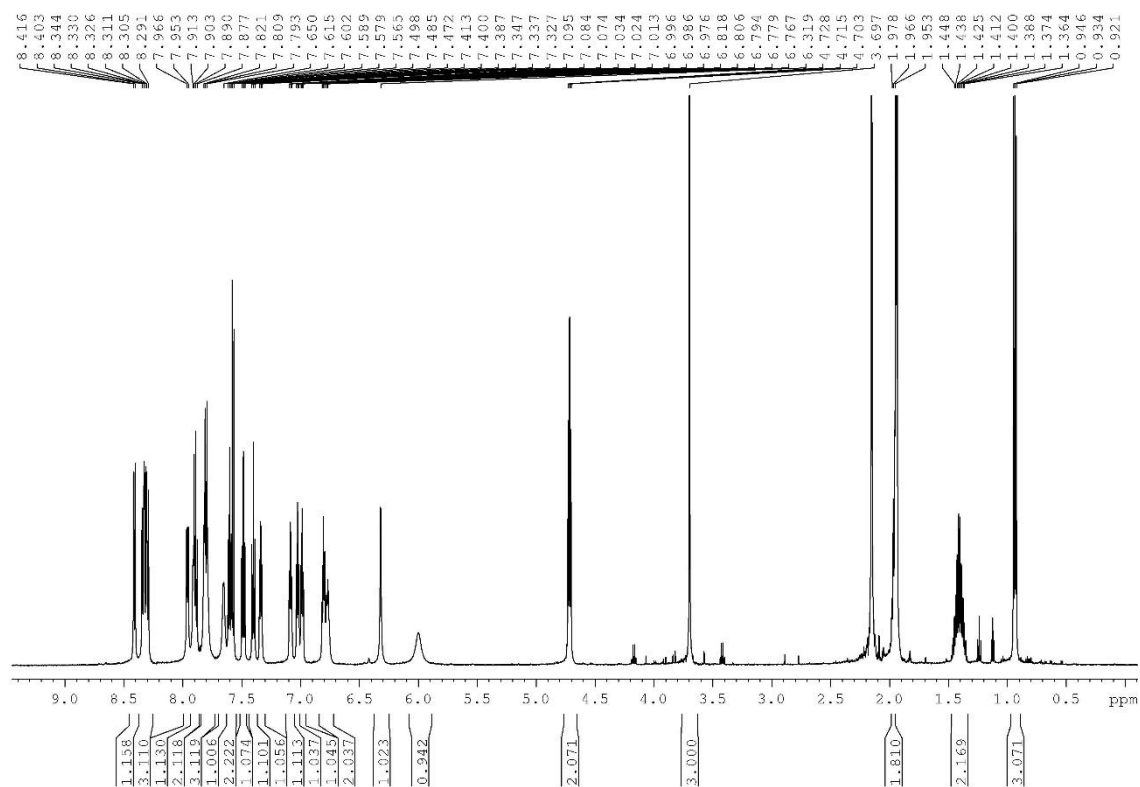


Figura A2.7. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 15 en CD_3CN .

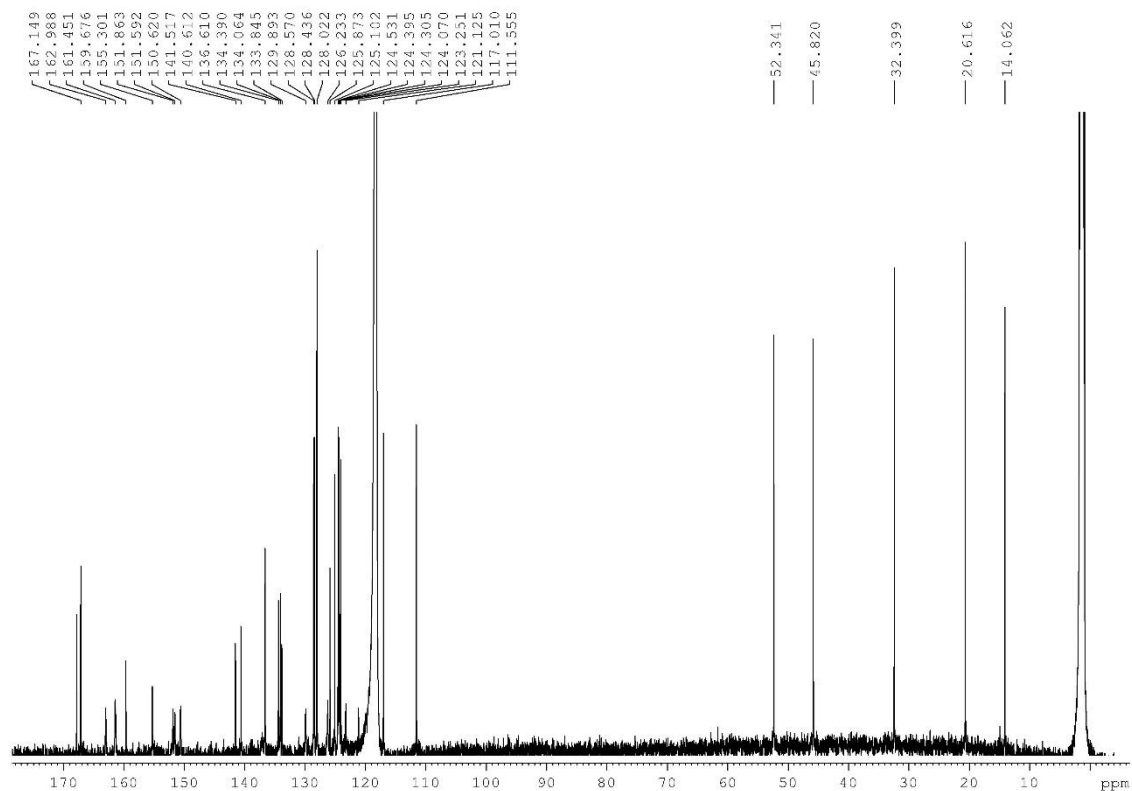
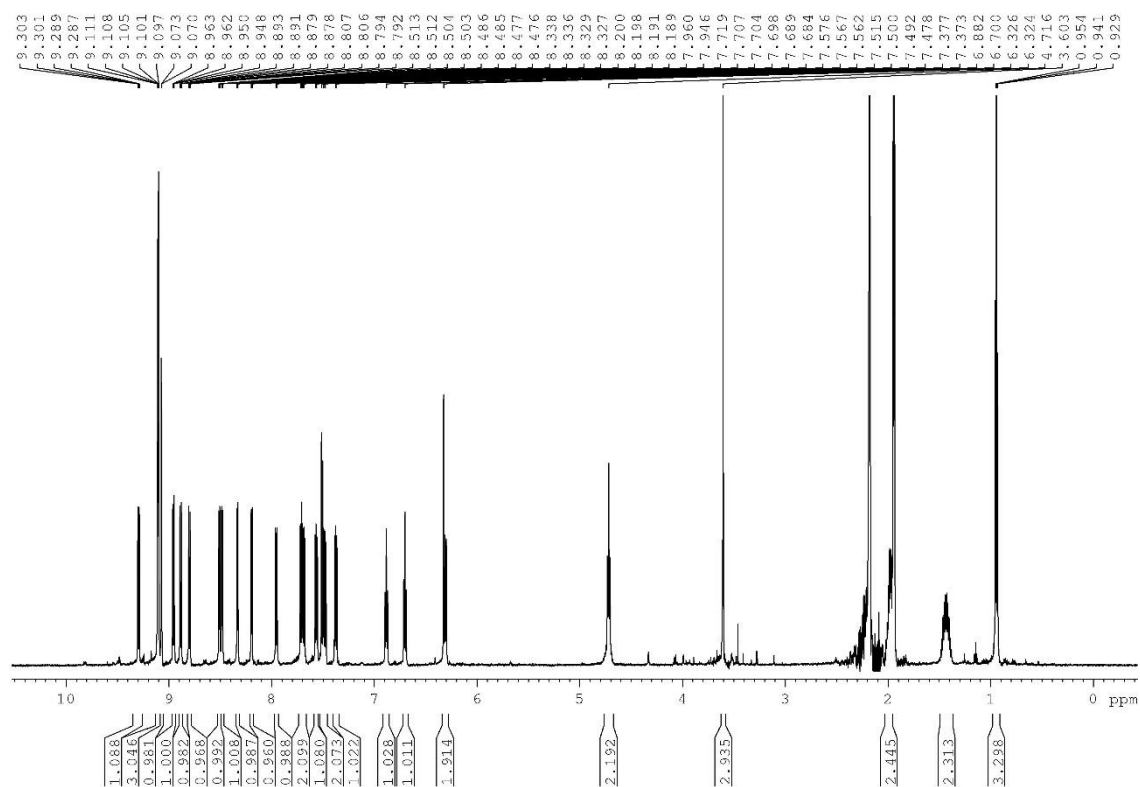
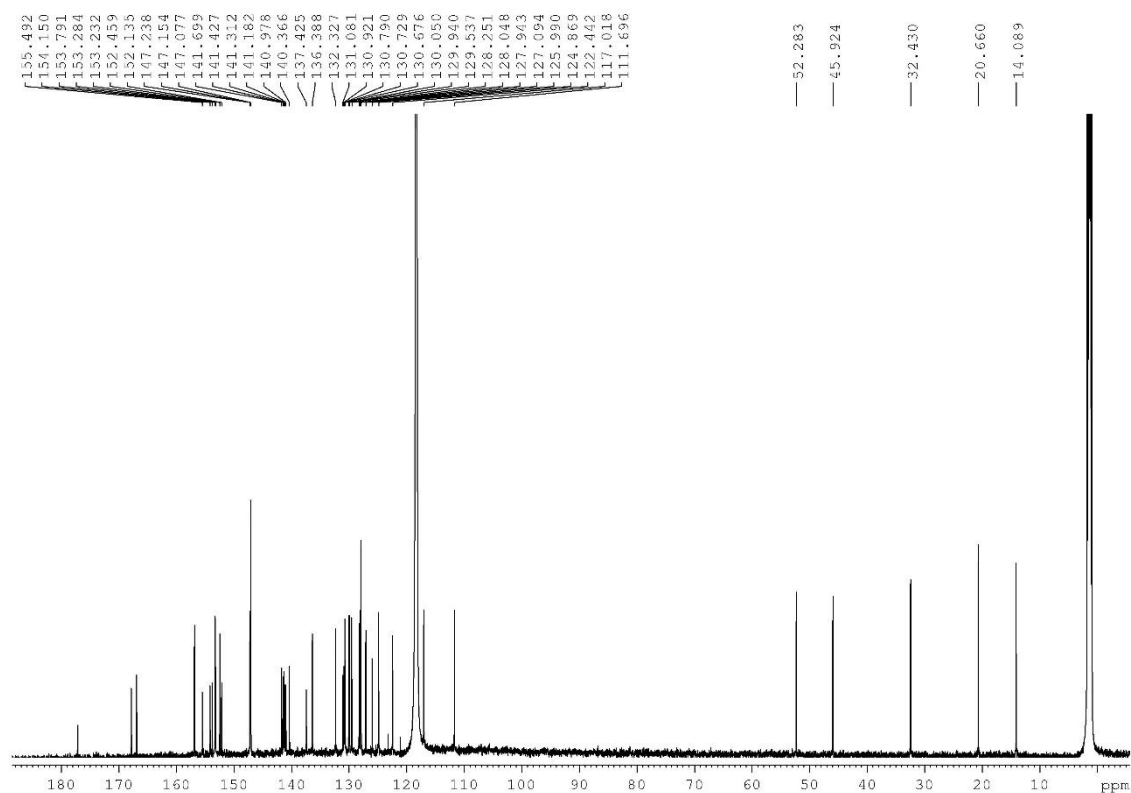


Figura A2.8. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 15 en CD_3CN .

1.5. Compuesto 16

Figura A2.9. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 16 en CD_3CN .Figura A2.10. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 16 en CD_3CN .

1.6. Compuesto 17

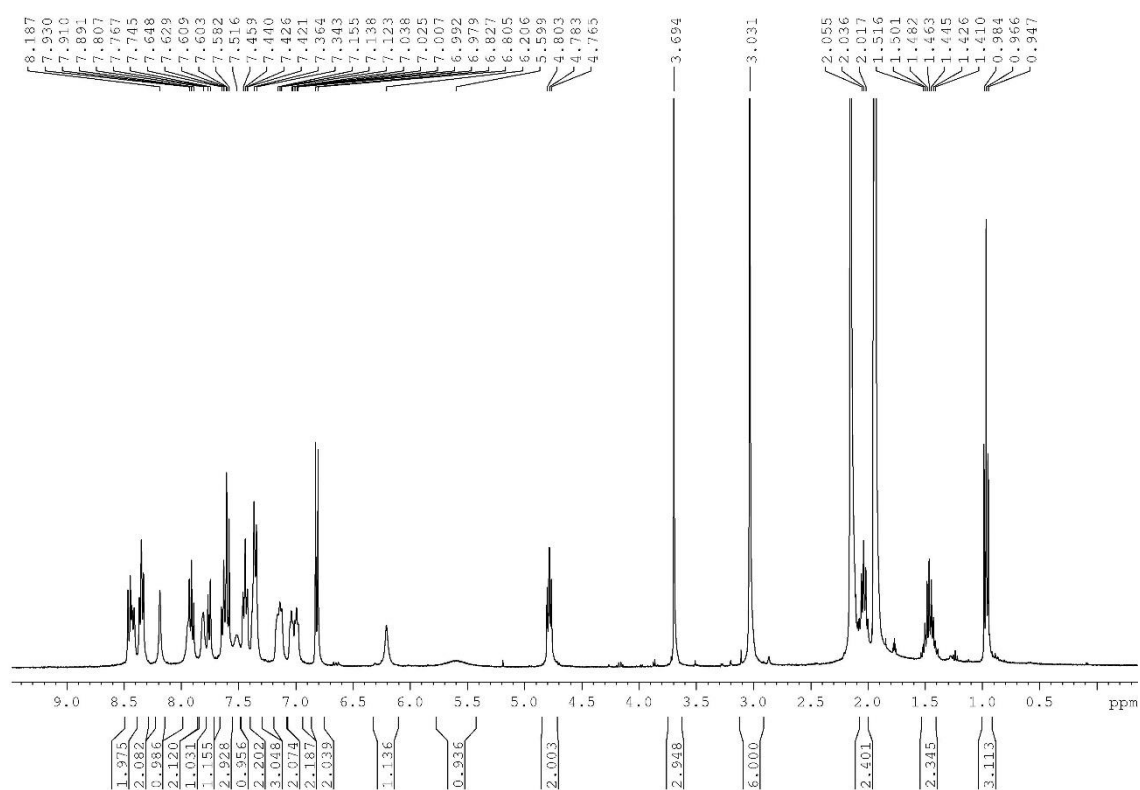


Figura A2.11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 17 en CD_3CN .

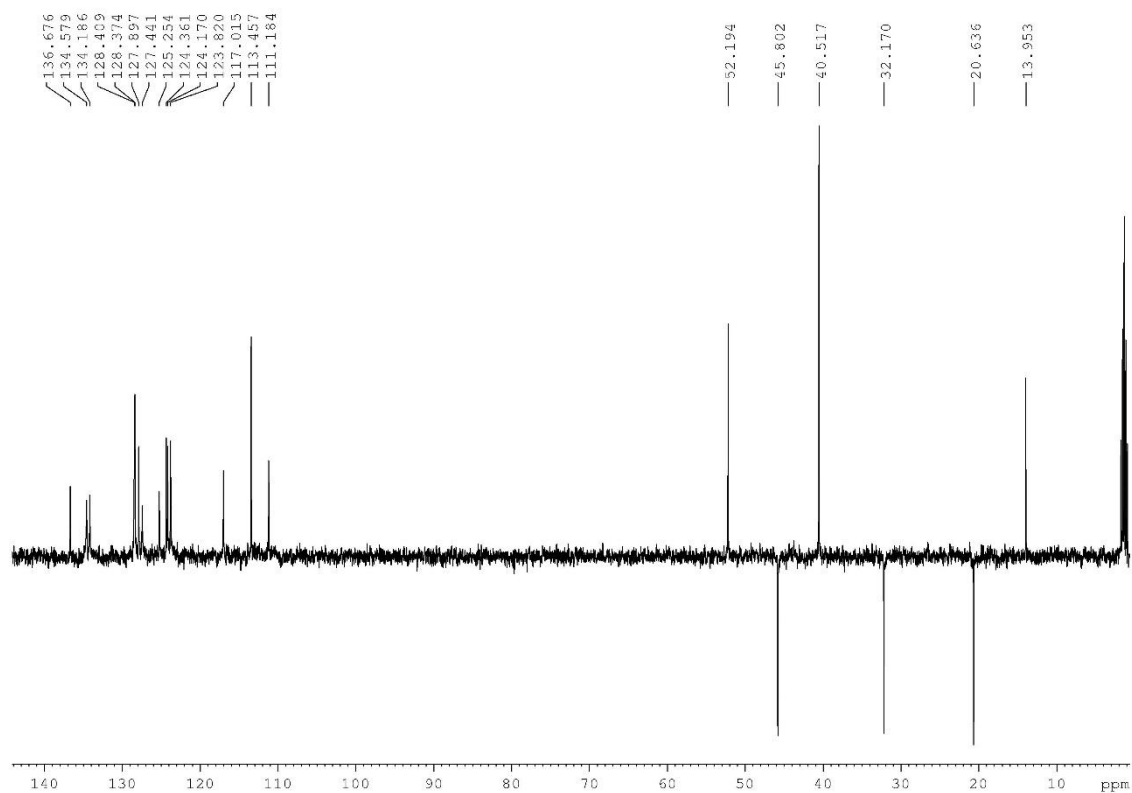


Figura A2.12. Espectro de DEPT-135 del compuesto 17 en CD_3CN .

1.7. Compuesto 18

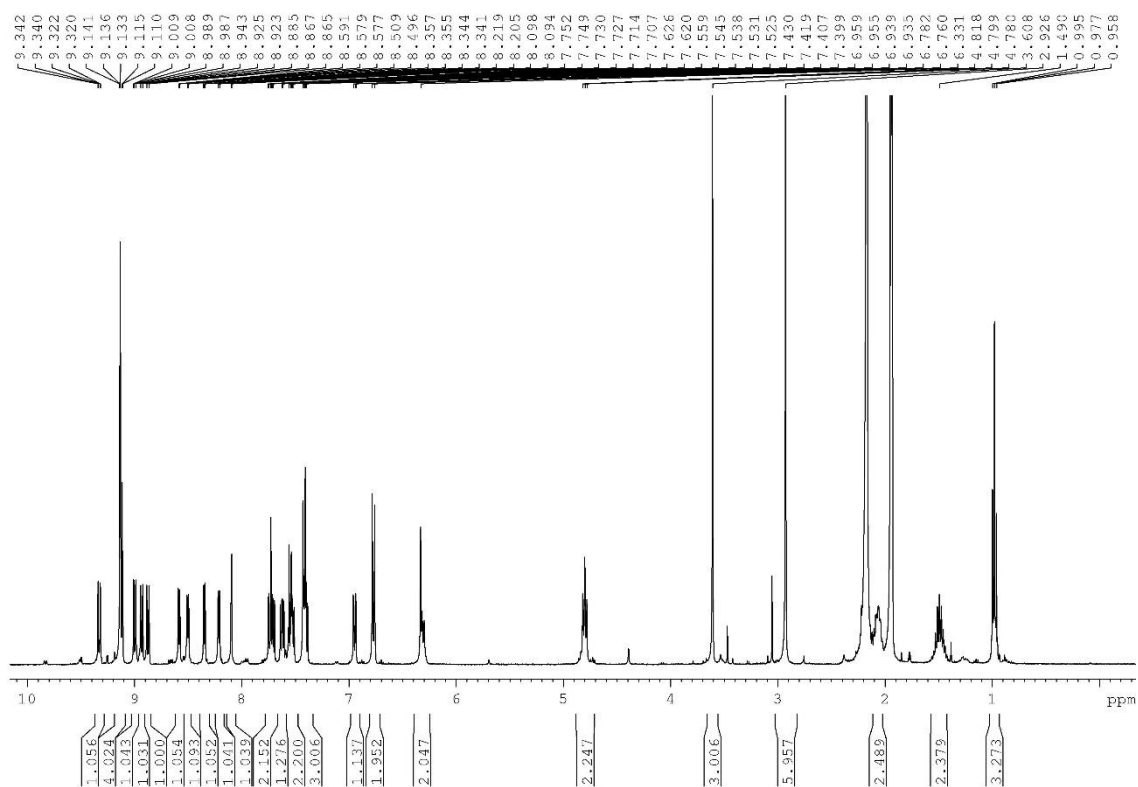


Figura A2.13. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 18 en CD_3CN .

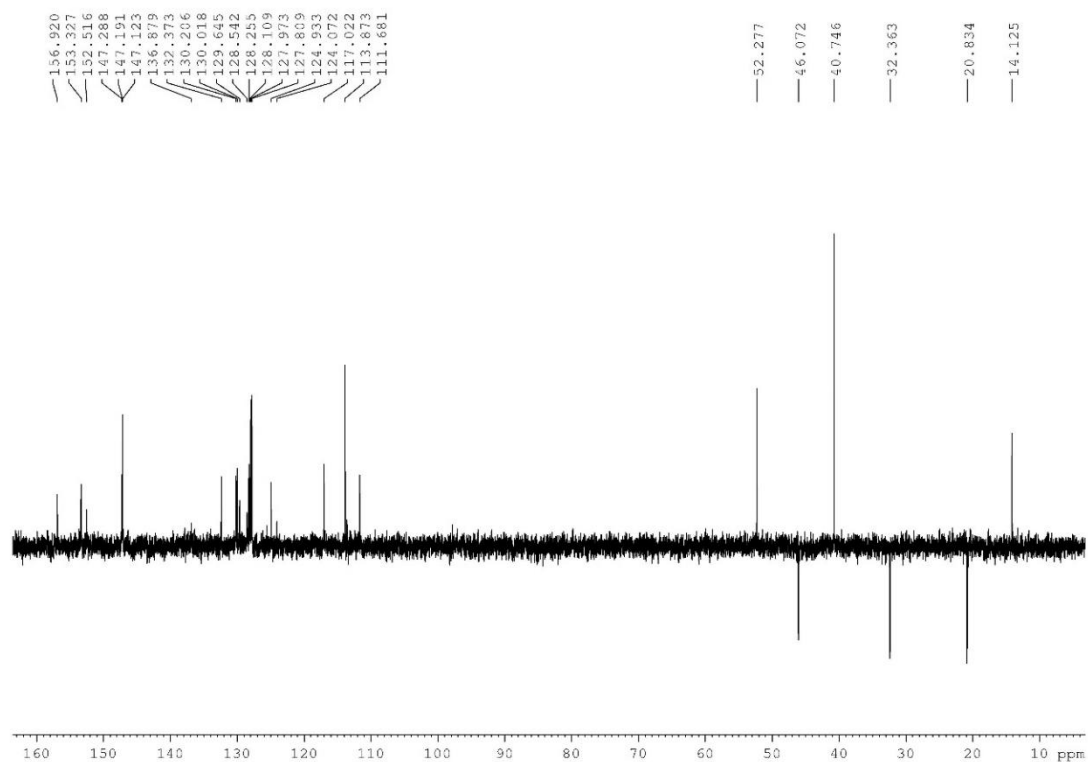


Figura A2.14. Espectro de DEPT-135 del compuesto 18 en CD_3CN .

1.8. Compuesto 19

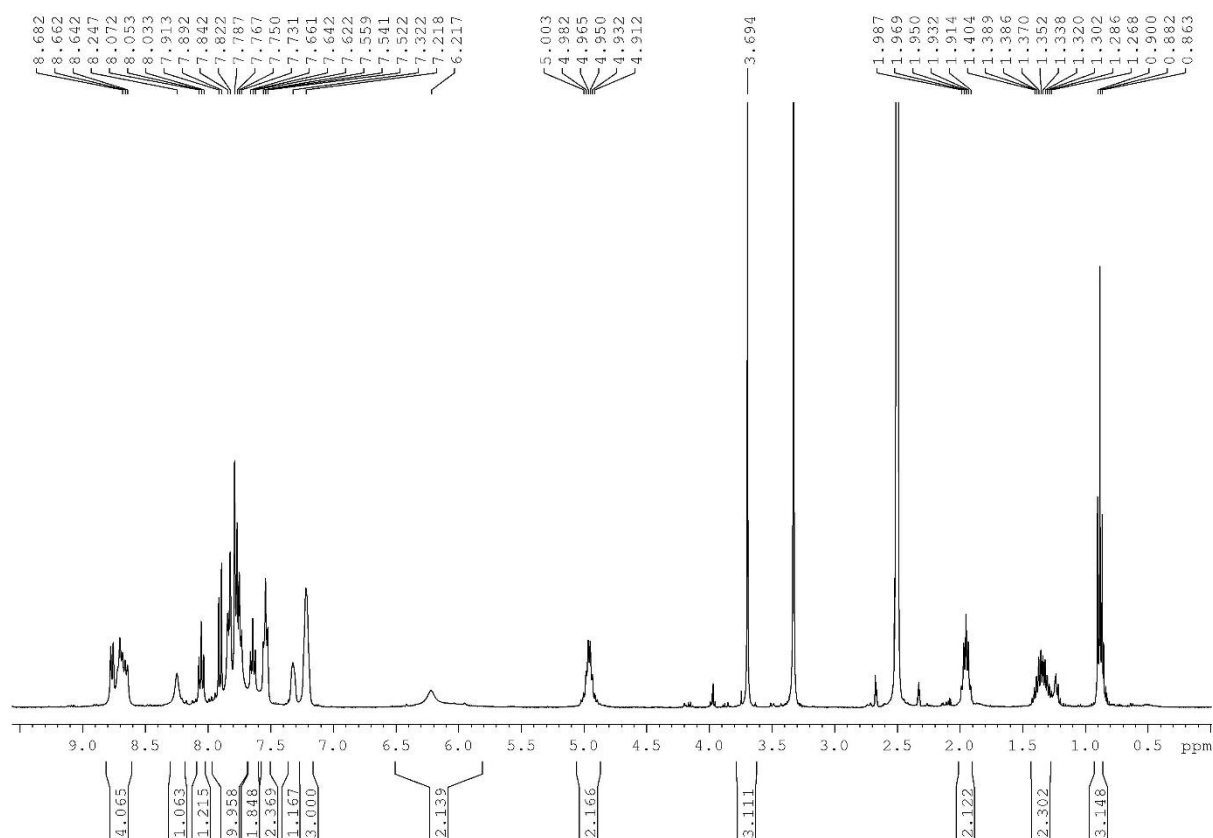


Figura A2.15. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **19** en $\text{DMSO}-d_6$.

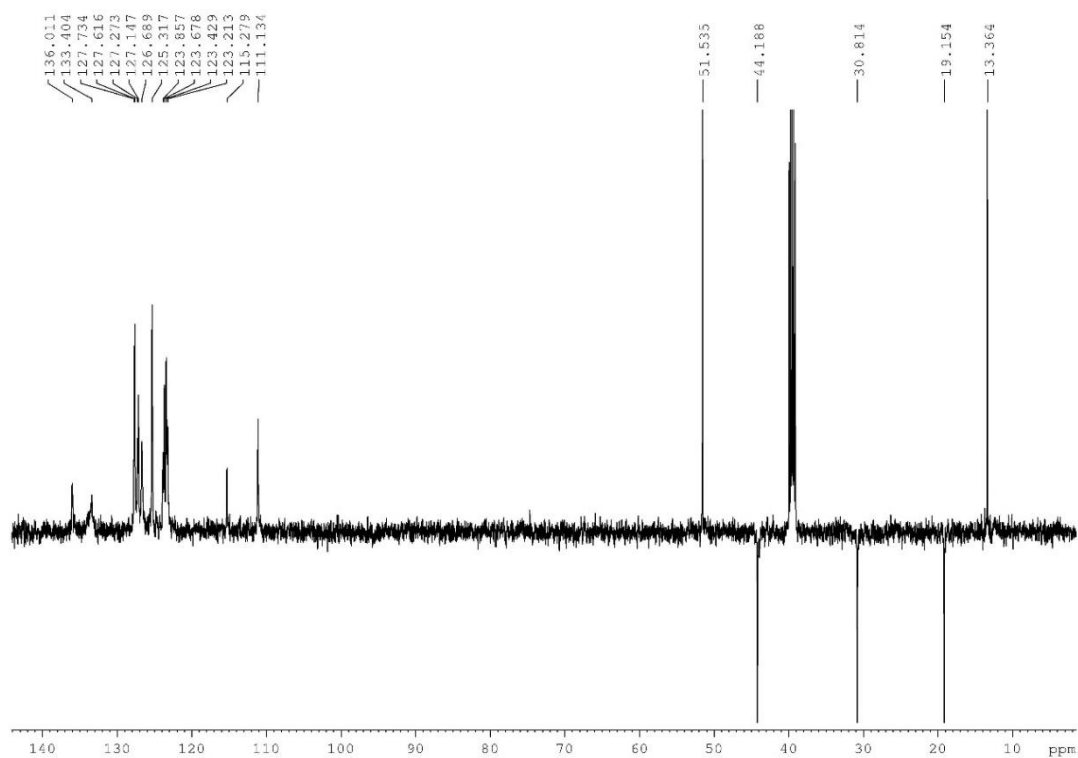
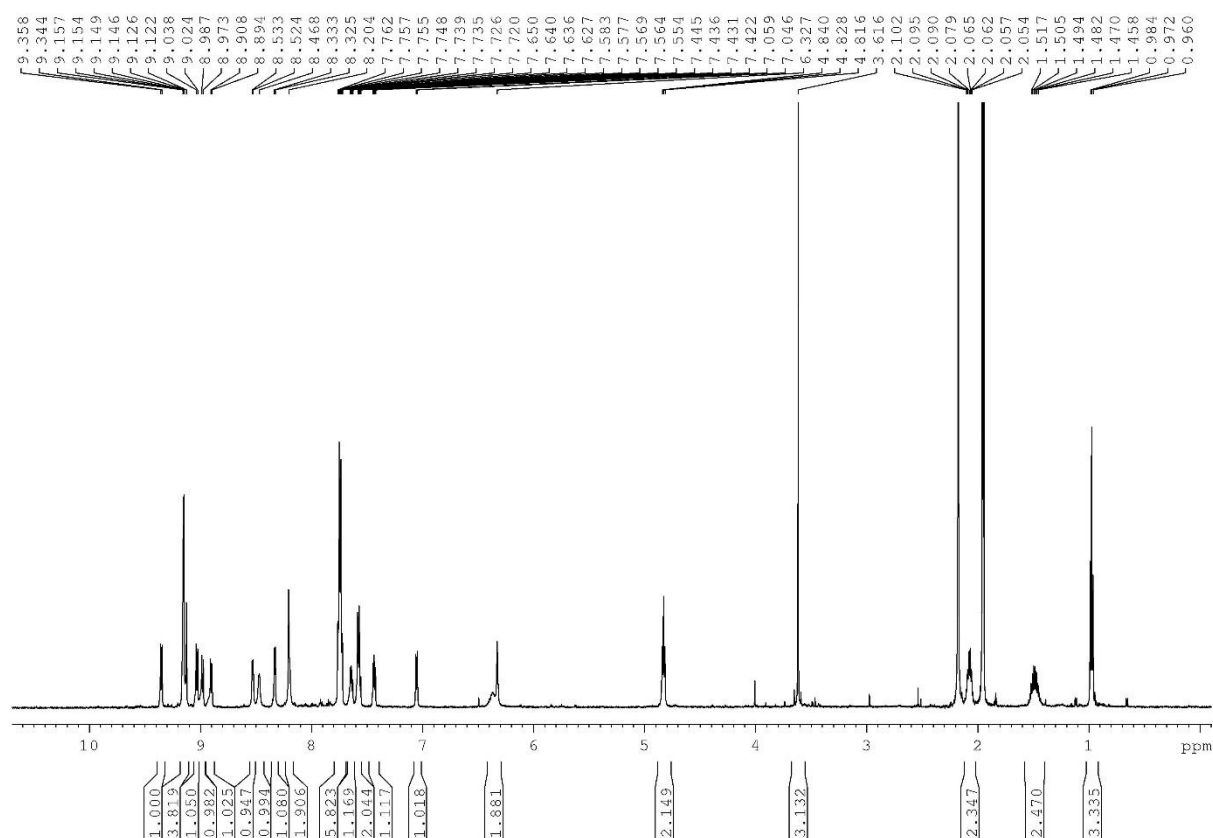
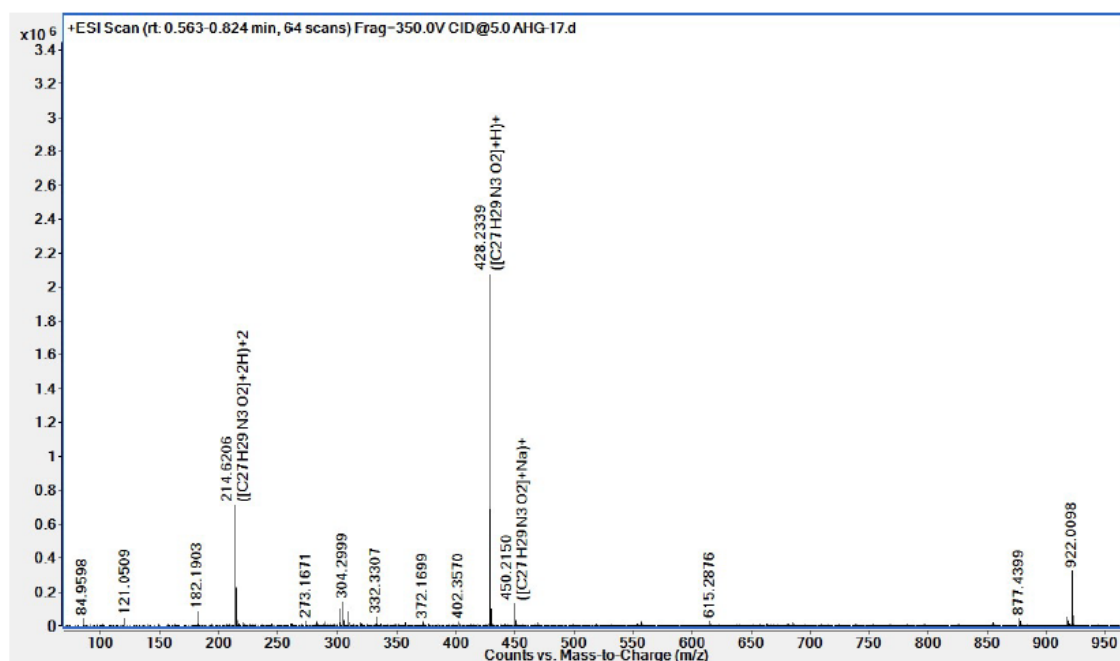


Figura A2.16. Espectro de DEPT-135 del compuesto **19** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.9. Compuesto 20

Figura A2.17. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **20** en CD_3CN .

2. Espectrometría de masas (HR-MS)



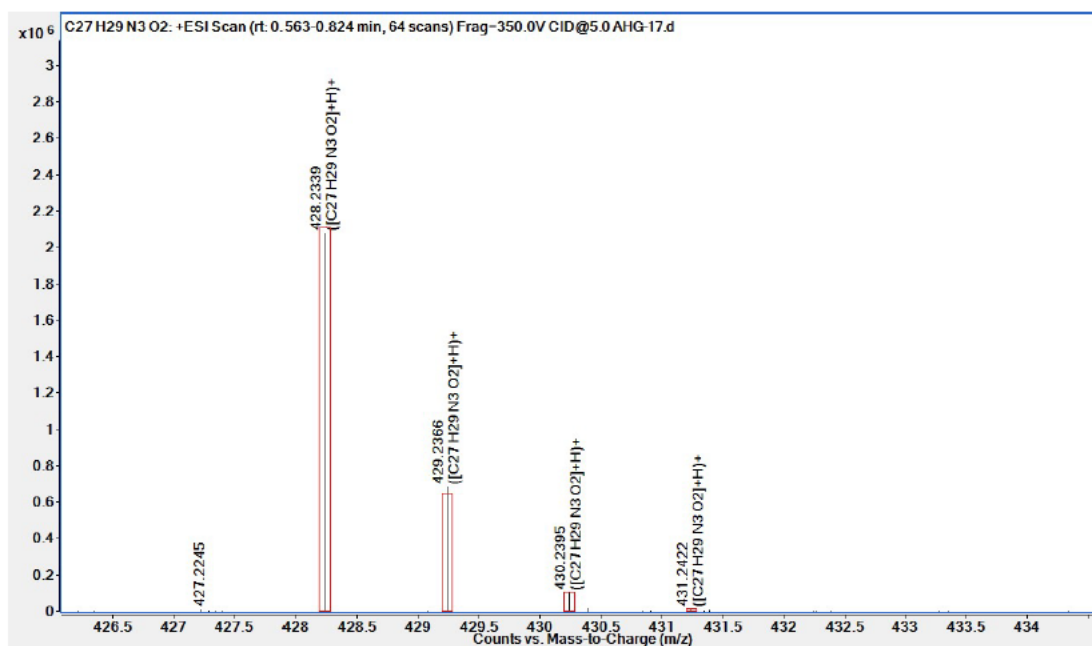
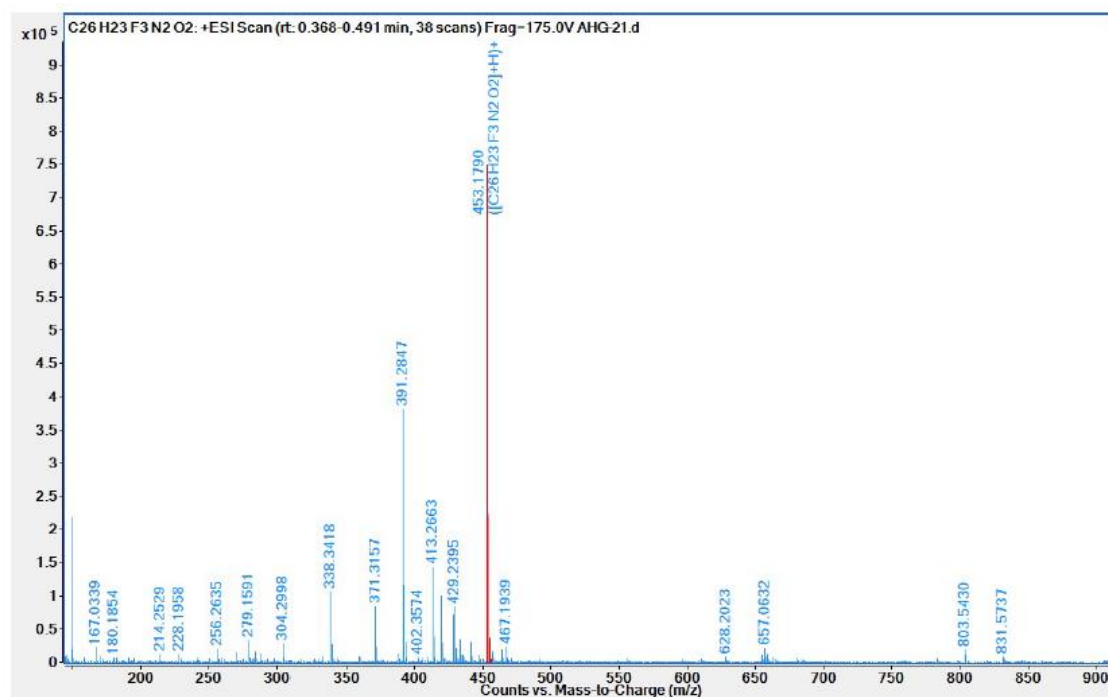


Figura A2.18. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto 13.



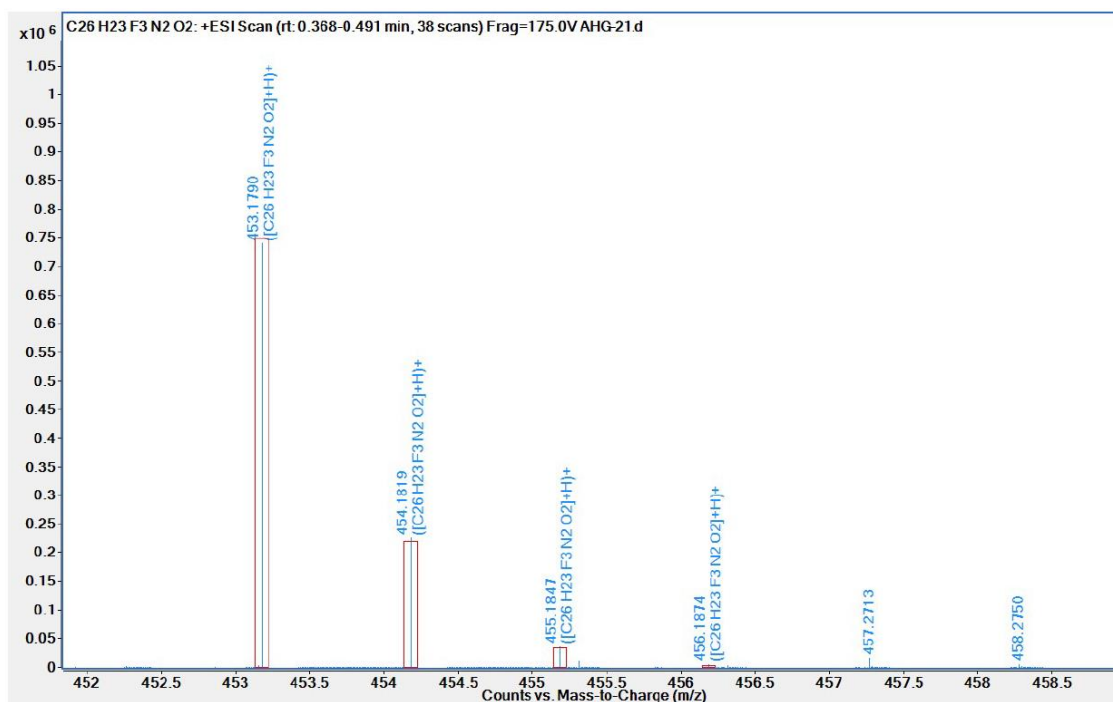
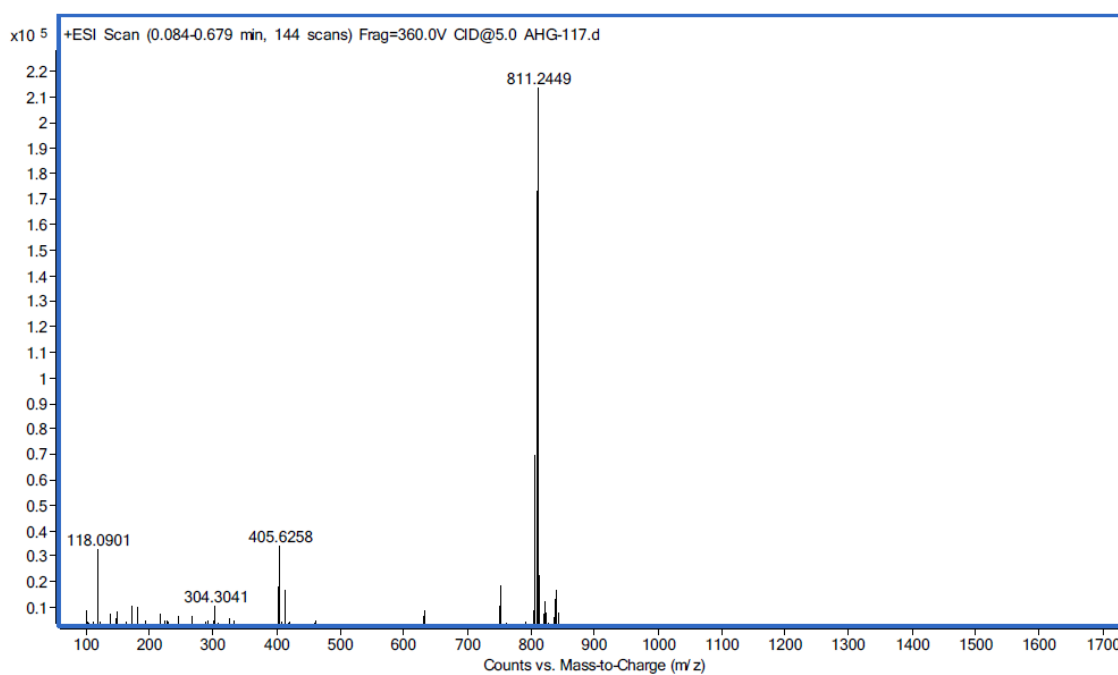


Figura A2.19. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto 14.



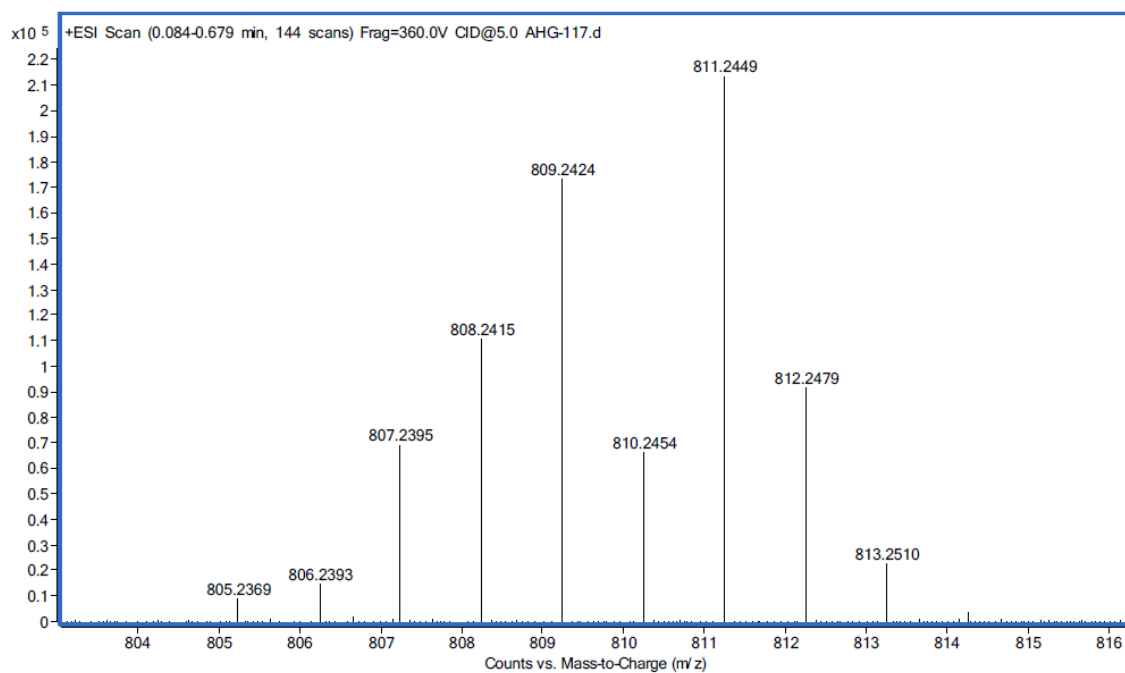
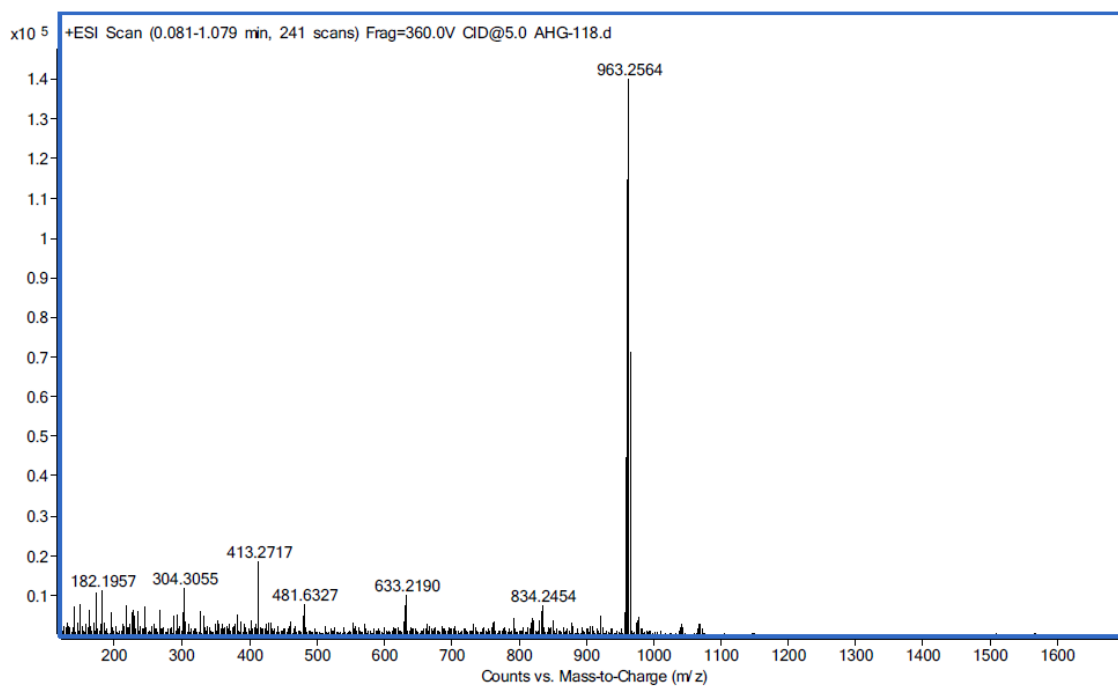


Figura A2.20. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto 15.



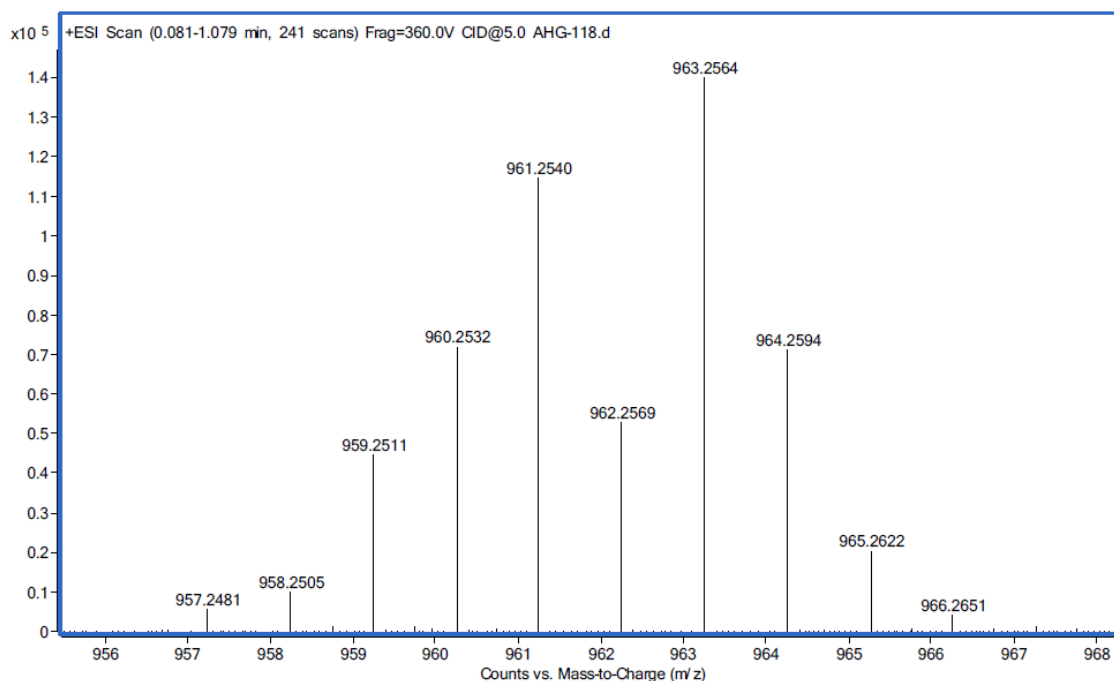


Figura A2.21. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **16**

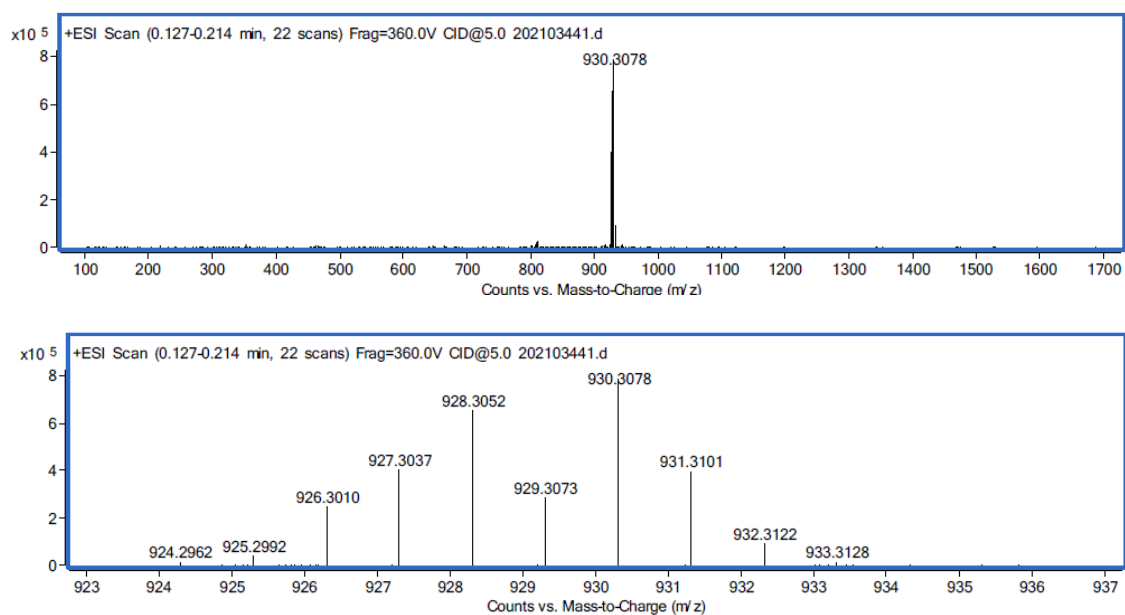


Figura A2.22. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **17**.

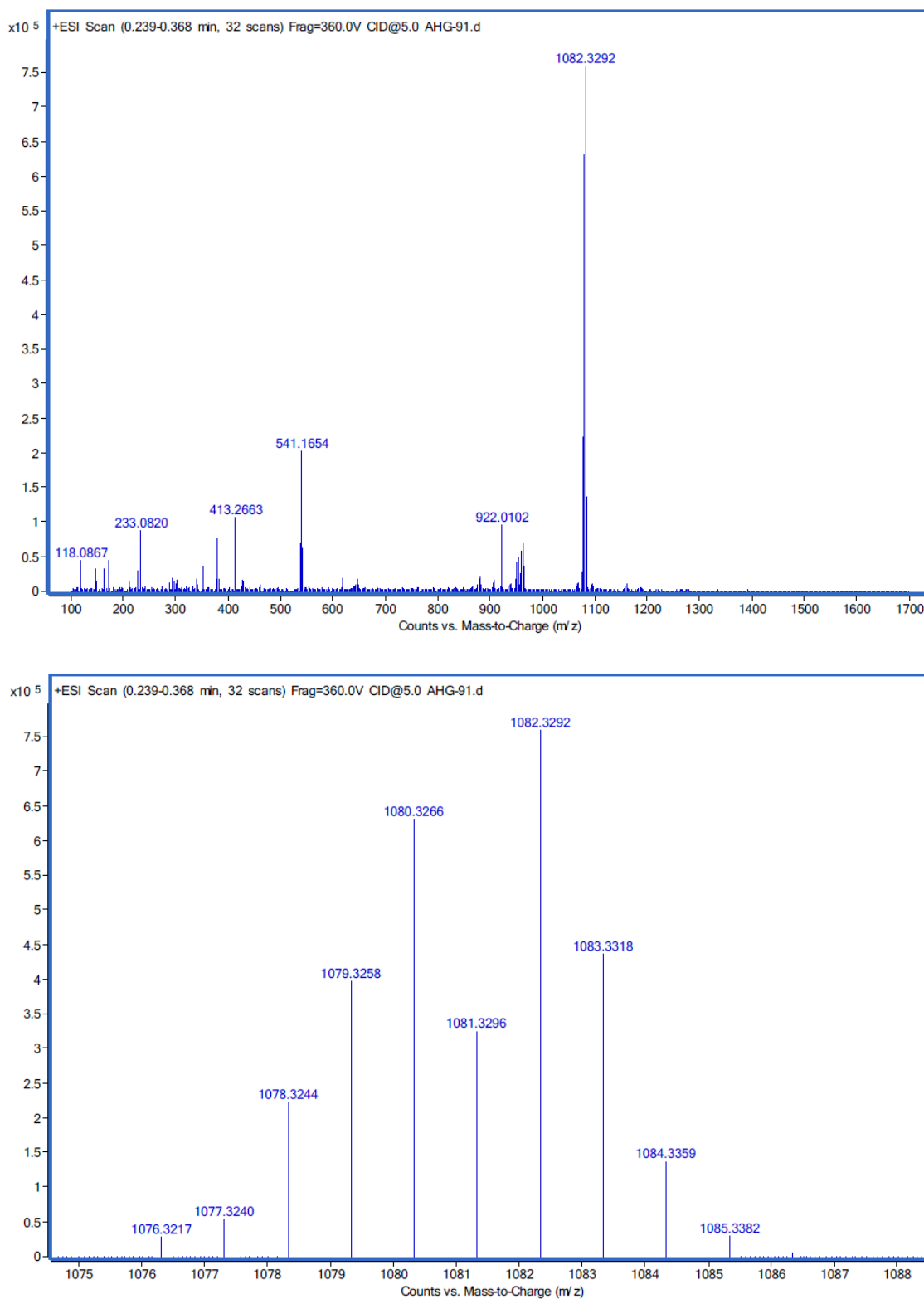


Figura A2.23. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **18**.

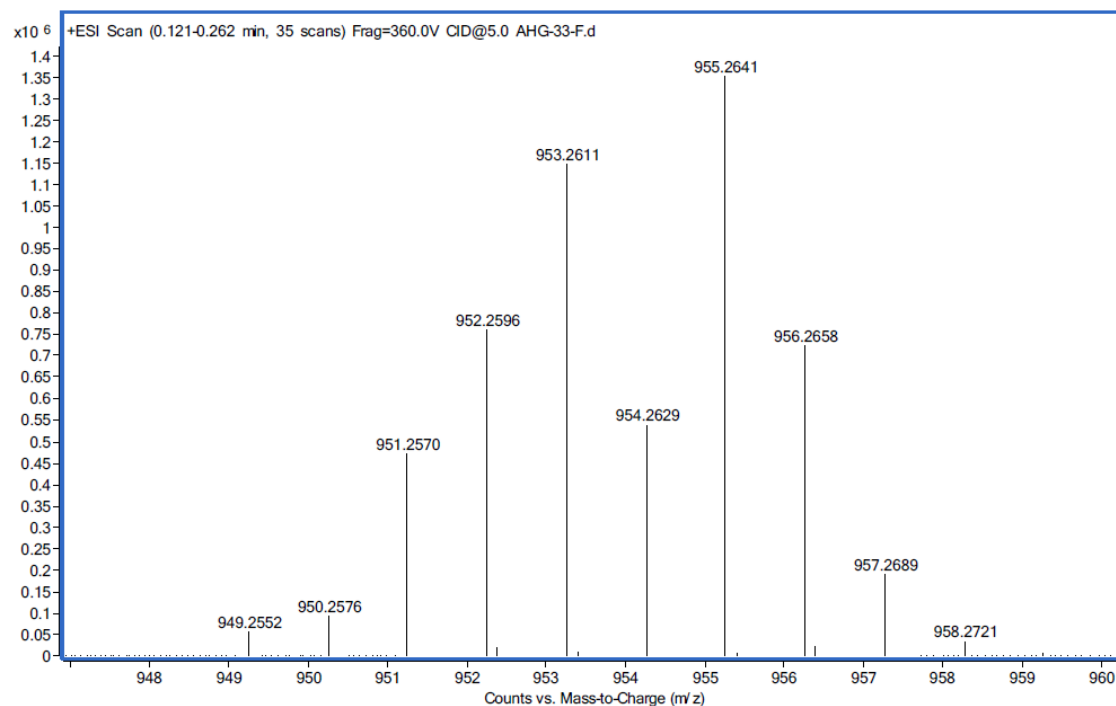
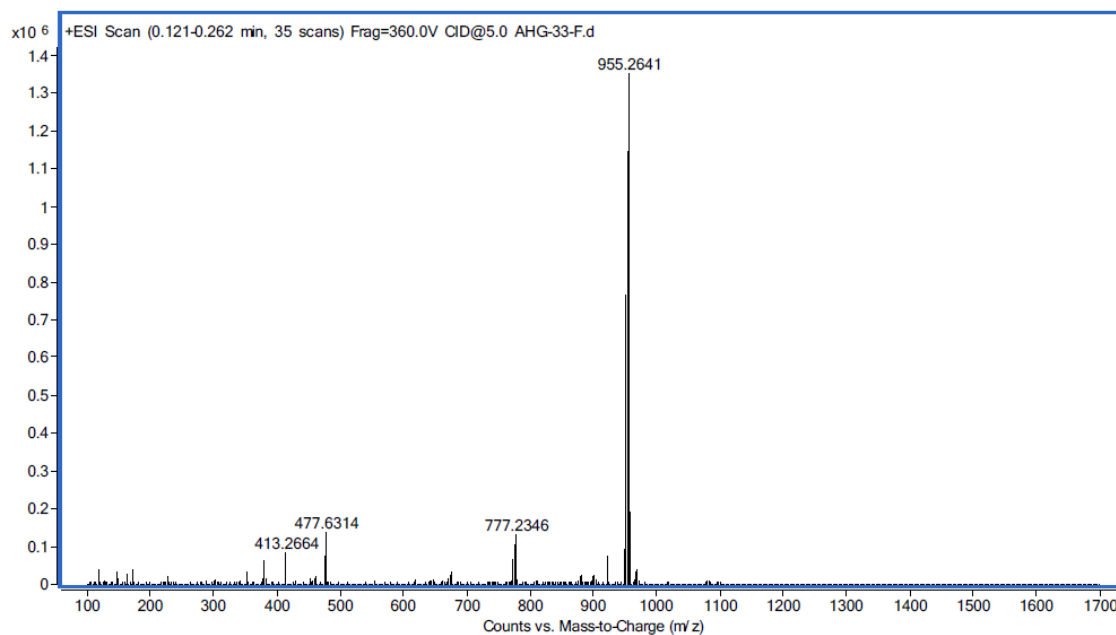


Figura A2.24. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **19**.

