



Universidad
Zaragoza

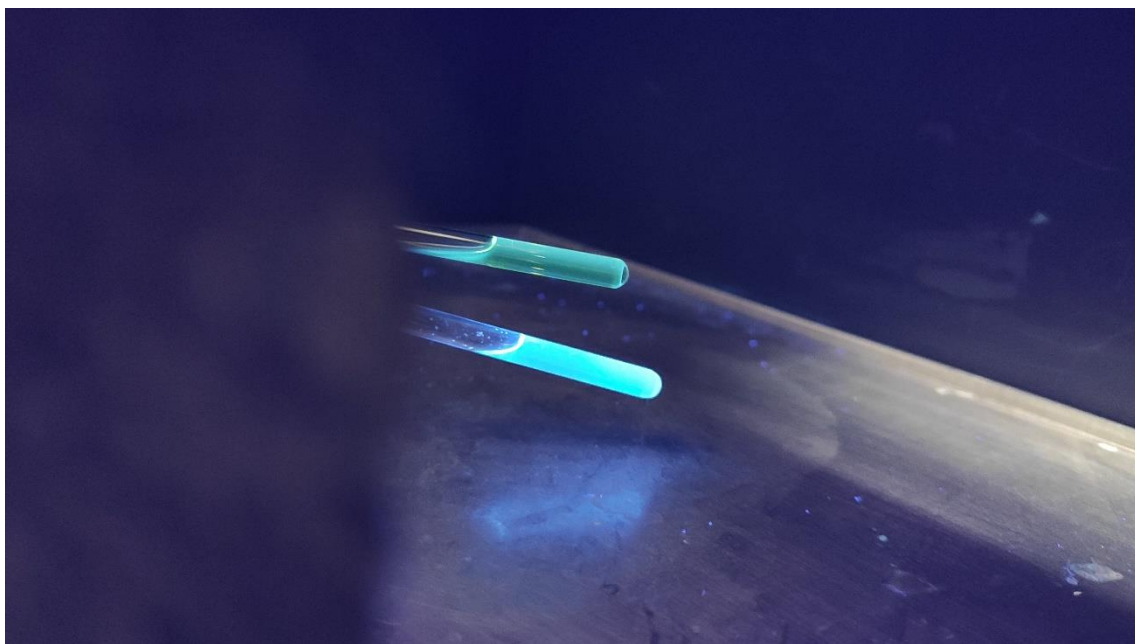


Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO
DE FIN
DE
GRADO
2021

COMPUESTOS METÁLICOS BIFUNCIONALES PARA TERAPIA FOTODINÁMICA Y BIOIMAGEN

Miriam Miñana Longares



DIRECTORA: Vanesa Fernández Moreira

Departamento de Química Inorgánica

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Vanesa Fernández, por su dedicación, consejos y enseñanza durante estos meses; por permitir que me incorporase a su investigación y conseguir que disfrutase aprendiendo y trabajando en un laboratorio químico como nunca lo había hecho.

A todo el equipo de investigación por la ayuda prestada y la acogida que me dieron; y a Marta Redrado en particular, por ser mi segunda profesora.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
3.1. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS	8
3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS	11
3.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS	13
3.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	16
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
4.1. INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES.....	20
4.2. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	20
SÍNTESIS DEL COMPUESTO D:	20
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₁ :	21
SÍNTESIS DEL COMPLEJO C ₁ :	22
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₂ :	22
SÍNTESIS DEL COMPLEJO C ₂ :	23
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₃ :	24
SÍNTESIS DEL COMPUESTO C ₃ :	24
SÍNTESIS DEL COMPUESTO L ₄ :	25
SÍNTESIS DEL COMPUESTO C ₄ :	26
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28
7. ANEXOS.....	29

ABREVIATURAS

<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>DMF</i>	N,N-dimetilformamida
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>IC</i>	Inhibitory concentration
<i>IR</i>	Infrarrojo
<i>LC</i>	Ligand Center
<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>PDT</i>	Photodynamic therapy
<i>PSs</i>	Photosensitizers
<i>ppy</i>	2-fenilpiridina
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species
<i>UV-vis</i>	Ultravioleta-visible

RESUMEN

Con el objetivo de aumentar el campo de fármacos que aúnan en una misma molécula las funciones de agentes de visualización y agentes terapéuticos, se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de compuestos catiónicos de iridio (III) de tipo $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, donde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ representa un ligando N-dador polidentado derivado de 2-(2-piridil)benzimidazol o 2-(4-tiazolil)benzimidazol que se ha funcionalizado con grupo cromóforo orgánico. Se han elegido concretamente estos derivados nitrogenados por dos razones, su coordinación al centro metálico de iridio se prevé que sea robusta y ofrecen la posibilidad de ser desprotonados para su posterior funcionalización con el grupo cromóforo deseado.

Concretamente, se ha detallado la síntesis y caracterización de cuatro ligandos $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ y sus correspondientes complejos de iridio (III). Posteriormente, se han estudiado las propiedades fotofísicas de los complejos por espectrometría de UV-vis y de fluorescencia para evaluar su posible uso como agentes de visualización en microscopía de fluorescencia. También se han llevado a cabo estudios biológicos de citotoxicidad de los complejos en presencia y ausencia de radiación para estudiar su valía como fármacos en terapia fotodinámica. Del mismo modo se han llevado a cabo estudios de biodistribución haciendo uso de la microscopía de fluorescencia confocal que demuestra su internalización en la célula y su distribución por distintos orgánulos del citoplasma sin llegar a permear el núcleo. Los resultados muestran que los complejos son altamente citotóxicos y únicamente el compuesto conteniendo 2-(4-tiazolil)benzimidazol funcionalizado con un grupo fenilo presenta un comportamiento prometedor para su uso como fármaco en PDT y como agente de visualización en microscopía de fluorescencia. El resto de los compuestos podrían ser considerados como agentes quimioterapéuticos y de imagen.

ABSTRACT

The aim of this paper is to increase the amount of drugs that combine the functions of bioimaging and therapy in the same molecule. Therefore, the synthesis of a series of cationic iridium compounds of the type $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, where $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ represents a polydentate N-donor derivative that contains an organic chromophore in its structure, has been carried out. Specifically, 2-(2-pyridyl)benzimidazole and 2-(4-tiazolyl)benzimidazole have been selected as $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand because of the high coordinative strength to Ir(III) center and the possibility of further functionalization upon deprotonation.

Thus, the synthetic procedure and characterization of four $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligands and their correspondent iridium (III) complexes was described. Thereafter, photophysical properties of the complexes have been studied by UV-vis and fluorescence spectrometry to evaluate their possible use as imaging agents in fluorescence microscopy. Moreover, biological cytotoxicity assays of the complexes in the presence and absence of radiation have also been carried out to study their suitability as photosensitisers in photodynamic therapy. Additionally, their biodistribution was assessed by confocal fluorescence microscopy. The results show that the complexes are highly cytotoxic and they could be used in chemotherapy as well as in bioimaging. Regarding their suitability as PDT agents, only the Ir(III) complex containing a 2-(4-tiazolyl)benzimidazole functionalised with a phenyl group showed some promising behavior with this technique.

1. INTRODUCCIÓN

Siendo el cáncer una de las principales causas de muerte de los países desarrollados, una de las ramas de la investigación más activa en la investigación en medicina es la búsqueda de tratamientos que combinen la máxima eficacia y los menores efectos secundarios posibles para tratar esta enfermedad.

En este marco se encuentra la terapia fotodinámica, una modalidad terapéutica que hace uso de agentes fotosensibilizadores (PSs) para el tratamiento del cáncer principalmente, aunque su uso está extendido a otras afecciones. Estos agentes fotosensibilizadores se caracterizan por ser inocuos para las células en condiciones normales, pero son activados cuando se irradian con luz, absorbiéndola y pasando a un estado energético excitado en el que pueden actuar por distintos mecanismos produciendo finalmente la muerte de la célula. Sin embargo, la terapia fotodinámica cuenta con algunos inconvenientes que se están intentando solventar, como la poca penetración de la luz en el tejido celular, lo que limita las aplicaciones en el tratamiento de tumores profundos, grandes o casos en los que aparece metástasis, así como la fotosensibilidad que aparece como efecto secundario del tratamiento.¹

Dependiendo del mecanismo de acción, los PSs se pueden clasificar en tres categorías, siendo los de tipo I y tipo II dependientes de oxígeno, y el tipo III independientes de oxígeno. El uso de este último tipo de PSs para el tratamiento del cáncer es conocido como *Photo-Activated Chemotherapy* (PACT). Los PSs de tipo I y II actúan en el estado excitado generando especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la transferencia de electrones o interaccionando con oxígeno molecular y a través de la transferencia de energía a oxígeno molecular, respectivamente. Tanto las especies ROS como el oxígeno singlete generado en estos procesos son especies altamente dañinas y provocan la muerte celular. Los PSs de tipo I y tipo II requieren una serie de características comunes como la de poseer un estado electrónico excitado de vida larga, que en ausencia de luz no son tóxicos, que tengan preferencia por las células tumorales, que su absorción de radiación tenga una longitud de onda que se encuentra en el rango de penetración del tejido y que su eliminación del cuerpo sea relativamente rápida (para minimizar los efectos secundarios derivados de fotosensibilidad).

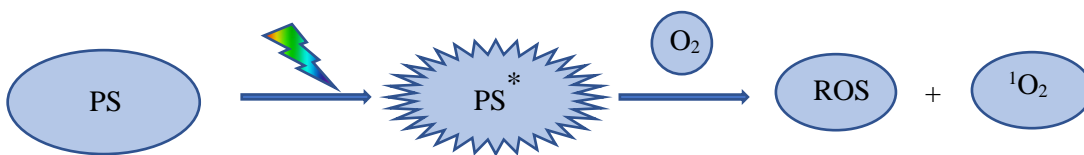


Figura 1: Esquema del funcionamiento de la terapia fotodinámica.

Los PSs utilizados hoy en día son compuestos orgánicos derivados de la porfirina o clorina, los cuales tienen unas rutas sintéticas muy complicadas y su purificación representa un problema. Además, sus propiedades ópticas son típicas de compuestos orgánicos lo que conlleva tiempos de vida del estado excitado cortos y bajos desplazamientos de Stokes, entre otras características. El uso de complejos de metales de transición como PSs intenta solventar alguna de las limitaciones de las especies ya existentes y mejorar otros aspectos, como la permeabilidad celular, la afinidad por células tumorales o la absorción de la luz visible y del IR cercano intentando conseguir una buena absorción de luz a mayor profundidad en el tejido.²

Entre los metales de transición, se encuentra que los d^6 y d^8 presentan unas propiedades fotofísicas adecuadas para su uso como PSs, las cuales pueden modificarse cambiando los ligandos de su esfera de coordinación.

La reacción entre los PSs de tipo I y II con el oxígeno molecular tiene lugar en las inmediaciones del PS, por lo que sólo ocurrirá en las zonas irradiadas con luz, lo que implica que es una terapia muy localizada y no afecta a otras partes del cuerpo. Además, esto también hace que la localización del PS sea un factor a tener en cuenta, ya que la destrucción de las células será más efectiva si la especie se encuentra en orgánulos clave para el buen funcionamiento de la célula, como las mitocondrias o los lisosomas.³

Debido al importante papel que juega la localización del fotosensibilizador, así como el conocimiento que puede aportar el seguimiento del comportamiento de la especie en la célula, parece importante escoger adecuadamente el método de detección.

Uno de los métodos de detección que más importancia ha ido cobrando a lo largo de los años en el área de la biología celular es la microscopía de fluorescencia, cuyas características la convierten en una potente herramienta en imagen celular que ha sido usada para la detección de compuestos luminiscentes tanto metálicos como orgánicos.

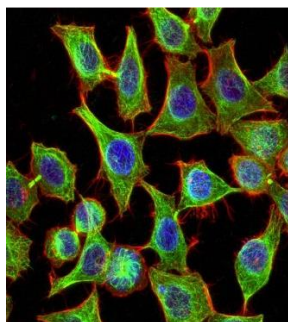


Figura 2: Imagen de células HeLa obtenida por microscopía de fluorescencia.

El objetivo es crear compuestos que por ellos mismos puedan actuar como PSs, así como emisores de fluorescencia para poder ser detectados por microscopía de fluorescencia; este tipo de compuestos se englobarían dentro de la clasificación de agentes teragnósticos. Para ello se usarán compuestos que combinen una fracción anticancerígena y una fracción luminiscente, que proporcionará la información necesaria sobre su comportamiento en las células, así como su biodistribución y acumulación y permitirán, a partir de ella, crear PSs más efectivos.

Para cumplir su función, los agentes teragnósticos planteados deben ser capaces de distinguir entre dos longitudes de onda distintas. Así pues, seleccionando adecuadamente la longitud de onda con la que se irradia los compuestos se puede activar bien su función de detección o la de tratamiento. Además, el tiempo de vida del estado excitado del fragmento PS debe ser mucho mayor que el del fragmento utilizado para visualización, para que la producción de ROS y de oxígeno singlete tenga lugar exclusivamente cuando la parte con actividad terapéutica esté excitada, garantizando así una buena diferenciación de las funciones.

La producción de ROS y de $^1\text{O}_2$ se lleva a cabo a través de una serie de procesos que vienen indicados en el diagrama de Jablonski, Figura 3. El PS es irradiado y pasa desde el estado fundamental S_0 a un estado electrónico superior S_1 que inmediatamente puede dar lugar a la desactivación a través de varios procesos, como la conversión interna o la fluorescencia, llevando a la molécula de vuelta al estado fundamental, S_0 . Este proceso es muy rápido, y es lo que se conoce como fluorescencia.

Por otro lado, algunos sistemas pueden dar lugar a procesos de entrecruzamiento de sistemas, pasando del estado excitado S_1 a un estado excitado T_1 , cuya desactivación directa por una transición T_1-S_0 está prohibida, lo que significa que el tiempo de vida de este estado triplete excitado es mayor y permite la interacción con el oxígeno molecular. Esa transición prohibida T_1-S_0 es lo que se conoce por fosforescencia. La diferencia de tiempos entre los distintos procesos permite distinguir la fluorescencia de la fosforescencia: la fluorescencia cesa inmediatamente después de retirar la excitación lumínica, mientras que la fosforescencia persiste un corto espacio de tiempo.

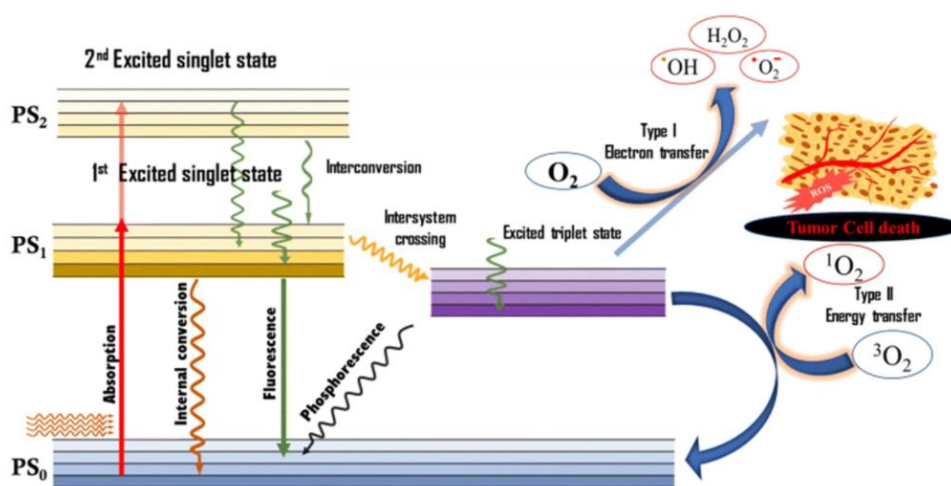


Figura 3: Diagrama de Jablonski. ¹

Para que pueda ocurrir el entrecruzamiento de sistemas que da lugar a la población del estado triplete excitado es importante el acoplamiento spin-orbita, el cual es mucho mayor en sistemas con átomos pesados como los metales de transición, quedando demostrada una vez más la gran ventaja que supone usar los metales de este bloque para la terapia fotodinámica.²

Concretamente, en este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de agentes teragnósticos de Ir^{III} . Entre las distintas ventajas que aportan los complejos de iridio encontramos que presentan estados excitados de vida larga, lo que favorece una mayor interacción con el oxígeno molecular y en última instancia, una mayor actividad anticancerígena.⁴ También presentan grandes desplazamientos de Stokes y son complejos catiónicos utilizando los ligandos de coordinación adecuados, con lo que se mejora así su absorción por parte de la célula.

2. OBJETIVOS

La investigación en agentes teragnósticos de iridio (III) todavía está en una fase temprana, y sumado a esto, se encuentra que las características de este metal como agente de imagen y de PDT son muy prometedoras. Además, los resultados obtenidos en la investigación en agentes teragnósticos de otros metales de transición como el renio (I) también son muy esperanzadores. En todo esto encontramos los motivos que han promovido este trabajo, en el que se ha intentado sintetizar especies organometálicas de iridio (III) que combinan en su estructura una fracción anticancerígena y una fracción luminiscente para que puedan ser utilizados como agentes teragnósticos en terapia fotodinámica.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Sintetizar una serie de complejos de Ir^{III} de tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ es el ligando 2-fenilpiridina (ppy) y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ representa ligandos N-dadores polidentados derivados de benzimidazol, los cuales llevan unido un cromóforo orgánico.
2. Caracterización de 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, y espectroscopía de masas.
3. Estudio de las propiedades luminiscentes de los complejos, a través de espectroscopia UV-visible, de emisión, medidas de tiempo de vida media y rendimientos cuánticos.
4. Estudio de la acción antitumoral y efectividad como agentes de PDT mediante el ensayo MTT con irradiación.
5. Estudio de las dianas biológicas de los complejos a través de microscopia de fluorescencia confocal.

Una vez completadas estas etapas se pretende haber dado un primer paso para la obtención de una familia de complejos de iridio (III) que puedan servir como agentes antitumorales en terapia fotodinámica y de visualización en técnicas de imagen celular como la microscopía de fluorescencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La idea principal es el desarrollo de compuestos de Ir^{III} que posean la capacidad de poder ser utilizados como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica y al mismo tiempo que puedan ser trazables por medio de técnicas de fluorescencia. Lo ideal sería el poder desarrollar compuestos que simplemente cambiando la longitud de onda de irradiación permitiese seleccionar una de las dos funciones, para lo cual se debería unir dos fragmentos que posean unas propiedades fotofísicas bien diferenciadas. Así pues, estos permitirían seleccionar a la carta la función que queremos darle en cada momento, simple visualización de biodistribución o terapéutica.

Específicamente los agentes teragnósticos que se plantean en este Trabajo Fin de Grado son los que se muestran en la Figura 4. Estos complejos de Ir^{III} contienen en su esfera de coordinación dos ligandos ppy que se unirán al centro metálico de forma bidentada a través del nitrógeno piridínico y un carbono del anillo fenilo (N[^]C). Para completar la hexa-coordinación que ofrece el Ir^{III}, se usará un derivado de 2-(2-piridil)benzimidazol o 2-(4-tiazolil)benzimidazol unido en forma quelato al centro metálico a través de los nitrógenos imínicos (N[^]N), siendo este conjunto la parte del compuesto que aporte las propiedades anticancerígenas. Así mismo estos dos ligandos (N[^]N) serán funcionalizados con dos cromóforos orgánicos como son los derivados de la quinolina y benceno para poder utilizarlos posteriormente como fluoróforo en imagen celular.

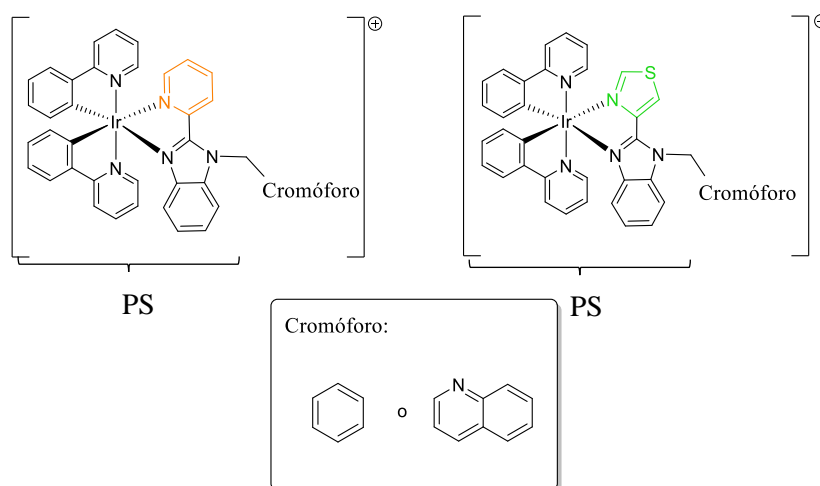


Figura 4: Complejos obtenidos.

Para la obtención de los compuestos se comenzó con la síntesis de los ligandos de tipo N[^]N, los cuales llevarán unido el cromóforo orgánico.

3.1. SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS

Se ha llevado a cabo la síntesis de cuatro ligandos N-dadores polidentados diferentes, los cuales se muestran en la Figura 5. Se comenzó con la síntesis de ligandos derivados del 2-(2-piridil)benzimidazol, a los cuales por medio de una reacción de sustitución nucleofílica se les han incorporado dos cromóforos orgánicos distintos, un derivado de la quinolina y otro fenílico

para la obtención de L_1 y L_2 respectivamente. Es de vital importancia la existencia de un espaciador existente entre el derivado de benzimidazol y el cromóforo para evitar que se conecten electrónicamente los dos fragmentos y así intentar obtener unas propiedades emisivas diferenciadas. En este caso en concreto se ha utilizado un simple $-CH_2-$ como una aproximación inicial. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de los ligandos derivados del 2-(4-tiazolil)benzimidazol a los que se les incorporaron los mismos cromóforos usados anteriormente obteniéndose los compuestos L_3 y L_4 . En todos los casos la estrategia planteada para su síntesis fue la misma: un primer paso de desprotección del nitrógeno del anillo benzimidazol por medio de una base y la posterior reacción de sustitución nucleófila donde el nitrógeno desprotonado atacaría al derivado de halogenuro de carbono correspondiente. De esta forma se han conseguido cuatro ligandos diferentes, pero que comparten entre ellos parte de su estructura, lo que permitirá ver la influencia de cada uno de los fragmentos en las propiedades luminiscentes y biológicas.

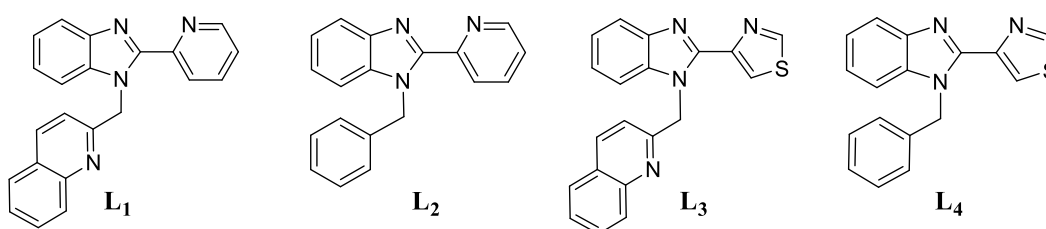


Figura 5: Ligandos sintetizados.

En primer lugar se sintetizó el **ligando L_1** , siguiendo inicialmente el procedimiento sintético propuesto por Guo-Lin Gao y colaboradores⁵ sin éxito. Este procedimiento implica el uso de hidróxido sódico como base y THF como disolvente, manteniendo la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche, pero por el estudio de 1H -RMN del producto obtenido, se observa que se recuperaban los compuestos de partida sin reaccionar.

Se intenta de nuevo la síntesis del ligando L_1 , esta vez con éxito, siguiendo una modificación del procedimiento experimental propuesto por Nail M. Shavaleev y colaboradores⁶ para la síntesis de complejos similares. En primer lugar, se intenta llevar a cabo la desprotonación del reactivo comercial 2-(2-piridil)benzimidazol con carbonato de potasio y posteriormente se adiciona 2-clorometilquinolina, usando DCM como disolvente. Pasadas 48 horas de reacción se observa por espectroscopia de 1H -RMN que el derivado benzoimidazolico sigue protonado, por lo que se decide evaporar el DCM y redissolver el residuo generado en DMF, manteniendo la agitación otras 48 horas. Pasado este tiempo la reacción se completa y se obtiene un sólido que se lava con agua para eliminar las impurezas que eran solubles (como el KCl formado). Se redissuelve el sólido en DCM y se seca con $MgSO_4$. Tras una filtración por gravedad para eliminar el $MgSO_4$, se reduce el volumen del disolvente a sequedad y se obtiene un aceite que se tritura con éter, obteniendo así el producto de reacción con un rendimiento de 58,44 %.

Se muestra en la Figura 6 una comparación de los espectros de 1H -RMN del 2-(2-piridil)benzimidazol, 2-clorometilquinolina y del producto final de la reacción[†]. Además de la aparición de los protones de los dos fragmentos acoplados que integran perfectamente por 16

[†] Es importante mencionar que los espectros de los dos productos de partida están hechos usando como disolvente DMSO deuterado, mientras que para hacer el espectro del producto, L_2 , se usó como disolvente cloroformo deuterado. Por ello, la comparación entre los espectros no debe ser estricta.

protones, se observa claramente el desplazamiento de los protones metilénicos que se encuentran ahora menos apantallados y se desplazan a menor campo, apareciendo a 6,48 ppm, confirmando así el éxito de la reacción.

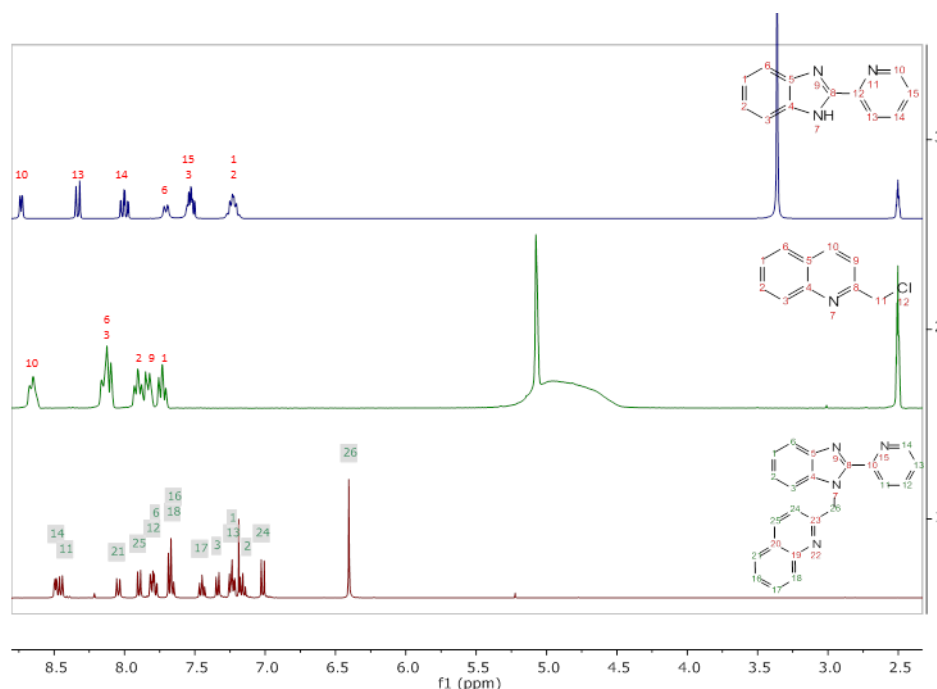


Figura 6: Espectros de ¹H-RMN de los reactivos y del producto de reacción, L₁.

En segundo lugar, se llevó a cabo la síntesis del **ligando L₂** siguiendo una modificación del procedimiento experimental propuesto por Mónica Vaquero y colaboradores⁷. En este caso el 2-(2-piridil)benzimidazol es desprotonado usando hidróxido potásico como base y acetonitrilo como disolvente. A continuación, se adiciona bromometilbenceno y la mezcla de reacción se deja en agitación durante 24 horas, obteniendo un sólido que se lleva a sequedad, se resuspende en agua y se filtra, lavándolo con agua y éter. Finalmente, el sólido se seca a vacío obteniendo así el ligando L₂ con un rendimiento de reacción de 90,29 %. Nuevamente en el espectro de ¹H-RMN se observa el desplazamiento de los protones metilénicos a 6.20 ppm indicativo de la obtención del producto deseado.

En tercer lugar, se sintetizó el ligando L₃ usando el mismo procedimiento experimental que en el caso del ligando L₂. En este caso se usan 2-(4-tiazolil)benzimidazol y clorometilquinolina, pero el sólido aislado de la reacción se obtuvo impuro ya que por medio de ¹H-RMN se podía ver parte de 2-(4-tiazolil)benzimidazol sin reaccionar. Como se supone que el producto deseado es soluble en DCM, se añade este disolvente para intentar solubilizarlo y se obtiene así una suspensión. Las fases líquida y sólida se separan por centrifugación. Esta acción se repite dos veces y los lavados de DCM se combinan y se llevan a sequedad, obteniendo el producto deseado puro con un 75,62 % de rendimiento. Nuevamente las integraciones y desplazamientos observados en el espectro de RMN de ¹H coinciden con la estructura esperada, ver figura 7.12 de los anexos. Como ahora tenemos un anillo tiazolil en lugar del anillo piridínico los protones más desapantallados pasan a ser CH(13) a 8.85 ppm y CH(11) a 8.41 ppm en lugar de los CH(11) y CH(14) del anillo piridínico en L₁ y L₂. Por otro lado, el protón alifático CH₂ tiene un desplazamiento de 6.37 ppm similar al de su análogo L₁. Por último, se llevó a cabo la obtención del **ligando L₄** a través del mismo procedimiento experimental que el usado para la

obtención de L₂. Los reactivos usados en este caso son 2-(4-tiazolil)benzimidazol y bromometilbenceno, y el producto de reacción se obtuvo con un 105,25 % de rendimiento, posiblemente por un secado del disolvente deficiente.

