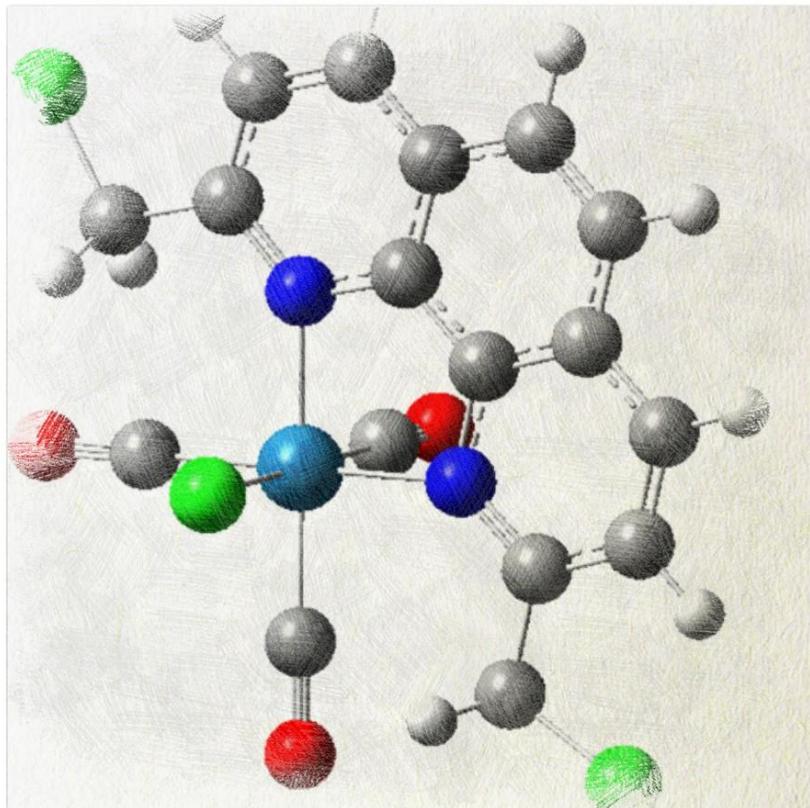




TRABAJO
DE FIN
DE
GRADO
2017

COMPUESTOS METÁLICOS LUMINISCENTES PARA IMAGEN Y TERAPIA

Marta Redrado Domingo



Directoras: Vanesa Fernández Moreira
María Concepción Gimeno Floría

Departamento de Química Inorgánica - Laboratorio 7049

Agradecimientos

A M^a Concepción Gimeno por permitirme incorporarme a su grupo de investigación para realizar este trabajo. A los integrantes del mismo, por enseñarme a disfrutar de la química y guiarme por el buen camino con sus consejos; en especial a Vanesa Fernández, mi directora, sin la cual nada de esto hubiese sido posible.

A Andrés y Adrián, por ser mis segundos profesores.

A mi familia y amigos, *muggles* en el este tema, pero participes en la sombra.

Por último, me gustaría hacer una mención a Manolo, mi tanque, apoyo incondicional y fuente infinita de sonrisas.

Índice de contenidos

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Resumen..... | 5 |
| Introducción..... | 6 |
| Objetivos..... | 9 |
| Resultados y discusión..... | 10 |
| Síntesis del ligando L..... | 11 |
| Síntesis de complejos..... | 13 |
| Reactividad frente a ligandos N- y S- dadores..... | 15 |
| Análisis de las propiedades ópticas..... | 16 |
| Análisis de propiedades biológicas..... | 18 |
| Parte experimental..... | 23 |
| Instrumentación y condiciones..... | 23 |
| Materiales y procedimientos..... | 23 |
| Síntesis del compuesto 1..... | 23 |
| Síntesis del compuesto 2..... | 24 |
| Síntesis del compuesto L..... | 24 |
| Síntesis del complejo 4..... | 25 |
| Conclusiones..... | 26 |
| Bibliografía..... | 27 |
| Anexos..... | 28 |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|---|
| MLCT | Metal to ligand change transfer |
| TMRE | Éster etílico tetrametilrodamina |
| Vis-UV | Visible- Ultravioleta |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| IR | Infrarrojo |
| OTf⁻ | Anión triflato |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| DA | Doblete aparente |
| THF | Tetrahidrofurano |

Abstract

This work describes the development of a new variety of luminescent rhenium(I) complexes of the type *fac*-[Re(NN)(CO)₃L] where NN represents a phenanthroline derivative and L is either a pyridine molecule or an chloride group, suitable for specific cell imaging and whose modified photophysical properties overcome some of the problems associated with traditional imaging agents.

Specifically, the successful synthesis and photophysical and biological studies of a neutral Re(I) species such as *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl] is described. Furthermore, the attempt to transform this species into the thiol selective agent *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃(Py)]⁺ is also reported.

Photophysical studies were performed for the complex *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl] by UV visible and fluorescence spectroscopy. Moreover, cytotoxicity of *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl] in human adenocarcinoma cervical cancer cells; HeLa cells, was analyzed, as well as the mutagenic potential via a Genotoxicity Ames Test. In addition to those studies, fluorescent microscopy was also performed to validate the complex as a potential contrast agent. These results succeed to demonstrate the promising future of this new class of imaging probes and therefore, this work represents the initial step in the growing area of the development of transition metal based imaging agents.

Resumen

Este trabajo describe el desarrollo de una nueva variedad de complejos luminiscentes de renio (I) del tipo *fac*-[Re(NN)(CO)₃L] donde NN representa un derivado de fenantrolina y L es una molécula de piridina o un grupo de cloruro, con una aplicación potencial en imagen celular y cuyas propiedades fotofísicas logran superar algunos de los problemas asociados a los agentes de imagen tradicionales.

En concreto, se detalla la síntesis y los estudios biológicos y fotofísicos de una especie Re(I) neutra como *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl]; además de su completa caracterización mediante técnicas espectroscópicas. También se detalla el intento de transformar esta especie neutra en el agente catiónico selectivo de grupos tiol; *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃(Py)]⁺.

Se realizaron estudios fotofísicos para la especie *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl] por espectrometría de UV visible y de fluorescencia. La citotoxicidad de *fac*-[Re(2,9-(CH₂Cl)₂-Phen)(CO)₃Cl] fue comprobada en células humanas de adenocarcinoma de cáncer de cérvix; células HeLa; así como su capacidad como agente mutagénico. Además de estos estudios, se hizo uso de microscopía de fluorescencia para validar el complejo como un potencial agente de contraste. Estos resultados demuestran el futuro prometedor de esta nueva clase de agentes de imagen y, por lo tanto, este trabajo representa un pequeño paso en la creciente área del desarrollo de agentes de imagen basados en metales de transición.

Introducción

En la actualidad la investigación de la medicina diagnóstica centra su atención en el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas como método de detección de biomoléculas individuales, componentes celulares e incluso en el tratamiento de enfermedades.

Tradicionalmente se han utilizado tintes orgánicos como el verde Malachite, la Flúoresceína, Rodamina, etc., los cuales permitían la tinción de manera específica de tejidos biológicos, células u orgánulos. Actualmente y ante la demanda de información más precisa a cerca de la distribución y procesos en los que están implicados fármacos, se está desarrollando nuevas técnicas, entre las que destaca la microscopía de fluorescencia; la cual, se está convirtiendo en una herramienta con un gran potencial para el seguimiento de medicamentos y como herramienta de diagnóstico. Se basa en la recepción de luz emitida por fluoróforos al volver a su estado fundamental de energía; este hecho permite la elucidación de la biodistribución y de las interacciones que establecen ciertos fármacos a nivel celular, **Figura 1.**¹

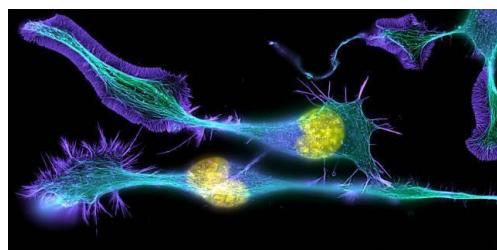


Figura 1. Células del sistema nervioso vistas por microscopía de fluorescencia.

Sin embargo uno de los mayores problemas que presenta esta técnica, es la escasa disponibilidad de especies químicas que presenten propiedades luminiscentes adecuadas. Generalmente los compuestos orgánicos, presentan propiedades fotofísicas con tiempos de vida media del estado excitado cortos, lo que nos supone un serio problema para emplearlos como agentes de visualización celular ya que impide emplear técnicas de visualización dependientes del tiempo (time-gating techniques) que reducen considerablemente la autofluorescencia de las propias muestras. Los avances en la última década han llevado al desarrollo de nuevos agentes luminiscentes entre los que destacan los puntos cuánticos (QDots) y complejos de lantánidos y metales de transición, en particular los de Re(I), Ru(II) e Ir(III).

Las propiedades fotoquímicas ideales para que una especie reúna las características necesarias para que pueda ser usada en procesos de visualización celular son:

- Grandes desplazamientos de Stokes; de este modo se previene la auto desactivación (self-quenching); es decir, la reabsorción emitida por fluoróforos vecinos; y para ser capaces de discernir entre la autofluorescencia y la emisión propia de un fluoróforo.²
- Tiempo de vida largos; así pues, podemos distinguir la señal deseada de la autofluorescencia (la autofluorescencia tiene una breve duración (~10ns)), mientras que los fluoróforos metálicos presentan tipos de vida de 100ns a ms.

- Alta penetración en el tejido irradiado. Las radiaciones en el UV presentan una baja capacidad de penetración y también pueden dañar los tejidos, mientras que las que se encuentran en el infrarrojo cercano (NIR) muestran una mayor penetración y transmisión en el tejido, lo que nos va a permitir visualizar estas especies fácilmente.

Para que se produzca la emisión de luz por fluorescencia y fosforescencia; es necesario que se produzcan los siguientes hechos, que se muestran esquemáticamente en el diagrama de Jablonski, **Figura 2**. Cuando una molécula es excitada a un estado electrónico superior S_1 , mediante la absorción de un fotón, también estará excitada vibracionalmente de acuerdo con el principio de Frank-Condon. La absorción es seguida de una rápida relajación vibracional, debido a las colisiones con otras moléculas, hasta el estado fundamental vibracional del estado electrónico excitado. Varios procesos de desactivación pueden tener lugar entonces (conversión interna, relajación vibracional...) hasta llegar al estado electrónico fundamental, esto es lo que se conoce como fluorescencia. La fluorescencia es por tanto un proceso muy rápido y que cesa a gran velocidad cuando no se le aplica radiación de excitación.

En algunos sistemas, se produce la emisión a tiempos considerablemente más largos y persiste después de que la radiación de excitación cese. Estos estados excitados tienen tiempos de vida muy largos y son metaestables; y solo pueden desactivarse mediante una transición prohibida. Este hecho se identifica a la fosforescencia. Además, para que este proceso de fosforescencia ocurra es necesario un cruce entre estados singlete y triplete, el cual se da con mayor facilidad en aquellas moléculas que tienen átomos pesados, hecho por el cual los complejos de metales de transición y lantánidos son ideales.

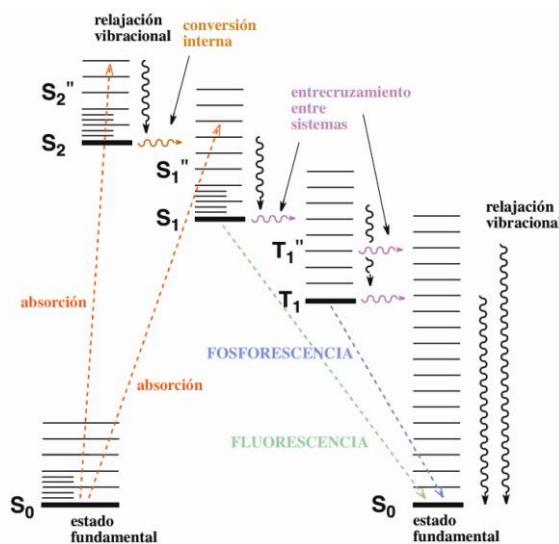


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

Además de las propiedades fotoquímica indicadas, es necesario que los agentes empleados en bioimagen cumplan ciertas premisas como son:

- Foto estabilidad y solubilidad en el medio de estudio.
- Baja toxicidad para el organismo.

- Absorción rápida en el interior celular; sin necesidad de recurrir a técnicas de electro permeabilización o la adición de agentes externos para aumentar la permeabilidad; ya que pueden interferir en el proceso en estudio.
- Localización específica en un determinado orgánulo celular.

En este sentido, los sistemas de metales de transición del bloque d, tienen unas propiedades fotoquímicas muy destacables y teniendo en cuenta la simplicidad de la química de estos compuestos serán la vía a seguir. Concretamente, los complejos de metales de transición d⁶ presentan unas características excepcionales como fluoróforos y unas propiedades más ventajosas que los colorantes tradicionales; ya que son estables en medio acuoso en presencia de oxígeno, tienen grandes desplazamientos de Stokes, tiempos de vida media largos, lo que permite que puedan ser visualizados en técnicas de visualización dependientes del tiempo, fácil modulación de las longitudes de onda de emisión en función del metal y los ligandos empleados y longitudes de onda de excitación generalmente superiores a 400nm.

