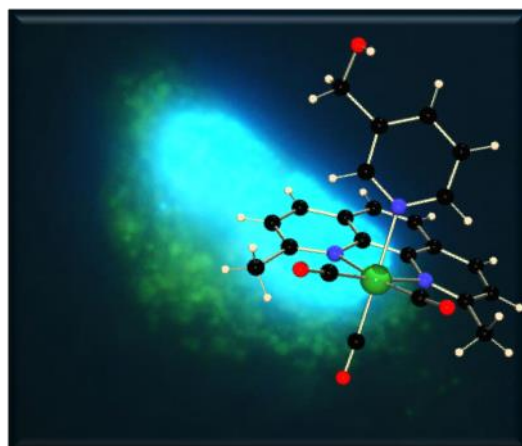


# Compuestos luminiscentes de Re(I) con aplicaciones en bioimagen

Trabajo de Fin de Grado



**Laura Rodríguez Pascual**

Directora: Vanesa Fernández Moreira  
Ponente: M<sup>a</sup> Dolores Villacampa Pérez

Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza

26 de junio de 2015

## Índice de contenidos

	Página
Abreviaturas	2
Summary	3
Resumen	4
1. Introducción	5
2. Objetivos	8
3. Resultados y discusión	9
3.1. Síntesis de compuestos de Re(I)	9
3.1.1. Síntesis de especies neutras de Re(I)	9
3.1.2. Síntesis de especies activadas	11
3.1.3. Síntesis de la especie catiónica de Re(I)	13
3.1.4. Síntesis de los derivados de cloruro de alquil-piridina de Re(I)	15
3.2. Estudio de difracción de rayos X	16
3.3. Estudio de propiedades fotofísicas	17
3.4. Determinación de la actividad biológica	18
4. Parte experimental	23
4.1. Información general	23
4.2. Síntesis de compuestos de renio	23
4.2.1. Especies neutras de Re(I)	23
4.2.2. Especies activadas	24
4.2.3. Especie catiónica	25
4.3. Actividad biológica	25
4.3.1. Determinación de la toxicidad: Test MTT	25
4.3.2. Análisis de la unión al DNA	26
4.3.3. Marcaje y visualización de núcleos	26
5. Conclusions	27
6. Conclusiones	28
7. Referencias	29

## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

MLCT: transferencia de carga del ligando al metal (del inglés, metal-to-ligand charge transfer)

IL: intraligando

v-UV: visible-ultra violeta

H-RMN: espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón.

C-RMN: espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono

FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

DCM: diclorometano

ACN: acetonitrilo

THF: tetrahidrofurano

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

TBE: Tris, borato y EDTA

OTf: tflurometansulfonato

IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria máxima media

## Summary

This work describes the development of a new variety of luminescent rhenium(I) complexes of the type  $fac-[Re(NN)(CO)_3L]^{n+}$  where NN represents a phenanthroline derivative and L is either a pyridine derivative or an acetonitrile molecule ( $n = 1$ ) or either a chloride or a triflate ( $n=0$ ), suitable for specific cell imaging and whose modified photophysical properties overcome some of the problems associated with traditional imaging agents.

Specifically, the successful synthesis and photophysical studies of a series neutral Re(I) species such as  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ ,  $fac-[Re(2,9-(CHO)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  and  $fac-[Re(2,9-(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  are presented. Moreover, activation of those species by an abstraction or substitution reaction of the halide for a labile ligand is described. Then, the synthesis of a thiol selective precursor was achieved by substitution of the activated ligand for a 3-hydroxymethyl-pyridine affording the complex  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$ . Besides to its full characterization, its crystalline structure is also discussed. Furthermore, the attempt to transform this species into the thiol selective agent  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2Cl-Py)]^+$  is also reported. Moreover, attempts to synthesize  $fac-[Re(2,9-(CHO)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  and  $fac-[Re(2,9-(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2Cl-Py)]^+$  are also included.

Photophysical studies were performed for species  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ ,  $fac-[Re(2,9-(CHO)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  and  $fac-[Re(2,9-(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  and  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  by UV visible and fluorescence spectroscopy.

Eventually, cytotoxicity of  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  in human adenocarcinoma cervical cancer cells, HeLa cells, was analyzed as well as its DNA interaction behavior. In addition to those studies, fluorescent microscopy was also performed to validate  $fac-[Re(2,9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  as a potential contrast agent.

These results succeed to demonstrate the promising future of this new class of imaging probes and therefore, this work represents the initial step in the growing area of the development of transition metal based imaging agents.

## Resumen

Este trabajo describe el diseño y la síntesis de una nueva familia de complejos luminiscentes de renio (I) del tipo  $fac-[Re(NN)(CO)_3L]^{n+}$ , donde NN representa un derivado de fenantrolina y L es, o bien un derivado de piridina o acetonitrilo ( $n=1$ ), o bien un cloruro o triflato ( $n=0$ ), con potencial aplicación en imagen celular y cuyas propiedades fotofísicas superan algunos de los problemas asociados con los agentes tradicionales de imagen.

En concreto, se presentan la síntesis y los estudios fotofísicos de una serie de especies neutras de Re(I) como son el  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ ,  $fac-[Re(2,9(CHO)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  y  $fac-[Re(2,9(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ . Además, se describe la activación de estas especies por abstracción o reacción de sustitución del haluro por un ligando más lábil. Por último, también se describe la síntesis de complejo  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$ , que se logró mediante la sustitución del ligando activado (OTf) en el compuesto  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3(OTf)]$  por 3-hidroximetilpiridina. Además de su caracterización completa, se analizó su estructura cristalina por difracción de rayos X. Por otra parte, se recoge también el intento de transformar esta especie en su análogo  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2Cl-Py)]^+$ , la cual debería de ser un complejo con afinidad a reaccionar con tiolatos. Igualmente se describen los intentos de las síntesis de  $fac-[Re(2,9(CHO)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  y  $fac-[Re(2,9(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2Cl-Py)]^+$ .

Se realizaron los estudios fotofísicos de las especies  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ ,  $fac-[Re(2,9(CHO)_2-Phen)(CO)_3Cl]$ ,  $fac-[Re(2,9(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  y  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  por espectroscopía de fluorescencia y visible-UV.

Finalmente, se analizó la citotoxicidad de  $fac-[Re(2,9(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)]^+$  en células humanas de adenocarcinoma de cáncer de cérvix, células HeLa, así como su interacción con el ADN. Además de estos estudios, también se utilizó la microscopía fluorescencia para validar éste compuesto como un potencial agente de contraste.

Estos resultados demuestran el futuro prometedor de esta nueva clase de compuestos como agentes de imagen y, por lo tanto, este trabajo representa un paso adelante en la creciente área del desarrollo de agentes de imagen basados en metales de transición.

## 1. Introducción

Uno de los objetivos más importantes de la medicina es la óptima detección de biomoléculas individuales, componentes celulares y otras entidades biológicas. La microscopía de fluorescencia es una técnica muy potente de alta resolución en imagen celular que la hace especialmente útil en el seguimiento de fármacos y diagnóstico.

Tradicionalmente se han utilizado colorantes orgánicos que permitían la tinción específica de tejidos celulares y mostraban preferencia por algunos orgánulos intracelulares en particular, permitiendo su visualización. Algunos de los primeros compuestos orgánicos utilizados son el verde de malaquita y el azul de Coomassie, que fueron posteriormente ampliados por el uso de colorantes fluorescentes como la fluoresceína y la rodamina para intentar mejorar la sensibilidad, figura 1.

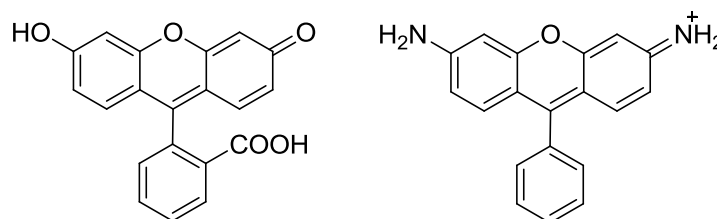


Figura 1. Representación de fluoresceína (izq.) y rodamina (drcha.).

Generalmente los compuestos orgánicos presentan una serie de características comunes dentro de sus propiedades fotofísicas como por ejemplo el pequeño desplazamiento de Stokes (diferencia entre los máximos de la longitud de onda entre la luz absorbida y la luz emitida) y tiempos vida media del estado excitado cortos, que pueden generar problemas a la hora de ser utilizados como agentes de visualización celular. Esto, junto con los avances tecnológicos y la necesidad de información más específica sobre los procesos biológicos, ha llevado al desarrollo de nuevos agentes biológicos luminiscentes dentro de los cuales se encuentran los puntos cuánticos y los complejos de metales de transición y de lantánidos.<sup>1</sup>

En particular, los complejos de metales de transición  $d^6$  tienen unas características excepcionales como fluoróforos y ofrecen claras ventajas frente a los colorantes orgánicos tradicionales: son fotoestables, tienen grandes desplazamientos de Stokes, longitudes de onda de excitación generalmente superiores a 400 nm y tiempos de vida media largos, lo que permite que puedan ser utilizados en técnicas de visualización dependientes del tiempo (time gating techniques)<sup>2</sup>. Teniendo en cuenta la simplicidad de la química de los compuestos de coordinación de los metales de transición con respecto a los lantánidos, cabe pensar en los compuestos de metales de transición como el objetivo a seguir.

Las propiedades fotofísicas ideales para que una especie pueda ser utilizada en visualización celular son: (a) Alta penetración en el tejido irradiado; las especies deben ser capaces de ser excitadas y emitir en longitudes de onda que puedan transmitirse a través del tejido a visualizar. Las radiaciones en el área del UV tienen baja capacidad de penetración y también puede causar daño al tejido, mientras que aquellas desplazadas a menor energía como las infrarrojas cercanas (NIR) muestran una mayor penetración y transmisión en el tejido. (b) Desplazamientos de Stokes grandes; el desplazamiento de Stokes tiene una doble importancia: para prevenir la auto-desactivación o self quenching (es decir, la re-absorción de la luz emitida por los fluoróforos vecinos); y para distinguir la emisión del fluoróforo de la autofluorescencia.<sup>3</sup> Normalmente, los desplazamientos de Stokes de autofluorescencia son pequeños (decenas de nm) y los grandes desplazamientos de Stokes de los fluoróforos permiten filtrar la autofluorescencia sin perder intensidad de la señal. (c) Tiempos de vida largos; el tiempo de vida de la luminiscencia,  $\tau$ , también se puede utilizar para distinguir la señal

deseada de la autofluorescencia. La mayor parte de la autofluorescencia es de corta duración (10 ns), mientras que algunos fluoróforos metálicos pueden tener tiempos de vida que van desde los 100 ns a ms por lo que es factible utilizar técnicas dependientes del tiempo para poder visualizar las muestras.<sup>4</sup>

El diagrama de Jablonsky de la figura 2 muestra esquemáticamente los pasos necesarios para que se produzca una emisión de luz por fluorescencia y fosforescencia. Si la emisión se produce desde un estado singlete se llamará fluorescencia y desde uno triplete es conocida como fosforescencia. La ventaja que ofrece la fosforescencia con respecto a la fluorescencia es que se trata de una transición prohibida por las reglas de Laporte<sup>5</sup> con lo que tendrá un tiempo de vida más largo y desplazamiento de Stokes mayores, propiedades altamente deseables para el diseño de agentes de visualización celular. Además, para que este proceso de fosforescencia ocurra se necesita que se produzca un proceso de entrecruzamiento de sistemas efectivo entre los orbitales del estado excitado singlete y triplete, el cual se dará con más facilidad en aquellas moléculas que contiene átomos pesados, por los que los complejos de metales de transición o lantánidos son ideales.

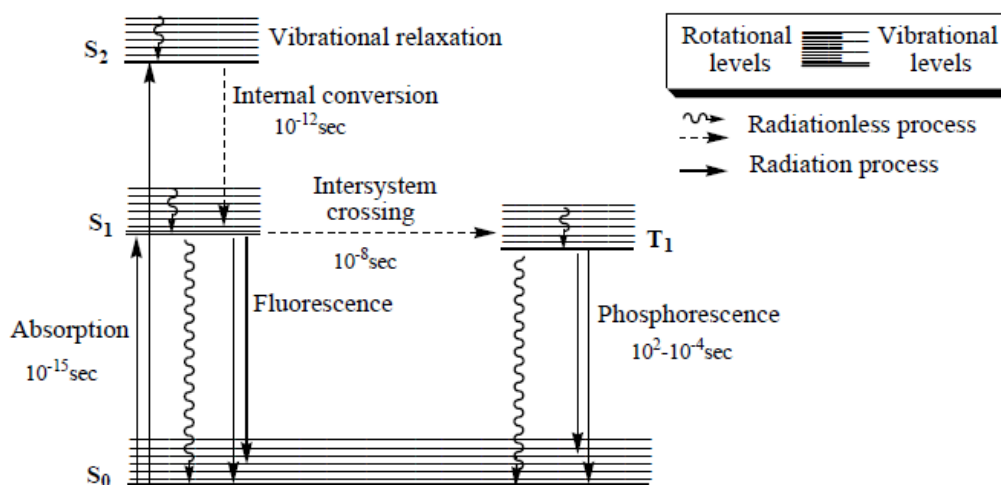


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

Aparte de las propiedades fotofísicas citadas es conveniente que los agentes de imagen celular cumplan también una serie de premisas como son: (a) Alta estabilidad y solubilidad; además de tener fotoestabilidad deben de ser estables y solubles en el medio de estudio. (b) Baja toxicidad; no deben ser tóxicos para el organismo, al menos durante el transcurso del experimento. Tampoco deben presentar fototoxicidad. (c) Fácil penetración; deben ser absorbidos en el interior de las células, preferiblemente sin necesidad de añadir ningún agente químico para mejorar la permeabilidad de la membrana celular o el uso de electroporación ya que éstos pueden interferir en el proceso natural que se esté estudiando. (d) Localización específica; deben de mostrar una localización preferente por algún orgánulo celular, o ser fácilmente adaptables por bioconjugación para que adquieran esa afinidad.

