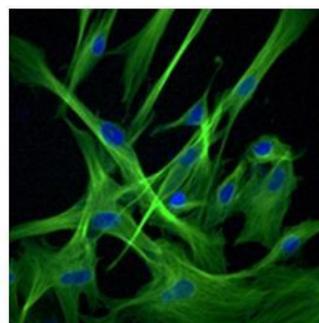
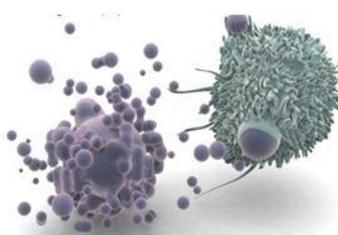
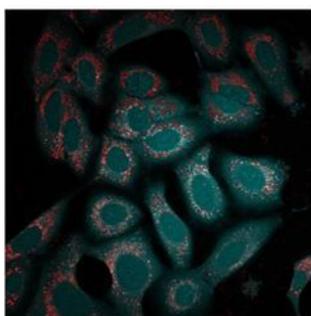
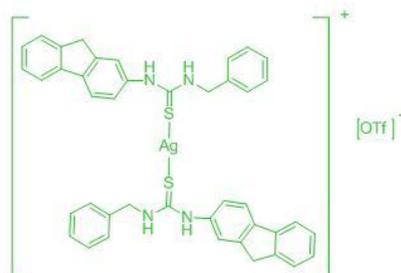


Compuestos metálicos para bioimagen y terapia.



Raúl Carrero Sender

Directora: Vanesa Fernández Moreira

Ponente: M^a Dolores Villacampa Pérez

Zaragoza, Junio 2016

ABREVIATURAS

UV-visible: Ultravioleta- Visible	t: Triplete
¹H-RMN: Resonancia magnética nuclear de Protón	dd: Doblete de doblete
¹³C-RMN: Resonancia magnética nuclear de Carbono	m : Multiplete
¹⁹F-RMN: Resonancia magnética nuclear de flúor	J: Constante de acoplamiento
COSY: Correlation spectroscopy	MLCT: Transferencia de carga del ligando al metal
APT: Attached Proton Test	IL: Intraligando
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy	DMSO: Dimetilsulfóxido
HMBC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy	THF: Tetrahidrofurano
IR: Espectrometría Infrarroja	MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MS: Espectrometría de masas	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ESI: Ionización por electrspray	OTf: Trifluorometanosulfonato, Triflato
M: Molar	PPh₃: Trifenilfosfina
μM: Micromolar	λ_{abs}: Longitud de onda de absorción
μL: Microlitros	λ_{exc}: Longitud de onda de excitación
mL: Mililitros	λ_{emisión}: Longitud de onda de emisión
mmol: Milimoles	ε: Coeficiente de extinción molar
mg: Miligramos	IC₅₀: Concentración inhibitoria máxima media.
Hz: Herzio	
s: Singlete	
d: Doblete	

RESUMEN

En este trabajo se ha realizado la síntesis de dos familias de ligandos tioureas del tipo RNHCSNHR', donde R representa un grupo fluoreno o acridina y R' es un fenilo, bencilo o 3-fluorofenilo, así como su posterior coordinación a Ag (I) cuando ha sido posible. Además, se han estudiado sus propiedades fotofísicas, citotóxicas y su posible aplicación en microscopía de fluorescencia. Específicamente, se ha realizado la síntesis y caracterización de cada uno de los ligandos mediante técnicas de espectroscopia infrarroja, de resonancia magnética nuclear de protón, carbono y flúor, COSY, APT, HSQC, HMBC, y así hacer una comparación exhaustiva con los complejos metálicos sintetizados posteriormente.

Se han llevado a cabo diferentes reacciones de coordinación de los ligandos derivados de fluoreno con AgOTf en diferentes estequiometrias L:Ag (1:1 y 2:1). En estos derivados, los ligandos objeto de estudio se coordinan al centro metálico a través del átomo de azufre de la tiourea.

Posteriormente, se ha procedido a la caracterización estructural de los nuevos complejos sintetizados mediante las técnicas habituales nombradas anteriormente. La comparación de los espectros de los nuevos complejos y los ligandos de partida ha servido para confirmar que la coordinación del metal se ha producido satisfactoriamente.

Así mismo se ha intentado las reacciones de coordinación de los ligandos derivados de acridina con AgPPh₃OTf. Lamentablemente, estos complejos no han podido ser aislados para su posterior caracterización.

A continuación se ha elaborado un estudio de las propiedades fotofísicas utilizando las técnicas de UV-visible y espectroscopia de emisión así como un estudio de la actividad citotóxica de los diferentes ligandos y sus correspondientes complejos metálicos mediante el método MTT en la línea celular A-549 de cáncer de pulmón. Finalmente se ha realizado un experimento de microscopía de fluorescencia con una tiourea de cada familia para poder elucidar su comportamiento a nivel celular.

ABSTRACT

This work entails the synthesis of two families of thiourea ligands, RNHCSNHR', where R represents a fluorene or an acridine and R' is a phenyl, benzyl or 3-fluorophenyl group, as well as their subsequent coordination to Ag (I). In addition, photophysical and cytotoxic studies were performed together with a preliminary fluorescence microscopy analysis. Specifically, the synthesized ligands have been characterized by mass spectroscopy, IR, ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR spectroscopy as well as 2D experiment like COSY, HSQC and HMBC for further signals assignation.

Thereafter, coordination reactions of AgOTf and the fluorene derivatives were performed in different stochiometries, 1:1 and 2:1 (L:Ag) leading to 5 new complexes where the thiourea ligand is behaving as a S-donor. The synthesized complexes were characterized by the typical characterization techniques previously described.

Furthermore, coordination reaction between the acridine derivatives and AgOPPh₃ was also attempted. However, purification of those was not possible.

In addition, a photophysical study by UV-visible spectroscopy and fluorescence techniques was performed together with the examination of their cytotoxic activity by MTT assays in lung cancerous cell line A549. Finally, a compound of each family was studied by fluorescence microscopy to ascertain their biodistribution and possible localization.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	7
3. DISCUSION DE RESULTADOS	8
3.1. Estudio y síntesis de los ligandos L1-L4 y L6	8
3.2. Estudio y síntesis de los complejos C1 y C3-C6	12
3.3. Estudio de las propiedades fotofísicas	16
3.4. Estudio de la actividad biológica	19
3.5. Estudio de la biodistribución	21
4. PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1. Instrumentación	23
4.2. Síntesis y caracterización de los ligandos L1-L4 y L6.	23
4.2.1.Ligando L1	23
4.2.2.Ligando L2	24
4.2.3.Ligando L3	24
4.2.4.Ligando L4	25
4.2.5.Ligando L6	25
4.3. Síntesis y caracterización de los complejos C1 y C3	26
4.3.1.Complejo C1	26
4.3.2.Complejo C3	27
4.4. Síntesis y caracterización de los complejos C4, C5 y C6	27
4.4.1.Complejo C4	27
4.4.2.Complejo C5	28
4.4.3.Complejo C6	29
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31
7. ANEXOS	32
7.1. Productos de partida	32
7.2. Espectros RMN e IR de los ligandos L1-L6	33
7.2.1.Ligando L1	33
7.2.2.Ligando L2	36
7.2.3.Ligando L3	39
7.2.4.Ligando L4	42
7.2.5.Ligando L5	45
7.2.6.Ligando L6	48
7.3. Espectros RMN e IR de los complejos C1-C6	51
7.3.1.Complejo C1	51
7.3.2.Complejo C2	54
7.3.3.Complejo C3	57
7.3.4.Complejo C4	60
7.3.5.Complejo C5	63
7.3.6.Complejo C6	66
7.4. Espectros UV-visible para los ligandos L1-L4 y L6 y complejos C1 y C3-C6	69
7.5. Espectros de excitación-emisión para los ligandos L1-L4 y L6 complejos C1 y C3-C6	71
7.6. Graficas IC ₅₀ para los ligandos L1-L4 y L6 y complejos C1 Y C3-C6	72

1. INTRODUCCIÓN

La Plata (Ag) es un metal de transición situado en el grupo 11 de la tabla periódica, con número atómico 47. Este metal muestra diferentes estados de oxidación (+1, +2 y +3), pero la química de este metal se centra exclusivamente en compuestos de plata (I), con configuración electrónica $[\text{Kr}]4d^{10}$. Debido a que tiene el subnivel 4d completamente ocupado, Ag(I) forma complejos diamagnéticos con diferentes geometrías (lineal, complejos di-coordinados, complejos con geometría trigonal plana, y tetraédricos).¹ Aunque el carácter blando del ion metálico Ag(I) favorece la coordinación con átomos dadores blandos como los sulfuros, los complejos de coordinación de Ag(I) con átomos duros como nitrógeno y oxígeno puede ser también posible con ligandos heterocíclicos y/o macrociclos.²

Muchos complejos de plata son citotóxicos para bacterias. Se cree que Ag(I) puede unirse a los grupos amina, imidazol, y carboxilo de algunos metabolitos como proteínas de alto peso molecular en el citosol y en enzimas con grupos tiol/sulfidriilo para inactivarlas. Aunque el ion Ag(I) puede jugar muchos papeles en los sistemas biológicos como la interacción y posterior desactivación de enzimas, uniéndose al ADN, interaccionando con la membrana celular, e interfiriendo en la cadena respiratoria, el mecanismo de la acción antimicrobiana no está del todo claro.

Las tioureas N, N'-disustituidas son importantes compuestos orgánicos debido a su actividad farmacológica. Especialmente, muchos de estos derivados son usados como anti-hestamínicos. Estos derivados comenzaron a usarse como agentes antitiroideos (Figura 1).³

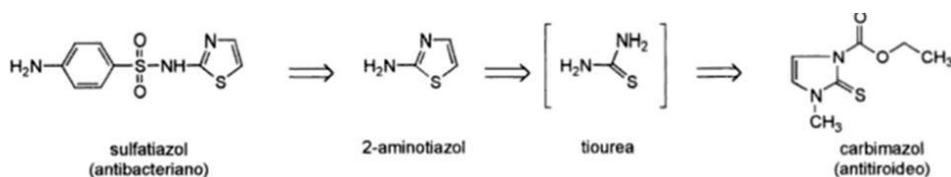


Figura 1. Derivados de tioureas utilizados como fármacos.

Uno de los fármacos más conocidos, Sorafenib, muestra algunas ventajas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer debido a que es capaz de inhibir algunas encimas quinasas involucradas en la proliferación de tumores y angiogénesis.⁴ Se ha puesto gran interés en modificar el Sorafenib para encontrar fármacos más eficaces en las células diana para lo cual se ha sustituido el grupo urea por diaril tiourea (Figura 2) mostrando una mayor actividad.⁴

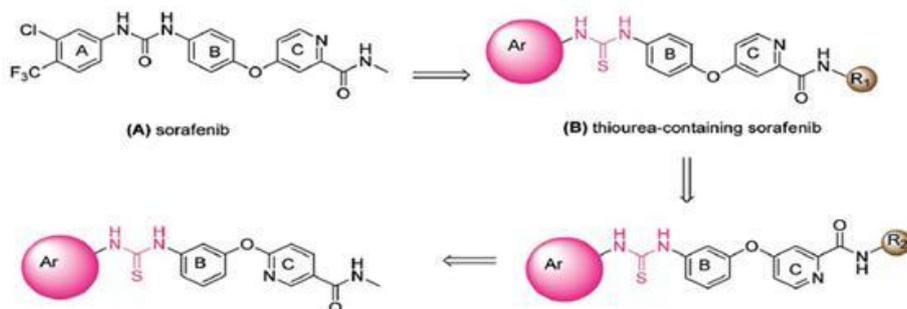


Figura 2. Ruta sintética para modificar el Sorafenib.

Analizar cómo actúan los fármacos o cómo distribuyen en el organismo es todavía un gran reto en nuestra sociedad. Grupos cromóforos como por ejemplo derivados de acridina, fluoreno y fenantreno entre otros, ofrecen diversas ventajas cuando son incorporados a estructuras con actividad biológica. Por un lado además de ser comúnmente utilizados como intercaladores de ADN y ARN debido a su condición de planaridad y aromaticidad, lo que inhibe una gran variedad de procesos biológicos, su condición cromófora se ve acentuada en el proceso de intercalación.⁵ La vida media del estado excitado y su intensidad de emisión se incrementa y permite su visualización por técnicas de microscopía de fluorescencia.⁶ Esta técnica se encuentra en auge en el campo de la medicina debido a su carácter no invasivo que no acarrea ningún riesgo al paciente. Por ello el diseñar fármacos con las propiedades emisoras idóneas para poder ser visualizados en el organismo es uno de los retos en los que muchos grupos de investigación están trabajando hoy en día.⁷

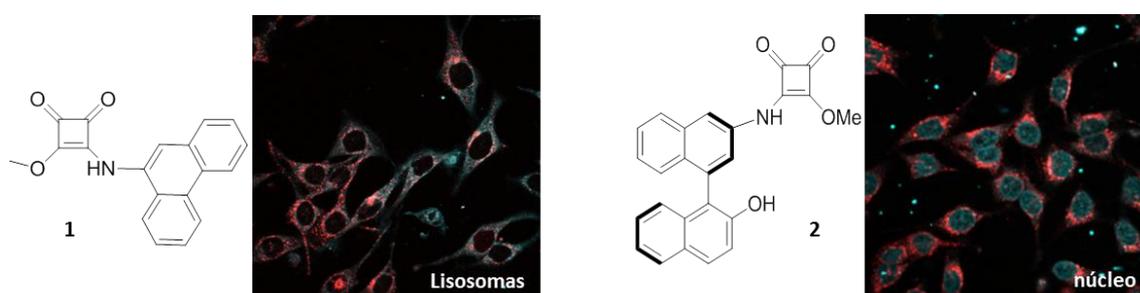


Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia describiendo el comportamiento de los compuestos 1 y 2 incubados en la línea celular HeLa.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.

Teniendo en cuenta el posible impacto de los complejos de Ag(I) como agentes antitumorales y las excelentes propiedades emisoras de cromóforos orgánicos como el 2-aminofluoreno o 9-aminoacridina, este trabajo se centrará en la síntesis de nuevos derivados de Ag(I) que puedan servir para ampliar la lista de compuestos antitumorales con propiedades luminiscentes. Para la unión de ambos fragmentos se utilizarán estructuras tiouréicas, que también son conocidos por su amplio uso en medicina facilitando así la biocompatibilidad de los nuevos derivados. Los objetivos marcados son los siguientes:

- 1) Síntesis y caracterización de derivados de tiourea con el grupo cromóforo, 2-aminofluoreno o 9-aminoacridina.
- 2) Síntesis y caracterización de sus correspondientes complejos de Ag (I) en relación 1:1 y 1:2 (metal:ligando).
- 3) Estudio de sus propiedades luminiscentes por medio de espectroscopia de UV-visible y de fluorescencia.
- 4) Estudio de la actividad citotóxica de la especies de Ag (I) obtenidas en células cancerígenas de pulmón A-549.
- 5) Análisis de la biodistribución de a nivel celular por medio de microscopia de fluorescencia.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Estudio y síntesis de los ligandos

Para la realización de este trabajo se han elegido dos fluoróforos: 2-aminofluoreno y 9-aminoacridina, los cuales hacemos reaccionar con tres derivados de isotiocianato: fenil-isotiocianato, bencil-isotiocianato y 3-fluorofenil-isotiocianato, obteniéndose los correspondientes derivados de tiourea, L1-L6 (Figura 4). Lo que se pretende con esto es obtener ligandos derivados de tiourea que posean las propiedades luminiscentes óptimas para poder utilizarlo posteriormente como agentes de visualización celular.

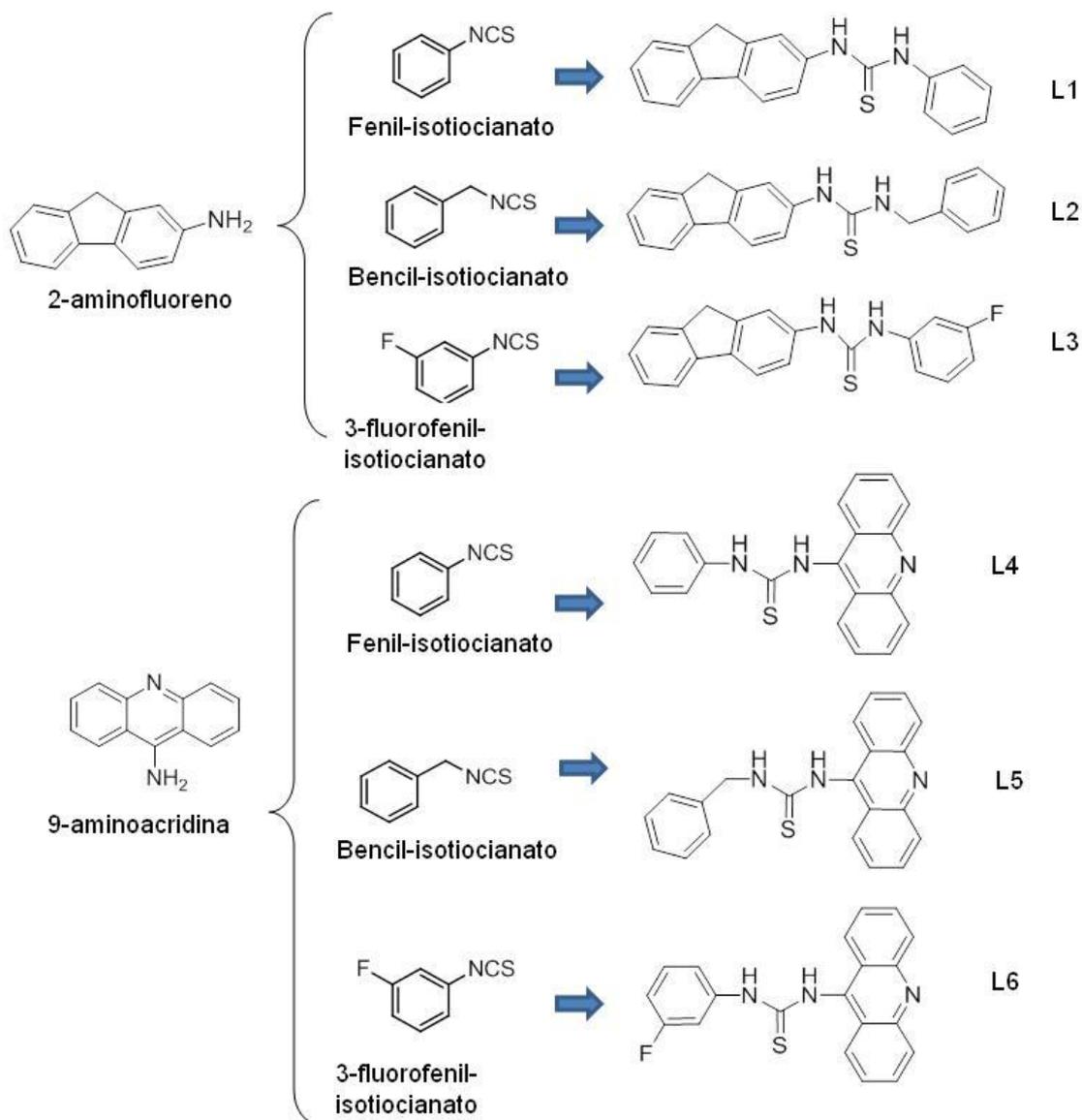
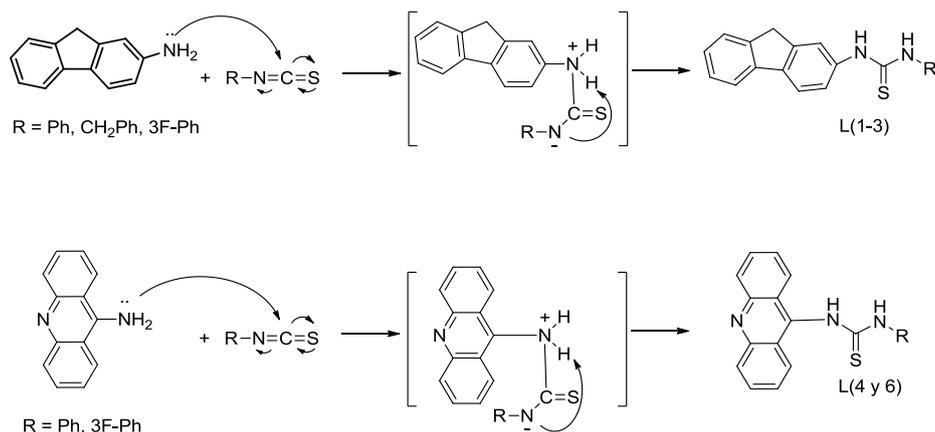


Figura 4. Ligandos derivados de tioureas.

El mecanismo de reacción que se propone para la formación de estos derivados L1-L4 y L6 está representado en el Esquema 1. Primero se produce un ataque nucleófilo por parte de la amina al carbono del isotiocianato y a continuación un reordenamiento intramolecular da lugar a la tiourea deseada.



Esquema 1. Mecanismo de reacción para los ligandos L1-L4 y L6.

El ligando L1, sintetizado previamente por G. Pelosi y colaboradores⁸ se prepara haciendo reaccionar 2-aminofluoreno, en etanol, con un equivalente de fenil isotiocianato. El producto deseado se obtiene tras dos horas de reacción calentando a reflujo como un sólido blanco y con un rendimiento del 64.7%. Para la síntesis de los ligandos L2 y L3 se ha utilizado un procedimiento similar al descrito anteriormente. En ambos casos se obtienen los ligandos deseados como sólidos blancos y con unos rendimientos buenos (84.8%, 58%, respectivamente). Todos ellos han sido caracterizados por espectroscopía IR, ¹H-RMN y ¹³C-RMN. La figura 5 muestra a modo de ejemplo el espectro de IR del L1, donde se observa claramente las bandas correspondientes al enlace N-C=S a 1245 cm⁻¹. Esto se repite para L2 y L3, apareciendo específicamente a 1233-1259 cm⁻¹ y 1242 cm⁻¹, respectivamente.

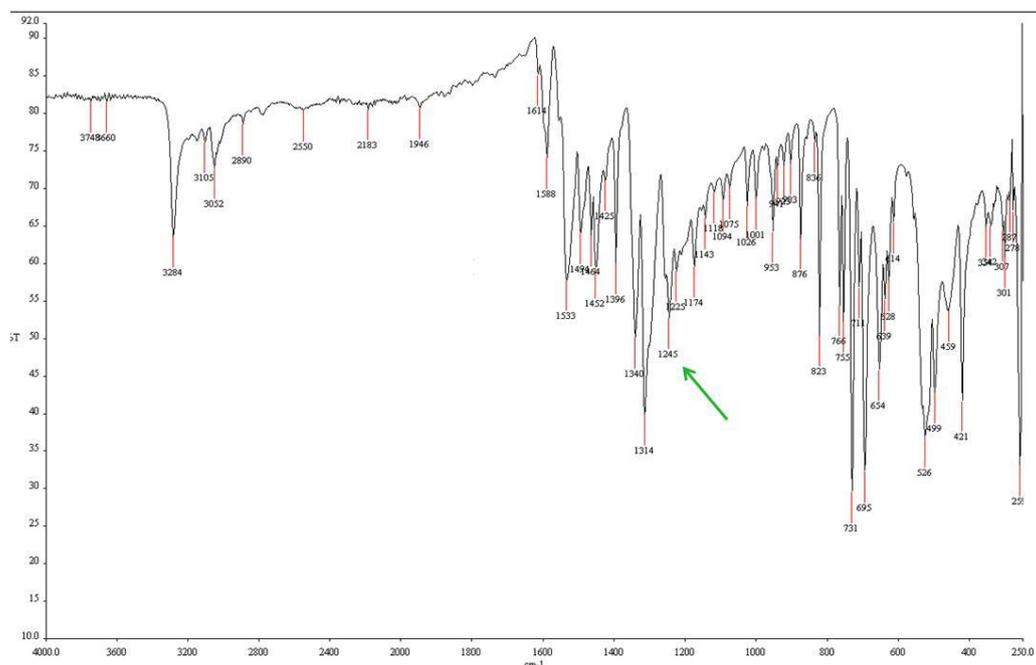


Figura 5. Espectro IR correspondiente al ligando L1.

En todos los casos se observó que en los espectros ¹H-RMN hay un desplazamiento del H(12) del 2-aminofluoreno, de 3.75 a 3.89 ppm cuando se forma el derivado tioureico, así como la desaparición de la señal correspondiente a los protones del grupo amina primaria, a 4.75 ppm,

dando paso a dos señales anchas entorno a 9.14 y 9.06 ppm correspondiente a los protones NH. Además, para el caso concreto del ligando L2 se observó un desplazamiento del $-\text{CH}_2\text{Ph}$, de 4.74 ppm a 4.91 ppm una vez se forma la tiourea correspondiente. Es decir, hay un desplazamiento de estos protones a campo bajo con respecto a los productos de partida. (Figura 6).

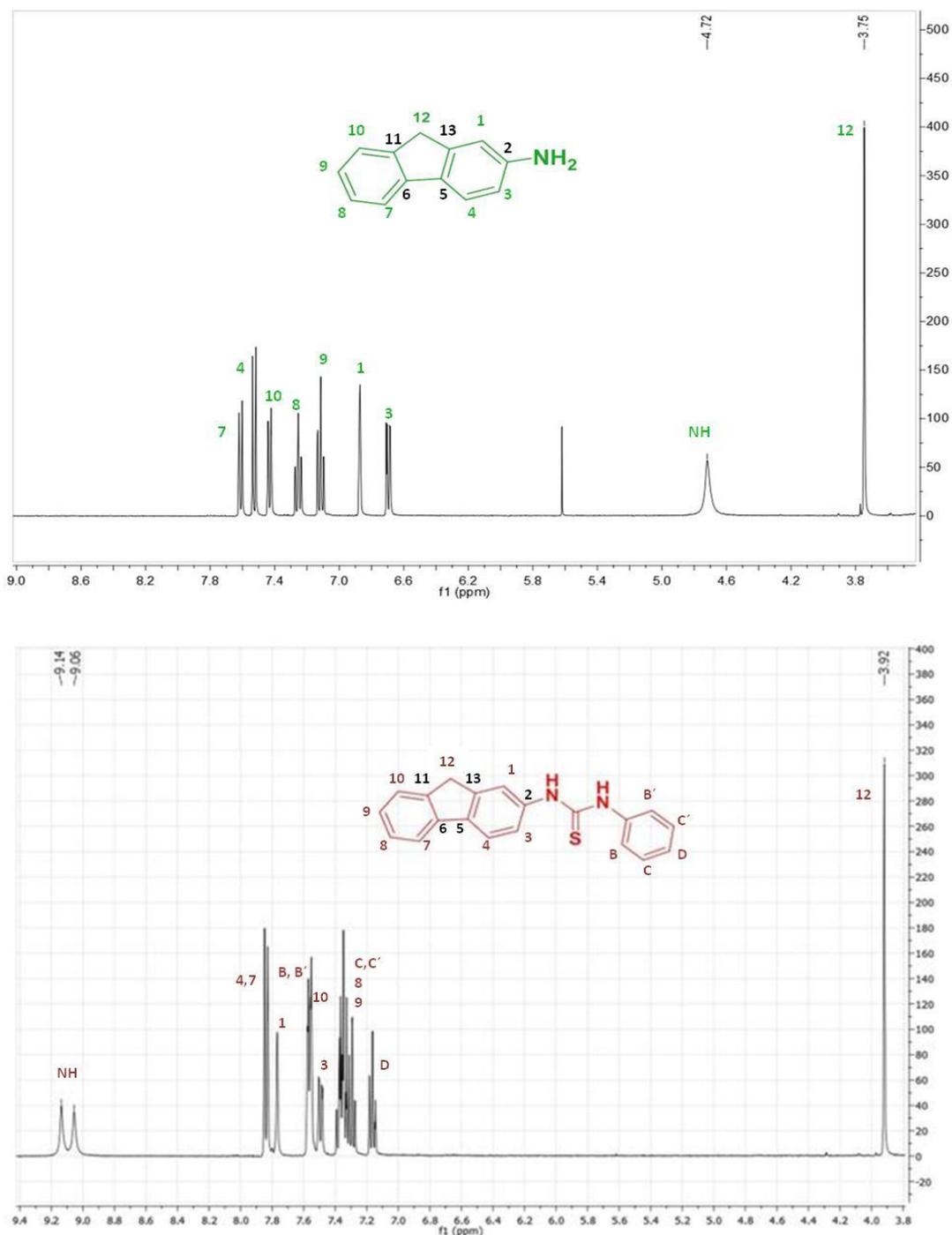


Figura 6. Espectros ¹H-RMN correspondientes a 2-aminofluoreno (arriba) y L1 (abajo).

En la síntesis de los ligandos L4 y L6, se ha utilizado la 9-aminoacridina.HCl como reactivo de partida, por lo que ha sido necesario un paso previo. Para ello se ha utilizado KOH como base para la neutralización del HCl. Finalmente los ligandos L4 y L6 se han obtenido como sólidos

naranjas después de calentar a reflujo en cloroformo la 9-aminoacridina con un exceso de los correspondientes isotiocianatos. Al igual que sus análogos L1-L3, todos ellos han sido caracterizados por técnicas espectroscópicas de IR y RMN de ^1H y de ^{13}C , utilizando esta vez dimetilsulfoxido como disolvente debido a la baja solubilidad de estos nuevos derivados. A modo de ejemplo se muestran los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el ligando L4 (Figura 7).

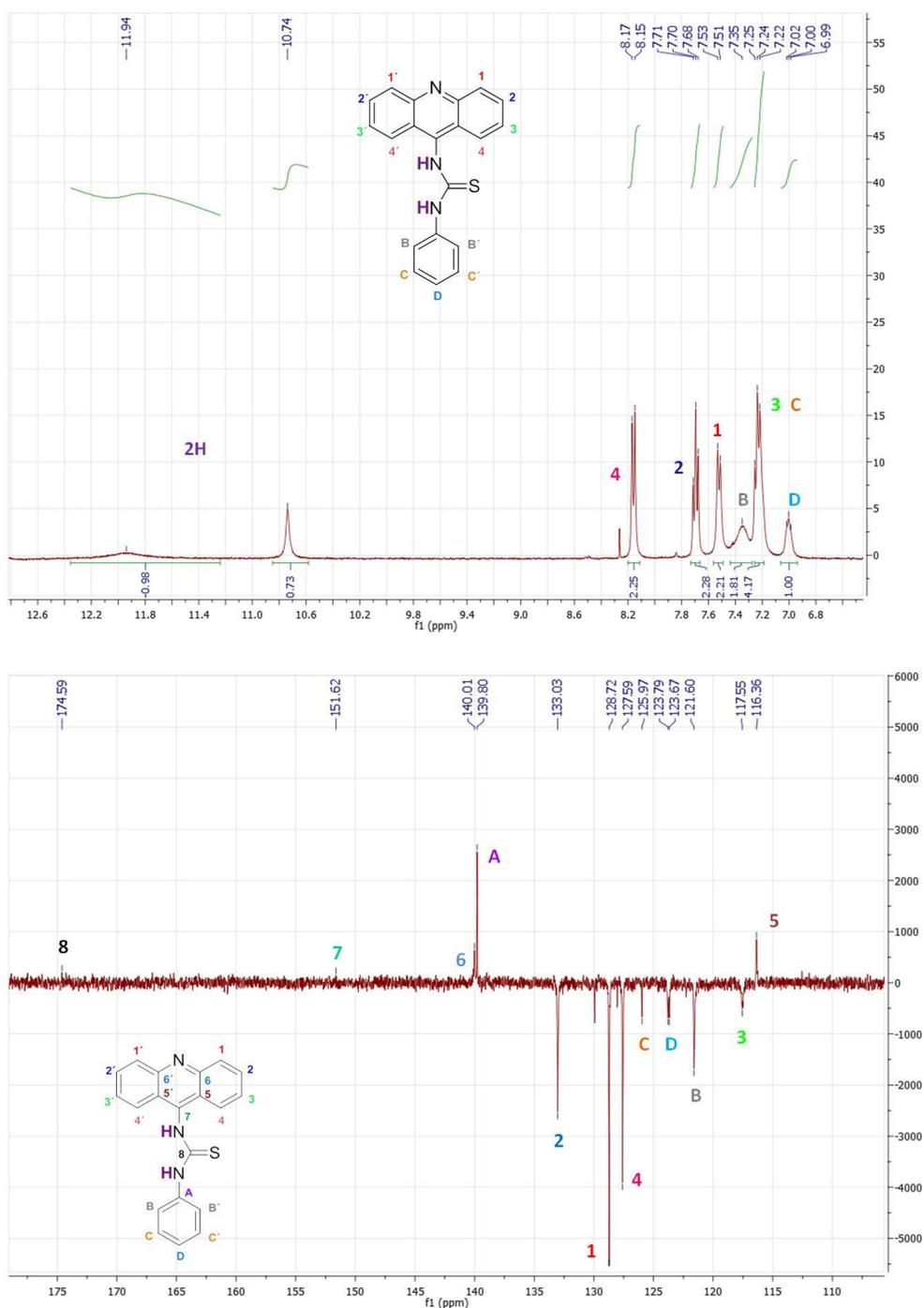


Figura 7. Espectro ^1H -RMN y ^{13}C -RMN correspondiente al ligando L4.

En el espectro ^1H -RMN, se observó un mayor apantallamiento de los hidrógenos 1, 2, 3 y 4, correspondientes al producto de partida. En concreto en el caso de L4 pasan de 7.82, 7.65,

7.32 y 8.40 ppm en la 9-aminoacridina de partida a 7.45, 7.54, 7.20 y 8.18 ppm, respectivamente, cuando se forma ligando deseado. En el espectro ^{13}C -RMN los cambios más significativos se observaron en los carbonos más cercanos a la amina, donde se observa un desplazamiento de los carbonos 3, 4, 5 y 7 que pasan de 121.7, 123.4, 112.9 y 150.6 ppm en el producto de partida a 117.5, 127.6, 116.4 y 151.1 ppm, respectivamente. Además en el caso del ligando L6, el espectro de ^{19}F -RMN, muestra una señal a 112.12 ppm indicando la presencia del fragmento 3-fluorofenil en la molécula.

La obtención de L4 y L6 puros ha sido mucho más laboriosa que en el caso de los análogos L1-3, ya que en muchos casos se obtenía una mezcla del ligando deseado con 9-aminoacridina. A pesar de continuos lavados con distintos disolventes o intentos por encontrar las condiciones adecuadas para hacer una separación por columna cromatográfica, no se ha logrado establecer un método para ello. Por ello, únicamente en los casos donde la 9-aminoacridina se consumía totalmente durante la reacción, se puede llegar a aislar el ligando puro. Además de esto, en el caso específico del L5 se han observado la formación de dos productos de reacción, que no se han podido identificar. No cabe duda de que en ambos casos se trata de tioureas análogas, puesto que el ^1H -RMN muestra la señal $-\text{CH}_2-$ del fragmento bencil-isotiocianato como un doblete y el correspondiente triplete asociado al protón de la amina ($-\text{NH}$) contigua, como sucedía en el caso de su análogo L2, ver anexos. Por esta razón este ligando no se ha considerado válido para seguir este estudio.

3.2. Estudio y síntesis de los complejos metálicos

Una vez sintetizado los derivados de tiourea se procedió a su coordinación con Ag(I), utilizándose AgOTf como fuente metálica para los ligandos L1-L3 y $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{PPh}_3)]$ para los ligandos L4 y L6. En el primer caso, la reacción de coordinación se han realizado utilizando estequiometrias 1:1 y 1:2 ($\text{Ag}:\text{L}(1-3)$), y anticipando el enlace del metal a través del átomo de azufre, ver figura 8.

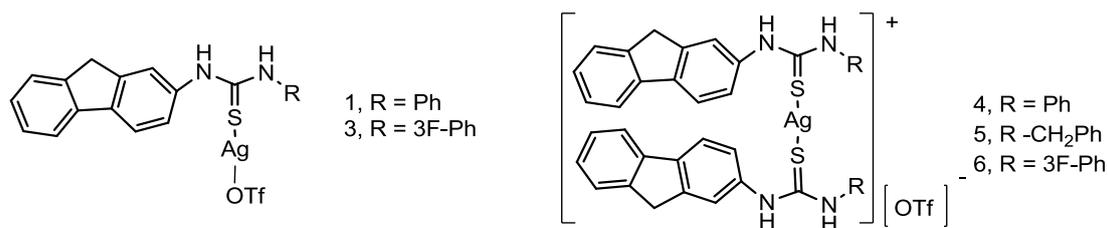
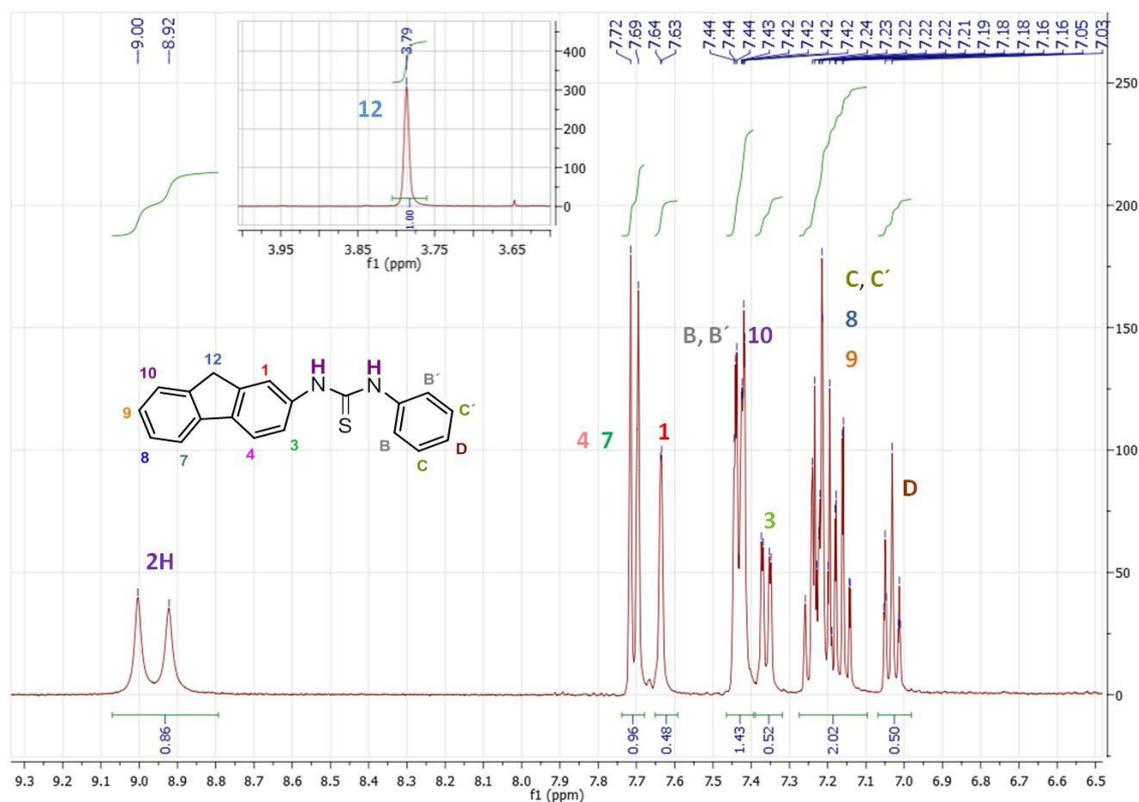


Figura 8. Complejos metálicos de Ag (I) derivados de L1-3.