En particular, los derivados de Re(I) de tipo *fac*-[Re(CO)₃(NN)X]^{0/+}, donde NN representa un ligando quelato tipo fenantrolina y X un derivado halogenado o un ligando monodentado nitrógeno dador tipo piridina, ofrecen la capacidad de modificación de modo independiente las características luminiscentes y biológicas. Distintos entornos del ligando quelato, cambiarán las propiedades emisoras del compuesto ya que la luminiscencia de este tipo de compuestos se debe a la transferencia de carga entre el metal y el ligando quelato (MLCT). Por lo tanto, modelar las propiedades biológicas del compuesto se puede hacer a través de distintas funcionalizaciones del ligando X. Un ejemplo de compuesto luminiscente de renio (I), es el que se muestra en la **Figura 3**, el cual está actuando como agente de bioimagen; estos complejos presentan una localización selectiva en las mitocondrias, que es comprobada al comparar éste con TMRE (tinte selectivo de mitocondrias).³

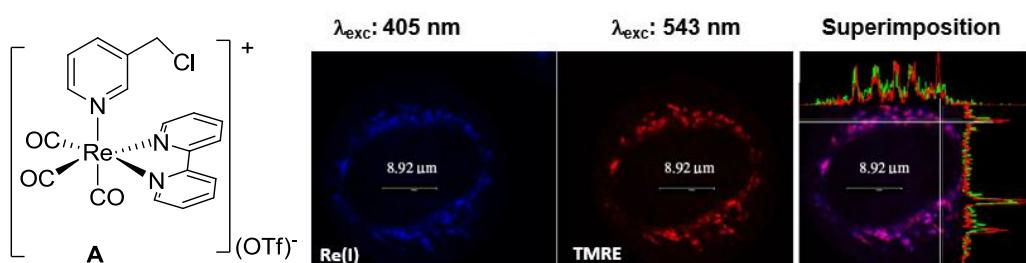


Figura 3. Localización de compuestos de renio (I) en mitocondrias.

Objetivos

Como consecuencia del gran impacto que están teniendo actualmente los complejos de renio (I) en el ámbito de imagen celular, con el objeto de ser usados como agentes de contraste debido a sus excelentes propiedades luminiscentes, han promovido el interés para desarrollar este trabajo; el cual se centrará en la síntesis de nuevos complejos luminiscentes de renio (I) que puedan servir para ampliar las opciones disponibles de agentes de contraste, teniendo como diana selectiva la mitocondria.

Los objetivos marcados son los siguientes:

1. Síntesis de un derivado de la fenantrolina contenido grupos cloruro de metileno.
2. Síntesis de compuestos luminiscentes de Re (I) del tipo *fac*-[Re(CO)₃(NN)X], donde NN representa el derivado de la fenantrolina descrito anteriormente y X es una molécula de piridina o un grupo cloruro.
3. Caracterización de los complejos obtenidos mediante las técnicas espectroscópicas habituales tales como resonancia magnética nuclear de protón y carbono e infrarrojo. En el caso que sea posible se realizará el estudio de la estructura de los mismos por difracción de rayos X.
4. Estudio y análisis de las propiedades luminiscentes. En primer lugar se trataran los espectros Vis-UV y, posteriormente, los espectros de emisión.
5. En base a los resultados experimentales anteriores se experimentará con estos complejos para comprobar su acción antitumoral mediante el ensayo MTT y su potencial mutagénico mediante el Test de Ames.⁴
6. Estudio de las posibles dianas biológicas y mecanismos de acción haciendo uso de la microscopía de fluorescencia confocal.

Al finalizar todos estos pasos se pretende alcanzar el ambicioso propósito de haber sintetizado uno o varios complejos de renio (I) bioespecíficos, que puedan ser usados como agentes de visualización en técnicas bioimagen como la microscopía de fluorescencia.

Resultados y discusión

Conocido el comportamiento del compuesto **A** descrito en la **Figura 3** como un agente de visualización selectivo de mitocondria, se intentará sintetizar un equivalente a este con unas propiedades ópticas mejoradas. Coogan y colaboradores han asociado esa bioespecificidad a dos condiciones, a) la presencia del grupo funcional cloruro de metileno, el cual es susceptible de reaccionar con grupos tioles y, b) al alto contenido de grupos tioles presentes en la mitocondria.³ Por ello, en este trabajo se propone la síntesis de un compuesto de Re(I) que contenga dicho grupo en su estructura y utilizando un ligando quelato diferente a bipiridina que pueda mejorar sus propiedades ópticas. En concreto se propone la síntesis específica de *fac*-[Re(CO)₃(L)py]⁺, donde **L** es 2,9-bis(clorometil)-1,10-fenantrolina, **Figura 4**.

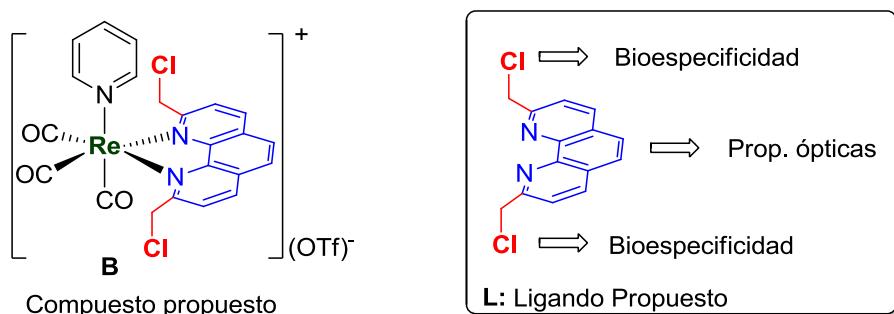
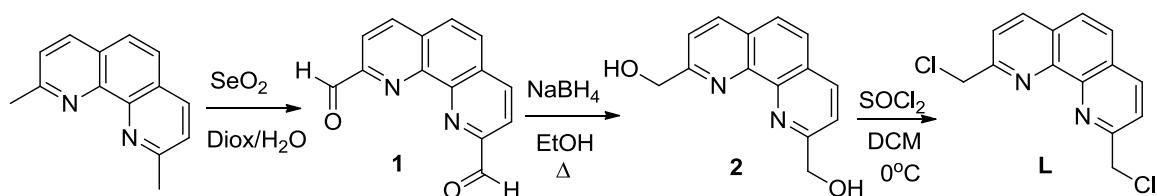


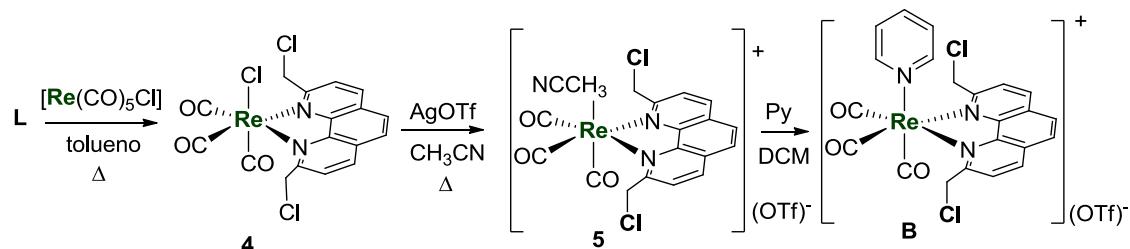
Figura 4. Compuesto deseado (**B**).

Para la obtención del compuesto **B** es necesario la síntesis previa del ligando fenantrolina funcionalizado con los grupos cloruro de metilo. La ruta sintética que se ha seguido para la obtención del ligando **L** es la representada en el **Esquema 1**, el cual ya ha sido descrita anteriormente por Alexander J. Blake y colaboradores.⁵ La síntesis implica una reacción inicial de oxidación de neocuprina al correspondiente derivado de aldehído, después su reducción formando la 2, 9-bis(hidroximetil)-1-10-fenantrolina seguida un paso de clorinación para la obtención de **L**.



Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de **L**

Una vez se haya sintetizado y caracterizado oportunamente el ligando **L**; se pasará a su coordinación al centro metálico y la obtención de **B** a través de la ruta sintética descrita inicialmente por Caspar y Meyer,⁶ **Esquema 2**. Esta síntesis que implica una reacción inicial de sustitución de dos ligandos carbonilo por el ligando quelato **L**, seguida de una reacción de abstracción del ligando cloro por un ligando menos coordinante y finalmente su sustitución por un ligando nitrógeno dador como piridina.



Esquema 2. Ruta sintética para la obtención del compuesto B

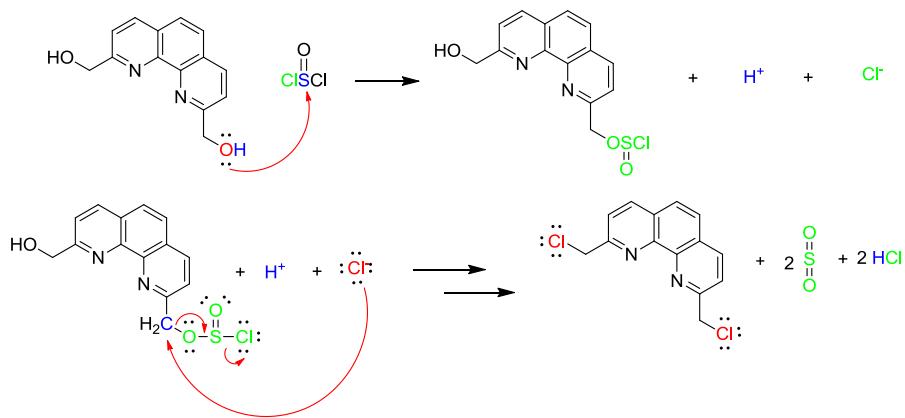
Se plantea así la idea de sintetizar un complejo de renio funcionalizado con un ligando, **L**, que presente un grupo clorometilo y que de este modo sea reactivo frente a grupos tioles y presenten selectividad por introducirse en el interior de la mitocondria, dejando los a los demás orgánulos en un segundo plano. Además, se busca que el complejo presente unos tiempos de vida, así como grandes desplazamientos de Stokes; para lo cual se ha incrementado la aromaticidad pasando de utilizar un ligando bipiridina, compuesto **A**, a un derivado de fenantrolina como ligando quelato, haciéndolo un candidato atractivo para ser usado en aplicaciones biológicas.

SÍNTESIS DEL LIGANDO **L**

El ligando **L** ha sido utilizado con anterioridad por Arca y colaboradores,⁷ para la síntesis de ligandos macrocíclicos que incorporaran átomos dadores tales como N, S u O. En nuestro caso **L** será el encargado de otorgar la bioespecificidad al complejo final. Su gran facilidad para reaccionar con grupos tioles o aminas será clave para conseguirlo.

Su síntesis se hace partiendo del reactivo comercial, neocuprina. En primer lugar se llevó a cabo un proceso de oxidación para conseguir funcionalizar los grupos metilos presentes en la neocuprina; para lo cual se usó SeO_2 como oxidante. El paso siguiente consistió en una reducción del aldehído generado; para lo cual se eligió como reductor borohidruro de sodio, siguiendo la misma ruta sintética utilizada por Arca y colaboradores. Así pues se consiguió obtener la especie **2**, con un bajo rendimiento debido a las dificultades que tuvimos para separar el etoxiborohidruro de sodio y la posterior purificación de la especie **2**.⁸

El último paso que se llevó a cabo fue la sustitución nucleófila del grupo hidroxilo por un cloruro, para lo cual se uso cloruro de tionilo en atmósfera de argón y a una temperatura de 0°C ; esta reacción sigue el siguiente mecanismo descrito en el **Esquema 3**.



Esquema 3. Mecanismo de reacción.

Una vez se ha completado la reacción es necesario un proceso de neutralización para de este modo eliminar el HCl generado. Tras sucesivos lavados con ether, así como extracciones líquido líquido usando una solución de NaHCO₃ al 5%, se consiguió obtener la especie L con un rendimiento de 71,7%. A modo de ejemplo la **Figura 5** muestra el RMN de ¹H (cloroformo-d) de L y su precursor compuesto 2, donde se observa claramente como la señal perteneciente a los protones de la fenantrolina se han desplazado hacia campos más bajos; es decir, presentan mayores desapantallamientos demostrando así el éxito de la reacción de sustitución.

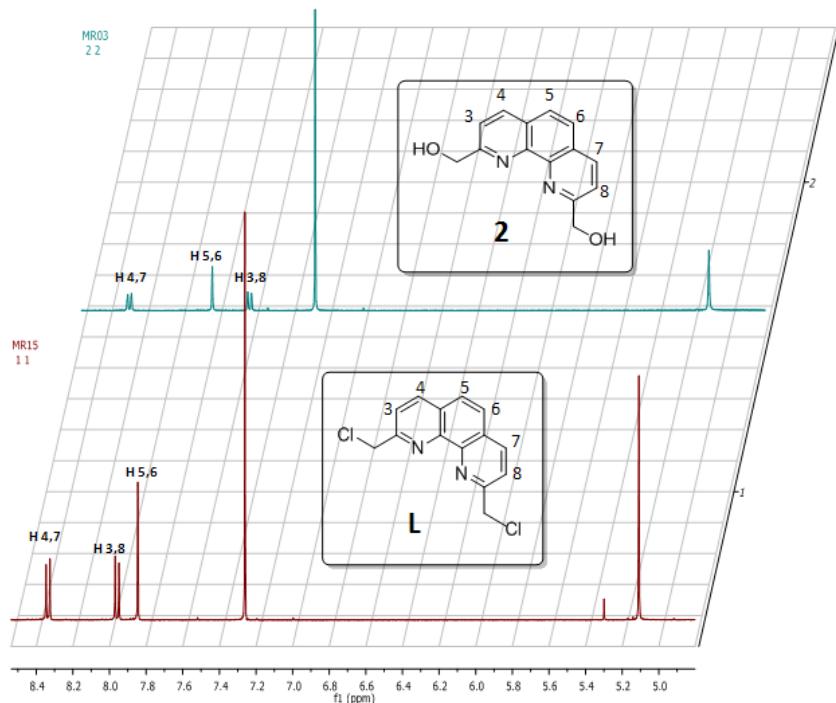


Figura 5. Comparativa de espectros ¹H-RMN. En la parte de arriba se observa el espectro de la especie 2 y abajo el correspondiente a la especie L.

