



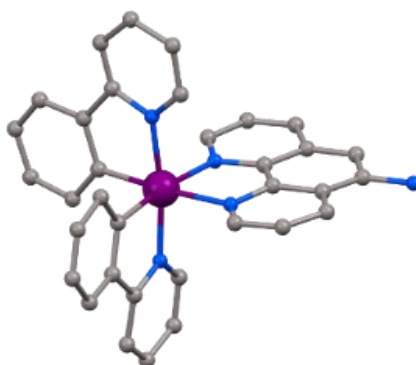
**Universidad
Zaragoza**



**Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza**

Trabajo de Fin de Grado 2021-2022

Síntesis y estudio de complejos ortometalados de iridio (III)



Alejandro Soriano Jarabo

Directora: Vanesa Fernández Moreira

Departamento de Química Inorgánica

Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
3.1. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS	10
3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS	13
3.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS	19
3.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	21
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	24
4.1. INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES.....	24
4.2. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	24
SÍNTESIS DEL COMPUESTO A	24
SÍNTESIS DEL COMPUESTO B	25
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₁	26
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₂	26
SÍNTESIS DEL COMPUESTO C ₂	27
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₃	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA	30

ABREVIATURAS

<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>THF</i>	Tetrahidrofurano
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>IC</i>	Inhibitory concentration
<i>PI</i>	Índice de fotocitotoxicidad
<i>5-am-phen</i>	5-amino-1,10-fenantrolina
<i>ppy</i>	2-fenilpiridina
<i>LLCT</i>	Ligand to Ligand Charge Transfer
<i>MLCT</i>	Metal to Ligand Charge Transfer
<i>MTT</i>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<i>TFD</i>	Terapia fotodinámica
<i>ROS</i>	Reactive Oxygen Species
<i>MT</i>	Metales de Transición
<i>FS</i>	Fotosensibilizante
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>UV-vis</i>	Ultravioleta-visible
<i>COSY</i>	Correlations Spectroscopy
<i>HSQC</i>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>HMBC</i>	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
<i>TLC</i>	Thin Layer Chromatography

RESUMEN

En los últimos años la terapia fotodinámica (TFD) está ganando un gran interés por su gran eficacia en el tratamiento específico de cánceres como el de piel o garganta entre otros. Esta terapia presenta gran selectividad y control espacial que permite minimizar muchos efectos secundarios, por lo que es altamente demandada. Los compuestos de Ir^{III} han demostrado tener grandes capacidades como fotosensibilizadores (FSs) en TFD. Con el objetivo de desarrollar y sintetizar compuestos ortometalados de Ir^{III} que puedan ser utilizados tanto en bioimagen como en TFD, se ha llevado a cabo la síntesis de complejos de iridio catiónicos del tipo $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]$ donde N[^]N representa los ligandos N-dadores bidentados con cromóforo sintetizados. Se han utilizado este tipo de ligandos ya que la coordinación bidentada de estos con el iridio se prevé que sea robusta, además el ligando de partida que utilizaremos puede formar una unión fuerte del tipo tiourea entre él y los cromóforos orgánicos.

En detalle, se sintetizarán tres ligandos, formados todos a partir de la 5-amino-1,10-fenantrolina a la cual se ha unido a través su grupo amina, el grupo isotiocianato de 3 cromóforos orgánicos distintos. Posteriormente se evaluarán las propiedades foto-físicas de los complejos mediante espectroscopia de emisión y absorción UV-vis. También se han llevado a cabo estudios biológicos para comprobar el posible uso de los complejos en terapia fotodinámica, midiendo su citotoxicidad en ausencia y presencia de radiación. Los resultados muestran que tanto un complejo formado como la 5-amino-1,10-fenantrolina son muy citotóxicos aún en ausencia de radiación lo cual impide su uso fototerapéutico. Adicionalmente, debido a su poca intensidad de emisión tampoco serían útiles como agentes de bioimagen. También, se muestra la dificultad experimental en mantener intacto el enlace tipo tiourea cuando se procede a la coordinación N-bidentada de los ligandos N[^]N al Ir^{III}. Se discutirán los distintos problemas y soluciones que se dieron para abordar la síntesis de los complejos.

ABSTRACT

Over the last few years, photodynamic therapy (PDT) has gained a great interest in the treatment of skin cancer and throat cancer, among others. This therapy is selective and presents spatial control that minimizes many side effects, so it is highly demanded. Ir^{III} compounds have been shown great capabilities as PSs in PDT. The aim of this work is to develop and synthesize orthometallated Ir^{III} compounds that can be used in both bioimaging and therapy. Therefore, the synthesis of cationic iridium complexes of the type [Ir(ppy)₂(N[^]N)₂] where N[^]N represents the synthesized N-donor bidentate ligands that contain an organic chromophore, bonded through a thiourea moiety, has been carried out. These types of ligands have been used as their both, bidentate coordination with iridium and the chromophore thiourea binding are expected to be robust.

In particular, three ligands will be synthesized, all starting from 5-amino-1,10-phenanthroline, and three isothiocyanate organic chromophores derivatives to form the thiourea quelates N[^]N. Thereafter their coordination to the Ir^{III} metal center, evaluation of the photophysical properties using an UV-visible absorption and emission spectroscopy will be performed. Biological studies have also been carried out to test the possible use of the complexes in photodynamic therapy via cytotoxicity assays in presence and absence of irradiation. The results show that a complex formed and 5-amino-1,10-phenanthroline are highly cytotoxic even in absence of radiation, which prevents their therapeutic use. In addition, they are not useful as bioimaging agents due to their low emission intensity observed by fluorescence spectroscopy. Also, the experimental difficulty for maintaining the thiourea bond intact when the N[^]N ligand is coordinated to the Ir^{III} residue is highlighted.

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo final en el desarrollo de fármacos es diseñarlo de tal forma que ejerza el máximo beneficio posible en el tejido objetivo produciendo los mínimos efectos secundarios en el resto del organismo. Sin embargo, esto no siempre es posible y los efectos secundarios son habituales en la mayoría de los fármacos, sobre todo cuando hablamos de fármacos para el tratamiento del cáncer. Dentro de las distintas terapias existentes para dar solución o mitigar los efectos nocivos de esta enfermedad, se encuentra la terapia fotodinámica (TFD). La TFD se basa en el uso de compuestos o profármacos que se activan mediante el uso de luz. Estos compuestos son conocidos como fotosensibilizadores (FSs) y su actividad terapéutica es muy localizada, ya que únicamente ejercen su acción citotóxica en aquellos lugares donde se le aplica la irradiación localizada de luz, minimizando así los efectos secundarios. Hay que tener en cuenta que los FS no deben ser tóxicos en ausencia de luz ya que sino la TFD carecería de la selectividad y ausencia de efectos secundarios necesaria.

En la TFD, al paciente se le suministra el FS no activo mediante diferentes vías (sistémica, intravenosa, etc) la vía de administración dependerá de la enfermedad. A continuación, se permite a la FS acumularse en todo el cuerpo, tanto en tejidos sanos como los no sanos. Una vez que alcanza el máximo de concentración en el tejido no sano, el FS se activa mediante la irradiación localizada con una luz de una longitud de onda específica. De la longitud de onda irradiada dependerá su capacidad de penetración en el tejido, siendo esta penetración mayor cuanto mayor es la longitud de onda y permitiendo el tratamiento de tumores más grandes y profundos (cuanto más pueda penetrar en el tejido sin dañarlo, más efectivo será el FS).¹

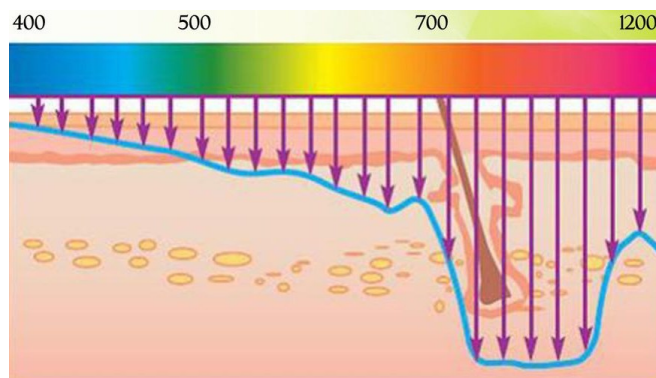


Figura 1. Rango de penetración en los tejidos dependiendo de la longitud de onda.

Tras la irradiación, el fotosensibilizante (FS) que absorbe la luz se excitará a un estado excitado singlete ($^1\text{FS}^*$), este estado puede desactivarse mediante conversión interna o puede producir una relajación radiativa dando fluorescencia. También puede ocurrir un cruce intersistemas que genere un estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$), debido a la naturaleza de espín prohibido de este proceso el estado excitado triplete puede ser muy duradero. La combinación de este estado triplete con la presencia de oxígeno en estado de mínima energía ($^3\text{O}_2$) generará las especies que producirán los daños en la célula.²

Estas especies se pueden generar mediante dos tipos de procesos, el tipo I en el cual se produce una transferencia electrónica para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de $^3\text{O}_2$, o el tipo II donde se produce la transferencia energética para producir $^1\text{O}_2$ a partir del $^3\text{O}_2$. Los PS aprobados producen citotoxicidad a partir del proceso de tipo II mayoritariamente. Una vez producido el $^1\text{O}_2$ o las ROS, las células serán dañadas por oxidación lo cual conducirá a la muerte celular, normalmente mediante una vía apoptótica.³

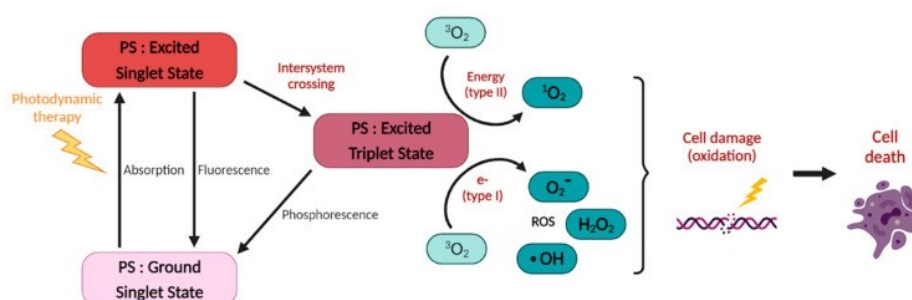


Figura 2. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (TFD).³

Dentro de este contexto, los complejos metálicos juegan un papel importante en la aplicación de la química inorgánica en la terapia o diagnóstico de enfermedades, actuando como FS. La razón por la cual el uso de los metales de transición (MT) en TFD es cada vez más demandado se debe a que cumplen varios requisitos esenciales como FS: absorción de luz eficientemente en la región del visible y eficiente y rápida población de los estados excitados tripletes debido a que la presencia del metal que favorece el acoplamiento espín-orbita, esto último conduce a altos rendimientos en la generación de oxígeno singlete. A diferencia de la mayoría de los orgánicos utilizados en TFD, los complejos de MT son generalmente fotoestables bajo iluminación prolongada de fotones lo que permite el reciclaje prolongado del FS y, por tanto, una reducción de la dosis general de FS necesaria. Además, añadido a todas las propiedades fotofísicas mencionadas hay que destacar la relativa facilidad sintética y la gran cantidad de ligandos que se puede utilizar, lo cual permite adaptar las características fotofísicas a nuestras necesidades.

Dentro de la gran cantidad de metales que se incluyen en los MT los que mejores propiedades presentan para ser seleccionados como FS son los siguientes: Ru^{II} , Os^{II} , Ir^{III} , Pt^{I} y Re^{I} .¹

Concretamente los estudios recientes en química médica han demostrado que los compuestos de Ir^{III} poseen una actividad anticancerígena muy prometedora. El iridio tiene la capacidad de mostrar un estado de oxidación variable y una estabilidad cinética en el sistema biológico, además, tiene una amplia reactividad y pueden formar un gran número de estructuras haciendo uso de rutas sintéticas bien establecidas. Otra ventaja que tienen los compuestos de iridio es la relativa facilidad para diseñar complejos solubles en agua lo que favorece su uso como FS. Además, tienen una buena actividad antiproliferativa *in vitro/in vivo*.