El procedimiento experimental seguido para la obtención de los complejos metálicos C1, C3, C4, C5 y C6 ha sido la misma en todos los casos. Específicamente, una mezcla en acetona de ligandos y el AgOTf en las cantidades estequeométricas correspondientes se agitaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 3 h. Tras este tiempo, se evaporó el disolvente hasta un volumen mínimo obteniéndose un aceite de color marrón oscuro. A éste se le adicionó 20 ml de hexano (en tres fracciones), manteniéndose la agitación en todo momento. Finalmente se aislaron los productos por filtración o decantación como sólidos marrones y con rendimientos de 42% y 85.9% para los complejos C1 y C3 y de 39%, 40% y 85% para los complejos C4, C5 y C6 respectivamente. El complejo C2 no pudo caracterizarse

completamente debido a que no se obtuvo el producto puro (ver anexos), a pesar de los diversos intentos realizados.

Por espectroscopia infrarroja, se observó en todos los casos una debilitación del enlace N-C=S tras la coordinación del metal. Así pues hubo un desplazamiento de la banda correspondiente a la vibración del enlace N-C=S de 1245, 1233/1259 y 1242 cm^{-1} , en los ligandos L1, L2 y L3, respectivamente, a 1216 y 1216 cm^{-1} en los complejos C1 y C3 y a 1222, 1223 y 1249 cm^{-1} en los complejos C4, C5 y C6. , Así mismo, en el espectro ^1H -RMN, se observó un desplazamiento del H(1) y H(3) hacia campos altos tras la coordinación del metal. En concreto, la figura 6 muestra el espectro de ^1H -RMN de L1 y el complejo C4 y se observa, por un lado, el H(1) pasa de un singlete a 7.77 ppm en el ligando a un singlete a 7.56 ppm; en el complejo. De la misma forma el H(3) pasa de dar un doblete de doblete a 7.50 ppm en L1, a estar integrado dentro del multiplete a 7.37-7.44 ppm en el espectro del complejo C4 (ver Figura 9). Estos mismos desplazamientos, aunque con ligeras variaciones, también son aplicables al resto de los complejos sintetizados.



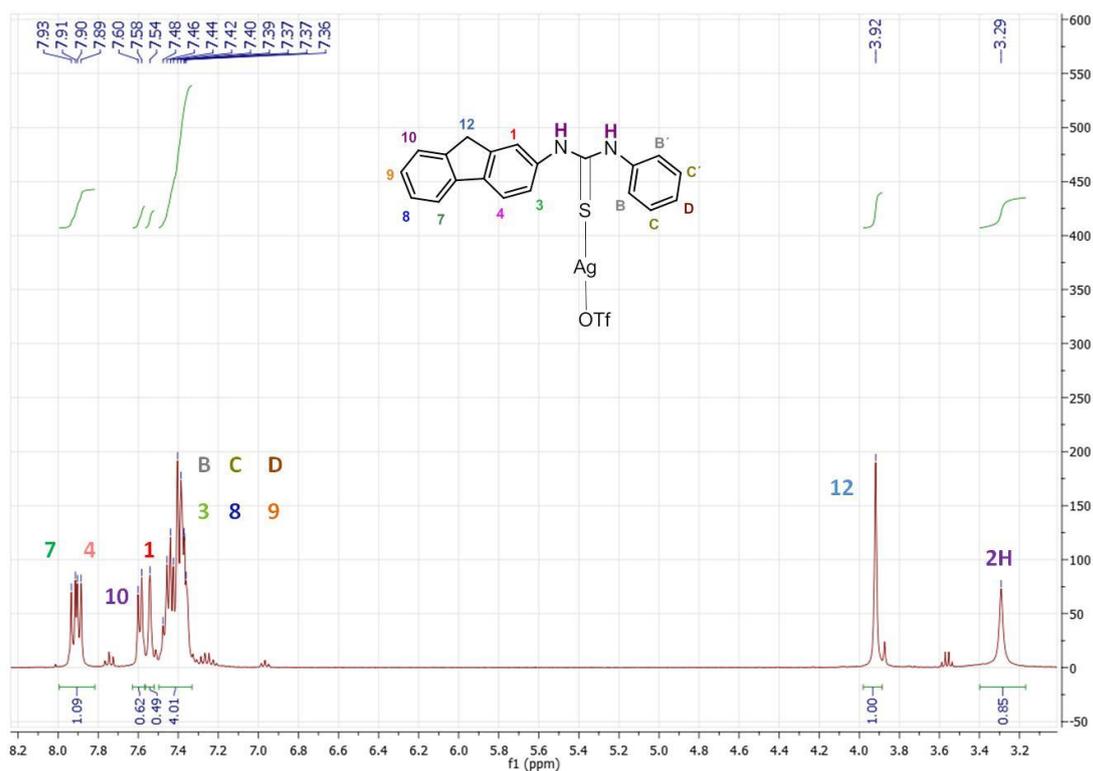


Figura 9. Espectros de ^1H -RMN correspondientes a L1 y C1.

Para el caso de L2 Y L3 y sus respectivos compuestos se sigue el mismo patrón, además para el caso del ligando L3 y el complejo C3 y C6 se observa de un cambio en la señal y el desplazamiento del hidrogeno H(D), dando un multiplete en 6.88-6.94 ppm en el ligando a un triplete a 7.19 ppm y un doblete a 7.30 ppm en los complejos respectivamente; es decir, el hidrógeno H(D) sufre un desplazamiento hacia campos bajos tras la coordinación del metal. En el espectro ^{13}C -RMN, los cambios más significativos después de la coordinación con el metal son los desplazamientos de los carbonos C(3) y C(5) hacia campos altos, posiblemente por encontrarse más apantallados en presencia del metal. A modo de ejemplo, la figura 10 muestra el espectro ^{13}C -RMN del compuesto C5 y el ligando L2 con las distintas asignaciones de sus carbonos más característicos.

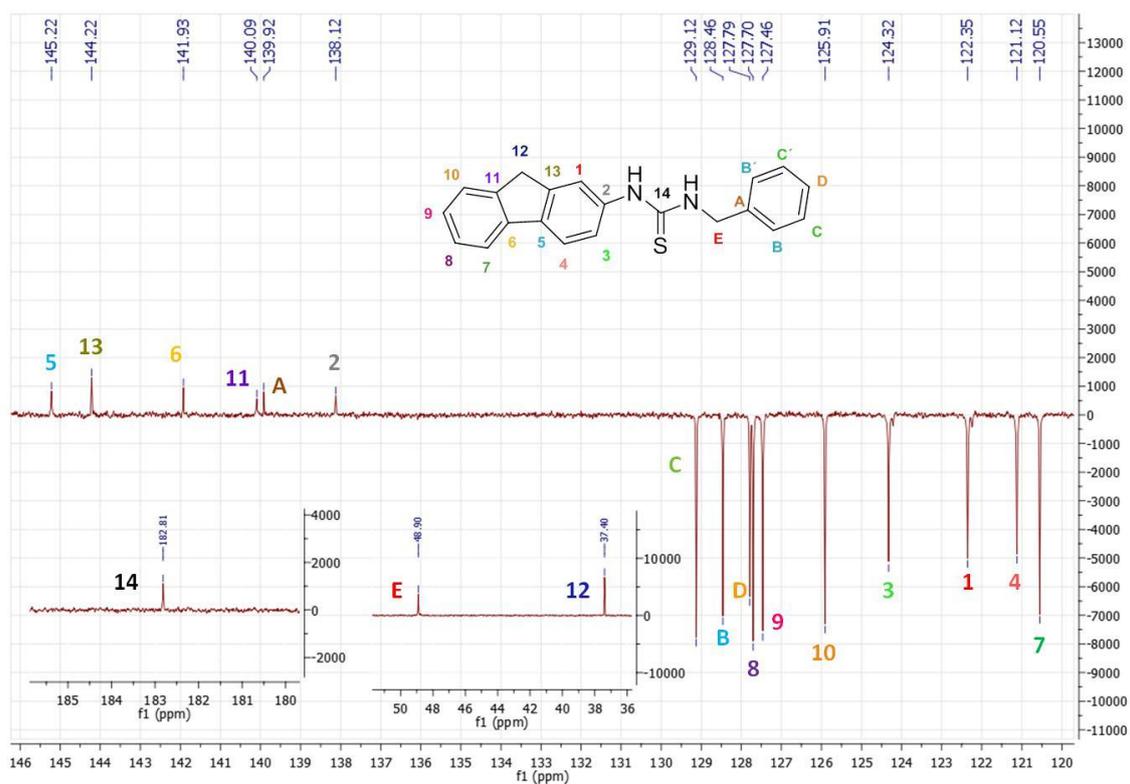
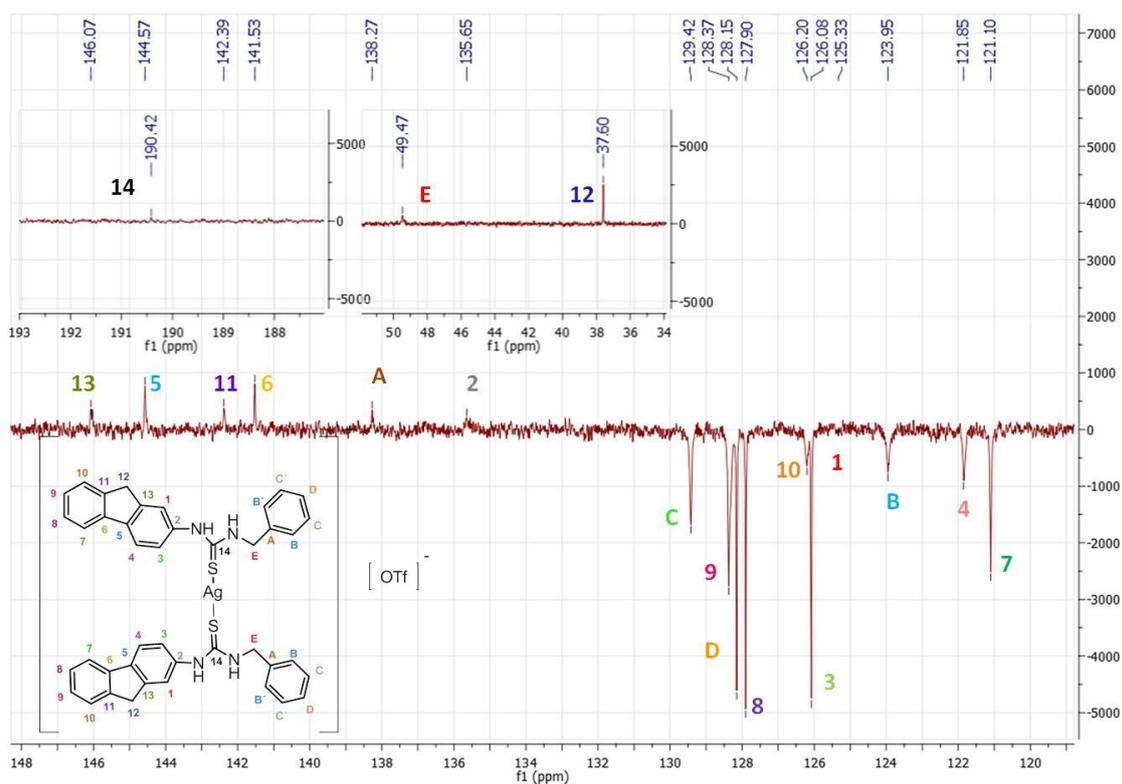


Figura 10. Espectros de ¹³C-RMN correspondientes a C5 y L2.

Para el caso de las tioureas L4 y L6, se ha optado por realizar la reacción de coordinación con [AgOTf(PPh₃)]. La introducción del fragmento trifenilfosfina ayudará probablemente a que el compuesto metálico pueda ser incorporado a las células más fácilmente. Estudios de

citotoxicidad realizados con distintas fosfinas metálicas demuestran que es importante un balance en la lipofilicidad de los compuestos para obtener una mayor eficacia. Lamentablemente, y aunque la espectrometría de masas nos indica que los productos deseados se habían formado, estos no se han podido aislar satisfactoriamente de subproductos de descomposición formados durante la reacción. A modo de ejemplo, en la figura 11 se muestra el espectro de masas para el complejo C9.

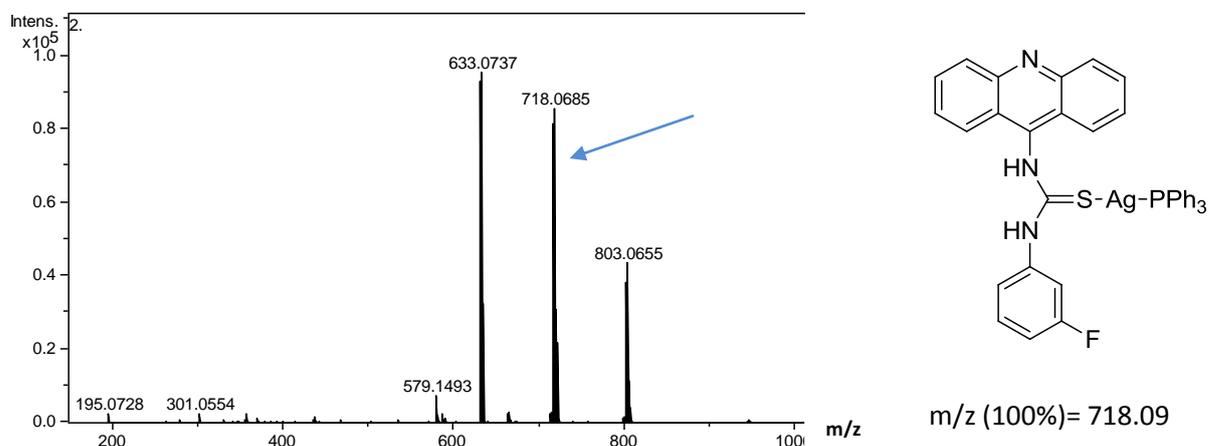


Figura 11. Espectro de masas del compuesto C9

3.3. Estudio de las propiedades fotofísicas.

Se ha realizado un estudio de las propiedades fotofísicas de los ligandos y complejos sintetizados por medio de la espectroscopia de UV-visible y de emisión.

Los espectros de absorción UV-visible tanto de los de los ligandos L1-L4 y L6 como de los complejos C1 y C3-C6 se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para el caso de los ligandos L1-L3 y los complejos C1 y C3-C6 las medidas se llevaron a cabo en DCM, mientras que para los ligandos L4 y L6, las medidas se llevaron a cabo en DMSO (debido a que L4 y L6 tienen baja solubilidad en otro disolvente).

Los datos espectrales correspondientes a los ligandos L1-4 y L6 los correspondientes a los complejos C1 y C3-6 se resumen en la tabla 1 junto con los correspondientes coeficientes de extinción. Como ejemplo se muestra el espectro de UV-Vis obtenido para el ligando L1 y sus respectivos complejos, figura 12.

Tabla 1. Datos espectrales correspondientes a los ligandos L1-L4 y L6 y los complejos C1-C6.

	Absorbancia/nm ($\epsilon/M^{-1}Cm^{-1}$)		Absorbancia/nm ($\epsilon/M^{-1}Cm^{-1}$)
L1	229(21200), 276(18200), 305(15400)	L3	228(27000), 282(22800), 302 (22200)
C1	228(37100), 272(39600), 305(35200)	3	227(19700), 270(22400), 304(18600)
C4	229(239000), 274(281000), 304(261000)	6	228(29800), 276(38400), 305(31000)
L2	221(10300), 284 (15300),303(16900)	L4	260 (3500), 430 (1400)
C5	281(69700), 303(62100)	L6	265(38000), 436(12600)

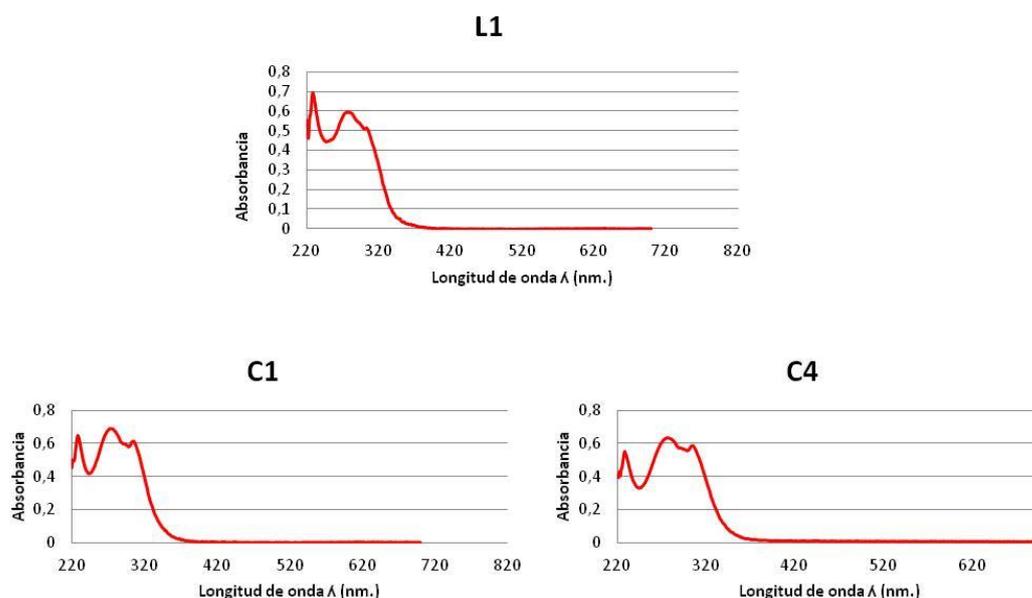


Figura 12. Espectros UV-visible correspondientes a L1, C1 y C4

Las bandas de absorción intensa observadas alrededor de 230 y 270-280 nm han sido asignadas a las transiciones intraligando (IL) ($\pi \rightarrow \pi^*$) debido a las transiciones de los electrones de los anillos aromáticos). Además, las bandas de absorción observadas en torno a 305 nm se corresponden con transiciones intraligando (IL) ($n \rightarrow \pi^*$), las cuales son menos intensas que las anteriores debido a que la probabilidad de que ocurra este tipo de transición es menor. Al coordinar el metal al ligando no se observa que aparezcan nuevas banda.

También se estudiaron las propiedades luminiscentes tanto de los ligandos L1-L4 y L6 como de sus respectivos complejos C1 y C3-C6 a través del análisis de sus respectivas bandas de emisión. Interesa que los diferentes ligandos y complejos emitan con una intensidad razonable para que puedan ser visualizados aun siendo utilizados a concentraciones muy bajas. Además, es importante que tengan un máximo de excitación fuera ultravioleta para no dañar las células al ser irradiadas.

Se observó que para los tres ligandos derivados de 2-aminofluoreno (L1-3) aparece una banda de emisión estructurada, con un máximo en torno a 450 nm que se asigna a transiciones intraligando (1IL). Sus respectivos complejos también muestran espectros de emisión muy parecidas entre sí. Son emisiones estructuradas con máximos en torno a 430 o 450 nm, que por analogía con lo visto para sus ligandos también se asignan a transiciones 1IL . El único complejo que muestra un perfil diferente es el complejo C4. Éste, además de tener la banda IL a 450 nm, presenta otra a 550 nm cuyo máximo de excitación es de 500 nm y que se podría asignar tentativamente a una transferencia de carga del ligando al metal (LMCT). En el caso de los espectros de emisión de los ligandos derivados de acridina L4 y L6, también se observa una emisión estructurada entorno a 460 nm que seguramente sea debida a transiciones intraligando dentro del fragmento de acridina. Así mismo también se observa una segunda banda de emisión entorno a 550 nm que la asignamos a una transición intraligando pero esta

vez con la participación del fragmento tiourea. A modo de ejemplo se muestra en la figura 13, el espectro de excitación y de emisión para el ligando L3 y los complejos C3 y C6 y la figura 14 el correspondiente al L6.

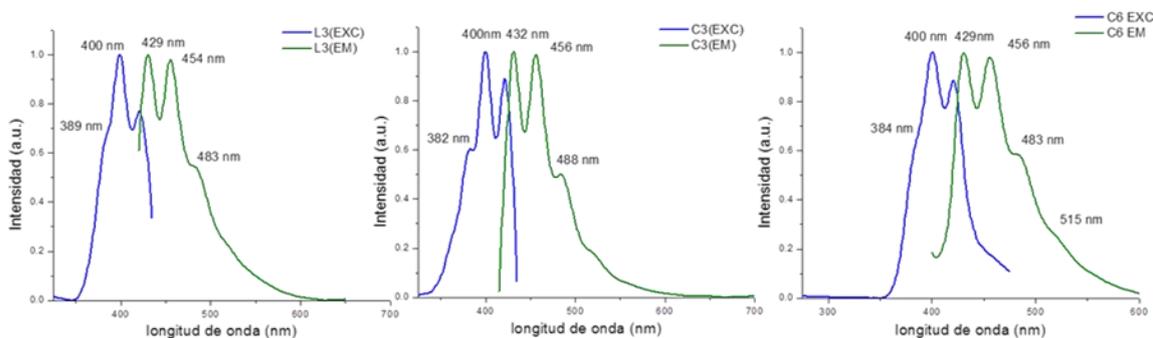


Figura 13. Espectros de excitación-emisión de L3, C3 y C6.

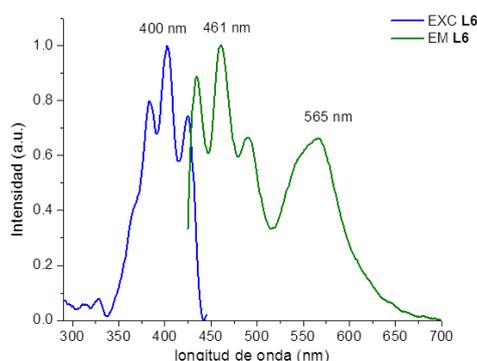


Figura 14. Espectro de excitación-emisión correspondiente a L6.

Cabe destacar que la intensidad de emisión observada en todos los casos ha sido mucho más pequeña de lo esperado considerando la presencia de los fragmentos cromóforos, fluoreno y acridina. Específicamente, en la Tabla 2, se muestran los máximos de excitación y emisión observados.

Tabla 2. Datos de excitación/emisión de los ligandos y complejos sintetizados.

	$\lambda_{\text{emisión}} \text{ (nm.)} / (\lambda_{\text{excitación}}) \text{ (nm.)}$		$\lambda_{\text{emisión}} \text{ (nm.)} / (\lambda_{\text{excitación}}) \text{ (nm.)}$
L1	431 (h ¹), 454 (f ²), 483 (h) / (398)	L3	429 (f), 454 (f), 483 (h) / (400)
C1	458 (f), 487 (h) / (400)	C3	432 (f), 456 (h), 488 (h) / (400)
C4	423 (f), 454(h), 488(h), 550/ (380)	C6	429 (f), 456 (f), 483 (h), 515 (h) / (400)
	550 (f)/ (525)	L4	460 (f), 553 (f) / (402)
L2	435 (h), 456(f), 483 (h) / (397)	L6	461 (f), 565 (f) / (400)
C5	431), 456 (f), 485 (h) / (400)		

¹ h: hombro

² f: fuerte

3.4. Estudio de la actividad biológica

La actividad biológica se ha estudiado para los ligandos L1-L4 y L6 Y los complejos C1 y C3-C6. Específicamente, se ha utilizando el ensayo MTT para determinar la posible actividad antiproliferativa de los ligandos y compuestos sintetizados sobre una línea celular tumoral A-549, células cancerígenas de pulmón. Las sales de tetrazolio son útiles para ensayos de cuantificación de células viables debido a que la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a azul formazán solo se puede producir por la presencia de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) de las células vivas. En la figura 15, se muestra a modo de esquema la reacción que tiene lugar por acción de dichas enzimas.

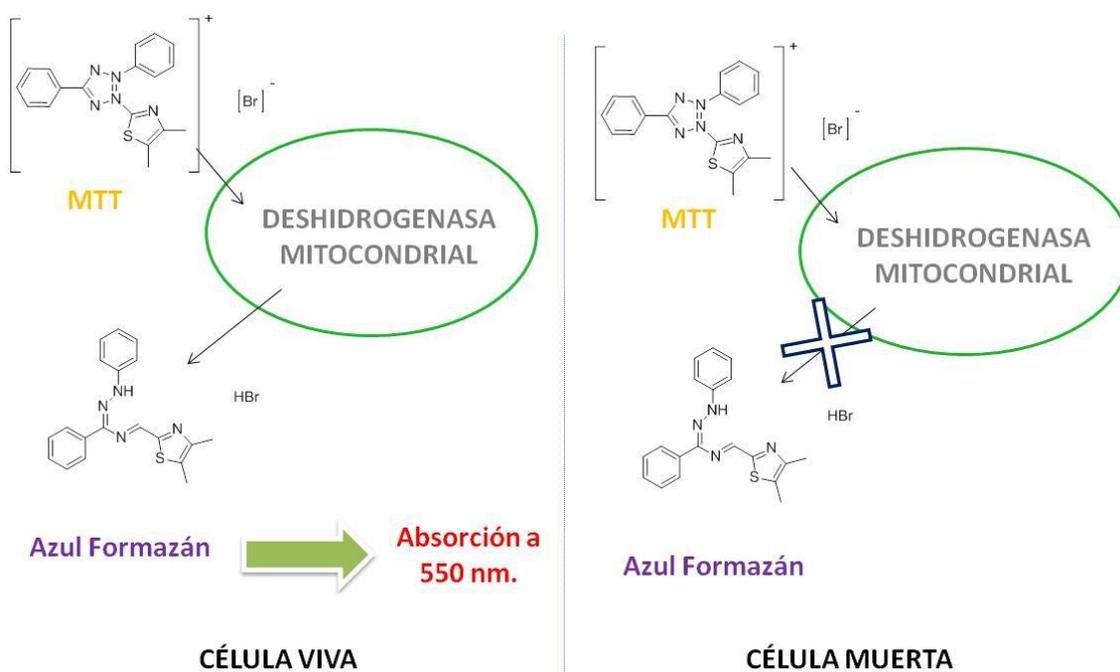


Figura 15. Reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para la determinación de la citotoxicidad por el método MTT, se sembraron en una placa de 96 pocillos células A-549 en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 100 μ l) y se tuvieron incubando durante 24 horas, a 37°C y con un 5% en CO₂. Se sembraron en cada pocillo aproximadamente el mismo número de células (15000 células/pocillo aproximadamente) para que fueran comparables.

Se preparó una disolución de stock 0.1 M en DMSO de cada ligando y complejo y a partir de ésta una intermedia de 0.001M en medio de cultivo. A partir de la disolución intermedia se prepararon cinco disoluciones de concentraciones 5, 10, 50, 100 y 200 μ M. Se reservó la primera columna de la placa de 96 pocillos para el control, al cual se añadió solo medio de cultivo con el porcentaje máximo de DMSO utilizado a las células ya incubadas. En las cinco columnas siguientes al control se añadieron 50 μ L de las distintas disoluciones preparadas (total de 100 μ L por pocillo) obteniéndose una concentración final igual a la mitad de la

concentración añadida de compuesto a estudiar. Con el fin de obtener datos más fiables, para cada concentración se realizan cuatro replicas. Por último; se añadió 100 µl de medio de cultivo a la columna nº12, en la cual no hay células y así se utilizó como blanco, ver figura 16.

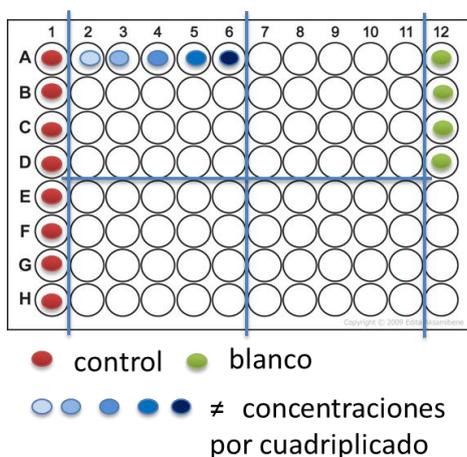


Figura 16. Esquema de placa de 96 pocillos para la realización del ensayo MTT

El color de los pocillos es rojizo una vez acabada de preparar el experimento debido al rojo de fenol que contiene el DMEM. Tras 24 horas en cultivo, se lleva a cabo la adición del MTT (10µL por pocillo de una disolución 5 mg/L) y dejamos que actúe durante 2 horas en la estufa. Eliminamos el medio de cultivo y disolvemos los cristales de formazán formados en DMSO y realizamos las medidas espectrofotométricas recogiendo las absorbancias medidas a 550 nm. Los resultados se expresan en porcentajes de células vivas según la ecuación 1:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{Abs}(\text{pocillo con ligando/complejo})}{\text{Abs}(\text{pocillo control DMSO})} \times 100$$

Ecuación 1.

Representando en una gráfica % células vivas frente a la concentración, y ajustando los puntos a una curva sigmoidea podemos calcular el IC₅₀ (concentración de ligando o complejo que inhibe la población celular al 50% respecto a los controles). A modo de ejemplo se muestra la grafica obtenida para el complejo C5 (Figura 17).

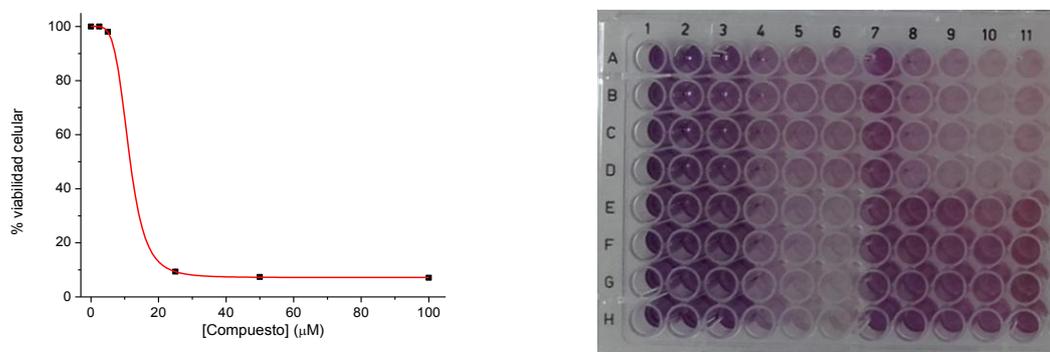


Figura 17. Grafica de IC₅₀ correspondiente a C5 (izquierda) e imagen de uno de los experimentos MTT (derecha).

Como se puede observar las tioureas derivadas del fluoreno son mucho más citotóxicas que las derivadas de acridina, los cuales no presentaron citotoxicidad en las condiciones de trabajo. Por otro lado, la coordinación del metal a las tioureas L1-L3 no parece mejorar su bioactividad como cabría esperar en principio. Lo que es evidente es que los complejos tipo sándwich son mucho menos citotóxicos que sus correspondientes ligandos.

Tabla 3. Concentración inhibitoria media correspondiente a los ligandos L1-L4 y L6 y los complejos C1 y C3-C6

compuesto	IC ₅₀	compuesto	IC ₅₀
L1	4.98 ± 0.702 μM	L3	2.85 ± 0,30 μM
C1	2,52 ± 0,20 μM	C3	5,98 ± 2,86 μM
C4	10,96 ± 1,39 μM	C6	13,98 ± 1,63 μM
L2	5.39 ± 0.18 μM	L4	>100 μM
C5	11,24 ± 0,01 μM	L6	>100 μM

3.5. Estudio de la biodistribución.

Un ligando de cada familia de tioureas, L1 y L4, fue incubado con células A549 para proceder a su visualización por microscopía de fluorescencia. La incubación de los compuestos se ha realizado colocalizando un tinte comercial, el LisoTracker, que específicamente se va a localizar en los lisosomas de las células y únicamente se observa cuando se irradia las células a 577 nm. Además la concentración utilizada de L1 y L4 ha sido la mitad de su IC₅₀ para evitar la muerte celular antes de poder ser visualizadas. Como L4 había resultado no citotóxico a 100 μM esa ha sido la concentración utilizada, mientras que en el caso de L1 se ha tomado 2.5 μM. Irradiación de las células a 405 nm muestra únicamente la emisión por procedente de L4 y L6 mientras que irradiando a 577 nm se observa la del standard interno en los lisosomas. Como se puede observar en las fotografías tomadas con el microscopio confocal (Figura 18), para el ligando L4 (color azul) se observa una emisión distribuida a los largo de toda la célula, incluyendo el núcleo. Parece que en algunos casos se observa una distribución granulada en el citoplasma, que no coincide con una localización lisosomal (color rojo). La superposición de las imágenes obtenidas después de excitar a 405 nm y 577 nm corrobora esta idea. En el caso de L1, no se ha logrado ver ninguna emisión por parte de las células al ser excitado. Posiblemente la concentración tan pequeña utilizada y la baja intensidad de emisión que se observada por espectroscopia de fluorescencia ha sido determinante en este resultado. En ninguno de los dos casos se ha observado la muerte celular, lo que confirma que las concentraciones de trabajo habían sido las adecuadas.

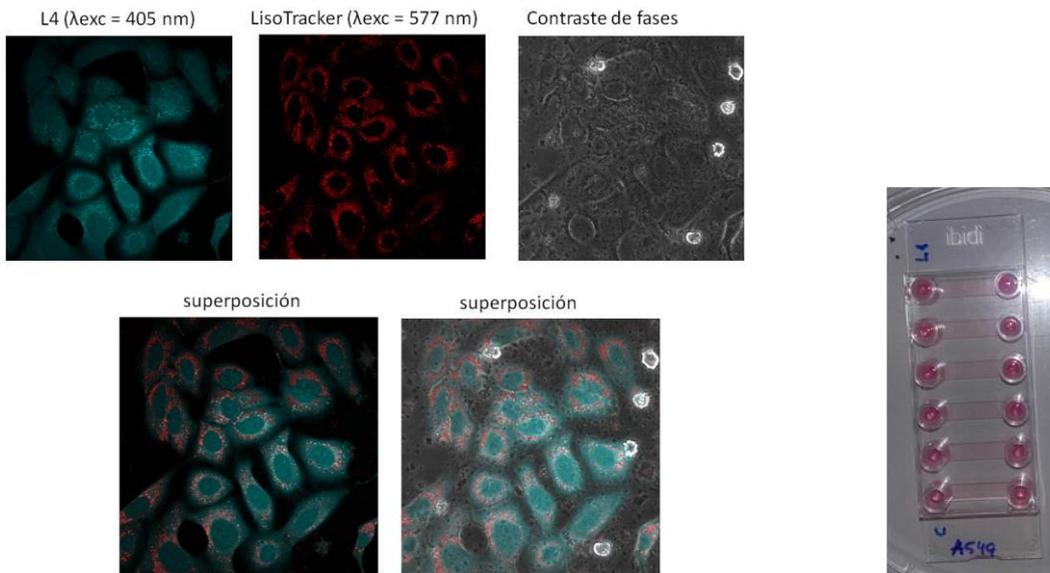


Figura 18. Fotografías tomadas con el microscopio confocal de L4 colocalizado con el tinte comercial LisoTracker de la placa IBIDI de 6 canales donde se realizó el experimento.

4. PARTE EXPERIMENTAL:

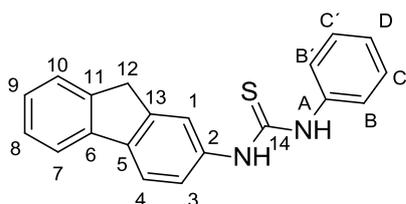
4.1. Instrumentación

Los espectros de RMN se han realizado a 298 K en un espectrómetro Bruker Advance 400 MHz y los desplazamientos químicos (δ , ppm) se han dado utilizando como referencia los picos residuales del respectivo disolvente deuterado en cada caso (acetona, DMSO). 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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5 % de CO_2 . Las placas se visualizaron en un lector de placas de 96 pocillos multiscanner (ELISA) Las imágenes de biodistribución se han obtenido en un microscopio de fluorescencia Olympus FV10-i Confocal Laser Scanning usando objetivos $\times 10$ ó $\times 60$ e irradiando con unas longitudes de onda de excitación de 405, 473 y 577 nm.

4.2. Síntesis y caracterización de ligandos L1 – L4 y L6:

4.2.1. Síntesis del ligando L1

A una disolución de 2-aminofluoreno (250 mg, 1.38 mmol) en etanol (25 ml) se añade un equivalente de fenil-isocianato (170 μL , 1.38 mmol) obteniendo una disolución incolora. La mezcla se deja a reflujo durante 30 minutos, tiempo durante el cual se observa la precipitación de más sólido blanco. Transcurrido ese tiempo el sólido formado se separa por filtración, se lava con etanol frío y se seca a vacío (282.4 mg, 64.7%).



Fórmula química: $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$
Peso molecular (g/mol): 316,42

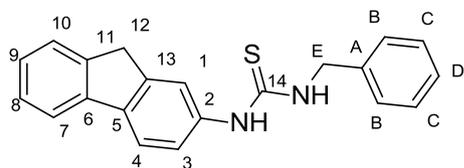
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3284, 1533; ν (H-C_{ar}):3052; ν (C_{ar}=C_{ar}):1614, 1588; ν (N-C=S):2183, 1314, 1245; ν (C=S):731.

^1H -RMN (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ : 9.13 (d, $J=30.56 \text{ Hz}$, 2H, 2 NH), 7.84 (d, $J=8.06 \text{ Hz}$, 2H, H(4),H(7)), 7.77 (s, 1H, H(1)), 7.56 (d, $J=8.28 \text{ Hz}$, 3H, 2H(B, B'), H(10)), 7.50 (dd, $J= 1.12\text{Hz}$, 8.16 Hz, 1H, H(3)), 7.33 (m, 4H, 2H(C, C'), H(8), H(9)), 7.16 (t, $J= 6.95\text{Hz}$, 1H, H(D)), 3.92 (s, 2H, 2H(12)).

^{13}C -RMN (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ :181.4 (s, 1C, C(14)), 144.8 (s, 1C, C(13)), 144.3 (s,1C, C(11)), 142.0 (s, 1C, C(6)), 140.3 (s,1C, C(A)), 139.8 (s, 1C, C(5)), 138.8 (s,1C, C(2)), 129.4 (s, 2C, C(C, C')), 127.7 (s,1C, C(9)), 127.4 (s, 1C, C(8)), 125.9 (s,2C, C(B, B')), 126.0(S, 1C, C(D)), 125.3 (s, 1C, C(10)), 124.3 (s,1C, C(3)), 122.3 (s, 1C, C(1)), 120.8 (s,1C, C(7)), 120.5 (s, 1C, C(4)), 37.4 (s,1C, C(12)).

4.2.2. Síntesis del ligandos L2

A una disolución de 2-aminofluoreno (250 mg, 1.50 mmol) en etanol (25 ml) se añade un equivalente de bencil-isotiocianato (170 μ L, 1.50 mmol) obteniendo una disolución amarilla. La mezcla se deja a reflujo durante 1 hora y 30 minutos, tiempo durante el cual se observa la precipitación de más sólido blanco brillante. Transcurrido ese tiempo el sólido formado se separa por filtración, se lava con etanol frío y se seca a vacío (415.5 mg, 84.8%).



Fórmula química: $C_{21}H_{18}N_2S$
Peso molecular (g/mol): 330,45

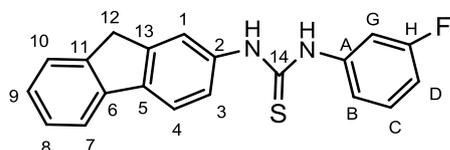
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3273, 3231, 1547; ν (-CH₂-):2925, 1451; ν (H-C_{ar}):3056; ν (C_{ar}=C_{ar}):1618; ν (N-C=S):2160, 1336, 1316; ν (C=S): 727.

¹H-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ : 9.00 (s,1H, NH), 7.83 (d, J=8.1 Hz, 2H, H(4),H(7)), 7,67 (s, 1H, H(1)), 7.58-7.65 (m, 1H, NH), 7.56 (d, J=7.4 Hz, 1H, H(10)), 7.20-7.42 (m, 8H, H(3), H(8), H(9), H(B, B'), H(C, C'), H(D)), 4.91 (d, J= 5.8, 2H, 2H(E)), 3.90 (s, 2H, 2H(12)).