SÍNTESIS DE COMPLEJOS

Para la obtención del complejo **B** se plantea la ruta sintética mostrada en el **Esquema 2**. Así pues, en primer lugar se hizo reaccionar el ligando **L** con cloruro de pentacarbonilo renio (**I**) en tolueno a reflujo. Tras 9 horas de reacción se formó un sólido amarillo que se aisló por filtración, el complejo **4**, con un rendimiento del 73%. Como era de esperar, de los dos isómeros posibles, el isómero meridional y facial, se ha obtenido únicamente este último. La disposición facial de los ligandos carbonilos quedó patente al observar la simetría de las señales correspondientes a **L** en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, dando únicamente 4 y 7 señales respectivamente, que confirman la existencia de un plano de simetría que pasa por el ligando quelato, ver **Figura 6**. Además, estudios por espectroscopía infrarroja y masas confirman la obtención de **4**.

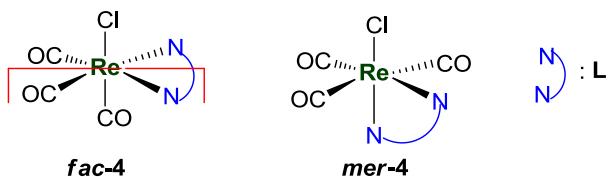


Figura 6. Disposición de los ligandos CO.

Una vez caracterizado se usó como compuesto de partida a partir del cual por desplazamiento el grupo cloruro del centro metálico e inserción de piridina, se obtendría el complejo catiónico **B**.

Este proceso, transcurre en dos reacciones sucesivas. La primera de ellas, hace uso de triflato de plata, reactivo con el cual se busca la abstracción del grupo cloruro, que precipita en forma de AgCl. La vacante de coordinación será cubierta por acetonitrilo, el disolvente usado en esta reacción por sus capacidades coordinantes y el anión OTf⁻ estabiliza el complejo catiónico resultante. Este proceso tiene una cinética lenta por lo que necesita 10 horas hasta que la reacción se ha completado; este hecho se comprueba mediante ¹H-RMN, tal y como se muestra en la **Figura 7** donde se puede observar que la señal correspondiente a los protones correspondientes a la fenantrolina se han desplazado hacia un campo más bajo con respecto al producto de partida una vez se completa la reacción.

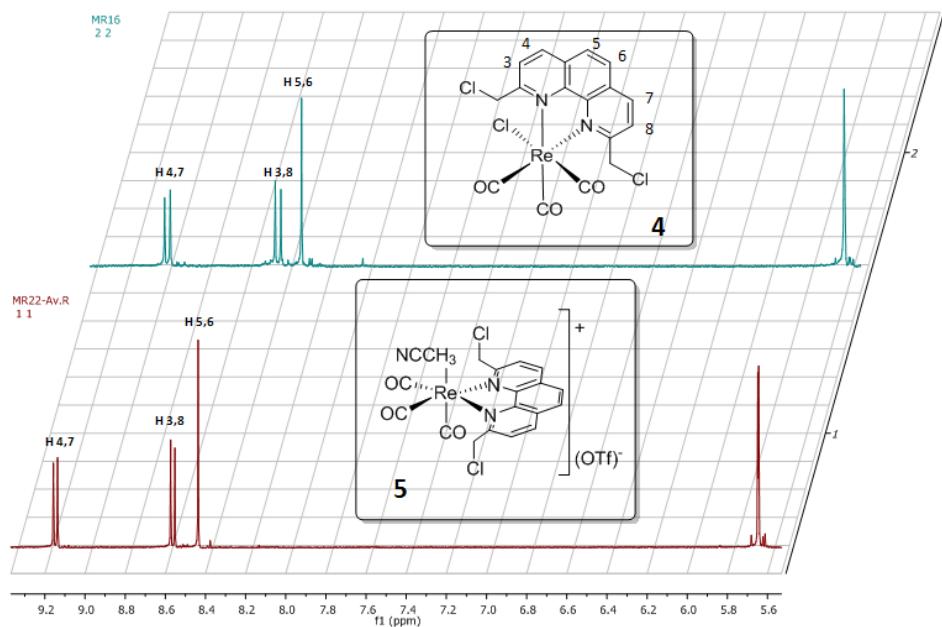


Figura 7. Comparativa de espectros ^1H -RMN. En la parte de arriba se observa el espectro del complejo 4 y abajo el correspondiente a la especie 5.

En este punto se plantearon diversos métodos de síntesis para la obtención del complejo **B**. En un primer momento, se optó por eliminar del medio el cloruro de plata precipitado por filtración sobre tierra de diatomeas, y llevar el compuesto **5** a sequedad para realizar un cambio de disolvente, diclorometano, y añadir directamente 1,5 equivalentes de piridina. Sin embargo transcurridas 24 horas de agitación a temperatura ambiente, la reacción no se había completado, y se obtenían mezclas de productos, por lo que se planteó trabajar con un mayor exceso de piridina. Concretamente, en la segunda ruta se trabajó con una relación molar 1:5 (**5**:L), usando nuevamente diclorometano como disolvente, en esta ocasión la reacción también se siguió por ^1H -RMN y se comprobó que pasadas 5 horas, el producto se empezaba a descomponer.

Por último, se intentó realizar la reacción usando 5 equivalentes de piridina, en THF a reflujo, y comprobar el avance de la reacción usando ^1H -RMN. En esta ocasión sí se pudo obtener el complejo **B** por precipitación con dietil eter, tal y como muestra el espectro de la **Figura 8**. Lamentablemente su purificación no fue posible pese a realizar sucesivas precipitaciones y lavados con hexano y éter para intentar separarlo del gran exceso de piridina en el que se encontraba embebido. Debido a este hecho, los estudios de propiedades ópticas y de actividad biológica se llevan van a llevar a cabo usando exclusivamente el complejo **4**.

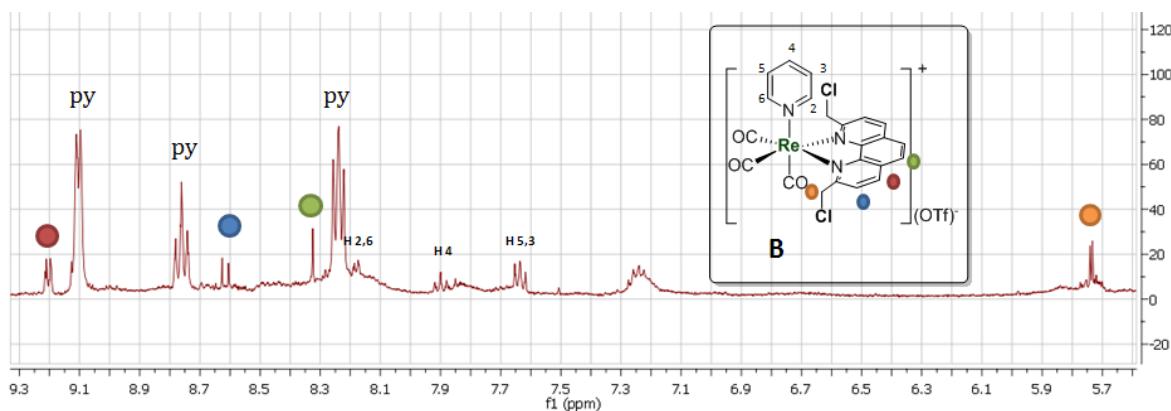
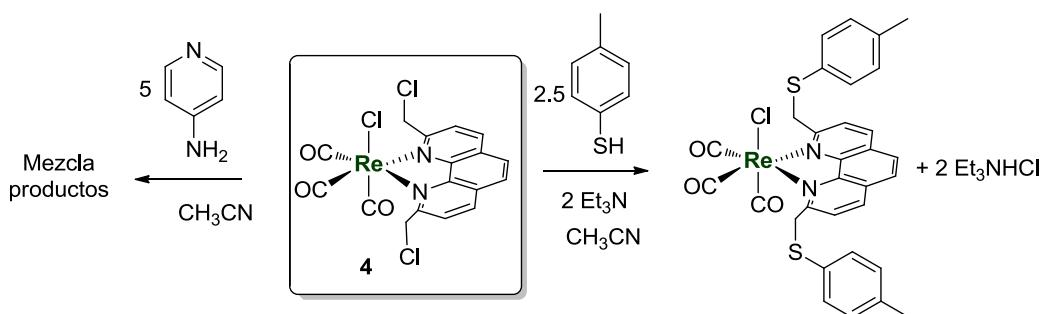


Figura 8. Espectro del compuesto B.

REACTIVIDAD FRENTE A LIGANDOS N- Y S- DADORES

Se ha estudiado por espectroscopía de RMN de ^1H si efectivamente el compuesto **4** es susceptible de reaccionar con compuestos N- y S- dadores. Para ello se han elegido como nucleófilos tipo el 4-(aminometil)piridina, 4-metilbencenotiol, un ligando N-dador y S-dador respectivamente. Los dos experimentos se han realizado directamente en un tubo de RMN, donde se ha introducido el compuesto **4** y a continuación se le ha añadido el nucleófilo correspondiente y Et_3N en el caso del compuesto de tiol para facilitar y capturar así el cloruro liberado, **Esquema 4**. Una vez adicionadas las cantidades adecuadas, las reacciones se sometieron a agitación en baño de ultrasonidos durando 5 minutos su avance.



Esquema 4. Estudio de reactividad

Así pues se pudo comprobar que la reacción en la cual se usó 4-metilbencenotiol se había completado con éxito, en menos de 1 hora; no ocurre así con 4-(aminometil)piridina la cual al cabo de 24 horas mostraba una mezcla de productos que no se han podido identificar, ver **Figura 9**. Demostrando así que el compuesto **4** es susceptible a reacciones de sustitución nucleófica con compuestos N y S-dadores siendo este último el que ofrece una mejor afinidad.

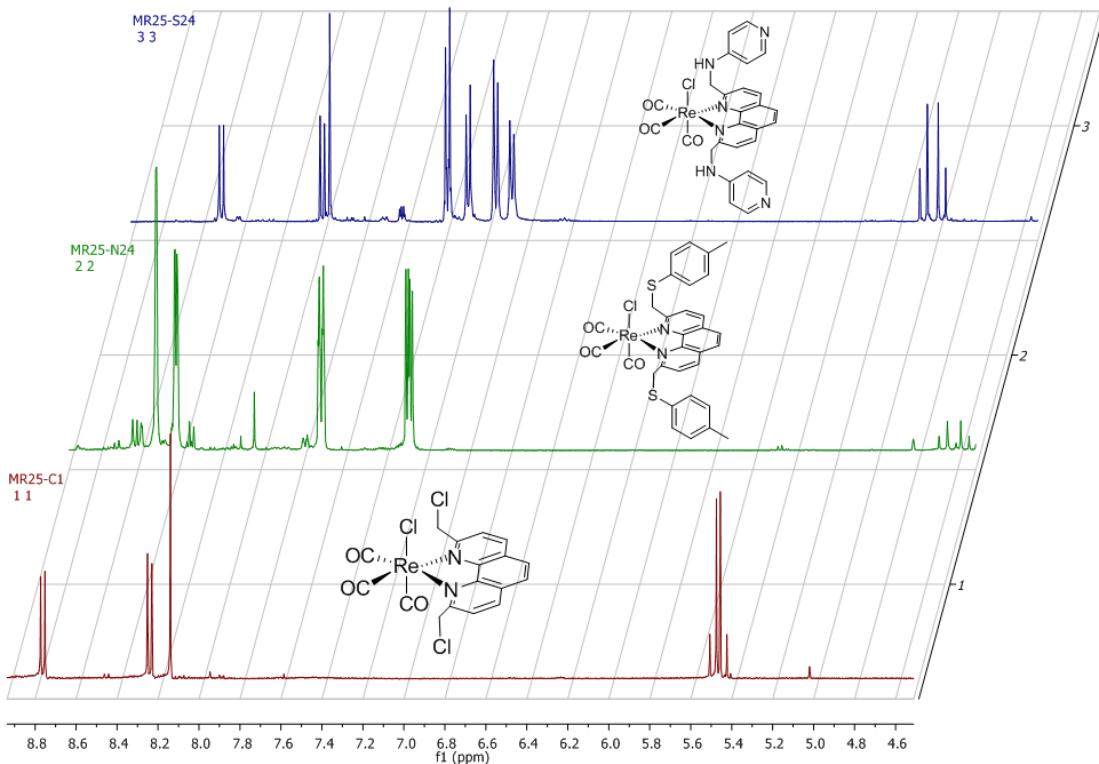


Figura 9. Comparativa de espectros ¹H-RMN. De arriba a abajo; espectro con el compuesto S-dador, a continuación, N-dador y compuesto 4.