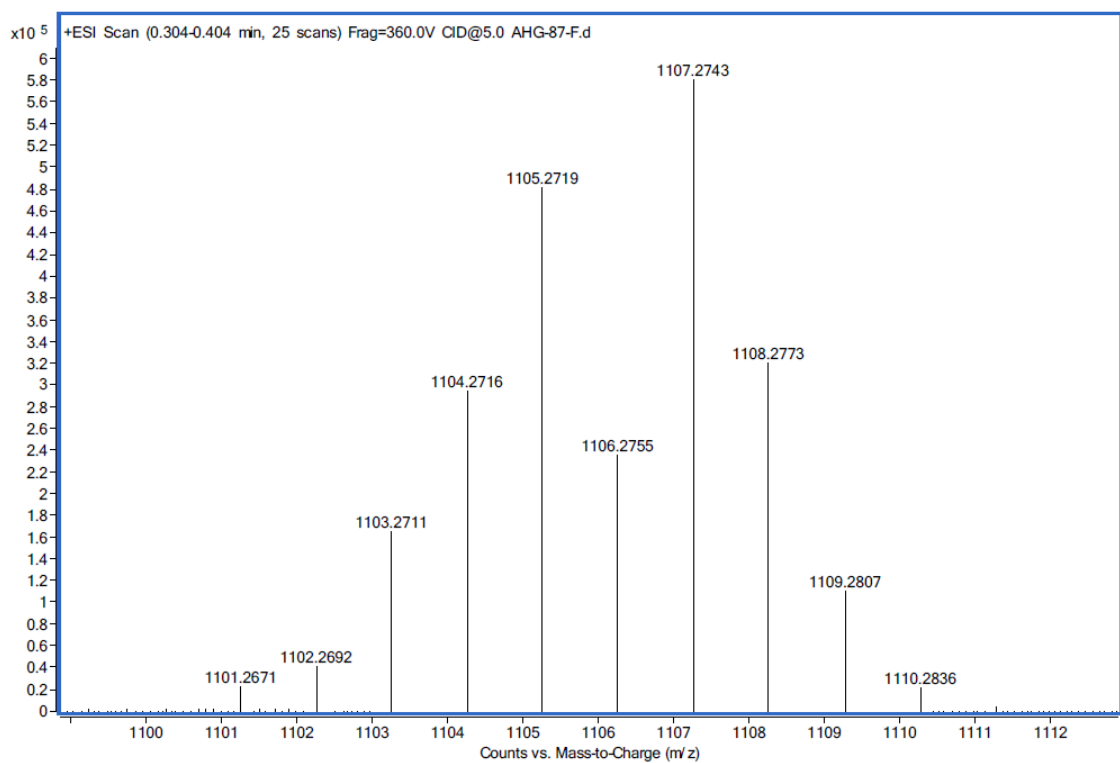
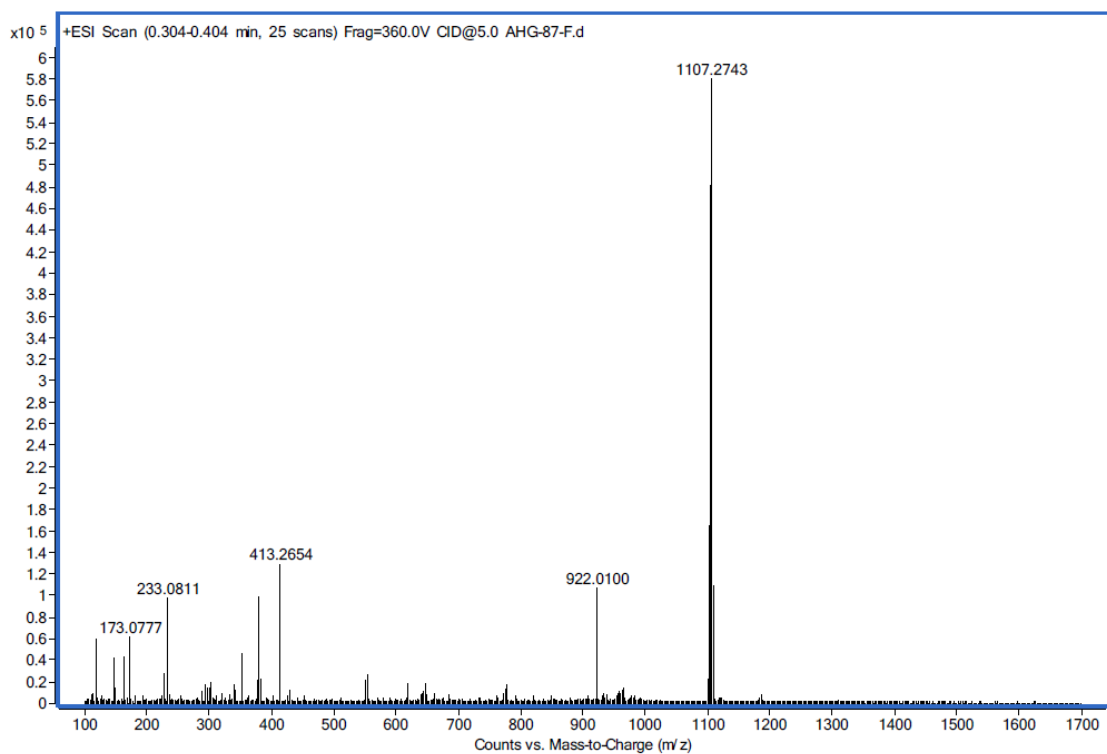


Figura A2.25. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **20**.

3. Determinación de la estructura cristalina por rayos X

El número de referencia CCDC para el compuesto **17** es 2226215.

Tabla A2.1. Datos cristalográficos del compuesto **17**.

Fórmula empírica	C ₄₈ H ₄₄ F ₃ N ₇ O ₅ OsS	
Peso molecular	1078,16	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	a = 13,5749(5) Å	α = 84,3400(10)°
	b = 14,0139(5) Å	β = 72,0520(10)°
	c = 16,0407(6) Å	γ = 62,2910(10)°
Volumen	2566,51(16) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1,395 Mg/m ³	
Coeficiente de absorción	2,584 mm ⁻¹	
F(000)	1080	
Tamaño del cristal	0,120 x 0,080 x 0,020 mm ³	
Rango theta para la recogida de datos	1,877 a 27,103°	
Rangos de índices	-17 ≤ h ≤ 17, -17 ≤ k ≤ 17, -20 ≤ l ≤ 20	
Reflexiones recogidas	103395	
Reflexiones independientes	11300 [R(int) = 0,0301]	
Integridad de Theta = 25,242°	99,9 %	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa F ²	
Datos / restricciones / parámetros	11300 / 0 / 590	
Buen ajuste de F²	1,119	
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0205, wR2 = 0,0521	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0231, wR2 = 0,0540	
Mayor diferencia pico-hueco	1,294 y -0,798 eÅ ⁻³	

4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

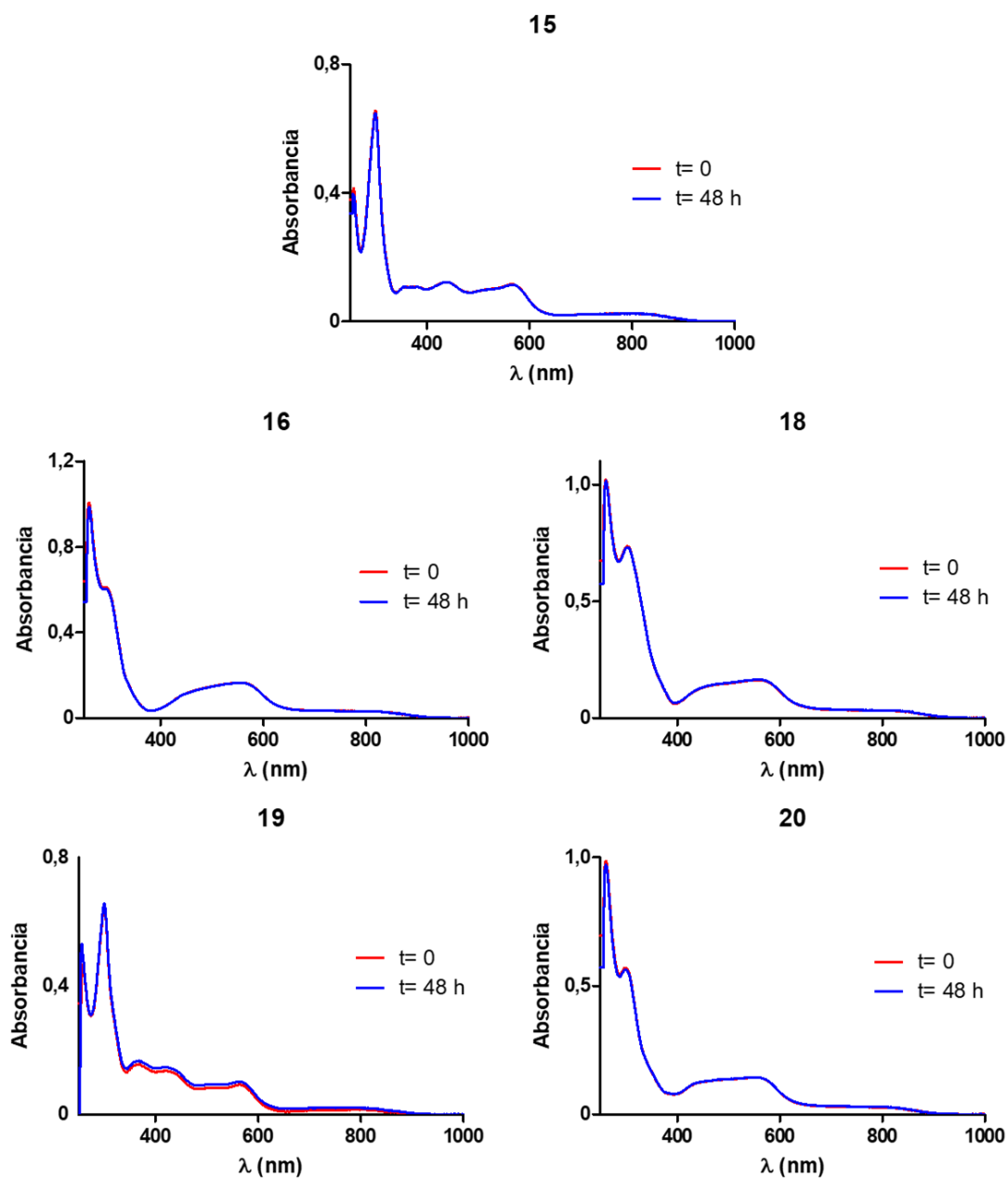


Figura A2.26. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **15-20** (10 μ M) en DMSO a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

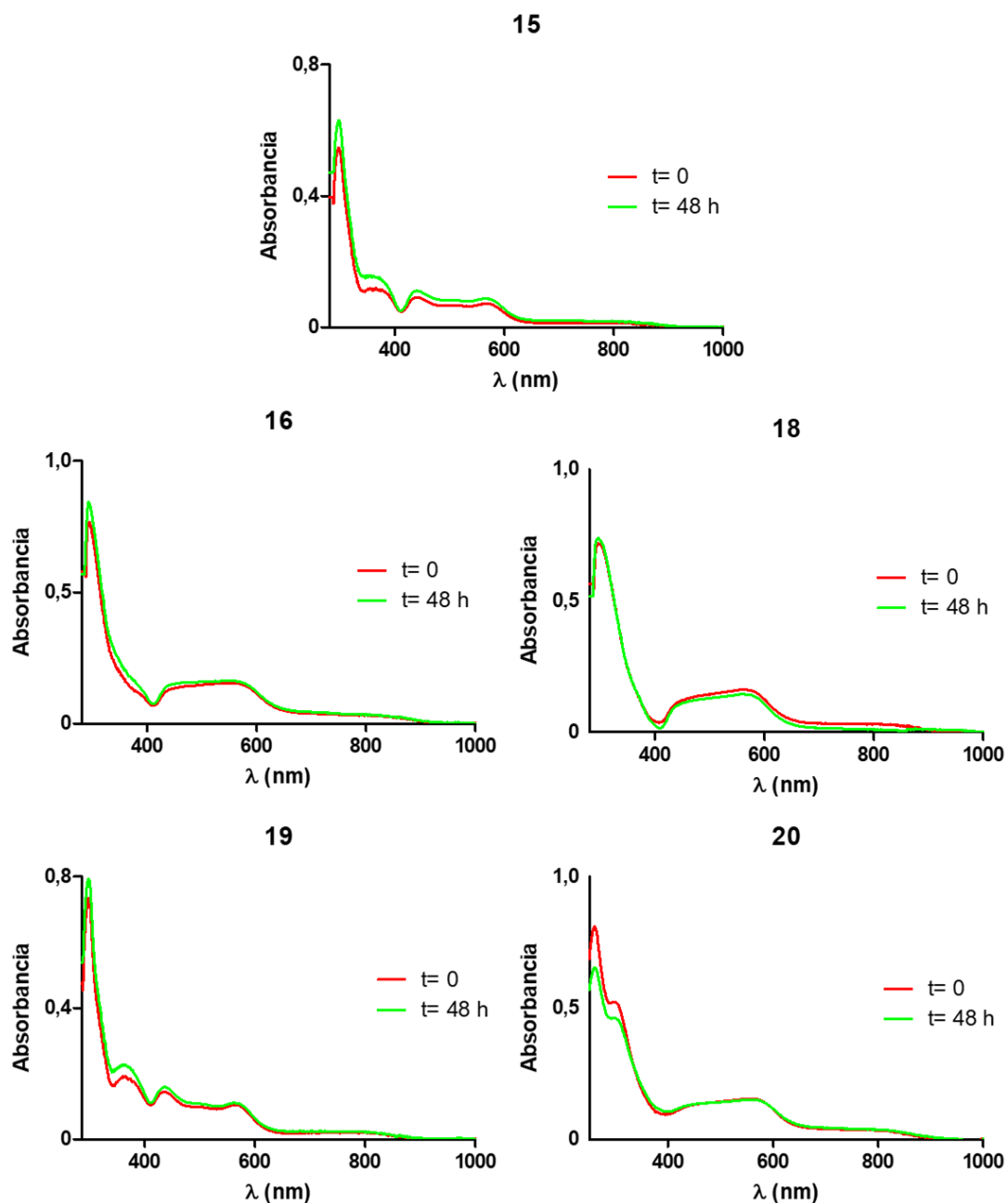


Figura A2.27. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **15-20** (10 μ M) en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10% de FBS a $t=0$ y tras 48 h de incubación a 37 °C.

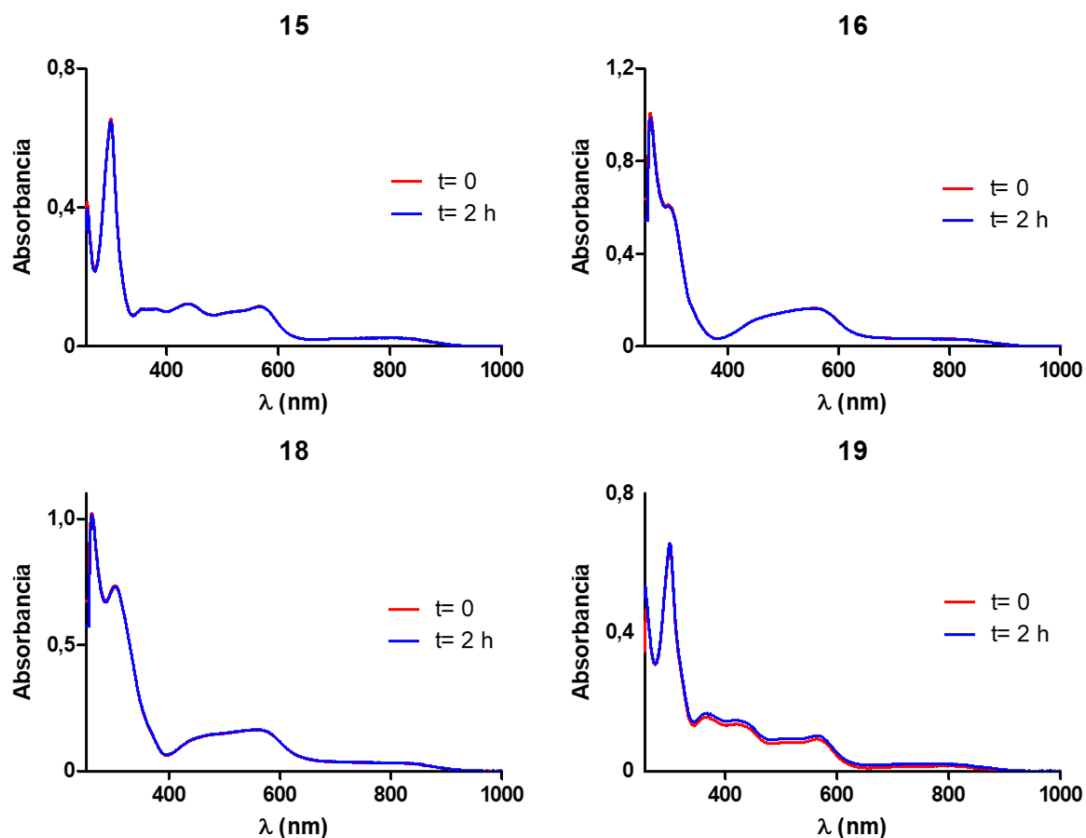


Figura A2.28. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **15-20** ($10 \mu\text{M}$) en DMSO a $t=0$ y tras 2 h de irradiación con luz verde ($520, 2,0 \text{ mW/cm}^2$).

5. Interacción con la seroalbúmina

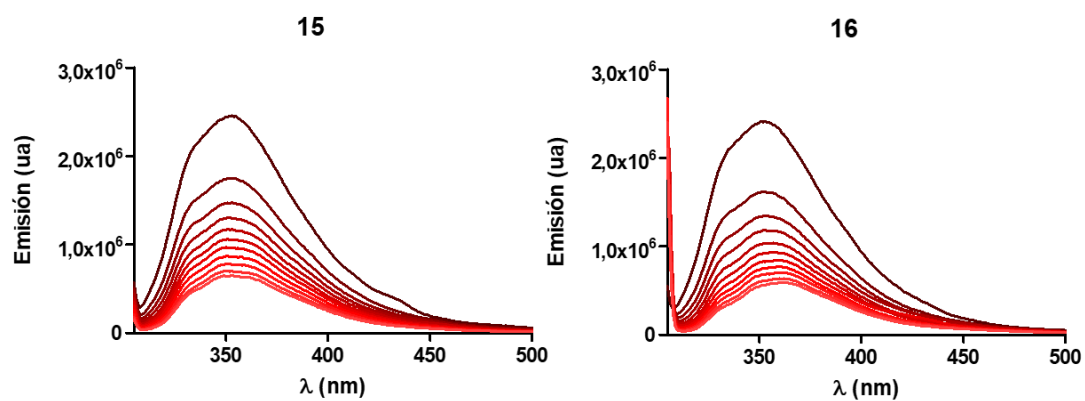


Figura A2.29. Espectro de emisión de la HSA ($2,5 \mu\text{M}$) en presencia de cantidades crecientes de los complejos **17-20** ($0-25 \mu\text{M}$). El aumento de la concentración se produce de arriba abajo.

6. Propiedades biológicas

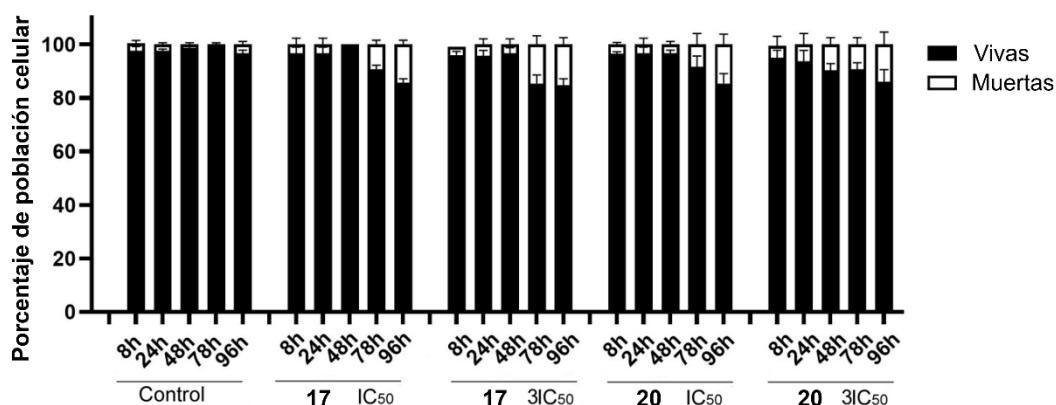


Figura A2.30. Porcentaje de células MDA-MB-231 vivas (negras) y muertas (blancas) de la población celular total evaluada mediante la tinción con azul tripán.

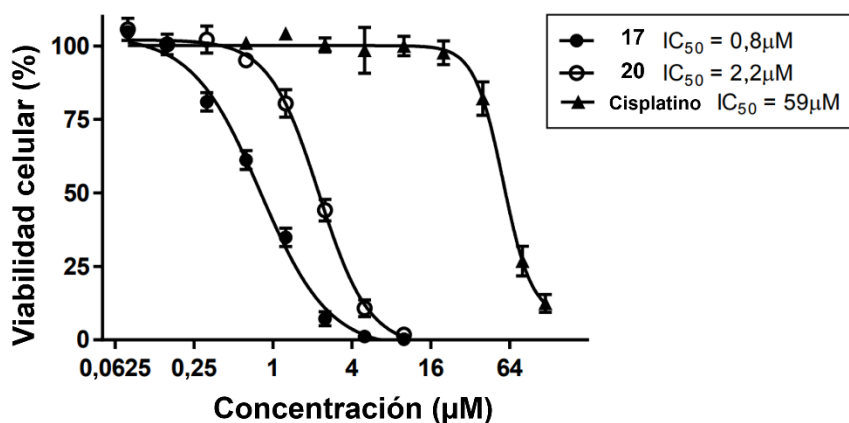


Figura A2.31. Curvas sigmoidales de supervivencia celular determinadas mediante el reactivo CellTiter-Glo 3D. Se trataron esferoides de cuatro días de edad con los compuestos investigados **17**, **20** o cisplatino durante 72 h. A continuación, los esferoides tratados se transfirieron a una placa de cultivo negra y se añadió el reactivo CellTiter-Glo 3D. Tras 30 min de incubación se midió la señal de luminiscencia con el lector Tecan SPARK. La viabilidad celular se normalizó frente al control tratado con vehículo.

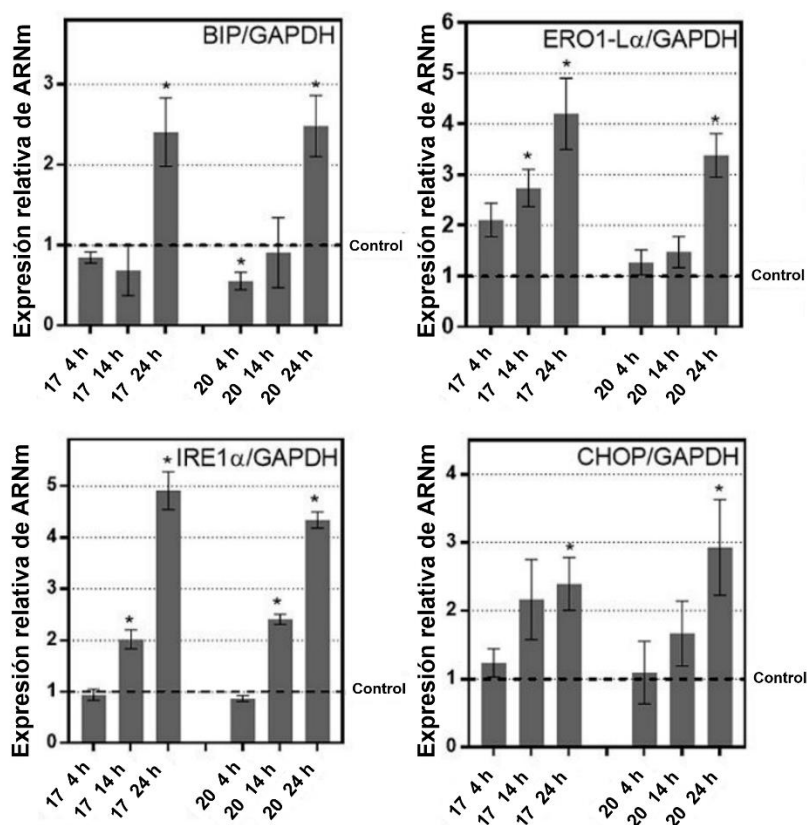


Figura A2.32. qRT-PCR de los marcadores de estrés de RE en células MDA MB-231 tratadas con los complejos de Os(II) investigados. Las células se trataron durante 4, 14 o 24 h a la concentración correspondiente a $3 \times IC_{50}$, 72h. La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El gen GAPDH se utilizó como control de referencia endógeno, y las muestras aisladas de las células no tratadas se utilizaron como calibradores arbitrarios. Los datos se sometieron a un análisis estadístico mediante la prueba t de Student, y las estrellas indican una diferencia significativa ($p \leq 0,01$) con respecto a las muestras de control no tratadas (línea discontinua).

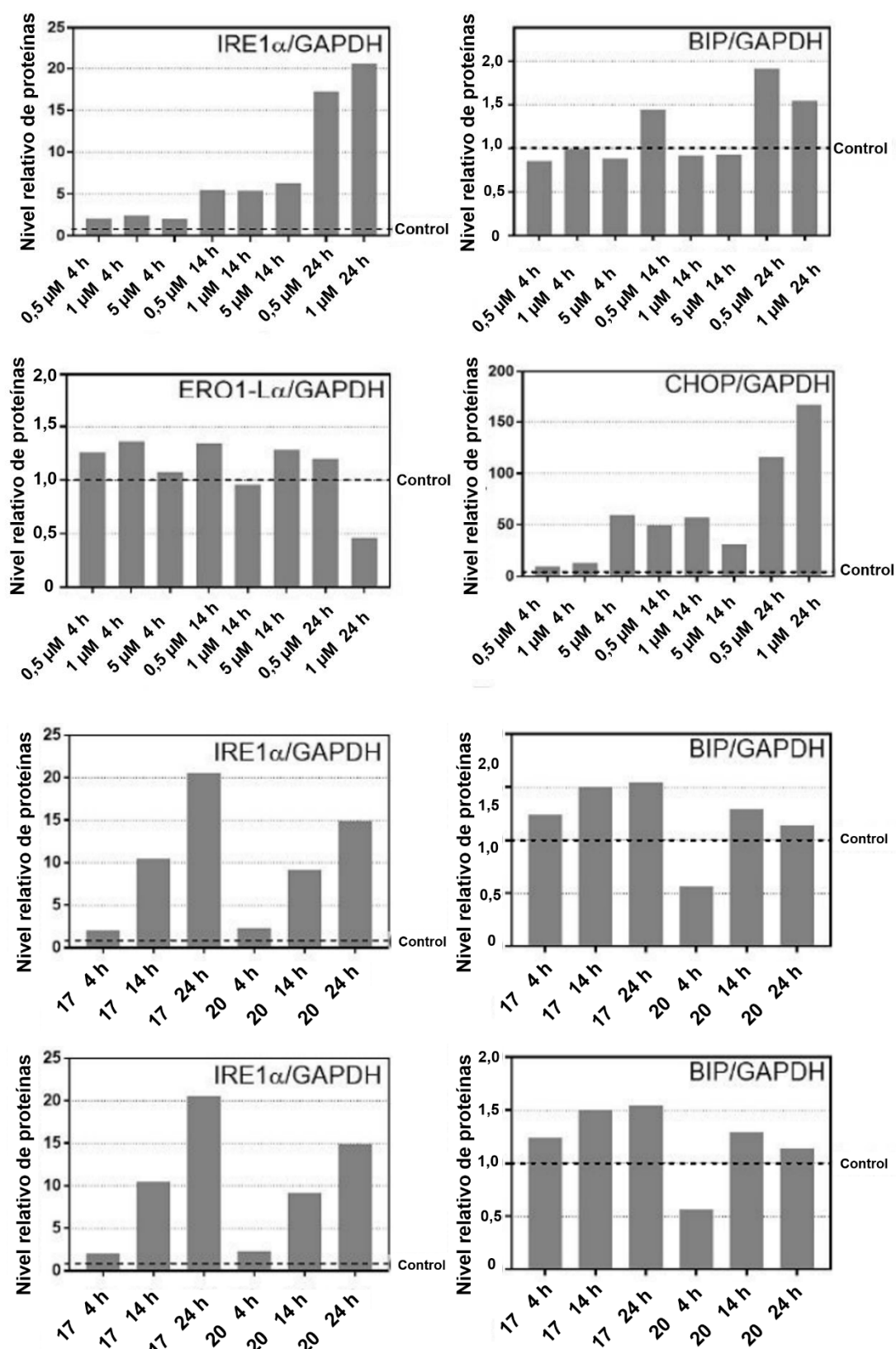


Figura A2.33. Evaluación cuantitativa de los datos de Western blotting: expresión relativa de los marcadores de estrés de RE normalizada con respecto a GAPDH. Paneles superiores: Las células MDA-MB-231 se trataron con el complejo **17** durante el tiempo indicado y a las concentraciones indicadas. Paneles inferiores: Las células MDA-MB-231 se trataron con **17** y **20** a sus concentraciones equitoxicas correspondientes a $3 \times IC_{50,72h}$ durante el tiempo indicado. Los niveles de proteína se expresan en relación con las células de control no tratadas (línea discontinua).

Anexo III

ÍNDICE

1. Espectros de RMN	A63
1.1. Compuesto 21	A63
1.2. Compuesto 22	A67
1.3. Compuesto 23	A71
1.4. Compuesto 24	A73
2. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)	A77
3. Determinación de la estructura cristalina por rayos-X.....	A79
4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	A80
5. Interacción con la HSA.....	A85
6. Generación de oxígeno singlete	A86
7. Generación de radicales hidroxilo	A87
8. Propiedades biológicas	A87

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 21

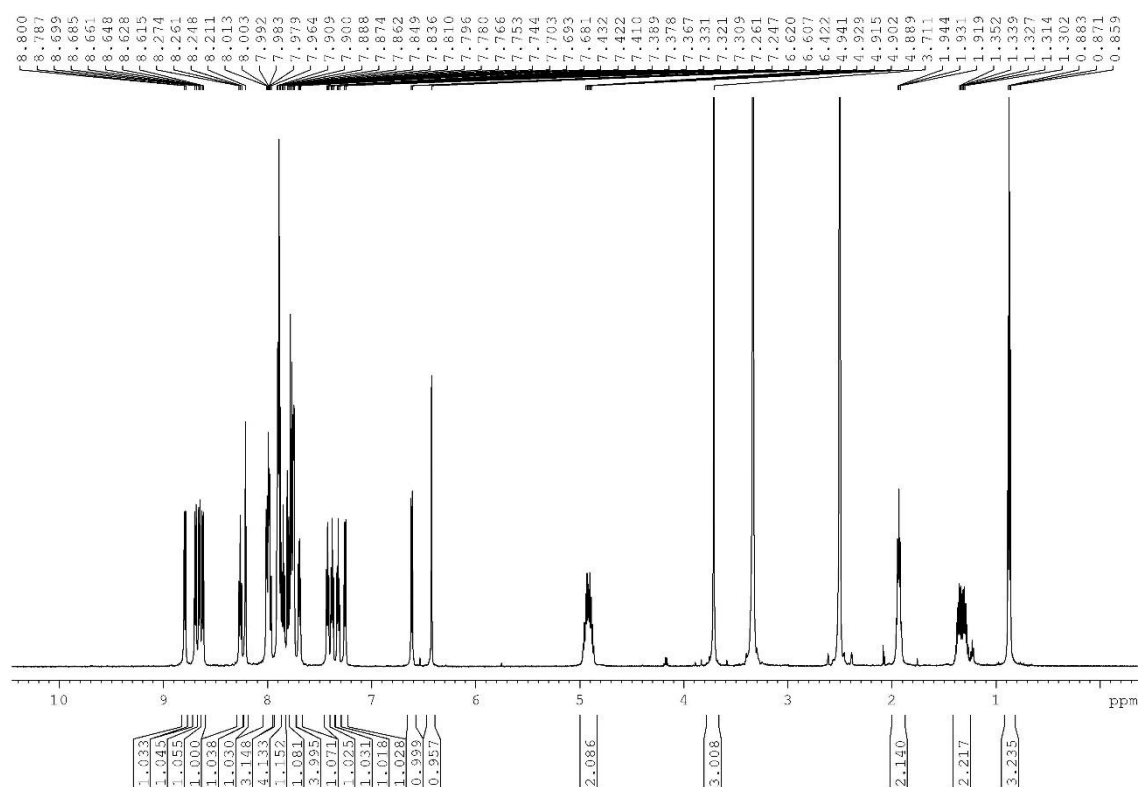


Figura A3.1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 21 en DMSO-d_6 .

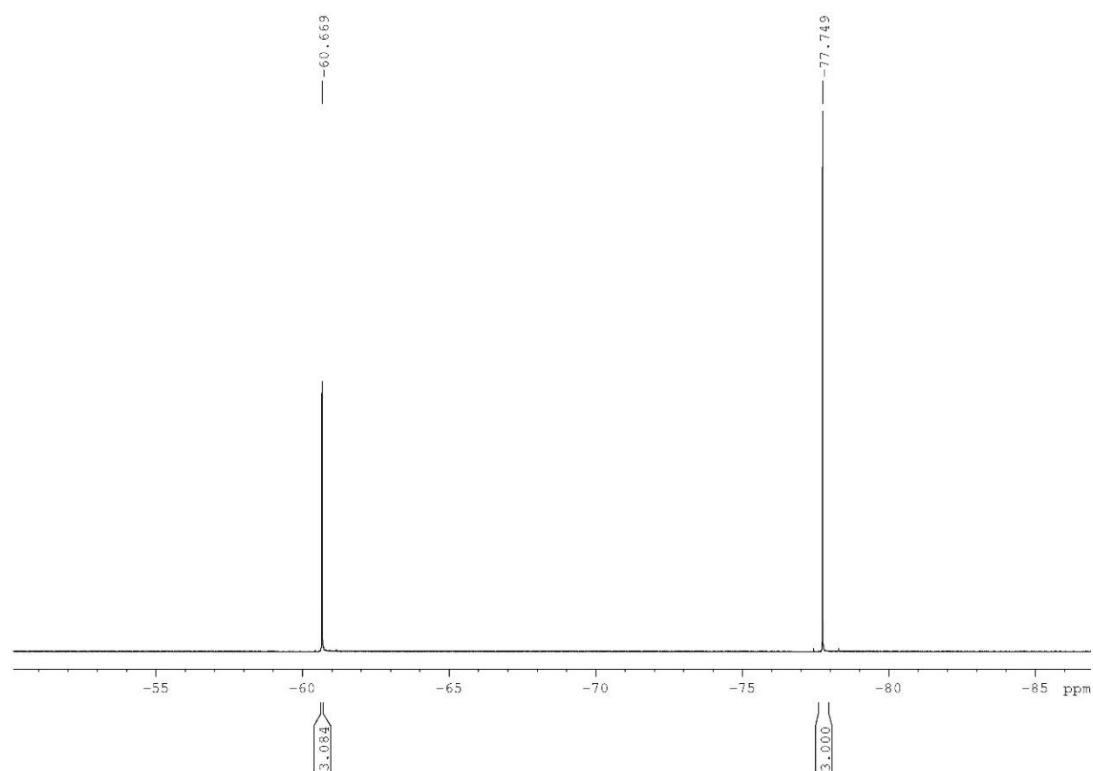


Figura A3.2. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto 21 en DMSO-d_6 .

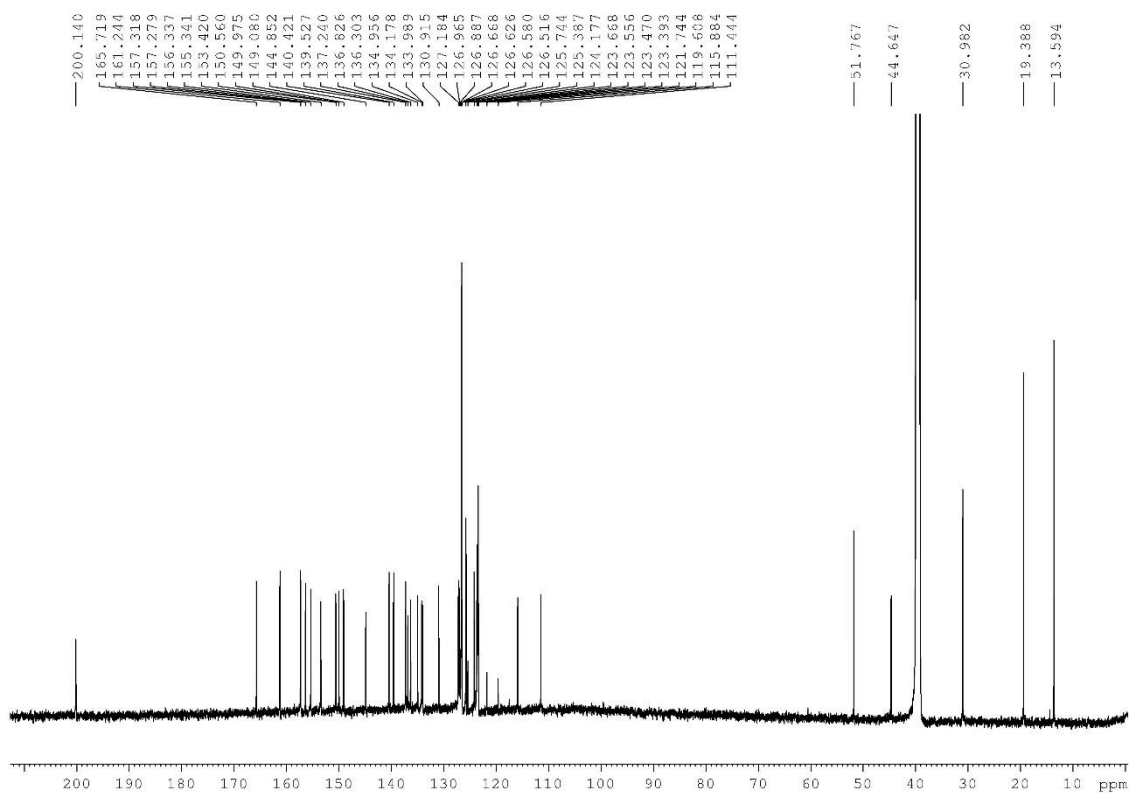


Figura A3.3. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

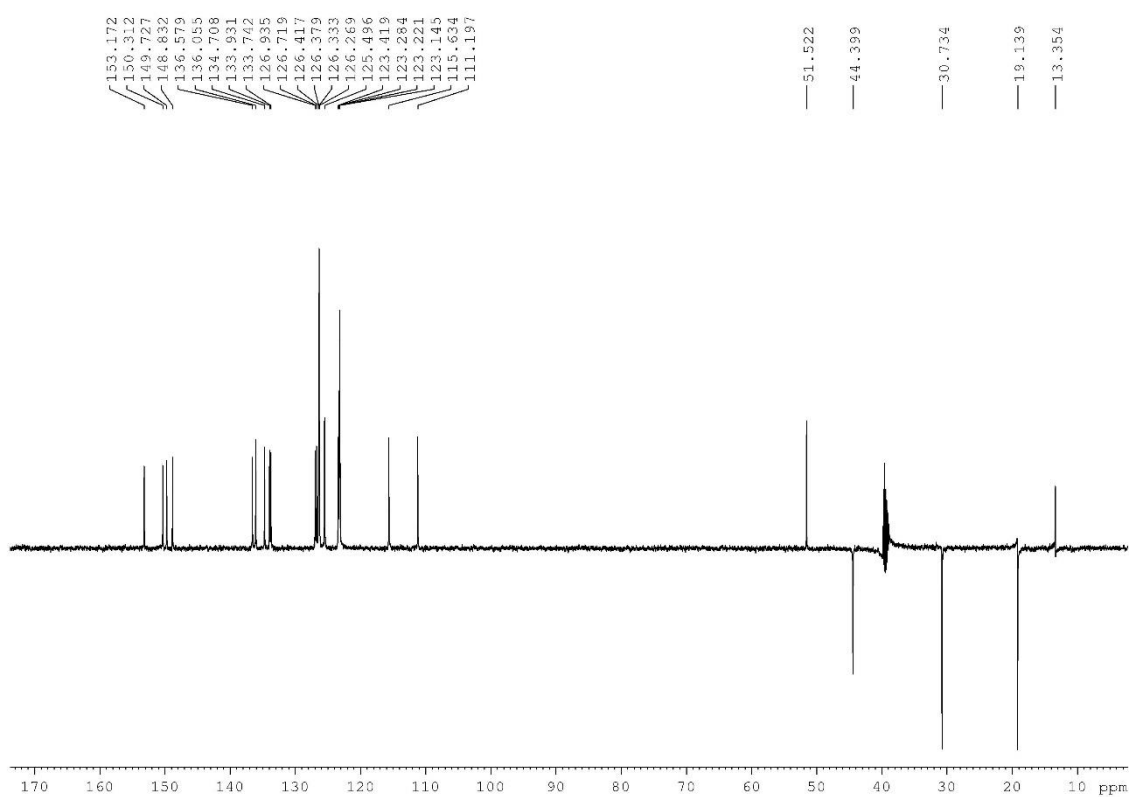


Figura A3.4. Espectro de DEPT-135 del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

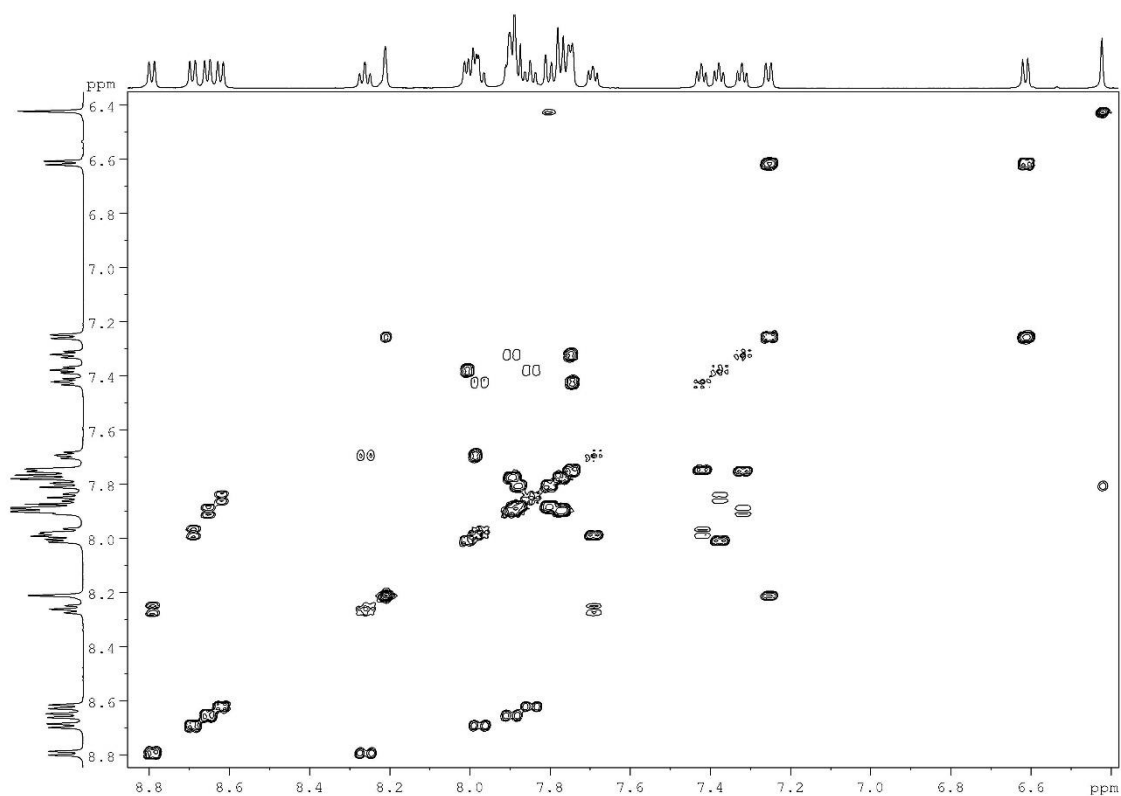


Figura A3.5. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

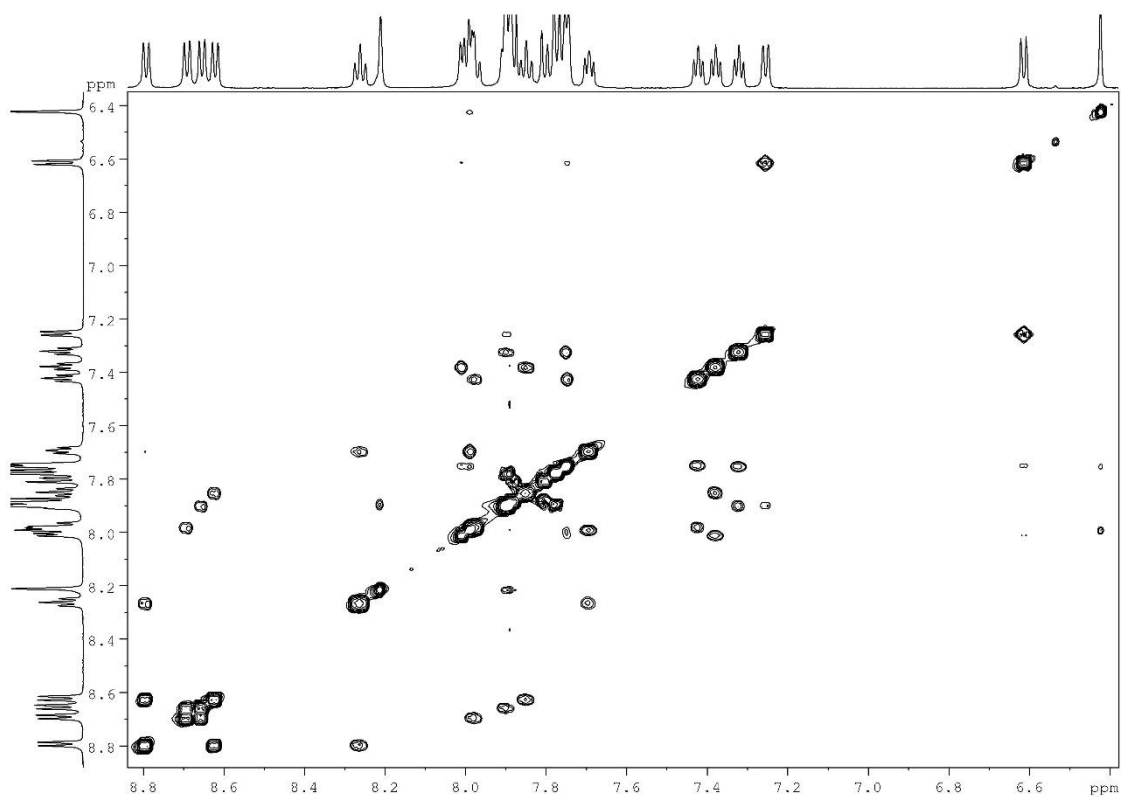


Figura A3.6. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

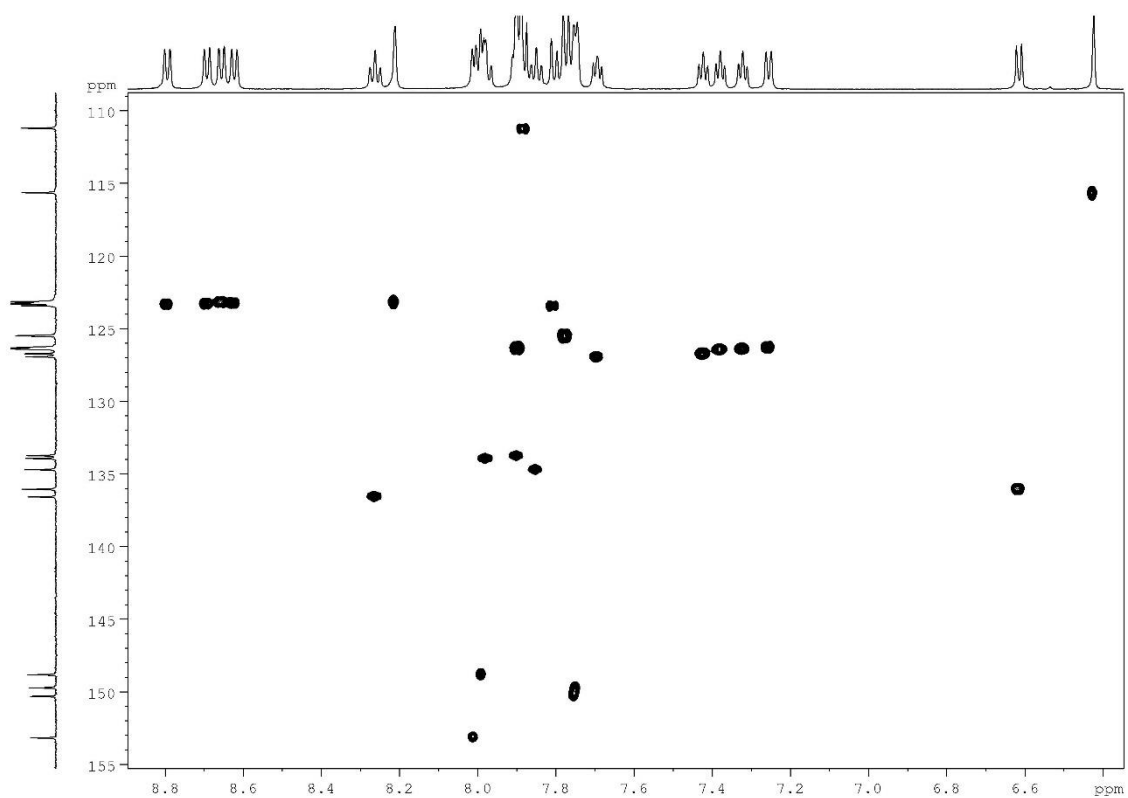


Figura A3.7. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HSQC del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

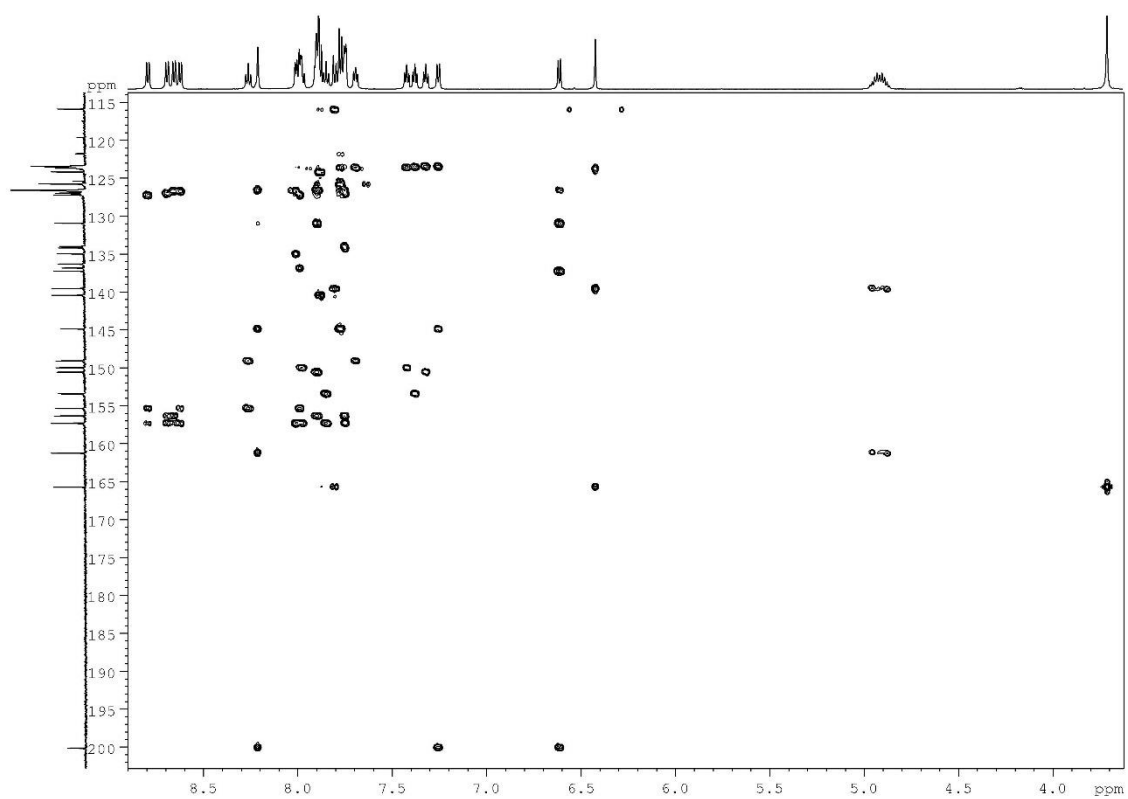
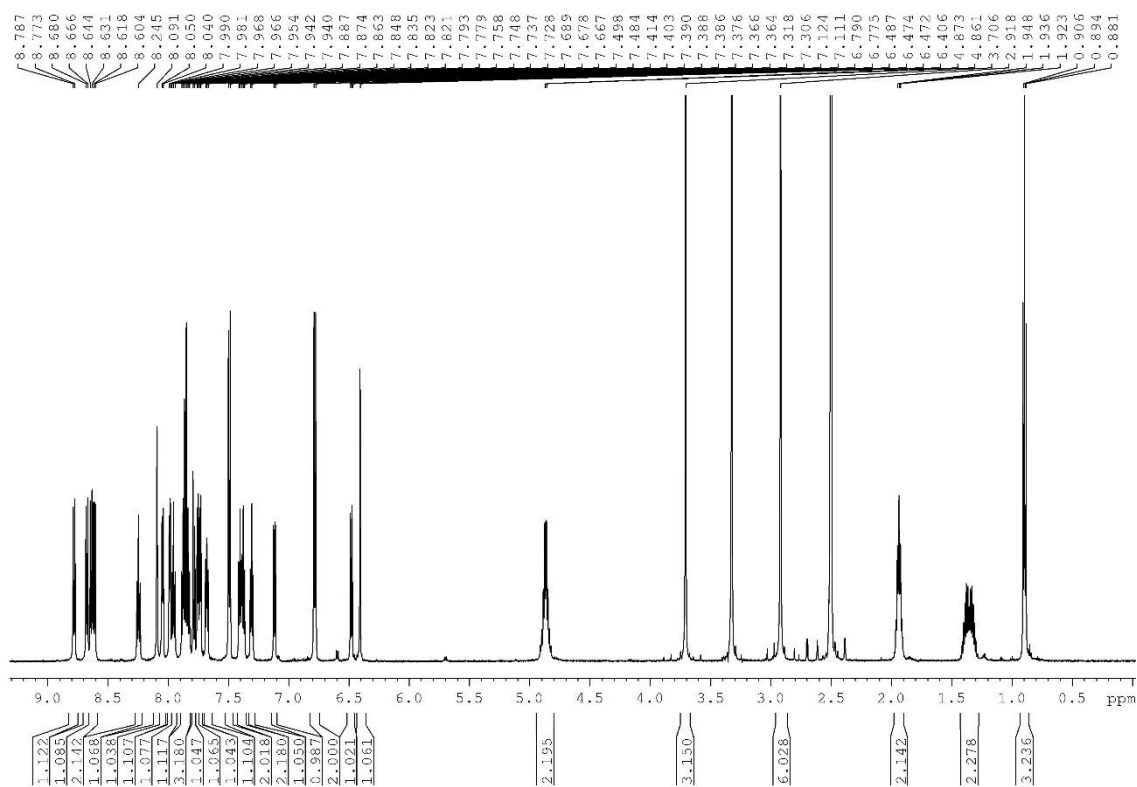
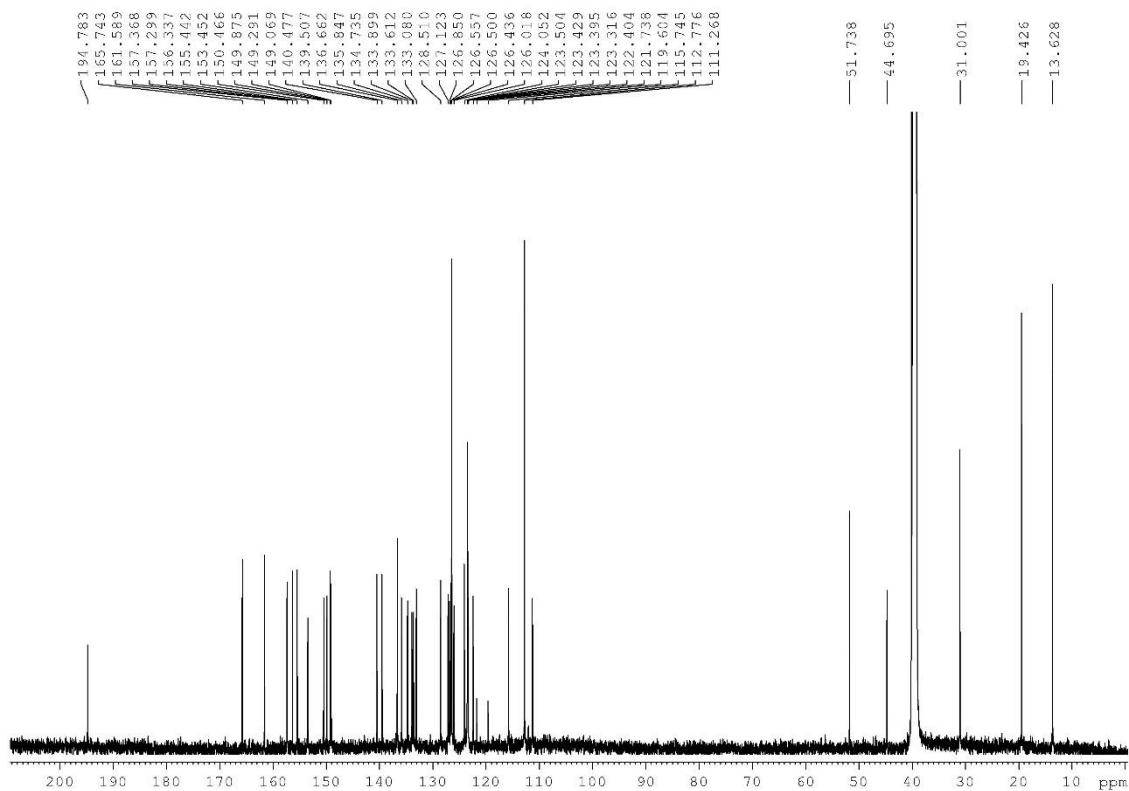


Figura A3.8. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HMBC del compuesto **21** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.2. Compuesto 22

Figura A3.9. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 22 en $\text{DMSO}-d_6$.Figura A3.10. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 22 en $\text{DMSO}-d_6$.