¹³C-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ : 182.8 (s, 1C, C(14)),145.2 (s, 1C, C(5)), 144.2 (s, 1C, C(13)), 141.9 (s, 1C, C(6)), 140.1 (s, 1C, C(11)), 139.9 (s, 1C, C(A)), 138.1 (s, 1C, C(2)), 129.1 (s, 1C, C(C, C')), 128.5 (s, 1C, C(B, B')), 127.8 (s, 1C, C(D)), 127.7 (s, 1C, C(8)), 127.5 (s, 1C, C(9)), 125.9 (s, 1C, C(10)), 124.3 (s, 1C, C(3)), 122.4 (s,1C, C(1)), 121.1 (s, 1C, C(4)), 120.6 (s, 1C, C(7)), 48.9 (s, 1C, C(E)), 37.4 (s,1C, C(12)).

4.2.3. Síntesis del ligando L3

A una disolución de 2-aminofluoreno (250 mg, 1.38 mmol) en etanol (25 ml) se añade un equivalente de 3-fluorofenil-isotiocianato (170 μ L, 1.38 mmol) obteniendo una disolución amarilla. La mezcla se deja a reflujo durante 1 hora, tiempo durante el cual se observa la precipitación de más sólido blanco apagado. Transcurrido ese tiempo el sólido formado se separa por filtración, se lava con etanol frío y se seca a vacío (267.4 mg, 58.0%).



Fórmula química : $C_{20}H_{15}FN_2S$
Peso molecular (g/mol): 334,41

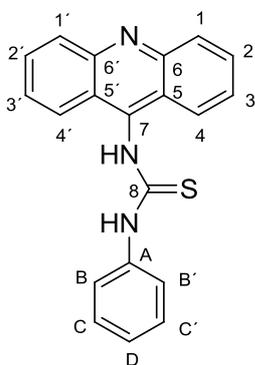
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3285, 1531; ν (H-C_{ar}): 3054; ν (C_{ar}=C_{ar}):1603; ν (N-C=S):2160, 1242; ν (C=S):732.

¹H-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ : 9.29 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 7.85 (d, J=8.03 Hz, 2H, H(4),H(7)), 7,75 (d, J=1 Hz, 1H, H(1)), 7.63 (m, 1H, H(G)), 7.58 (m, 1H, H(10)), 7.48 (dd, J=8.97 Hz y J=8.16 Hz, 1H, 1H(3)), 7.28-7.40 (M, 4H, H(8), H(9), H(B), H(C)), 6.88-6.94 (m, 1H, H(D)), 3.93 (s, 1H, 1H(12)).

¹³C-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ:181.2 (s, 1C, C(14)),162.1 (d, J=243 Hz, 1C, C(H)), 145.0 (s, 1C, C(13)), 144.3 (s,1C, C(11)), 142.4 (s, 1C, C(A)), 142.0 (s,1C, C(6)), 140.1 (s, 1C, C(5)), 138.5 (s,1C, C(2)), 130.7 (d, J= 10 Hz, 1C, C(C)), 127.7 (s,1C, C(8)), 127.5 (s, 1C, C(9)), 125.9 (s,1C, C(10)), 124.4 (s, 1C, C(3)), 122.4 (s, 1C, C(1)), 120.9 (s,1C, C(7)), 120.6 (s, 1C, C(4)), 120.3 (d, J=34 Hz, 1C, C(B)), 112.0 (d, J=21 Hz, 1C, C(D)),111.7 (d, J=25 Hz, 1C, C(G)), 37.4 (s,1C, C(12)).

4.2.4. Síntesis del ligandos L4

A una disolución de 9-aminoacridina (150 mg, 0.77 mmol) en cloroformo (25 ml) se añaden 3 equivalente de fenil-isotiocianato (190 µL, 1.6 mmol) obteniendo una suspensión amarilla. La mezcla se deja a reflujo durante 24 horas, tiempo durante el cual se observa la precipitación de un sólido naranja. Transcurrido ese tiempo, el sólido formado se separa por filtración, se lava con cloroformo frío y se seca a vacío (134.2 mg, 53%).



Fórmula química: C₂₀H₁₅N₃S
Peso molecular (g/mol): 329,42

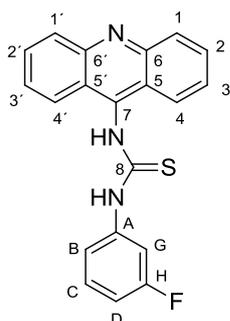
IR (cm⁻¹): ν (N-H):3150, 1536; ν (H-C_{ar}): 2915; ν (C_{ar}=C_{ar}):1627; ν (N-C=S):2216, 1267, 1236; ; ν (C=S):745.

¹H-RMN (ppm)(400MHz, (DMSO-d₆), δ: 11.79 (s, 1H, NH), 10.75 (s, 1H, NH), 8.18 (d, J= 8.16 Hz, 2H, H(4, 4')), 7.60 (t, J=7.13 Hz, 2H, H(2, 2')), 7,54 (d, J=8.30 Hz, 2H, H(1, 1')), 7.33-7.48 (m, 2H, H(B, B')), 7.10-7.31 (m, 4H, H(3, 3'), H(C, C')), 7.00 (t, J=6.70 Hz, 1H, H(D)).

¹³C-RMN (ppm)(400MHz, (DMSO-d₆), δ:174.6 (s, 1C, C(8)),151.6 (s, 1C, C(7)), 140.0 (s, 2C, C(6, 6')), 139.8 (s, 1C, C(A)), 133.0 (s, 2C, C(2, 2')), 128.7 (s,2C, C(1, 1')), 127.6 (s, 2C, C(4, 4')), 126.0 (s,2C, C(C, C')), 123.7 (d, 1C, C(D)), 121.6 (s,2C, C(B, B')), 117.6 (s, 2C, C(3, 3')), 116.4 (s,2C, C(5, 5')).

4.2.5. Síntesis del ligando L6

A una disolución de 9-aminoacridina (97.1 mg, 0.5 mmol) en cloroformo (25 ml) se añaden tres equivalente de 3-fluorofenil-isotiocianato (185 µL, 1.5 mmol) obteniendo una suspensión amarilla. La mezcla se deja a reflujo durante 24 horas, tiempo durante el cual se observa la precipitación de más sólido naranja. Transcurrido ese tiempo el sólido formado se separa por filtración, se lava con etanol frío y se seca a vacío (153.6 mg, 88.4 %).



Fórmula química: $C_{20}H_{14}FN_3S$
 Peso molecular (g/mol) : 347,41

IR (cm^{-1}): ν (N-H):3134, 1550; ν (H- C_{ar}): 3066; ν ($C_{ar}=C_{ar}$):1660, 1627; ν (N-C=S):2085, 1266; ν (C=S):746.

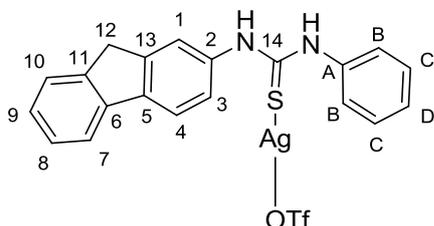
1H -RMN (ppm)(400MHz, (DMSO- d_6), δ : 12.14 (s, 1H, NH), 10.80 (s, 1H, NH), 8.16 (dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.0$ Hz, 2H, H(4, 4')), 7.74 (m, 2H, H(2, 2')), 7,58 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H(1, 1')), 7.28 (m, 5H, 2H(3, 3'), H(B), H(C), H(G)), 6.82 (s, 1H, H(D)).

^{13}C -RMN (ppm)(400MHz, (DMSO- d_6), δ : 179.9 (s, 1C, C(8)), 162.1 (s, 1C, C(H)), 151.90 (s, 1C, C(7)),140.2 (s, 2C, C(6, 6')), 141.7 (s, 1C, C(A)), 133.3 (s, 2C, C(2, 2')),130.4 (d, $J=10$ Hz, 1C, C(G)), 127.6 (s,2C, C(4, 4')), 121.9 (s, 2C, C(3, 3')),117.9 (s, 2C, C(1, 1')), 116.3 (s,2C, C(5, 5')), 115.9 (s, 1C, C(B)), 109.8 (d, $J=22$ Hz, 1C, C(D)), 106.8 (d, $J=21$ Hz, 1C, C(C)).

4.3. Síntesis de los complejo de plata 1:1

4.3.1. Síntesis de [Ag(L1)OTf] (C1)

A una disolución de L1 (63.8 mg, 0.2 mmol) en acetona (35 ml) se adiciona AgOTf (53.1 mg, 0.222 mmol). La mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 2 horas. A continuación el volumen de disolvente se reduce hasta 1/5 y se añade hexano hasta que se observa la aparición de un aceite marrón. Las aguas madres se decantan y se procede a un proceso de trituración con más hexano hasta obtener un sólido blanco. Éste se filtra, se lava con hexano y finalmente se seca a vacío obteniéndose el producto deseado (38.6 mg, 42%).



Fórmula química: $C_{21}H_{16}AgF_3N_2O_3S_2$
 Peso molecular (g/mol): 573,36

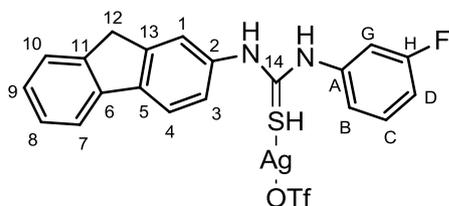
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3211, 1554; ν (H- C_{ar}): 3057; ν ($C_{ar}=C_{ar}$):1702; ν (N-C=S):1273, 1217, 1163; ν (C=S):631.

1H -RMN (ppm)(400MHz, ($CO(CD_3)_2$), δ : 7.91 (dd, $J=7.77$ Hz, $J=11.92$ Hz,, 2H, H(7), H(4)), 7.59 (d, $J=7.13$ Hz, 1H, H(10)), 7.54 (s, 1H, H(1)), 7.36-7.48 (tt, $J=5.43$ Hz, $J=4.07$ Hz, 8H, 2H(B, B'), 2H(C, C'), H(D), H(3), H(8), H(9)), 3.95(s, 2H, 2H(12)), 3.29 (s, 2H, NH).

¹³C-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ: 185.8 (s, 1C, C(14)), 146.0 (s, 1C, C(13)), 144.6 (s, 1C, C(11)), 142.8 (s, 1C, C(5)), 141.3 (s, 1C, C(6)), 136.9 (s, 1C, C(A)), 135.7 (s, 1C, C(2)), 130.7 (s, 2C, C(C, C')), 129.5 (s, 1C, C(D)), 129.2 (s, 2C, C(B, B')), 128.4 (s, 1C, C(9)), 128.0 (s, 1C, C(8)), 127.2 (s, 1C, C(3)), 126.1 (s, 1C, C(10)), 124.1 (s, 1C, C(1)), 121.8 (s, 1C, C(7)), 121.2 (s, 1C, C(4)), 37.6 (s, 1C, C(12)).

4.3.2. Síntesis de [Ag(L3)OTf] (C3)

A una disolución de L3 (65.2 mg, 0.2 mmol) en acetona (30 ml) se adiciona AgOTf (51.8 mg, 0.2 mmol). La mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 2 horas. A continuación el volumen de disolvente se reduce hasta 1/5 y se añade hexano hasta que se observa la aparición de un aceite marrón. Las aguas madres se decantan y se procede a un proceso de trituración con más hexano hasta obtener un sólido naranja. Éste se filtra, se lava con hexano y finalmente se seca a vacío obteniéndose el producto deseado (75.6 mg, 86%).



Fórmula química : C₂₁H₁₅AgF₄N₂O₃S₂
 Peso molecular (g/mol) : 591,35

IR (cm⁻¹): ν (N-H):3217, 1555; ν (H-C_{ar}): 3069; ν (C_{ar}=C_{ar}):1597; ν (N-C=S):1218, 1165; ν (C=S):630.

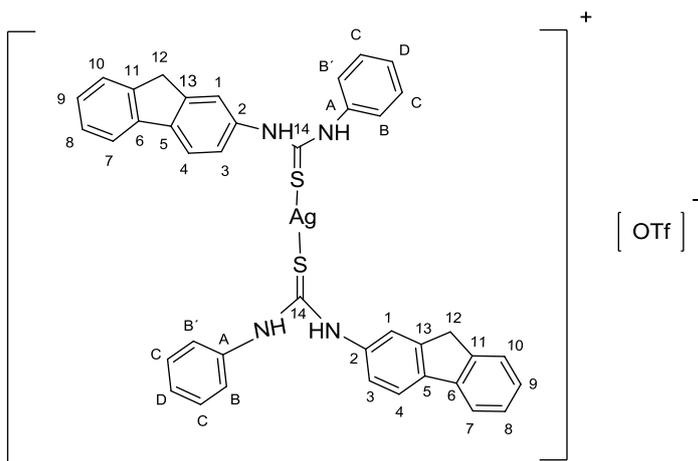
¹H-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ: 10.23 (s, 2H, 2 NH), 7.96 (d, J=8.0 Hz, 1H, H(4)), 7.91 (d, J=7.4 Hz, 1H, H(7)), 7.60 (d, J=7.2 Hz, 2H, H(1), H(10)), 7.51 (dd, J=14.7, J=7.9, 1H, H(C)), 7.34-7.46 (m, 3H, H(3), H(8), H(9)), 7.29 (d, J=7.3 Hz, 2H, H(B), H(G)), 7.19 (t, J=8.5 Hz, 1H, H(D)), 3.94 (s, 2H, 2H(12))

¹³C-RMN (ppm)(400MHz, (CO(CD₃)₂), δ: 181.9 (s, 1C, C(14)), 165.1 (d, J=245.3 Hz, 1C, C(H)), 146.1 (s, 1C, C(13)), 144.6 (s, 1C, C(11)), 142.9 (s, 1C, C(5)), 141.2 (s, 1C, C(6)), 139.4 (s, 1C, C(A)), 135.3 (s, 1C, C(2)), 132.0 (d, J=135.4 Hz, 1C, C(C)), 128.4 (s, 1C, C(9)), 128.0 (s, 1C, C(8)), 126.3 (s, 1C, C(3)), 126.2 (s, 1C, C(10)), 124.1 (s, 1C, C(1)), 123.2 (s, 1C, C(B)), 121.9 (s, 1C, C(4)), 121.2 (s, 1C, C(7)), 115.8 (d, J=20.7 Hz, 1C, C(D)), 114.4 (s, 1C, C(G)), 37.6 (s, 1C, C(12)).

4.4. Síntesis de los complejos de plata 2:1

4.4.1. Síntesis de [Ag(L1)₂][OTf] (C4)

El complejo C4 se prepara de forma análoga a C1 pero utilizando el doble de moles de L1 que de AgOTf. El producto final se obtiene como un sólido marrón claro (100.4 mg, 42%).



Fórmula química: $C_{41}H_{32}AgF_3N_4O_3S_3$
 Peso molecular (g/mol) : 889,78

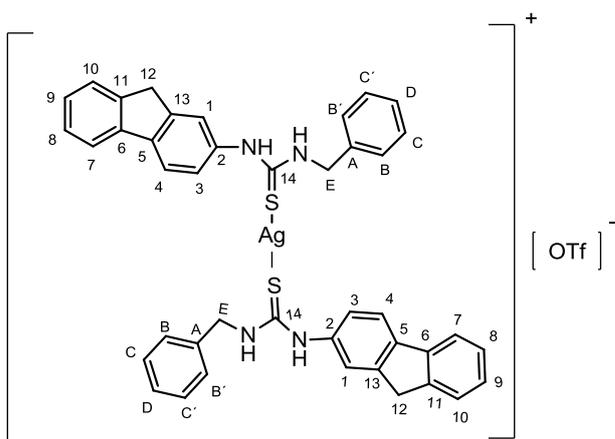
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3243, 1537; ν (H- C_{ar}): 3054; ν ($C_{ar}=C_{ar}$):1704; ν (N-C=S): 2164, 1222; ν (C=S):630.

1H -RMN (ppm)(400MHZ, $CO(CD_3)_2$), δ : 9.71 (s, 4H, 4 NH), 7.88 (d, $J=1.91$ Hz, 2H, 2H(7)), 7.86 (d, $J=2.78$, 2H, 2H(4)), 7.57 (d, $J=7.4$, 2H, 2H(10)), 7.46(d, $J=1.1$, 2H, 2H(1)), 7.27-7.43 (m, 16H, 4H(2B, 2B'), 4H(2C, 2C'), 2H(D), 2H(3), 2H(8), 2H(9)), 3.90 (s, 4H, 4H(12)).

^{13}C -RMN (ppm)(400MHZ, $CO(CD_3)_2$), δ :179.37 (s, 2C, 2C(14)), 145.54 (s, 2C, 2C(13)), 144.51 (s, 2C, 2C(11)), 141.86 (s, 2C, 2C(5)), 141.56 (s, 2C, 2C(6)), 138.26 (s, 2C, 2C(A)), 136.54 (s, 2C, 2C(2)), 130.20 (s, 4C, 4C(2C, 2C')), 128.08 (s, 2C, 2C(9)), 127.99 (s, 2C, 2C(8)), 127.83 (s, 2C, 2C(D)), 126.76 (s, 4C, 4C(2B, 2B')), 126.04 (s, 2C, 2C(10)), 125.94 (s, 2C, 2C(3)), 123.71 (s, 2C, 2C(1)), 121.42 (s, 2C, 2C(7)), 121.0 (s, 2C, 2C(4)), 35.54 (s, 2C, 2C(12)).

4.4.2. Síntesis de $[Ag(L2)_2][OTf]$ (C5)

El complejo C5 se prepara de forma análoga a C2 pero utilizando una relación 2:1 entre los moles de ligando y $Ag[OTf]$, respectivamente. El producto final se obtiene como un sólido marrón. (94.2 mg, 40%).



Fórmula química $C_{44}H_{39}AgF_3N_4O_3S_3$
 Peso molecular (g/mol): 932,86

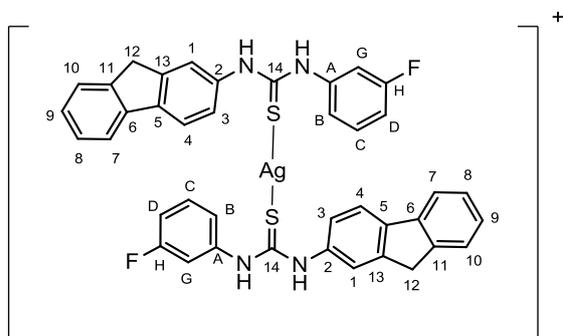
IR (cm^{-1}): ν (N-H):3338, 3263, 1535; ν (H- C_{ar}): 3069; ν ($C_{ar}=C_{ar}$):1588; ν (N-C=S): 2162, 1249; ν (C=S):629.

$^1\text{H-RMN}$ (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ : 9.67 (s, 2H, 2 NH), 8.43 (s, 2H, 2 NH), 7.90 (t, $J=6.10$ Hz, 4H, 2H(4) y 2H(7)), 7.60 (d, $J=7.16$ Hz, 2H, 2H(1)), 7.57 (d, $J=7.4$, 2H, 2H(10)), 7.21-7.44 (m, 18H, 2H(1), 2H(3), 2H(8), 2H(9), 4H(B), 4H(C), 2H(D)), 4.56 (s, 4H, 4H(E)), 3.93 (s, 4H, 4H(12)).

$^{13}\text{C-RMN}$ (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ : 190.4 (s, 2C, 2C(14)), 146.1 (d, 2C, 2C(13)), 144.6 (s, 2C, 2C(5)), 142.4 (s, 2C, 2C(11)), 141.5 (s, 2C, 2C(6)), 138.3 (s, 2C, 2C(A)), 135.7 (s, 2C, 2C(2)), 129.4 (s, 4C, 4C(2C, 2C')), 128.4 (s, 2C, 2C(9)), 128.2 (s, 2C, 2C(D)), 127.9 (s, 2C, 2C(8)), 126.2 (s, 2C, 2C(10)), 126.1 (s, 2C, 2C(3)), 125.3 (s, 2C, 2C(1)), 124.0 (s, 4C, 4C(2B, 2B')), 121.8 (s, 2C, 2C(4)), 121.1 (s, 2C, 2C(7)), 49.5 (s, 2C, 2C(E)), 37.6 (s, 2C, 2C(12)).

4.4.3. Síntesis de $[\text{Ag}(\text{L3})_2][\text{OTf}]$ (C6)

El complejo C6, igual que en los anteriores casos, se prepara en este caso de forma análoga al complejo C3 pero utilizando una relación molar 2:1 entre L3 y AgOTf, respectivamente. El producto final se obtiene como un sólido de color gris claro (132.1 mg, 85%).



Fórmula química : $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{AgF}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_3$
 Peso molecular (g/mol) : 925,76

IR (cm^{-1}): ν (N-H): 3230, 1538; ν (H- C_{ar}): 3053; ν ($\text{C}_{\text{ar}}=\text{C}_{\text{ar}}$): 1701; ν (N-C=S): 2201, 1223, 1167; ν (C=S): 631.

$^1\text{H-RMN}$ (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ : 9.96 (d, $J=19.50$ Hz, 4H, 4 NH), 7.94 (m, 4H, 2H(4) y 2H(7)), 7.61 (d, $J=7.40$ Hz, 2H, H(10)), 7.34-7.53 (m, 8H, 2H(8), 2H(9), 2H(B), 2H(G)), 7.30 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, 2H(D)), 7.13 (m, 6H, 2H(1), 2H(3), 2H(C)), 3.97 (s, 4H, 4H(12)).

$^{13}\text{C-RMN}$ (ppm)(400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), δ : 179.5 (s, 2C, C(14)), 164.9 (s, 2C, C(13)), 162.4 (s, 2C, C(H)), 145.9 (s, 2C, C(11)), 144.6 (s, 2C, C(5)), 141.4 (s, 2C, C(6)), 139.6 (s, 2C, C(A)), 136.0 (d, $J=16$ Hz, 2C, C(2)), 131.9 (d, $J=10$ Hz, 2C, C(C)), 128.2 (s, 2C, 2C(9)), 127.9 (s, 2C, C(8)), 126.2 (d, $J=$ Hz, 2C, C(10)), 123.9 (s, 2C, C(3)), 122.8 (s, 2C, C(1)), 121.7 (s, 2C, C(4)), 121.1 (s, 2C, C(7)), 115.3 (d, $J=21.3$ Hz, 2C, C(D)), 114.1 (d, $J=23.9$ Hz, 2C, 2C(G)), 37.6 (s, 2C, 2C(12)).

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha realizado la síntesis de 6 derivados de tioureas conteniendo un fragmento cromóforo, 2-aminofluoreno y 9-aminoacridina. Para ello se ha hecho reaccionar distintos isotiocianatos (fenil-isotiocianato, bencil-isotiocianato y 3-fluor-isotiocianato) con los amino derivados correspondientes.

Posteriormente se han sintetizados los correspondientes complejos de Ag derivados de 2-aminofluoreno utilizando AgOTf como fuente metálica. De esta forma se han obtenido 5 complejos de Ag en relación 1:1 y 2:1 L:Ag. Todos ellos han mostrado un máximo de emisión en torno a 430nm. Su perfil no varía mucho del observado para sus respectivos ligandos por lo que se propone una emisión centrada en el ligando (IL). Únicamente se ha observado un perfil de emisión diferente en el caso del complejo C4, con una banda centrada alrededor de 550 nm que se ha asignado a una transición LMCT. Los estudios citotóxicos muestran que tanto los ligandos como sus complejos derivados tienen valores de citotoxicidad similares, $IC_{50} < 15 \mu M$, por lo que no se puede concluir que la introducción del metal en estas estructuras haya mejorado su bioactividad. Lamentablemente, ha sido imposible elucidar la biodistribución celular de estos compuestos por medio de microscopia de fluorescencia. Posiblemente su alta citotoxicidad junto con la baja intensidad de emisión observada en estos complejos no ha permitido su detección.

Los ligandos derivados de acridina, L4-L6, han mostrado una intensidad de emisión mucho mayor que sus análogos derivados de 2-aminofluoreno. Su emisión también tiene un perfil estructurado con un máximo en torno a 460 nm que se asigna a transferencias de carga centradas en el fragmento acridina. Así mismo, también se observa una segunda banda de emisión entorno a 565 nm que la asignamos a una transición intraligando pero esta vez con la participación del fragmento tiourea. Los estudios de citotoxicidad han mostrado que estos compuestos, al contrario que lo visto para los derivados de 2-aminofluoreno, no presentan valores significativos de capacidad inhibitoria mínima ($IC_{50} > 100 \mu M$). Así mismo el estudio de biodistribución celular indica que no presenta ninguna localización específica, puesto que la emisión por parte del compuesto se observa en toda la célula por igual.

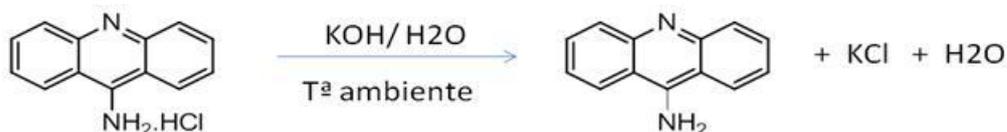
6. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- C. E. Housecroft, A. G. Sharpe, *Química Inorgánica*, **2003**, 2ª edición, 689.
- 2.- F. Grifasi, M. R. Chierotti, C. Garino, R. Gobetto, E. Priola, E. Diana, F. Turci, *Cryst. Growth Des.*, **2015**, 15, 2935.
- 3.- M. Kalhor, M. Salehifar, I. Nikokar, *Med. Chem. Res.*, **2014**, 23, 2947.
- 4.- X. Kong, Z. Yao, Z. He, W. Xu y J. Yao, *Med. Chem. Commun*, **2015**, 6, 867.
- 5.- S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi, *J Mol. Struct.*, **2007**, 827, 35.
- 6.- V. Fernández-Moreira, J. V. Alegre-Requena, R. P. Herrera, I. Marzo, M. C. Gimeno, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 14171.
- 7.- V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 4434.
- 8.- M. Belicchi Ferrari, F. Bisceglie, E. Cavalli, G. Pelosi, P. Tarasconi, V. Verdolino; *Inorg. Chem. Acta*, **2007**; 360; 3233.

7. ANEXOS

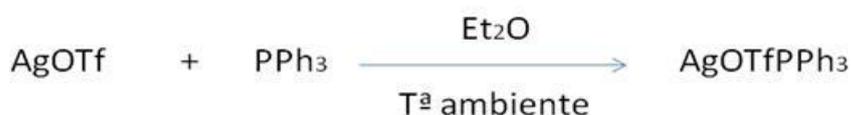
7.1 PRODUCTOS DE PARTIDA

7.1.1. Síntesis de 9-aminoacridina



Sobre 50 ml de agua destilada se adiciona 9-aminoacridina.HCl (305 mg, 1.3 mmol). A esta disolución se añade KOH (79 mg, 1.3 mmol). La mezcla se mantiene durante 24 horas con agitación. Tras este tiempo se obtiene el producto deseado como un sólido amarillo. Se filtra a vacío y se lava el sólido con agua destilada (189 mg, 74.8%).

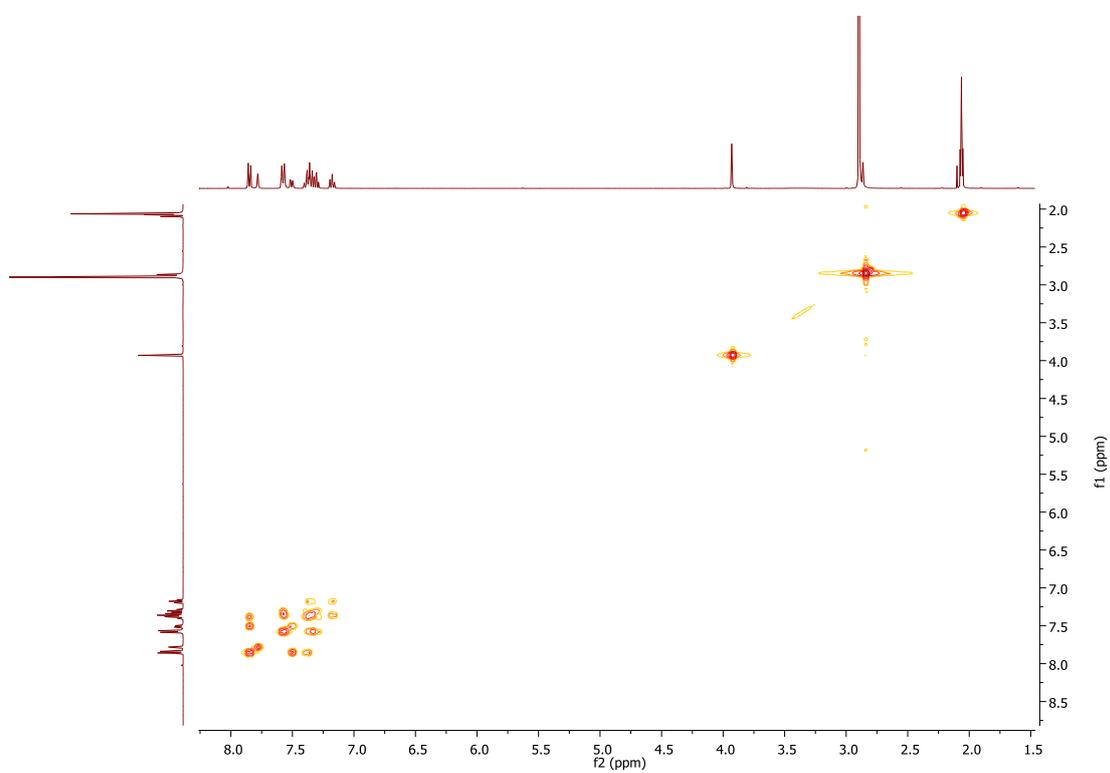
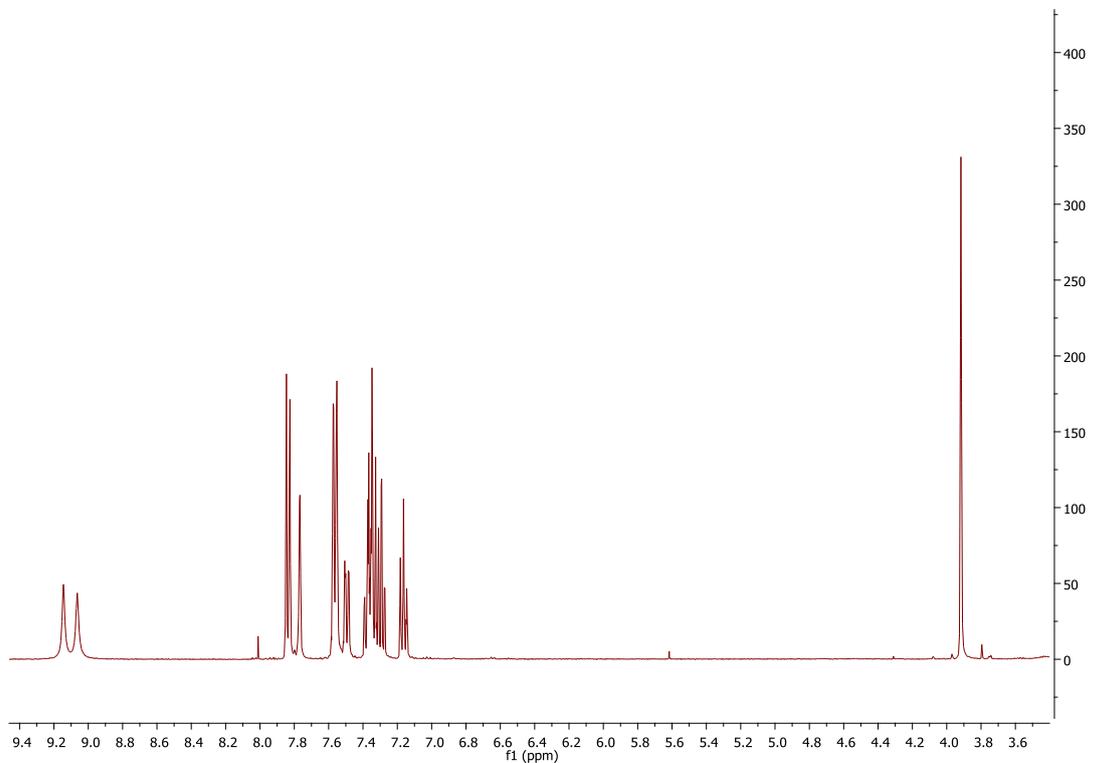
7.1.2. Síntesis de AgOTf(PPh₃)

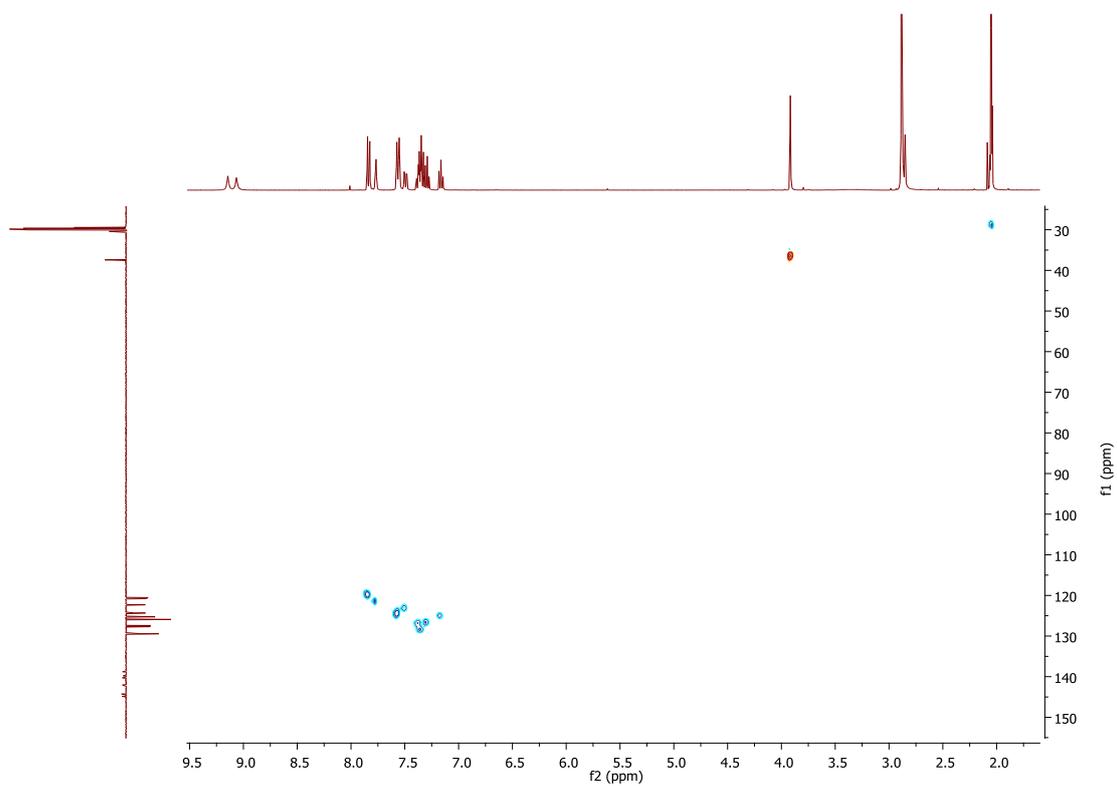
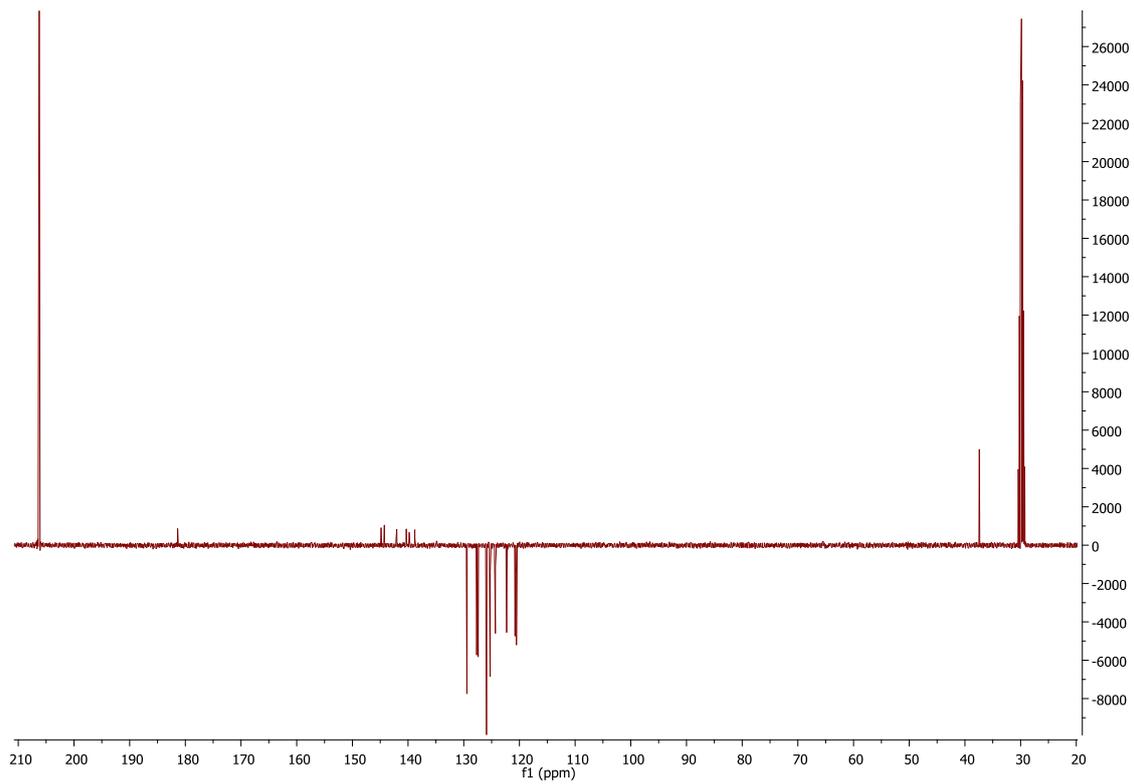


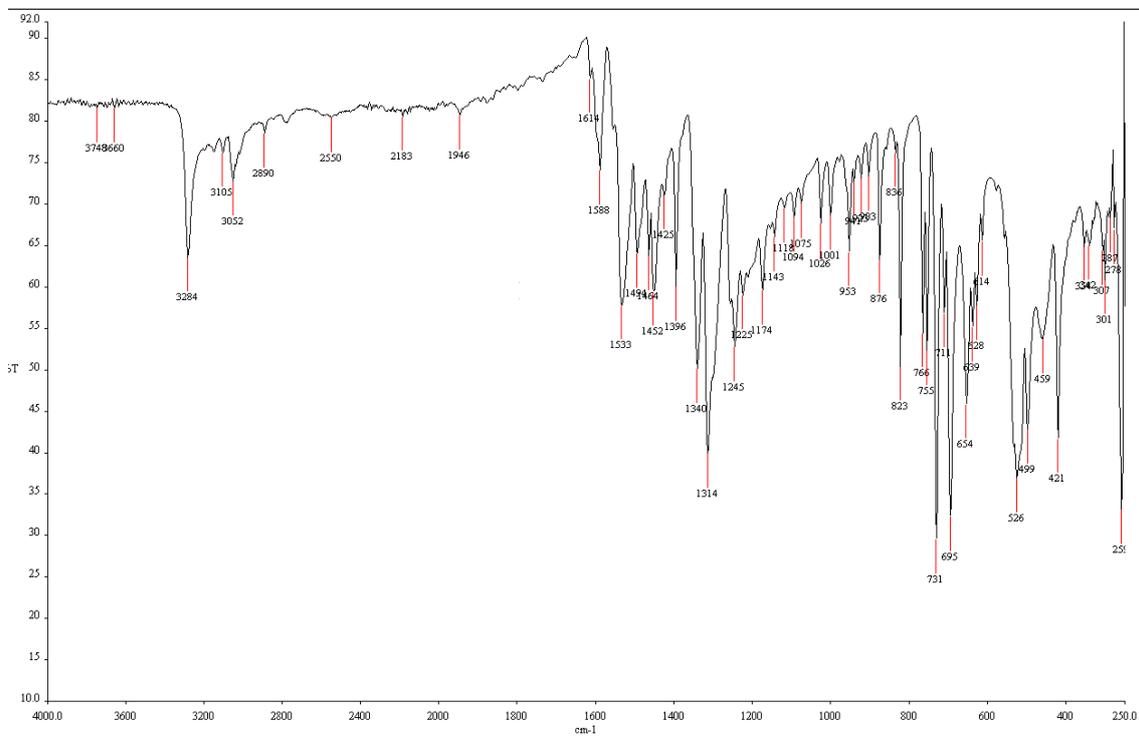
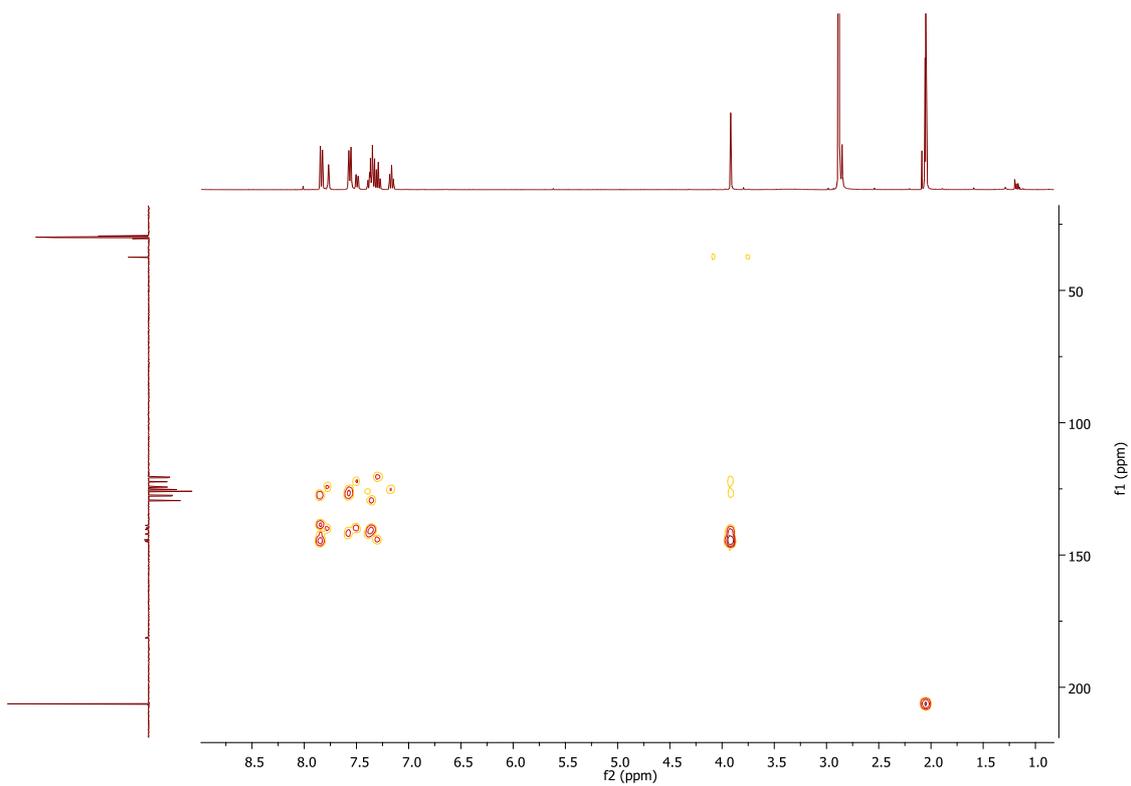
Se añade triflato de plata (384 mg, 1.5 mmol) sobre 10 ml de éter dietílico. A esta disolución se adiciona trifenilfosfina (392 mg, 1.5 mmol). La mezcla se mantiene durante 30 minutos con agitación, obteniéndose un sólido blanco. Se filtra a vacío, se lava con éter dietílico y se seca (289 mg., 60%).