La figura 3 muestra algunos ejemplos de complejos de metales de transición  $d^6$  que cumplen muchas de las premisas comentadas para ser candidatos perfectos como agentes de imagen. Todos ellos han demostrado en los últimos años su gran capacidad como agentes de contraste.

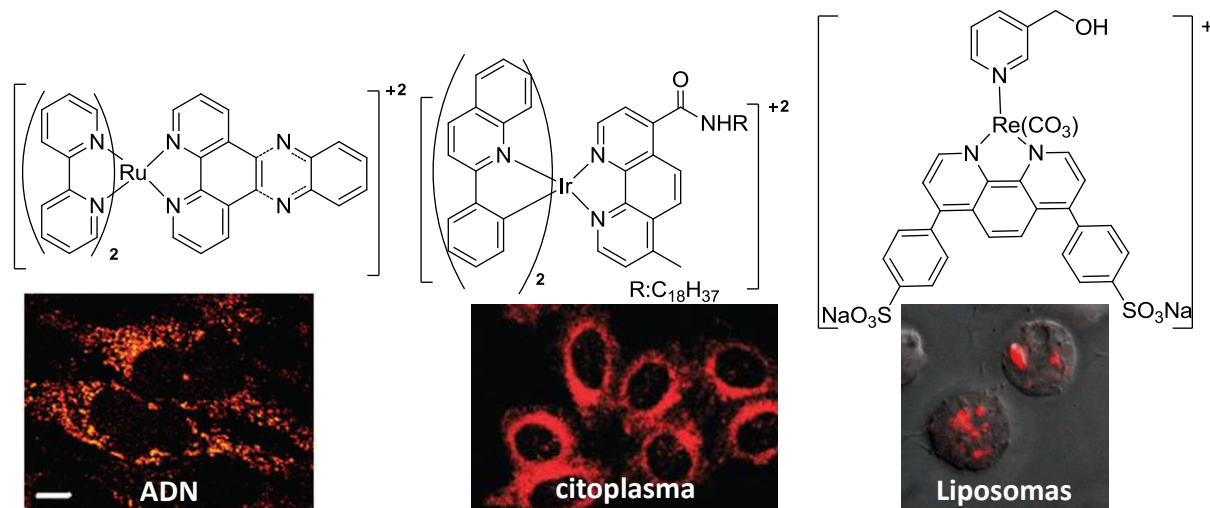


Figura 3. Ejemplos de complejos metálicos d<sup>6</sup> que han sido utilizados en visualización celular.<sup>6</sup>

En particular, los derivados de Re(I) del tipo fac-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)X]<sup>+</sup>, donde NN representa un ligando quelato tipo bipyridina y X un derivado de piridina, ofrecen una característica única a todos ellos, la facilidad de modular independientemente las propiedades luminiscentes y las biológicas. Modificaciones en el ligando quelato afectarán fundamentalmente a las propiedades emisoras del compuesto ya que la luminiscencia en estos compuestos es debida a una transferencia de carga del ligando al metal (MLCT) donde los orbitales del ligando implicado son principalmente los ligando quelato. De esta forma se deja libre el derivado de piridina para poder introducir grupos que permitan las modificaciones deseadas de las propiedades biológicas. Un ejemplo de ello es el compuesto luminiscente fac-[Re(bipy)(CO)<sub>3</sub>(3-CH<sub>2</sub>Cl-Py)]<sup>+</sup> publicado por Coogan y colaboradores, que tiene una afinidad específica por la mitocondria, donde la concentración de grupos tioles es elevada, gracias a la introducción de un cloruro de alquilo en el anillo piridínico.<sup>7</sup> Éste grupo es conocido por tener una gran afinidad por reaccionar con grupos tioles, siendo así utilizado como motor para modular la especificidad de este compuesto en las células. La figura 4 muestra el experimento de colocalización, en el que las células son incubadas simultáneamente con el derivado Re(I) y un fluoróforo comercial, diseñado específicamente para visualizar la mitocondria. Cada uno de los fluoróforos es excitado a una longitud de onda distinta por lo que pueden visualizarse por separado (A y B). Como se puede observar en la superposición de imágenes (C) los dos compuestos tienen afinidad por el mismo orgánulo, es decir, la mitocondria. Esta se presenta como una diana biológica muy atractiva por su papel biológico en generación de energía, en los ciclos de división y en la muerte celular. Su detección y entendimiento de los procesos biológicos que en ella se desarrollan con una mayor profundidad es de vital importancia a la hora de diseñar, por ejemplo, nuevos agentes antitumorales. Por ello cada vez más este orgánulo se despunta como un objetivo a seguir para muchos grupos de investigación.

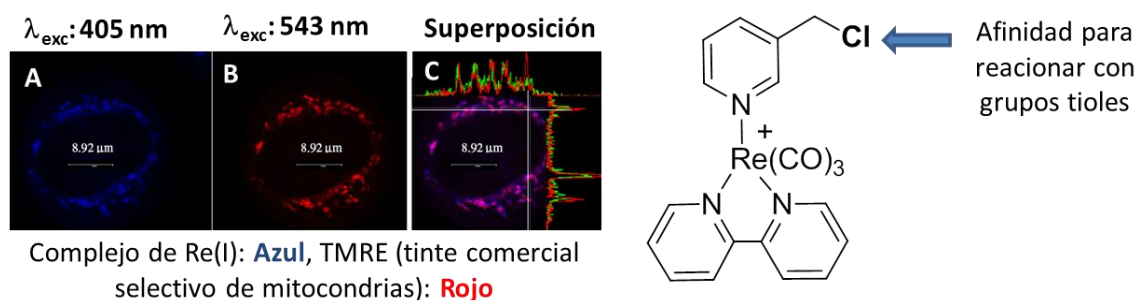


Figura 4. Experimento de colocalización



## 2. Objetivos

Teniendo en cuenta el reciente impacto de los complejos de Re(I) en imagen celular como agentes de contraste debido a sus excelentes propiedades luminiscentes, este trabajo se centrará en la síntesis de nuevos derivados de Re(I) que puedan servir para ampliar la librería de agentes de contraste, haciendo prioritaria la mitocondria como diana biológica. Los objetivos marcados son los siguientes.

1. Preparación de diferentes complejos de Re(I) del tipo  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{NN})\text{Cl}]$ , donde NN representa distintos derivados de fenantrolina.
2. Síntesis de las especies activadas de Re(I) del tipo  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{NN})\text{X}]$  donde NN representa distintos derivados de fenantrolina y X o bien una molécula de acetonitrilo o un grupo triflato.
3. Síntesis de las especies catiónicas de Re(I) del tipo  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{NN})\text{X}]^+$ , donde NN representa distintos derivados de fenantrolina y X el derivado de piridina, 3-hidroximetilpiridina.
4. Transformación de los grupos alcoholes en los cloruros de alquilo correspondientes para potenciar la selectividad hacia la mitocondria.
5. Caracterización de los complejos obtenidos mediante las técnicas espectroscópicas habituales de resonancia magnética nuclear, infrarrojo y espectrometría de masas. En los casos que sea posible se realizará el estudio de la estructura por difracción de rayos X.
6. Estudio y análisis de las propiedades luminiscentes. En primer lugar se estudiarán los espectros v-UV y, posteriormente, de los espectros de emisión de los complejos, haciendo hincapié en la posible influencia de los distintos sustituyentes del derivado de fenantrolina.
7. Estudio de la actividad biológica de la especie de Re(I) seleccionada, específicamente se estudiará la citotoxicidad, la interacción con el DNA y su actividad como agente de contraste en células HeLa de adenocarcinoma de cérvix.

### 3. Resultados y discusión

Para la realización de este trabajo se han elegido tres derivados de fenantrolina donde la única diferencia son los sustituyentes R, siendo así R un grupo metilo, aldehído o metil-alcohol y que a partir de ahora serán nombrados como L1, L2 y L3 respectivamente, figura 5. Lo que se pretende con estos tres sistemas es ver el efecto que este puede tener las sobre propiedades luminiscentes y/o bioactividad y así encontrar aquel sistema mejor se ajuste para poder ser utilizado como agente de contraste.

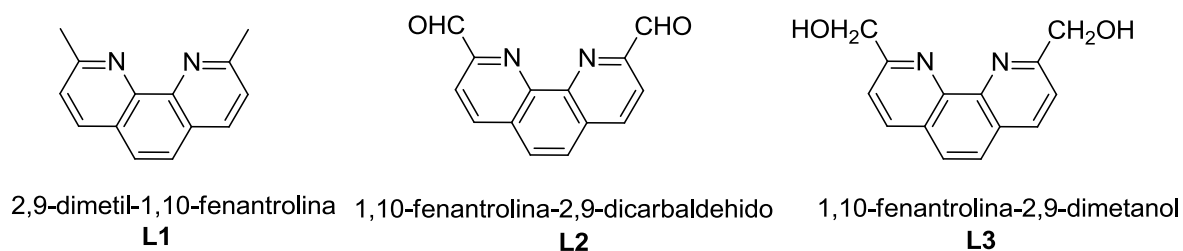


Figura 5. Derivados de fenantrolina L1, L2 y L3.

#### 3.1. Síntesis de compuestos de Re(I):

A modo de ejemplo, la figura 6 muestra la ruta sintética que será seguida para la obtención del derivado de cloruro de alquilo. Esta es la comúnmente seguida para la síntesis de compuestos del tipo *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)L]<sup>+</sup>, donde NN representa un ligando quelato de tipo fenantrolina y L un derivado de piridina. Implica en primer lugar la sustitución de dos grupos carbonilo por un ligando quelato como el derivado de la fenantrolina, en segundo lugar la activación del complejo mediante abstracción o sustitución del cloro por un ligando más lábil, en tercer lugar la sustitución del ligando activado por 3-hidroximetilpiridina y, por último, la transformación del grupo metil alcohol por cloruro de alquilo para obtener el compuesto final.<sup>8</sup>

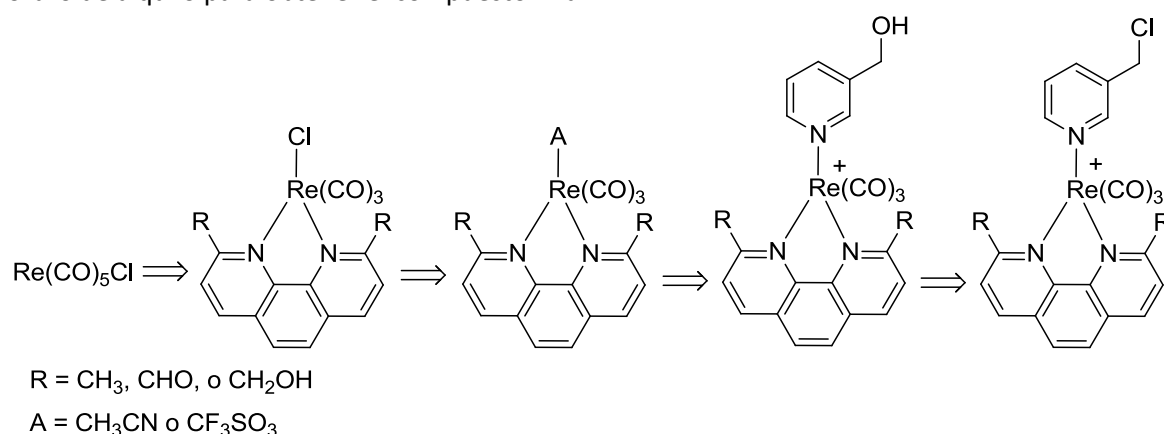


Figura 6. Ruta sintética para la síntesis de los complejos de Re(I).