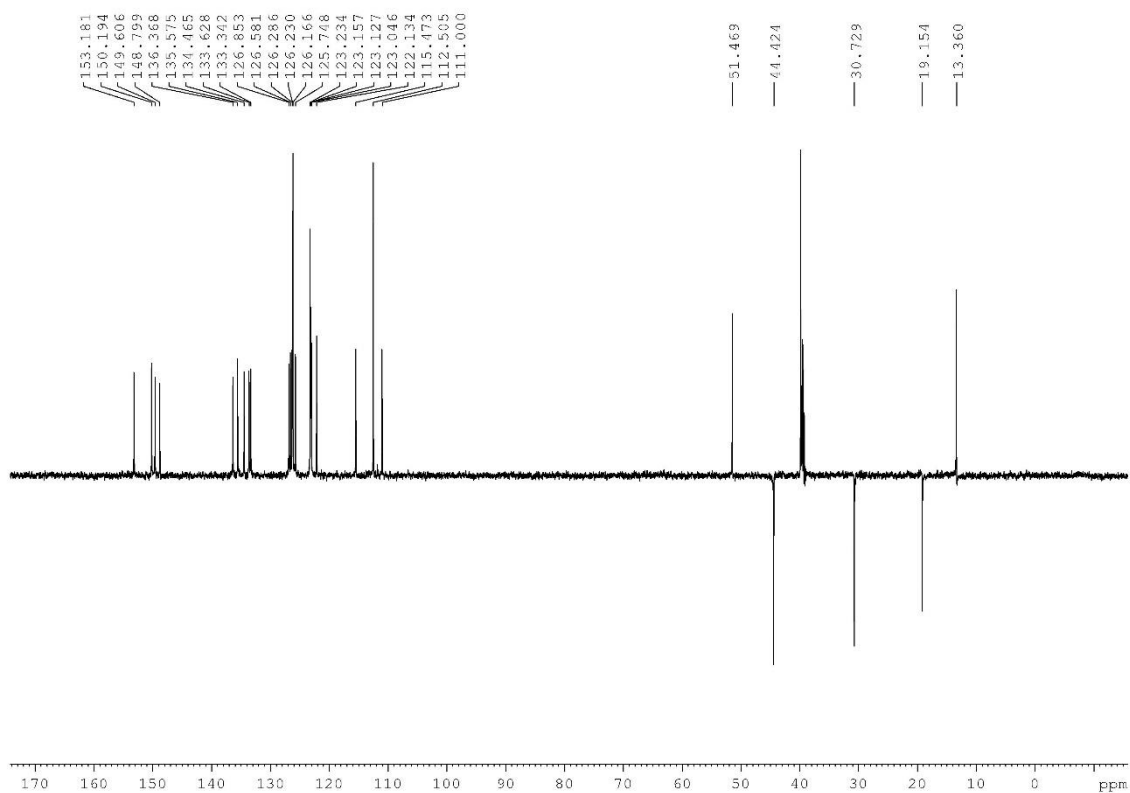


Figura A3.11. Espectro de DEPT-135 del compuesto **22** en DMSO- d_6 .

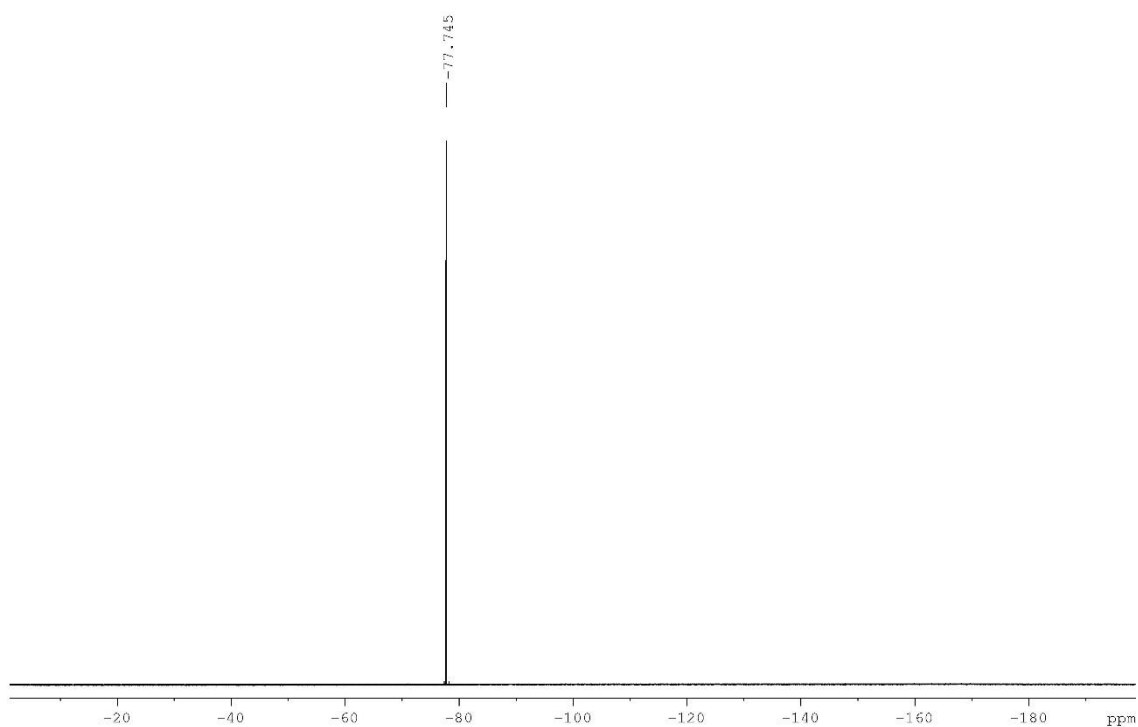


Figura A3.12. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **22** en DMSO- d_6 .

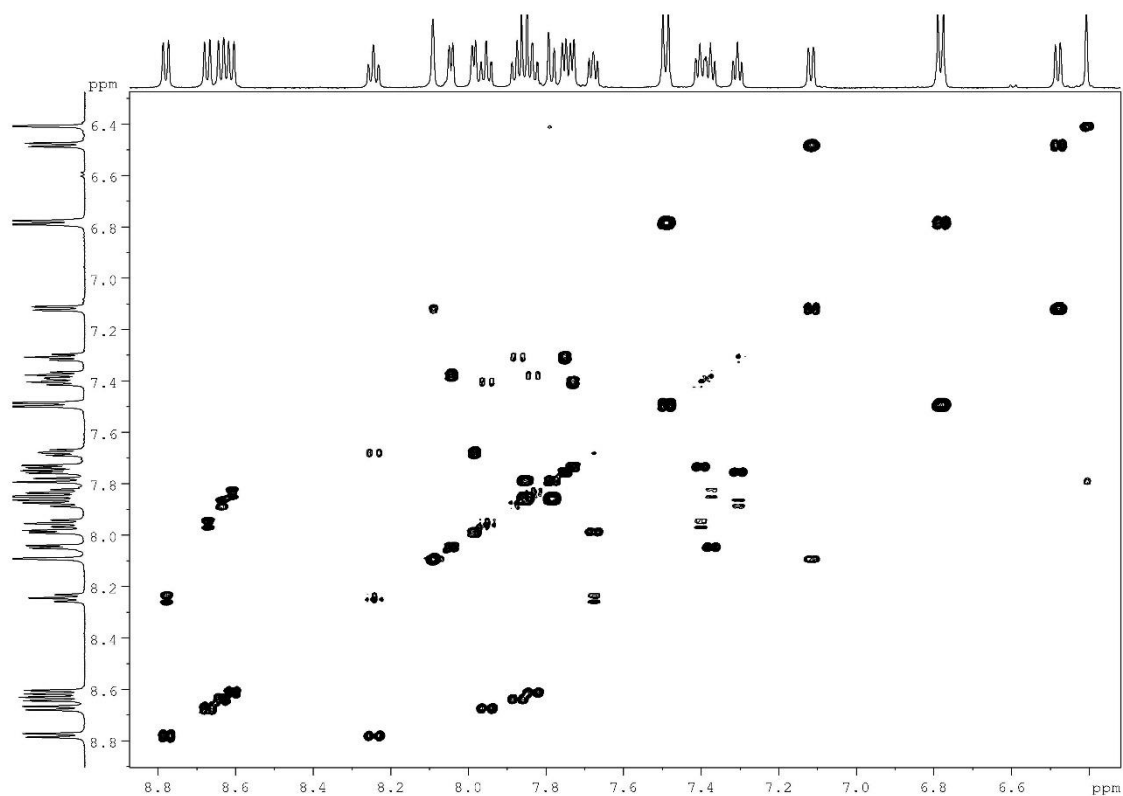


Figura A3.13. Espectro de $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$.

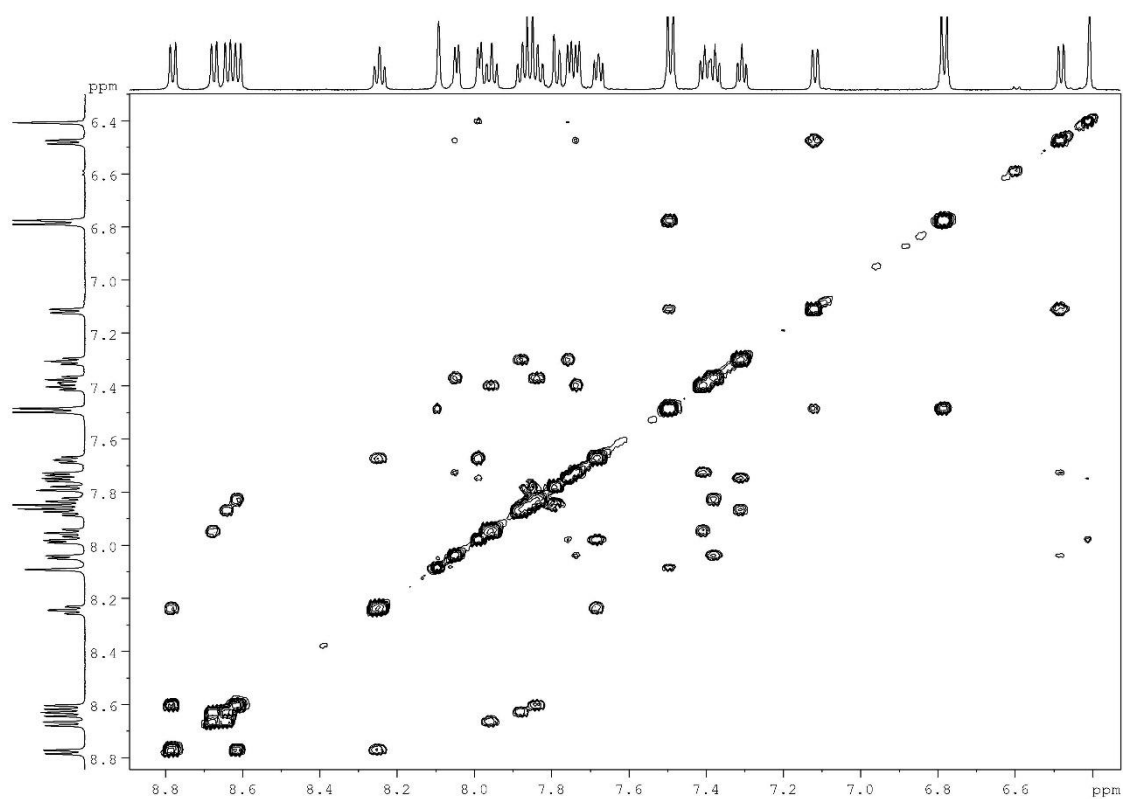


Figura A3.14. Espectro de $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$.

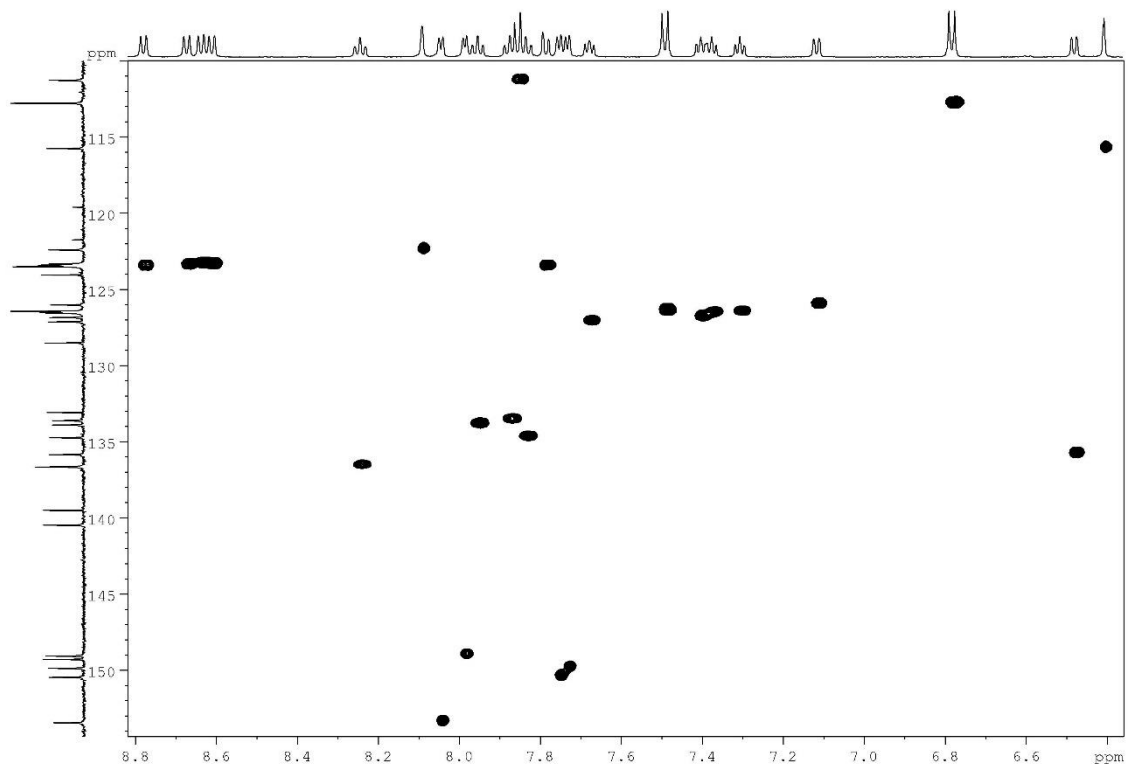


Figura A3.15. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HSQC del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$.

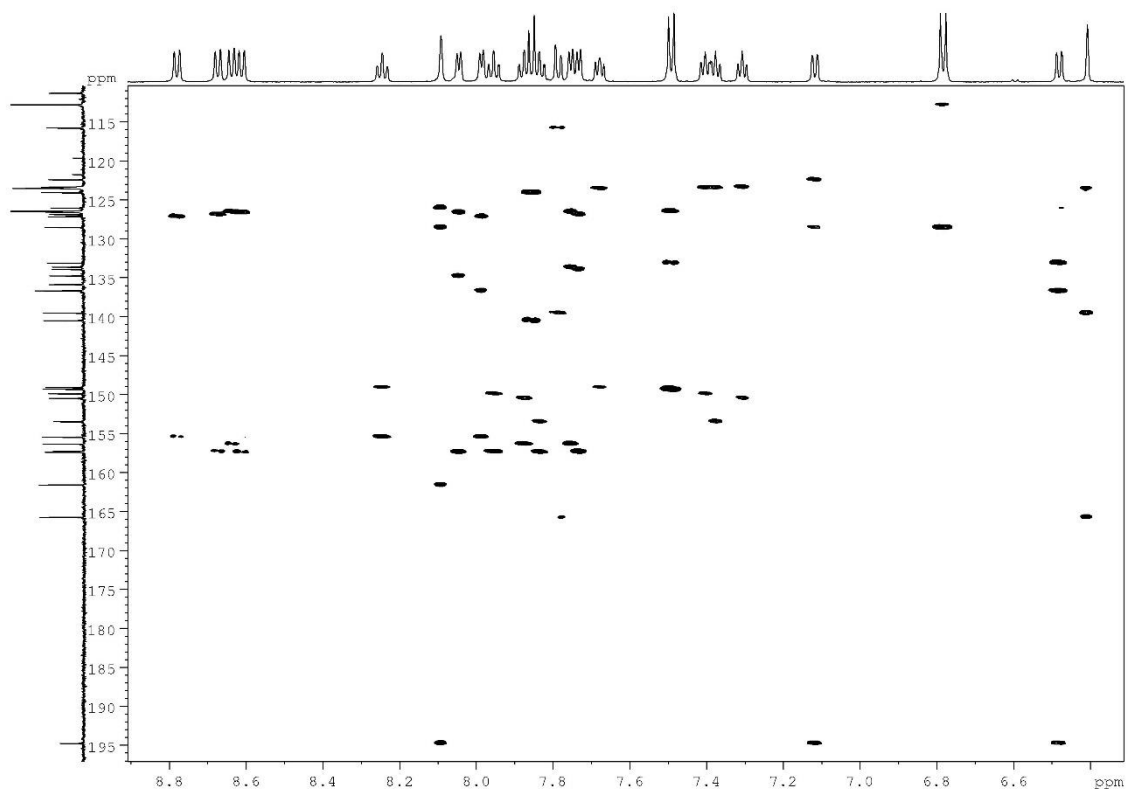
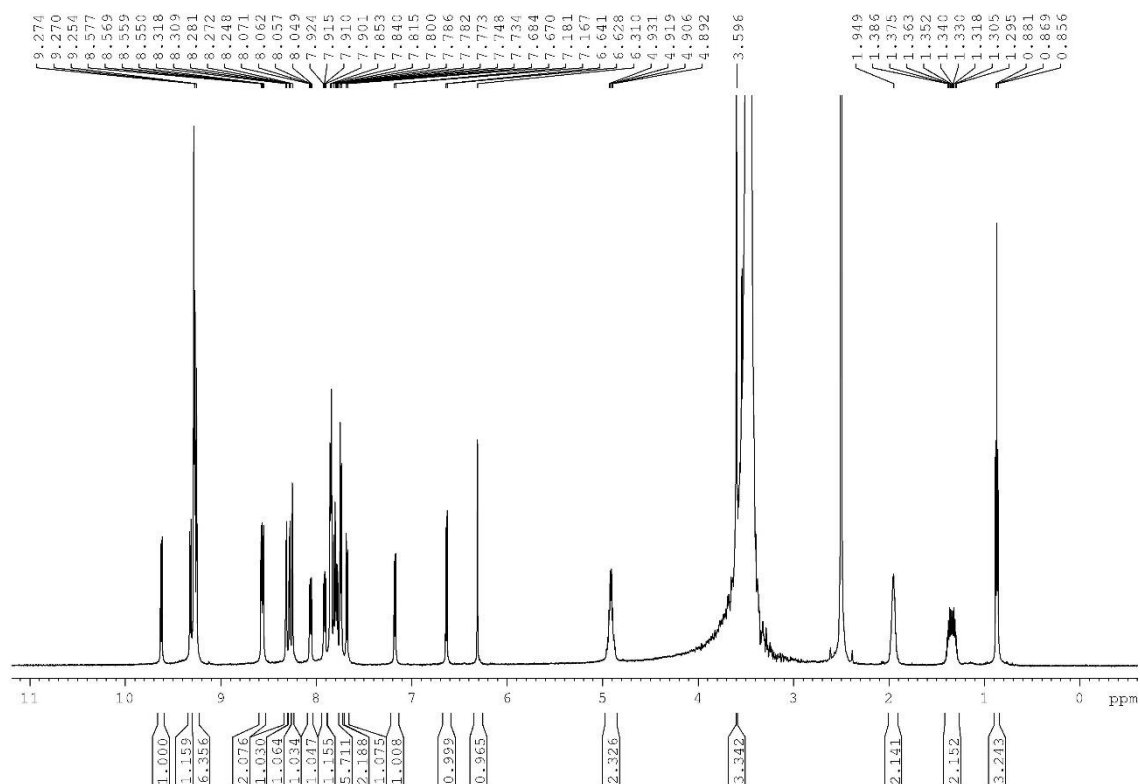
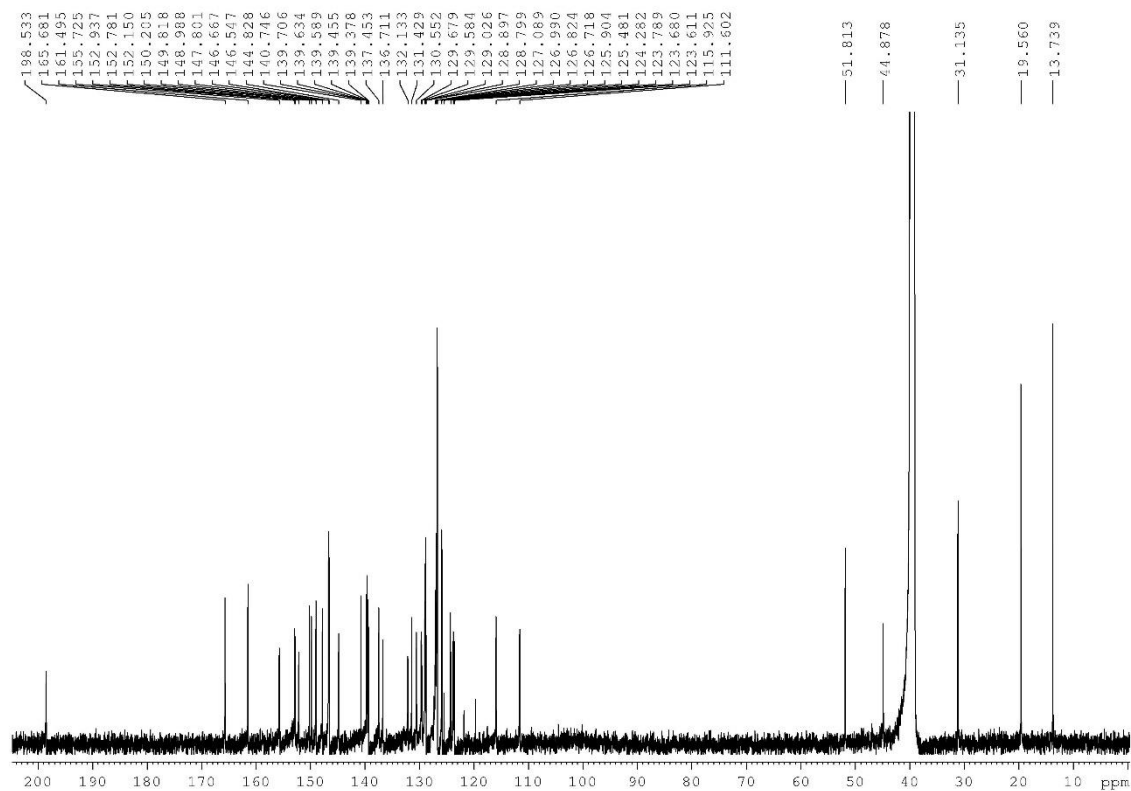


Figura A3.16. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HMBC del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.3. Compuesto 23

Figura A3.17. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **23** en $\text{DMSO}-d_6$.Figura A3.18. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **23** en $\text{DMSO}-d_6$.

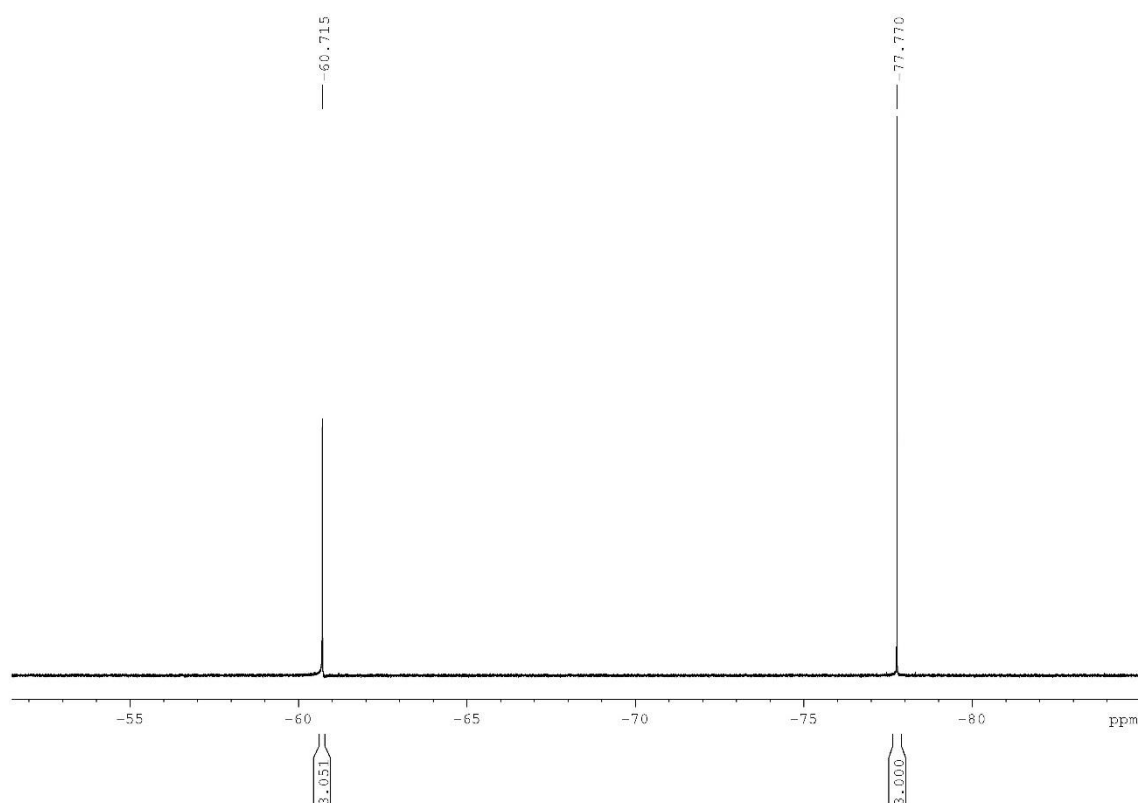


Figura A3.19. Espectro de ¹⁹F-RMN del compuesto **23** en DMSO-*d*₆.

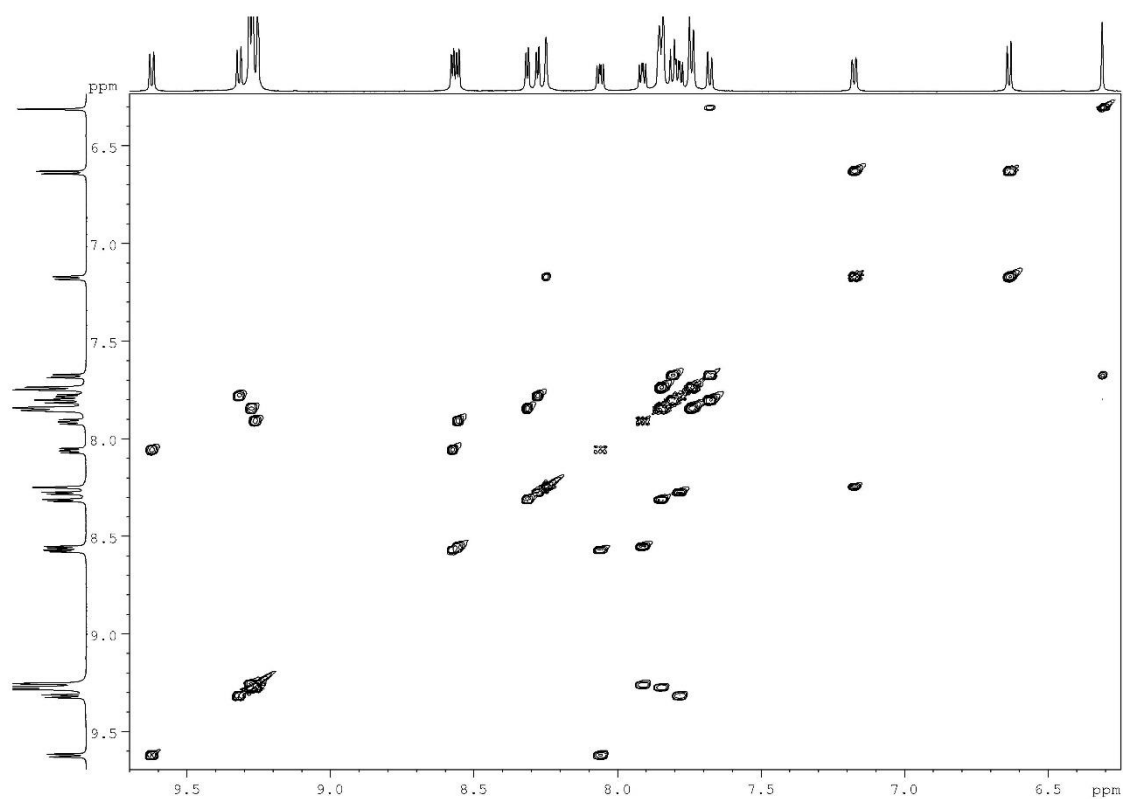


Figura A3.20. Espectro de [¹H-¹H]-COSY del compuesto **23** en DMSO-*d*₆.

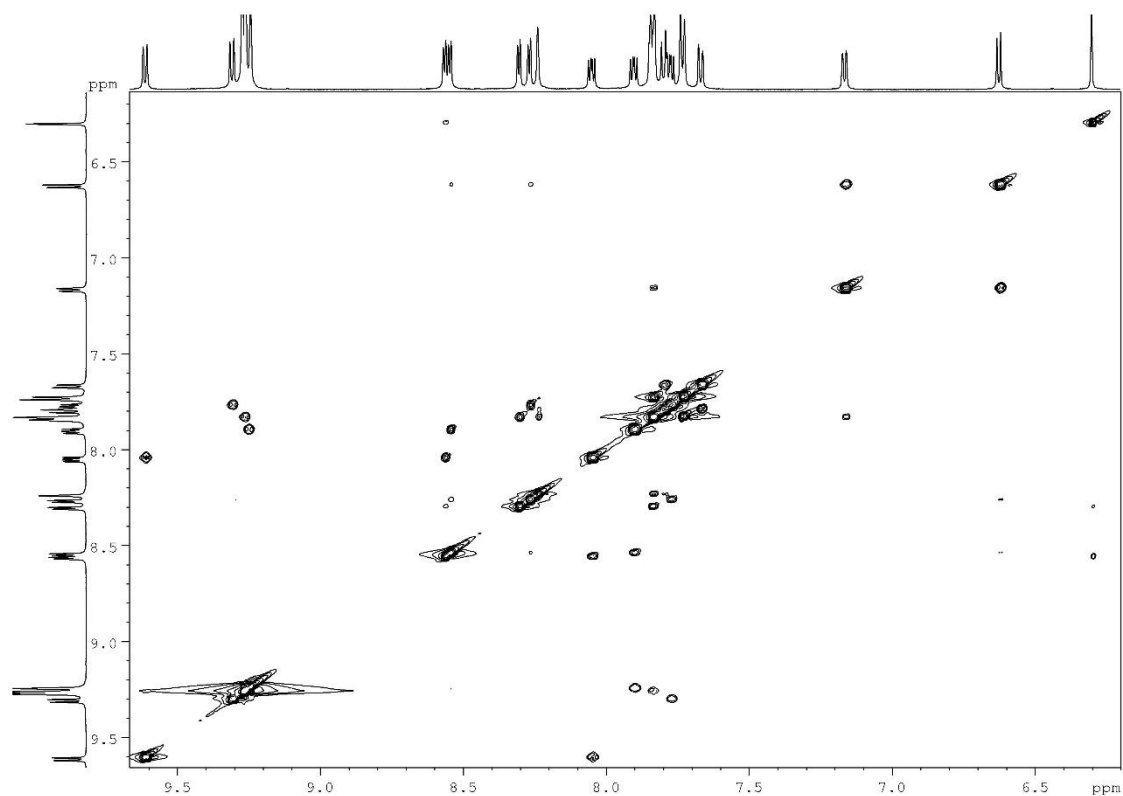


Figura A3.21. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **23** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.4. Compuesto 24

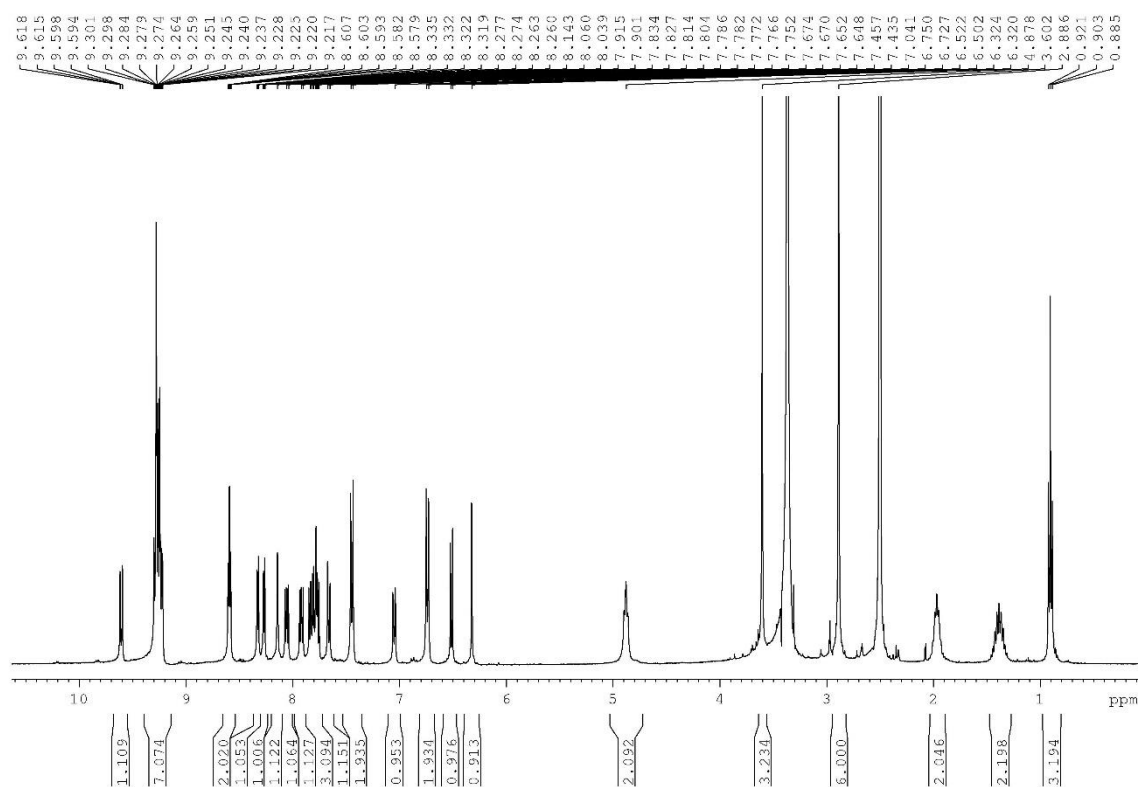


Figura A3.22. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **24** en $\text{DMSO}-d_6$.

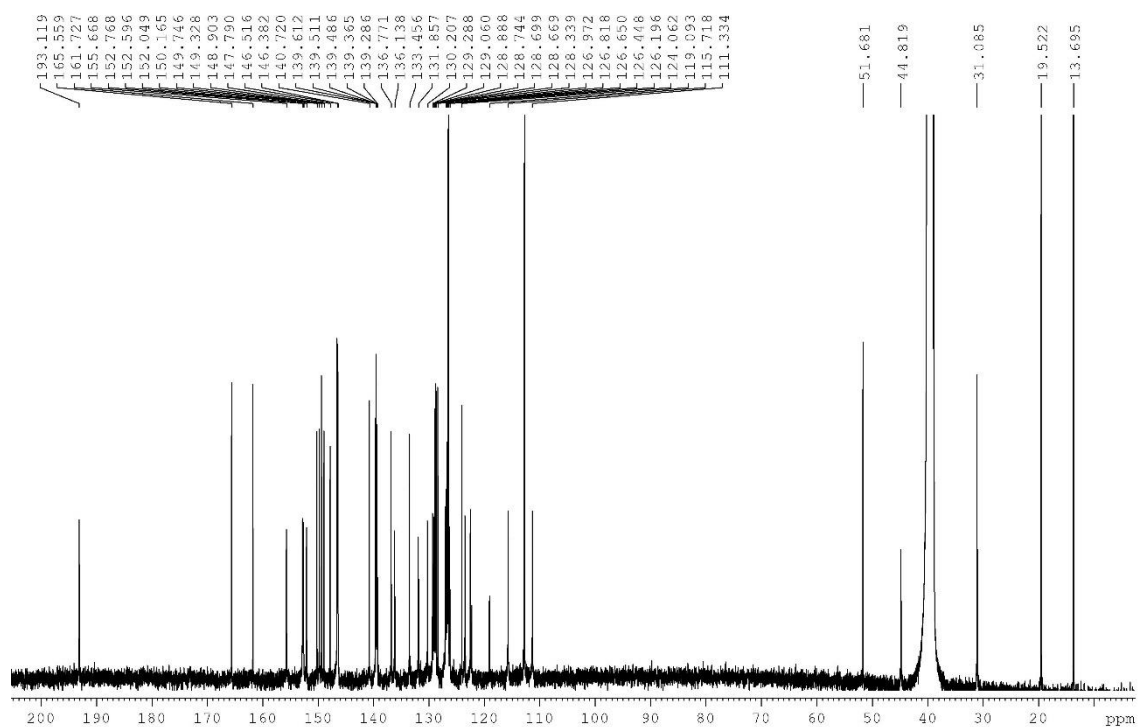


Figura A3.23. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **24** en $\text{DMSO}-d_6$.

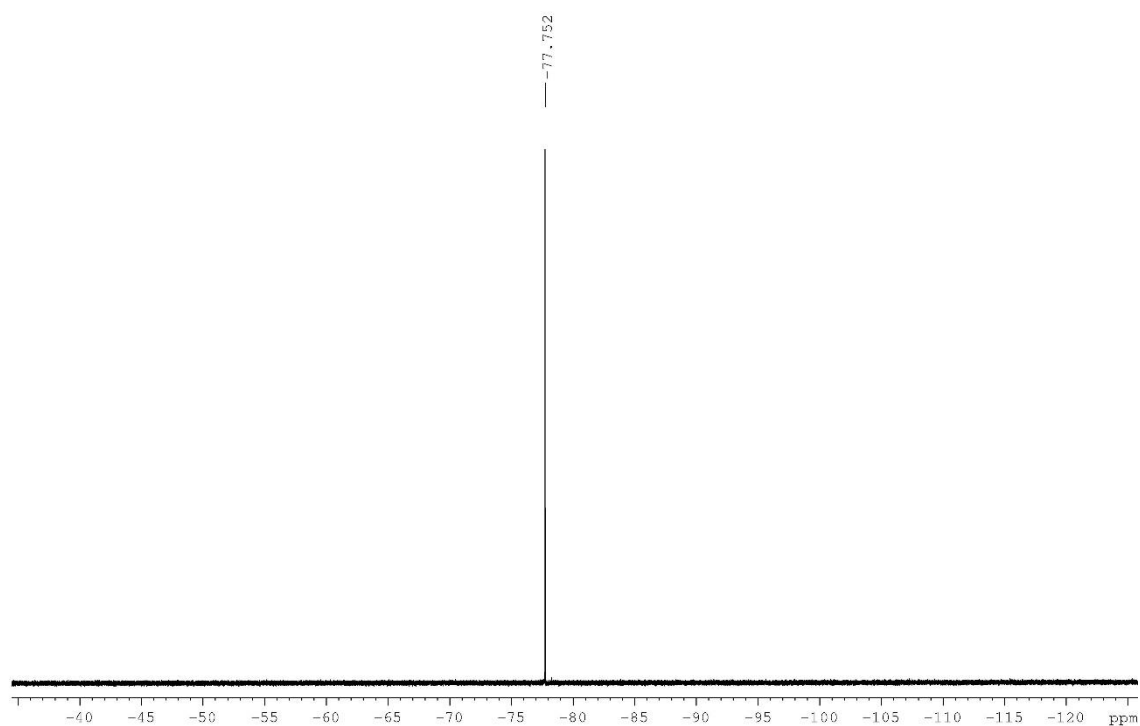


Figura A3.24. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **24** en $\text{DMSO}-d_6$.

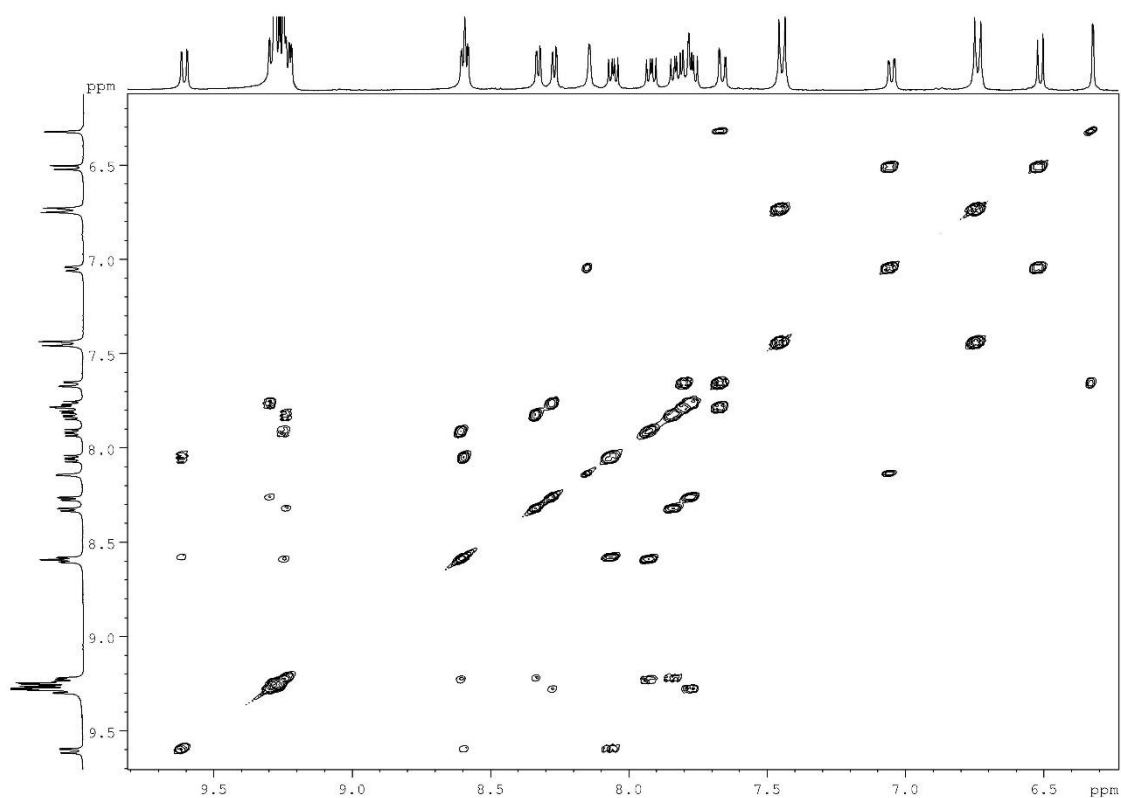


Figura A3.25. Espectro de [^1H - ^1H]-COSY del compuesto **24** en DMSO- d_6 .

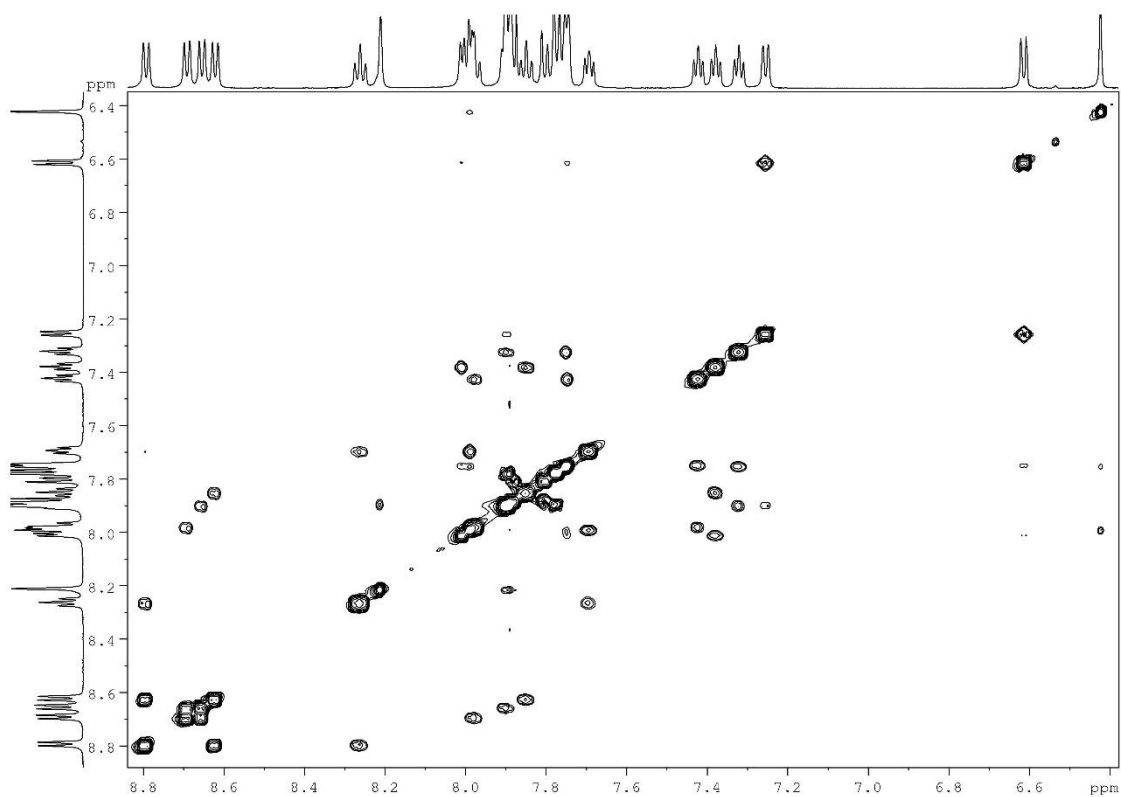


Figura A3.26. Espectro de [^1H - ^1H]-NOESY del compuesto **24** en DMSO- d_6 .

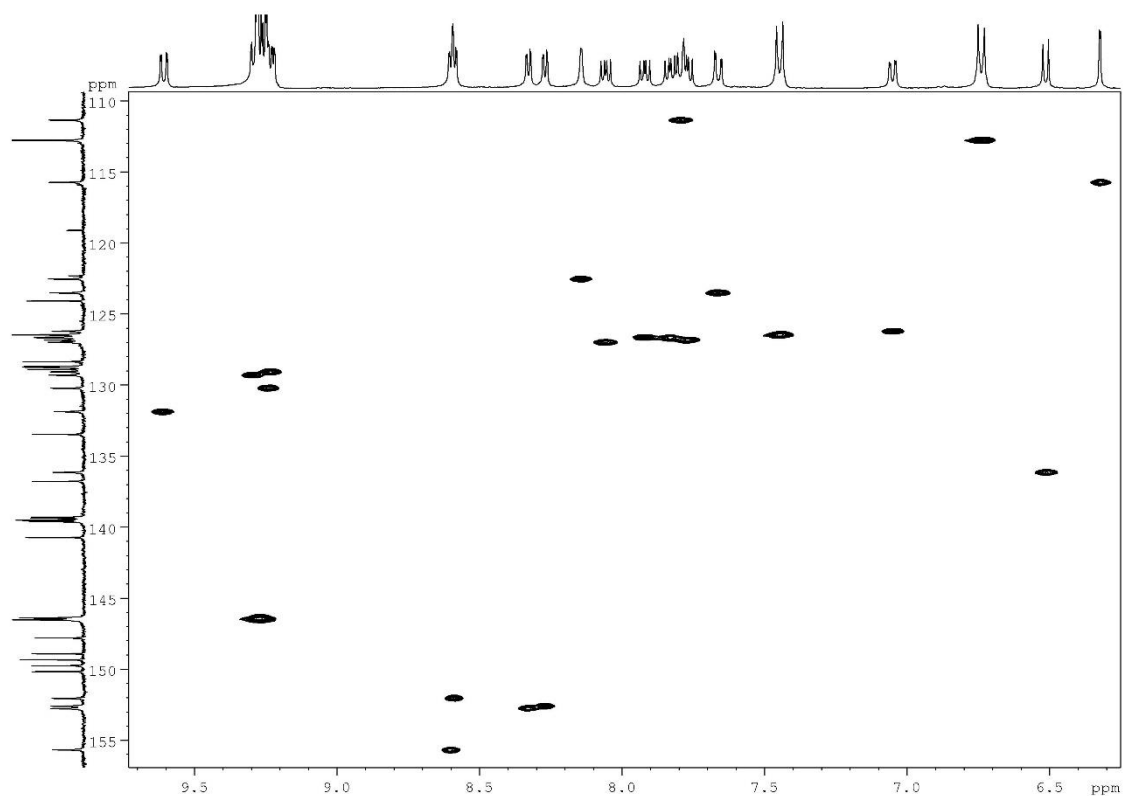


Figura A3.27. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HSQC del compuesto **24** en $\text{DMSO}-d_6$.

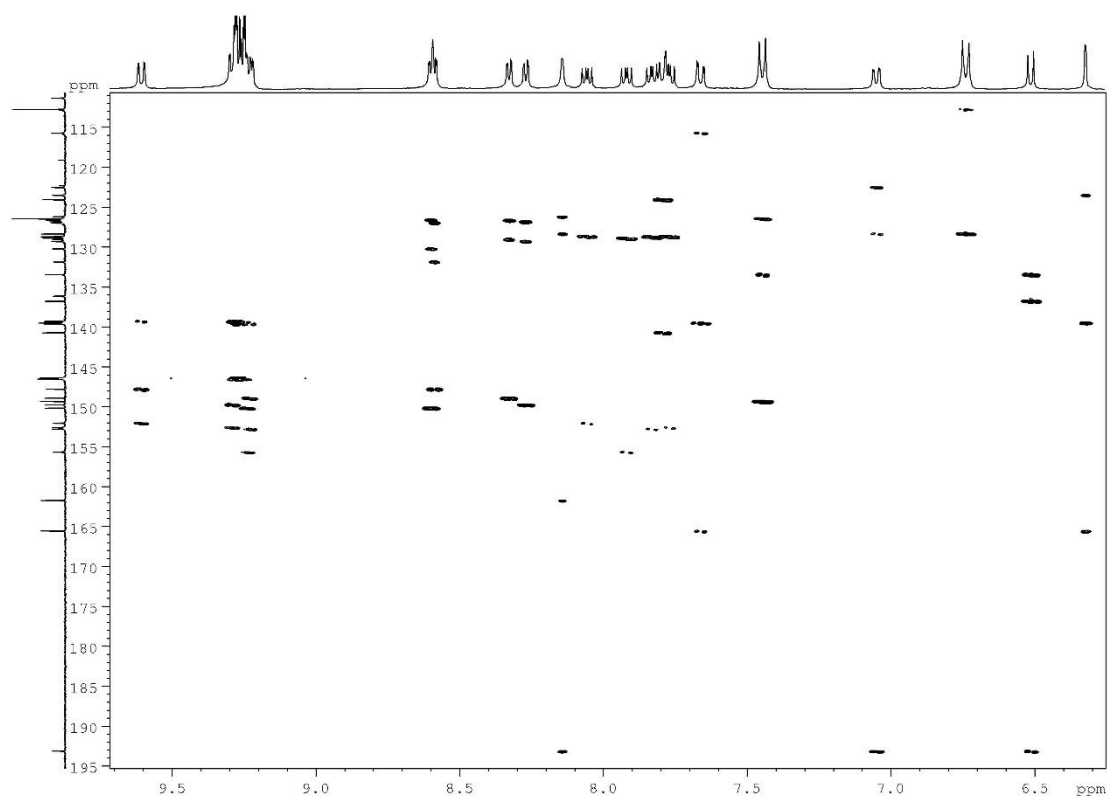


Figura A3.28. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HMBC del compuesto **24** en $\text{DMSO}-d_6$.

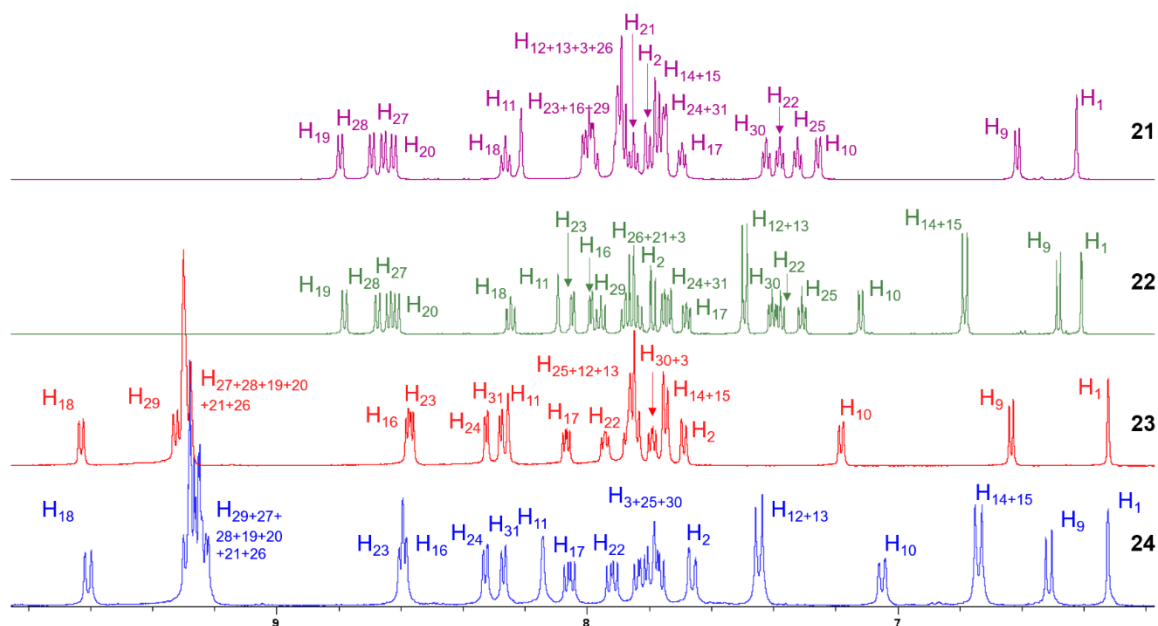


Figura A3.29. Apilamiento de la región aromática de los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **21-24** registrados en $\text{DMSO}-d_6$.

2. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

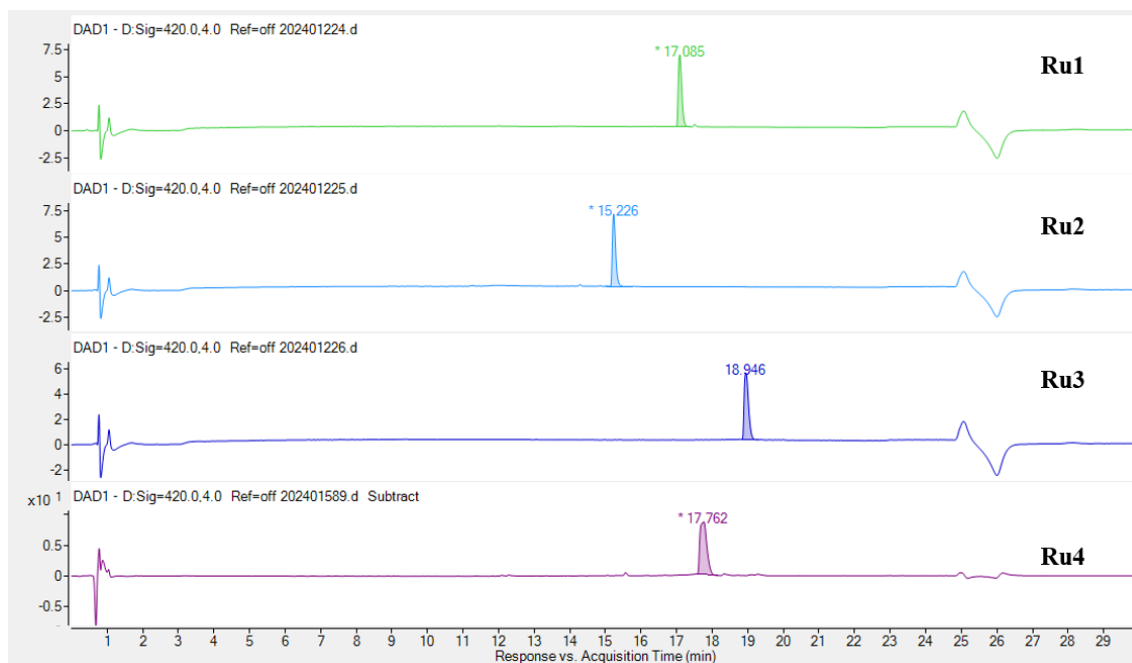


Figura A3.30. Cromatogramas de los compuestos **21-24** disueltos en CH_3CN con detección UV a 420 nm.

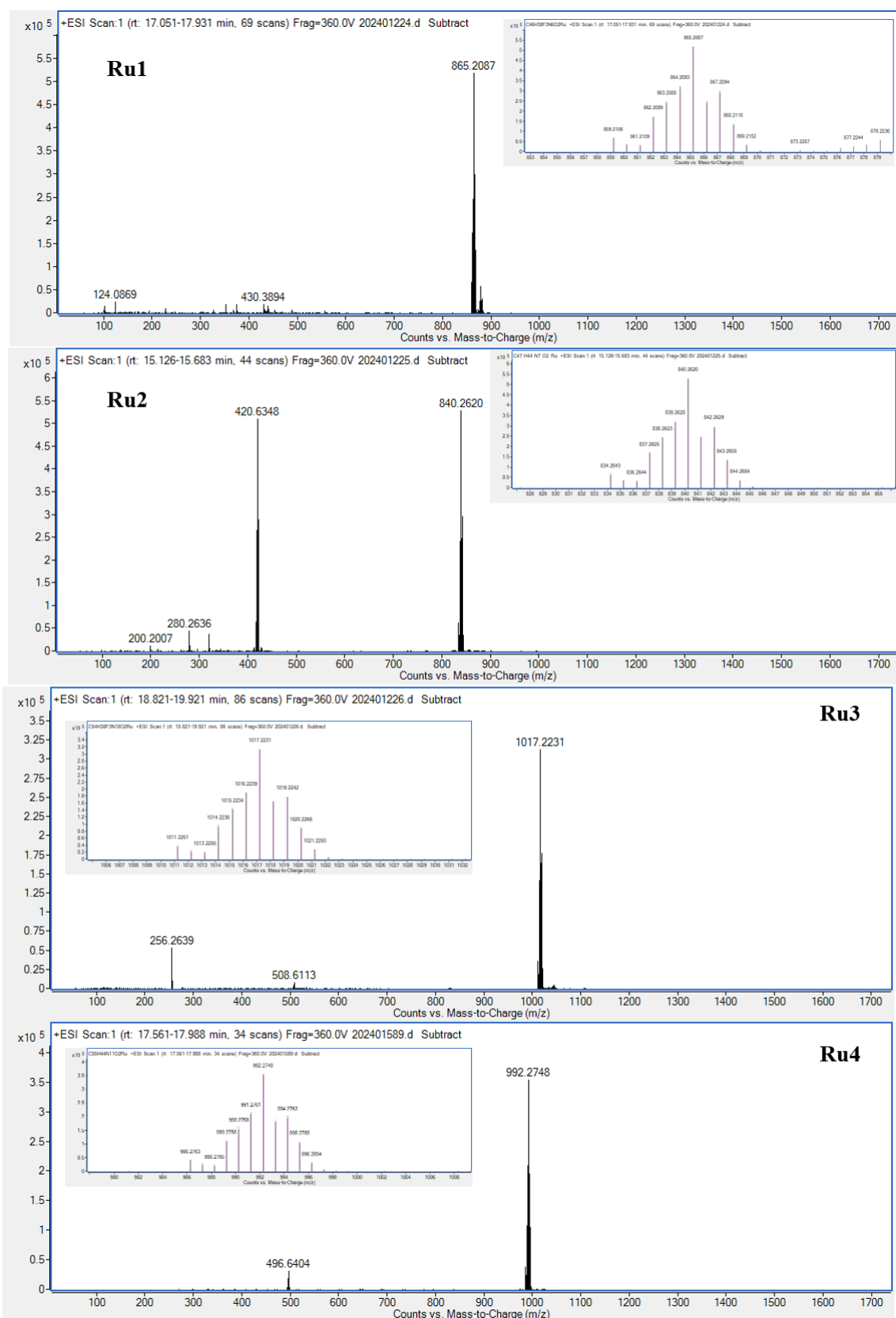


Figura A3.31. Espectro de masas de los picos a 15-18 min de los cromatogramas de la Figura A3.30.