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS

Uno de los objetivos de este trabajo residía en la síntesis de compuestos con capacidad de poder ser utilizados en técnicas de bioimagen. Tal y como se comentó con anterioridad, las propiedades ópticas residen básicamente en el fragmento contenido Re-L, ya que la luminiscencia de estos compuestos se debe normalmente a una transición de carga del metal al ligando (MLCT). Para comprobar esto, se realizó el estudio de las propiedades fotofísicas, donde se midió el espectro de absorción y de emisión del complejo **4** a temperatura ambiente y en una disolución de dimetil sulfóxido. De acuerdo con estudios fotofísicos previos realizado en compuestos análogos de renio (I) las bandas de absorción intensa observadas alrededor de 285 nm han sido asignadas a las transiciones intraligando (¹IL)($\pi \rightarrow \pi^*$ (derivado quelato)). Por otro lado, las absorciones observadas en torno a 368 nm se corresponden con las transiciones de transferencia de carga del metal al ligando (¹MLCT)(d π (Re) $\rightarrow \pi^*$ (N-N)). La **Figura 10** muestra el espectro de UV-visible del complejo **4**. Como era de esperar, por espectroscopía de fluorescencia también se observó una banda de emisión ancha con un máximo en 578 nm con un tiempo de vida media de 30 ns que se puede atribuir a un proceso de fosforescencia ³MLCT.⁹

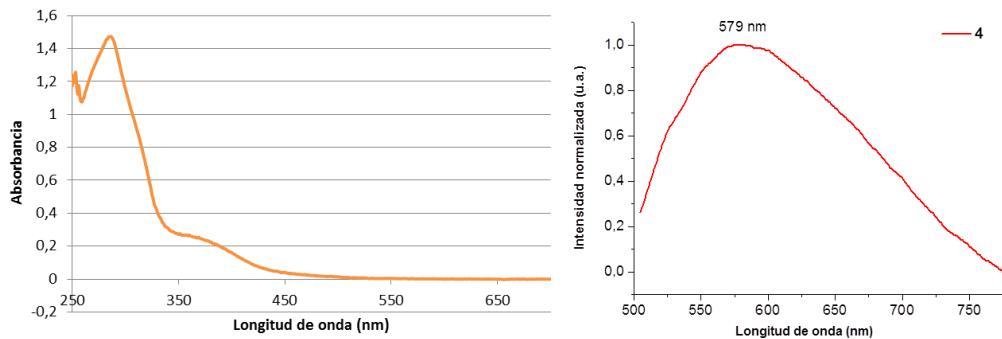


Figura 10. Espectro de absorción y emisión del compuesto 4.

El complejo **4** es susceptible de reaccionar con compuestos N- y S- dadores, lo que podría llevar a un cambio de sus propiedades ópticas por afectar directamente a la estructura del ligando quelato que es el que mayormente se encuentra implicado en el proceso de emisión. Por ello se analizó su comportamiento fotofísico en presencia de dos compuestos tipo, propilamina y octanotiol, elegidos específicamente por no tener grupos cromóforos que puedan enmascarar la luminiscencia del complejo **4**. La Figura 11 muestra los espectros de emisión del compuesto **4** una vez añadido distintas cantidades de los dos nucleófilos. En ambos casos se observa un desplazamiento del máximo de emisión a altas energías 546 nm, que en el caso de la propilamina llegaría a 515 nm al saturar la muestra, mientras con la adición del octanotiol se mantiene constante a 546 nm. Además también se observa que el paso del tiempo también es un factor que favorece el incremento de intensidad de emisión, para lo cual no se tiene todavía una explicación pero que es indicativo de la robustez del compuesto en estas condiciones, ya que si se estuviese produciendo fragmentación de algún ligando lo veríamos mediante la desaparición de la banda de emisión.

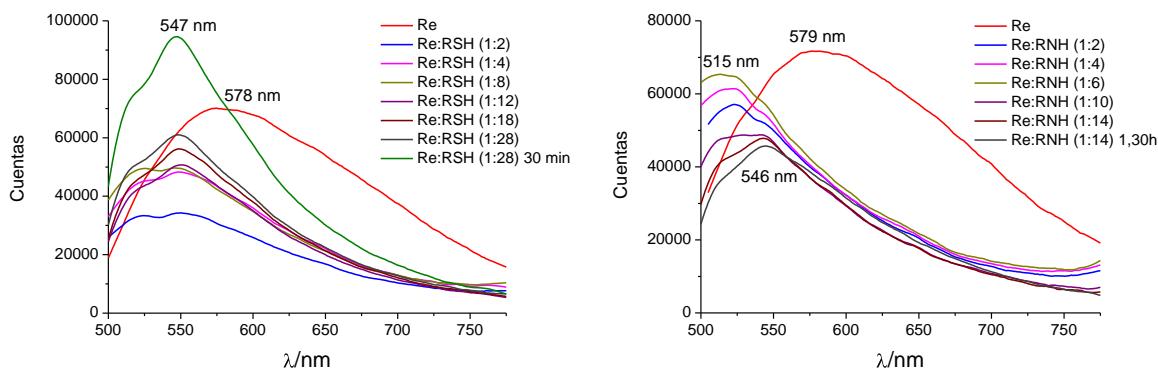


Figura 11. Longitudes de onda a las que aparecen los máximos de emisión a diferentes concentraciones de reactivos N-, S- dadores.

ANÁLISIS DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La actividad biología fue estudiada para la especie **L** y el complejo **4**; para de este modo comprobar cómo afecta a las propiedades biológicas la coordinación al centro de renio. Concretamente, se ha analizado la citotoxicidad utilizando el Test MTT, su capacidad

mutagénica por medio del Test de Ames y por último, su comportamiento como agente de contraste valiéndose de la técnica de microscopía de fluorescencia.

Para la determinación de la toxicidad mediante el método MTT, se sembraron en una placa de 96 pocillos células de HeLa (adenocarcinoma de cuello de cérvix) en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 100 μ l). Estas células se cultivaron durante 24 horas, a 37°C y en atmósfera con un 5% de CO₂. A continuación se adicionó a cada pocillo (con aproximadamente 15000 células HeLa) diferentes concentraciones de las especies **L** y el complejo **4** (200, 100, 50, 25 y 12,5 μ M), que se prepararon a partir de una disolución stock de 100 mM. La primera fila de la placa de 96 pocillos se reservó para ser usada como control, al cual solo le fue añadido 100 μ l de medio de cultivo, sobre las células ya cultivadas. En las filas siguientes se añadieron 100 μ l de las distintas disoluciones preparadas de los compuestos a analizar (**L** y complejo **4**). Por último, se añadió 200 μ l de medio de cultivo a otra fila, en la cual no se habían sembrado células y así se usó como blanco. Para comprobar la citotoxicidad de nuestros compuestos, se estudió en la misma placa los efectos de la doxorrubicina; un fármaco de la familia de las antraciclinas que es usado como tratamiento contra el cáncer desde 1970, **Figura 12.**¹⁰

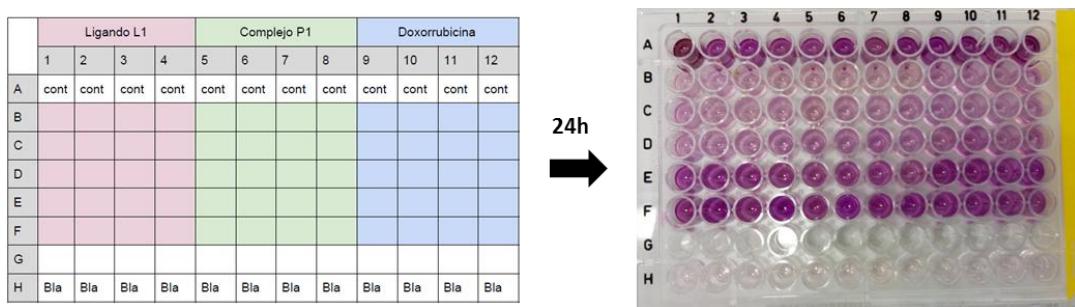


Figura 12. Esquema de la placa de 96 pocillos usada en el Test MTT.

Tras 24 horas de cultivo, se visualizaron los distintos pocillos usando un microscopio óptico y se observa un cambio notable en la morfología de las células a medida que aumenta la concentración de los compuestos a estudio, hecho indicativo de una posible muerte celular. De arriba abajo y de izquierda a derecha en la **Figura 13** podemos ver: Control, donde tenemos un gran número de células viables; **L** a concentración de 50 μ M, ya pueden observarse las primeras células que entran en procesos de muerte celular, pero aún son visibles las células que mantienen su actividad; **L** en una concentración de 100 μ M, solo vemos las células inmersas en el proceso de apoptosis; las dos últimas imágenes corresponden al complejo **4**, en concentraciones de 50 y 100 μ M respectivamente; como se puede observar, el número de células es muy inferior al que se podía ver en las otras imágenes y todas ellas están en plena senescencia celular.

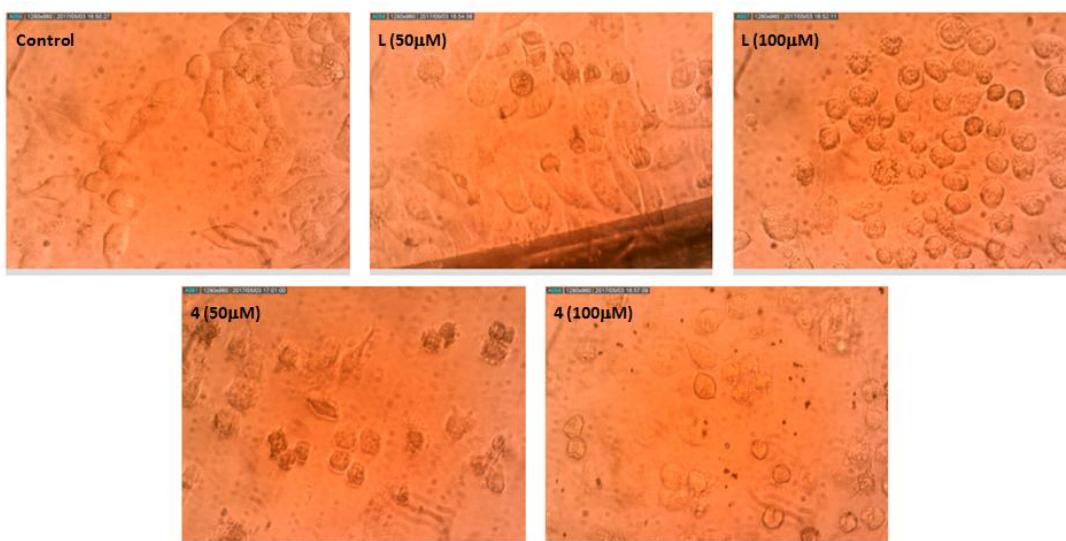


Figura 13. Morfología celular tras 24 horas de cultivo.

Para confirmar los hechos observados cuantitativamente, se añadió a cada pocillo 10 μ l de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de concentración 5 mg/ml, se agitó la placa y se dejó incubar durante dos horas. De esta manera, todas las células que continúen siendo viables reducirán metabólicamente al MTT por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa generando un compuesto de color purpura- azul, el formazán.

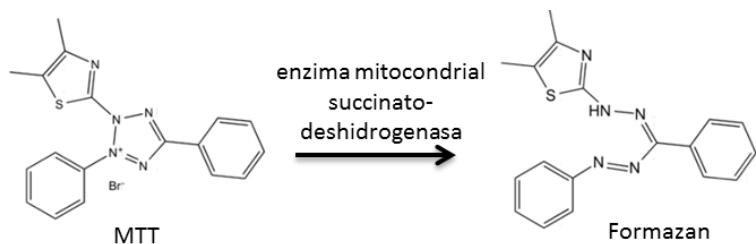


Figura 14. Reacción que sufre el MTT.

Tras centrifugar durante 10 min, se eliminó el medio de cultivo y se adicionó a cada pocillo 100 μ l de DMSO. Por último, se midieron las absorbancias a 550 nm haciendo uso de un lector de placas, para de este modo cuantificar la viabilidad celular.

La representación del % de proliferación celular frente a la concentración de compuesto en cada pocillo revela el valor IC_{50} ; es decir, la concentración necesaria que hay que añadir del compuesto a estudio para conseguir una inhibición celular del 50%. La cual se calcula aplicando la expresión descrita en la **Figura 15**. El valor calculado de IC_{50} para **L** 20 μ M, mientras que el del complejo **4** es de 17 μ M; por lo que queda demostrado un ligero aumento de la capacidad citotóxica al producirse la coordinación sobre el centro de Re (I). Estos valores son superiores al encontrado para la doxorrubicina, 14 μ M, sugiriendo que no tiene una actividad citotóxica tan elevada como el fármaco comercial.

$$\% \text{ células viables} = \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}} \cdot 100 \right)$$

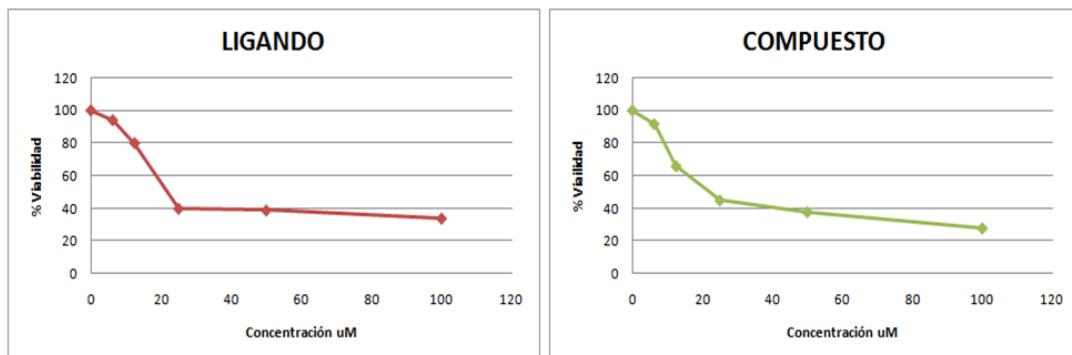


Figura 15. Curvas de viabilidad frente a concentración de compuesto.