##### 3.1.1. Síntesis de las especies neutras de Re(I)

El compuesto *fac*-Re(L1)(CO)<sub>3</sub>Cl, **1**, sintetizado previamente por Campagna y colaboradores, se ha preparado haciendo reaccionar Re(CO)<sub>5</sub>Cl en tolueno con 1.1 equivalente de **L1**.<sup>9</sup> El compuesto deseado fue obtenido después de 1 hora de calentamiento a reflujo bajo atmósfera inerte, en la que

el producto deseado precipitó como un sólido amarillo con un rendimiento del 87%. Este compuesto solo ha sido caracterizado por  $^1\text{H-RMN}$  e IR ya que su completo análisis y coinciden con los ya publicados.<sup>9</sup> Los compuestos *fac*-Re(L2)(CO)<sub>3</sub>Cl, **2**, y *fac*-Re(L3)(CO)<sub>3</sub>Cl, **3**, fueron obtenidos de forma similar al compuesto **1**, pero utilizando el ligando **L2** y **L3**, respectivamente en lugar de **L1**, figura 7. En este caso ambos se obtuvieron con un excelente rendimiento del 97%. En el primer caso se observó un cambio en el color de la disolución, de naranja a rojo obteniéndose finalmente un sólido rojizo. En el segundo caso, el cambio de color fue de amarillo palo a amarillo intenso y se obtuvo un sólido amarillo. En ambos casos se observó en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  un desplazamiento del el protón 4 del derivado de fenantrolina a campo bajo con respecto al ligando sin coordinar indicando la coordinación del ligando quelato al centro metálico, figura 8. Esto también se observa en los espectros de  $^{13}\text{C-RMN}$ , donde en el caso del complejo **3** el carbono 4 aparece a 140 ppm, figura 9. Además se observan dos señales pertenecientes a los carbono carbonílicos a 197  $\text{cm}^{-1}$  y 188  $\text{cm}^{-1}$  mostrando así su distinto entorno químico (ecuatorial y apical), ver figura 9. Por otro lado, espectroscopía infrarroja muestra perfectamente las dos señales características del grupo carbonilo a 2020  $\text{cm}^{-1}$ , 1888  $\text{cm}^{-1}$  para el compuesto **2** y a 2018  $\text{cm}^{-1}$ , 1881  $\text{cm}^{-1}$  para el compuesto **3**, sugiriendo su disposición facial.

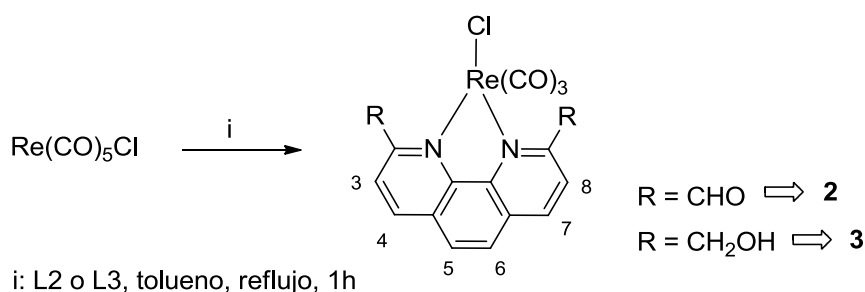


Figura 7. Vía de síntesis de los compuestos **2** y **3**.

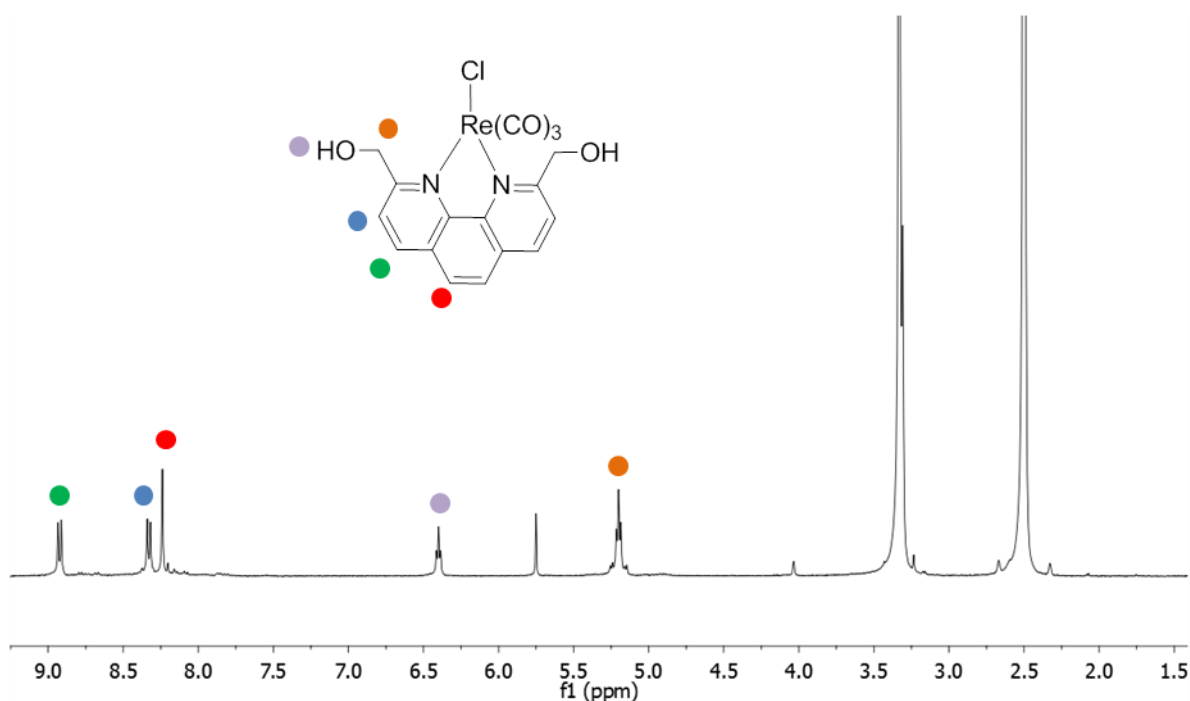


Figura 8. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  para el complejo **3**

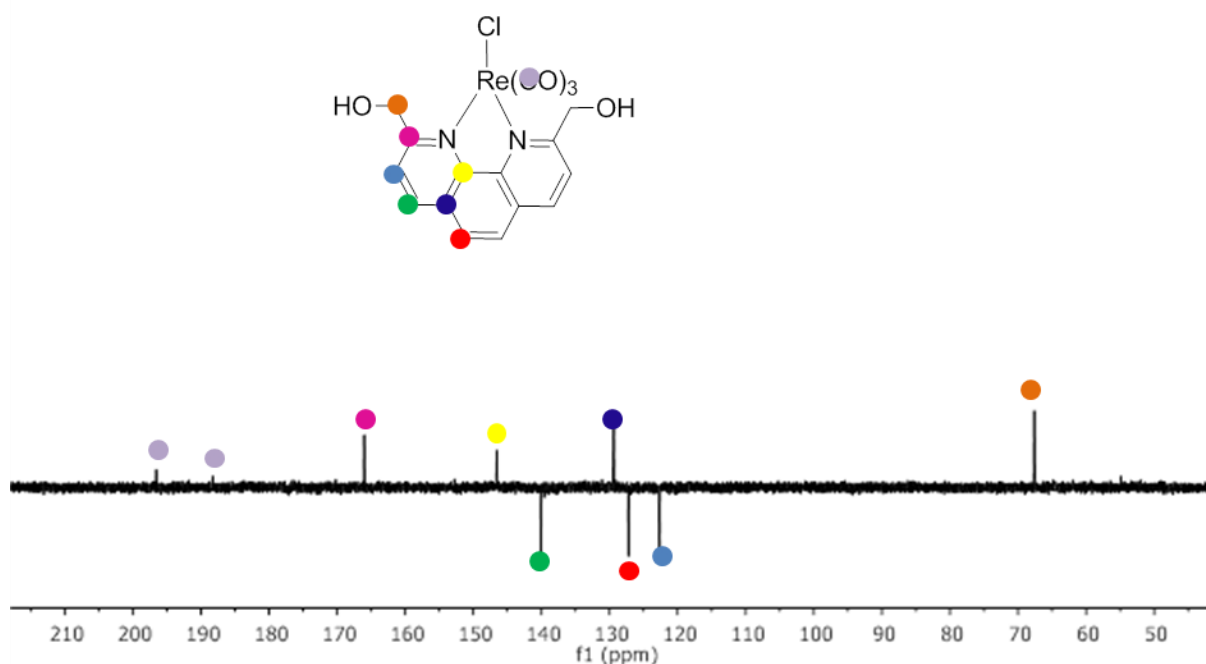


Figura 9. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el complejo **3**

### 3.1.2. Síntesis de las especies activadas

El siguiente paso en la síntesis es la abstracción o sustitución del haluro con el fin de llegar al complejo final vía un complejo activado. Una primera ruta seguida para la de síntesis del complejo activado es la utilización de ácido trifílico por la que se consiguió preparar el compuesto *fac*- $\text{Re}(\text{L1})(\text{CO})_3\text{CF}_3\text{SO}_3$ , **4**, Figura 10. Específicamente, en esta reacción se realizó haciendo reaccionar compuesto **1** con 10.5 equivalentes de ácido trifluoromentansulfónico añadidos gota a gota en diclorometano, formandose una disolución amarilla. Tras 45 minutos agitando vigorosamente, se añadió éter gota a gota por medio de un embudo de adición para conseguir la precipitación del sólido deseado, con un color amarillo más tenue que su predecesor y con un 60% de rendimiento. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra el desplazamiento esperado de los protones de 8.34, 7.86, 7.75 y 3.35 ppm a 8.50, 7.98, 7.87 y 3.38 ppm, figura 11, lo que concuerda con los desplazamientos químicos observados para compuestos similares.<sup>10</sup>

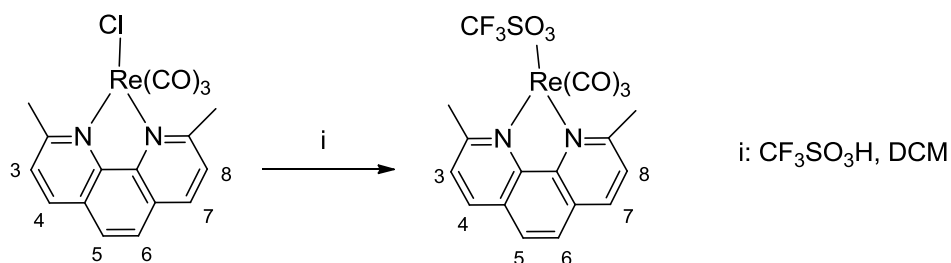
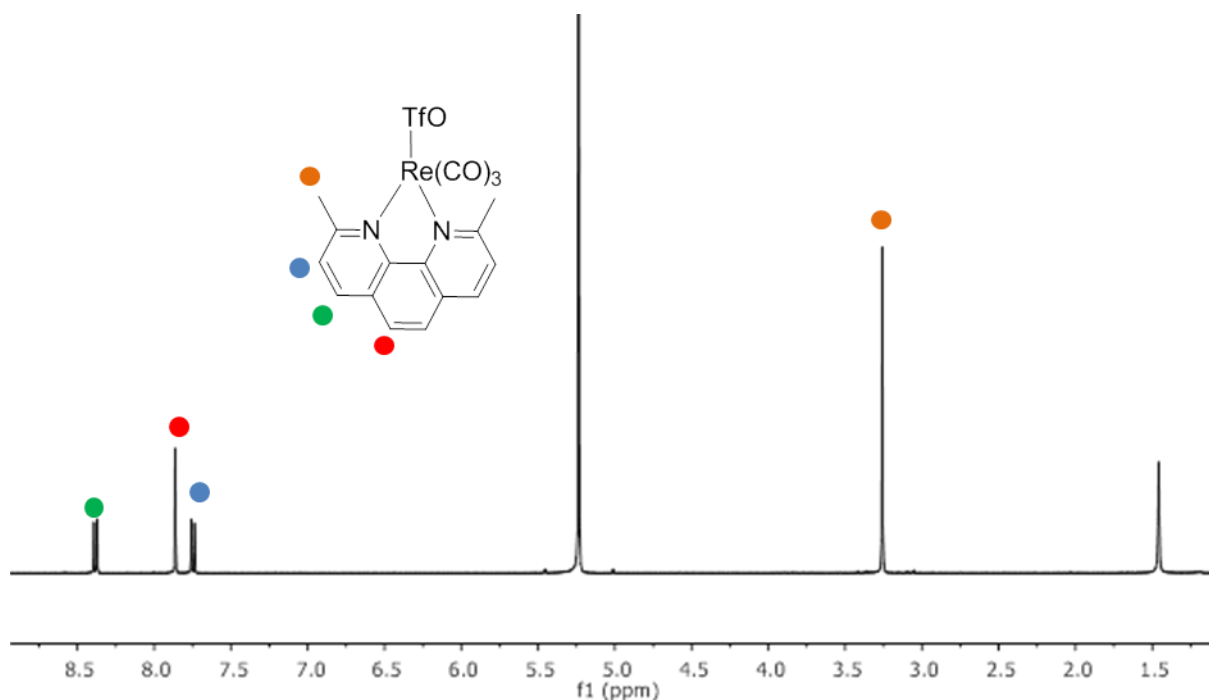


Figura 10. Vía de abstracción del haluro para obtener el compuesto **4**.

Figura 11. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **4**.