Cabe destacar también el intento de síntesis del ligando derivado de 2-(2-piridil)benzimidazol con el cromóforo 9-(bromometil)acridina, Figura 7, cuya ruta sintética todavía está en desarrollo. Este cromóforo presenta unas propiedades luminiscentes extraordinarias, de ahí el interés en la obtención de ligandos que incluyan este compuesto en su estructura. Lamentablemente no se ha podido aislar satisfactoriamente hasta el momento.

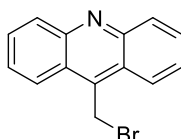


Figura 7: Estructura de la 9-(bromometil)acridina.

3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos metálicos se siguió el esquema sintético que se muestra en la Figura 8.

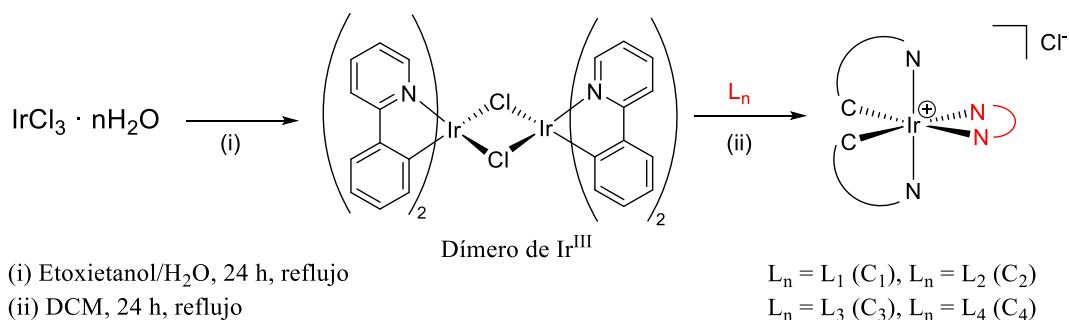


Figura 8: Esquema sintético para la obtención de los complejos C₁-C₄.

El primer paso en la síntesis de los complejos deseados es la obtención del dímero [Ir(ppy)₂(μ₂-Cl)₂]₂, y para ello se siguió el método propuesto por S. Sprouse y colaboradores.⁸ Así pues, se hizo reaccionar tricloruro de iridio hidratado con dos equivalentes de ppy en una mezcla de etoxietanol y agua. Tras 24 horas de reacción a reflujo, se formó un sólido amarillo que se filtró y secó a vacío, obteniendo así el dímero con un 52,38 % de rendimiento. Este compuesto únicamente se ha caracterizado por RMN de protón puesto que se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía.

Una vez obtenido el dímero, se hace reaccionar con los distintos ligandos L₁-L₄ que se han obtenido en el apartado anterior (en todos los casos en proporción 1:2) de forma que se obtienen cuatro complejos diferentes C₁-C₄ siguiendo un procedimiento experimental optimizado en el grupo de investigación.

Concretamente, en el caso del **complejo C₁**, el dímero de Ir^{III} y el ligando L₁ se hacen reaccionar en proporciones 1:2 en una mezcla de disolventes DCM/MeOH (1:3), manteniendo la mezcla a reflujo durante 24 h y otras 24 h en agitación a temperatura ambiente. Se obtiene una suspensión amarilla que se filtra y se recogen las aguas madre, las cuales se llevan a sequedad y se purifican por cromatografía en columna de silica gel con una mezcla de eluyentes DCM:MeOH (9:1), obteniendo el complejo como un sólido amarillo con un 22,33 % de rendimiento. La pérdida de simetría del ligando ortometalado ppy observada en el espectro de RMN de protón por la coordinación de L₁ es la característica más evidente que demuestra la coordinación satisfactoria de L₁ al centro metálico, Figura 9. Hay que recordar que L₁, al igual que sus análogos L₂-L₄, es un ligando asimétrico que provoca tras su coordinación que todos los protones y carbonos del complejo correspondiente den lugar a señales unitarias y diferenciadas en el espectro de protón y carbono respectivamente. Por ello, su asignación específica requeriría un estudio espectroscópico mucho más completo del realizado en este Trabajo de Fin de Grado. De todas formas, con los datos iniciales obtenidos por ¹H-RMN y ¹³C-RMN sumado a la caracterización realizada por espectroscopía de masas, se puede afirmar la coordinación satisfactoria de L₁ al centro metálico, Figura 9. Por otro lado, una prueba adicional de que se ha coordinado el ligando L₁ es la aparición de una emisión naranja cuando una disolución en cloroformo de este compuesto se irradia con la lámpara de mano de UV a una longitud de onda de 365 nm.

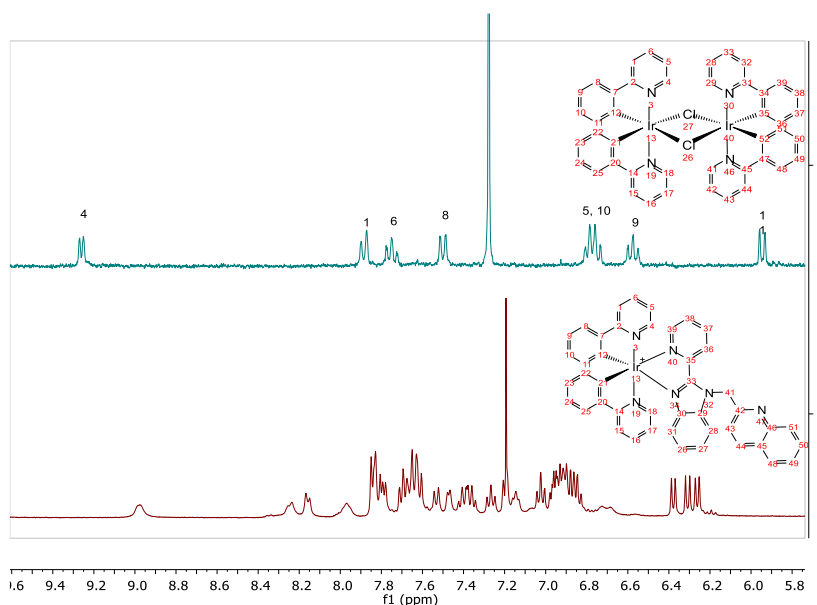


Figura 9: espectros ¹H-RMN del dímero de Ir^{III} y del complejo C₁.

Para la obtención del **complejo C₂**, se hace reaccionar el dímero con el ligando L₂ esta vez en DCM durante 24 horas a reflujo. Una vez pasado este tiempo a la mezcla de reacción se le añade hexano, que provoca la precipitación de un sólido amarillo que se filtra a vacío y finalmente se purifica por cromatografía en columna con una mezcla de eluyentes DCM:MeOH (9:1) obteniéndose así C₂. Nuevamente, la pérdida de simetría en el espectro de RMN de protón y carbono, junto con la capacidad de emitir luz naranja cuando se irradia a 365 nm sugieren que el compuesto C₂ se ha obtenido satisfactoriamente.

En el caso del **complejo C₃** se sigue el mismo procedimiento que el usado para la obtención de C₂, aunque esta vez la adición de hexano promueve la aparición de un aceite marrón que se tritura con éter forzando la aparición del sólido deseado. En el estudio por ¹H-RMN se

comprueba que el producto está impuro (puede que algún disolvente o instrumento estuviese contaminado) por lo que una parte de este sólido se vuelve a purificar por cromatografía en columna usando la misma mezcla de eluyentes y se obtiene finalmente el sólido puro con un rendimiento de 8,38 %. Este rendimiento se corresponde únicamente con la fracción de sólido que se ha purificado por completo, por lo que no es el rendimiento real de la reacción. La figura 7.32 de los anexos muestra el espectro de RMN de protón del compuesto C₃ donde se pueden ver los desplazamientos de todos los protones tras la coordinación, siendo el más evidente el del protón CH(46) del anillo tiazolil de 8.89 ppm (Figura 7.12 anexos) a 9.75 ppm tras la coordinación. Además de todos los desplazamientos observados, se comprueba que cuando se irradia bajo la lámpara de UV una disolución de este compuesto pasa a tener una emisión en verde, al contrario que sus análogos C₁ y C₂ que era naranja.

Por último, la obtención del **complejo C₄** se lleva a cabo usando el mismo procedimiento experimental que el usado para la obtención del complejo C₂, pero esta vez no hay necesidad de llevar a cabo la purificación del producto por cromatografía, el cual se aísla satisfactoriamente como un sólido amarillo por filtración. Se obtiene así el complejo C₄ con un rendimiento del 72,08 %. Al igual que en los casos anteriores se observa por espectroscopia de ¹H-RMN como hay un desplazamiento claro de todas las señales, así como la pérdida de simetría de las mismas como consecuencia de la coordinación de L₄ con el centro metálico. Nuevamente al irradiar una disolución de este complejo bajo la luz UV, se vuelve a obtener una emisión en verde, lo que pone de manifiesto la importancia en la elección del ligando N^N para la modulación en el color de emisión.

Tras este proceso sintético se han obtenido cuatro complejos metálicos diferentes que combinan en su estructura un fragmento potencialmente apto para su uso como agente PS (fragmento de iridio), y otro que podría utilizarse en imagen celular (cromóforo orgánico). Se estudiarán las propiedades ópticas y biológicas de estos compuestos, cuya estructura se muestra en la Figura 10.

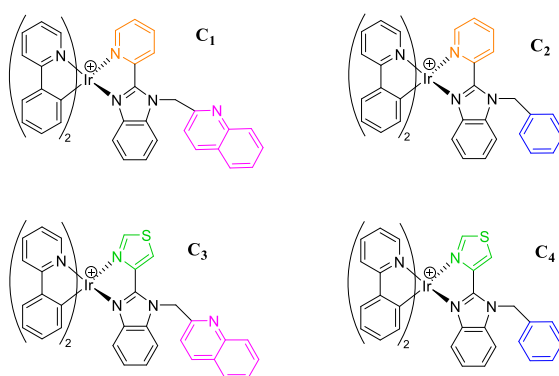


Figura 10: Complejos sintetizados.

3.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS

Una de las metas de este trabajo es que los complejos sintetizados puedan servir como agentes de visualización en técnicas de bioimagen como la microscopía de fluorescencia al

mismo tiempo que agentes para terapia fotodinámica; por lo tanto, uno de los pasos es el estudio de las propiedades fotofísicas de los complejos para comprobar su valía en ambas aplicaciones.

Así pues, se han estudiado las propiedades ópticas de los complejos C₁-C₄ 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. Así pues, se han medido los espectros de absorción UV-visible, de emisión y excitación, los tiempos de vida del estado excitado y rendimientos cuánticos. La Tabla 1 recoge los datos más significativos y las Figuras 11, 12 y 7.43 y 7.45 de los anexos, los distintos espectros de emisión, excitación y de ultravioleta visible. En concreto, el análisis de las bandas de absorción muestra que todos los compuestos tienen una banda de absorción intensa con picos sobre 275 nm que se asignan a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los distintos ligandos coordinados al metal, es decir una transición centrada en el ligando (¹LC).⁹ A continuación se observan otras bandas de menos intensidad entre 315 y 385 nm que pueden ser atribuidas tanto a transiciones de carga ligando-ligando (¹LLCT) desde los ligandos ppy(π) al ligando N[^]N(π^*) y también a transiciones de carga metal-ligando (¹MLCT) desde Ir($d\pi$) al ligando N[^]N(π^*).¹⁰ Por último, se detecta una cola de muy poca intensidad que se extiende por encima de 400 nm y que generalmente es asociada a una transición ³MLCT.

En lo que se refiere a sus propiedades luminiscentes, se observa que todos ellos son altamente emisores y que el color de esta emisión está en función de la naturaleza del ligando N[^]N. Así pues se observa que los compuestos C₁ y C₂ emiten en rojo/naranja, con un máximo de emisión en torno a 604 nm con un banda de emisión ancha lo que se asocia a un proceso MLCT Ir($d\pi$) \rightarrow NN(π^*).¹¹ En cambio para los compuestos C₃ y C₄, la banda que se observa es estructurada con picos sobre 485 y 512 nm dando un color verde y que se asigna mayormente a transiciones LLCT ppy(π) \rightarrow NN(π^*). En ambos casos estas emisiones se pueden considerar procesos de fosforescencia ya que la vida media de todos ellos se encuentra en los centenares de nanosegundos, concretamente desde 283 a 471 ns. Los rendimientos cuánticos se midieron en presencia y ausencia de oxígeno (por borboteo de Ar durante 2 min). Se observa como los valores de eficiencia aumentan considerablemente después de desplazar al oxígeno, un conocido desactivador de luminiscencia, llegando a valores de hasta 38 % en el caso del compuesto C₃.

Como se puede observar en este estudio, no se ha conseguido diferenciar la emisión proveniente del centro metálico y el cromóforo, una de las premisas del diseño. De los cuatro complejos sintetizados el C₁ y C₂ serían los más adecuados para nuestro objetivo ya que su emisión en la zona del rojo/naranja (alrededor de 600) estaría bien diferenciada de la de los cromóforos, que emitirían en la zona azul/violeta (alrededor de 400) si hubiésemos llegado a detectarlos. Lamentablemente la gran intensidad de la emisión del fragmento metálico es capaz de esconder la del fragmento cromóforo, por lo que es necesario trabajar en este aspecto.

Tabla 1: Bandas de absorción y valores de los coeficientes de extinción molar calculados a través de la Ley de Lambert-Beer para los complejos medidos en DMSO (1,5·10⁻⁵ M). Máximos de excitación, emisión y tiempo de vida media en DMSO en presencia de oxígeno. Valores de rendimientos cuánticos en presencia y ausencia de oxígeno.

		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
UV-vis	λ_1 (nm)	264	264	267	267
	$\epsilon_1/1000$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	23,20	54,80	20,87	18,00

	λ_2 (nm)	318	322	305	297
	$\epsilon_2/1000$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	18,33	40,40	17,60	14,47
	λ_3 (nm)	378	383	384	381
	$\epsilon_3/1000$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	4,33	11,53	3,27	1,93
EXCITACIÓN	λ (nm)	422	424	336, 401	336, 401
EMISIÓN	λ (nm)	604	604	486, 513	485, 512
TIEMPO DE VIDA	τ (ns)	376	471	436	283
RENDIMIENTO CUÁNTICO EN PRESENCIA DE O₂	ϕ (%)	12,50	20,00	8,50	5,50
RENDIMIENTO CUÁNTICO EN AUSENCIA DE O₂	ϕ (%)	26,50	28,50	38,00	27,00

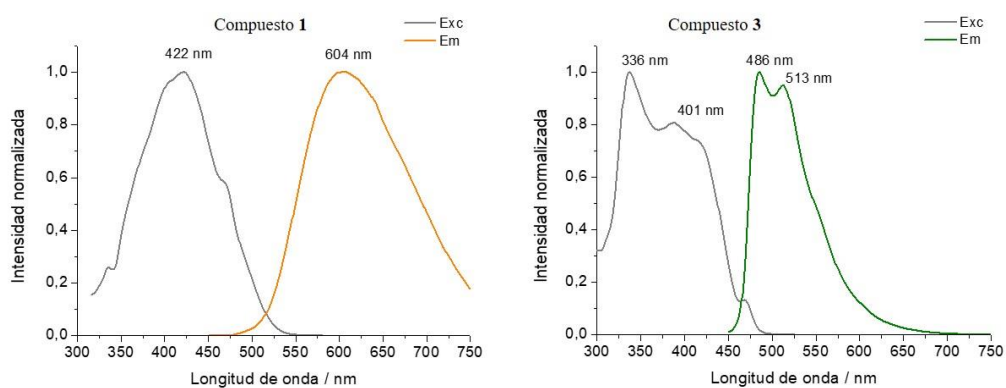


Figura 11: Espectros emisión y excitación de los compuestos C₁ y C₃ medidos en DMSO a temperatura ambiente.

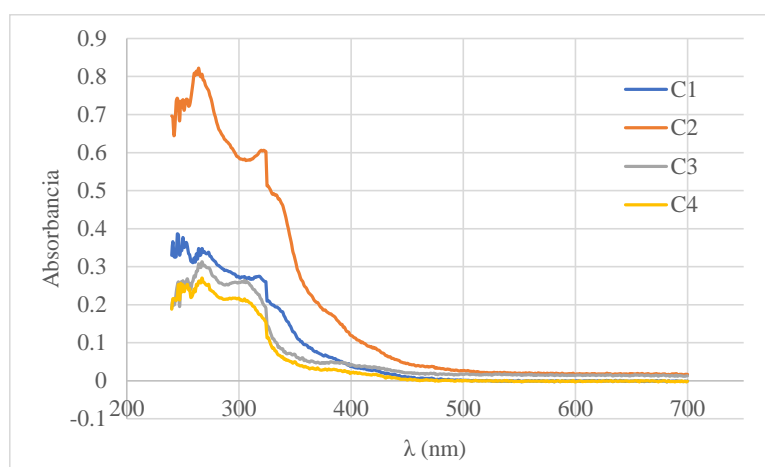


Figura 12: Espectros UV-vis de los complejos medidos en DMSO ($1,5 \cdot 10^{-5}M$) a temperatura ambiente.

3.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Se estudiaron las propiedades biológicas de los cuatro complejos sintetizados; concretamente, se analizó la citotoxicidad y fotocitotoxicidad por medio del Test MTT así como su posible aplicación en microscopía de fluorescencia como agente de imagen.

Para analizar la citotoxicidad de los complejos se hace uso de MTT, un compuesto orgánico de color amarillo que es reducido por la enzima succinato-deshidrogenasa de las células (principalmente por las succinato-deshidrogenasas mitocondriales) a azul de formazán, Figura 13. Por lo tanto, todas las células vivas que haya en el medio metabolizarán el MTT y formarán cristales de azul de formazán, y la cantidad de cristales que haya será proporcional a la cantidad de células vivas.

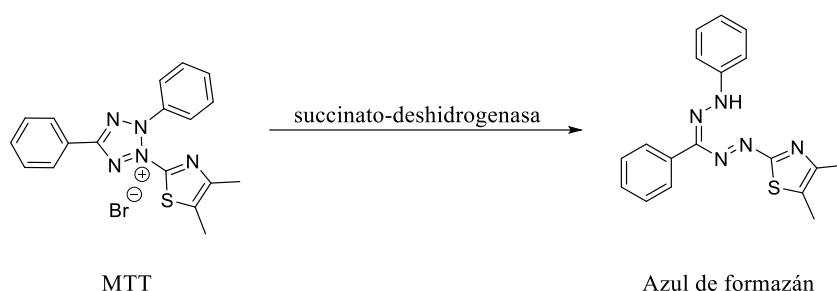


Figura 13: Reacción del Test MTT.

Para llevar a cabo el Test MTT se sembraron en una placa de 96 pocillos células de la línea A549 (células cancerígenas de pulmón) en 100 μ L de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), y se dejaron incubando durante 24 horas. A su vez, se prepararon a partir de una disolución stock de 0,1 M en DMSO y en condiciones de esterilidad cinco disoluciones en medio de cultivo de cada uno de los complejos, las cuales eran de distinta concentración (100, 20, 4, 0,80 y 0,20 μ M).

Tabla 2: Esquema de la placa de 96 pocillos.

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

LEYENDA

C ₁	C ₂
C ₄	C ₃

B= Blanco
C=Control

La placa se divide en 4 secciones, una para cada complejo. En cada sección se encuentra que en una misma columna (4 pocillos) se añaden 100 μ L/pocillo de una de las disoluciones; es decir, en los pocillos A2-D2 se han añadido a cada uno 100 μ L de la disolución de 0,20 μ M del

complejo C₁, haciendo así cada ensayo por cuadruplicado, en los A3-D3 se añaden 100 µL de la disolución de 0.80 µM del complejo y así sucesivamente con cada complejo se va aumentando la concentración. Teniendo en cuenta que cada pocillo contenía 100 µL de medio de cultivo, las concentraciones de trabajo son la mitad de las preparadas inicialmente por la dilución. Por otro lado, en los pocillos de la columna 1 se tendrán las disoluciones de control, es decir se añade 100 µL de medio de cultivo conteniendo el mismo porcentaje de DMSO que tenga la disolución de complejo más concentrada. Esto sirve para medir la toxicidad que tiene de por sí el DMSO en las células y asegurarse que no es este el que está ofreciendo el efecto citotóxico. Por último, en los pocillos A12-D12, en los que no hay células sembradas, se preparan las medidas del blanco añadiendo en cada pocillo 200 µL de medio de cultivo. Esta placa se prepara por duplicado, ya que una de ellas se irradiará con luz de 470 nm (placa B), comprobando de esta forma la efectividad de los compuestos para PDT. Así pues, una vez incubados los compuestos por 4 horas, se retira el medio de las dos placas para eliminar el compuesto que no haya conseguido penetrar. Después una de las placas (placa B) se somete 10 min a irradiación a 470 nm mientras que la otra (placa A) ya se introduce en la incubadora. Cuando se retira la irradiación la placa B se introduce también en la incubadora y allí se dejan las dos hasta transcurridas las 24 h desde la adición de los compuestos.

Pasado este tiempo se añaden 10 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo, se agitan las placas y se dejan incubando otras dos horas. Se elimina el medio de cultivo por inversión sobre papel y se añaden 100 µL de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de azul de formazán que se hayan formado en aquellos que todavía hay células vivas, dando una coloración violeta, Figura 14. Finalmente, se mide la absorbancia a 550 nm en un lector de placas, pero ya a simple vista por la coloración violeta se puede discernir que la placa no irradiada (izquierda) contiene más células vivas que la irradiada (derecha).

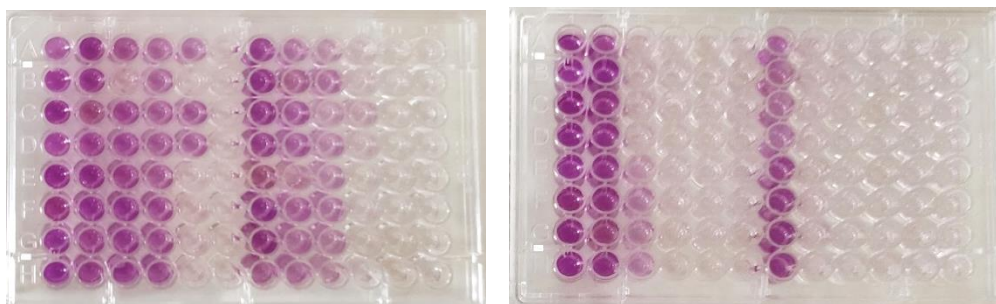


Figura 14: Placas de 96 pocillos. A la izquierda se encuentra la placa que no se ha irradiado, y a la derecha la placa que sí que ha sido irradiada.

Con los datos de la absorbancia se calcula el porcentaje de proliferación de las células, y éste se representa frente a la concentración de los complejos, Figura 15. Esta representación revela el valor del IC₅₀, es decir, la concentración de complejo que provoca la muerte del 50% de las células.

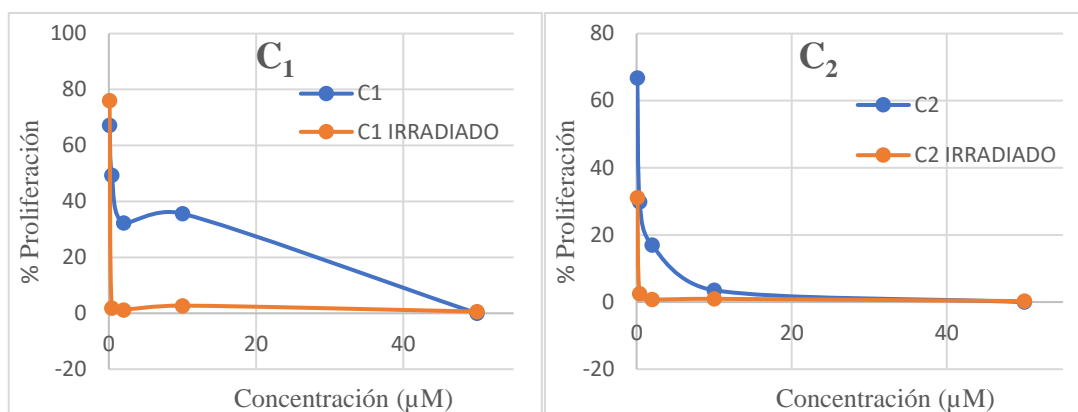


Figura 15: Porcentaje de proliferación frente a la concentración de los complejos C₁ y C₂.

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos de IC₅₀ para los complejos. A partir de estos valores se puede deducir que los compuestos son bastante citotóxicos ya que, incluso sin irradiar, los valores de IC₅₀ están en el rango nanomolar. Una vez irradiados esta citotoxicidad aumenta hasta 20 veces como es en el caso del compuesto C₄, aunque hay otro caso como el C₃ que no muestra ninguna diferencia con la irradiación (PI = 1), por lo que no vemos un patrón claro en los índices de citotoxicidad. Para que los compuestos sean aptos como agentes en PDT deben ser inocuos para la célula en condiciones normales y letales cuando son irradiados; para ello, los valores de IC₅₀ de los complejos irradiados y sin irradiar deben ser lo más diferentes posible. Esto no se observa en este caso ya que como se ha comentado, los compuestos sin irradiar son bastante citotóxicos. Analizando concretamente los valores de IC₅₀, se podría sugerir que en el caso de los complejos C₂ y C₄, que son los que tienen como fragmento cromóforo un grupo fenilo, son los que muestran una mayor diferencia entre los valores de IC₅₀ irradiados y sin irradiar. El extremo opuesto se encuentra en el caso del compuesto C₃, que tanto irradiado como sin irradiar tiene los mismos valores de IC₅₀ y no serviría para ser usado el PDT.

Tabla 3: Valores de IC₅₀ (µM) para los complejos. PI: Índice de fotocitotoxicidad

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
IC₅₀ SIN IRRADIAR	0,90	0,30	0,21	2,82
IC₅₀ IRRADIADO	0,74	0,07	0,21	0,14
PI	1.2	4	1	20

Una vez conocidos los valores de IC₅₀, se llevó a cabo un experimento de colocalización para comprobar el funcionamiento de los compuestos como agentes de imagen celular y la biodistribución de estos dentro la célula. Para ello, se incubaron las células a 2 µM durante 2 horas. Además, también se usó un tinte fluorescente comercial como patrón interno; concretamente se usó el LysoTracker-red, que se fija a los lisosomas de la célula permitiendo así visualizarlos a través de microscopía de fluorescencia. La razón por la que se escogió el LysoTracker-red fue para comprobar si los complejos se localizaban en los lisosomas ya que, como ya se ha comentado anteriormente, son unos orgánulos clave para el buen funcionamiento

de la célula, y la localización de los complejos en estos orgánulos sería muy adecuada para que la función de agentes PSs sea efectiva.

Específicamente, para llevar a cabo el ensayo, se sembraron células de la línea A549 sobre un cubreobjetos en una placa de 6 pocillosⁱⁱ y tras un periodo de incubación, se retiró la mitad del medio de cultivo y se añadieron 100 μL del compuesto a estudiar al doble de la concentración deseada, obteniendo una concentración final de 2 μM . Las células se dejaron incubando durante dos horas con los complejos, y una vez pasado este tiempo, se añadieron 50 μL de LysoTracker, consiguiendo una concentración final de 100 nM. Una vez añadido el patrón interno, las células se dejaron incubando una hora más y se observaron a través del microscopio de fluorescencia confocal después de irradiar a 405 nm (donde se ve únicamente la emisión de nuestros compuestos, color verde en Figura 16) e irradiar a 556 nm (donde se ve únicamente la emisión del LysoTracker, color rojo en Figura 16). Una vez obtenidas las dos imágenes se procesa a la superposición de las mismas. Si los complejos se localizan en los lisosomas obtendríamos una coloración naranja resultado de la superposición de los colores verdes y rojos.

