



Universidad
Zaragoza

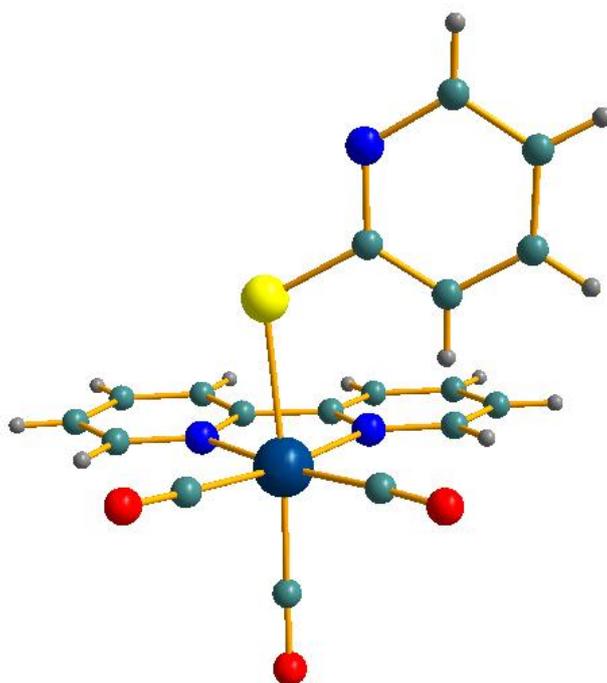


CIENCIAS
ZARAGOZA

TRABAJO
FIN DE
GRADO
2016

Complejos metálicos luminiscentes con aplicaciones en terapia y bioimagen

Héctor Sastre Martín



Director: Vanesa Fernández Moreira

Ponente: María Dolores Villacampa Pérez

Agradecimientos

A todo el grupo de investigación, un equipo maravilloso de personas que me ha concedido la opción, los medios y la ayuda suficiente en todo momento para la consecución de este proyecto y, en particular, a mi directora Vanesa Fernández Moreira, quien en su admirable dedicación a la investigación hizo de este un trabajo más asequible.

A Andrés, mi segundo profesor, con quien compartí grandes momentos de laboratorio.

Por último, me gustaría hacer mención a mi hermano, que sin necesidad de hacer acto de presencia, ha sido, es y será siempre un modelo de comportamiento en el que querer verse reflejado.

Índice

Abreviaturas

Resumen

Abstract

Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Resultados y discusión.....	4
Procedimiento sintético y caracterización.....	4
Difracción de rayos X.....	9
Estudios espectroscópicos.....	11
Actividad biológica y biodistribución.....	14
Parte experimental.....	18
Instrumentación y condiciones.....	18
Materiales y procedimientos.....	18
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	25
ANEXOS.....	26
Espectroscopia de RMN.....	27
Espectroscopia de IR.....	41
Espectrometría de MS.....	44
Difracción de rayos X.....	47
Luminiscencia.....	48

Abreviaturas

bipy	2,2'-bipiridina
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
DCM	Cloruro de metileno, diclorometano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRAQ5	1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}-4,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona
eq.	Equivalente/s
HOTf	Ácido tríflico, ácido trifluorometansulfónico
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> o <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC	<i>Inhibitory Concentration</i>
IR	Espectroscopia infrarroja
LLCT	<i>Ligand to Ligand Charge Transfer</i>
MLCT	<i>Metal to Ligand Charge Transfer</i>
MS	Espectrometría de masas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OTf	Triflato, trifluorometansulfonato
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
py	Piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rt	<i>Room temperature</i>
tht	Tetrahidrotiofeno
tol.	Tolueno
TrxR	Tiorredoxina reductasa
UV	Ultravioleta

Resumen

Con la vista puesta en el desarrollo de especies químicas útiles en medicina diagnóstica y terapéutica se ha tratado de sintetizar una serie de compuestos de coordinación tanto monometálicos como heterobimetálicos del tipo *fac*-[Re(bipy)(CO)₃L]⁺ y *fac*-[Re(bipy)(CO)₃(L-AuPPh₃)]⁺ respectivamente, donde L representa a distintos derivados de mercaptopiridina que actuarán como ligandos conectores entre los fragmentos metálicos de renio y oro. En ellos, el de renio aporta las propiedades luminiscentes, mientras que el de oro proporciona efectos antiproliferativos.

Los compuestos obtenidos se han caracterizado debidamente mediante técnicas de espectroscopia de RMN e IR, espectrometría de masas y, cuando ha sido posible, por difracción de rayos X. Además, se han estudiado sus propiedades fotofísicas con objeto de valorar su viabilidad como agentes de imagen en microscopía de fluorescencia, técnica cuyo carácter no invasivo le augura a sí misma un futuro prometedor, y de esta forma comprender el mecanismo de actuación mediante la visualización a nivel celular.

También se han llevado a cabo estudios de actividad biológica sobre una línea celular tumoral, las células cancerígenas cervicouterinas HeLa, para evaluar el efecto de las variaciones estructurales introducidas en la biodistribución, citotoxicidad, etc., quedando patentes las diferencias entre los derivados de Re(I) y los de Re(I)/Au(I). Así, las especies heterobimetálicas presentan valores significativamente menores de IC₅₀, lo que se traduce directamente en una mayor actividad anticancerígena en esta línea celular, hecho que, en parte, puede ser explicado por su aparente entrada a las mitocondrias, donde desarrollan todo su potencial, y que ha sido observado por microscopía de fluorescencia.

Abstract

With the aim of developing new chemical species with potential adequacy in medical diagnosis and therapy, we have tried to synthesize a series of coordination compounds, either monometallic or heterobimetallic, with the form *fac*-[Re(bipy)(CO)₃L]⁺ and *fac*-[Re(bipy)(CO)₃(L-AuPPh₃)]⁺ respectively, where L stands for distinct mercaptopyridine derivatives that will act as ligands between the metallic fragments of rhenium and gold. In these compounds, while rhenium provides the luminescent properties, the gold fragment contributes with antiproliferative effects.

The synthesized compounds have been thoroughly characterized with NMR and IR spectroscopy, mass spectrometry and, when feasible, with X ray diffraction techniques. Moreover, with the purpose to assess their viability as fluorescent microscopy imaging agents, their photo-physical properties have been studied. In fact, the application in this microscopic technique, which due to its little invasiveness it's predicted to have a promising future, allow us to understand their mechanisms of action tracking these compounds at the cellular level.

Furthermore, we have performed biological activity assays to evaluate the effects of the introduced structural variations on the sub-cellular distribution, cytotoxicity, etc. For this purpose, we have used the well-known cervical cancer cell line HeLa. Our results, indicate the existence of differences between the Re(I) and the Re(I)/Au(I) compounds. Thus, the heterobimetallic species significantly showed reduced IC₅₀ values, which directly means that their anticancer activity is higher in this cell line. This could be partially explained by their mitochondrial localization, assessed by fluorescence microscopy, and where it's predicted that they develop all their cytotoxic potential.

Introducción

Las investigaciones en medicina diagnóstica se centran en la búsqueda de técnicas no invasivas como método de detección, e incluso de tratamiento, de enfermedades. En este sentido, la microscopía de fluorescencia se está convirtiendo gradualmente en una herramienta de uso habitual.

Esta técnica consiste básicamente en la recepción de la luz emitida por ciertos grupos denominados fluoróforos o fluorocromos al volver a su estado fundamental de energía y, dado que permite la visualización a nivel celular (Figura 1), conforma una gran estrategia para la elucidación de la biodistribución y las interacciones que establecen los fármacos de nueva generación con las moléculas del organismo a las que va dirigida su acción farmacológica.

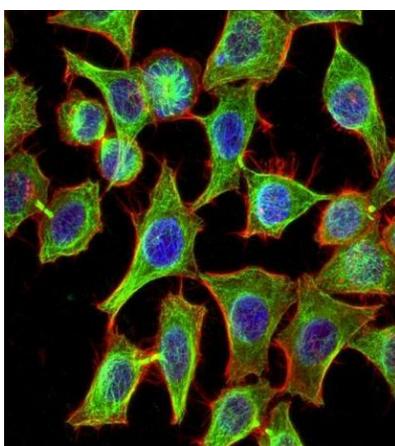


Figura 1.- Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia de células HeLa. Marcaje de la membrana plasmática en rojo, del citoesqueleto en verde y del núcleo en azul.

Sin embargo, el mayor impedimento para la puesta en marcha de esta técnica es la escasa disponibilidad de especies químicas que presentan las propiedades luminiscentes adecuadas y que a su vez actúan como fármacos en las moléculas diana, lo cual, no solo suele implicar la unión a ellas, sino también la realización de una acción eficaz.

Por ello, es conveniente dar comienzo a estos estudios con el diseño previo de las moléculas que, a priori, presentarán unas mejores características de estabilidad, solubilidad, localización, selectividad, toxicidad, curva dosis-respuesta y demás factores que hay que tener en cuenta para evitar en la mayor medida posible los efectos adversos que pueden tener lugar en una matriz tan compleja como la de los organismos vivos.

Por tanto, se parte de un análisis minucioso de las numerosas investigaciones realizadas sobre agentes de imagen celular. Por un lado, se trata de encontrar un segmento que, por sus propiedades fotofísicas, permita la visualización y por otro, de un fragmento que presente buenas características farmacológicas.

En cuanto al primer punto, se han estudiado especialmente colorantes orgánicos, compuestos organometálicos y complejos de coordinación tanto de metales del bloque p como del bloque d y f, siendo estos últimos los que mejores características presentan

debido fundamentalmente a su estabilidad en medio acuoso en presencia de oxígeno y a la fácil modulación de las longitudes de onda de emisión en función del metal de transición y los ligandos empleados.¹

En este sentido los sistemas de los que se tiene un mayor conocimiento son los complejos de metales de transición del bloque d, en particular los de Re(I), Ru(II) e Ir(III) en configuración d^6 , por lo que sus propiedades fotofísicas están más que reputadas y en los que la emisión suele consistir en un proceso de transferencia de carga metal-ligando (MLCT).

Respecto al segundo punto, los complejos de Au, y más concretamente los de Au(I), están siendo investigados debido a sus atractivas propiedades biológicas² hasta tal punto que se ha acuñado el término "crisoterapia" para referirse a la utilización de estos como tratamiento médico. En este campo es digno de mención el Auranofín (Figura 2), un fármaco pionero que viene siendo usado para combatir la artritis reumatoide.³

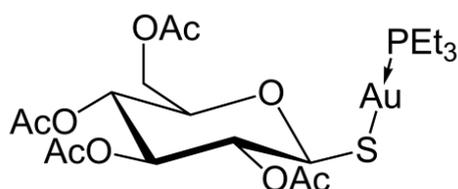


Figura 2.- Estructura del Auranofín

Diversos estudios demuestran que este metal es capaz de inhibir la acción de la enzima mitocondrial tiorredoxina reductasa (TrxR)^{4,5} gracias a que esta contiene un residuo de selenocisteína en su centro activo. Dicha proteína está involucrada en la eliminación del estrés oxidativo en las células y se sobreexpresa en células tumorales, lo que permite explicar la actividad anticancerígena del oro al inducir apoptosis⁶ sobre ellas, y que las mitocondrias sean una diana extraordinaria para los fármacos antitumorales. Además, los complejos de Au muestran una buena estabilidad bajo condiciones fisiológicas.

Objetivos

Este trabajo tiene como finalidad la consecución de una serie de metas en la que cada una depende directamente de la anterior. A continuación, se describen en un orden lógico:

- 1) Sintetizar una librería de complejos monometálicos de Re(I) (d^6) en entornos de coordinación octaédricos del tipo $[\text{Re}(\text{bisimina})(\text{CO})_3\text{L}]^+$, donde la bisimina será la 2,2'-bipiridina (bipy) y el ligando L será un derivado de la piridina (py), con el objetivo de obtener nuevas especies metálicas altamente luminiscentes por comparación con compuestos similares descritos en la bibliografía.⁷
- 2) Acoplar a cada complejo sintetizado previamente un fragmento adicional de Au(I) (d^{10}) idéntico. De esta manera, se trata de obtener una serie análoga de derivados heterobimetálicos de Re(I)/Au(I) para asociar a los primeros compuestos las buenas propiedades biológicas que estos últimos presentan. Para ello, se trabaja con el oro en entornos de coordinación lineales del tipo S-Au-P, así, los átomos dadores de los ligandos de su esfera de coordinación son equivalentes a los del ya mencionado Auranofín pretendiendo emularlo.
- 3) Estudiar la capacidad de ambas series de compuestos de actuar como agentes de contraste en bioimagen mediante métodos espectroscópicos.
- 4) En base a los resultados experimentales anteriores se realizará la elección de los complejos que se experimentarán finalmente como agentes antitumorales mediante el ensayo del MTT, un método estándar para la determinación de la viabilidad/proliferación celular.
- 5) Estudiar sus correspondientes localizaciones en el organismo y con ello, sus posibles dianas biológicas y mecanismos de acción gracias a la microscopía de fluorescencia confocal.
- 6) Comparar los distintos resultados obtenidos procurando discernir cuál puede ser la causa que lo fundamenta.

Así, en este trabajo se trata de aunar las excelentes propiedades que presentan ambos fragmentos por separado con la síntesis de complejos heterobimetálicos de Re(I) y Au(I)⁷ para, posteriormente, valorar en base a datos experimentales si la sinergia que a priori debería producirse tiene lugar o no.

Al finalizar todos estos pasos se pretende alcanzar el ambicioso propósito de haber localizado una gama de complejos heterobimetálicos que, aún con posibles modificaciones y teniendo en cuenta el largo proceso adicional que conllevaría, muestren principios de poder ser empleados en un futuro como fármacos antitumorales de nueva generación en terapia.

Resultados y discusión

Procedimiento sintético y caracterización

Puesto que en este contexto no se ha descrito nada en la literatura científica sobre ellos, se ha optado por los derivados de mercaptopiridina representados en la Figura 3. Todos ellos poseen la capacidad de actuar como ligandos bidentados por lo que, en contra de lo que pueda parecer, su elección no es casual. De esta manera se pretende que el heteroátomo del ciclo, es decir, el N, ceda su par de electrones σ libre al renio como base de Lewis que es, lo que implicaría el cumplimiento de la regla de los 18 electrones por parte del complejo formado inicialmente, proporcionándole una gran estabilidad. Tras esto, sería el átomo de S el único disponible para la unión al oro. En este sentido ambos presentan afinidad por el otro debido a sus sendos caracteres blandos. Así que se han escogido con la finalidad de ejercer de nexo de unión entre ambos centros metálicos.

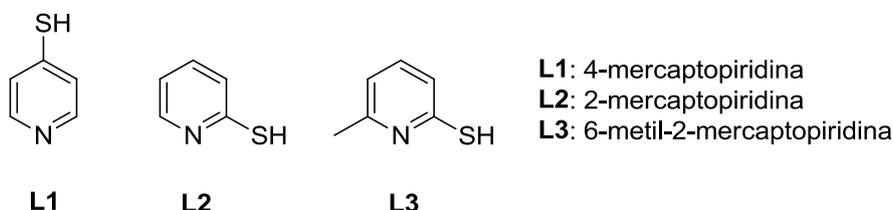


Figura 3.- Estructuras de los ligandos "puente" empleados

Gracias a ellos se pretende sintetizar los complejos heterometálicos de Re(I)/Au(I) mostrados en la Figura 4, donde a su vez, se consigue imitar el entorno del oro respecto al fármaco de eficacia demostrada Auranofín para tratar de emular al máximo sus propiedades bioactivas.

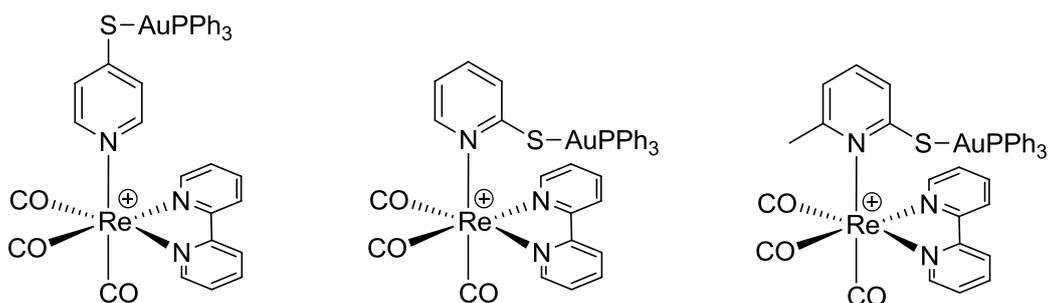


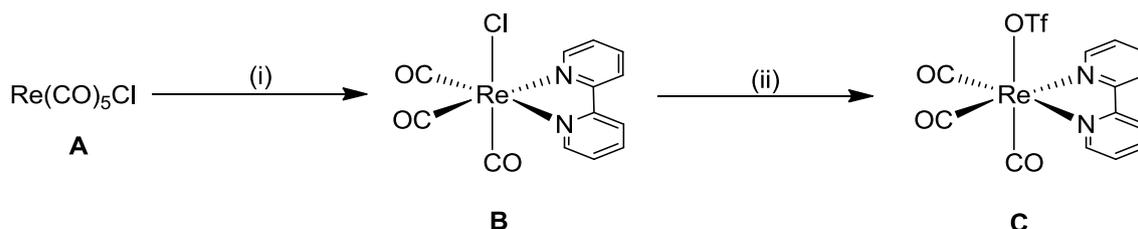
Figura 4.- Compuestos de coordinación objetivo

En primer lugar, se parte del reactivo comercial reniopentacarbonilcloro, **A**, el cual se refluje en tolueno seco en presencia de un ligero exceso de bipy produciéndose una reacción de sustitución de ligandos (Esquema 1).

En ella, los ligandos carbonilo presentan mayor efecto trans que el cloro de forma que son aquellos los que dirigen en qué posición queda finalmente la bipy teniendo en cuenta que, al tratarse de un ligando quelato de cinco miembros, impone la restricción de una estereoquímica cis. Así, a pesar de la gran afinidad del renio por ligandos σ -

dadores/ π -aceptores, son sustituidos dos ligandos carbonilo por el ligando bipy por un mecanismo de reacción disociativo.

Además, la configuración electrónica d^6 del centro metálico, al pertenecer este a la tercera serie de transición, le confiere una configuración de bajo spin ($t_{2g}^6 e_g^0$) que estabiliza el campo originado por los ligandos respecto a la situación de degeneración energética de los orbitales d del renio en solitario. Todo ello conlleva a que estos complejos sean inertes cinéticamente, presentando una velocidad de intercambio de ligandos baja.



- (i) 1.05 eq. bipy, tol. seco, reflujo, Ar, 1 h
(ii) 10.45 eq. HOTf, DCM, rt, Ar, 1 h

Esquema 1.- Síntesis del complejo activado de Re(I)

El producto obtenido, **B**, es el isómero facial de simetría C_{3v} , hecho que se corrobora con los espectros de 1H -RMN (Figura 5) al obtener cuatro señales para los ocho hidrógenos de la bipy, lo que necesariamente implica la presencia de un plano de simetría en la molécula ya que, en caso de tener el isómero meridional, dichos protones no serían equivalentes en ambos ciclos. Además, la formación de este último isómero implicaría la sustitución del ligando carbonilo en trans al cloro, proceso que está muy desfavorecido cinéticamente por las mismas razones que ya se han puntualizado.

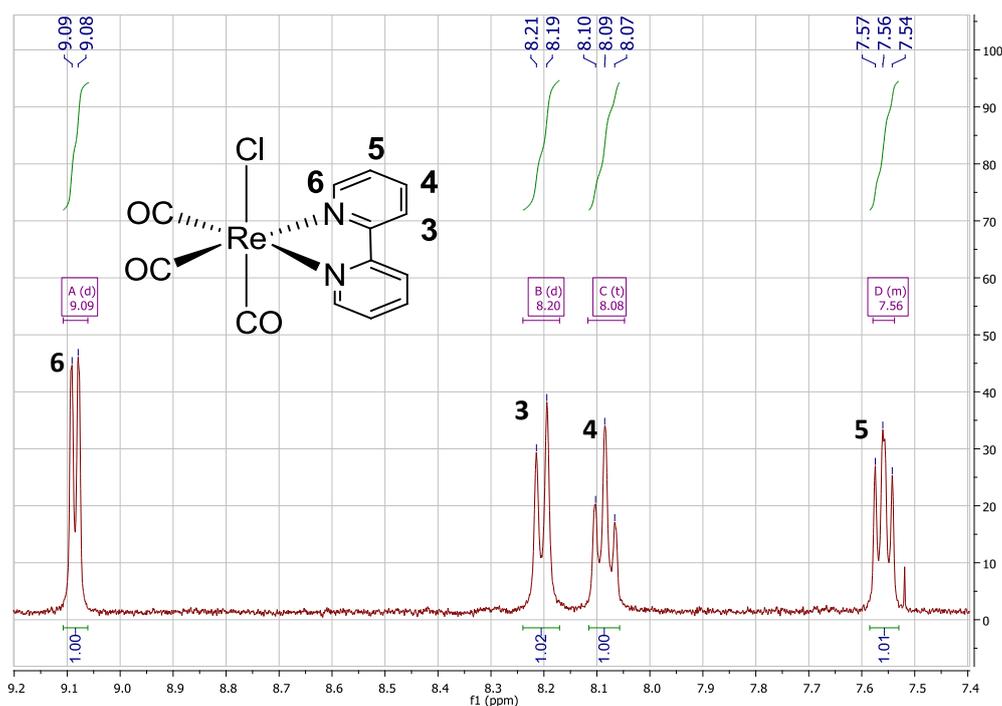
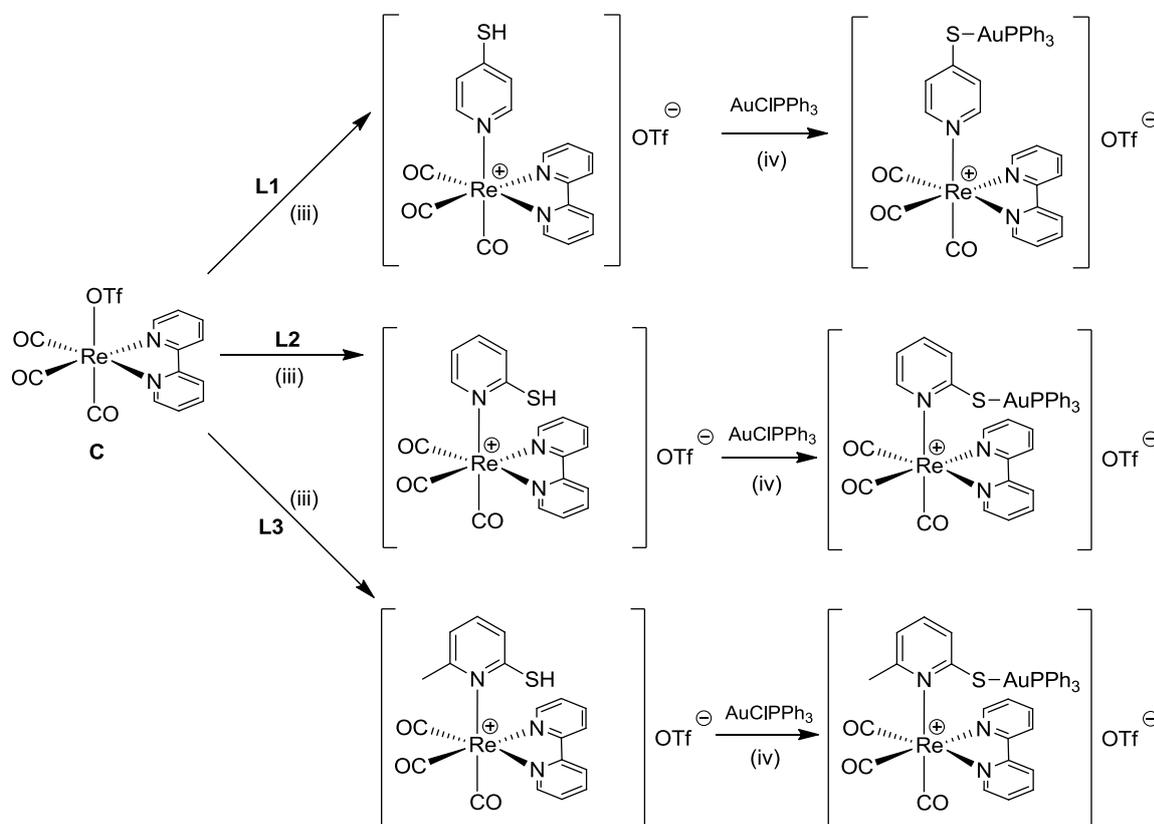


Figura 5.- Espectro H-RMN de *fac*-[Re(bipy)(CO)₃Cl]

Posteriormente, se hace reaccionar el complejo **B** en DCM añadiendo lentamente HOTf con la ayuda de una cánula y permitiendo así la salida del cloro por ser el único ligando monodentado en trans a un carbonilo y la entrada en su lugar del anión triflato (Esquema 1), un excelente grupo saliente debido a su capacidad para deslocalizar su carga negativa y a su gran tamaño, por lo que este producto **C** proporciona un estimable punto de partida para reacciones sucesivas.