3. Determinación de la estructura cristalina por rayos-X

El número de referencia CCDC para el compuesto **22**·CH₂Cl₂·1/2Et₂O·1,75H₂O es 2332906.

Tabla 3.1. Datos cristalográficos del compuesto **22**.

Fórmula empírica	C ₄₇ H ₄₄ N ₇ O ₂ Ru·CF ₃ O ₃ S·1(CH ₂ Cl ₂)· 0,5(C ₄ H ₁₀ O)·1,75[H ₂ O]	
Peso molecular	1142,54	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	a = 13,5090(6) Å	α = 84,3410(10)°
	b = 14,0322(7) Å	β = 73,105(2)°
	c = 15,9709(6) Å	γ = 62,2960(10)°
Volumen	2562,3(2) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1,481 Mg/m ³	
Coeficiente de absorción	0,521 mm ⁻¹	
F(000)	1177	
Tamaño del cristal	0,290 x 0,230 x 0,120 mm ³	
Rango theta para la recogida de datos	1,641 a 27,103°	
Rangos de índices	-17≤h≤17, -17≤k≤17, -20≤l≤20	
Reflexiones recogidas	184861	
Reflexiones independientes	11300 [R(int) = 0,0273]	
Integridad de Theta = 26,000°	100,0 %	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa F ²	
Datos / restricciones / parámetros	11300 / 32 / 691	
Buen ajuste de F²	1,058	
Índices R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0,0610, wR2 = 0,1684	
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0629, wR2 = 0,1704	
Mayor diferencia pico-hueco	1,844 y -2,047 eÅ ⁻³	

4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

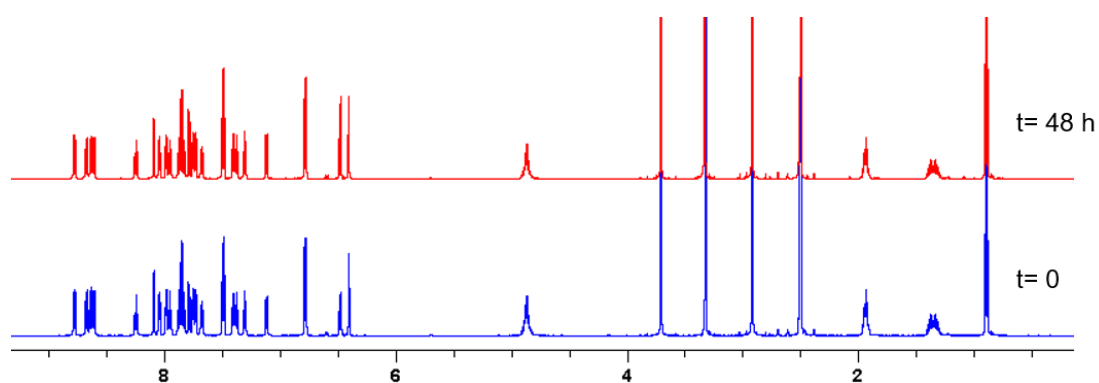


Figura A3.32. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

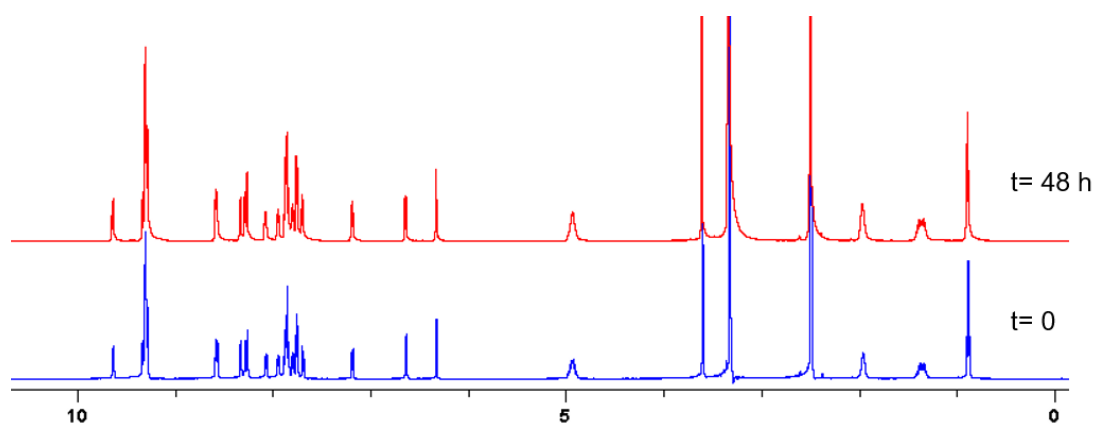


Figura A3.33. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

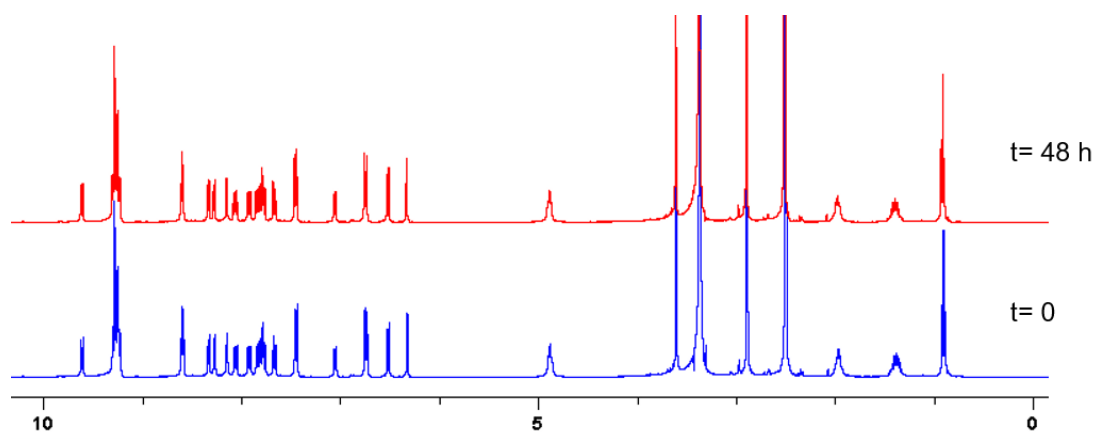


Figura A3.34. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **22** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

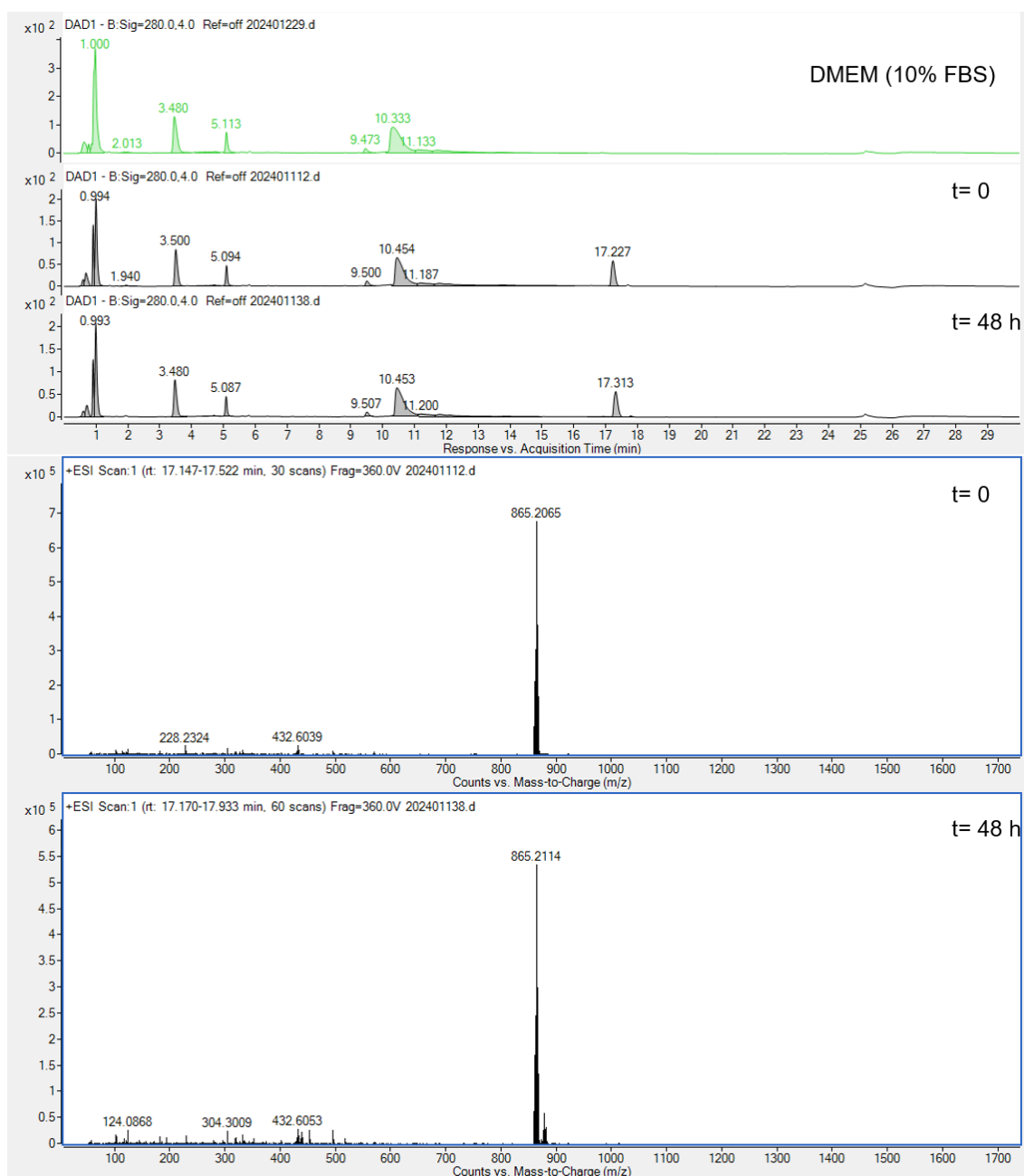


Figura A3.35. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **21** (10 μ M) disuelto en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS a $t=0$ y tras 48 de incubación a 37 $^{\circ}$ C.

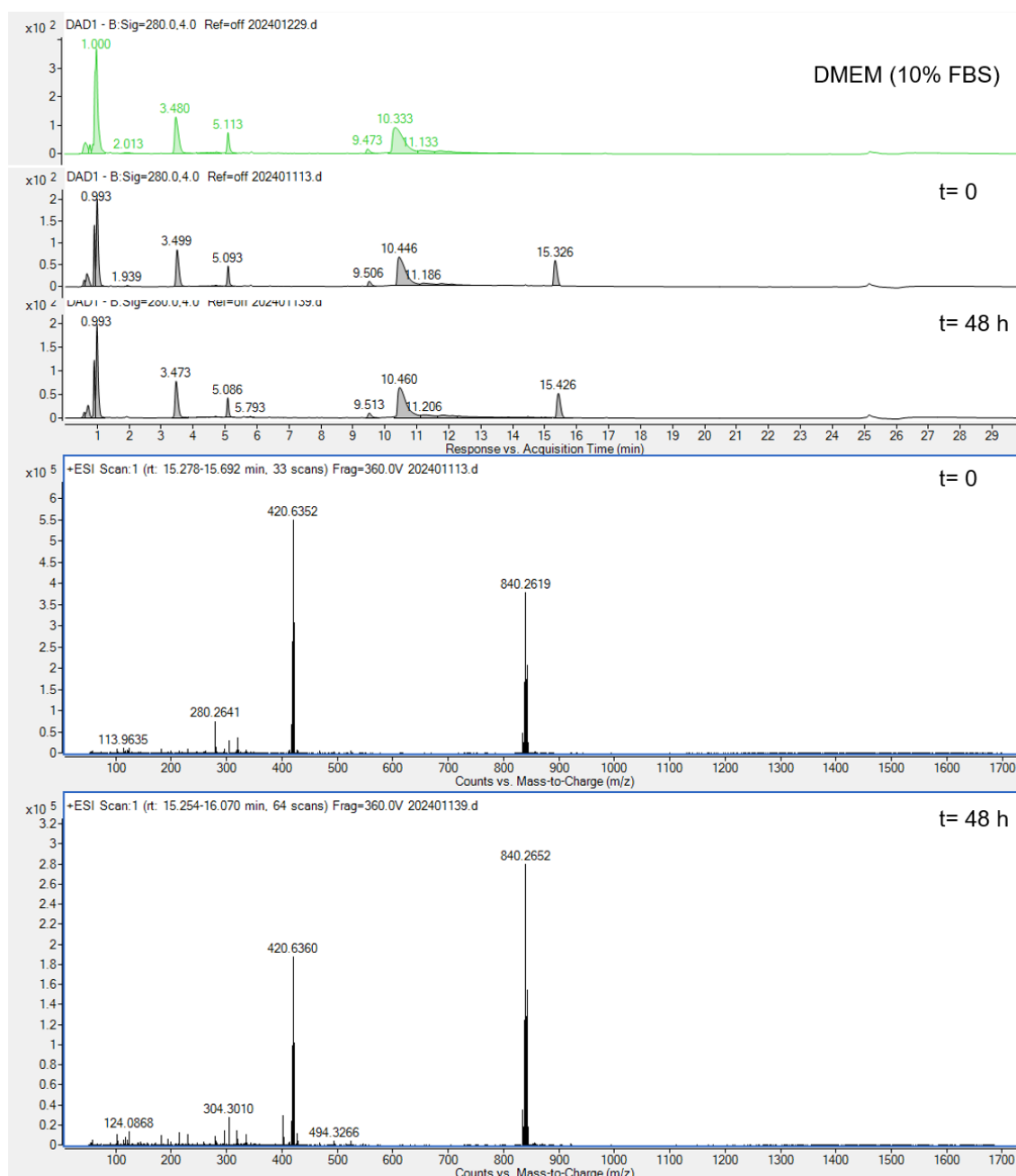


Figura A3.36. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **22** ($10\text{ }\mu\text{M}$) disuelto en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS a $t=0$ y tras 48 de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

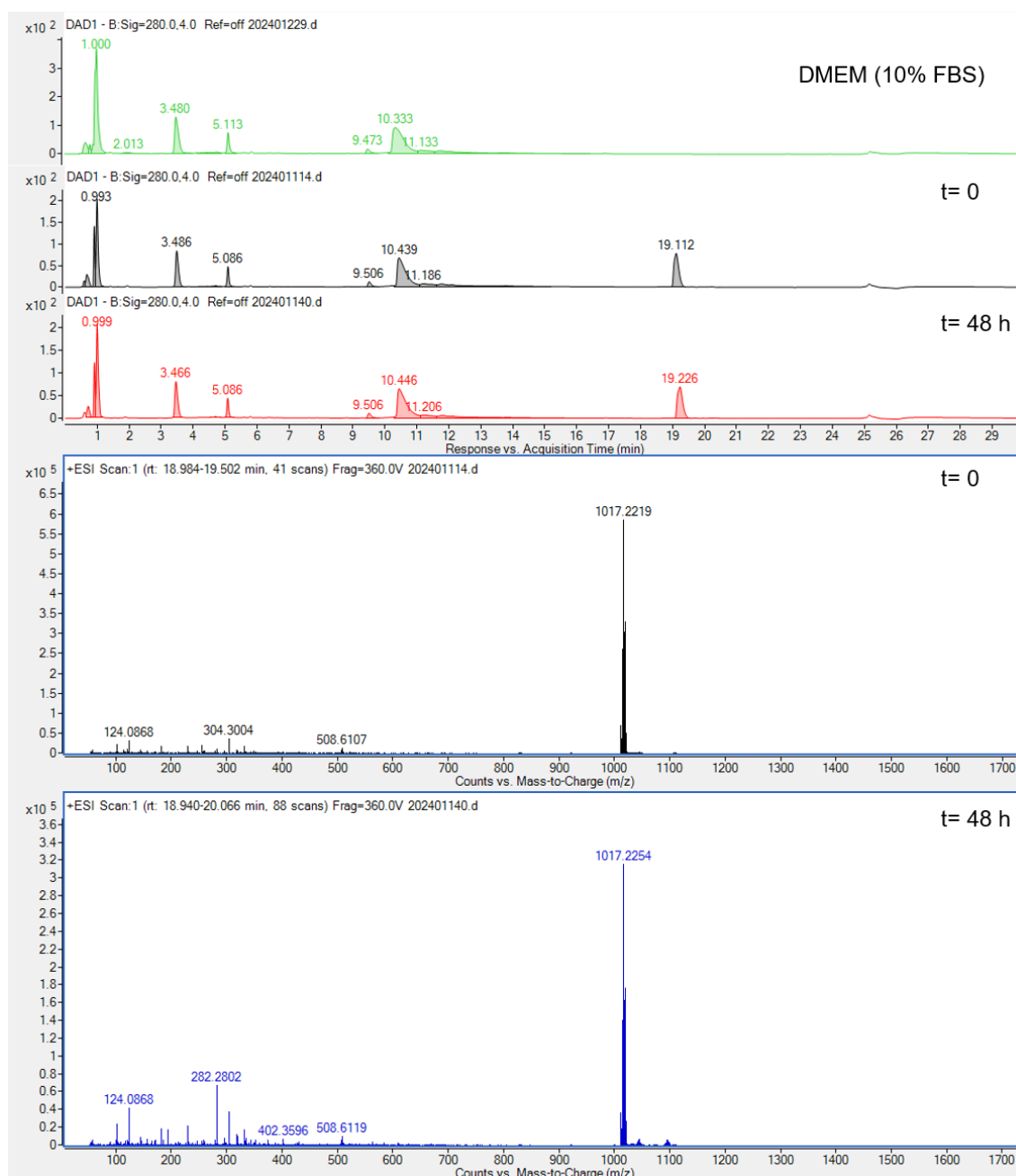


Figura A3.37. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **23** (10 μ M) disuelto en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS a $t=0$ y tras 48 de incubación a 37 °C.

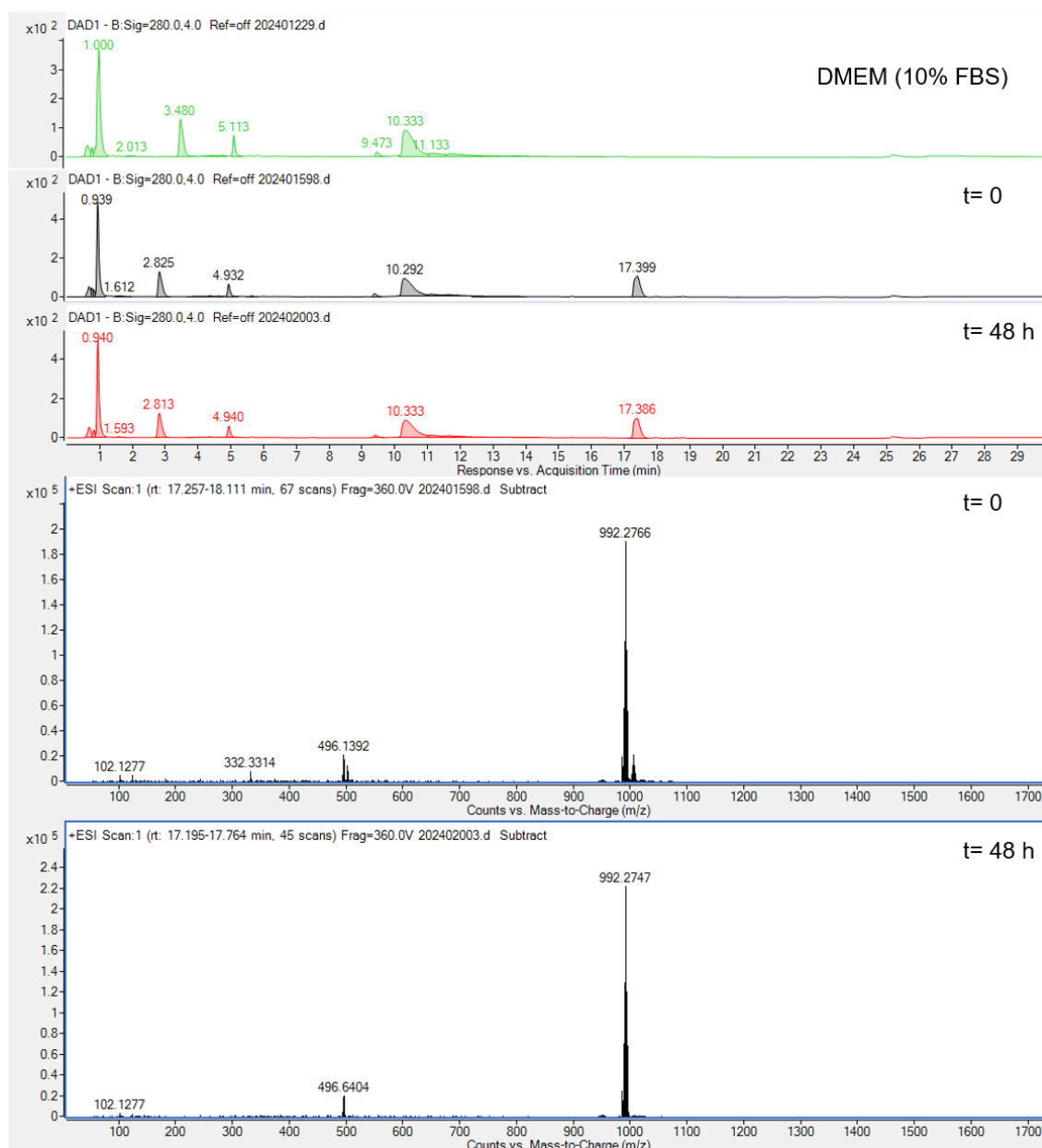


Figura A3.38. Cromatogramas de HPLC-MS del compuesto **24** (10 μ M) disuelto en DMEM (5 % DMSO) suplementado con 10 % FBS a $t=0$ y tras 48 de incubación a 37 $^{\circ}$ C.

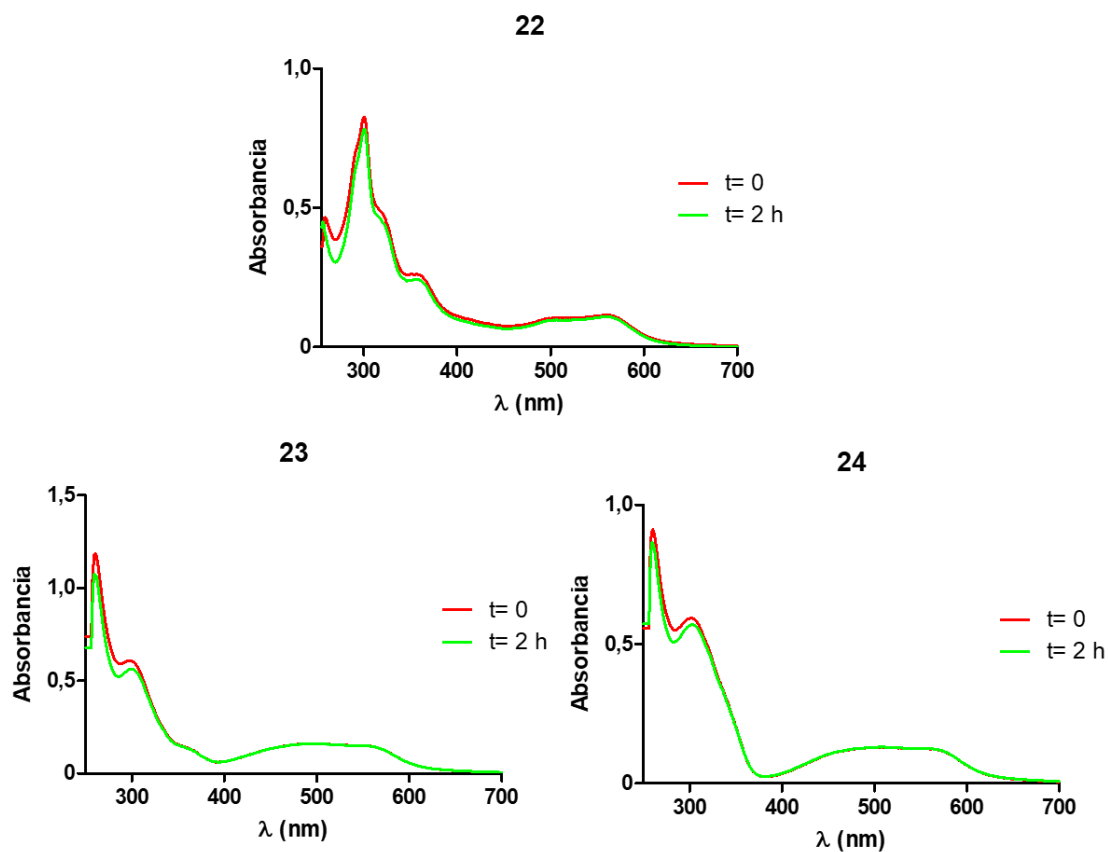


Figura A3.39. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **22-24** (10 μM) en DMSO a $t=0$ y tras 2 h de irradiación con luz verde (520, 2,0 mW/cm²).

5. Interacción con la HSA

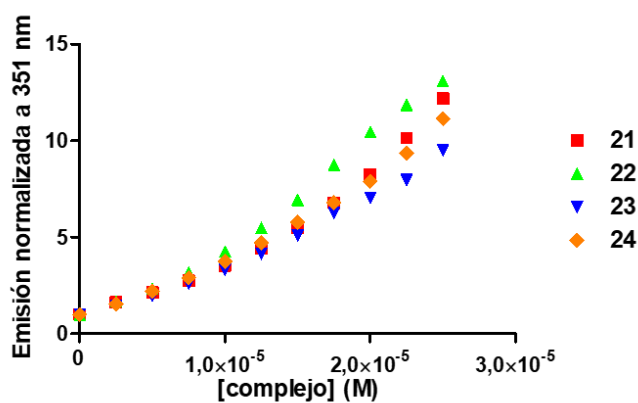


Figura A3.40. Curvas de Stern-Volmer de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **21-24**.

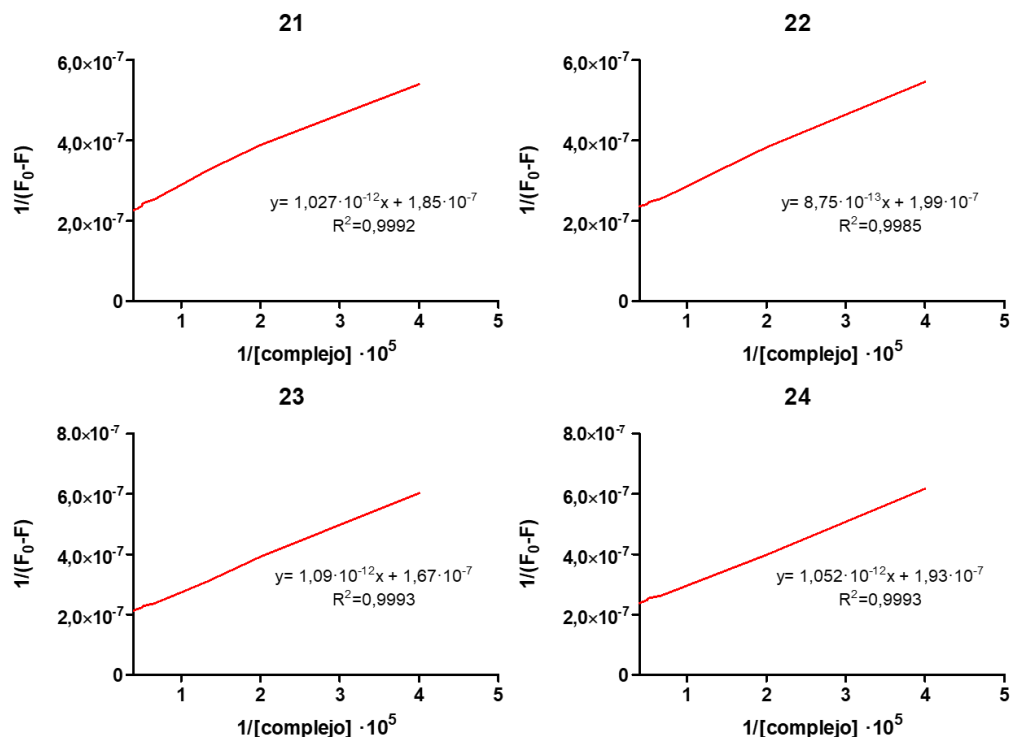


Figura A3.41. Curvas de Lineweaver-Burk de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **21-24**.

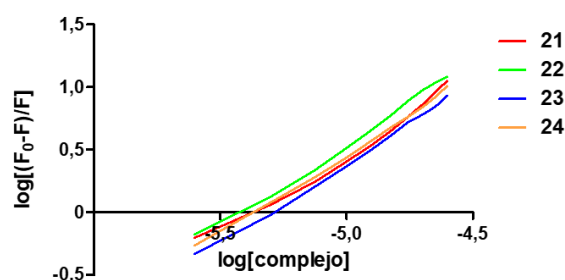


Figura A3.42. Curvas de Scatchard de la extinción de la fluorescencia de la HSA en presencia de los compuestos **21-24**.

6. Generación de oxígeno singlete

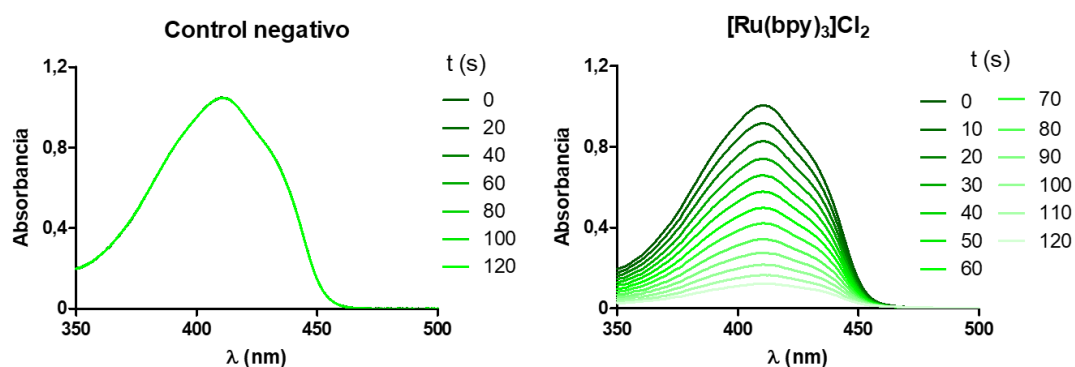


Figura A3.43. Espectro de absorción de DPBF (50 μM) en ausencia de compuesto y en presencia de la referencia ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, 50 μM) en acetonitrilo tras irradiación con luz verde (520 nm, 0,5 mW/cm²).

7. Generación de radicales hidroxilo

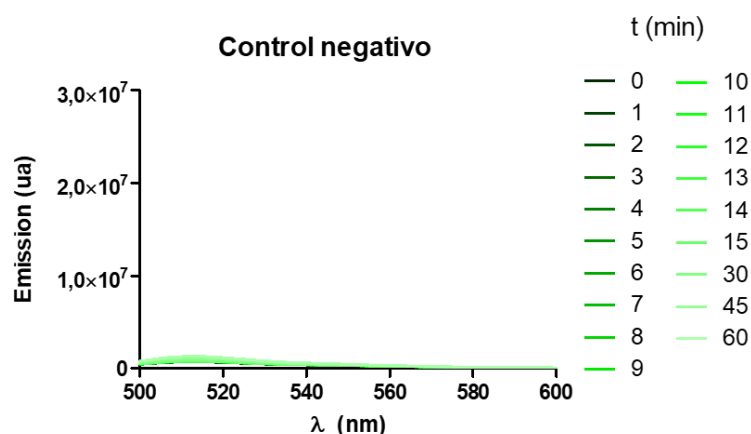


Figura A3.44. Espectro de emisión de la HPF (10 μM) tras irradiación con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm^2).

8. Propiedades biológicas

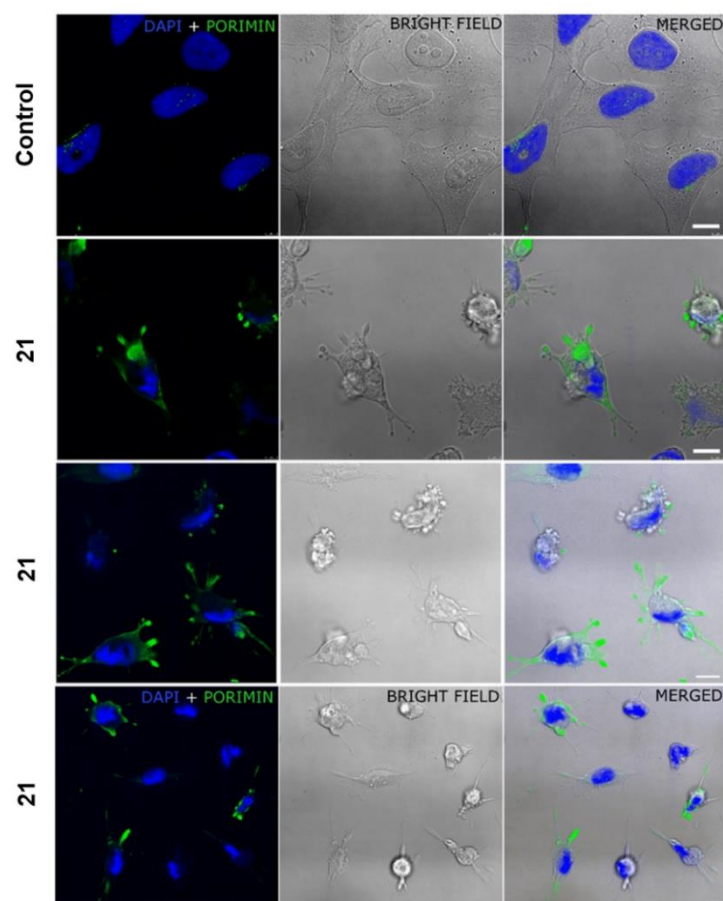


Figura A3.45. Tinción de inmunofluorescencia de células HeLa que muestra la localización de porimina en la membrana (señal de fluorescencia verde). Para mayor claridad, los núcleos se tiñeron con DAPI (señal azul). Fila superior: control, células no tratadas 4 h después de la irradiación. **21**: células tratadas con **21** en una concentración correspondiente al IC_{50} 4 h después de la irradiación. Se muestran tres imágenes representativas. Las barras de escala representan 10 μm .

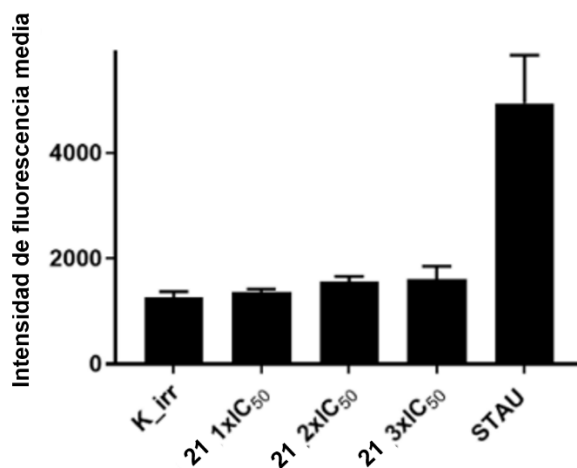


Figura A3.46. Activación de la caspasa 3/7 detectada mediante el reactivo de detección verde CellEvent®Caspase3/7. Las células HeLa se trataron con **21** (o se incubaron sin tratar) durante 1 h en la oscuridad y se irradiaron con luz verde. Tras 24 h de recuperación en medios libres de compuestos, las muestras celulares se tiñeron con el reactivo de detección CellEvent®Caspase 3/7 Green y la fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo; se analizaron 30 000 células en cada muestra. En la concentración más alta (correspondiente a 3xIC₅₀, se detecta una cantidad insignificante de células apoptóticas; sin embargo, la población apoptótica no es significativamente diferente de la de las células irradiadas de control no tratadas. Como control positivo, se incluyó en el experimento estaurosporina (STAU, 1 µM).

Anexo IV

ÍNDICE

1. Espectros de RMN	A91
1.1. Compuesto 25	A91
1.2. Compuesto 27	A92
1.3. Compuesto 28	A93
1.4. Compuesto 29	A95
1.5. Compuesto 30	A96
1.6. Compuesto 31	A99
1.7. Compuesto 32	A102
1.8. Compuesto 33	A106
2. Espectrometría de masas	A109
3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)	A113
4. Determinación de la estructura cristalina por rayos X.....	A115
5. Propiedades fotofísicas	A116
6. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	A117
7. Fotooxidación del NADH	A119
8. Generación de oxígeno singlete	A120
9. Generación de radical hidroxilo	A120
10. Propiedades biológicas.....	A120

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 25

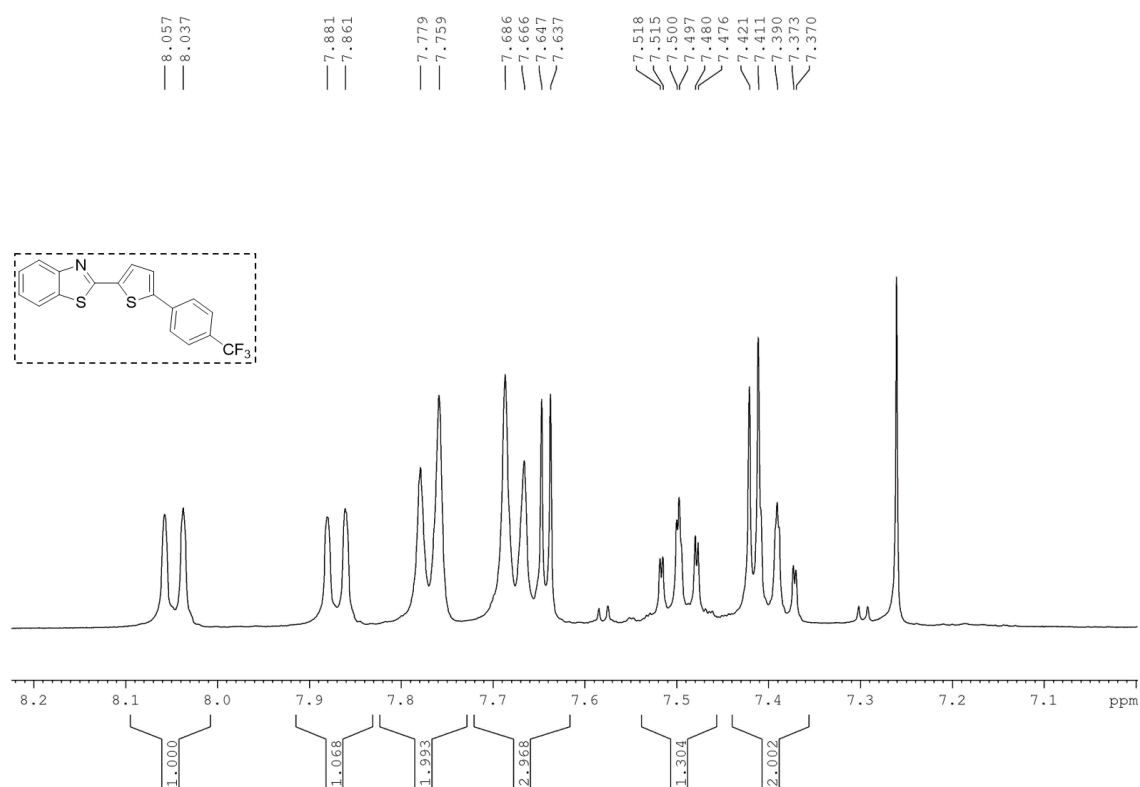


Figura A4.1. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 25 en CDCl₃.

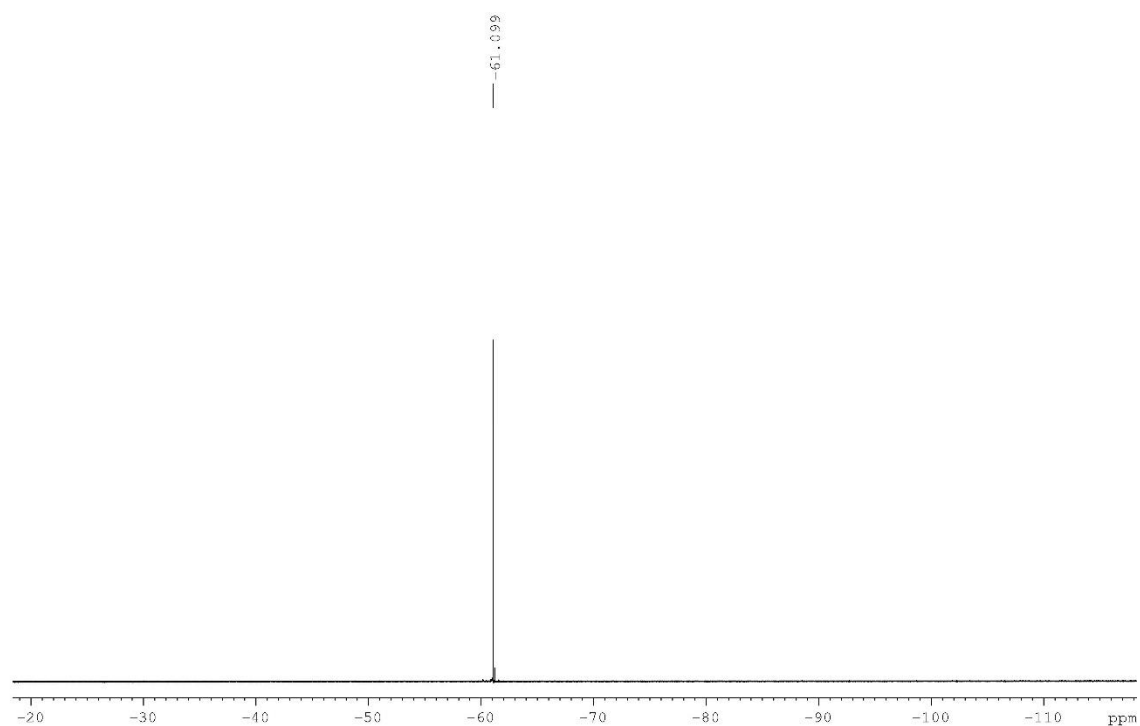


Figura A4.2. Espectro de ¹⁹F-RMN del compuesto 25 en DMSO-*d*₆.

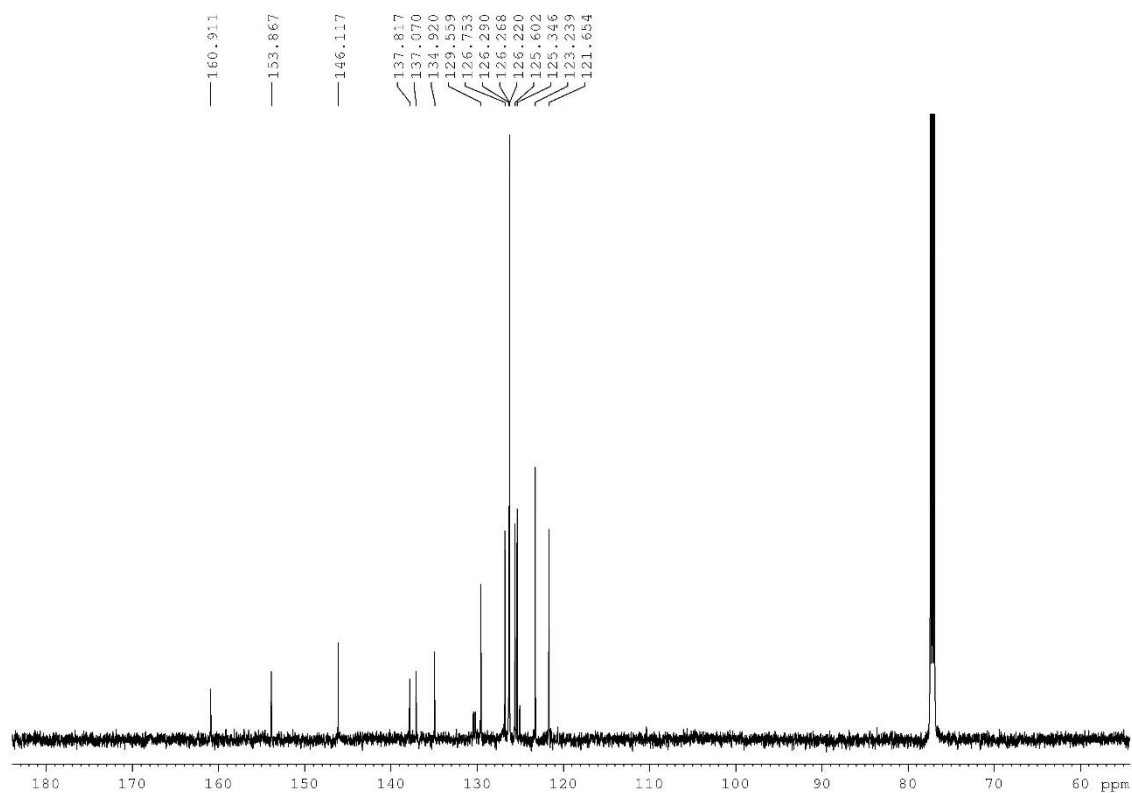


Figura A4.3. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **25** en CDCl_3 .

1.2. Compuesto 27

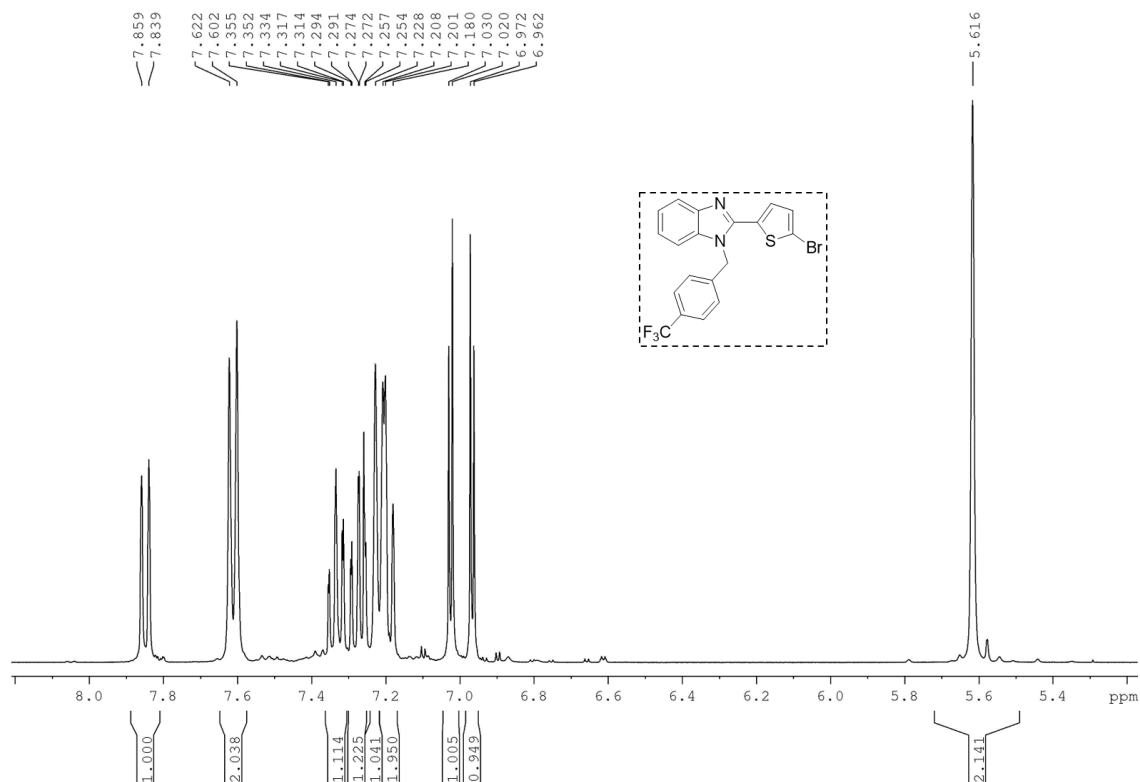


Figura A4.4. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **27** en CDCl_3 .

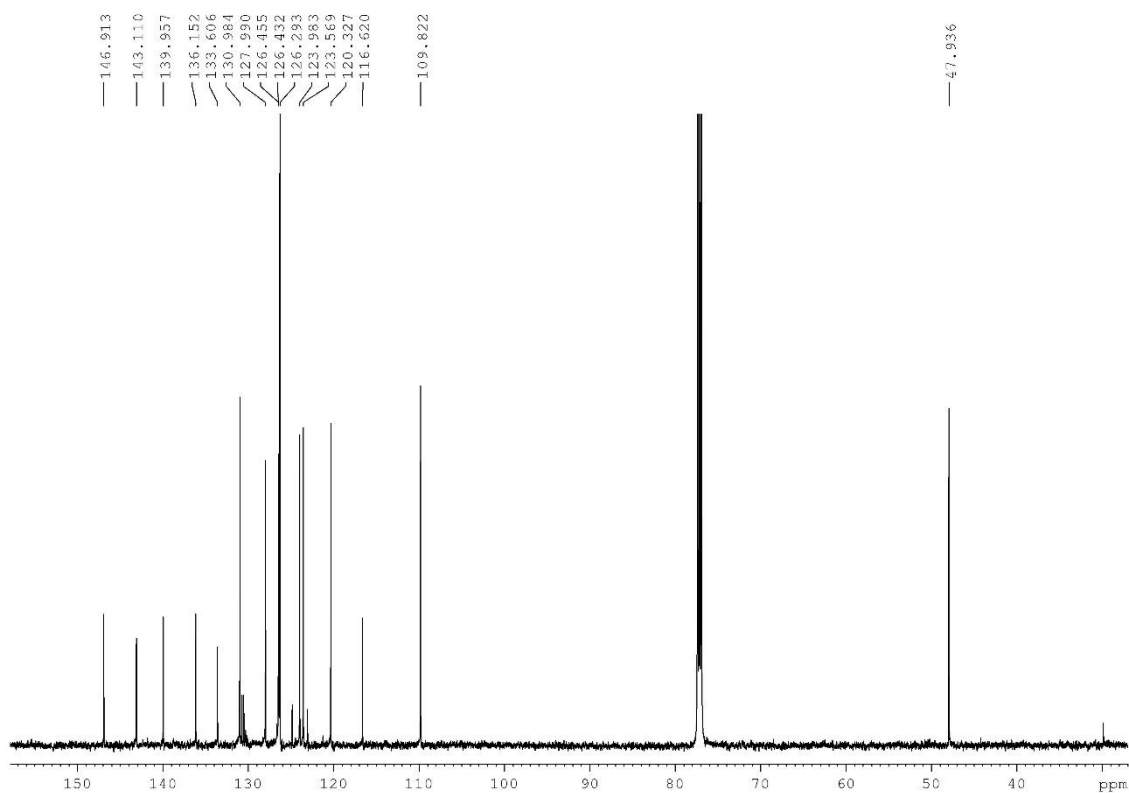


Figura A4.5. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **27** en CDCl_3 .

1.3. Compuesto 28

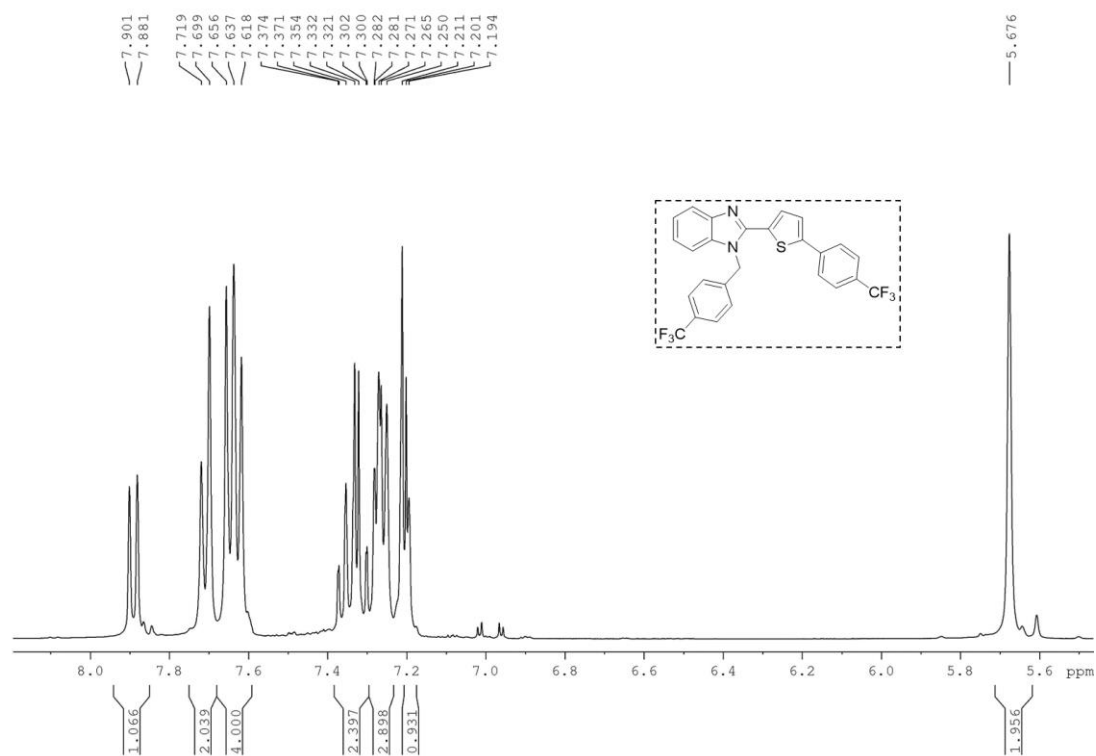


Figura A4.6. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **28** en CDCl_3 .

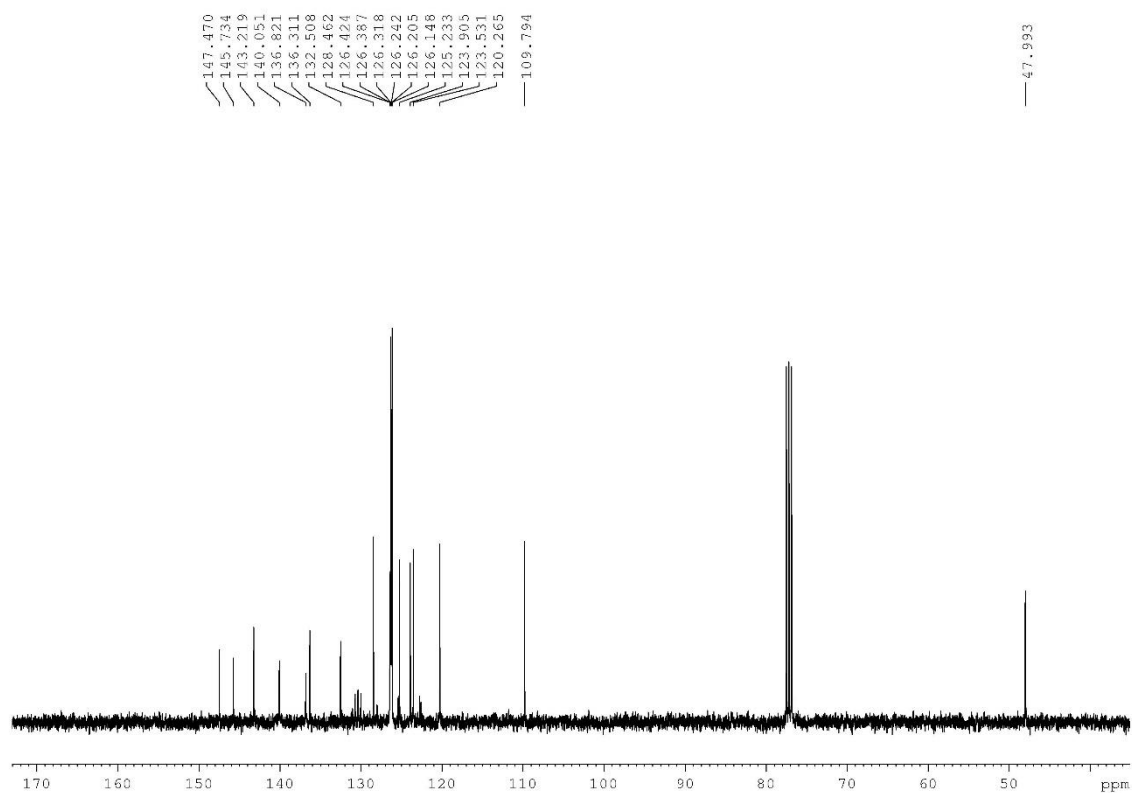


Figura A4.7. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **28** en CDCl_3 .

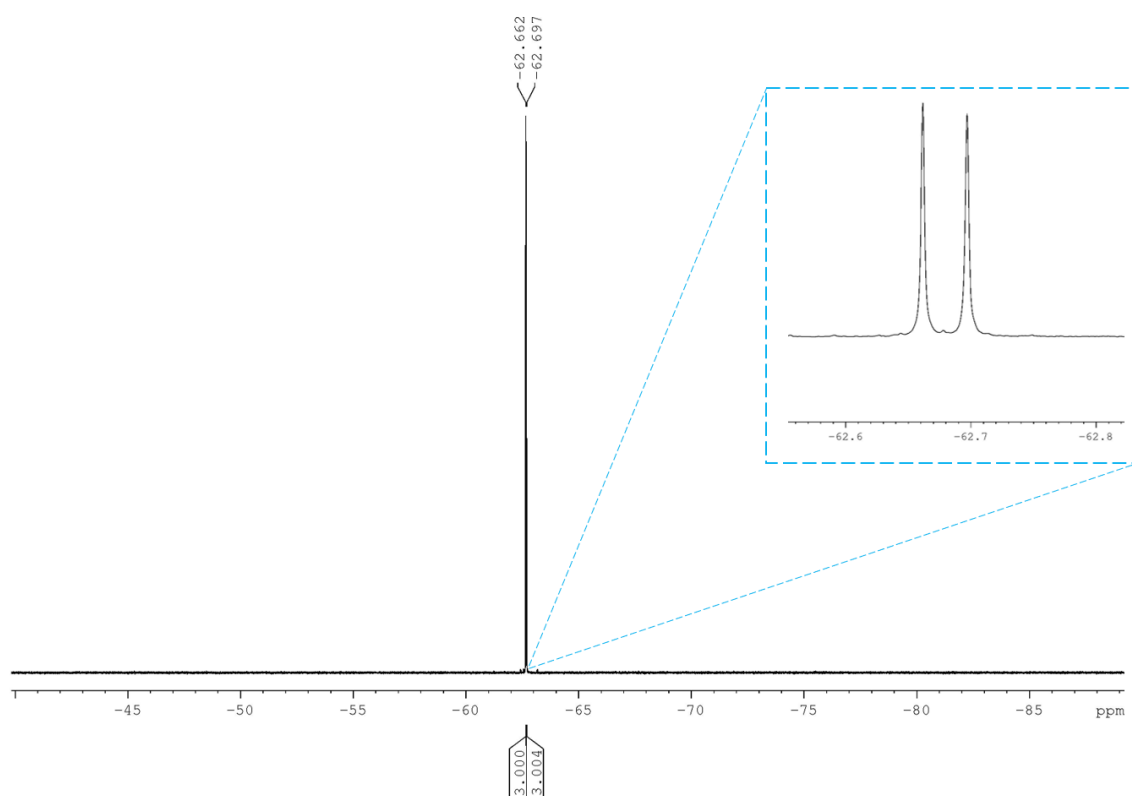
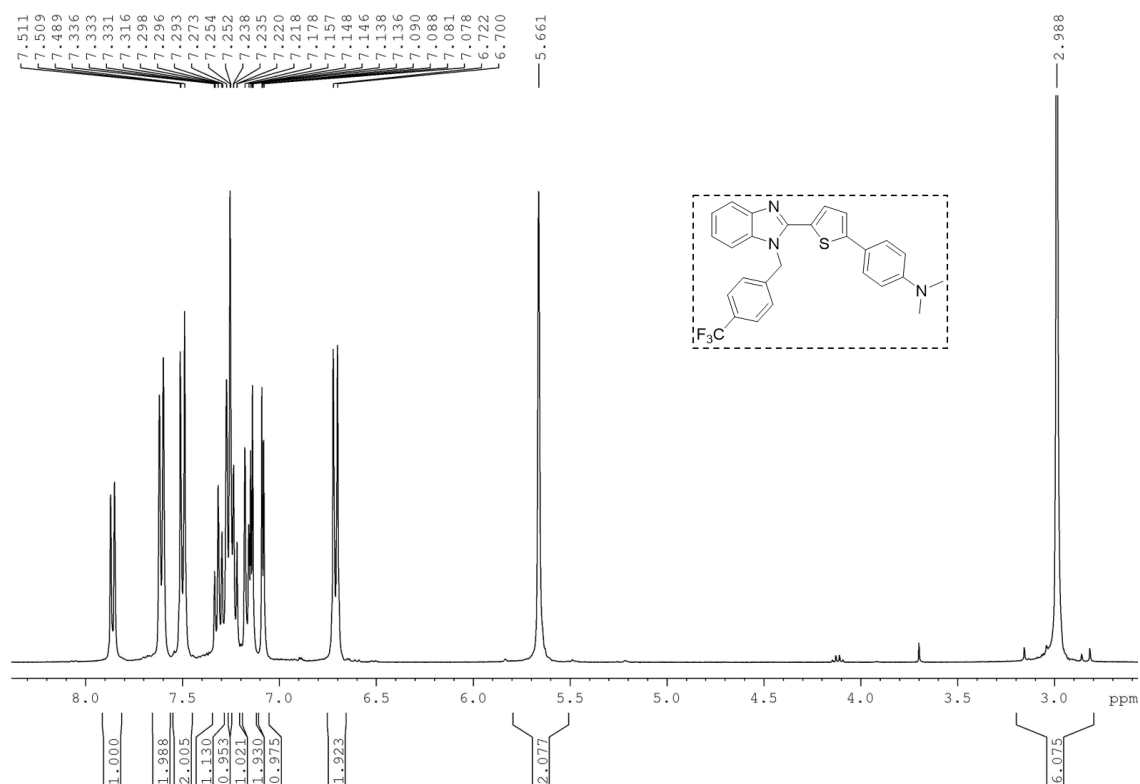
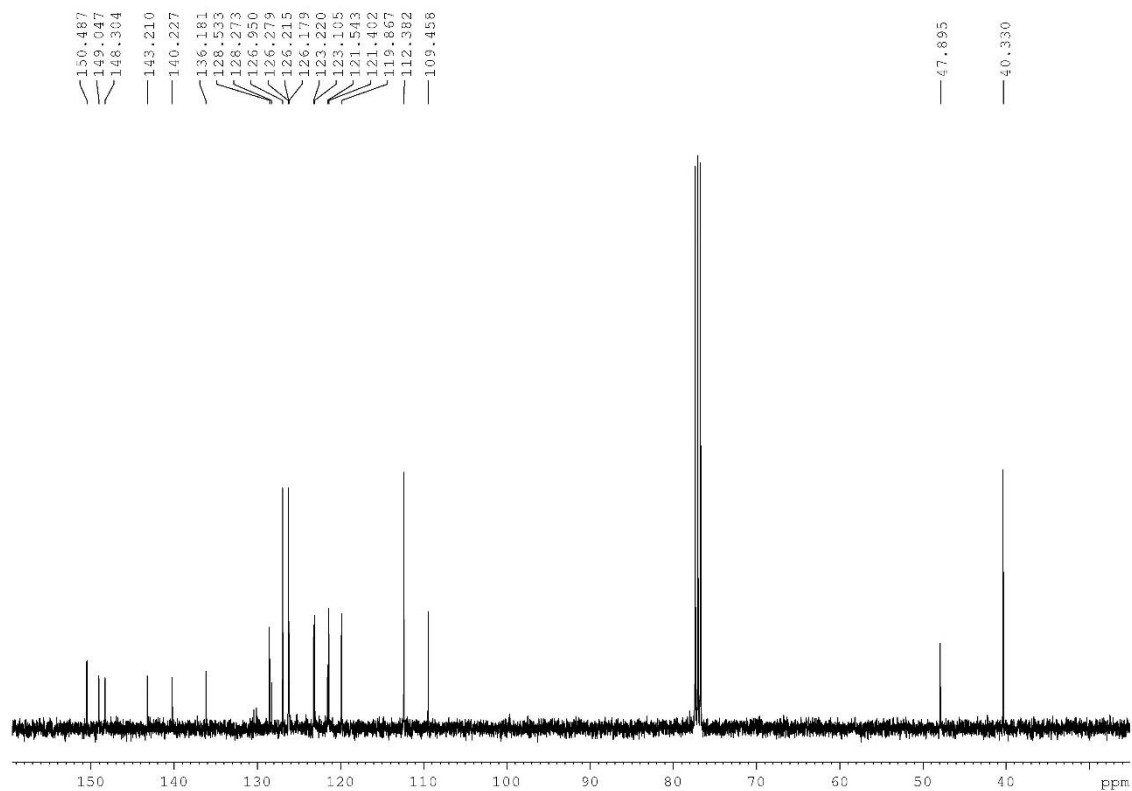


Figura A4.8. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **28** en CD_2Cl_2 .