7.2. ESPECTROS RMN E IR PARA LOS LIGANDOS.

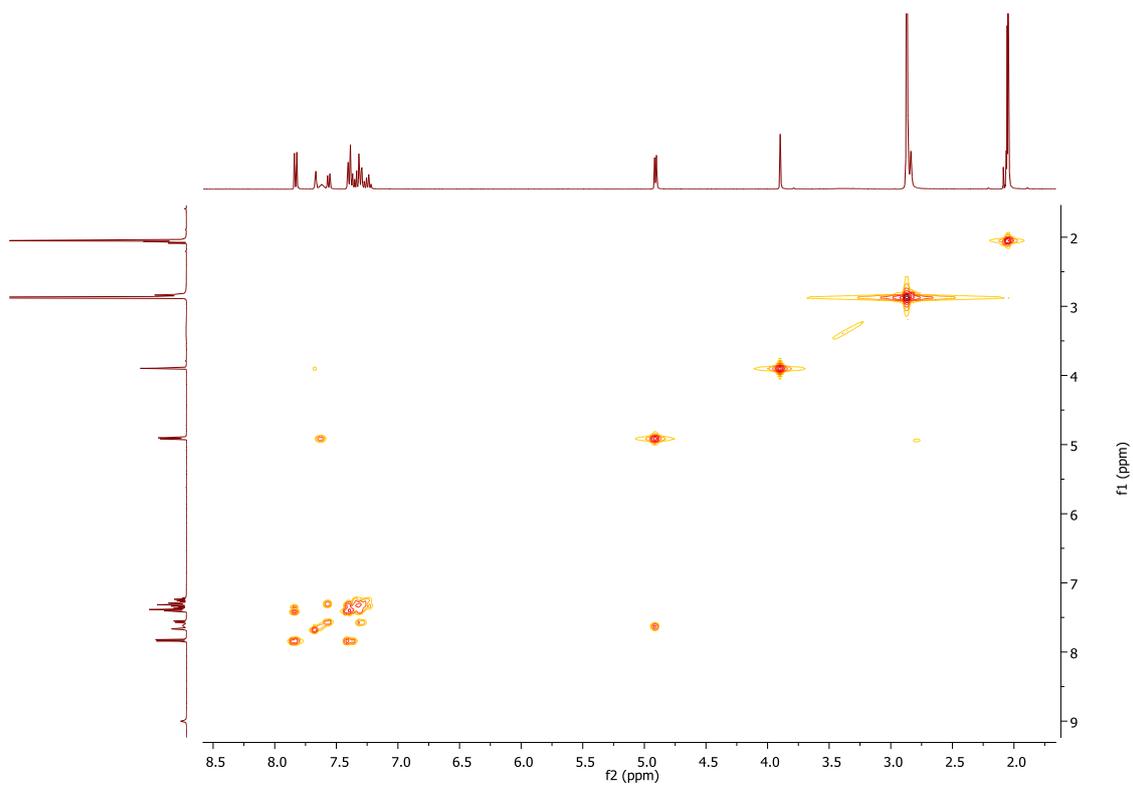
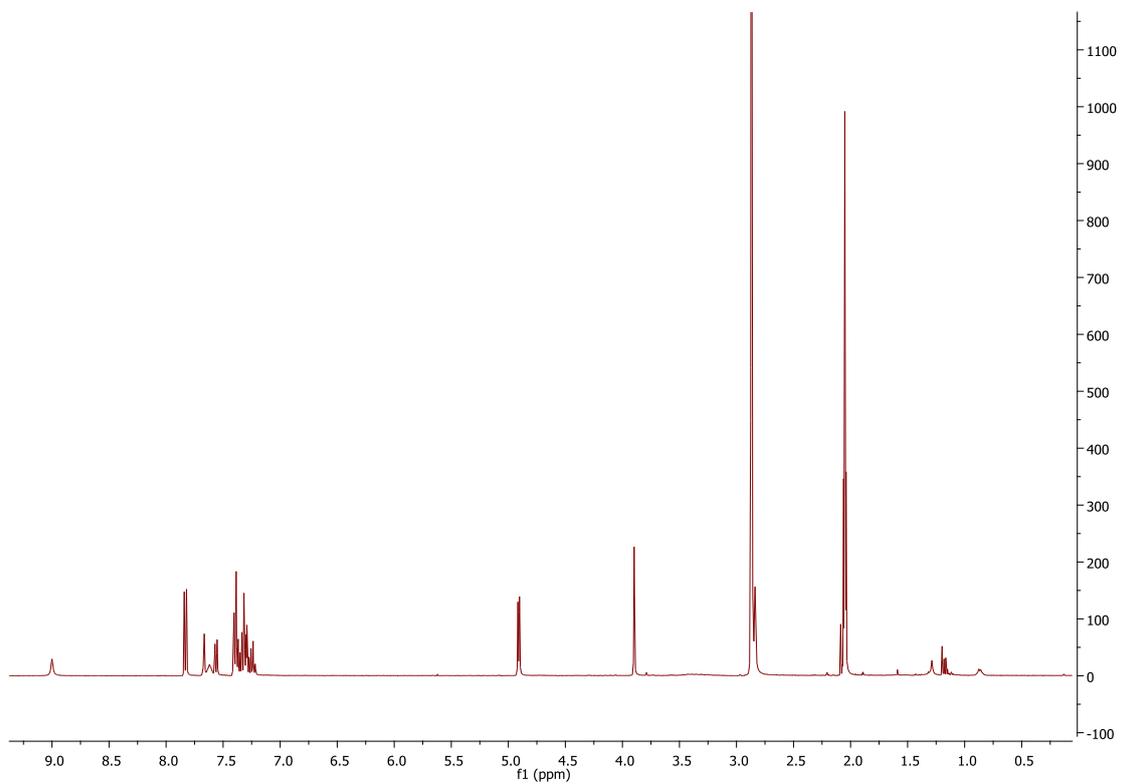
7.2.1. ESPECTRO ^1H RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L1.

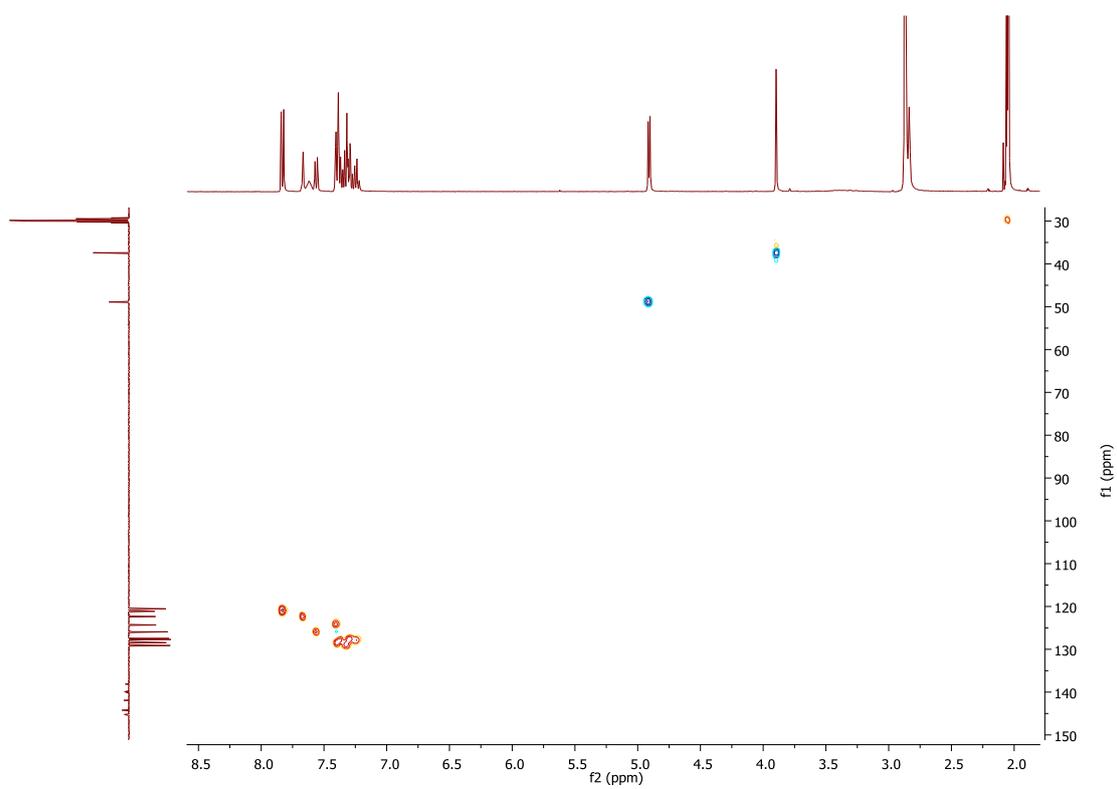
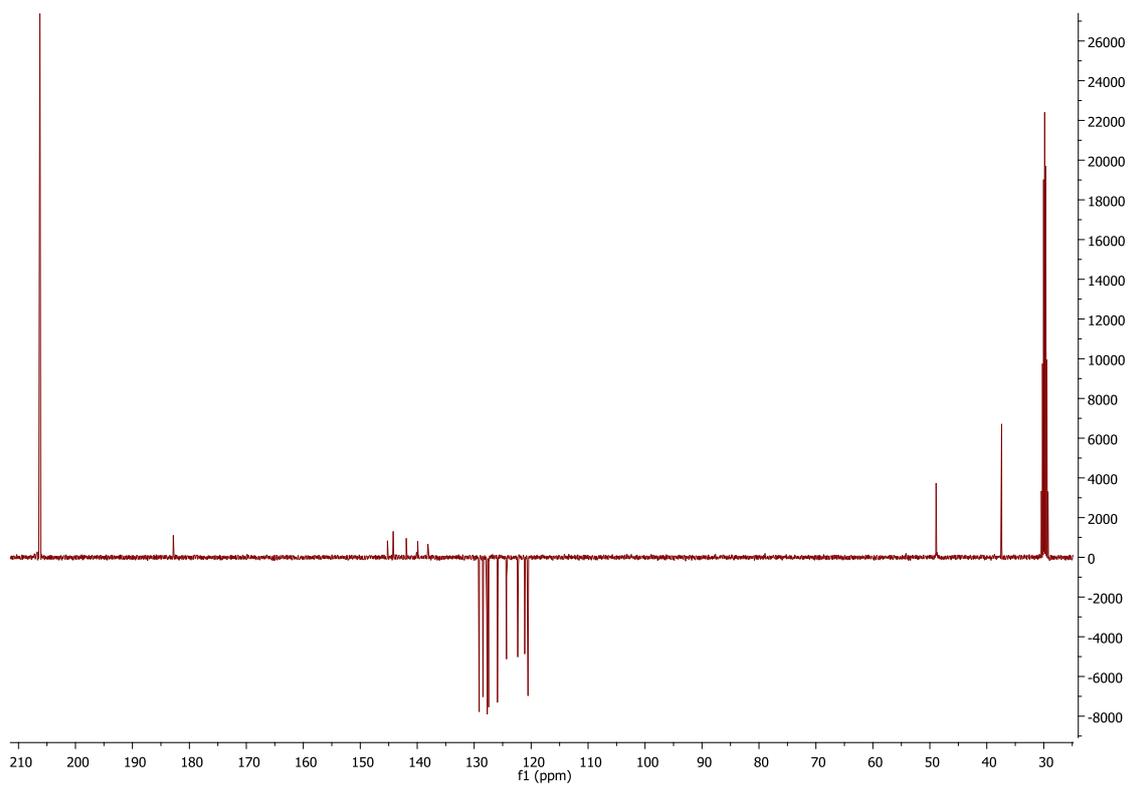


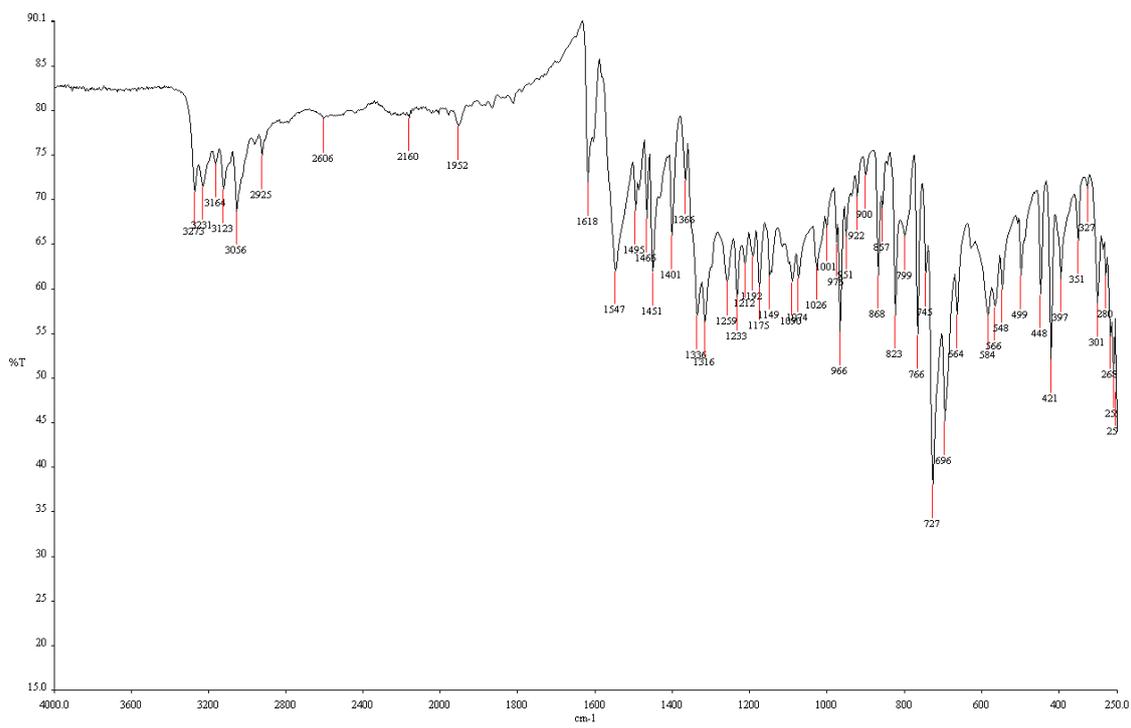
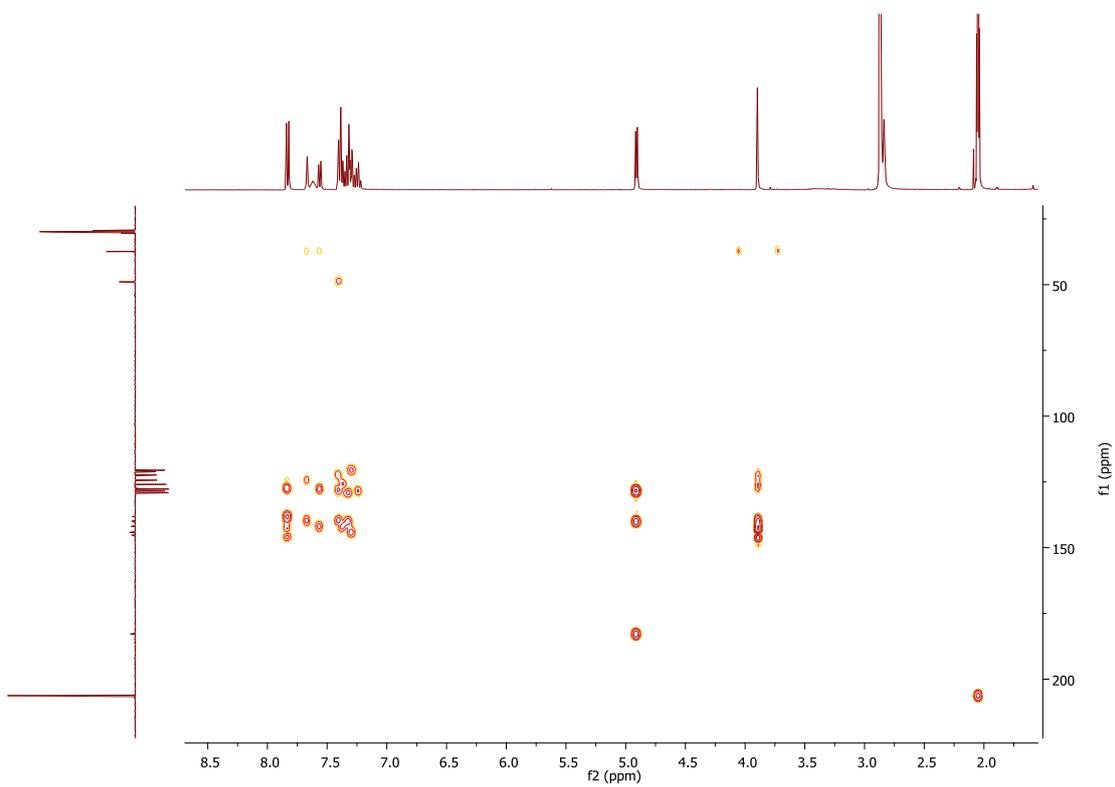




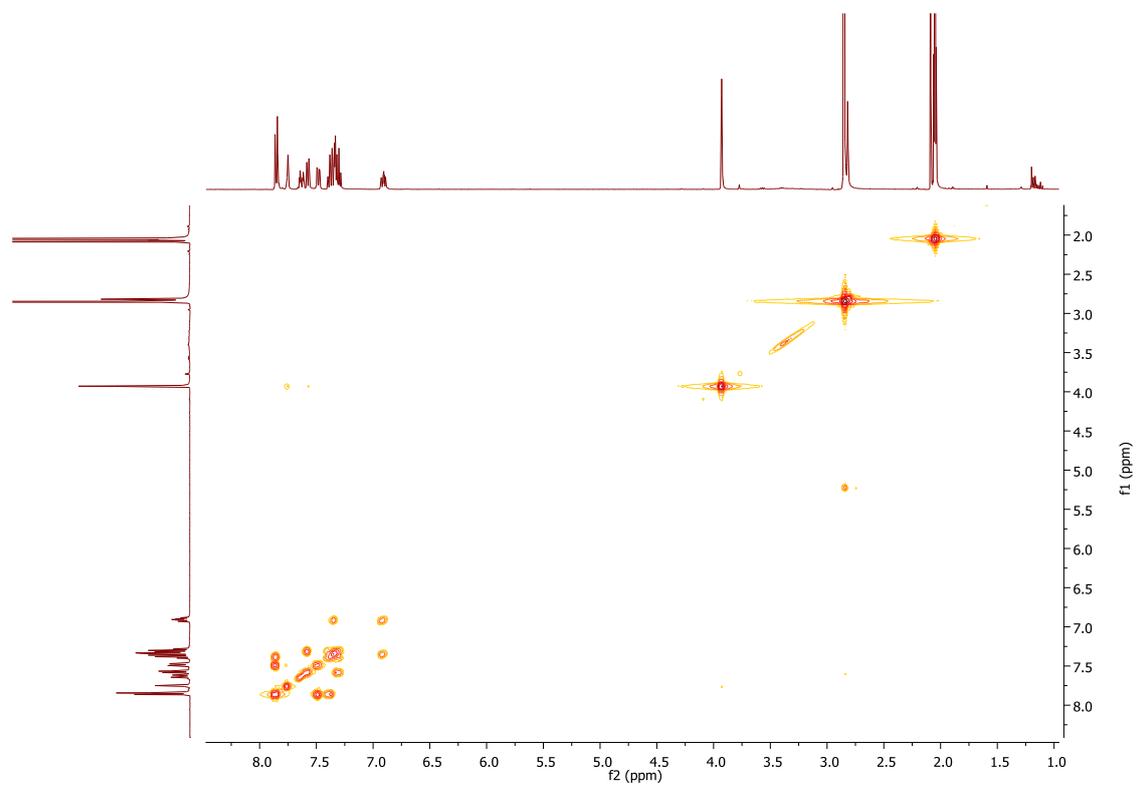
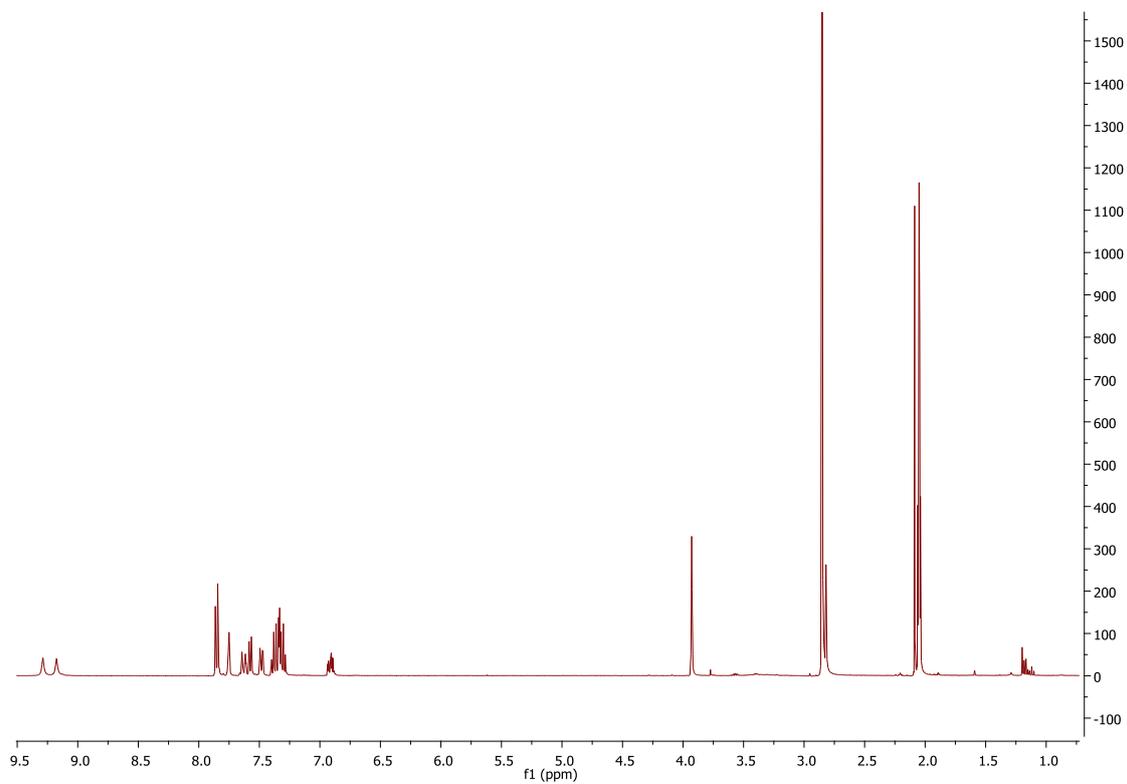
7.2.2. ESPECTRO ^1H RMN ,COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L2

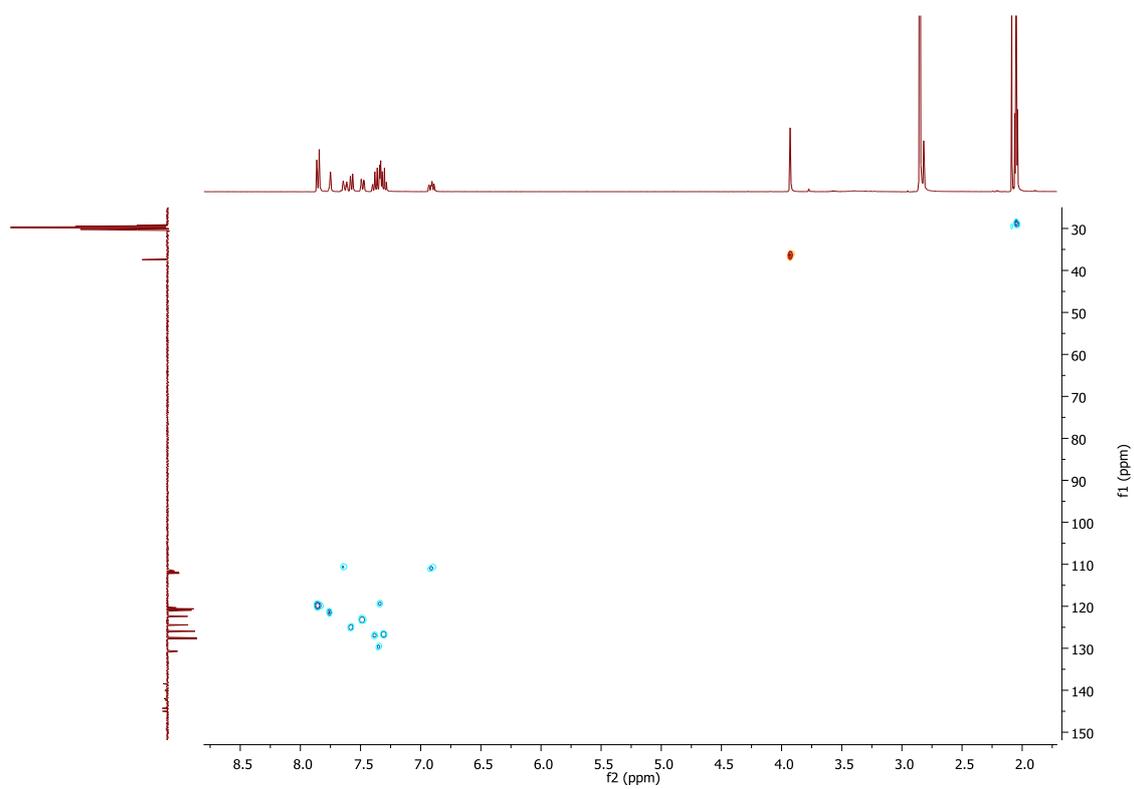
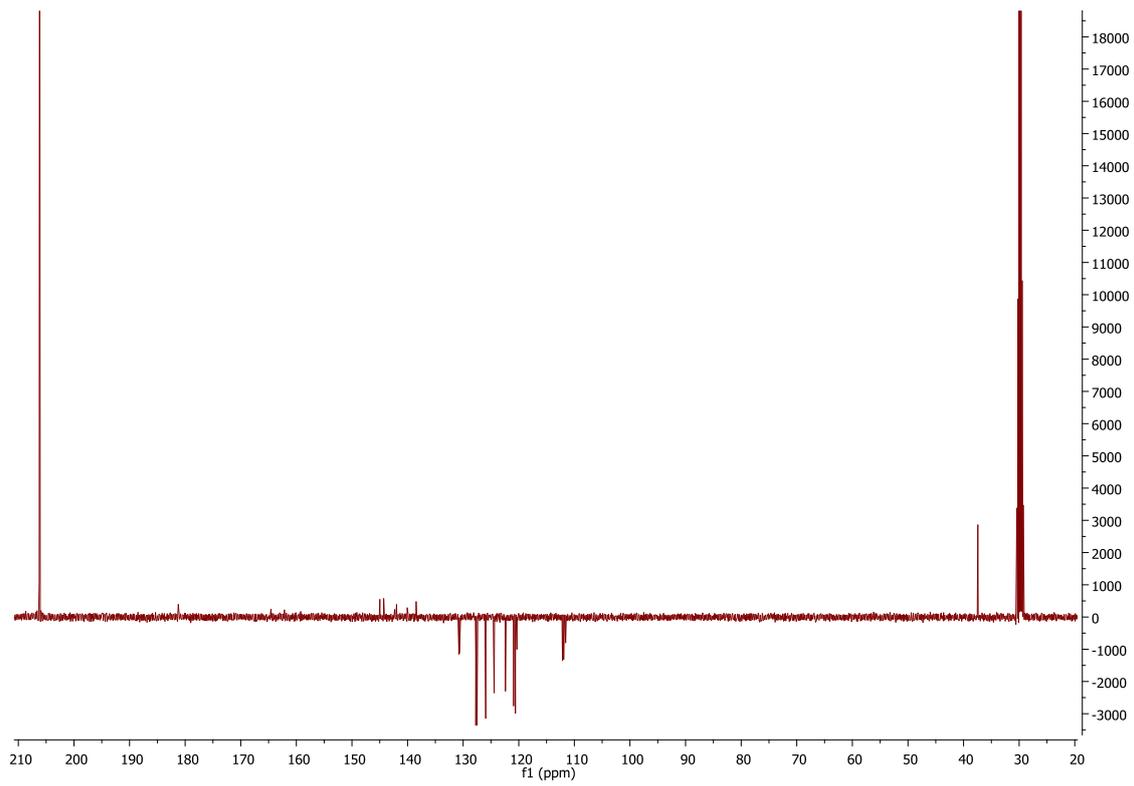


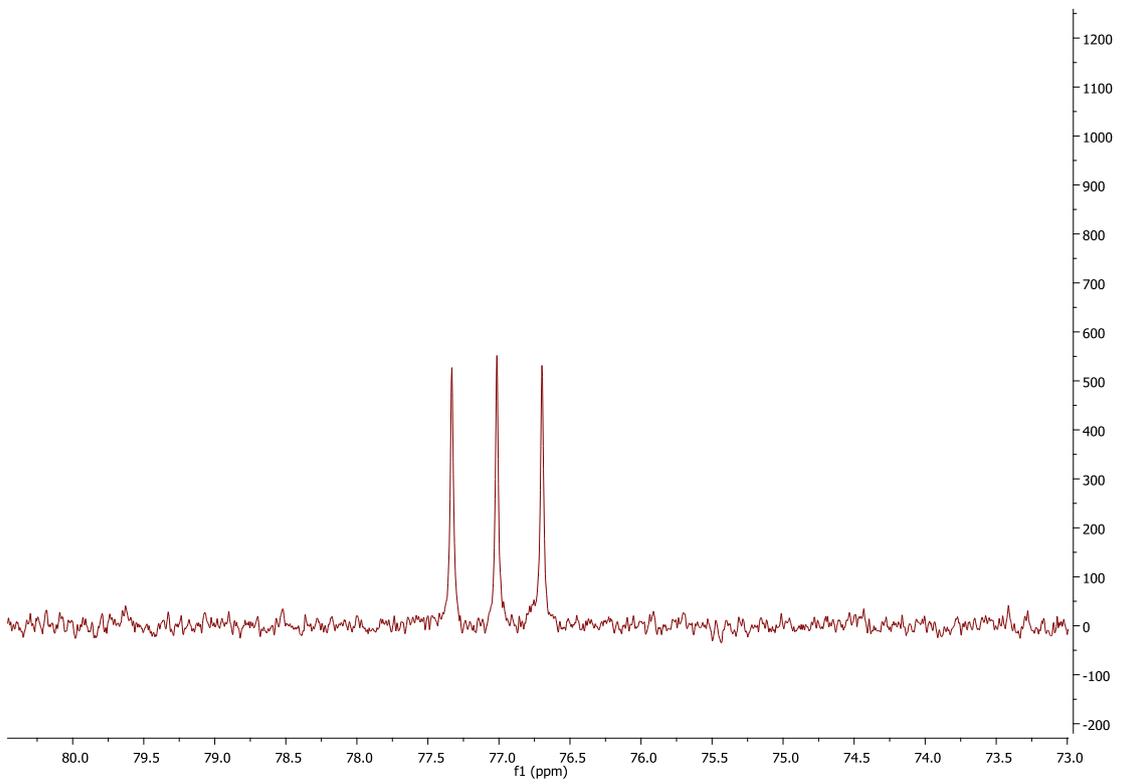
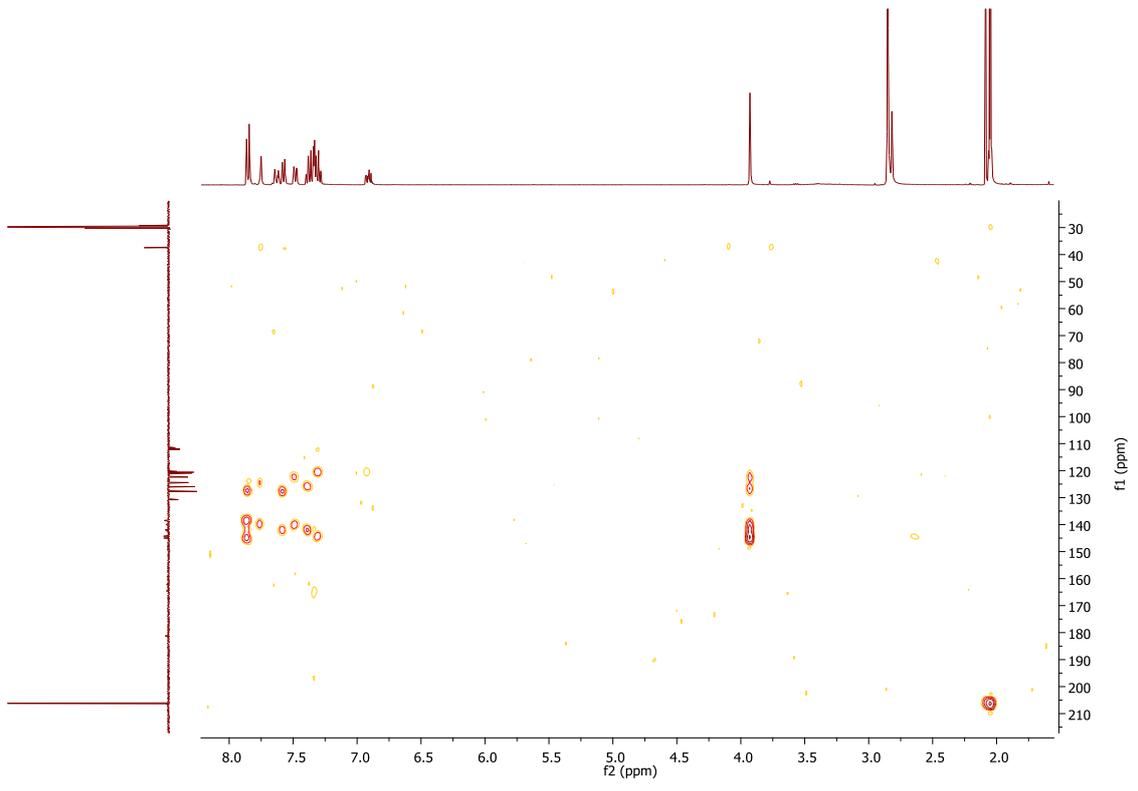