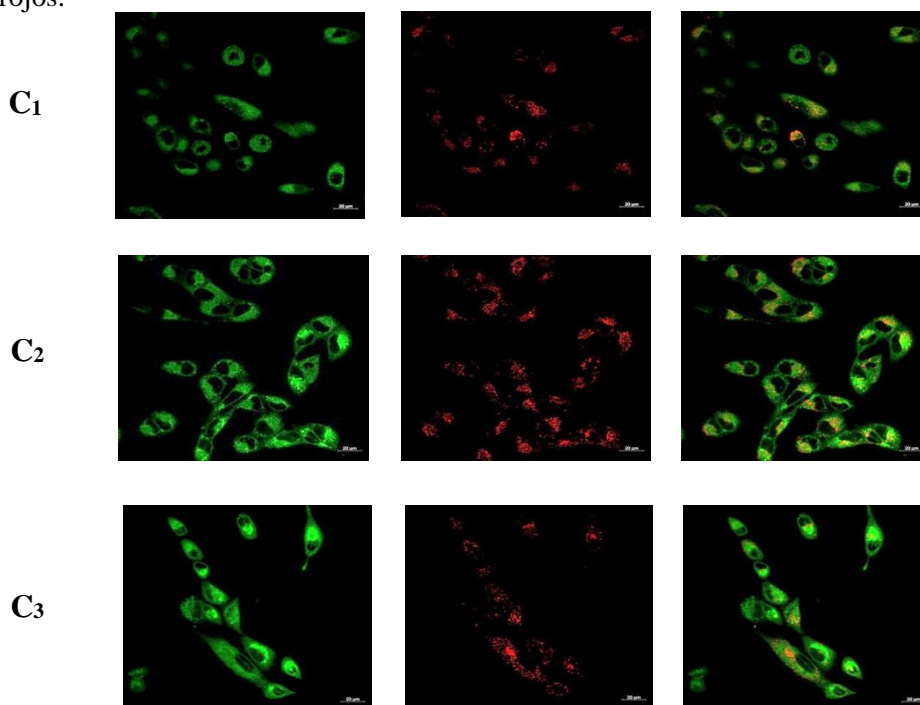


Figura 76: Visualización de las células con microscopía de fluorescencia confocal. De izquierda a derecha, células incubadas con el complejo excitadas a 405 nm, células con LysoTracker-Red excitadas a 556 nm, y superposición de las dos imágenes anteriores.

En este caso se puede deducir que los tres complejos tienen el mismo comportamiento. Son capaces de entrar en la célula y distribuirse por el citoplasma, no entran al núcleo ni se observa una colocalización clara en los lisosomas. Para llegar a conocer la biodistribución de estos complejos es necesario realizar ensayos adicionales con otros tintes comerciales como pueden ser marcadores de mitocondrias, retículo endoplasmático, vacuolas, etc.

ⁱⁱ Este estudio se realizó para tres de los cuatro complejos sintetizados ya que, debido a los medios materiales disponibles, el máximo de complejos que se podían estudiar era tres.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES

Los espectros de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, 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 análisis de masas se llevaron a cabo en disolución en un espectrómetro de masas Bunker Esquire 3000 Plus utilizando la técnica de ionización por electrospray positivo (ESI+).

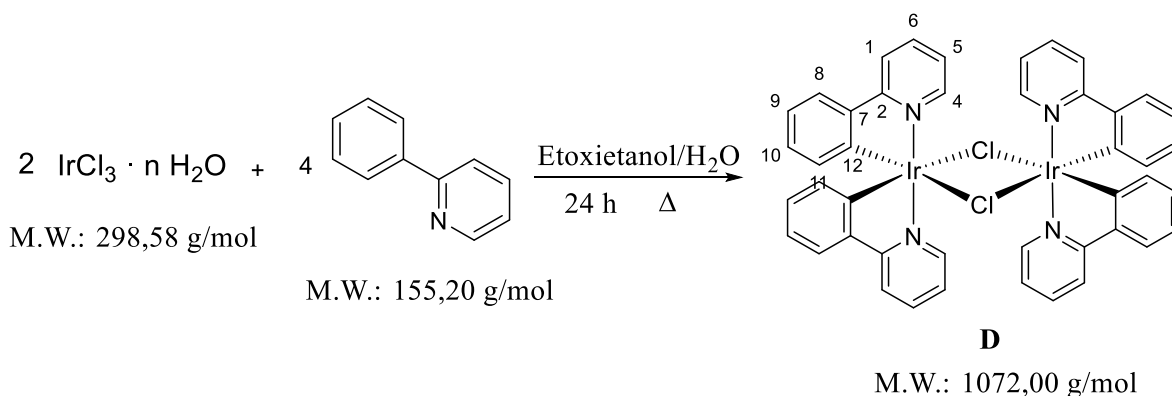
Los estudios de excitación y emisión se realizaron en un espectrofotómetro Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11, y los de absorción en un espectrofotómetro Evolution 600 empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud. En ambos casos en disolución de DMSO. Las imágenes de biodistribución se han obtenido 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.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Para las estrategias de síntesis propuestas se han tomado como punto de partida los siguientes reactivos comerciales: tricloruro de iridio hidratado, 2-fenilpiridina, 2-(2-piridil)benzimidazol, 2-clorometilquinolina, bromometilbenceno y 2-(4-tiazolil)benzimidazol.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO D:



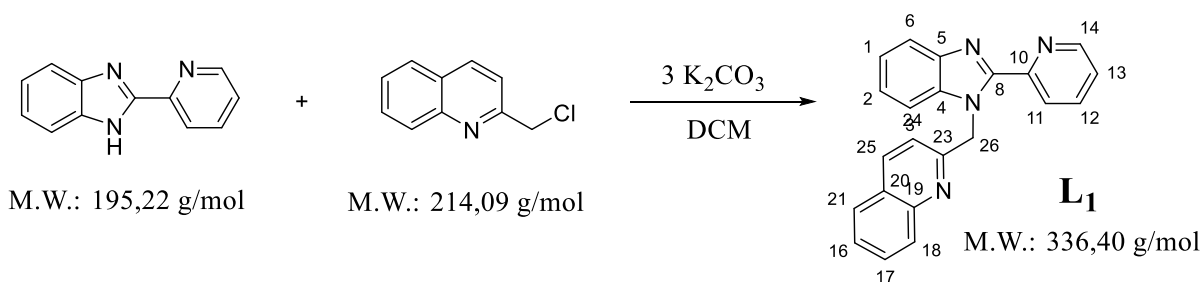
Se disuelve el tricloruro de iridio hidratado (250 mg; 0,84 mmol) en 3,4 mL de una mezcla de disolventes etoxietanol:agua (2 mL de etoxietanol, 1,4 mL de agua) y se añade 2-fenilpiridina (ppy) (0,239 mL; 1,68 mmol). La suspensión negruzca se agita y se somete a reflujo durante

24 h a 135 °C. Pasado este tiempo se observa un precipitado amarillo. La mezcla de reacción se enfría y el sólido se filtra en placa filtrante; es lavado con etanol (3x5 mL) y se hace un último lavado con una cantidad mínima de acetona (0,3 mL). Finalmente, el sólido amarillo (**D**) se seca a vacío.

$$\eta = 52,38 \% ; 237,37 \text{ mg} ; 0,22 \text{ mmol}$$

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.24 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, (CH (4))), 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, (CH (1))), 7.73 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, (CH (6))), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, (CH (8))), 6.75 (q, $J = 7.5, 7.1$ Hz, 2H, CH (5, 10)), 6.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, (CH (9))), 5.93 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, (CH (11))).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO **L**₁: 2-((2-piridil)benzimidazol-1-il)metil)quinolina

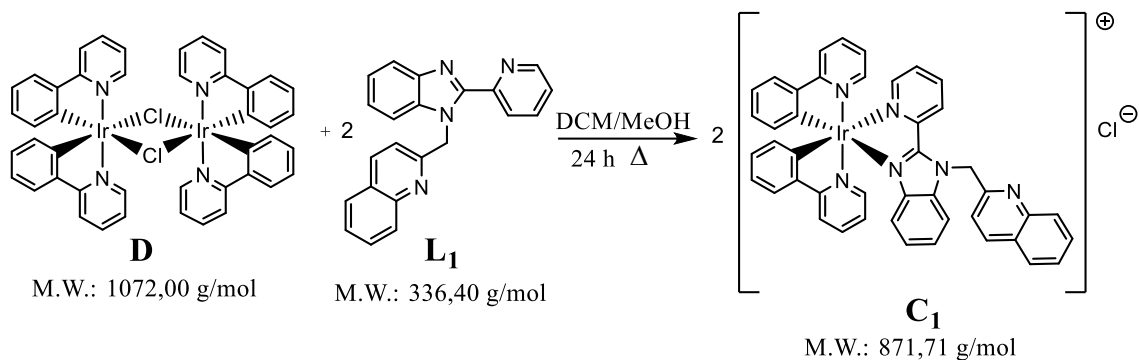


Se disuelven 2-(2-piridil)benzimidazol (300 mg; 1,54 mmol) y K₂CO₃ (637,71 mg; 4,62 mmol) en DMF (4 mL), quedando una suspensión blanca que se agita durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añade 2-clorometilquinolina (329 mg; 1,54 mmol) junto con 1 mL más de DMF. La mezcla se somete a agitación durante otras 48 horas, y pasado este tiempo se obtiene un precipitado amarillo que se lleva a sequedad. Al sólido se le añade H₂O (15 mL) y se filtra sobre placa filtrante quedando un sólido amarillo que se lava con agua (3x4 mL) y se disuelve en 17 mL de DCM, se seca con MgSO₄ y se filtra con un filtro de pliegues. De la disolución amarilla obtenida se evapora el disolvente y se obtiene un aceite marrón al que se le añade éter (3x1 mL) y se tritura para forzar la aparición de un sólido de color blanco hueso (**L**₁) que se deja al aire para que se seque completamente.

$$\eta = 58,44 \% ; 302,15 \text{ mg} ; 0,90 \text{ mmol}$$

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.56 (ddd, $J = 4.8, 1.8, 1.0$ Hz, 1H, CH (14)), 8.52 (dt, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 1H, CH (11)), 8.12 (dq, $J = 7.8, 1.1$ Hz, 1H, CH (21)), 7.97 (dd, $J = 8.6, 0.8$ Hz, 1H, CH (25)), 7.91 – 7.82 (m, 2H, CH (6, 12)), 7.74 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 2H, CH (16, 18)), 7.52 (td, $J = 7.3, 1.2$ Hz, 1H, CH (17)), 7.41 (dt, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H, CH (3)), 7.34 – 7.28 (m, 2H, CH (1, 13)), 7.23 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H, CH (2)), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH (24)), 6.48 (s, 2H, CH₂ (26)). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.83 (C (10)), 150.33 (C (8, 23)), 149.90 (C (19)), 148.67 (C (14)), 147.57 (C (5)), 137.08 (C (25)), 136.98 (C (20)), 136.91 (C (12)), 129.75 (C (18)), 128.96 (C (21)), 127.62 (C (16)), 127.34 (C (4)), 126.40 (C (17)), 124.67 (C (11)), 123.93 (C (1)), 123.80 (C (2)), 123.07 (C (13)), 120.07 (C (6)), 118.87 (C (24)), 110.95 (C (3)), 51.89 (C (26)). ESI: [L₁]⁺ = 336,40 calculado, [L₁]⁺ = 337,15 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPLEJO C₁:

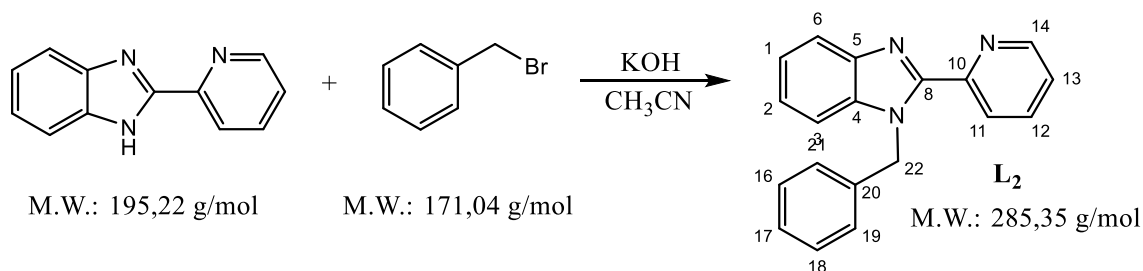


Los compuestos D (55 mg; 0,051 mmol) y L₁ (34,48 mg; 0,103 mmol) se incorporan a 4 mL de una mezcla de DCM:MeOH (1:3), obteniéndose una suspensión amarilla que se agita y se somete a reflujo durante 24 h a una temperatura de 55 °C, y otras 24 h agitando a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra y las aguas madre se llevan a sequedad, obteniendo un sólido amarillo (C₁) que se purifica mediante cromatografía en columna de silica gel usando como eluyente la mezcla DCM:MeOH (9:1).

$\eta = 22,33\%$; 19,71 mg; 0,023 mmol

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.04 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.90 (dd, $J = 10.4, 7.2$ Hz, 3H), 7.85 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.80 – 7.69 (m, 3H), 7.72 – 7.65 (m, 2H), 7.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.51 – 7.39 (m, 2H), 7.33 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.27 – 7.16 (m, 3H), 7.13 – 7.03 (m, 1H), 7.07 – 6.91 (m, 5H), 6.95 – 6.87 (m, 1H), 6.77 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 6.41 – 6.30 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.28, 168.17, 154.48, 153.59, 152.18, 150.93, 149.72, 148.96, 147.84, 147.65, 147.43, 144.27, 143.94, 140.36, 139.51, 137.82, 137.67, 137.48, 137.41, 132.53, 131.75, 130.95, 130.21, 129.09, 128.91, 128.08, 127.88, 127.53, 127.42, 126.54, 126.03, 125.19, 124.90, 124.65, 123.26, 123.17, 122.58, 122.44, 121.37, 119.51, 119.39, 118.25, 111.88, 50.94. ESI: [C₁]⁺ = 836,21 calculado, [C₁]⁺ = 837,23 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₂: 1-bencil-2-(piridin-2-il)benzimidazol



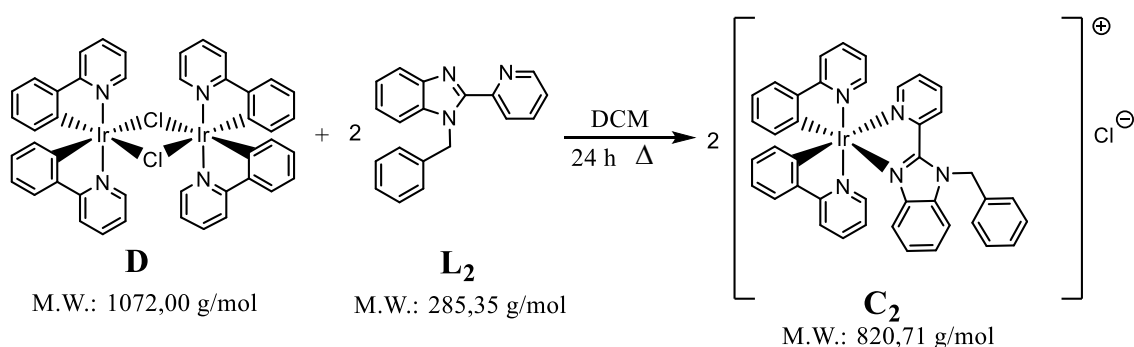
Se disuelven 2-(2-piridil)benzimidazol (200 mg; 1,02 mmol) y KOH en exceso en CH₃CN (6 mL) y se obtiene una suspensión blanquecina que se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras este tiempo se añade bromometilbenceno (122 μ l; 1,02 mmol) y se observa un cambio de color en la suspensión, que pasa a un color amarillo claro. La mezcla de reacción se agita durante 24 horas y pasado este tiempo se observa una disolución amarilla y un sólido blanco. La mezcla se lleva a sequedad obteniendo un sólido amarillo claro que se

suspende en H₂O (12 mL), se filtra en placa filtrante y se lava con agua (3x4 mL) y con un poco de éter (0,4 mL). Finalmente, el sólido amarillo (**L**₂) se seca a vacío.

η = 90,29 %; 262,79 mg; 0,92 mmol

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.63 (ddd, J = 4.8, 1.9, 0.9 Hz, 1H, CH (14)), 8.43 (dt, J = 8.0, 1.1 Hz, 1H, CH (11)), 7.90 – 7.77 (m, 2H, CH (6, 12)), 7.40 – 7.12 (m, 9H, CH (1, 2, 6, 13, 16, 17, 18, 19, 21)), 6.20 (s, 2H, CH₂ (22)). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 150.66 (C(10)), 148.60 (C (14)), 143.51 C(5), 142.77 (C (4)), 140.10 (C(8)), 137.47 (C (20)), 136.82 (C (12)), 128.55 (C (16, 18)), 127.31 (C (19, 21)), 126.79 (C (17)), 124.68 (C (11)), 123.81 (C (3)), 123.54 (C (1)), 122.76 (C (2)), 120.14 (C (6)), 110.74 (C (13)), 48.91 (CH₂ (22)). ESI: [**L**₂]⁺ = 285,35 calculado, [**L**₂]⁺ = 286,43 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPLEJO **C**₂:

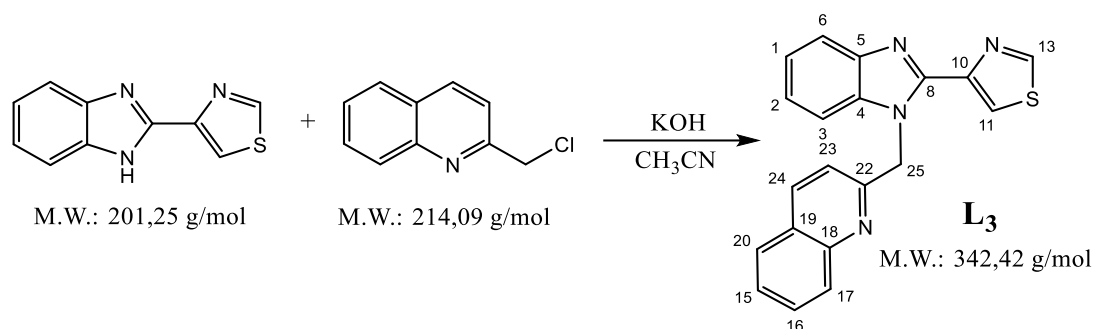


El ligando **L**₂ (39,95 mg; 0,14 mmol) se disuelve en DCM (4 mL) y se añade el compuesto **D** (75 mg; 0,07 mmol). La mezcla de reacción se agita y se calienta a reflujo durante 24 h a 45 °C. Pasado este tiempo se obtiene una disolución de color amarillo oscuro a la que se añade hexano (18 mL) para forzar el precipitado de un sólido que se filtra en placa filtrante y se lava con hexano (3x4 mL). El sólido amarillo (**C**₂) se purifica por cromatografía en columna de silica gel usando como eluyente la mezcla DCM/MeOH (9:1).

η = 84,84 %; 48,8 mg; 0,06 mmol

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.18 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.92 – 7.83 (m, 3H), 7.78 – 7.64 (m, 5H), 7.57 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.40 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.0 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.26 – 7.17 (m, 3H), 7.12 – 6.87 (m, 6H), 6.59 (q, J = 18.1 Hz, 2H), 6.44 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 6.38 (dt, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 6.30 (dd, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.17, 167.98, 153.02, 151.55, 151.04, 149.59, 148.89, 147.53, 146.62, 144.24, 143.84, 140.55, 139.40, 137.92, 137.76, 137.27, 135.35, 132.52, 131.79, 130.94, 130.25, 129.23, 128.15, 127.88, 127.80, 126.47, 126.33, 125.60, 124.90, 124.65, 123.32, 123.11, 122.66, 122.50, 119.55, 119.32, 118.44, 111.73, 49.16, NOTA: dos carbonos no se observan, posiblemente carbonos cuaternarios. ESI: [**C**₂]⁺ = 785,21 calculado, [**C**₂]⁺ = 786,22 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₃: 1-((quinolinil)-2-metil)-2-(4-tiazolil)benzimidazol

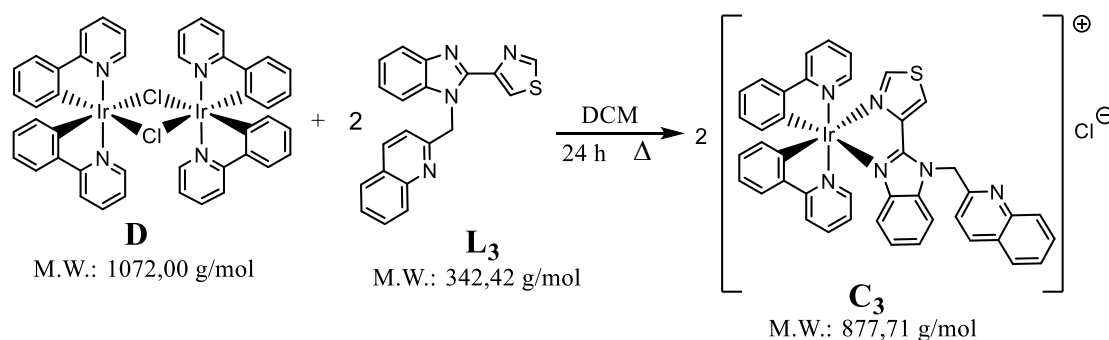


Se disuelve 2-(4-tiazolil)benzimidazol (200 mg; 0,99 mmol) en CH₃CN (7 mL) y se añade un exceso de KOH triturado, quedando una suspensión blanca que se agita durante diez minutos y a la que posteriormente se le añade 2-clorometilquinolina (211,95 mg; 0,99 mmol) quedando ahora la suspensión de color blanco hueso. La mezcla de reacción se deja agitando durante 48 h y pasado este tiempo se lleva a sequedad. Al sólido blanco se le añade H₂O (13 mL) obteniéndose una suspensión que se filtra en placa filtrante y se lava con agua (3x4 mL). Finalmente se hace un lavado con un poco de hexano (0,4 mL). Para purificar el sólido se disuelve en DCM (2 mL), quedando una fase líquida amarilla y sólido blanco que se separan por centrifugación. Se repite este proceso dos veces más y se combinan los lavados de DCM. Finalmente, esta fase orgánica se lleva a sequedad obteniéndose así el producto deseado (L₃) como un sólido blanco.

$\eta = 75,62\%$; 256,35 mg; 0,75 mmol

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, (CH (13)), 8.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H (CH, (11)), 8.15 – 8.08 (m, 1H, (CH (20)), 7.97 (dd, $J = 8.5, 0.8$ Hz, 1H, (CH (24)), 7.84 (dt, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H, (CH (6)), 7.77 – 7.71 (m, 2H, (CH (15, 17)), 7.52 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.2$ Hz, 1H, (CH (16)), 7.39 (dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, (CH (3)), 7.30 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H, CH (1)), 7.21 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H (CH (2)), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, (CH (23)), 6.37 (s, 2H, (CH₂ (25))). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.42 (C (22)), 153.11 (C (13)), 147.71 (C (18)), 147.64 (C (5)), 146.91 (C (10)), 143.04 (C (5)), 137.19 (C (24)), 136.08 (C (4)), 129.82 (C (17)), 129.02 (C (20)), 127.63 (C (8)), 127.35 (C (15)), 126.49 (C (16)), 123.46 (C (19)), 123.03 (C (2)), 121.41 (C (1)), 119.71 (C (11)), 118.68 (C (6)), 118.14 (C (23)), 110.82 (C (3)), 51.46 (CH₂ (25)). ESI: [L₃]⁺ = 342,42 calculado, [L₃]⁺ = 343,10 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO C₃:

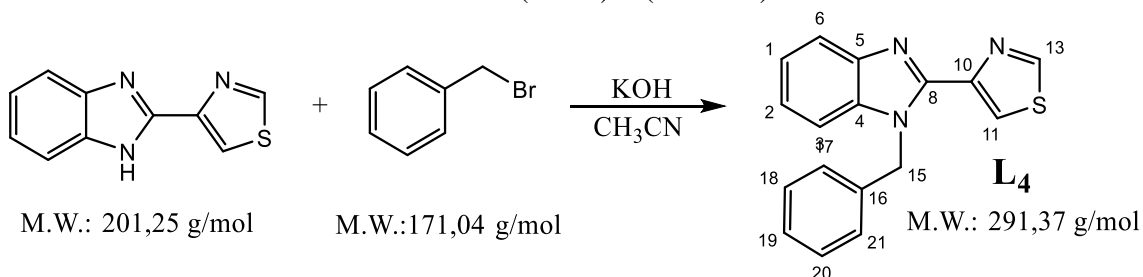


El compuesto L₃ (44,46 mg; 0,13 mmol) se disuelve en DCM (5 mL) y se añade el dímero D (70 mg; 0,65 mmol), quedando una suspensión amarilla que se agita y se somete a reflujo durante 24 h a una temperatura de 45 °C. Pasado este tiempo se obtiene una disolución transparente de color amarillo y se fuerza el precipitado del producto añadiendo hexano (19 mL). El sólido amarillo obtenido se filtra en placa filtrante y se lava con hexano (3x4 mL). Se purifica por cromatografía en columna de silica gel con una mezcla de eluyentes DCM/MeOH (9:1). Las fracciones de la columna conteniendo el producto deseado se combinan y se evapora hasta la obtención de un aceite marrón. La adición de éter (3x1 mL) y trituración del aceite marrón fuerza la aparición de un sólido amarillo que sigue sin estar puro completamente (disolvente contaminado). Una fracción del sólido se vuelve a purificar por columna con la misma mezcla de eluyentes para comprobar que realmente es el producto de reacción. Finalmente se obtiene un sólido amarillo, esta vez completamente puro (C₃).

$$\eta = 8,38^{\text{iii}} \% ; 9,56 \text{ mg} ; 0,011 \text{ mmol}$$

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.75 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.28 – 8.14 (m, 2H), 8.07 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.96 – 7.83 (m, 3H), 7.79 – 7.68 (m, 4H), 7.65 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.57 – 7.39 (m, 4H), 7.35 – 7.26 (m, 2H), 7.09 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.05 – 6.82 (m, 7H), 6.61 – 6.44 (m, 2H), 6.40 – 6.28 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.31, 168.15, 155.12, 154.19, 149.81, 149.50, 148.86, 148.69, 147.48, 147.44, 144.41, 144.30, 144.19, 139.52, 137.87, 137.70, 137.43, 136.96, 132.53, 132.18, 130.63, 130.18, 129.10, 129.07, 128.05, 127.86, 127.51, 126.55, 125.37, 124.81, 124.66, 124.63, 123.22, 123.13, 122.58, 122.40, 121.19, 119.45, 119.32, 118.01, 111.55, 50.11. ESI: [C₃]⁺ = 842,21 calculado, [C₃]⁺ = 843,19 experimental.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L₄: 1-(benzil)-2-(4-tiazolil)benzimidazol



Se disuelve 2-(4-tiazolil)benzimidazol (200 mg; 0,99 mmol) en CH₃CN (8 mL) y se añade un exceso de KOH triturado, quedando una suspensión blanca que se agita durante diez minutos y a la que posteriormente se le añade bromometilbenceno (118 μ l; 0,99 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y se obtiene una suspensión blanca, la cual se lleva a sequedad. El sólido blanco obtenido se resuspende en H₂O (13 mL) y se filtra en placa filtrante. Se lava con agua (2x4 mL) y con un poco de hexano (0,4 mL), obteniendo así el producto puro (L₄) que se seca a vacío.

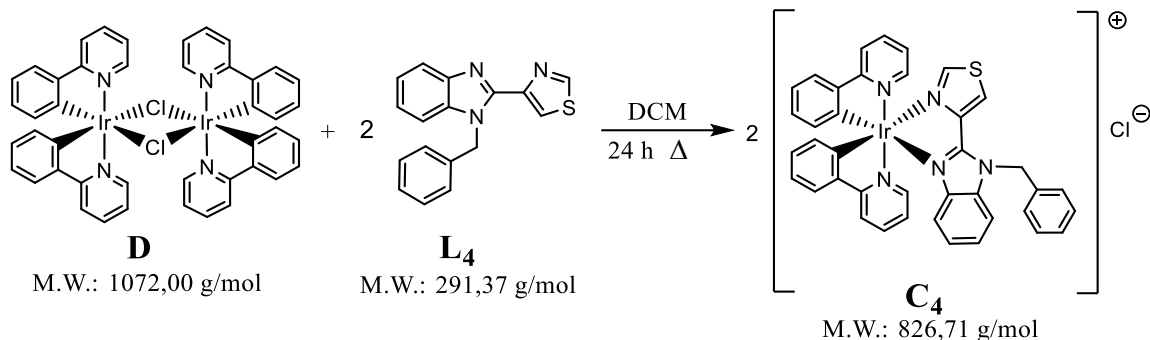
$$\eta = 105,25^{\text{iv}} \% ; 303,6 \text{ mg} ; 1,04 \text{ mmol}$$

ⁱⁱⁱ No es el rendimiento total de la reacción, sólo de la parte del sólido que ha sido purificado por completo.

^{iv} Rendimiento mayor que 100% por secado ineficiente del disolvente.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.89 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, (CH (13)), 8.40 – 8.35 (m, 1H, CH (11)), 7.83 (dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, (CH (6)), 7.36 – 7.24 (m, 3H, (CH (3, 18, 20)), 7.28 – 7.12 (m, 5H, (CH (1, 2, 17, 19, 21)), 6.09 (s, 2H, (CH (15)). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 152.99 (C (13)), 146.78 (C (10)), 136.97 (C (4)), 135.86 (C (16)), 128.66 (C (18, 20)), 127.50 (C (19)), 126.69 (C (17, 21)), 123.34 (C (2)), 122.92 (C (1)), 121.59 (C (11)), 119.64 (C (6)), 110.66 (C (3)), 48.56 (C (15)). NOTA: dos carbonos cuaternarios no se observan. ESI: $[\text{L}_4]^+ = 291,37$ calculado, $[\text{L}_4]^+ = 292,09$ experimental.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO C_4 :



Se disuelve el compuesto L_4 (40,07 mg; 0,14 mmol) en DCM (4 mL) y se añade el compuesto D (75 mg; 0,07 mmol) obteniéndose una suspensión amarilla que se calienta a reflujo durante 24 horas a 45°C . Pasado este tiempo queda una disolución de color marrón-verde a la que se añade hexano (14 mL) para favorecer la precipitación de un sólido amarillo (C_4) que posteriormente es filtrado en placa filtrante, lavado con hexano (3x4 mL) y se seca a vacío.