En los últimos años, los complejos organometálicos de iridio han sido ampliamente estudiados como anticancerígenos. Entre otros mecanismos de acción vistos para este tipo de compuestos destaca la posibilidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que les permite inducir la apoptosis celular actuando sobre las mitocondrias y el ADN.⁴

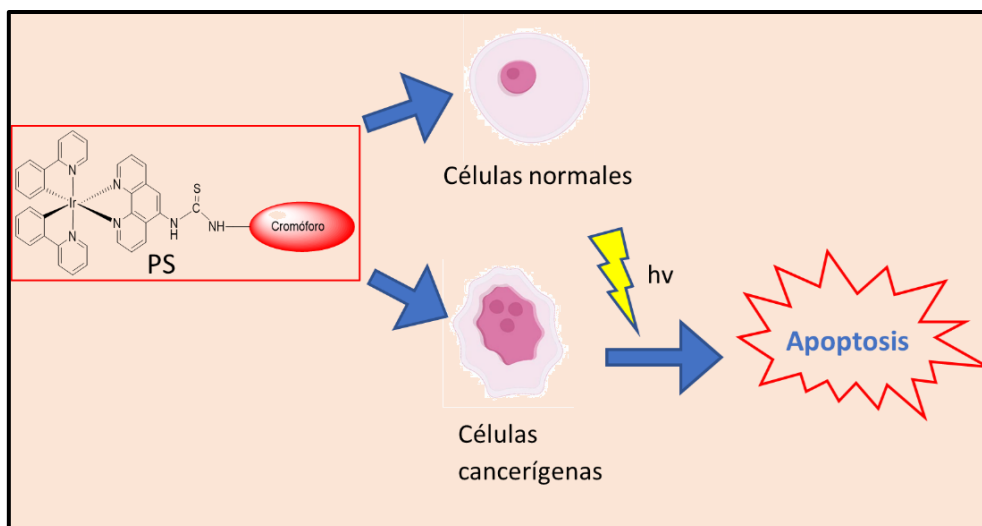


Figura 3. Mecanismo del efecto de complejos de Ir^{III} sobre células tumorales.

Hasta ahora habíamos visto la parte terapéutica de la TFD, pero para que los PSs sean localizados en el organismo necesitan también poder ser observados y tener propiedades luminiscentes. Para ello nosotros nos centraremos en el uso de cromóforos orgánicos como agentes de visualización y el uso de la microscopia de fluorescencia como técnica de bioimagen. La microscopia de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas en biología debido al gran avance en los últimos años tanto en la mejora de ópticas confocales así como en el desarrollo de nuevos fluoróforos. Comparadas con otras técnicas de bioimagen la microscopía de fluorescencia tiene ventajas como las de no necesitar exposición a la radiación, tener un bajo coste, portabilidad, alta resolución y adquisición de imágenes en tiempo real. Los cromóforos orgánicos han sido ampliamente usados como agentes de visualización. Entre ellos cabe destacar moléculas como derivados de fluoresceína, rodamina, BODIPY, acridinas, cianinas, etc, que se pueden funcionalizar con distintos grupos para que puedan unirse a distintas moléculas y así actuar como antena fluorescente y permitir su visualización.

En concreto, el isotiocianato de fluoresceína, que es un derivado de la fluoresceína del grupo de los cromóforos derivados de xanteno, tiene un amplio rango de aplicaciones, especialmente en la microscopía de inmunofluorescencia. Este compuesto con un grupo isotiocianato lo convierte en reactivo frente a nucleófilos como pueden ser grupos amino y sulfhídrico de las proteínas. El isotiocianato de fluoresceína tiene un buen rendimiento cuántico ya que la mitad de los fotones absorbidos se emiten en forma de luz fluorescente.⁵

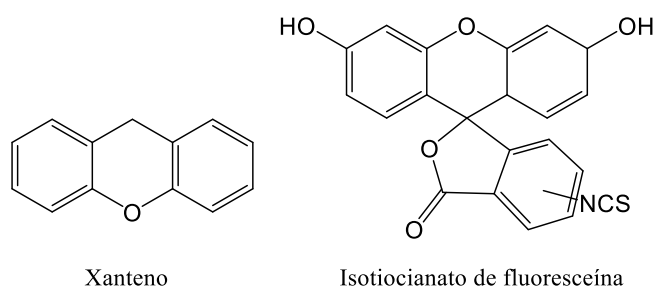


Figura 4. Xanteno y su derivado: isotiocianato de fluoresceína, usado como cromóforo orgánico.

2. OBJETIVOS

Como hemos mencionado anteriormente los complejos de Ir^{III} tienen un futuro muy prometedor como agentes antitumorales, por ello nosotros nos dedicaremos al desarrollo y síntesis de compuestos ortometalados de Ir^{III} que puedan ser utilizados de forma dual en imagen y terapia fotodinámica). Es decir, prepararemos compuestos con una fracción luminiscente (imagen) y una fracción que puede actuar como FS (terapia), ver Figura 5.

Para conseguirlo combinaremos fragmentos metálicos de Ir^{III}, potencialmente activo en terapia, con cromóforo orgánico de forma que nos ayude a visualizar dicho fragmento mediante técnicas de microscopía por fluorescencia. El puente de unión entre el fragmento metálico y el cromóforo será a través de un grupo tiourea.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Sintetizar una serie de ligandos tiourea bidentados (N^N) usando como molde la 5-amino-1,10-fenantrolina, y distintos cromóforos orgánicos derivados de isotiocianato.
2. Sintetizar complejos de Ir^{III}: [Ir(C^N)₂(N^N)₂] donde C^N es el ligando 2-fenilpiridina (ppy), N^N los distintos ligandos tiourea bidentados.
3. Caracterizar los complejos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), de carbono (¹³C-RMN), bidimensionales de correlación mononuclear COSY-¹H/¹H y heteronuclear HSQC-¹H/¹³C.
4. Analizar las propiedades ópticas de los complejos formados mediante espectroscopia UV-visible y de emisión.
5. Análisis de las propiedades citotóxicas en presencia y ausencia de radiación mediante el ensayo MTT, así como de su capacidad como agente de visualización por técnicas de microscopía de fluorescencia.

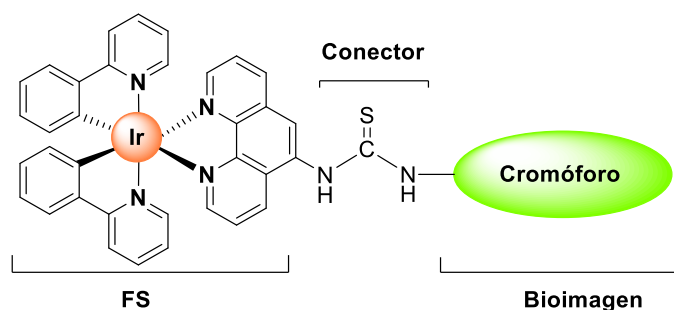


Figura 5. Esquema de los complejos de Ir^{III} con la parte cromófora y el fragmento metálico unidos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La idea principal es desarrollar complejos de Ir^{III} que posean la capacidad de actuar como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica y al mismo tiempo puedan usarse como sondas de visualización para la localización del tumor mediante la emisión fluorescente. En ambos casos necesitaremos irradiar radiación de una longitud de onda específica para que se produzca el efecto deseado, por tanto, lo ideal es que la longitud de onda que produce cada efecto este bien diferenciada. De modo que podremos seleccionar la función que queramos darle en cada momento (terapéutica o de biodistribucion). Para ello debemos unir fragmentos que posean propiedades fotofísicas bien diferenciadas como van a ser complejos ortometalados de Ir^{III}, que poseen la capacidad de actuar como FS, y cromóforos orgánicos, los cuales pueden usarse para bioimagen.

Concretamente, en este Trabajo de Fin de Grado, los complejos de Ir^{III} que queremos sintetizar son del tipo de los mostrados anteriormente en la Figura 5. En ellos el metal está coordinado a dos ligandos 2-fenilpiridina (ppy) de forma bidentada, mediante el nitrógeno piridínico y un carbono del anillo fenilo (N[^]C). Los cromóforos que usaremos se coordinarán a la 5-amino-1,10-fenantrolina a través de su grupo amino y esta se unirá al metal de forma quelato mediante sus dos nitrógenos piridínicos (N[^]N). De esta forma completaremos la hexa-coordinación que ofrece el Ir^{III}. La parte de nuestro complejo que contendrá las propiedades terapéuticas será el Ir coordinado a los tres ligandos bidentados, mientras que las propiedades de bioimagen las ofrecerá el cromóforo orgánico unido a la fenantrolina. Se espera poder activar dichas propiedades de visualización y terapéuticas por separado puesto que cada fragmento tiene unas propiedades ópticas localizadas en distintas partes del espectro visible, naranja rojizo para el fragmento metálico y verde-amarillento para el cromóforo orgánico.

Para la obtención de los compuestos se comenzó con la síntesis de los ligandos tipo N[^]N los cuales llevarán unido el cromóforo orgánico a través de un conector tipo tiourea.

3.1. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS

Se sintetizaron 3 ligandos N-dadores polidentados distintos, todos ellos partiendo de 5-amino-1,10-fenantrolina (5-am-phen) a la cual le agregamos un grupo cromóforo orgánico. La estrategia seguida para la síntesis de los ligandos finales L₁, L₂ y L₃ se basa en la formación de tioureas, partiendo de un cromóforo funcionalizado con un isotiocianato y el ligando diimina conteniendo una amina. En concreto el carbono del grupo isotiocianato posee carga parcial positiva ya que se encuentra entre dos átomos de mayor electronegatividad, como son el nitrógeno y el azufre, por tanto, actuará como electrófilo y reaccionará con el grupo amino de la 5-am-phen que es nucleófilo, formándose así un grupo tiourea que actuará de puente. Esta unión nos permitía una gran versatilidad ya que los nitrógenos piridínicos de la 5-am-phen seguían libres para poder coordinarse de forma bidentada con el Ir^{III}. Siguiendo esta estrategia sintetizamos el ligando L₁, posteriormente el L₂ y finalmente el L₃, Figura 6.

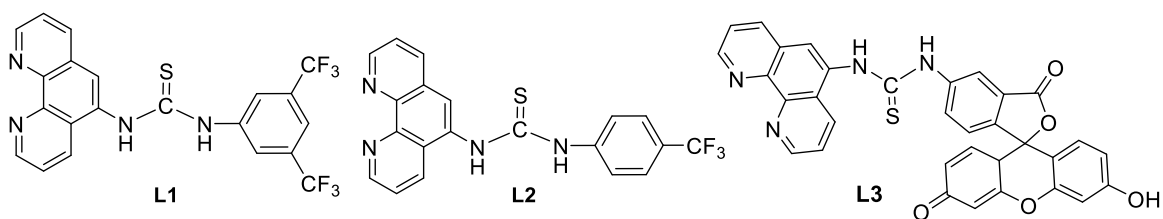


Figura 6. Ligandos sintetizados.

Por tanto, comenzamos con la síntesis del ligando **L**₁, para ello utilizamos una mezcla de DCM y EtOH como disolventes, en dicha mezcla agregamos y disolvimos la 5-am-phen, y después añadimos lentamente, en ligero exceso, el reactivo comercial 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato. Dejamos agitando la reacción a temperatura ambiente, al cabo de 30 minutos apareció un precipitado blanco, la reacción se mantuvo en agitación durante 12 h. Pasado este tiempo el sólido blanco obtenido se filtró y se secó a vacío obteniendo así un polvo muy fino. El rendimiento de esta reacción fue del 74,85%.

En segundo lugar, se llevó a cabo la síntesis del ligando **L**₂, siguiendo un procedimiento análogo al de la síntesis del **L**₁ y obteniéndose también el producto deseado como un sólido blanco y un buen rendimiento de reacción, 63,84%.

Como podemos observar en la Figura 7, aparecen dos señales en torno a 10 ppm en los espectros de nuestros productos, estas señales corresponden a los protones unidos a los nitrógenos que forman el puente, lo cual confirma que la reacción se ha llevado a cabo correctamente. Además, la integración total es de 12 (**L**₁) y 13 (**L**₂) protones, la cual coincide con el número de hidrógenos de las moléculas, lo cual el éxito de la reacción. Podemos observar también el desplazamiento que se produce en las señales de la 5-am-phen como consecuencia de la inserción de los derivados fenílicos, Figura 7. Es especialmente llamativo el desplazamiento sufrido por el proton H(4) de unos 7 ppm en la 5-amoni-fen a unos 8 ppm en **L**₁ y **L**₂ debido a la presencia ahora del anillo Ph conteniendo grupos CF₃ que retiran carga .