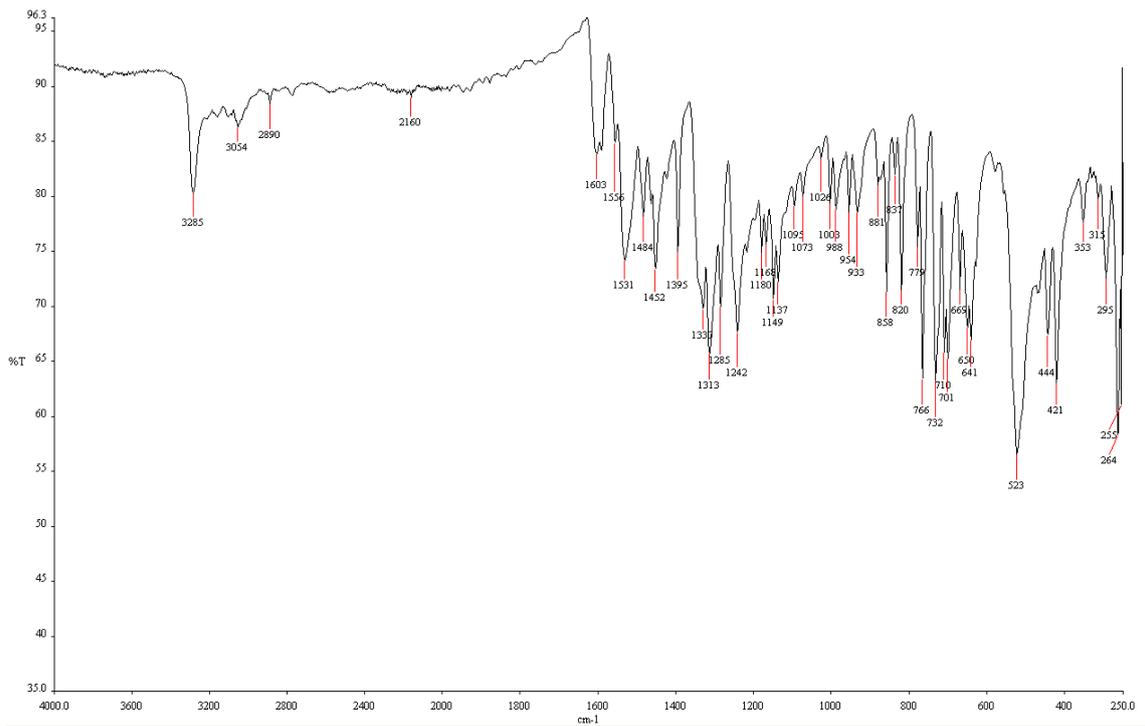


7.2.3. ESPECTRO ^1H RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L3

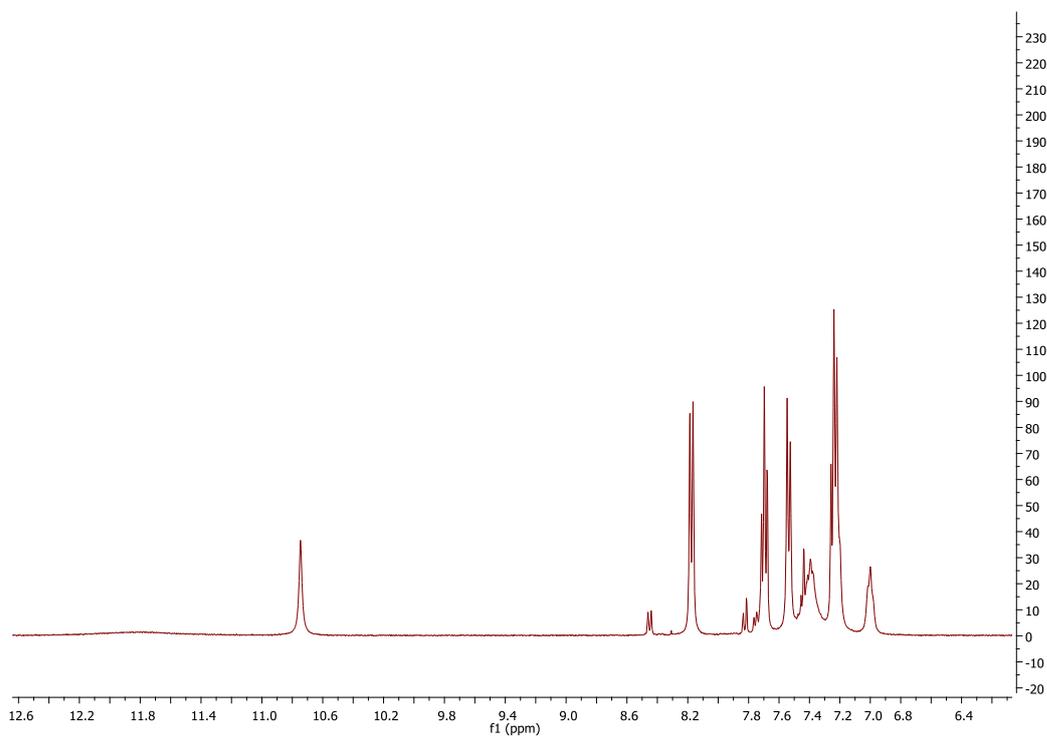


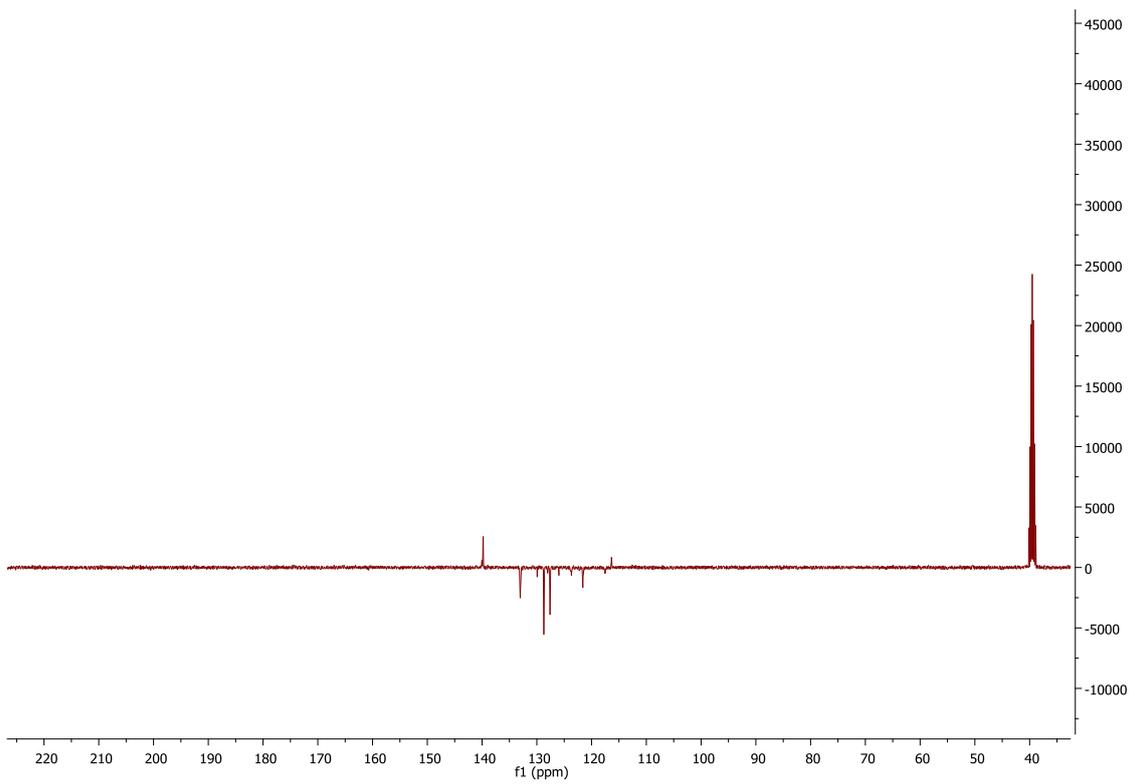
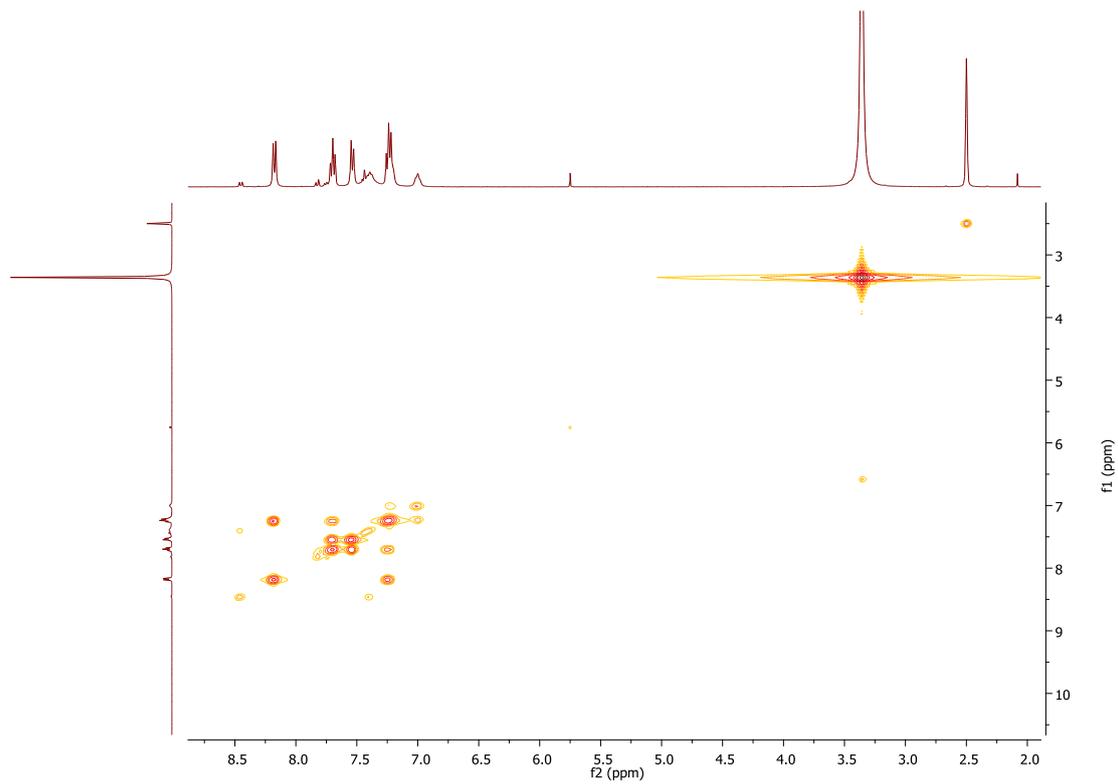


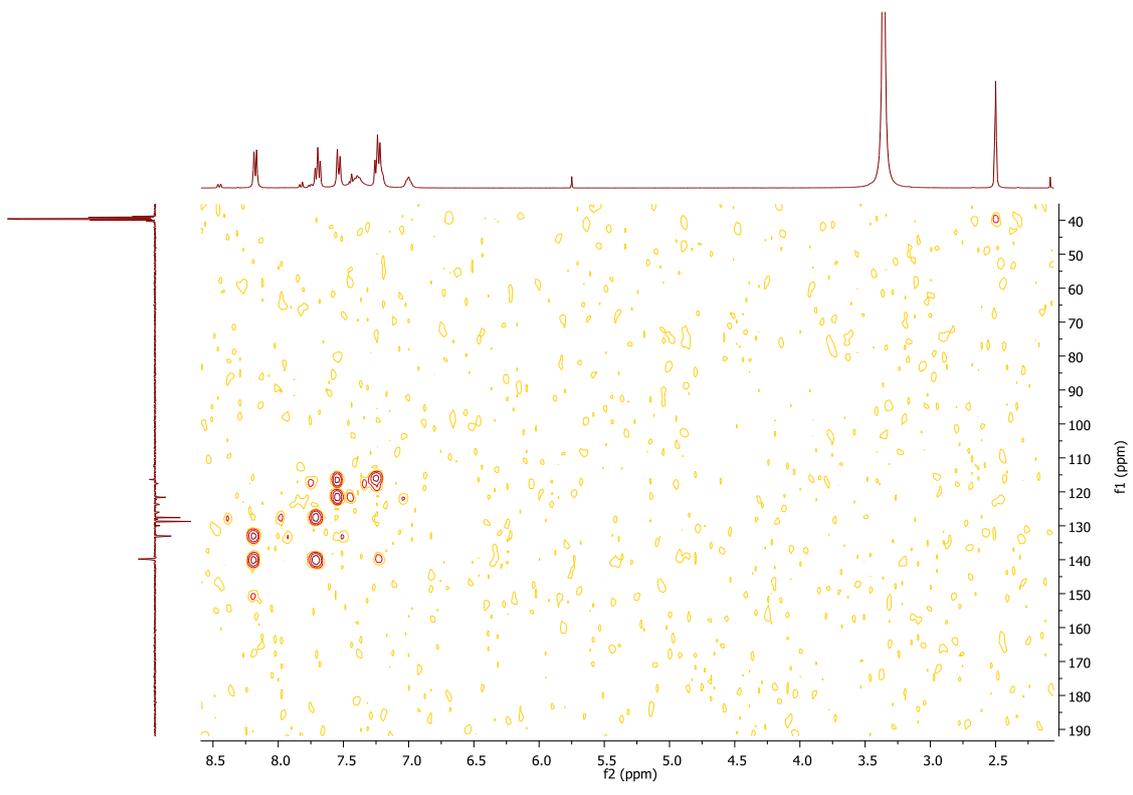
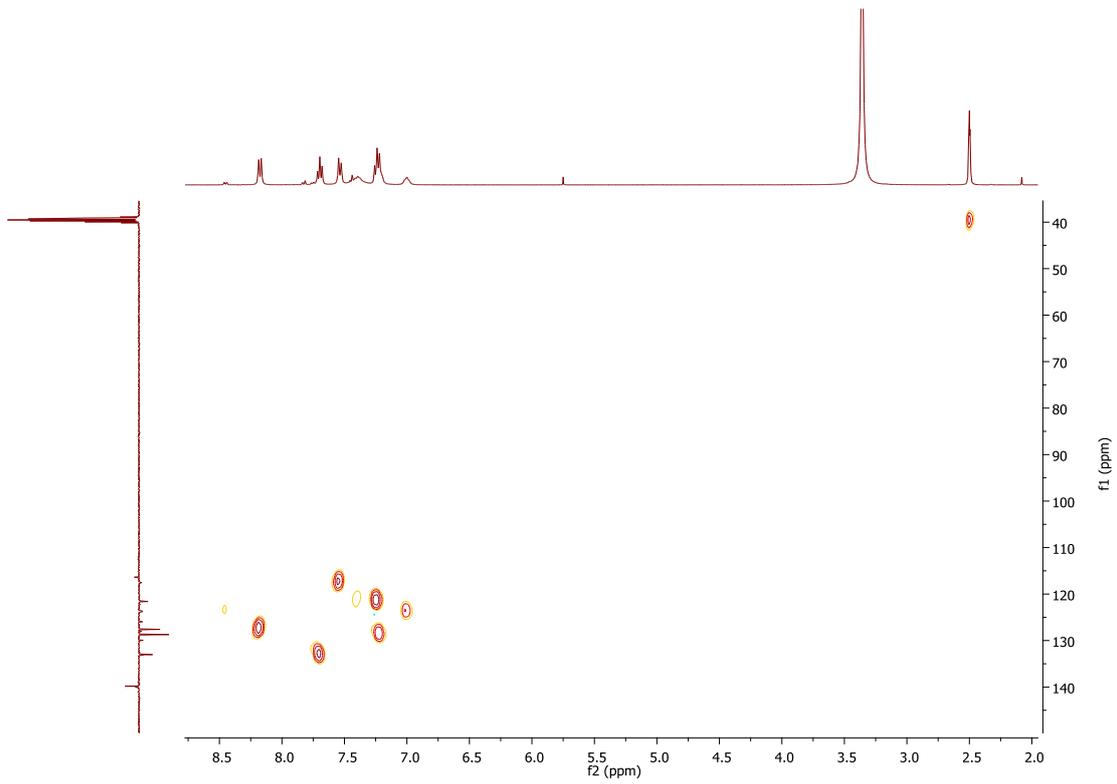


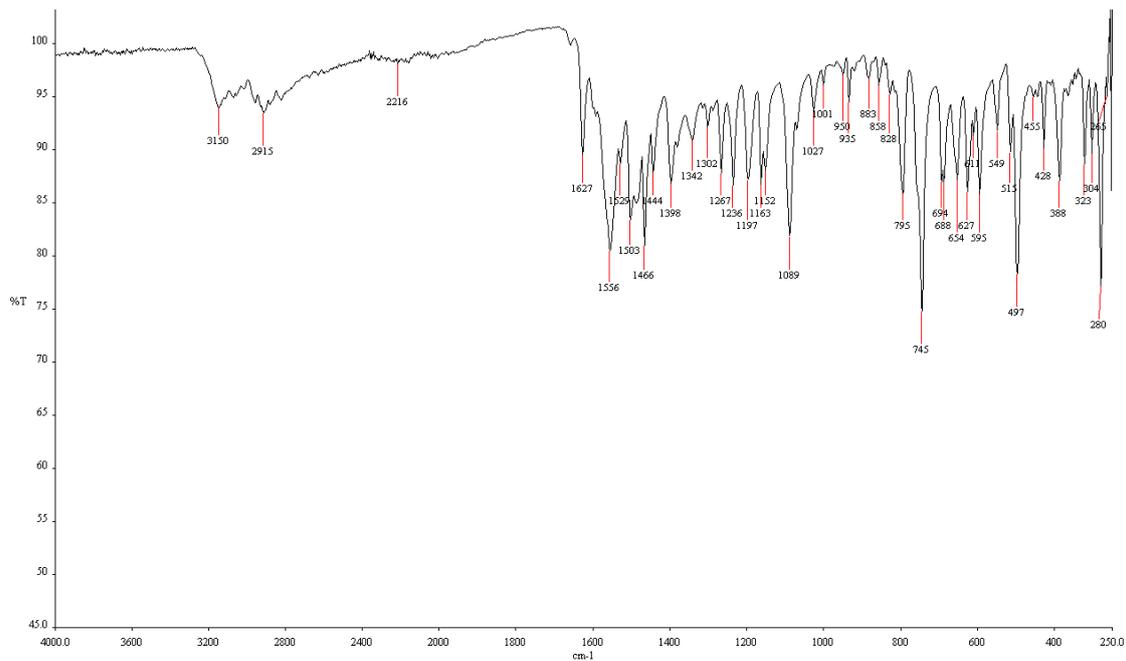


7.2.4. ESPECTRO ¹H-RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L4

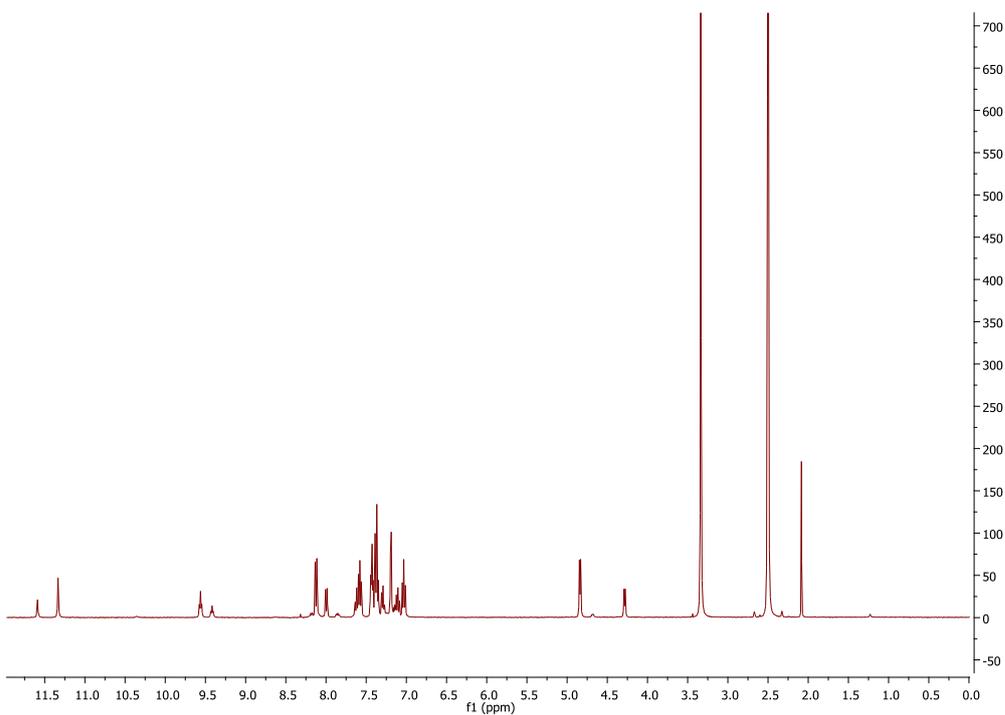


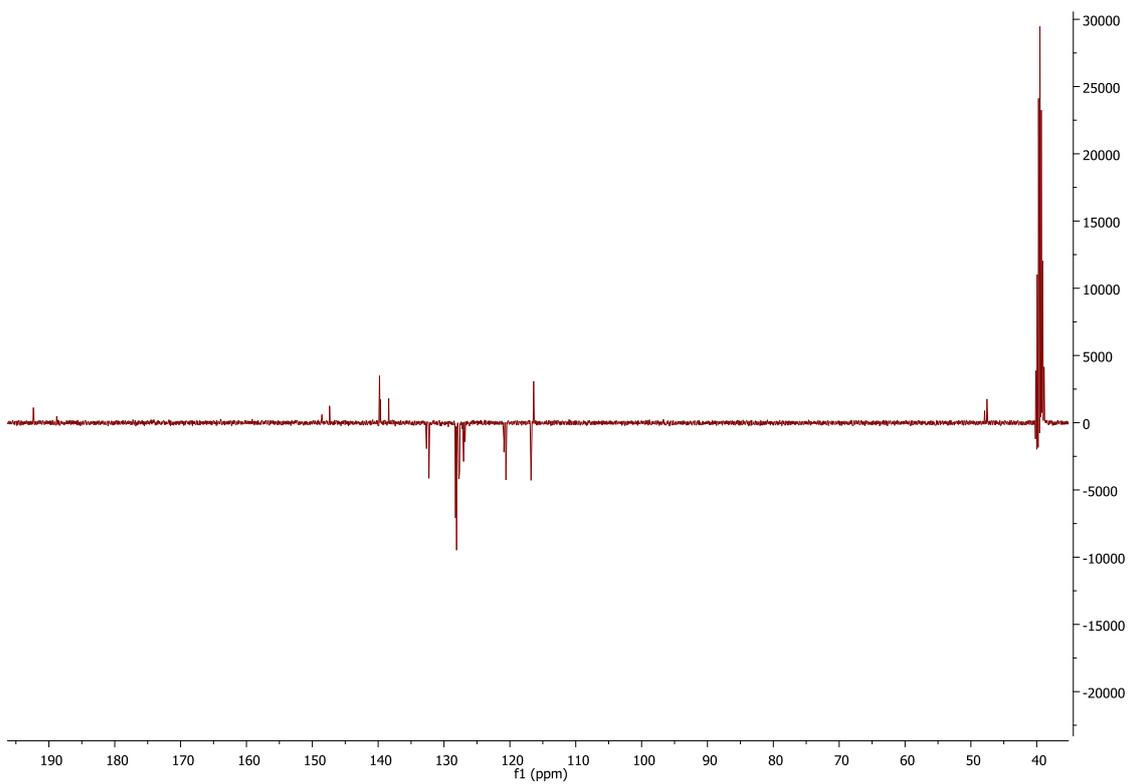
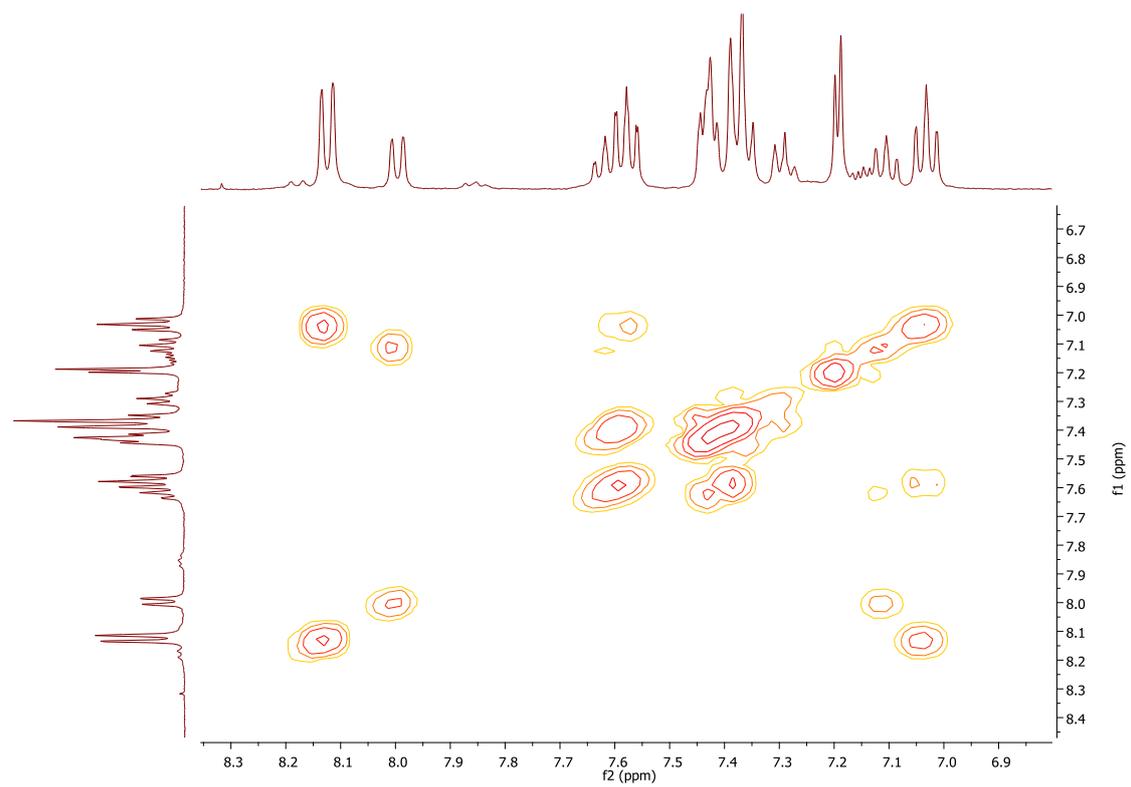


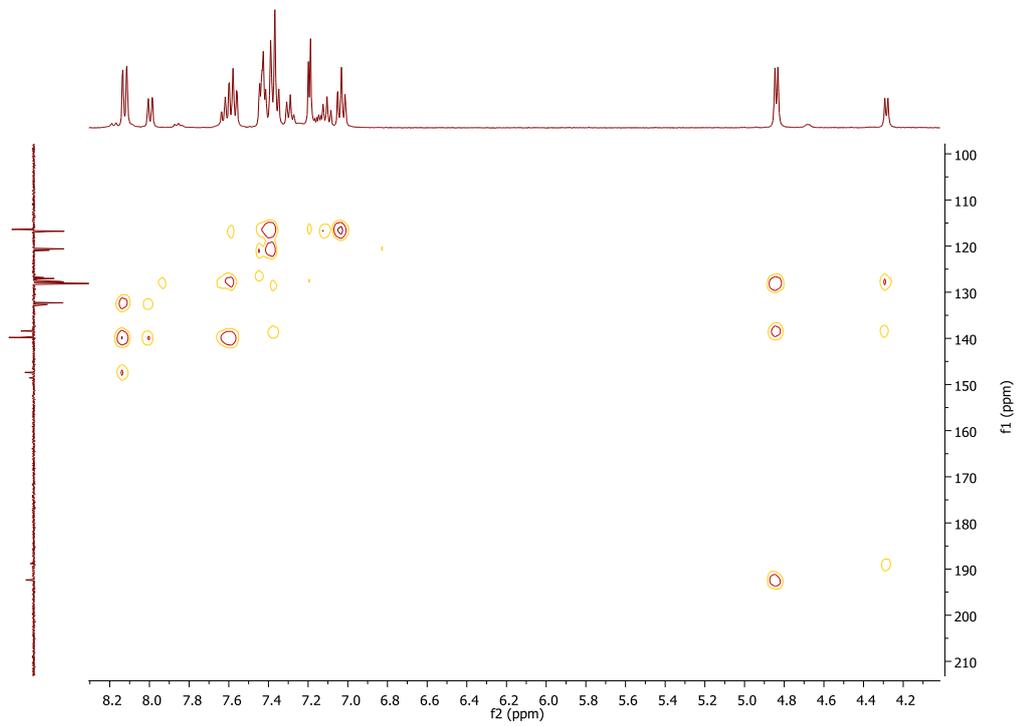
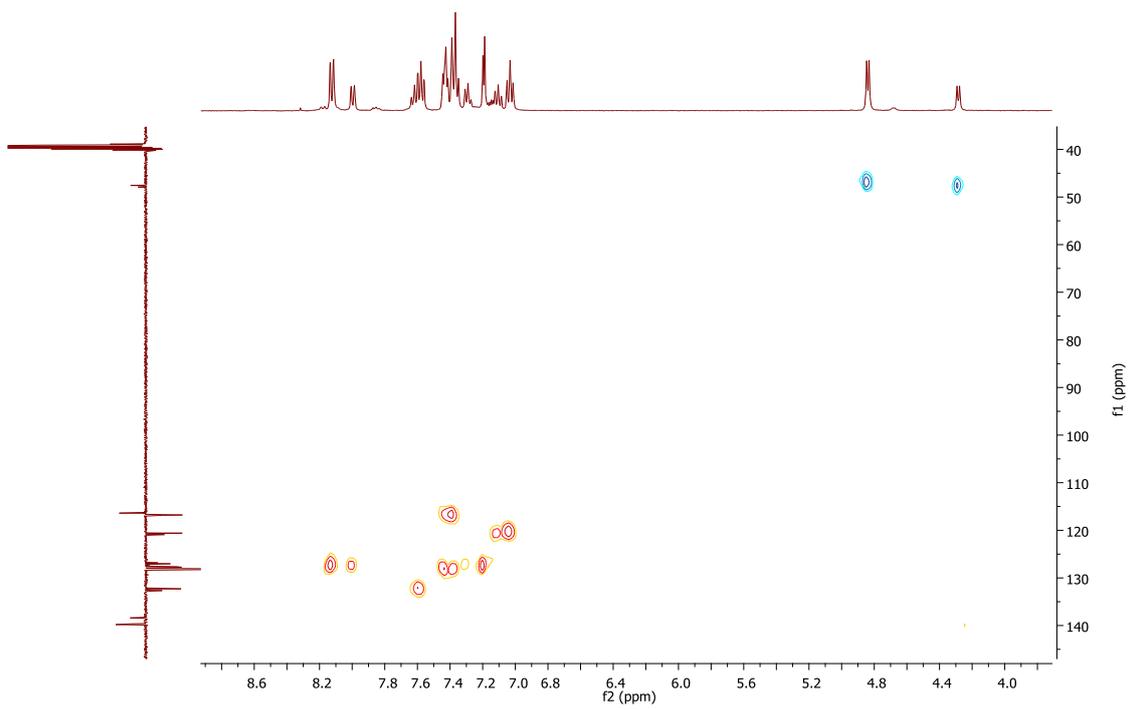




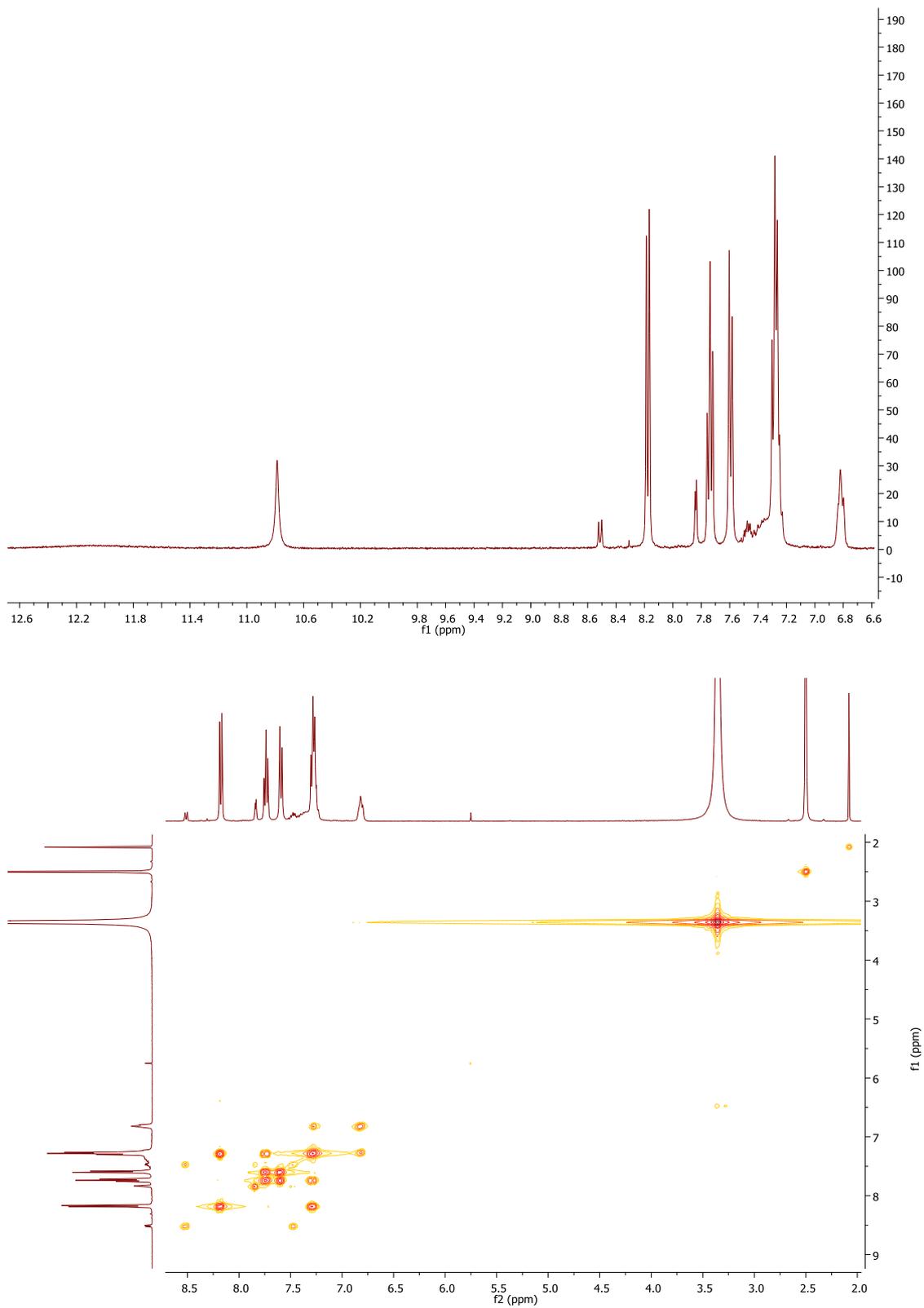
7.2.5. ESPECTRO ¹H-RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L5

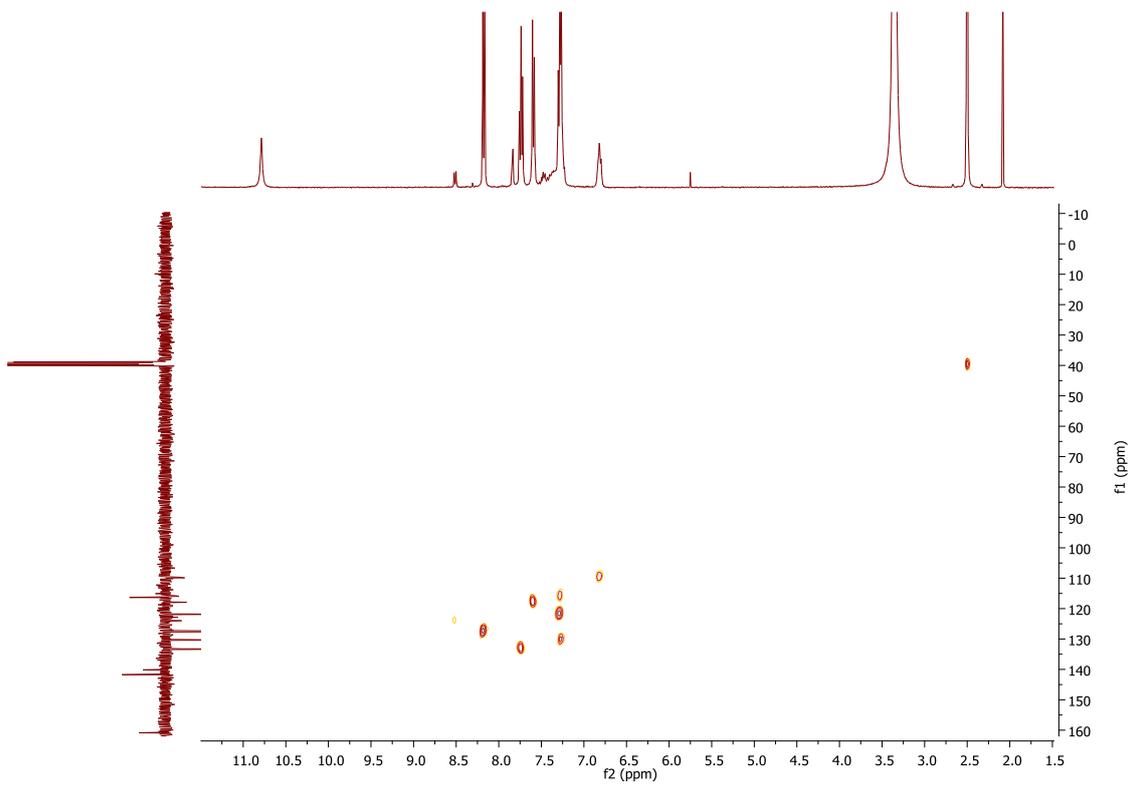
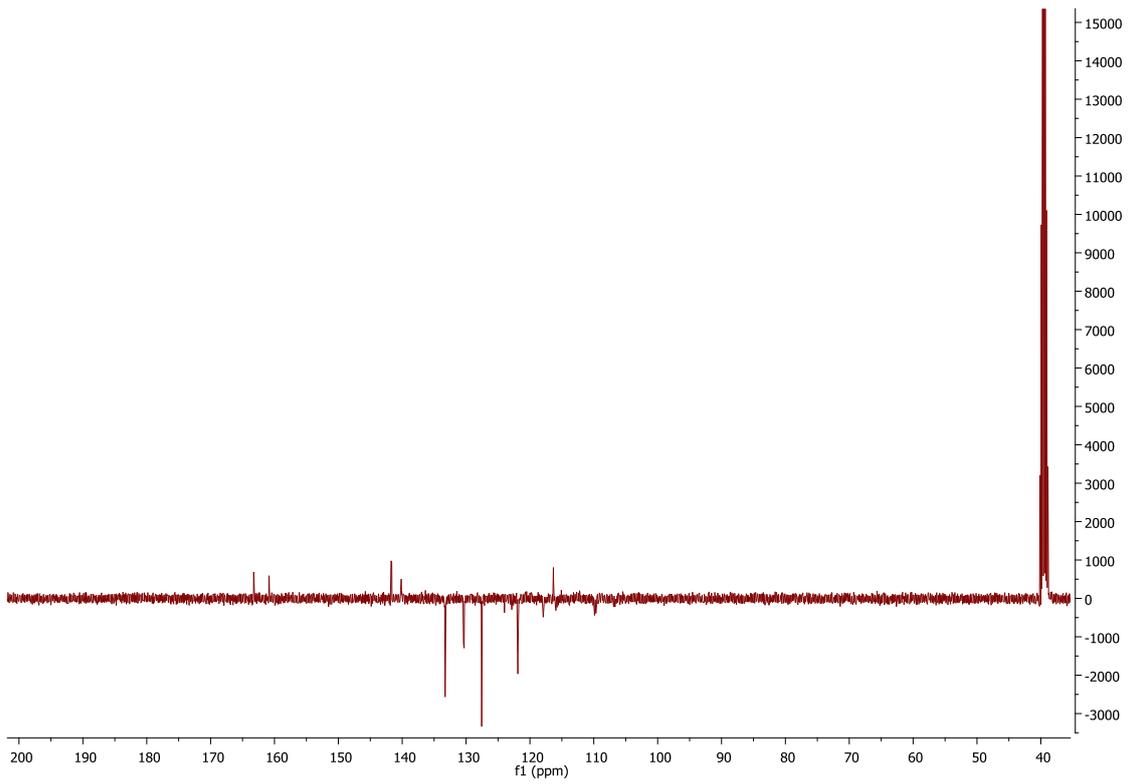


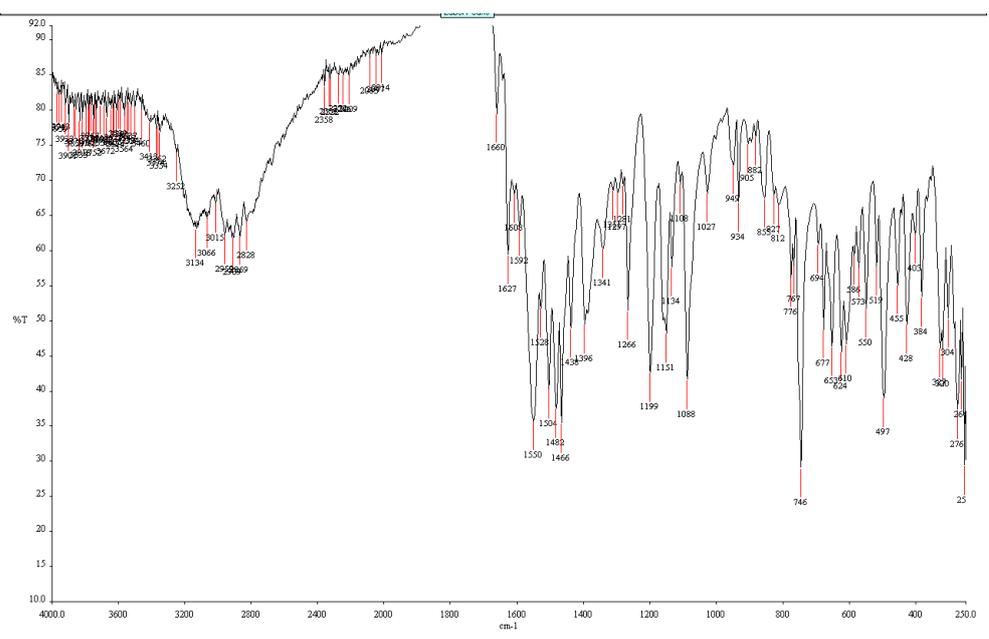
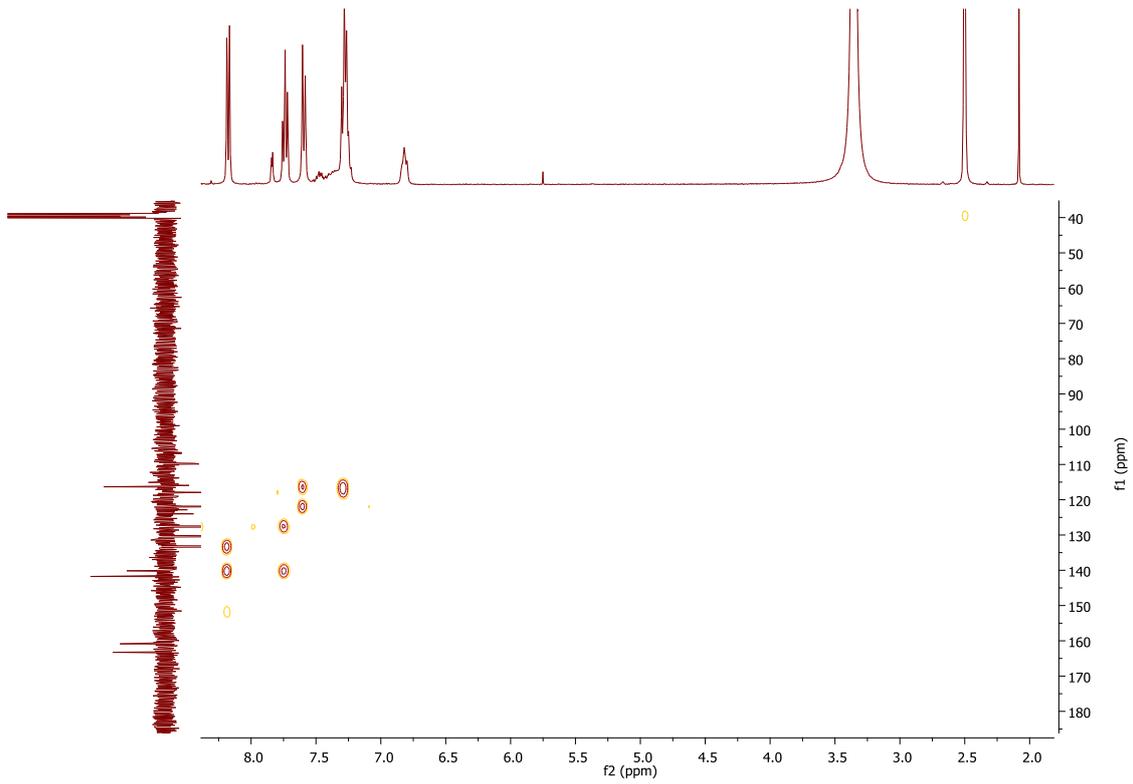




7.2.6. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL LIGANDO L6.