$\eta = 72,08\%$; 83,43 mg; 0,1 mmol

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.86 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.91 – 7.58 (m, 6H), 7.49 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.20 (s, 5H), 7.12 – 6.67 (m, 4H), 6.63 – 6.21 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.09, 167.86, 155.24, 149.52, 148.71, 148.47, 148.25, 147.12, 144.19, 144.05, 142.93, 139.22, 137.85, 137.62, 136.42, 134.93, 132.37, 132.06, 130.49, 130.07, 129.17, 128.98, 127.93, 126.45, 125.61, 125.05, 124.53, 124.50, 123.13, 122.95, 122.51, 122.30, 119.37, 119.12, 118.00, 111.41, 48.52. ESI: $[\text{C}_4]^+ = 791,21$ calculado, $[\text{C}_4]^+ = 792,17$ experimental.

5. CONCLUSIONES

En la búsqueda de agentes teragnósticos de metales de transición, se ha llevado a cabo la síntesis de cuatro complejos de iridio (III) de 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 (ppy) y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ es un ligando N-dador polidentado derivado de 2-(2-piridil)benzimidazol (L_1 y L_2) o 2-(4-tiazolil)benzimidazol (L_3 , L_4) que contienen un cromóforo orgánico en su estructura. Tanto los ligandos como los complejos metálicos han sido caracterizados por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN y espectrometría de masas. Además, se realizó de todos ellos espectroscopia bidimensional HSQCH y COSY para asegurar la asignación correcta de las señales del mayor número de compuestos posibles.

Una vez se han sintetizado y caracterizado los complejos, se han estudiado sus propiedades fotofísicas por espectroscopía de UV-vis y de fluorescencia. Los espectros de absorción de UV-vis mostraban un perfil que se correspondía con lo esperado para complejos de iridio (III) con transiciones a alta energía correspondientes a transiciones LC, y bandas de menor intensidad a 315-385 nm asignadas a transiciones $^1\text{LLCT}$ y $^1\text{MLCT}$. Además, se observó en todos los casos una cola más allá de los 400 nm que se asigna a transiciones $^3\text{MLCT}$. Por otro lado, la espectroscopía de fluorescencia mostró que los espectros de emisión están condicionados por la naturaleza del ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$, teniendo los compuestos C_1 y C_2 bandas de emisión en torno a 604 nm y emitiendo con color naranja, mientras que los compuestos C_3 y C_4 presentan sus bandas de emisión estructuradas con picos en torno a 485 y 512 nm y que por lo tanto emiten en color verde. La gran intensidad del brillo del fragmento metálico enmascara la del cromóforo, lo que muestra la importancia de seguir desarrollando ligandos $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ con cromóforos de mayor intensidad emisiva, como la 9-(bromometil)acridina, cuya síntesis sigue en proceso de estudio.

Los estudios biológicos de los complejos en células cancerígenas A549 de pulmón muestran una gran citotoxicidad incluso a concentraciones muy bajas con valores de IC_{50} entre 0,30 y 2,82 μM . Por ello, en principio, estos compuestos no podrían ser utilizados en terapia fotodinámica, ya que se necesita que los compuestos solo muestren su citotoxicidad cuando se irradian y no antes, y este no es el caso. De todas formas, se ha demostrado que la irradiación de los compuestos C_1 - C_4 a 470 nm durante 10 min incrementa esta citotoxicidad, llegando a valores de IC_{50} 0,07 μM excepto en el caso de C_3 que se mantiene invariable en 0,21 μM antes y después de irradiar. Si nos fijamos ahora en el fragmento cromóforo, se podría pensar que los compuestos conteniendo un fenilo presentan una mejor predisposición para ser utilizados como agentes PSs. De los valores de IC_{50} obtenidos se deduce que el grupo cromóforo parece tener mayor importancia en las propiedades biológicas de la que se creía.

Por último, los análisis de biodistribución revelan que los complejos son capaces de atravesar la membrana plasmática y, una vez que lo han hecho, se distribuyen por el citoplasma sin llegar a penetrar en el núcleo. No se observa una colocalización en los lisosomas; haría falta seguir haciendo ensayos biológicos para conocer la localización exacta de los complejos.

Como conclusión final se puede decir que se han desarrollado cuatro compuestos luminiscentes de iridio que muestran una alta citotoxicidad en células cancerígenas de pulmón y pueden ser visualizados en las células por técnicas de fluorescencia aunando terapia e imagen celular en un solo compuesto. Se necesita seguir trabajando para su optimización.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S.-G. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater. Res.* **2018**, *22* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
- (2) 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>.
- (3) Ferri, K. F.; Kroemer, G. Organelle-Specific Initiation of Cell Death Pathways. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3* (11), E255–E263. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-e255>.
- (4) Nam, J. S.; Kang, M.-G.; Kang, J.; Park, S.-Y.; Lee, S. J. C.; Kim, H.-T.; Seo, J. K.; Kwon, O.-H.; Lim, M. H.; Rhee, H.-W.; Kwon, T.-H. Endoplasmic Reticulum-Localized Iridium(III) Complexes as Efficient Photodynamic Therapy Agents via Protein Modifications. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (34), 10968–10977. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05302>.
- (5) Gao, G.-L.; Yang, C.; Xia, W. Selective C–H Trifluoromethylation of Benzimidazoles through Photoredox Catalysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (6), 1041–1044. <https://doi.org/10.1039/C6CC08975E>.
- (6) Shavaleev, N. M.; Bell, Z. R.; Easun, T. L.; Rutkaite, R.; Swanson, L.; Ward, M. D. Complexes of Substituted Derivatives of 2-(2-Pyridyl)Benzimidazole with Re(i), Ru(II) and Pt(II): Structures, Redox and Luminescence Properties. *Dalton Trans.* **2004**, No. 21, 3678. <https://doi.org/10.1039/b411341a>.
- (7) Vaquero, M.; Busto, N.; Fernández-Pampín, N.; Espino, G.; García, B. Appended Aromatic Moieties Determine the Cytotoxicity of Neutral Cyclometalated Platinum(II) Complexes Derived from 2-(2-Pyridyl)Benzimidazole. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (7), 4961–4971. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00219>.
- (8) 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>.
- (9) Dragonetti, C.; Falciola, L.; Mussini, P.; Righetto, S.; Roberto, D.; Ugo, R.; Valore, A.; De Angelis, F.; Fantacci, S.; Sgamellotti, A.; Ramon, M.; Muccini, M. The Role of Substituents on Functionalized 1,10-Phenanthroline in Controlling the Emission Properties of Cationic Iridium(III) Complexes of Interest for Electroluminescent Devices. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (21), 8533–8547. <https://doi.org/10.1021/ic700414z>.
- (10) Castor, K. J.; Metera, K. L.; Tefashe, U. M.; Serpell, C. J.; Mauzeroll, J.; Sleiman, H. F. Cyclometalated Iridium(III) Imidazole Phenanthroline Complexes as Luminescent and Electrochemiluminescent G-Quadruplex DNA Binders. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (14), 6958–6967. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00921>.
- (11) Langdon-Jones, E. E.; Ward, B. D.; Pope, S. J. A. Synthesis and Luminescence Properties of Cyclometalated Iridium(III) Complexes Incorporating Conjugated Benzotriazole Units. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *861*, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.02.019>.

ANEXOS

MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

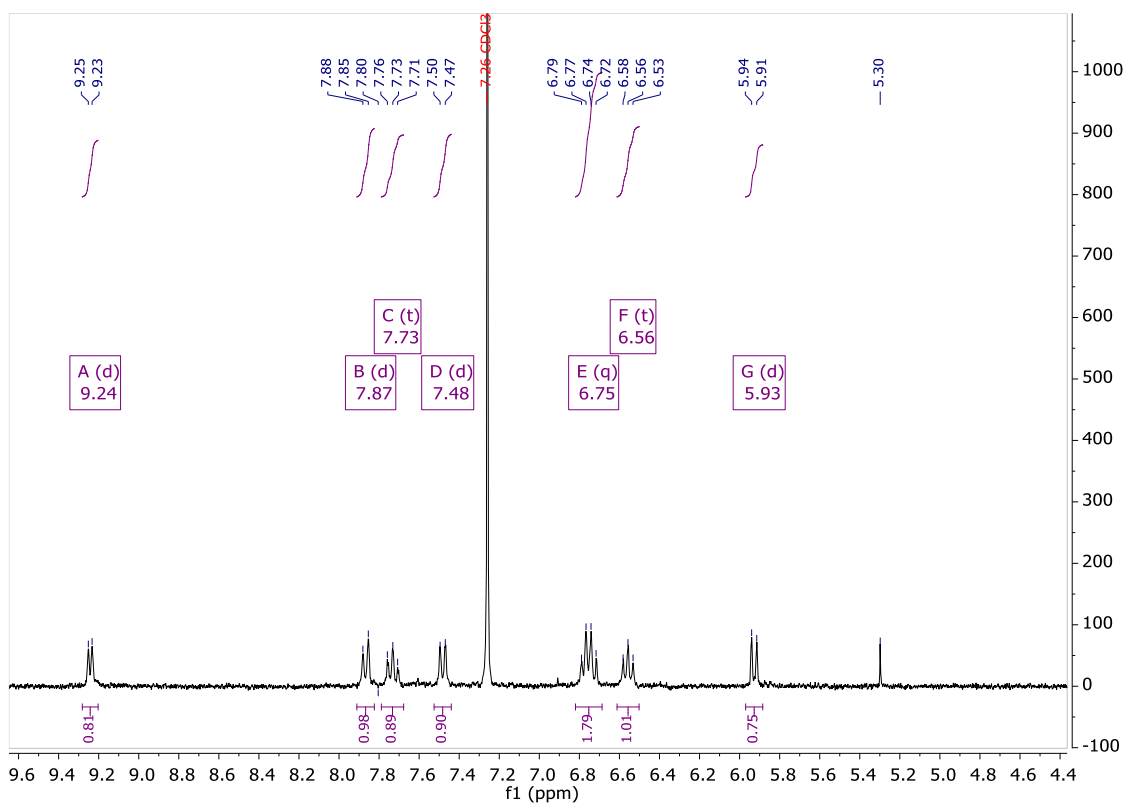
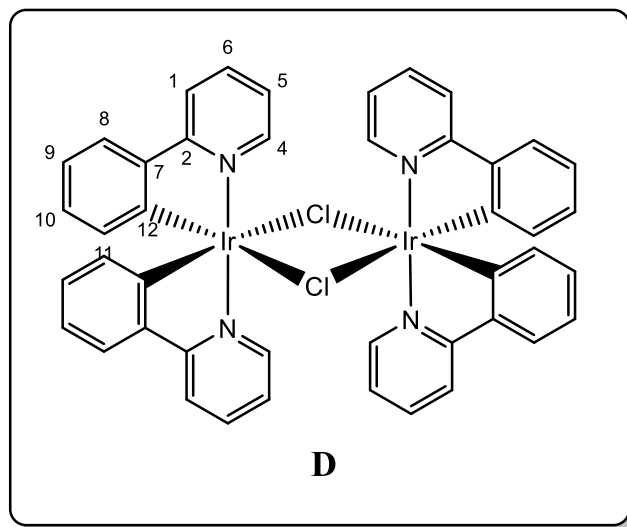


Figura 7.1. Espectro del dímico de Ir(III), $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\mu\text{-Cl})_2]$, realizado en CDCl_3

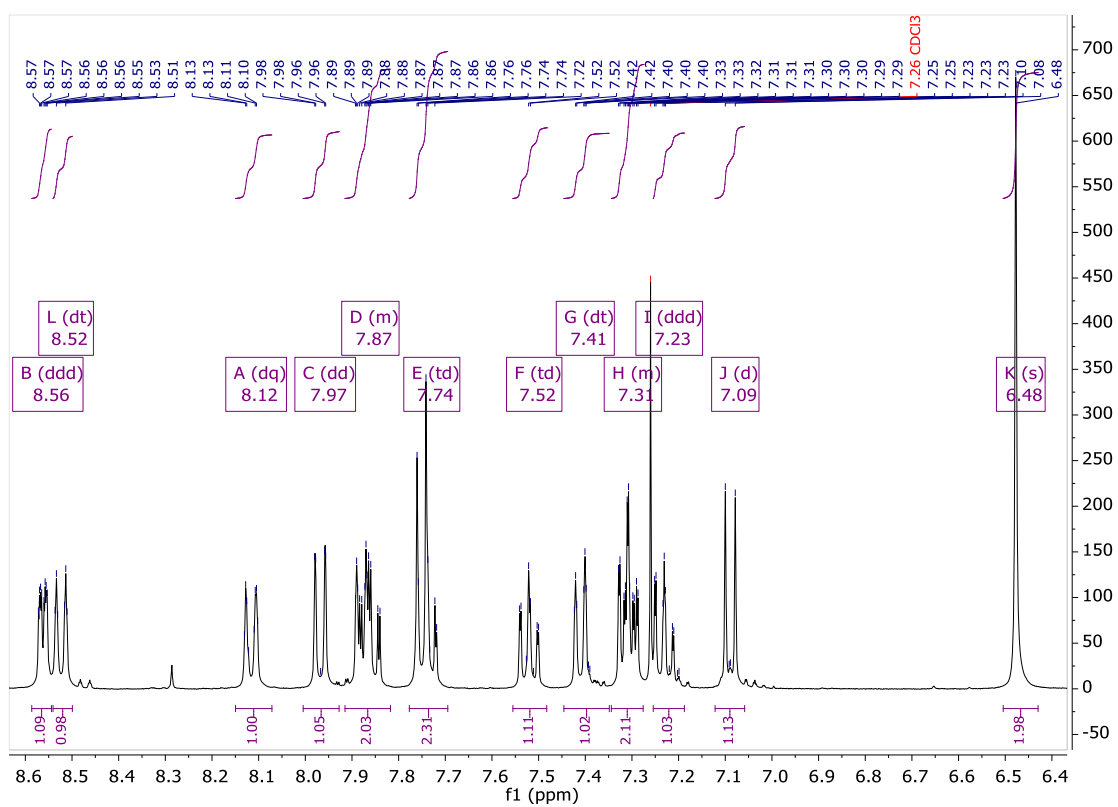
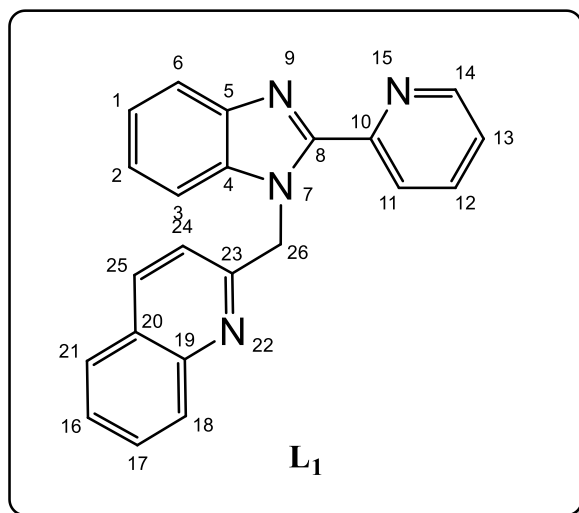


Figura 7.2. Espectro de ¹H-RMN de L₁ realizado en CDCl₃

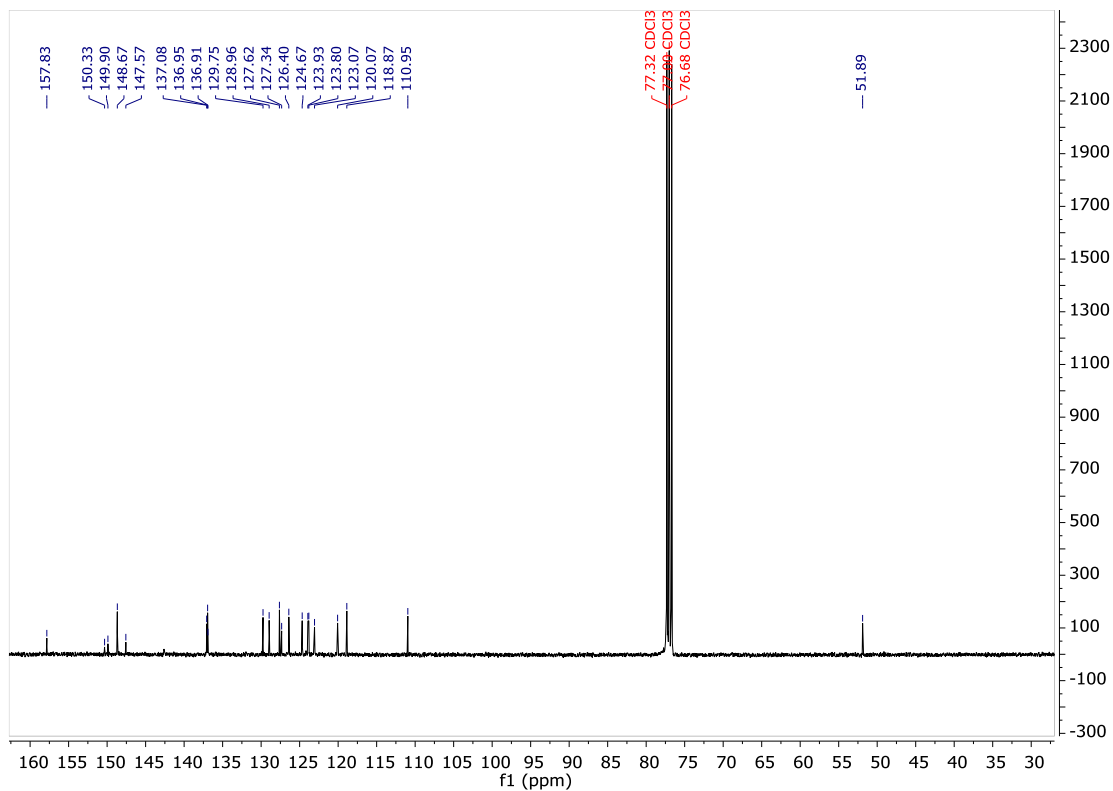


Figura 7.3. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de L_1 realizado en CDCl_3

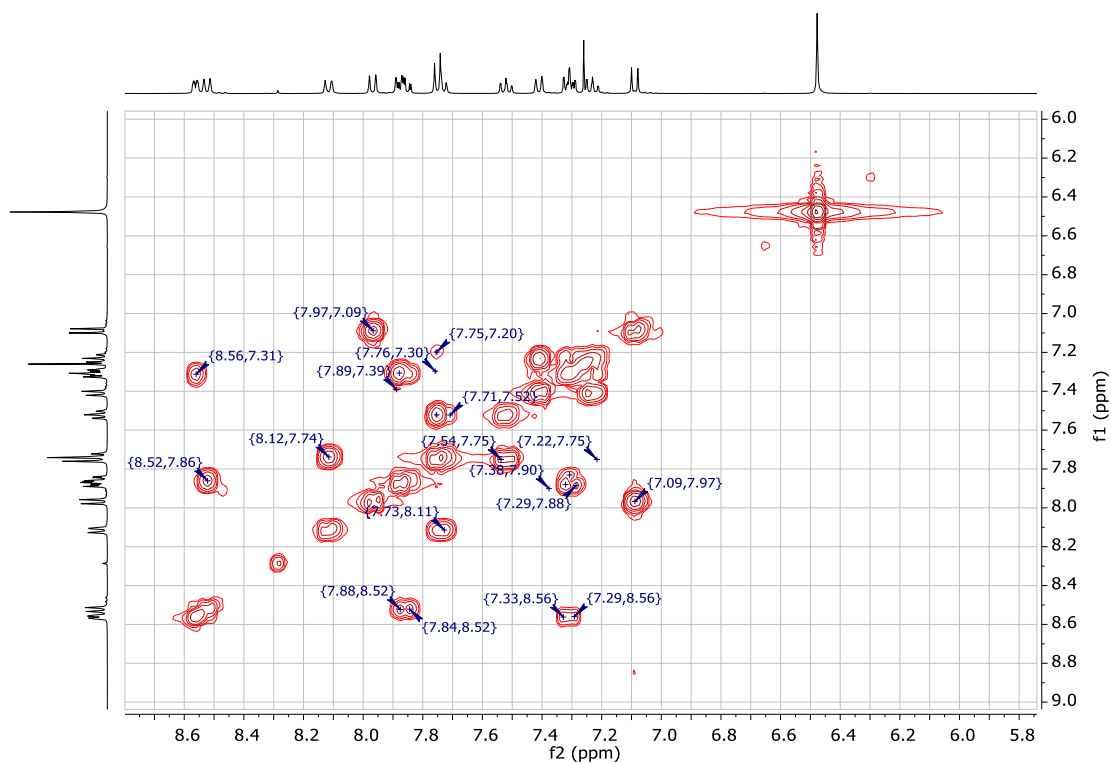


Figura 7.4. Espectro bidimensional COSY de L_1 realizado en CDCl_3

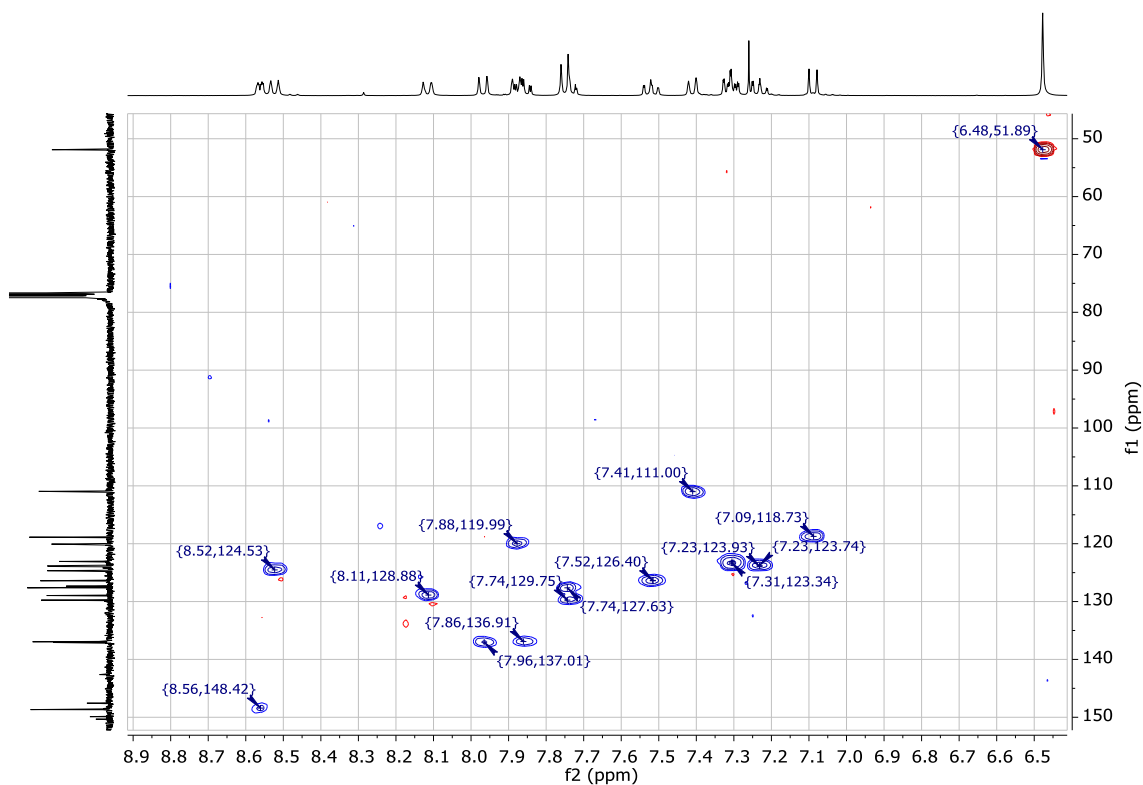


Figura 7.5. Espectro bidimensional HSQC de L_1 realizado en $CDCl_3$

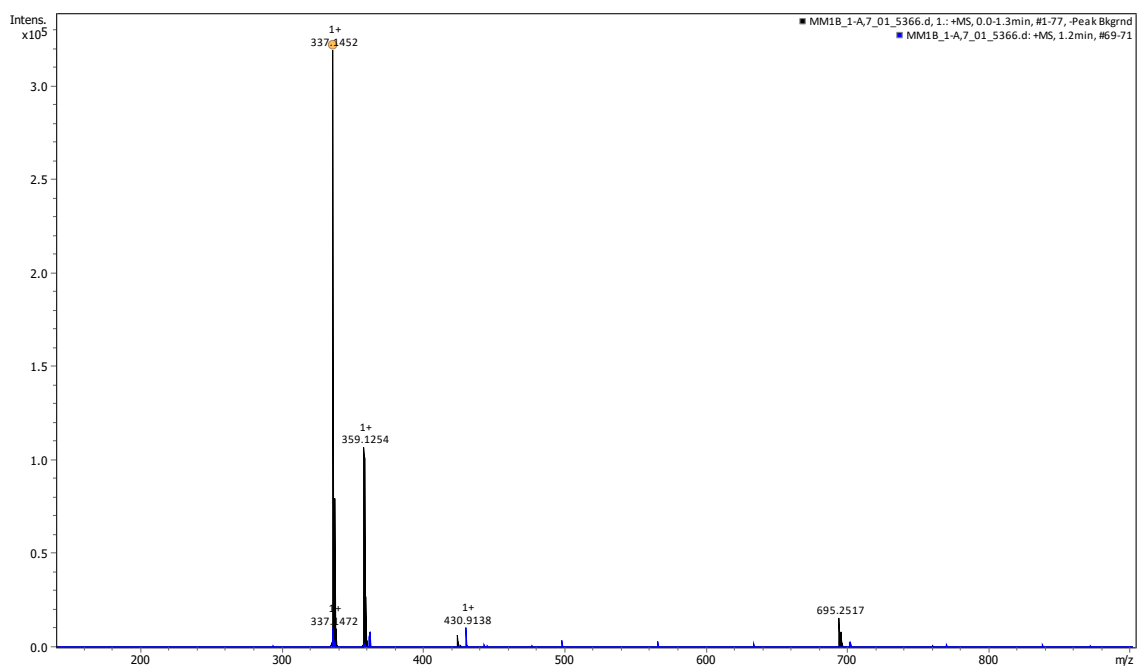


Figura 7.6. Espectro de masas ESI de L_1 .