1.4. Compuesto 29

Figura A4.9. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 29 en CDCl₃.Figura A4.10. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 29 en CDCl₃.

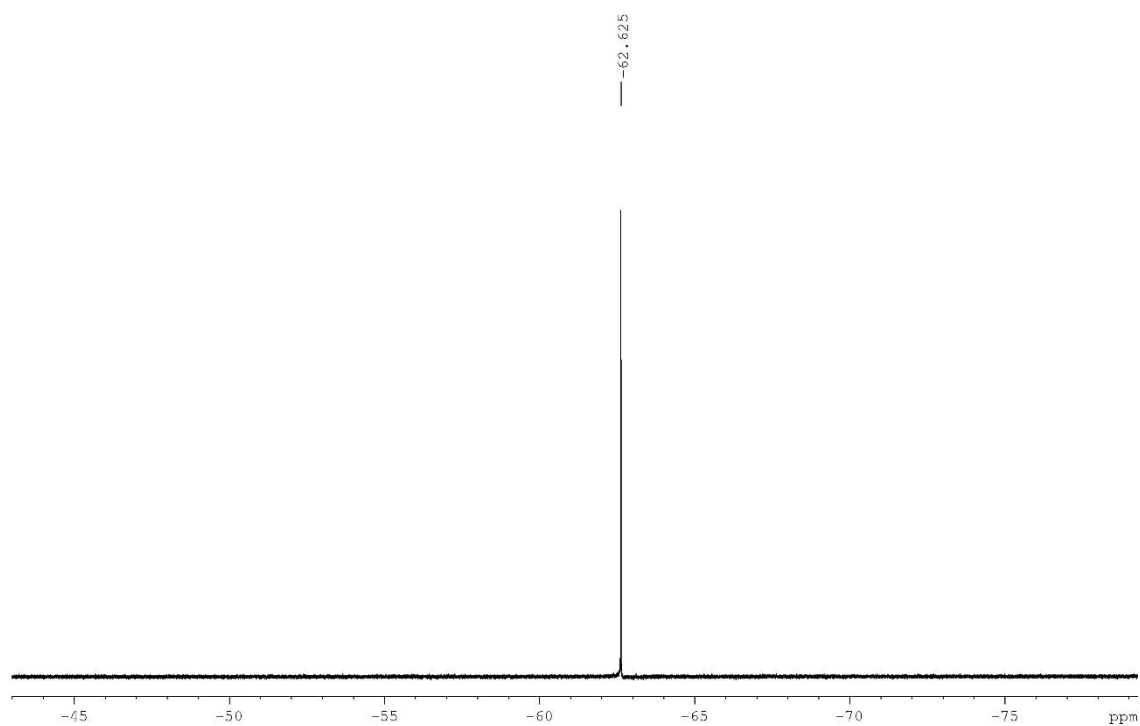


Figura A4.11. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **29** en CDCl_3 .

1.5. Compuesto 30

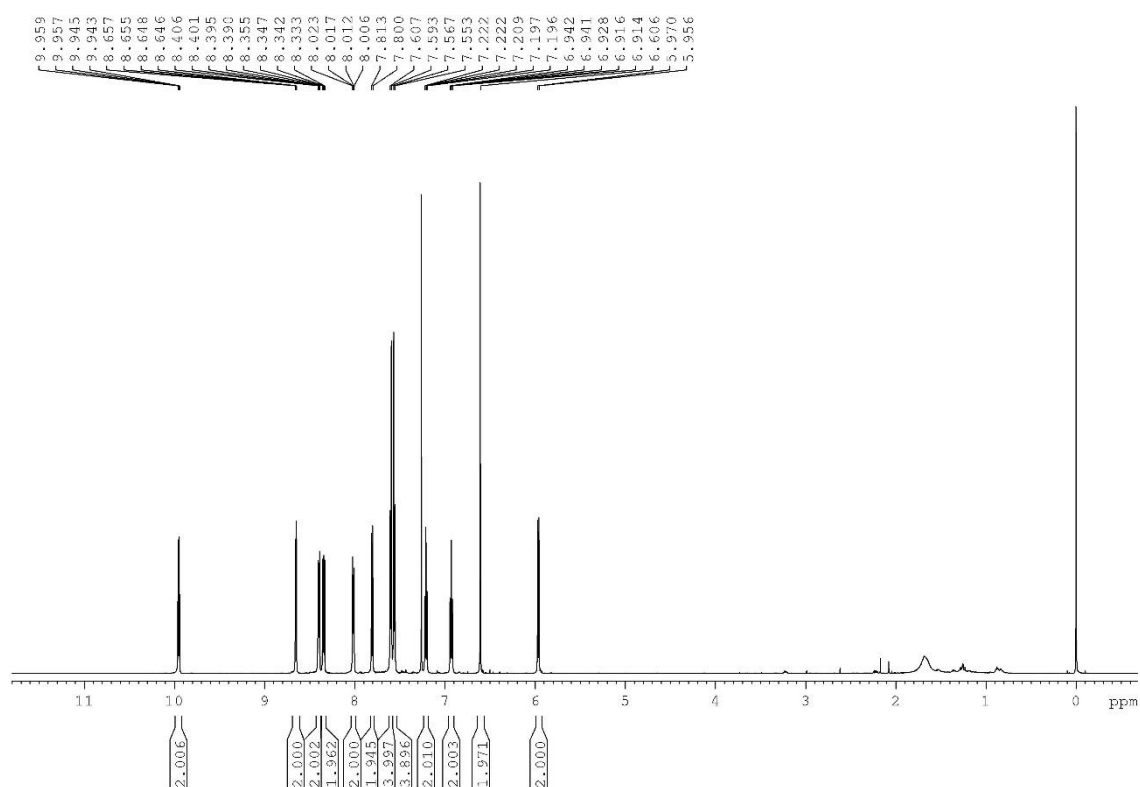


Figura A4.12. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **30** en CDCl_3 .

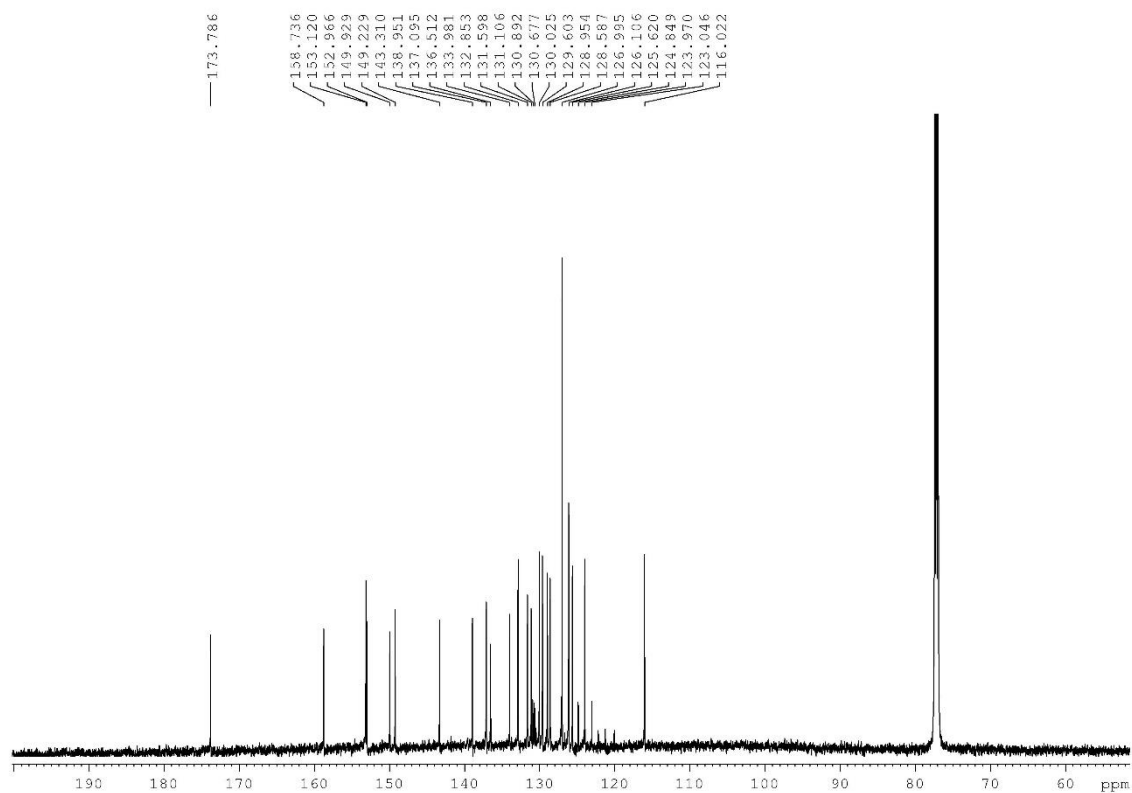


Figura A4.13. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **30** en CDCl_3 .

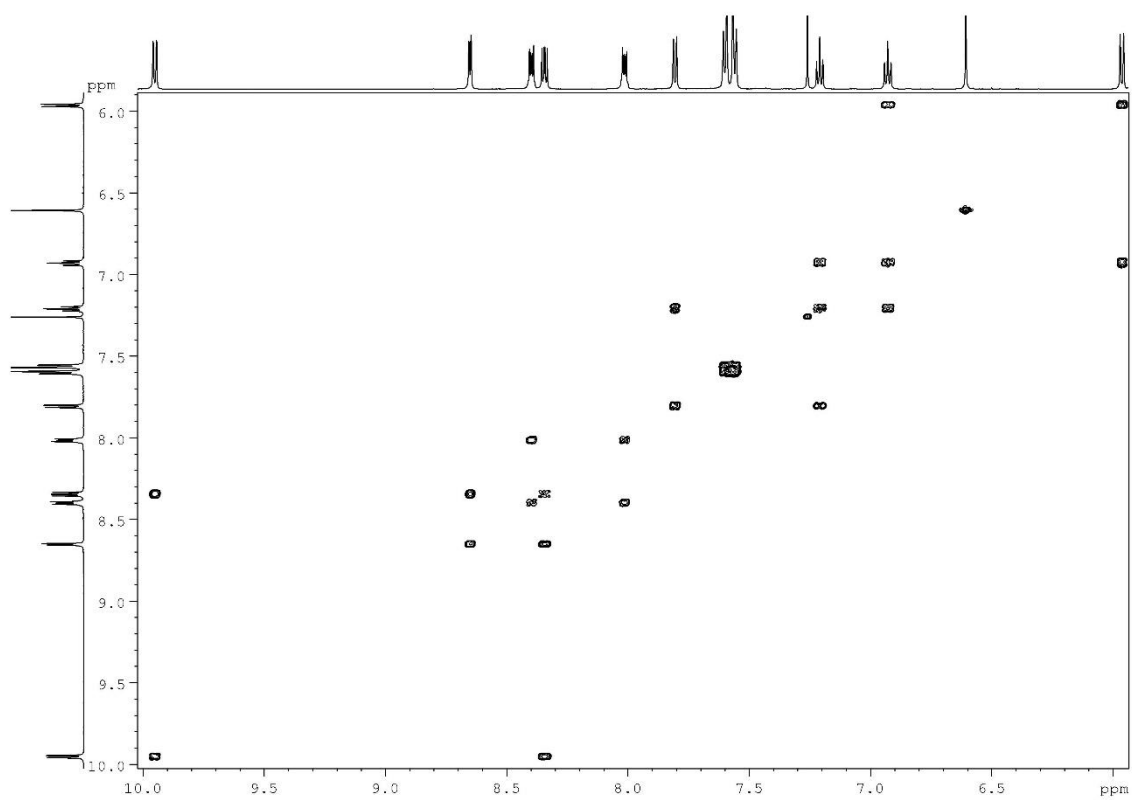


Figura A4.14. Espectro de $[\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **30** en CDCl_3 .

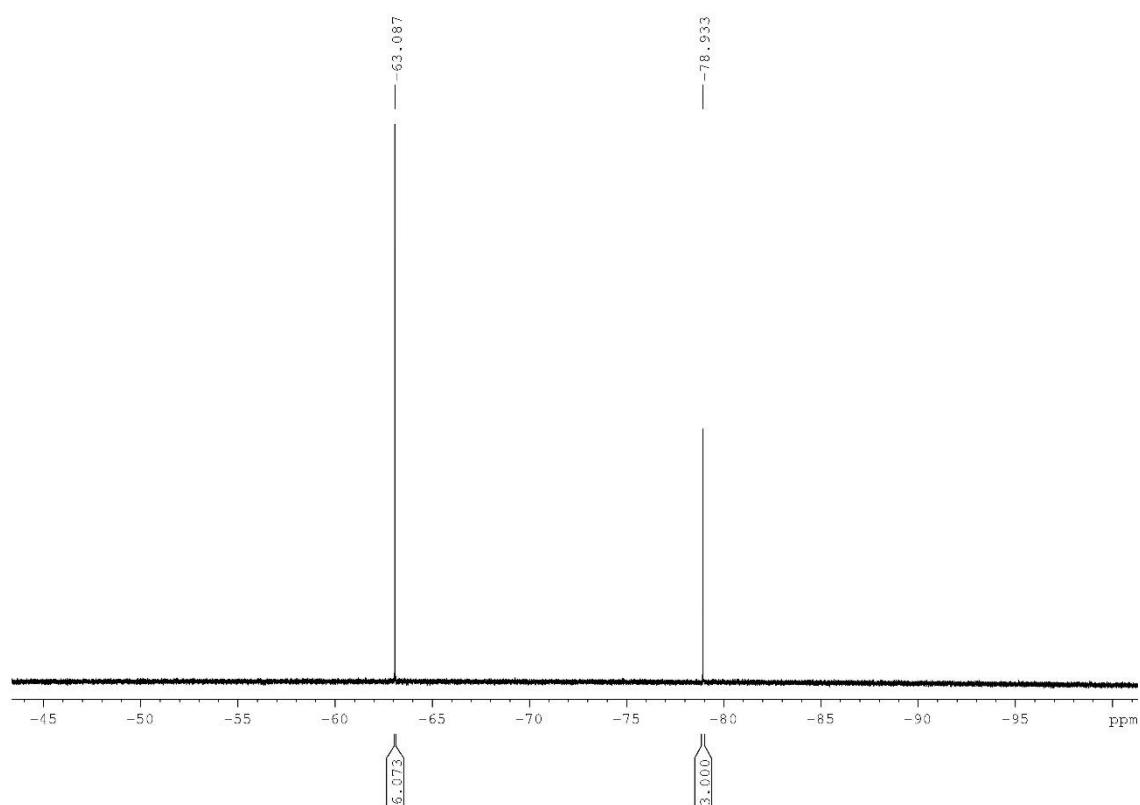


Figura A4.15. Espectro de ¹⁹F-RMN del compuesto **30** en CD₂Cl₂.

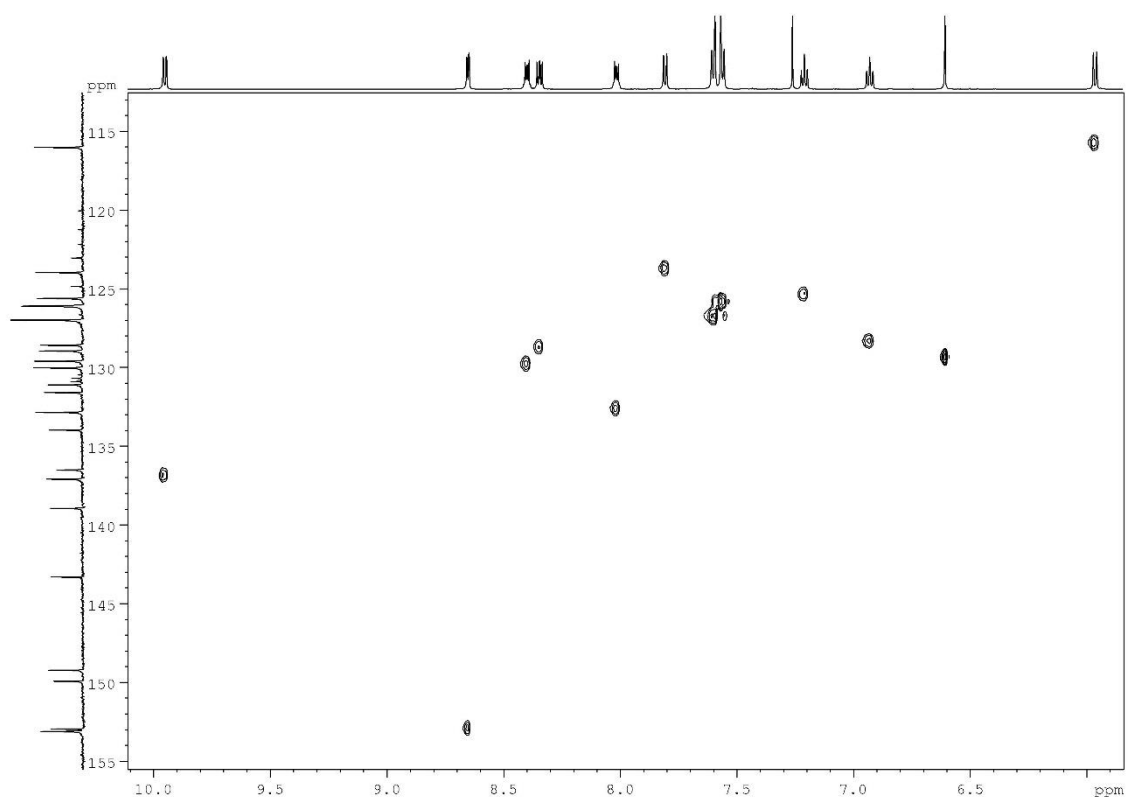


Figura A4.16. Espectro de [¹H-¹³C]-HSQC del compuesto **30** en CDCl₃.

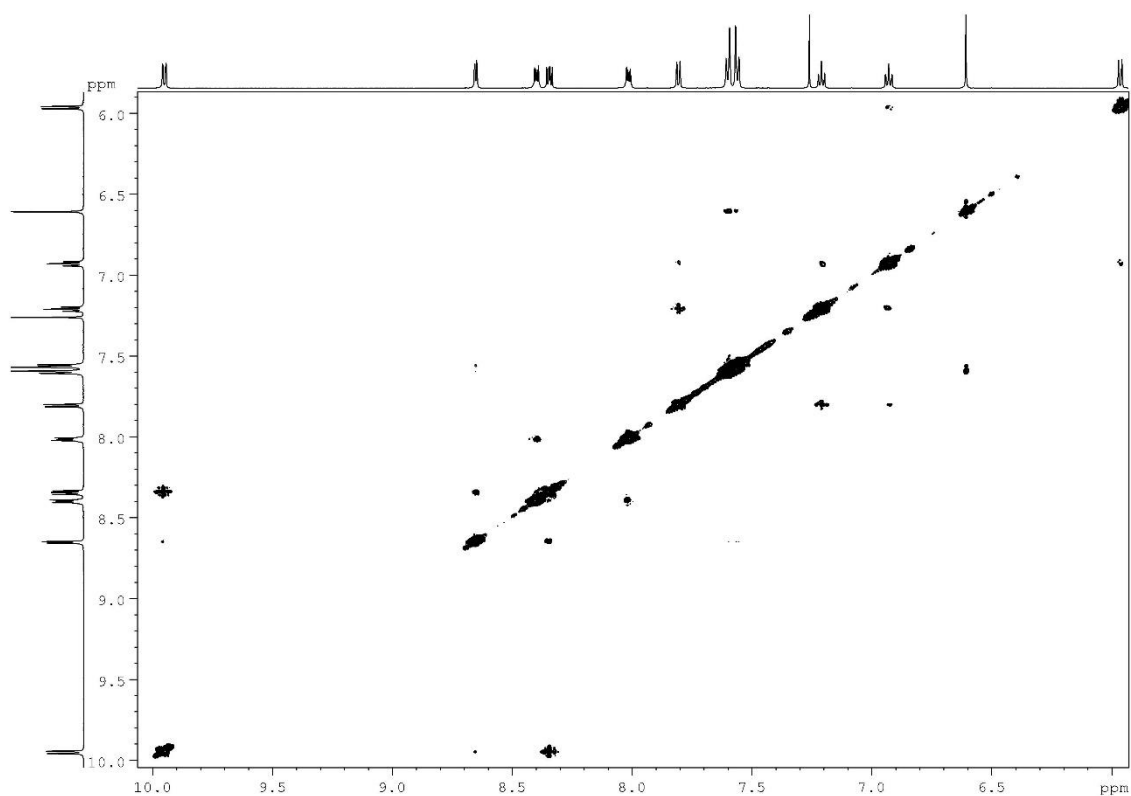


Figura A4.17. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY del compuesto **30** en CDCl_3 .

1.6. Compuesto 31

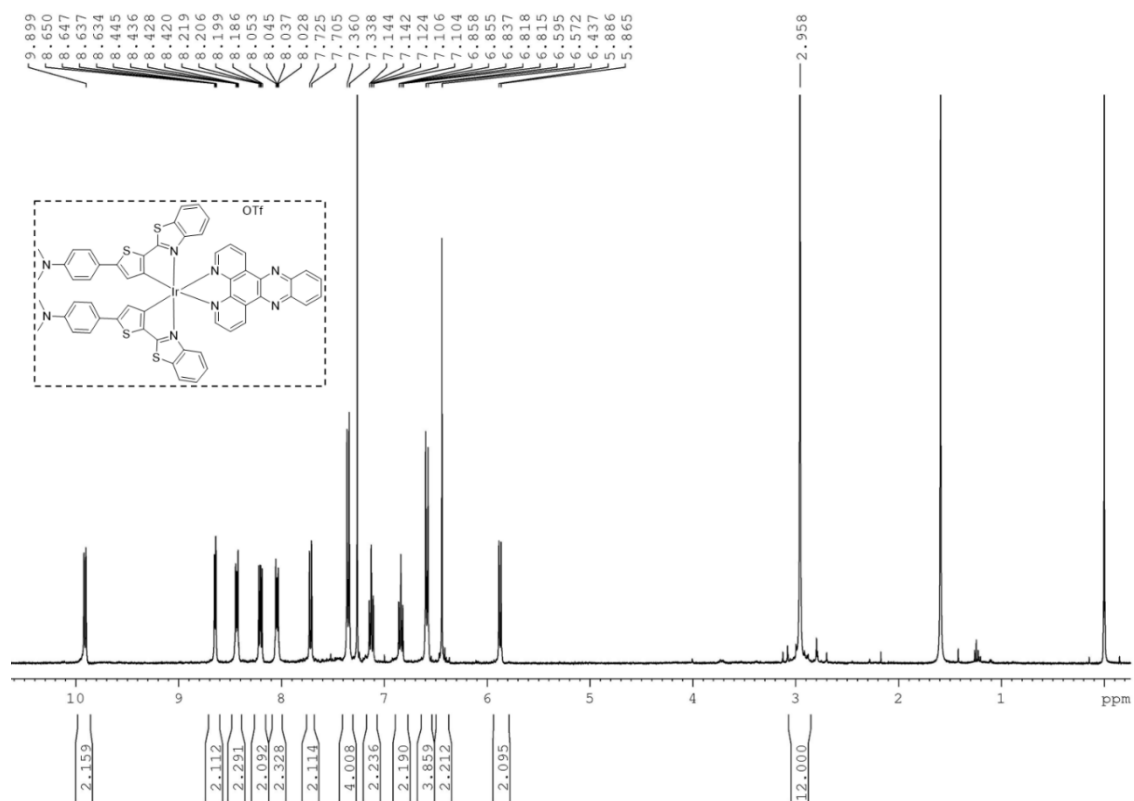


Figura A4.18. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **31** en CDCl_3 .

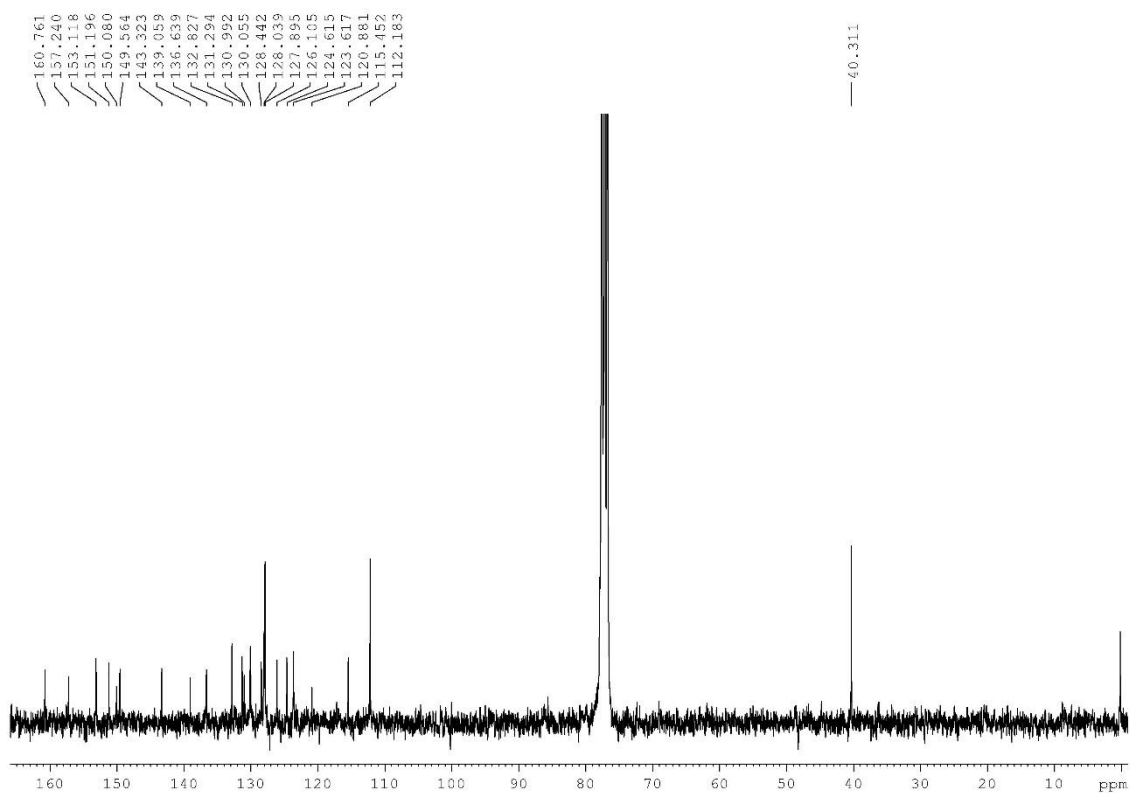


Figura A4.19. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **31** en CDCl_3 .

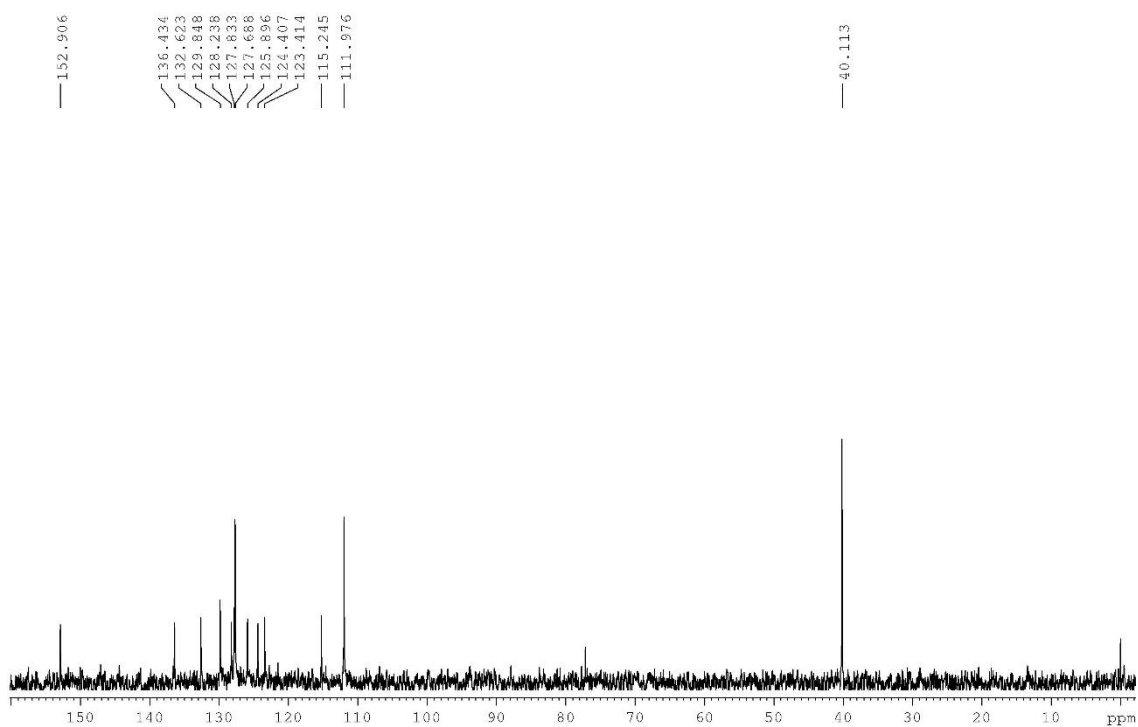


Figura A4.20. Espectro de DEPT-135 del compuesto **31** en CDCl_3 .

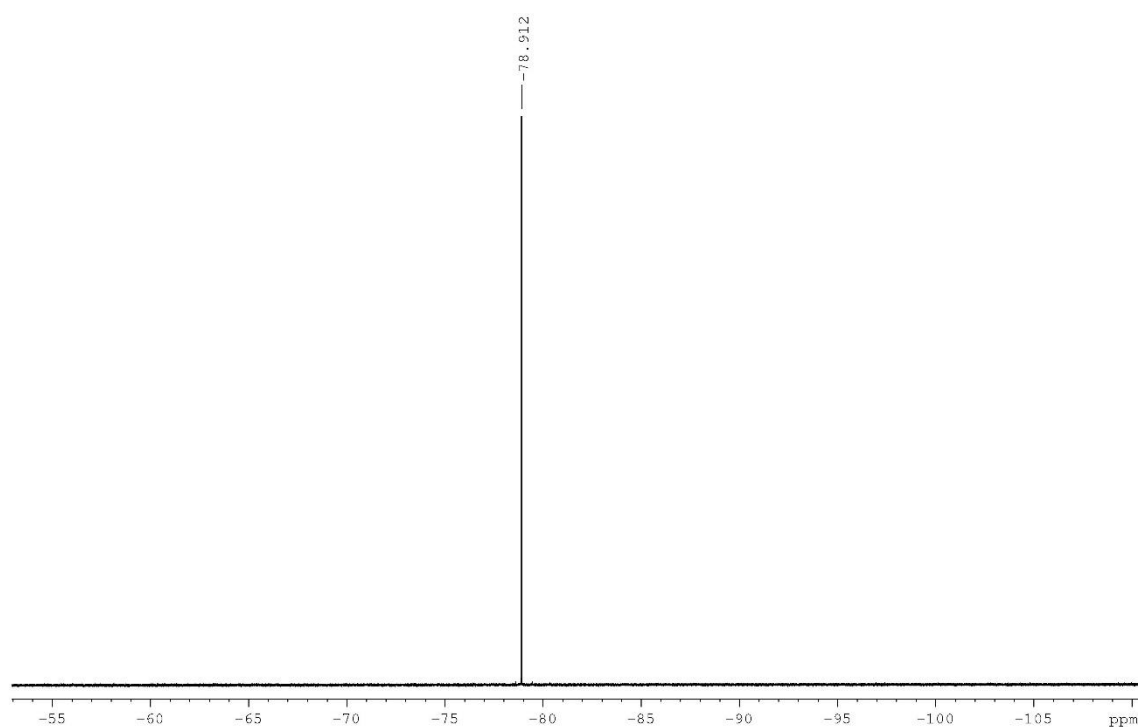


Figura A4.21. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **31** en CDCl_3 .

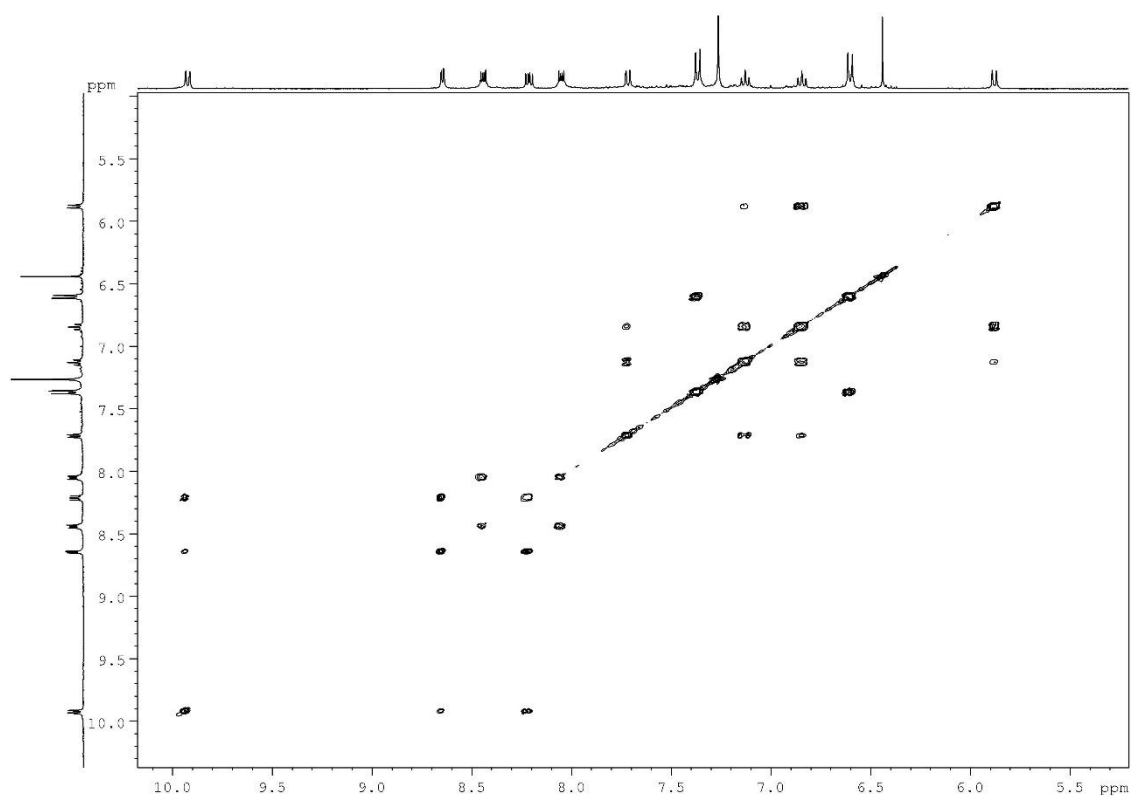
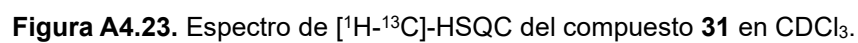


Figura A4.22. Espectro de $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **31** en CDCl_3 .



1.7. Compuesto 32



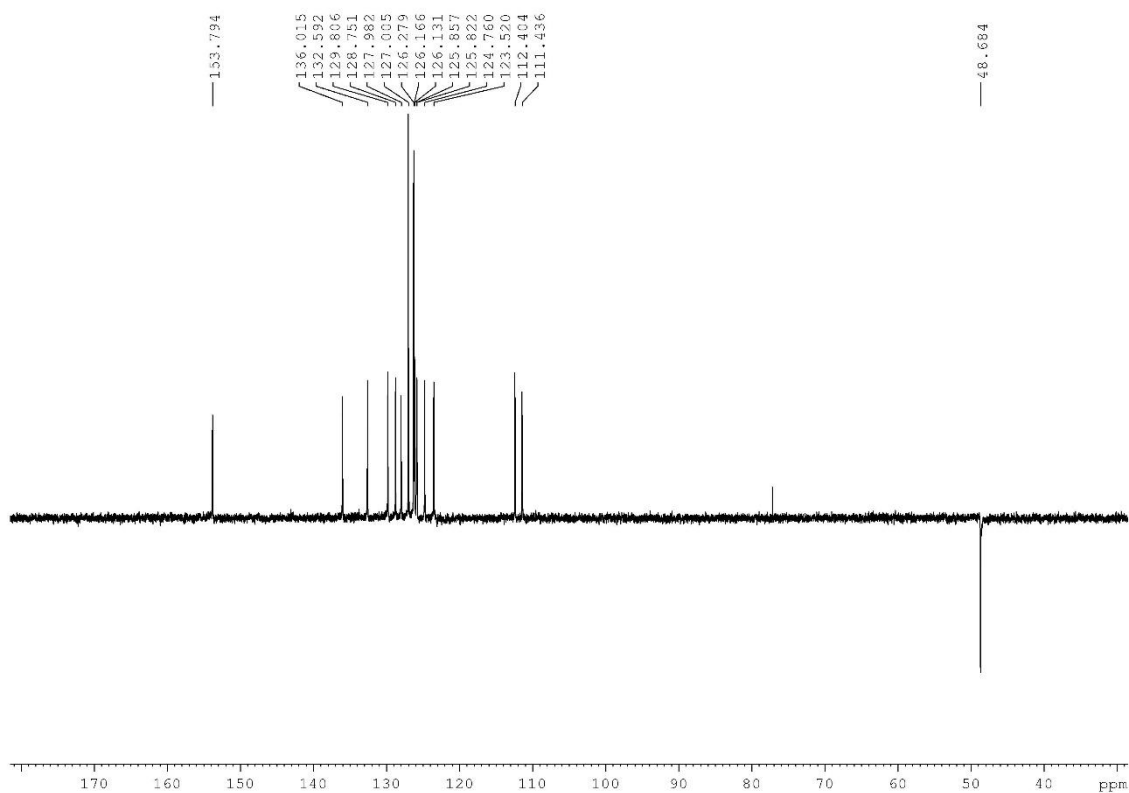


Figura A4.25. Espectro de DEPT-135 del compuesto **32** en CDCl_3 .

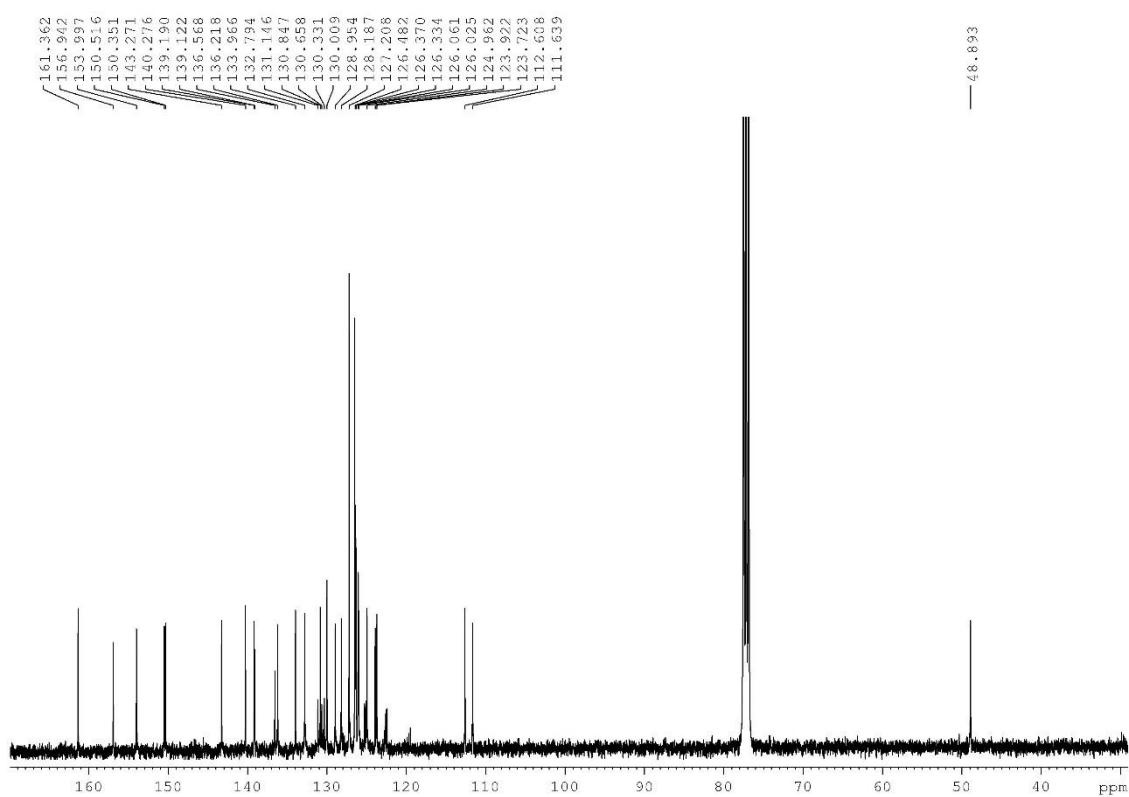


Figura A4.26. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **32** en CDCl_3 .

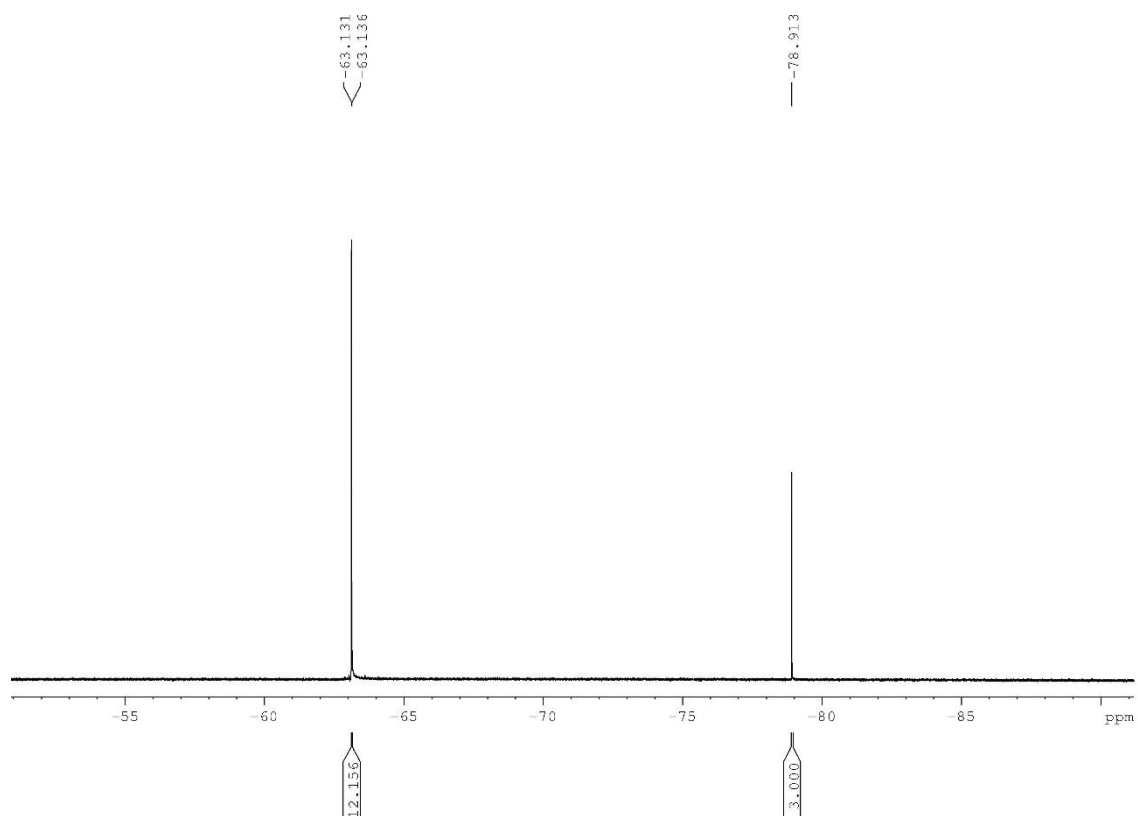


Figura A4.27. Espectro de ^{19}F -RMN del compuesto **32** en CDCl_3 .

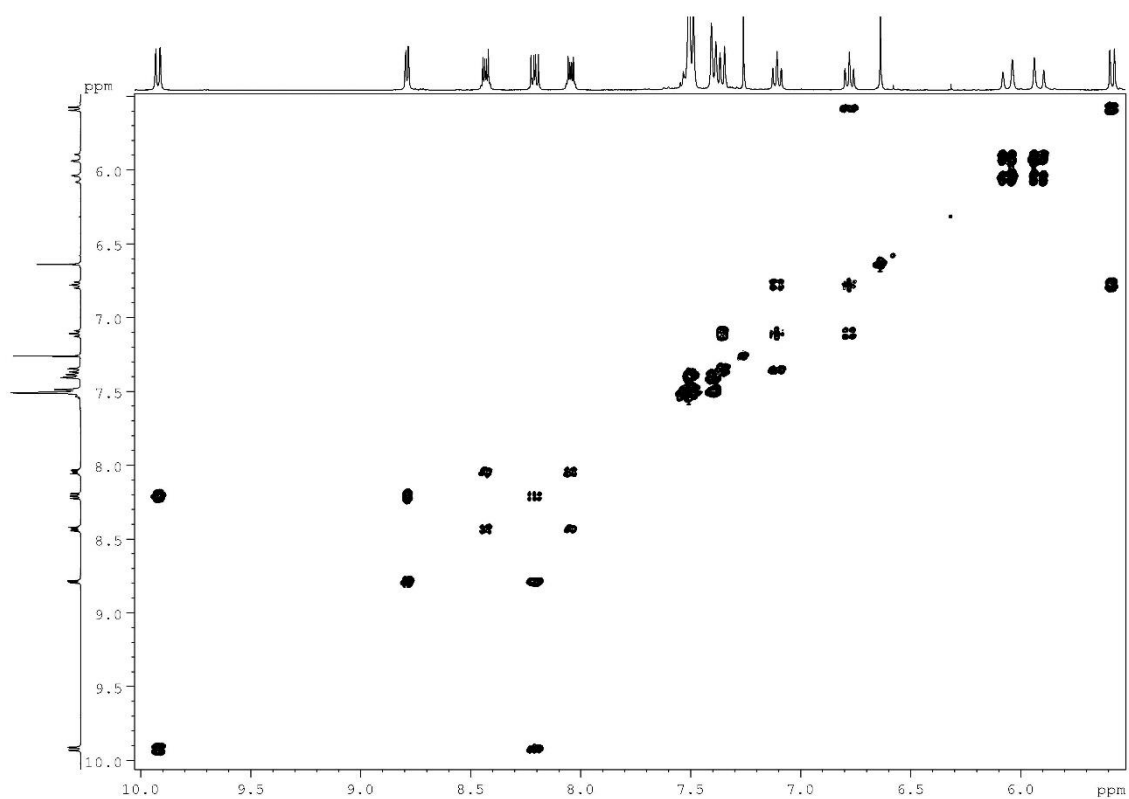


Figura A4.28. Espectro de $[^1\text{H}\text{-}^1\text{H}]$ -COSY del compuesto **32** en CDCl_3 .

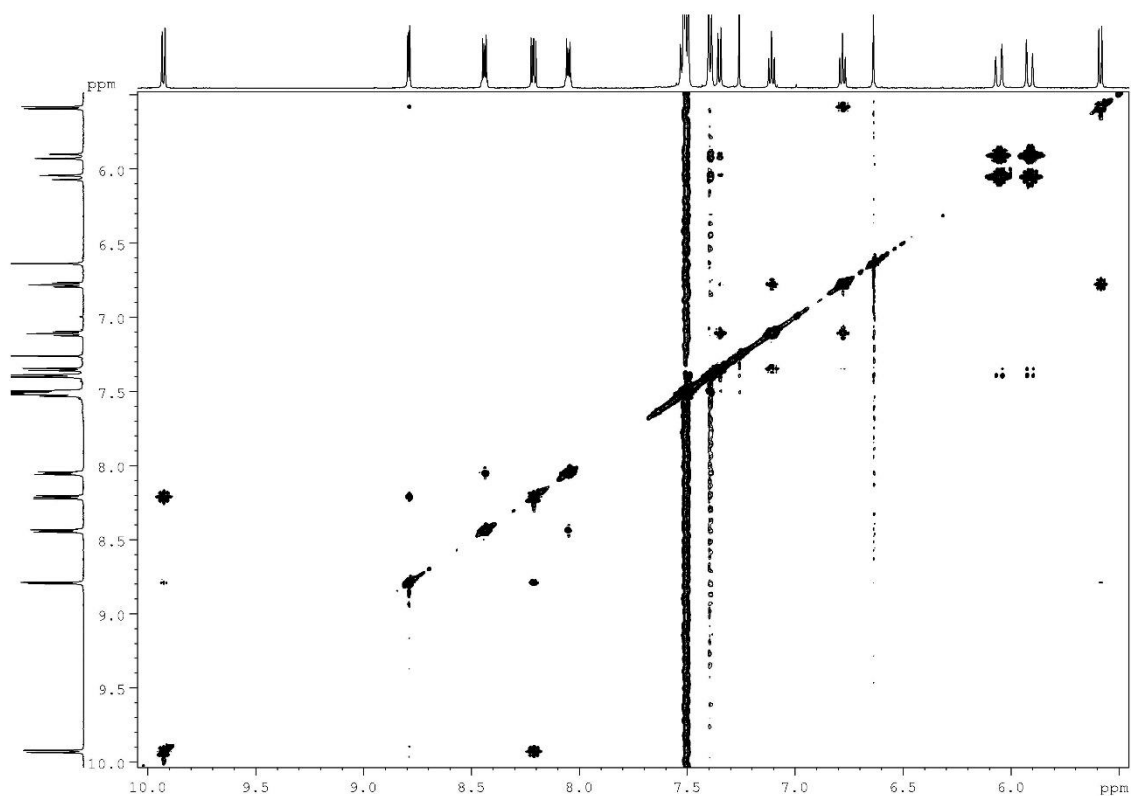


Figura A4.29. Espectro de [^1H - ^1H]-NOESY del compuesto **32** en CDCl_3 .

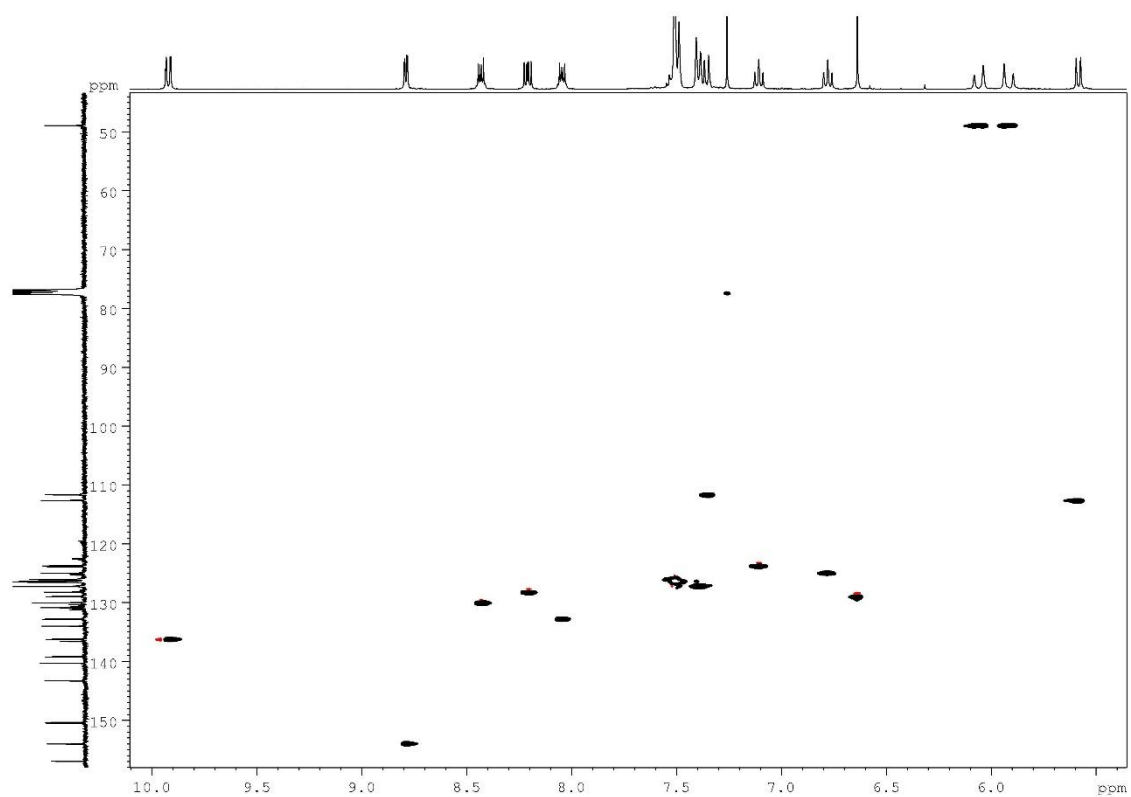
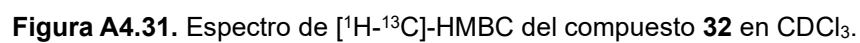


Figura A4.30. Espectro de [^1H - ^{13}C]-HSQC del compuesto **32** en CDCl_3 .



A106



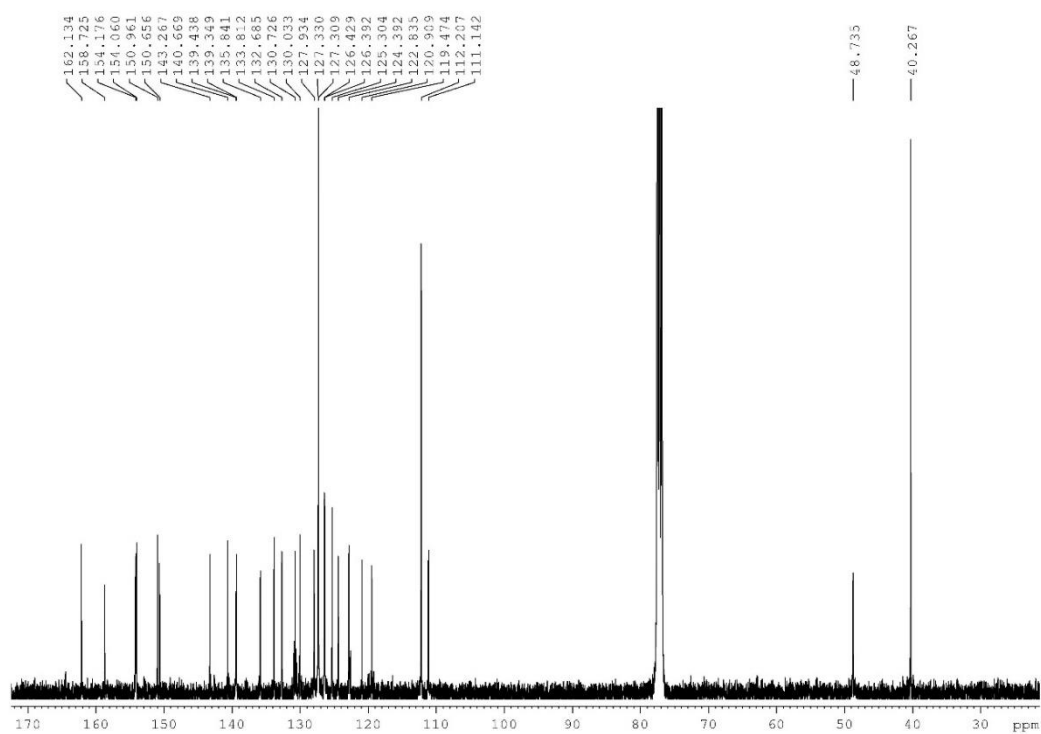


Figura A4.33. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **33** en CDCl_3 .