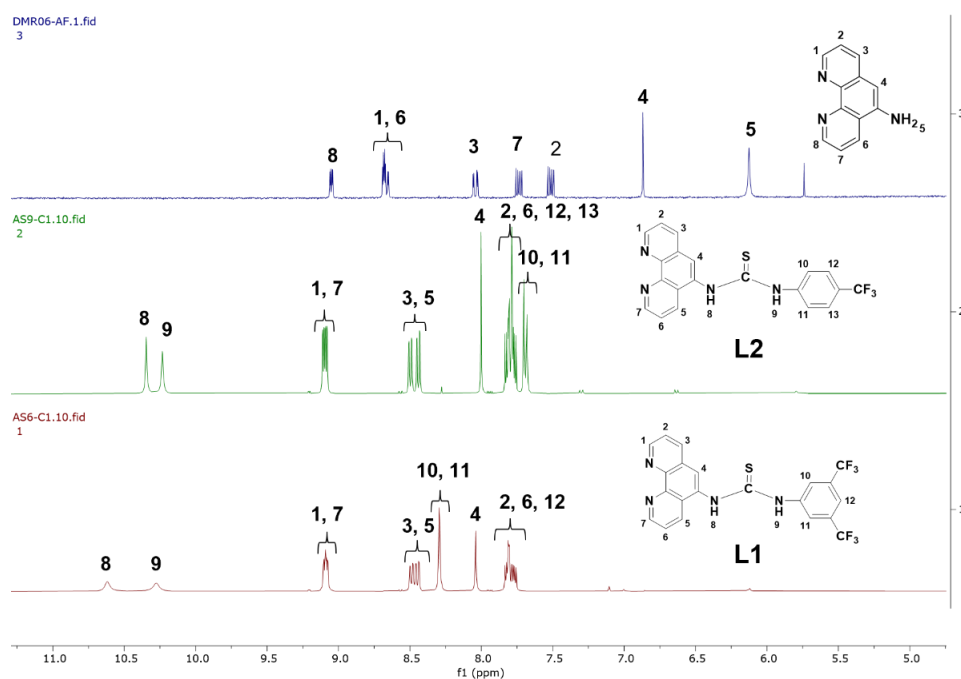


Figura 7. Espectros de ¹H-RMN de 5-amino-1,10-fenantrolina y los ligandos **L₁ y **L**₂.**

En tercer lugar, se sintetizó el ligando **L₃**, siguiendo un procedimiento ligeramente diferente. En este caso se usó THF como disolvente (seco y desoxigenado), en el cual se disolvió la 5-amphen y el isotiocianato de fluoresceína. Este compuesto tiene dos isómeros como vemos en la Figura 8, nosotros usaremos el isómero 1.

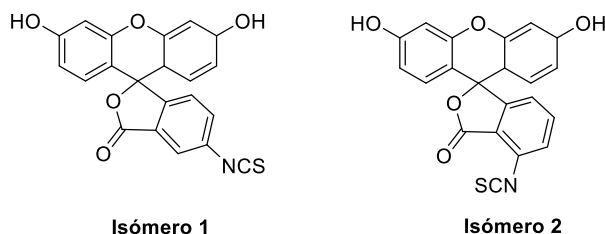


Figura 8. Isómeros del isotiocianato de fluoresceína.

La reacción se realizó usando atmósfera inerte de argón y se dejó agitando en un reflujo de 70 °C durante 72 horas. Pasado este periodo se observó un precipitado de color naranja, el cual se filtró y secó a vacío lavándolo con THF frío y éter. El rendimiento de esta reacción fue 73,07%.

Como vemos en los RMN de H mostrados en la Figura 9, al igual que en el caso de los ligandos **L₁** y **L₂**, en este, también aparecen dos señales nuevas en 10,38 y 10,30 ppm, correspondientes a los dos H que enlazan con los nitrógenos que forman el enlace tiourea. La aparición de estas señales confirma la formación de nuestro producto, así como la integración de las señales en la zona aromática (20H) y los desplazamientos que sufren las mismas.

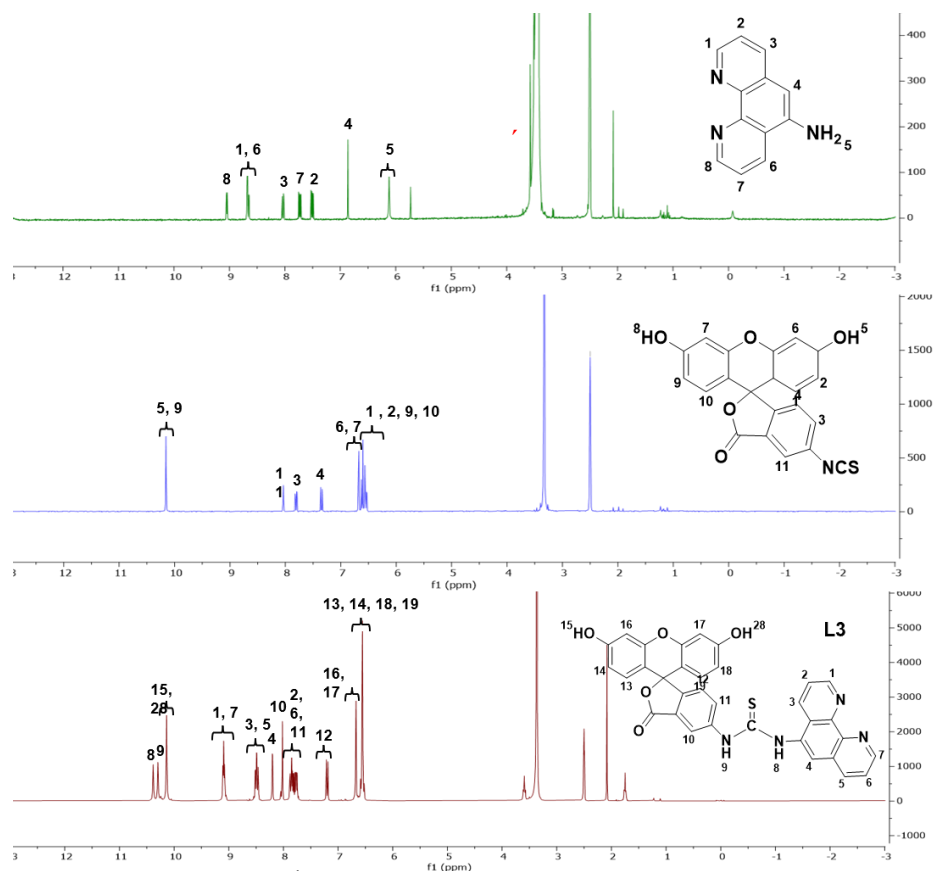


Figura 9. Espectros de ¹H-RMN de 5-amino-1,10-fenantrolina, isotiocianato de fluoresceína y el ligando **L₃.**

Hay que destacar que antes de conseguir sintetizar estos ligandos se intentó la reacción de 5-amino-1,10-fenantrolina con el fenil-isotiocianato. Para la síntesis de ligando se siguió un procedimiento que consiste en disolver ambos compuestos en etanol y dejarlos refluir bajo atmosfera de argón durante 5 h. Pasado este tiempo hicimos $^1\text{H-RMN}$ del medio de reacción y el resultado obtenido fue que no se había producido reacción entre los compuestos. Pensamos que la causa de que no se produjera la síntesis fue la falta de electrofilia en el carbono del isotiocianato, por tanto, decidimos volver a intentar la reacción, pero esta vez usando compuestos con grupos atractores de densidad electrónica en el benceno, como el: $-\text{CF}_3$, de esta forma lograríamos aumentar la electrofilia en el carbono para que se produjera el ataque nucleofílico de la amina, lo cual se consiguió con la obtención de L_1 y L_2 .

3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Los complejos que queremos sintetizar se forman siguiendo el esquema que se puede observar en la Figura 10:

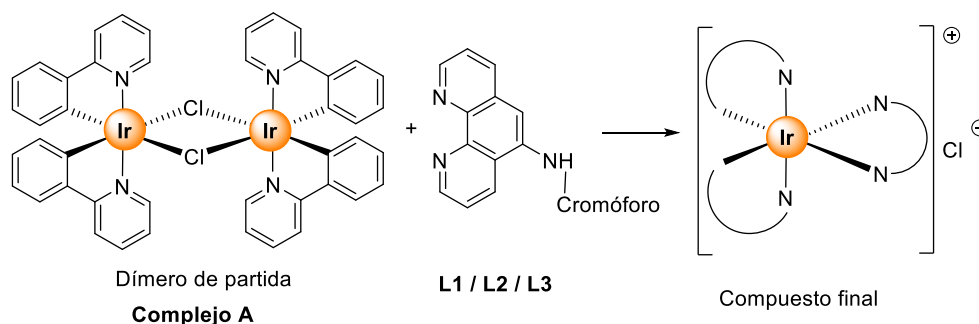


Figura 10. Esquema sintético para la obtención de los compuestos finales.

Por tanto, lo primero que tenemos que hacer para formar los complejos finales una vez obtenidos los ligandos L_1 , L_2 y L_3 es sintetizar el dímero de partida. Este dímero de fórmula: $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\mu_2\text{-Cl})_2]$ tiene dos ligandos ppy coordinados a cada Ir^{III} de forma bidentada mediante el nitrógeno piridínico y un C del anillo de benceno. Los iridios no están unidos mediante un enlace metal-metal, sino que lo están mediante dos cloruros que actúan como puente entre ambos. De forma que tenemos un complejo dímero en el que cada iridio tiene carga +3, es decir son d^6 , en donde el número de electrones de valencia en la esfera de coordinación de cada metal es de 18 por lo que cumplen la regla del número atómico efectivo (NAE).

Para sintetizar el dímero (A) seguimos el método propuesto por S. Sprouse y colaboradores.⁶ Así pues, hacemos reaccionar IrCl_3 hidratado y ppy en proporción 1:2 disolviéndolos en una mezcla de etoxietanol y agua (3:1). Obtuvimos una suspensión marrón oscura que se dejó agitando a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo se formó un sólido amarillo que se filtró a vacío y se lavó con etanol y acetona fríos. A continuación, el sólido se disolvió en DCM para limpiar las posibles impurezas mediante filtración por gravedad. Finalmente, la disolución se lleva a sequedad obteniendo un sólido amarillo con un rendimiento del 64,08%. Este compuesto se ha caracterizado únicamente con RMN de protón puesto que se encuentra descrito en la bibliografía. En este espectro se observa perfectamente la equivalencia de los protones de los dos ligandos ortometalados debido a la simetría del complejo A.

Una vez formado el dímero A se procede a hacer su reacción con cada uno de los ligandos sintetizados; L_1 , L_2 y L_3 para la obtención de los complejos deseados, cuyo tipo está ilustrado en la Figura 5.

La primera reacción que intentamos fue la del **A** con **L₁**. Para ello, usamos una mezcla DCM/MeOH (secos y desoxygenados), como disolvente. La reacción se realizó usando atmósfera de argón y refluendo durante 7 h. Transcurrido ese tiempo, el color de la disolución se tornó de amarillo a naranja y la adición de dietiléter promovió la precipitación de un sólido amarillo-naranja que se filtró y a vacío y se lavó con más dietiléter. Para purificar nuestro producto se realizó una cromatografía en columna de sílica gel usando como eluyentes una mezcla de DCM/MeOH en proporciones 9,5:0,5. Lamentablemente espectroscopia de RMN de ¹H mostró que ninguna de las fracciones obtenidas en la cromatografía contenía el producto deseado. El análisis de las distintas fracciones revela, por un lado, la presencia de dímero **A** sin reaccionar, y por otro una mezcla de productos que pueden ser debidos a descomposición del compuesto deseado y/o del ligando **L₁** que no se han podido identificar.

Intentamos por tanto la reacción del complejo **A** con **L₂**. Usamos las mismas condiciones que en el caso del ligando **L₁**. En este caso la reacción se paró pasadas las 24 h. Reducimos el volumen de la disolución y usamos dietiléter para precipitar el sólido. De nuevo el experimento de ¹H-RMN realizado indicaba que la reacción no se había producido e incluso que nuestros compuestos habían descompuesto, por lo que en este caso ya no se procedió a realizar ningún proceso de purificación.