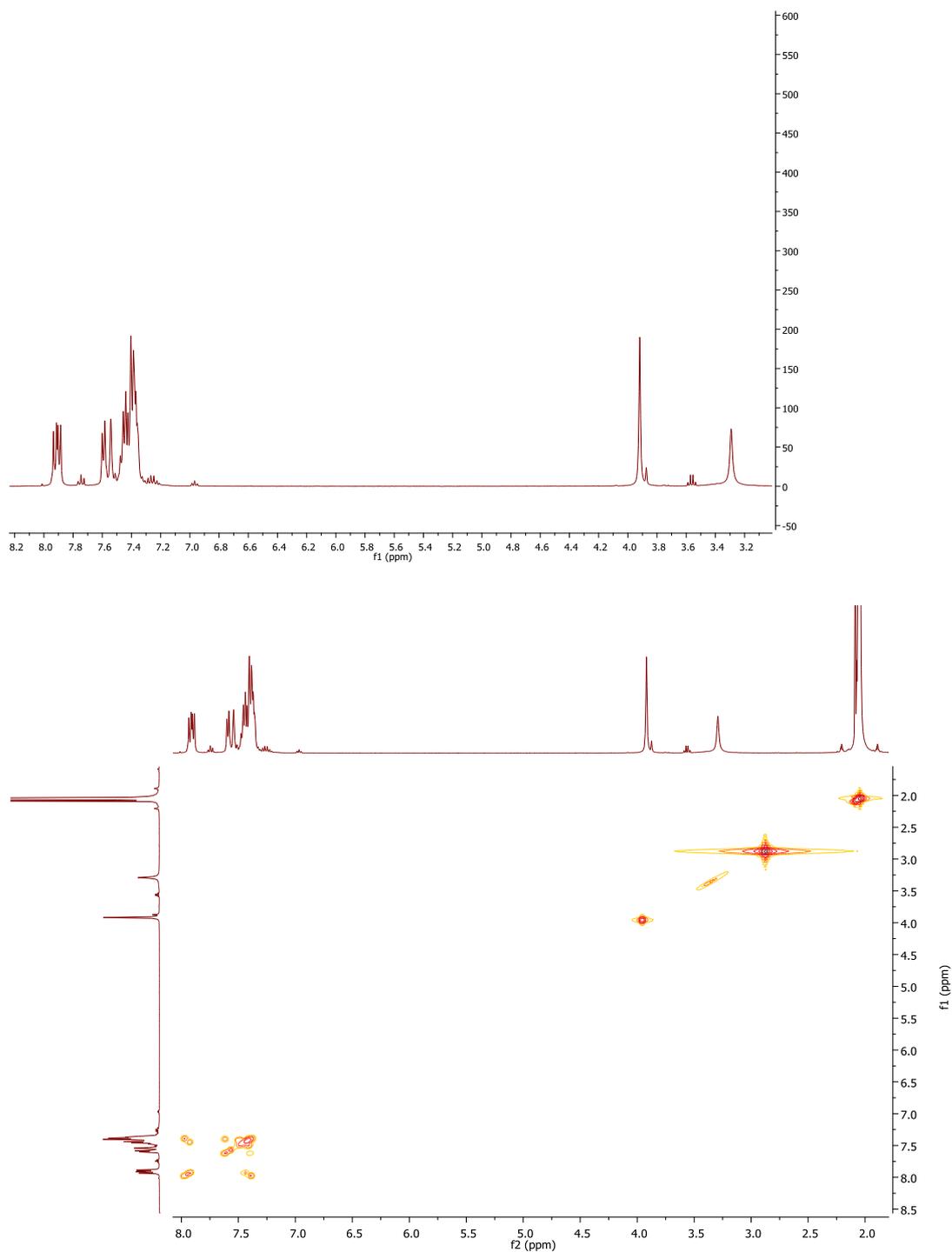


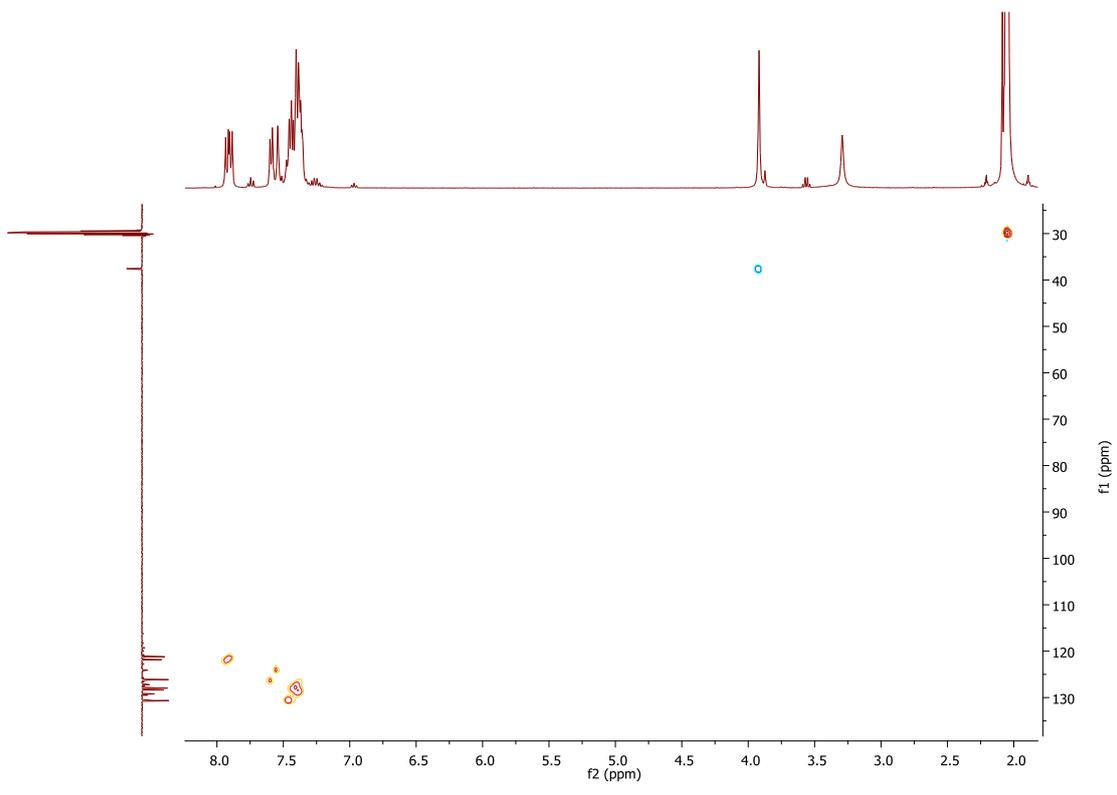
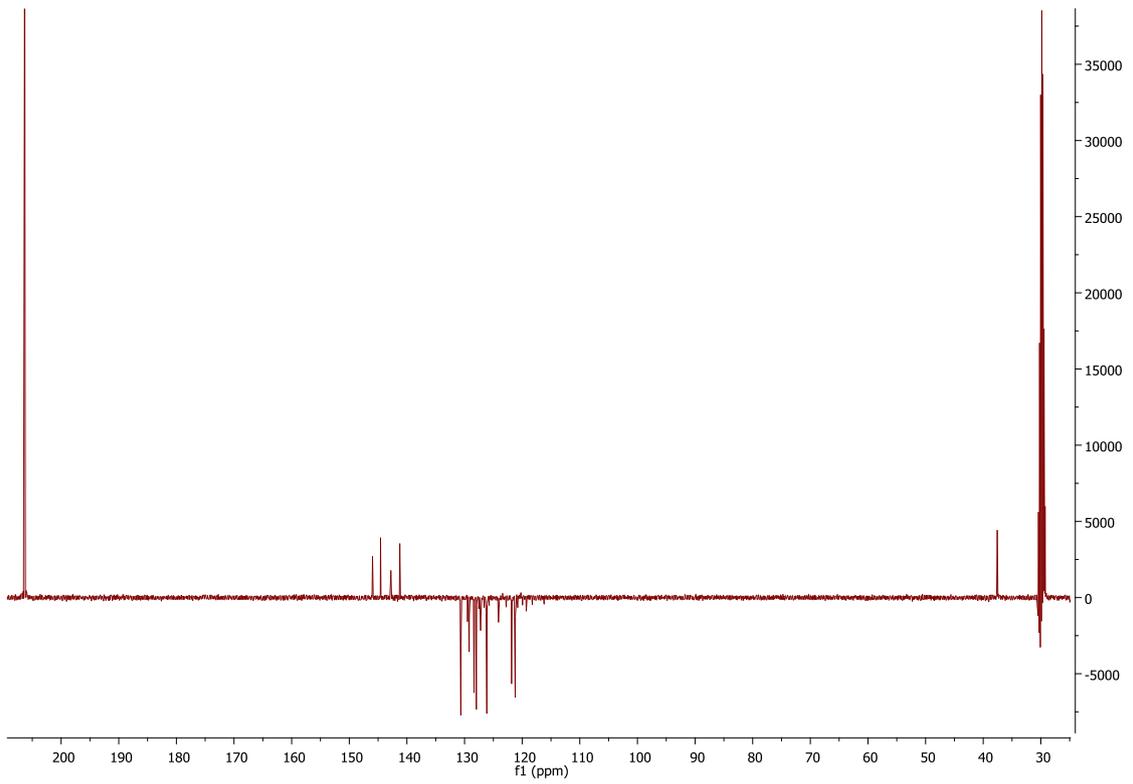


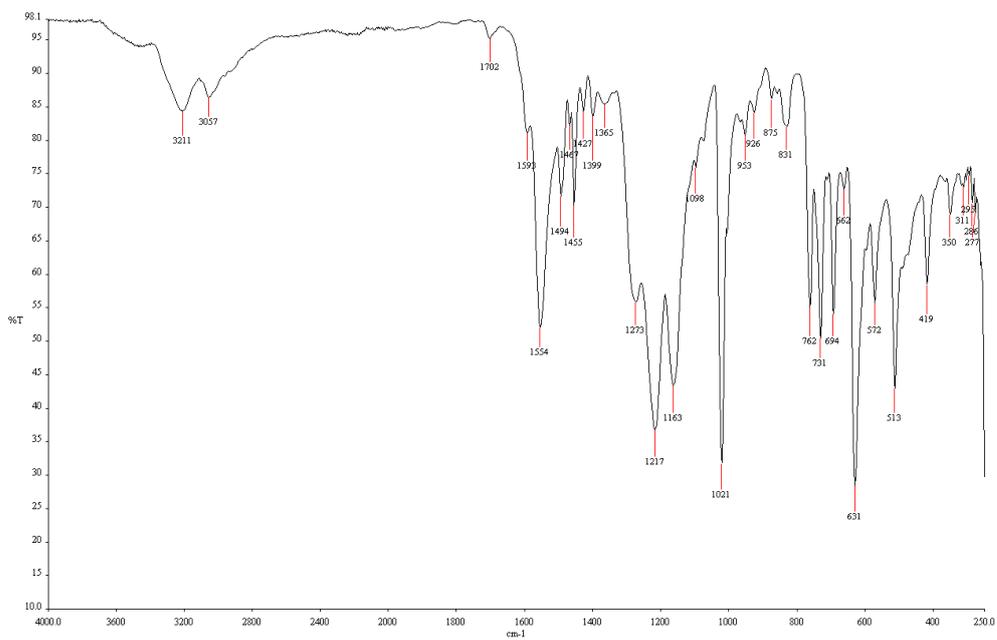
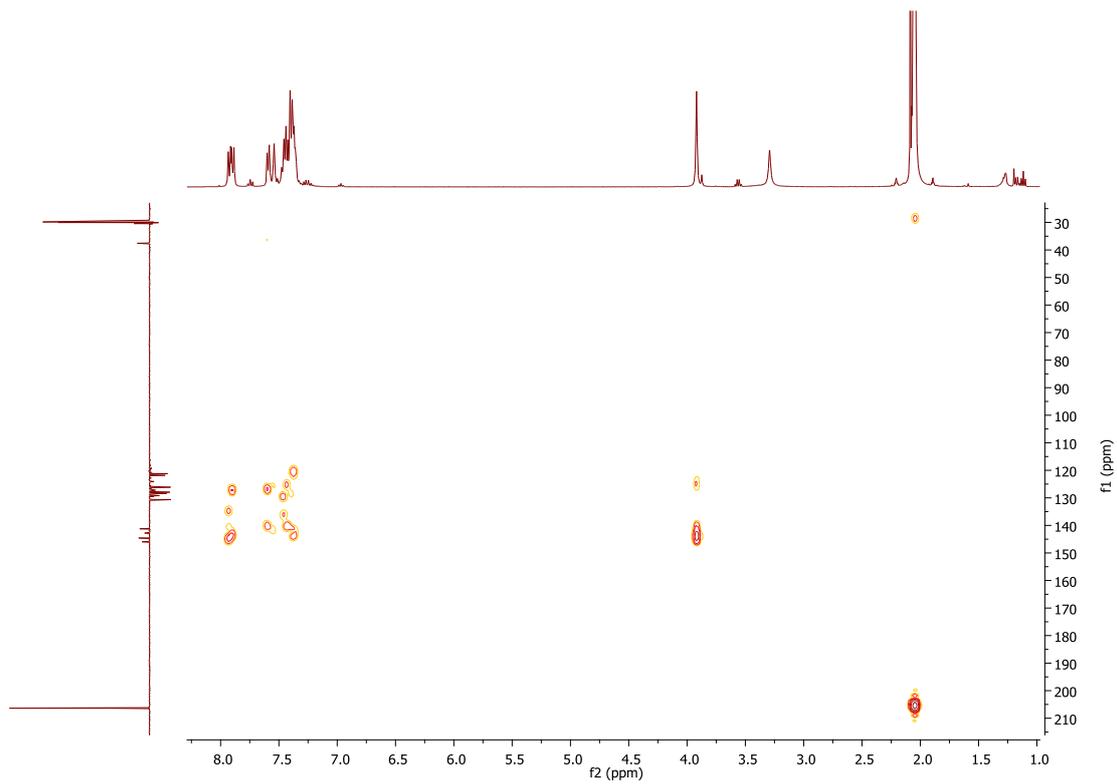


7.3. ESPECTROS RMN E IR PARA LOS COMPLEJOS METÁLICOS

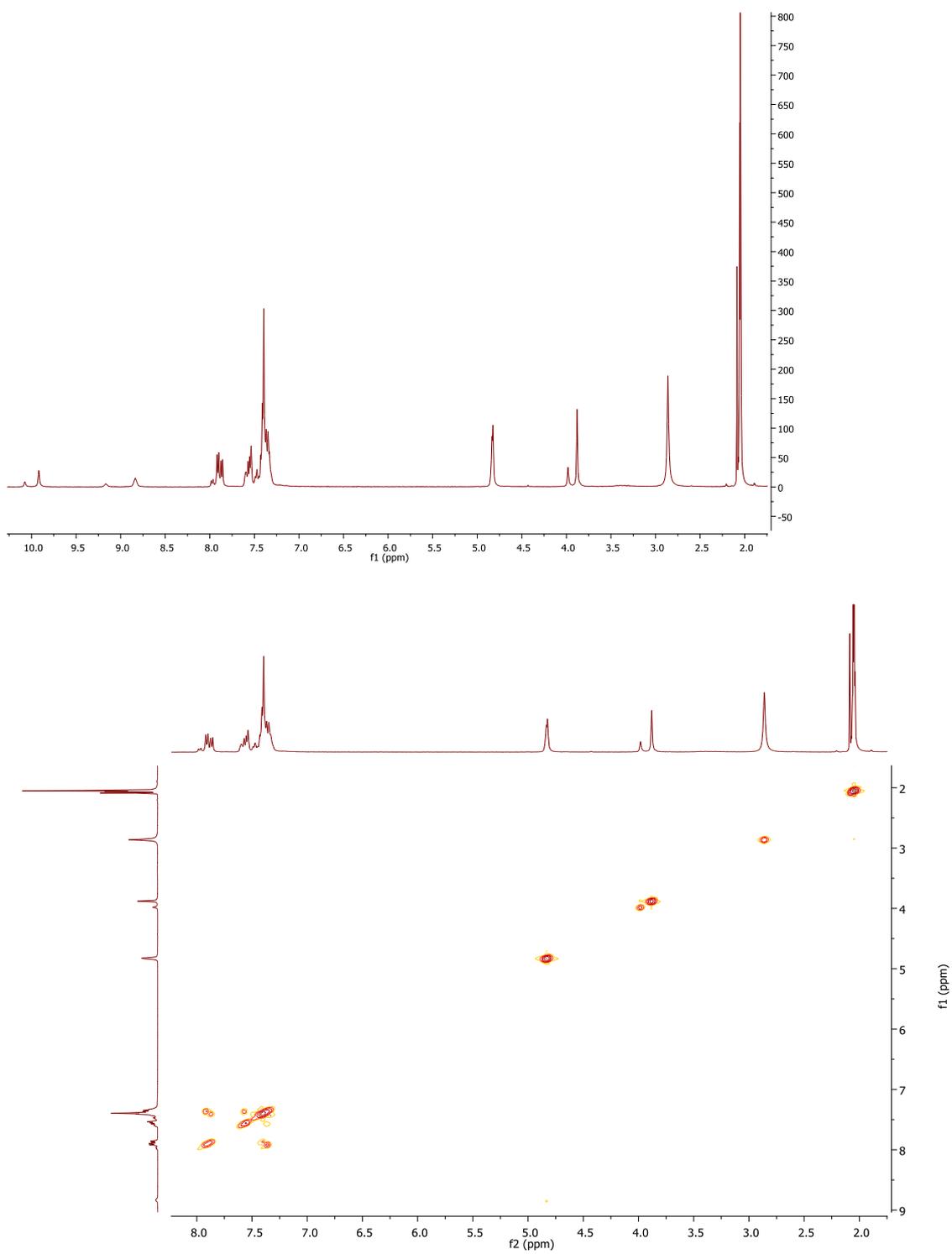
7.3.1 ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C1

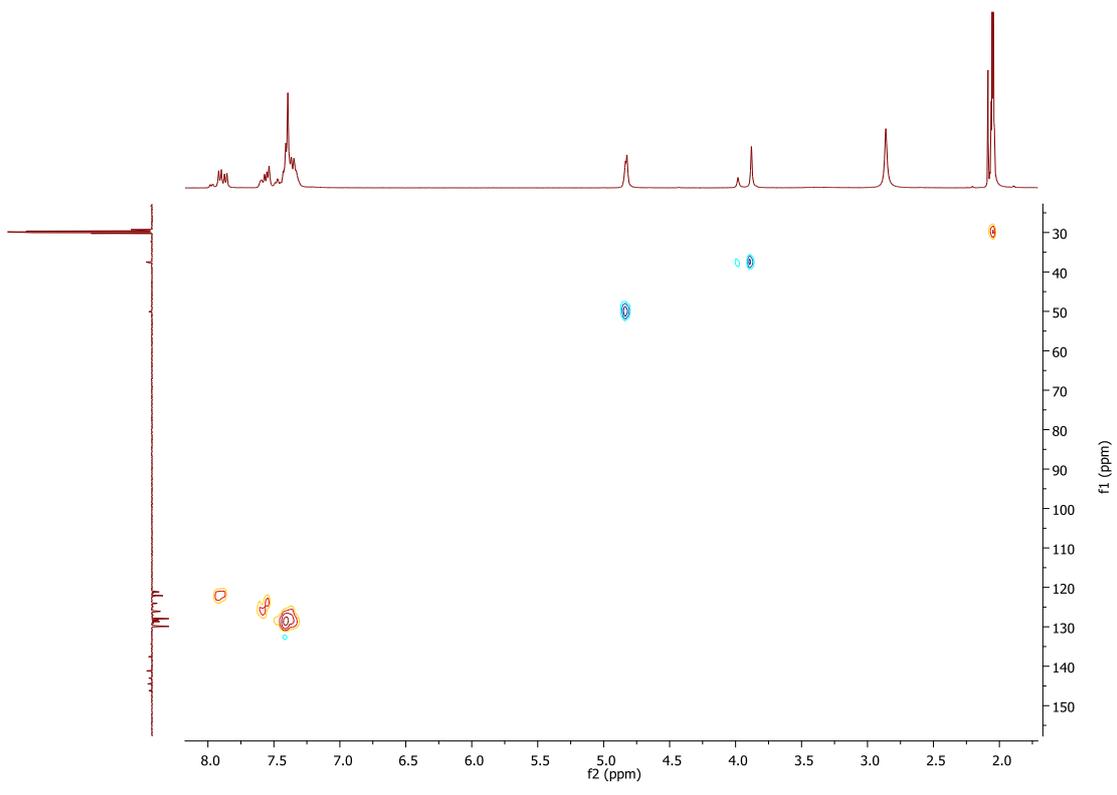
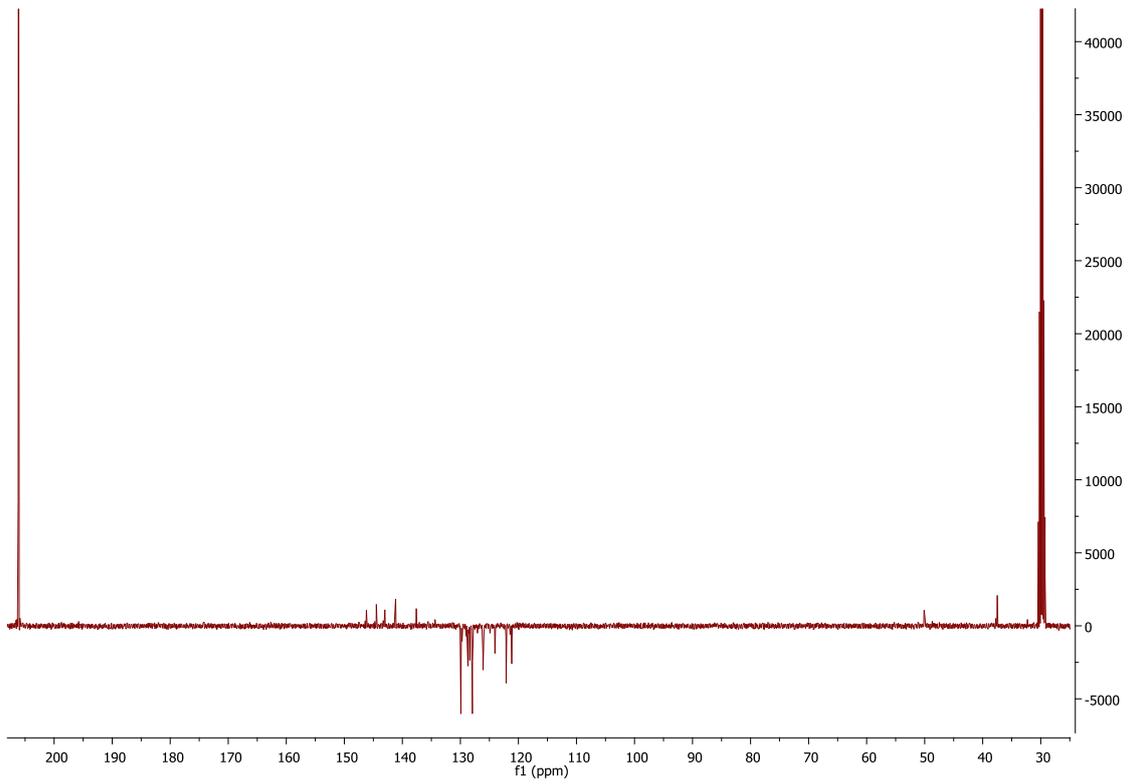


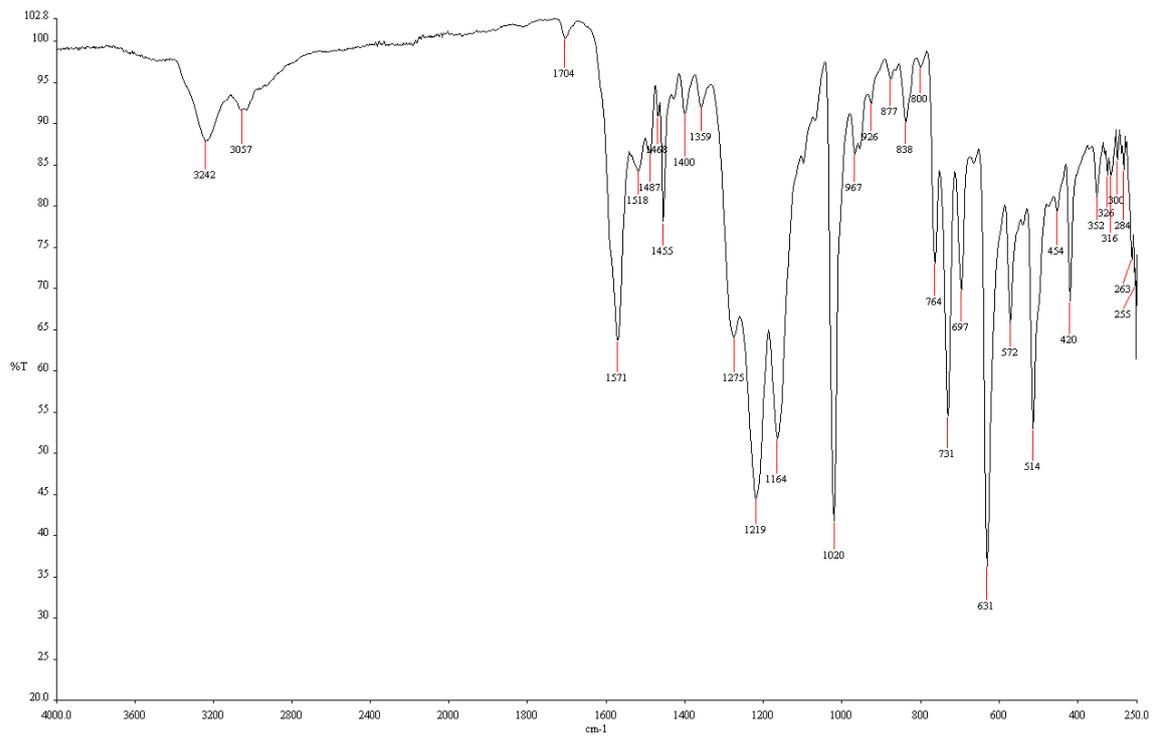
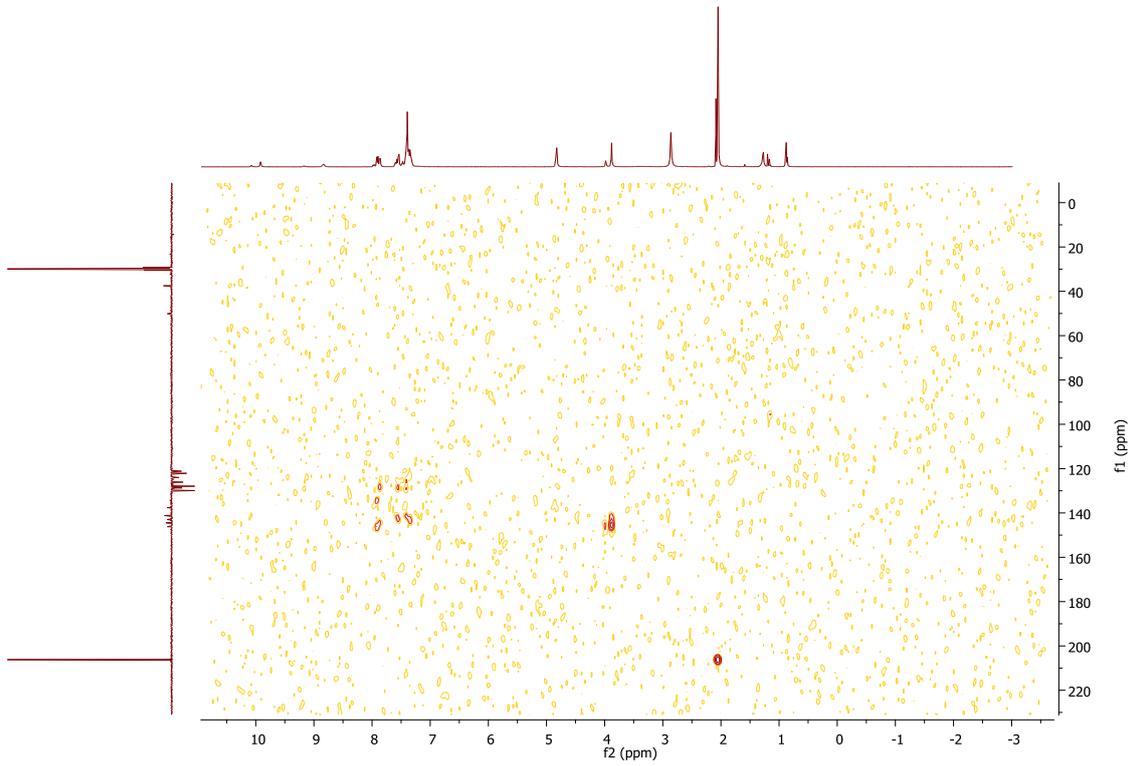




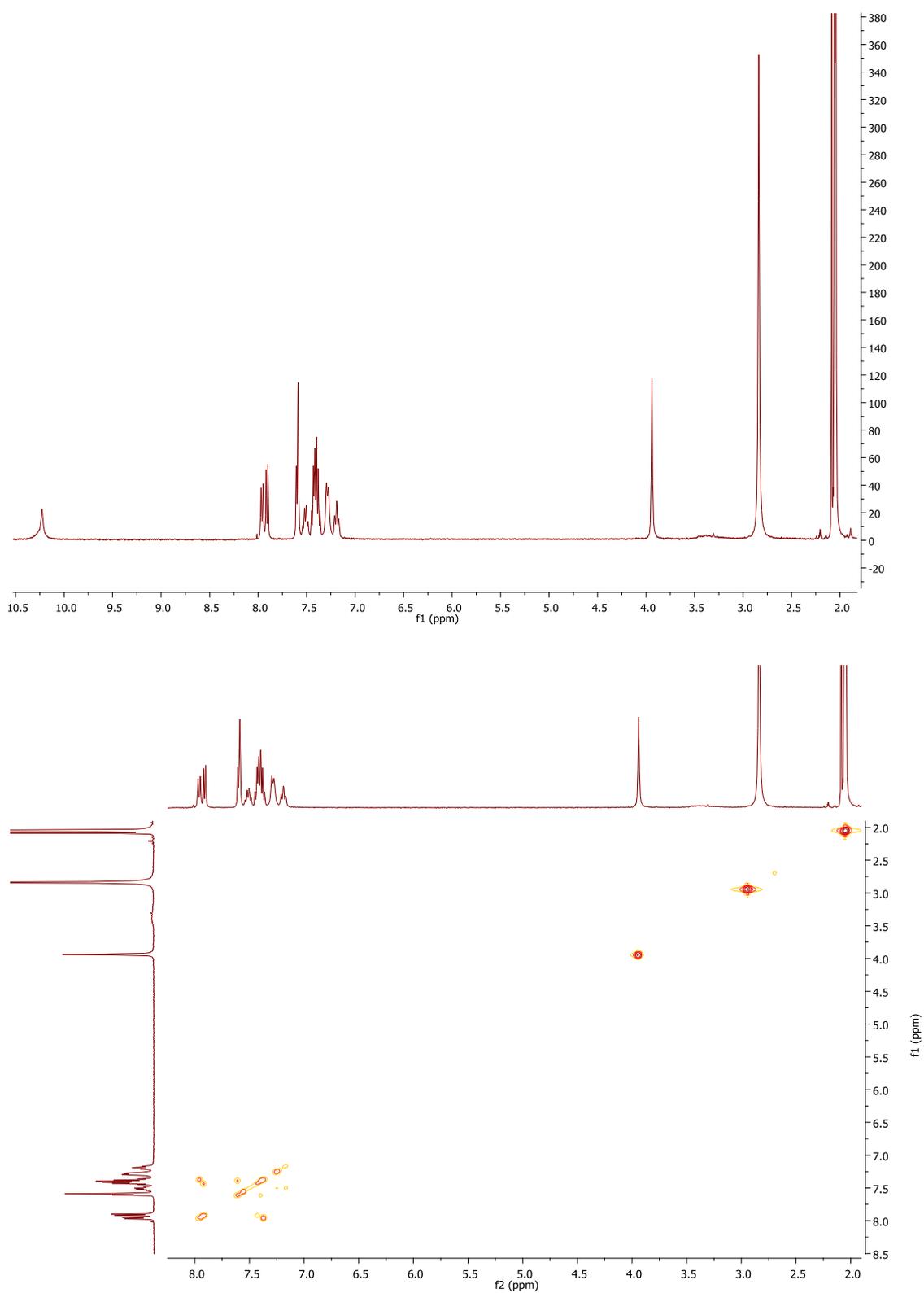
7.3.2. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C2