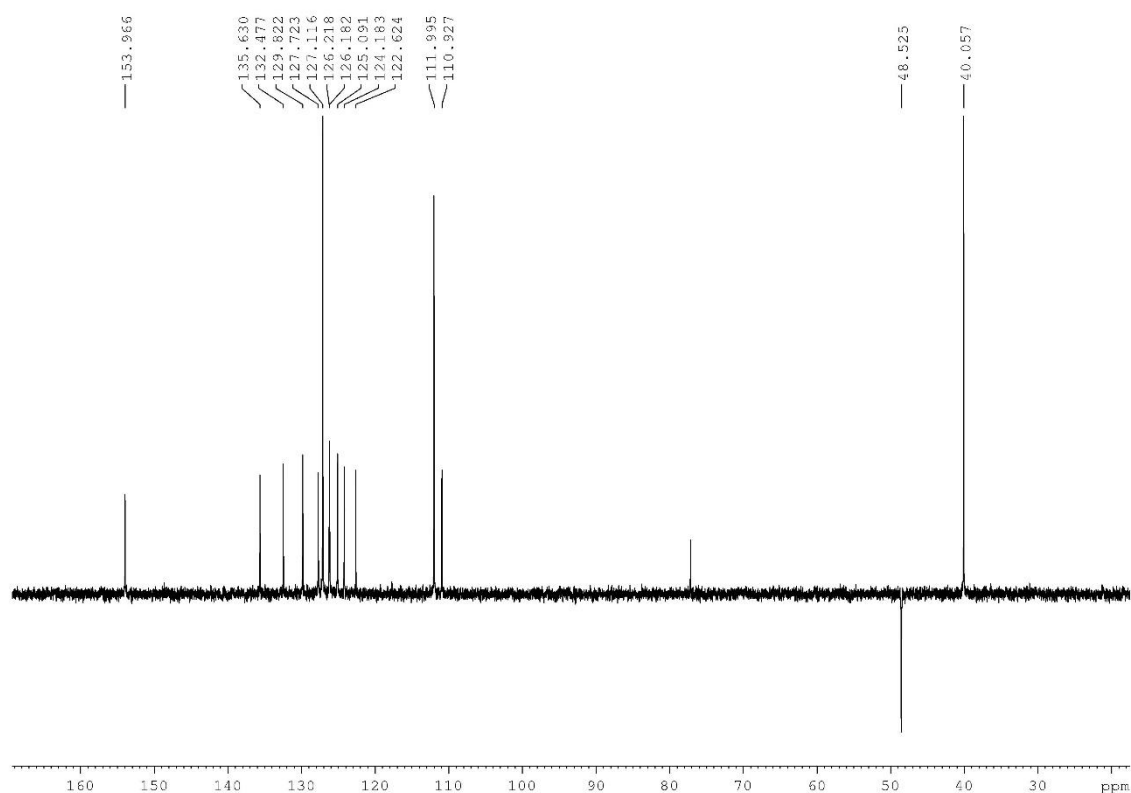


Figura A4.34. Espectro de DEPT-135 del compuesto **33** en CDCl_3 .

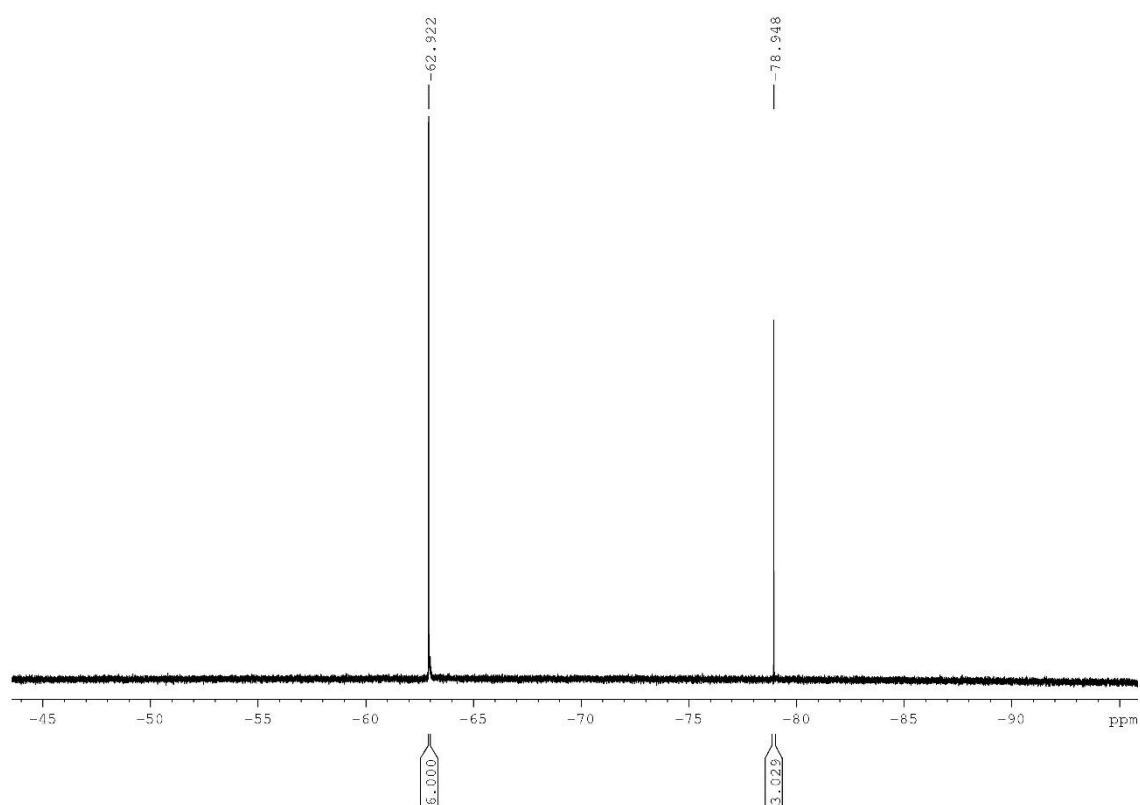


Figura A4.35. Espectro de ¹⁹F-RMN del compuesto **33** en CDCl₃.

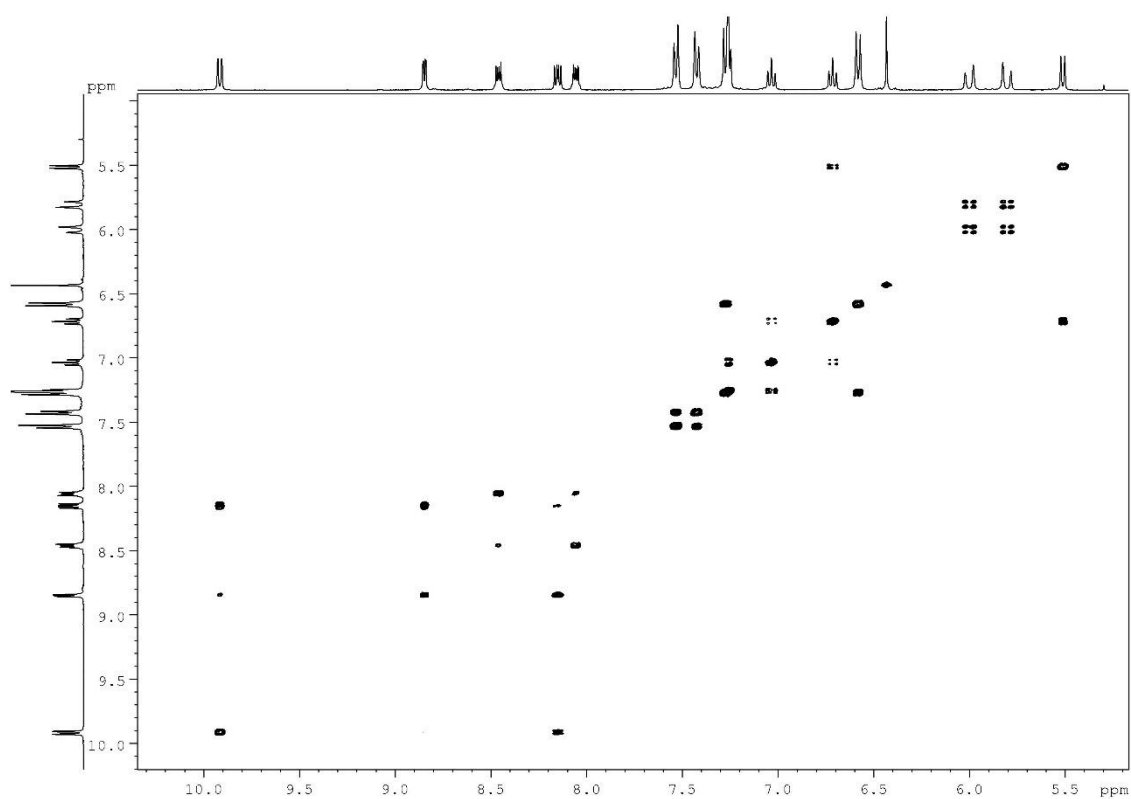


Figura A4.36. Espectro de [¹H-¹H]-COSY del compuesto **33** en CDCl₃.

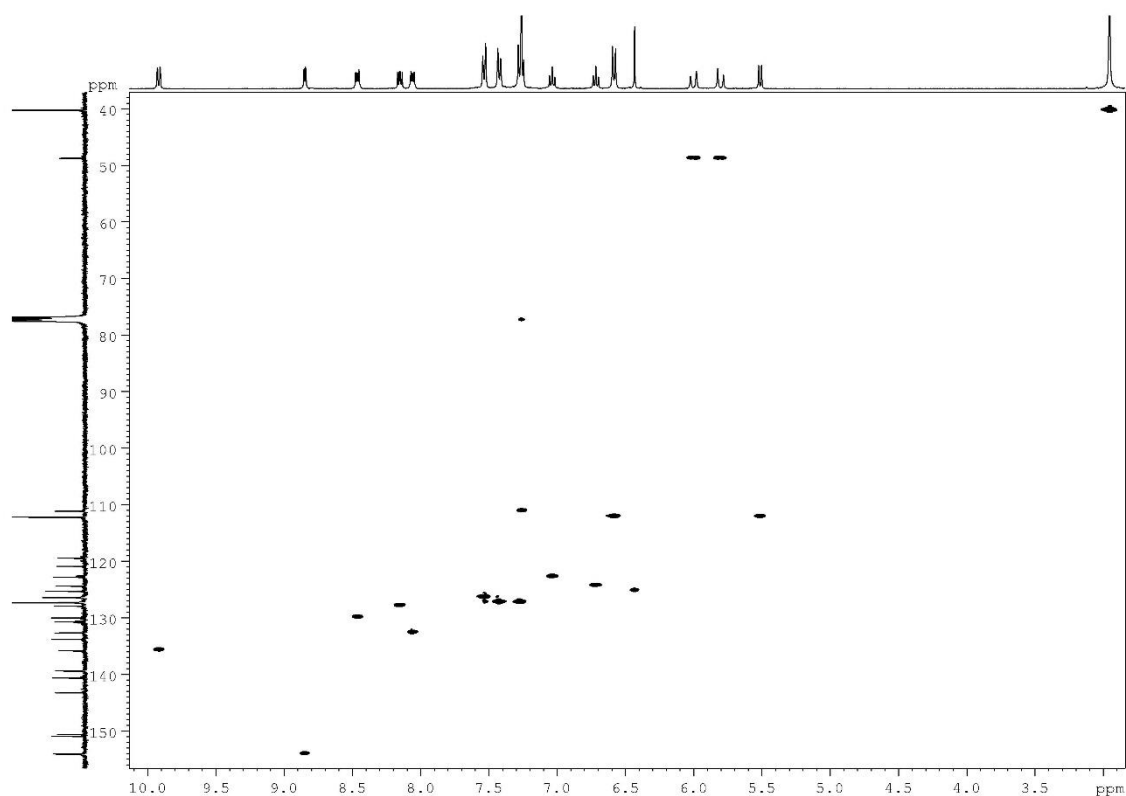


Figura A4.37. Espectro de $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC del compuesto **33** en CDCl_3 .

2. Espectrometría de masas

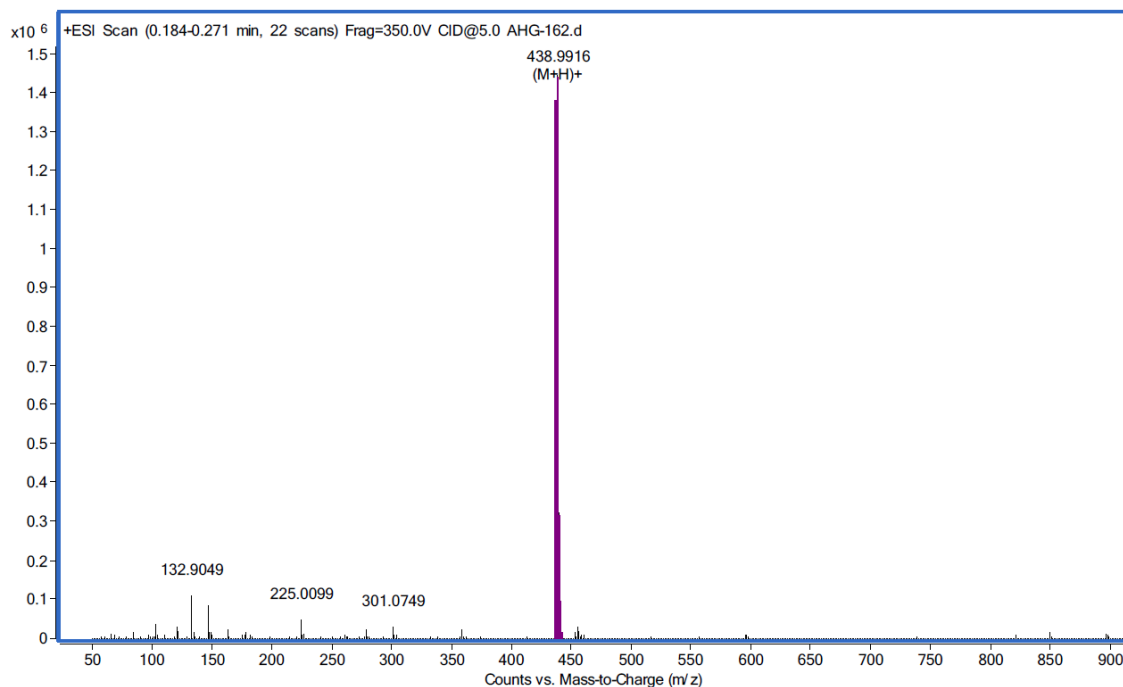


Figura A4.38. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **27**.

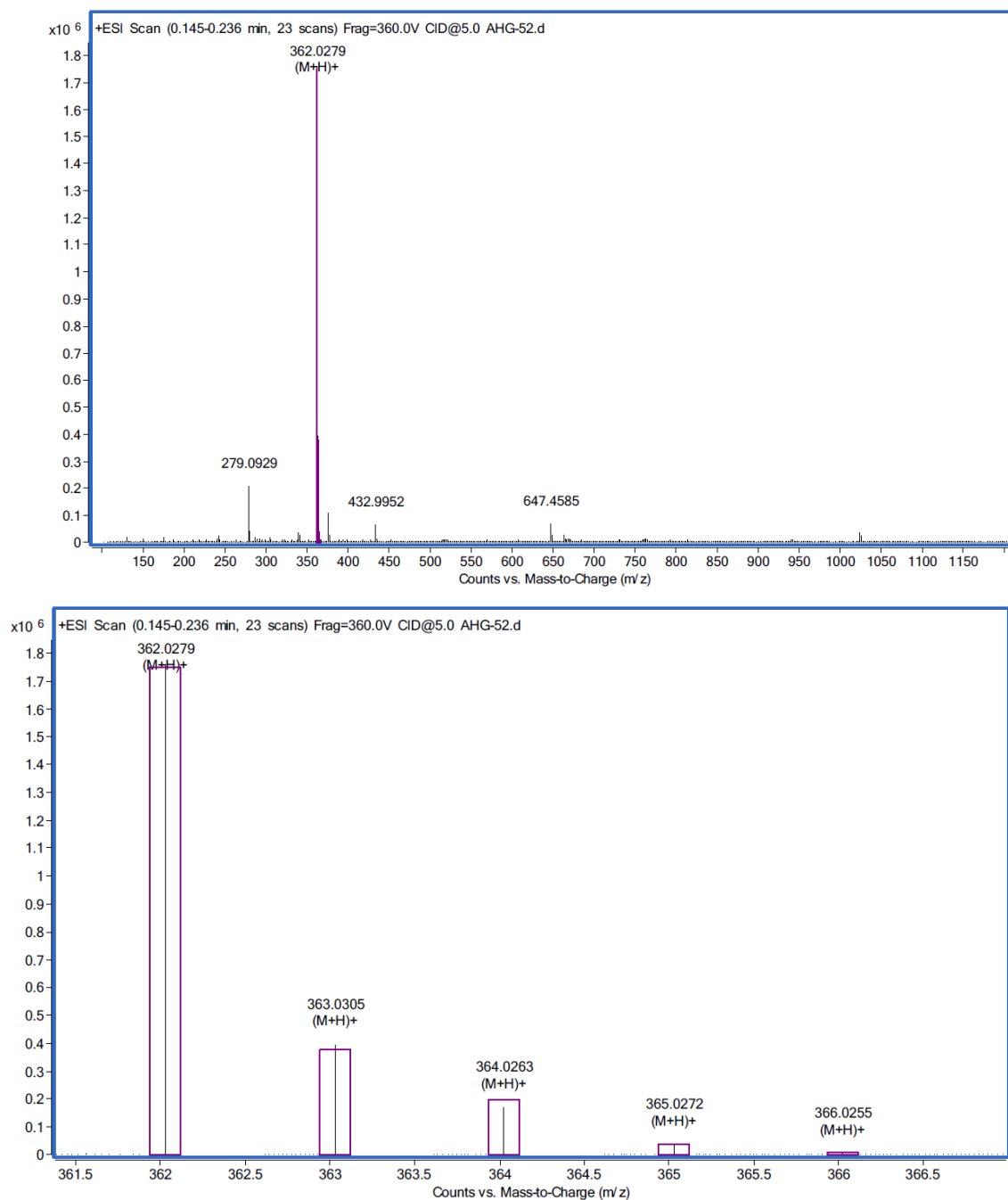


Figura A4.39. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **25**.

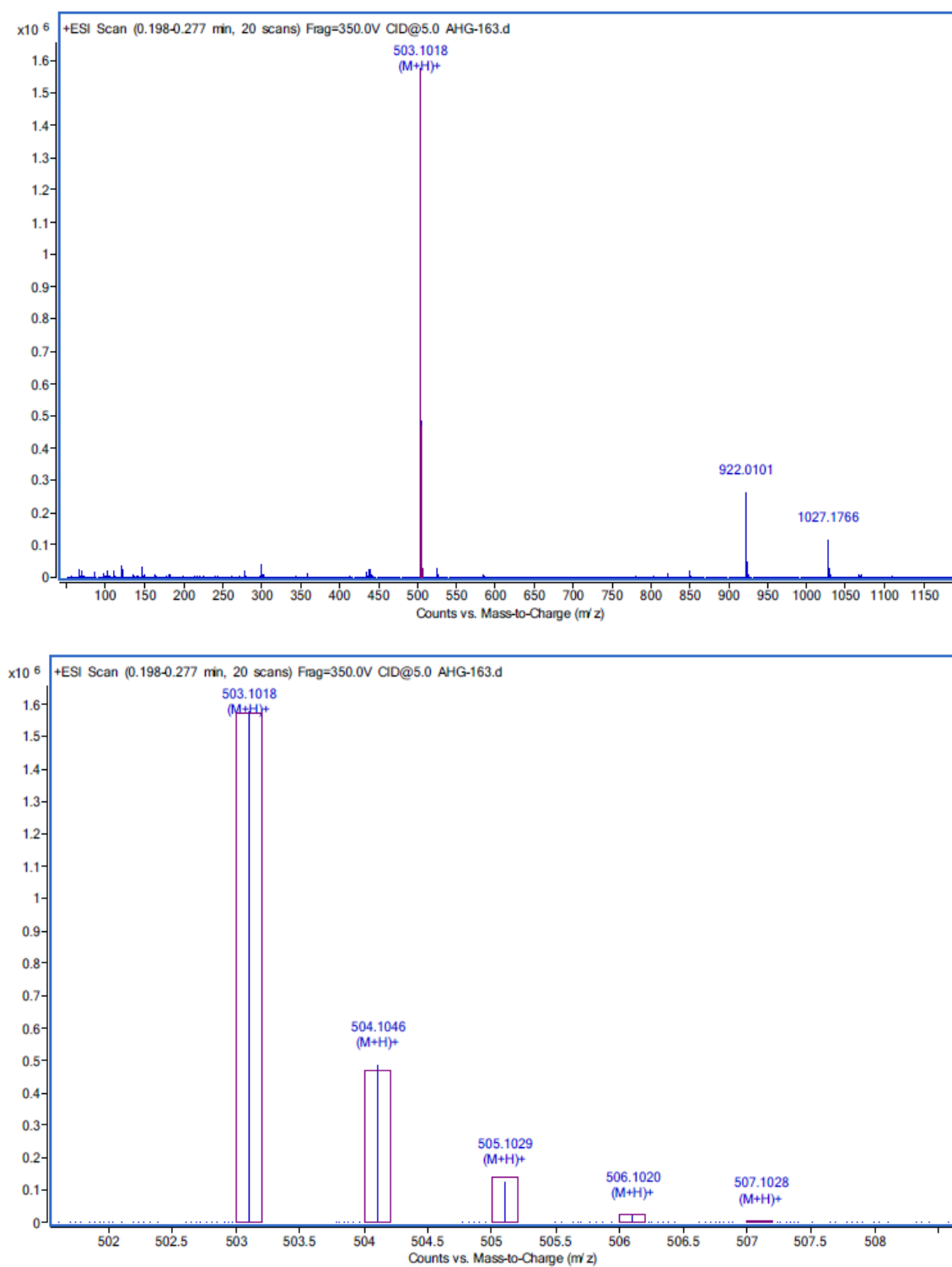


Figura A4.40. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **28**.

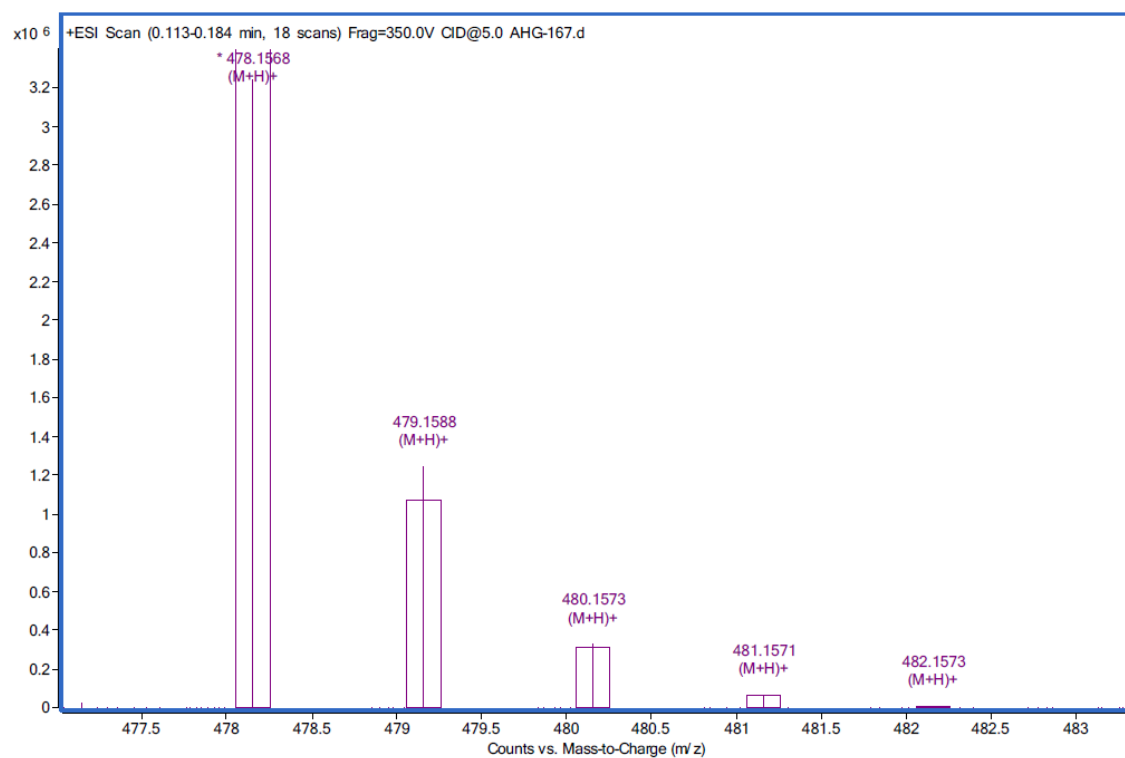
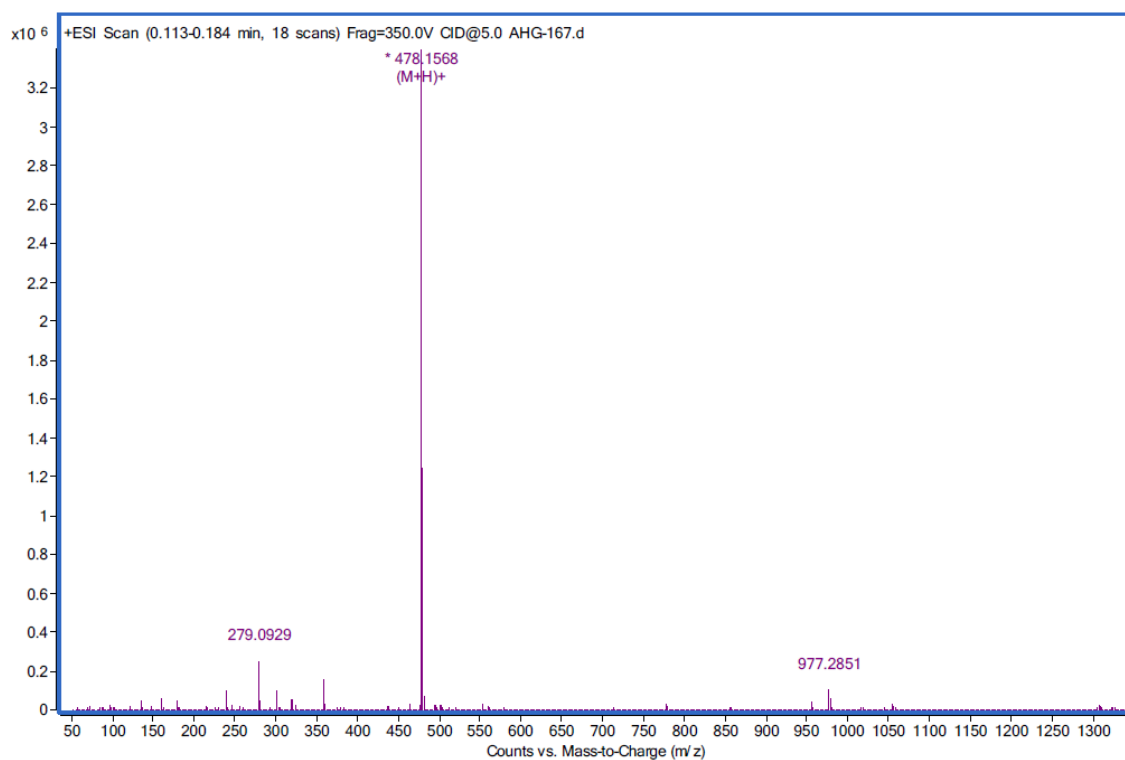


Figura A4.41. Espectro ESI-MS en modo de ionización positivo del compuesto **29**.

3. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

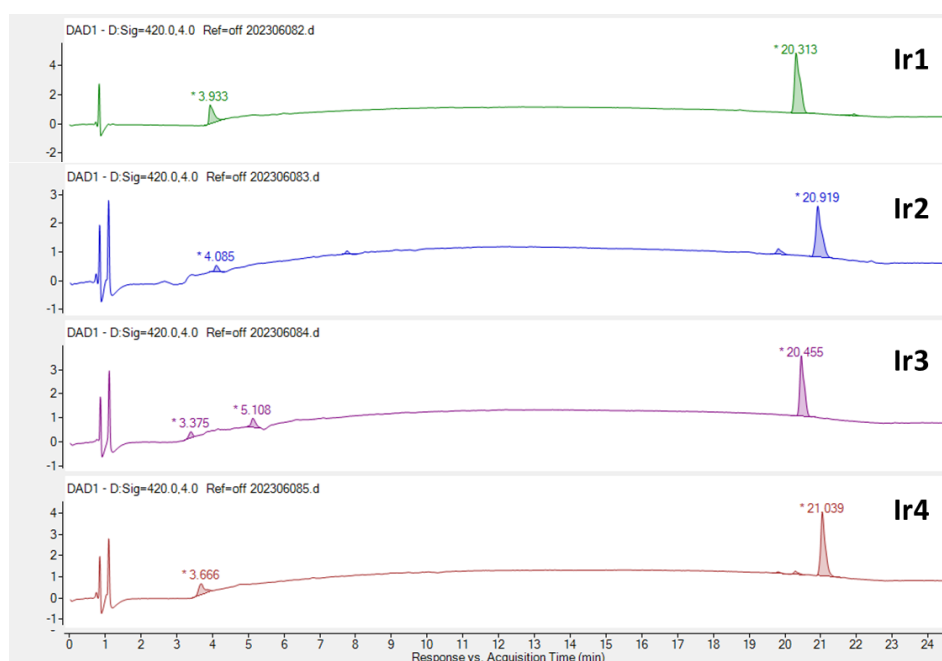


Figura A4.42. Cromatogramas de los compuestos **30-33** disueltos en CH₃CN con detección UV a 420 nm.

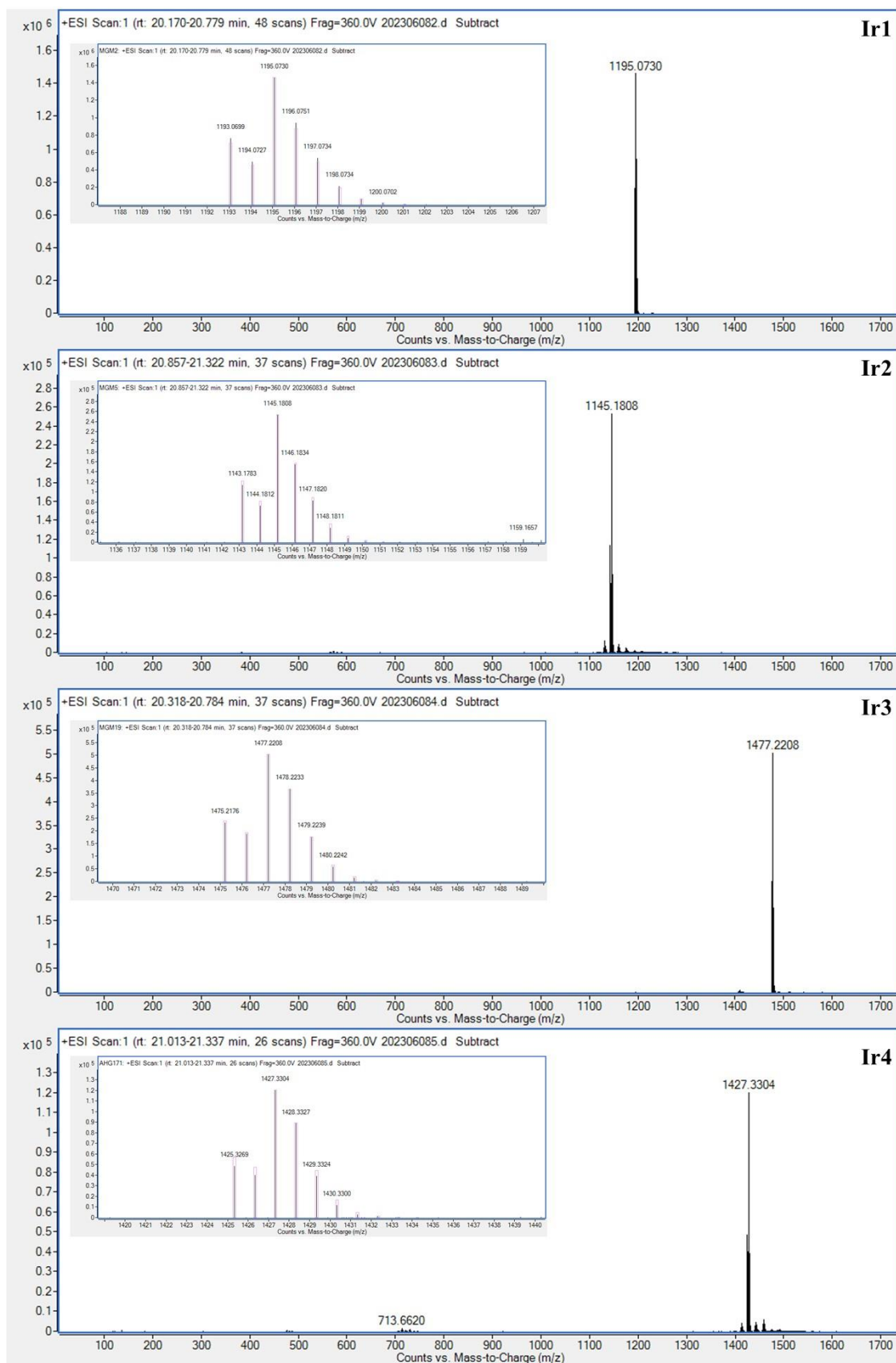


Figura A4.43. Espectro de masas de los picos a 20-21 min de los cromatogramas de la **Figura A4.42**.

4. Determinación de la estructura cristalina por rayos X

El número de referencia CCDC para el compuesto **32** es 2302438.

Tabla A4.1. Datos cristalográficos del compuesto **32**

Fórmula empírica	$C_{71}H_{40}F_{15}IrN_8O_3S_3$	
Peso molecular	1626,49	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Dimensiones celdilla unidad	$a = 14,302(7) \text{ Å}$	$\alpha = 78,870(14)^\circ$
	$b = 15,809(7) \text{ Å}$	$\beta = 66,395(15)^\circ$
	$c = 17,023(7) \text{ Å}$	$\gamma = 68,46(2)^\circ$
Volumen	$3276(3) \text{ Å}^3$	
Z	2	
Densidad (calculada)	$1,649 \text{ Mg/m}^3$	
Coeficiente de absorción	$2,233 \text{ mm}^{-1}$	
F(000)	1612	
Tamaño del cristal	$0,125 \times 0,080 \times 0,020 \text{ mm}^3$	
Rango theta para la recogida de datos	$1,642 \text{ to } 26,372^\circ$	
Rangos de índices	$-17 \leq h \leq 17, -19 \leq k \leq 19, -21 \leq l \leq 21$	
Reflexiones recogidas	193595	
Reflexiones independientes	13398 [R(int) = 0,0508]	
Integridad de Theta = 25.242°	100,0 %	
Corrección de la absorción	Semiempírica a partir de equivalentes	
Transmisión máxima y mínima	0,7457 and 0,6483	
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa F^2	
Datos / restricciones / parámetros	13398 / 1139 / 1003	
Buen ajuste de F^2	1,096	
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0478, wR2 = 0,1288$	
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0,0583, wR2 = 0,1437$	
Mayor diferencia pico-hueco	$3,062 \text{ and } -2,900 \text{ e.Å}^{-3}$	

5. Propiedades fotofísicas

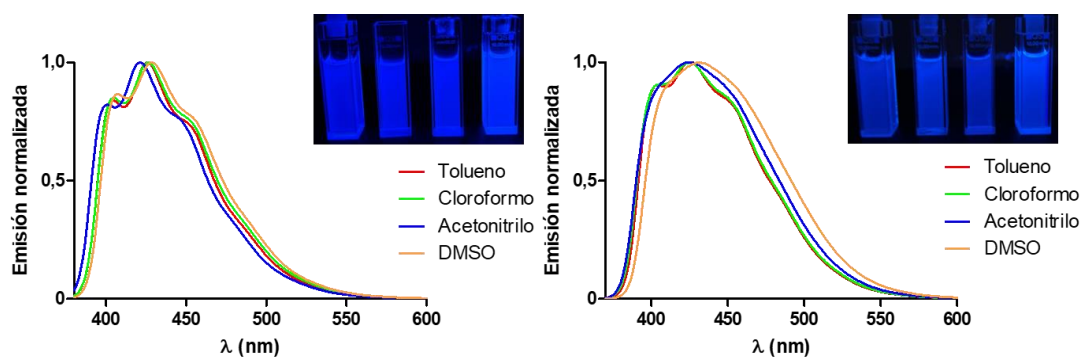


Figura A4.44. Emisión normalizada de los prolíandos **25** (izquierda) y **28** (derecha) en disolventes de distinta polaridad.

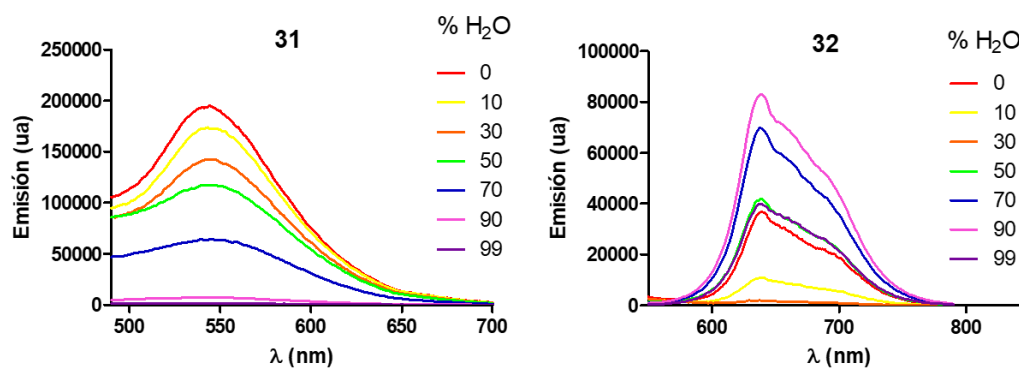


Figura A4.45. Espectros de emisión de **31** y **32** (10 μM) a diferentes porcentajes de agua. λ_{ex} = 405 nm.

6. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

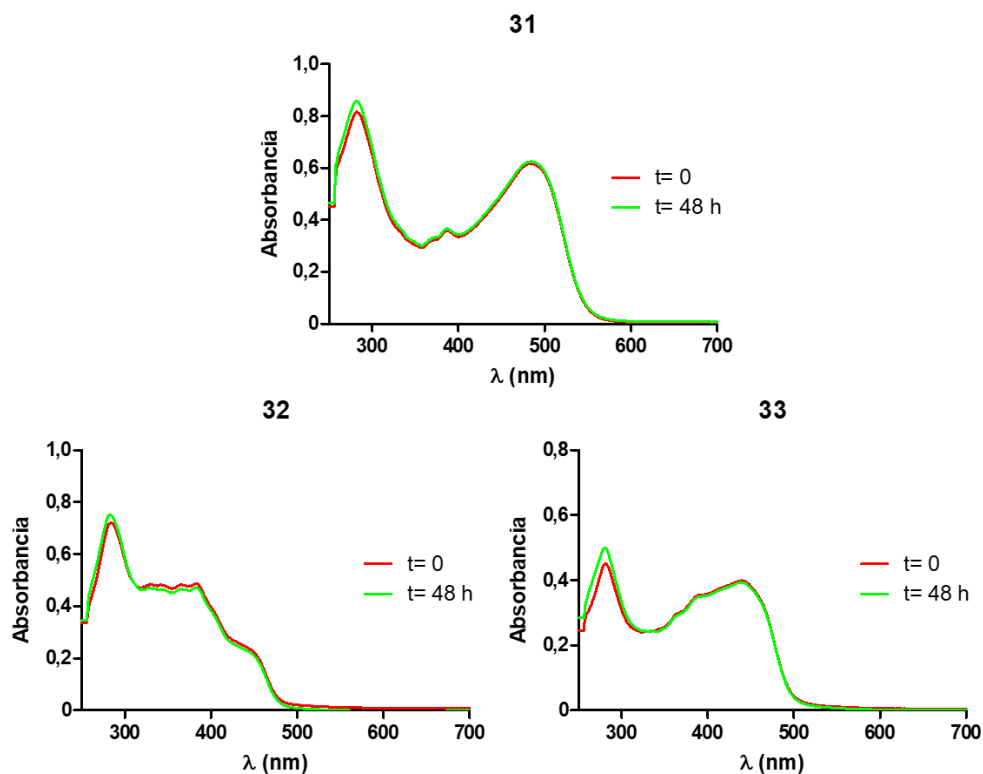


Figura A4.46. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **31-33** (10 μ M) en DMSO a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

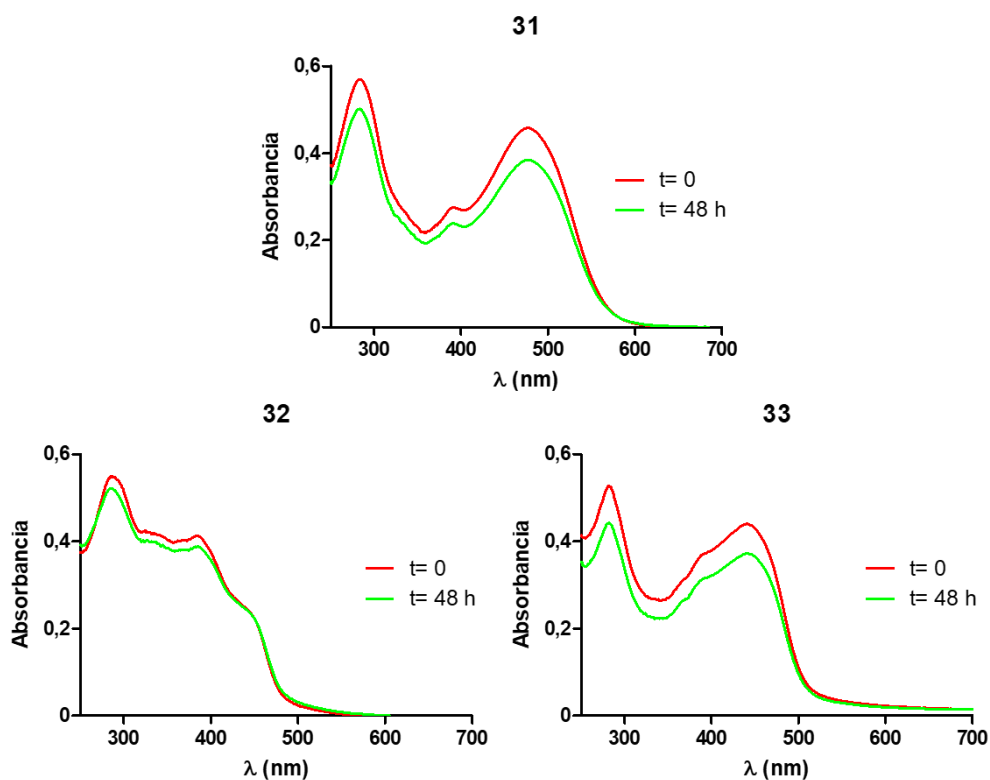


Figura A4.47. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **31-33** (10 μ M) en RPMI (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 48 h de incubación a 37 °C.

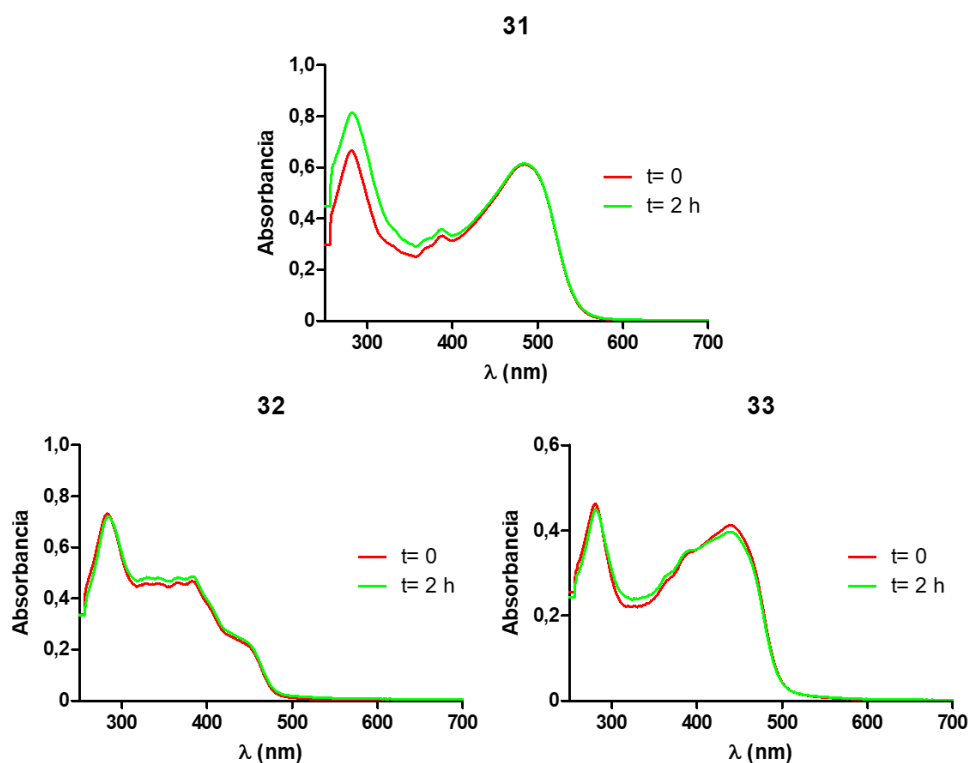


Figura A4.48. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **31-33** (10 μM) en DMSO a $t=0$ y tras 2 h de irradiación con luz azul (4,0 mW/cm^2).

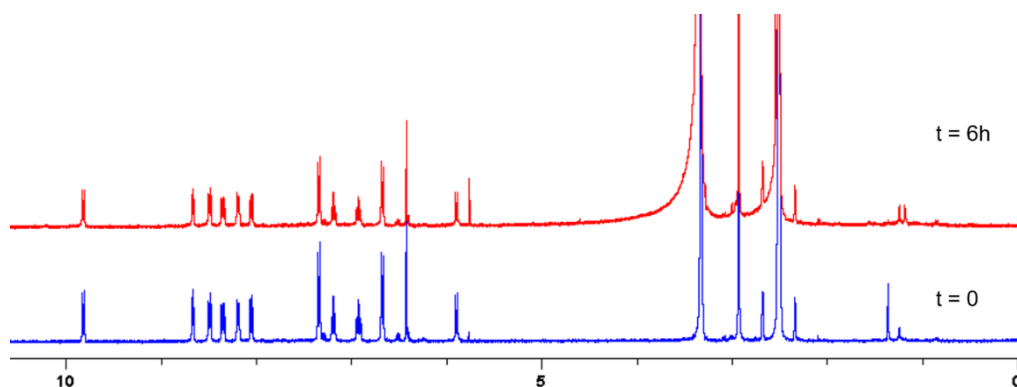


Figura A4.49. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **31** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 6 h irradiación con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm^2) a 25 $^\circ\text{C}$.

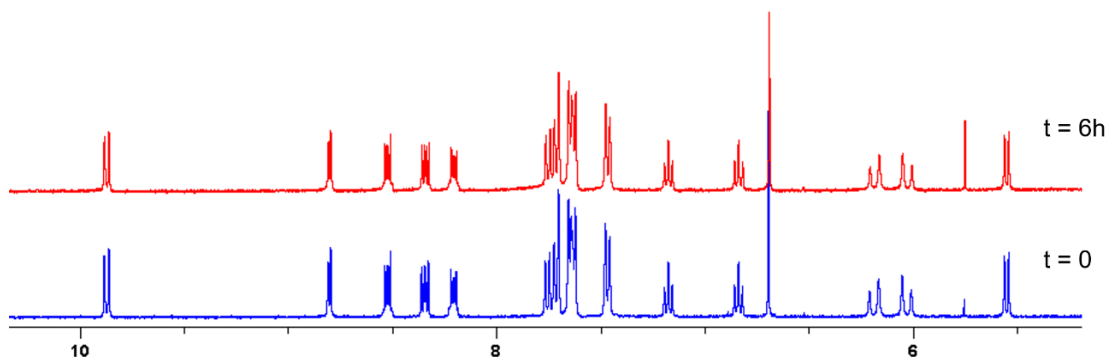


Figura A4.50. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **32** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 6 h irradiación con luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm^2) a 25 $^\circ\text{C}$.

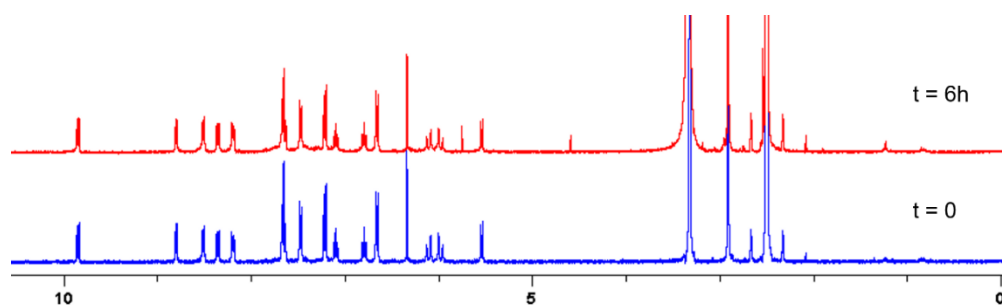


Figura A4.51. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **33** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 6 h irradiación con luz azul (465 nm, $4,0 \text{ mW}/\text{cm}^2$) a 25°C .

7. Fotooxidación del NADH

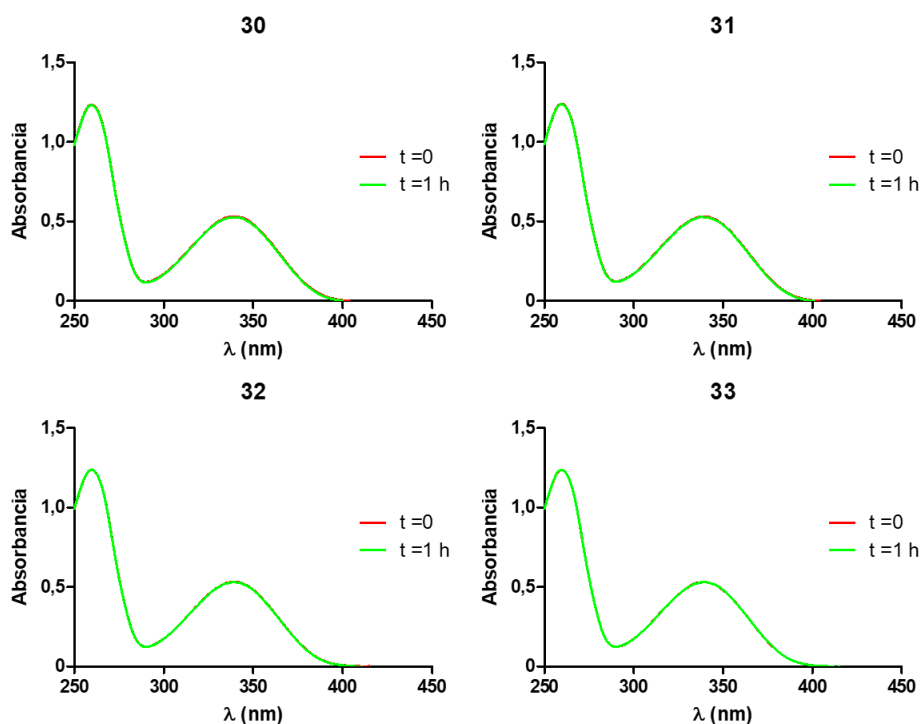


Figura A4.52. Espectros de absorción UV/Visible del NADH ($100 \mu\text{M}$) en PBS (5 % DMF) en presencia de los compuestos **30-33** en condiciones de oscuridad.

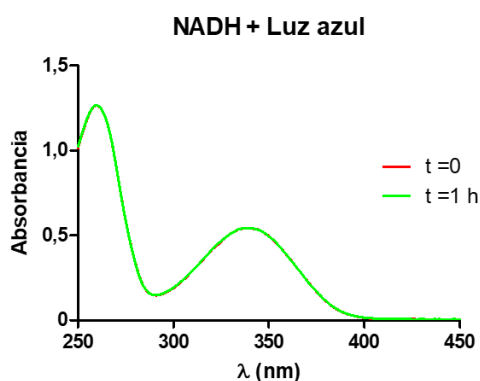


Figura A4.53. Espectro de absorción UV/Visible del NADH ($100 \mu\text{M}$) en PBS (5 % DMF) tras 1 h de irradiación con luz azul (465 nm, $4,0 \text{ mW}/\text{cm}^2$).

8. Generación de oxígeno singlete

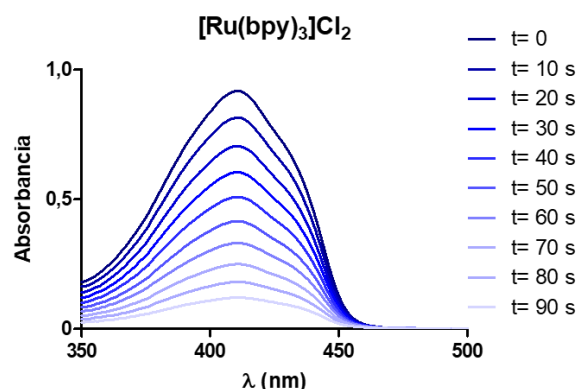


Figura A4.54. Espectro de absorción UV/Visible de la DPBF (50 μM) en presencia de la referencia ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, 5 μM) en acetonitrilo aireado tras irradiación con luz azul (465 nm, 0,5 mW/cm²).

9. Generación de radical hidroxilo

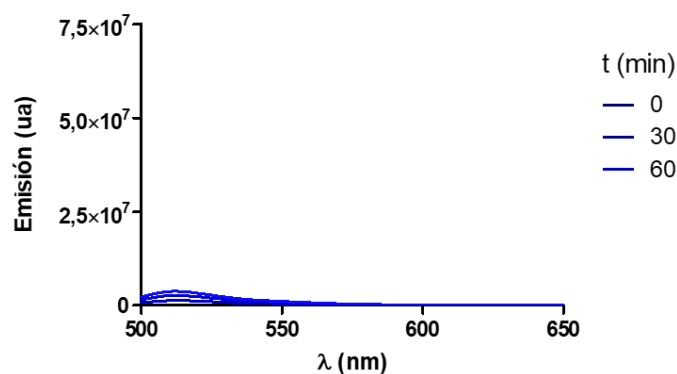


Figura A4.55. Espectro de emisión de la HPF (10 μM) tras irradiación con luz (465 nm, 4,0 mW/cm²).

10. Propiedades biológicas

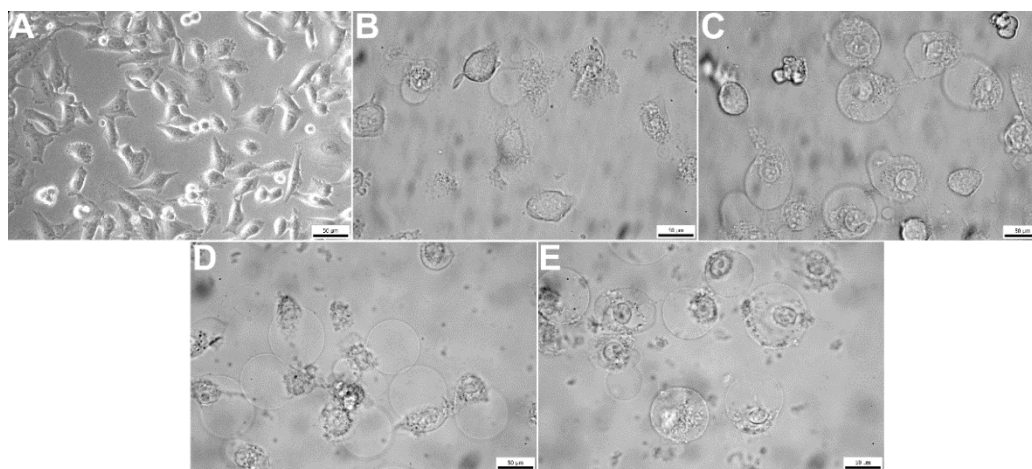


Figura A4.56. Morfología de las células HeLa tratadas durante 1 h con **30** (0,3 μM , panel **B**), **31** (0,7 μM , panel **C**), **32** (1,2 μM , panel **D**), **33** (3,7 μM , panel **E**) o sin tratar (panel **A**), irradiadas y, posteriormente, incubadas en medio libre de compuestos durante 2 h en la oscuridad. Las barras de

escala representan 50 μm .

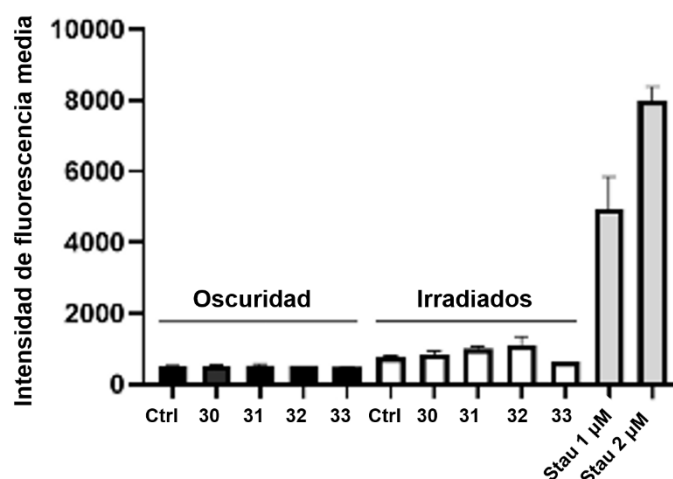


Figura A4.57. Activación de la caspasa 3 detectada mediante el reactivo de detección verde CellEvent®Caspase3/7. Las células HeLa se trataron con **30-33** a sus concentraciones equitoxicas (0,36,0,8,1,3 y 4 μM) durante 1 h en la oscuridad. Las células se mantuvieron en la oscuridad o se irradiaron con luz azul. Las células control se trataron con un soporte de DMSO. Tras 2 h de recuperación en medio libre de compuestos, las células se tiñeron con CellEvent®Caspase 3/7 y la fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo (30000 células por muestra). Se utilizó la estaurosporina (2 μM) como control positivo (paneles inferiores).

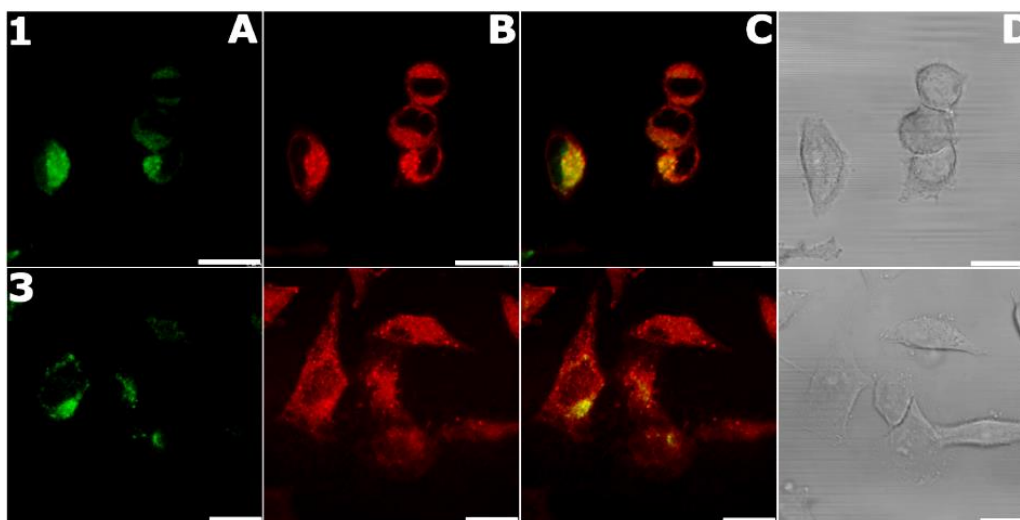


Figura A4.58. Colocalización de **30** (panel 1) y **32** (panel 3) con mitocondrias en células HeLa determinada mediante microscopía confocal. Las células se trataron con 2 μM de los compuestos ensayados y se incubaron durante 3 h antes de la tinción con MitoTracker®. **A)** Señal de fluorescencia procedente de los compuestos de iridio. **B)** Fluorescencia de MitoTracker®. **C)** Superposición de la fluorescencia procedente de los compuestos ensayados y de MitoTracker®. **D)** Canal de campo claro. La barra de escala indica 20 μM . Los coeficientes de colocalización de Pearson se calcularon a partir de tres experimentos independientes, al menos diez imágenes por muestra para cada experimento.

Tabla A4.2. Coeficientes de colocación de Pearson^a determinados para **30** y **32** en células HeLa teñidas con sondas LysoTracker® o MitoTracker®. Los coeficientes de colocación de Pearson se determinaron en el software Image J utilizando el algoritmo de umbral de Costes con el subsiguiente análisis directo de colocación.

Compuesto	Coeficiente Pearson	Coeficiente Pearson
	LysoTracker®	MitoTracker®
30	0,76 ± 0,07	0,50 ± 0,06
32	0,8 ± 0,1	0,42 ± 0,04

^aCoeficientes de colocación calculados a partir de tres experimentos independientes, al menos diez imágenes por muestra para cada experimento.