Se volvieron a intentar las 2 reacciones anteriores, la del complejo **A** con **L₁**, que daría el complejo **C₁** (**reacción 1**) y la del complejo **A** con **L₂**, que daría el complejo **C₂** (**reacción 2**), en ambos casos bajo las mismas condiciones que anteriormente, pero esta vez durante 48 horas en vez de 7 y 24 horas respectivamente, Figura 11. Pasado este tiempo, las dos disoluciones se habían tornado a color naranja, pero en esta ocasión, en vez de precipitar el sólido, se redujo el volumen de la disolución y se utilizó n-hexano para formar un aceite. Este aceite posteriormente “se rompió” y obtuvimos dos sólidos (uno de cada reacción) naranjas. Se realizó una TLC de ambos sólidos junto con sus respectivos reactivos y en los dos casos se apreció la aparición de dos nuevos compuestos.

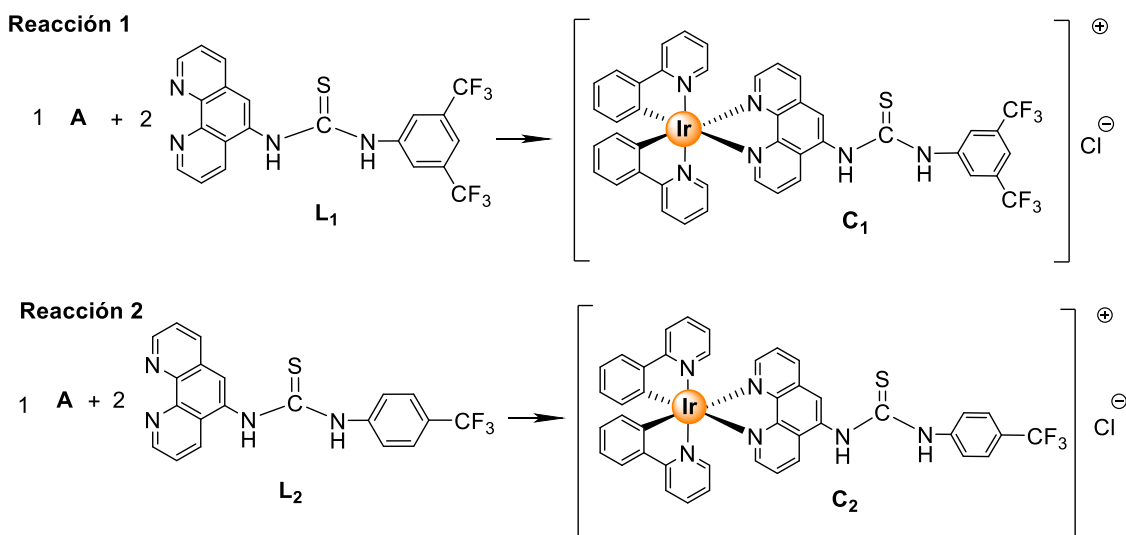


Figura 11. Reacciones del complejo A con **L₁ y **L₂**.**

La Figura 12 que muestra las TLC realizadas durante el transcurso de las reacciones utilizando una mezcla de eluyentes DCM:MeOH 9,5:0,5. En la fotografía de la izquierda, podemos ver las TLC de nuestras reacciones 1 y 2 respectivamente, donde en el centro se ha puesto la mezcla de reacción (R1, R2) y en los extremos los correspondientes reactivos de partida, el dímero **A** y los correspondientes ligando **L₁** y **L₂**. A la vista de la imagen se concluye que la reacción está prácticamente acabada por la casi completa desaparición de ambos reactivos de partida. En la

imagen de la derecha vemos una TLC comparativa de ambas reacciones donde únicamente se ha pinchado la mezcla de **reacción 1** y **2** y donde podemos ver la aparición de dos productos distintos con una luminiscencia amarilla cuando se iluminan con una longitud de onda de 365 nm, lo cual nos indica la presencia de un derivado de iridio en todos los casos.

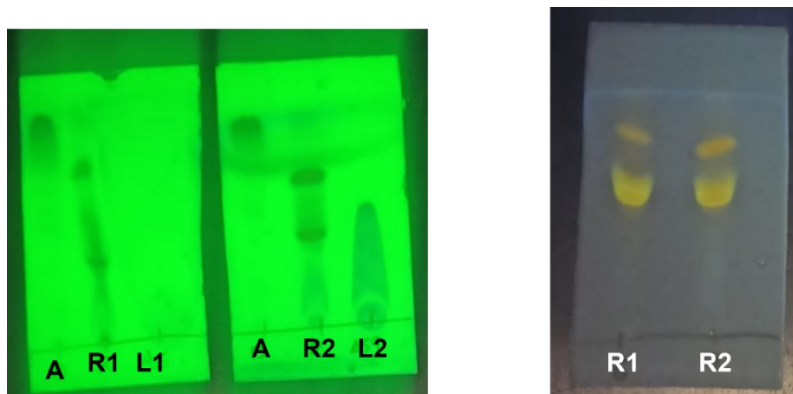


Figura 12. TLC de las reacciones del complejo A con L₁ y el complejo A con L₂.

Como indican las TLC y el posterior espectro de ¹H-RMN realizado se produjeron productos adicionales al deseado, por lo que se procedió a realizar una cromatografía en columna de sílica gel para la purificación del complejo deseado. La mezcla de eluyentes elegida fue la misma que se usó para las TLC descritas anteriormente DMC/MeOH, 9,5:0,5. Para la purificación de la **reacción 2** se obtuvieron dos fracciones (una para cada producto) mientras que para la **reacción 1** solo se obtuvo una. Esto fue debido a que la fracción que debía contener el producto que eluía más rápido no estaba purificada, es decir, había más de un compuesto en ella. La razón por la que esto ocurrió fue la contaminación de los disolventes utilizados para hacer el eluyente en esta purificación, creemos que estaban contaminados con compuestos más polares y que por ello la separación no fue lo suficientemente buena en esta segunda purificación.

Una vez evaporado el disolvente obtuvimos 3 productos, dos para la **reacción 2** y uno para la **reacción 1**. Se realizó un espectro de ¹H-RMN de cada uno y se concluyó que solo un producto de la **reacción 2**, el de la primera fracción que eluía más rápido, podría ser el que buscábamos (Figura 14) ya que los otros no tenían las señales esperadas y además integraban por menos señales de las que correspondía (Figura 13). En esta última, podemos apreciar los productos de las segundas fracciones, arriba el de la **reacción 1** y abajo el de la **reacción 2**. Lo primero que salta a la vista es que son exactamente iguales e integran por la misma cantidad de protones (24H). No puede ser ni el producto C₁ ni C₂ ya que solamente tenemos una señal que podría corresponder al H del nitrógeno de la tiourea, mientras que para estos productos deberían aparecer dos, además, tampoco aparecen las señales correspondientes a los protones del grupo trifluorometil fenilo. Por tanto, concluimos que al ser un producto común para ambas reacciones podría tratarse de la formación de un derivado de iridio conteniendo únicamente el derivado 5-amino-fenantrolina. Esta posibilidad es la más factible ya que la integración de protones es de 24, muy parecida a la que le correspondería si se hubiese roto el enlace tiourea en ambas reacciones (25H), pero se necesitan estudios adicionales para asegurarse.

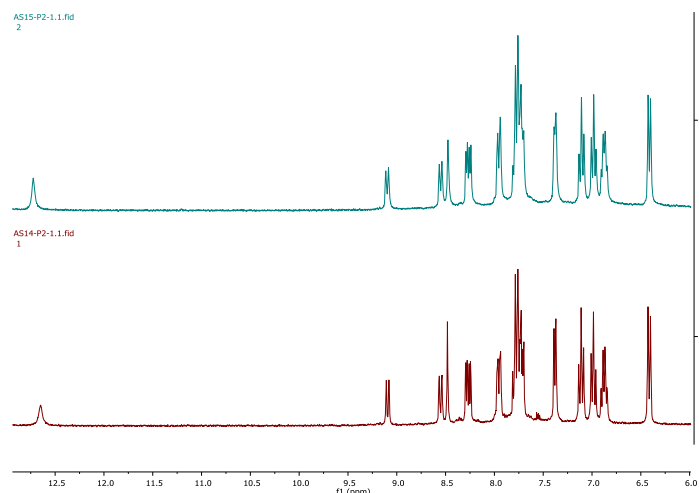


Figura 13. Espectro ^1H -RMN de los productos de la segunda fracción de las dos reacciones.

Por otro lado, en la Figura 14 podemos observar que aparecen las señales características del compuesto que queríamos obtener: singletes de 12,04 y 11,94 ppm correspondientes a los H de los nitrógenos de la tiourea y dos dobletes, que integran por dos, a 8,11 y 7,36 ppm correspondientes a los H del anillo de 4-(trifluorometil)isotiocianato de fenilo. Estas señales indican la formación del compuesto deseado, pero lamentablemente la integración de las señales indica que todavía se tiene alguna pequeña impureza. Cabría la posibilidad de que la 5-am-phen no estuviera coordinada pero se vieran sus señales, pero en este caso sabemos que está coordinada porque las señales correspondientes a los protones de la fenilpiridina aparecen desplazados respecto a cuando no está coordinada la 5-am-phen.⁷ Para obtener el compuesto completamente puro se debería realizar otra cromatografía en columna, pero lamentablemente no disponíamos de tiempo, ni el rendimiento de esta había sido suficiente para realizar esa segunda columna.

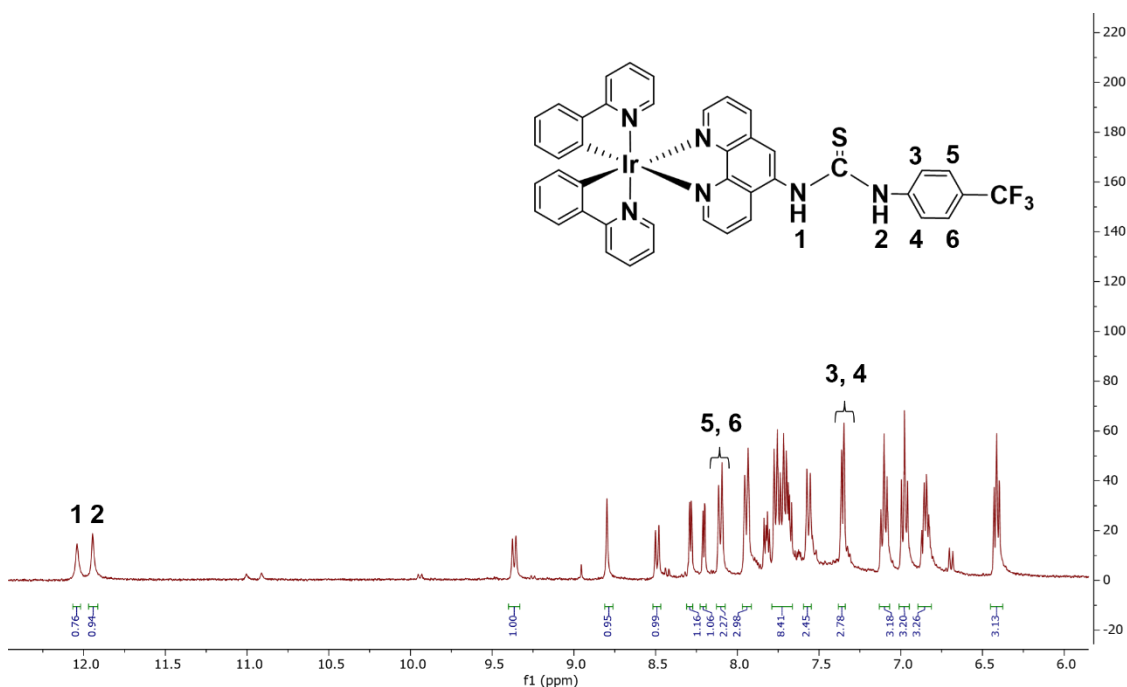


Figura 14. Espectro ^1H -RMN del producto de la primera fracción de la reacción 2.

Por último, se intentó la reacción del complejo **A** con **L₃**. De nuevo utilizamos una mezcla de DCM/MeOH, secos y desoxigenados, como disolvente. La reacción se realizó bajo atmósfera de argón y se dejó agitando. Pasadas 24 h realizamos un ^1H -RMN en DMSO para ver el seguimiento

de la reacción, observamos que la reacción aún no se había producido y la dejamos agitando durante 24 h más. En este punto realizamos una cromatografía de capa fina (TLC) y comprobamos que en el medio de reacción tenemos un poco de ligando y dímero y algo que parece el producto deseado con un r_f intermedio a los dos anteriores.