Se siguió la misma vía para la abstracción del haluro en el caso del compuesto **2**. Tras intentar precipitar con éter sólo se consiguió un aceite marrón oscuro, que se desechó tras comprobar por  $^1\text{H}$ -RMN que era producto de descomposición. En este punto se optó por una segunda ruta para obtener el compuesto **2**, que consistió en utilizar tetrafluoroborato de plata por la gran afinidad de la plata a unirse a iones cloruro. La reacción se llevó a cabo calentando los dos reactivos a reflujo en una disolución de acetonitrilo y en ausencia de luz, debido a la fotosensibilidad de las sales de plata. Una molécula de este disolvente coordinante ocupó la vacante que dejó el cloro y se obtuvo el compuesto *fac*-[Re((L2)(CO)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>CN)(BF<sub>4</sub>)] **5**, figura 12. A lo largo de la reacción se observó la aparición de un sólido blanco (AgCl) en la disolución, la cual pasó de color rojo a anaranjado. Para aislar el producto deseado se filtró primero el cloruro de plata sobre tierra de diatomeas. Después se eliminó el disolvente por evaporación y se añadió una pequeña cantidad de acetonitrilo para redissolver el producto deseado y forzar la precipitación de restos de cloruro de plata que pudiesen quedar. Este proceso se repitió varias veces hasta que finalmente con la adicción de éter a la disolución de acetonitrilo se consiguió precipitar el compuesto **5**, como un sólido anaranjado y con un rendimiento del 34%. Por espectroscopia infrarroja se observa el cambio esperado para la transformación de un compuesto neutro en una especie catiónica, en concreto  $\nu(\text{CO})$  se desplazó de 2020, 1888  $\text{cm}^{-1}$  a 2037, 1913  $\text{cm}^{-1}$  mostrando así como menor densidad de carga que posee el metal provoca una menor retrodonación al orbital  $\pi^*$  del carbonilo y consecuentemente un enlace CO más fuerte.

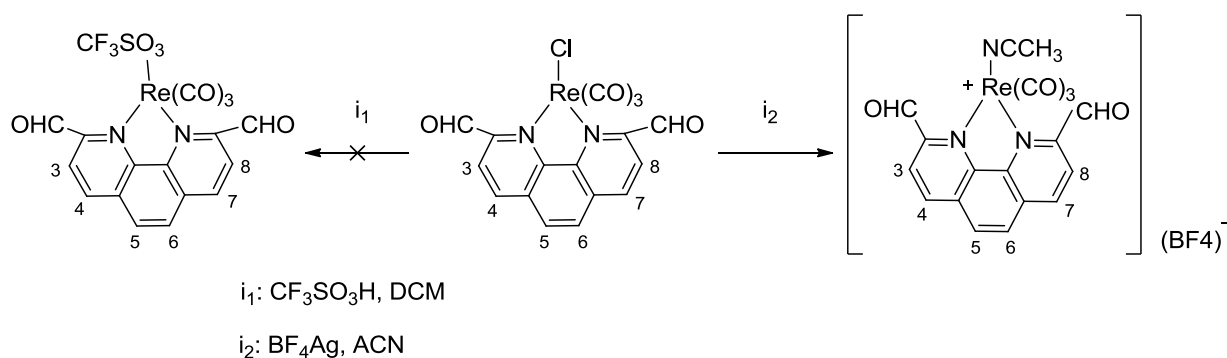


Figura 12. Vía de la abstracción del haluro para obtener el compuesto 5.

Debido a los problemas para seguir la primera vía de abstracción del haluro con el compuesto 2, se optó directamente por la segunda vía para obtener el compuesto *fac*-[Re(L3)(CO)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>CN](BF<sub>4</sub>), 6, a partir del compuesto 3, procediendo de la misma forma, es decir, utilizando AgBF<sub>4</sub>. Finalmente se obtuvo un sólido amarillo, con un rendimiento del 65%. Una vez más se observa el desplazamiento característico en espectroscopía infrarroja de los ligandos carbonilo para especies catiónicas,  $\nu(\text{CO})$ , pasando de 2018, 1881  $\text{cm}^{-1}$  a 2030, 1932  $\text{cm}^{-1}$  lo que demuestra que la reacción ha transcurrido con éxito.

### 3.1.3. Síntesis la especie catiónica de Re(I)

Para la obtención del derivado de piridina *fac*-[Re(L1)(CO)<sub>3</sub>PyCH<sub>2</sub>OH](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 7, a partir del compuesto 4, se disolvió éste en diclorometano junto con 10 equivalentes de 3-hidroximetilpiridina, que se mantuvo agitando durante 24 horas, a temperatura ambiente y en atmósfera de argón, figura 13. Durante ese tiempo el color de la mezcla de reacción pasó de ser amarilla a rojiza. Finalmente el compuesto 7 fue obtenido por precipitación tras la adición de eter (rendimiento del 73%). En este caso, se observa en el espectro <sup>1</sup>H-RMN como la señal perteneciente a los protones metileno CH<sub>2</sub> pasan de un desplazamiento químico de 4.6 ppm a 4.3 ppm tras la coordinación de ese ligando al centro metálico, figura 14. Así mismo la figura 15 muestra el espectro de <sup>13</sup>C-RMN donde nuevamente se ven las dos señales pertenecientes a los carbonos carbonílicos ecuatoriales y axiales a 195 ppm y 191 ppm respectivamente así como los carbonos 2 y 6 de ligando piridinico que se desplazan a un desplazamiento químico mayor de 150 ppm, demostrando así la coordinación de este fragmento al centro metálico.

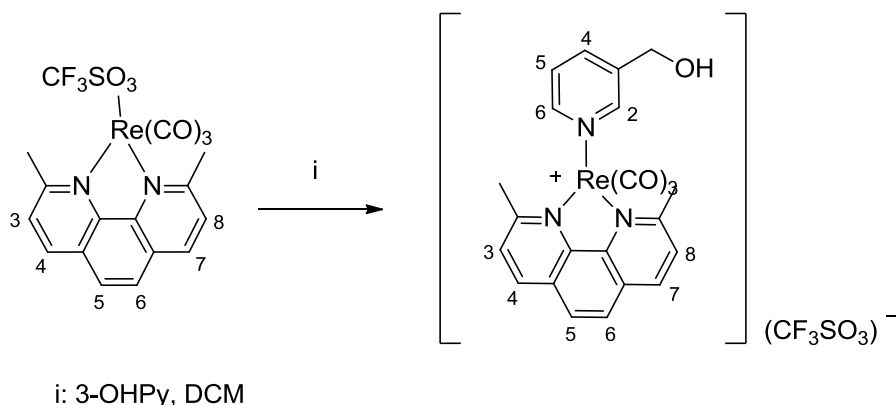


Figura 13. Vía de síntesis para el compuesto 7.

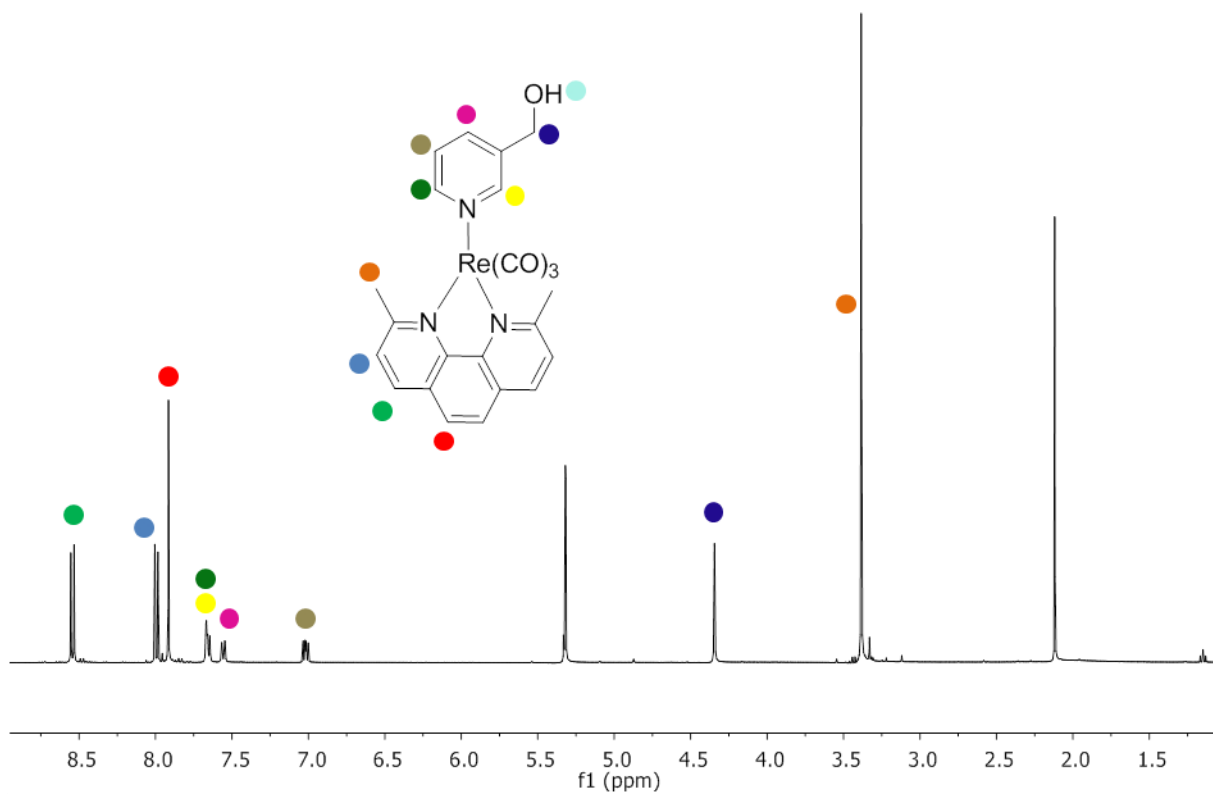
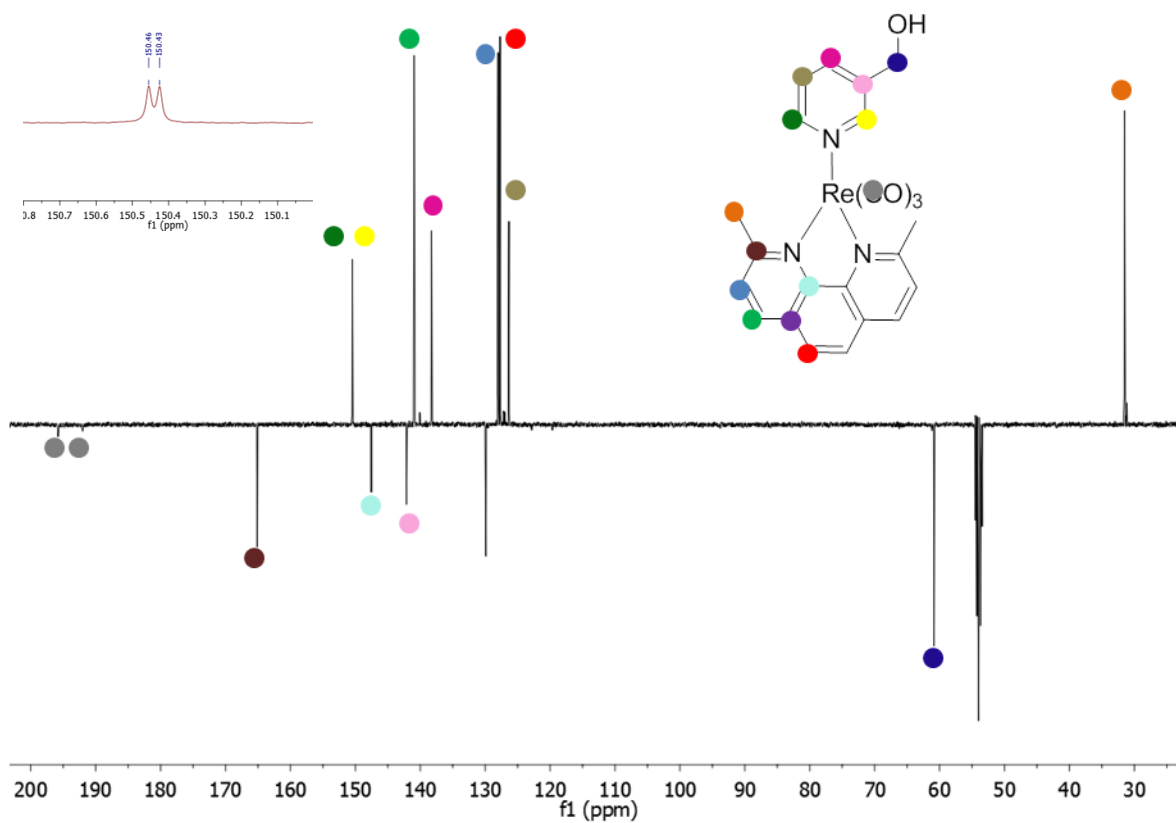


Figura 14. Espectro de H-RMN del complejo 7

Figura 15. Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  del complejo 7

En un primer intento por preparar las especies catiónicas *fac*-[Re((L2)(CO)<sub>3</sub>PyCH<sub>2</sub>OH)](BF<sub>4</sub>), **8**, y *fac*-[Re((L3)(CO)<sub>3</sub>PyCH<sub>2</sub>OH)](BF<sub>4</sub>), **9**, a partir de los compuestos **5** y **6**, respectivamente, se utilizó el mismo procedimiento que para la síntesis del compuesto **7**, pero lamentablemente no se pudieron obtener debido a la poca solubilidad en de los reactivos de partida en DCM. Por ello, para la preparación del compuesto **8**, se optó en primer lugar por utilizar tetrahidrofurano como disolvente y 5 equivalentes de 3-hidroximetilpiridina. La reacción se siguió por <sup>1</sup>H-RMN y mostró que tampoco se estaba produciendo la reacción, una vez más posiblemente debido a la baja solubilidad del compuesto **5** en THF. Por ello se decidió utilizar metanol como disolvente, obteniéndose en este caso una disolución naranja oscuro que se mantuvo agitando durante 24h a temperatura ambiente. Después de ese tiempo de reacción, se precipitó un sólido marrón con la adición de éter. Lamentablemente su análisis por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN no mostró ninguna señal característica que indicase la coordinación del derivado piridínico.