Anexo V

ÍNDICE

1. Espectros de RMN	A125
1.1. Compuesto 39	A125
1.2. Compuesto 40	A126
1.3. Compuesto 41	A127
1.4. Compuesto 42	A128
1.5. Compuesto 43	A129
1.6. Compuesto 44	A130
1.7. Compuesto 45	A130
1.8. Compuesto 46	A131
1.9. Compuesto 47	A132
1.10. Compuesto 48	A133
2. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)	A134
3. Propiedades fotofísicas	A138
4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad	A139
5. Fotooxidación del NADH	A143
6. Generación de oxígeno singlete	A146
7. Generación de radicales hidroxilo	A147

1. Espectros de RMN

1.1. Compuesto 39

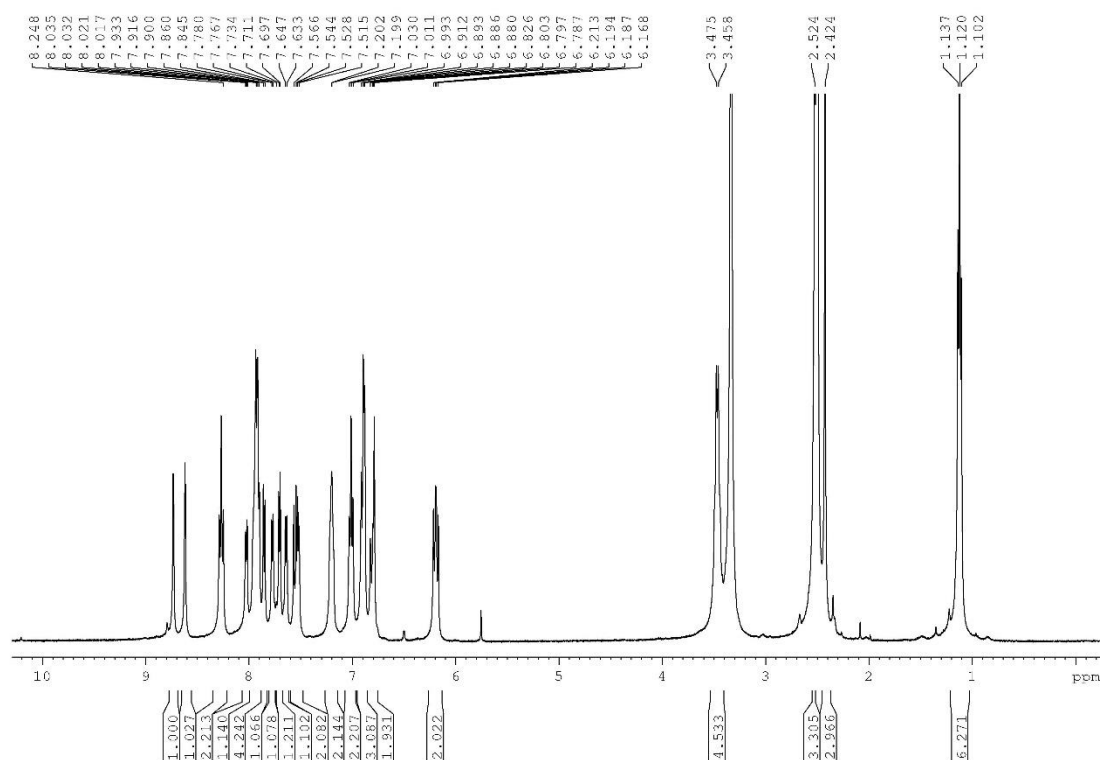


Figura A5.1. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **39** en $\text{DMSO}-d_6$.

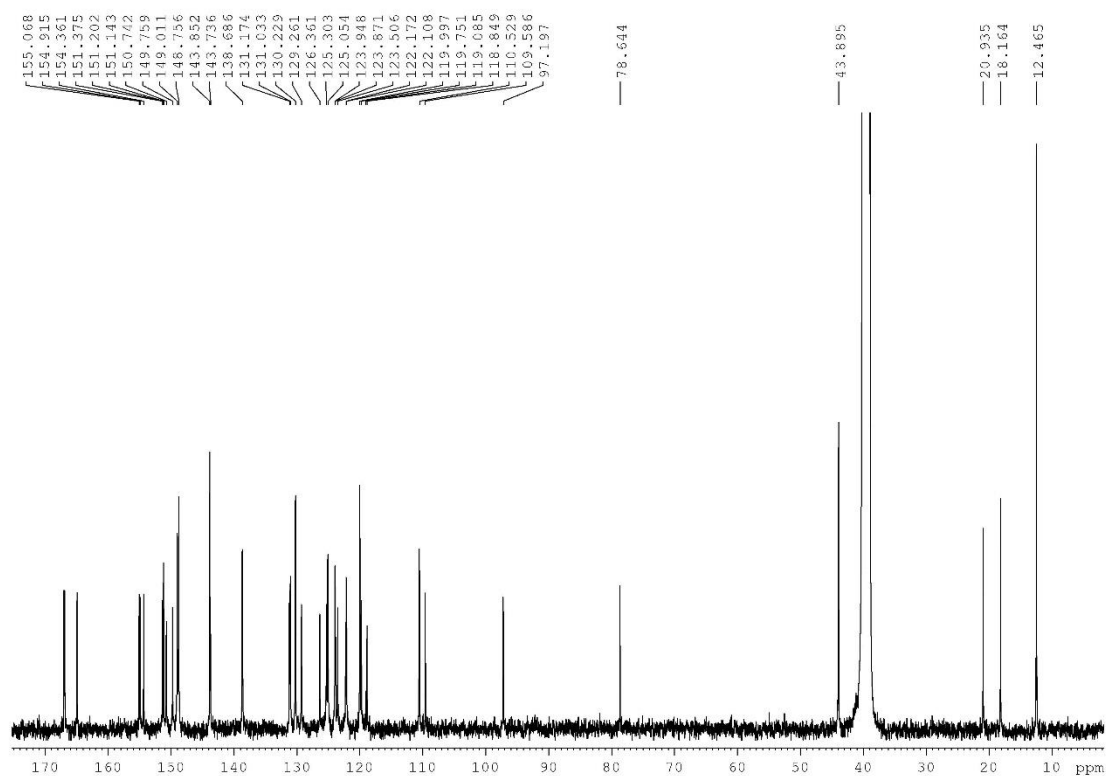


Figura A5.2. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **39** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.2. Compuesto 40

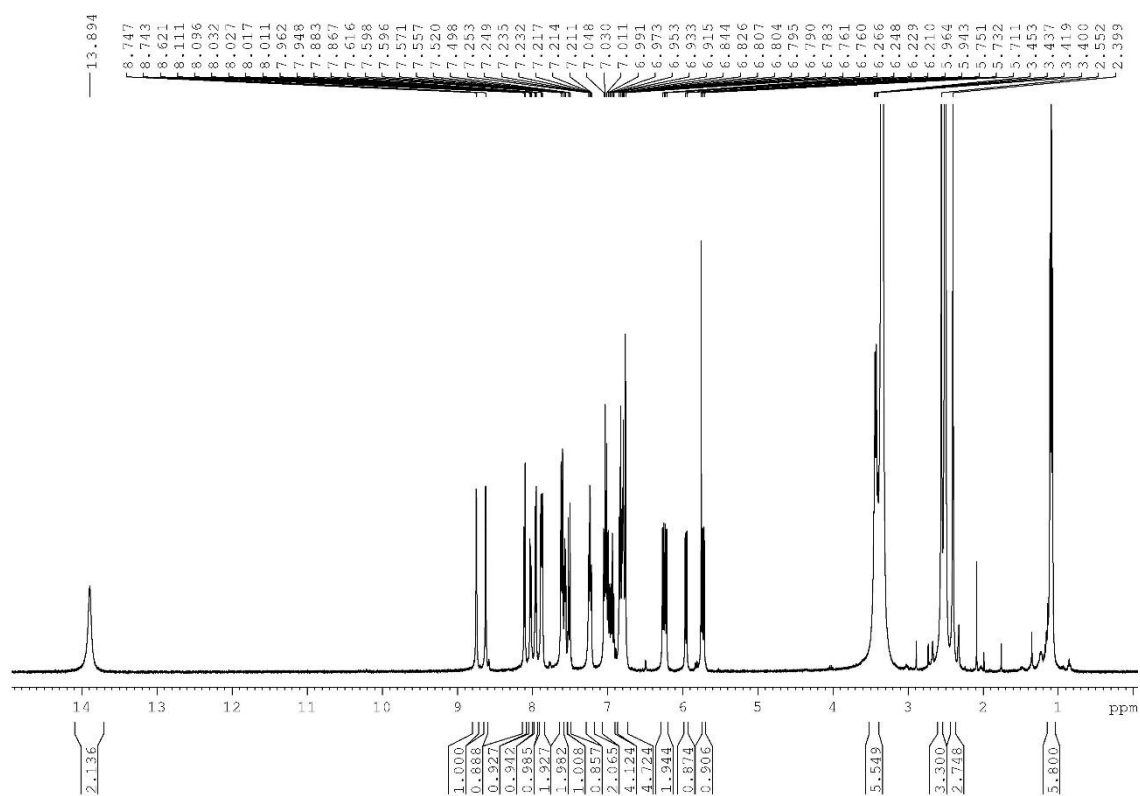


Figura A5.3. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **40** en $\text{DMSO}-d_6$.

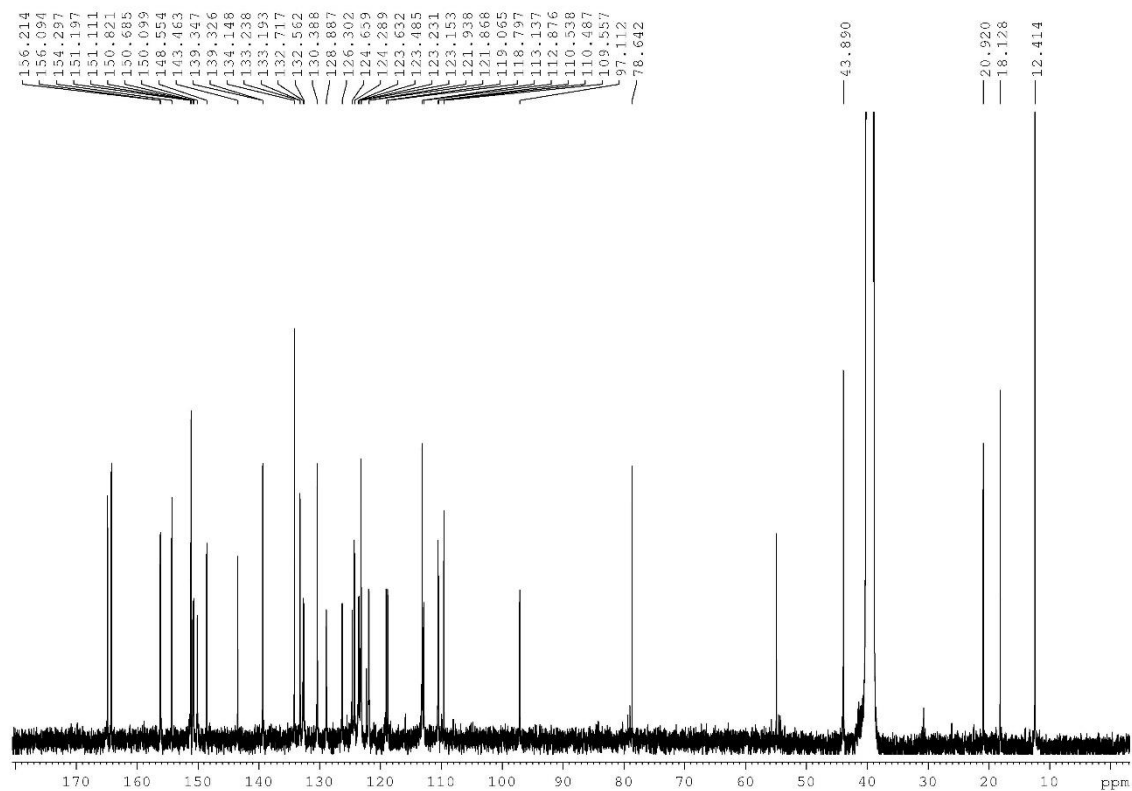
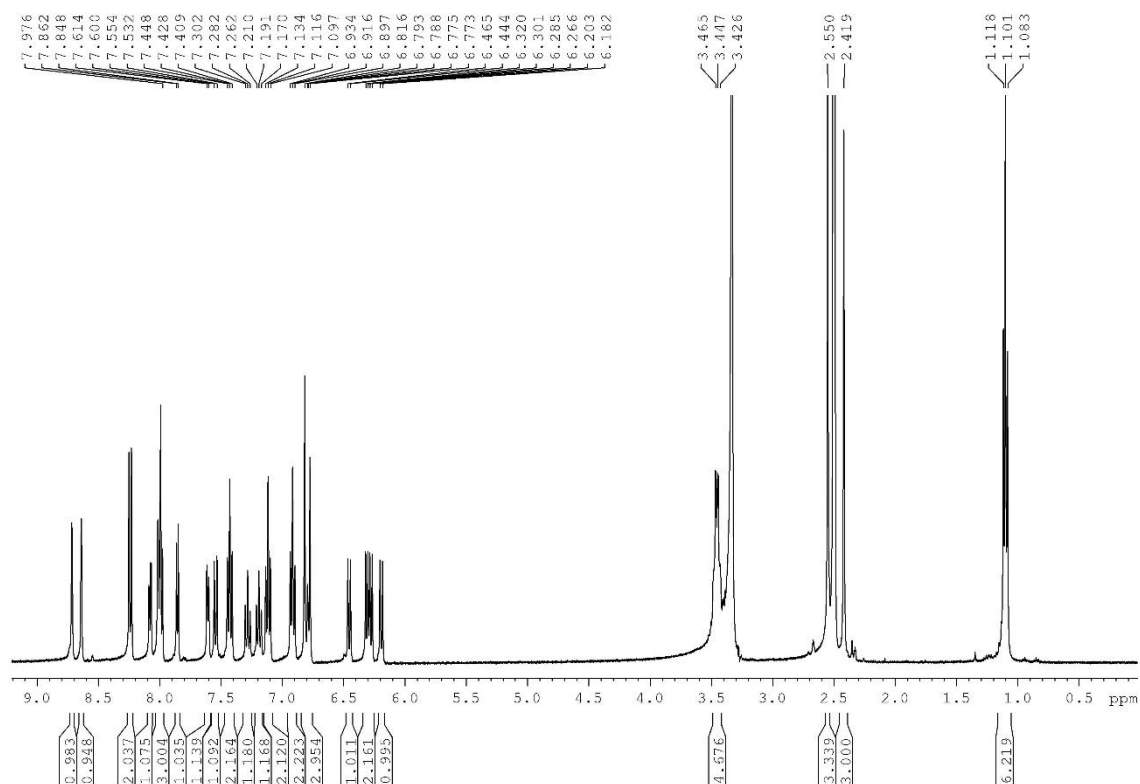
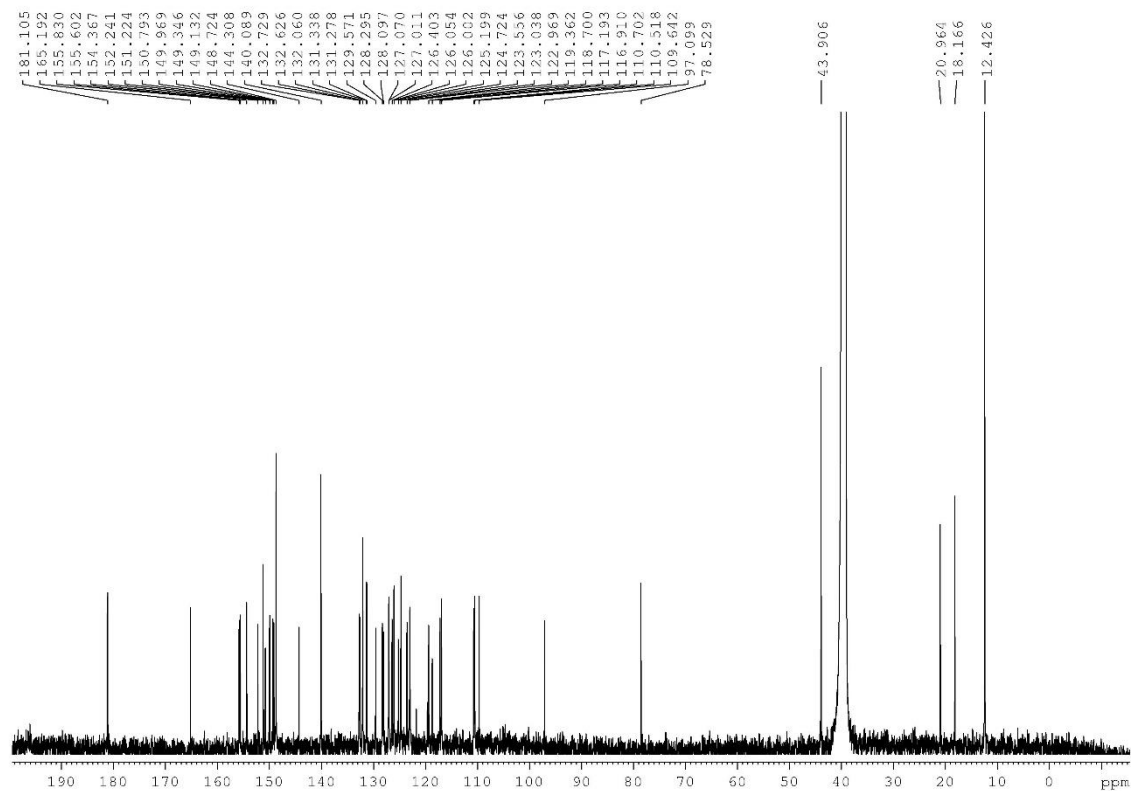


Figura A5.4. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **40** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.3. Compuesto 41

Figura A5.5. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 41 en $\text{DMSO}-d_6$.Figura A5.6. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 41 en $\text{DMSO}-d_6$.

1.4. Compuesto 42

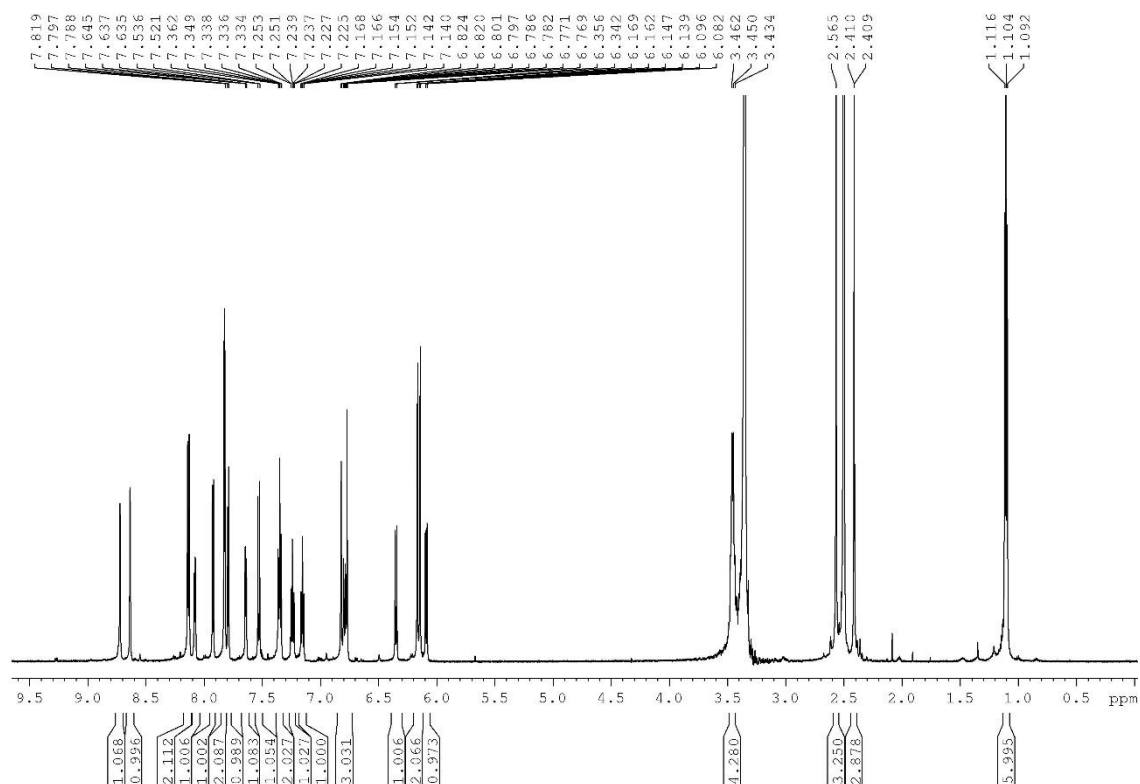


Figura A5.7. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 42 en $\text{DMSO}-d_6$.

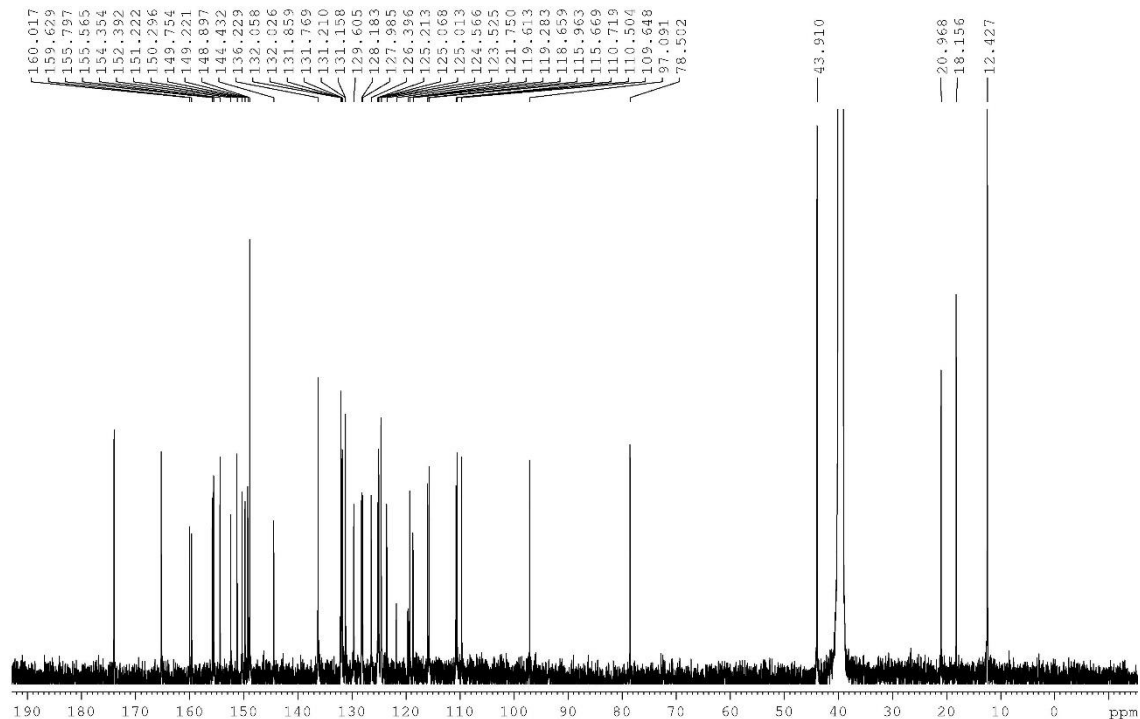
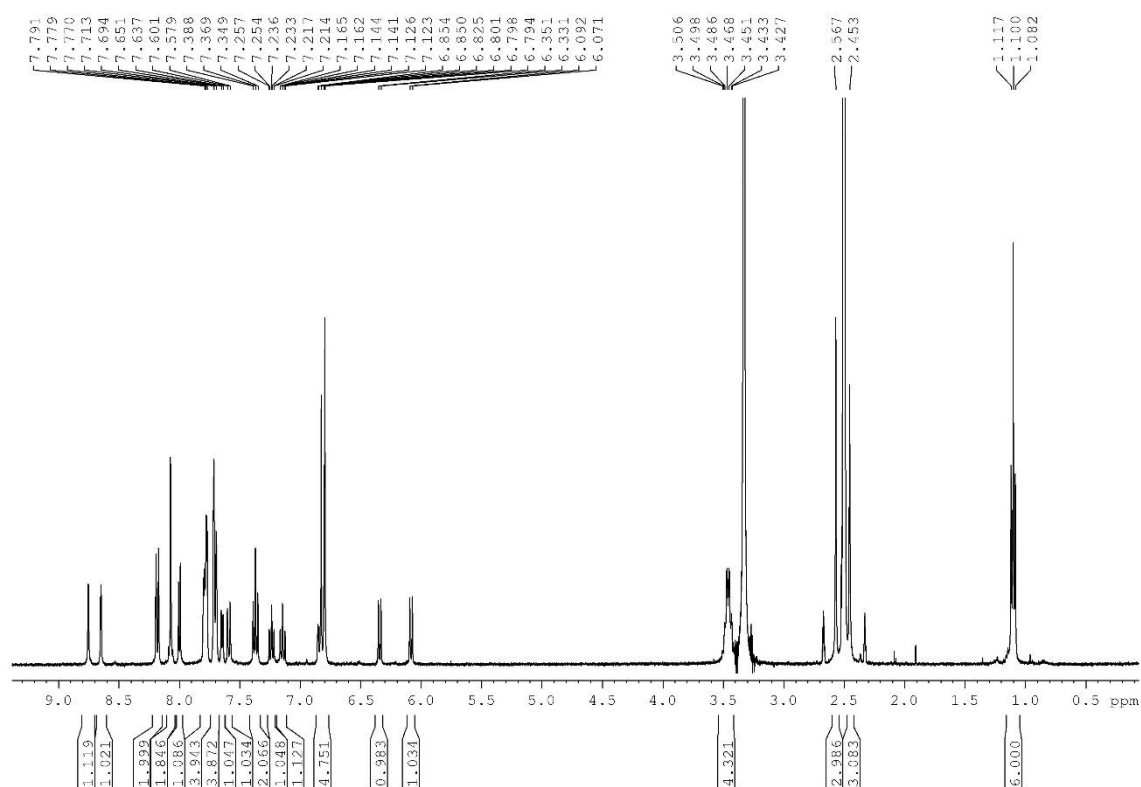
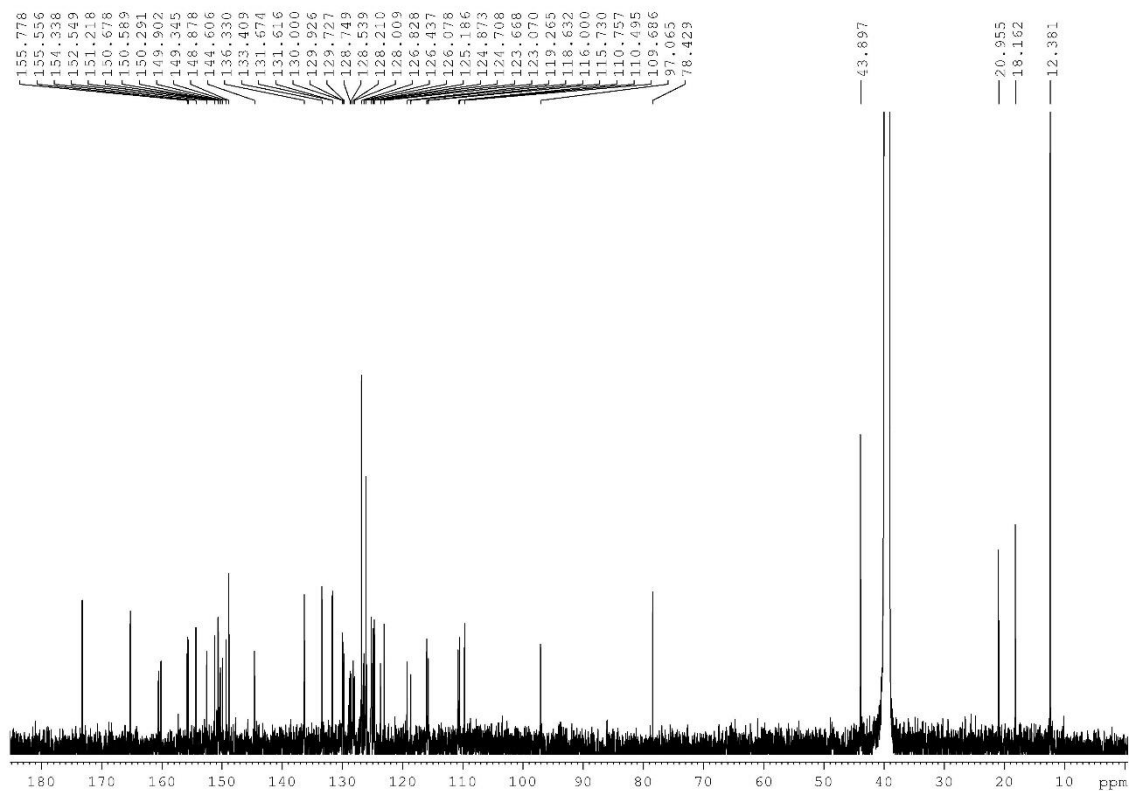


Figura A5.8. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 42 en $\text{DMSO}-d_6$.

1.5. Compuesto 43

Figura A5.9. Espectro de ¹H-RMN del compuesto 43 en DMSO-*d*₆.Figura A5.10. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto 43 en DMSO-*d*₆.

1.6. Compuesto 44

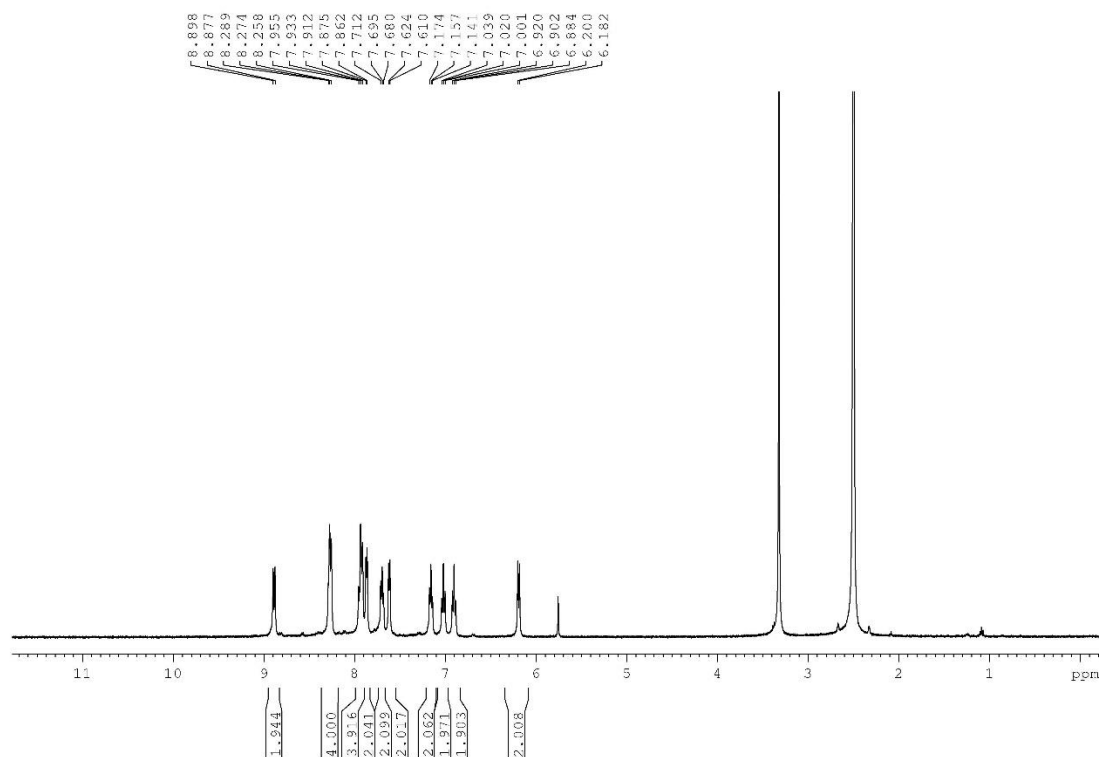


Figura A5.11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **44** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.7. Compuesto 45

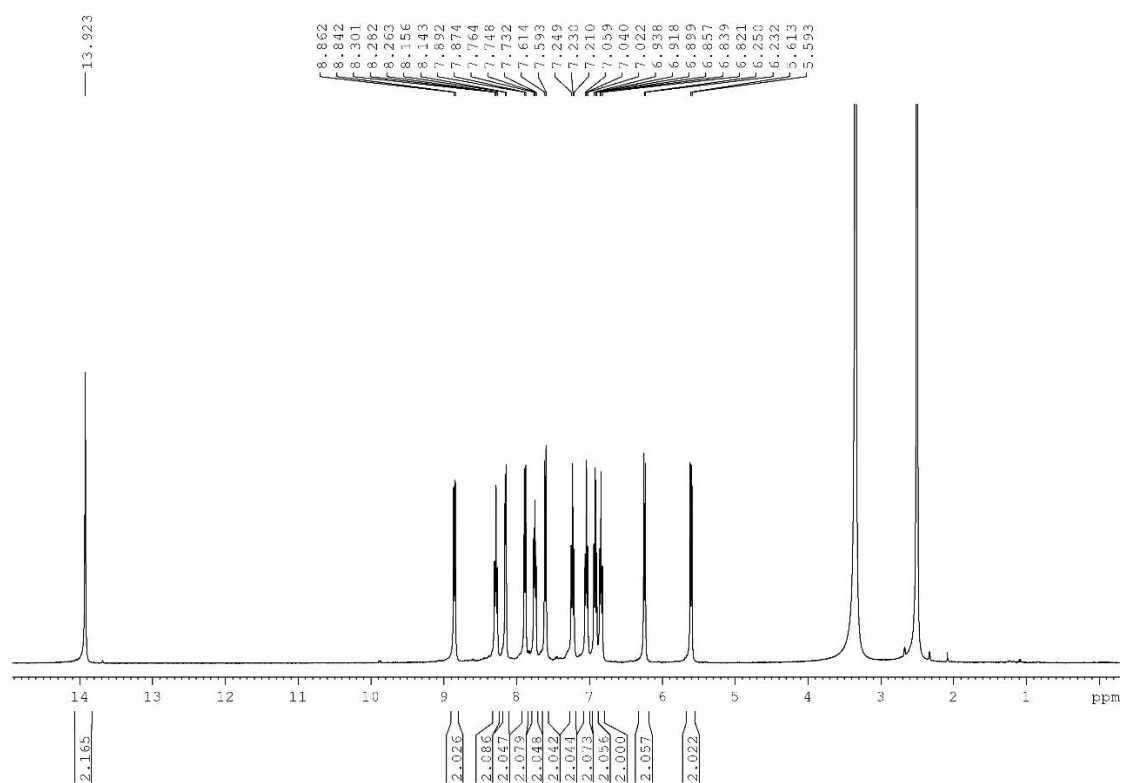


Figura A5.12. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **45** en $\text{DMSO}-d_6$.

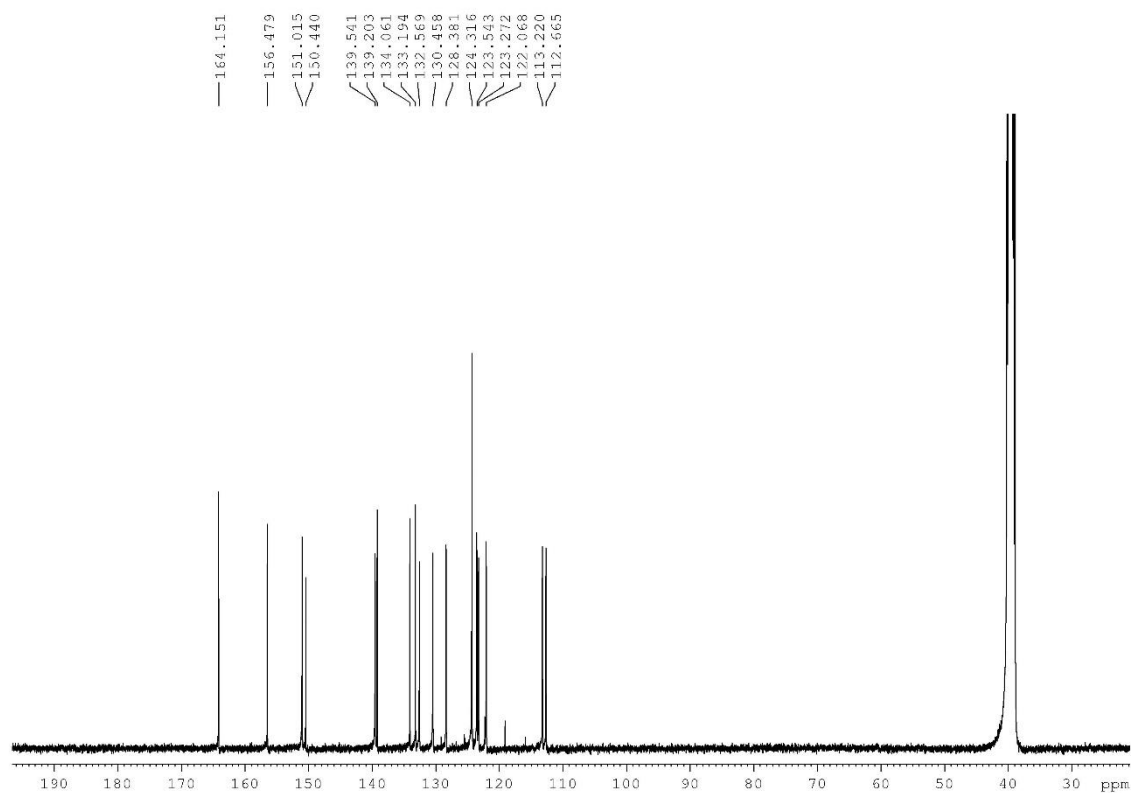


Figura A5.13. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **45** en $\text{DMSO-}d_6$.

1.8. Compuesto 46

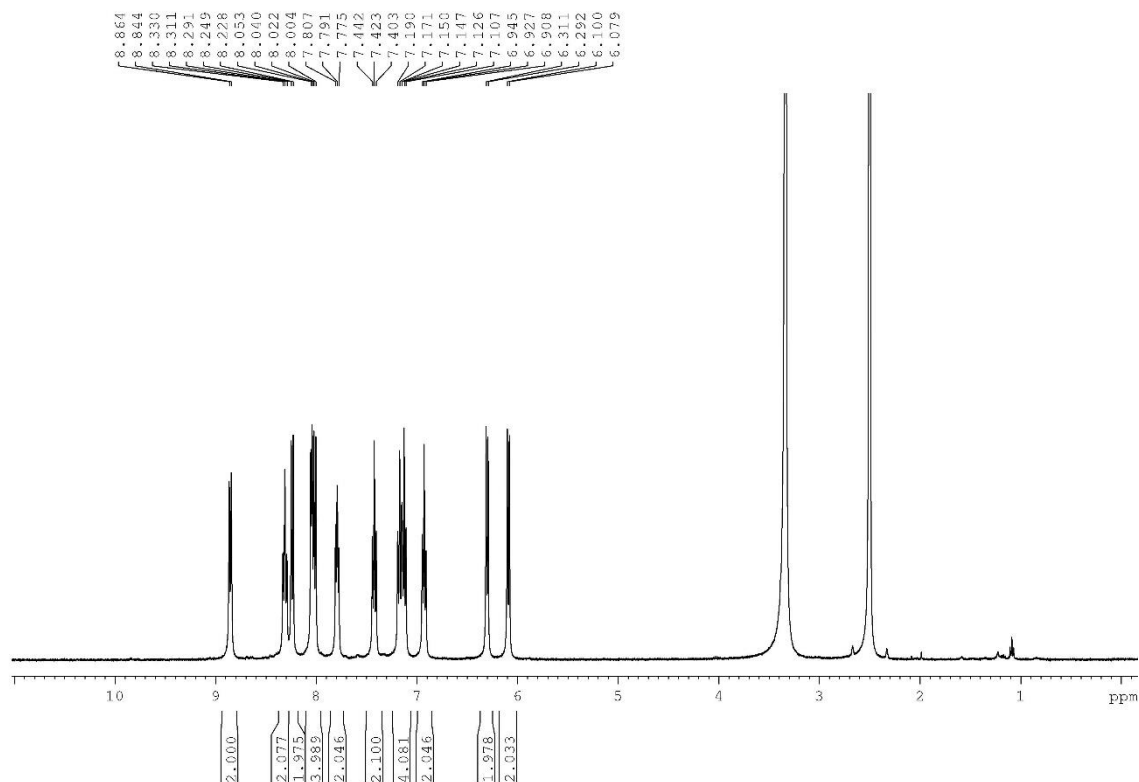


Figura A5.14. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **46** en $\text{DMSO-}d_6$.

1.9. Compuesto 47

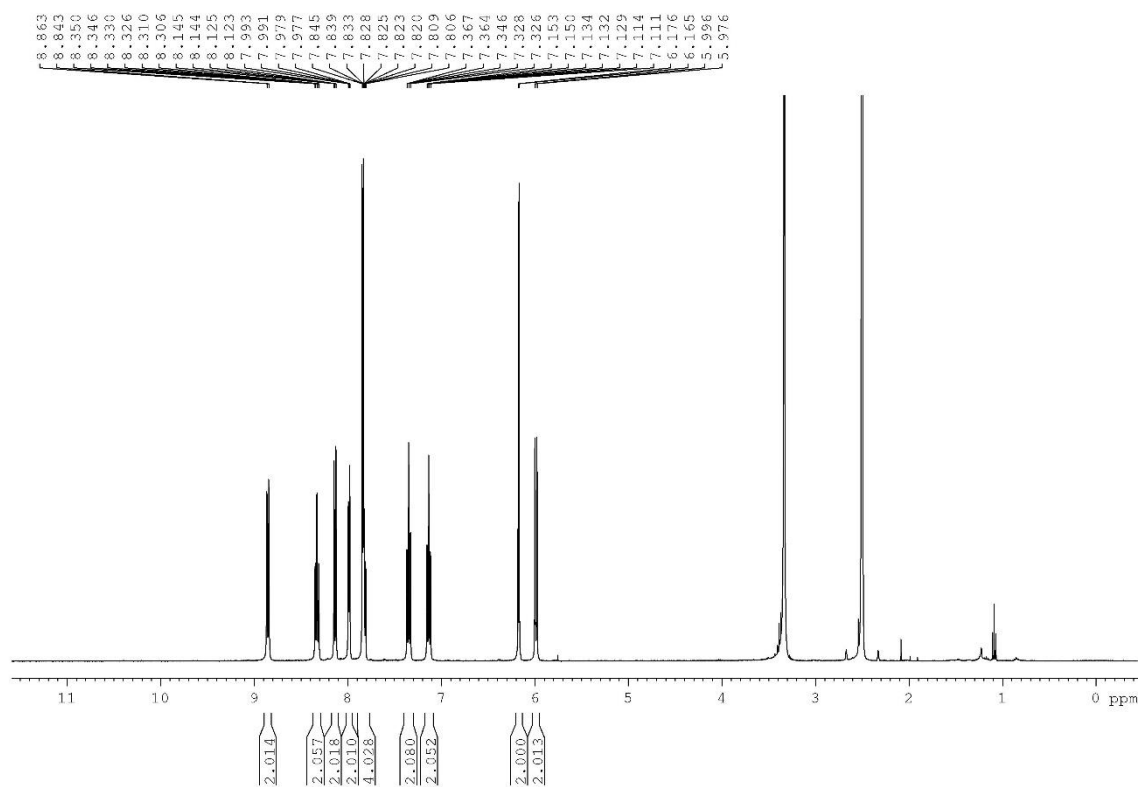


Figura A5.15. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **47** en $\text{DMSO}-d_6$.

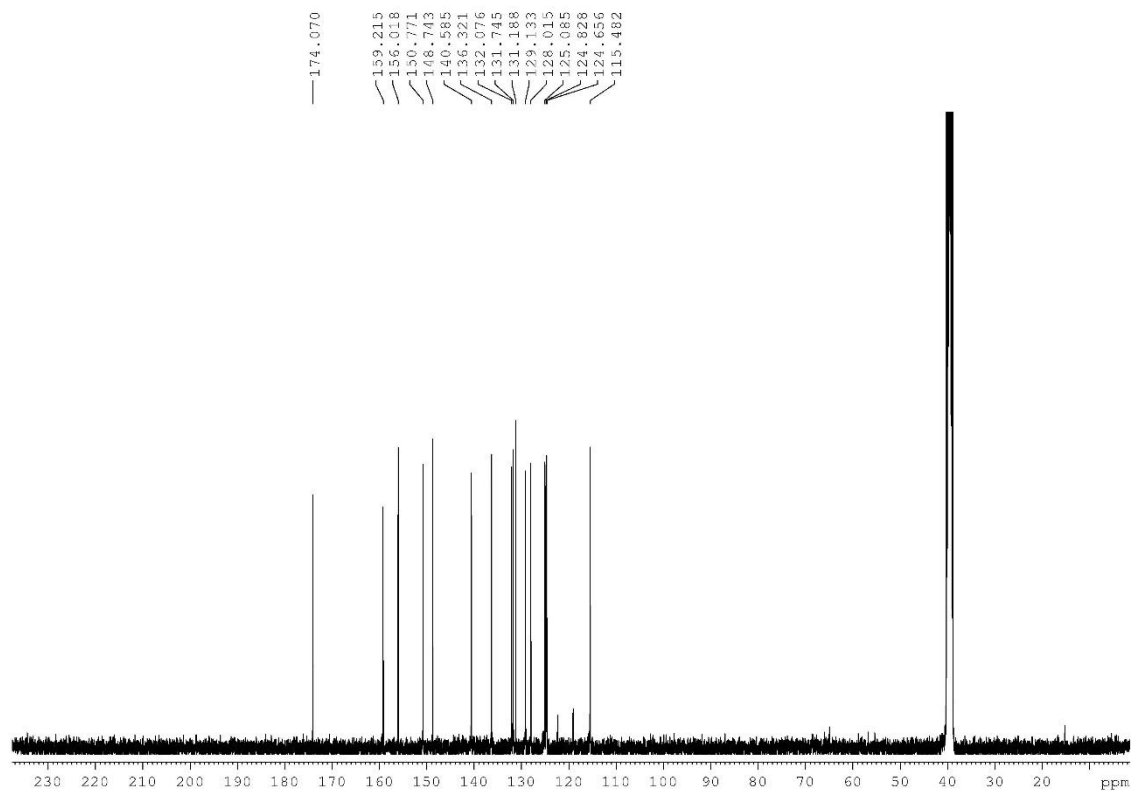
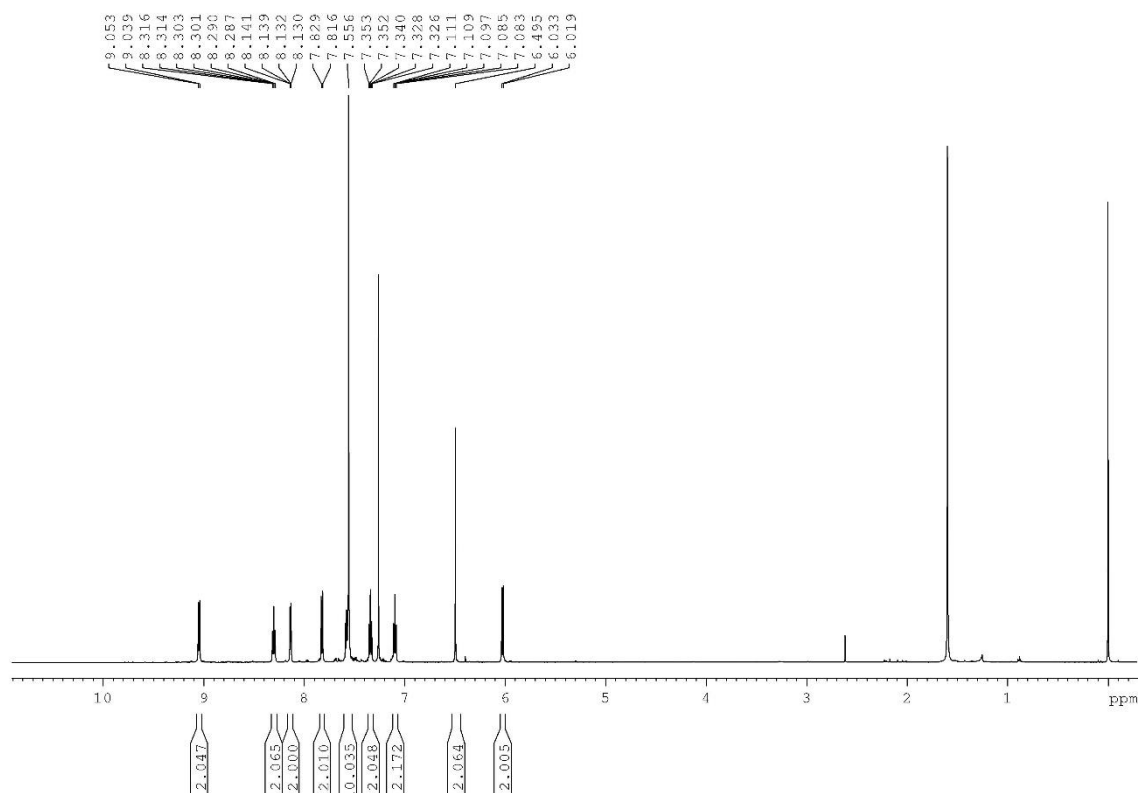
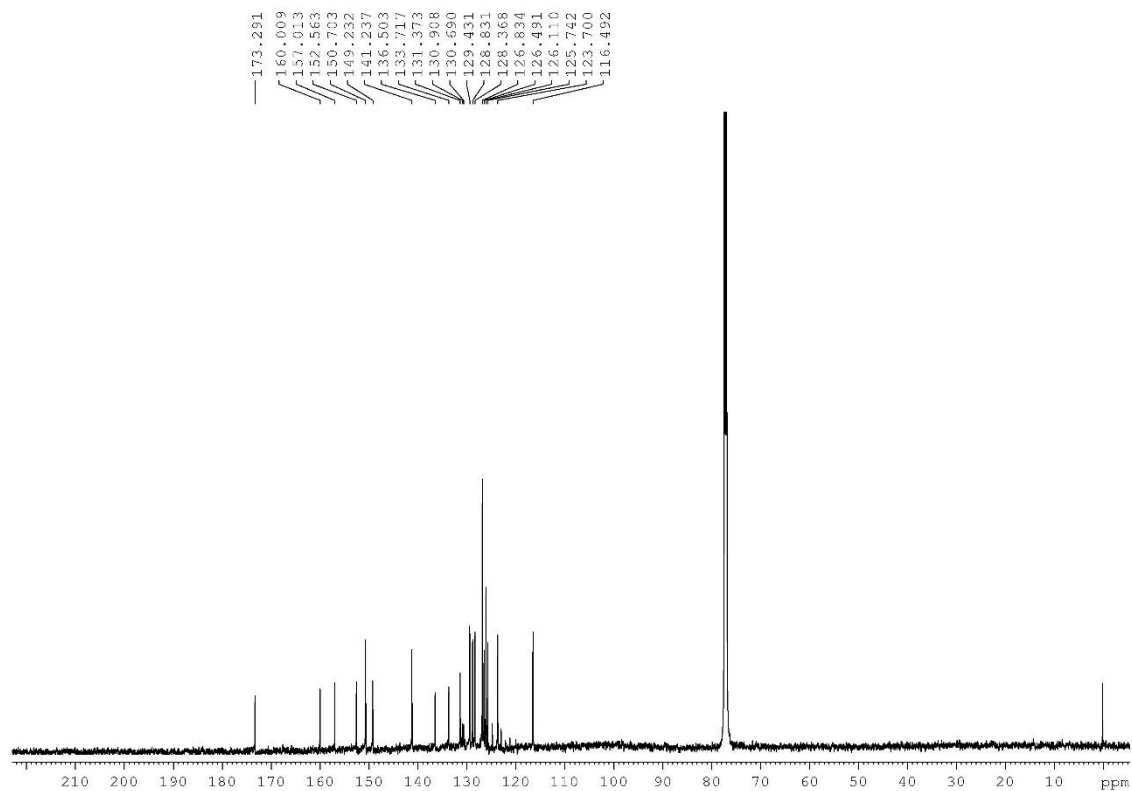


Figura A5.16. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **47** en $\text{DMSO}-d_6$.

1.10. Compuesto 48

Figura A5.17. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **48** en CDCl_3 .Figura A5.18. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **48** en CDCl_3 .

2. Cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC/MS)

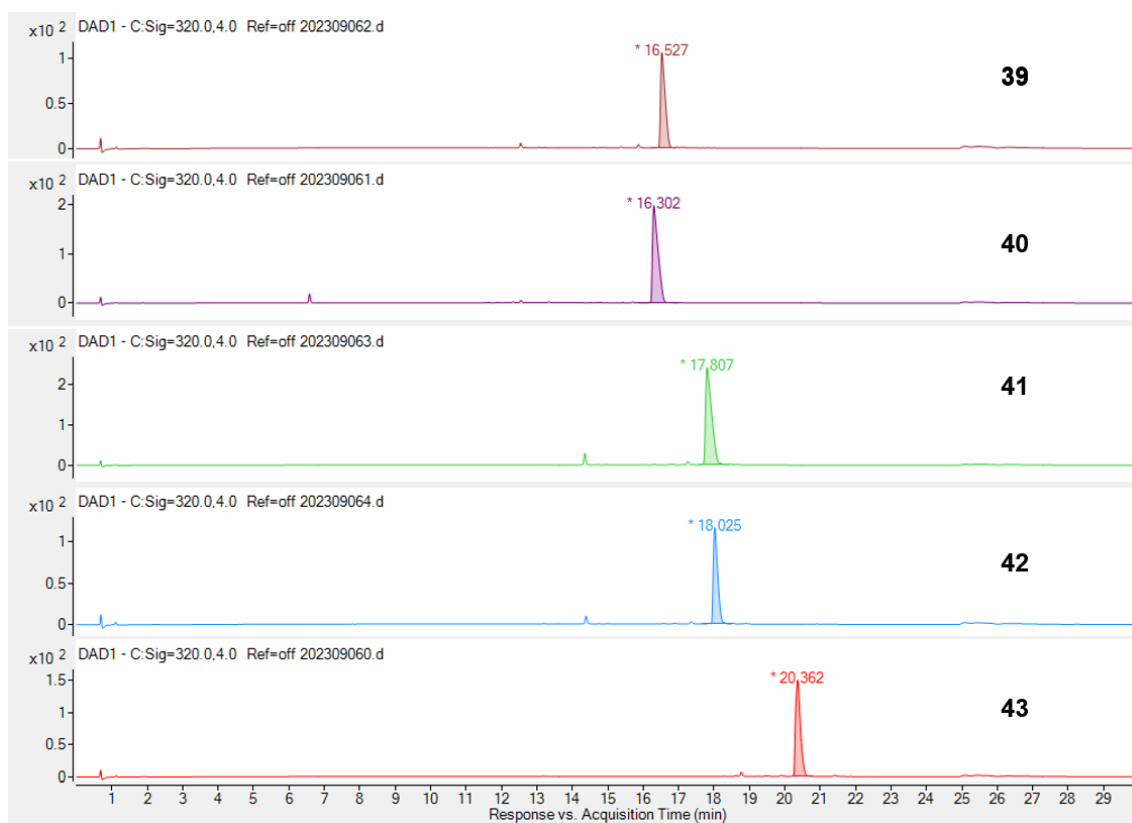
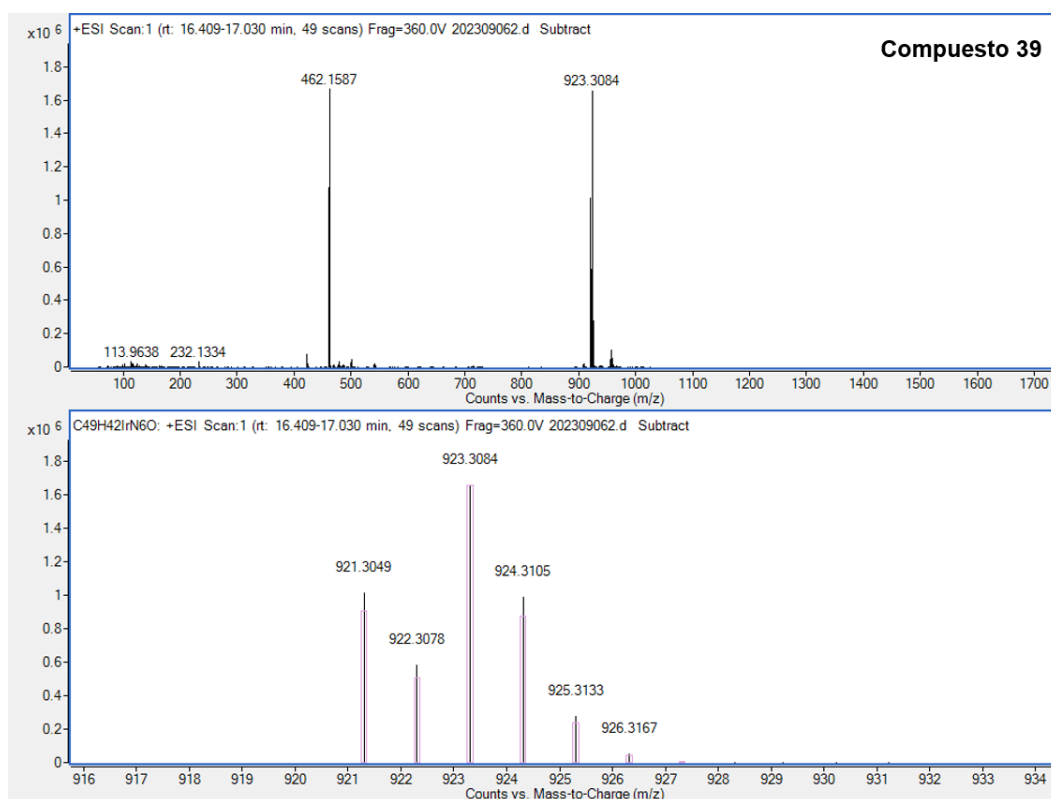
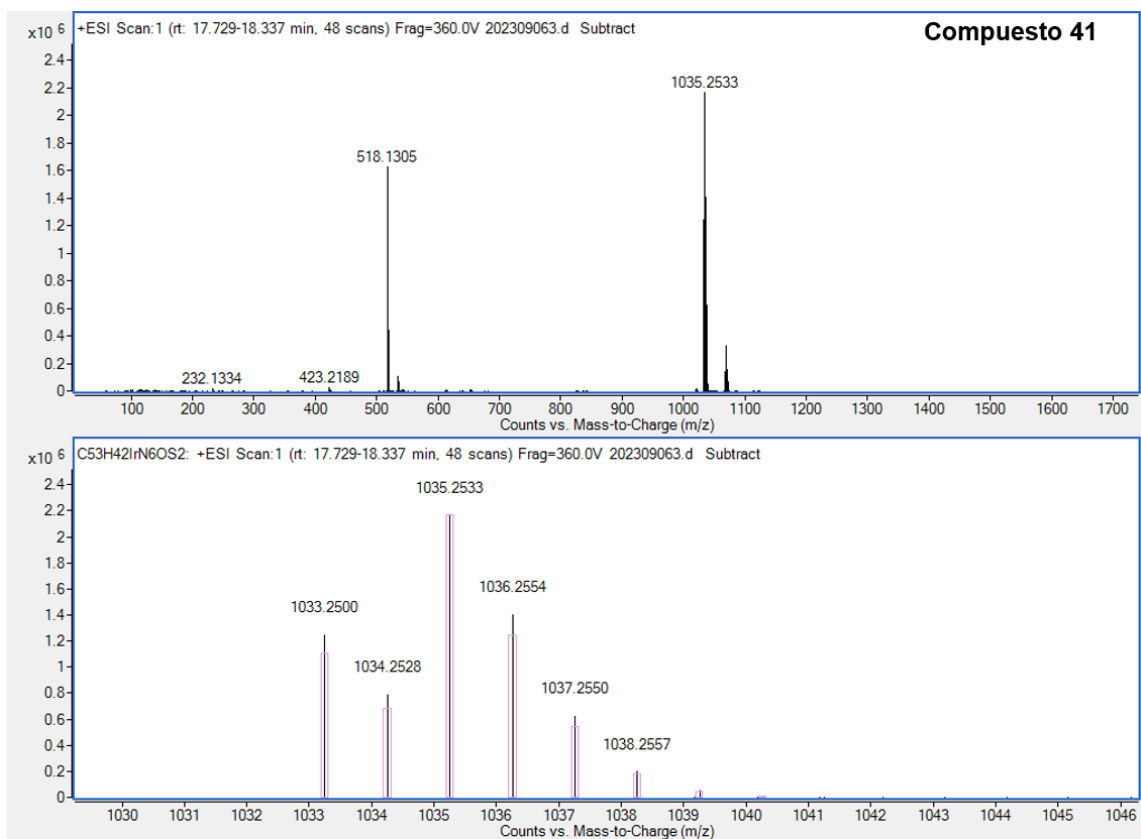
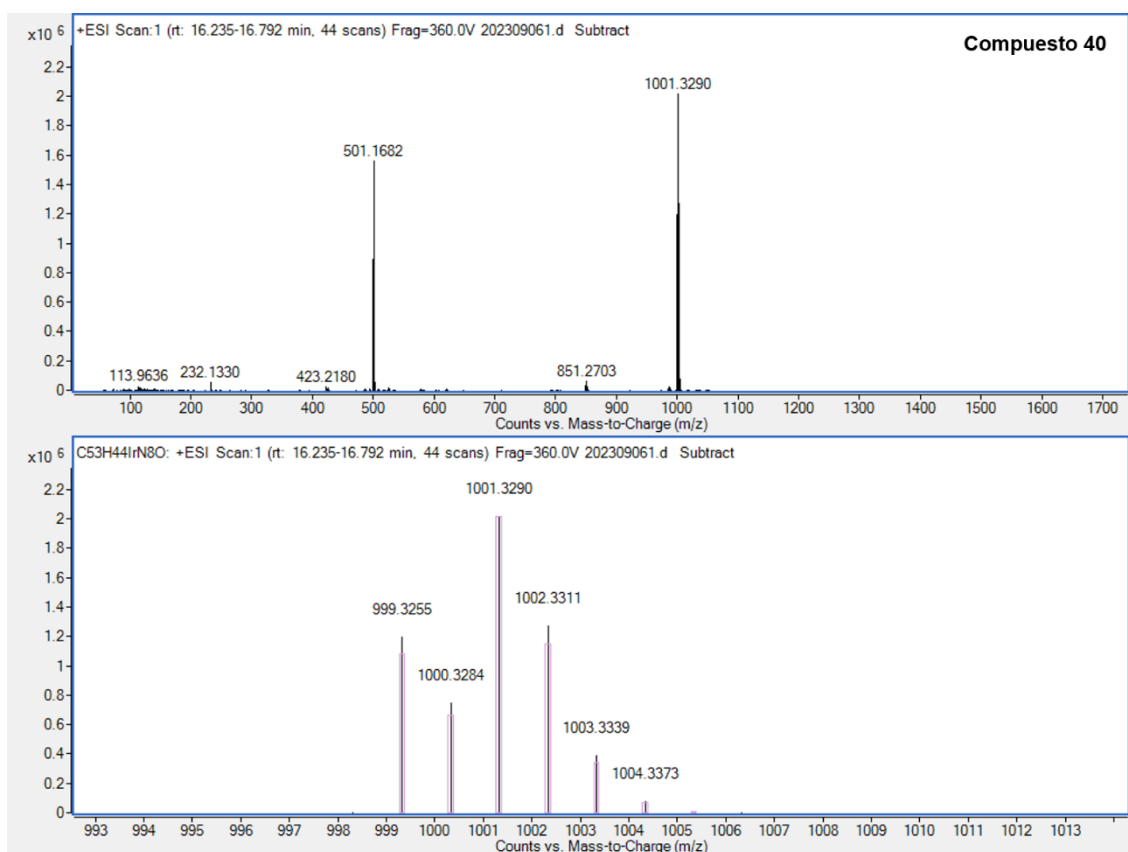


Figura A5.19. Cromatogramas de los compuestos **39-43** disueltos en DMSO con detección UV a 420 nm.