La señal extra que se veía en nuestra TLC podía indicar dos cosas, que se ha producido la reacción y que tenemos nuestro producto o que se ha producido la descomposición de nuestro ligando. Para comprobarlo realizamos otra TLC con más porcentaje de eluyente apolar para mejorar la separación de nuestros puntos. Una vez hecha comprobamos que el punto que nos aparecía antes, en realidad englobaba a más puntos ya que teníamos más señales que antes. Estas nos daban a entender que se podía haber formado producto pero que además se había producido también la descomposición del ligando, por ello, y ya que intensidad de las señales que se veían de nuestros reactivos eran muy pequeñas se decidió parar la reacción y proceder a separar los productos formados.

esta separación se efectuó por cromatografía en columna de sílica gel, usando como eluyente una mezcla de DCM/MeOH (9,5:0,5). Lamentablemente, la mezcla de reacción quedó retenida en la sílica y para intentar no perderla aumentamos la polaridad echando más metanol. Finalmente, se consiguió que la reacción eluyera por completo y se obtuvieron 4 fracciones distintas que se analizaron por $^1\text{H-RMN}$. Lamentablemente, lo que se observó en todos los casos fueron productos de descomposición.

En este punto cambiamos la estrategia de partida, y decidimos realizar *in-situ* la reacción del complejo **B** con 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato directamente, como se puede ver en la Figura 15.

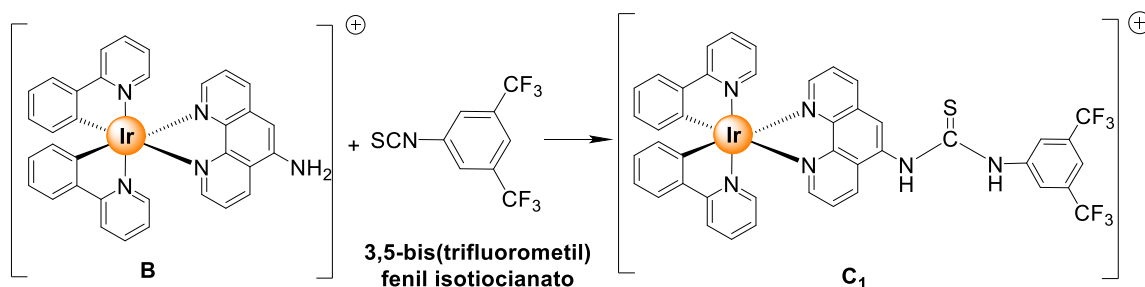


Figura 15. Esquema sintético para la obtención del complejo C₁.

Por tanto, lo primero que hicimos es la síntesis del complejo **B**, para ello hicimos reaccionar el dímero **A** con 5-amino-1,10-fenantrolina en proporciones 1:2. El disolvente utilizado fue en una mezcla de DCM y MeOH (secos y desoxigenados). La reacción se realizó en atmósfera de argón y se mantuvo agitando a reflujo durante 48 horas. Pasado este tiempo se añadió hexano apareciendo así un sólido marrón que se filtró a vacío y se lavó con más hexano. Al hacer un $^1\text{H-RMN}$ de nuestro producto nos dimos cuenta de que estaba impuro por lo que procedimos a purificarlo mediante una cromatografía en columna de sílica gel usando como eluyentes DCM/MeOH en una proporción 9,5:0,5. Una vez combinadas las fracciones deseadas se evaporan y se obtuvo un sólido marrón puro con un rendimiento del 15%.

Como se puede ver en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de la Figura 16, en el espectro del dímero observamos solo señales correspondientes a 8 protones ya que la molécula tiene dos planos de simetría (uno que pasaría por el eje vertical que conecta los dos iridios y otro perpendicular a este). Pero en el espectro del compuesto **B** observamos muchas más señales, en concreto las correspondientes a 25 protones. Esto es debido a que la 5-am-phen es una molécula asimétrica,

por tanto, al coordinarse al dímero de iridio, rompe la simetría que este tenía, por lo que ahora veremos las señales correspondientes a todos los protones de la molécula. La aparición de todas estas señales y su asignación gracias a la ayuda de espectros bidimensionales es una confirmación de que se ha producido la coordinación, verificándola formación del complejo deseado.

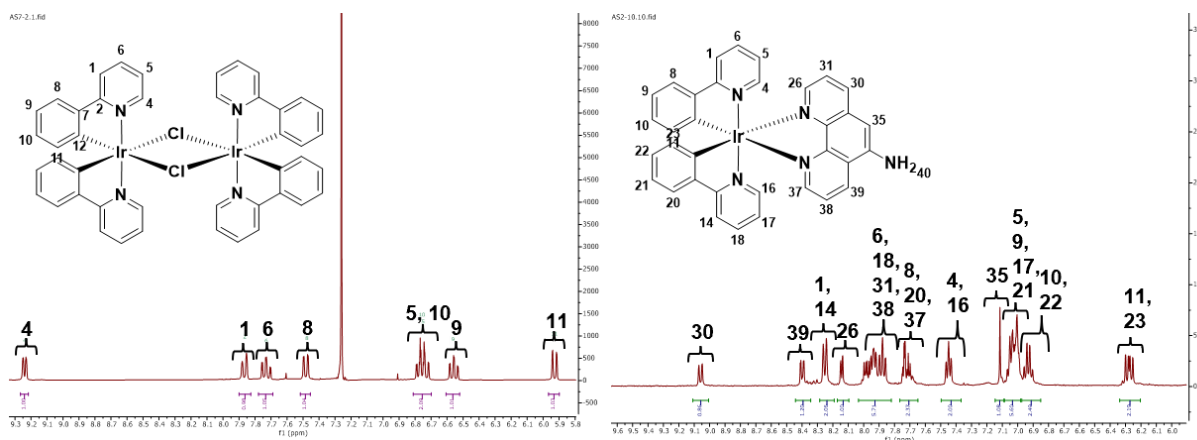


Figura 16. Espectros de ^1H -RMN del dímero de Ir^{III} y del complejo B

Además, se han obtenido cristales del complejo **B** por difusión de una disolución de éter sobre una disolución del compuesto en DCM que han sido aptos para su difracción por rayos X, confirmando así la obtención del complejo deseado. La Figura 17 muestra el átomo de iridio en un entorno octaédrico coordinado 2-fenilpiridinas enlazadas de forma bidentada a través del átomo de nitrógeno y de un átomo de carbono del anillo de benceno. Igualmente, observamos la planaridad de la molécula de 5-am-phen que se coordina también de forma bidentada al iridio a través de sus dos nitrógenos piridínicos.

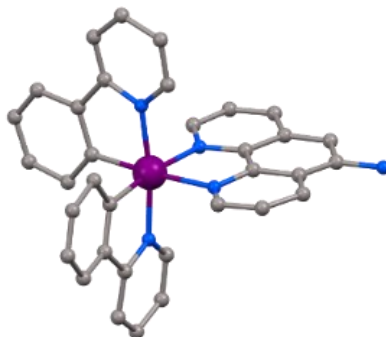


Figura 17. Estructura del complejo B realizada por difracción de rayos X. código de colores: Ir (morado), N (azul), C (gris)

Una vez sintetizamos el **B**, ahora sí, realizamos la reacción de este con 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato. Para ello disolvimos ambos reactivos en MeOH y dejamos agitando la reacción por 48 h. Pasado este tiempo reducimos el volumen de la disolución, echamos dietiléter y precipitamos un sólido. Este sólido se filtró a vacío y se lavó con éter. Realizamos ^1H -RMN tanto de las aguas madres como del sólido y comparamos los espectros con el complejo de partida. Desafortunadamente, el resultado no fue el deseado, el sólido obtenido era complejo de partida sin reaccionar y las aguas madres una mezcla de compuestos que no se pudieron identificar.

Esta última reacción (Figura 15) la volvimos a efectuar, pero esta vez en un tubo de RMN para realizar un seguimiento de misma y ver si se formaba algo de nuestro producto o si la reacción no

funcionaba. La primera medida que realizamos fue la del blanco, para ello disolvimos 3,31 mg del complejo **B** en DMSO- d_6 y realizamos el primer experimento de RMN de 1H para efectuar el blanco. Acto seguido añadimos directamente 0,83 μL de 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato, agitamos y realizamos otra medición (reacción a tiempo 0). Una vez hecho, la reacción se sometió a agitación por ultrasonidos para mezclar bien los reactivos dentro del tubo. Se realizaron 4 mediciones más de la reacción, 2 h, 24 h, 48 h y una semana después de la adición de los dos reactivos. El resultado, como se puede apreciar en la Figura 18 es que pasadas 2 h se empezaron a ver las señales características de los protones de los nitrógenos de la tiourea (11,51 y 11,21 ppm), estas señales son el mejor indicador de si la reacción se está produciendo o no ya que indican la formación del enlace tiourea entre los dos reactivos. Desafortunadamente junto con esta aparece una de mayor intensidad 10.90 ppm que no somos capaces de asignar con ninguno de los protones correspondientes al producto deseado. Además de estas, aparecen tres dobletes en torno a 9 ppm que indican que se está formando más de un producto. Estos se mantienen a lo largo de todo el experimento. Así mismo los protones correspondientes al anillo del derivado isotiocianato van modificando su desplazamiento químico, pero a la vista de todos los experimentos realizados no se puede concluir que se haya obtenido el complejo deseado.

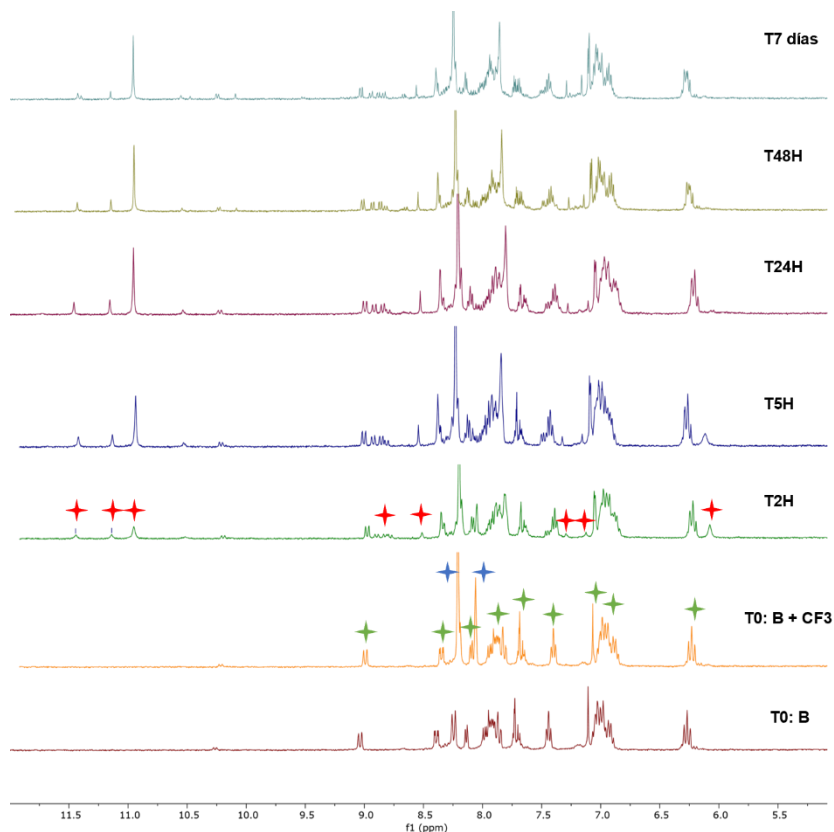


Figura 18. De abajo a arriba: espectros de tiempo 0, 2h, 5h, 24h, 48h y 7 días de la reacción del complejo B con 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato. Código de colores: señales debidas al complejo B (verde), señales del 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato (azul), señales nuevas (rojo).

3.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS

Una de las metas de este trabajo es que los compuestos sintetizados puedan servir como agentes de visualización utilizando técnicas de bioimagen como la microscopía de fluorescencia, por lo tanto, el estudio de las propiedades de emisión es esencial. Además, también se ha

procedido a evaluar sus propiedades de absorción por ultravioleta visible, que nos dará una indicación de su valía como fotosensibilizadores para terapia fotodinámica.