ESI: $[L_1]^+ = 336,40$ calculado, $[L_1]^+ = 337,15$ experimental

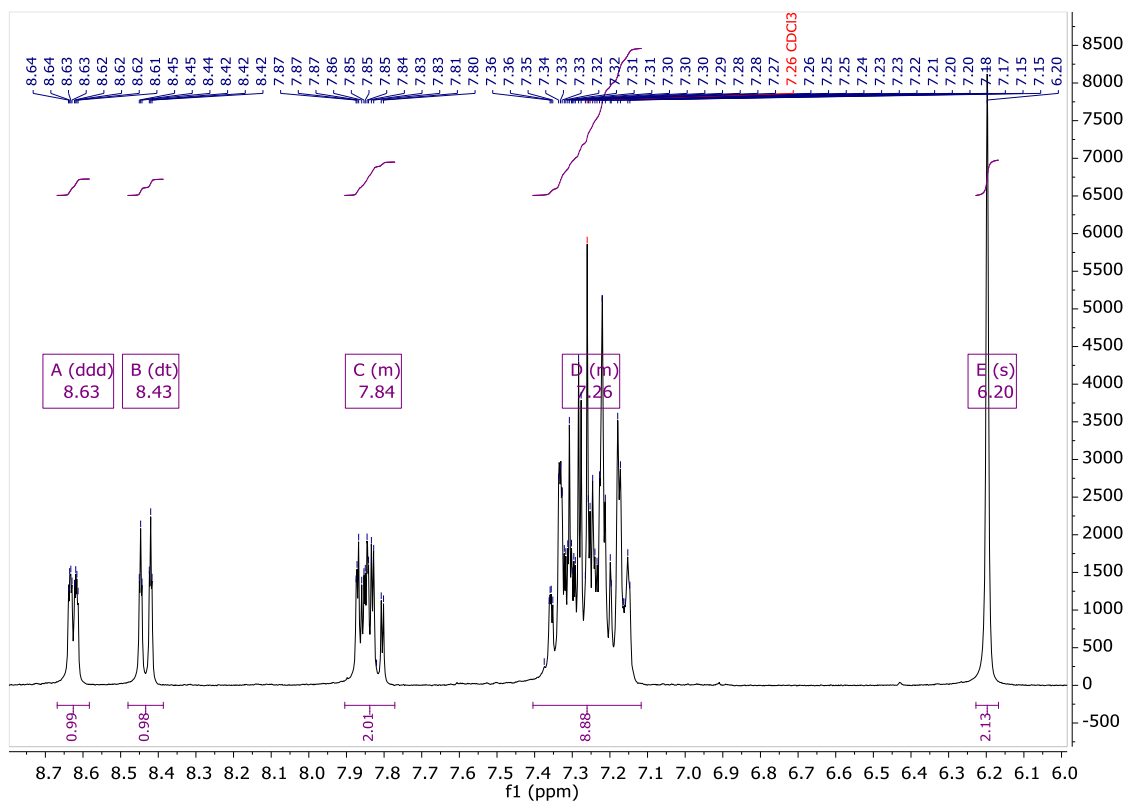
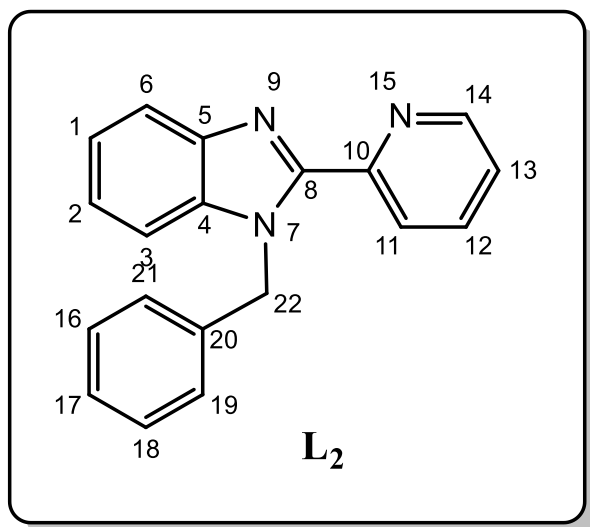


Figura 7.7. Espectro de ¹H-RMN de L₂ realizado en CDCl₃

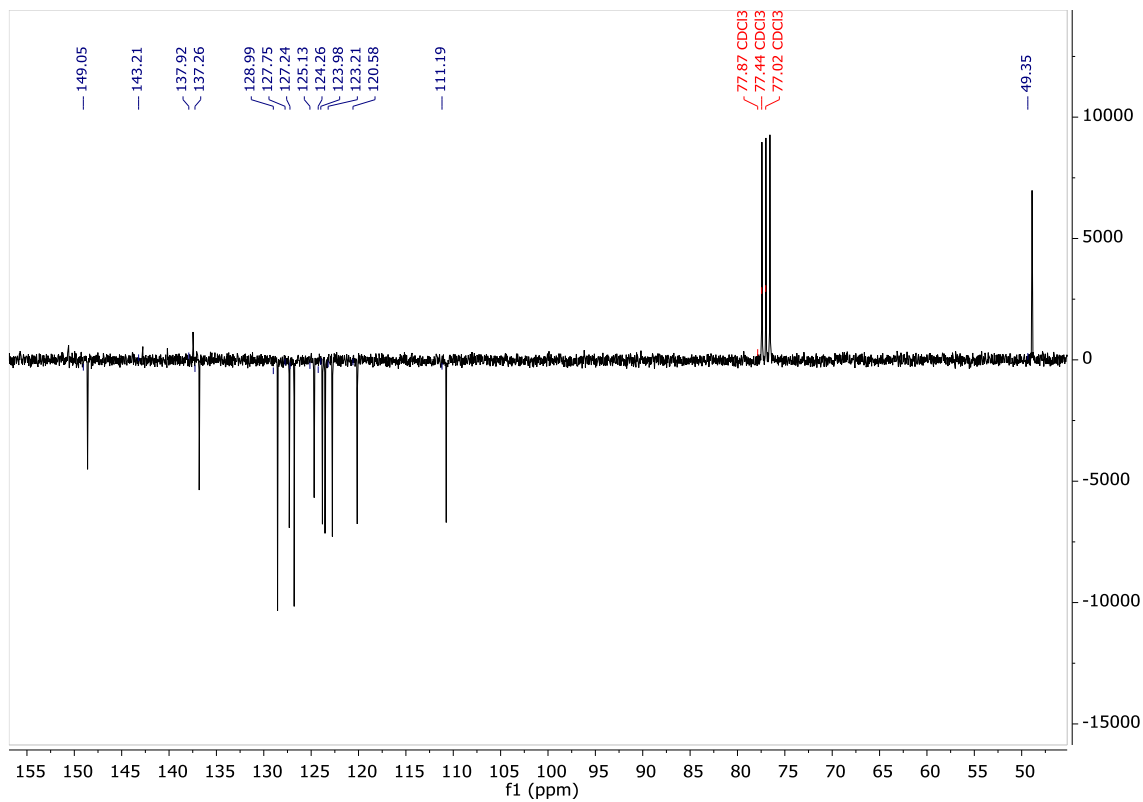


Figura 7.8. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de L_2 realizado en CDCl_3

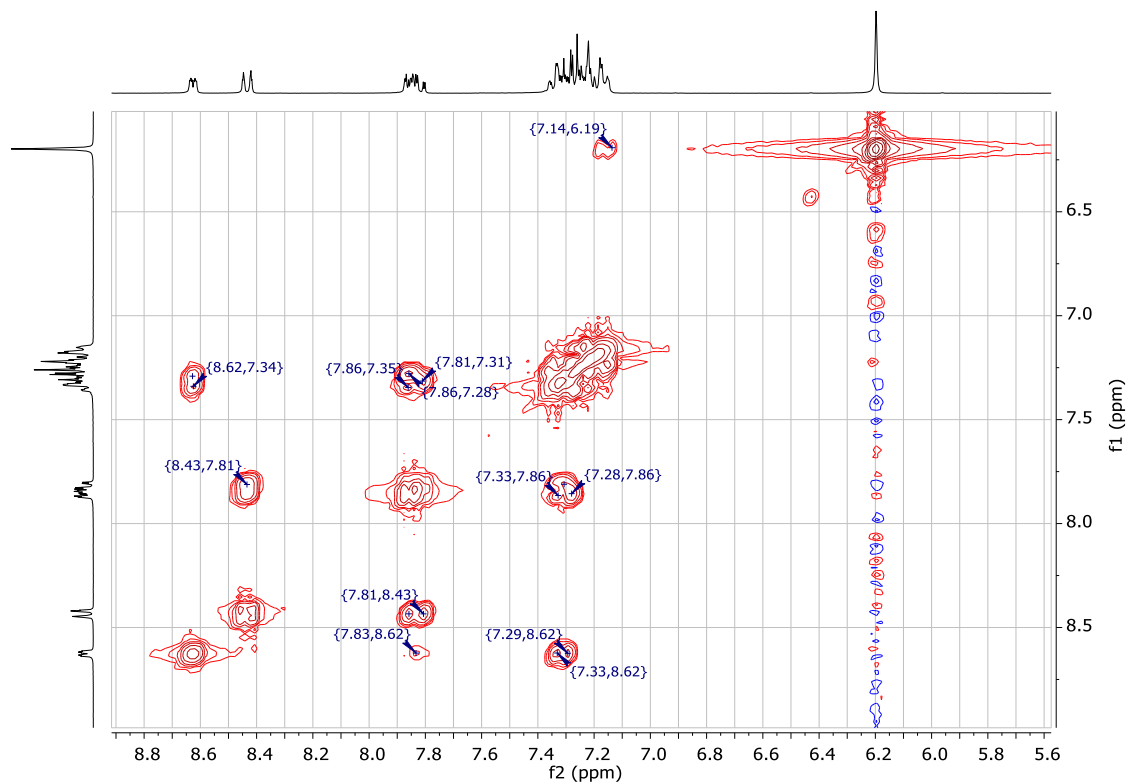


Figura 7.9. Espectro bidimensional COSY de L_2 realizado en CDCl_3

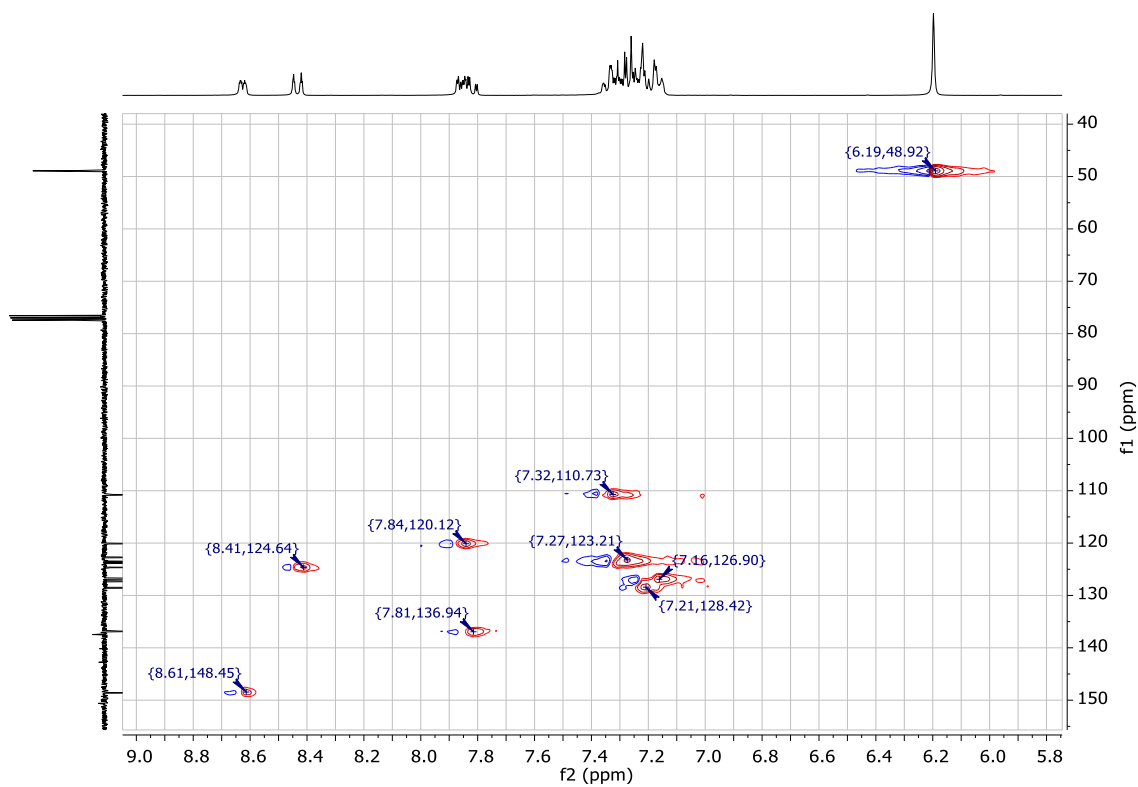


Figura 7.10. Espectro bidimensional HSQC de L_2 realizado en $CDCl_3$

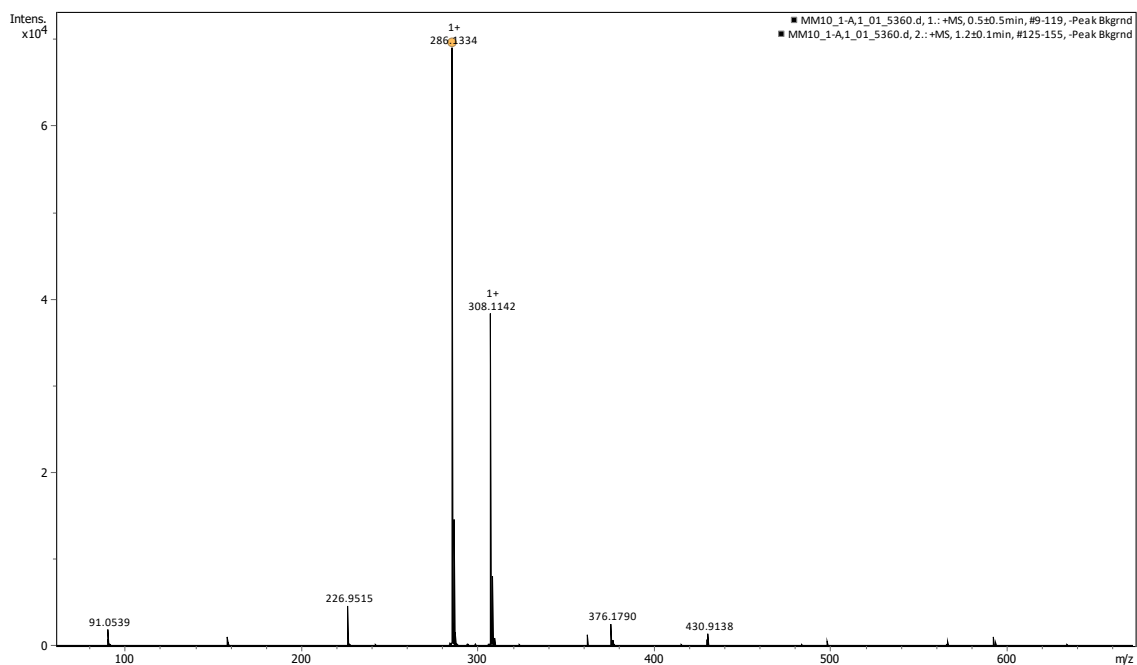


Figura 7.11. Espectro de masas ESI de L_2 .

ESI: $[L_2]^+ = 285,35$ calculado, $[L_2]^+ = 286,43$ experimental

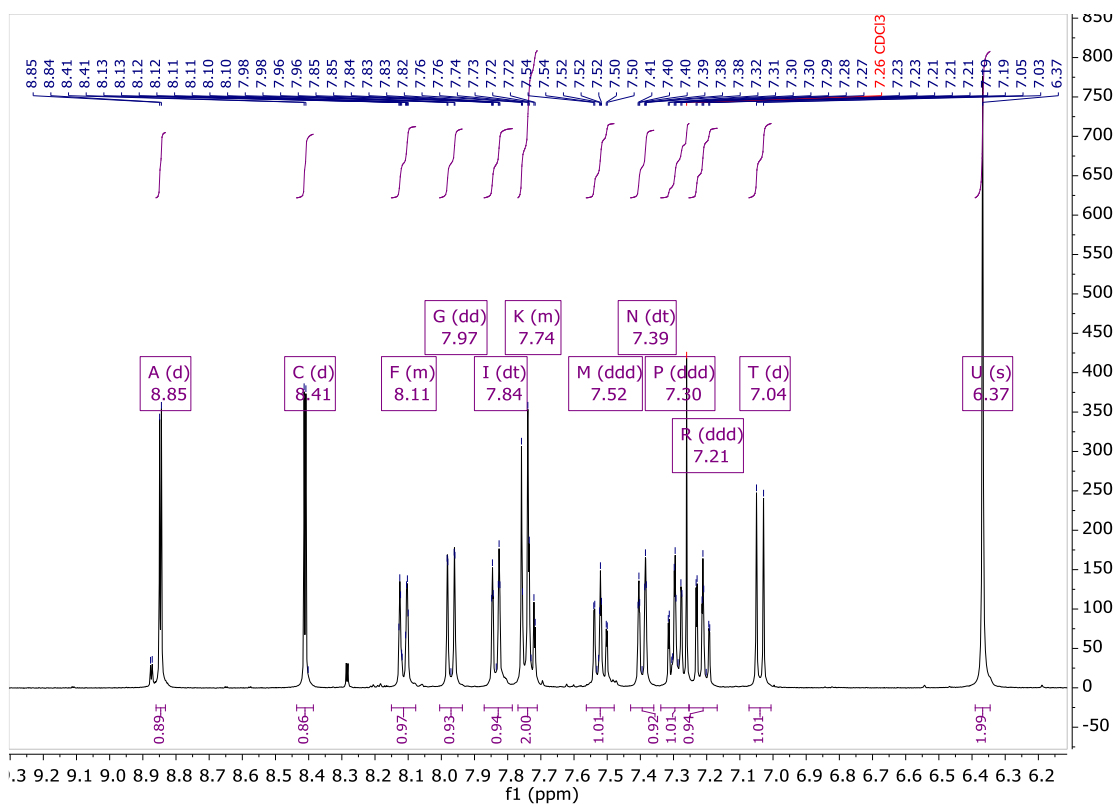
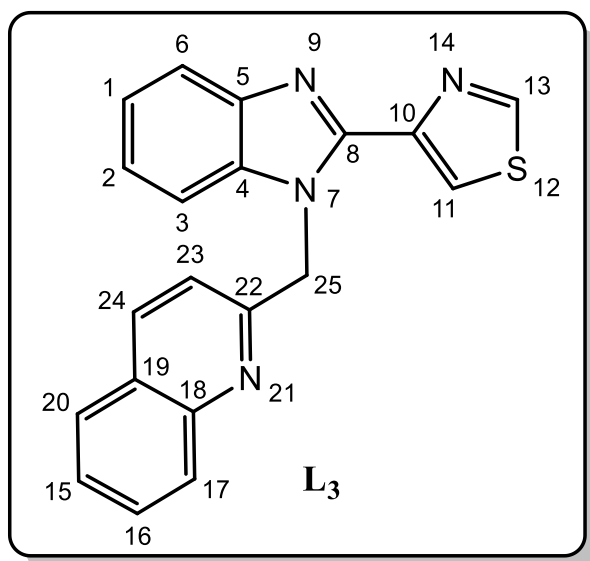


Figura 7.12. Espectro de ¹H-RMN de L₃ realizado en CDCl₃

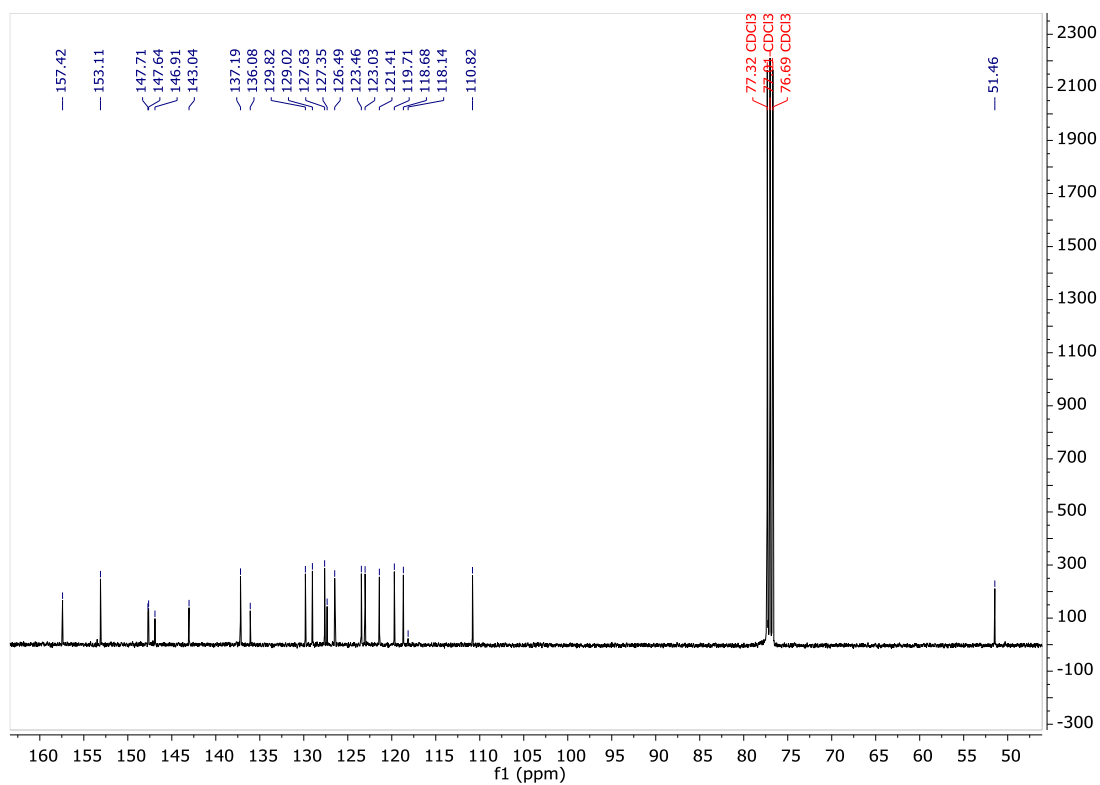


Figura 7.13. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de L_3 realizado en CDCl_3

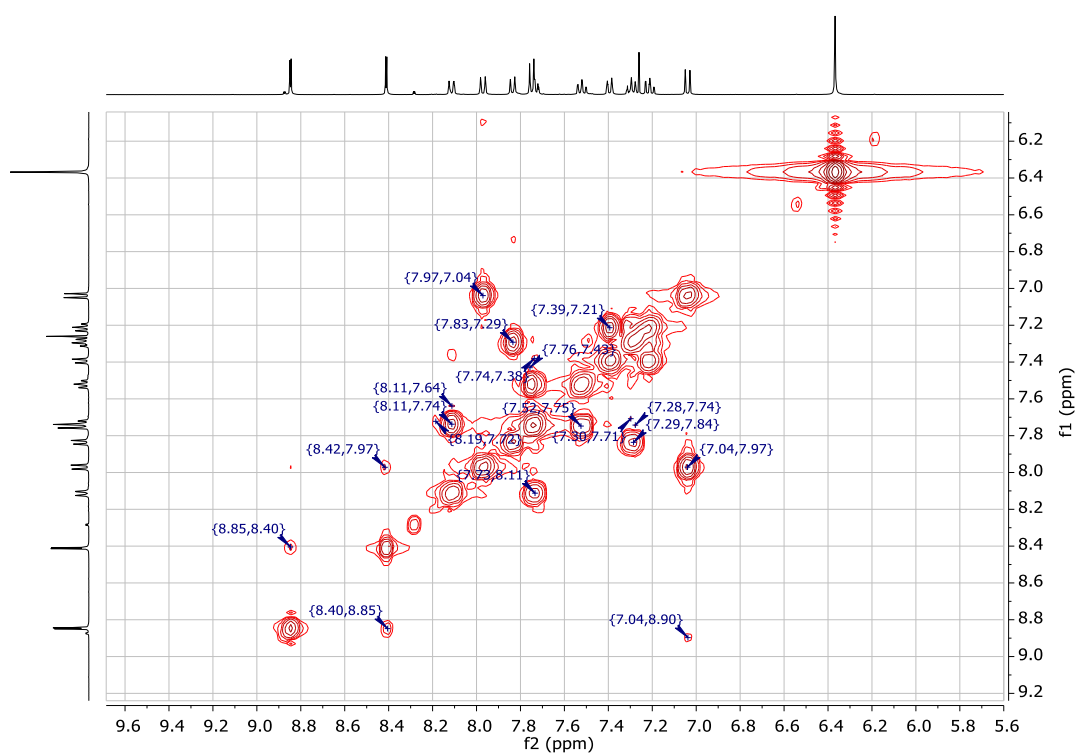


Figura 7.14. Espectro bidimensional COSY de L_3 realizado en CDCl_3

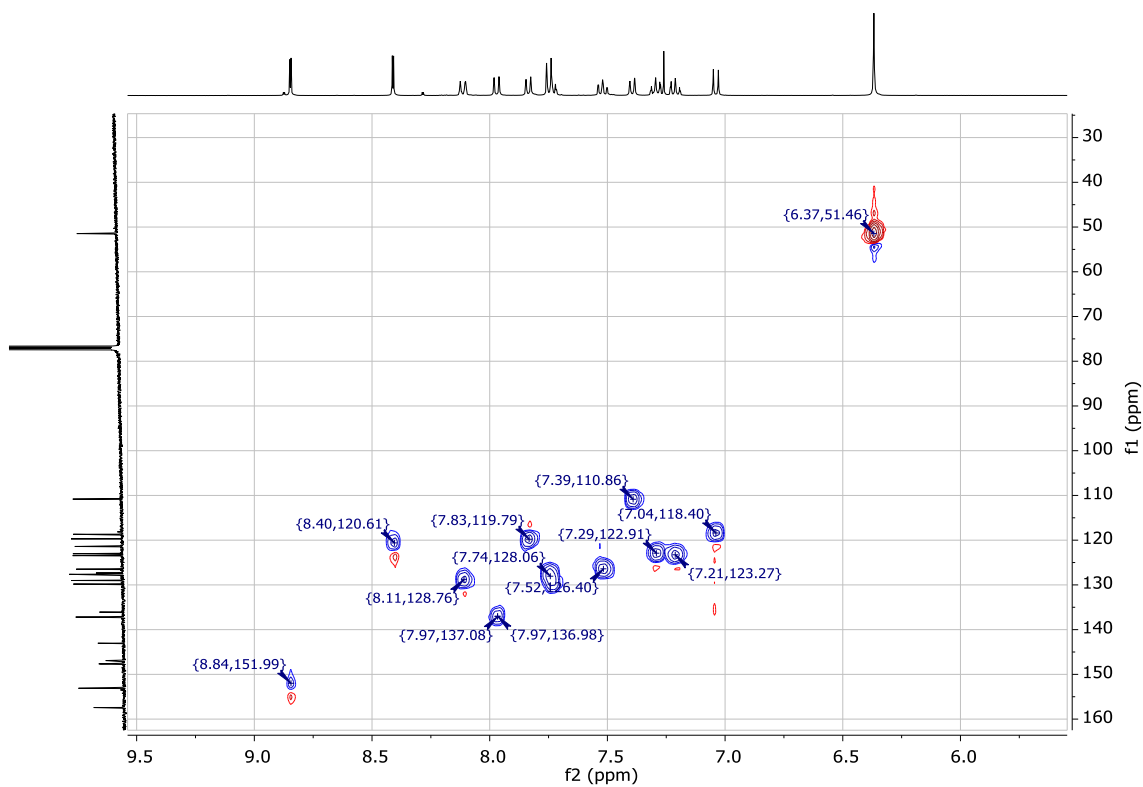


Figura 7.15. Espectro bidimensional HSQC de L_3 realizado en $CDCl_3$

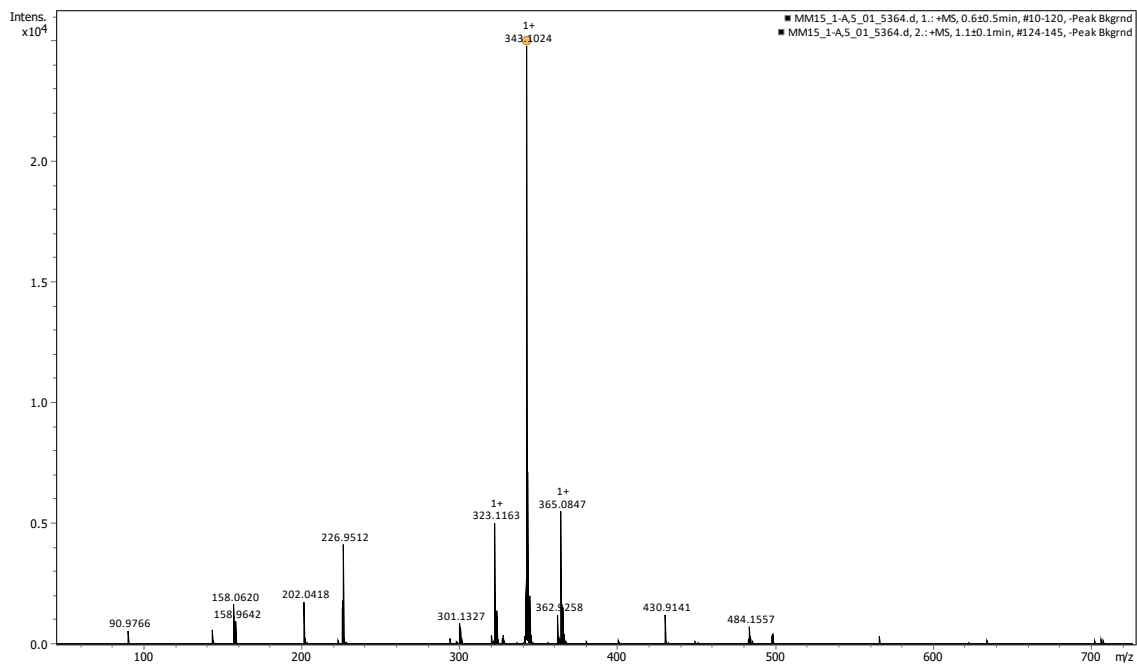


Figura 7.16. Espectro de masas ESI de L_3 .