En el caso de la síntesis del compuesto **9**, se opta también por usar tetrahidrofurano como disolvente, pero esta vez calentando a 65 °C durante 24h. Tras la adición de éter se obtiene un aceite marrón oscuro el cual se desechó tras comprobar por espectroscopía de RMN de H que eran productos de descomposición.

Debido a los problemas para obtener los compuestos **8** y **9**, se propuso otra vía de síntesis que consistía en hacer reaccionar trifluorometanosulfonato de plata con 3-hidroximetilpiridina para formar una sal de plata que, tras ser aislada, se haría reaccionar directamente con las especies neutras sin activar **1**, **2** y **3**. Para comprobar su viabilidad se probó en primer lugar con el compuesto **1**, ya que por lo visto hasta ahora parece que es el más sencillo de manejar. Sin embargo, el espectro de <sup>1</sup>H-RMN no mostró la obtención del compuesto final **7**, por lo que no se siguió con este procedimiento.

#### 3.1.4. Síntesis de los derivados de cloruro de alquil-piridina de Re(I)

Para la obtención del derivado de piridina *fac*-[Re(L1)(CO)<sub>3</sub>PyCH<sub>2</sub>Cl](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), **10**, figura 16, se utilizaron 30 mg del compuesto **7**, al que se añadió gota a gota 1 ml de cloruro de tionilo, obteniéndose una disolución rojiza que se mantuvo 24 horas agitando bajo atmósfera de argón. La disolución se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota una disolución acuosa de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio mientras se agitaba vigorosamente hasta obtener un precipitado amarillo anaranjado que se filtró y lavó con agua. Por espectrometría de masas se observa el pico que corresponde con el del ion molecular lo que indica que efectivamente el compuesto deseado se ha formado. Sin embargo se necesita trabajar sobre las condiciones de reacción para obtener un rendimiento suficiente que permita aislar el producto deseado ya que como se ha observado por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN este se forma en menor porcentaje junto con producto de descomposición.

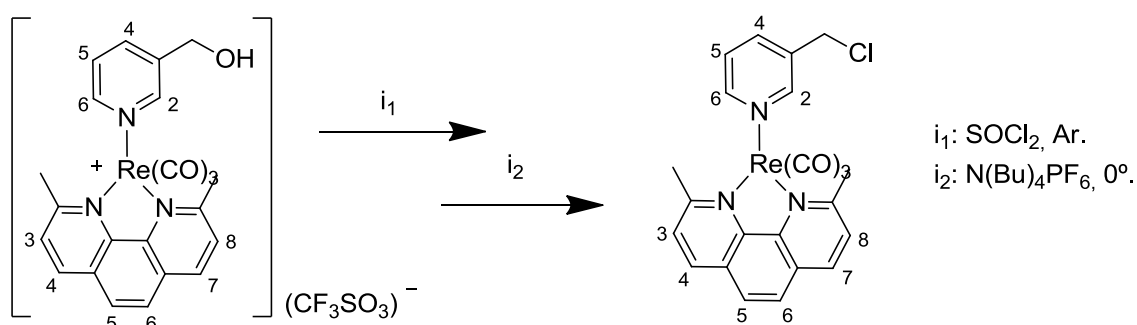


Figura 16. Vía de síntesis del compuesto **10** a partir del compuesto **7**.



### 3.2. Estudio de difracción de rayos X

Se obtuvieron monocristales del compuesto **7** adecuados para su análisis por difracción de rayos X mediante difusión lenta en diclorometano/éter. La tabla 1 muestra un resumen de los datos cristalográficos más significativos. Como era de esperar, la esfera de coordinación del metal se describe como un octaedro distorsionado donde los grupos carbonilo adoptan una distribución facial. El plano ecuatorial está formado por el ligando quelato de tipo fenantrolina y dos carbonilos, figura 17. El tercer carbonilo y el derivado de piridina ocupan el plano axial. Los ángulos y distancias de enlace seleccionados se muestran en la tabla 2. La desviación de la geometría octaédrica ideal se origina básicamente por las restricciones geométricas del ligando quelato, con ángulos quelato de  $N3-Re1-N2 = 76.1(1)$ , en lugar de los  $90^\circ$  ideales. Las distancias de enlace en el centro de renio están entre los valores típicos para compuestos similares, es decir, las distancias  $Re-C(CO)$  están entre  $1.917(4)$  Å y  $1.922(4)$  Å y  $Re-N(py)$  es  $2.208(3)$  Å.<sup>11</sup>

Tabla 1. Colección de datos para el compuesto 7.

<b>Fórmula empírica</b>	$C_{24}H_{19}N_3O_4Re^+$	<b>a (Å)</b>	18.753(4)
<b>Peso molecular</b>	588.09	<b>b (Å)</b>	12.788(3)
<b>Sistema cristalino</b>	Ortorrómbico	<b>c (Å)</b>	20.706(4)
<b>Grupo espacial</b>	Pbca	<b><math>\alpha</math> (°)</b>	90
<b>Volumen (Å<sup>3</sup>)</b>	4965.5(17)	<b><math>\beta</math> (°)</b>	90
<b>Z</b>	8	<b><math>\gamma</math> (°)</b>	90

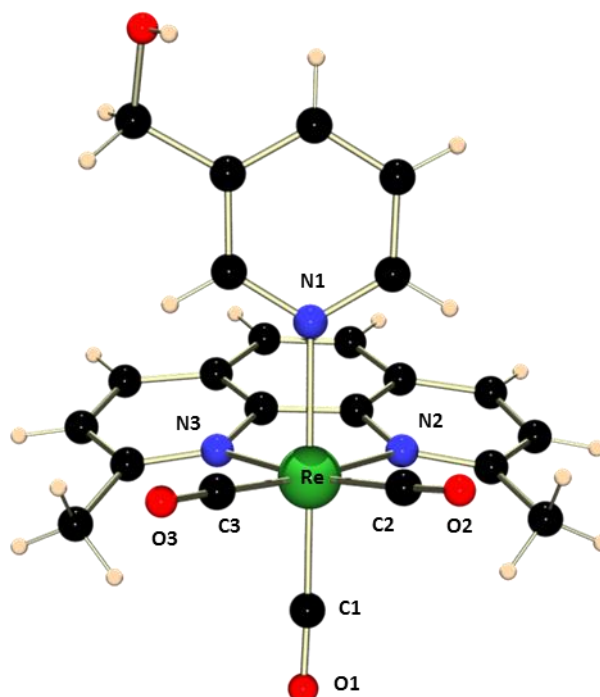


Figura 17. Representación de la estructura del compuesto 7.

Tabla 2. Distancia de enlace (Å) y ángulos (°) seleccionados.

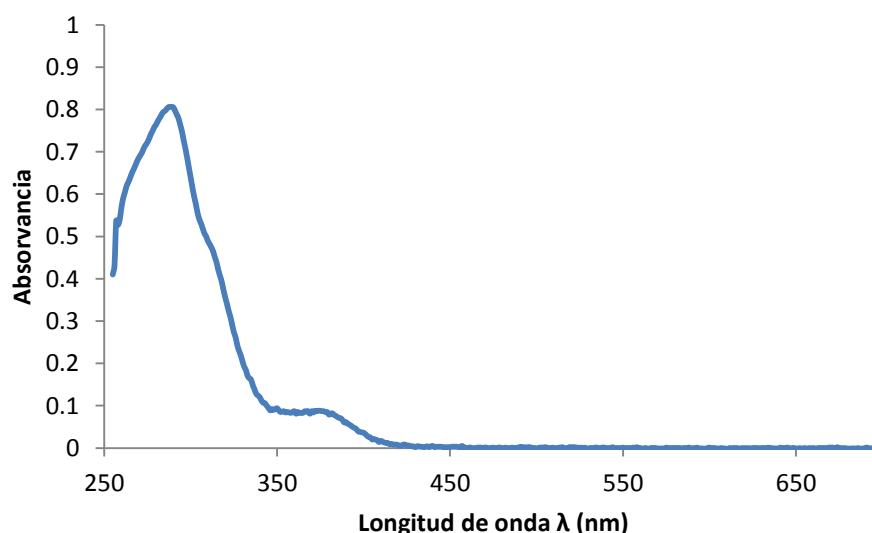
<b>Re-C(1)</b>	1.922(4)	<b>Re-N(1)</b>	2.208(3)	<b>C(1)-O(1)</b>	1.149(5)
<b>Re-C(2)</b>	1.917(4)	<b>Re-N(2)</b>	2.209(3)	<b>C(2)-O(2)</b>	1.153(5)
<b>Re-C(3)</b>	1.919(4)	<b>Re-N(3)</b>	2.189(3)	<b>C(3)-O(3)</b>	1.153(5)
<b>N(3)-Re-N(2)</b>	76.1(1)				

### 3.3. Estudio de las propiedades fotofísicas

Los espectros de absorción electrónica de los compuestos **1**, **2**, **3** y **7** se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en una disolución de dimetilsulfóxido; sus datos espectrales se resumen en la tabla 3 junto con las longitudes máximas de emisión. De acuerdo con estudios fotofísicos previos realizado en compuestos análogos de renio (I)<sup>12</sup> las bandas de absorción intensa observadas alrededor de 280 nm han sido asignadas a las transiciones intraligando (<sup>1</sup>IL)( $\pi \rightarrow \pi^*$  (derivado quelato y el ligando piridina). Por otro lado, las absorciones observadas en torno a 370 nm se corresponden con las transiciones de transferencia de carga del metal al ligando (<sup>1</sup>MLCT)( $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\text{N-N})$ ). Como ejemplo de espectro de UV-Vis se muestra el obtenido para el complejo **7**, figura 18.

Tabla 3. Asignación de las bandas de absorción y emisión.

Complejo	<sup>1</sup> IL, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	<sup>1</sup> MLCT, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	<sup>3</sup> MLCT, $\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$ ( $\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$ )
<b>1</b>	282 (19528)	370 (2575)	610 (425)
<b>2</b>	284 (13208)	368 (2292)	560 (499)
<b>3</b>	283 (21244)	372 (2488)	530 (488), 630 (422)
<b>7</b>	288 (45795)	374 (5000)	557 (400)

Figura 18. Ejemplo de espectro UV del compuesto **7**.

Espectroscopía de fluorescencia mostró una banda intensa de emisión para los complejos **1** y **7** a 610 nm y 557 nm respectivamente, mientras que el complejo **2** mostró una emisión mucho menos intensa centrada a 560 nm, figura 19. En el caso del compuesto **3** se observa una emisión en función de la longitud de onda de excitación. Así pues cuando la muestra se excita a 422 nm la emisión máxima se centra a 630 nm, mientras que se observa a 530 nm cuando la longitud de onda utilizada

es de 488nm. Estas bandas de emisión han sido asignadas a transiciones de transferencia de carga que van desde el metal al ligando ( ${}^3\text{MLCT}$ ) y específicamente al ligando quelato: ( $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\text{N-N})$ ) como sugieren estudios realizados en compuesto similares.<sup>13</sup> Por ello y como era de esperar, los diferentes sustituyentes en el anillo quelato afecta drásticamente el máximo de emisión de los compuestos lo que demuestra la posibilidad que ofrece este tipo de compuestos para modular sus propiedades fotofísicas.

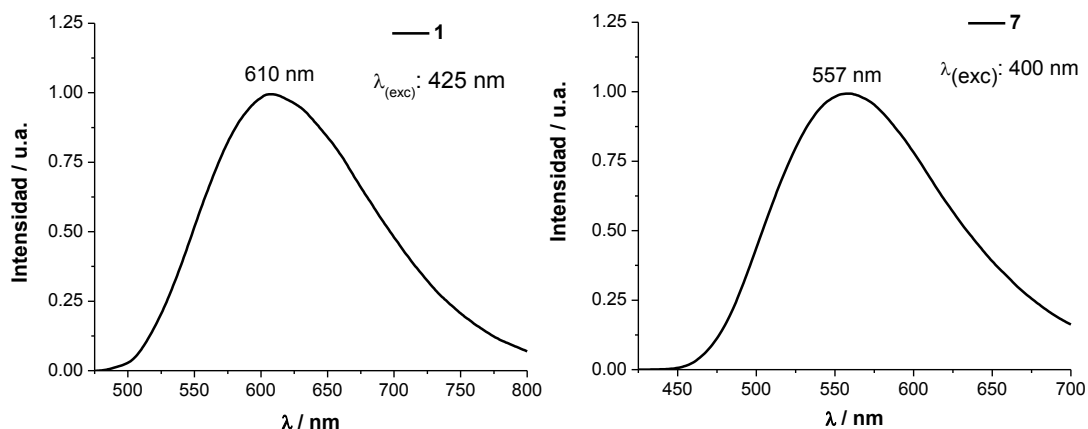


Figura 19. Espectros de emisión para los compuestos **1** y **7**.