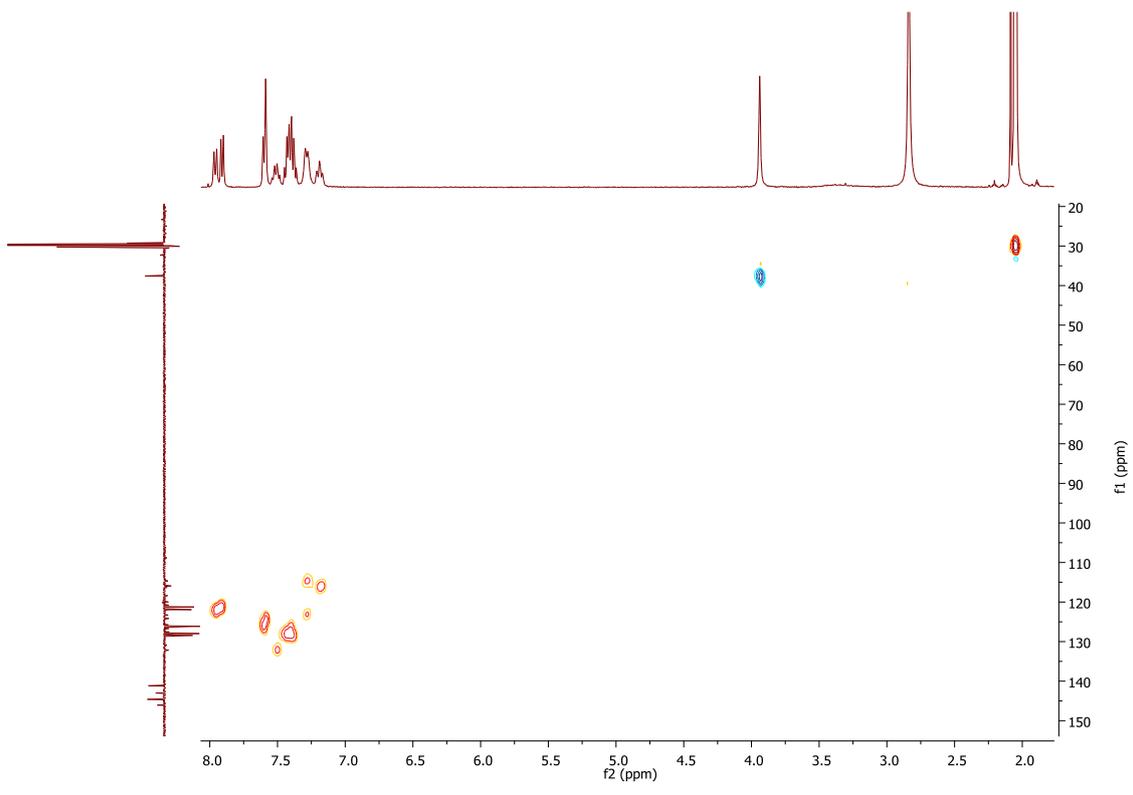
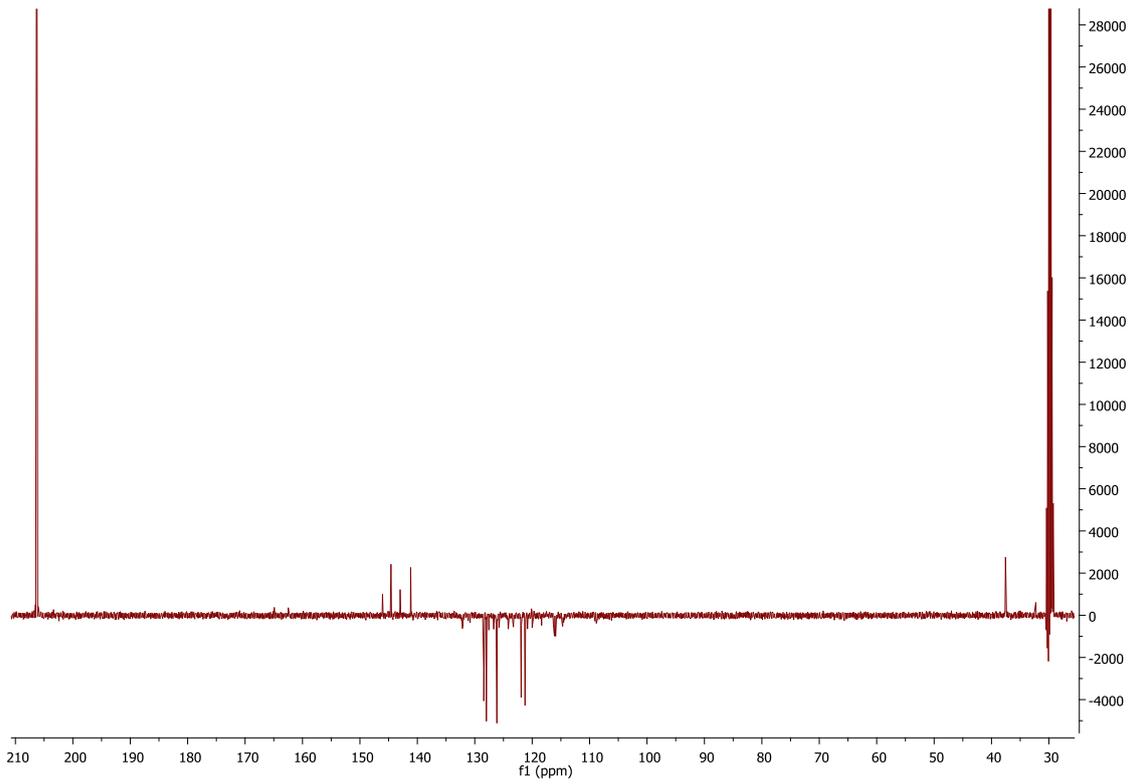


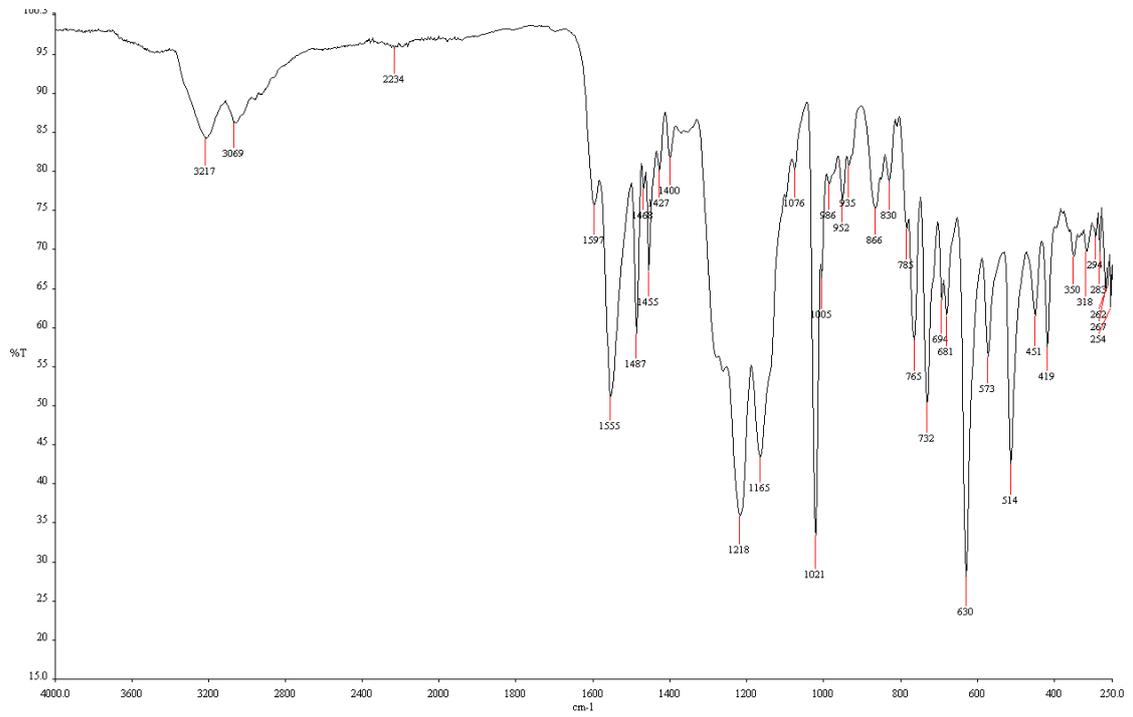
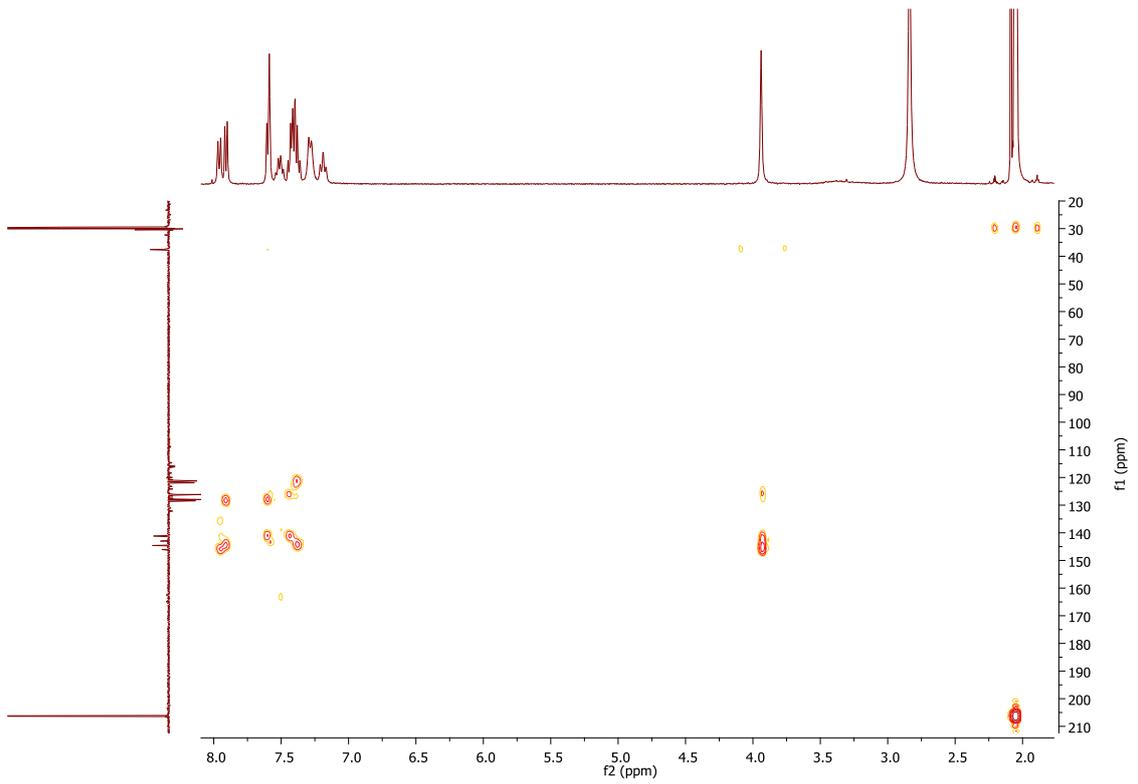




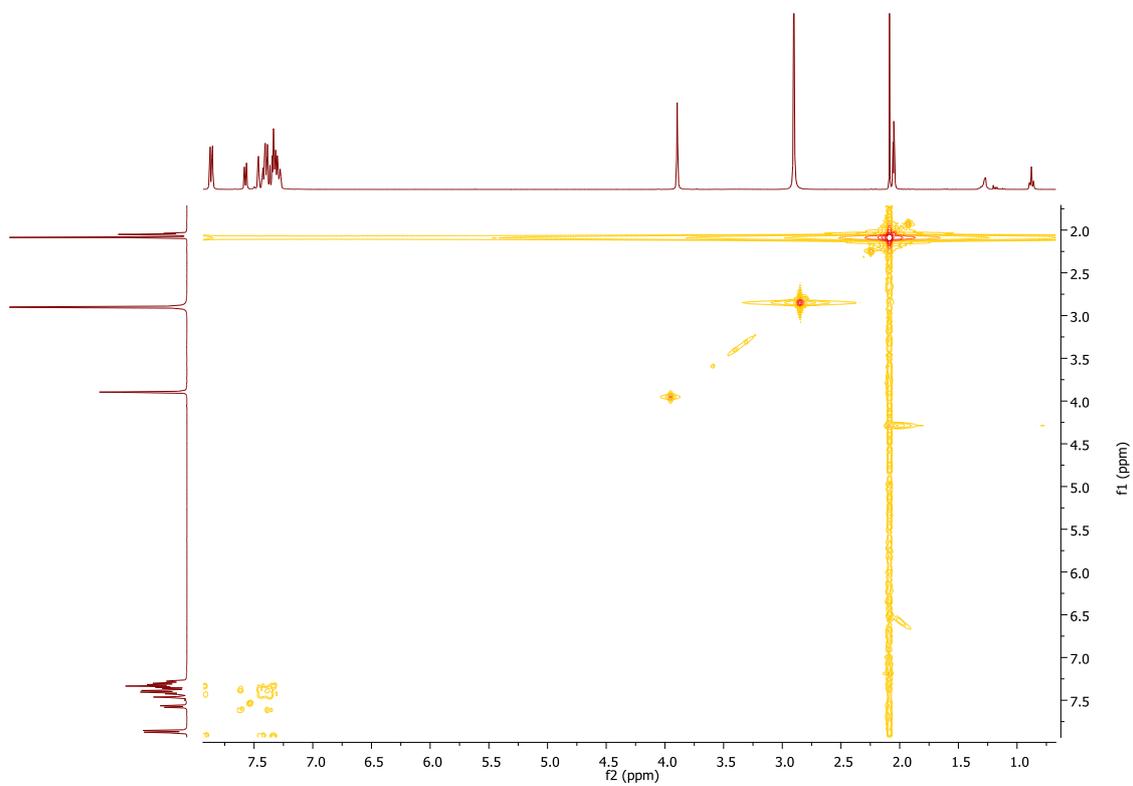
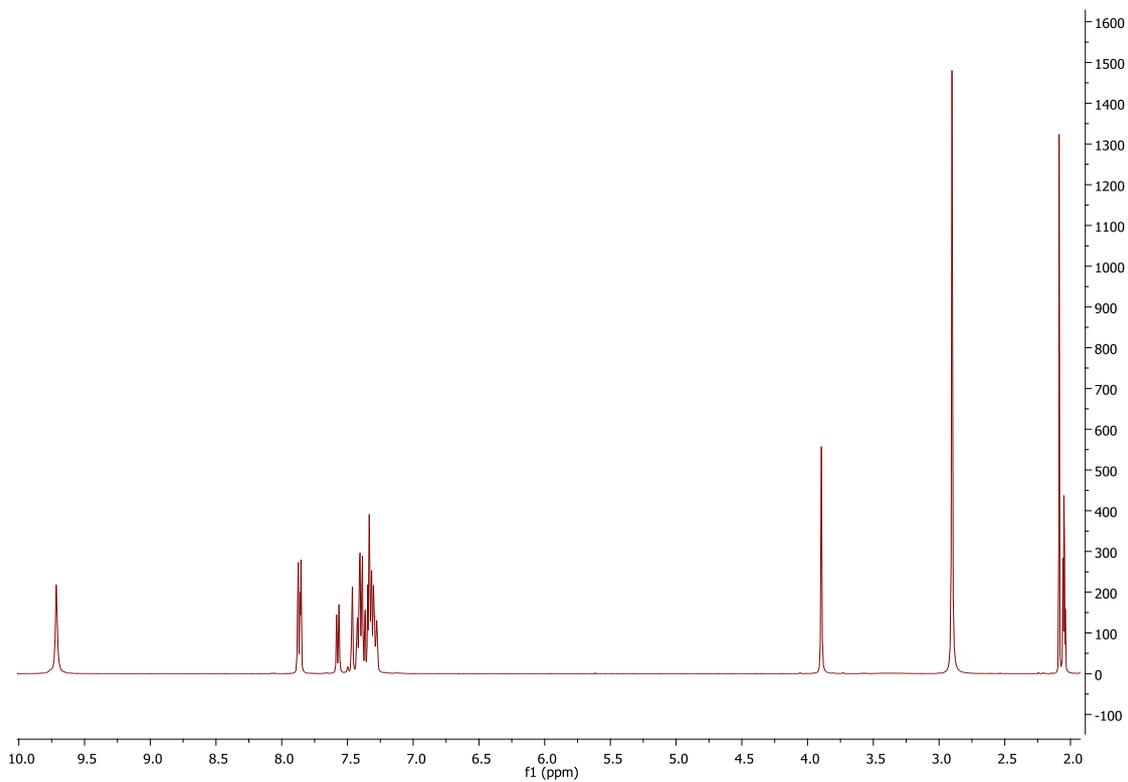
7.3.3. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C3

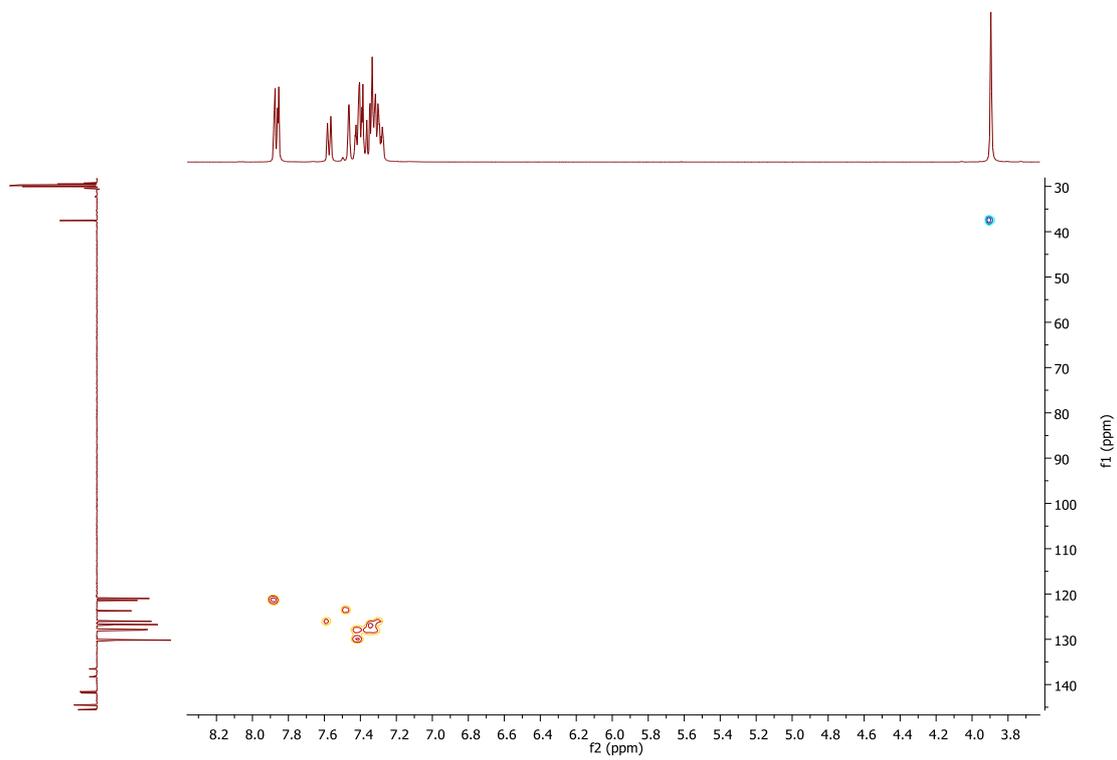
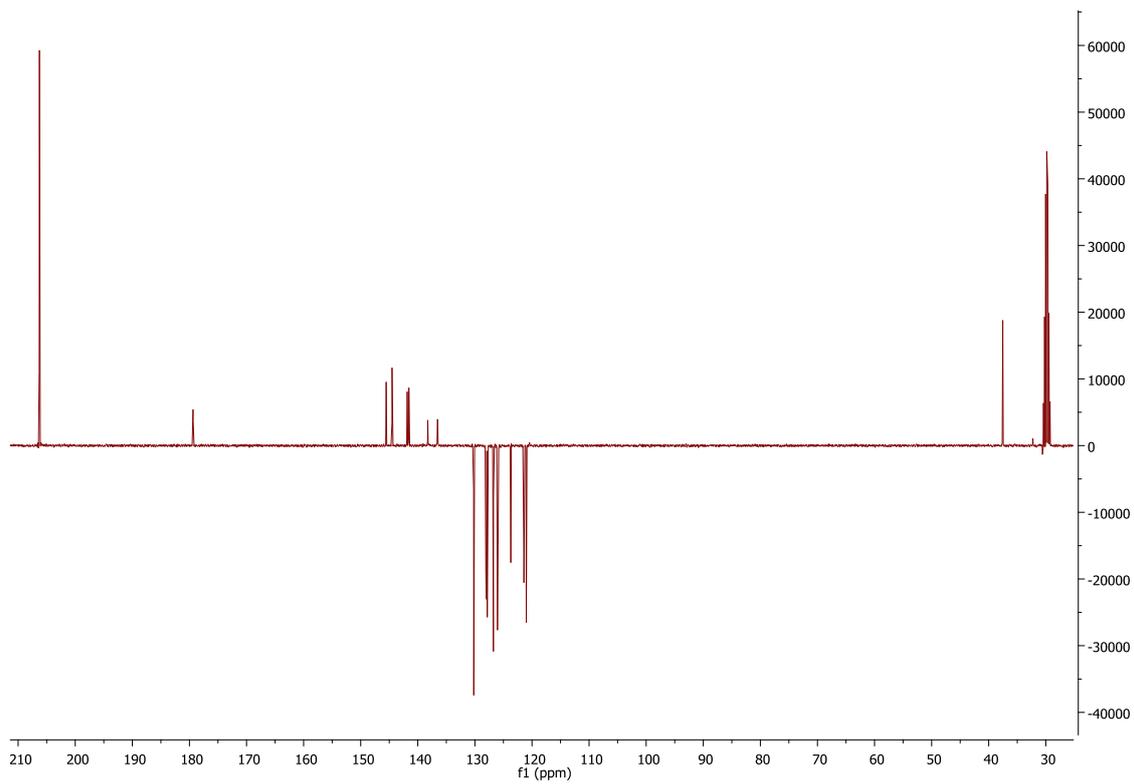


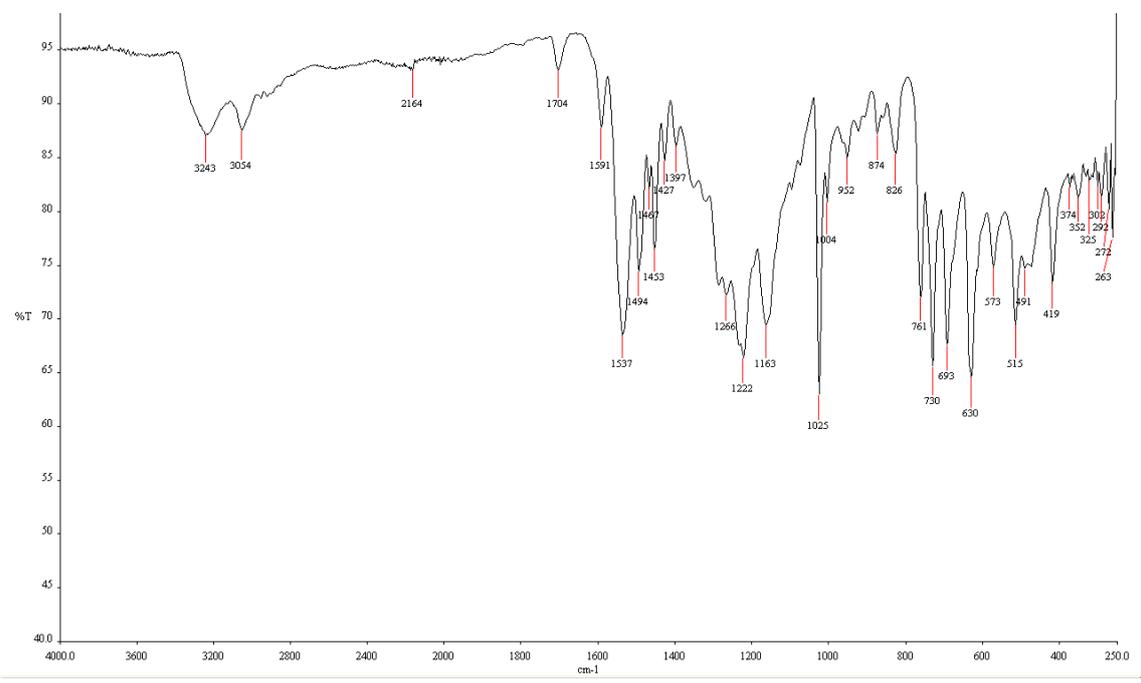
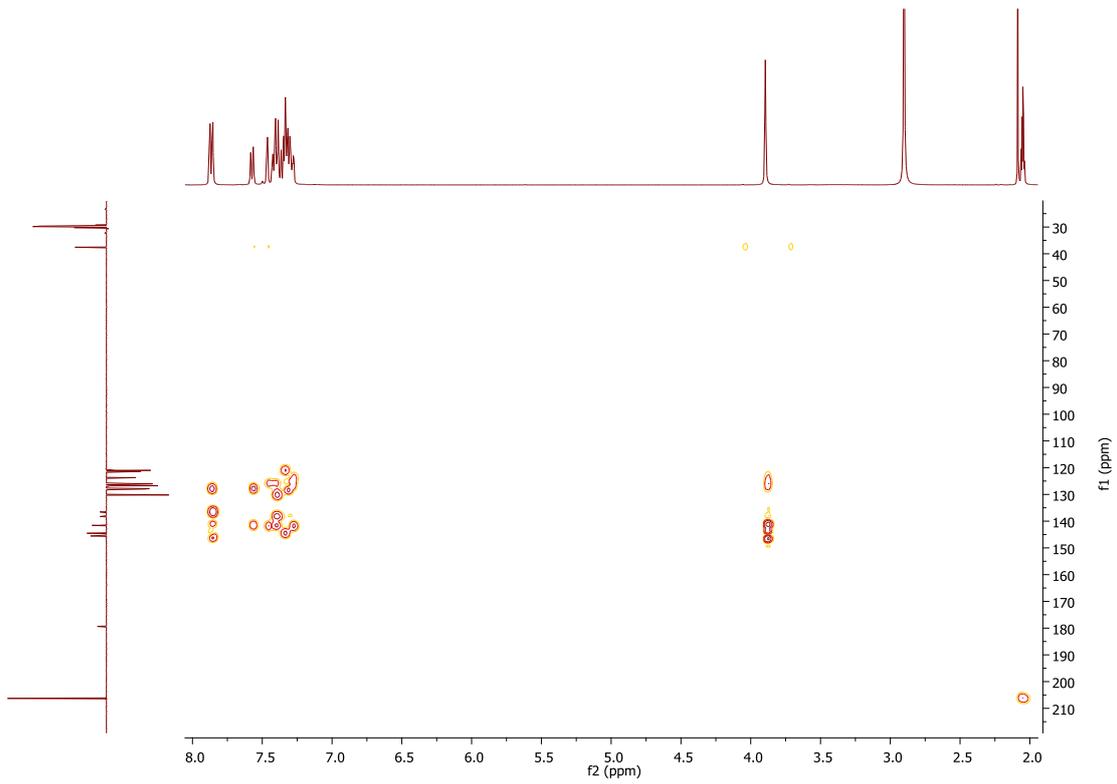




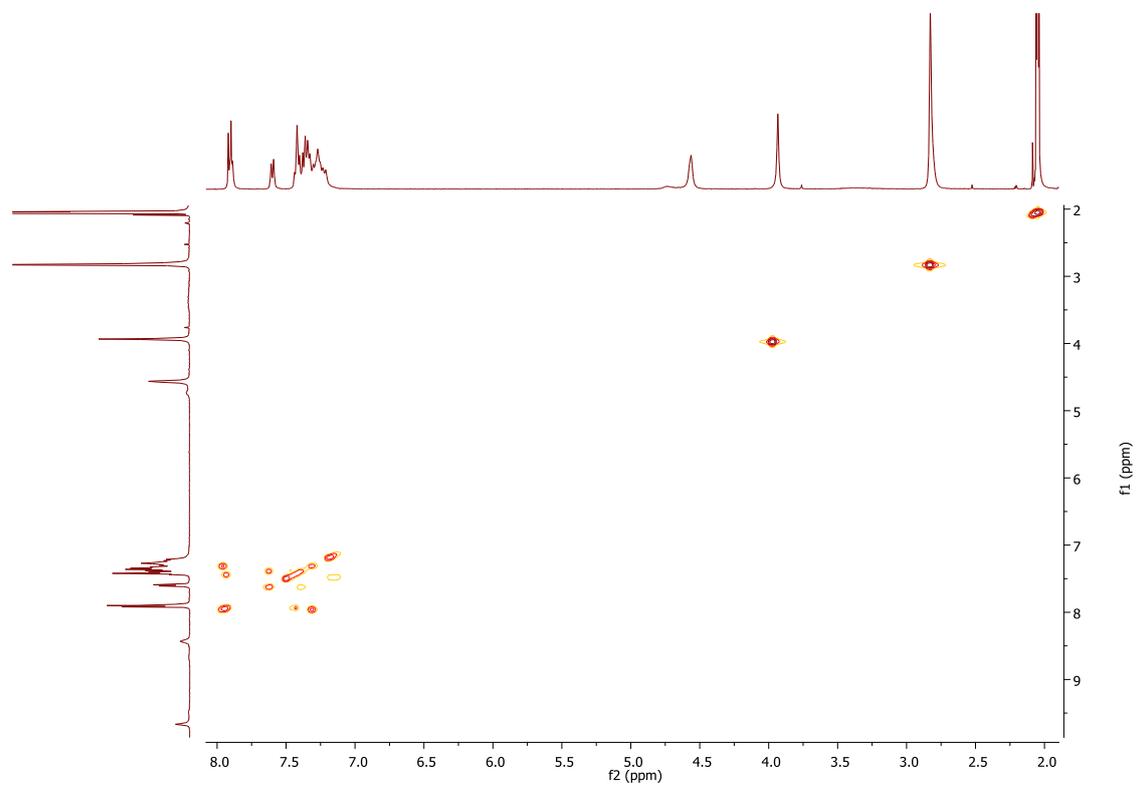
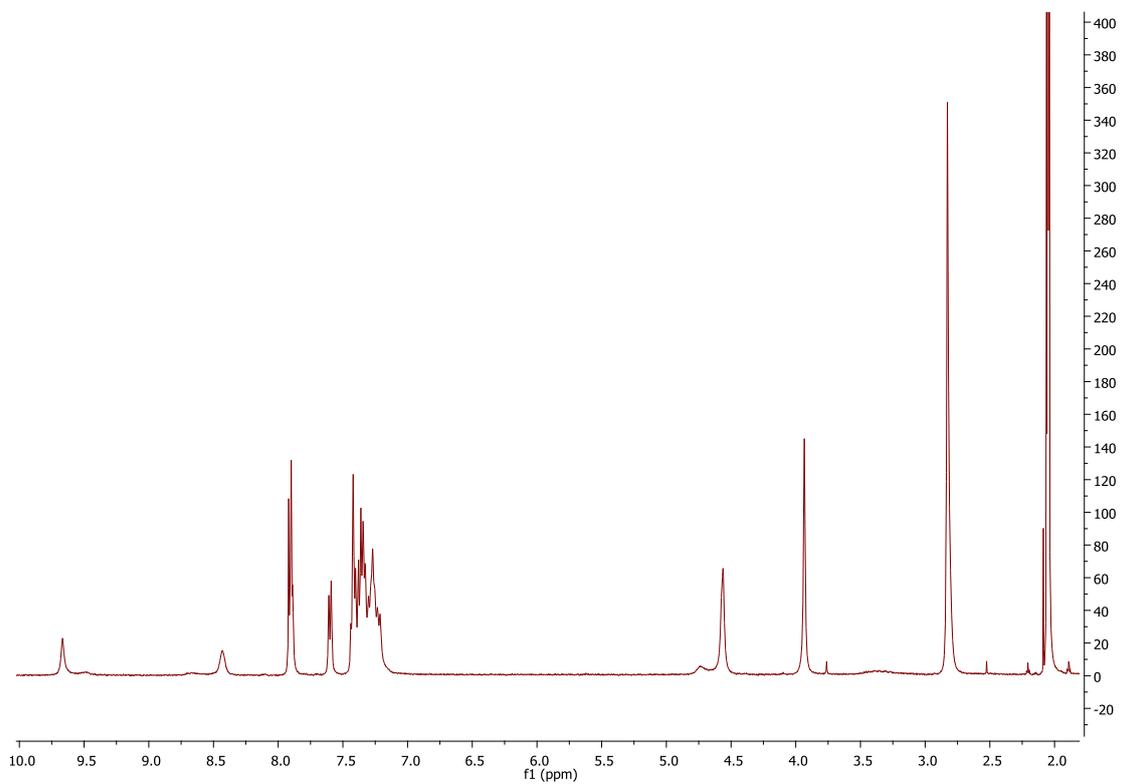
7.3.4. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C4

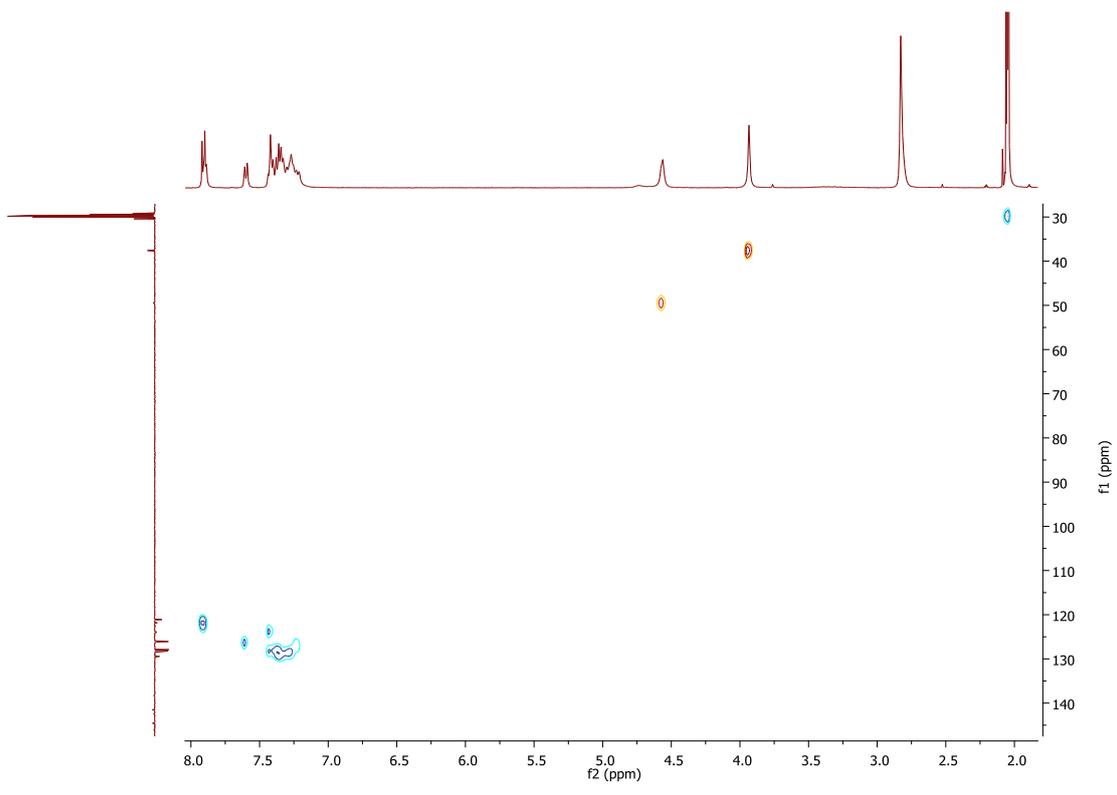
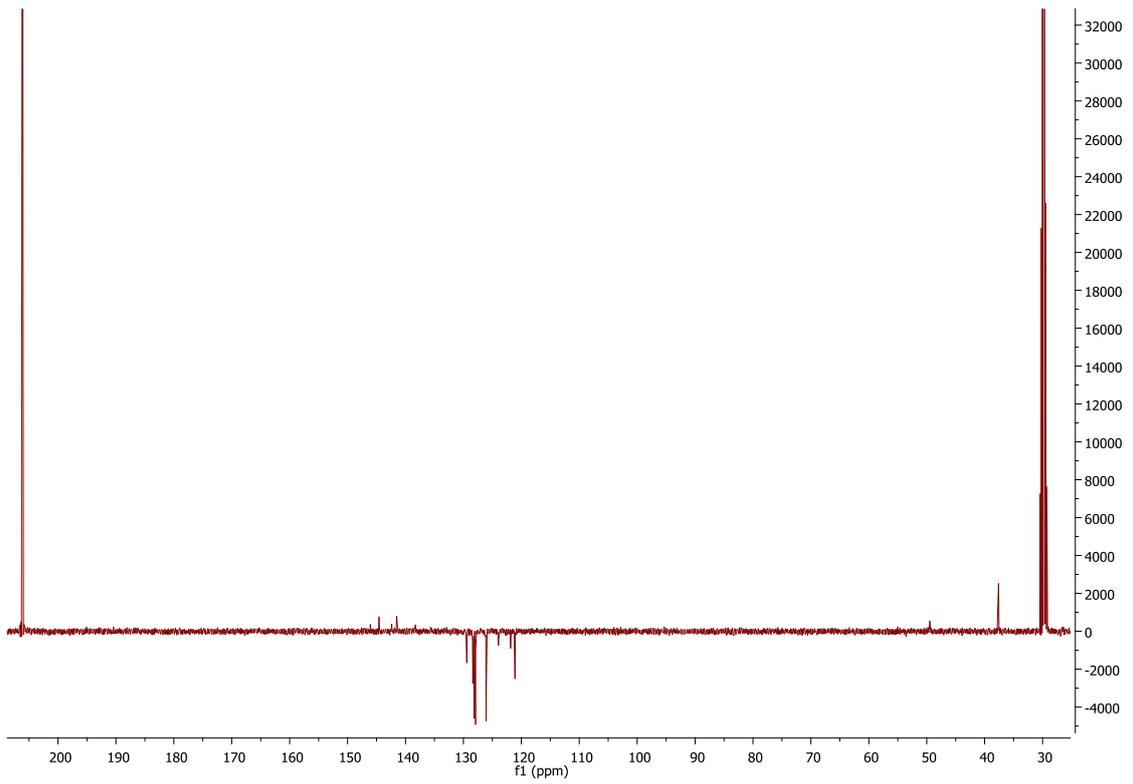


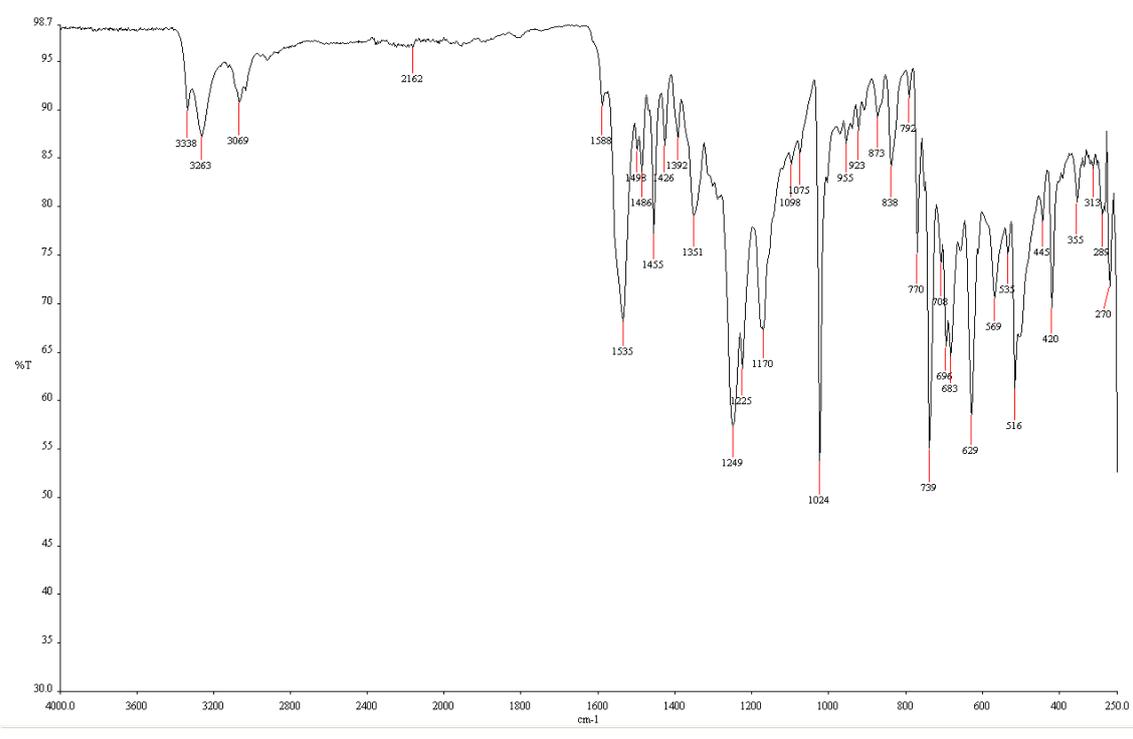
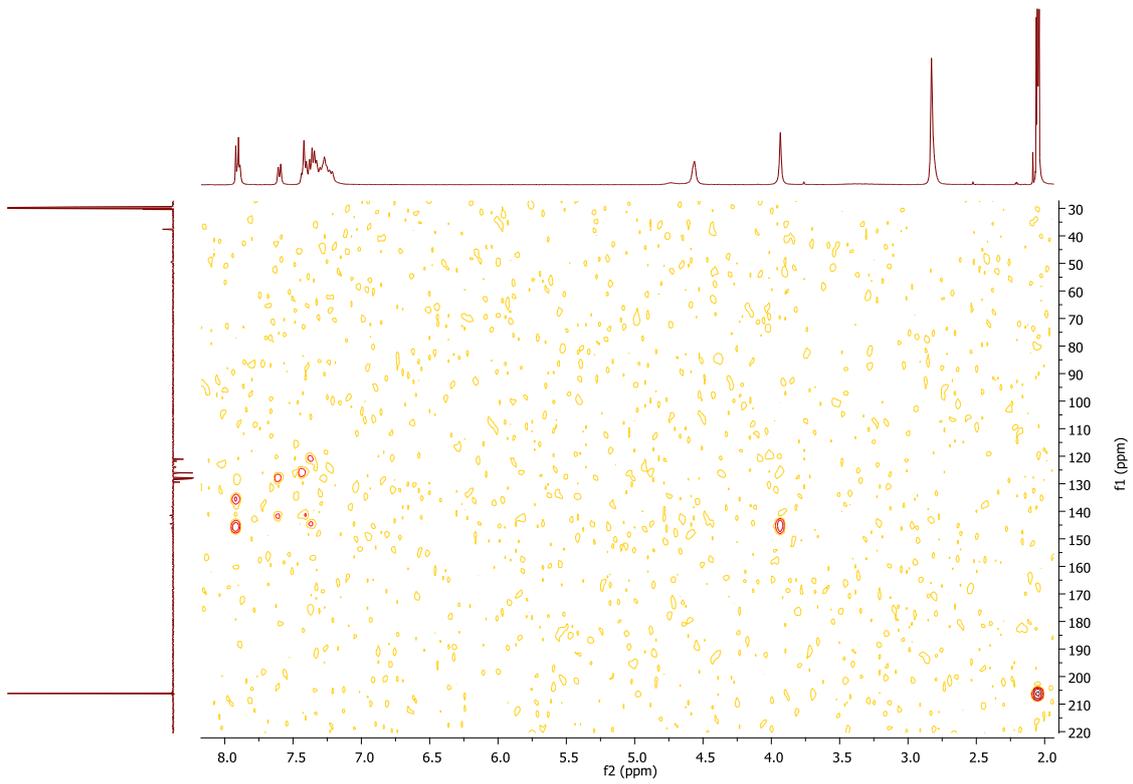