ESI: $[L_3]^+ = 342,42$ calculado, $[L_3]^+ = 343,10$ experimental

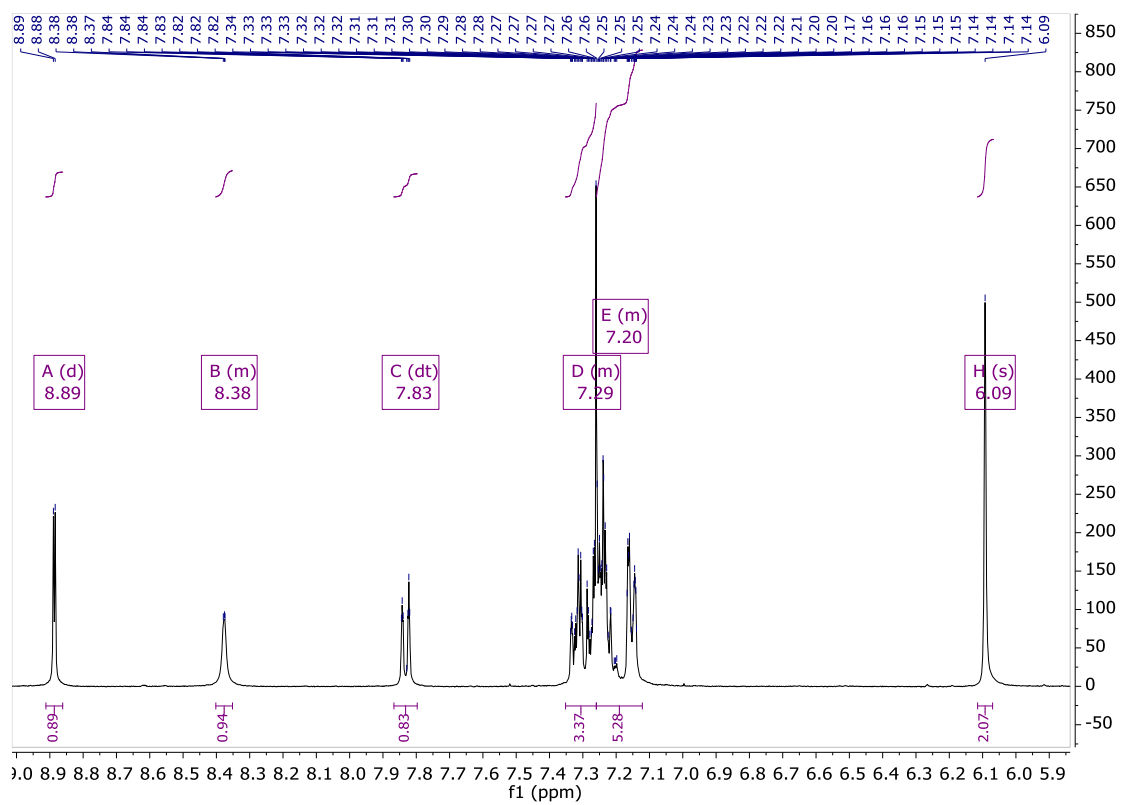
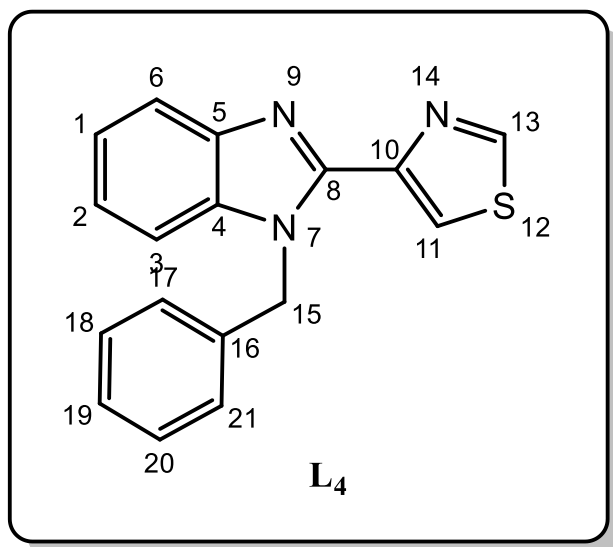


Figura 7.17. Espectro de ¹H-RMN de L₄ realizado en CDCl₃

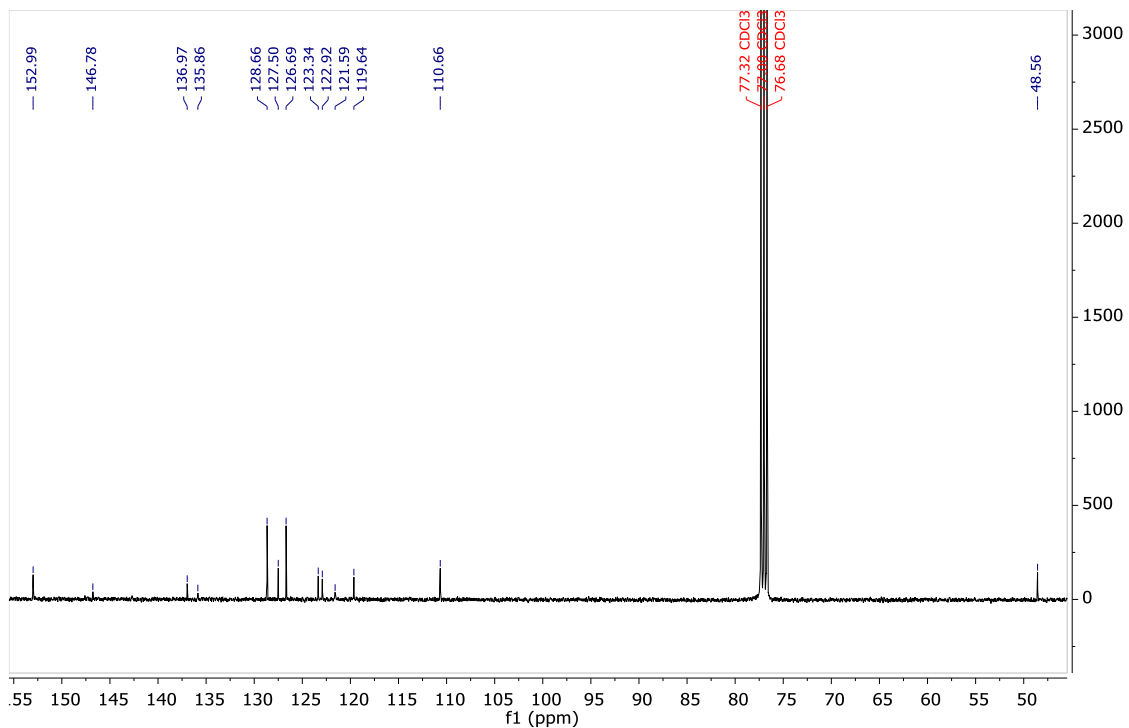


Figura 7.18. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de L_4 realizado en CDCl_3

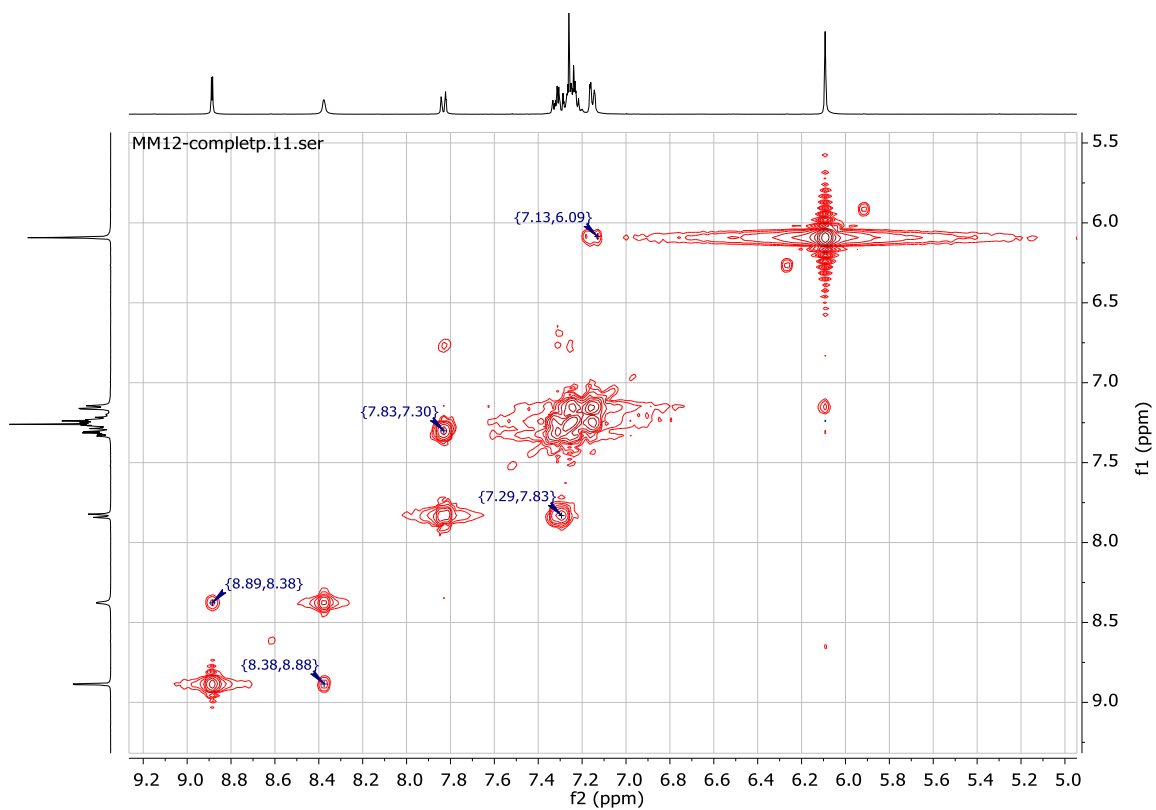


Figura 7.19. Espectro bidimensional COSY de L_4 realizado en CDCl_3

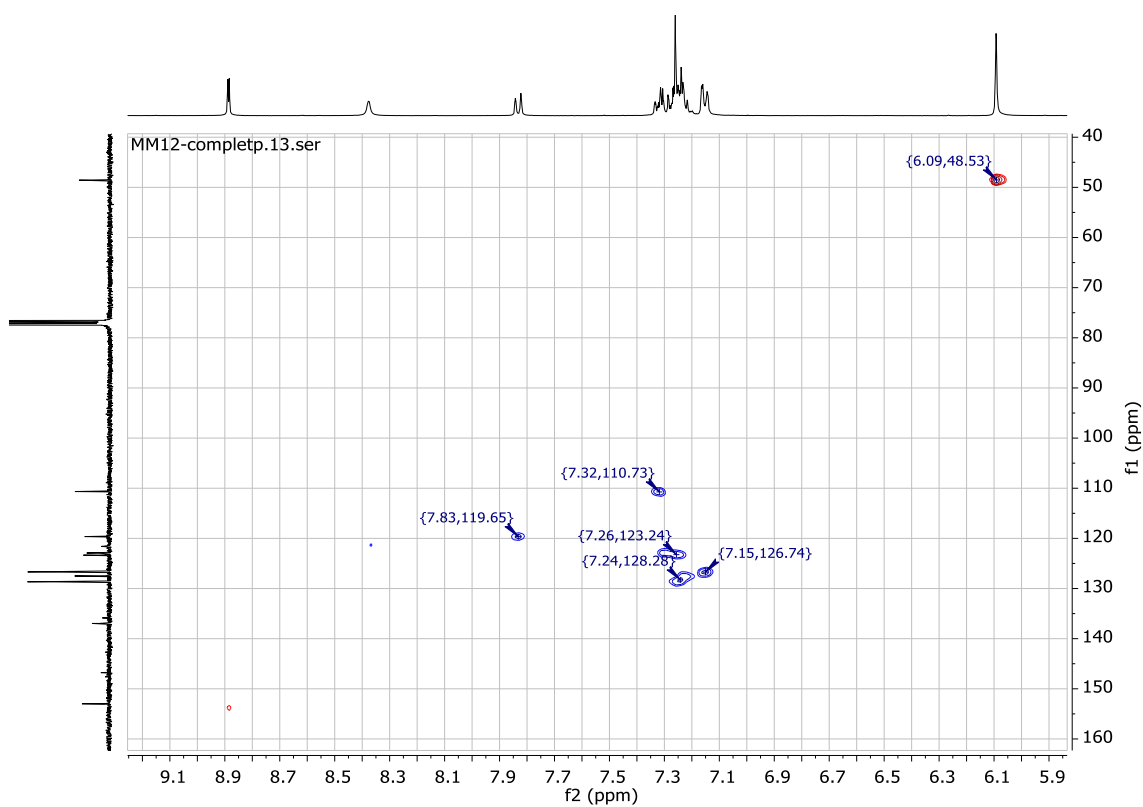


Figura 7.20. Espectro bidimensional HSQC de L_4 realizado en $CDCl_3$

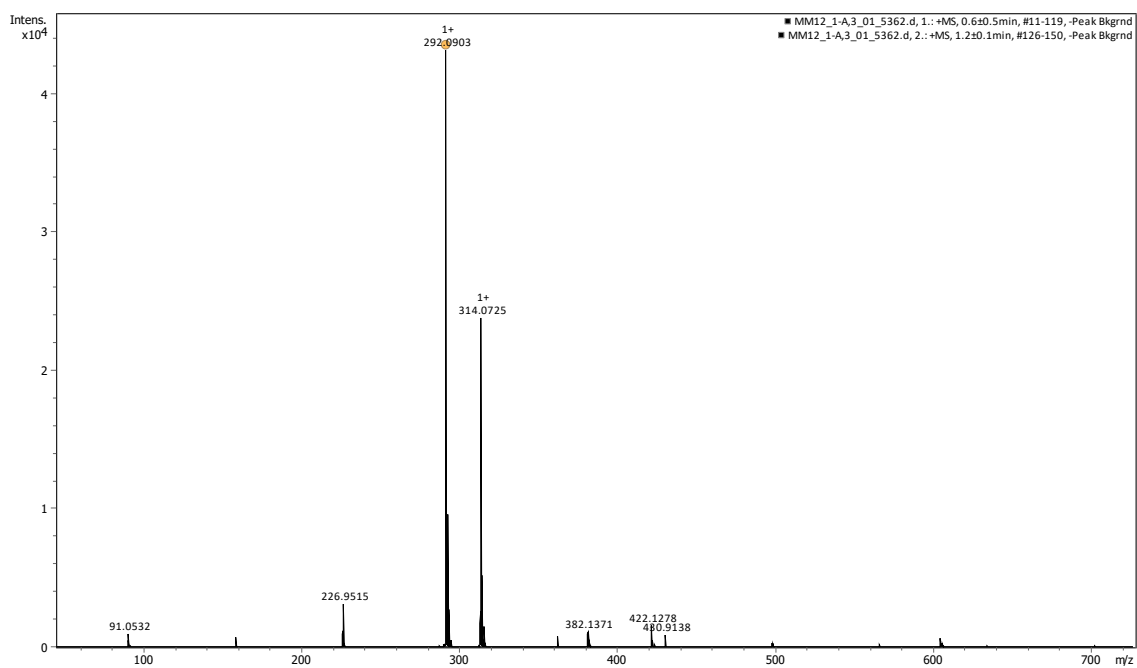


Figura 7.21. Espectro de masas ESI de L_4 .

ESI: $[L_4]^+ = 291,37$ calculado, $[L_4]^+ = 292,09$ experimental

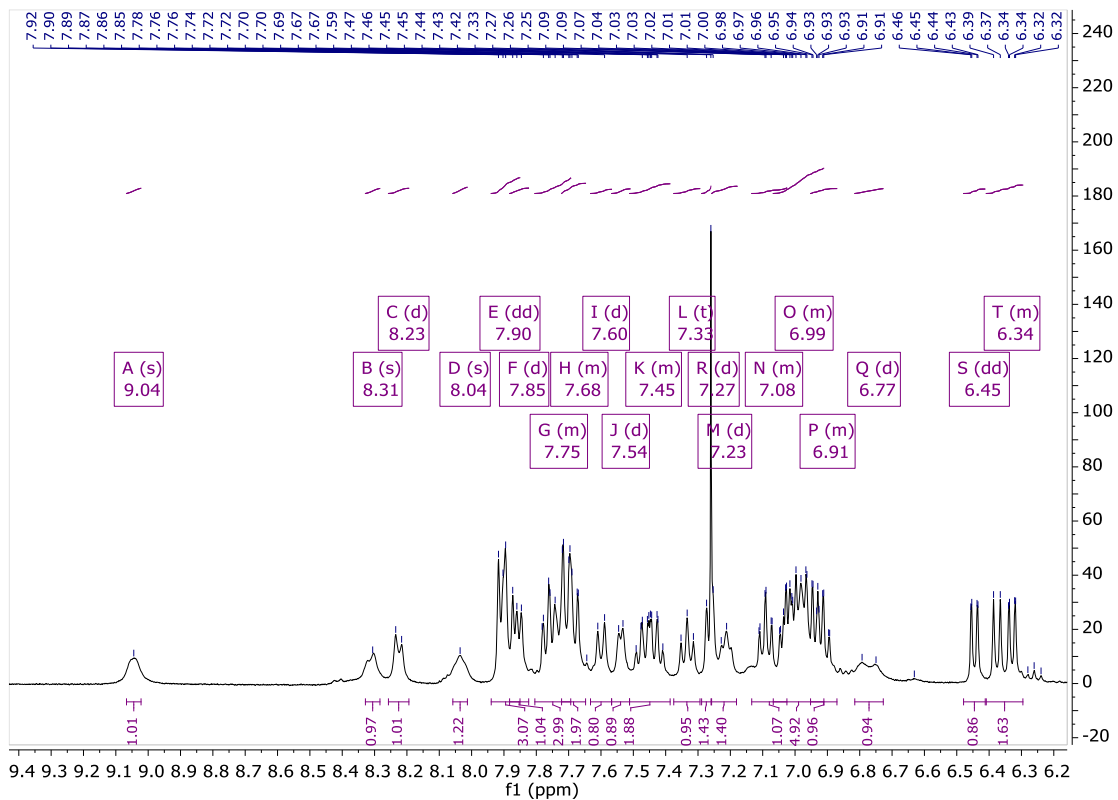
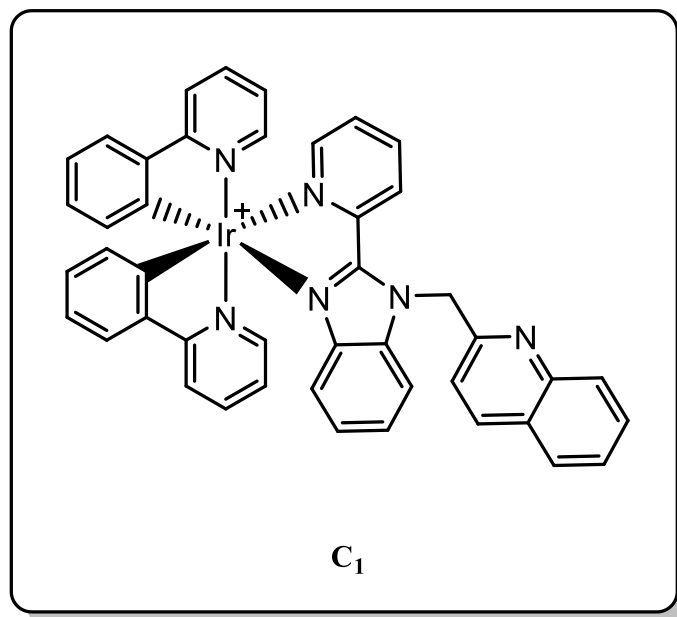


Figura 7.22. Espectro de ¹H-RMN de C₁ realizado en CDCl₃

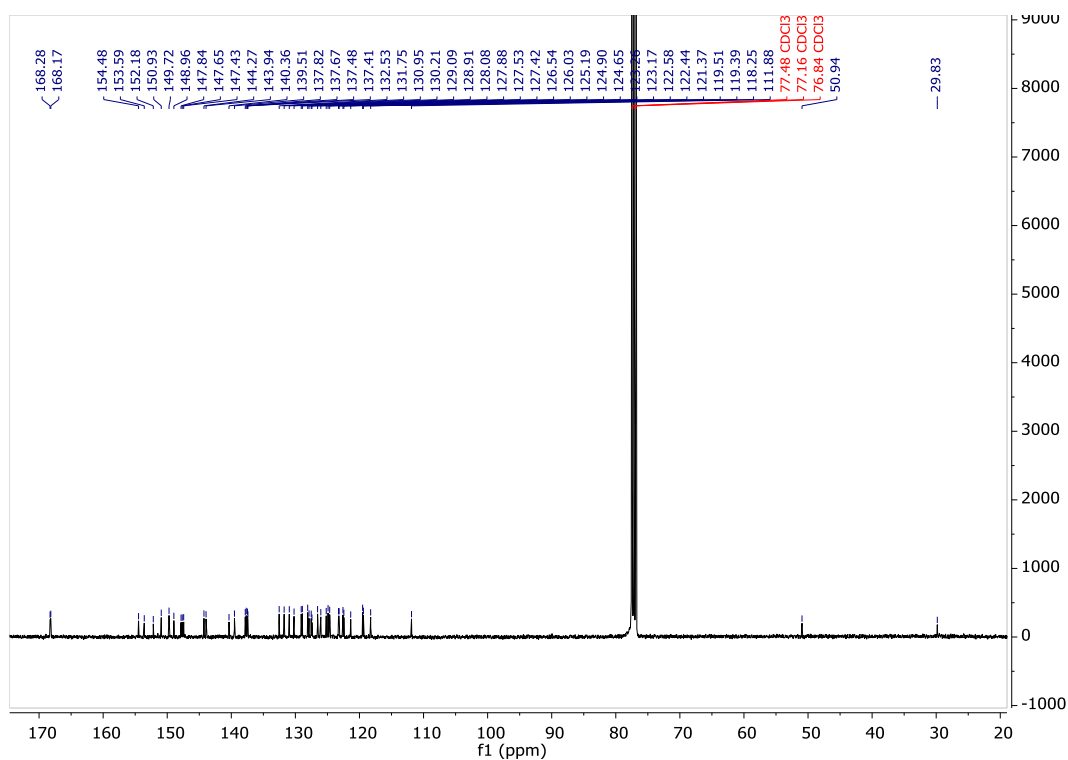


Figura 7.23. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de C_1 realizado en CDCl_3

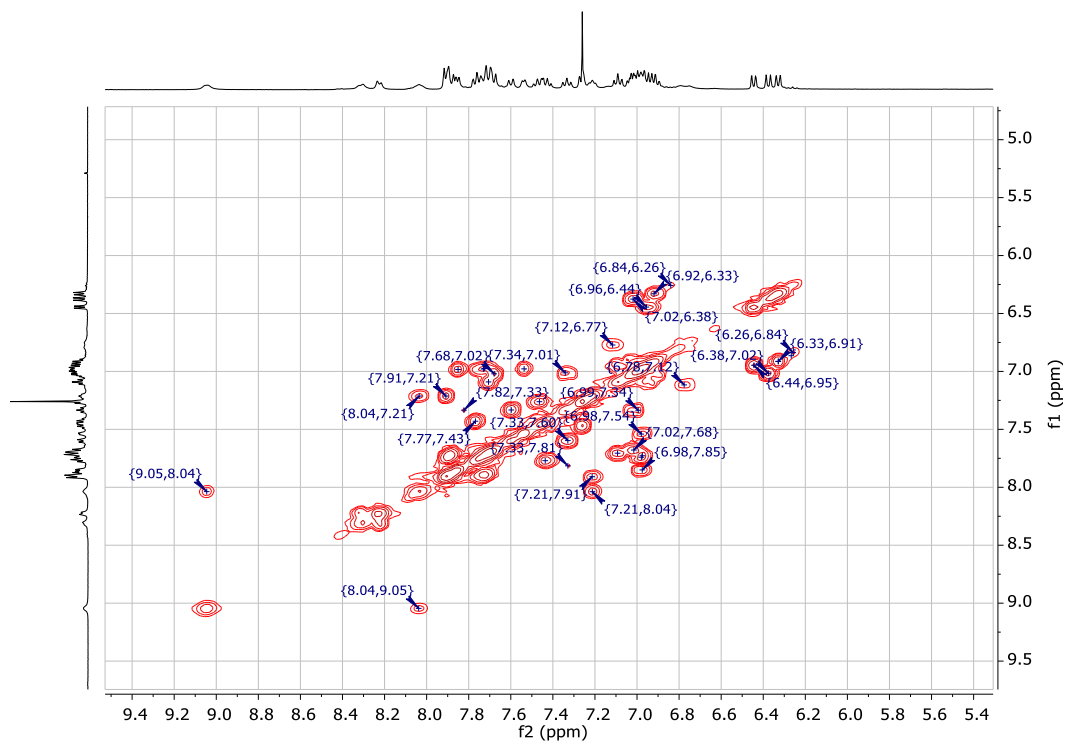


Figura 7.24. Espectro bidimensional COSY de C_1 realizado en CDCl_3

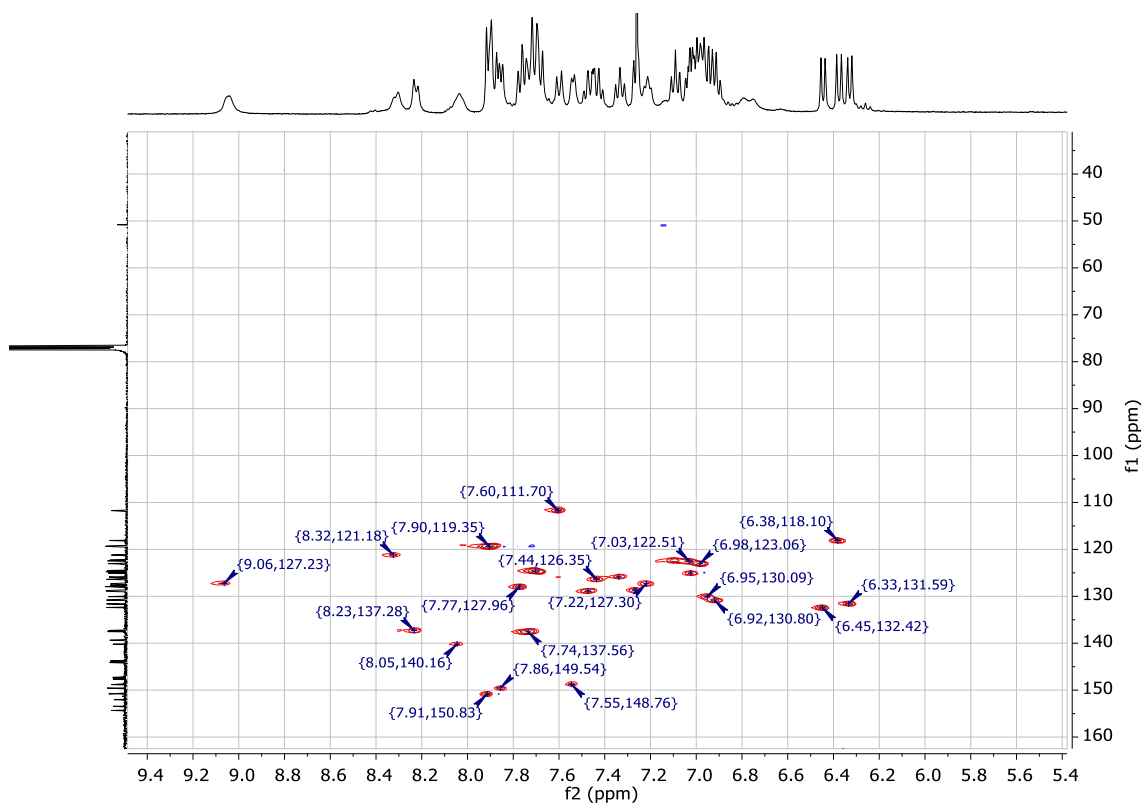


Figura 7.25. Espectro bidimensional HSQC de C_1 realizado en CDCl_3

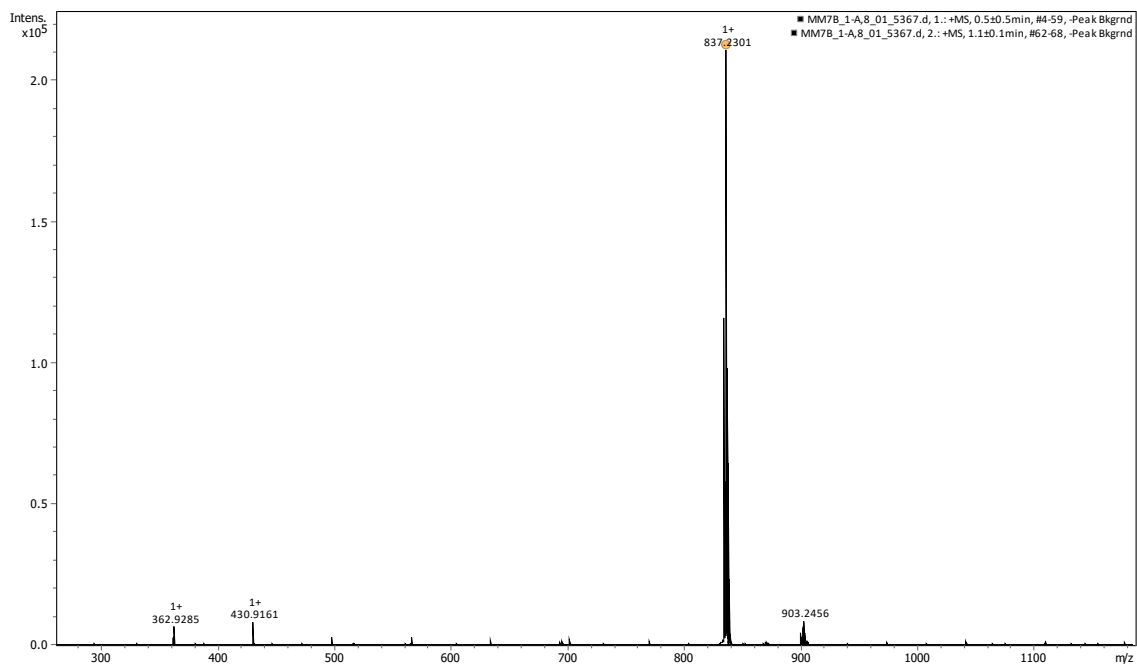


Figura 7.26. Espectro de masas ESI de C_1 .