### 3.4. Determinación de la actividad biológica

La actividad biológica se ha estudiado para el complejo compuesto **7**. Específicamente, se ha analizado su citotoxicidad utilizando el método MTT, su interacción con ADN por medio de electroforesis en un gel de agarosa y por último su comportamiento como agente de contraste en valiéndose de la técnica de microscopía de fluorescencia.

Para la determinación de la toxicidad por el método MTT, se sembraron en una placa de 96 pocillos células HeLa (adenocarcinoma de cérvix) en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 100  $\mu\text{l}$ ) y se tuvieron incubando durante 24 horas, a 37°C y con un 5% en  $\text{CO}_2$ . Se sembraron en cada pocillo aproximadamente el mismo número de células (15000 células/pocillo aproximadamente) para que fueran comparables. Por otro lado se preparó una disolución de stock 2.5 mM del compuesto **7** y a partir de ella 5 cinco disoluciones de concentraciones 2, 20, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$ . Se reservó la primera fila de la placa de 96 pocillos para el control, al cual se añadió solo medio de cultivo (100  $\mu\text{l}$ ) a las células ya incubadas. En las cinco filas siguientes a al control se añadieron las distintas disoluciones del compuesto **7** (100  $\mu\text{l}$  por pocillo) obteniéndose una concentración final igual a la mitad de la concentración añadida de compuesto a estudiar puesto que cada pozo contiene 100  $\mu\text{l}$  de medio cultivo. Por último; se añadió 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo a la séptima fila, en la cual no hay células y así se utilizó como blanco, ver figura 20. El color de los pocillos es rojizo una vez acabada de preparar el experimento es rojizo debido al rojo de fenol que contiene el DMEM. Tras 24 horas en cultivo, se visualizaron los distintos pocillos en un microscopio y se observa un cambio considerable en la morfología de las células al pasar de los pocillos que contienen 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , figura 21, lo que es una indicación de la posible muerte celular.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control				C	C	C	C	C	C	C	C
B	1	1	1	1								
C	10	10	10	10								
D	50	50	50	50								
E	100	100	100	100								
F	200	200	200	200								
G	Blanco				B	B	B	B	B	B	B	B
H												

Figura 20. Representación del experimento MTT para compuesto 7 en una placa de 96 pozos. (filas: A: Control, B-E: distintas concentraciones del compuesto 7, G: Blanco)

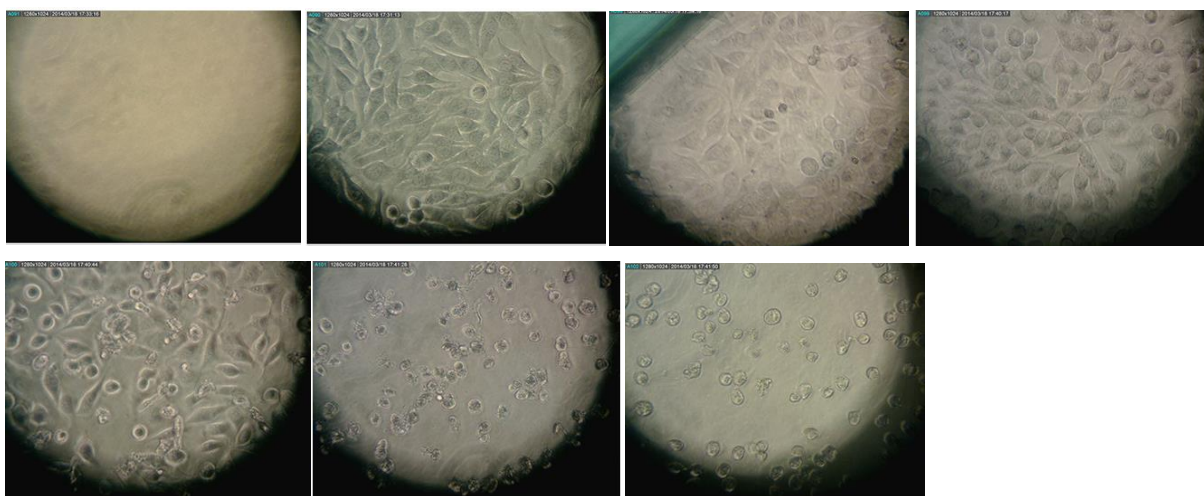


Figura 21. De arriba abajo y de izquierda a derecha: control, blanco, 1 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM

Para la confirmación de este resultado se añadió a cada pocillo MTT, Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo, se agitó la placa y se dejó incubando 2 horas adicionales. De esta forma las células que permanezcan vivas reducirán metabólicamente al MTT por medio de la encima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciendo un compuesto coloreado de color púrpura, el formazán, ver figura 22.

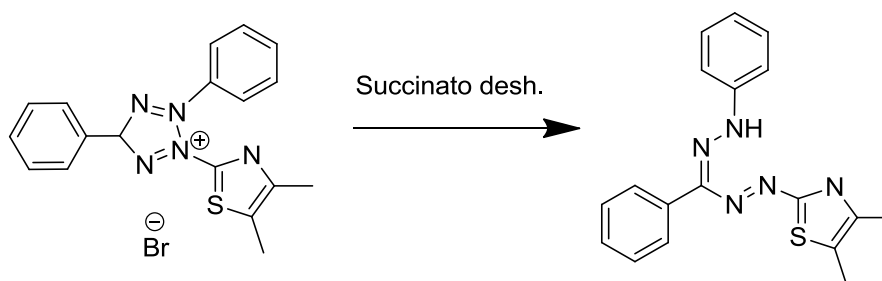
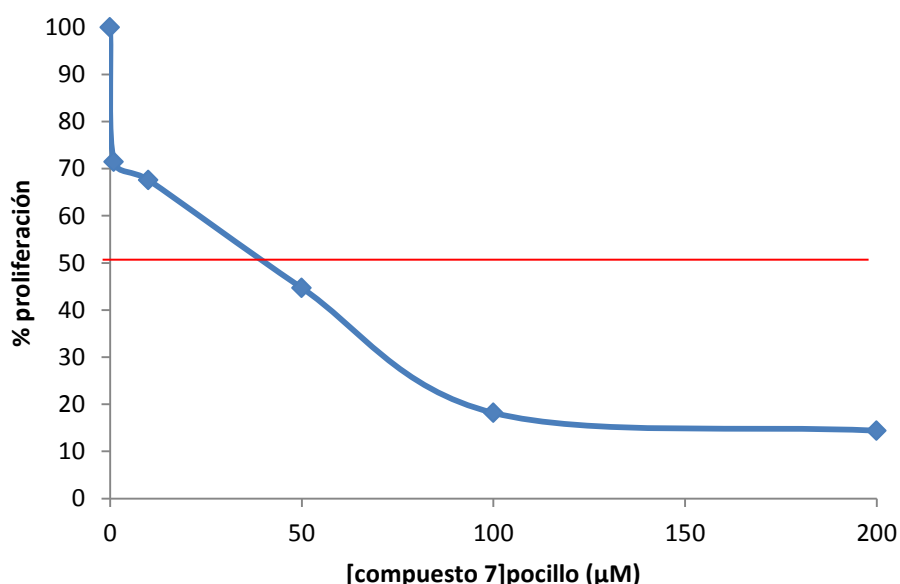


Figura 22. Reducción mitocondrial del compuesto MTT.

Tras centrifugar durante 10 minutos, se eliminó el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo DMSO a través de una pipeta multicanal. Por último, se midieron las absorbancias a 490 nm en el lector de placas, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 4. La representación del % de proliferación celular frente a la concentración del compuesto en el pocillo revela el valor del  $IC_{50}$ , es decir la concentración necesaria del compuesto **7** para inhibir el crecimiento celular en un 50%, que en este caso fue de 40  $\mu M$ , grafica 1. Así pues, 40  $\mu M$  del compuesto **7** inhibe la proliferación celular de las células HeLa en un 50 %.

Tabla 4. Resultados de absorbancia obtenidos en el estudio de citotoxicidad del compuesto **7**.

[compuesto <b>7</b> ] <sub>ependorf</sub> ( $\mu M$ )	[compuesto <b>7</b> ] <sub>pocillo</sub> ( $\mu M$ )	Absorbancia media ( $\lambda=490nm$ )	% de proliferación
0	0	0,969	100
2	1	0,692	71,4
20	10	0,655	67,6
100	50,0	0,433	44,7
200	100	0,176	18,2
400	200	0,139	14,4



Gráfica 1. Representación del  $IC_{50}$ .

Para el análisis de la interacción con DNA, se preparó un tubo tipo eppendorf estéril (A) con el vector pEYFP, que es un vector recombinante de 47000 pares de bases; otro con una mezcla del vector pEYFP y 2  $\mu l$  de compuesto **7** (C); y un último con una mezcla del vector pEYFP y 5  $\mu l$  de compuesto **7** (D). Se dejaron incubando a 37 °C y 5% de  $CO_2$  durante 3 horas y después se guardaron a 4 °C durante 12 horas.

Para preparar el gel de agarosa se calentaron 0.2 g de agarosa en 30 ml de tampón TBE, éste se encargará de mantener el pH, así como la estructura del DNA para evitar su degradación. Aproximadamente a los 10 minutos se observó como la disolución turbia pasó a ser transparente, señal de que la agarosa se había fundido totalmente. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió SYBR-safe (1:15000), lo que permitió visualizar las bandas durante la electroforesis, y se vertió sobre el soporte de geles. Se introdujo un peine de 10 pocillos y se dejó enfriar. Posteriormente se

colocó el gel en el aparato de electroforesis y se añadió TBE hasta cubrir el gel. Las muestras se prepararon añadiéndoles 4  $\mu$ l de tampón de carga SB para que se pudieran mantener dentro de sus correspondientes pocillos (C y D). Por otro lado se preparó un tubo (E) con 2  $\mu$ l de marcadores de peso molecular, el marcador HindIII, mezclados con 4  $\mu$ l de tampón de carga y 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se cargó el control (A), las muestras (C y D) y el marcador (D) en cada pocillo y se conectó a la fuente para realizar la separación a 90 V, 400 mA, durante 90 minutos, ver figura 20.

La matriz de agarosa funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. Si el compuesto de estudio se une al vector, se producirá una menor migración. Los geles se visualizaron en un transiluminador para observar la migración de cada banda. Se observó como la banda de ambas combinaciones de vector y compuesto **7** están en línea con la del vector solo, por lo que no se produjo unión al DNA, ver figura 23.

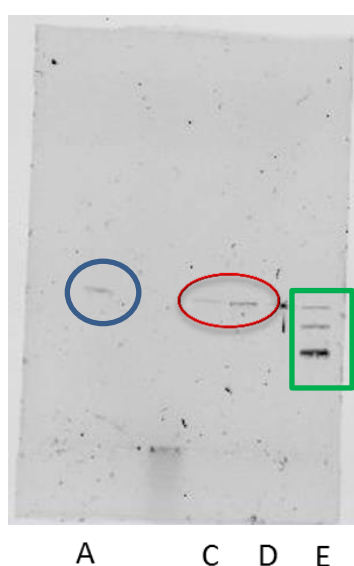


Figura 23. Imagen del gel proporcionada por el transiluminador. En azul se muestra el control (A), en rojo las dos muestras (2  $\mu$ l (C) y 5  $\mu$ l(D)) y en verde el marcador de pesos moleculares.

Por último, se realizó un experimento de colocalización para analizar la posible acumulación del compuesto **7** en las células HeLa. Para ello se marcaron los núcleos con el colorante comercial Hoechst 33342. Se sembró una placa de 6 pocillos con células HeLa sobre un cubreobjetos. Tras la incubación, se dejó un pocillo de control (solo DMEM) y en otro se añadieron 4  $\mu$ l del compuesto **7** (75  $\mu$ M). Tras 24 horas se recuperaron los cubre con ayuda de unas pinzas y se dejaron secando sobre papel con la células orientadas hacia el exterior. Tras esto, se añadió el colorante permeable a las membranas celulares Hoechst 33342, figura 24. Por su capacidad de tinción de ADN se emplea para visualizar núcleos excitándolo mediante luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm y emitiendo fluorescencia azul/cían con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm.

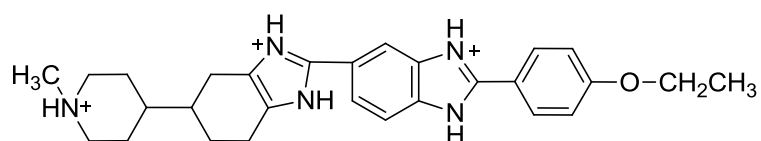


Figura 24. Hoechst 33342

Se colocó el cubreobjetos con las células en dirección hacia el colorante y se dejó incubar durante una hora. Las células incubadas se visualizaron por medio de un microscopio de fluorescencia, ver figura 25. Se observa que el colorante Hoechst 33342 ha teñido los núcleos de azul, como era de esperar. Además es evidente una coloración amarilla difundida por el citoplasma que sería debida al compuesto **7** lo que implica que el compuesto **7** ha penetrado en la célula. Así mismo, el compuesto **7** parece tener especificidad por algún orgánulo del citoplasma ya que la tinción no es homogénea y existen puntos en los que ese color amarillo es más intenso. Por similitud con otros ejemplos encontrados en la bibliografía, ese patrón granular podría indicar que los orgánulos de acumulación serían las mitocondrias.<sup>14</sup> Lamentablemente se necesita un estudio más en profundidad para poder asegurar esto, por ejemplo experimentos de co-localización específicos para mitocondria.