En este punto, se plantea qué ruta sintética tomar optándose por aquella en la que se hace reaccionar el complejo de renio(I) activado, **C**, con los ligandos **L1**, **L2** y **L3** respectivamente, para posteriormente llevar a cabo las reacciones de los compuestos resultantes con el oro-clorotrifetilfosfina tal y como se muestra en el Esquema 2.

Así, en el tercer paso de esta ruta sintética, el compuesto **C** se agita en DCM seco y se añade un gran exceso del ligando **L** correspondiente para facilitar la sustitución del ligando activado por los derivados de mercaptopiridina en condiciones suaves.



(iii) 7 eq. L, DCM seco, rt, Ar, 48-96 h

(iv) 1.1 eq. AuClPPh₃, 10 eq. Cs₂CO₃, DCM, rt, 48 h

Esquema 2.- Primera ruta sintética. Compuestos esperados

Aunque las mercaptopiridinas son ligandos bidentados, hecho que es completamente necesario para que sirvan como nexo de unión entre ambos centros metálicos, se postulaba la preferencia del renio por el N frente al S como átomo dador como se deduce por la gran cantidad de compuestos de Re-N encontrados en la bibliografía en comparación con los derivados de tioles. Además, la utilización de DCM como disolvente en ambas reacciones que, al ser poco polar ($\epsilon \approx 8.93$) y aprótico, no favorece

la formación del tiolato, sería suficiente para que sendos fragmentos se unieran mediante un enlace Re-N piridínico. Sin embargo, las posteriores pruebas de elucidación estructural, y más concretamente los análisis de ^1H y ^{31}P -RMN y difracción de rayos X, revelaron que en los complejos formados el renio se enlaza al átomo de azufre en su forma tiolato con los derivados 4 y 2-mercaptopiridina y como tiona en el caso de la 6-metil-2-mercaptopiridina (Figura 6), obteniéndose así dos especies de Re(I) neutras (**1** y **2**) y una catiónica (**3**) respectivamente. De ahí que la cuarta etapa (iv) de esta vía, es decir, la introducción del fragmento $-\text{AuPPh}_3$ para la consecución de la síntesis de especies heterobimetálicas no fuera posible ya que su intento produjo la descoordinación de los derivados de mercaptopiridina del Re, hecho que fue claramente observable por la desaparición de las señales correspondientes a los hidrógenos de la piridina en los espectros de ^1H -RMN.

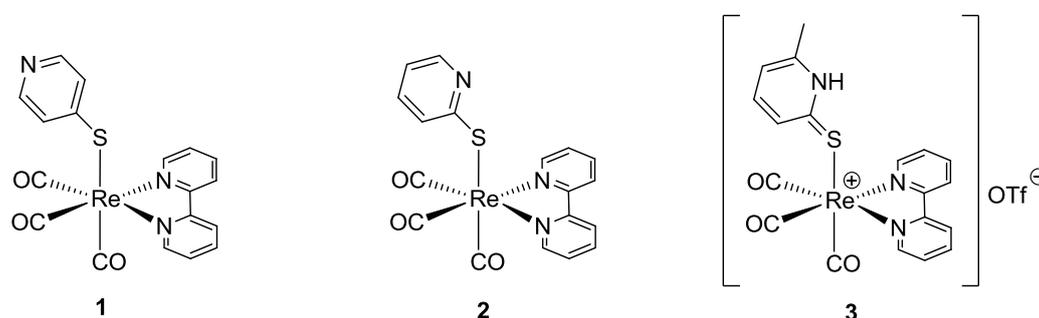
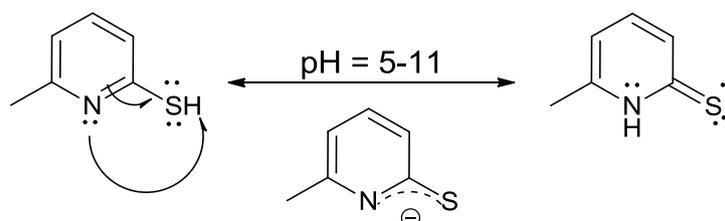


Figura 6.- Compuestos obtenidos

Una posible explicación a la diferencia en la estructura molecular entre los complejos **1** y **2** y el **3** viene dada por el sensible equilibrio químico que se establece entre las dos formas tautoméricas de los derivados de las mercaptopiridinas en disolución (Esquema 3).

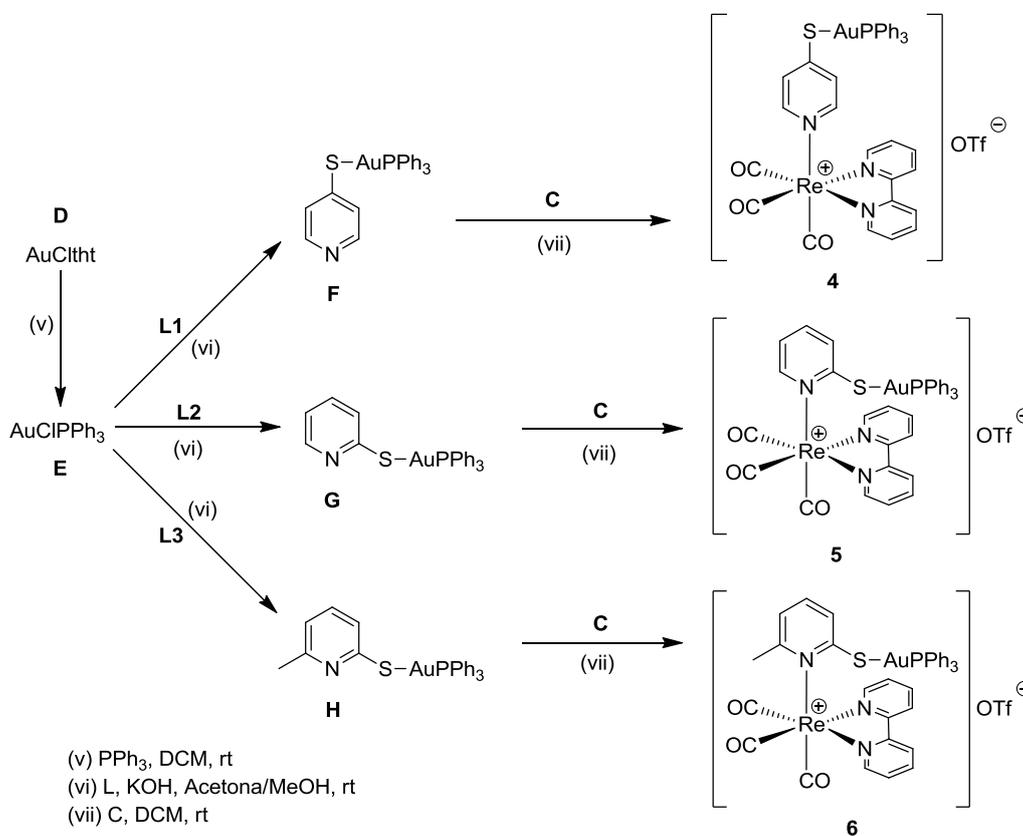


Esquema 3.- Equilibrio tautomérico de la 6-metil-2-mercaptopiridina

Además, en este sentido los espectros de IR, aunque no son por si mismos entidad suficiente, sí son capaces de reforzar esta teoría ya que las frecuencias de resonancia de los ligandos carbonilo se conocen con bastante certeza. De esta manera, los compuestos **1** y **2**, al ser neutros, presentan picos intensos en el rango de $2005 - 1877 \text{ cm}^{-1}$, mientras que el complejo **3**, por ser catiónico, muestra señales de idéntica intensidad pero a frecuencias ligeramente superiores, de 2035 a 1886 cm^{-1} (Tabla 1), debido a que al disponer el renio de menos densidad electrónica, la retrodonación a orbitales π^* del carbono es menor, lo que se traduce en una mayor estabilidad del triple enlace C-O. Este factor está directamente relacionado con la constante de fuerza del enlace y este a su vez con la frecuencia de resonancia del grupo funcional.

Estos resultados adversos condujeron a la idea de que tal vez invirtiendo el orden de la secuencia de reacciones, es decir, sintetizando previamente los derivados de mercaptopiridina-Au(I)-PPh₃, donde el centro metálico se encuentra unido quimioselectivamente al átomo de azufre, para luego llevar a cabo la reacción de coordinación de este fragmento con el complejo de Re(I), por lo que únicamente el nitrógeno puede actuar como dador σ para formar el enlace coordinado. Esta estrategia conforma la segunda ruta sintética (Esquema 4) y parte del oro-clorotetrahidrotiofeno comercial, **D**, el cual se hace reaccionar en DCM en presencia de trifenilfosfina para dar lugar a la sustitución del ligando cíclico obteniéndose el complejo **E**. Posteriormente, se llevan a cabo las correspondientes reacciones de coordinación de cada una de las mercaptopiridinas empleadas logrando sintetizar los compuestos **F**, **G** y **H** respectivamente y consiguiendo formar el antes problemático enlace Au-S. Para ello se utilizó una mezcla de disolventes acetona/MeOH y se añadió una base fuerte como el KOH para la abstracción previa del protón del tiol.

Por último, los compuestos **F**, **G** y **H** se ponen en contacto con el complejo activado de renio **C** en DCM con el fin de formar las especies heterobimetálicas pretendidas **4**, **5** y **6**. Lamentablemente solo se han podido obtener puros los complejos **4** y **6**, para lo cual ha sido necesario la realización de cromatografías en columna sobre alúmina utilizando como eluyente una mezcla DCM:MeOH 70:1 e incrementando progresivamente su polaridad. A pesar de haber llevado a cabo este mismo tratamiento con el compuesto **5**, el bajo rendimiento obtenido y la contaminación visible en sus espectros han imposibilitado el considerarlo para los estudios posteriores.



Esquema 4.- Segunda ruta sintética. Compuestos esperados y obtenidos

Los complejos **F**, **G**, **H**, **4** y **6** se han caracterizado debidamente mediante las técnicas espectroscópicas de ^1H , ^{13}C y ^{31}P -RMN, IR (Tabla 1) y MS. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 7 el espectro de ^1H -RMN del producto final **4**, donde se puede apreciar el patrón típico que exhiben este tipo de complejos. Las señales correspondientes a los protones de la bipy siguen la misma pauta que ya se mostro en la Figura 5, pero en este caso aparecen notablemente más desapantalladas por efecto de la coordinación del ligando derivado de mercaptopiridina al centro metálico.

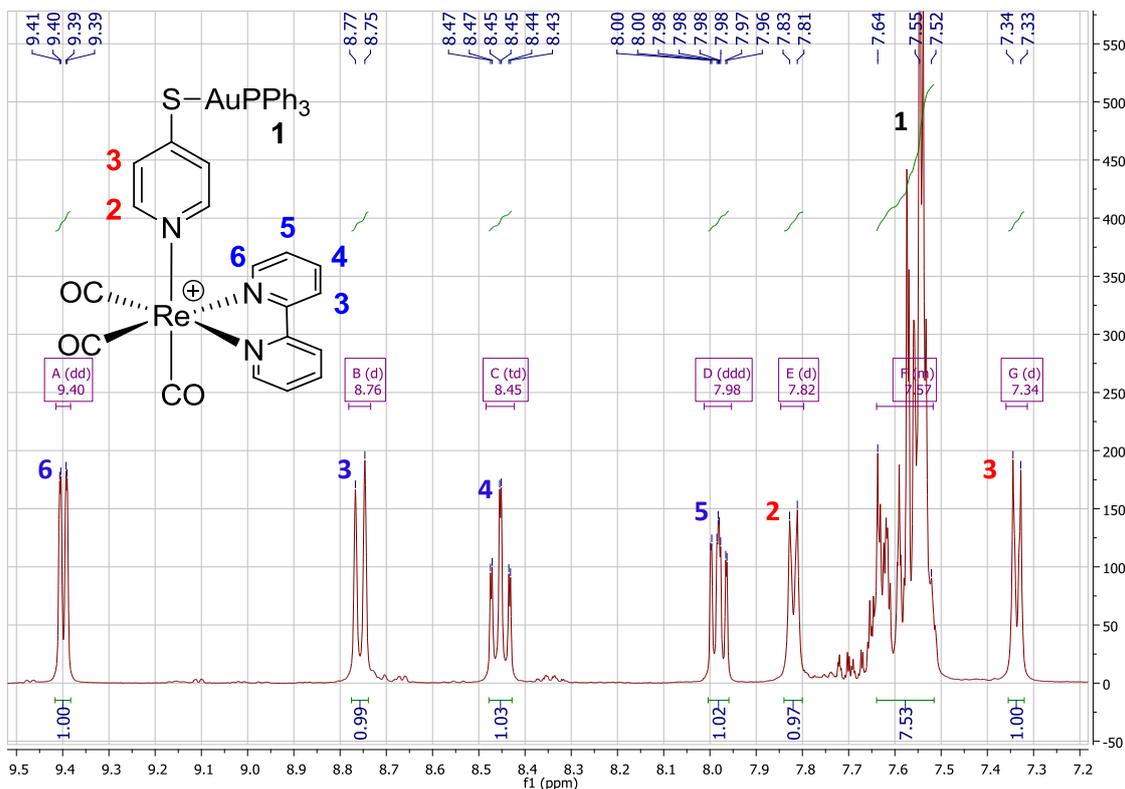


Figura 7.- Espectro ^1H -RMN del complejo **4**

Tabla 1.- Frecuencias de vibración en espectroscopia IR

Compuesto	$\nu(\text{C}\equiv\text{O})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C}-\text{S})$ (cm^{-1})
1	2005 (f), 1901 (f), 1877 (f)	757 (f)
2	2002 (f), 1878 (f)	754 (f)
3	2035 (m), 2023 (m), 1915 (m), 1886 (m)	767 (f) (C=S)
4	2025 (f), 1900 (f)	691 (f)
6	2014 (m), 1876 (f)	691 (f)

Código de intensidades: (f) fuerte, (m) media, (d) débil

Difracción de rayos X

Se han obtenido monocristales de los compuestos **2** y **3** mediante difusión líquido-líquido lenta que cumplen los requisitos de forma, tamaño y pureza para poder ser resueltos por difracción de rayos X (Figuras 8 y 9 respectivamente).

Para ello, se ha utilizado una mezcla de disolventes de DCM, donde dichos complejos son perfectamente solubles, y éter dietílico o hexano, llamado agente de cristalización o precipitante, por ser miscible con el primero pero menos denso y polar. Este último se vierte con sumo cuidado por las paredes del tubo de cristalización de manera que aparentemente se formen dos fases. Con el paso del tiempo y la difusión de moléculas de disolvente entre sí, la menor solubilidad de las especies disueltas va provocando la progresiva cristalización.

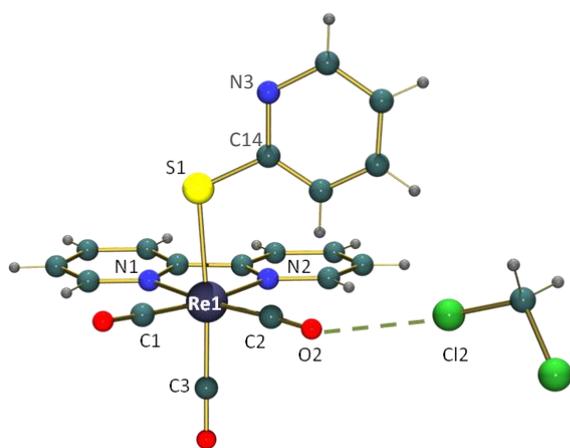


Figura 8.- Estructura molecular del complejo 2. Las distancias (Å) y ángulos de enlace (deg) más relevantes son: Re1-C1 = 1.921(5), Re1-C2 = 1.918(5), Re1-C3 = 1.924(6), Re1-N1 = 2.179(3), Re1-N2 = 2.170(4), Re1-S1 = 2.495(1), S1-C14 = 1.735(5), N3-C14 = 1.392(7), O2--Cl2 = 3.054(4); N1-Re1-N2 = 74.9(1), C3-Re1-S1 = 175.1(2), Re1-S1-C14 = 112.10(2).

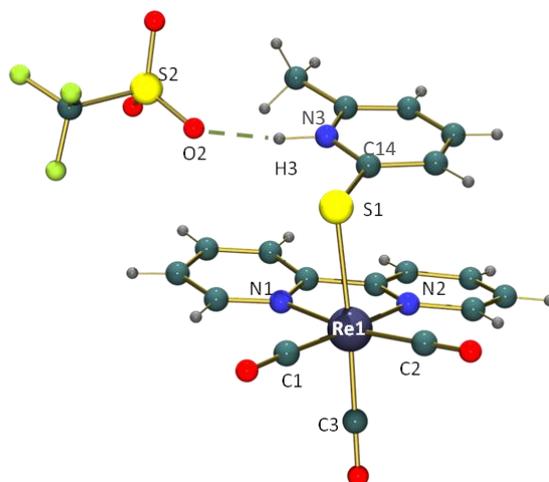


Figura 9.- Estructura molecular del complejo 3. Las distancias (Å) y ángulos de enlace (deg) más relevantes son: Re1-C1 = 1.908(4), Re1-C2 = 1.935(4), Re1-C3 = 1.923(3), Re1-N1 = 2.164(3), Re1-N2 = 2.174(3), Re1-S1 = 2.543(1), S1-C14 = 1.733(4), N3-C14 = 1.358(5), H3--O2 = 1.770(4); N1-Re1-N2 = 74.8(1), C3-Re1-S1 = 176.3(1), Re1-S1-C14 = 104.80(1).

Como era de esperar, en ambos tipos de complejos el átomo de renio se encuentra en un entorno de coordinación octaédrico distorsionado debido básicamente a la limitación geométrica que viene impuesta por el ángulo de mordedura del ligando quelato bipyridina. Los tres carbonilos presentan una disposición facial, por lo que dos de ellos y el ligando bipy se sitúan en el plano ecuatorial quedando, por tanto, el restante carbonilo y el derivado de mercaptopiridina ocupando las posiciones axiales.

Sin embargo, en contra de lo esperado se observa que apenas hay variación en la longitud del enlace S1–C14 del tiol y de la tiona. Este hecho se puede justificar en base a la longitud del enlace Re1–S1, que parece ser el realmente afectado por la presencia de ambas formas tautómeras. Así, en el tiol el azufre dispone de mayor densidad electrónica y por tanto, de mayor capacidad para actuar como σ -dador y formar un enlace coordinado. Por el contrario, en la tiona el S tiene sus electrones menos disponibles para la coordinación, por lo que se aprecia que su enlace al centro metálico es más débil.

Además, en el caso concreto del complejo **3**, al ser catiónico y requerir la presencia de un contraión para mantener la neutralidad eléctrica permite apreciar que la red

crystalina se forma gracias a enlaces de hidrógeno entre átomos de oxígeno del anión triflato y átomos de hidrógeno propiamente dichos presentes en el catión tanto en el ligando bipyridina como en el derivado de mercaptopiridina. No obstante, el que mayor tendencia tiene a formarlos es el unido al N de la piridina ya que este átomo le retira mucha densidad electrónica al enlace debido a su alta electronegatividad.

Estudios espectroscópicos

La posible utilización de los compuestos que se ha logrado sintetizar como medio para la visualización a nivel celular empleando técnicas no invasivas pasa por sus propiedades de absorción y emisión de luz.

Así, los espectros de absorción (Figura 10) se han obtenido utilizando la técnica de espectroscopia de absorción UV-visible. Para ello, se prepararon disoluciones de los complejos **1**, **2**, **3**, **4** y **6** aproximadamente 10^{-5} M en DCM que se midieron a 298 K.

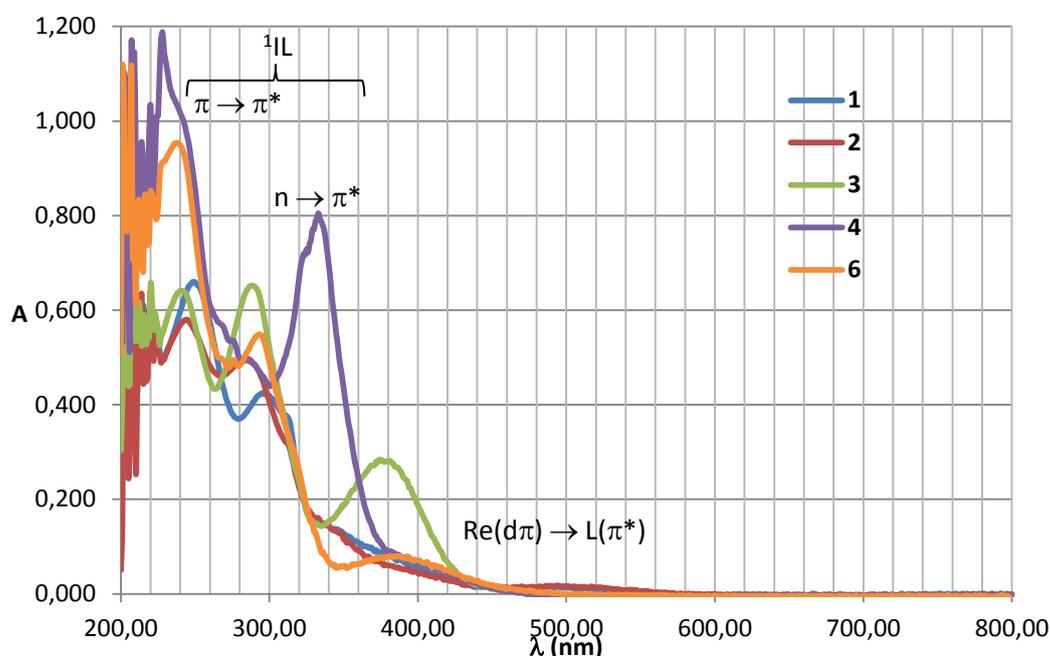


Figura 10.- Espectros de absorción UV-visible

Todos los compuestos ensayados exhiben el patrón típico de los complejos de Re(I) con ligandos bisimina, es decir, transiciones electrónicas centradas en los ligandos (1IL), en estos casos tanto en el ligando 2,2'-bipyridina como en los derivados de mercaptopiridina, y de transferencia de carga metal-ligando (1MLCT).⁸ Las primeras son más energéticas, por lo que aquellas bandas que aparecen a $\lambda < 270$ nm son las debidas a transiciones electrónicas intraligando $\pi \rightarrow \pi^*$ y, del mismo modo, las bandas correspondientes a $\lambda < 340$ nm proceden también de transiciones centradas en los ligandos pero desde orbitales n hasta orbitales π^* . Sin embargo, aquellas bandas que se aprecian a menores energías, a $\lambda > 340$ nm, y que posiblemente se extienden hasta los 500 nm se asignan a transiciones electrónicas de transferencia de carga metal-ligando generalmente atribuidas a $Re(d\pi) \rightarrow L(\pi^*)$. Excepcionalmente, la banda que muestra el

complejo **3** centrada en 374 nm se achaca a una transición 1IL , de ahí que el valor de su coeficiente de extinción molar sea más próximo al de las anteriores transiciones. Consecuentemente la transición 1MLCT no se está observando en este caso, probablemente debido a su alta intensidad.

La razón por la que la segunda banda del complejo **4** se desplaza hasta los 333 nm no está clara, aunque dado que esa misma banda también está más desplazada en el compuesto **6** podría estar relacionada con la presencia del fragmento de $AuPPh_3$.

Los coeficientes de extinción molar, ϵ , calculados para las distintas bandas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.- Bandas de absorción y sus coeficientes de extinción molar

Compuesto	λ_1 (nm) / ϵ_1 ($\times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$)	λ_2 (nm) / ϵ_2 ($\times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$)	λ_3 (nm) / ϵ_3 ($\times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$)	λ_4 (nm) / ϵ_4 ($\times 10^2$ $M^{-1}cm^{-1}$)
1	249/1.73	295/1.11	369/2.56	488/4.18
2	245/1.51	284/1.30	353/2.87	494/4.70
3	241/2.15	288/2.18	374/9.51	
4	242/3.35	333/2.69	410/2.01	
6	238/3.19	293/1.84	386/2.67	

Es digno de mención el incremento de los coeficientes de los complejos bimetálicos frente a los de los monometálicos para la transición intraligando $\pi \rightarrow \pi^*$, no así en las demás, ya que el ligando trifenilfosfina presente en dichos casos puede realizar su aportación a la intensidad de la banda.