ESI: $[\text{C}_1]^+ = 836,21$ calculado, $[\text{C}_1]^+ = 837,23$ experimental

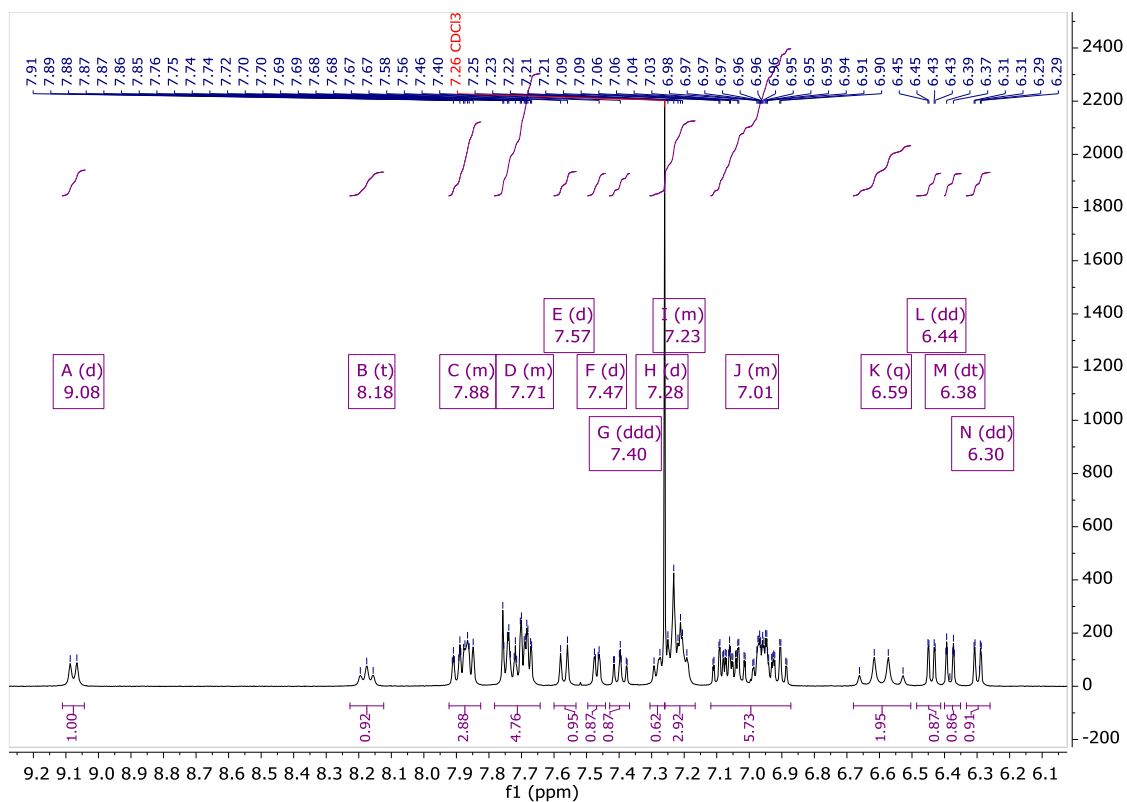
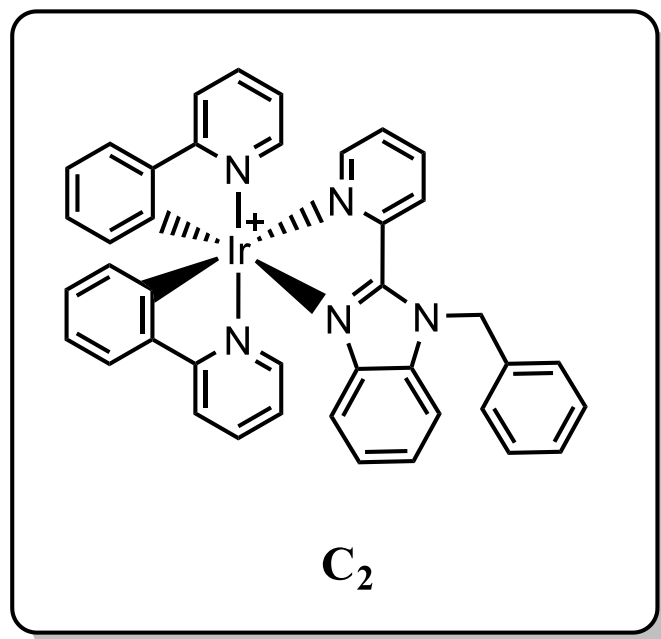


Figura 7.27. Espectro de ¹H-RMN de C₂ realizado en CDCl₃

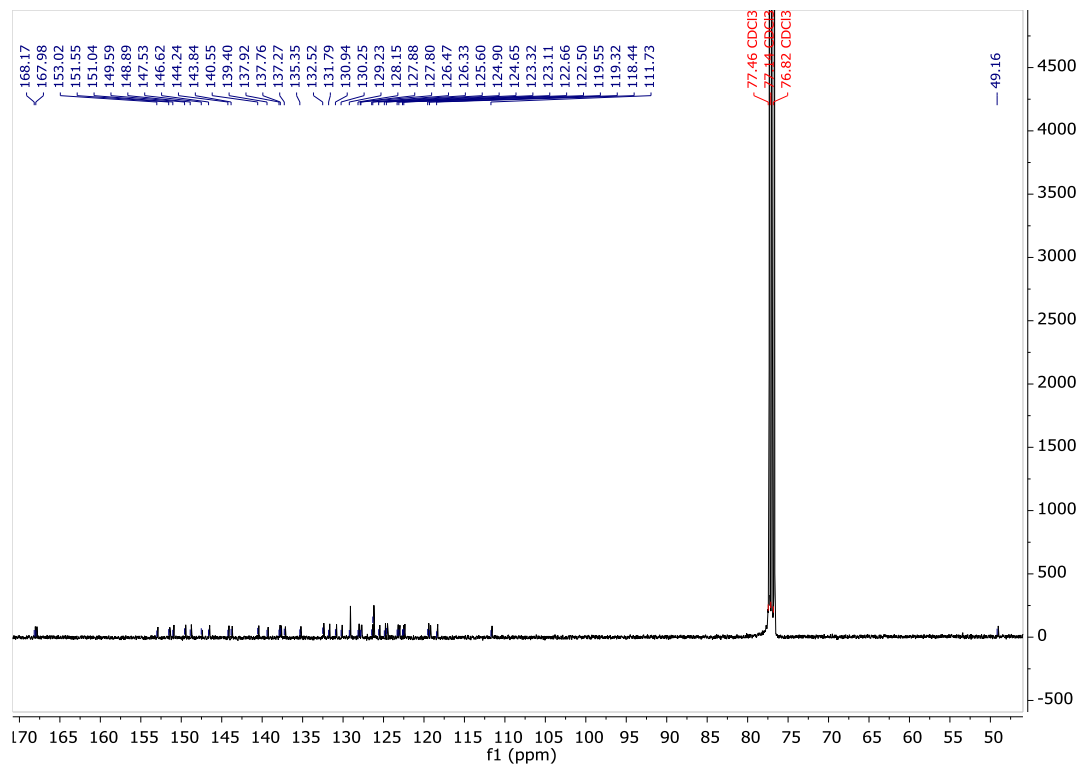


Figura 7.28. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de C_2 realizado en CDCl_3

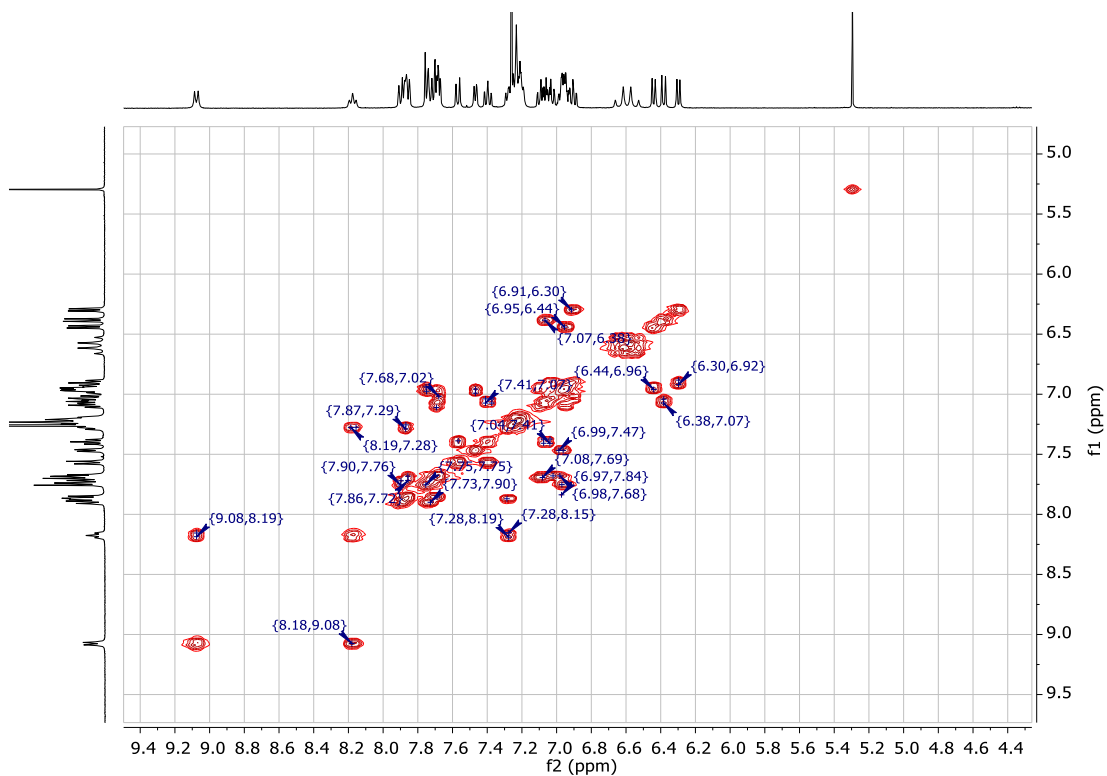


Figura 7.29. Espectro bidimensional COSY de C_2 realizado en CDCl_3

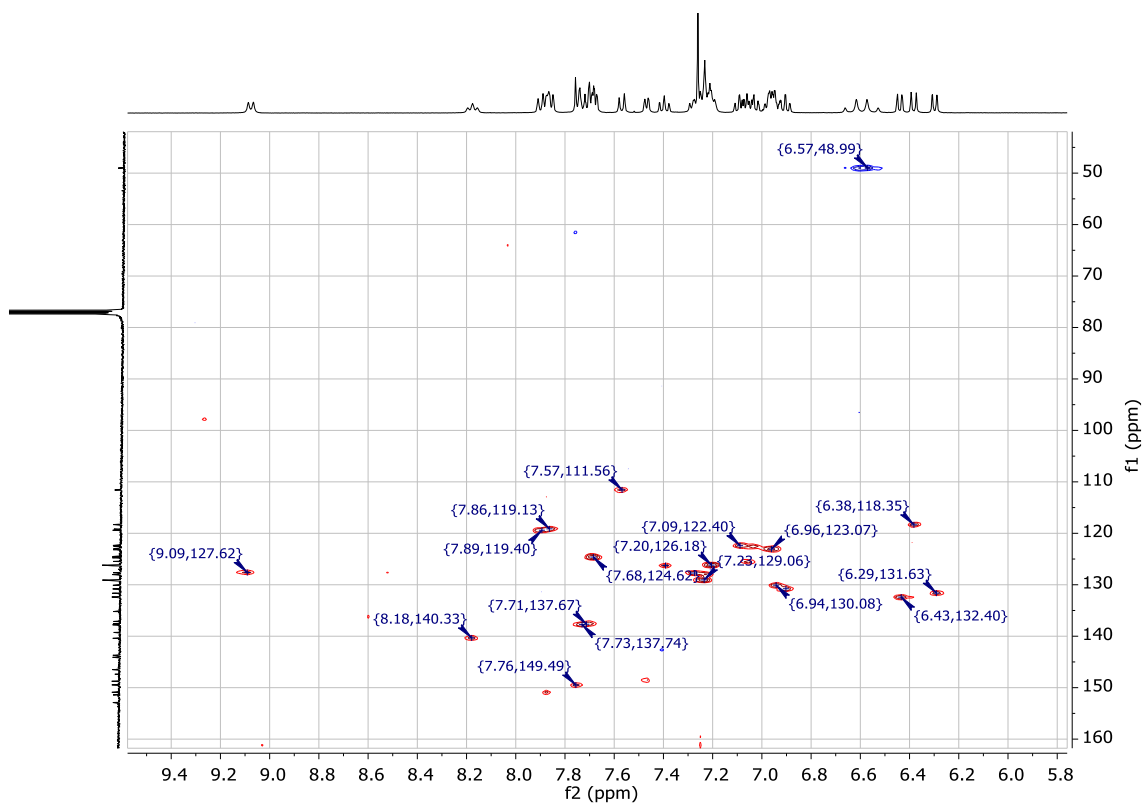


Figura 7.30. Espectro bidimensional HSQC de C_2 realizado en $CDCl_3$

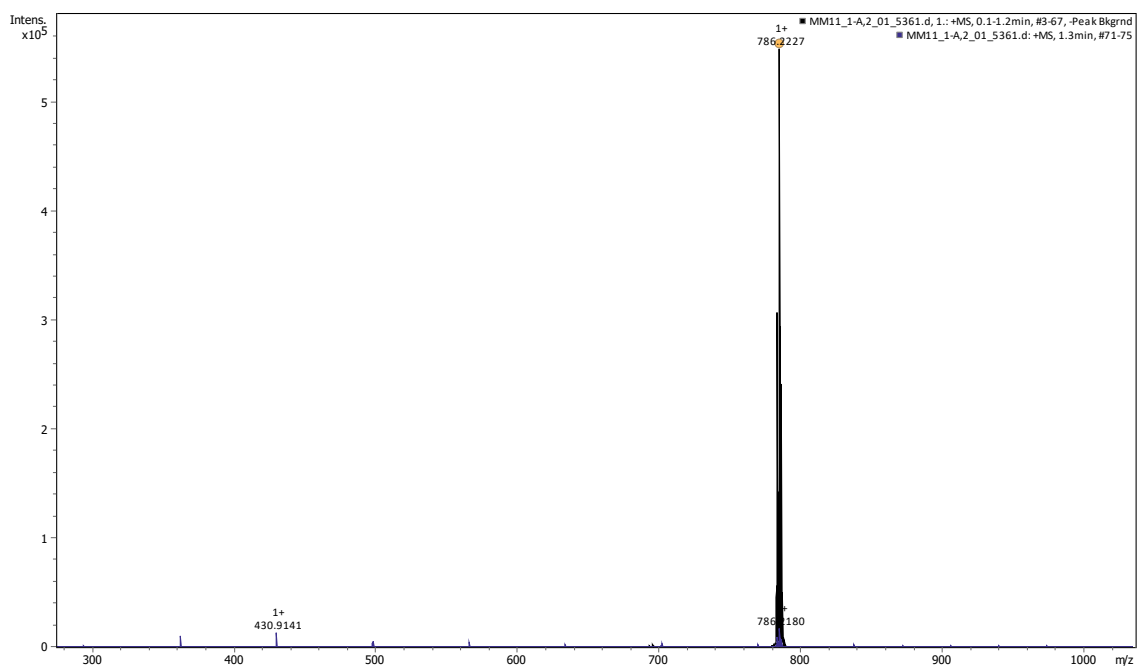


Figura 7.31. Espectro de masas ESI de C_2 .

ESI: $[C_2]^+ = 785,21$ calculado, $[C_2]^+ = 786,22$ experimental

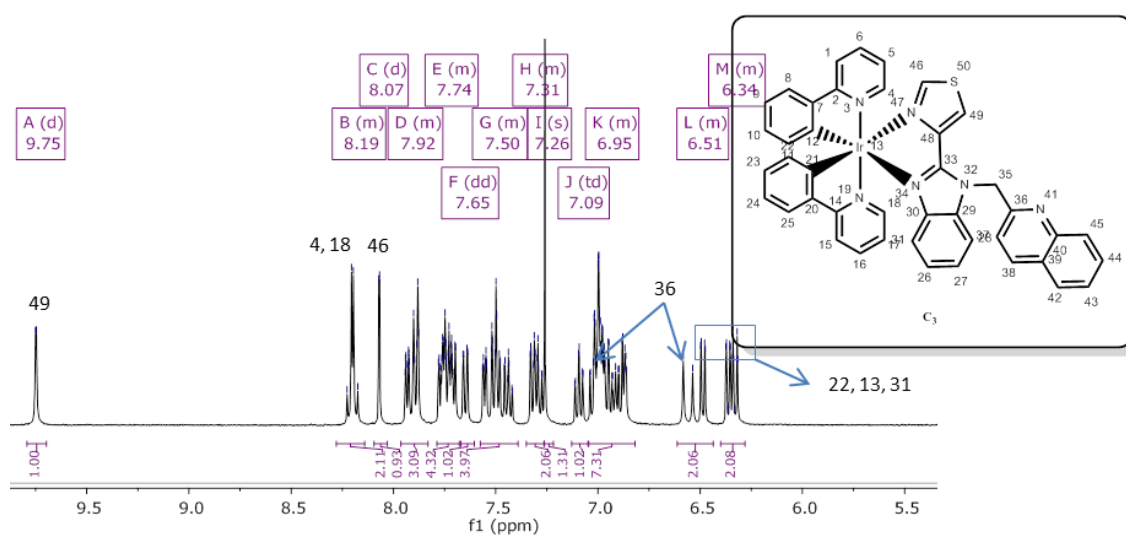
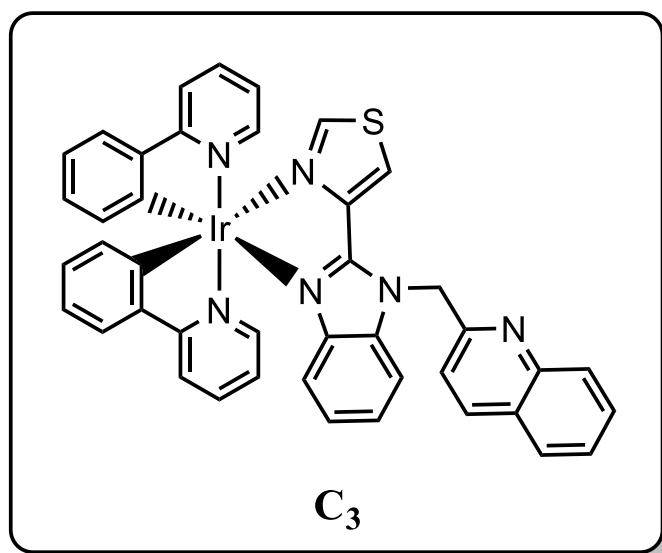


Figura 7.32. Espectro de ¹H-RMN de C₃ realizado en CDCl₃

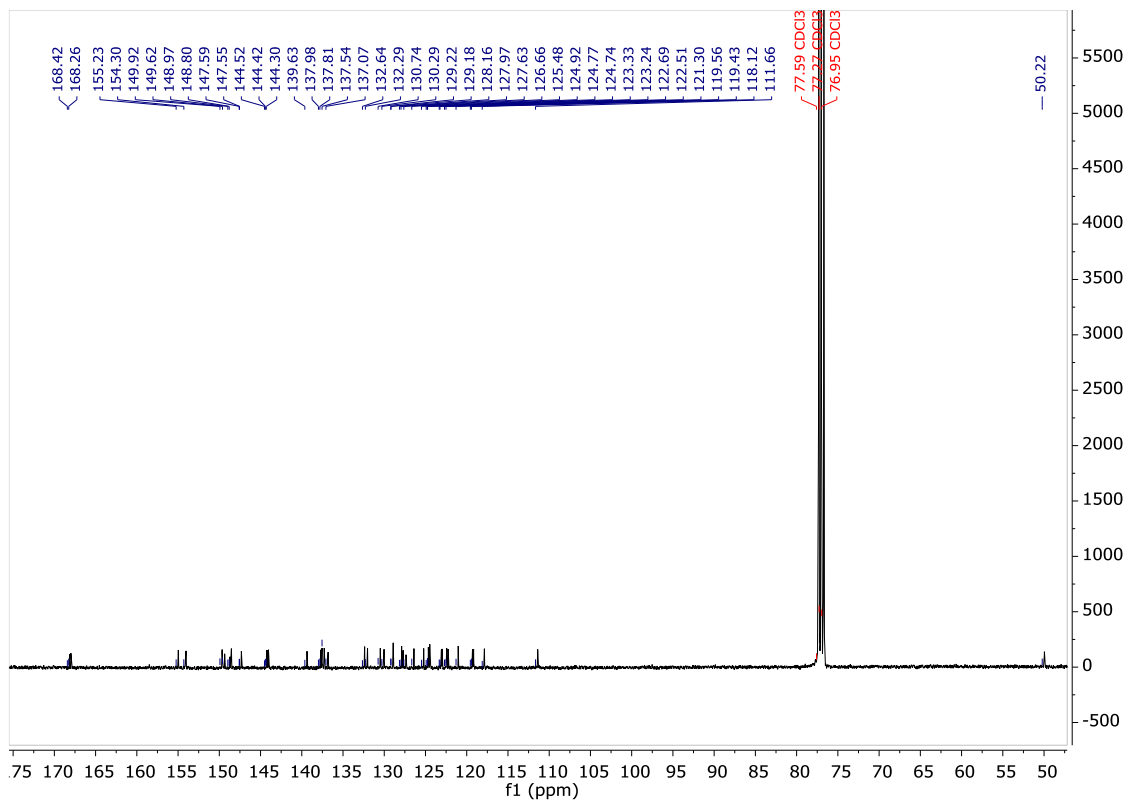


Figura 7.33. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de C_3 realizado en CDCl_3

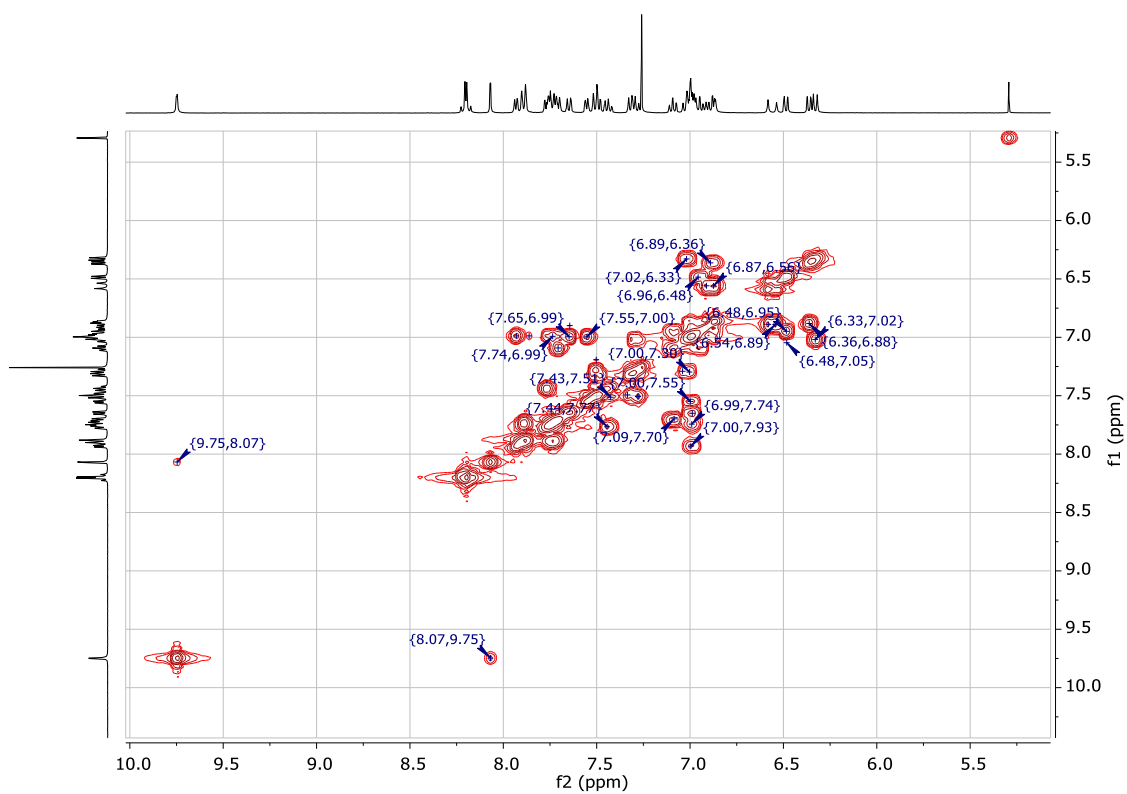


Figura 7.34. Espectro bidimensional COSY de C_3 realizado en CDCl_3

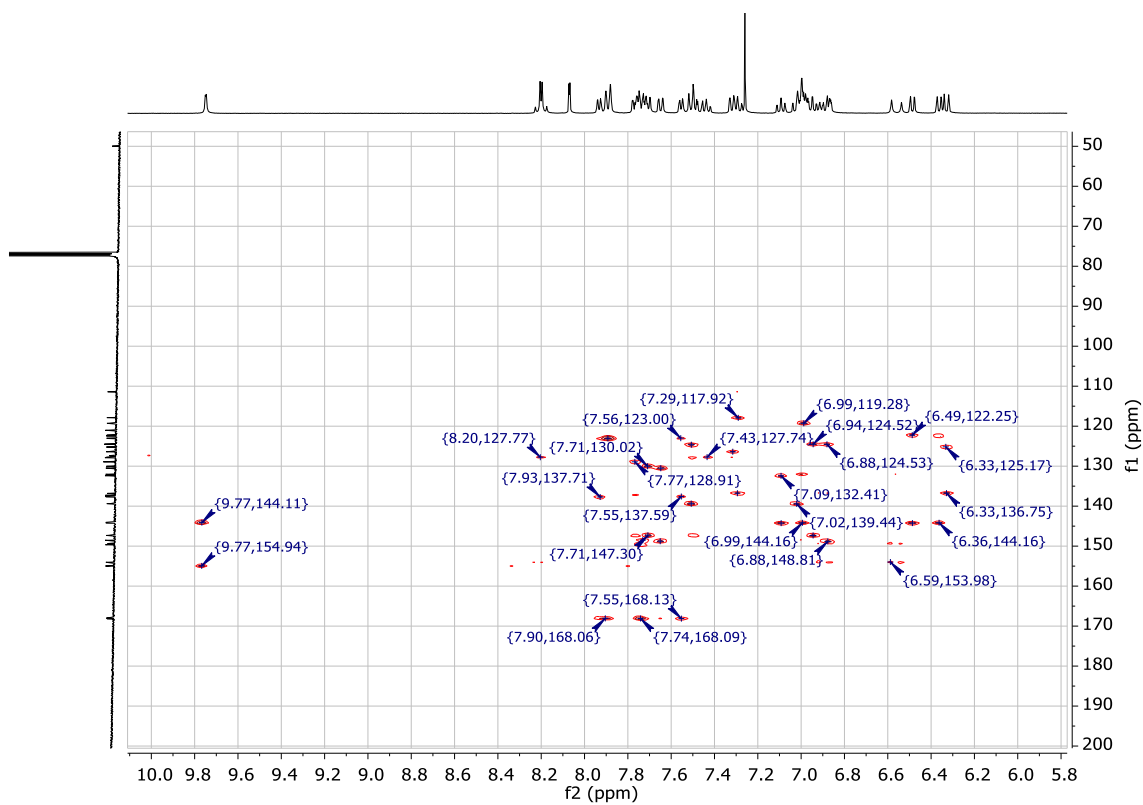


Figura 7.35. Espectro bidimensional HSQC de C_3 realizado en $CDCl_3$

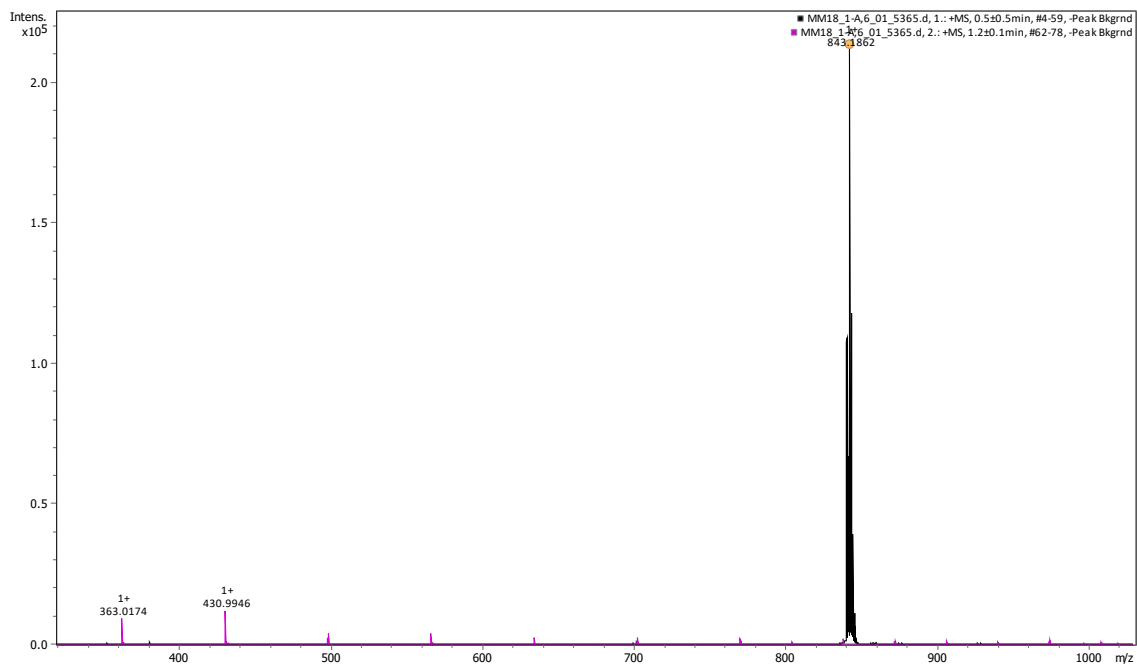


Figura 7.36. Espectro de masas ESI de C_3 .