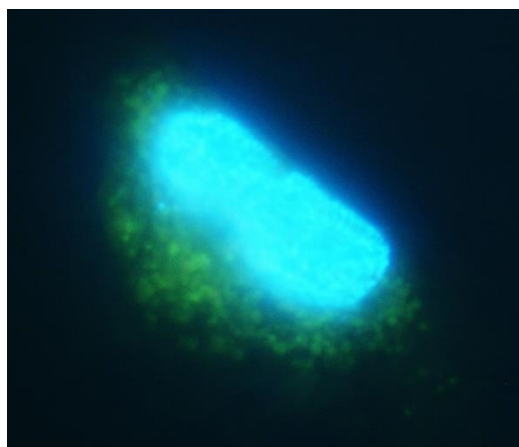


Figura 25. Imagen tomada mediante microscopía de fluorescencia del experimento de colocalización del compuesto **7** y hoechst.

## 4. Parte experimental

### 4.1. Información general

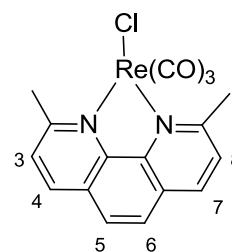
Los espectros de RMN se han realizado a 298 K en un espectrómetro Bruker Advance 400 MHz y los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) se han dado utilizando como referencia los picos residuales del respectivo disolvente deuterado en cada caso (cloroformo, acetonitrilo, DMSO, diclorometano). Los estudios de emisión y excitación se realizaron en un espectrofotómetro Jobin-Yvon-Horiba fluorolog FL3-11 a 298 K y los espectros de absorción se realizaron en espectrofotómetro Evolution 600 utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR en el rango 4000 – 250  $\text{cm}^{-1}$ . El análisis de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Bruker Esquire 300 Plus, utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI). Los estudios de la actividad biológica se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Se utilizó una estufa Jouan IG50 para los cultivos celulares, que se mantuvo a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ , y una centrífuga B3.11 de la misma marca. Las placas se visualizaron en un lector de placas Bio-tek Instrument inc. EL800 Universal Microplate Reader, los geles de agarosa en un transiluminador Bio-rad mediante el software *quantity one* y los núcleos celulares en un microscopio de fluorescencia directo Nikon Eclipse50i con un total de 1000 aumentos. Por último, las fotos se realizaron con una cámara Nikon digital Dxm1200F conectada al microscopio de fluorescencia.

### 4.2. Síntesis de complejos de renio:

#### 4.2.1. Especies neutras de Re(I)

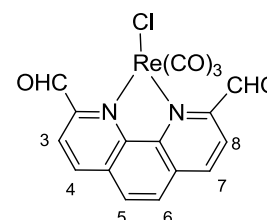
##### *fac*-Re(L1)(CO)<sub>3</sub>Cl (**1**)<sup>9</sup>

Re(CO)<sub>5</sub>Cl (101 mg, 0.28 mmol) y un exceso 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (64 mg, 0.31 mmol) se calentaron a reflujo en tolueno seco (10 ml) durante 1 hora en atmósfera de argón. El precipitado formado se filtró y lavó con tolueno, obteniéndose el complejo **1** como un sólido amarillo (125 mg, 87%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, cloroformo-*d*)  $\delta$  8.34 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH(4, 7)), 7.86 (s, 2H, CH(5, 6)), 7.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH(3, 8)), 3.35 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).  $\nu_{\text{max}}$  2016, 1880, 1853 (CO).



##### *fac*-Re(L2)(CO)<sub>3</sub>Cl (**2**)

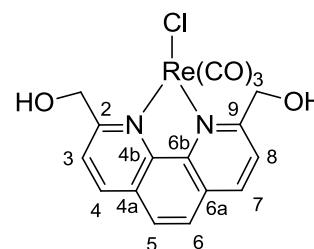
El complejo **2** fue sintetizado siguiendo un proceso similar al utilizado en el caso del complejo **1** pero utilizando 1,10-fenantrolina-2,9-dicarbaldehído (72 mg, 0.30 mmol) en lugar de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina. *fac*-Re(1,10-fenantrolina)(CO)<sub>3</sub>Cl se obtuvo como sólido rojizo (151 mg, 97%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>)  $\delta$  10.90 (d,  $J = 0.8$  Hz, 2H, CHO), 8.93 (dd,  $J = 8.3, 0.8$  Hz, 2H, CH(4, 7)), 8.41 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH(3, 8)), 8.27 (s, 2H, CH(5, 6)).  $\nu_{\text{max}}$  2020, 1888 (CO). Masas ESI: [M+Na]<sup>+</sup> 564.96. La baja solubilidad de este compuesto impidió la obtención del espectro de <sup>13</sup>C-RMN



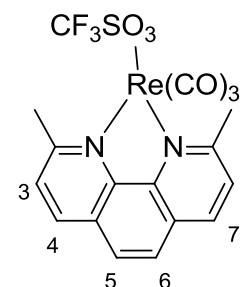


*fac*-Re(L3)(CO)<sub>3</sub>Cl (**3**)

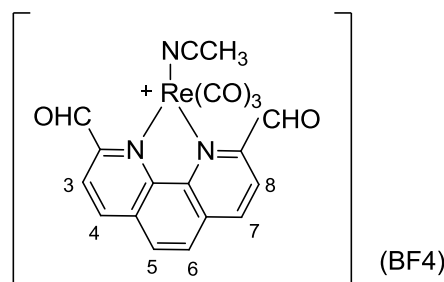
El complejo **3** fue sintetizado siguiendo un proceso similar al utilizado en el caso del complejo **1** pero partiendo de Re(CO)<sub>5</sub>Cl (150 mg, 0.41 mmol) y utilizando 1,10-fenantrolina-2,9-dimetanol (95 mg, 0.46 mmol) en lugar de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina. Finalmente el complejo **3** se obtuvo como sólido amarillo (151 mg, 97%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH(4, 7)), 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH(3, 10)), 8.24 (s, 2H, CH(5, 6)), 6.40 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OH), 5.20 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (DMSO) δ 197.0 (CO<sub>ec</sub>), 188.1 (CO<sub>ax</sub>), 166.0 (C(2, 9)), 147.0 (C(4b, 6b)), 140.0 (C(4, 7)), 129.4 (C(4a, 6a)), 127.2 (C(5, 6)), 123.0 (C(3, 8)), 68 (C(CH<sub>2</sub>)). ν<sub>max</sub> 2018, 1881 (CO). Masas ESI: [M+Na]<sup>+</sup> 568.99.

**4.2.2. Especies activadas:***fac*-[Re(L1)(CO)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (**4**)

Ácido trifluorometansulfónico (0.27 ml, 3 mmol) se añadió vía cánula a una disolución del complejo **1** (146 mg, 0.29 mmol) en diclorometano seco (30 ml) bajo atmósfera de argón y agitación vigorosa. Tras 45 minutos de reacción, se añadió éter gota a gota por medio de un embudo de adición a la mezcla de reacción manteniendo la agitación y la corriente de argón. El sólido amarillo precipitado se filtró y lavó con éter (107 mg, 60% rendimiento). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Diclorometano-*d*<sub>2</sub>) δ 8.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(4, 7)), 7.98 (s, 2H, CH(5, 6)), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(3, 8)), 3.38 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). ν<sub>max</sub> 2026, 1930, 1894 (CO).

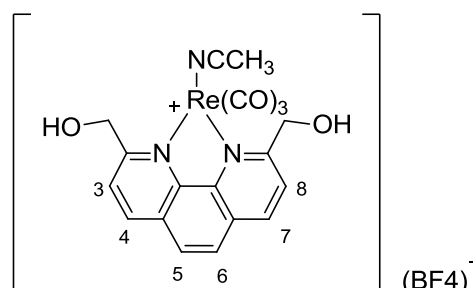
*fac*-[Re(L2)(CO)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>CN](BF<sub>4</sub>) (**5**)

El complejo **2** (150 mg, 0.28 mmol) y tetrafluoroborato de plata (59 mg, 0.3 mmol) se disolvieron en acetonitrilo (30 ml) y se calentaron a 60 °C bajo una atmósfera de argón, con agitación contante y en ausencia de luz. Después de 48 h, la mezcla de reacción dejó enfriar y a continuación se filtró sobre tierra de diatomeas para eliminar el AgCl formado. Finalmente el disolvente se eliminó a vacío obteniéndose un aceite amarillo que se redisolvió en una pequeña cantidad de acetonitrilo y se volvió a filtrar sobre tierra de diatomeas para asegurar que se elimina todo el AgCl. Este procedimiento se repitió una tercera vez. Por último se añadió éter para forzar la precipitación de complejo **5** como sólido anaranjado (60 mg, 35%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>) δ 10.81 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H, CHO), 9.05 (dd, *J* = 8.4, 0.7 Hz, 2H, CH(4, 7)), 8.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH(3,8)), 8.36 (s, 2H, CH(5, 6)). ν<sub>max</sub> 2037, 1913 (CO).

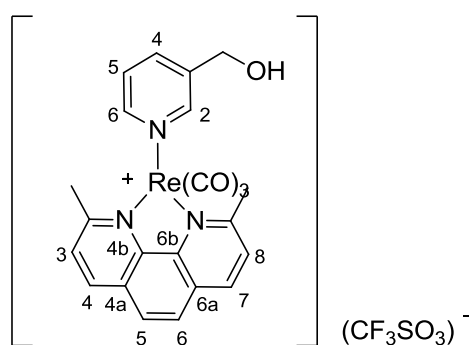


*fac*-[Re(L3)(CO)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>CN](BF<sub>4</sub>) (**6**)

El complejo **6** fue sintetizado siguiendo un proceso similar al utilizado en el caso del complejo **5**. Finalmente se obtuvo **6** como un sólido amarillo (118 mg, 65%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-d<sub>3</sub>) δ 8.80 (d, J = 8.6 Hz, 2H, CH(4, 7)), 8.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H, CH(3, 8)), 8.16 (s, 2H, CH(5, 6)), 5.32 (d, J = 5.4 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OH), 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). ν<sub>max</sub> 2030, 1932 (CO).

**4.2.3. Especie catiónica:***fac*-[Re(L1)(CO)<sub>3</sub>PyCH<sub>2</sub>OH](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**7**)

*fac*-[Re(2, 9-dimetil-1, 10-fenantrolina)(CO)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>CN](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (90 mg, 0.14 mmol) y un exceso de 3-hidroximetilpiridina (15 μl, 1.6 mmol) se agitaron en diclorometano seco (35 ml) a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón durante 24 horas. Se eliminó parte del disolvente a vacío y, por último, se añadió éter para forzar la precipitación del sólido rojizo final (77 mg, 73% de rendimiento). <sup>1</sup>H-Rmn (400 MHz, diclorometano-d<sub>2</sub>) δ 8.54 (d, J = 8.3 Hz, 2H, CH(4, 7)), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH(3, 8)), 7.92 (s, 2H, CH(5 Y 6)), 7.66 (d, J=8.8 Hz, 2H, CH(2, 6)py), 7.56 (d, J=7.6 Hz, 1H, CH(4)py), 7.02 (dd, J = 8.1, 5.8 Hz, 1H, CH(5)py), 4.35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.38 (s, 6H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (diclorometano-d<sub>2</sub>) δ 196 (CO<sub>ec</sub>), 192 (CO<sub>ax</sub>), 165 (C(2, 9)), 150 (C(2, 6)Py), 147 (C(4b, 6b)), 142 (C(3)Py), 140 C(4, 7), 138 (C(4)Py), 129 (4a, 6a), 128 (C(3, 8)), 127 (C(5, 6), 126 (C(5)Py), 60 (CH<sub>2</sub>), 31 (CH<sub>3</sub>). ν<sub>max</sub> 2027, 1912 (CO).

**4.3. Actividad biológica****4.3.1. Determinación de la toxicidad: Test MTT**

Se sembraron 6 filas y 4 columnas de pocillos de fondo plano con células HeLa y 100 μl de medio de cultivo DMEM y se dejaron incubando durante 24 horas. Se prepararon 5 disoluciones de distinta concentración (2, 20, 100, 200 y 400 μM) del compuesto **7** a partir de una de concentración Stock (2.5 mM). Se añadieron, todo por cuatuplicado, 100 μl de medio de cultivo a la primera fila, fila de control; 100 μl de cada una de las cinco disoluciones en las filas siguientes; y 200 μl de medio de cultivo a la séptima fila, fila de blanco. Esta placa se mantuvo en cultivo durante 24 horas. Luego se añadió a cada pocillo 10 μl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (5 mg/ml), se agitó la placa y se dejó incubando 2 horas hasta que se observaron los cristales de azul formazán. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm, se eliminó el medio de cultivo por inversión sobre un papel, se añadieron a cada pocillo 100 μl de DMSO y se agitó. Finalmente se midió la absorbancia a 490 nm en el lector de placas.