A continuación, se realizó el análisis de las capacidades mutagénicas de los compuestos **L** y **4**; es decir, de producir daño en el DNA, mediante el test de Ames. El procedimiento general consiste en usar varias cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* alterada genéticamente, de modo que presentan mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina (auxótrofas en histidina). Esta mutación es debida a un único nucleótido, por lo que es fácilmente reversible. El ensayo pone a prueba la capacidad del mutágeno para provocar una alteración genética en las bacterias que permita el retorno al crecimiento en un soporte libre de histidina. En nuestro caso, se utilizó como cepa la *Escherichia coli* *WP2*, una bacteria no patógena, mutada en el gen *trpE* para que no pueda sintetizar triptófano (auxótrofas en triptófano). Además, la cepa *WP2* es susceptible de adquirir mutaciones ya que es deficiente en algunos de los sistemas de reparación de DNA propios de *E. coli*. Así pues, se considera mutágeno a los compuestos que provocan la aparición de un número de colonias 2-3 veces superior al control. Como podemos ver en la **Figura 16**, solo podemos considerar como mutágeno el compuesto **4**, puesto que es el único donde vemos una gran proliferación celular, consecuencia de su capacidad para provocar cambios en el material genético de las bacterias.

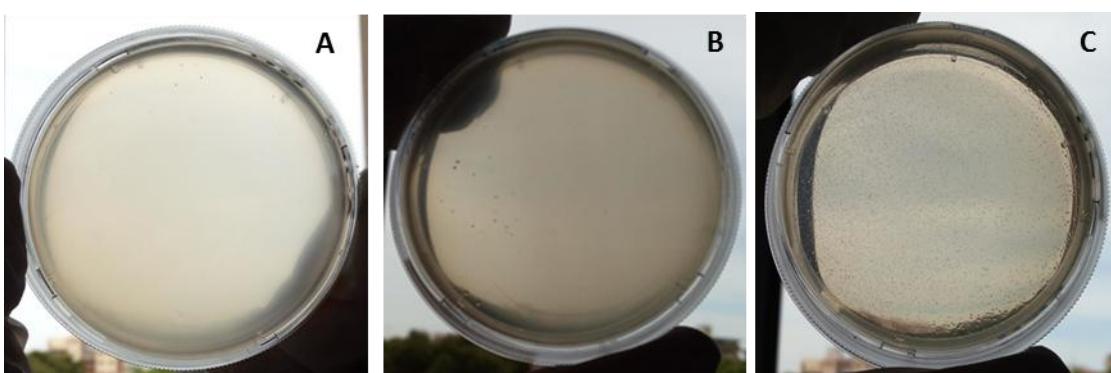


Figura 16. Recuento del número de colonias. A (Control), B (compuesto L) y C (complejo 4).

Por último, se realizó un experimento de colocalización para analizar la posible acumulación de los compuestos **L** y **4** en las células HeLa. Para ello se marcaron los números con colorante comercial Hoechst 33342. Se sembró una placa de 6 pocillos con células HeLa sobre un cubreobjetos; tras un periodo de incubación, se dejó un pocillo

como control (cuyo único contenido era DMEM) y sobre el resto se añadió 4 μ l de los compuestos a estudio, de modo que la concentración a la que se encontraban nuestros compuestos es a 48,6 μ M L y 67,3 μ M el compuesto **4**. Tras 24 horas se recuperaron los cubreobjetos con ayuda de unas pinzas y se eliminó el disolvente excedente; a continuación, se añadió el colorante Hoechst 33342. Por su capacidad de tinción de DNA se emplea para la visualización de núcleos excitándolos con luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm y emitiendo fluorescencia de color azul/cian con un máximo en las proximidades de 460 nm. Se deja incubar nuevamente durante una hora, tras este periodo, las células son observadas a través de un microscopio de fluorescencia. La **Figura 17** muestra la emisión de las células incubadas con L (A), con el compuesto **4** (B utilizando un filtro azul y C utilizando un filtro verde de emisión) y no cabe duda que en el caso del compuesto **4** este se localiza en el mismo orgánulo que el tinte comercial, el núcleo. Para confirmar que esta es la localización real del compuesto **4** se realizó otro experimento de colocalización esta vez utilizando un microscopio de fluorescencia confocal en el cual se puede elegir específicamente el fluoróforo que se quiere excitar.



Figura 17. Visualización de núcleos celulares por microscopía de fluorescencia. A: células incubadas con L y visualizadas con el filtro azul, B: células incubadas con 4 y visualizadas con el filtro azul y C: células incubadas con 4 y visualizadas con el filtro verde.

En este caso el experimento de colocalización se realizó utilizando células A549, células cancerígenas de pulmón. El compuesto **4** se incubó durante 4 horas utilizando una concentración final próxima a la de su IC_{50} , 20 μ M, para evitar una posible muerte celular o que esta perciba la presencia un agente externo que haga que active algún mecanismo de protección. De esta forma se asegura que se puede observar el comportamiento celular del agente de imagen. Una vez más se utilizó como patrón interno el tinte de núcleo (Hoechst 33342) que se excita específicamente a una longitud de onda de 405 nm y que no interfiere con la emisión del compuesto **4** ya que este se excita a 473 dando una emisión en torno a 550 nm. La **Figura 18** muestra claramente como en este caso no existe colocalización de ambos fluoróforos. Mientras que el Hoechst se localiza en el núcleo (**A**) el compuesto **4** entra en la célula pero no consigue penetrar en esa región, sino que se sitúa en orgánulos cercanos a la membrana celular (**B**), que se podría pensar que son la mitocondria debido a esta disposición y a la predisposición de **4** por reaccionar con grupos tioles, grupos presentes en gran concentración en estos orgánulos. Otra información que se deduce de este experimento es que en este caso las células en este caso se encuentran en perfecto estado de viabilidad, ver **Figura 18 (C)**. La discrepancia en la localización del compuesto **4** entre este experimento de colocalización y el anterior, seguramente es debida a que en el primer caso se han utilizado concentraciones demasiado elevadas (48,6

μM **L** y $67,3 \mu\text{M}$) el compuesto **4** y tiempos de incubación muy largos (24h frente a 4h). Cuando esto ocurre la integridad de las membranas celulares se ve comprometida y hace que sean más permeables y que los compuestos tengan la posibilidad de acumularse en el núcleo. Este hecho ha sido observado anteriormente por nuestro grupo de investigación con compuestos heterometálicos de Re(I)/Au(I);¹¹ así como por otros trabajos publicados en relación a complejos metálicos como agentes de visualización.¹²⁻¹⁶

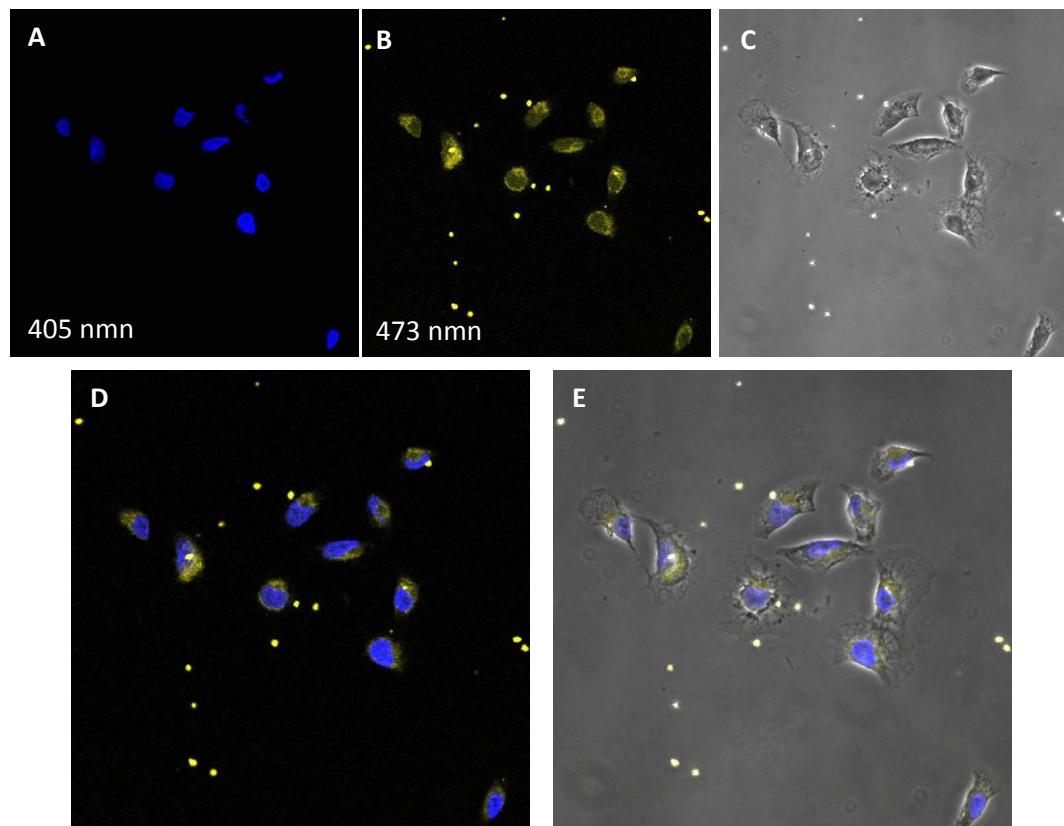


Figura 18. Visualización de la morfología celular.

Parte experimental

INSTRUMENTACIÓN Y CONDICIONES

Los espectros de ^1H , ^{13}C { ^1H }, 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). En ellos, los desplazamientos químicos, δ (ppm), se han asignado utilizando como referencia los picos residuales del correspondiente disolvente deuterado: acetona, cloroformo, acetonitrilo.

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} .

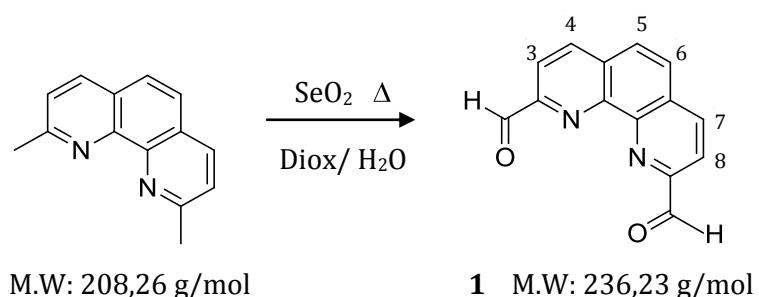
Los estudios de excitación y emisión se realizaron en un espectrofotómetro Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11, y los de absorción en un espectrofotómetro Evolution 600 empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud. En ambos casos en disolución de diclorometano a 298 K. Las imágenes de biodistribución 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 y 473 nm.

Los estudios de actividad biológica se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Se utilizó una estufa Jouan IG50 que se mantuvo a 37 °C y 5 % de CO₂ 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: $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ y neocuproina.

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 1 (1,10-fenatrolina-2,9-dicarbaldehido)



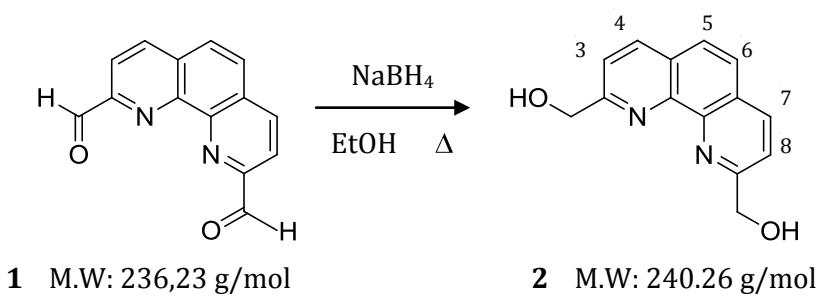
A una disolución de neocuproina (3,452 g; 16,60 mmol) en dioxano (6,9 ml) con un contenido en agua del 4%, se le añade SeO_2 (4,572 g; 41,50 mmol), la mezcla se agita

vigorosamente y es sometida a reflujo durante 4 horas. A medida que transcurre la reacción la disolución se torna rojiza. Pasado el tiempo de reacción, se realiza una filtración en caliente, con el objetivo de eliminar el dióxido de selenio restante; a las aguas de filtrado se les añade éter para favorecer la precipitación del compuesto **1**.