ESI: $[C_3]^+ = 842,21$ calculado, $[C_3]^+ = 843,19$ experimental

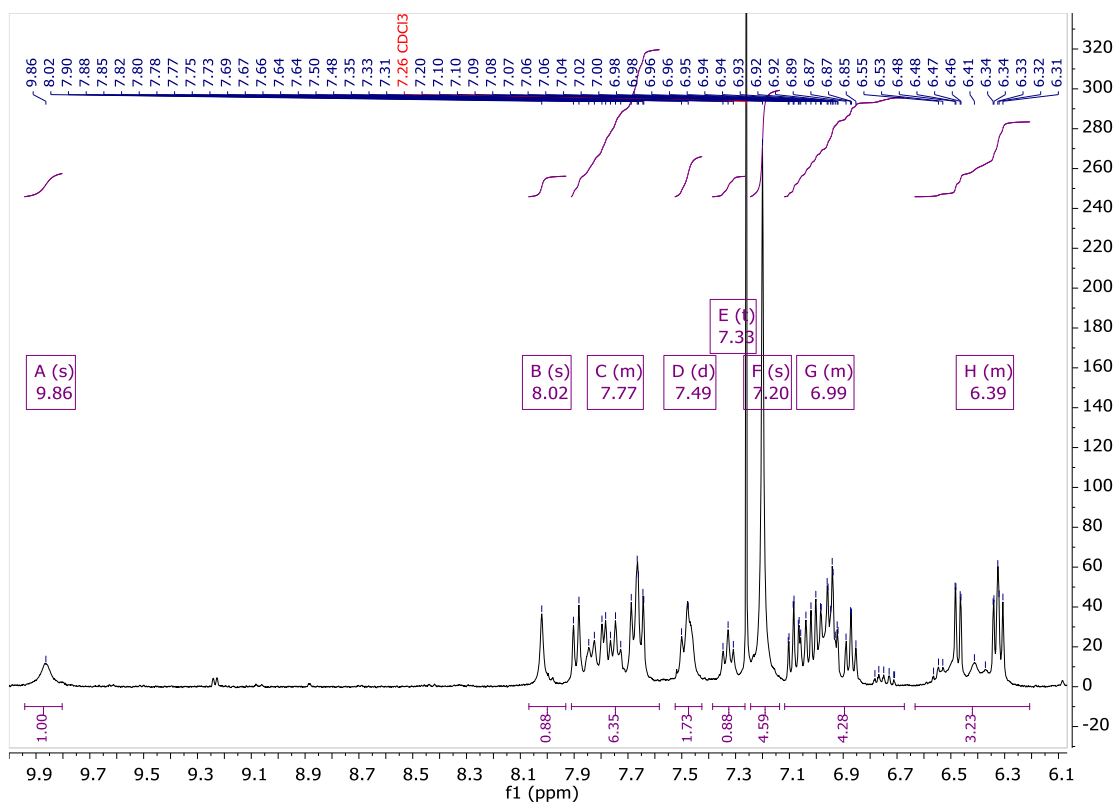
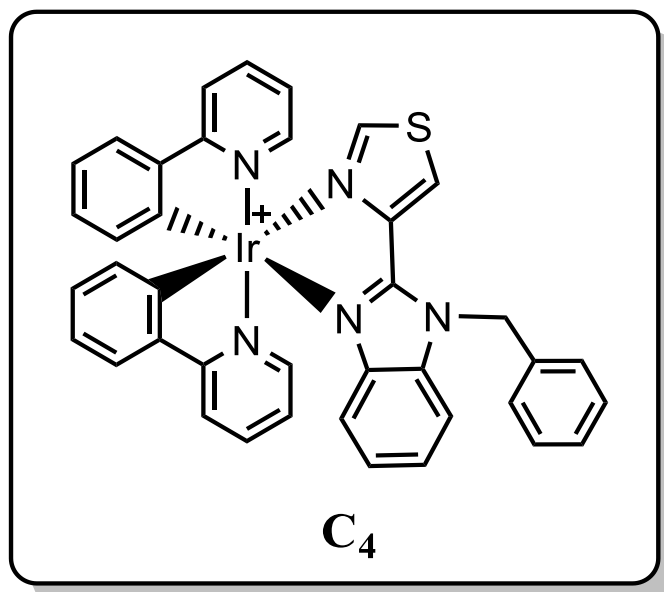


Figura 7.37. Espectro de ¹H-RMN de C₄ realizado en CDCl₃

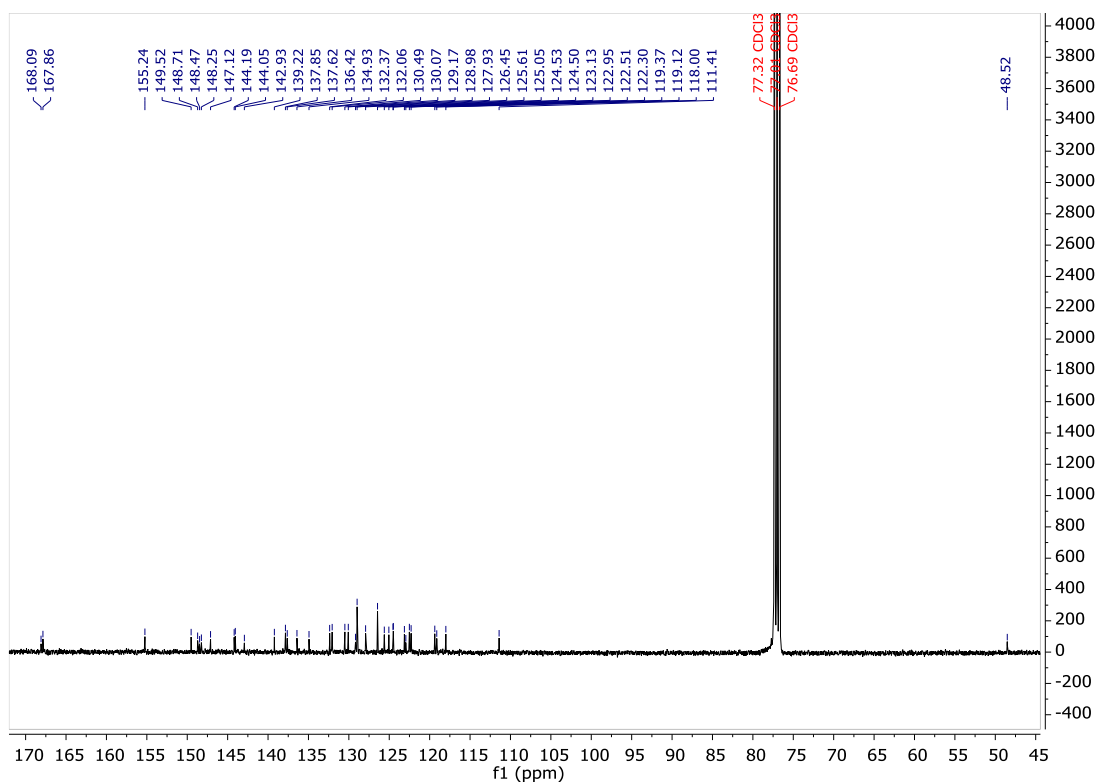


Figura 7.38. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de C_4 realizado en CDCl_3

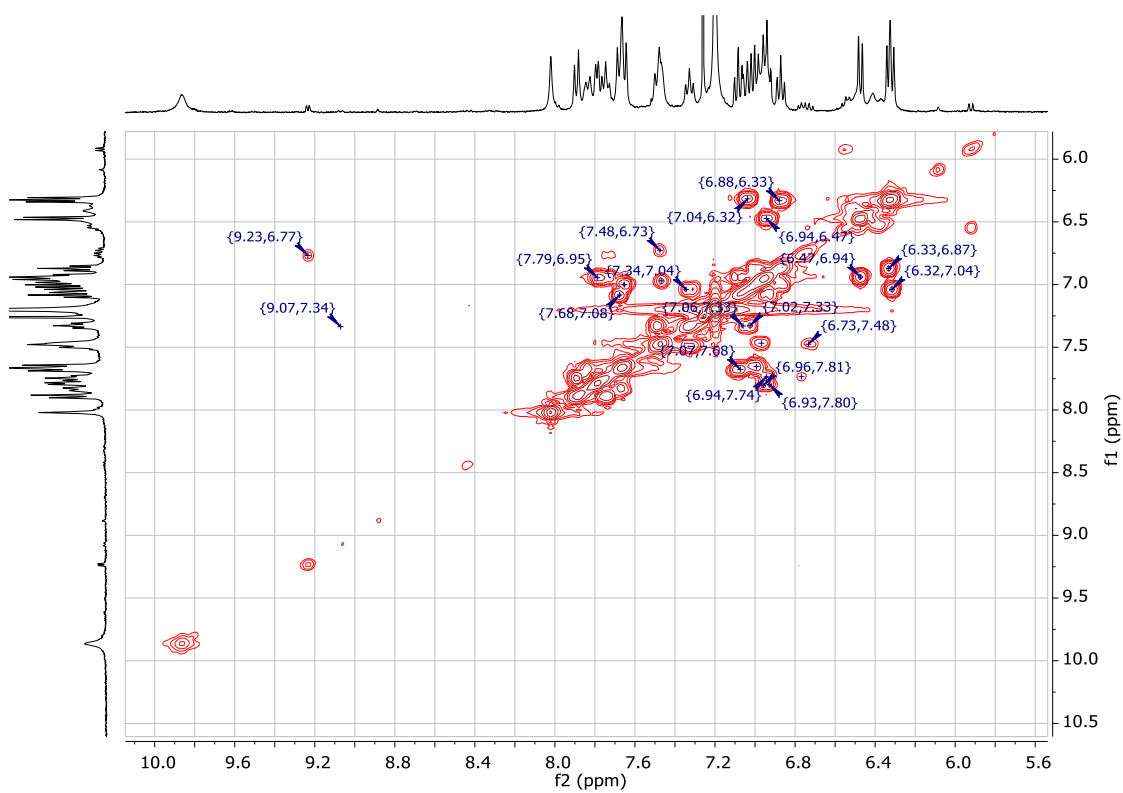


Figura 7.39. Espectro bidimensional COSY de C_4 realizado en CDCl_3

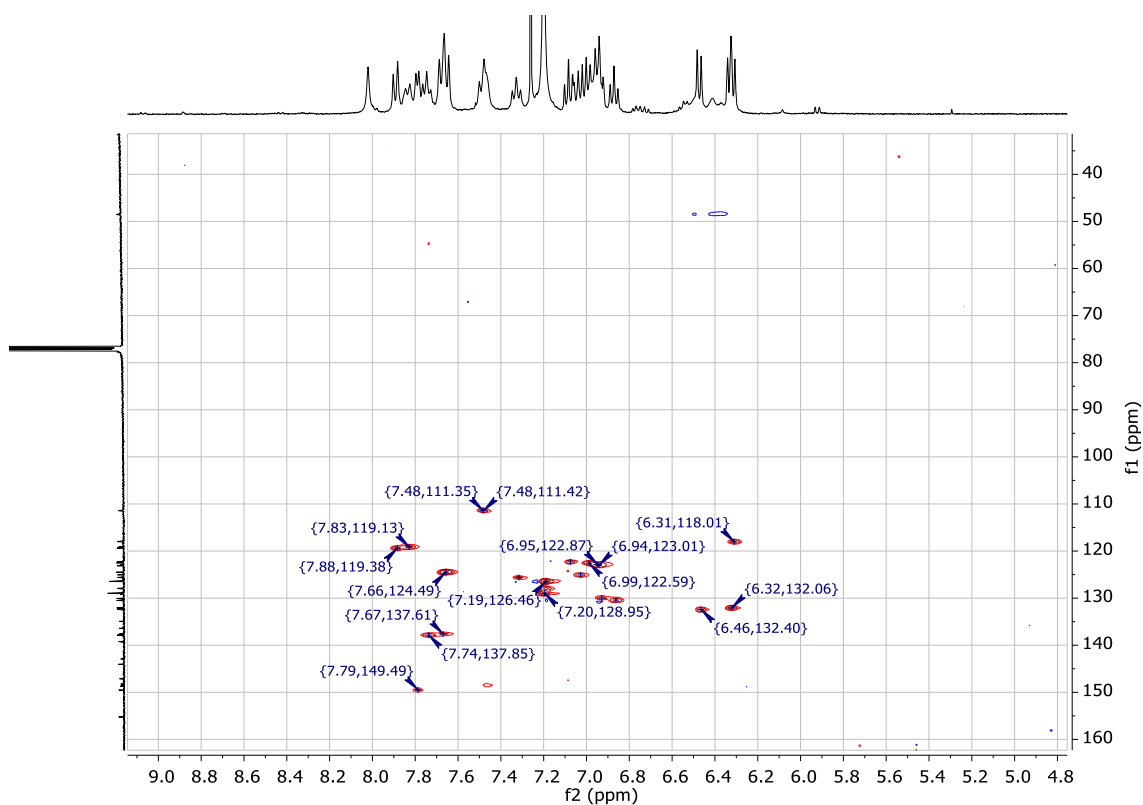


Figura 7.40. Espectro bidimensional HSQC de C₄ realizado en CDCl₃

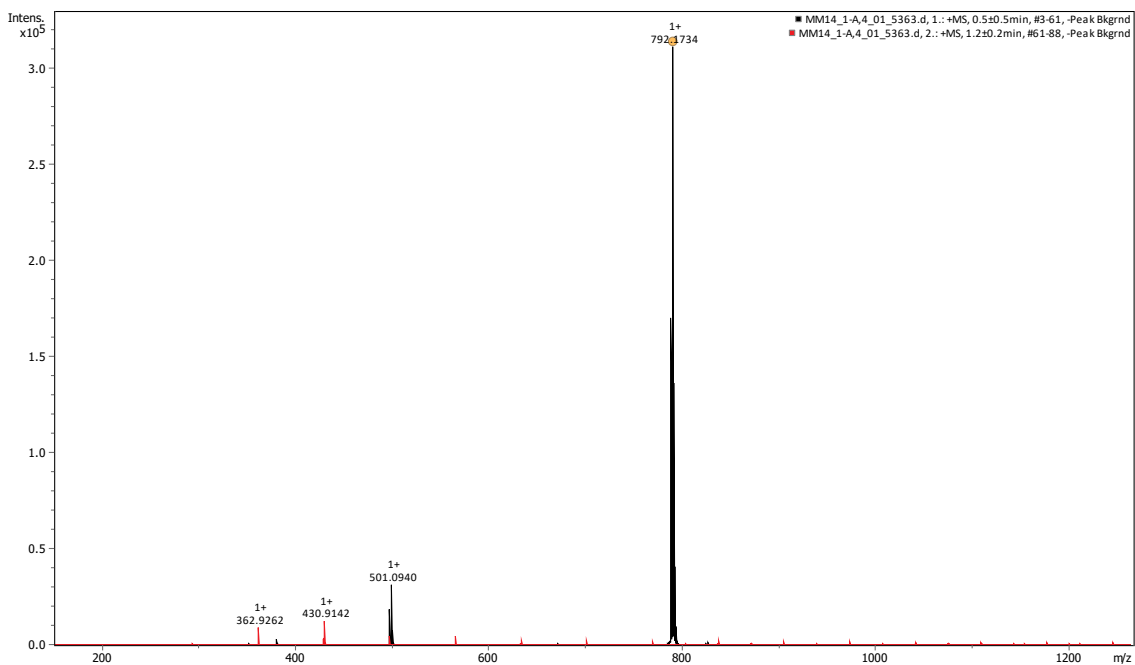


Figura 7.41. Espectro de masas ESI de C₄.

ESI: [C₄]⁺ = 791,21 calculado, [C₄]⁺ = 792,17 experimental

LUMINISCENCIA

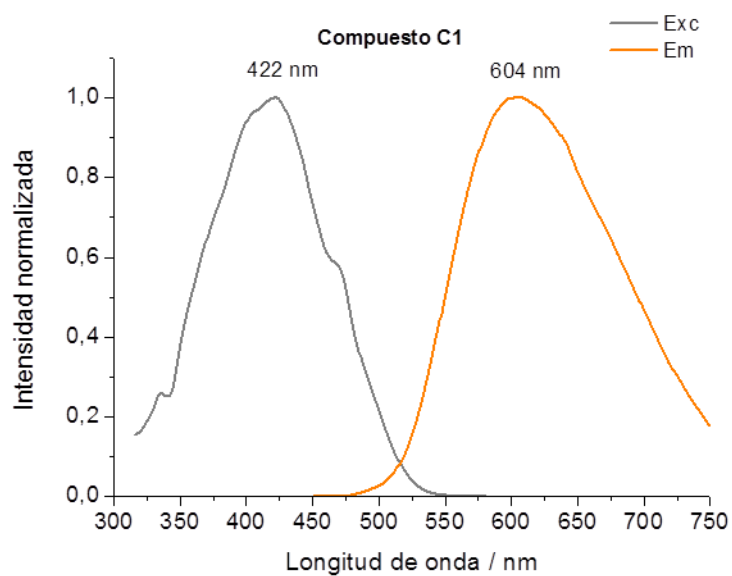


Figura 7.42. Espectros emisión y excitación del compuesto C₁ medido en DMSO a temperatura ambiente.

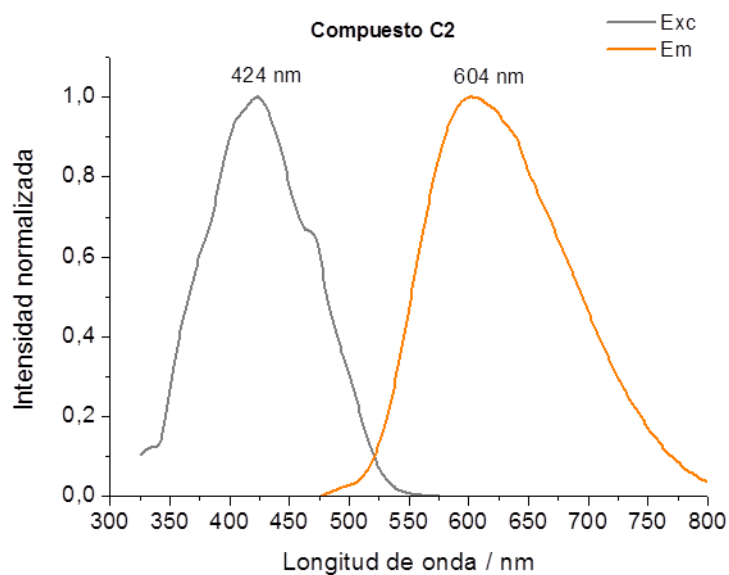


Figura 7.43. Espectros emisión y excitación del compuesto C₂ medido en DMSO a temperatura ambiente.

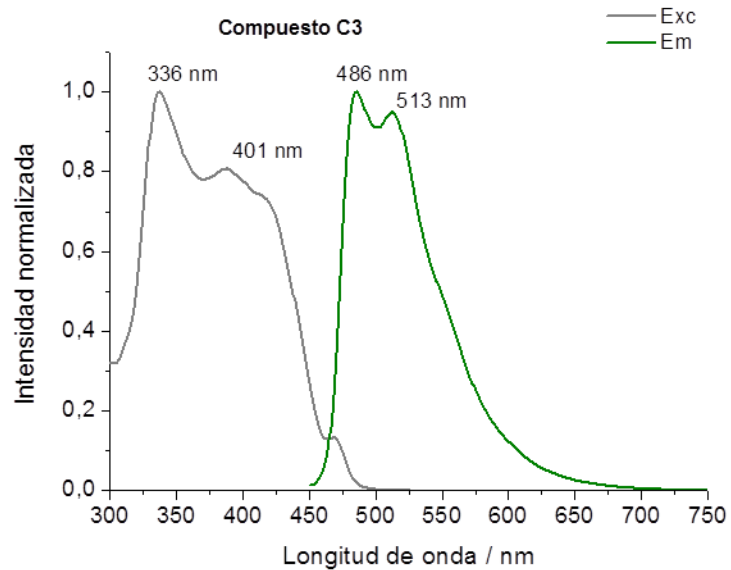


Figura 7.44. Espectros emisión y excitación del compuesto C₃ medido en DMSO a temperatura ambiente.

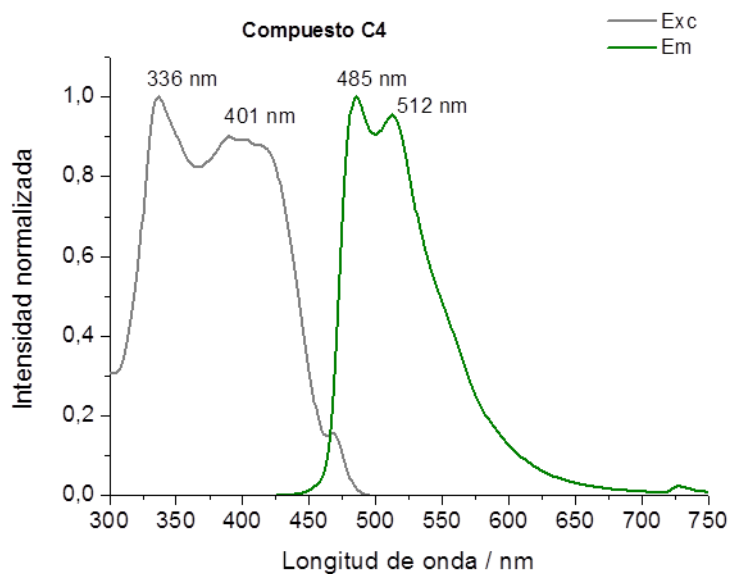


Figura 7.45. Espectros emisión y excitación del compuesto C₄ medido en DMSO a temperatura ambiente.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

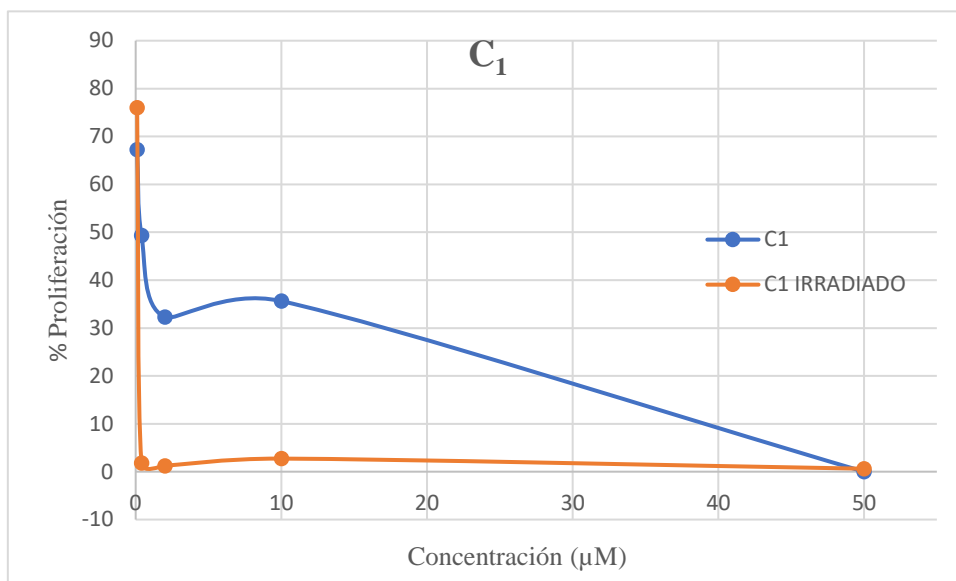


Figura 7.46. Porcentaje de proliferación frente a la concentración del complejo C_1 .

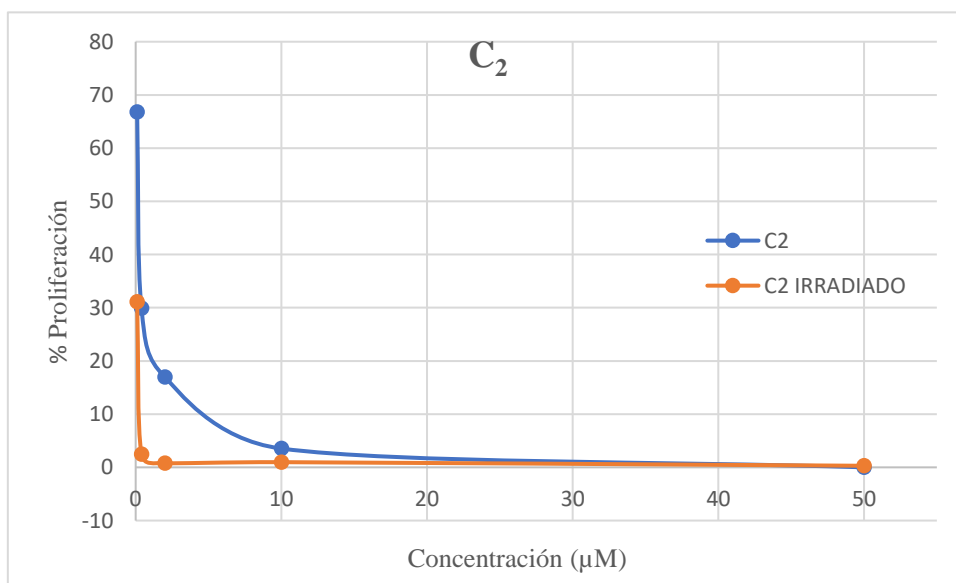


Figura 7.47. Porcentaje de proliferación frente a la concentración del complejo C_2 .

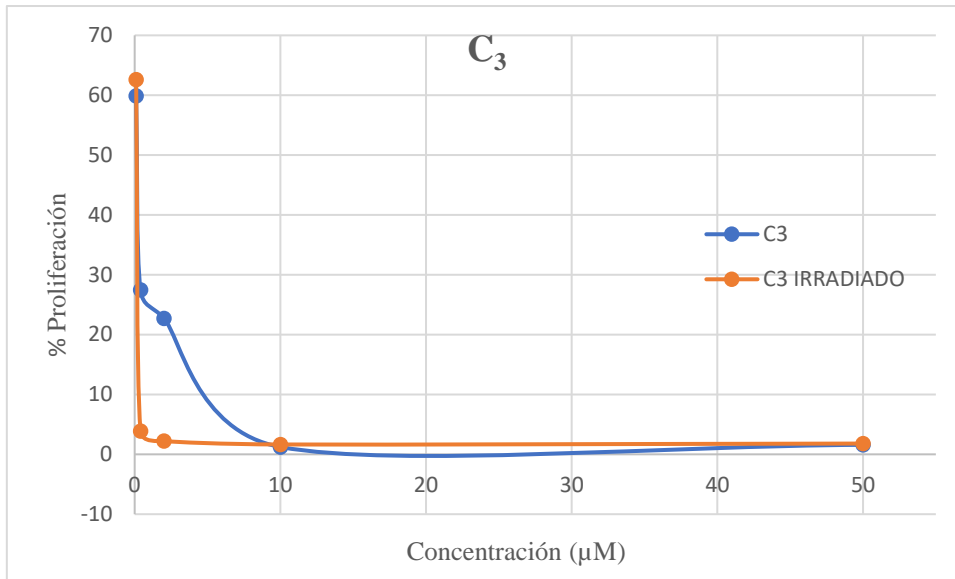


Figura 7.48. Porcentaje de proliferación frente a la concentración del complejo C_3 .

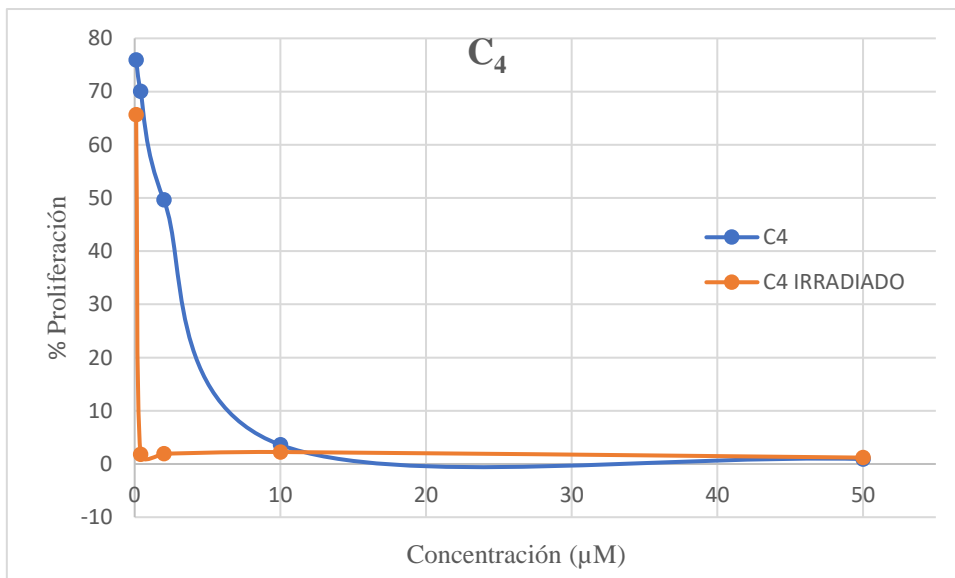


Figura 7.49. Porcentaje de proliferación frente a la concentración del complejo C_4 .