#### **4.3.2. Análisis de la unión al DNA**

Se preparan en un tubo tipo eppendorf estéril 10  $\mu$ l de vector pEYFP (20  $\mu$ g/ml); en otro 10  $\mu$ l de vector pEYFP con 2  $\mu$ l de compuesto **7**; y en un tercero 10  $\mu$ l de vector pEYFP y 5  $\mu$ l de compuesto **7**. Se dejan incubando a 37 °C durante 3 horas y después se guardan a 4 °C 24h.

Para preparar el gel de agarosa se funden 0.2 g de agarosa en 30 ml de tampón TBE. Se atempera la agarosa, se añade SYBR-safe (1:15000; 2  $\mu$ l) y se vierte sobre el soporte de geles. Se introduce un peine de 10 pocillos y se deja enfriar. Posteriormente se coloca en el aparato de electroforesis, se añade TBE para cubrir el gel. Las muestras se preparan añadiéndoles 4  $\mu$ l de tampón de carga SB. Por otro lado se prepara un tubo eppendorf con 2  $\mu$ l de marcadores de peso molecular L/HindIII, mezclados con 4  $\mu$ l de tampón de carga y 8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se carga cada muestra y el marcador en diferentes pocillos y se conecta a la fuente para realizar la separación a 90 V, 400 mA, durante 90 minutos. Los geles se visualizan en un transiluminador.

#### **4.3.3. Marcaje y visualización de núcleos**

En una placa de 12 pocillos previamente sembrada con células HeLa sobre un cubreobjetos, se introducen 4  $\mu$ l del compuesto **7** (75  $\mu$ M). Se deja un pocillo control al cual no se añade compuesto **7**. Tras 24 horas, se recupera el cubreobjetos donde se había depositado el compuesto **7** con pinzas y se deja secando sobre papel de filtro con las células hacia arriba. Después se añade una gota de Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/l) en Fluoromount-G sobre un portaobjetos y se coloca sobre él el portaobjetos con las células hacia abajo. Se deja incubando a temperatura ambiente durante 1 hora y se visualiza en el microscopio de fluorescencia.

## 5. Conclusions

**A.** This work presents a series of Re(I) complexes of the type  $fac-[Re(NN)(CO)_3L]^{n+}$  where NN represents a phenantroline derivative and L is either pyridine derivative or acetonitrile ( $n = 1$ ) or either a chloride or a triflate ( $n = 0$ ). Specifically, the synthesised complexes are:

*The neutral species:*  $fac-[Re(2, 9-(Me)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  (**1**),  $fac-[Re(2, 9-(CHO)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  (**2**),  $fac-[Re(2, 9-(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3Cl]$  (**3**).

*The activated species:*  $fac-[Re(2, 9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(CF_3SO_3)]$  (**4**),  $fac-[Re(2, 9-(CHO)_2-Phen)(CO)_3(CH_3CN)](BF_4)$  (**5**),  $fac-[Re(2, 9-(CH_2OH)_2-Phen)(CO)_3(CH_3CN)](BF_4)$  (**6**).

*The cationic species:*  $fac-[Re(2, 9-(Me)_2-Phen)(CO)_3(3-CH_2OH-Py)](CF_3SO_3)$  (**7**)

All of them have been fully characterized by IR,  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR spectroscopy, except for those species, complex **2**, whose low solubility in the solvent of the analysis did not allow to observe the C signal in the  $^{13}C$ -NMR spectrum. Moreover, bidimensional HSQC and COSY spectroscopy was also performed to assure the correct assignments of the H and C signals. Further analytical data provided by mass spectrometry and, in the particular case of complex **7** x-ray diffraction, corroborate the success of the synthesis.

**B.** The photophysical properties of complexes neutral species **1**, **2** and **3** as well as the cationic species complex **7** has been studied by UV visible and fluorescence spectroscopy. UV-absorption revealed that all the species showed a similar behavior which is in concordance with the typical absorption profile for these type of Re(I) species, i.e. an intense band at c.a. 283 nm assigned to  $IL(\pi \rightarrow \pi^*)$  transitions within the Py and Phen ligand and a less intense broad band at c.a. 370 nm assigned to a  $^1MLCT$  transition. Furthermore, fluorescence spectroscopy showed an intense emission band for complexes **1** and **7** at 610 nm and 557 nm respectively, whereas complexes **2** displayed a much less intense band at 560 nm. In the case of complexes **3**, the also less intense emission observed varies from 530 nm to 630 nm depending on the excitation wavelength applied. As expected the different substituents in the chelate ligand affects drastically the emission maxima of the complexes, which demonstrate the possibility of tuning the luminescence by tailoring the chelate ligand. All of them could be assigned to a  $^3MLCT$  transition.

**C.** Bioactivity studies were performed for the cationic species complex **7**. Cytotoxic studies were performed in HeLa cell by an MTT analysis and it showed that complex **7** have an  $IC_{50}$  value of  $40\mu M$ . Further DNA interaction analysis was carried out by an electrophoresis experiment suggesting that complex **7** does not interact with the DNA. This result might indicate that the nucleus would not be the expected biological target for this complex. Moreover, fluorescent cell microscopy was used to assess the suitability of this complex as a contrast agent. A colocalization experiment in HeLa cells using complex **7** and the commercially available nuclear selective dye Hoechst 33342, pointed out that the novel complex enters the cell and it is possibly accumulated in the mitochondria.

**D.** Although more studies are needed to probe these family of Re(I) complexes as cell contrast agents, there is no doubt that they have great potential in the cell imaging field. A possible way to proceed is to compare the effect of grafting methylchloride groups in the chelate ligand and in the axial pyridine derivative in order to tune the bioactivity and luminescent properties to obtain the desired target.

## 6. Conclusiones

**A.** Este trabajo presenta la síntesis de una serie de complejos de Re (I) del tipo  $\text{fac}[\text{Re}(\text{NN})(\text{CO})_3\text{L}]^{n+}$  donde NN representa un derivado de fenantrolina y L es o bien derivado de piridina o acetonitrilo ( $n=1$ ) o bien un cloruro o un triflato ( $n=0$ ). Específicamente, los complejos sintetizados son:

*Las especies neutras:*  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{Me})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3\text{Cl}]$  (**1**),  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{CHO})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3\text{Cl}]$  (**2**) y  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3\text{Cl}]$  (**3**).

*Las especies activadas:*  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{Me})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$  (**4**),  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{CHO})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})](\text{BF}_4)$  (**5**) y  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{CH}_2\text{OH})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})](\text{BF}_4)$  (**6**).

*La especie catiónica:*  $\text{fac}[\text{Re}(2,9(\text{Me})_2\text{-Phen})(\text{CO})_3(3\text{-CH}_2\text{OH-Py})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  (**7**).

Todos ellos han sido completamente caracterizados por IR y espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, excepto la especie, complejo **2**, cuya baja solubilidad en el disolvente del análisis no permitió observar las señales de C en el espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR. Por otra parte, también se realizó espectroscopía bidimensional HSQC y COSY para asegurar las asignaciones correctas de las señales de H y C. Los datos analíticos proporcionados por espectrometría de masas y, en el caso particular de complejo **7**, de difracción de rayos X, corroboran el éxito de las síntesis.

**B.** Las propiedades fotofísicas de los complejos de especies neutras **1**, **2** y **3** así como de la especie catiónica **7** han sido estudiadas por espectroscopía de fluorescencia y visible-UV. El experimento de absorción UV reveló que todas las especies mostraban un comportamiento similar que está en concordancia con el perfil de absorción típico de este tipo de especies de Re(I), es decir, una banda intensa en c.a. 283 nm asignada a transiciones  $\text{IL}(\pi \rightarrow \pi^*)$  de los ligandos Py y Phen y una banda ancha menos intensa en c.a. 370 nm asignada a una transición  $^1\text{MLCT}$ . Por otra parte, la espectroscopía de fluorescencia mostró una banda de emisión intensa para los complejos **1** y **7** a 610 nm y 557 nm, respectivamente, mientras que el complejo **2** muestra una banda mucho menos intensa a 560 nm. En el caso del complejo **3**, también se observa una emisión poco intensa que varía de 530 nm a 630 nm en función de la longitud de onda de excitación aplicada. Como era de esperar, los diferentes sustituyentes en el ligando quelato afectan drásticamente a los máximos de emisión de los complejos, lo que demuestra la posibilidad de afinar la luminiscencia mediante la adaptación del ligando quelato. Todos ellos podrían ser asignados a una transición  $^3\text{MLCT}$ .

**C.** Se realizaron estudios de bioactividad del compuesto catiónico **7**. Los estudios de citotoxicidad se realizaron en células HeLa mediante un análisis MTT, que mostró que el complejo **7** tiene un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 40  $\mu\text{M}$ . Además, el análisis de la interacción con ADN se llevó a cabo por electroforesis y sugiere que el complejo **7** no interacciona con este. Este resultado podría indicar que el núcleo no sería el objetivo biológico esperado para este complejo. Además, se utilizó la microscopía de fluorescencia en células para evaluar la idoneidad de este complejo como un agente de contraste. Se realizó un experimento de colocalización en células HeLa utilizando el complejo **7** y un colorante comercial que se acumula selectivamente en el núcleo, Hoechst 33342, mostrando que el nuevo complejo entra en la célula y se acumula posiblemente en la mitocondria.

**D.** Aunque se necesitan más estudios para investigar esta familia de complejos de Re(I) como agentes de contraste celular, no hay duda de que tienen un gran potencial en el campo de la imagen celular. Un posible camino a seguir sería comparar el efecto que tendrían los grupos clorometilo insertados en el ligando quelato y en el ligando axial, buscando así la modular la bioactividad y obtener una mayor luminiscencia.

## Referencias

- <sup>1</sup> (a) M. P. Coogan, V. Fernández-Moreira; *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 384; (b) J.-C. G. Bunzli and S. V. Eliseeva, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 1939; (c) (b) E. Baggaley, J. A. Weinstein, J. A. G. Williams, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 1762;
- <sup>2</sup> Time gating techniques: se excita el fluoróforo y se espera un tiempo antes de recoger la señal de la emisión.
- <sup>3</sup> Autofluorescencia: emisión desde fluoróforos endógenos a la muestra de estudio como por ejemplo, ADN, NADPH.
- <sup>4</sup> Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. J. R. Lakowicz, Springer, New York, **2006**.
- <sup>5</sup> Las transiciones electrónicas prohibidas son aquellas entre las que hay un cambio de spin.
- <sup>6</sup> (a) C. A. Puckett, R. J. Ernst and J. K. Barton, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 1159; (b) M. Yu, Q. Zhao, L. Shi, F. Li, Z. Zhou, H. Yang, T. Yia, C. Huanga, *Chem. Commun.*, **2008**, 2115; (c) A. J. Amoroso; M. I. P. Coogan; J. E. Dunne; V. Fernández-Moreira; J. B. Hess; A. J. Hayes; D. Lloyd; C. Millet; S. J. A. Pope; C. Williams. *Chem. Commun.*, **2007**, 3066
- <sup>7</sup> A. J. Amoroso, R. J. Arthur, M. P. Coogan, J. B. Court, V. Fernández-Moreira, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. Millet, S. J. A. Pope, *New J. Chem.*, **2008**, 32, 1097
- <sup>8</sup> Fernández-Moreira, V.; Thorp-Greenwood, F. L.; Amoroso, A. J.; Cable, J.; Court, J. B.; Gray, V.; Hayes, A. J.; Jenkins, R. L.; Kiriuki, B. M.; Lloyd, D.; Millet, C. O.; Williams, C. F.; Coogan, M. P. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3888.
- <sup>9</sup> A. Juris, S. Campagna, I. Bidd, J.-M. Lehn Ray, R. Ziesseli, *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 4007.
- <sup>10</sup> Y. Wang, L. A. Lucia, K. S. Schanze, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 1961.
- <sup>11</sup> S.-H. Wu, H. D. Abruña, Y.-W. Zhong, *Organometallics*, **2012**, 31, 1161. (b) E. Gómez, M. A. Huertos, J. Pérez, L. Riera, A. Menéndez-Velazquez, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 9527.)
- <sup>12</sup> B. J. Coe, N. R. M. Curati, E. C. Fitzgerald, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light, M. B. Hursthouse, *Organometallics*, **2007**, 26, 2318.
- <sup>13</sup> Sacksteder, L. A.; Lee, M.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8230; (b) M. P. Coogan, V. Fernández-Moreira, J. B. Hess, S. J. A. Pope, C. Williams, *New J. Chem.*, **2009**, 33, 1094.
- <sup>14</sup> K. Y. Zhang, K. K.-S. Tso, M.-W. Louie, H.-W. Liu, K. K.-W. Lo, *Organometallics*, **2013**, 32, 5098; (b) T. S. Pitchumony, L. Banevicius, N. Janzen, J. Zubieta and J. F. Valliant, *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 13521. (c) V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Science*, **2014**, DOI: 10.1039/C4SC01684J.)