(η =80,7%; 3,1642 g; 13,39 mmol).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.56 (da, J = 0.9 Hz, 2H, CHO), 8.52 (dd, J = 8.2, 0.9 Hz, 2H, CH (4,7)), 8.39 (d, J = 8.2Hz, 2H, CH (3, 8)), 8.05 (s, 2H, CH (5, 6)).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 2 (2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina)

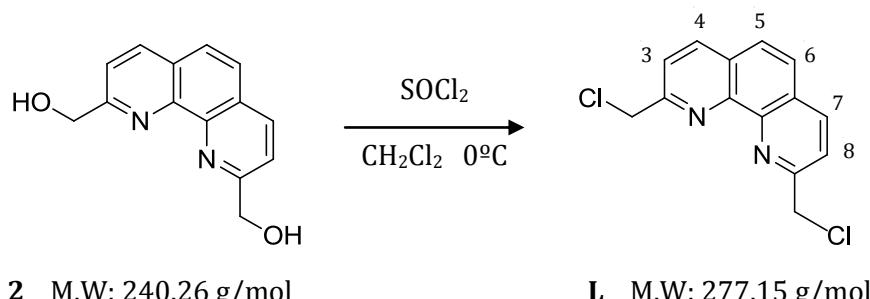


El aldehído resultante en la reacción anterior (446,3 mg; 1,89 mmol) se disuelve en etanol (5 ml) y sobre esta se va añadiendo lentamente y con agitación $NaBH_4$ (146,9 mg; 3,88 mmol); el cual había sido previamente solubilizado en etanol (3ml). La mezcla de reacción se deja a reflujo durante dos horas, obteniendo una disolución amarilla cuando la reacción se ha completado. Para eliminar posibles impurezas se filtra la disolución a través de un filtro de pliegues. El filtrado resultante se lleva a sequedad, quedando de este modo un sólido amarillo apelmazado, para limpiarlo, se procede a realizar una recristalización en caliente con agua; a continuación se filtra y se seca por aspiración a vacío.

(η = 32,2%; 146,1 mg; 0.608 mmol).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ , 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 2H, CH (4, 7)), 7.82 (s, 2H, CH (5, 6)), 7.62 (d, J = 8.3, 2H, CH (3, 8)), 5.11 (s, 4H, CH_2OH).

SÍNTESIS DEL COMPUESTO L (2,9-bis(clorometil)-1,10-fenantrolina)

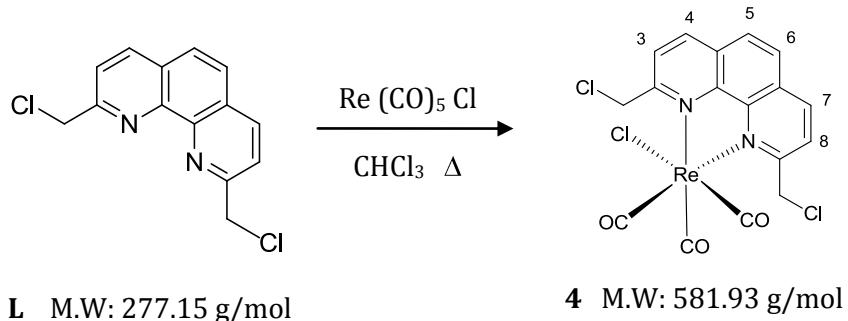


La reacción se lleva a cabo en atmósfera inerte y medio anhidro. Se disuelve el alcohol **2** (146,1 mg; 0.608 mmol) en cloruro de metileno seco (2.25 ml), se lleva la mezcla a 0°C. A continuación, una vez que se ha alcanzado dicha temperatura, se adiciona cloruro de tionilo (0.222 ml; 3.04 mmol) y se deja reaccionar 2 horas. Se observa así la aparición de un precipitado amarillo; se le añade hexano para favorecer la precipitación. Se elimina el disolvente por decantación y se lava el precipitado con éter. El sólido se seca con la bomba y se disuelve en diclorometano; esta disolución se neutraliza con una de NaHCO_3 al 5%, permitiendo así la completa solubilización. Se realiza una extracción líquido-líquido, donde se extrae la fase orgánica y se anhidrifica con Na_2SO_4 . Filtración a vacío y secado por succión.

($\eta=71,73\%$; 99 mg; 0.4361 mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.34 ($d, J=8.3$ Hz, 2H, CH (4, 7)), 7.96 ($d, J=8.3$ Hz, 2H, CH (3, 8)), 7.85 (s, 2H, CH (5, 6)), 5.11 (s, 4H, CH_2Cl).

SÍNTESIS DEL COMPLEJO **4** (Fac-[$\text{ReCl}(\text{CO})_3\text{L}$])



El compuesto **L** (120,6 mg; 0,531 mmol) y cloruro de pentacarbonil renio (I) (192,2 mg; 0,531 mmol) se disuelven en 5 ml de cloroformo. La mezcla se refluje durante 9 horas dando lugar a un precipitado amarillo. Este sólido en suspensión se separa mediante filtración a vacío y posterior secado por succión.

($\eta=72,9\%$; 206,5 mg; 0,387 mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.98 ($d, J=8.4$ Hz, 2H, CH (4, 7)), 8.43 ($d, J=8.4$ Hz, 2H, CH (3, 8)), 8.30 (s, 2H, CH (5, 6)), 5.61 (da, 4H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 161.42 (C (2,9)), 148.98 (C (4b, 6b)), 141.79 (C (4, 7)), 131.69 (C (4a, 6a)), 128.94 (C (5, 6)), 127.12 (C (3, 8)), 50.51 (CH_2Cl).

IR (solido, cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$): 2018, 1884.

Conclusiones

- I. Este trabajo presenta la síntesis de complejo de Re (I) del tipo *fac*-[Re(NN)(CO)₃L] donde NN representa un derivado de fenantrolina y L es un cloruro. Además, se han sintetizado los derivados de fenantrolina, 1,10-fenantrolina-2,9-dicarbaldehido (**1**), 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (**2**) y (2,9-bis(clorometil)-1,10-fenantrolina) (**L**); este último, se ha empleado para formar el complejo *fac*-[Re (CO)₃(L)Cl] (**4**) y se intentó obtener sin éxito, *fac*-[Re(CO)₃(L)Py]⁺.

Todos los derivados de fenantrolina se han caracterizado por espectroscopía de ¹H-RMN. Excepto la especie, complejo **4** que fue caracterizada también mediante ¹H, ¹³C-NMR e IR. Por otra parte, también se realizó espectroscopía bidimensional HSQC para asegurar las asignaciones correctas de las señales de H y C.

Se comprobó mediante estudios de ¹H-RMN que la especie **4** es susceptible a reaccionar con compuestos N- y S- dadores, mostrando una mayor afinidad por estos últimos.

- II. Las propiedades fotofísicas del complejo **4**, han sido estudiadas por espectroscopía de fluorescencia y visible-UV. El experimento de absorción UV reveló que la especie mostraba un comportamiento que está en concordancia con el perfil de absorción típico de especies de Re(I), es decir, una banda intensa en 285 nm asignada a transiciones IL($\pi \rightarrow \pi^*$) del ligando y una banda ancha menos intensa a 378 nm asignada a una transición ¹MLCT.

Por otra parte, la espectroscopía de fluorescencia mostró una banda de emisión intensa a 578 nm, que se asocia a una transición ³MLCT. Esta emisión se desplaza a mayores energías (546 y 515 nm) en presencia de compuestos con grupos N- y S-dadores demostrando así la interacción de estos grupos con el compuesto **4**.

- III. Los estudios de citotoxicidad del compuesto **4** y el ligando **L**, realizados en células HeLa muestran que ambos tienen una toxicidad parecida, siendo ligeramente superior en el caso del compuesto **4** (IC₅₀ (**4**)= 17 μ M, IC₅₀ (**L**)= 20 μ M).

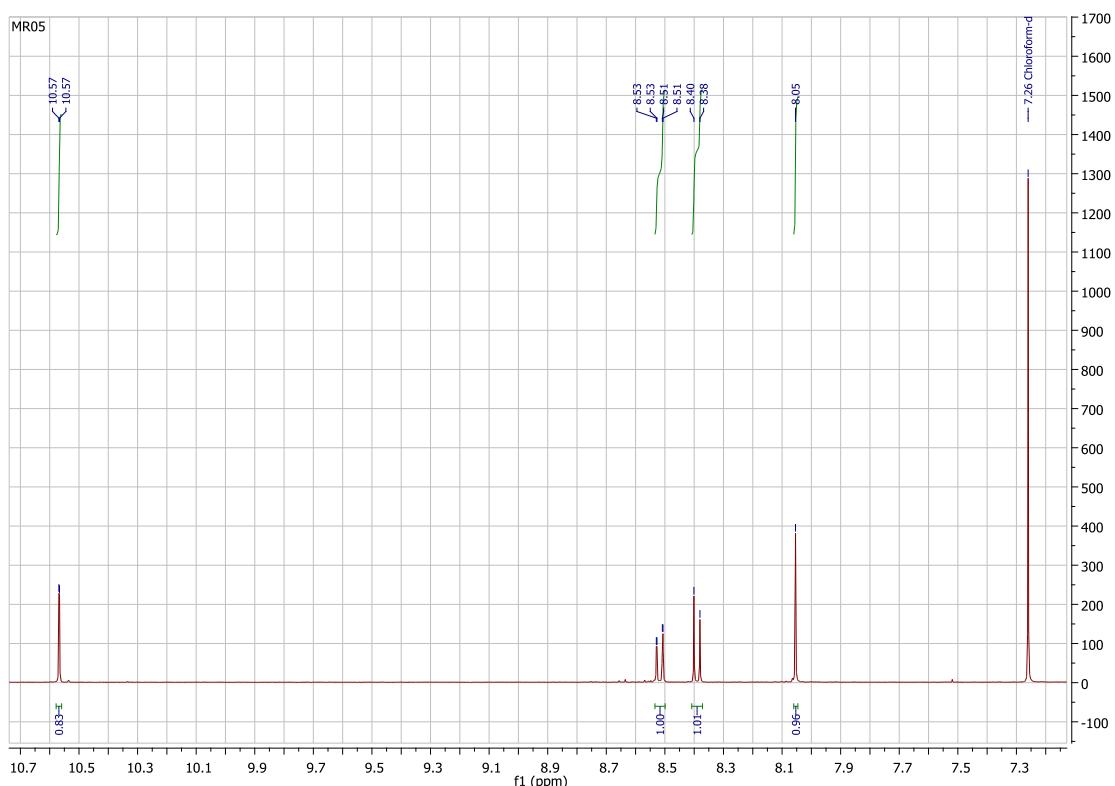
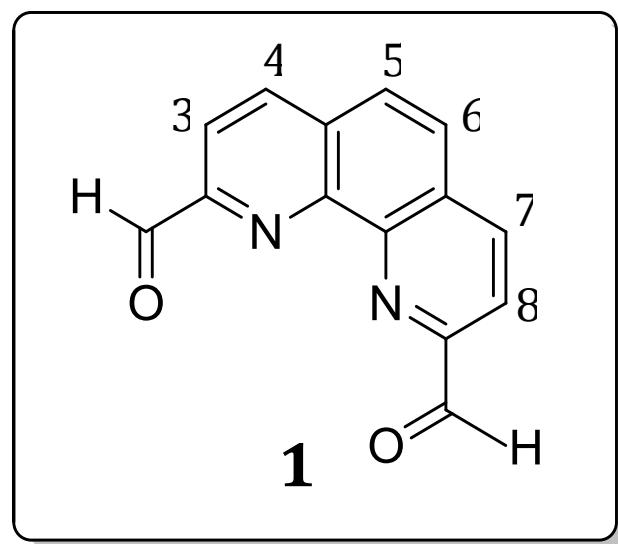
- IV. El análisis de su biodistribución se ha realizado por medio de experimentos de colocalización utilizando un tinte comercial específico de núcleo, Hoechst. Este estudio sugiere que el compuesto **4** no tiene la capacidad de entrar en el núcleo y que ésta solo se ve favorecida cuando los tiempos de incubación y las concentraciones empleadas son elevados. En condiciones normales, el complejo **4** se localiza en algún orgánulo del citoplasma, distribuido en la periferia del núcleo. Este patrón de distribución recuerda mucho al que ofrecen las mitocondrias pero para su confirmación es necesaria la realización de otros ensayos biológicos.