Estas propiedades ópticas se han estudiado a temperatura ambiente en disolución de DMSO. Se ha elegido concretamente este disolvente por ser el utilizado en primera instancia para la preparación de las disoluciones stock de los ensayos biológicos, ver sección 3.4, intentando mimetizar de la mejor forma posible las propiedades ópticas en el transcurso de los distintos ensayos. En concreto se han medido los espectros de absorción UV-visible de los ligandos 5-am-phen y del complejo **B**, ver Figura 19. La Tabla 1 muestra los máximos de absorción y los correspondientes coeficientes de extinción. En concreto el análisis de las bandas de absorción muestra que tanto el ligando como el complejo tienen una banda de absorción intensa con picos centrados sobre 259 y 280 nm que se asignan a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los distintos anillos aromáticos. A continuación, se observan otras bandas de menos intensidad, en el caso del ligando sobre 343 nm que se asocia a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y una ancha con máximo en 391 nm para el complejo, que es una combinación de transiciones $n \rightarrow \pi^*$ con transiciones permitidas de transferencia de carga metal ligando (1MLCT) y ligando-ligando (1LLCT). Por último, el complejo muestra una última absorción que se extiende por más allá de 450 nm y se asocia a una transición de carga prohibida 3MLCT .⁸

En lo que se refiere a sus propiedades luminiscentes, se han medido la emisión del complejo **B** obteniéndose el espectro que se muestra en la Figura 20. En concreto, el complejo **B** presenta dos bandas de emisión, una estructurada entre 409 y 450 nm que se corresponderá a una transición de carga 3LLCT , normalmente atribuida a una transición desde el ligando ortometalado al ligando diimina. La segunda banda se encuentra centrada a 610 nm, es una banda ancha de menor intensidad y que corresponde a otra transición de carga 3MLCT . El pico observado a 675 nm no es más que un artefacto del aparato. Este artefacto es una indicación de la poca intensidad de emisión del complejo, debido a que su aparición únicamente se da en esas condiciones baja intensidad emisora. Por otro lado, se ha recogido también el espectro de emisión del ligando 5-am-phen que se muestra en la figura 20, el cual posee una banda de emisión centrada a 508 nm y que corrobora que la banda del complejo **B** centrada a 610 nm, es una banda correspondiente a una transición 3MLCT y no centrada en el ligando 5-am-phen. Lamentablemente una vez corroborada la baja intensidad de emisión de estos complejos se descarta ya en este paso que puedan ser utilizados como agentes de visualización en microscopia de fluorescencia.

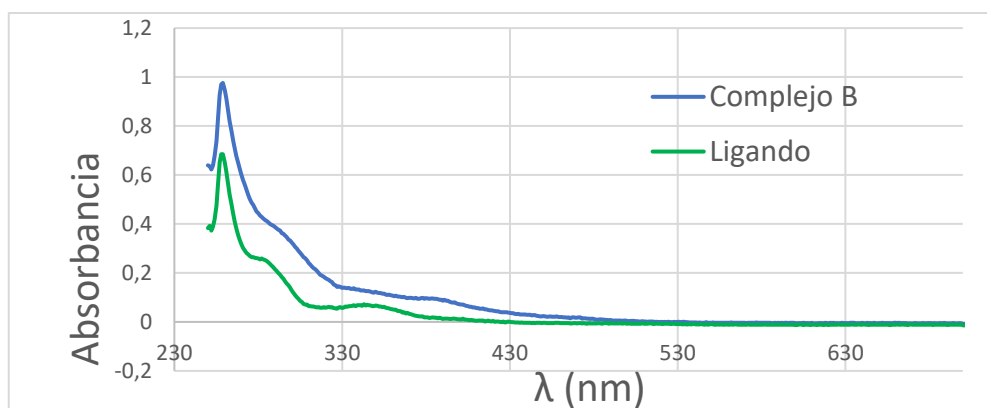


Figura 19: Espectros UV-vis del complejo **B** y el ligando 5-am-phen medidos en DMSO ($1 \cdot 10^{-5}M$) a temperatura ambiente.

Tabla 1: Bandas de absorción y valores de los coeficientes de extinción molar calculados a través de la Ley de Lambert-Beer para los compuestos medidos en DMSO (1·10⁻⁵ M). Máximos de emisión medido en DMSO.

		Complejo B	Ligando
UV-vis	λ (nm)	259	259
	$\epsilon/1000$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	97,6	68,5
	λ (nm)	391	282
	$\epsilon/1000$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	9	25,9
	λ (nm)	450	343
	$\epsilon/1000$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	2,4	7,2
EMISION	λ (nm)	409	508

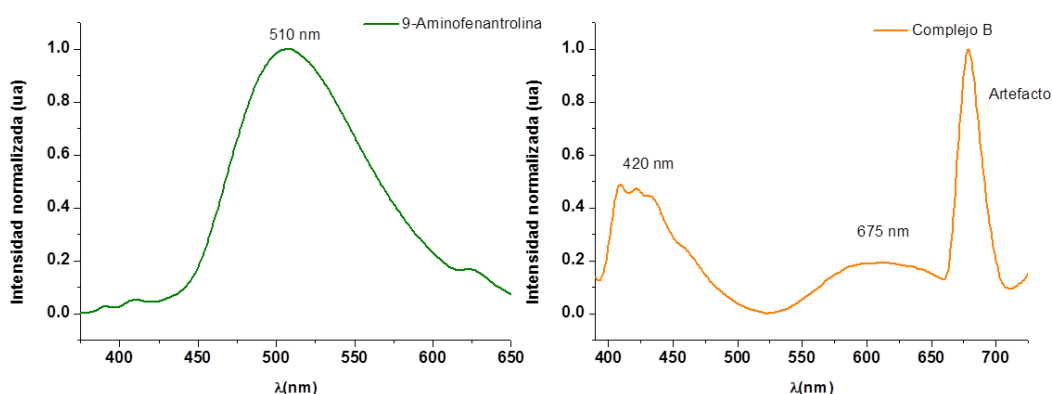


Figura 20. Espectro de emisión de la 9-aminofenantrolina y el complejo B en DMSO. Ambos espectros se han recogido excitando las muestras a 375 nm.

3.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Se estudiaron las propiedades biológicas tanto del **complejo B** como de la 5-amino-1,10-fenantrolina, analizamos tanto la citotoxicidad como la fotocitotoxicidad de ambos compuestos por medio del Test MTT.

Este test consiste en la aplicación de la sustancia MTT para medir la citotoxicidad de nuestros compuestos. Para ello, primero aplicaremos nuestro compuesto a unas células, y después añadiremos el MTT. Esta sustancia se reduce con la enzima succinato- deshidrogenasa presente en las células para formar el Azul de Formazán, Figura 21. De esta forma, el MTT, que es de color amarillo, se transforma en cristales azules de Azul de Formazán. La cantidad de cristales que se formen será proporcional a la cantidad de células vivas presentes, por lo que midiendo la absorbancia de estos cristales podemos cuantificar la citotoxicidad de nuestros complejos.

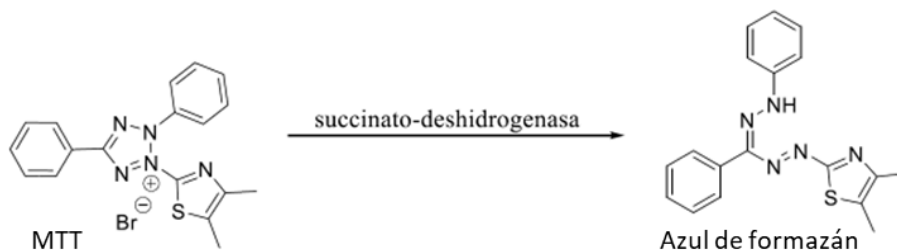


Figura 21. Reacción del MTT con la succinato-deshidrogenasa.

Para realizar esta prueba usamos una placa de 96 pocillos con células de la línea A549 (células cancerígenas de pulmón), se sembraron 6000 células/pocillo. En la que en cada pocillo previamente se habría añadido 100 μ L de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 5% de FBS (Suero fetal bovino), dejándolo incubar a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% en CO₂ durante 24 horas. Posteriormente preparamos las disoluciones stock de nuestros compuestos, el del complejo **B** y el de la 5-am-phen, ambos con una concentración 0,1 M, usando DMSO y en condiciones de esterilidad. Usamos estos patrones para preparar diez disoluciones seriadas, de cada compuesto, en medio de cultivo. El rango de concentraciones fue entre 100 μ M y 0,20 μ M, en concreto (100, 50, 25, 12'50, 6'25, 3'12, 1'56, 0'78, 0'39, 0'20) y cada concentración se estudió por cuadruplicado. El rango de concentraciones descrito anteriormente es el que queremos en nuestros pocillos, hay que tener en cuenta que en cada pocillo hay 100 μ L de medio por lo que al echar aquí nuestro compuesto su concentración se reducirá a la mitad ya a cada pocillo añadimos 100 μ L de la disolución de nuestros compuestos. La distribución de la placa se puede ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema de la placa de 96 pocillos. Azul: complejo B, Verde: aminofenantrolina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		0.2	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
A	Ctl											Blc
B	Ctl											Blc
C	Ctl											Blc
D	Ctl											Blc
E	Ctl											Blc
F	Ctl											Blc
G	Ctl											Blc
H	Ctl											Blc

En la tabla podemos observar también dos columnas en las que no hemos echado compuesto. La columna 1 corresponde a los pocillos control donde añadimos 100 μ L de medio de cultivo conteniendo el mismo porcentaje de DMSO que tenga la disolución de compuesto más concentrada. Los pocillos control sirven para medir la toxicidad que tiene el DMSO, que también puede afectar a las células, por lo que tenemos que asegurarnos de que no es este el que produce el efecto citotóxico. Por otro lado, en la columna de los pocillos blanco no tenemos células sembradas, en ellos solo hay 200 μ L de medio de cultivo que se usamos para preparar las medidas del blanco. Para las disoluciones seriadas utilizamos una disolución diluida de 200 μ M de nuestros dos compuestos, por lo que primero preparamos esta disolución a partir de la disolución stock de 0,1 M. La concentración más concentrada (100 μ M) corresponde a la columna 11, mientras que la más diluida (0,2 μ M) a la columna 2. Esta placa se prepara por duplicado, ya que una de ellas se irradiará con luz de 405 nm (placa B) y la no sufrirá irradiación. Una vez adicionados los compuestos dejamos incubar durante 24 horas, pasado este tiempo se retiró el medio y se reemplazó por medio fresco para evitar interferencias con los compuestos no internalizados. La placa B, que es la que va a sufrir irradiación, se irradia con luz de 405 nm durante 10 min, la otra, se guardara en la incubadora. Una vez irradiada la placa B se introduce también en la incubadora y allí permanecen ambas durante otras 24 h.

Pasado este tiempo se adicionó 10 μ L de MTT /5 mg/ml en PBS) a cada pocillo y se incubó durante 2 horas. Finalmente se retiró todo el medio y se añadieron 100 μ L de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de azul de formazán que se habían formado en los pocillos que tenían células vivas todavía, de forma que apareció una coloración violeta, Figura 22. Finalmente

se midió la absorbancia de las dos placas a 550 nm usando un lector de placas multiescanner (ELISA). A simple vista parecía que nuestros compuestos mataban en ausencia de irradiación (placa A), lo cual no es un comportamiento bueno para una sustancia que se planea utilizar en TFD ya que lo óptimo es que mate a las células únicamente cuando se irradia la luz de una determinada longitud de onda. También hay que destacar que la placa que fue irradiada tenía menos pocillos con células vivas lo cual daba a entender que nuestros compuestos matan más cuando se irradia luz.

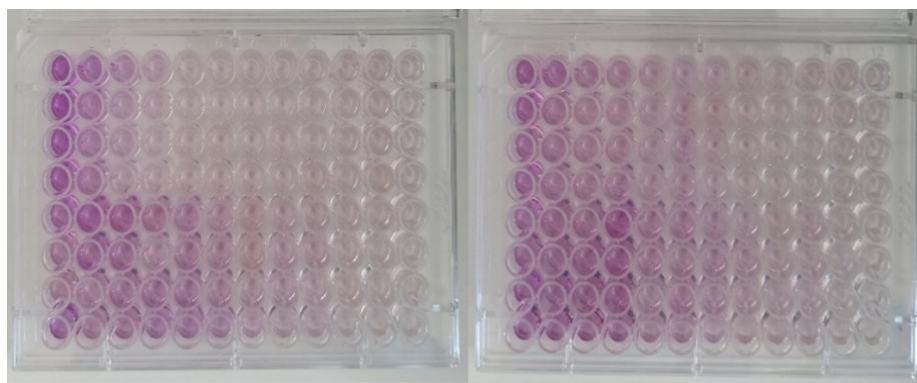


Figura 22. Placas de 96 pocillos. Izquierda: placa irradiada. Derecha: placa no irradiada.