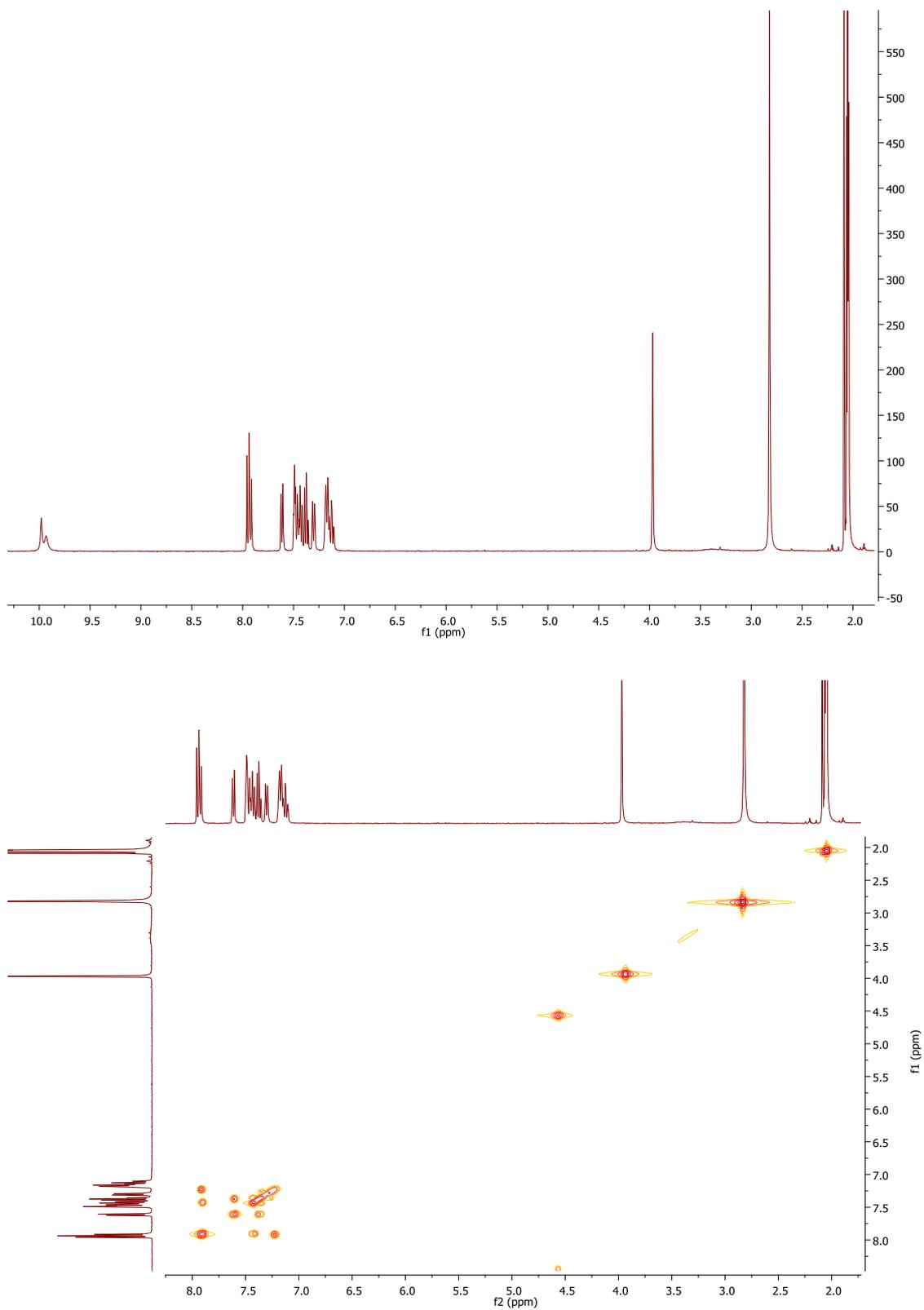
7.3.5. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C5

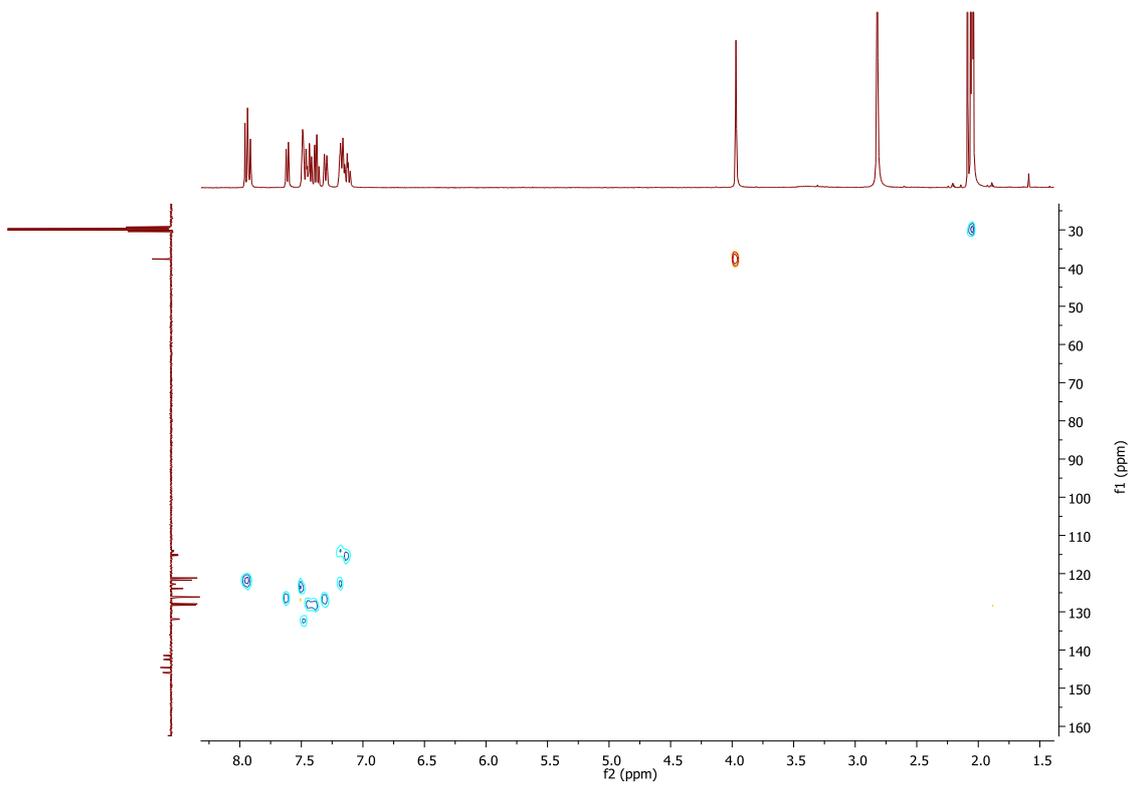
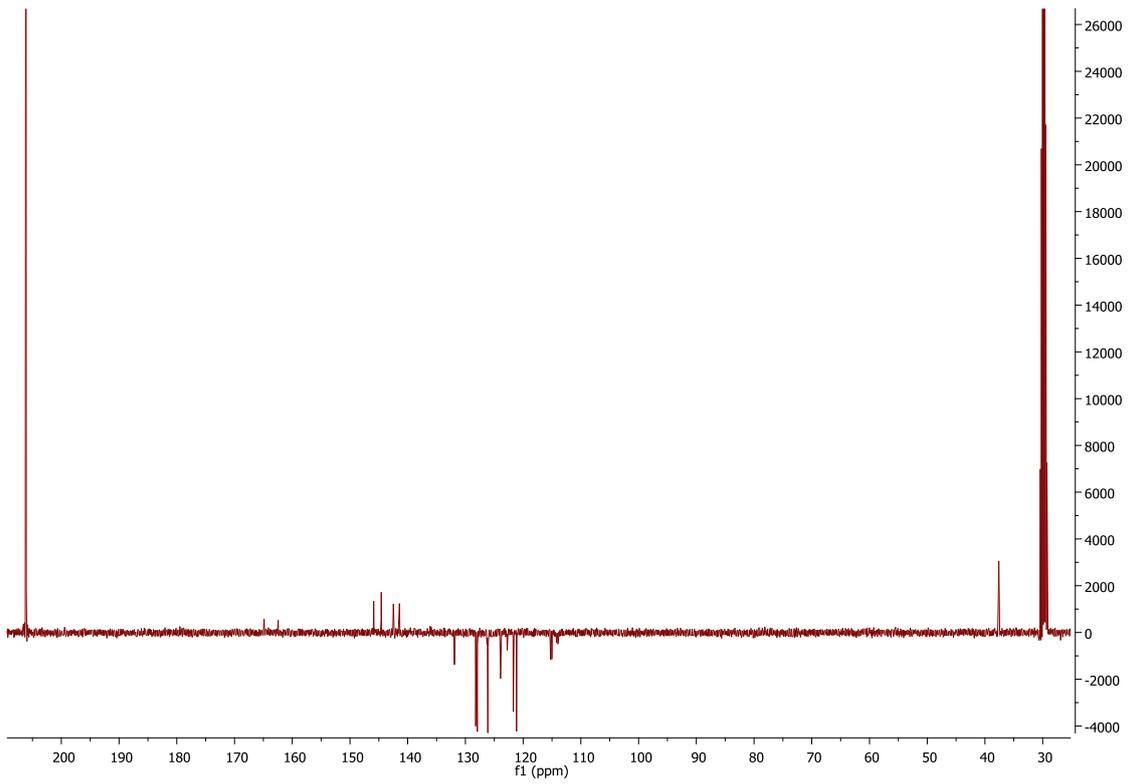


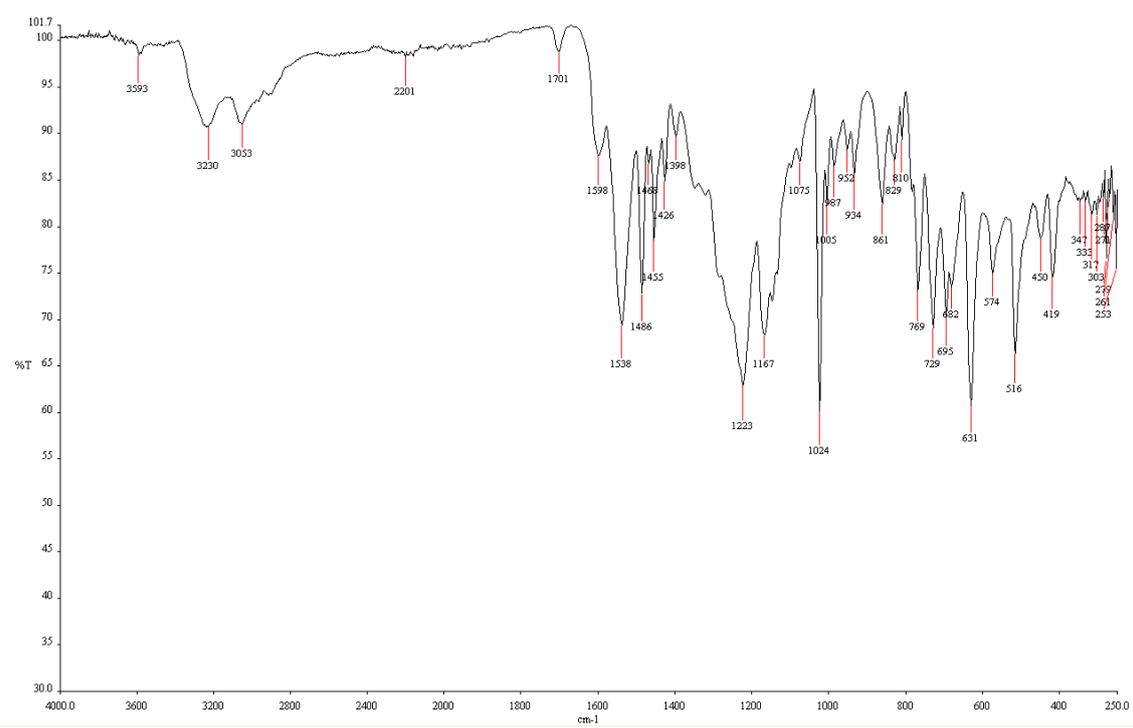
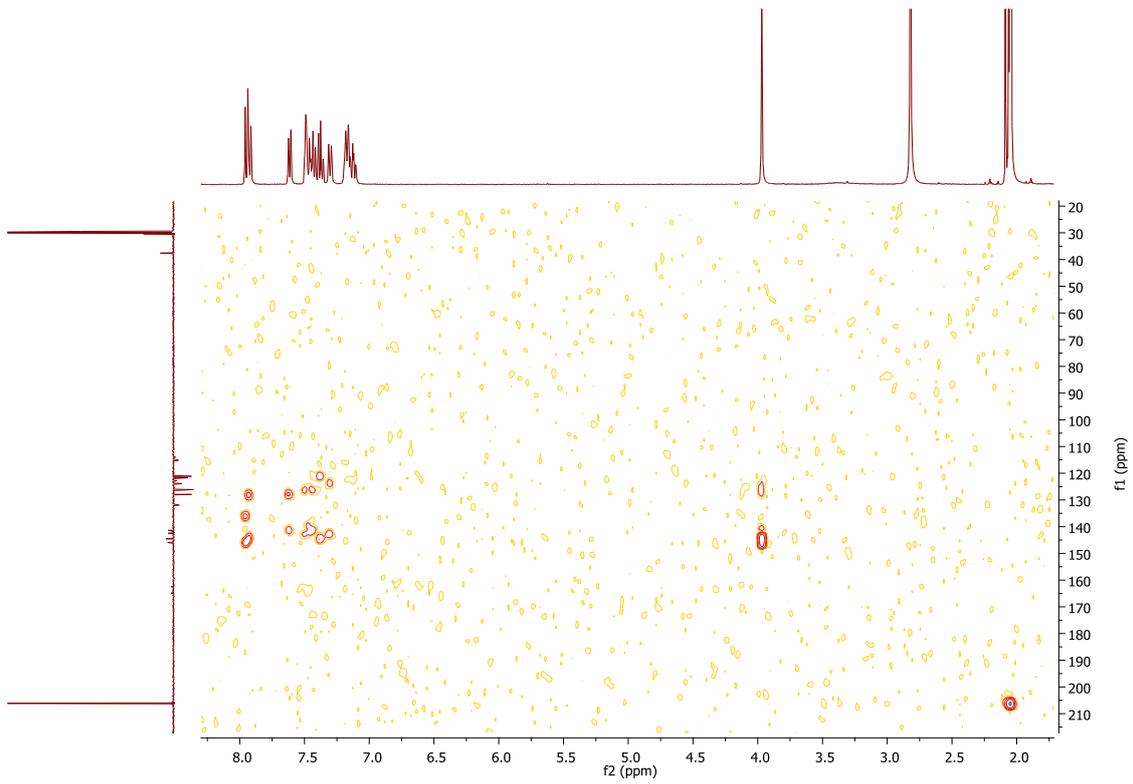




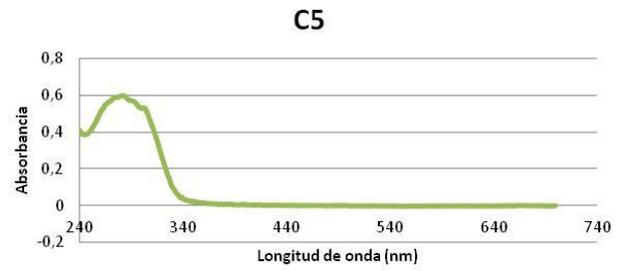
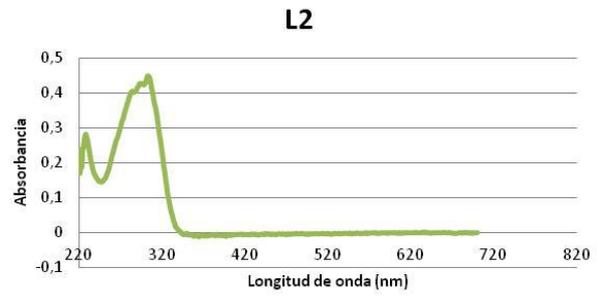
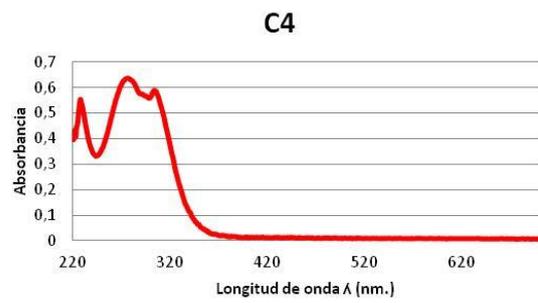
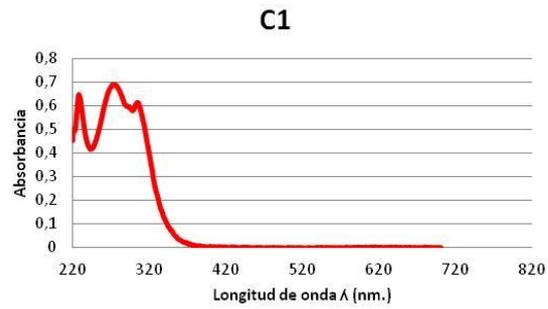
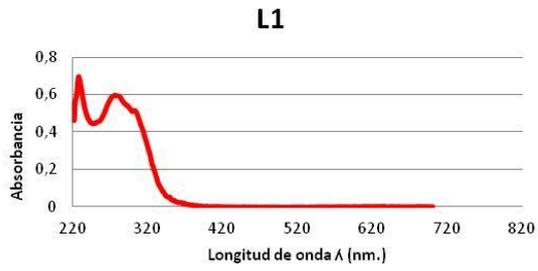
7.3.6. ESPECTRO ^1H -RMN, COSY, APT, HSQC, HMBC, IR DEL COMPLEJO C6



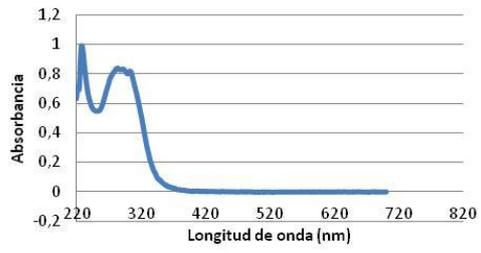




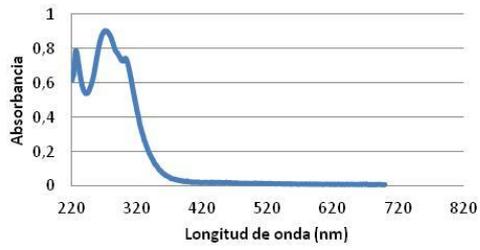
7.4. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE PARA LOS LIGANDOS L1-4 Y L6 Y COMPLEJOS C1 Y C3-C6.



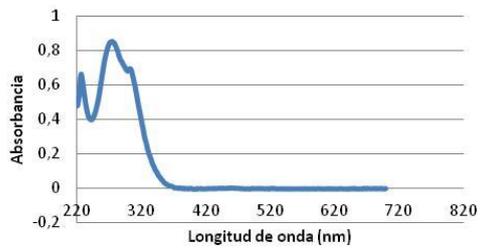
L3



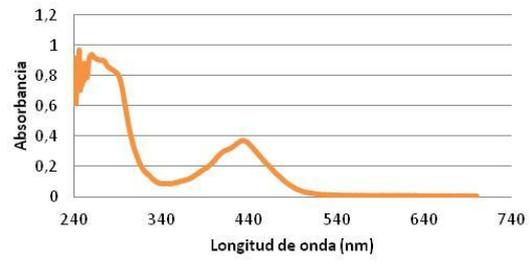
C3



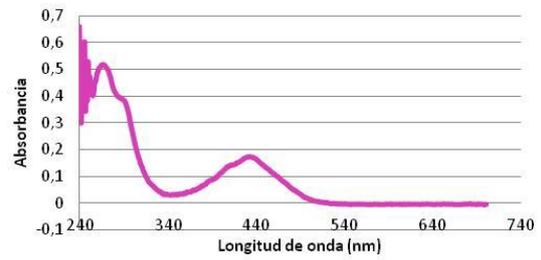
C6



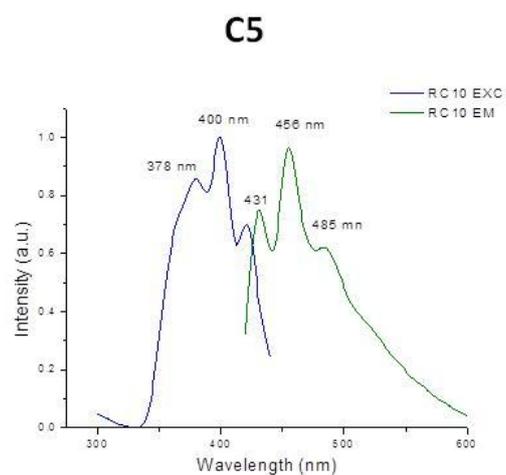
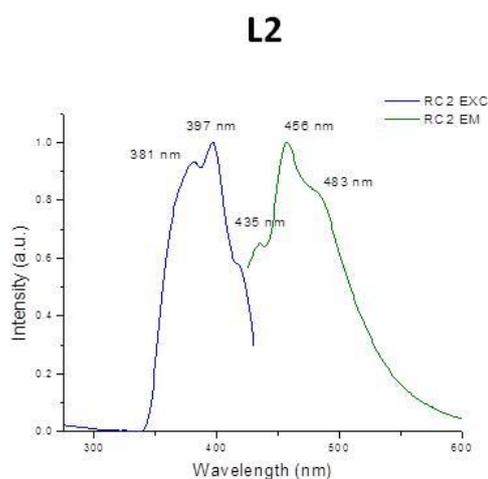
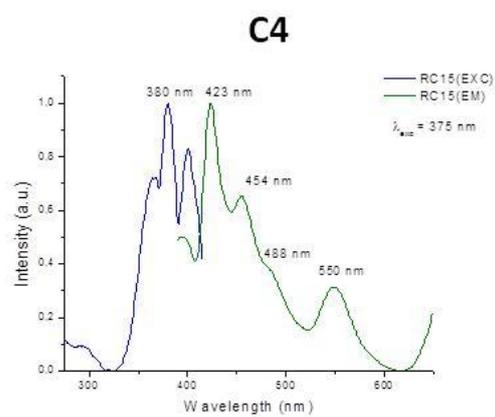
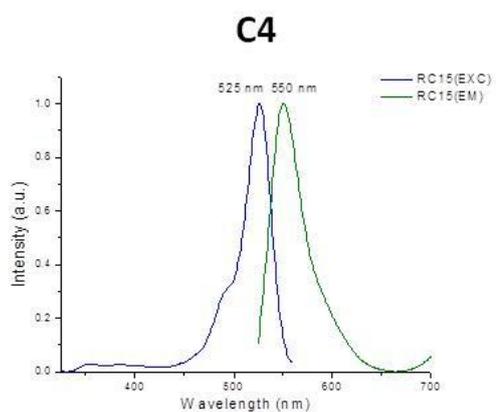
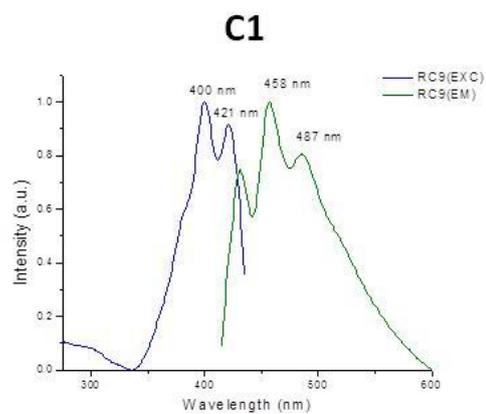
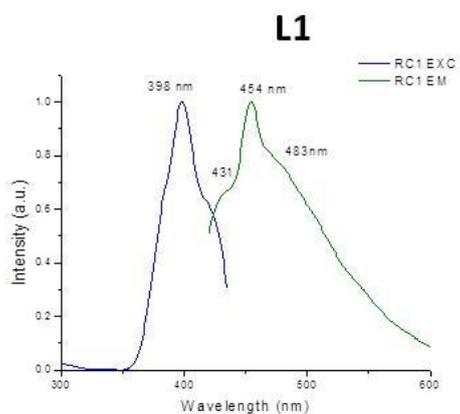
L4

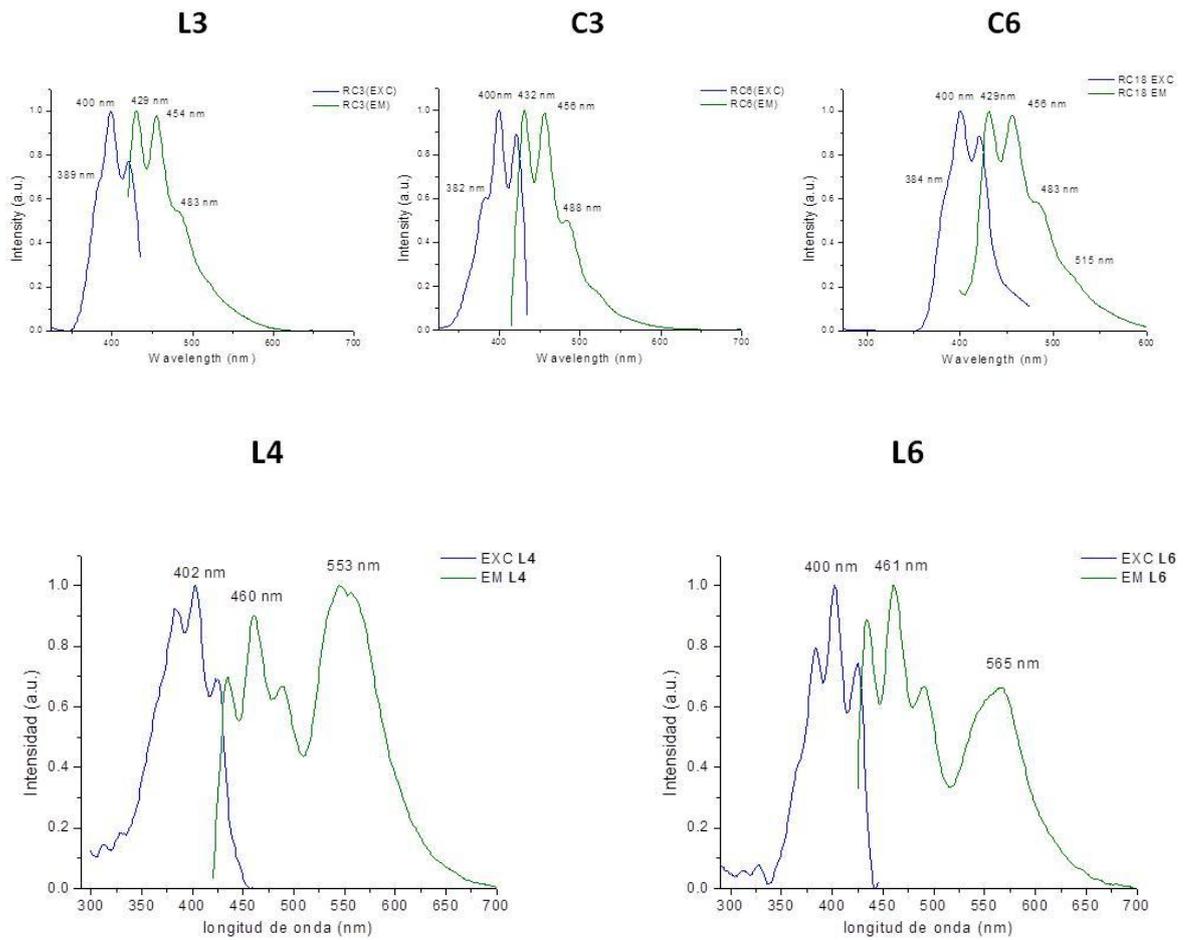


L6

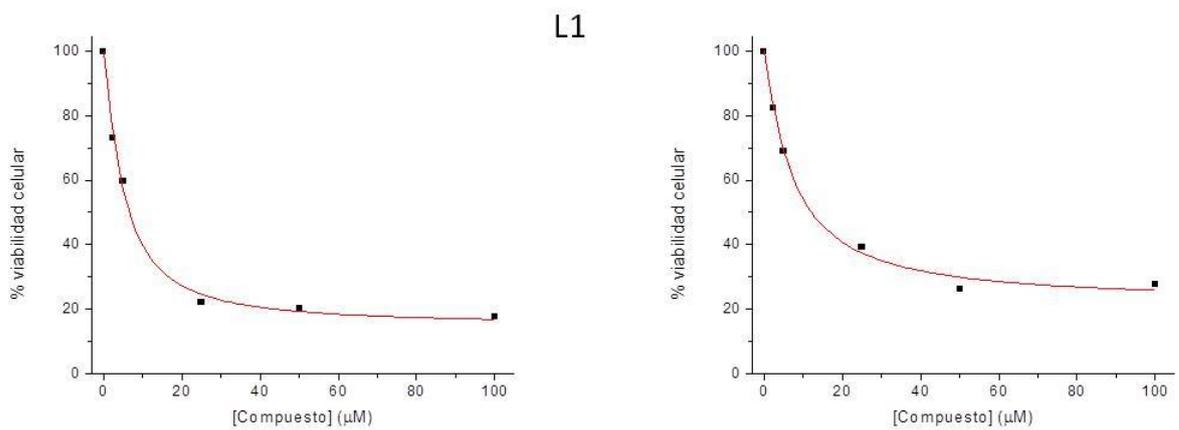


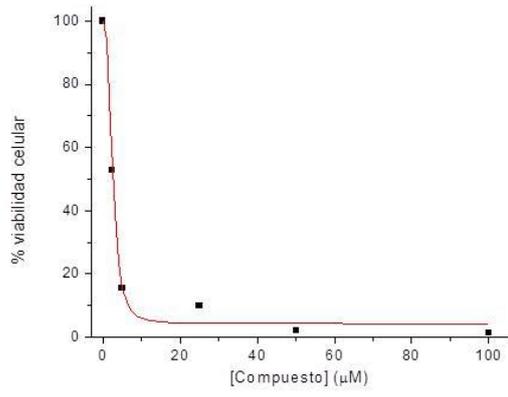
7.5. ESPECTROS DE EXCITACIÓN-EMISIÓN PARA LOS LIGANDOS L1-L4 Y L6 Y COMPLEJOS C3-C6.



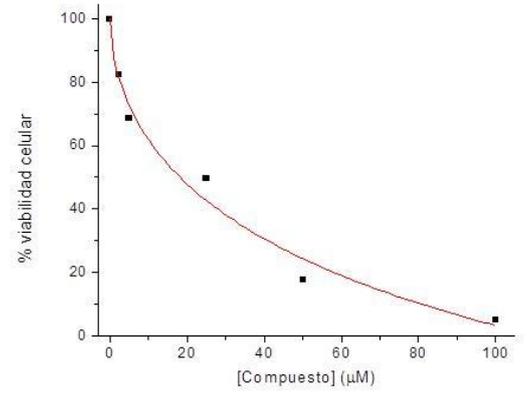


7.6. GRAFICAS IC₅₀ PARA LOS LIGANDOS L1-L4 Y L6 Y COMPLEJOS C1 Y C3-C6

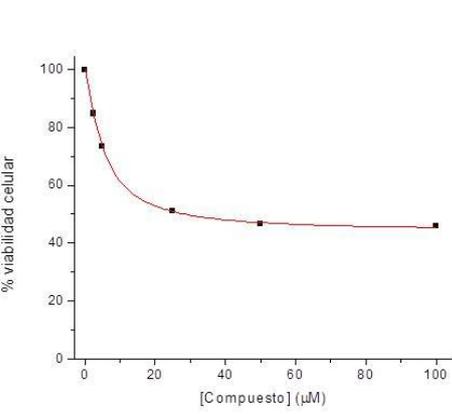
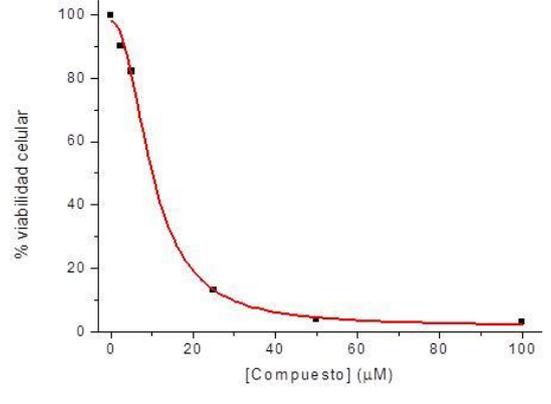
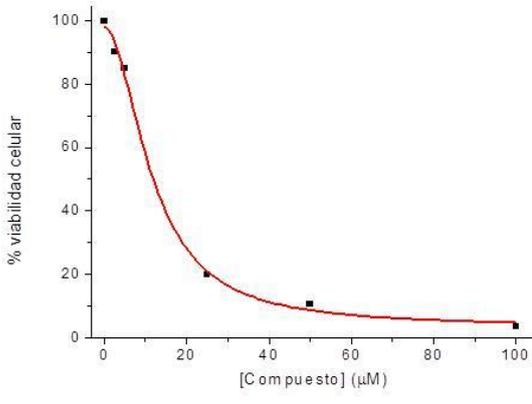




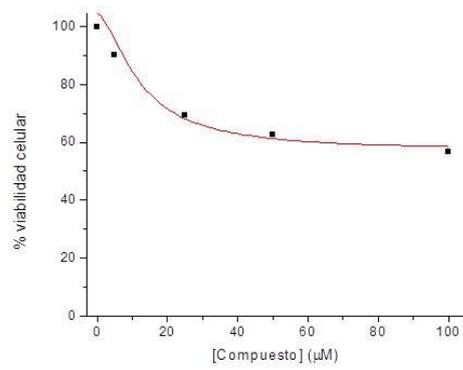
C1



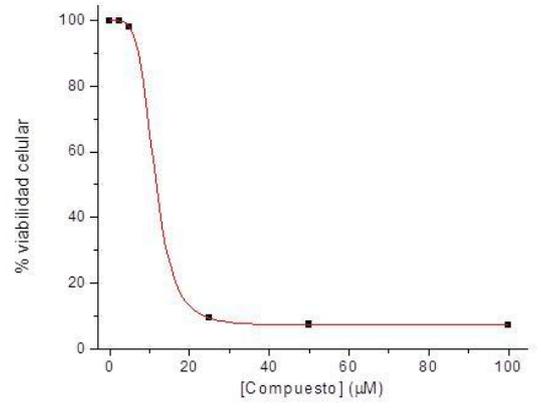
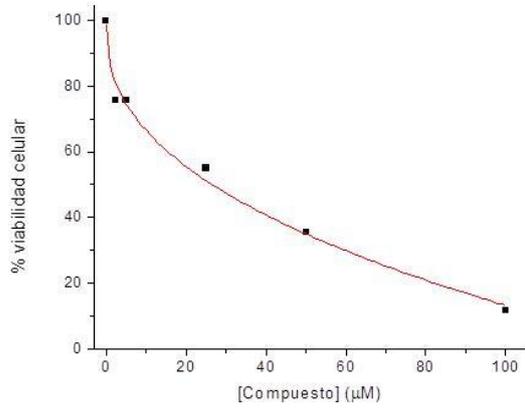
C4



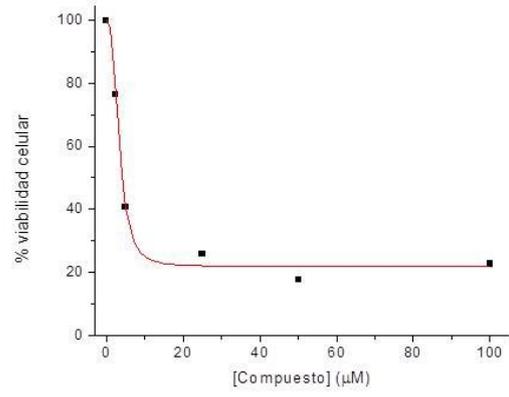
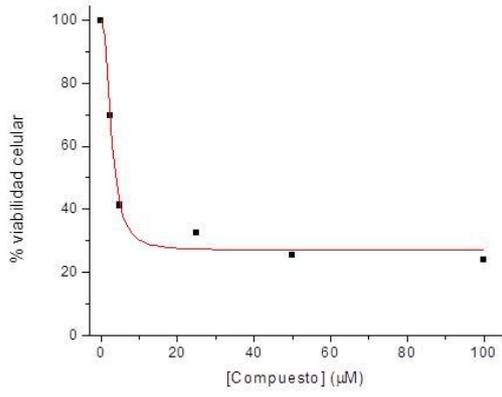
L2



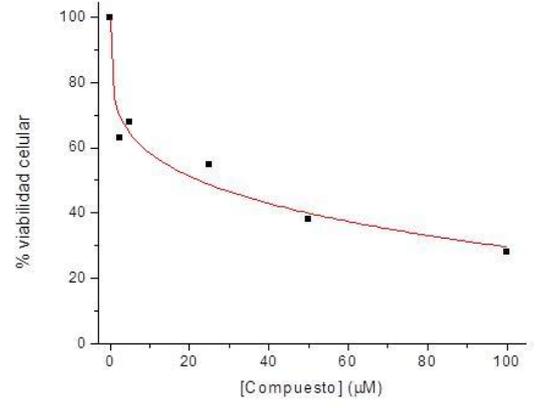
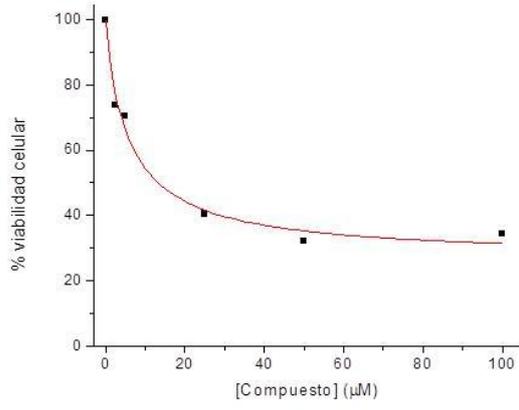
C5



L3



C3



C6