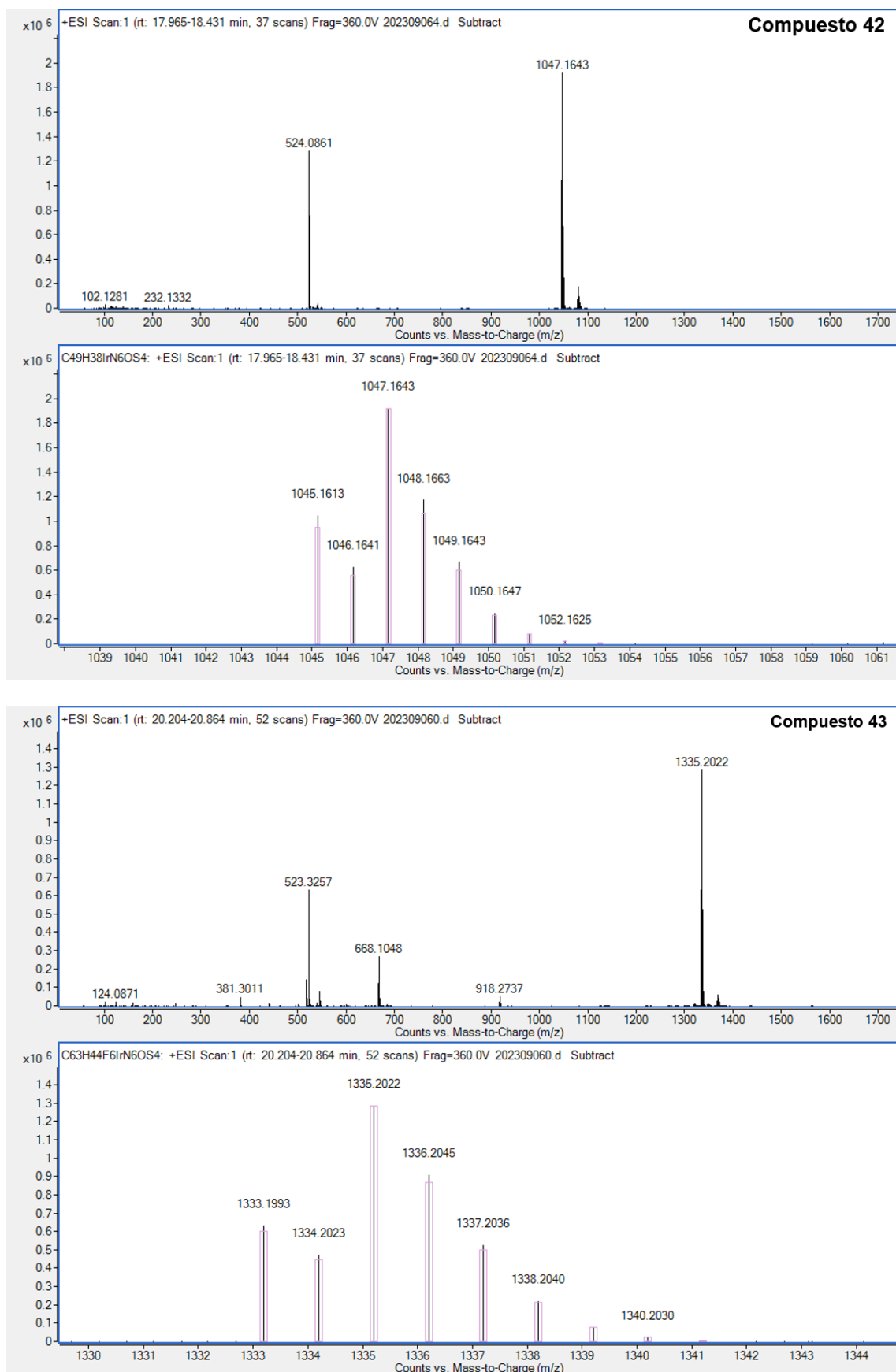


Figura A5.20. Espectros de masas de los picos a 16-20 min de los cromatogramas de la **Figura A5.19**.

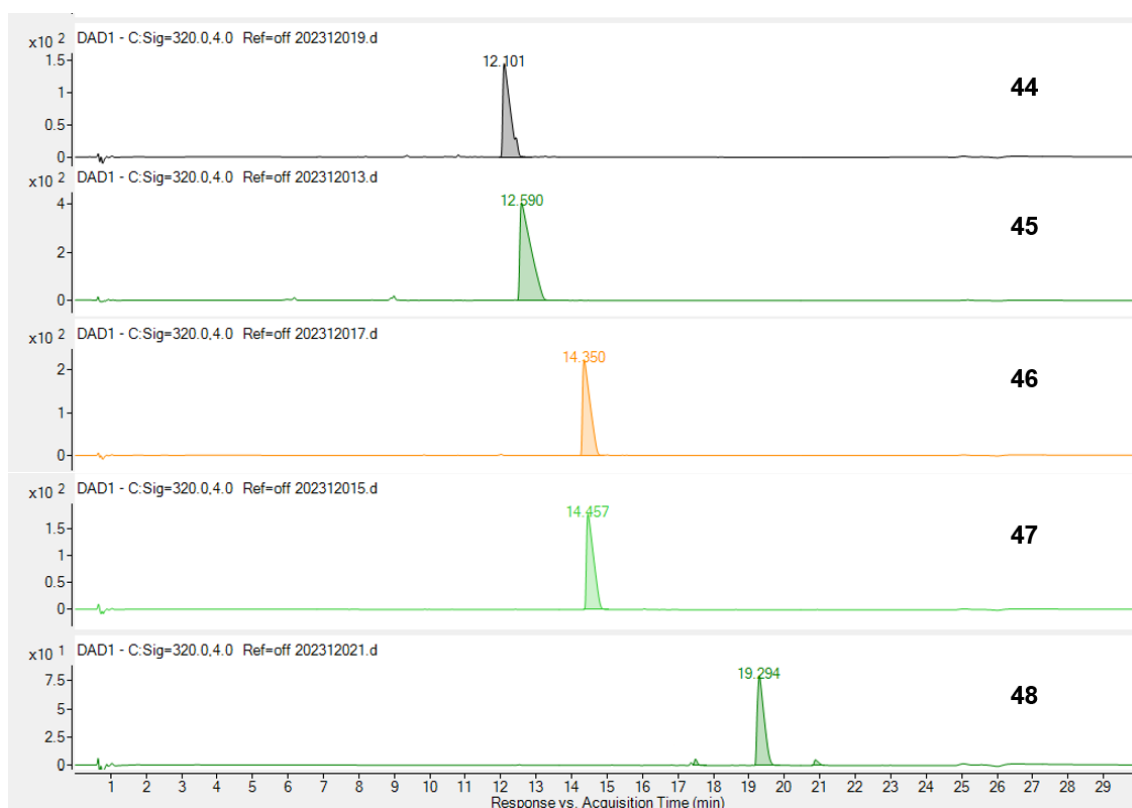


Figura A5.21. Cromatogramas de los compuestos **44-48** disueltos en DMSO con detección UV a 320 nm.

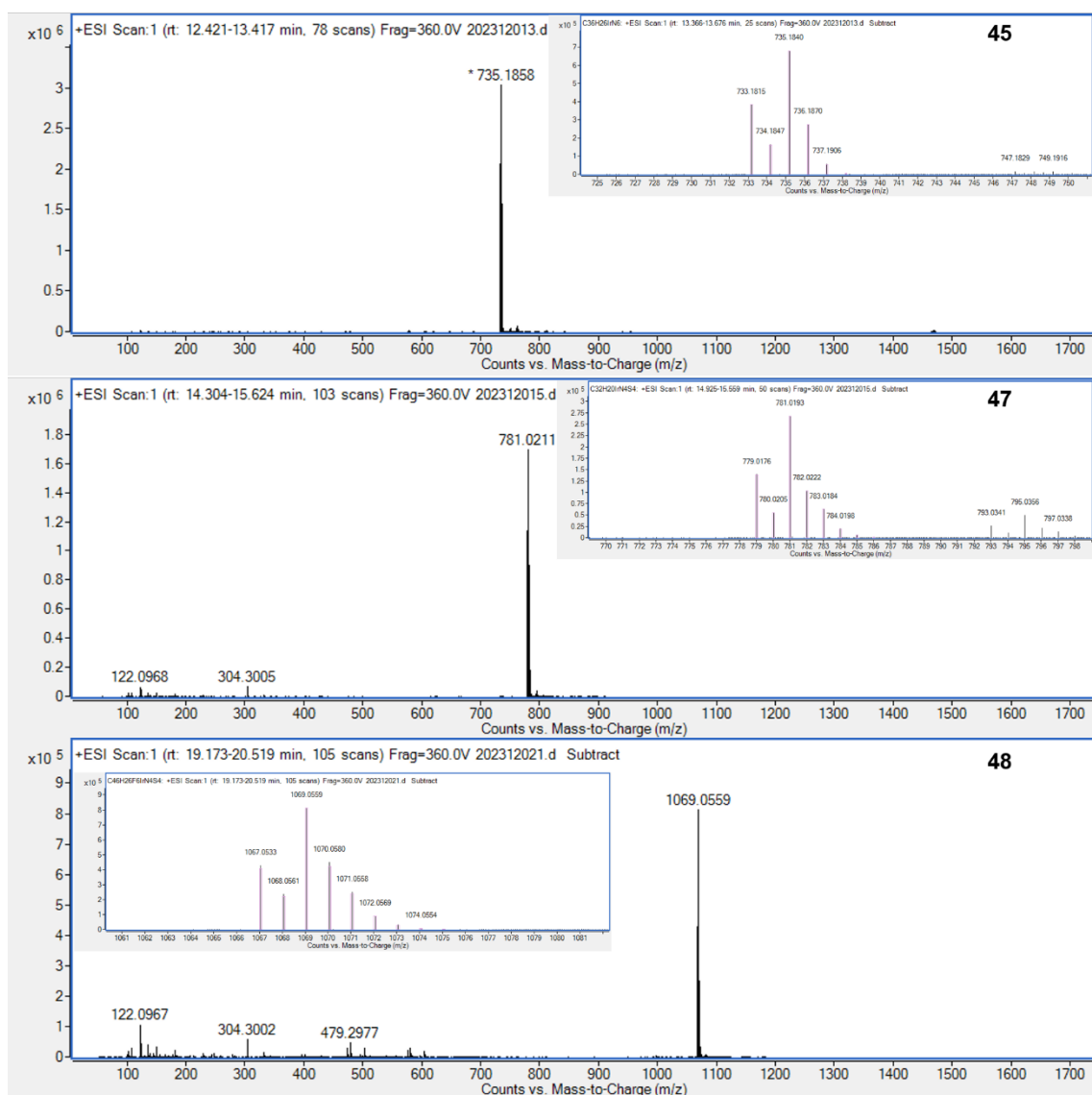


Figura A5.22. Espectro de masas de los picos a 20-21 min de los cromatogramas de la Figura A5.21.

3. Propiedades fotofísicas

Tabla A5.1. Longitudes de onda de absorción (λ_{abs}) y de emisión (λ_{em}) de los complejos **39-43** en agua (1 % DMSO).

Comp.	λ_{abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm
39	259 (39330), 339 ^{sh} (18170), 392 ^{sh} (13790), 524 (19380), 564 (16640)	520	627 656
40	305 (32570), 515 (17500), 558 (15440)	520	628 sh 671
41	314 (48910), 380 (20990), 327 (47820), 380 (20990), 521 (29960), 554 (30740)	520	607
42	327 (39800), 394 ^{sh} (21530), 448 ^{sh} (14850), 524 (24420), 558 (26740)	520	622 655 sh

43	304 (30760), 347 (36760), 481 (20000), 554 (22900)	520	627 677
----	--	-----	------------

4. Estudios de estabilidad y fotoestabilidad

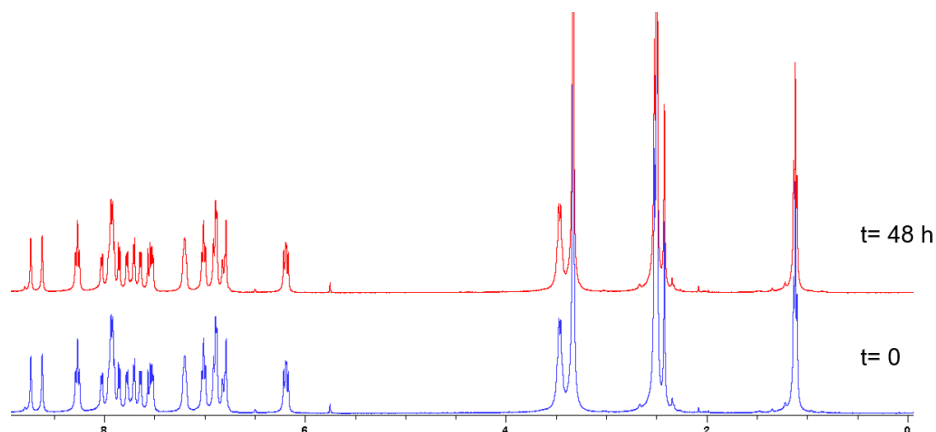


Figura A5.23. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **39** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

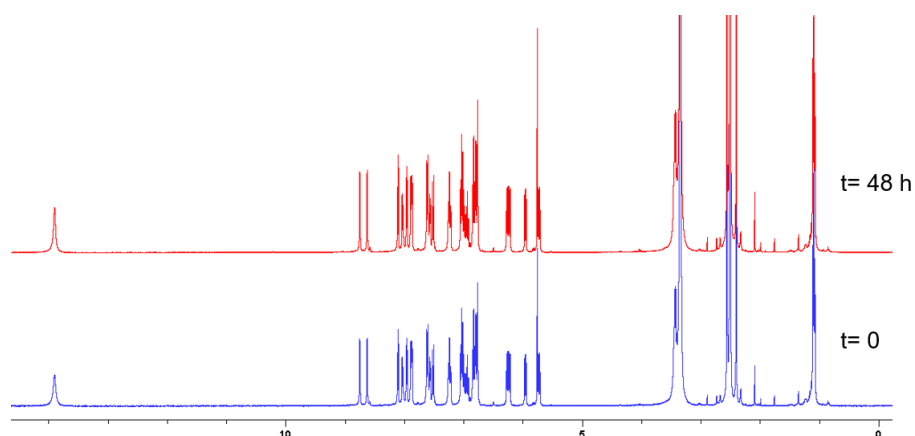


Figura A5.24. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **40** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

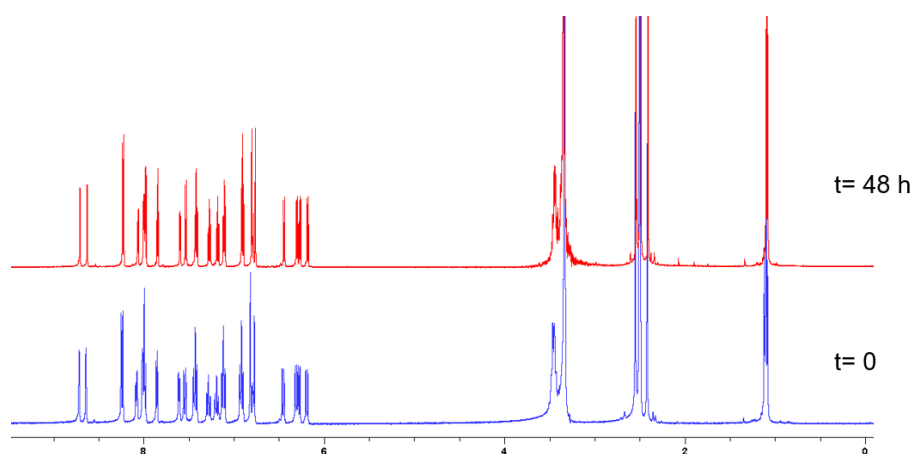


Figura A5.25. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **41** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

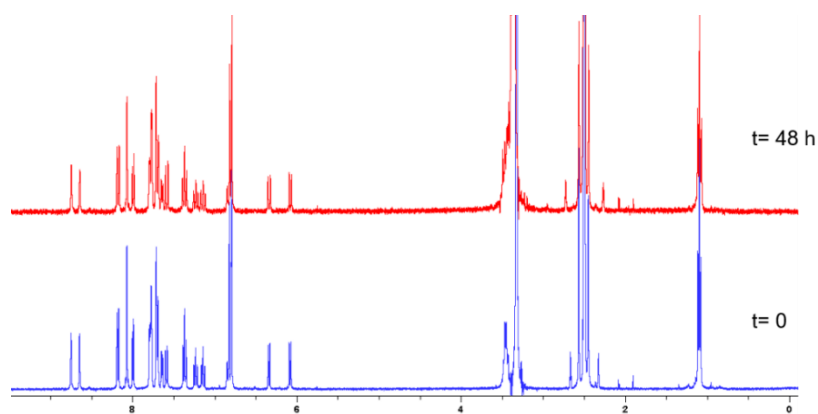


Figura A5.26. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **43** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

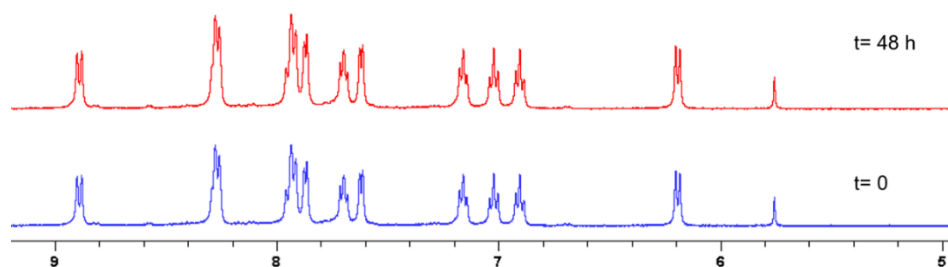


Figura A5.27. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **44** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

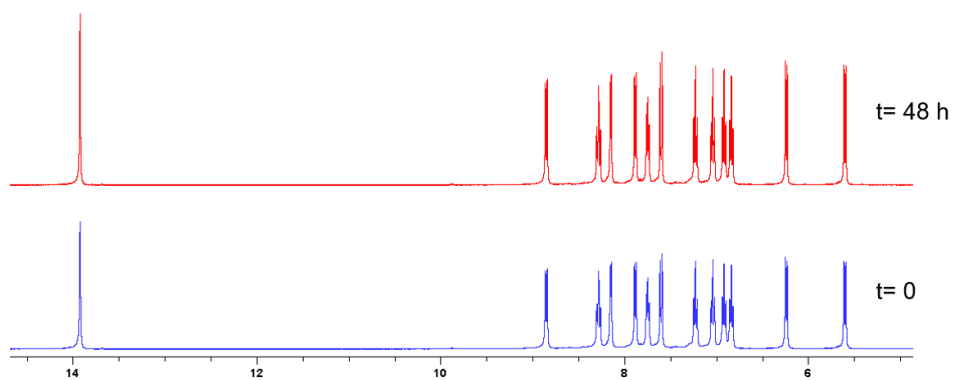


Figura A5.28. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **45** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

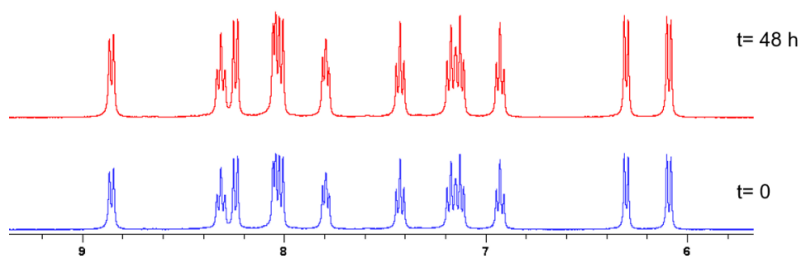


Figura A5.29. Espectros de ¹H-RMN del compuesto **46** en DMSO-*d*₆ a t= 0 y tras 48 h de incubación a t.a.

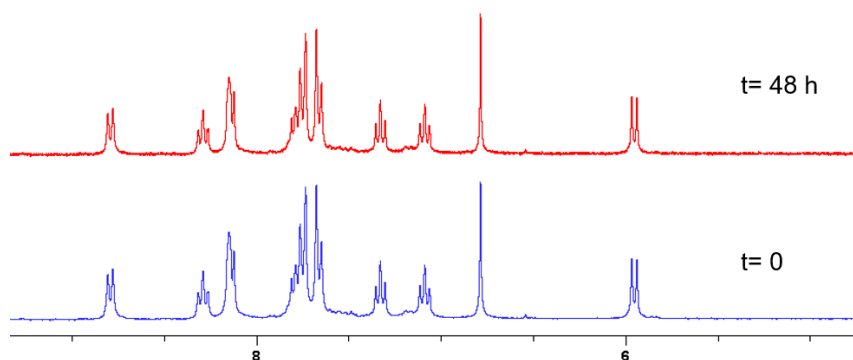


Figura A5.30. Espectros de ^1H -RMN del compuesto **48** en $\text{DMSO}-d_6$ a $t=0$ y tras 48 h de incubación a t.a.

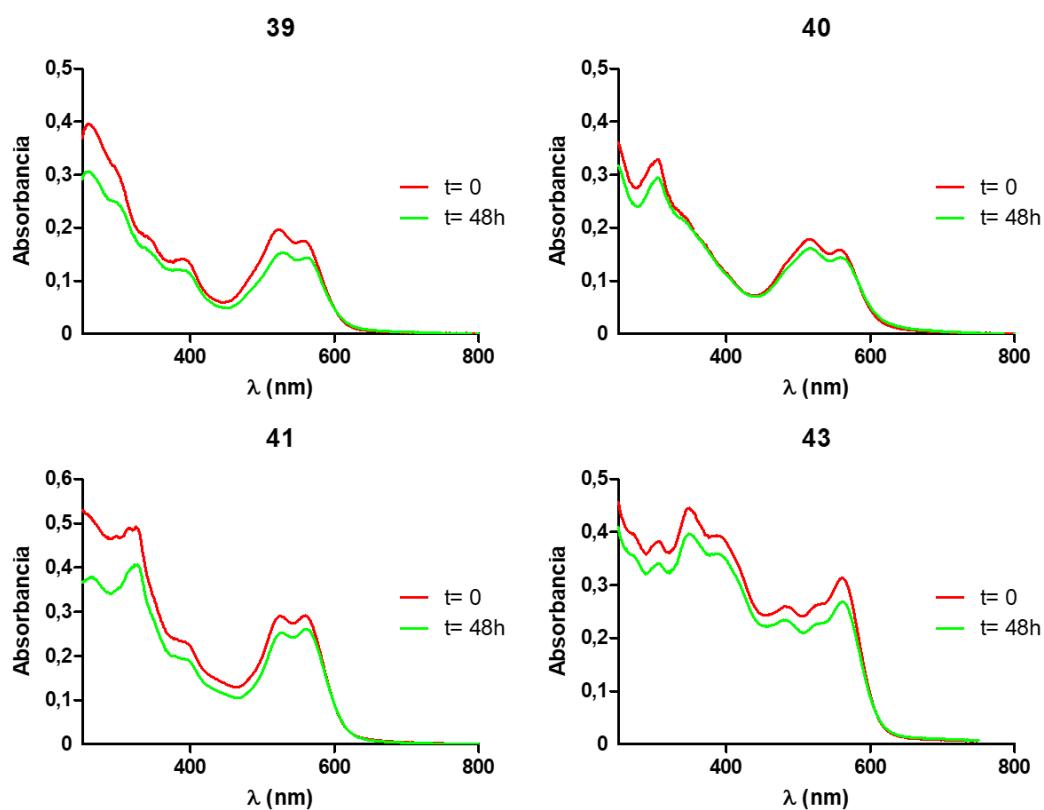


Figura A5.31. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **39-43** (10 μM) en RPMI (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 48 h de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$.

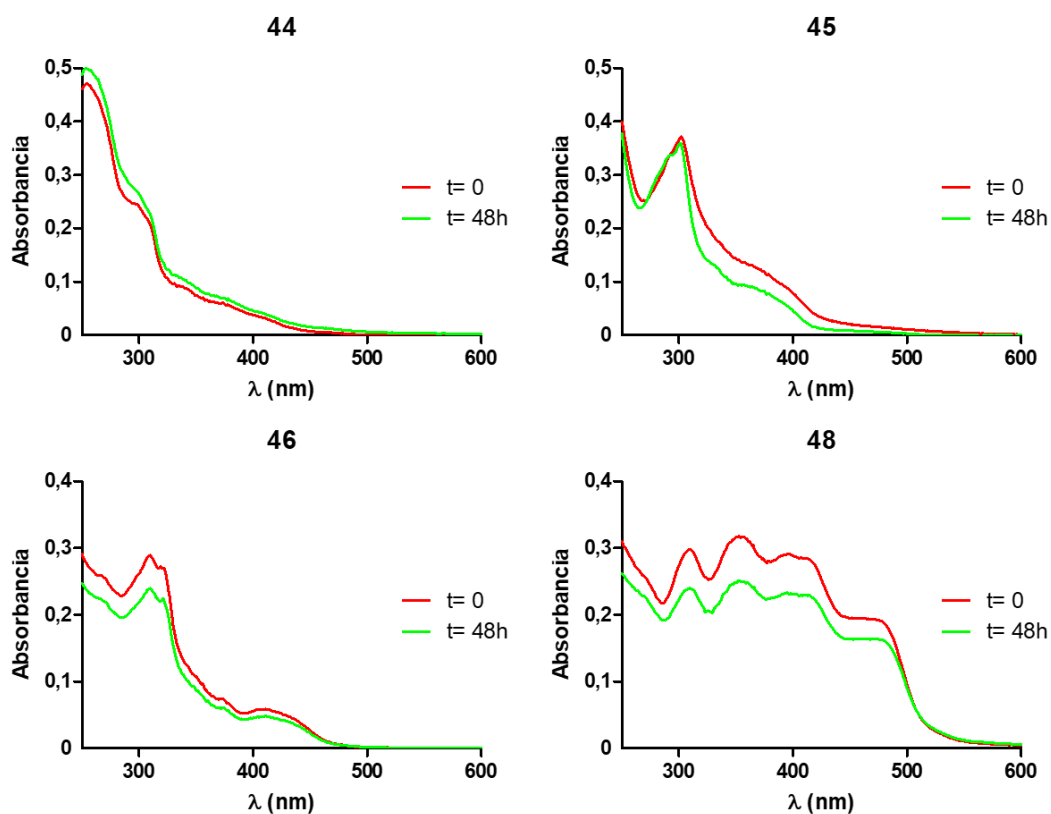


Figura A5.32. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **44-48** (10 μ M) en RPMI (5 % DMSO) a $t=0$ y tras 48 h de incubación a 37 $^{\circ}$ C.

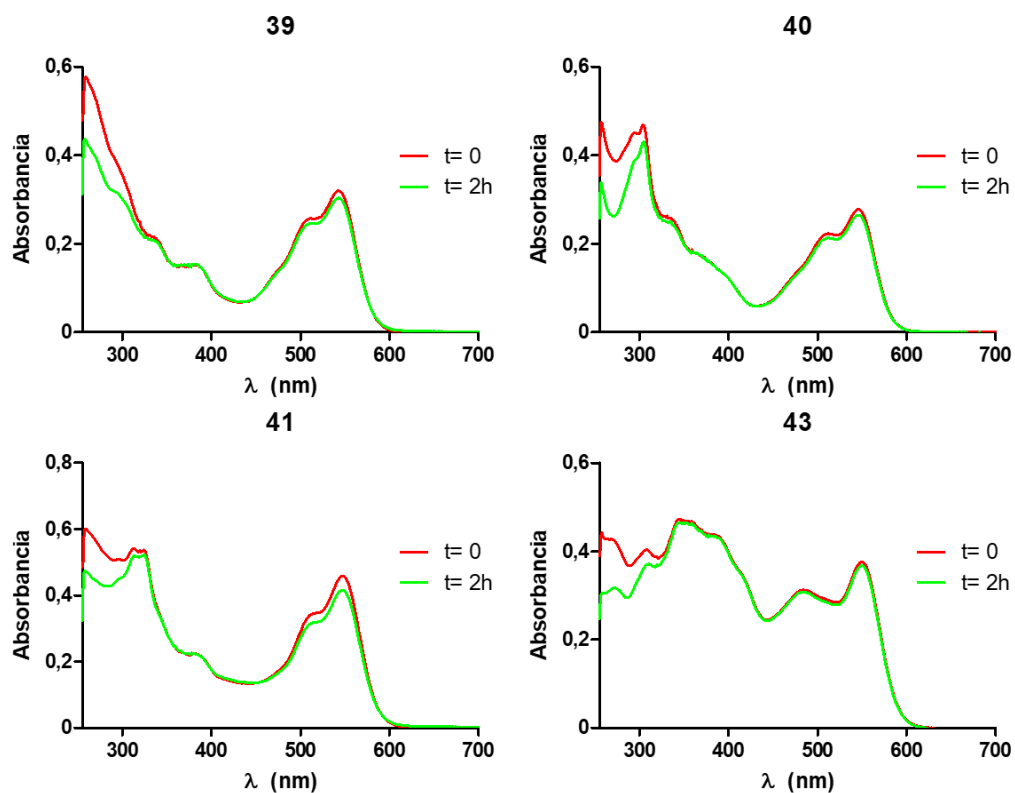


Figura A5.33. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **39-43** (10 μ M) en DMSO a $t=0$ y tras 2 h de irradiación con luz verde (2,0 mW/cm^2).

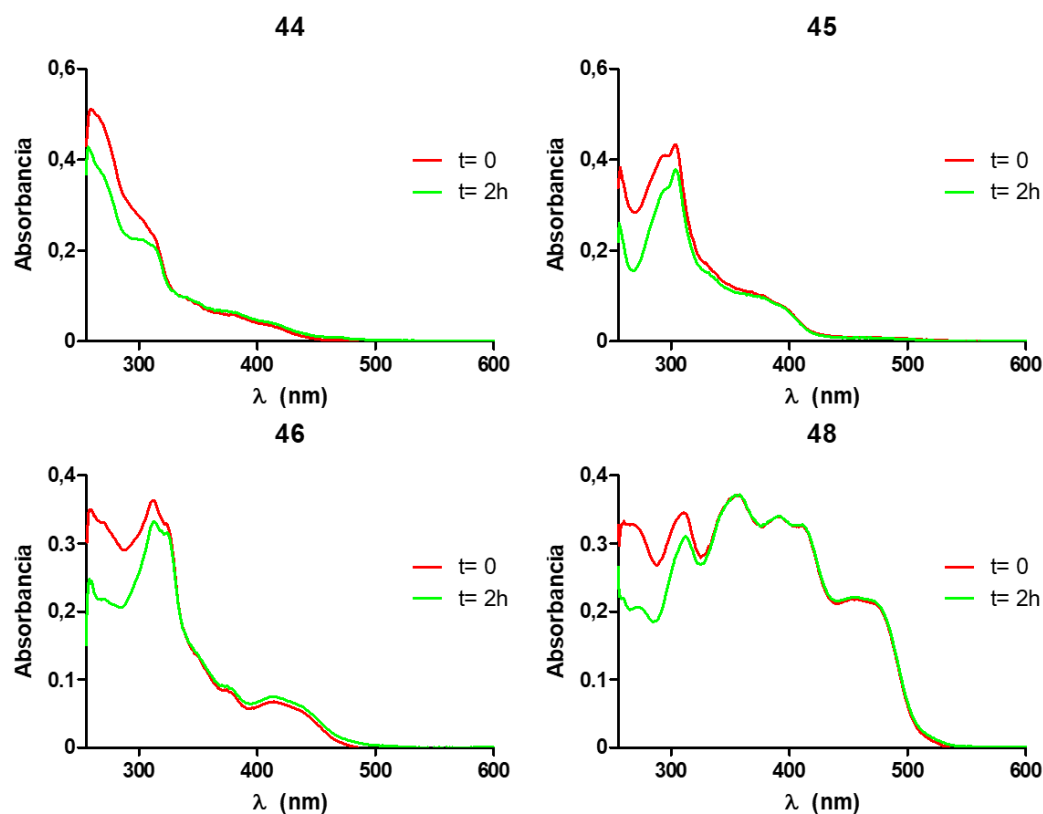


Figura A5.34. Espectros de absorción UV/Visible de los compuestos **44-48** ($10 \mu\text{M}$) en DMSO a $t=0$ y tras 2 h de irradiación con luz azul (4.0 mW/cm^2).

5. Fotooxidación del NADH

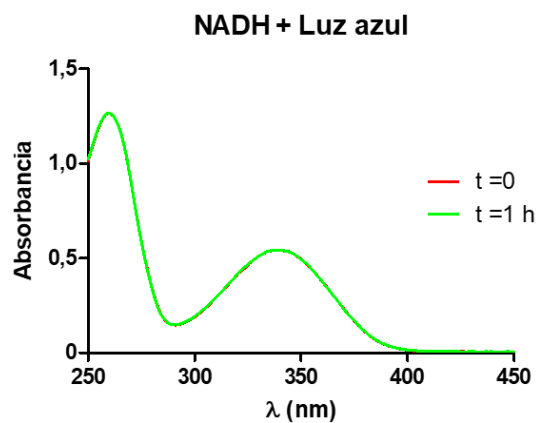


Figura A5.35. Espectro de absorción UV/Visible del NADH ($100 \mu\text{M}$) en PBS (5 % DMF) tras 1 h de irradiación con luz azul (465 nm , 4.0 mW/cm^2).

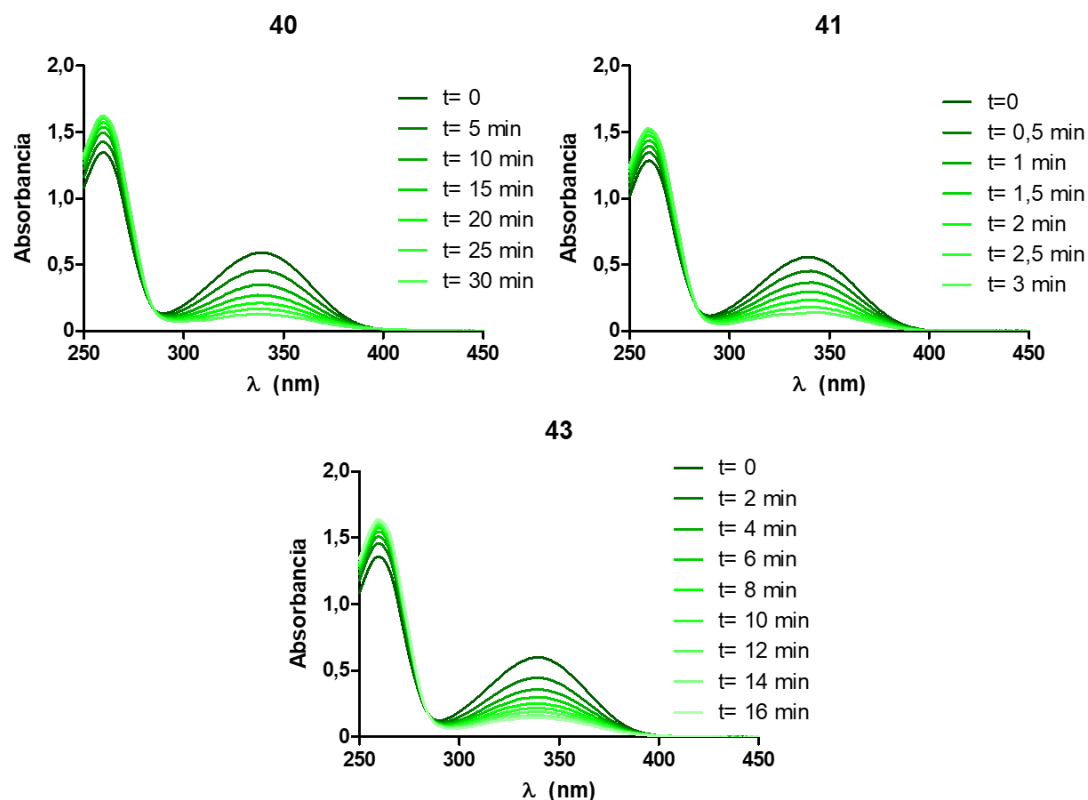


Figura A5.36. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **40**, **41** y **43** (5 μM) tras irradiación de luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²).

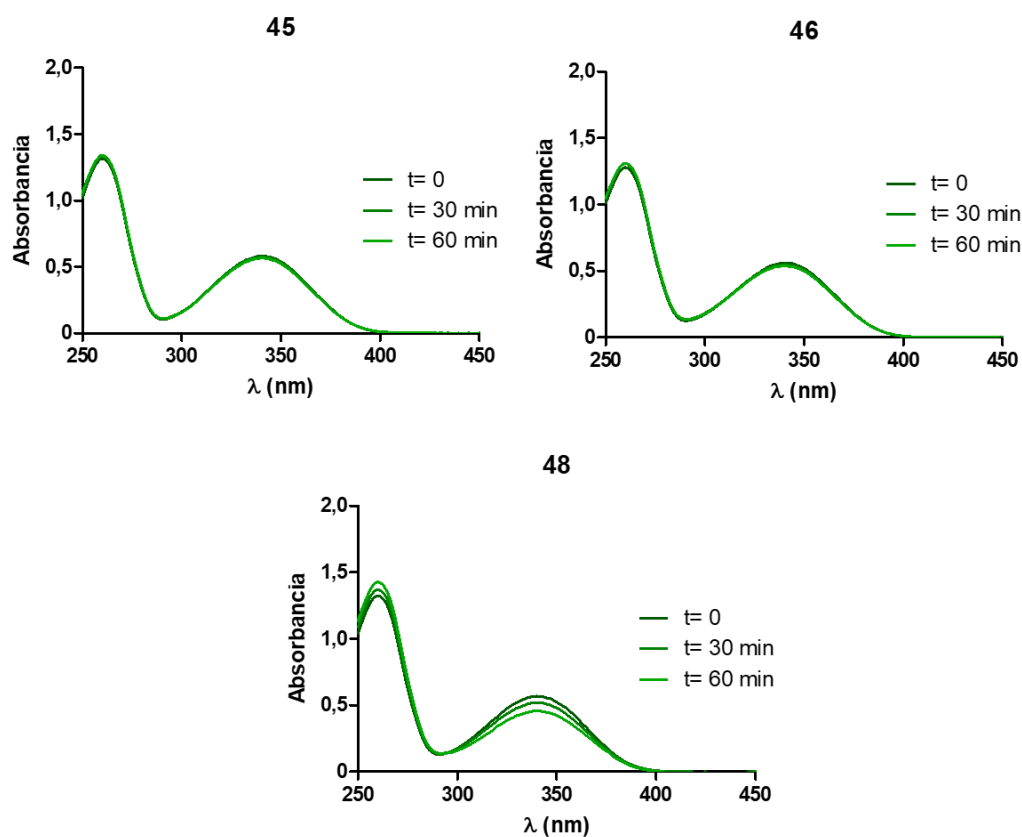


Figura A5.37. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **45**, **46** y **48** (5 μM) tras irradiación de luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²).

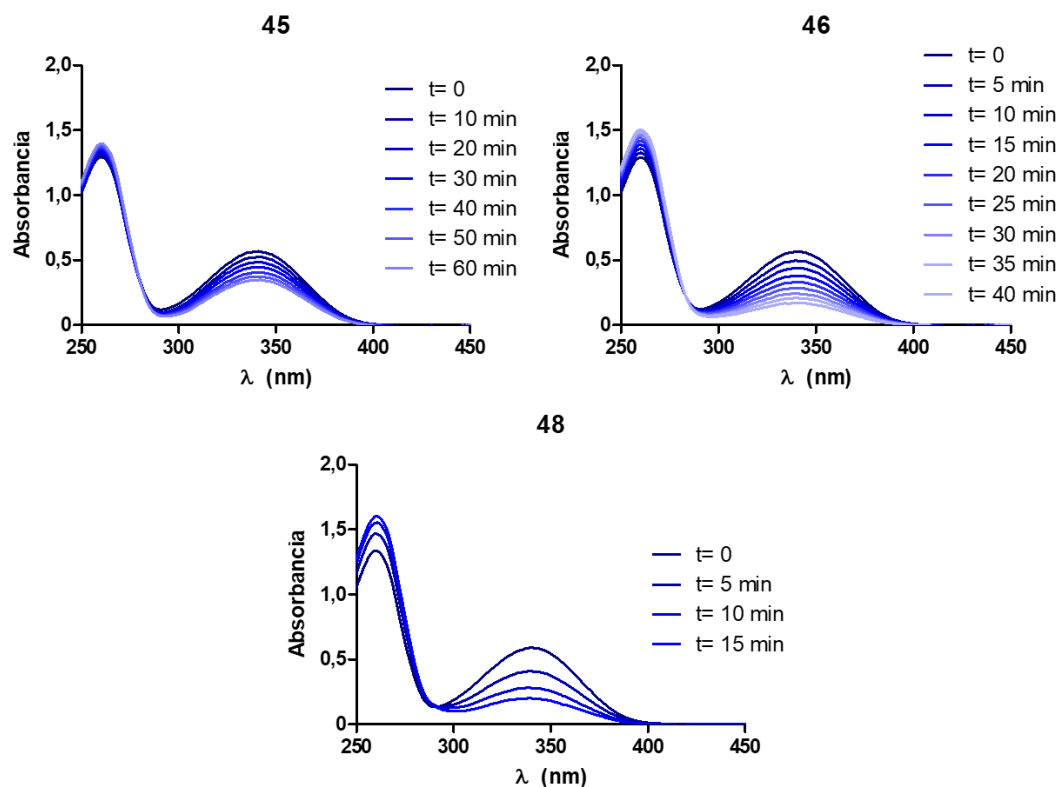


Figura A5.38. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **45**, **46** y **48** (5 μM) tras irradiación de luz azul (465 nm, 4,0 mW/cm²).

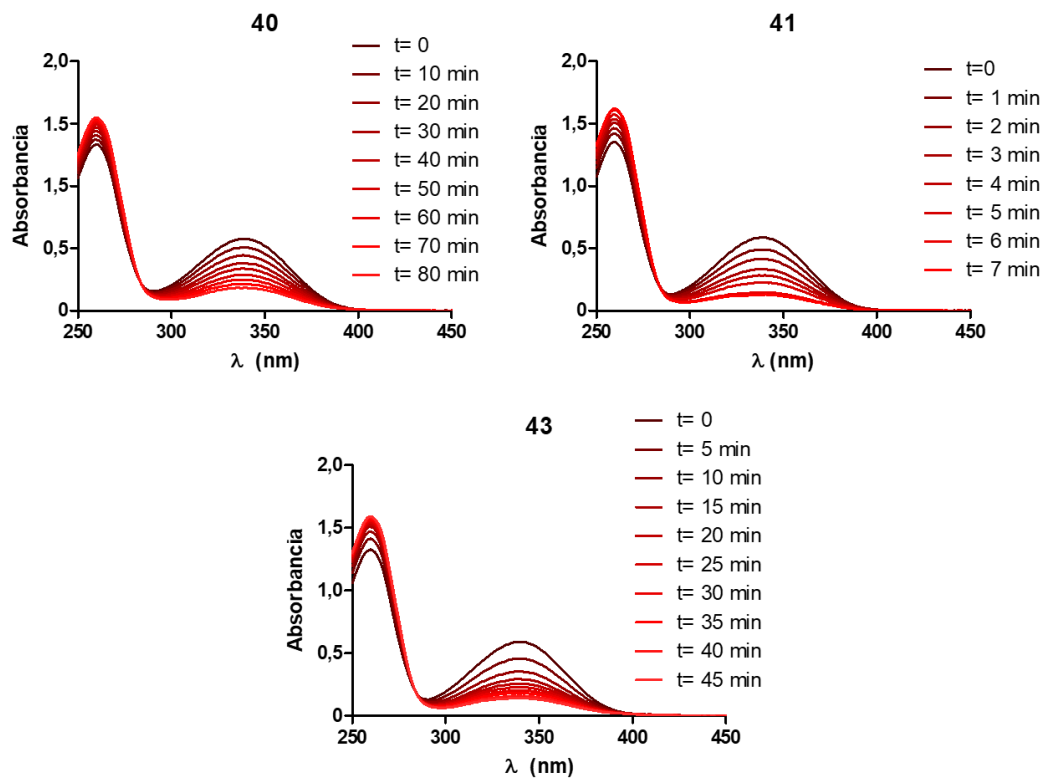


Figura A5.39. Fotooxidación del NADH (100 μM) en presencia de los compuestos **40**, **41** y **43** (5 μM) tras irradiación de luz roja (620 nm, 15 mW/cm²).

6. Generación de oxígeno singlete

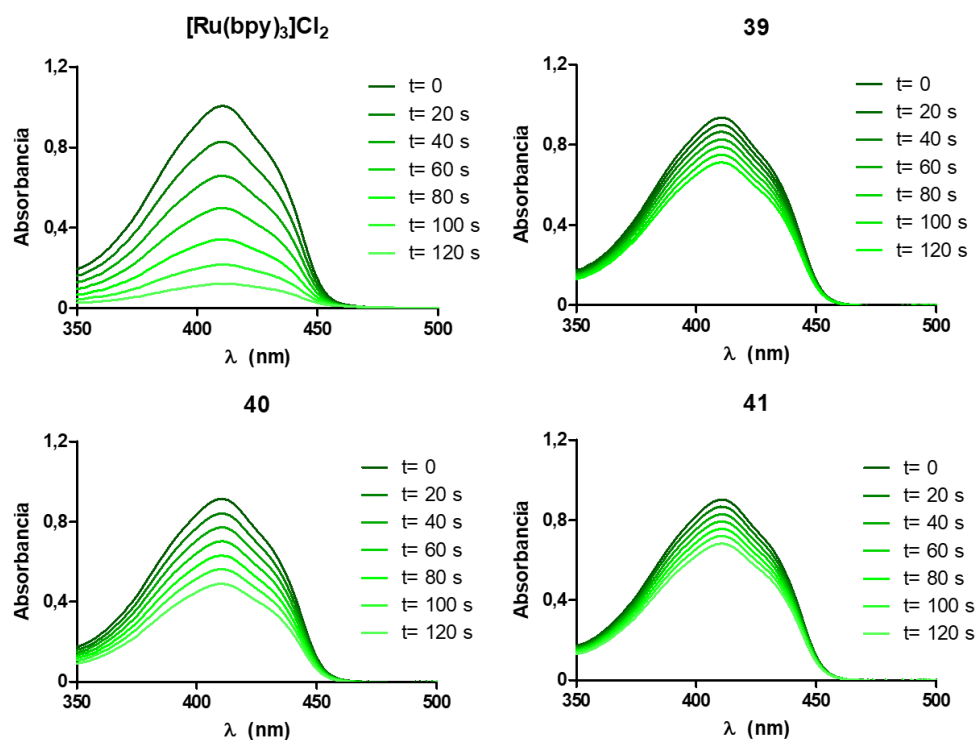


Figura A5.40. Espectro de absorción UV/Vis de DPBF (50 μM) en presencia de la referencia ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, 50 μM) y de los compuestos **39-41** en acetonitrilo aireado tras irradiación con luz verde (520 nm, 0,5 mW/cm²).

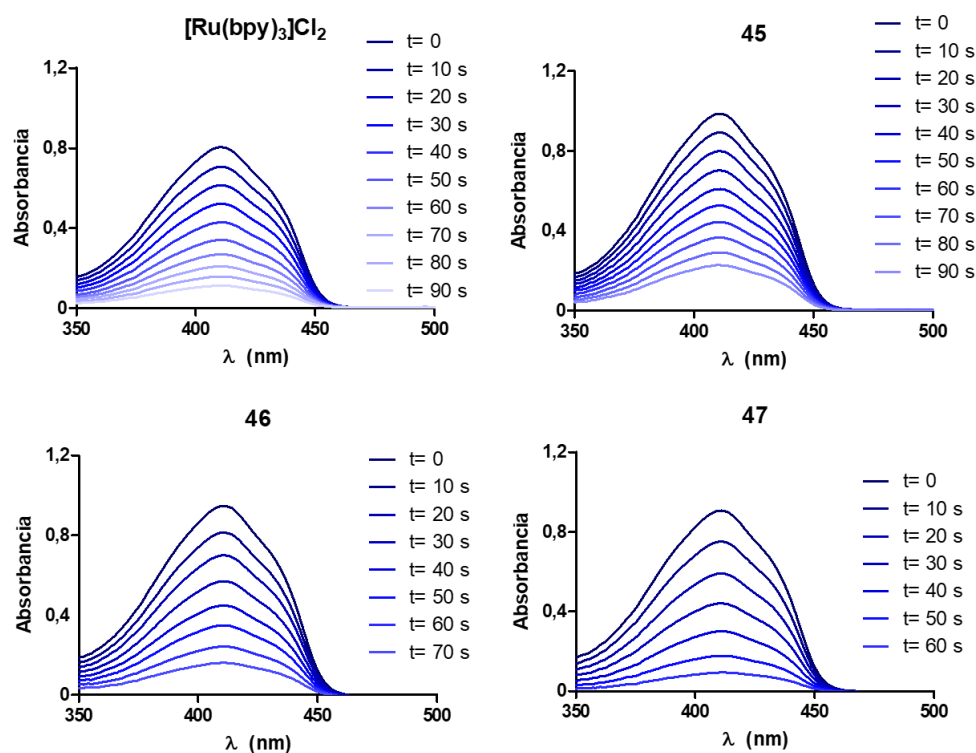


Figura A5.41. Espectro de absorción del DPBF en acetonitrilo aireado presencia de la referencia ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, 5 μM) y de los compuestos **45-47** tras la irradiación con luz azul (465 nm, 0,5 mW/cm²)

7. Generación de radicales hidroxilo

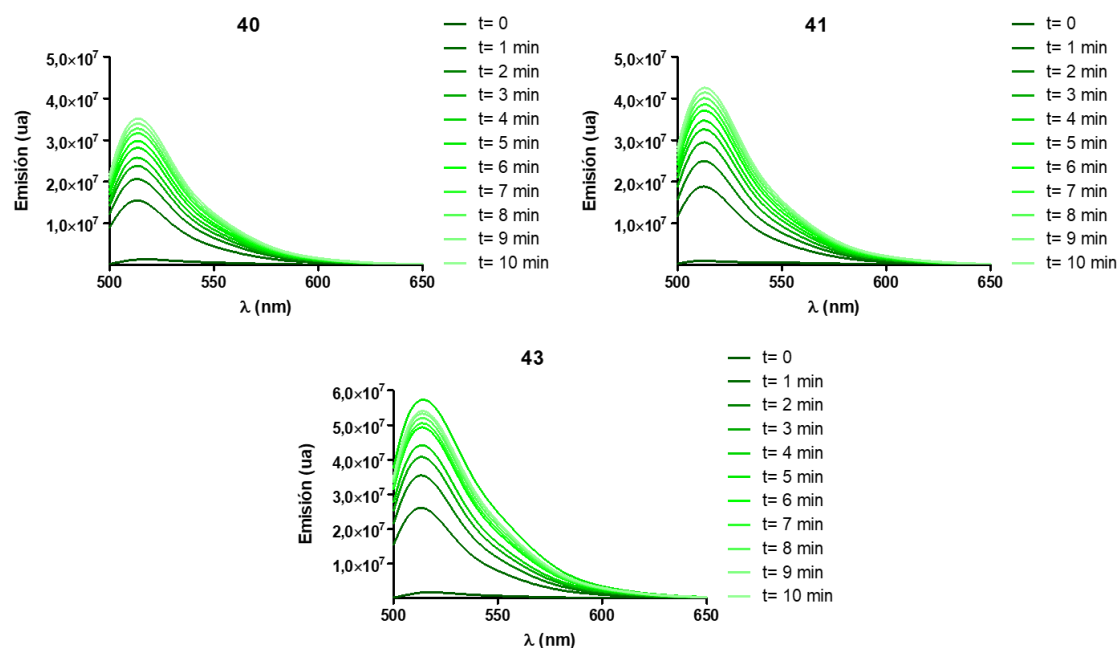


Figura A5.42. Espectro de emisión de la HPF (10 μM) en presencia de los complejos **40**, **41** y **43** (10 μM) tras la irradiación con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo.

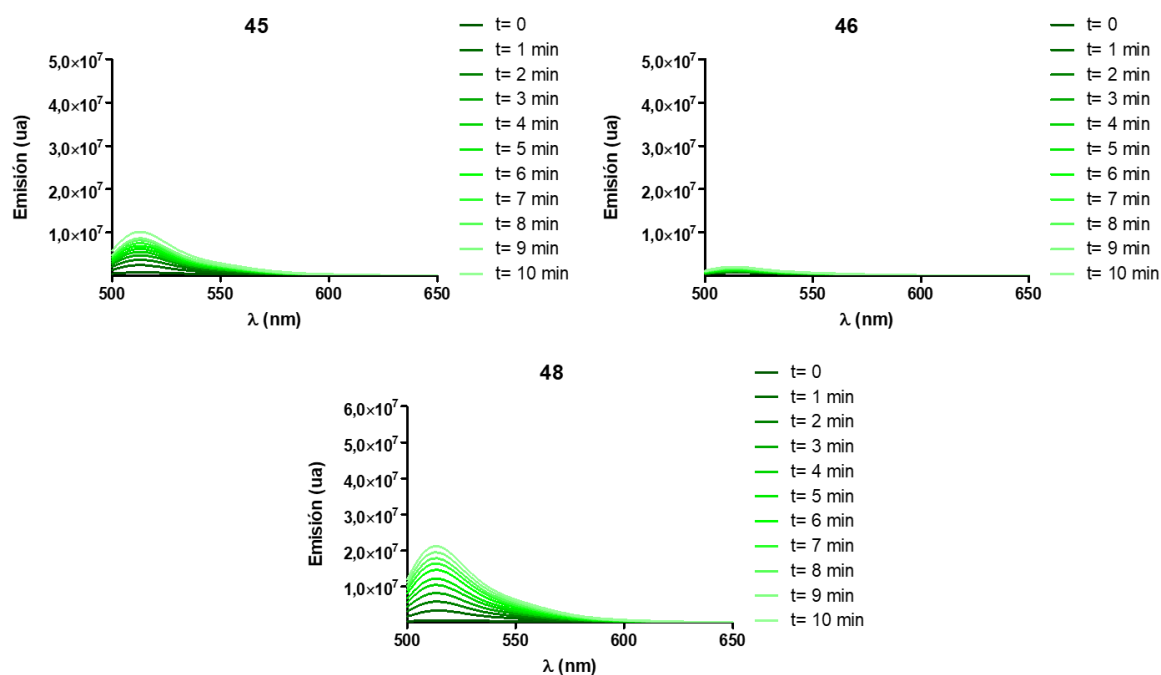


Figura A5.43. Espectro de emisión de la HPF (10 μM) en presencia de los complejos **45**, **46**, y **48** (10 μM) tras la irradiación con luz verde (520 nm, 2,0 mW/cm²) en un intervalo de tiempo.

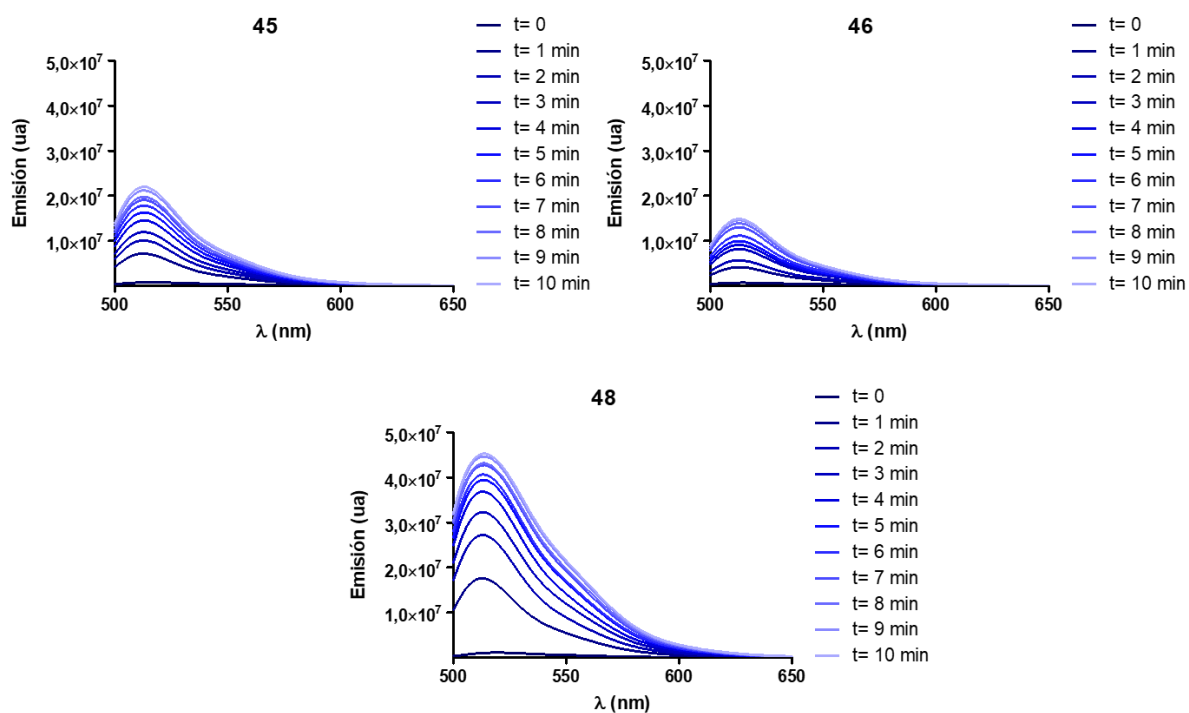


Figura A5.44. Espectro de emisión de la HPF ($10 \mu\text{M}$) en presencia de los complejos **45**, **46** y **48** ($10 \mu\text{M}$) tras la irradiación con luz azul (465 nm , $4,0 \text{ mW/cm}^2$) en un intervalo de tiempo.