Dado que la microscopía de fluorescencia es una técnica de localización en auge, el conocimiento de los procesos luminiscentes que generan estos complejos resulta de vital importancia. En este orden de cosas, como ya se ha comentado, es frecuente la excitación de un electrón de un orbital d (t_{2g}) del Re a otro orbital pi antienlazante del ligando 2,2'-bipiridina con su posterior vuelta al estado fundamental mediante emisión de luz, de ahí que se hable de fotoluminiscencia y más concretamente de fosforescencia puesto que dicha transición tiene lugar entre un estado triplete metaestable y un estado singlete (3MLCT) vulnerando así la segunda regla de selección o de espín. Para ello, previamente ha de darse un entrecruzamiento de sistemas desde el estado singlete excitado hasta el triplete desde el que tiene lugar la emisión, proceso que está favorecido por la naturaleza del propio renio, que al ser un metal pesado de la tercera serie de transición hace que el acoplamiento espín-órbita adquiera importancia.

Se han obtenido los espectros de excitación y emisión de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **6** a temperatura ambiente. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 11 los de uno en concreto.

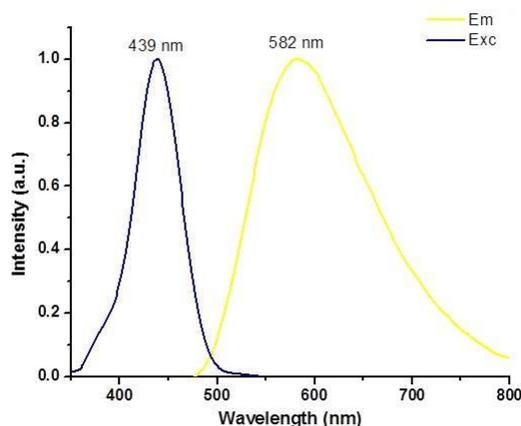


Figura 11.- Espectro de excitación y emisión del compuesto 4

Todos presentan una amplia banda de emisión que puede ser asignada a transiciones $^3\text{MLCT}$, salvo el complejo **3** que muestra dos bandas diferentes, una estrecha e intensa centrada en 545 nm que corresponde a una transición ^1IL y otra ancha y menos intensa y energética a 679 nm debida a dicha transferencia de carga.

A pesar de que todas las emisiones resultaron ser de escasa intensidad, se apreció que las de los compuestos monometálicos eran menos intensas que las de los heterobimetálicos ya que, como aquellos se han unido formando un enlace Re–S, el átomo de azufre presenta mayor capacidad σ -dadora dado que su efecto inductivo atractor es menor que el del nitrógeno. De esta forma, el proceso de transferencia de un electrón del Re a la bipy ($^3\text{MLCT}$) compite con la transferencia de otro desde el derivado de mercaptopiridina a la propia bipy (LLCT).⁹ Se puede decir que el azufre actúa como quencher de la transición $^3\text{MLCT}$.

Además, las bandas de excitación y emisión no se superponen en gran medida siendo así de irrelevante importancia los procesos de autoabsorción o reabsorción, que se traducirían en la desactivación de la emisión, a excepción, de nuevo, del compuesto **3**, en el que se observa una significativa disminución del desplazamiento de Stokes (Tabla 3), lo que implica una menor diferencia energética entre el estado excitado singlete y triplete.

Tabla 3.- Valores máximos de excitación y emisión

Compuesto	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{Stokes} (nm)	τ (ns)
1	432	572	140	120
2	425	675	250	48
3	522	545	23	140
	472	679	207	47
4	439	582	143	
6	478	636	158	

Como ya se ha comentado, la emisión se debe a la transición entre el Re y la bipy, por tanto, y dado que los tres ligandos carbonilos se mantienen constantes, ha de ser el ligando axial derivado de mercaptopiridina el que module las longitudes de onda de emisión. Así, se puede observar como los complejos **1** y **4** presentan valores entorno a 577 nm, mientras que los compuestos **2**, **3** y **6** superan la barrera de los 600 nm.

Actividad biológica y biodistribución

A la vista de los resultados anteriores y para evaluar la capacidad de actuar como fármacos de los compuestos sintetizados se procede a la determinación de la viabilidad celular en su presencia mediante el método del MTT.

Para ello se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo plano 8 filas y 11 columnas de pocillos con células cancerosas HeLa (adenocarcinoma de cérvix, es decir, cáncer de cuello de útero) y 100 μ l de medio de cultivo DMEM y se deja incubando durante 24 horas (Figura 12).

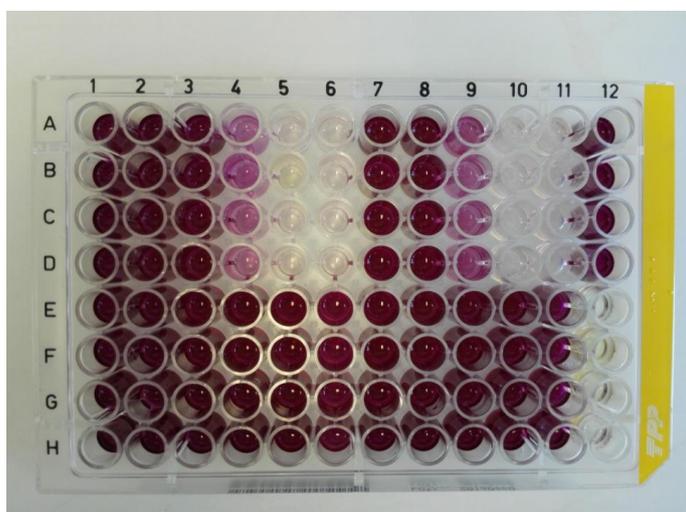


Figura 12.- Placa de 96 pocillos

Por otro lado, se preparan en condiciones estériles 5 disoluciones de distinta concentración (5, 10, 50, 100 y 200 μ M) de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **6** en DMSO a partir de otra de Stock (0.1 M). Después se añaden 100 μ l de medio a cada pocillo de la primera columna, 100 μ l de cada una de las disoluciones de los compuestos de forma que se realizan por cuadruplicado y 200 μ l de medio en una última columna número 12 que hará las veces de blanco. Así, las concentraciones en la placa son, por dilución, la mitad de las preparadas inicialmente. Se mantiene la placa en cultivo durante otras 24 horas.

Posteriormente, se adiciona a todos los pocillos 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT (5 mg/ml en PBS), un compuesto orgánico de color amarillo que en presencia de células vivas es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa transformándose en otro de tonalidad azul de manera que la cantidad de cristales de azul formazán obtenidos será proporcional al

número de células vivas, por ello es tan importante que en la primera etapa de cultivo se depositen aproximadamente el mismo número de células en cada pocillo, unas 15000.

Para su medida se agita la placa y se incuba 2 horas hasta que se forman dichos cristales. Luego se centrifuga 10 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente para que los cristales se adhieran al fondo de los pocillos y no se pierdan al eliminar el medio de cultivo por inversión de la placa sobre un papel. Tras esto se añade 100 µl de DMSO, que disuelve los cristales para así poder medir la absorbancia UV-visible a 550 nm en un lector de placas.

Tal y como era de esperar las especies heterometálicas presentan un valor considerablemente menor de concentración inhibitoria 50, IC_{50} , es decir, de concentración/dosis *in vitro* que provoca una viabilidad celular del 50%, lo que se traduce en una mayor citotoxicidad en comparación con los derivados monometálicos de renio (Figura 13 y Tabla 4). Así, queda patente que la diferencia se debe al fragmento de Au-fosfina cuya actividad ya ha sido probada. Con la intención de disponer más datos frente a los que poder comparar, se han reportado valores de IC_{50} para el Auranofín de $0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$ mediante este mismo método para idéntica línea celular pero con un periodo de incubación de 72 horas.⁴

Parece que el tipo de sustitución del ligando mercaptopiridina afecta de forma muy sutil ya que ambos compuestos "en para" (respecto de los átomos de N y S) son ligeramente más citotóxicos que sus correspondientes derivados "en orto". Además, en base a la tendencia observada en las curvas de los compuestos **1**, **2** y **3** no parece que la carga positiva del complejo **3** favorezca su entrada en la célula, a pesar de tener esta una carga parcial negativa en su cara interna facilitándole su acción.

Aunque este método realmente no permite diferenciar si las células han muerto o tan solo no han proliferado, la actuación del oro sobre la enzima TrxR inhibiéndola está bien definida y su funcionamiento es esencial en la vida celular, por lo que no es probable que sigan intactas tras la pérdida de sus funciones, aun así para cerciorarse completamente sería necesario realizar algún otro análisis.

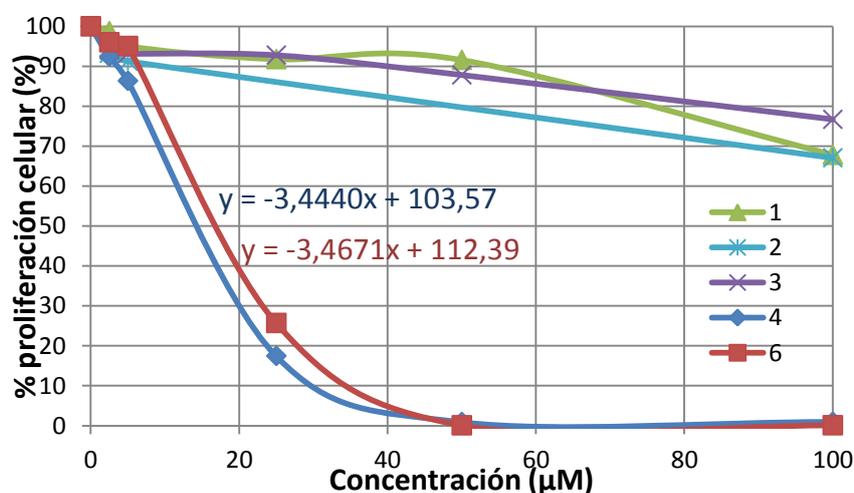


Figura 13.- Evolución de la toxicidad de los compuestos 1, 2, 3, 4 y 6 en función de la concentración

Tabla 4.- Valores de IC₅₀ para los compuestos 1, 2, 3, 4 y 6

Compuesto		IC ₅₀ (μM)	Compuesto		IC ₅₀ (μM)
Monometálicos	1	> 100	Heterometálicos	4	12.50 ± 1.37
	2			6	17.22 ± 1.70
	3				

Estos resultados no son los más adecuados para el uso como fármacos pues ninguno presenta la citotoxicidad suficiente como para que la dosis necesaria en su tratamiento sea baja.

Una vez llegados a este punto, se puede proceder a averiguar qué capacidad presentan estos mismos compuestos como agentes de contraste pues están diseñados para su aplicación en terapia y su correspondiente seguimiento por bioimagen. Así, se pretende examinar simultáneamente la emisión de los compuestos y de ciertos orgánulos celulares tintados con especies fluorescentes para, con ayuda de la microscopía de fluorescencia confocal, determinar si son capaces de permear la membrana celular y, en caso afirmativo, en qué localización se acumulan preferentemente.

Para ello, en una placa de 24 pocillos se fijan sobre un cubre células tumorales HeLa en presencia de 50 μl de cada uno de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **6** respectivamente en concentración inferior a sus correspondientes IC₅₀ (concentración final en placa: 10 μM) para que no se induzca la muerte celular y las células conserven su funcionalidad, de otra forma el estudio no tendría sentido alguno. Se reserva un pocillo sin ningún compuesto para que actúe de control y se incuba durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se desecha el medio de cultivo y se añaden 50 μl de medio nuevo y otros 50 μl de una disolución 10⁻⁴ M en medio de cultivo de DRAQ5, un tinte fluorescente comercial usado como patrón interno que es específico para núcleo al unirse a un par adenina-timina (A-T) en los surcos menores de la doble hélice simulando ser histonas 2B cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 647 y 681 nm respectivamente. Se vuelve a incubar 15 minutos a 37°C, se retira el medio y se realizan dos lavados de las células con PBS (1 ml). Se adicionan 0.5 ml de paraformaldehído en agua al 4 %, se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se realizan tres lavados con PBS (0.5 ml). Por último, se añaden 0.5 ml de PBS a cada pocillo y se pesca el cubre, el cual se lava con agua destilada, se elimina su exceso y se coloca sobre un porta en el que se han añadido previamente 0.5 μl de Fluoromount con DRAQ5 2 mM.

Así se lleva al microscopio empleando dos láseres de excitación, uno a 405 nm para lograr la excitación de los complejos (véase Tabla 2 y Figura 11) y otro a 647 nm para el DRAQ5.

Respecto a los compuestos **1**, **2** y **3**, es decir, las especies monometálicas, no se ha conseguido observar ninguna emisión, ni siquiera tras haber aumentado su concentración en un segundo intento hasta 100 μM dado que su IC₅₀ lo permite. Este hecho puede deberse o a que estos complejos no penetran en la célula, lo que choca un poco con la bibliografía ya que en ella se describe como tanto compuestos catiónicos

como neutros de Re(I) son capaces de permear la membrana celular,¹⁰ o a que sus débiles intensidades de emisión imposibilitan diferenciar su luminiscencia de la procedente de la autofluorescencia de las células.

Sin embargo, los complejos **4** y **6**, que exhiben un comportamiento similar, logran entrar en la célula, aunque no así en el núcleo, distribuyéndose por el citoplasma como se puede observar en la Figura 14. Sería interesante averiguar si se acumulan preferentemente en algún orgánulo en concreto, que a priori, por su diana y por lo ya reportado, debería ser la mitocondria, pero el tinte que se dispone para ellas, el mitotracker, requiere utilizar un laser de excitación a 573 nm que está dentro del rango de longitudes de onda donde emiten los complejos, y el instrumento es incapaz de realizar semejante tarea. En este sentido, la limitación impuesta por la propia instrumentación se puede solventar mediante el uso de un tinte selectivo de mitocondrias recientemente descubierto que, al igual que el ya empleado DRAQ5, necesita un laser de excitación entorno a 644 nm.

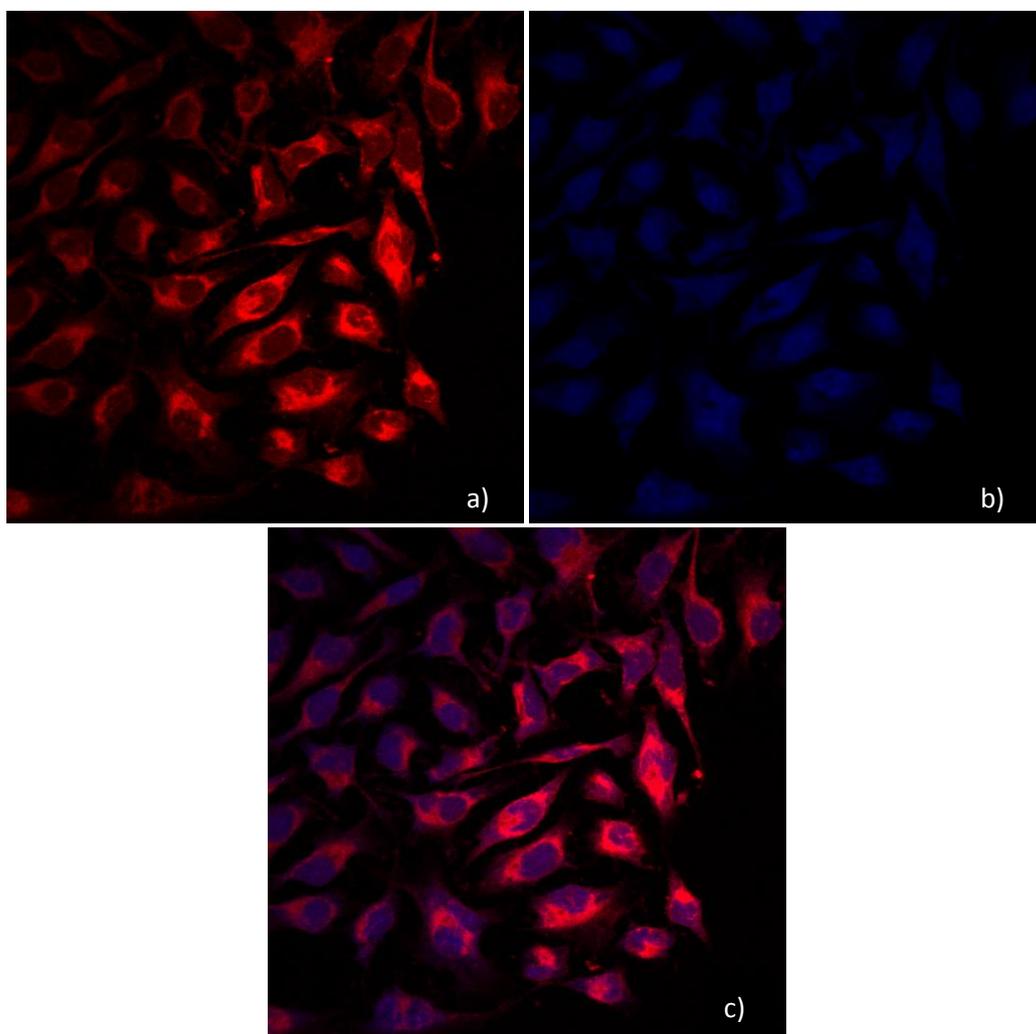


Figura 14.- Imágenes del compuesto **4** incubado con células HeLa durante 4 h a una concentración de 10 μ M.
(a) Imagen obtenida con el laser de excitación de 405 nm. Compuesto **4**.
(b) Imagen obtenida con el laser de excitación de 647 nm. DRAQ5.
(c) Superposición de ambas imágenes.

Parte experimental

Instrumentación y condiciones

Los espectros de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN, incluidos los experimentos 2D-HSQC{H-C}, se han realizado en disolución a 298 K en un espectrómetro Bruker Advance 400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100,6 MHz y ^{31}P , 162 MHz). En ellos, los desplazamientos químicos, δ (ppm), se han asignado utilizando como referencia los picos residuales del correspondiente disolvente deuterado: acetona, cloroformo, diclorometano.

Los espectros de IR se han elaborado en estado sólido a 298 K en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR en el rango 4000 - 250 cm^{-1} . Los análisis de masas se llevaron a cabo en disolución en un espectrómetro de masas Bruker 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 diclorometano a 298 K. 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 647 nm.

Las estructuras monocristalinas y los datos cristalográficos se han obtenido en un difractómetro de rayos X Xcalibur Oxford Diffraction (XRD).

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, y una centrífuga B3.11 de la misma marca. Las placas se visualizaron en un lector de placas Bio-Tek Instrument Inc. EL800 Universal Microplate Reader.

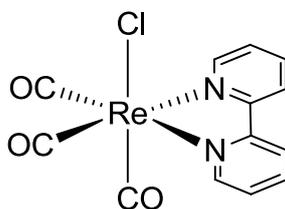
Materiales y procedimientos

Para las estrategias de síntesis propuestas se han tomado como punto de partida los siguientes reactivos comerciales: $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, 4-mercaptopiridina, 2-mercaptopiridina y 2-mercapto-6-metilpiridina. Asimismo se utiliza AuCl_3 , el cual se sintetiza en el laboratorio a partir de oro metálico utilizando procedimientos ya establecidos en el mismo.

fac-[Re(bipy)(CO)₃Cl]

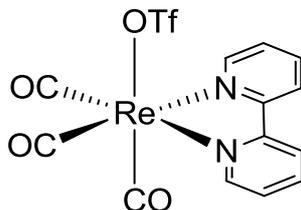
Se prepara una disolución de $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (300 mg, 0.829 mmol) en tolueno seco (3-4 ml). Se añade un ligero exceso de 2,2'-bipiridina (136 mg, 0.871 mmol) bajo atmósfera inerte de argón. La mezcla se calienta a reflujo durante 1 hora, obteniéndose por precipitación un sólido amarillo que se separa por filtración y se lava con tolueno (327

mg, 84 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.09 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H, CH(6) bipy), 8.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH(3) bipy), 8.09 (t, $J = 7.5$, 2H, CH(4) bipy), 7.57-7.54 (m, 2H, CH(5) bipy).



***fac*-[Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)]**

Se prepara una disolución de *fac*-[Re(bipy)(CO)₃Cl] (327 mg, 0.708 mmol) en diclorometano (15 ml). Luego se añade lentamente otra mezcla de ácido trifílico (0.65 ml, 7.40 mmol) en DCM (5 ml) con la ayuda de una cánula mientras se agita vigorosamente. Se mantiene la agitación en el matraz de reacción durante 1 hora. Posteriormente, se adiciona gota a gota éter etílico con la ayuda de un embudo de adición, lo que provoca la precipitación de un sólido amarillo que se filtra y se lava con más éter (315 mg, 77%). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (ddd, $J = 5.5, 1.5, 0.7$ Hz, 2H, CH(6) bipy), 8.23 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH(3) bipy), 8.18 (td, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 2H, CH(4) bipy), 7.65 (ddd, $J = 7.5, 5.5, 1.4$ Hz, 2H, CH(5) bipy).



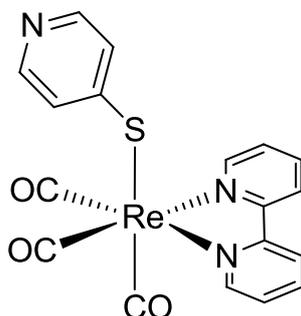
[AuClPPh₃]

Una disolución de AuCltht (500 mg, 1.560 mmol) y PPh₃ en ligero exceso (430 mg, 1.64 mmol) en DCM (20 ml) se agita durante unos 30-45 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se evapora un poco de disolvente (10 ml) y se añade hexano hasta que el correspondiente proceso de precipitación finalice, obteniéndose así un sólido blanco que se separa por filtración (721 mg, 93 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.69-7.59 (m, 15H, 3Ph). $^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 33.96.

Complejo 1

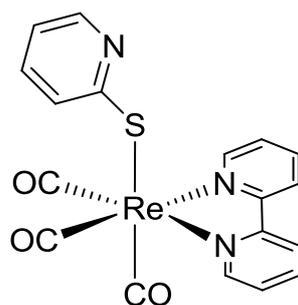
El compuesto [Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)] (78 mg, 0.136 mmol) se agita en DCM seco (10 ml) hasta que se logre una suspensión amarilla homogénea. En ese momento, se añade un exceso de 4-mercaptopiridina (100 mg, 0.900 mmol), sólido cristalino amarillo pálido, junto con otros 10 ml de DCM seco, con lo que se obtiene una disolución turbia amarilla que se mantiene en agitación bajo atmósfera de argón durante 48 horas. Luego, el volumen de la mezcla de reacción se reduce a la mitad a vacío y se añade éter etílico, precipitando así un sólido amarillo pastoso que se filtra y se lava con

más éter. Finalmente el complejo **1** se obtiene como un sólido amarillo tras haber sido purificado por cromatografía en columna de alúmina ($R_f = 0.22$), utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano:metanol (70:1) y aumentando gradualmente la polaridad de esta (43 mg, 59 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 9.05 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH(6, 6') bipy), 8.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH(3, 3') bipy), 8.28 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, CH(4, 4') bipy), 7.85 (dd, $J = 4.7, 1.3$ Hz, 2H, CH(2, 6) py), 7.75 (ddd, $J = 7.9, 5.5, 1.2$ Hz, 2H, CH(5, 5') bipy), 6.89 (dd, 4.7, 1.5 Hz, 2H, CH(3, 5) py). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 158.2 (C(4) py), 156.2 (C(2, 2') bipy), 154.0 (C(6, 6') bipy), 148.5 (C(2, 6) py), 140.4 (C(4, 4') bipy), 129.5 (C(3, 5) py), 128.5 (C(5, 5') bipy), 124.9 (C(3, 3') bipy); 2CO no se observan. IR (sólido, cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$): 2005, 1901, 1877. MS ESI+ m/z : calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{ReS}$ (MH^+) 538.1.