Bibliografía

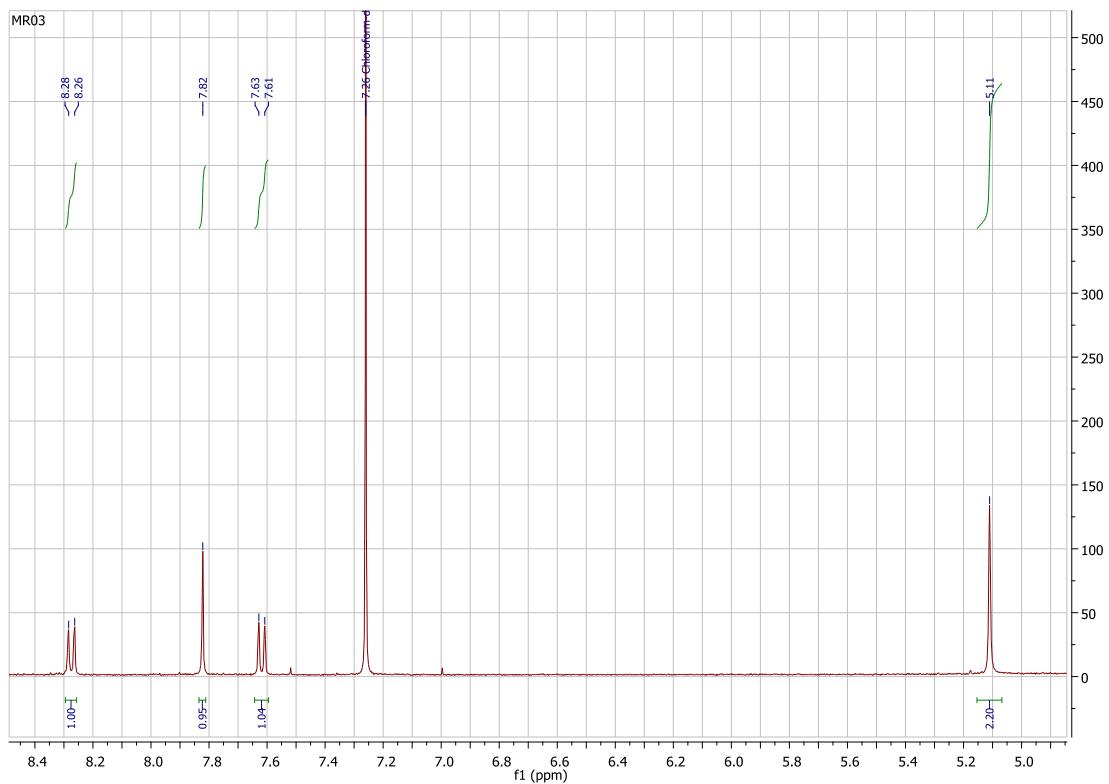
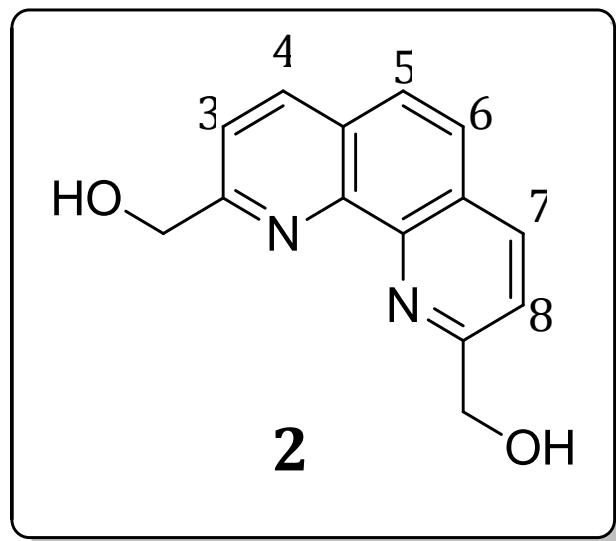
1. M.P. Coogan, V. Fernández-Moreira; *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 384.
2. Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. J.R. Lakowicz, Springer, New York, **2006**.
3. A. J. Amoroso, R. J. Arthur, M. P. Coogan, J. B. Court, V. Fernández-Moreira, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. O. Millet, J. A. Pope, *New J. Chem.* **2008**, 32, 1097.
4. C. de Castro Pardo. *Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions or substances by means of MTT Test.*
5. A. J. Blake, F. Dernartint, F. A. Devillanova, A. F. Isaia, V. Lippolis, M. Schröder, G. Verani, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 3705.
6. J.V Caspar, T. J. Meyer, *Phys. Chem.*, **1983**, 87, 952.
7. M. Arca, G. Azimi, A. Perra, M. Shamsipur, L. Sportelli, A. Yari, *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 2403-2412
8. Vollhardt, Schore, *Organic chemistry. Structure and function*, 5th edition. Omega.
9. B. J. Coe, N. R. M. Curati, E. C. Fitzgerald, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light, M. B. Hursthouse, *Organometallics*, **2007**, 26, 2318.
10. C. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernández-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein, R. B. Altman, *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*.
11. V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 4434.)
12. C. P. Bagowski, Y. You, H. Scheffler, D. H. Vlecken, D. J. Schmitz, I. Ott, *Dalton Trans.*, **2009**, 10799.
13. E. J. New, D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 851.
14. R. A. Poole, G. Bobba, J.-C. Frias, M. J. Cann, D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 1013.
15. J. Yu, R. Pal, R. A. Poole, M. J. Cann, D. Parker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2294.
16. R. Pal, D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1020.

Anexos

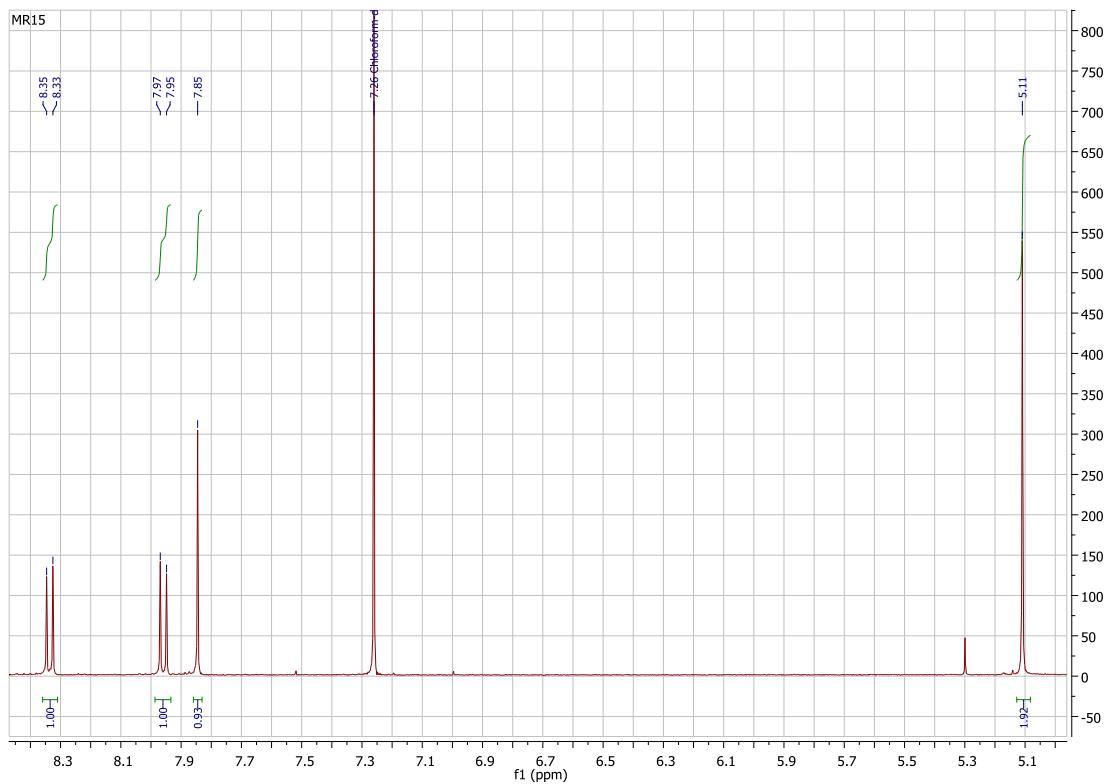
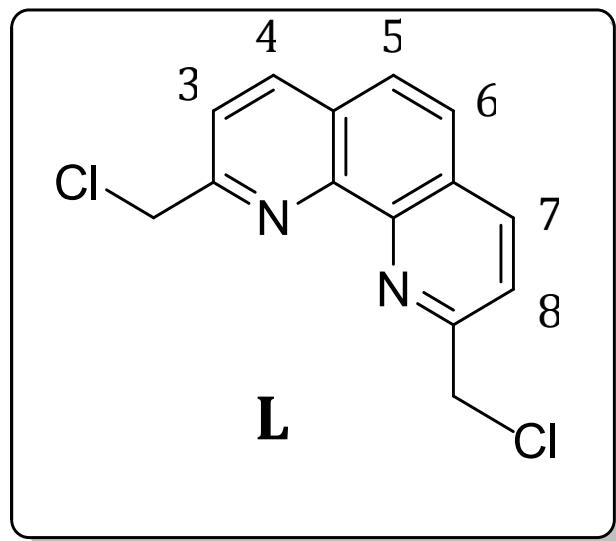
Caracterización de compuestos



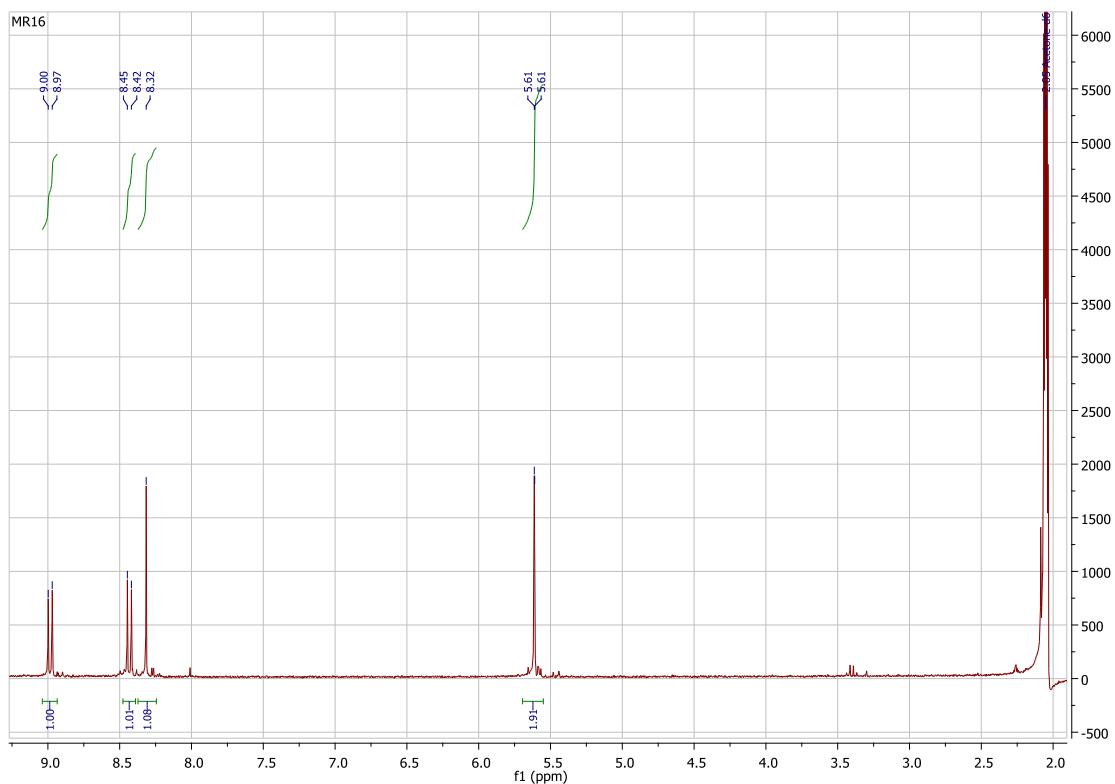
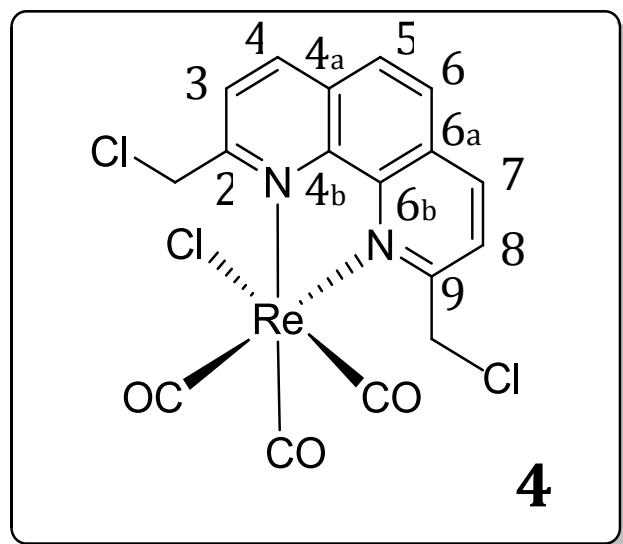
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.56 (da, $J= 0.9$ Hz, 2H, CHO), 8.52 (dd, $J= 8.2, 0.9$ Hz, 2H, CH (4,7)), 8.39 (d, $J= 8.2$ Hz, 2H, CH (3,8)), 8.05 (s, 2H, CH (5,6)).



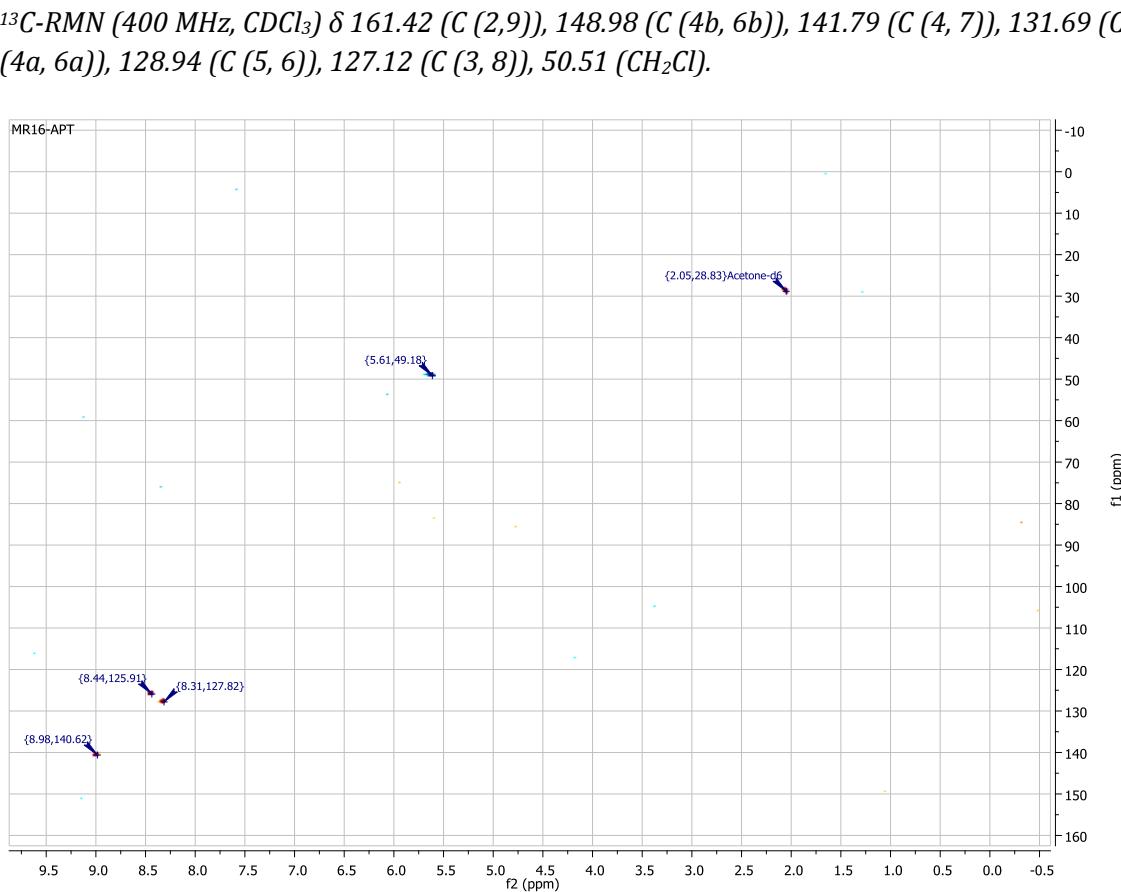
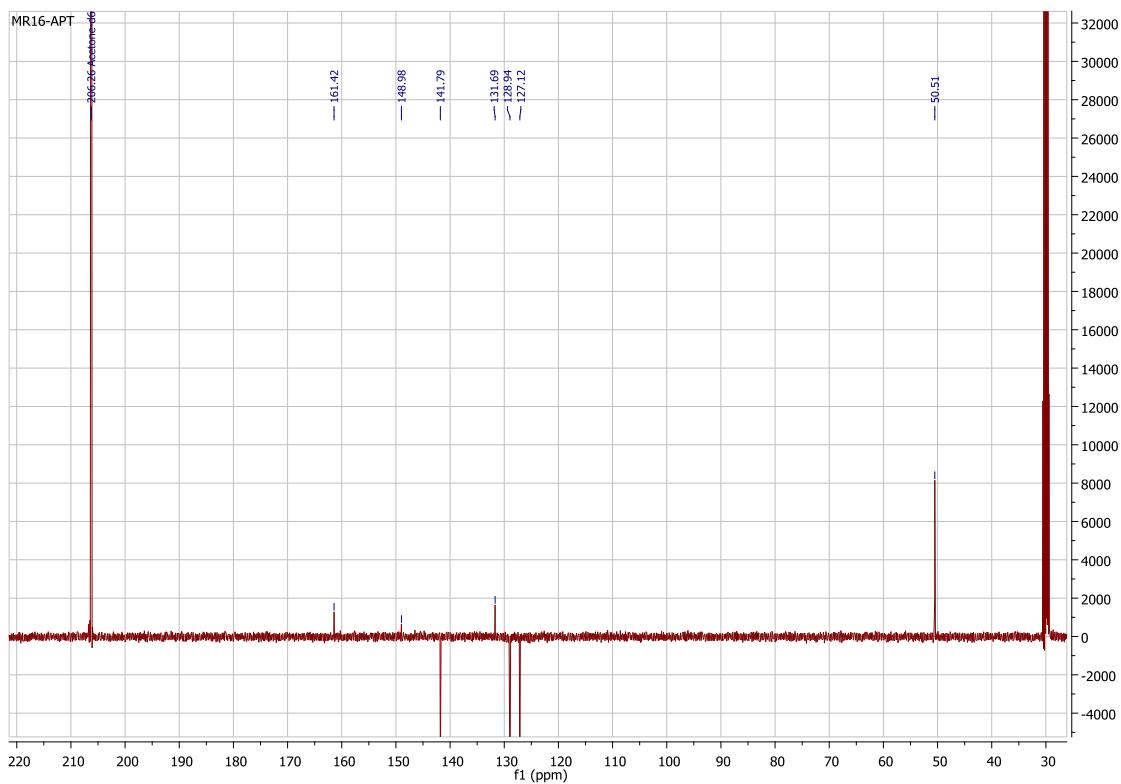
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ , 8.27 ($d, J = 8.3$ Hz, 2H, CH (4, 7)), 7.82 (s , 2H, CH (5, 6)), 7.62 ($d, J = 8.3$, 2H, CH (3, 8)), 5.11 (s , 4H, CH_2OH).

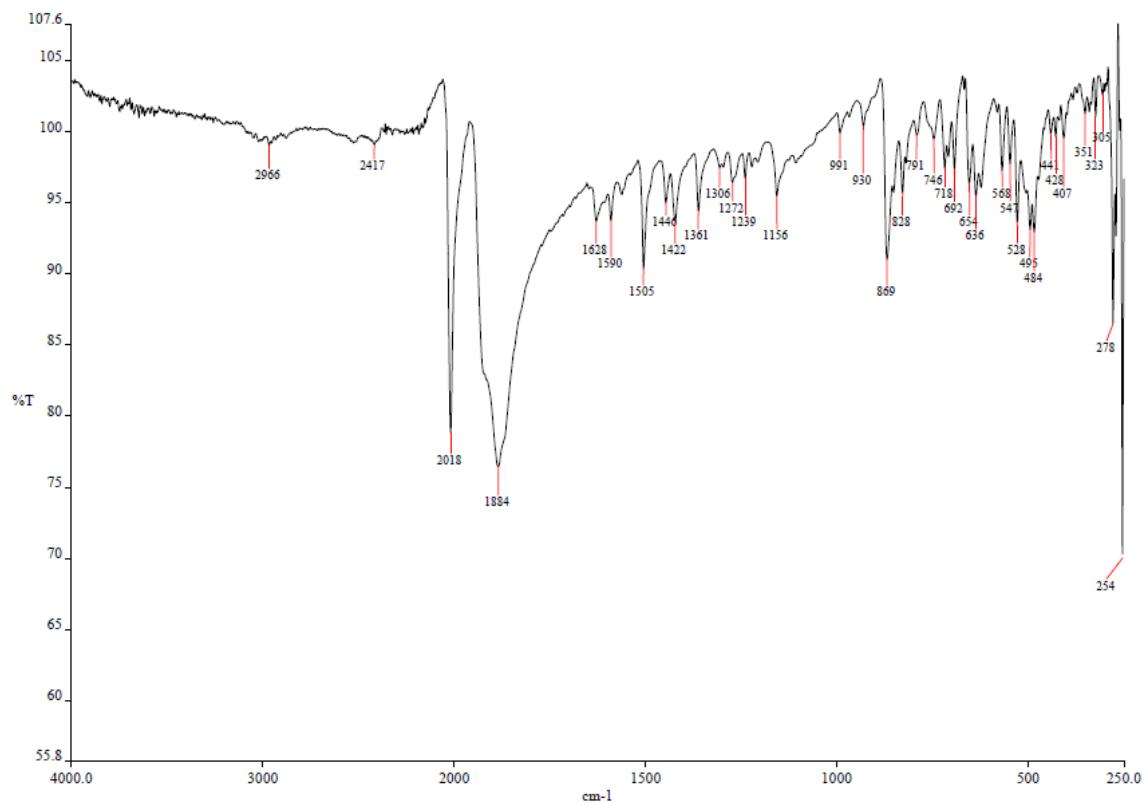


¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, J= 8.3 Hz, 2H, CH (4, 7)), 7.96 (d, J= 8.3 Hz, 2H, CH (3, 8)), 7.85 (s, 2H, CH (5, 6)), 5.11 (s, 4H, CH₂Cl).

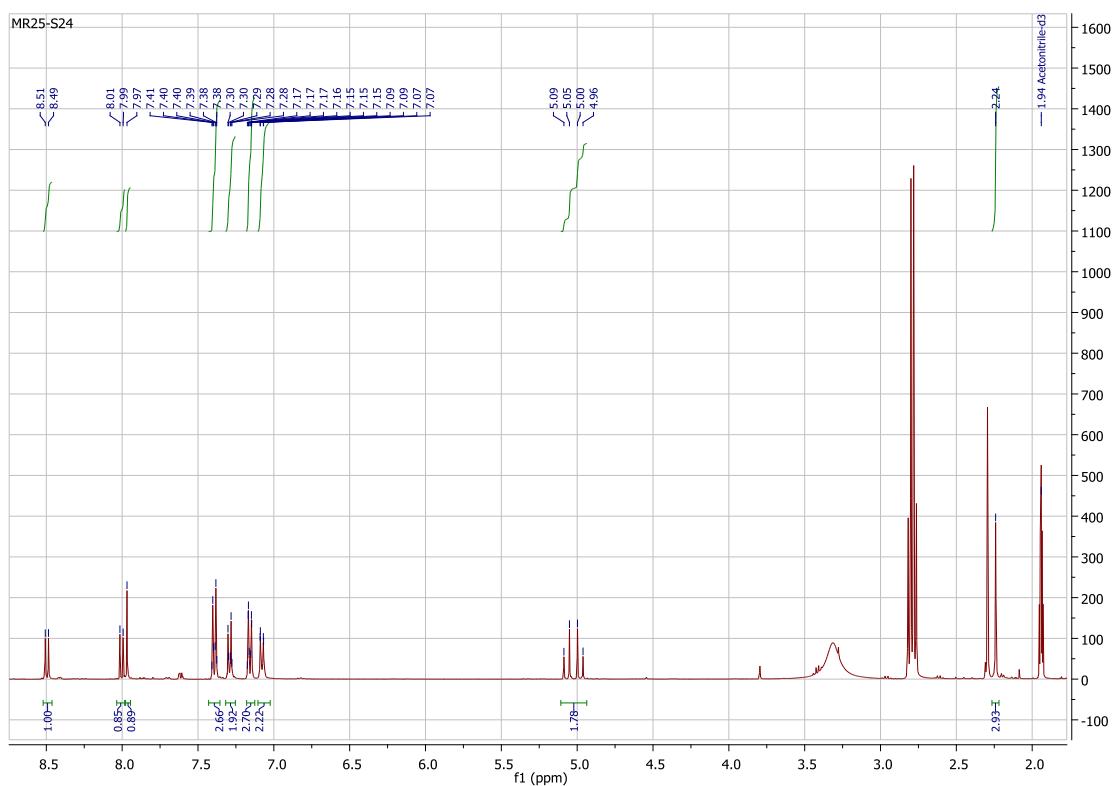
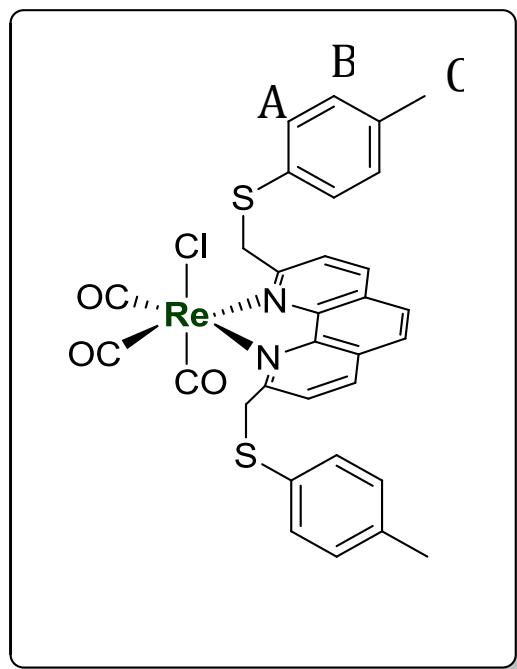


^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.98 ($d, J = 8.4$ Hz, 2H, CH (4, 7)), 8.43 ($d, J = 8.4$ Hz, 2H, CH (3, 8)), 8.30 (s , 2H, CH (5, 6)), 5.61 (da , 4H, CH_2Cl).





IR (solido, cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$): 2018, 1884.



^1H RMN(400 MHz, CD_3CN) δ 8.50 ($d, J = 8.5$ Hz, 2H, CH (4, 7)), 8.00 ($d, J = 8.4$ Hz, 2H, CH 3, 8)), 7.97 (s, 2H, CH (5, 6)), 7.29 (ad, 4H, CH (A)), , 7.08 ($dd, J = 8.5, 0.6$ Hz, 4H, CH (B)), 5.02 ($dd, J = 35.8, 14.6$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{S}-$)), 2.24 (s, 6H, CH (C)).