Con los datos de absorbancia observados se calcula el porcentaje de proliferación celular y representando este frente a la concentración de los complejos podemos calcular el IC_{50} (que es la concentración a la cual mueren el 50% de las células) de cada compuesto, tanto si es irradiado como si no. Para calcular este valor tan solo tendremos que sustituir $y = 50$ en la fórmula de la gráfica y obtendremos el valor de x que es la concentración.

Una vez calculamos estos valores (tanto los de la placa irradiada como los que habían permanecido en oscuridad) podemos construir una tabla como la Tabla 3 con la cual podemos discutir la citotoxicidad de los compuestos. Podemos observar que tanto para el complejo **B** como para la 5-am-phen disminuye el valor de IC_{50} cuando irradiamos. Para que los compuestos sean útiles en TFD deben carecer de toxicidad en ausencia de radiación ya que, sino perjudicarían a las células en condiciones normales, siendo más efectivos, por tanto, cuando los valores de IC_{50} irradiados y sin irradiar son los más diferentes posibles. En nuestro caso, como hemos mencionado anteriormente, nuestros compuestos son bastantes citotóxicos en ausencia de radiación ya que sus valores de IC_{50} están en el rango nanométrico, además, en ambos casos su PI (IC_{50} sin irradiar/ IC_{50} irradiando) es muy pequeño, siendo en el caso del complejo **B** casi insignificante, por lo que estos compuestos no serían útiles en TFD, pero sí como agente quimioterapéutico.

Tabla 3. Esquema de la placa de 96 pocillos.

	Complejo B	5-am-phen
IC_{50} sin irradiar	0,1416	0,9572
IC_{50} irradiando	0,1222	0,475
PI	1,15	2

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES

Los espectros de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^{19}F , así como los experimentos de 2D-HSQC {H-C} y COSY-H-H se han llevado a cabo en disolución a 298 K en un espectrómetro Bunker Advance 400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100,6 MHz). Los desplazamientos químicos, δ (ppm), se han asignado usando como referencia los picos residuales del correspondiente disolvente deuterado: cloroformo y DMSO.

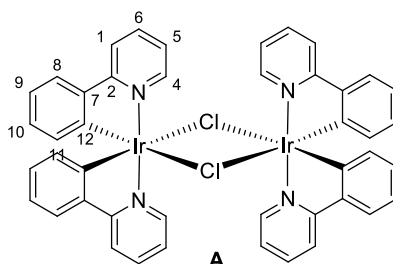
Los estudios de excitación y emisión se realizaron en un espectrofotómetro Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11, y los de absorción en un espectrofotómetro Evolution 600 empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud. En ambos casos en disolución de DMSO. Las imágenes de biodistribución se han obtenido en un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan y Fast Airyscan, irradiando con unas longitudes de onda de excitación de 405 y 556 nm.

Los estudios de actividad biológica se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Se utilizó una estufa Jouan IG50 que se mantuvo a 37 °C y 5 % de CO_2 para los cultivos celulares. Las placas se visualizaron en un lector de placas Bio-Tek Instrument Inc. EL800 Universal Microplate Reader.

4.2. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Para las distintas reacciones efectuadas durante este TFG se han utilizado como punto de partida los siguientes reactivos comerciales: tricloruro de iridio hidratado, 2-fenilpiridina, 5-amino-1,10-fenantrolina, 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato, 4-(trifluorometil)isotiocianato de fenilo e isotiocianato de fluoresceína (isómero 1).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO A:



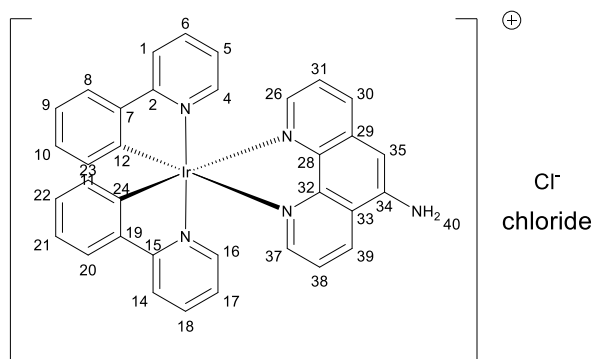
M.W: 1072,00 g/mol

Se disuelven 200 mg (0,671 mmol) de tricloruro de iridio hidratado en 4 mL de una mezcla de etoxietanol y agua (3:1), después se añaden 229 mg (1,48 mmol) de 2-fenilpiridina (ppy). La suspensión marrón oscura se deja agitando a reflujo durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, mezcla se enfría y se filtra a vacío el precipitado amarillo formado, lavándolo con un máximo de 1 mL de etanol y otro de acetona fría. A continuación, el sólido amarillo se disuelve en DCM para separar las posibles impurezas sólidas que son separadas por filtración a gravedad y lavadas con más DCM hasta que las aguas de lavado son incoloras. Finalmente, La disolución de DCM se lleva a sequedad obteniendo un sólido amarillo.

$\eta = 64,08\%$; $m = 230$ mg; $n = 0,215$ mmol

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.24 (dd, $J = 5.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, CH (4)), 7.87 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H, CH (1)), 7.73 (ddd, $J = 8.1, 7.3, 1.6$ Hz, 1H, CH (6)), 7.48 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, CH (8)), 6.81 – 6.70 (m, 2H, CH (5, 10)), 6.61 – 6.52 (m, 1H, CH (9)), 5.93 (dd, 1H, CH (11)).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO B:



B

M.W: 710,86 g/mol

Se disuelven 100 mg (0,093 mmol) del dimero de iridio en una mezcla de de 4.5 mL de disolventes secos y desoxygenados de DCM:MeOH (3:1.5). Después se añaden 36,4 mg (0,184 mmol) de 5-amino-1,10-fenantrolina y se deja agitando la reacción durante 48 horas a relujo en atmosfera de Argón. Pasadas las 48 horas se deja enfriar y se añade hexano apareciendo un sólido. sólido marrón que se filtra a vacío y se lava con hexano (3x3 mL). Finalmente, el sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de sílica gel utilizando una mezcla de eluyentes DCM/MeOH (9,5:0,5). Las fracciones de columna conteniendo el producto deseado se combinan y se evaporan hasta la obtención de un sólido marrón puro.

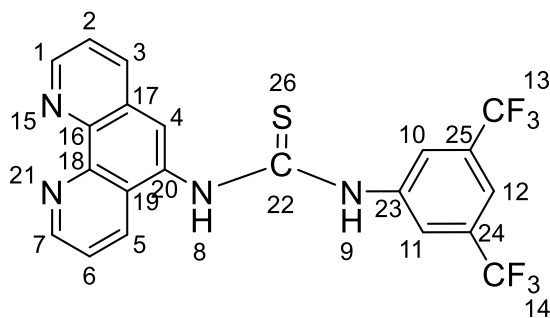
$\eta = 15\%$; $m = 20$ mg; $n = 0,028$ mmol

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.07 (dd, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H, CH (30)), 8.38 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H, CH (39)), 8.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, CH (1, 14)), 8.14 (dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz, 1H, CH (26)), 8.03 – 7.81 (m, 6H, CH (6, 18, 31, 38)), 7.77 – 7.65 (m, 3H, CH (8, 20, 37)), 7.44 (td, $J = 5.8, 1.4$ Hz, 2H, CH (4, 16)), 7.12 (s, 1H, CH (35)), 7.02 (td, $J = 7.4, 5.9, 3.8, 1.3$ Hz, 6H, CH (5, 9, 17, 21)), 6.92 (tdd, $J = 7.2, 5.3, 1.4$ Hz, 2H, CH (10, 22)), 6.27 (td, 2H, CH (11, 23)).ⁱ ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 206.67 (C (34)), 167.03 (C (28)), 166.92 (C (32)), 150.26 (C (26)), 149.03 (C (4)), 148.81 (C (16)), 147.02 (C (2)), 145.50 (C (15)), 144.02 (C (37)), 139.82 (C (6)), 138.68 (C (18)), 135.10 (C (39)), 133.94 (C (29, 33)), 133.29 (C (30)), 131.36 (C (11)), 131.23 (C (23)), 130.26 (C (10)), 130.19 (C (22)), 126.50 (C (7, 19)), 125.43 (C (8)), 125.10 (C (20)), 125.03 (C (31)), 124.06 (C (38)), 123.92 (C (5)), 123.87 (C (17)), 122.33 (C (9)), 122.26 (C (21)), 120.02 (C (1)), 119.95 (C (14)), 101.70 (C (35)).ⁱⁱ

ⁱ Hay dos multipletes que integran por dos señales más de las que tienen. Esto puede ser debido a que contengan los NH (40, 40') que son difíciles de localizar en el espectro.

ⁱⁱ Los carbonos 12 y 14 no conseguimos identificarlos.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₁:



L₁

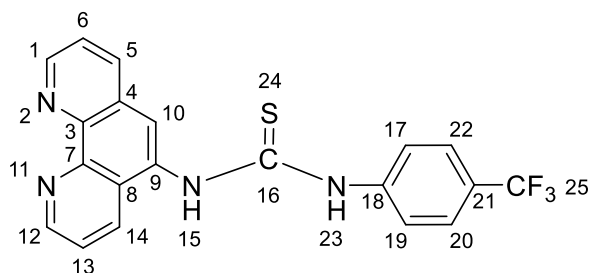
M.W: 468,41 g/mol

Se disuelven 100 mg (0,513 mmol) de 5-amino-1,10-fenantrolina en una mezcla de 5 mL de DCM y 0,5 mL de EtOH. Después se añaden 112,5 μ L (0,616 mmol) del compuesto 3,5-bis(trifluorometil)fenil isotiocianato que se encuentra en ligero exceso. Se deja agitando la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo aparece un precipitado blanco en el medio de reacción. La reacción se mantiene agitando durante 12 h y posteriormente el sólido formado (un polvo muy fino) se filtra y se seca a vacío.

$$\eta = 74,85\%; m = 179,7 \text{ mg}; n = 0,384 \text{ mmol}$$

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.62 (s, 1H, NH (8)), 10.28 (s, 1H, NH (9)), 9.09 (ddd, $J = 7.1, 4.3, 1.7$ Hz, 2H, CH (1, 7)), 8.47 (ddd, $J = 16.4, 8.3, 1.7$ Hz, 2H, CH (3, 5)), 8.29 (s, 2H, CH (10, 11)), 8.04 (s, 1H, CH (4)), 7.86 – 7.70 (m, 3H, CH (2, 6, 12)). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 181.66 (C (22)), 150.01 (C (1, 7)), 146.10 (C (18)), 144.83 (C (20)), 141.81 (C (23)), 136.23 (C (3)), 132.04 (C (5)), 130.39 (C (24)), 130.06 (C (25)), 128.05 (C (17)), 126.39 (C (16)), 125.14 (C (13, 14)), 124.58 (C (4)), 124.19 (C (10, 11)), 123.55 (C (2)), 123.28 (C (6)), 121.87 (C (19)), 117.32 (C (12)).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₂:



L₂

M.W: 400 g/mol

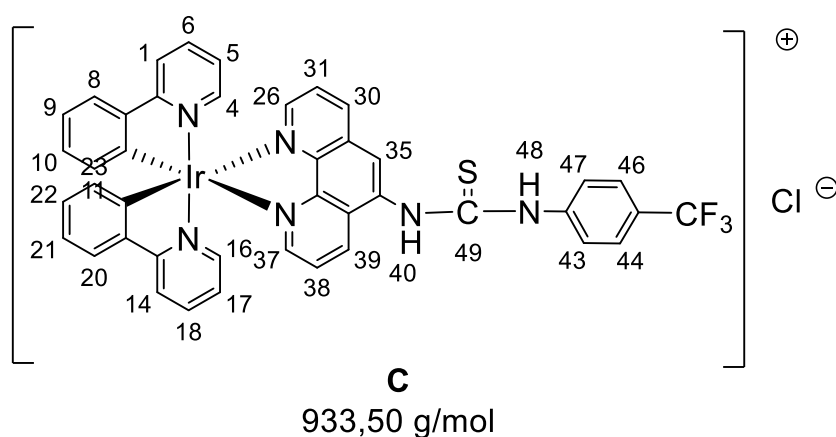
Se disuelven 100 mg (0,513 mmol) de 5-amino-1,10-fenantrolina en una mezcla de 5 mL de DCM y 1,5 mL de EtOH. Después se añaden 125 mg (0,615 mmol) del compuesto 4-(trifluorometil)isotiocianato de fenilo que se encuentra en ligero exceso. Se deja agitando la reacción durante 2h a temperatura ambiente bajo atmosfera de Argón. Una vez pasado este tiempo

aparecerá un precipitado blanco en el medio de reacción. La reacción se mantuvo agitando durante 24 h y posteriormente el sólido formado se filtra y se seca a vacío.

$$\eta = 63,84\%; m = 131 \text{ mg}; n = 0,328 \text{ mmol}$$

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.35 (s, 1H, NH (15)), 10.23 (s, 1H, NH (23)), 9.10 (ddd, $J = 8.4, 4.3, 1.7$ Hz, 2H, CH (1, 12)), 8.50 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H, CH (14)), 8.44 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H, CH (5)), 8.00 (s, 1H, CH (10)), 7.88 – 7.75 (m, 4H, CH (6, 13, 22, 20)), 7.69 (dd, 2H, CH (17, 19)). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 181.70 (C (16)), 149.97 (C (1)), 149.92 (C (12)), 146.10 (C (7)), 144.85 (C (9)), 143.37 (C (18)), 136.14 (C (5)), 133.28 (C (21)), 132.17 (C (14)), 128.04 (C (4)), 126.58 (C (3)), 125.70 (C (17)), 125.51 (C (19)), 125.47 (C (10)), 123.73 (C (20, 22)), 123.49 (C (6)), 123.13 (C (13)).ⁱⁱⁱ

SÍNTESIS DEL COMPUESTO C₂:



Se disuelven 30 mg (0,028 mmol) del compuesto A y 22,4 mg (0,056 mmol) del ligando L₂ en una mezcla de disolventes de DCM:MeOH (3:1,5). Se deja agitando la reacción a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado este tiempo se reduce el volumen de la reacción y se utiliza n-hexano para romper el aceite y obtener un polvo fino de color naranja. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de silica gel utilizando una mezcla de eluyentes DCM/MeOH (9,5:0,5). Las fracciones de columna conteniendo el producto deseado se combinan y se evaporan hasta la obtención de un sólido naranja impuro.^{iv}

$$\eta = \text{---} \quad m = \text{---} \text{ mg}; n = \text{---} \text{ mmol}$$

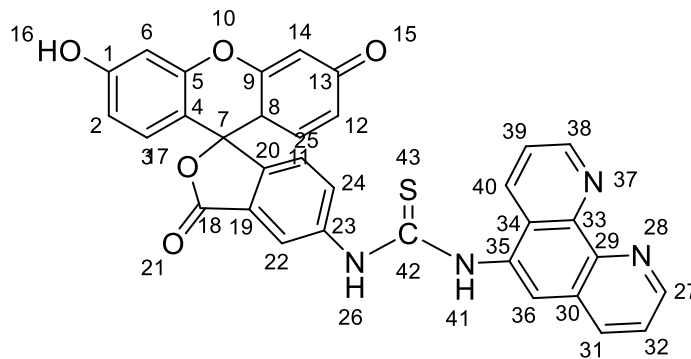
^1H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 12.04 (s, 1H, NH (40)), 11.94 (s, 1H, CH (48)), 9.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH (30)), 8.80 (s, 1H, CH (35)), 8.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH (39)), 8.29 (dd, $J = 5.0, 1.3$ Hz, 1H, CH (26)), 8.21 (dd, $J = 5.0, 1.4$ Hz, 1H, CH (37)), 8.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH (44, 46)), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H, CH (1, 14)), 7.79 – 7.65 (m, 8H, CH (6, 8, 18, 20, 31, 38)), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, CH (43, 47)), 7.39 – 7.31 (m, 3H, CH (4, 16)), 7.14 – 7.06 (m, 3H, CH (9, 21)), 6.98

ⁱⁱⁱ Faltarían por asignar 2 carbonos cuaternarios que no localizamos en el espectro.

^{iv} Se obtuvo el producto deseado, pero con impurezas, habría sido necesario realizar otra purificación por cromatografía en columna, pero no disponíamos de tiempo para realizarla y la cantidad de producto era muy pequeña.

(tt, $J = 7.4, 1.4$ Hz, 3H, CH (10, 22)), 6.89 – 6.79 (m, 3H, CH (5, 17)), 6.41 (ddd, $J = 7.3, 5.9, 1.2$ Hz, 3H, CH (11, 23)).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₃:



L₃

Molecular Weight: 584,61

Se disuelven 50 mg (0,257 mmol) de 5-amino-1,10-fenantrolina y 100 mg (0,257 mmol) de isotiocianato de fluoresceína (isómero 1) en 3 mL de THF seco y desoxygenado. La reacción se deja agitando durante 72 horas a reflujo en atmósfera de Argón. Pasadas las 72 horas se deja enfriar y el precipitado naranja que aparece se filtra y seca a vacío lavándolo con THF frío y éter.

$\eta = 73,07\%$; $m = 109,79$ mg; $n = 0,188$ mmol

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.38 (s, 1H, NH (41)), 10.30 (s, 1H, NH (26)), 10.14 (s, 2H OH (15, 16)), 9.09 (td, $J = 4.7, 1.7$ Hz, 2H, CH (27, 38)), 8.49 (td, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 2H, CH (31, 40)), 8.20 (s, 1H, CH (36)), 8.02 (s, 1H, CH (22)), 7.92 – 7.72 (m, 3H, CH (24, 32, 39)), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH (11)), 6.67 (s, 2H, CH (6, 14)), 6.62 – 6.50 (m, 4H, CH (2, 3, 12, 25)). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 181.78 (C (42)), 168.38 (C (18)), 159.50 (C (1)), 151.87 (C (13)), 149.97 (C (27, 38)), 148.20 (C (5, 9)), 146.09 (C (29, 33)), 144.81 (C (35)), 141.19 (C (23)), 136.19 (C (31)), 133.19 (C (32)), 132.21 (C (40)), 131.31 (C (39)), 128.97 (C (2, 3)), 128.04 (C (34)), 126.55 (C (19)), 126.40 (C (30)), 125.03 (C (22)), 123.93 (C (20)), 123.54 (C (25)), 123.22 (C (24)), 118.73 (C (36)), 112.63 (C (4, 8)), 109.60 (C (2, 12)), 102.27 (C (6, 14)), 83.08 (C (7)).

5. CONCLUSIONES

Con el objetivo de encontrar compuestos aptos para su uso como agentes terapéuticos y de bioimagen se sintetizaron complejos de Ir^{III} del tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ representa el ligando 2-fenilpiridina y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ los ligandos N-dadores bidentados sintetizados derivados de la 5-amino-1,10-fenantrolina. Dichos ligandos contienen un cromóforo orgánico unido a la 5-am-phen mediante un enlace tiourea entre su grupo amino y el grupo tioisocianato del cromóforo. En concreto se han sintetizados dos complejos de iridio (**B** y **C**) y tres ligandos tiourea bidentados L1-L3) Todos ellos han sido caracterizados por ¹H-RMN, ¹³C-RMN. Además, se realizaron espectroscopia bidimensional HSQC, COSY y HMSC de algunos compuestos para asegurar la asignación correcta de las señales.

El estudio de sus propiedades ópticas por espectroscopia de UV-visible y emisión muestra el perfil esperado tanto para el complejo **B** como para la 5-am-phen, ambos enseñan bandas de absorción intensas correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los distintos anillos aromáticos. En el caso del complejo se observan también transiciones de menor energía sobre 391 nm que corresponden con transiciones permitidas de ¹MLCT y ¹LLCT y una más allá de 450 nm debido a una transición de carga prohibida ³MLCT. Por otro lado, la espectroscopia de fluorescencia mostró en el caso de **B** un doble perfil de emisión asociado a transiciones ³LLCT sobre 420 nm y ³MLCT a 610 nm. Lamentablemente la poca intensidad de las mismas hace descartar el uso de este complejo en técnicas bioimagen por microscopia de fluorescencia.

Los estudios biológicos del complejo **B** y de la 5-am-phen en células cancerígenas A549 de pulmón muestran una gran citotoxicidad incluso en ausencia de radiación con IC₅₀ de 0.14 y 0.95 μM en oscuridad y 0.12 y 0.45 μM y bajo condiciones de irradiación respectivamente. Estos valores ponen de manifiesto tres puntos: A) la importancia del metal a la hora de incrementar la citotoxicidad asociada del compuesto, B) que la irradiación de los mismos efectivamente incrementa la citotoxicidad como se buscaba y, C) la imposibilidad de poder utilizarlos en TFP puesto únicamente deberían mostrar citotoxicidad cuando se irradian y no en oscuridad.

También se pone de manifiesto la dificultad experimental de la coordinación de los ligandos N-dadores bidentados al Ir^{III} conteniendo un grupo tiourea en su estructura como puente de unión con un cromóforo. La teoría dicta una fácil unión entre ligandos $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ bidentados y el dímero **A** de Iridio debido a la fortaleza del enlace Ir-nitrogeno y a la capacidad de coordinación octaédrica del metal, lo cual se cumple. Pero lamentablemente las condiciones de reacción para llevar a cabo esa reacción y el proceso de purificación no son lo suficientemente suaves para mantener ese cromóforo unido a través del grupo tiourea al ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$. Por ellos, y pese a los números intentos, se han observado bajos rendimientos de síntesis de productos y de descomposiciones de los reactivos.

Como conclusión podemos decir que se han sintetizado una serie de ligandos, derivados de la 5-am-phen, y complejos de Ir^{III}, los cuales, debido a la alta citotoxicidad en células cancerígenas de pulmón en oscuridad, se prevé que sean útiles como agentes terapéuticos en quimioterapia, no siendo así en terapia fotodinámica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) 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>.
- (2) Stacey, O. J.; Pope, S. J. A. New Avenues in the Design and Potential Application of Metal Complexes for Photodynamic Therapy. *RSC Adv.* **2013**, *3* (48), 25550. <https://doi.org/10.1039/c3ra45219k>.
- (3) Jung, A. C.; Moinard-Butot, F.; Thibaudeau, C.; Gasser, G.; Gaiddon, C. Antitumor Immune Response Triggered by Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Where Are We? *Pharmaceutics* **2021**, *13* (11), 1788. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111788>.
- (4) Sharma S, A.; P, S.; Roy, N.; Paira, P. Advances in Novel Iridium (III) Based Complexes for Anticancer Applications: A Review. *Inorganica Chim. Acta* **2020**, *513*, 119925. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119925>.
- (5) Sheng, Z.; Cai, L. Organic Dye-Loaded Nanoparticles for Imaging-Guided Cancer Therapy. In *Advances in Nanotheranostics I*; Dai, Z., Ed.; Springer Series in Biomaterials Science and Engineering; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016; Vol. 6, pp 217–245. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48544-6_7.
- (6) Sprouse, S.; King, K. A.; Spellane, P. J.; Watts, R. J. Photophysical Effects of Metal-Carbon σ -Bonds in Ortho-Metalated Complexes of Iridium(III) and Rhodium(III). *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (22), 6647–6653. <https://doi.org/10.1021/ja00334a031>.
- (7) Garces, F. O.; Watts, R. J. ^1H and ^{13}C NMR Assignments with Coordination-Induced Shift Calculations of Carbon σ -Bonded ortho-Metalated Rhodium(III) and Iridium(III) Complexes. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31* (6), 529–536. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260310603>.
- (8) Martínez-Alonso, M.; Cerdá, J.; Momblona, C.; Pertegás, A.; Junquera-Hernández, J. M.; Heras, A.; Rodríguez, A. M.; Espino, G.; Bolink, H.; Ortí, E. Highly Stable and Efficient Light-Emitting Electrochemical Cells Based on Cationic Iridium Complexes Bearing Arylazole Ancillary Ligands. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (17), 10298–10310. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01167>.