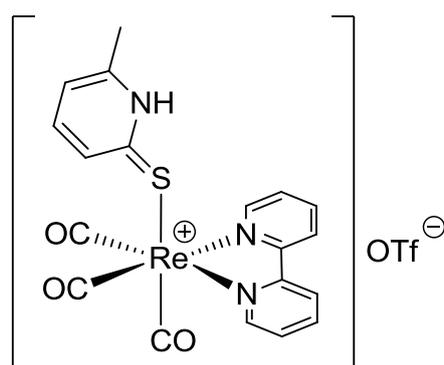
Complejo 2

Una disolución transparente de color amarillo intenso de $[\text{Re}(\text{bipy})(\text{CO})_3(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ (78 mg, 0.136 mmol) y 2-mercaptopiridina, sólido cristalino amarillo pálido, en exceso (100 mg, 0.900 mmol) en DCM seco (20 ml) se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 48 horas. Posteriormente, se evapora a vacío llevando el volumen de mezcla de reacción a la mitad y se añade éter etílico, precipitando así un sólido amarillo fino que se filtra y se lava con más éter. Por último, el complejo **2** se obtiene como un sólido amarillo después de haber sido purificado por cromatografía en columna sobre alúmina ($R_f = 0.26$) utilizando como eluyente una mezcla de DCM:MeOH (70:1) (67 mg, 92 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 9.18 (dt, $J = 5.5, 1.1$ Hz, 2H, CH(6, 6') bipy), 8.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH(3, 3') bipy), 8.22 (td, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 2H, CH(4, 4') bipy), 8.04 (ddd, $J = 4.9, 1.9, 1.0$ Hz, 1H, CH(6) py), 7.68 (ddd, $J = 7.9, 5.5, 1.0$ Hz, 2H, CH(5, 5') bipy), 7.02 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.9$ Hz, 1H, CH(4) py), 6.93 (dt, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 1H, CH(3) py), 6.62 (ddd, $J = 7.2, 4.9, 1.0$ Hz, 1H, CH(5) py). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 169.8 (C(2) py), 156.6 (C(2, 2') bipy), 154.7 (C(6, 6') bipy), 148.5 (C(6) py), 140.0 (C(4, 4') bipy), 134.4 (C(4) py), 127.6 (C(5, 5') bipy), 126.8 (C(3) py), 124.5 (C(3, 3') bipy), 117.0 (C(5) py); 2CO no se observan. IR (sólido, cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$): 2002, 1878. MS ESI+ m/z : calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{ReS}$ (MH^+) 538.1.



Complejo 3

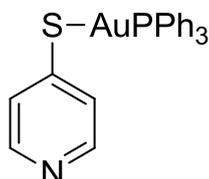
[Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)] (100 mg, 0.174 mmol) y un exceso de 6-metil-2-mercaptopiridina (152 mg, 1.22 mmol), sólido cristalino amarillo pálido, se disuelven en DCM seco (25 ml) formando una disolución transparente de color amarillo. Esta se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 96 horas. Luego, se elimina disolvente a vacío hasta tener 1/3 del volumen de mezcla inicial, con lo que precipita un sólido amarillo anaranjado. Se decanta el líquido y se lava con éter etílico. Por último, para purificar el complejo **3** se recristaliza en DCM y se evapora a sequedad, apareciendo así unos cristales de morfología filiforme de color naranja (85 mg, 70 %). ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 12.18 (s, 1H, NH py), 9.15 (ddd, J = 5.5, 1.6, 1.0 Hz, 2H, CH(6, 6') bipy), 8.76 (dt, J = 8.2, 1.0 Hz, 2H, CH(3, 3') bipy), 8.41 (ddd, J = 8.2, 7.7, 1.6 Hz, 2H, CH(4, 4') bipy), 7.94 (t, J = 7.9 Hz, 1H, CH(4) py), 7.86 (ddd, J = 7.6, 5.5, 1.0 Hz, 2H, CH(5, 5') bipy), 7.49 (d, J = 7.9 Hz, 1H, CH(5) py), 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H, CH(3) py), 2.55 (s, 3H, CH₃ py). ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂CO) δ 197.9 (CO_{ecuatorial}), 190.3 (CO_{apical}), 167.4 (C(2) py), 156.4 (C(2, 2') bipy), 154.4 (C(6, 6') bipy), 153.9 (C(6) py), 144.2 (C(4) py), 141.4 (C(4, 4') bipy), 130.4 (C(5) py), 129.1 (C(5, 5') bipy), 125.5 (C(3, 3') bipy), 121.1 (C(3) py), 19.3 (C(metilo) py). IR (sólido, cm⁻¹, ν(CO)): 2035, 2023, 1915, 1886. MS ESI+ m/z: calculada para C₁₉H₁₅N₃O₃ReS⁺ (M⁺) 552.1.



[Au(PPh₃)(4-Spy)]

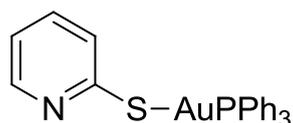
El complejo [Au(PPh₃)(4-Spy)] se sintetizó de acuerdo a los procedimientos ya descritos en la literatura científica.¹¹ Una fracción de [AuClPPh₃] (200 mg, 0.404 mmol) en acetona (30 ml) se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añade una disolución amarilla de 4-mercaptopiridina (45 mg, 0.405 mmol) y KOH (35 mg,

0.624 mmol) en MeOH (20 ml). La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se evapora todo el disolvente, se redissuelve el sólido que así precipita en DCM y se filtra. Se vuelve a llevar la mezcla a sequedad para obtener un producto más puro (221 mg, 96 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 8.08 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH(2, 6) py), 7.67-7.61 (m, 15H, 3Ph), 7.42 (dd, $J = 5.1, 1.6$ Hz, 2H, CH(3, 5) py). $^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 43.15 ($\text{Au}(\text{PPh}_3)_2$), 38.58.



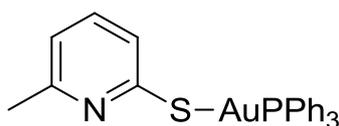
[Au(PPh₃)(2-Spy)]

El compuesto [Au(PPh₃)(2-Spy)] se sintetizó de acuerdo a los procedimientos ya descritos en la literatura científica.¹² Se prepara una disolución de color amarillo de [AuClPPh₃] (201 mg, 0.406 mmol), 2-mercaptopyridina (47 mg, 0.423 mmol) y KOH (35 mg, 0.624 mmol) en una mezcla de acetona-metanol 5:4 (45 ml). Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego, la mezcla de reacción se lleva a sequedad, apareciendo un precipitado blanco (producto) y otro amarillo (reactivo en exceso). Para separar los compuestos de partida y el producto deseado se redissuelve la mezcla de sólidos en el mínimo DCM posible y se filtra la parte insoluble. Después, se añade éter etílico hasta que precipite la totalidad del sólido cristalino blanco (198 mg, 86 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 8.24 (ddd, $J = 4.9, 1.7, 1.1$ Hz, 1H, CH(6) py), 7.76-7.59 (m, 15H, 3Ph), 7.37-7.30 (m, 2H, CH(4, 5) py), 6.87 (ddd, $J = 8.4, 4.9, 1.8$ Hz, 1H, CH(3) py). $^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 38.70.



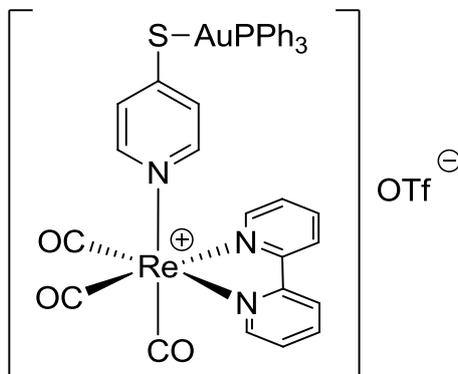
[Au(PPh₃)(6-Me-2-Spy)]

Sobre una disolución incolora de [AuClPPh₃] (200 mg, 0.404 mmol) en acetona (25 ml) se añade otra amarilla de 6-metil-2-mercaptopyridina (52 mg, 0.415 mmol) y KOH (35 mg, 0.624 mmol) en metanol (20 ml) y se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Más tarde, se evapora el disolvente, lo que propicia la precipitación de un sólido que se redissuelve en DCM y se filtra para eliminar las posibles impurezas. A continuación se adiciona hexano a las aguas madres (15 ml), dando lugar a la precipitación de un sólido blanco. Finalmente este sólido se separa por decantación, se lava con hexano y se seca a vacío (127 mg, 54 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.75-7.58 (m, 15H, 3Ph), 7.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH(4) py), 7.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH(5) py), 6.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH(3) py), 2.34 (s, 3H, CH₃ py). $^{31}\text{P-RMN}$ (162 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 38.63.



Complejo 4

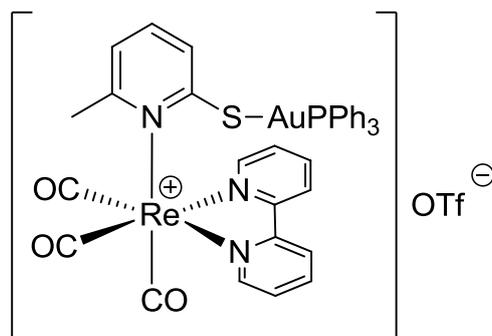
[Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)] (150 mg, 0.261 mmol) y un ligero exceso de [Au(PPh₃)(4-Spy)] (191 mg, 0.335 mmol) se agitan en DCM (50 ml) a temperatura ambiente durante 8 días. Posteriormente, la mezcla de reacción se lleva a sequedad y se realiza una cromatografía en columna de alúmina (R_f = 0.04) utilizando como eluyente DCM:MeOH (70:1) e incrementando la polaridad progresivamente. Finalmente el complejo **4** se obtiene como un sólido amarillo (49.3 mg, 17 %). ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 9.40 (dd, J = 5.5, 1.2 Hz, 2H, CH(6, 6') bipy), 8.76 (d, J = 7.9 Hz, 2H, CH(3, 3') bipy), 8.45 (td, J = 7.9, 1.2 Hz, 2H, CH(4, 4') bipy), 7.98 (ddd, J = 7.9, 5.5, 1.0 Hz, 2H CH(5, 5') bipy), 7.82 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH(2, 6) py), 7.64-7.52 (m, 15H, 3Ph), 7.34 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH(3, 5) py). ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂CO) δ 196.8 (CO_{ecuatorial}), 192.8 (CO_{apical}), 156.7 (C(2, 2') bipy), 154.8 (C(6, 6') bipy), 149.7 (C(2, 6) py), 142.2 (C(4, 4') bipy), 135.0 (d, ²J = 13.8 Hz, C_{orto} 3Ph), 133.1 (d, ⁴J = 2.5 Hz, C_{para} 3Ph), 130.5 (d, ³J = 11.6 Hz, C_{meta} 3Ph), 129.9 (C(5, 5') bipy), 129.7 (d, ¹J = 58.8 Hz, C_{ipso} 3Ph), 129.7 (C(3, 5) py), 125.9 (C(3, 3') bipy). ³¹P-RMN (162 MHz, (CD₃)₂CO) δ 37.67, 25.75 (O=PPh₃). IR (sólido, cm⁻¹, ν(CO)): 2025, 1900. MS ESI+ m/z: calculada para C₃₆H₂₇AuN₃O₃PreS⁺ (M⁺) 996.2.



Complejo 6

Se disuelve [Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)] (107 mg, 0.186 mmol) y [Au(PPh₃)(6-Me-2-Spy)] (120 mg, 0.206 mmol) en DCM (30-35 ml) y se sigue agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 20 días. Después se elimina el disolvente a vacío y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre alúmina (R_f = 0.32) utilizando una mezcla DCM:MeOH (70:1). Finalmente se obtiene el producto deseado como un sólido naranja rojizo (36 mg, 17 %). ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 9.11 (ddd, J = 5.5, 1.6, 1.0 Hz, 2H, CH(6, 6') bipy), 8.69 (dt, J = 8.2, 1.0 Hz, 2H, CH(3, 3') bipy), 8.33 (ddd, J = 8.2, 7.7, 1.6 Hz, 2H, CH(4, 4') bipy), 7.79 (ddd, J = 7.7, 5.5, 1.0 Hz, 2H, CH(5, 5') bipy), 7.74-7.58 (m, 15H, 3Ph), 7.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH(4) py), 7.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH(5) py), 6.74 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH(3) py), 2.34 (s, 3H, CH₃

py). ^{13}C -RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 168.6 (C(2) py), 157.2 (C(6) py), 156.7 (C(2, 2') bipy), 153.9 (C(6, 6') bipy), 140.8 (C(4, 4') bipy), 136.5 (C(4) py), 135.1 (d, $^2\text{J} = 14.0$ Hz, C_{orto} 3Ph), 132.8 (d, $^4\text{J} = 2.5$ Hz, C_{para} 3Ph), 130.9 (d, $^1\text{J} = 56.8$ Hz, C_{ipso} 3Ph), 130.3 (d, $^3\text{J} = 11.4$ Hz, C_{meta} 3Ph), 128.4 (C(5, 5') bipy), 124.9 (C(3, 3') bipy), 123.4 (C(5) py), 117.7 (C(3) py), 24.6 (C(metilo) py); 2CO no se observan. ^{31}P -RMN (162 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 38.12, 25.61 (O=PPh₃). IR (sólido, cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$): 2014, 1876. MS ESI+ m/z : calculada para $\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{AuN}_3\text{O}_3\text{PReS}^+$ (M^+) 1010.2.



Conclusiones

En la búsqueda de nuevos complejos heterobimetálicos de Re(I)/Au(I) capaces de actuar como fármacos antitumorales cuyo seguimiento se pueda realizar por métodos no invasivos se ha logrado sintetizar dos baterías de compuestos. En la primera de ellas, realmente monometálica, la ruta sintética elegida da lugar a la unión del centro metálico de renio al ligando derivado de la mercaptopiridina a través de un enlace Re-S, ya sea en la forma tiolato o como tiona, imposibilitando la entrada del fragmento de Au al estar así bloqueado su átomo dador preferente y el que nos permite emular el entorno de coordinación deseado. En estos casos se ha demostrado que la síntesis conlleva a la descoordinación de dicho ligando del renio en favor de la del oro. Sin embargo, en la segunda, la inversión en el orden de reacción permite obtener previamente el fragmento de Au ya unido al azufre de la mercaptopiridina para posteriormente unirlo al de Re por el nitrógeno, el único disponible.

Los posteriores estudios orientados a conocer su viabilidad revelaron que sus propiedades luminiscentes son más pobres de lo esperado en complejos de tipo $[\text{Re}(\text{bisimina})(\text{CO})_3\text{L}]^+$ evitando incluso que los compuestos monometálicos **1**, **2** y **3** se puedan utilizar como agentes de contraste en imagen celular. No obstante, dichas especies al no tener el fragmento de Au-PPh₃ enlazado presentan mayores valores de IC₅₀ no siendo viables a su vez en terapia. Por el contrario, los estudios de citotoxicidad realizados con células HeLa han resultado ser más relevantes para los compuestos heterometálicos **4** y **6**, cuyas estimaciones se acercan en mayor nivel a lo esperado, puesto que se han podido visualizar a nivel celular y su patrón de localización citoplasmático es una buena referencia para seguir adelante con ellos.

Parte de los resultados obtenidos, aquellos que se refieren a los complejos monometálicos, han sido enviados a la revista científica *Inorganica Chimica Acta* y están pendientes de aceptación a fecha de presentación de este trabajo.¹³

Bibliografía

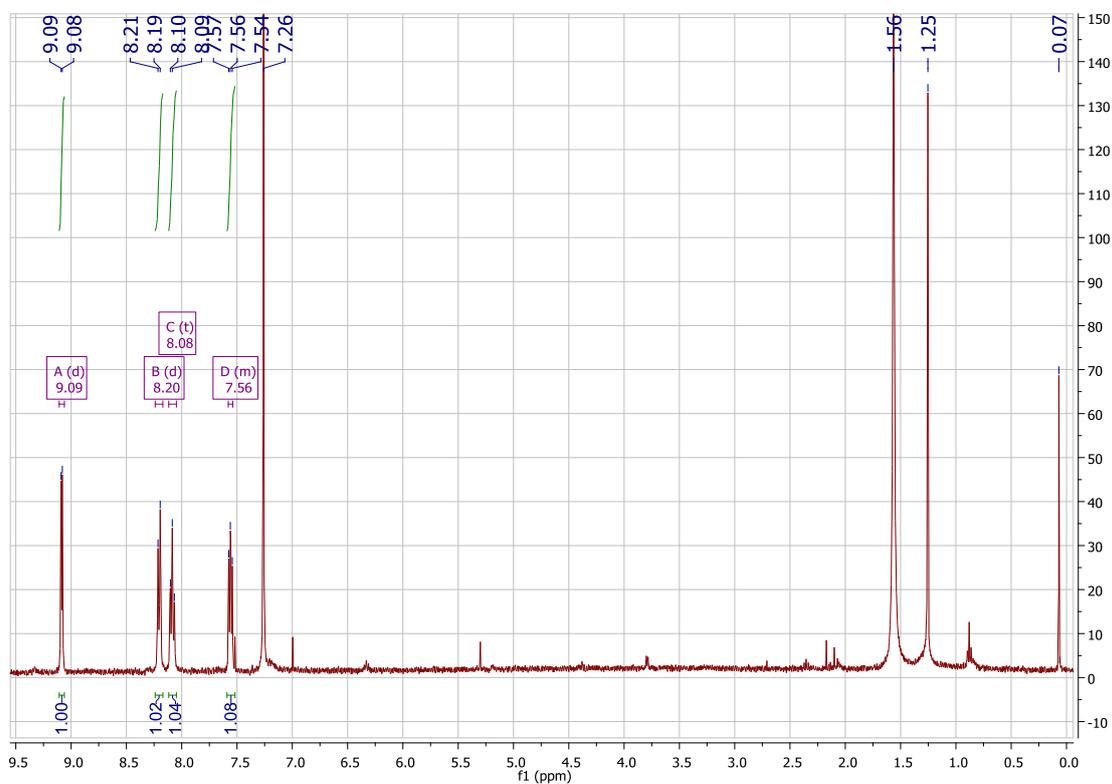
1. M. P. Coogan, V. Fernández-Moreira, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 384-399.
2. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Med. Chem. Rev.*, 2010, 30 (3), 550-580.
3. E. R. T. Tiekink, *Inflammopharmacology*, 2008, 16 (3), 138-142.
4. V. Gandin, A. P. Fernandes, M. P. Rigobello, B. Dani, F. Sorrentino, F. Tisato, M. Björnstedt, A. Bindoli, A. Sturaro, R. Rella, C. Marzano et al., *Biochem. Pharmacol.*, 2010, 79 (2), 90-101.
5. L. Ortego, F. Cardoso, S. Martins, M. F. Fillat, A. Laguna, M. Meireles, M. Dolores Villacampa, M. Concepción Gimeno, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 130, 32-37.
6. E. Varghese, D. Büsselberg, *Cancers (Basel)*, 2014, 6 (4), 2243-2258.
7. V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.*, 2014, 5, 4434-4446.
8. Y. Kim, F. W. M. Vanhelmont, C. L. Stern, J. T. Hupp, *Inorg. Chim. Acta*, 2001, 318, 53-60.
9. Y. Wang, B. T. Hauser, M. M. Rooney, R. D. Burton, K. S. Schanze, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115 (13), 5675-5683.
10. A. J. Amoroso, R. J. Arthur, M. P. Coogan, J. B. Court, V. Fernández-Moreira, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. Millet, S. J. A. Pope, *New J. Chem.*, 2008, 32, 1097-1102.
11. K. Nunokawa, S. Onaka, T. Tatematsu, M. Ito, J. Sakai, *Inorg. Chim. Acta*, 2001, 322, 56-64.
12. P. D. Cookson, E. R. T. Tiekink, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1993, 259-263.
13. V. Fernández-Moreira, H. Sastre-Martín, *Photophysical and bioactivity behavior of fac-Rhenium(I) derivatives containing ditopic sulfurpyridine ligands*. Enviado a *Inorg. Chim. Acta*, Manuscrito ID: ICA-D-16-00660.

Anexos

Espectroscopia de RMN

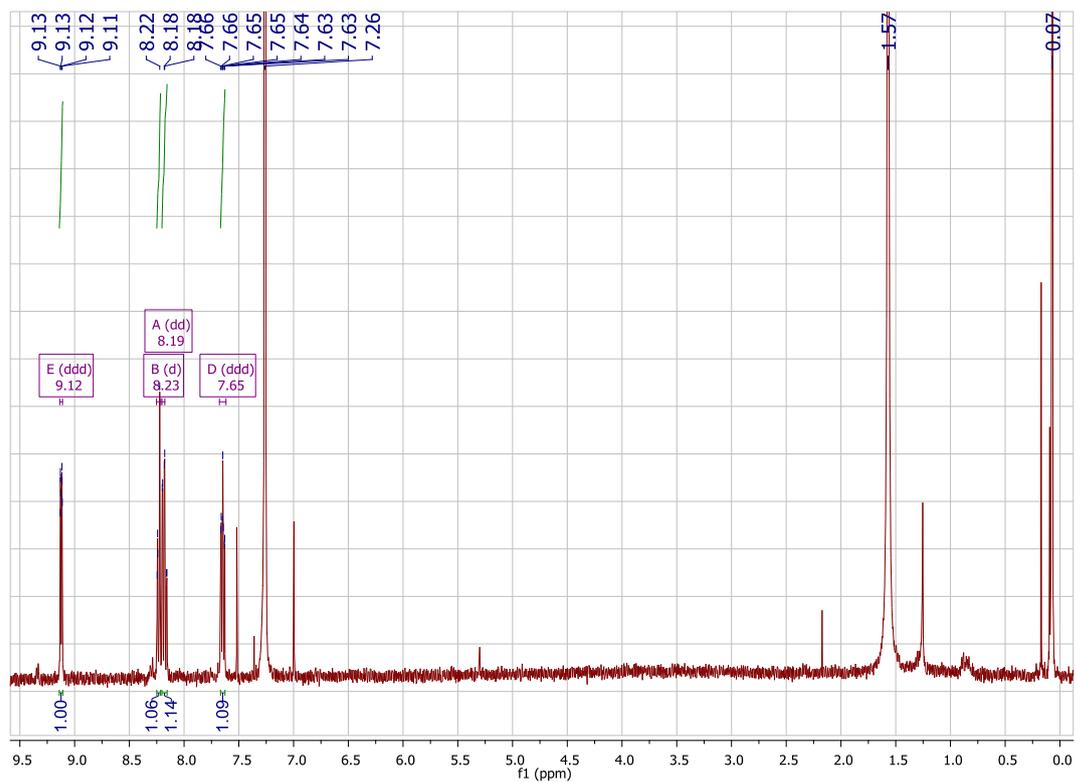
- *fac*-[Re(bipy)(CO)₃Cl]:

¹H-RMN



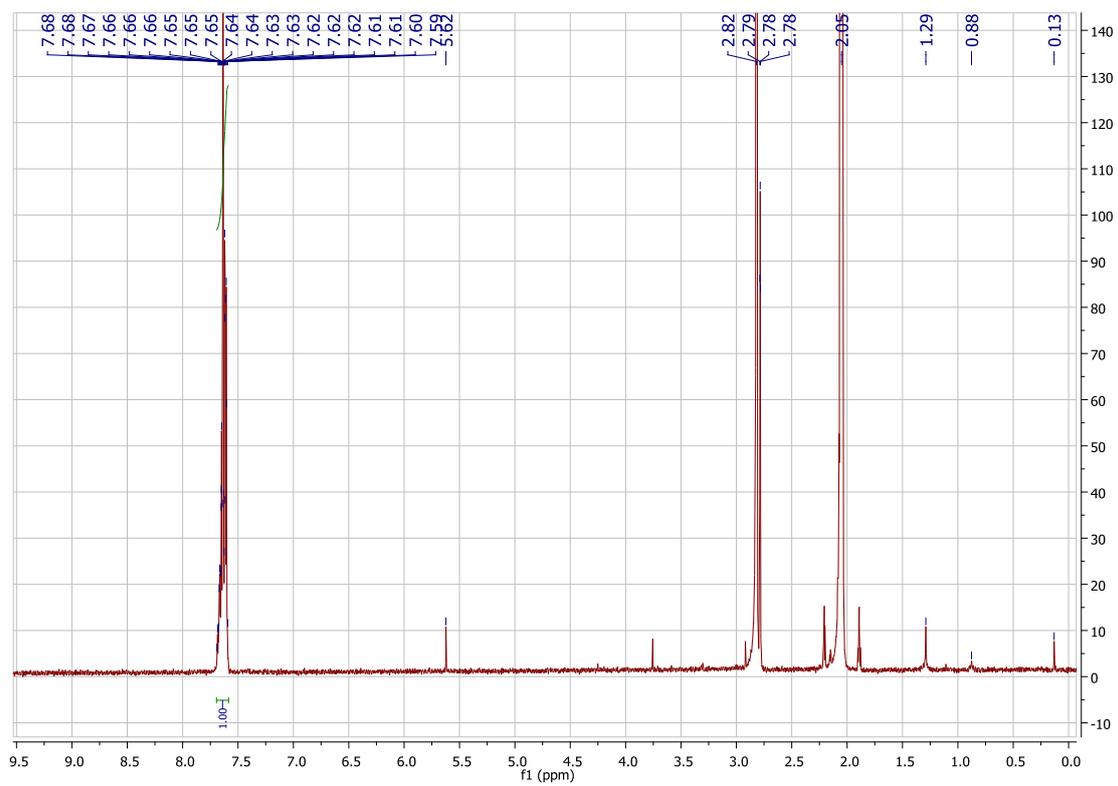
- *fac*-[Re(bipy)(CO)₃(CF₃SO₃)]:

¹H-RMN

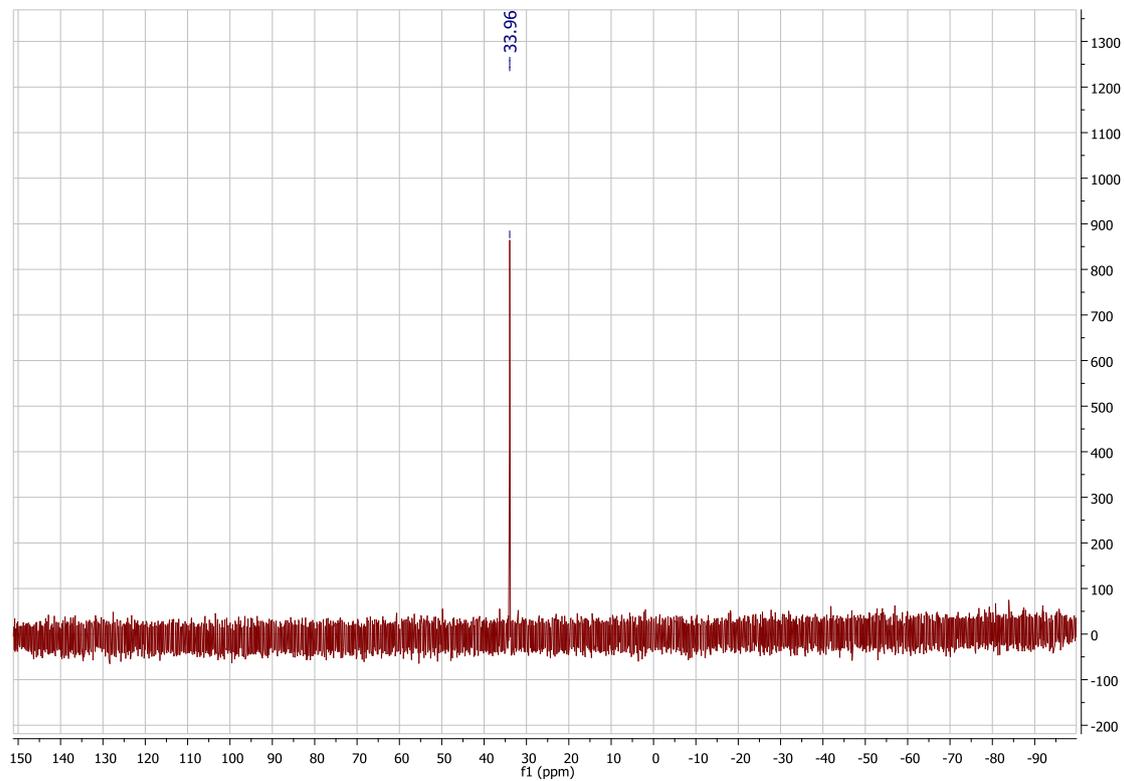


• [AuClPPh₃]:

¹H-RMN

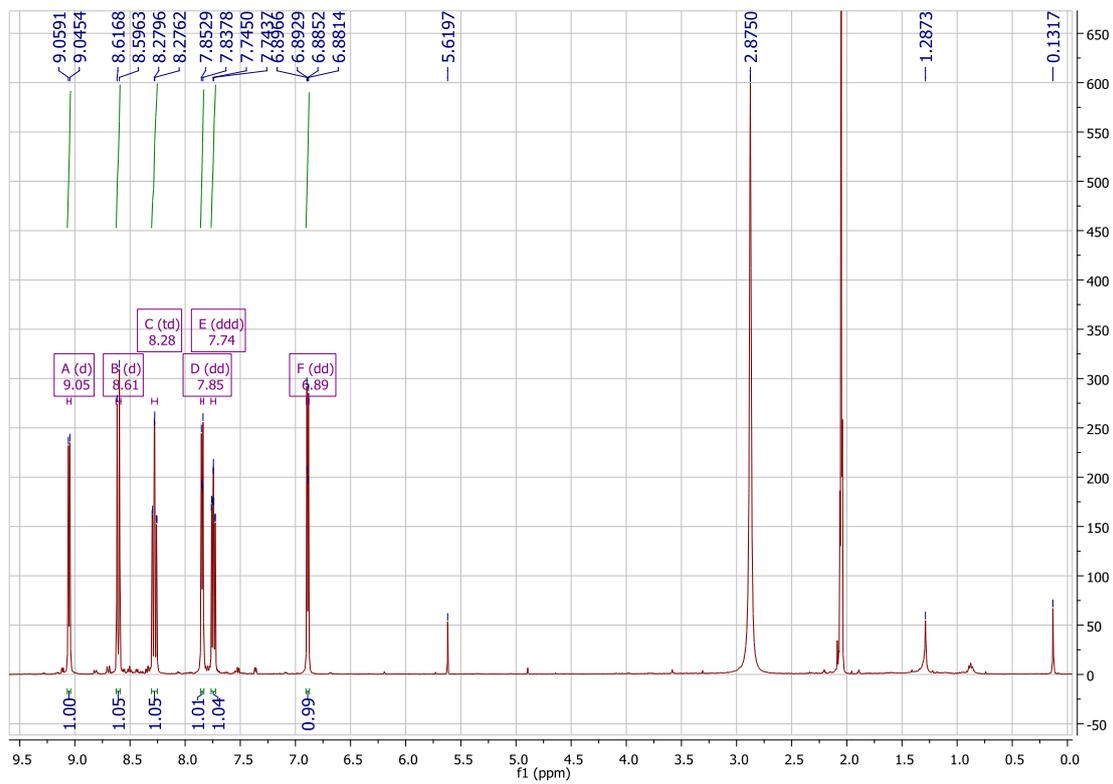


³¹P-RMN

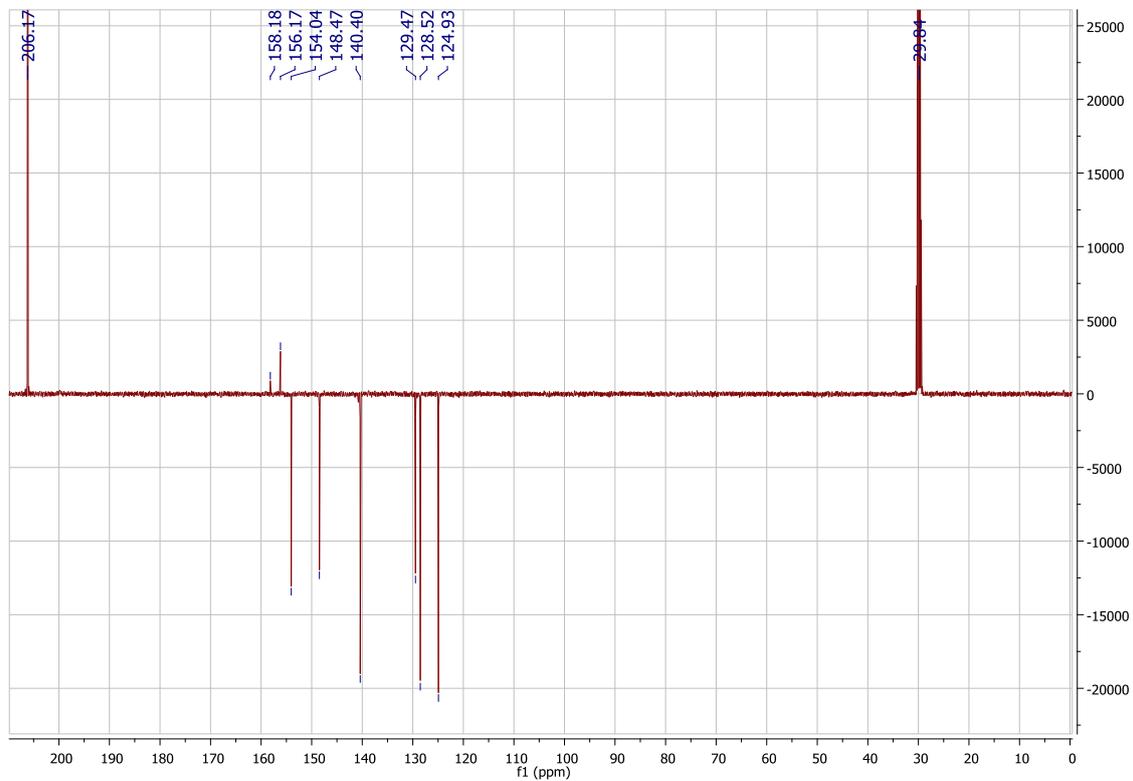


• Complejo 1:

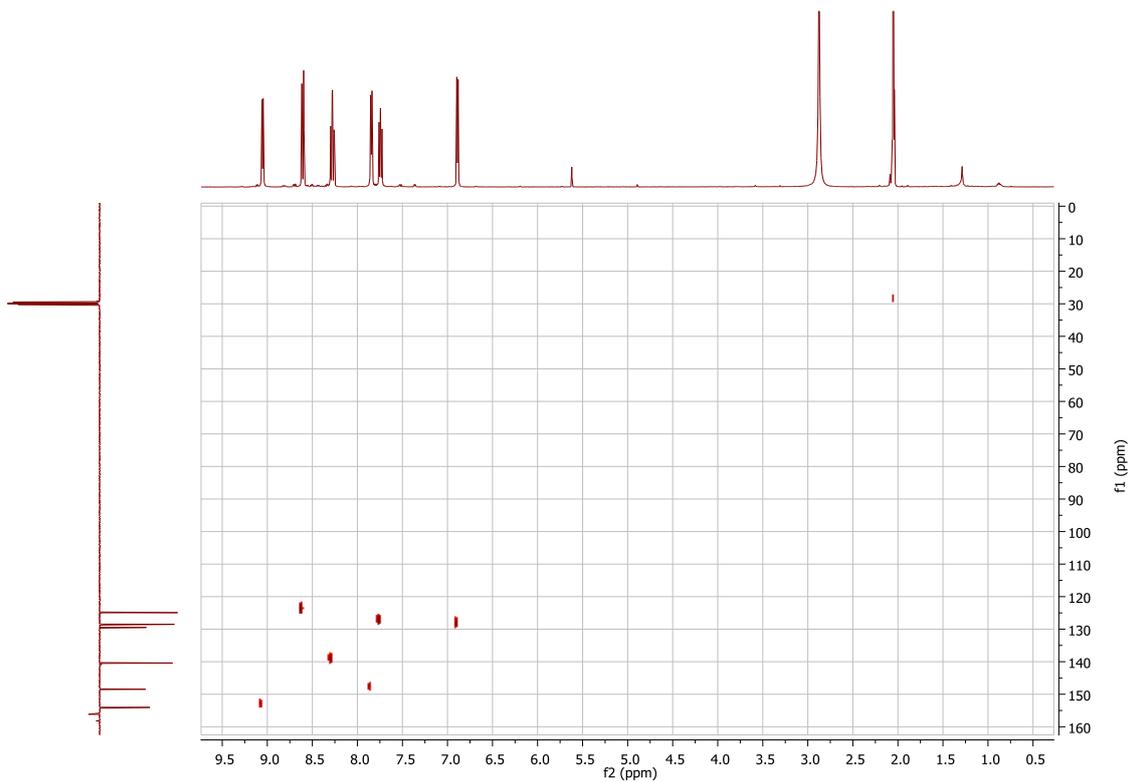
¹H-RMN



¹³C-RMN

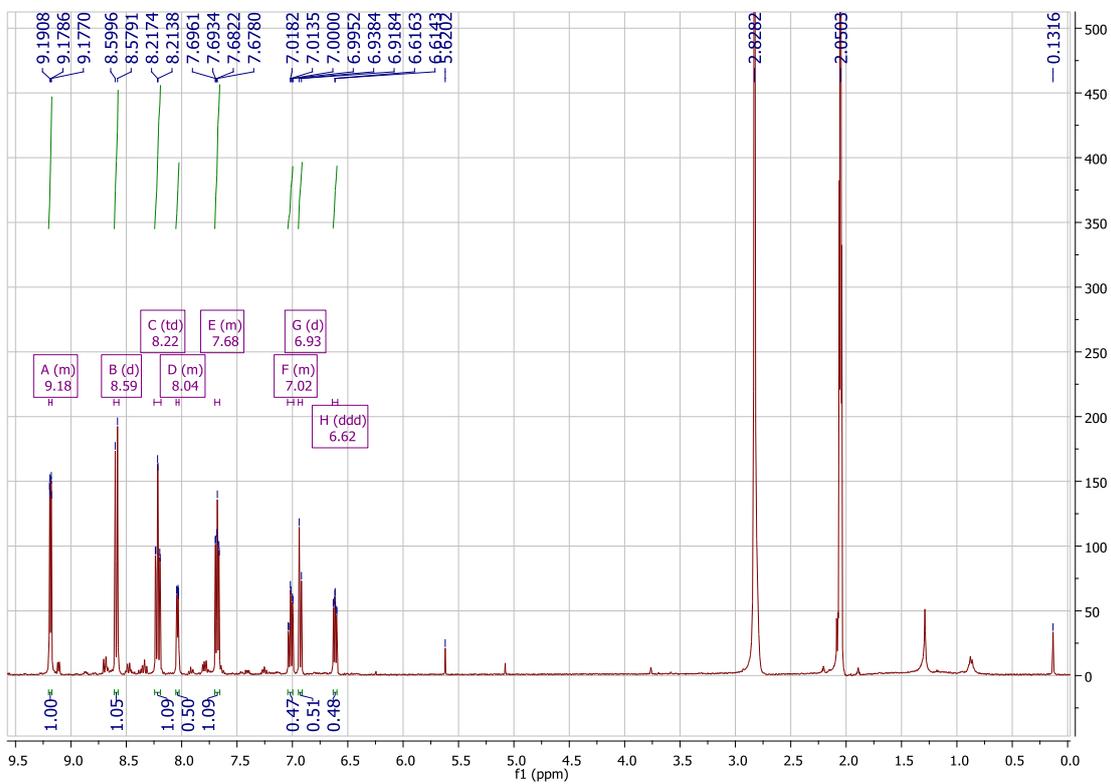


HSQC

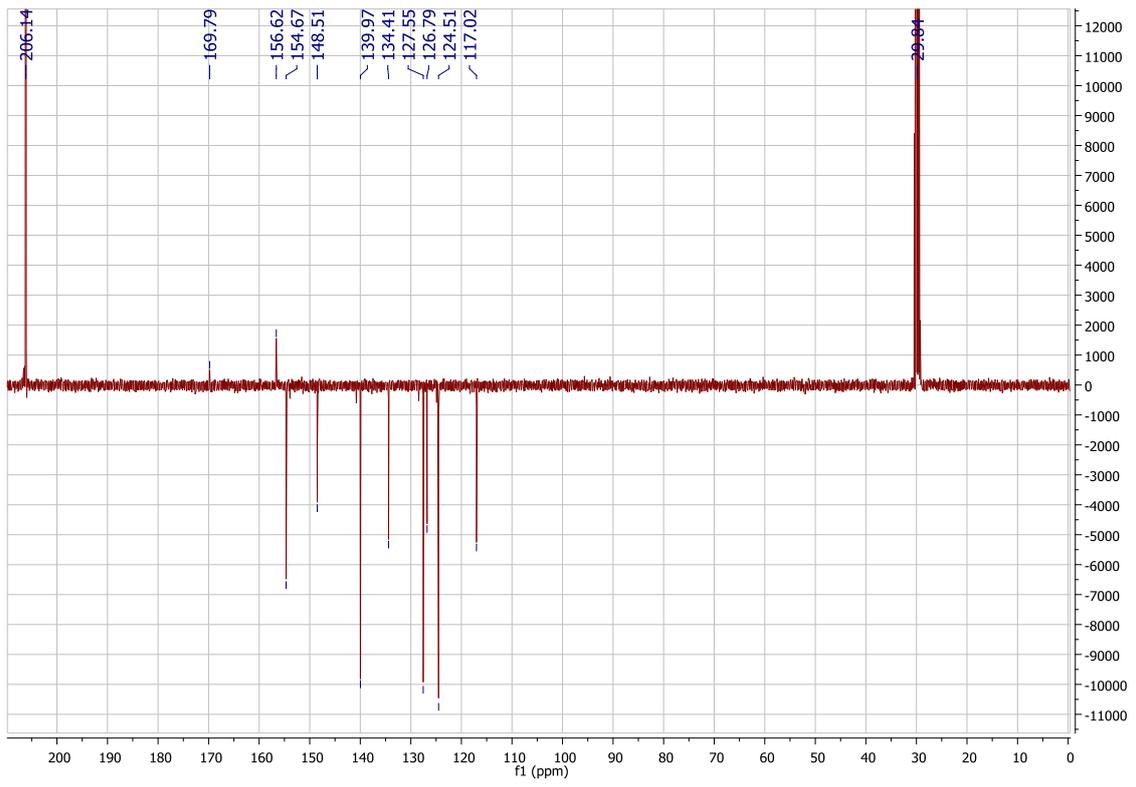


- **Complejo 2:**

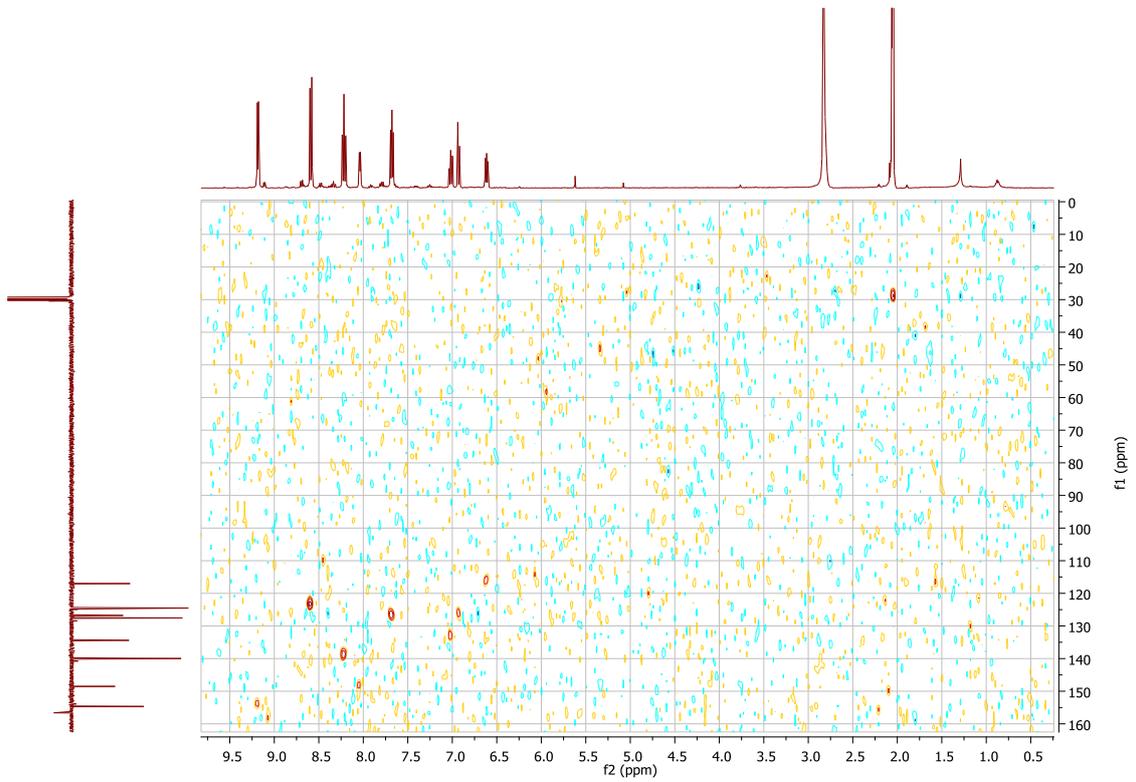
^1H -RMN



¹³C-RMN

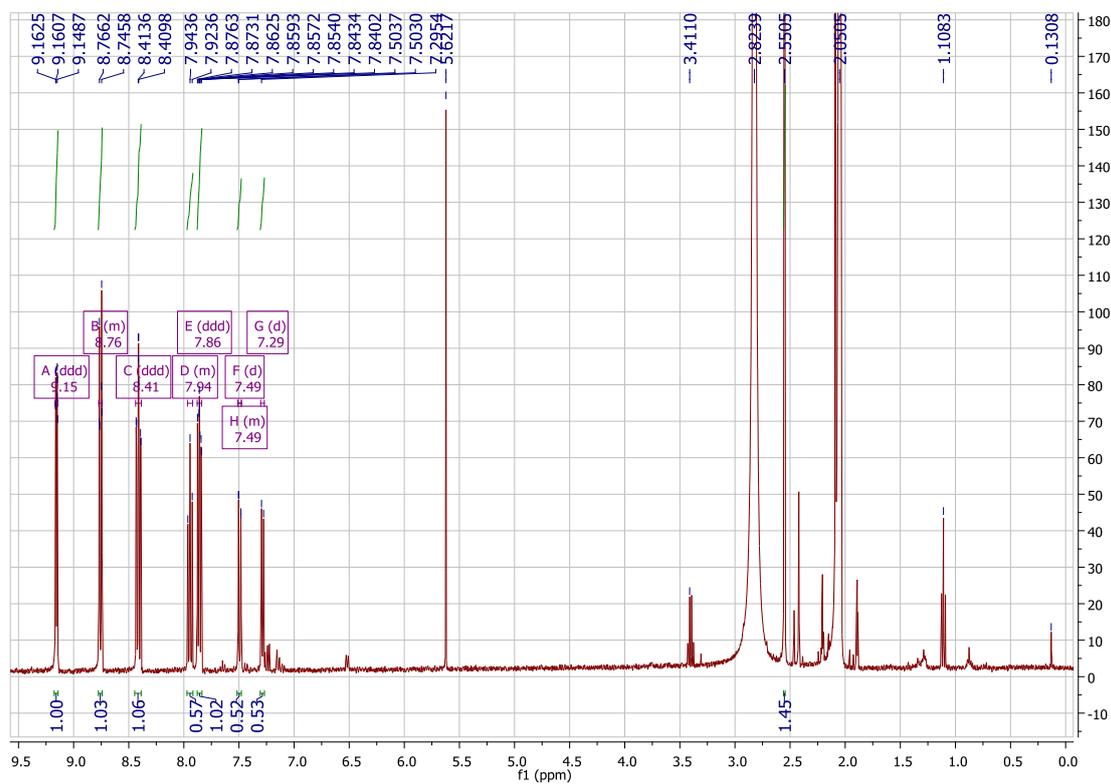


HSQC

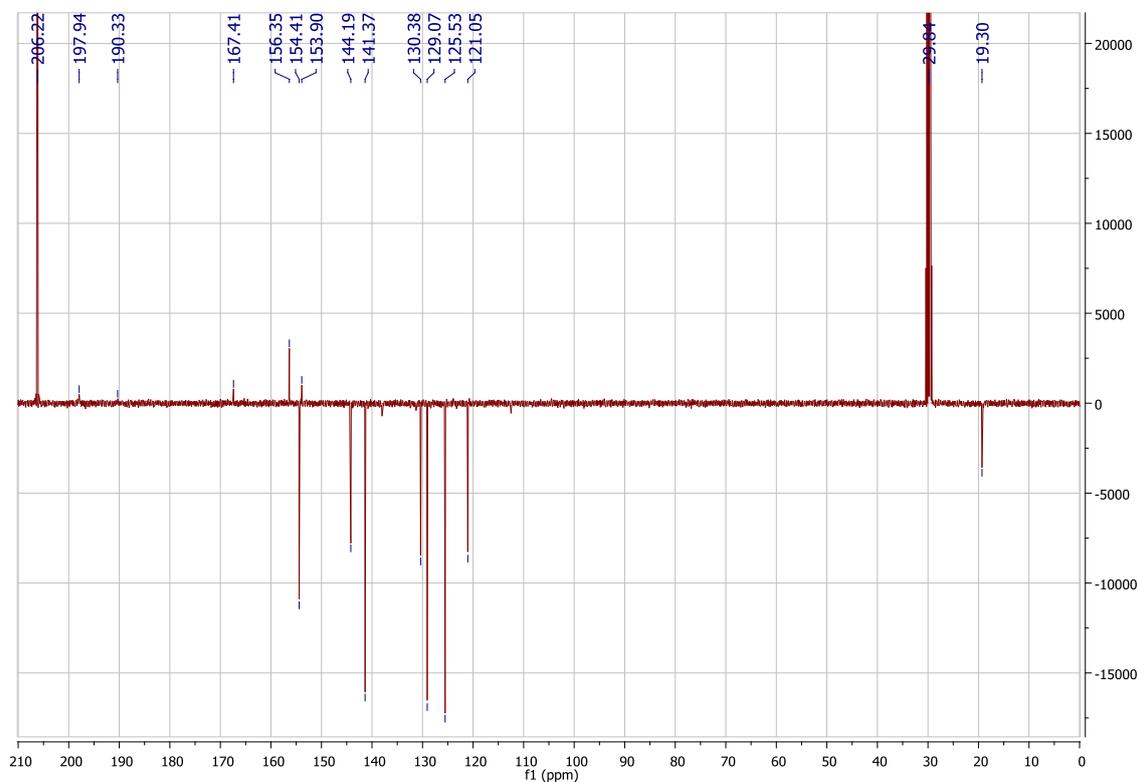


• Complejo 3:

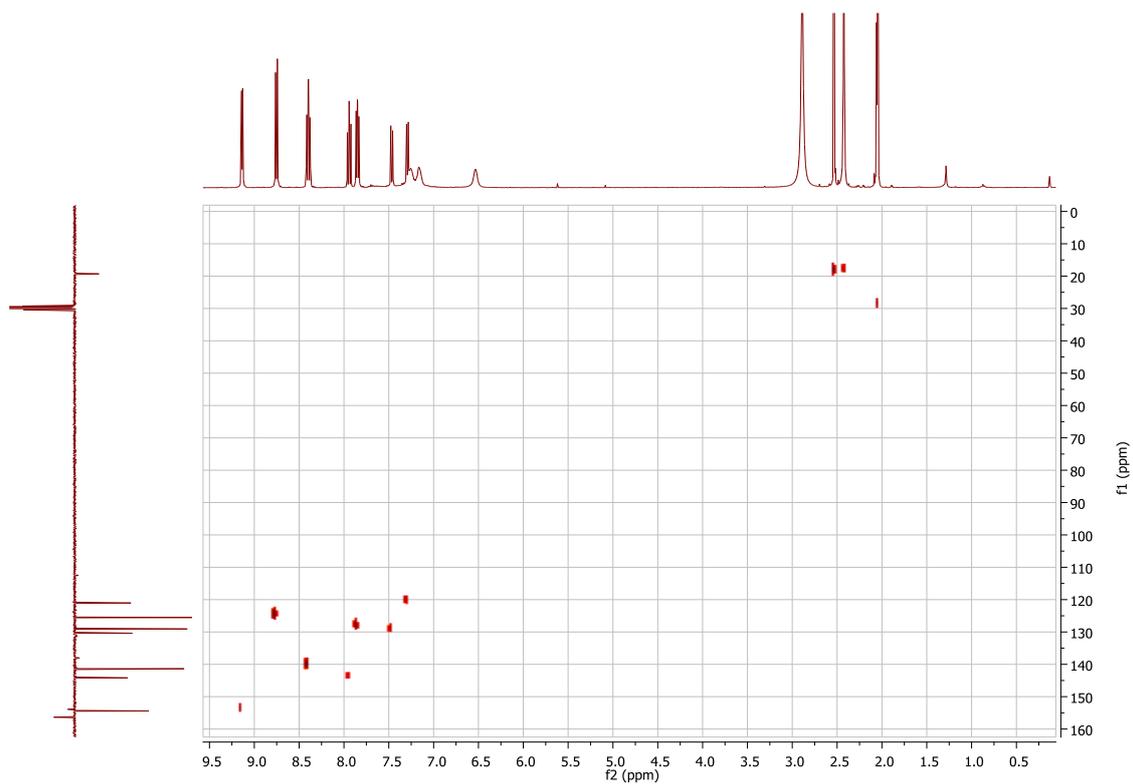
¹H-RMN



¹³C-RMN

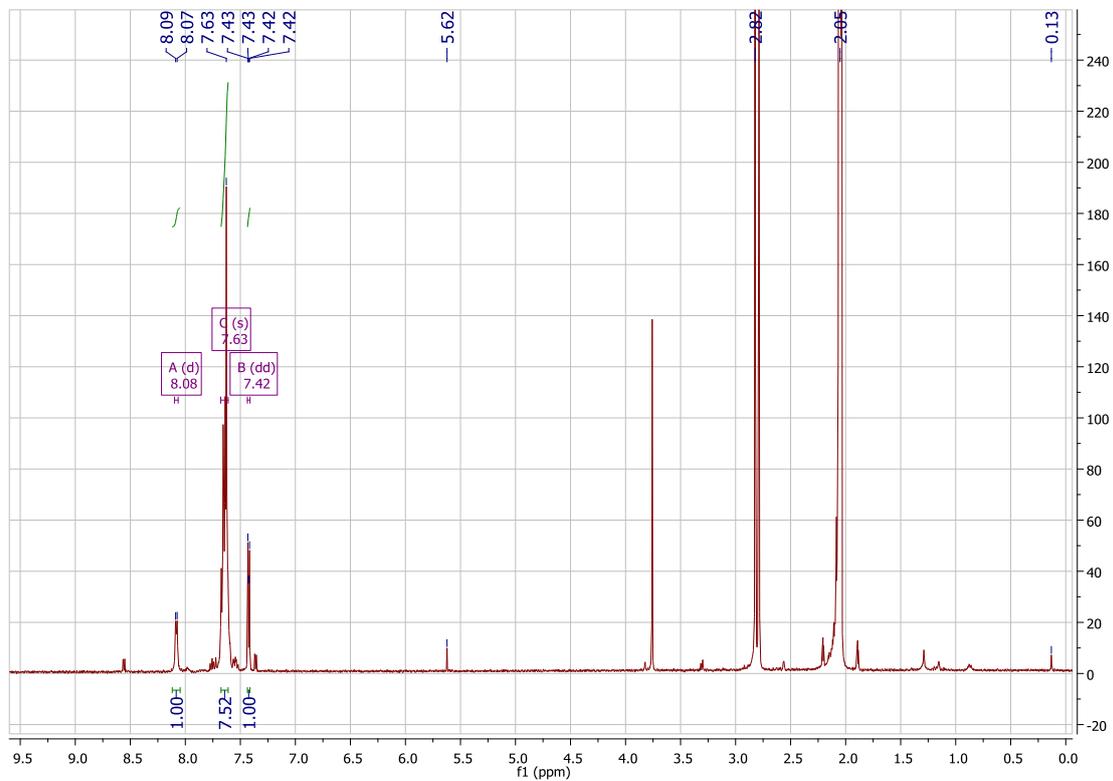


HSQC

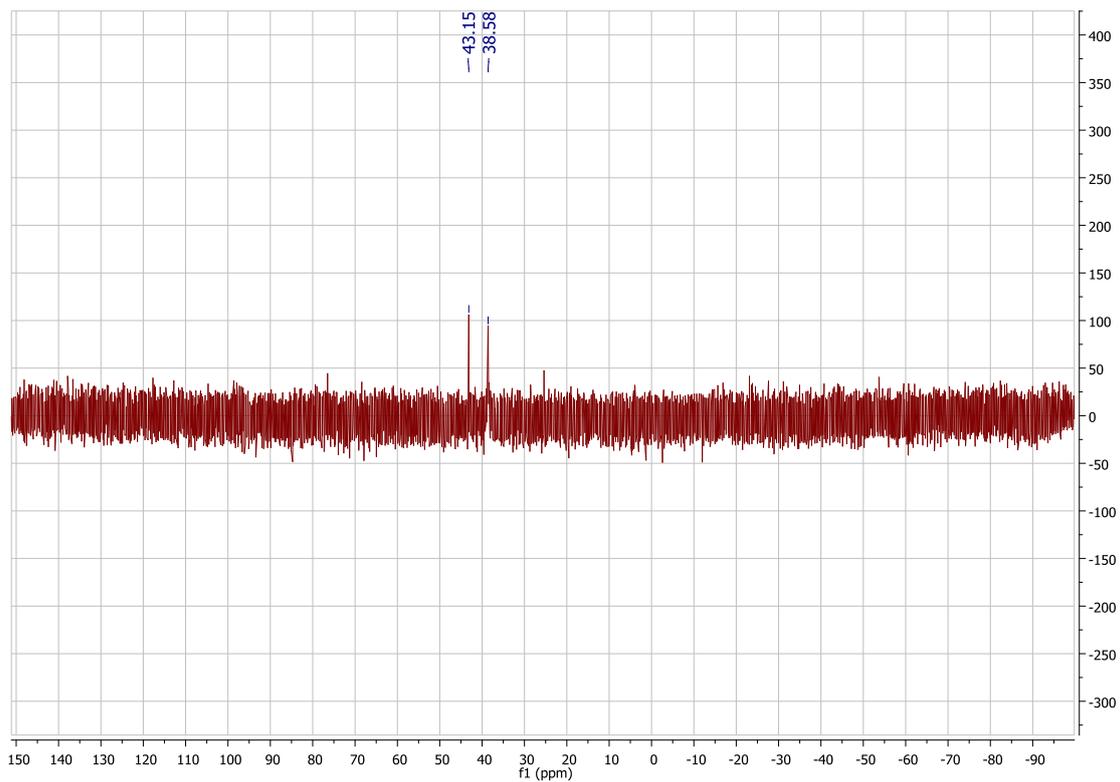


- $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(4\text{-Spy})]$:

^1H -RMN

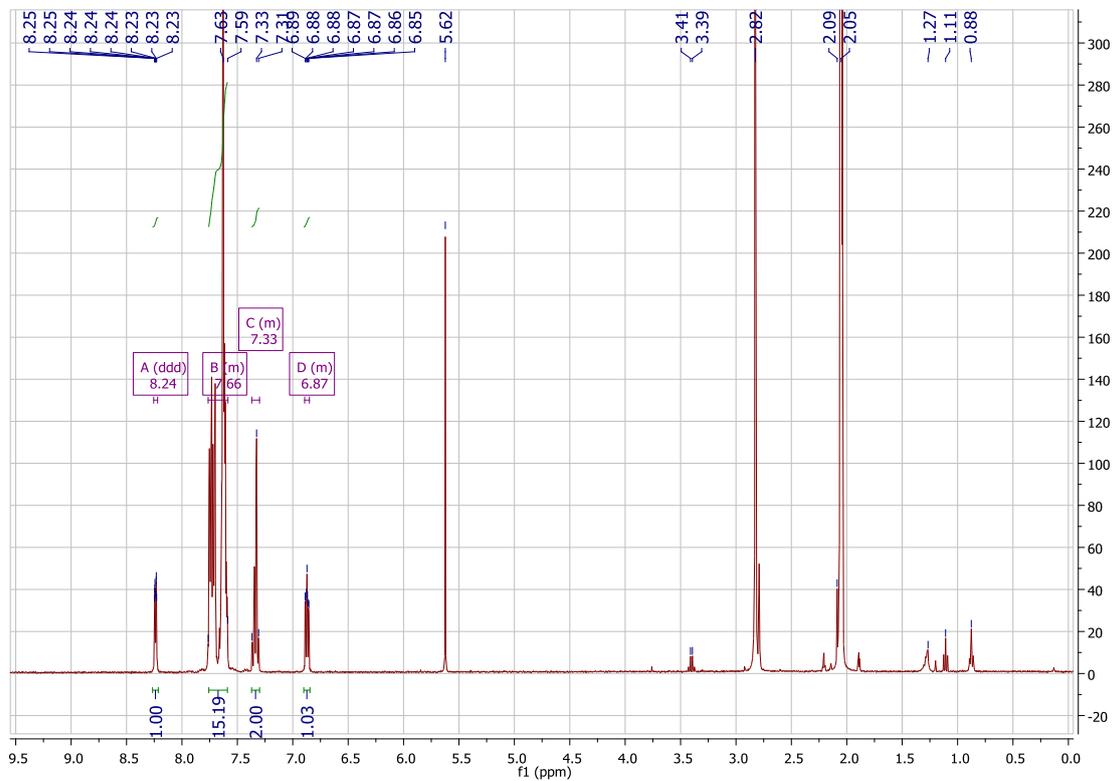


^{31}P -RMN

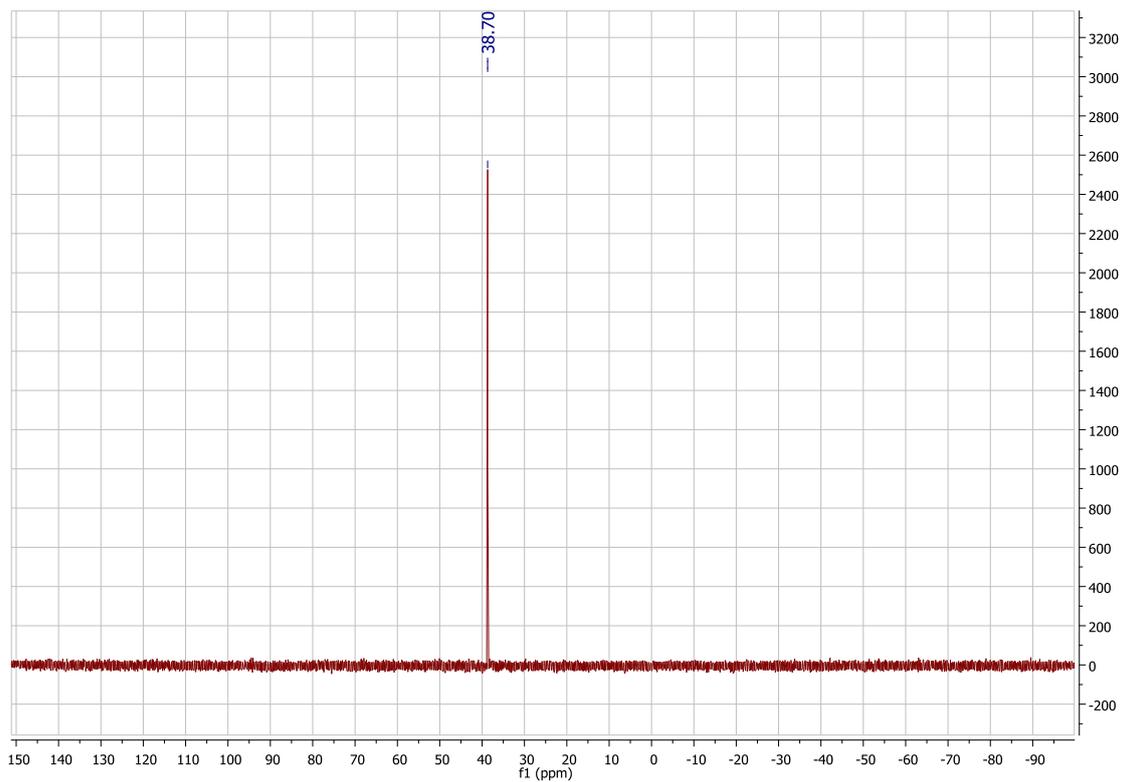


• $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(2\text{-Spy})]$:

^1H -RMN

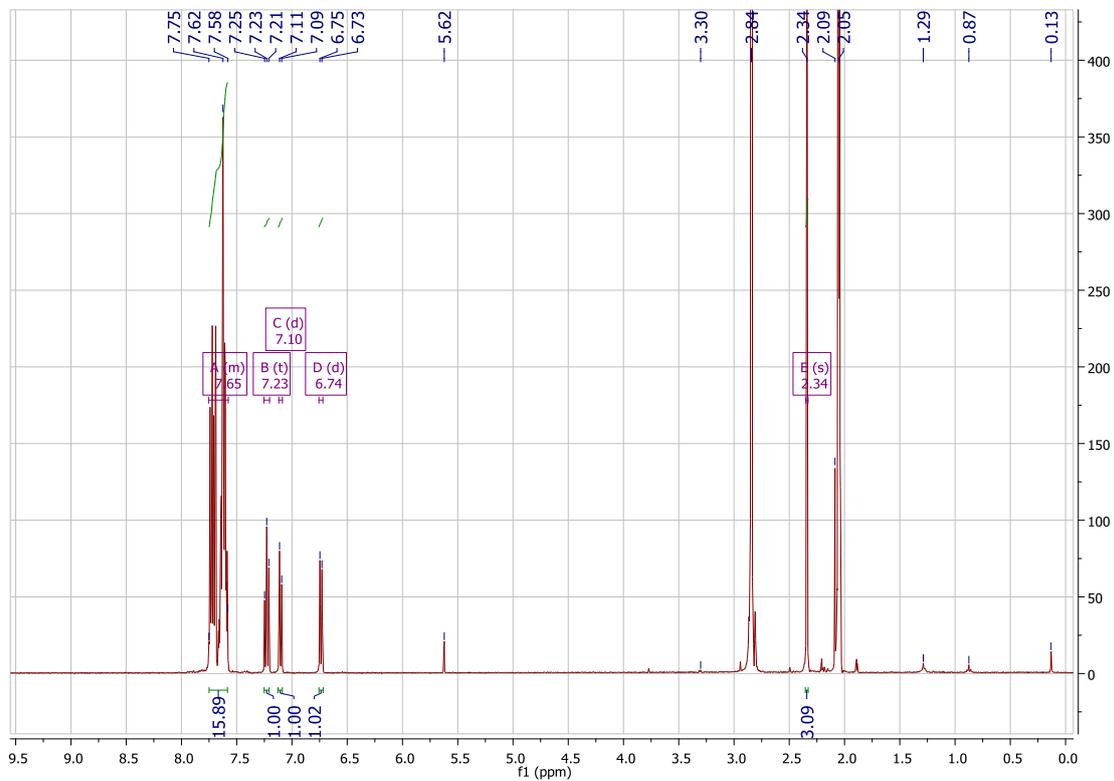


^{31}P -RMN

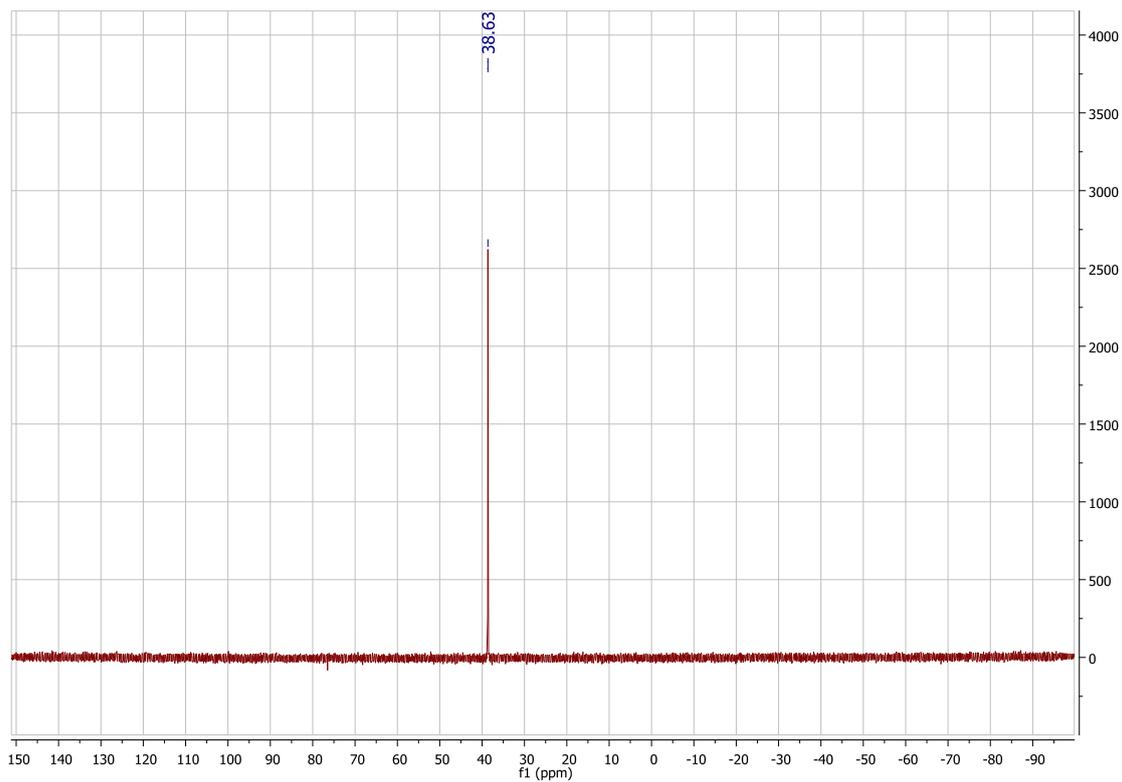


- $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(6\text{-Me-2-Spy})]$:

^1H -RMN

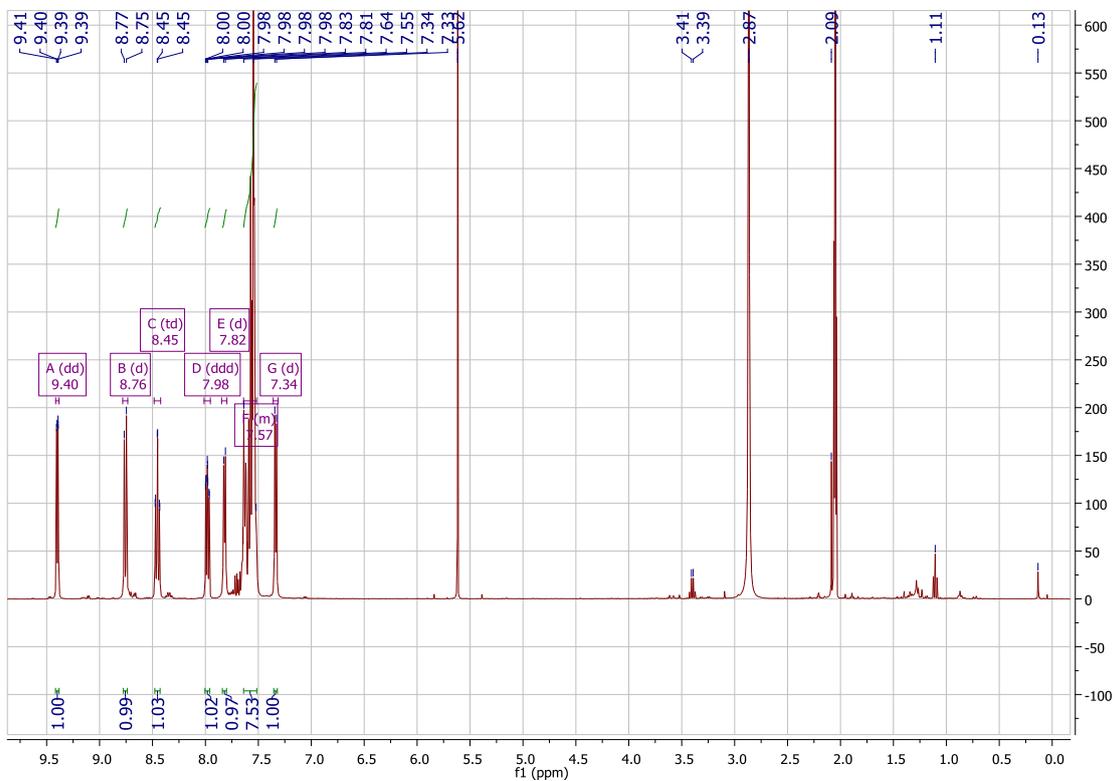


³¹P-RMN

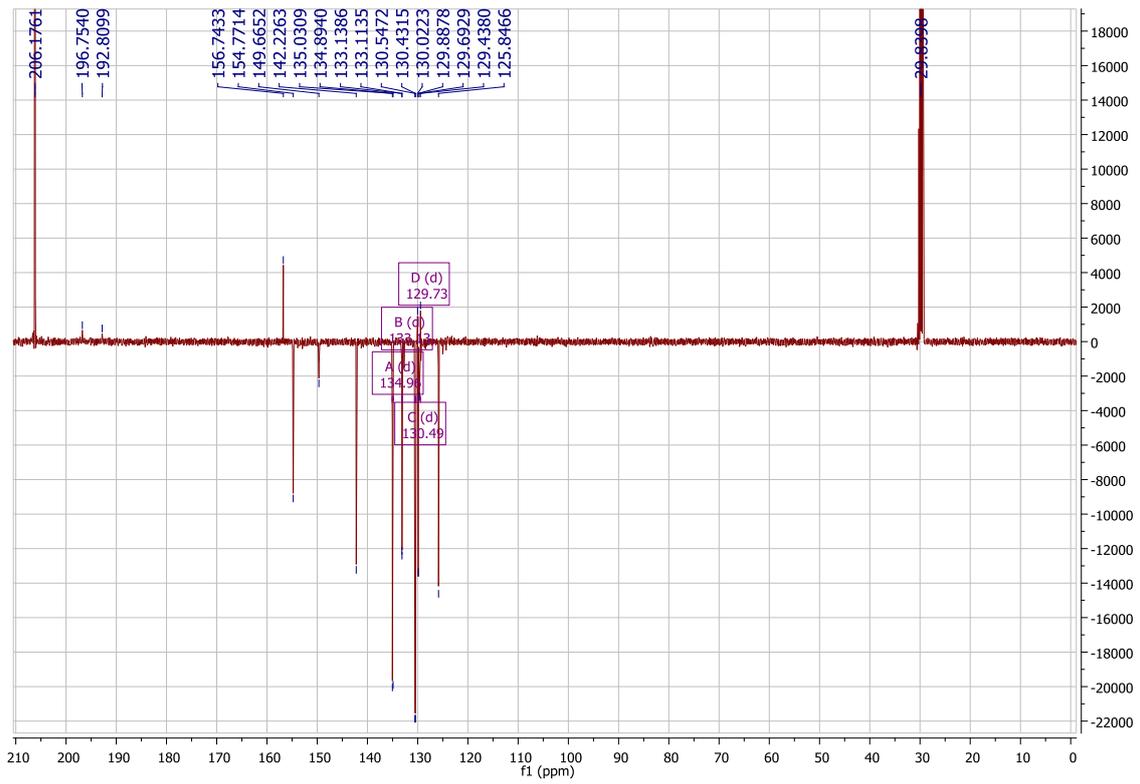


- **Complejo 4:**

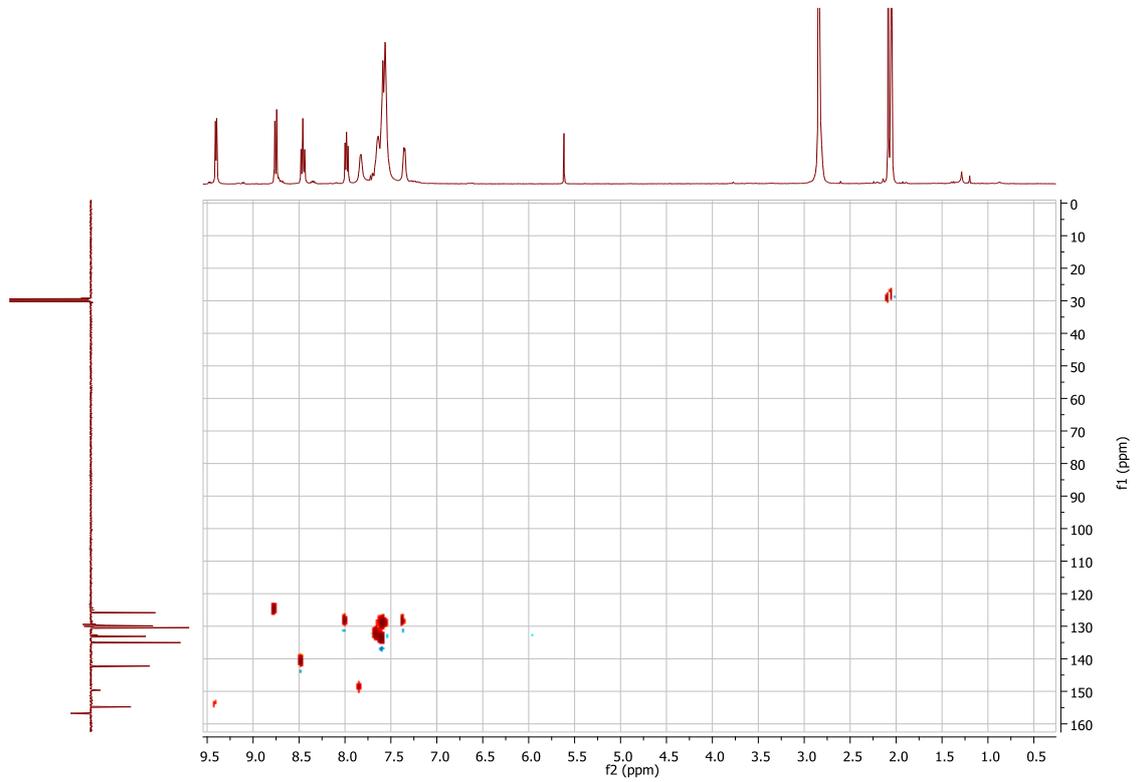
¹H-RMN



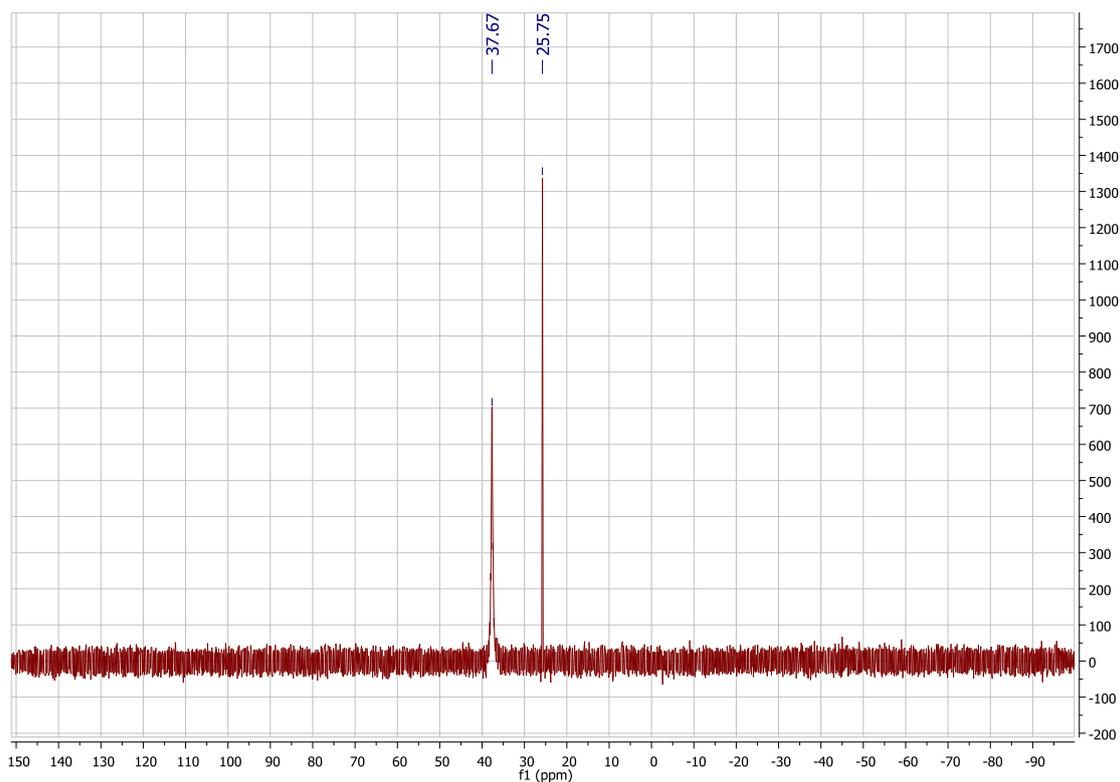
¹³C-RMN



HSQC

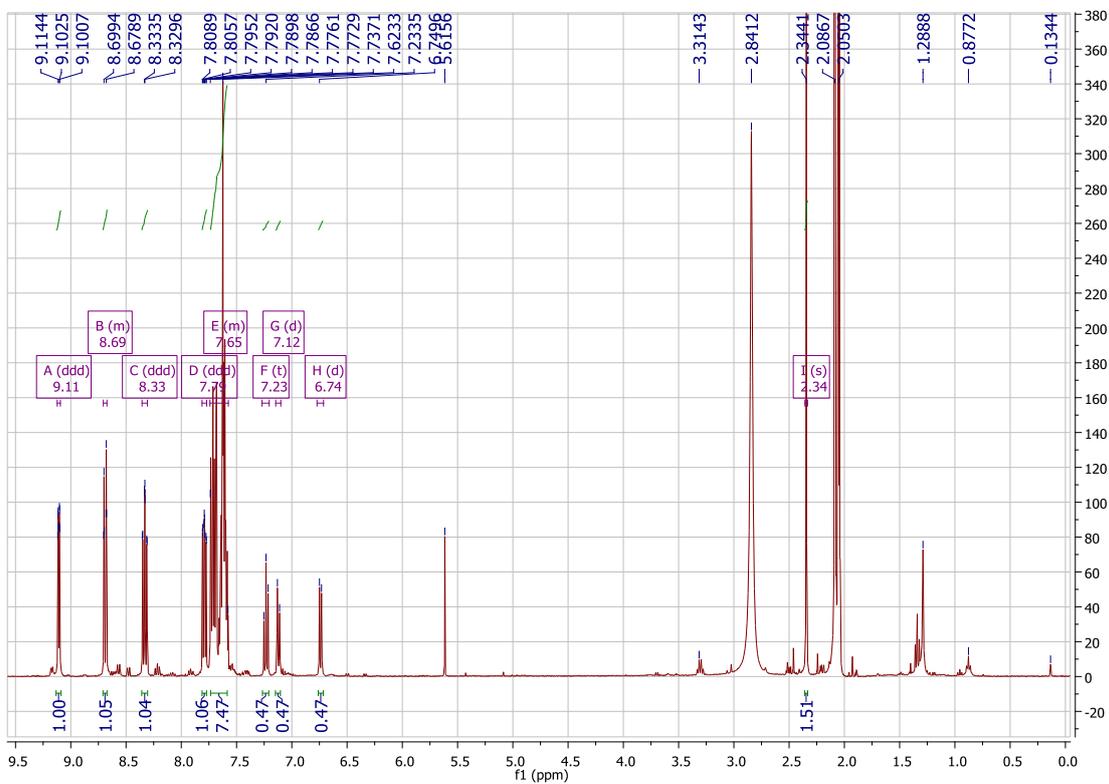


³¹P-RMN

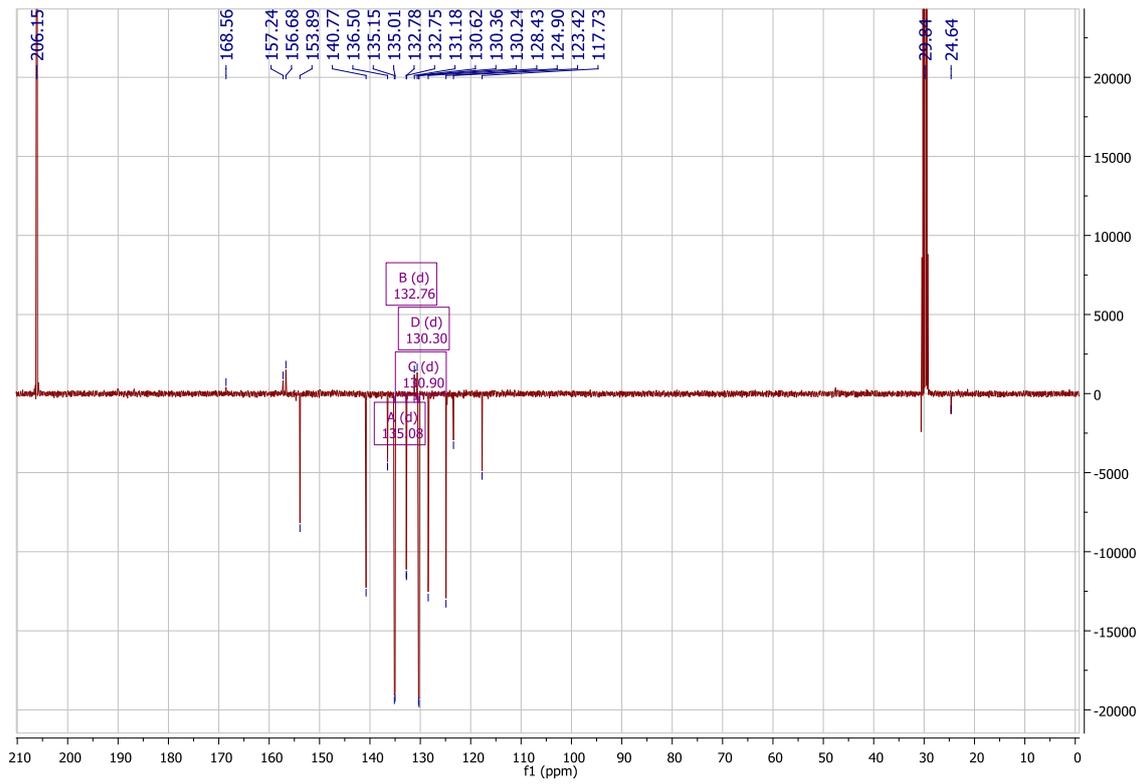


- **Complejo 6:**

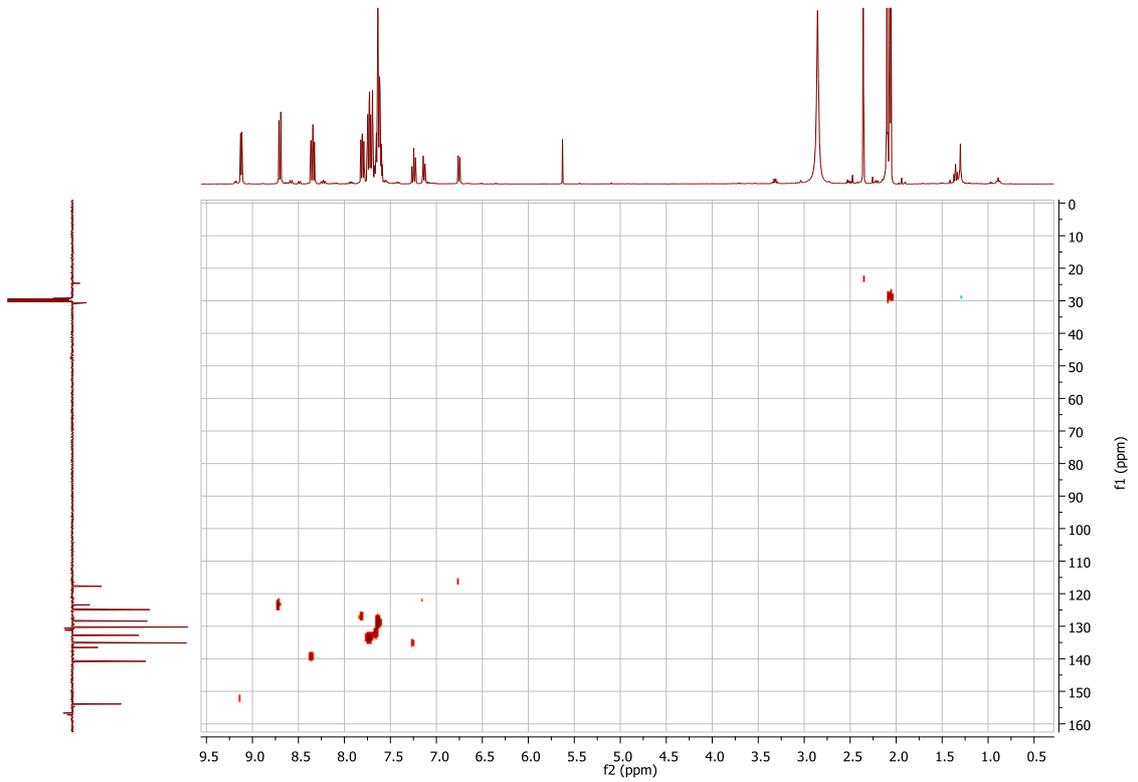
¹H-RMN



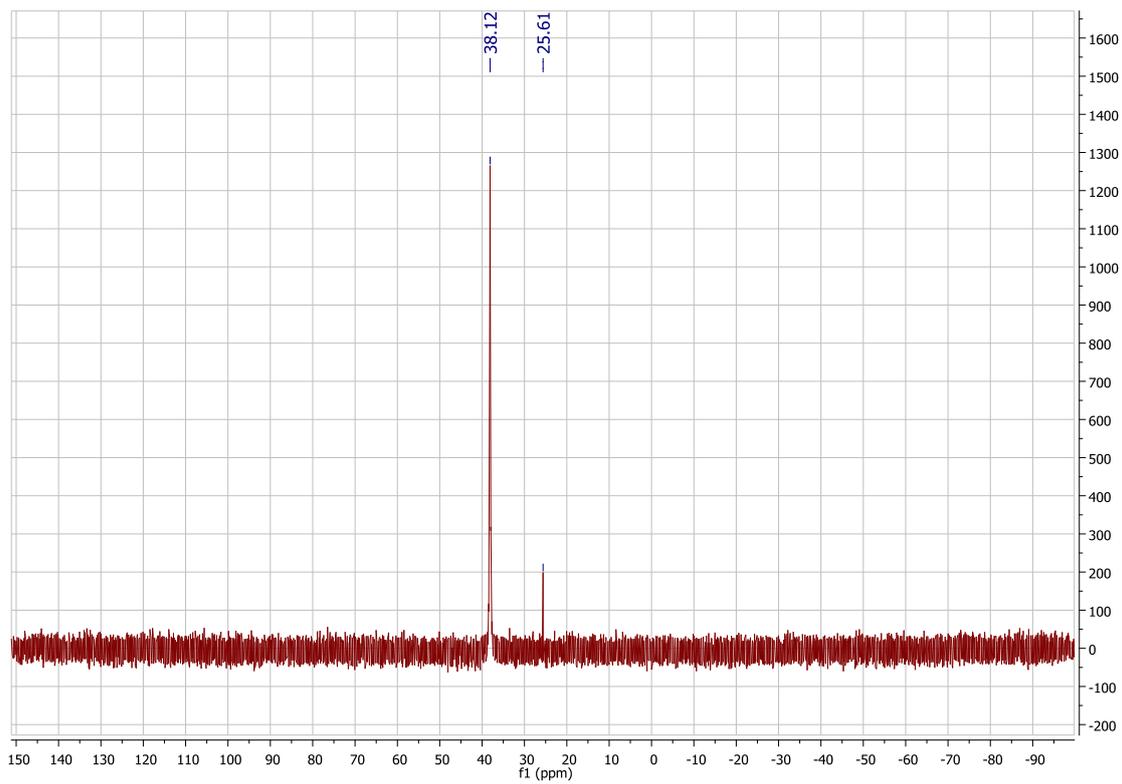
¹³C-RMN



HSQC

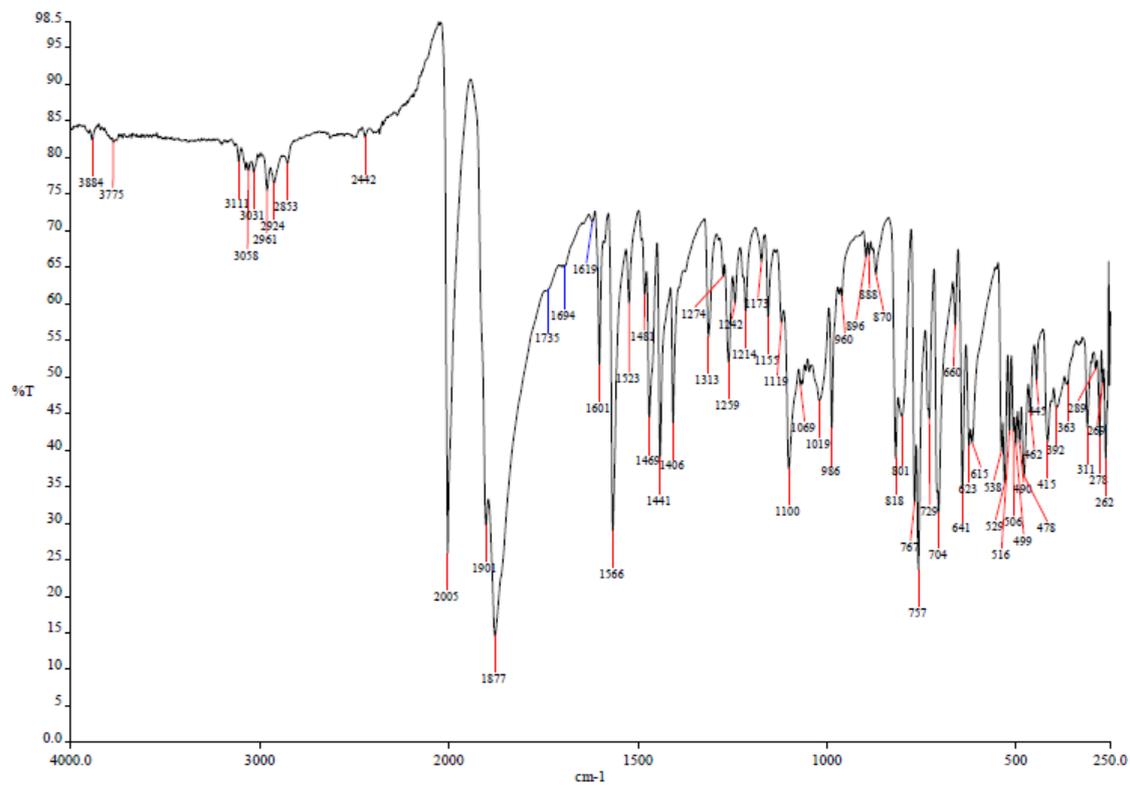


^{31}P -RMN

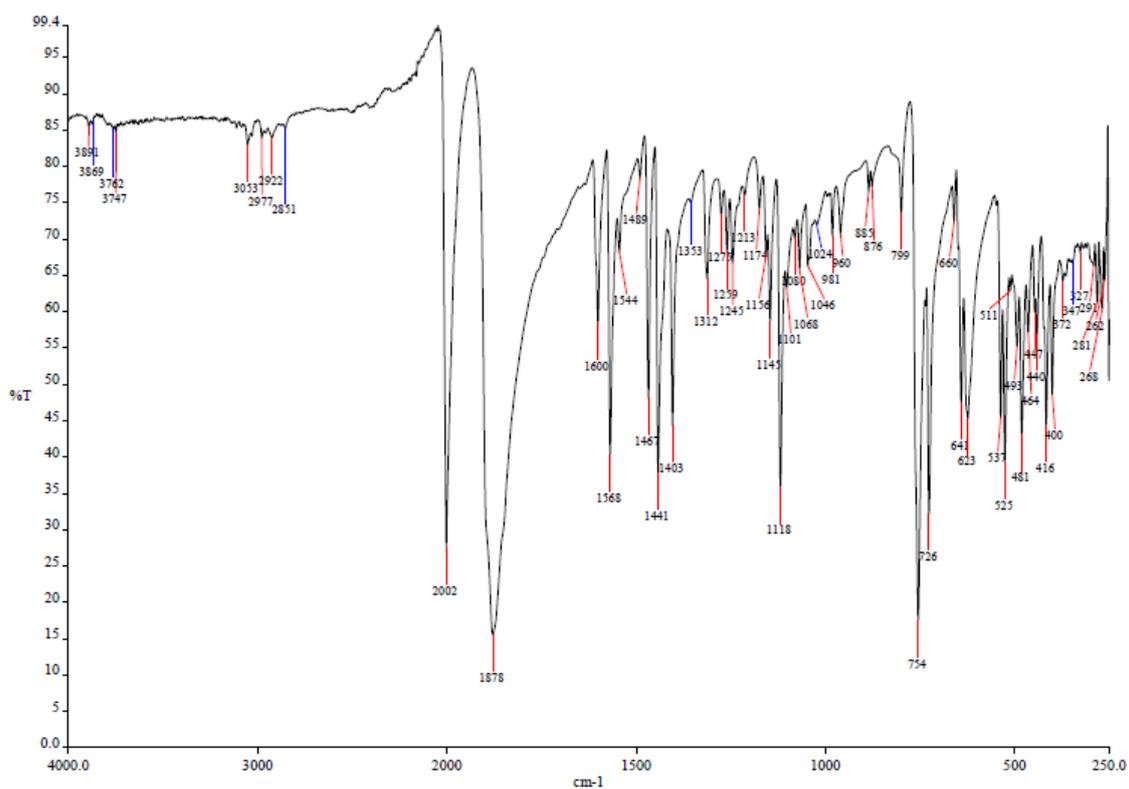


Espectroscopia IR

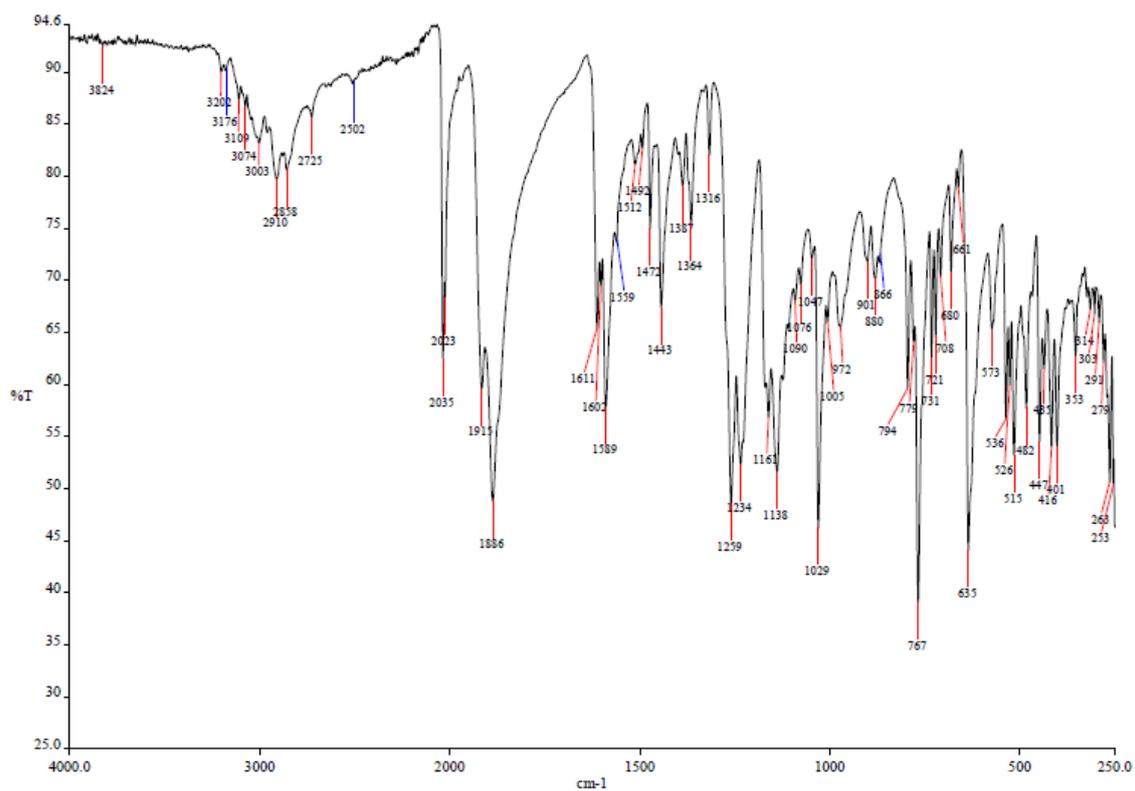
• Complejo 1:



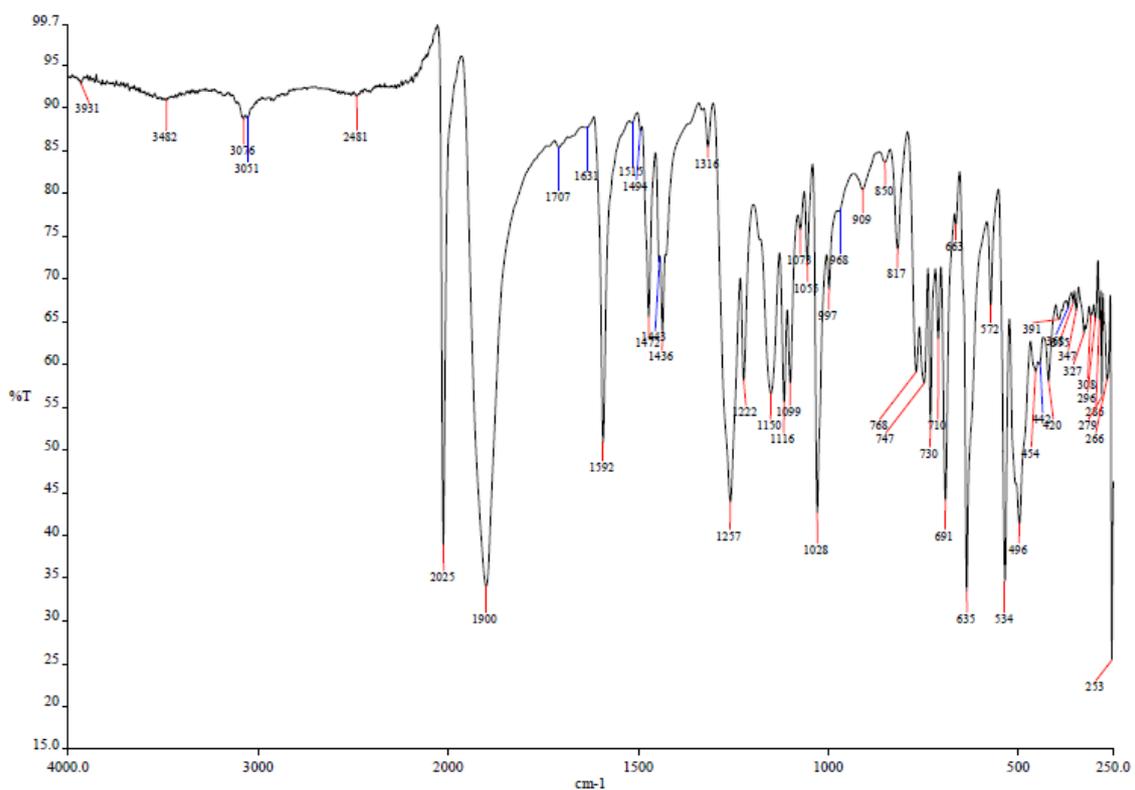
• Complejo 2:



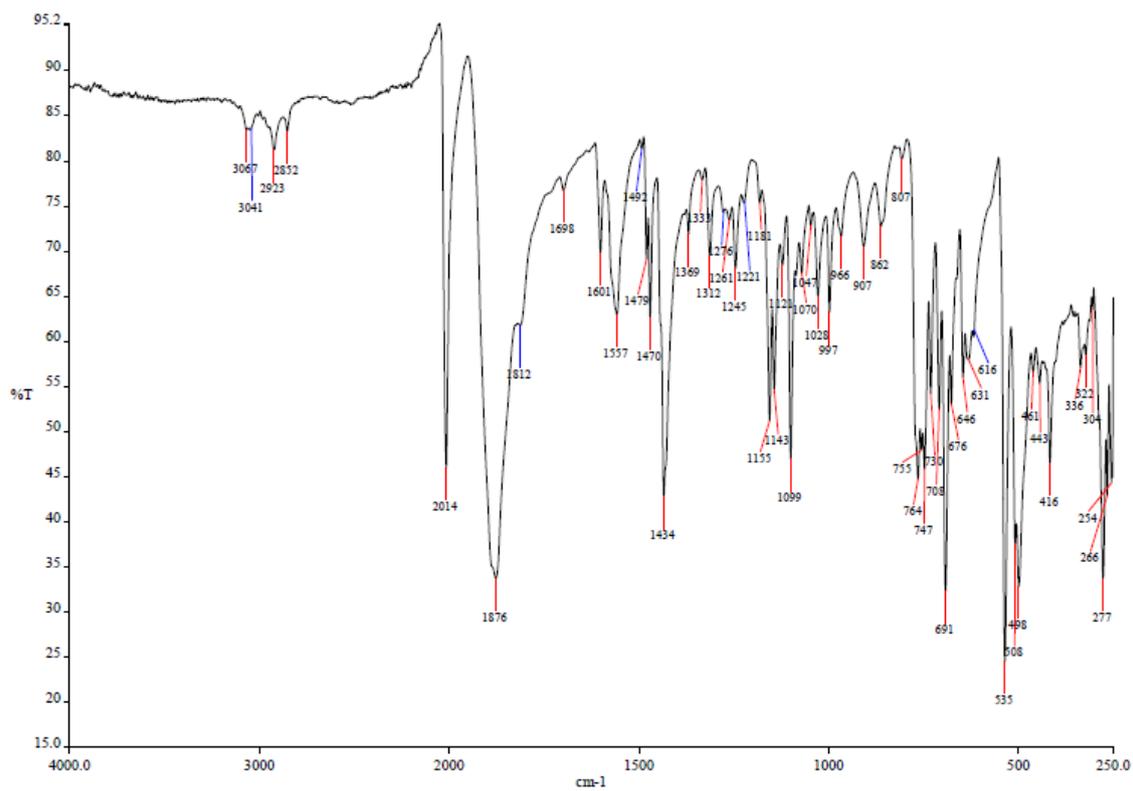
● **Complejo 3:**



● **Complejo 4:**

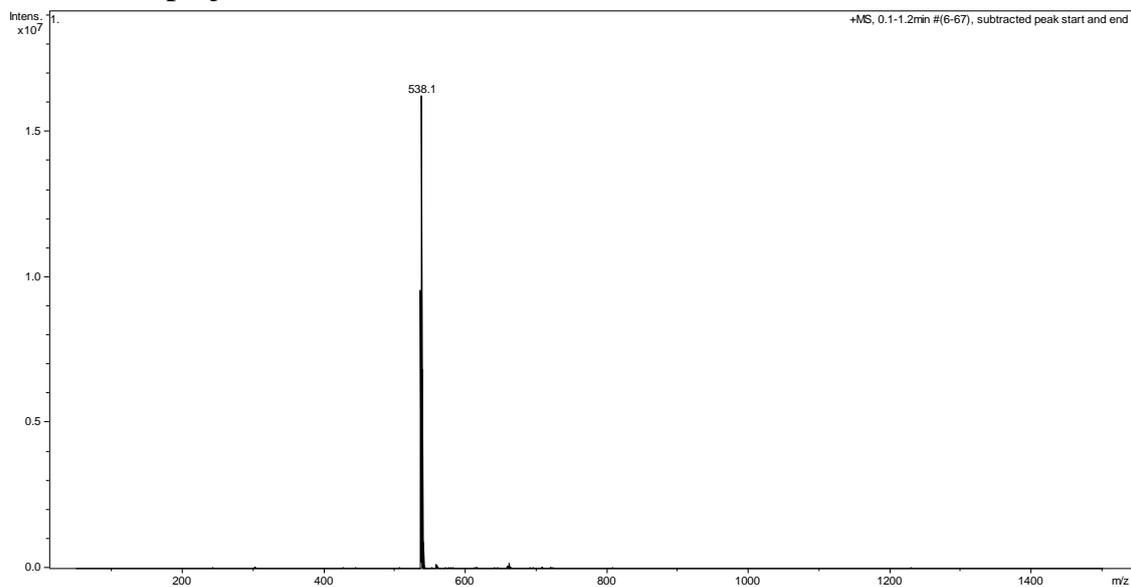


● Complejo 6:

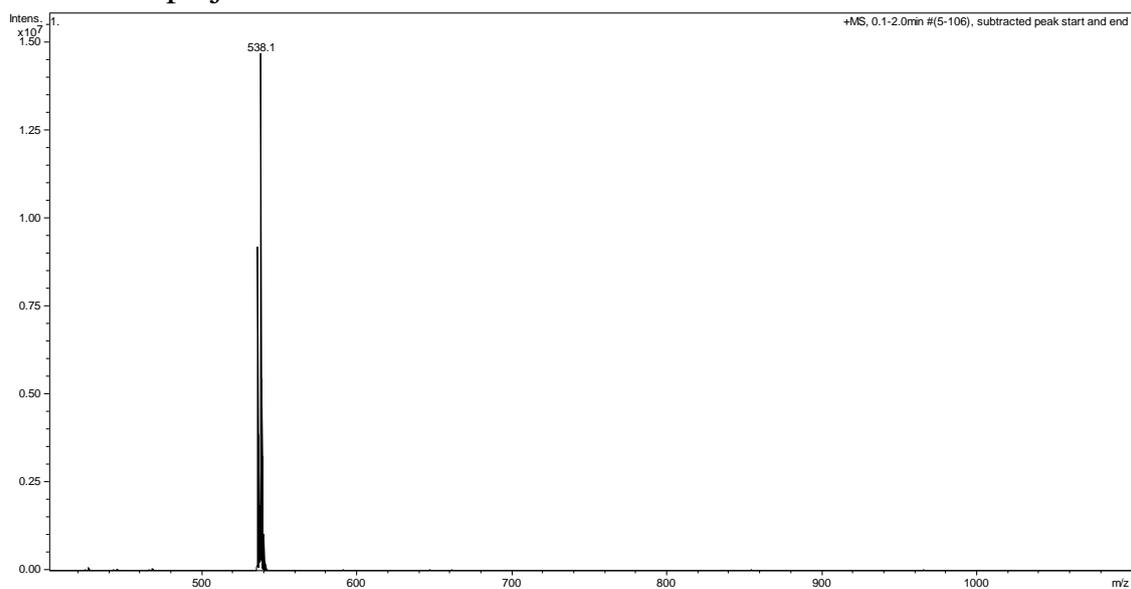


Espectrometría de MS

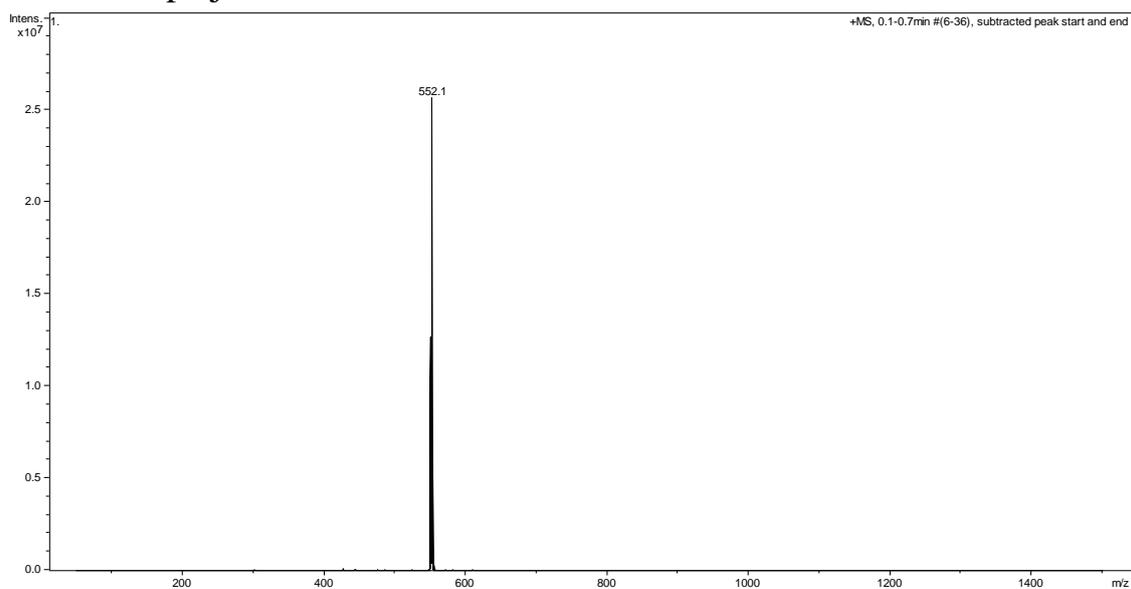
- Complejo 1:



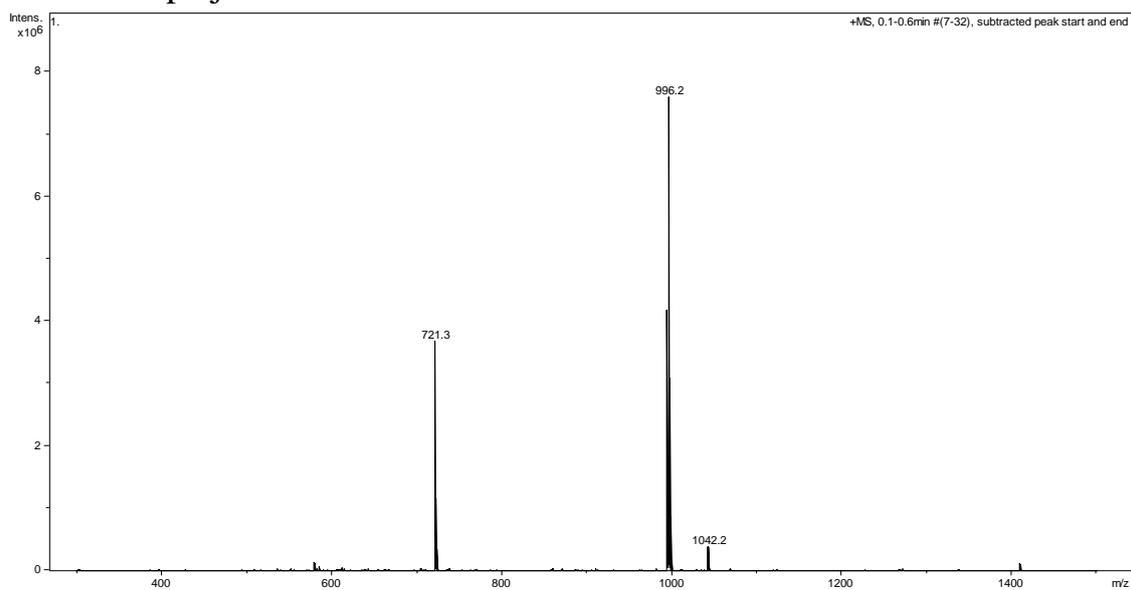
- Complejo 2:



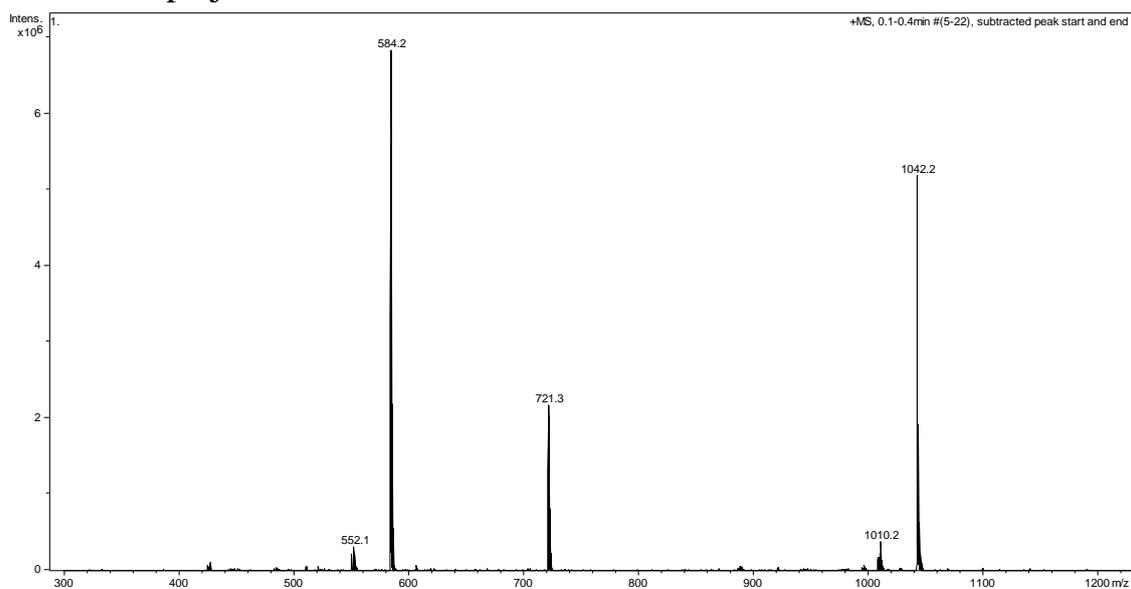
● **Complejo 3:**



● **Complejo 4:**



● Complejo 6:

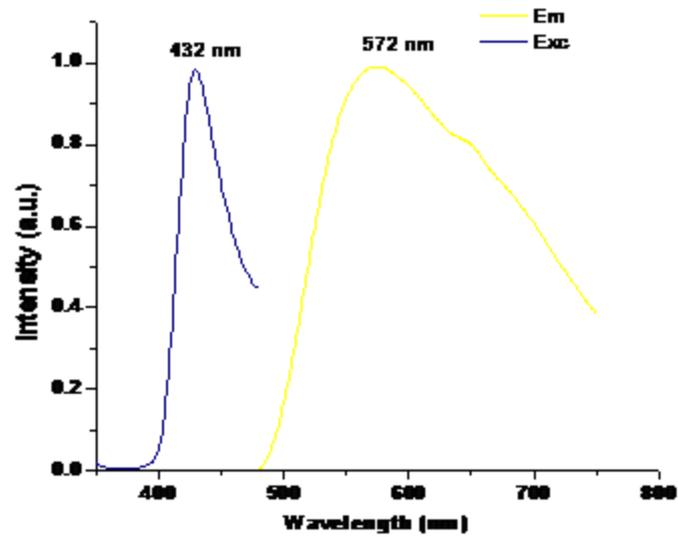


Difracción de rayos X

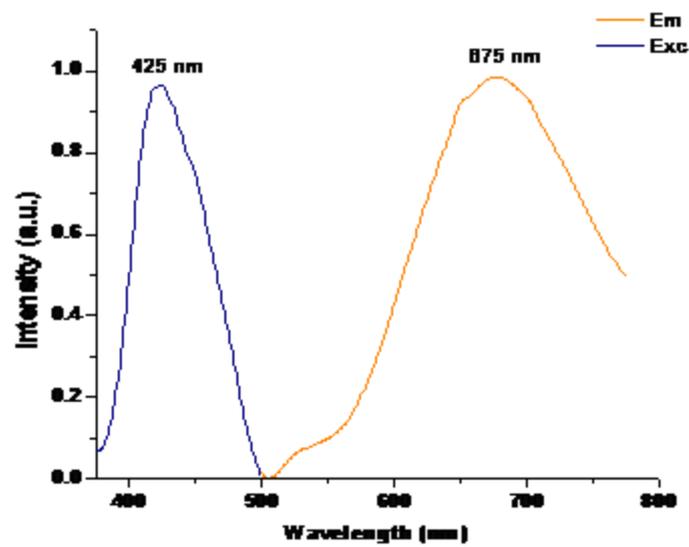
Complex	2	3
Formula	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ N ₃ O ₃	C ₂₀ H ₁₅ F ₃ N ₃ O ₆ ReS
M_r	621.49	700.67
Crystal size (mm)	0.44x0.32x0.24	0.38x0.36x0.35
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	C2/c	Pn
Cell constants:		
a (Å)	18.320(4)	6.9785(14)
b (Å)	15.122(3)	13.528(3)
c (Å)	16.726(3)	12.191(2)
α (°)	90	90
β (°)	114.86(3)	102.01(3)
γ (°)	90	90
V (Å³)	4204.2(15)	1125.6(4)
Z	8	2
D_x (Mg m⁻³)	1.964	2.067
μ(mm⁻¹)	6.160	5.652
F(000)	2384	676
T (K)	100(2)	100(2)
2θ_{max}	51	50.98
No. of refl.:		
measured	17612	11035
independent	3897	4075
Transmissions	0.0195-0.1725	0.2423-0.2226
R_{int}	0.0226	0.0187
Parameters	260	321
Restraints	0	2
Goodness of fit	1.099	1.047
wR(\bar{F}^2, all Refl.)	0.0711	0.0305
R(I > 2σ(I))	0.0287	0.0132
max. Δρ (e Å⁻³)	1.596	0.545

Luminiscencia

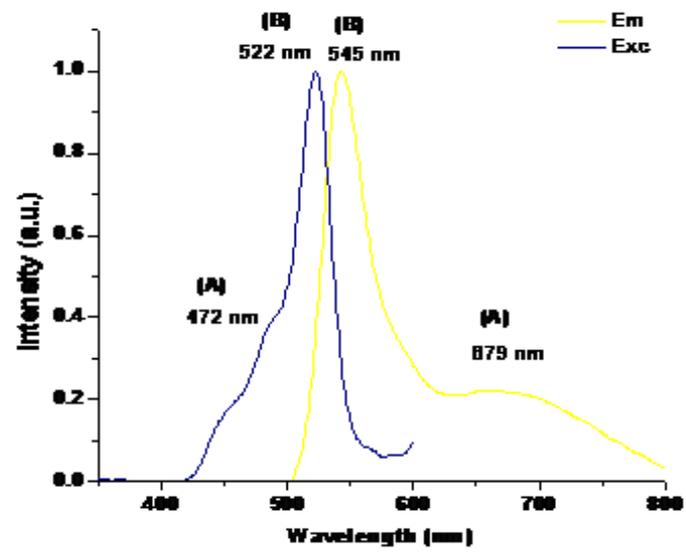
- Complejo 1:



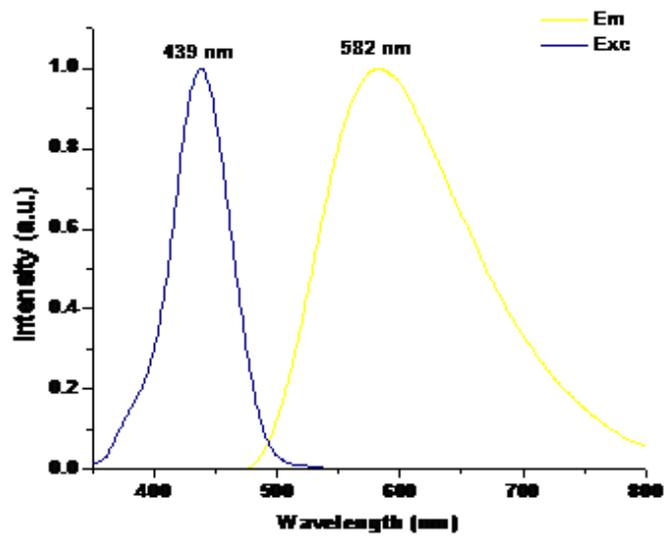
- Complejo 2:



- Complejo 3:



- Complejo 4:



- Complejo 6:

