



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO FOTO-QUÍMICO DE NITROSILOS DE RUTENIO Y DE CONJUGADOS BODIPY-CARBORANO PARA POSIBLES APLICACIONES EN TERAPIA E IMAGEN CELULAR

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Pablo Labra Vázquez

Programa de co-tutela entre la Universidad Toulouse III - Paul Sabatier y el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM

TUTORES

Dr. José Norberto Farfán García; Facultad de Química, UNAM.

Dr. Pascal Georges Lacroix, Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS

COMITÉ TUTOR

Dra. Ma. del Pilar Carreón Castro; Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.

Dr. Ronan Marie Le Lagadec; Instituto de Química, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrolló en el marco del Laboratorio Internacional Asociado (LIA) México-Francia en el Laboratorio F-204 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (FQ-UNAM) y en el Laboratoire de Chimie de Coordination (Équipe R, Líder: Dr. Isabelle Malfant) del Centre National de la Recherche Scientifique (LCC-CNRS), bajo la asesoría conjunta del Dr. José Norberto Farfán García (FQ-UNAM) y del Dr. Pascal Georges Lacroix (LCC-CNRS), con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 337958 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN22819).

ARTICULOS CIENTÍFICOS Y CAPITULOS DE LIBRO

1. **Labra-Vázquez P.**; Palma-Contreras M.; Santillan R.; Farfán N., *J. Mol. Struct.* **2017**, *1131*, 156 - 162.
2. **Labra-Vázquez P.**; Bocé M.; Tassé M.; Mallet-Ladeira S.; Lacroix P. G.; Farfán N.; Malfant I., *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 3138 – 3154. **SELECCIONADO como Hot Article.**
3. **Labra-Vázquez P.**; Flores-Cruz R.; Galindo-Hernández A.; Cabrera-González J.; Guzmán-Cedillo C.; Jiménez-Sánchez A.; Lacroix P. G.; Santillan R.; Farfán N.; Núñez R., *Chem. Eur. J.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/chem.202002600>

Colaboraciones

4. Ochoa M. E.; **Labra-Vázquez P.**; Farfán N.; Santillan R., *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (5), 2795 - 2803.
5. Jiménez C. C.; Enríquez-Cabrera A.; González-Antonio O.; Ordóñez-Hernández J.; Lacroix P. G.; **Labra-Vázquez P.**; Farfán N.; Santillan R., *Inorganics* **2018**, *6* (4), 131.
6. Romero-Montero A.; Gimeno M.; Farfán N.; **Labra-Vázquez P.**, *J. Mol. Struct.* **2019**, *1197*, 326 – 335.
7. Pawlak T., Czajkowska-Szczykowska D.; Jastrzebska I.; Santillan R.; Seroka B.; Maj J.; Morzycki J. W.; **Labra-Vázquez P.**; Farfán N.; Bujacz G. D.; Potrzebowski M. J., *Cryst. Growth Des.* **2020**, *20* (4), 2202-2216.
8. Romero-Montero A.; **Labra-Vázquez P.**; Valle L. J. d.; Puiggali J.; García-Arrazola R.; Montiel C.; Gimeno M., *RSC Adv.* **2020**, *10*, 30508–30518.

9. Ochoa M. E.; Farfán N.; **Labra-Vázquez P.**; Soto-Castro D.; Santillan R., *J. Mol. Struct.* **2020** (Aceptado).
10. Farfán N.; **Labra-Vázquez P.**; Santillán R., “Three-membered Rings with One Boron Atom” en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*, Ed. Elsevier, **2020**.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14762-6>

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y REUNIONES

Nacionales

1. **Cartel.** 51° Congreso Mexicano de Química, Pachuca de Soto, México, **2016**
2. **Cartel.** 30 años diseñando moléculas y formando investigadores: Dra. Rosa Santillán, Orizaba, México, **2016**

Internacionales

3. **Cartel.** XXVI International Materials Research Congress, Cancún, México, **2017**
4. **Conferencia.** 10th International Chemistry Conference Toulouse Kiev (IKCT-10), Toulouse, Francia, **2019**

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

1. Laboratorio de Materiales Inorgánicos y Catálisis. Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICMAB-CSIC). Barcelona, España, **2016**. Asesora: Dra. Rosario Núñez.
2. Laboratoire de Chimie de Coordination del Centre National de la Recherche Scientifique (LCC-CNRS). Équipe R, Molécules et composites pour l'optique. Toulouse, Francia, **2018**. Asesor: Dr. Pascal G. Lacroix.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis padres Manuel Luis, María del Carmen y a mis hermanos Lucía y Manolo, por su apoyo todos estos años, por su comprensión y por regalarme un hogar en este mundo ancho y ajeno. Ustedes les dan razón a todos mis esfuerzos. Gracias.

A mi querida Alejandra, por llenar con flores la ventana de mi vida y por construir conmigo un segundo lugar al cual llamar hogar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca doctoral (337958) y por la beca de movilidad y el apoyo económico a través del Laboratorio Internacional Asociado (LIA) México-Francia CONACyT-CNRS. Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN22819) de la UNAM.

A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, particularmente a la Dra. Adela Rodríguez y al Dr. Emilio Orgaz que hicieron realidad el Programa de co-tutelas con la Universidad Paul Sabatier. También a Josefina Tenopala, a Ana María Núñez y a Gumaro Viacobo, gracias por su apoyo estos años.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. María del Pilar Carreón y Dr. Ronan Le Lagadec, por sus consejos y apoyo durante todo el doctorado.

A los miembros del Jurado: Dra. Silvia Castillo, Dr. Ronan Le Lagadec, Dr. Hiram Beltrán, Dr. Remi Chauvin y Dr. Pascal Lacroix por sus valiosos comentarios y correcciones a la Tesis.

Al Dr. Norberto Farfán por su calidez humana y su valioso apoyo y guía durante estos 7 años. Pertenecer a su grupo de investigación ha sido un honor, un privilegio y una experiencia constantemente desafiante y de permanente crecimiento personal y académico. Gracias por motivarme siempre a superarme.

A la Dra. Rosa Santillán y la M. en C. María Eugenia Ochoa por estos años de apoyo y por su confianza en mi trabajo. Ha sido siempre un placer colaborar con ustedes.

Al M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, por su amistad y por enseñarnos que es siempre más conveniente ver la vida con humor.

Al Dr. Pascal Lacroix, la Dra. Isabelle Malfant y a Marine Tassé por recibirme en el LCC y hacer de mi estancia en Toulouse una muy grata experiencia. Gracias por sus consejos, por las discusiones científicas, por su amistad y por compartir conmigo no solamente la química del rutenio, sino también un poco del sur de Francia y mucho de su delicioso Cassoulet.

A la Dra. Rosario Núñez y al Dr. Justo Cabrera, por recibirme en el ICMAB y abrirme las puertas de la interesante química de los cúmulos de boro.

Al Dr. Arturo Jiménez Sánchez y a su estudiante Ricardo Flores por su interés en nuestros compuestos y su valiosa contribución con los estudios de microscopía confocal que se presentan en este trabajo. Muchas gracias.

Al Dr. Martín Iglesias Arteaga y a la M. en C. Margarita Romero Ávila. Todos vamos hacia algún sitio y venimos de algún lugar. Gracias por el apoyo y las enseñanzas durante mis primeros años de formación científica.

A mis estudiantes Erika Rocha, Alejandra Lugo y Miguel Palma, por enseñarme a guiar. A los que siguieron, Cristian Guzmán, Aylin Galindo, Rossi Mazariegos, Luis Javier Sánchez, Flor Rafaela Vega, Azucena Vargas y Yael Juárez. Estoy orgulloso de todos y me siento afortunado de haber tenido la oportunidad de contribuir a su formación.

A todos los *Farfis*, mis compañeros del laboratorio F-204, antes glorioso F-201. A Diego Martínez, Miguel Palma, Rodrigo González, Cristian Guzmán y Aylin Galindo, por ser buenos y leales amigos; a Mónica Farfán por los numerosos y agradables “coffee time” en el LCC, al (Dr.) Luis Blancarte y a Rossi Mazariegos por ayudarme tanto en la clase, y por las importantes deliberaciones en el billar y en *El Rey*. A los que ya mencioné y en general a todos por ser una gran familia.

Finalmente, pero no por ello menos importante, al pueblo de México, por brindarme esta educación tan cara. Me siento honrado por haberme formado en la UNAM, su máxima casa de estudios. Por mi raza, hablará el espíritu.

A mis padres, con cariño.
Porque si he mirado a lo lejos,
ha sido cargado en sus hombros.

1.7.4. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	139
1.7.5. Métodos computacionales	139
1.7.6. Estudios de difracción de Rayos-X de monocristal	140
1.7.7. Determinación cuantitativa de la concentración de óxido nítrico	141
1.7.8. Fotoquímica	141
1.7. Referencias	142
 CAPÍTULO II	
2.1. Resumen de compuestos nuevos	152
2.2. Antecedentes	153
2.2.1. Estructura y generalidades de los boranos y los carboranos	153
2.2.2. Síntesis y funcionalización de carboranos	158
2.2.3. Aplicaciones de los carboranos	162
2.2.4. Generalidades y aplicaciones de los BODIPYs	170
2.3. Hipótesis	176
2.4. Objetivo	176
2.5. Resultados	177
2.5.1. Diseño de los fluoróforos objetivo	177
2.5.2. Síntesis y caracterización	178
2.5.3. Propiedades fotofísicas	189
2.5.4. Incorporación celular y localización intracelular	192
2.6. Conclusión	197
2.7. Parte experimental	197
2.7.1. Consideraciones generales	197
2.7.2. Síntesis	198
2.7.3. Estudios de difracción de Rayos-X de monocristal	204
2.7.4. Métodos computacionales	204
2.7.5. Microscopía confocal	205
2.8. Referencias	206
CONCLUSIONES GENERALES	213
GENERAL CONCLUSIONS	216
ANEXO I. Espectroscopía y materiales complementarios	219
ANEXO II. Tablas Cristalográficas	306
ANEXO III. Publicaciones	310

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de correlación)	LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbital molecular más bajo desocupado)
DFT	Density Functional Theory (Teoría del funcional de la densidad)	MLCT	Metal-Ligand Charge Transfer (Transferencia de Carga Metal-Ligante)
DRX	Difracción de Rayos-X	NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser)
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución	OMS	Organización Mundial de la Salud
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (Resonancia Paramagnética electrónica)	PACT	Photoactivated chemotherapy (Quimioterapia fotoactivada)
FTIR - ATR	Fourier Transform Infrared- Attenuated Total Reflectance (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier- Reflectancia Total Atenuada)	PDT	Photodynamic Therapy (Terapia fotodinámica)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy (Espectroscopía de correlación heteronuclear a enlaces múltiples)	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Orbital molecular más alto ocupado)	TD- DFT	Time-Dependent Density Functional Theory (Teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)	TPA	Two-photon absorption (Absorción de dos fotones)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (Espectroscopía heteronuclear de coherencia cuántica simple)	TPEF	Two-photon excitation fluorescence (fluorescencia por excitación por dos fotones)
Φ_F	Rendimiento cuántico fluorescente	σ_{TPA}	Sección transversal de absorción de dos fotones
Φ_{NO}	Rendimiento cuántico de fotoliberación de NO [•]	Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete.
ϵ	Coeficiente de extinción molar		

INTRODUCCIÓN

Si tú debes arder de cualquier modo,

arde bien, con virtud.

Silvio Rodríguez.

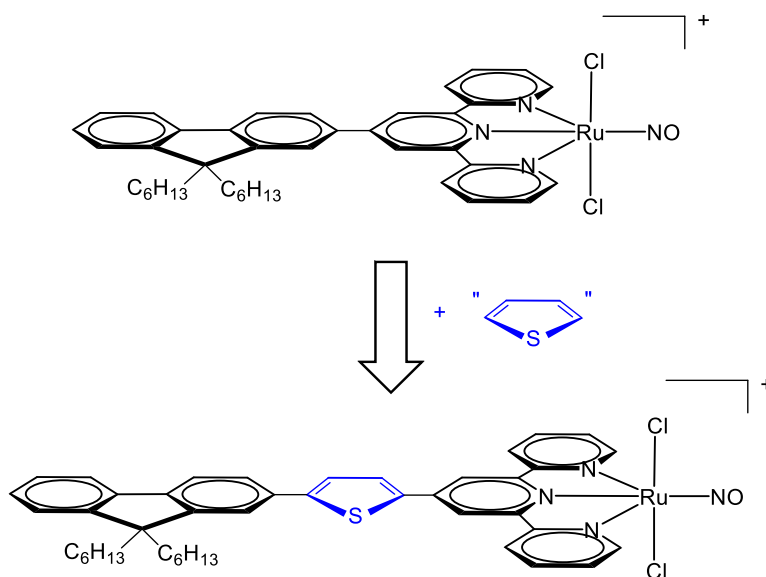
A pesar de los grandes esfuerzos que la comunidad científica ha dedicado a resolver la problemática del cáncer, de acuerdo con la OMS este padecimiento prevalece como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, lo cual puede atribuirse a la baja selectividad de las terapias habituales. Durante las últimas décadas ha habido un interés creciente en el desarrollo de nuevas terapias que sean capaces de eliminar eficientemente células tumorales sin producir daños significativos a los tejidos saludables. En este trabajo se presentan esfuerzos realizados para resolver ciertas limitaciones que presentan aún algunas de estas terapias alternativas.

La selectividad mejorada que ofrecen este tipo de terapias responde a un principio general simple, que estriba en que la toxicidad del fármaco debe ser baja o nula y producir muerte celular únicamente hasta ser activado con la aplicación de un estímulo específico. En una situación ideal, el fármaco es administrado al paciente, seguido por un tiempo de distribución en el organismo y de acumulación del fármaco en el tumor; después, la toxicidad del compuesto se activa aplicando un estímulo únicamente en la zona que abarca el tumor, conduciendo a procesos de muerte celular exclusivamente en la zona donde el estímulo fue aplicado. Una de las principales estrategias terapéuticas que siguen este enfoque se llama *terapia fotodinámica* (PDT por sus siglas en inglés) e involucra el uso de un compuesto

denominado *fotosensibilizador*, el cual es una molécula capaz de producir la muerte de células tumorales a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, una vez activado con luz de una longitud de onda específica. Dado que la toxicidad del compuesto se activa únicamente con luz, la PDT efectivamente conlleva menos efectos secundarios que las terapias habituales. Sin embargo, una limitante importante de la PDT es que presenta bajas efectividades en condiciones de hipoxia, una condición encontrada en tejidos con baja concentración de oxígeno y en tumores sólidos debido a su crecimiento rápido y la deficiente vascularización al interior del tejido maligno.

Esta limitante ha motivado el desarrollo en años recientes de una nueva estrategia terapéutica capaz de actuar en condiciones de hipoxia, denominada *quimioterapia fotoactivada* (PACT por sus siglas en inglés), que se basa en la liberación fotoinducida de una molécula tóxica capaz de producir muerte celular en ausencia de oxígeno. En este contexto, nuestro grupo, en colaboración con el grupo de la Dra. Isabelle Malfant (LCC, Toulouse), lleva algunos años desarrollando nitrosilos de Ru^{II} con ligantes polipiridínicos y un ligante nitrosilo, los cuales son capaces de liberar NO[•] al ser estimulados con luz, con una eficiencia determinada por el *rendimiento cuántico de liberación del radical* (Φ_{NO}). En este caso, el efecto terapéutico de la molécula no involucra la generación de especies reactivas de oxígeno, sino la liberación de óxido nítrico, una molécula pequeña, bien reconocida en las células humanas y que en concentraciones altas es capaz de producir muerte celular vía apoptosis. De manera remarcable, las altas concentraciones de NO[•] producidas por estos compuestos recientemente han permitido al grupo mejorar el efecto bactericida de la meticilina frente a cepas resistentes de *S. epidermidis*, como una aplicación terapéutica adicional, además de sus usos en terapia contra cáncer previamente mencionados.

En el **Capítulo 1**, después de presentar una revisión del estado del arte para la PACT, se reconocen algunas limitaciones que aún deben resolverse y que componen nuestra motivación científica: (1) Para llevar a la práctica clínica estos sistemas se requiere incrementar la eficiencia de liberación del radical vía absorción de dos fotones y (2) Los compuestos deben ser estables en agua, es decir no evolucionar a otras especies químicas al estar medio acuoso, en ausencia de luz. Con la intención de contribuir a resolver la primera problemática, decidimos investigar la influencia de la introducción de un anillo de tienilo en el ligante polipiridínico sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los sistemas más eficientes estudiados previamente por el grupo. Esta discreta modificación estructural, ilustrada en el Esquema 1, se empleó como una estrategia para incrementar la *sección transversal de absorción de dos fotones* (σ_{TPA}) sin modificar sustancialmente la masa molecular, pretendiendo con esto mejorar la eficiencia de liberación del radical, en términos del producto $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$, sin comprometer con ello la permeabilidad de la molécula hacia el interior de las células tumorales.



Esquema 1. Representación simplificada de la estrategia explorada en el **Capítulo 1** para incrementar la eficiencia de liberación de radicales nitrosilo vía absorción de dos fotones. La introducción de un anillo de tienilo mejora la planaridad y la transferencia de carga, lo cual se traduce típicamente en la generación de sistemas moleculares con propiedades fotoquímicas y fotofísicas mejoradas.

Después de presentar el diseño computacional de las moléculas objetivo, empleando cálculos de teoría de los funcionales de la densidad (DFT), se presentan la síntesis y la evaluación de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las moléculas obtenidas, encontrándose una modulación importante de estas propiedades como consecuencia de la introducción de los anillos de tienilo. De manera generalizada, se encontró que este heterociclo tiene una participación decisiva en la transferencia de carga hacia el fragmento Ru-NO, resultando en desplazamientos batocrómicos de $\lambda = 30 - 60$ nm y en mayores coeficientes de extinción molar, dos características que se asocian típicamente con incrementos sustanciales del valor de σ_{TPA} en moléculas con topologías similares a las

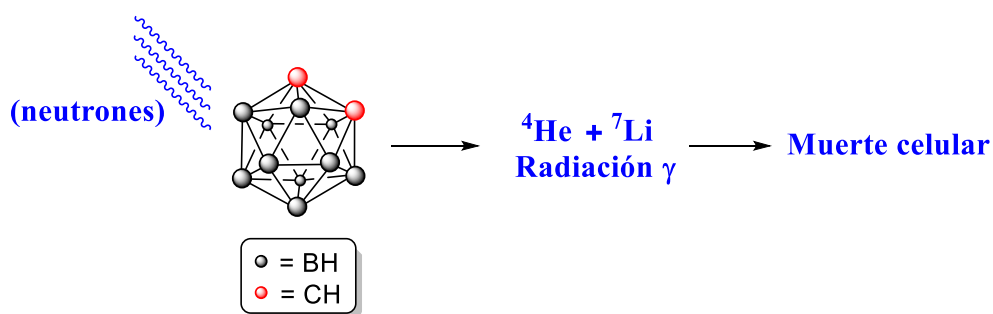
estudiadas y que permitieron que los sistemas más prometedores liberaran NO[•] bajo irradiación con luz visible ($\lambda = 490$ nm), una característica muy atractiva para las posibles aplicaciones en PACT, ya que esto evita el uso de luz ultravioleta, potencialmente dañina, para producir la liberación del NO[•] y con ello el efecto terapéutico.

Con respecto a la segunda limitante mencionada previamente para la PACT vía liberación de NO[•], en este capítulo se presenta también el desarrollo de un proceso de síntesis que permite obtener de manera práctica, escalable y selectiva nitrosilos de rutenio estables en agua, a partir de los cuales se demostró una liberación eficiente de NO[•] en medio acuoso, resultando en la generación de concentraciones del radical superiores a 100 nM, las cuales son un requisito indispensable para inducir los procesos de muerte celular que dan lugar a las posibles aplicaciones terapéuticas para este tipo de compuestos de coordinación.

El **Capítulo 2** de este trabajo se centra en otra terapia contra cáncer, denominada *terapia por captura neutrónica en boro* (BNCT, por sus siglas en inglés). La BNCT actúa mediante un mecanismo totalmente distinto a las terapias mencionadas anteriormente (PDT, PACT), en las que el estímulo que activa la toxicidad de las moléculas es la luz. Contrastantemente, la BNCT es un tipo de radioterapia en la que, a diferencia de las radioterapias convencionales, la energía ionizante que produce la muerte de las células tumorales se genera por la fisión de núcleos de ¹⁰B al ser irradiados con neutrones de baja energía. Dado que la muerte celular se restringe a las células enriquecidas en boro, la BNCT provee la posibilidad de tratar selectivamente los tumores, minimizando el daño a los tejidos saludables cercanos. Debido a esto, esta terapia ha atraído significativo interés de la comunidad médica y científica por décadas, gracias a lo cual algunos fármacos se encuentran actualmente en pruebas clínicas de Fases I y II, habiendo mostrado resultados prometedores en el tratamiento de tipos de

cáncer para los que no existen mejores alternativas, específicamente gliomas avanzados y cáncer de cuello y cabeza.

Debido a la baja abundancia natural del isótopo ^{10}B (19.9 %), los fármacos a ser empleados en BNCT requieren tener un alto contenido en boro o estar enriquecidos en ^{10}B . Los carboranos, asociaciones poliédricas de boro y carbono, son excelentes candidatos para aplicarse en esta área (Esquema 2), ya que cuentan con un alto contenido en boro, masas moleculares bajas (típicamente debajo de 500 Da) y una elevada lipofilicidad. Más aún, estos cúmulos de boro pueden funcionalizarse eficientemente con fluoróforos, permitiendo la obtención de potenciales *agentes teragnósticos* (acrónimo de *terapia* y *diagnóstico*), que son fármacos cuyo uso permite realizar de manera simultánea el tratamiento del padecimiento y la obtención en tiempo real de información sobre la distribución y concentración del fármaco en el tumor, que son factores críticos para el éxito de la BNCT.



Esquema 2. Representación simplificada del uso de carboranos en terapia por captura neutrónica en boro (BNCT). Las células ricas en boro son irradiada con neutrones de baja energía, produciendo la fisión de los núcleos de boro y la liberación de energía ionizante (en forma de partículas ^4He y radiación γ), produciendo así la muerte de las células tumorales.

Nuestro grupo de trabajo, en colaboración con el grupo de la Dra. Rosario Núñez (ICMAB, Barcelona), ha estudiado la funcionalización de carboranos con una amplia diversidad de fluoróforos, algunos de los cuales han mostrado resultados prometedores *in vitro*, encontrándose permeabilidades celulares remarcables. Sin embargo, los resultados suelen ser impredecibles, con ingresos celulares marcadamente divergentes para moléculas estructuralmente muy similares, lo cual ha eludido una explicación fisicoquímica.

En el **Capítulo 2**, después de presentar una revisión del estado del arte para la BNCT y presentar un panorama general del desarrollo de agentes teragnósticos basados en carboranos, se presenta la síntesis y caracterización química y fotoquímica de un grupo de carboranos funcionalizados con dipirrometenos de boro (BODIPYs), una familia versátil de fluoróforos con excelentes propiedades fotofísicas y estabilidad en medio acuoso, así como en un amplio intervalo de pH. Las estructuras de estos conjugados BODIPY-carborano fueron diseñadas de tal forma que pudiéramos evaluar, de forma independiente, la influencia de variaciones de parámetros como el peso molecular, la lipofilicidad y el momento dipolar sobre el ingreso y la localización subcelular de los fluoróforos.

Para proveer una explicación fisicoquímica a la interrogante de cómo pequeñas modificaciones estructurales en estos compuestos afectan significativamente sus permeabilidades al interior celular y para dar simultáneamente un paso adelante para explorar el posible uso de las moléculas desarrolladas como agentes teragnósticos, en este capítulo se presentan además los resultados de una colaboración con el grupo del Dr. Arturo Jiménez Sánchez (IQ, UNAM), con quienes se estudió el ingreso celular de los conjugados BODIPY-carborano en cultivos de células HeLa (de cáncer cervical) mediante microscopía confocal.

Los resultados encontrados, respaldados en varios niveles por cálculos de estructura electrónica, sugieren que la lipofilicidad, estimada a través del coeficiente de partición ($\log P$), y el momento dipolar estático, tienen una influencia importante sobre la facilidad con que los fluoróforos estudiados permean al medio intracelular, estableciendo así una primera explicación de los parámetros moleculares intrínsecos cuyas variaciones dan origen a las divergentes permeabilidades que suelen mostrar este tipo de compuestos. En su conjunto, nuestros resultados proveen herramientas de diseño para continuar con el desarrollo de carboranos fluorescentes que puedan ser exitosamente aplicados como agentes teragnósticos en terapia contra cáncer.

INTRODUCTION

In spite of the great efforts that the scientific community has devoted to solve the problem of cancer, according to the WHO this condition prevails as one of the main causes of mortality at world-wide level, which can be attributed to the low selectivity of the habitual therapies. During the last decades there has been a growing interest in the development of new therapies that are capable of efficiently eliminating tumor cells without producing significant damage to healthy tissues. In this work, efforts are presented to solve certain limitations that some of these alternative therapies still present.

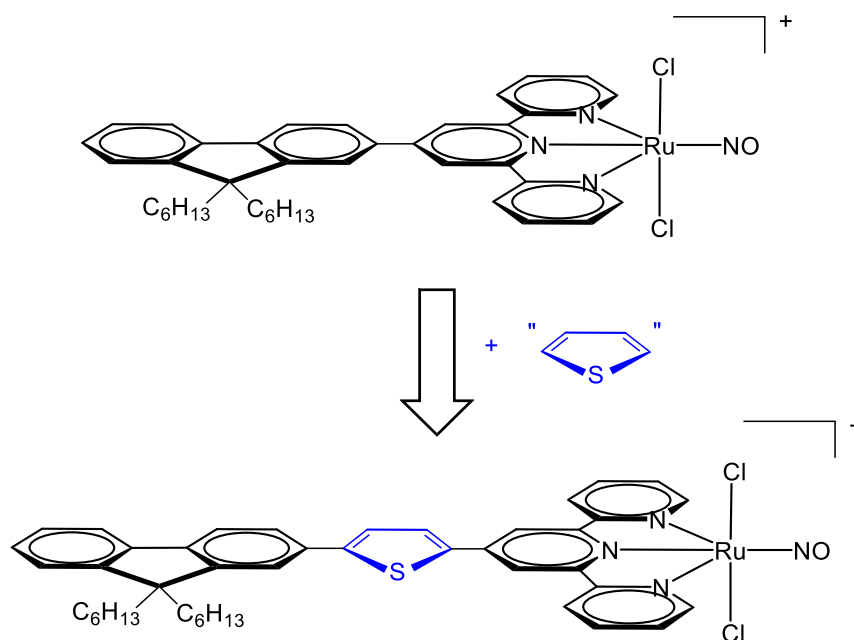
The improved selectivity offered by this type of therapy responds to a simple general principle, which is that the toxicity of the drug should be low or null and produce cell death only after its activation by the application of a specific stimulus. In an ideal situation, the drug is administered to the patient, followed by a time of distribution in the body and accumulation of the drug in the tumor; then, the toxicity of the compound is activated by applying a stimulus only in the area covered by the tumor, leading to cell death processes exclusively in the area where the stimulus was applied. One of the main therapeutic strategies that follow this approach is called *photodynamic therapy* (PDT) and involves the use of a compound called *photosensitizer*, which is a molecule capable of producing tumor cell death through the generation of reactive oxygen species, once activated with light of a specific wavelength. Because the toxicity of the compound is activated only by light, PDT effectively has fewer side effects than standard therapies. However, a major limitation of PDT is that it has low efficacy under conditions of hypoxia, a condition found in tissues with low oxygen

concentration and in solid tumors due to their rapid growth and poor vascularization within the malignant tissue.

This limitation has led to the development in recent years of a new therapeutic strategy capable of acting in hypoxic conditions, called *photo-activated chemotherapy* (PACT), which is based on the photo-induced release of a toxic molecule capable of producing cell death in the absence of oxygen. In this context, our group, in collaboration with the group led by Dr. Isabelle Malfant (LCC, Toulouse), has been developing Ru^{II} nitrosyls with polypyridine ligands, which are capable of releasing NO[•] when stimulated with light, with an efficiency determined by the NO-photorelease quantum yield (Φ_{NO}). In this case, the therapeutic effect of the molecule does not involve the generation of reactive oxygen species, but the release of nitric oxide, a small molecule, well recognized in human cells and that in high concentrations is capable of producing cell death via apoptosis. Remarkably, the high concentrations of NO[•] produced by these molecules have recently allowed the group to improve the bactericidal effect of methicillin against resistant strains of *S. epidermidis*, as an attractive therapeutic application, in addition to their previously mentioned uses in cancer therapy.

In **Chapter 1**, after presenting a review of the state of the art for PACT, we recognize some limitations that still need to be met and that constitute our scientific motivation: (1) To implement these compounds in clinical practice, it is necessary to increase the efficiency of NO[•] release via two-photon absorption and (2) The molecules must be stable in water, i.e. not evolve into other chemical species by being in aqueous medium, in the absence of light. In order to contribute to solve the first limitation, we decided to investigate the influence of the introduction of a thienyl ring in the polypyridine ligand on the photophysical and

photochemical properties of the most efficient systems studied by the group. This discrete structural modification, illustrated in Scheme 1, was used as a strategy to increase the two-photon absorption cross section (σ_{TPA}) without substantially modifying the molecular mass, in order to improve the efficiency of NO^\bullet release, in terms of the $\Phi_{\text{NO}} \times \sigma_{\text{TPA}}$ product, without compromising the permeability of the molecule to the interior of the tumor cells.



Scheme 1. Simplified representation of the strategy explored in **Chapter 1** to increase the efficiency of NO^\bullet release via two-photon absorption. The introduction of a thienyl ring improves planarity and charge transfer, which typically results in the generation of molecular systems with improved photochemical and photophysical properties.

After presenting the computational design of the target molecules, using DFT calculations, the synthesis and evaluation of the photophysical and photochemical properties of the target compounds are presented. An important modulation of these properties is found as a consequence of the introduction of thienyl rings. In a general way, it was found that this

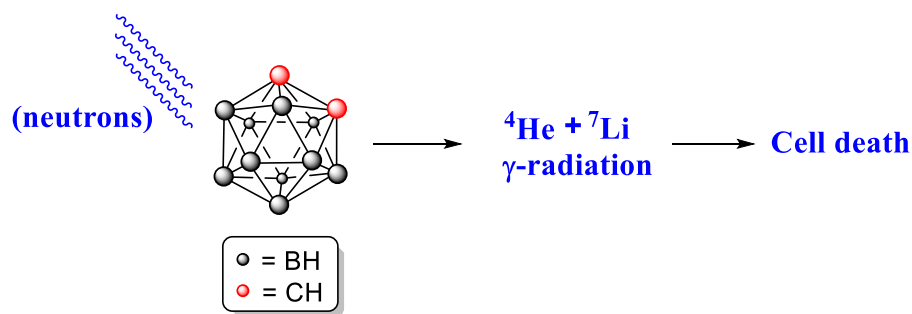
heterocycle has a decisive participation in the charge transfer towards the Ru-NO fragment, resulting in bathochromic shifts of $\lambda = 30 - 60$ nm and higher molar extinction coefficients, two characteristics that are typically associated with substantial increases in the value of TPA in molecules with similar topologies to those studied and which allowed the most promising systems to release NO \cdot under visible light irradiation ($\lambda = 490$ nm), a very attractive feature for possible applications in PACT, since this avoids the use of potentially harmful ultraviolet light to produce the NO \cdot release and thus the therapeutic effect.

With respect to the second limitation mentioned previously for PACT via NO \cdot release, this chapter also presents the development of a synthesis process that allows to obtain, in a practical, scalable and selective way, stable compounds in water from which we demonstrated an efficient release of NO \cdot in aqueous medium using various techniques, resulting in the generation of concentrations of the radical in aqueous medium greater than 100 nM, which are an indispensable requirement to induce cell death processes that give rise to possible therapeutics applications for these systems.

Chapter 2 of this work focuses on another cancer therapy, called *boron neutron capture therapy* (BNCT). BNCT acts by a completely different mechanism than the therapies mentioned above (PDT, PACT), in which the stimulus that activates the toxicity of the molecules is light. In contrast, BNCT is a type of radiotherapy in which, unlike conventional radiotherapies, the ionizing energy that produces the death of the tumor cells is generated by the fission of ^{10}B nuclei when they are irradiated with low energy neutrons. Since cell death is restricted to boron-enriched cells, BNCT provides the possibility of selectively treating tumors, minimizing damage to nearby healthy tissues. Because of this, this therapy has attracted significant interest from the medical and scientific communities for decades, thanks

to which some drugs are currently in Phase I and II clinical trials, with promising results in the treatment of types of cancer for which there are no better alternatives, specifically advanced gliomas and head and neck cancer.

Due to the low natural abundance of the ^{10}B isotope (19.9%), the drugs to be used in BNCT require either a high boron content or to be enriched in ^{10}B . Carboranes, polyhedral associations of boron and carbon, are excellent candidates for application in this area (Scheme 2), since they have a high boron content, low molecular mass (typically below 500 Da) and high lipophilicity. Moreover, these boron clusters can be efficiently functionalized with fluorophores, allowing the obtention of potential *teragnostic* agents (acronym of *therapy* and *diagnosis*), which are drugs whose use allows the simultaneous treatment of the condition and the real time acquisition of information about the distribution and concentration of the drug in the tumor, which are critical factors for the success of BNCT.



Scheme 2. Simplified representation of the use of carboranes in boron neutron capture therapy (BNCT). Boron-rich cells are irradiated with low energy neutrons, producing the fission of boron nuclei and the release of ionizing energy (in the form of ^4He particles and γ -radiation), thus producing the death of tumor cells.

Our research group, in collaboration with the group led by Dr. Rosario Núñez (ICMAB, Barcelona), has studied the functionalization of carboranes with a wide diversity of fluorophores, some of which have shown promising results *in vitro*, with remarkable cellular permeabilities. However, the results are often unpredictable, with markedly divergent cell incomes for structurally very similar molecules, which has so far eluded a physicochemical explanation.

In **Chapter 2**, after presenting a review of the state of the art for BNCT and an overview of the development of carboran-based teragnostic agents, the synthesis and chemical and photochemical characterization of a set of carboranes functionalized with boron dipyrromethenes (BODIPYs), a versatile family of fluorophores with excellent photophysical properties and stability in aqueous medium, as well as in a wide pH range, is presented. The structures of these BODIPY-carborane dyads were designed in such a way that we could independently evaluate the influence of variations in parameters such as molecular weight, lipophilicity and dipolar moment on the entry and subcellular localization of the fluorophores.

In order to provide a physicochemical explanation to the question of how small structural modifications in these compounds significantly affect their cell permeability and to simultaneously take a step forward to explore the possible use of these molecules as teragnostic agents, this chapter also presents the results of a collaboration with the group led by Dr. Arturo Jiménez Sánchez (IQ, UNAM), with whom we studied the cellular entry of BODIPY-carborane conjugates in HeLa (cervical cancer) cell cultures by confocal microscopy.

The results found, supported at various levels by electronic structure calculations, suggest that lipophilicity, estimated through the partition coefficient ($\log P$), and the static dipolar moment, have an important influence on the ease with which the fluorophores studied permeate the intracellular medium, thus establishing a first explanation of the intrinsic molecular parameters whose variations give rise to the divergent permeabilities that this type of compounds usually show. As a whole, our results provide design tools to continue with the development of fluorescent carboranes that can be successfully applied as theragnostic agents in cancer therapy.

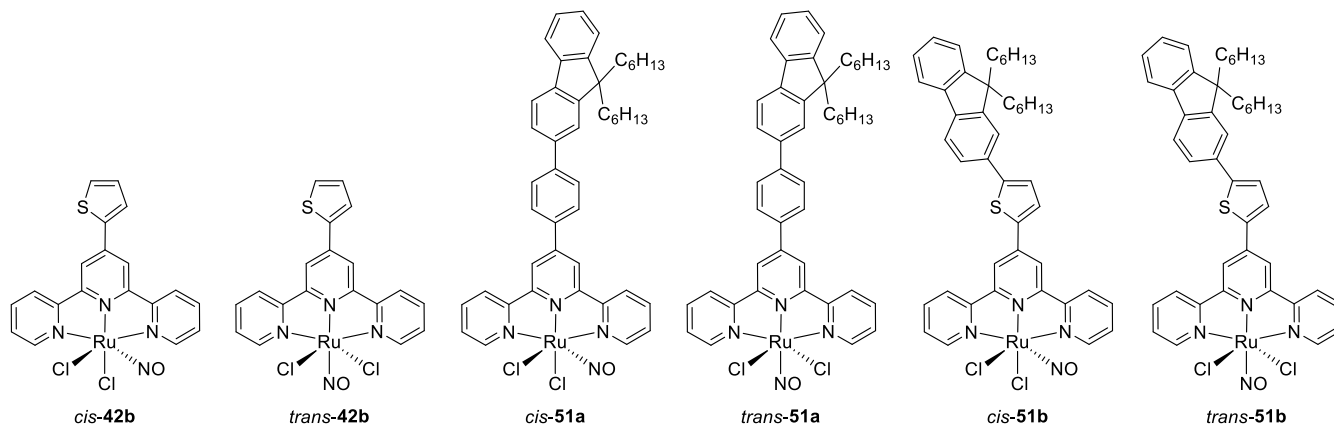
CAPÍTULO I

**INTRODUCCIÓN DE ANILLOS DE TIENILO EN
NITROSILOS DE RUTENIO COMO ESTRATEGIA PARA
INCREMENTAR LA EFICIENCIA DE LIBERACIÓN DE
ÓXIDO NÍTRICO VÍA ABSORCIÓN DE DOS FOTONES**

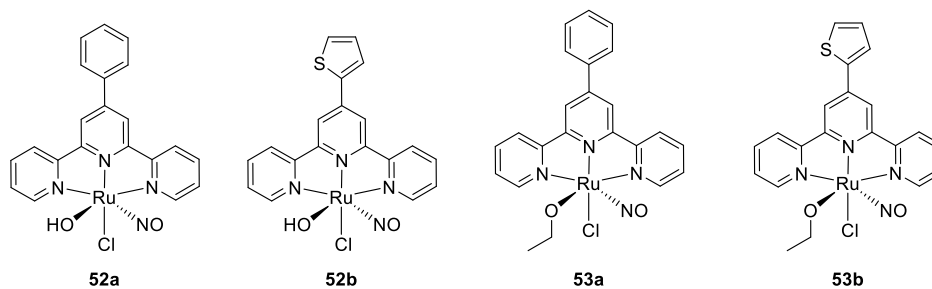
CHAPTER I

**INTRODUCTION OF THIENYL RINGS IN RUTHENIUM
NITROSILS AS A STRATEGY TO INCREASE THE
EFFICIENCY OF NITRIC OXIDE RELEASE VIA
TWO-PHOTON ABSORPTION**

1.1. RESUMEN DE COMPUESTOS NUEVOS



λ_{\max} (nm)	363	387	406	425	472	488
Φ_{NO} (ACN, $\lambda = 365$ nm)	0.37	0.18	0.16	0.05	0.14	0.06
Φ_{NO} (ACN, $\lambda = 490$ nm)					0.005	0.005



λ_{\max} (nm)	325	358	328	362
Φ_{NO} (ACN, $\lambda = 365$ nm)	0.18	0.17	0.38	0.15
Φ_{NO} (H ₂ O, $\lambda = 365$ nm)	0.17	0.075	0.09	0.10

(Todos los compuestos tienen carga 1+ y PF₆⁻ como contraión)

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Terapia fotodinámica

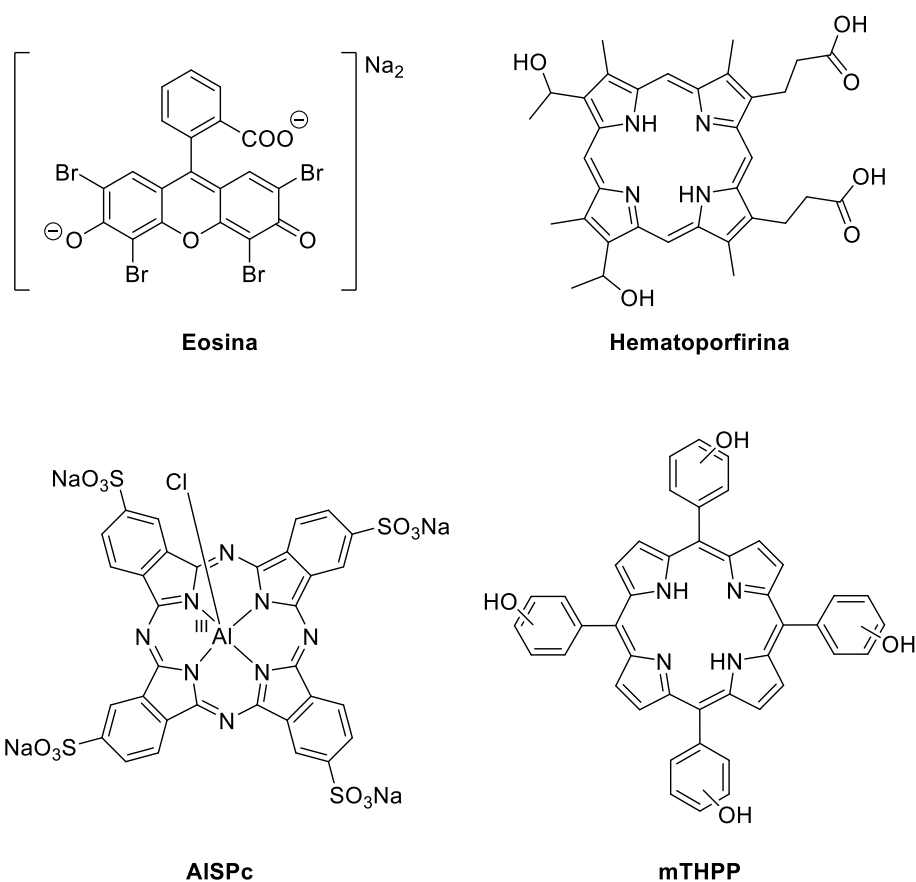
La luz se ha usado para tratar padecimientos humanos durante miles de años, los primeros registros pueden trazarse hasta el antiguo Egipto; hace más de 3500 años en el papiro de Ebers ya se describía que el consumo del extracto de la planta *Ammi majus*, seguido por exposición al sol era útil para tratar el vitiligo.^[1] En China, durante la dinastía Tang (618-807 d.C.), un procedimiento común para el tratamiento de diversos males consistía en tomar un baño de sol matutino sosteniendo una hoja que contenía un dibujo del símbolo del sol “☉”, posteriormente el papel era triturado en agua y consumido por el paciente con la intención de “atrapar” algo de la esencia del sol dentro del cuerpo.^[2] Estos primeros procedimientos, involucrando baños de sol prolongados, han recibido el nombre de helioterapia; sin embargo no fue sino hasta mucho tiempo después, gracias a los estudios relacionados con la naturaleza ondulatoria de la luz, que las bases científicas de la fototerapia moderna fueron establecidas.

Los primeros estudios científicos relacionados con el uso de la fototerapia fueron reportados durante el siglo XIX e inicios del siglo XX. En 1877, Arthur Downes y Thomas Blunt mostraron que la luz ultravioleta era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.^[3] Estos estudios fueron seguidos por los reportes de Niels Finsen sobre el uso de la luz roja para tratar viruela^[4] y de luz ultravioleta para tratar *lupus vulgaris*;^[5] estos estudios le valieron en 1903 el premio Nóbel “*en reconocimiento por su contribución al tratamiento de enfermedades, especialmente lupus vulgaris, con radiación de luz concentrada, con lo que ha abierto una nueva avenida para la ciencia médica*”.^[6]

Las investigaciones sobre el uso de la luz para curar enfermedades eventualmente dieron lugar a lo que hoy conocemos como terapia fotodinámica (PDT por sus siglas en inglés), la cual involucra el uso de dos componentes inocuos de manera individual, el primero es una sustancia llamada *fotosensibilizador*, que típicamente es un compuesto sensible a la luz que se administra y distribuye en el tejido afectado, el segundo componente involucra la administración de luz de una longitud de onda específica, la cual activa al fotosensibilizador, que a su vez ejerce el efecto terapéutico.^[7] La PDT funciona mediante la transferencia de energía del fotosensibilizador al oxígeno presente en el tejido, produciendo especies reactivas de oxígeno que inducen muerte celular por diversos mecanismos, entre los que frecuentemente figura la apoptosis o muerte celular programada.^[8] Dado que el fotosensibilizador se activa localmente bajo la acción del haz de luz, los tejidos que no han sido irradiados no se ven afectados.

En el Esquema 3 se muestra la estructura de algunos de los primeros fotosensibilizadores empleados en PDT. En 1903 von Tappeiner y A. Jesionek reportaron el tratamiento exitoso de melanomas mediante la irradiación de eosina aplicada de forma tópica.^[9] Siendo preparada a partir de sangre por Scherer en 1841,^[10] la hematoporfirina fue el primer fotosensibilizador usado en PDT que contiene el núcleo tetrapirrólico de las porfirinas. Esta molécula atrajo considerable interés como fotosensibilizador en las décadas posteriores a su aislamiento, llevando al primer reporte en 1913 del uso de un derivado de porfirina en PDT en humanos por Meyer-Betz, quien tras un estudio que demostró la fototoxicidad de la hematoporfirina en ratones,^[11] se administró a si mismo 200 mg del fármaco, experimentando dolor prolongado e inflamación en zonas expuestas a la luz.^[12] A pesar de que en las décadas posteriores hubo intensa investigación sobre la hematoporfirina y algunos de sus derivados,

bajas selectividades hacia las células tumorales^[13] y la presencia de efectos adversos en ensayos clínicos produjeron que hubiera pocas aplicaciones clínicas de la PDT hasta los años 70s.^[14] Sin embargo, a la fecha la mayoría de los fotosensibilizadores empleados en PDT son derivados de la hematoporfirina, incluyendo el medicamento “Photofrin”, que es una mezcla de identidad química desconocida, compuesta por derivados de la hematoporfirina. A pesar de que muchas de las porifirinas que componen dicha mezcla no tienen uso como fotosensibilizadores y de la presencia de efectos adversos significativos, este medicamento permanece como el fotosensibilizador más empleado clínicamente.



Esquema 3. Estructura de algunos de los primeros fotosensibilizadores desarrollados.

Las limitaciones encontradas en la aplicación clínica de la hematoporfirina y de los primeros derivados de la misma, despertó un gran interés en las últimas décadas en el

desarrollo de nuevos fotosensibilizadores con características fotofísicas o farmacocinéticas mejoradas. De esta manera se reportaron otros derivados de porfirinas, por ejemplo las *meso*-tetra(hidroxifenil)porfirinas^[15] (mTHPP por su nombre en inglés) y los derivados de ftalocianinas sulfonadas^[16] (AISPc por su nombre en inglés).

De acuerdo con el mecanismo de acción (Figura 1), las reacciones en que participan los fotosensibilizadores se clasifican en dos tipos.^[17] En ambos casos, el proceso inicia por la excitación del fotosensibilizador desde su estado basal (^1FS), con lo que alcanza su primer estado excitado ($^1\text{FS}^*$), desde el cual el fotosensibilizador puede regresar al estado basal por vías radiativas (fluorescencia) o no radiativas o puede alternativamente atravesar un cruce entresistemas (ISC por sus siglas en inglés) para generar un estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$), una vez alcanzado el cual el fotosensibilizador participa en reacciones Tipo I o Tipo II. Las reacciones Tipo I suceden entre el fotosensibilizador y una molécula de oxígeno ($^3\text{O}_2$) para dar lugar a oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), en tanto que en una reacción Tipo II el fotosensibilizador reacciona con biomoléculas generando un radical que reacciona a su vez con oxígeno produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).

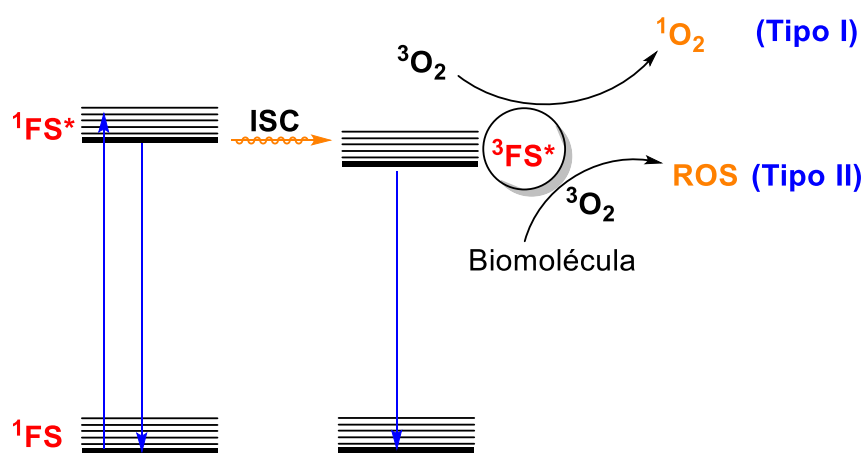


Figura 1. Diagrama de Jablonski para el mecanismo de acción de fotosensibilizadores en terapia fotodinámica.

La determinación de la eficiencia cuántica de un fotosensibilizador se evalúa típicamente *in vitro* midiendo el rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) ya sea determinando la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ generado en $\lambda = 1270$ nm o empleando una medición indirecta usando un compuesto que reacciona con $^1\text{O}_2$ produciendo un colorante con un espectro de absorción o emisión conocido.^[18]

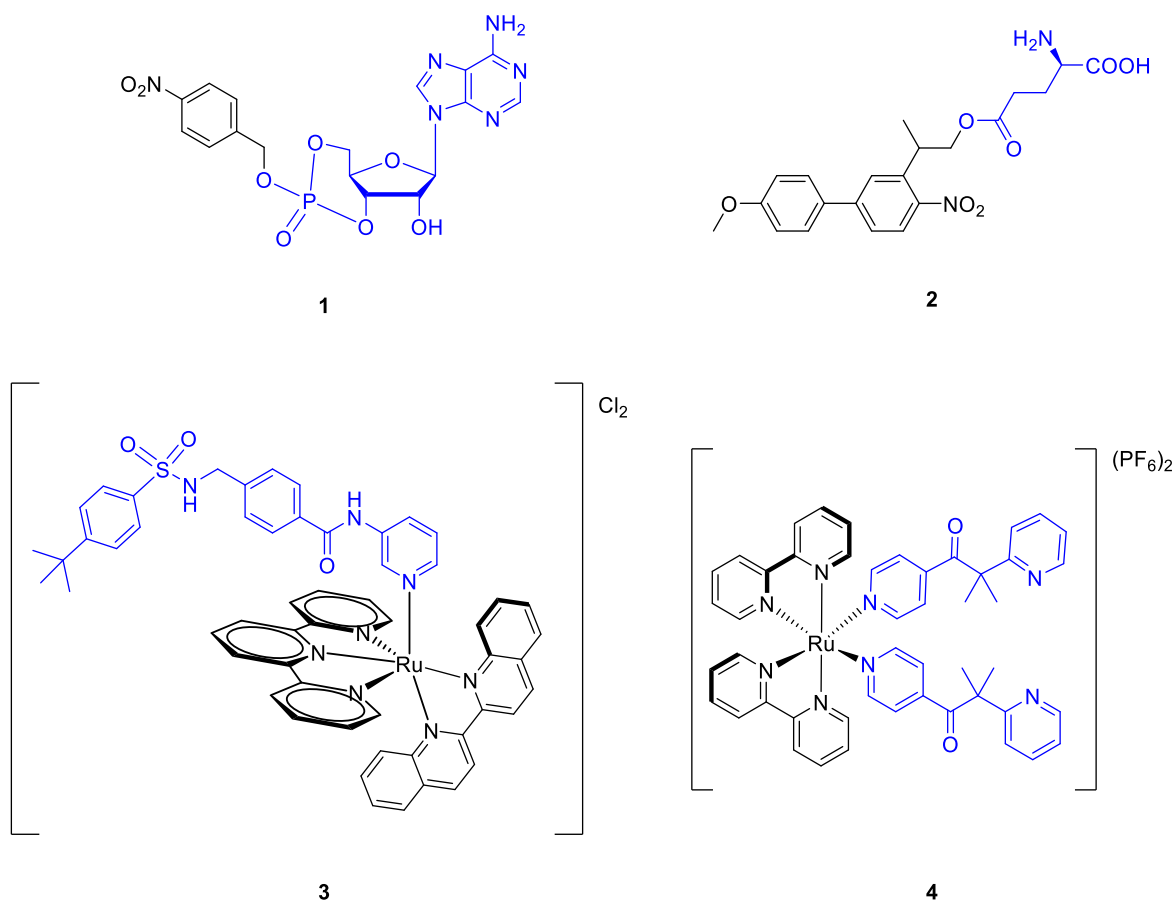
1.2.2. Quimioterapia fotoactivada

Como una alternativa a la terapia fotodinámica, que basa su mecanismo de acción en la generación de especies reactivas de oxígeno, la quimioterapia fotoactivada (PACT por sus siglas en inglés) hace uso de moléculas de baja toxicidad que al ser irradiadas liberan un agente terapéutico mediante la ruptura de un enlace químico, típicamente de coordinación.^[19]

A diferencia de la terapia fotodinámica, la PACT no requiere la presencia de oxígeno, lo cual permite su uso en tejidos en condiciones de hipoxia. Se han descrito una gran variedad de moléculas PACT, incluyendo compuestos totalmente orgánicos^[20] y de coordinación con diversos metales de transición, incluyendo de Pt^{IV} ,^[21] Rh^{III} ,^[22] Co^{III} ,^[23] Ir^{III} ,^[24] Cr^{III} ,^[25] Mn^{II} ^[26] y Ru^{II} .^[27]

Si bien todas estas moléculas funcionan por la ruptura fotoinducida de un enlace químico, dependiendo del fragmento submolecular liberado cada molécula PACT presenta un mecanismo diferente, muchas veces único, mediante el cual produce el efecto terapéutico (Esquema 4). Por ejemplo, tras ser irradiado a $\lambda = 366$ nm, **1** libera una molécula de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), facilitando la entrada de esta molécula al medio intracelular,^[20a] la cual es capaz de inhibir el crecimiento celular;^[28] de forma similar, **2** es capaz de liberar glutamato al irradiarse a $\lambda = 313$ nm,^[29] un aminoácido citotóxico en altas

concentraciones.^[30] Las moléculas PACT basadas en compuestos de coordinación de Ru^{II} han despertado un particular interés debido a que el proceso de fotólisis se puede dar bajo irradiación con luz visible, en contraste con los ejemplos anteriores en los que es necesario usar radiación ultravioleta, que puede resultar dañina para los tejidos que rodean al tumor; por ejemplo los compuestos **3**^[31] y **4**^[32] liberan moléculas citotóxicas al ser irradiados a $\lambda = 625 \text{ nm}$ y $\lambda = 470 \text{ nm}$, respectivamente.



Esquema 4. Ejemplos de moléculas para quimioterapia fotoactivada. Los fragmentos submoleculares a los que se atribuye el efecto citotóxico se muestran en color azul.

La PACT ha sido utilizada además a través de la liberación moléculas pequeñas como CO,^[33] H₂S^[34] y NO[•],^[35] que son compuestos que difunden fácilmente a través de las

membranas biológicas y que han sido reconocidas por sus marcadas propiedades citotóxicas a concentraciones altas.^[36]

1.2.3. Óxido nítrico

El óxido nítrico es una molécula que en su estado basal se encuentra en forma de radical (NO^\bullet); en la Figura 2 se muestra su diagrama de orbitales moleculares,^[37] en donde se puede apreciar que el electrón desapareado se encuentra en un orbital de antienlace, por lo cual el orden de enlace en el NO^\bullet es de 2.5, con una distancia de enlace de 1.154 Å que se encuentra entre la de un doble (1.18 Å) y un triple enlace (1.06 Å) nitrógeno-oxígeno.^[38]

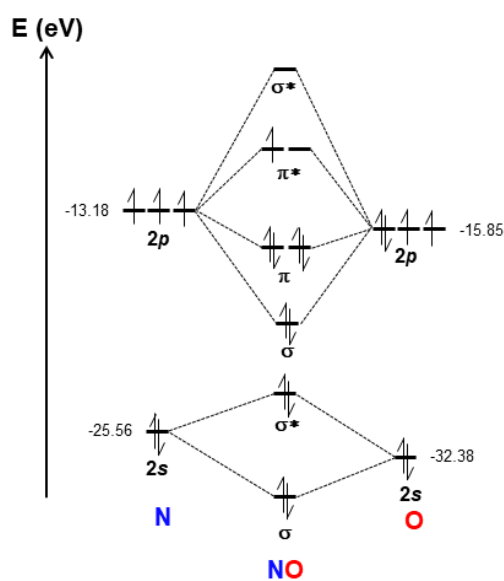
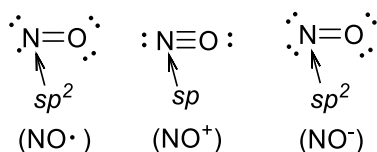


Figura 2. Diagrama de orbitales moleculares para el óxido nítrico.

Los átomos en el óxido nítrico pueden presentar diversas hibridaciones, estados de oxidación y órdenes de enlace (Esquema 5), presentando así diversas formas de coordinación hacia centros metálicos y por lo que se le denomina un ligante “no inocente”.



Esquema 5. Diferentes hibridaciones y estados de oxidación para el óxido nítrico.

El enlace entre el metal y el nitrosilo puede así presentar dos geometrías (Figura 3), lineal cuando el ángulo M-N-O es cercano a 180° lo cual corresponde a la coordinación del nitrosilo como NO^+ , actuando como un donador de $3 e^-$, y angular cuando el ángulo es cercano a 120° , coordinándose como NO^- y donando $1 e^-$ al centro metálico. El enlace entre el metal y el nitrosilo tiene dos componentes,^[39] por una parte el nitrosilo dona un par de electrones no enlazantes (donación σ) y por otra parte el traslape orbital entre orbitales d del metal con geometrías adecuadas y orbitales π^* del nitrosilo producen retrodonación metal-ligante, lo cual tiene un efecto dual, por un lado fortalece el enlace M-NO pero por otro debilita el enlace N-O, ya que este proceso polariza electrones hacia orbitales de antienlace en el nitrosilo.

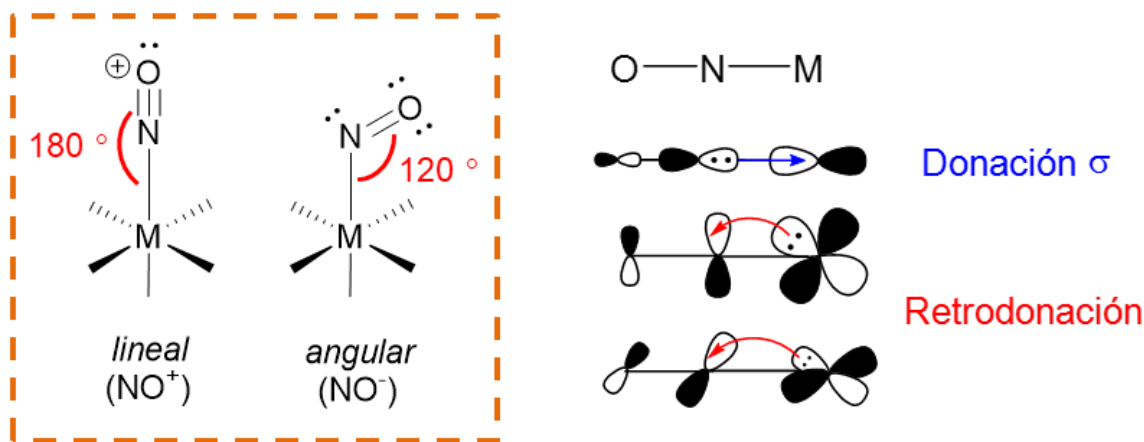
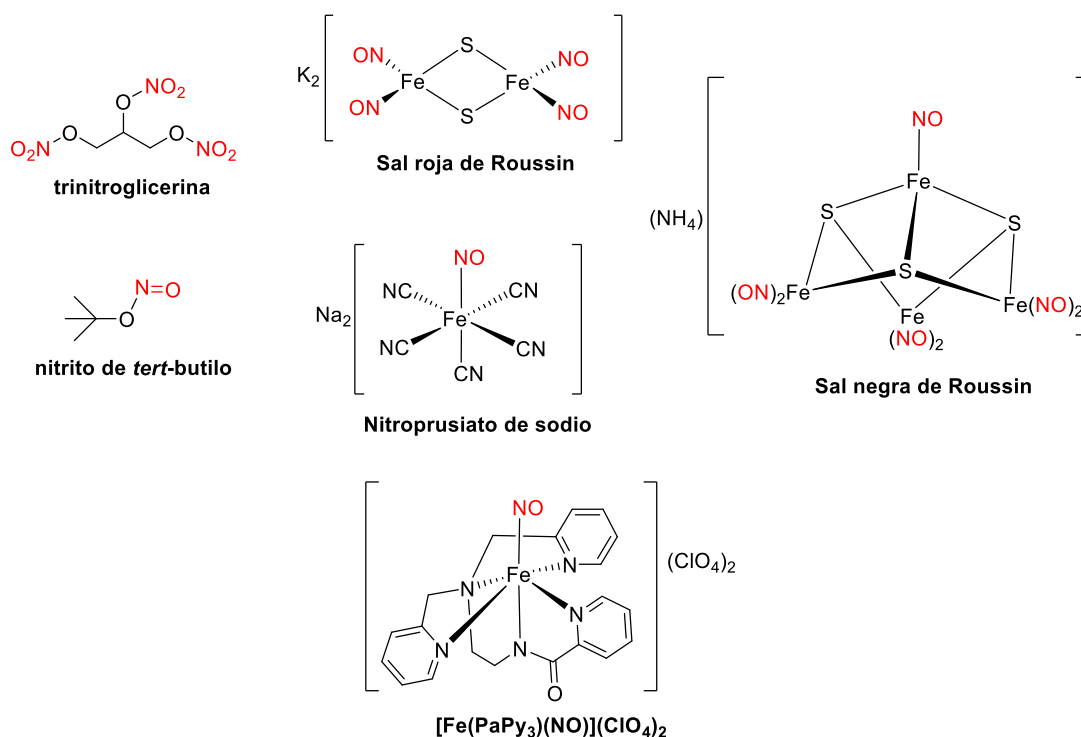


Figura 3. Geometrías y componentes del enlace de coordinación entre un metal y el óxido nítrico.

1.2.4. Donadores de óxido nítrico

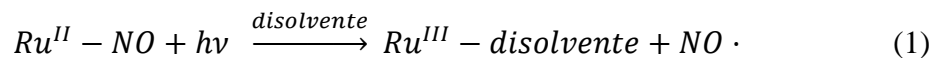
El óxido nítrico tiene un interés en terapia contra cáncer ya que es capaz de ejercer diversos efectos terapéuticos dependiendo de su concentración. Uno de los primeros efectos descubiertos fue su capacidad de producir relajación muscular y vasodilatación, lo cual ha permitido el uso de algunos donadores de NO[•] como reguladores de la presión sanguínea;^[40] por otro lado, con respecto a su uso en terapia contra cáncer, dependiendo de su concentración el óxido nítrico produce efectos contrarios, mientras que a bajas concentraciones (1- 100 nM) induce proliferación celular y favorece la angiogénesis y la metástasis, a concentraciones mayores a 100 nM es capaz de inducir muerte celular por diversos mecanismos, principalmente por apoptosis.^[38, 41] Debido a esto, durante las últimas décadas se se han desarrollado diversas moléculas capaces de liberar NO[•], incluyendo moléculas puramente orgánicas como la trinitroglicerina y el nitrato de tertbutilo o compuestos de coordinación de hierro como las sales de Roussin y el nitroprusiato de sodio (Esquema 6).^[39, 42] Sin embargo muchos de estos compuestos presentan limitaciones como el hecho de que liberan el radical de forma espontánea, lo cual impide tratar una zona específica del cuerpo; además algunos de estos compuestos son inestables en medio acuoso, por ejemplo el nitroprusiato de sodio libera lentamente iones cianuro en agua,^[43] sin embargo no lo suficientemente rápido como para prevenir su uso como antihipertensivo. A pesar de que el uso de un ligante pentadentado en el caso de $[\text{Fe}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{ClO}_4)_2$ (PaPy = N,N-bis(2-piridilmetil)amino-N-etil-2-piridin-2-carboxamida) resuelve la problemática de la liberación de ligantes cianuro, en medio acuoso este compuesto libera el radical NO[•] tanto al ser irradiado como de forma espontánea, como los compuestos de coordinación de hierro mencionados anteriormente.^[44]

Si bien muchos otros donadores de NO• con centros metálicos de cromo^[45] y manganeso^[46] han sido desarrollados, la amplia mayoría presenta también limitaciones similares.

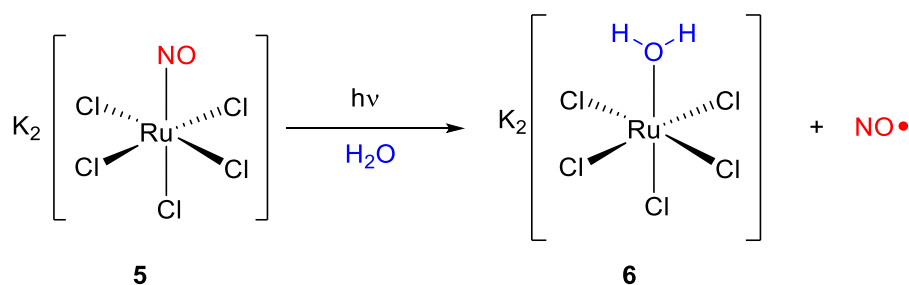


Esquema 6. Algunos ejemplos de los primeros sistemas moleculares capaces de liberar óxido nítrico.

Más recientemente, la atención se ha centrado en el desarrollo de nitrosilos de rutenio, ya que estos generalmente liberan el radical únicamente bajo irradiación y son relativamente inertes al oxígeno a temperatura ambiente, lo cual había sido una limitante frecuente con otros metales. La fotólisis de estos sistemas sigue de forma general la Ecuación (1),^[47] en la que bajo irradiación el compuesto intercambia el ligante nitrosilo por una molécula de disolvente (generalmente acetonitrilo o agua). En la amplia mayoría de los casos el proceso involucra la oxidación de Ru^{II} a Ru^{III} ya que el nitrosilo se libera como NO^\bullet , la presencia de un centro metálico de Ru^{III} ha sido demostrada por EPR en disolución,^[48] así como por difracción de Rayos-X de monocristal.^[49]



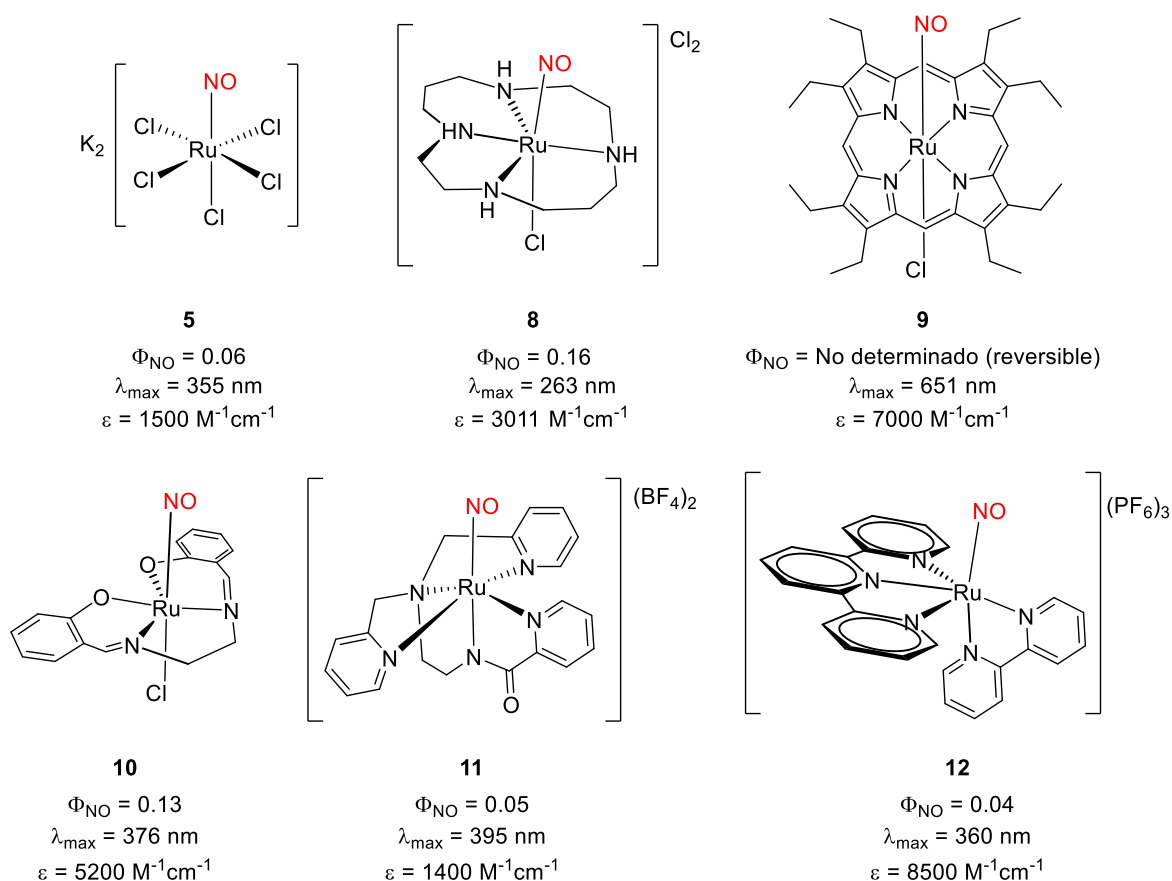
Las primeras investigaciones sobre la fotoquímica de nitrosilos de rutenio fueron reportadas en 1971 por Cox y Wallace que observaron que el compuesto $K_2[Ru(NO)(Cl)_5]$ (**5**) se tornaba café tras exponerse a la luz;^[50] Nikol'skij y colaboradores demostraron después que, al irradiarse en medio acuoso, dicho compuesto se transformaba en $K_2[Ru(H_2O)(Cl)_5]$ (**6**),^[51] con un cambio en el estado de oxidación de Ru^{II} a Ru^{III} (Esquema 7).^[52]



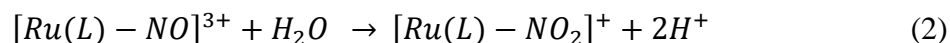
Esquema 7. Foto-reacción para la liberación de óxido nítrico a partir de $K_2[Ru(NO)(Cl)_5]$ en medio acuoso.

En el Esquema 8 se muestran algunos ejemplos representativos de los primeros nitrosilos de rutenio desarrollados.^[50, 53] A pesar de que estas primeras investigaciones rindieron algunos sistemas atractivos en términos de posibles aplicaciones, por ejemplo **11** que libera $NO\cdot$ exclusivamente bajo irradiación y es estable en medio acuoso en un intervalo de pH = 5-9, esto no es el caso con muchos otros, que presentan diversas limitaciones; por ejemplo la fotorreacción de **9** es reversible en medio acuoso, en tanto que compuestos como **5** evolucionan en agua para producir el intercambio de un cloruro por una molécula de agua; por otra parte, numerosos nitrosilos de rutenio con estructuras conteniendo ligantes bidentados similares a la 2,2'-bipiridina (bpy) en **12**, llevan a cabo en medio acuoso una reacción ácido-base indeseable en la que el NO^+ se convierte en un ligante nitrito (NO_2^-) de

acuerdo con la Ecuación 2,^[53e] limitando fuertemente sus aplicaciones. La eficiencia de la liberación del radical, expresada como el rendimiento cuántico de fotoliberación (Φ_{NO}), es la relación del número de moléculas de NO \cdot liberadas entre el número de fotones absorbidos. Las moléculas **5-12** poseen valores de $\Phi_{NO} = 0.04 - 0.16$, que son satisfactorios en relación a que más recientemente se ha encontrado que valores de Φ_{NO} similares permiten alcanzar concentraciones terapéuticas del radical.^[54] Sin embargo, la longitud de onda de irradiación para la mayoría de estos compuestos reside dentro del UV, lo que es indeseable pues puede causar daños a tejidos saludables al ser aplicados en terapia.



Esquema 8. Algunos de los primeros nitrosilos de rutenio desarrollados y sus rendimientos cuánticos de fotoliberación del óxido nítrico (Φ_{NO}).



Así pues, durante las últimas décadas se ha buscado la obtención de nitrosilos de rutenio que puedan ser irradiados dentro de la ventana fototerapéutica ($\lambda = 600 - 1000$ nm, Figura 4),^[55] que es una región del espectro electromagnético para la que los tejidos humanos, especialmente la piel, son altamente transparentes. Las primeras investigaciones a este respecto, lideradas y revisadas recientemente por el grupo de P. K. Mascharak,^[47, 56] han rendido ejemplos prometedores de nitrosilos de rutenio con liberación de NO[•] bajo irradiación con luz visible (Esquema 9); en los compuestos **13-17**,^[57] la estrategia consistió en introducir cromóforos en disposición *trans* al grupo nitrosilo, logrando con esto que **13-15** absorbieran luz visible y acercando la excitación de estos compuestos hacia la ventana fototerapéutica; si bien en el caso de **16** el compuesto no mostró absorción de luz visible, el cromóforo introducido tiene una emisión en $\lambda = 505$ nm (verde), que se pierde una vez que el compuesto ha liberado el NO[•], lo cual permitió hacer un seguimiento de dónde y cuándo se libera el radical;^[57c] contrariamente para **17**,^[57d] la fotorreacción involucra tanto la sustitución del ligante nitrosilo por una molécula de disolvente, como la fotólisis del cromóforo, lo cual produce un encendido de la fluorescencia ($\lambda = 526$ nm) una vez que la reacción se ha llevado a cabo. Es importante señalar que los valores de Φ_{NO} para los compuestos con un ligante cloruro y los que poseen diversos cromóforos (**13-15**, **17**) en general mostraron incrementos de la eficiencia cuántica en los compuestos sustituidos con cromóforos.^[56b, 57d]

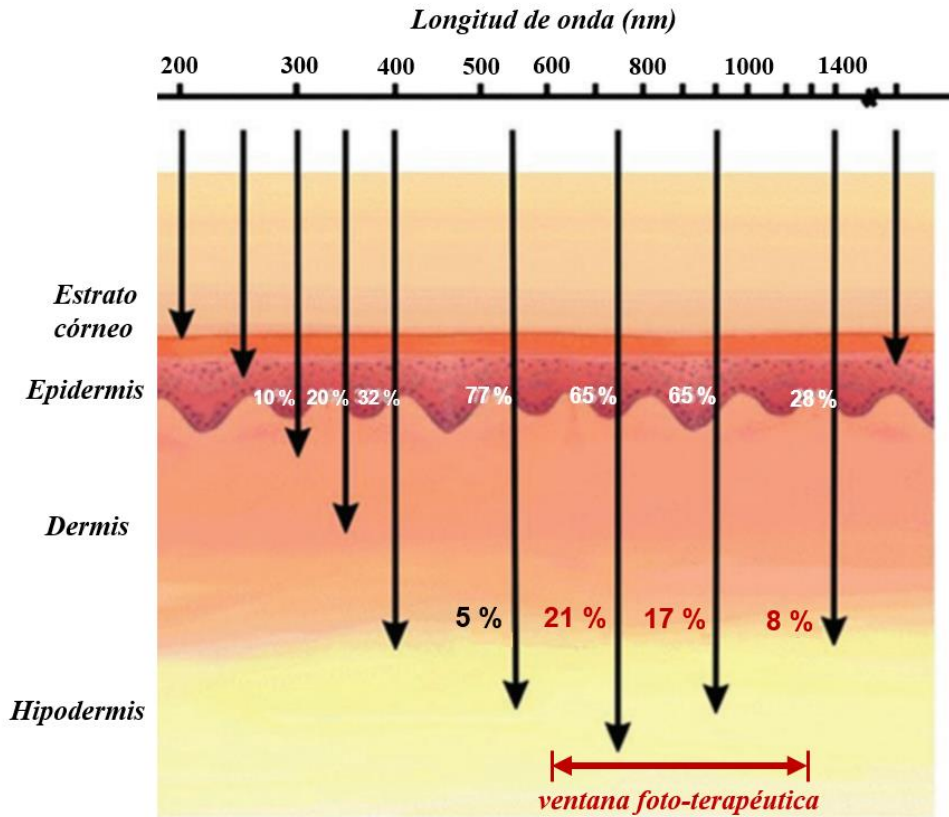
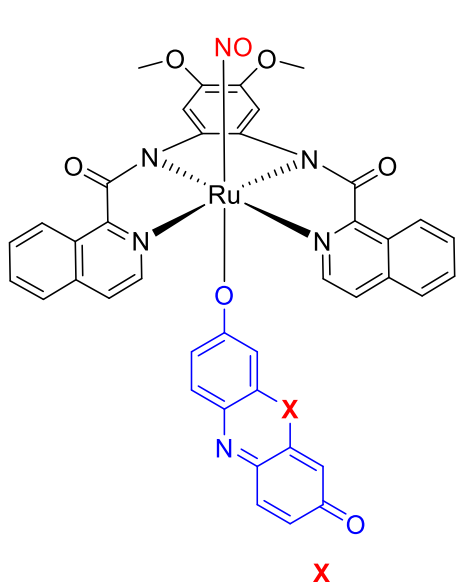
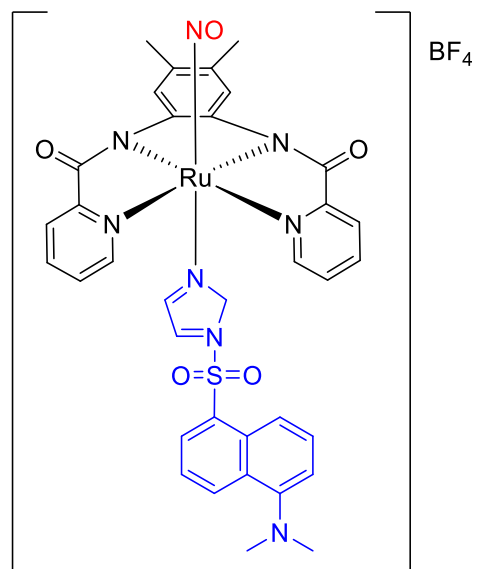


Figura 4. Representación de la ventana foto-terapéutica, un intervalo de longitudes de onda con una atenuación mínima a través de la piel humana. Adaptado con permiso de la Ref. 61.



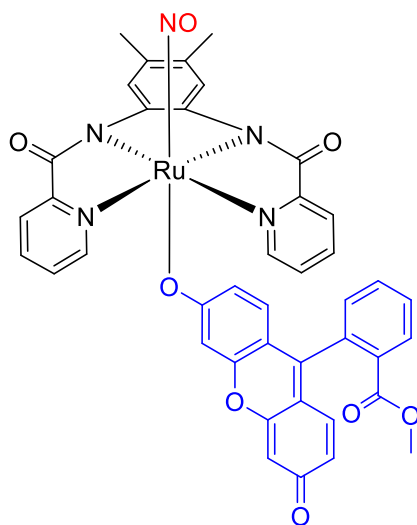
O (13) S (14) Se (15)

Φ_{500}	0.124	0.155	0.189
λ_{\max} (nm)	505	525	535
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	27,100	25,000	22,400



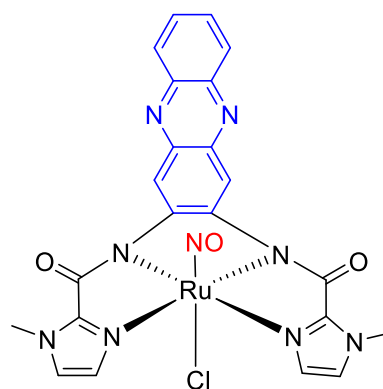
16

Φ_{NO} = No determinado
 λ_{\max} = 385 nm
 ϵ = 4950 $M^{-1}cm^{-1}$



17

Φ_{500} = 0.3
 λ_{\max} = 475 nm
 ϵ = 24000 $M^{-1}cm^{-1}$



18

Φ_{NO} = No determinado
 λ_{\max} = 457 nm
 ϵ = 21,900 $M^{-1}cm^{-1}$

Esquema 9. Nitrosilos de rutenio sensibilizados con cromóforos y sus propiedades fotofísicas. Por claridad, los cromóforos introducidos se indican en azul.

Otros sistemas recientemente informados y ejemplificados con **18** introducen el cromóforo en posición ecuatorial, sin embargo si bien estos son capaces de liberar NO[•] con luz visible,^[58] tienen un desplazamiento hipsocrómico con respecto a **13-15** y **17**, alejándose de la ventana fototerapéutica. Finalmente es importante remarcar que a pesar de que la mayoría de estos compuestos absorben luz visible, a la fecha no hay reportes de nitrosilos de rutenio con liberación de NO[•] dentro de la ventana fototerapéutica, a menos que el proceso se inicie vía absorción de dos fotones,^[35b] una alternativa discutida en la Sección 1.1.5.3.

1.2.5. Absorción de dos fotones y liberación de óxido nítrico

1.2.5.1. Absorción de dos fotones

Los procesos de absorción fotónica siguen la Ecuación 3,^[59] que describe la atenuación de un haz de luz en función de su distancia dentro del medio, donde I es la intensidad del haz de luz incidente, α , β y γ son los coeficientes de absorción de uno, dos y tres fotones, respectivamente, y z es la distancia dentro del medio. Mientras que la absorción de un fotón se encuentra descrita por el primer término, la absorción multifotónica involucra la contribución de términos de mayor orden.

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -\alpha I - \beta I^2 - \gamma I^3 \dots \quad (3)$$

Para el caso particular en que la absorción de dos fotones (TPA, por sus siglas en inglés) es el proceso dominante, la expresión se simplifica a la Ecuación 4,^[60] donde N es el número de moléculas por unidad de volumen, $F = I/h\nu$ es el flujo de fotones y σ_{TPA} , que se conoce como la sección transversal de absorción de dos fotones, define la capacidad de una molécula para presentar el fenómeno y encuentra su símil en el coeficiente de extinción molar (ϵ) para el proceso de absorción de un fotón.

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -\beta I^2 = -N\sigma_{TPA}FI \quad (4)$$

Para moléculas con arquitecturas donador-aceptor o “*push-pull*”, la TPA se suele describir empleando un modelo de dos niveles (Figura 5a-b),^[60-61] que involucra la transición de la molécula del estado fundamental (S_0) a un estado excitado (comúnmente el primero, S_1) en dos pasos secuenciales: el primer fotón lleva a la molécula a un estado virtual intermedio y el segundo fotón la lleva al estado excitado final; la permanencia en el estado virtual intermedio es tan efímera que formalmente se considera la absorción de ambos fotones como un evento simultáneo. El término *push-pull*, usado ampliamente en este trabajo, hace referencia a moléculas que presentan grupos electrodonadores y electroaceptores comunicados por un puente π , de tal forma que el grupo electrodonador “empuja” (*push*, en inglés) densidad electrónica y el electroceptor la “jala” (*pull*, en inglés).

Es importante señalar además que debido a que la TPA varía proporcionalmente con respecto a I^2 , este fenómeno requiere la aplicación de un haz de luz de alta intensidad, por lo que la TPA se produce de forma significativa únicamente en el punto focal de un láser pulsado, que es un volumen de $1 - 35 \mu\text{m}^3$ en donde la densidad de fotones es máxima,^[62] lo que constituye una diferencia importante con respecto a la absorción de un fotón y se ejemplifica en la Figura 5c con la fluorescencia por absorción de uno y dos fotones para un colorante orgánico. La necesidad de emplear un láser explica además la razón por la cual, habiendo sido descrito de manera teórica durante los años 30’s por Maria Goeppert-Mayer,^[63] este fenómeno fue observado por primera vez hasta 1961 por Kaiser y Garrett,^[64] poco tiempo después de la invención del láser.^[65]

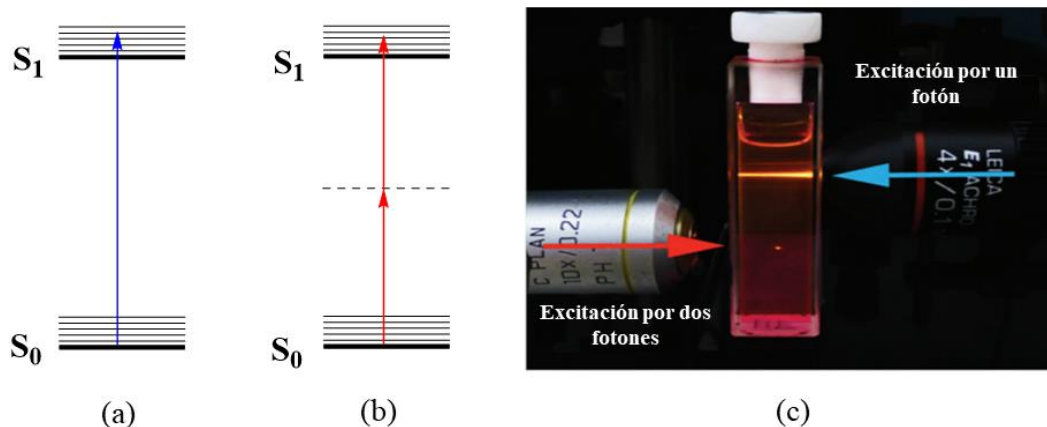


Figura 5. Representación simplificada para los procesos de absorción de un fotón (a) y dos fotones (b) para una molécula dipolar *push-pull*. Fluorescencia de un colorante tras excitación por uno y dos fotones (c). Adaptado con permiso de la Ref. 61.

Como se mencionó anteriormente, el valor de σ_{TPA} es clave para evaluar la capacidad de una molécula para presentar eficientemente TPA. Este parámetro, que se expresa en unidades GM (Goeppert-Mayer, $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} / \text{fotón}$), se mide generalmente utilizando la técnica Z-scan^[66] que consiste en aplicar un láser pulsado a una muestra del analito en disolución; la intensidad transmitida del láser, $T(z)$, varía dependiendo de la posición de la muestra (z) a lo largo del eje focal del láser, encontrándose generalmente un mínimo de intensidad transmitida (la mayor atenuación) cuando la muestra se encuentra en el punto focal del láser $T(z=0)$, que como se explicó previamente, corresponde al volumen con mayor intensidad incidente y es por lo tanto donde se espera un máximo para la TPA. A partir de un ajuste numérico de las mediciones de $T(z)$ es posible determinar con precisión el valor de σ_{TPA} . Alternativamente, este parámetro puede determinarse convenientemente por la técnica de fluorescencia por absorción de dos fotones (TPEF por sus siglas en inglés)^[67] en la que se mide la intensidad fluorescente de una muestra en disolución tras ser irradiada con un láser

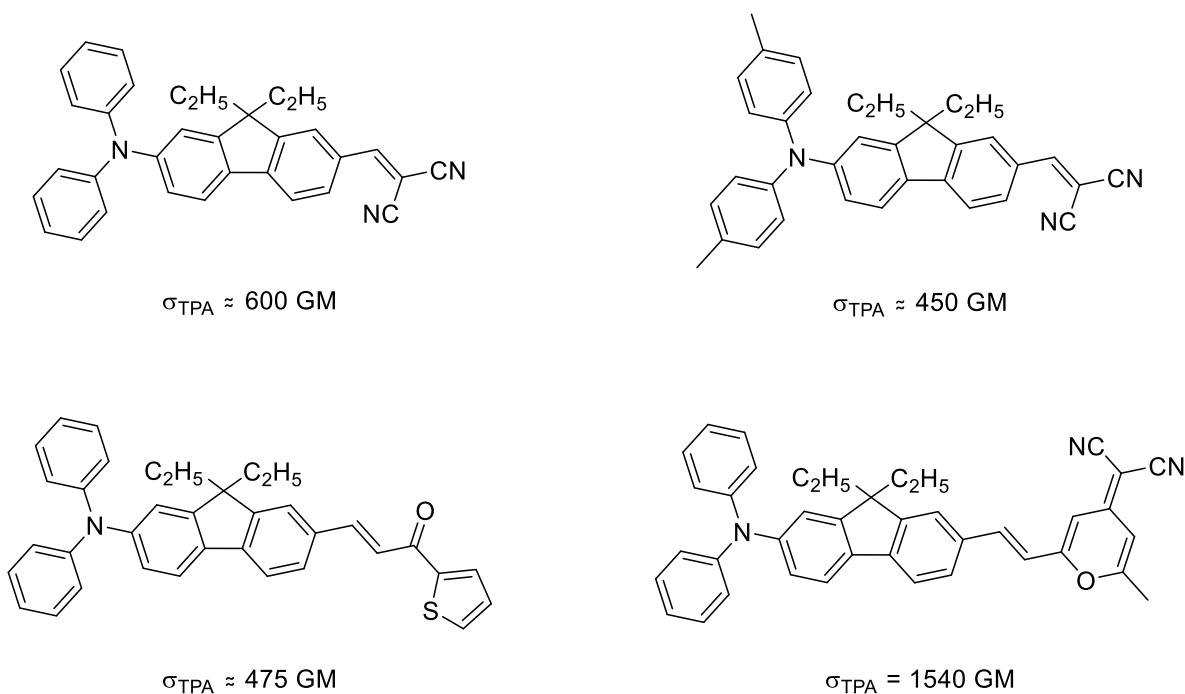
pulsado; el valor de σ_{TPA} para la muestra es obtenido comparando su intensidad fluorescente con respecto a la de un fluoróforo de referencia con un valor de σ_{TPA} conocido.

En comparación con la absorción de un fotón, la TPA ofrece diversas ventajas para la aplicación clínica de la terapia fotodinámica (PDT) y la quimioterapia fotoactivada (PACT); la primera es que en vez de usar un fotón de energía elevada (típicamente en la región del UV), en TPA se usan dos fotones de menor energía (típicamente en el visible/infrarrojo cercano), lo cual permite la excitación del compuesto dentro de la ventana foto-terapéutica; además, si tomamos en cuenta el diámetro usual de una célula eucarionte (10-100 μm),^[68] y que la TPA se produce únicamente en el punto focal del láser, resulta evidente que esta técnica provee una resolución espacial extraordinaria, suficiente para matar individualmente una célula vía PDT o PACT, sin afectar tejidos sanos circundantes. Sin embargo, el uso de TPA en terapia es desafiante, ya que los valores de σ_{TPA} para la mayoría de los cromóforos suelen ser muy bajos, por lo que para producir eficientemente la TPA es indispensable un diseño molecular racional que maximice el valor de σ_{TPA} .

Quizá la manera más popular y eficiente para obtener sistemas moleculares con valores elevados de σ_{TPA} sea la construcción de sistemas multipolares, es decir, moléculas con grupos electrodonadores y electroattractores participando en la formación de más de un eje de transferencia de carga. Sin embargo, esto conduce de forma casi invariable a sistemas con pesos moleculares muy elevados, cuyo ingreso al medio intracelular puede estar comprometido, como lo señalan diversas reglas empíricas como las de Lipinski^[69] y Ghose,^[70] que señalan que la permeabilidad celular se favorece para compuestos pequeños, con pesos moleculares cercanos o por debajo de 500 Da. Más aún, se han reportado moléculas dipolares *push-pull* con valores de σ_{TPA} en el intervalo de 450 – 1888 GM,^[71] que como se

discute a detalle en la Sección 1.1.5.3, son valores adecuados para las aplicaciones que persigue nuestro grupo de trabajo con respecto al uso de TPA en terapia mediante la liberación de NO:

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo decidimos enfocarnos al desarrollo de sistemas con tamaños moleculares reducidos y arquitecturas *push-pull*. Algunos ejemplos representativos para derivados de fluoreno con valores adecuados de σ_{TPA} se muestran en el Esquema 10, cuyos valores de σ_{TPA} fueron determinados mediante TPEF con pulsos de femtosegundos a $\lambda = 740 - 940$ nm; adicionalmente Seth R. Marder y colaboradores han encontrado valores de σ_{TPA} de 1113 – 1888 GM para moléculas estructuralmente similares.^[71c]

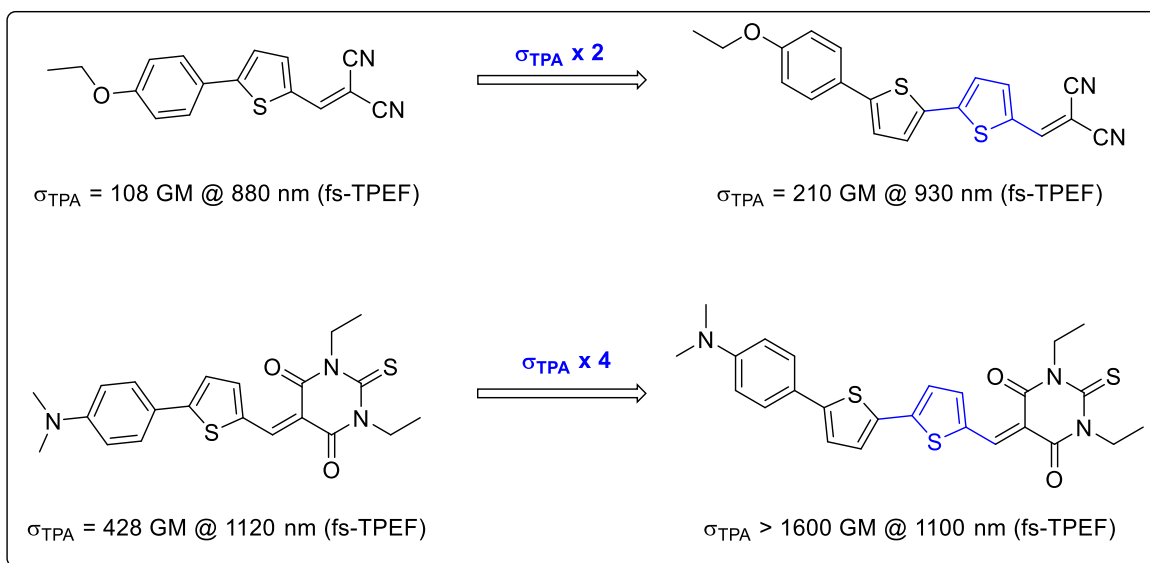


Esquema 10. Compuestos con arquitectura dipolar *push-pull* y elevadas secciones transversales de absorción de dos fotones (σ_{TPA}).

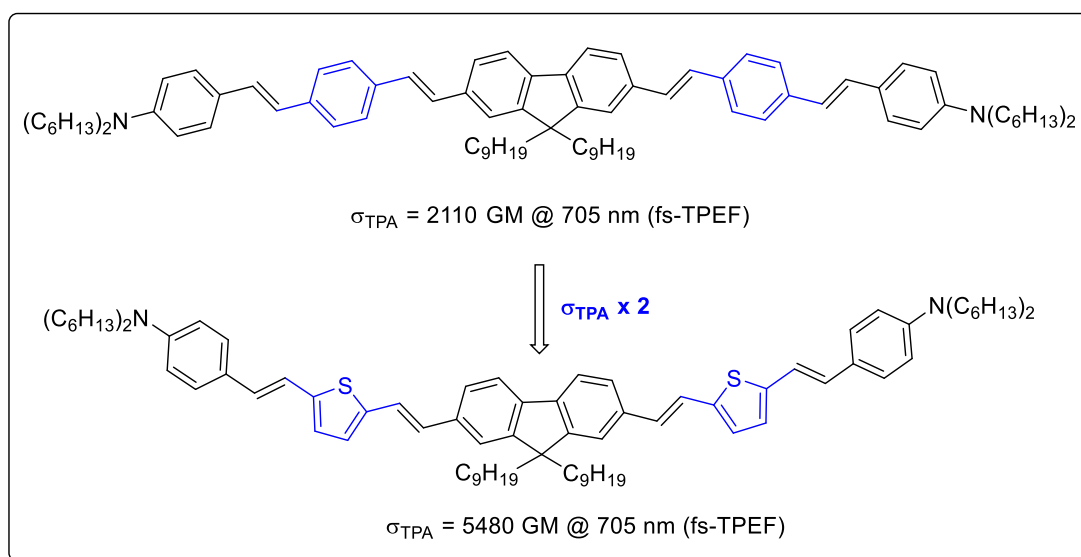
Resulta conveniente señalar que para moléculas con arquitecturas dipolares *push-pull*, el valor de σ_{TPA} puede aproximarse de acuerdo con la Ecuación 5,^[72] donde f es la fuerza del oscilador, una medida de la intensidad relativa de la transición electrónica, $\mu_e - \mu_g$ es la diferencia en momento dipolar entre el estado excitado y el basal, respectivamente, Γ es el ancho de la banda de absorción y E_{ge} es la energía asociada a la transición electrónica.

$$\sigma_{TPA} = \frac{16\pi^2 f(\mu_e - \mu_g)}{5\hbar c^2 \Gamma E_{ge}} \quad (5)$$

Como se muestra en el Esquema 11, la introducción de anillos de tienilo representa una de las estrategias más exitosas empleadas para incrementar el valor de σ_{TPA} en sistemas *push-pull* dipolares^[73] y multipolares,^[74] incrementando su valor de 2 a 4 veces. La influencia electrónica debida a la introducción de este heterociclo suele ser compleja, asociándose a a diversos factores, entre los que figuran una mejora en la planaridad de la molécula, una extensión del sistema π conjugado (disminuyendo E_{ge}), el aumento en la intensidad de la banda de absorción (incrementando f) y el rol que este heterociclo llega a tener como un grupo donador adicional, al tratarse de un sistema π -excesivo.



(a)



(b)

Esquema 11. Secciones transversales de absorción de dos fotones para moléculas con arquitecturas (a) dipolares y (b) cuadrupolares.

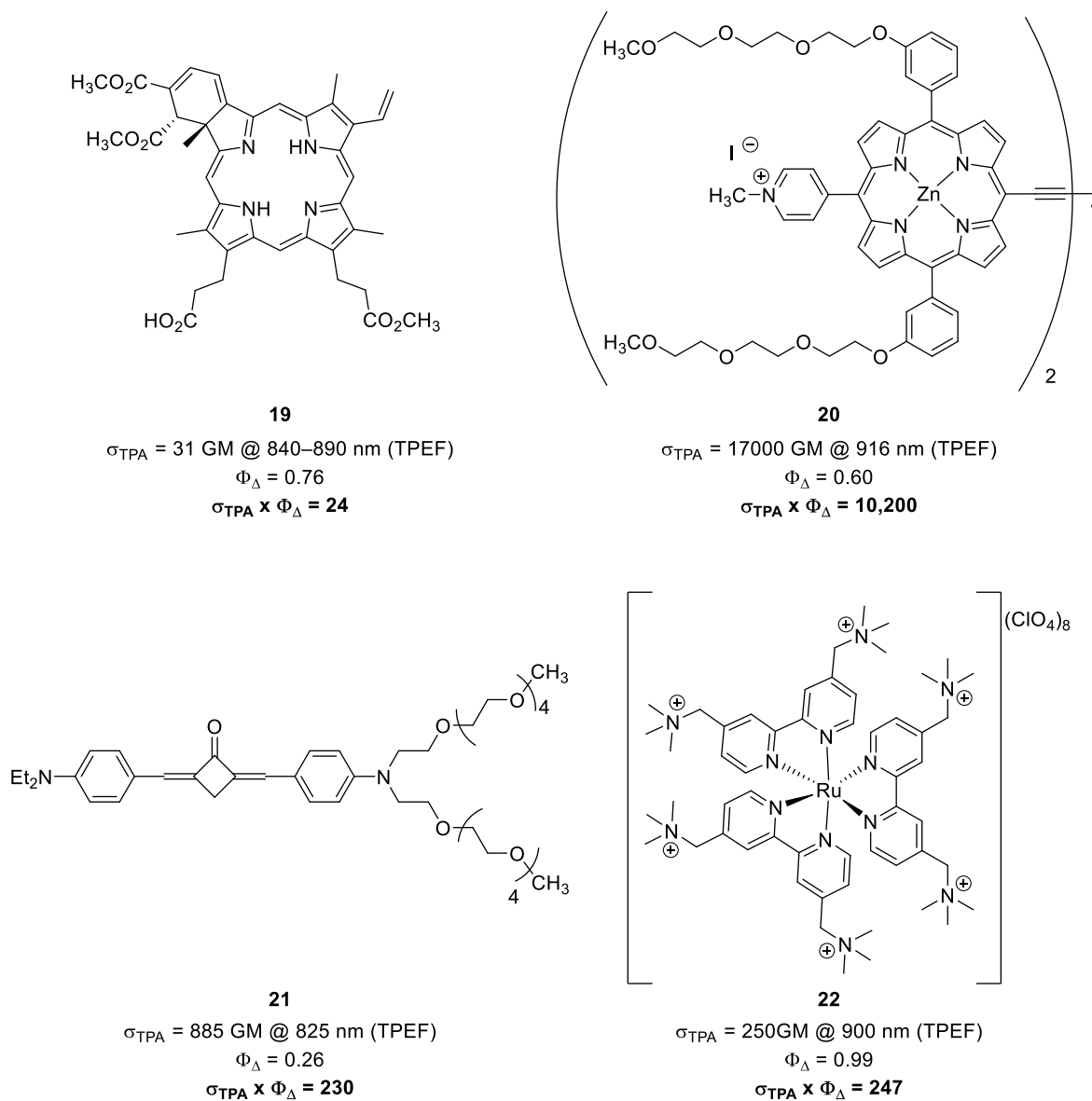
1.2.5.2. Terapia fotodinámica vía absorción de dos fotones

Quizá la problemática más importante para incorporar la TPA tanto en PACT como en PDT sea que mientras más bajo es el valor de σ_{TPA} , mayor es la intensidad del láser (P, en Watt)

y/o los tiempos de irradiación necesarios para producir el fenómeno, que a valores elevados puede inducir daños fototérmicos en el tejido.^[75] Esta problemática puede resolverse desarrollando compuestos con valores elevados de σ_{TPA} . Para ilustrar esto, en el Esquema 12 se muestra la estructura del compuesto Verteporfin (**19**), que resultó útil en una aplicación interesante para la PDT que no está relacionada con terapia contra cáncer; en este caso el estrés oxidativo provocado por la generación de 1O_2 se usó para la destrucción de un vaso sanguíneo de *ca.* 15 μm de diámetro en un modelo embrionario,^[62, 76] lo cual podría resultar útil para el tratamiento de derrames oculares. Sin embargo, debido a la elevada intensidad del láser y el tiempo de irradiación prolongado (5 min), el uso de este compuesto podría provocar posibles daños fototérmicos asociados a la terapia. Es importante aclarar que la eficiencia real para la fotorreacción en estos sistemas está dada por el producto $\Phi_{\Delta} \times \sigma_{TPA}$ (Φ_{Δ} es la eficiencia cuántica de generación de 1O_2) para PDT.^[61] Remarcablemente, mediante el uso del dímero porfirínico metalado **20**,^[77] con una eficiencia tres órdenes de magnitud mayor a la de **19**, fue posible el cierre de arterias con diámetros de *ca.* 40 μm de diámetro *in vivo* en ratones, necesitándose la mitad del tiempo de irradiación (a la misma intensidad del láser) que el necesario para producir el mismo efecto con el compuesto **19**, previniendo así el posible daño fototérmico inducido por el láser.

El compuesto **21** es otro ejemplo exitoso de aplicación *in vivo* de PDT vía TPA;^[78] la terapia con este fotosensibilizador resultó exitosamente en una reducción del tamaño promedio de tumores en ratones en un 43 % con respecto a grupos control, incrementando así en *ca.* 20 % la supervivencia del grupo de ratones tratados con el fotosensibilizador. Debido a su capacidad de generar estados excitados $^3\text{MLCT}$, algunos compuestos de coordinación de Ru^{II} , ejemplificados con el compuesto **22**,^[79] también han sido utilizados

para PDT vía generación de $^1\text{O}_2$; los compuestos con eficiencia *in vitro* y/o *in vivo* mostraron valores de σ_{TPA} entre 124 y 250 GM y de $\Phi_{\Delta} \times \sigma_{TPA}$ entre 92 y 247 GM.^[61, 79-80]



Esquema 12. Algunos fotosensibilizadores usados en terapia fotodinámica vía absorción de dos fotones, secciones transversales de absorción de dos fotones (σ_{TPA}) y eficiencias cuánticas de generación de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}).

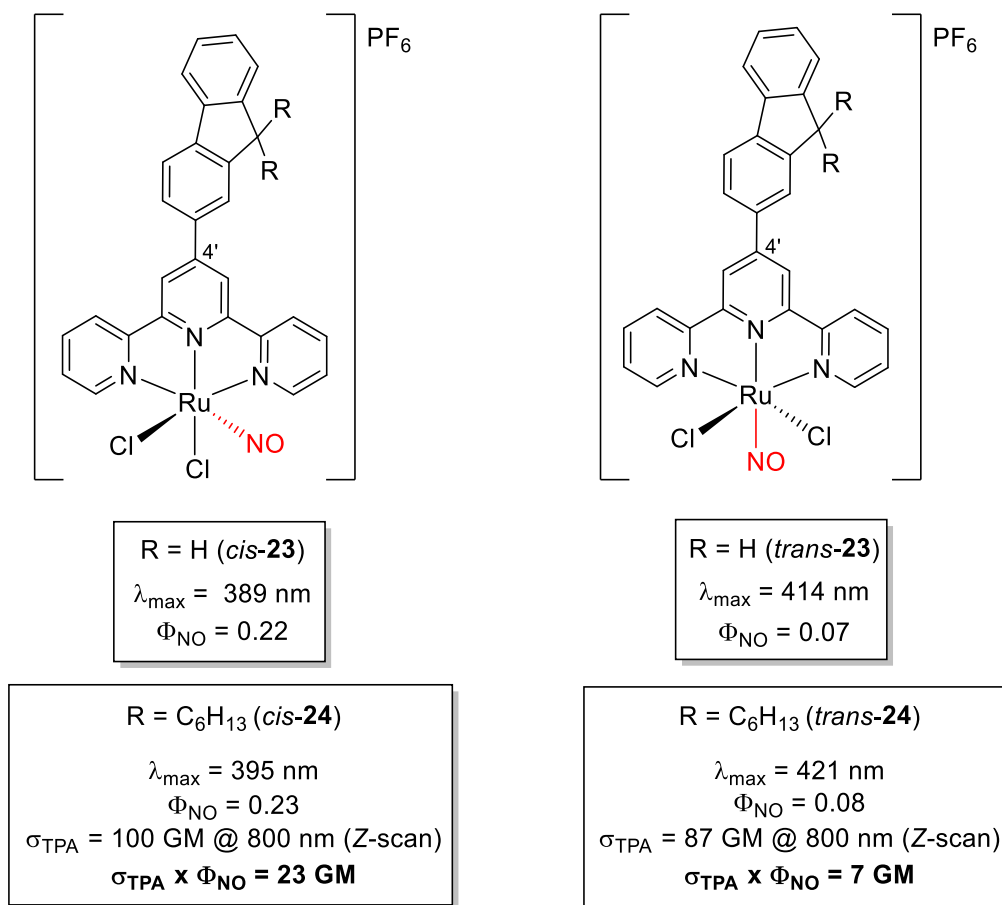
1.2.5.3. Liberación de óxido nítrico vía absorción de dos fotones

Nuestro grupo de trabajo se encuentra explorando el desarrollo de nitrosilos de rutenio para aplicaciones en quimioterapia fotoactivada (PACT) a través de la liberación fotoinducida de óxido nítrico. Nuestra estrategia para alcanzar la ventana fototerapéutica es distinta a la del grupo de Mascharak y otros (Sección 1.1.4), que con este fin han introducido diversos cromóforos al centro metálico de Ru^{II} en disposición *trans* al grupo NO[•], sin lograr aún alcanzar la ventana fototerapéutica vía absorción de un fotón; el enfoque de nuestro grupo para lograr esto es sustancialmente distinto y se basa en la excitación de los compuestos vía absorción de dos fotones, que es atractiva debido a las diversas ventajas frente a la absorción de un fotón (Sección 1.1.5.1).

De forma análoga a lo discutido en la Sección 1.1.5.2 para la PDT, para nuestros sistemas la eficiencia real de liberación del radical está dada por $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$.^[81] Si bien resulta difícil determinar un valor de eficiencia “mínimo” para producir una liberación eficiente del radical, es importante señalar que, en el caso de la PDT, eficiencias en el intervalo $\Phi_{\Delta} \times \sigma_{TPA} = 92 - 247 \text{ GM}$ resultaron suficientemente altas para aplicaciones *in vivo*. Tomando en cuenta además, que, como se discutió en la Sección 1.1.4., la producción de concentraciones bajas del radical pueden producir proliferación celular en vez de muerte celular por apoptosis, resulta clara la necesidad de desarrollar nitrosilos de rutenio con eficiencias cercanas o mayores a 100 GM para producir satisfactoriamente la liberación de NO[•] vía TPA.

Es así que nuestro grupo reportó en 2014 la liberación de NO[•] de nitrosilos de rutenio con un ligante tridentado tipo 2,2':6',2''-terpiridina funcionalizado con el grupo 9H-fluoreno

en la posición C-4';^[82] la elección de este sustituyente se basó en la amplia evidencia en la literatura de valores elevados de σ_{TPA} para derivados de fluoreno.^[83] La estructura de los sistemas estudiados se muestra en el Esquema 13 que corresponden a los isómeros *cis*(Cl,Cl)-[Ru(FT)Cl₂(NO)](PF₆) (*cis*-**23**) y *trans*(Cl,Cl)-[Ru(FT)Cl₂(NO)](PF₆) (*trans*-**23**), donde FT = 4'-(9*H*-fluoren-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina. Estos dos isómeros, que se generan debido al uso de K₂[RuCl₅(NO)] para la coordinación del rutenio, requieren purificación mediante HPLC seguida por metátesis con NH₄PF₆, lo cual es un proceso tedioso y relativamente caro. En este primer estudio, se encontró que *cis*-**23** posee un valor de Φ_{NO} tres veces mayor que el isómero *trans*-**23**, lo cual se asocia con el efecto *trans* del cloruro, favoreciendo la fotoliberación en *cis*-**23**; además hay un ligero desplazamiento batocrómico para *trans*-**23**, que se asoció con la presencia de un sistema π -conjugado más extendido y una arquitectura *push-pull* más eficiente en este caso, ya que el ligante nitrosilo (electroaceptor) se encuentra en el mismo plano que el grupo electrodonador (el ligante terpiridínico), lo que resulta en una mejor comunicación entre ambos.

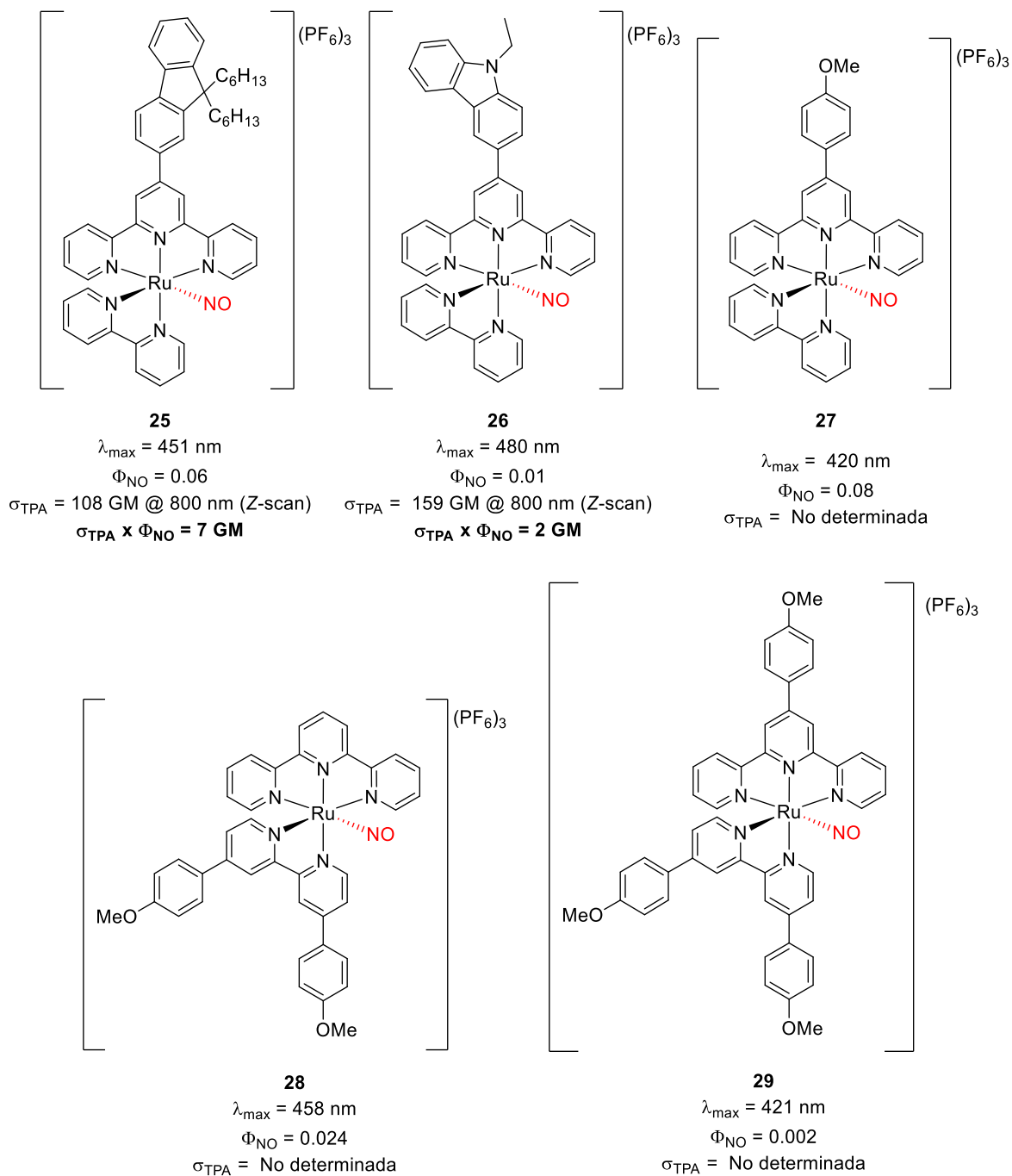


Esquema 13. Estructura y propiedades fotofísicas de nitrosilos de rutenio con ligantes tipo 2,2':6',2''-terpiridina conteniendo grupos 9*H*-fluoreno.

Debido a la ausente fluorescencia de estos compuestos, se escogió la técnica de Z-scan para la determinación de σ_{TPA} , sin embargo, dado que ésta requiere la preparación de una solución concentrada del analito (en el orden de 10^{-2} M), los compuestos *cis*-**23** y *trans*-**23**, con una baja solubilidad en disolventes orgánicos, resultaron inadecuados para las mediciones, lo que motivó la preparación de los compuestos *cis*-**24** y *trans*-**24** que poseen cadenas de *n*-hexilo en el fluoreno y resultaron notablemente más solubles, con lo que se lograron determinar confiablemente sus valores de σ_{TPA} ,^[72] que a pesar de ser respuestas

relativamente elevadas, debido a los valores bajos de Φ_{NO} , estos compuestos resultan inadecuados para PACT.

Como una forma de facilitar el proceso de síntesis de nitrosilos de rutenio y evitar el tedioso proceso de purificación de los isómeros *cis*(Cl,Cl) y *trans*(Cl,Cl) previamente mencionado, se sintetizaron los compuestos **25-26** (Esquema 14).^[72, 81] Por otro lado, la incorporación de sustituyentes 4-metoxifenilo en los compuestos **27-29**^[84] fue motivada por la hipótesis de que la introducción de grupos donadores favorecería la transferencia de carga hacia el fragmento Ru-NO, lo cual podría resultar en mayores valores de Φ_{NO} ; sin embargo, si bien hay un incremento sustancial en el valor de σ_{TPA} en **26** en comparación con **25**, esta familia de compuestos resultó notablemente menos fotorreactiva que los compuestos con dos ligantes cloruro, reflejado en valores de Φ_{NO} de uno a dos órdenes de magnitud menores que los sistemas con dos ligantes cloruro. Además, si bien la introducción de un ligante adicional tipo 2,2'-bipiridina es atractivo puesto que introduce ejes de transferencia de carga adicionales en el compuesto, como se mencionó en la Sección 1.1.4 este tipo de nitrosilos de rutenio, estudiados por primera vez en el 2006 por da Silva y colaboradores,^[53e] sufren un proceso indeseable en medio acuoso en que el ligante nitrosilo se transforma en nitrito; esta inestabilidad química limita fuertemente las aplicaciones en terapia para estos sistemas.

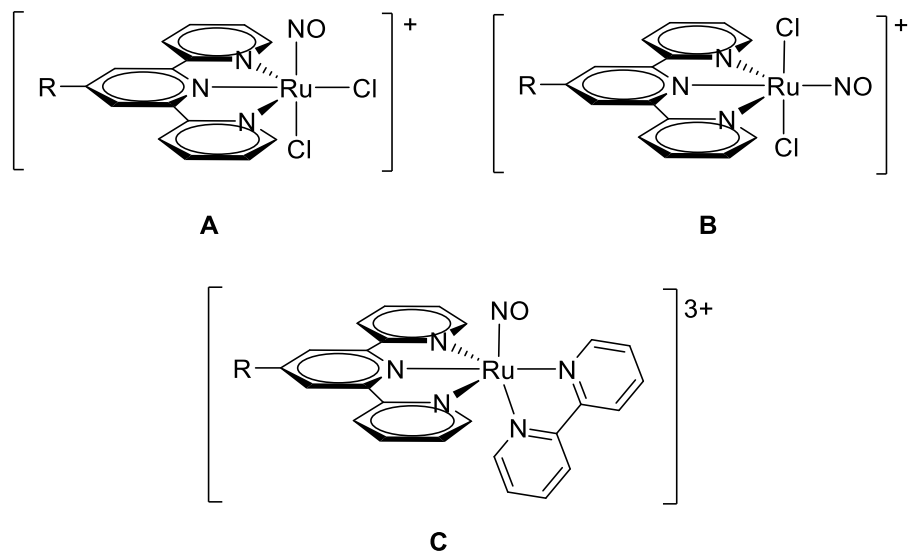


Esquema 14. Estructura y propiedades fotofísicas de nitrosilos de rutenio con ligantes funcionalizados tipo 2,2'-bipiridina y 2,2':6',2''-terpiridina.

En resumen, nuestro grupo de investigación ha trabajado extensamente con tres distintas esferas de coordinación (Esquema 15), la familia A y B con dos ligantes cloruro y la familia

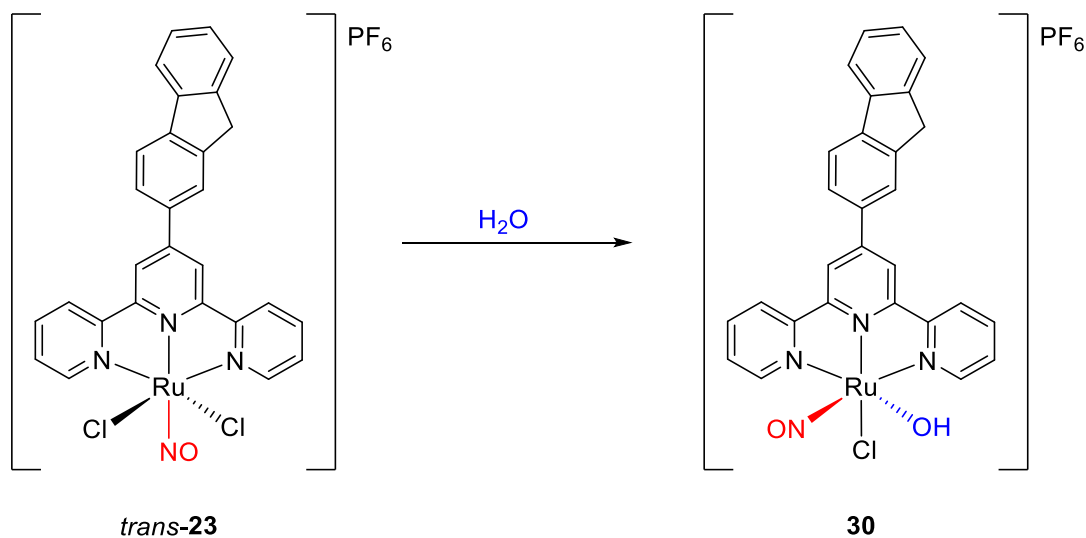
C con el reemplazo de los dos cloruros por un ligante de 2,2'-bipiridina. Las eficiencias obtenidas hasta ahora para nitrosilos de rutenio con liberación de NO^{*} vía TPA se encuentran en el intervalo de 2 - 23 GM, dificultando así la aplicación de estos sistemas y despertando nuestro interés en el diseño y evaluación de nuevos compuestos que presenten eficiencias más cercanas o mayores a 100 GM.

Para encontrar sistemas más eficientes, es necesario tomar en cuenta dos variables, Φ_{NO} y σ_{TPA} , dos propiedades moleculares independientes entre sí. Con respecto a Φ_{NO} , como se discute en la Sección 1.1.6., es un parámetro clave pero difícil de predecir; sin embargo es importante recalcar que la familia C ha producido valores sustancial y reiteradamente menores de Φ_{NO} en el intervalo de 0.002 a 0.08, que para alcanzar una eficiencia real de 100 GM harían necesarios valores de $\sigma_{TPA} = 1250 - 50,000$ GM, que se alcanzan típicamente en sistemas multipolares de peso molecular elevado,^[60] los cuales que pueden probablemente tener comprometida la permeabilidad al medio intracelular, como se discutió en la Sección 1.1.5.1. Contrastantemente, las familias A y B han mostrado valores de Φ_{NO} en el intervalo de 0.22 - 0.39 y 0.05 - 0.12, respectivamente, haciendo necesarios valores de σ_{TPA} considerablemente menores, en el intervalo de 256 - 450 GM y 833 - 2000 GM, respectivamente, que podrían razonablemente alcanzarse con compuestos de peso molecular bajo y arquitecturas dipolares *push-pull*.



Esquema 15. Tres familias de nitrosilos de rutenio estudiados por nuestro grupo de trabajo.

Finalmente, como se discutió con anterioridad, la inestabilidad en medio acuoso en ausencia de luz es un factor que limita en ocasiones las aplicaciones de estos sistemas. En un esfuerzo para estudiar el potencial uso de estos compuestos en medio acuoso, recientemente nuestro grupo publicó que una muestra pura del compuesto *trans*-**23** evoluciona en agua de acuerdo con la reacción mostrada en el Esquema 16, en donde se obtiene el intercambio de ligante Cl→OH produciéndose la especie *trans*(NO,OH)-[Ru(FT)(NO)(OH)(Cl)](PF₆) (**30**) donde FT = 4'-(9*H*-fluoren-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina.^[54b] Este derivado, que produce concentraciones locales de NO[•] en medio acuoso cercanas a 250 nM, resultó capaz de inhibir en un 50 % la viabilidad celular de cultivos de *S. epidermidis* resistente a meticilina, como resultado de la irradiación del compuesto vía absorción de un fotón. Sin embargo, si bien **30** fue identificado a partir de soluciones acuosas por diversas técnicas, incluyendo difracción de Rayos-X de monocristal, una limitante importante para continuar con los estudios de estos sistemas radica en la ausencia de una estrategia sintética adecuada para obtenerlos, que no había sido realizado hasta el presente trabajo.



Esquema 16. Evolución química en agua del compuesto *trans*-**23**.

1.2.6. Aspectos fotoquímicos de la liberación del óxido nítrico

Como se mencionó en la Sección 1.1.4, de forma general el proceso de fotólisis en nitrosilos de rutenio implica dos procesos después de la fotoexcitación: el cambio de oxidación del centro metálico de Ru^{II} a Ru^{III} y el reemplazo del ligante nitrosilo por una molécula de disolvente. La Figura 6 muestra una evolución espectral típica para la fotólisis de nitrosilos de rutenio con ligantes polipiridínicos, con bandas para el fotoproducto (espectro rojo) cercanas a $\lambda = 350 \text{ nm}$ y $\lambda = 630 \text{ nm}$, la última asociada a transferencia de carga del ligante al centro metálico de Ru^{III}. A partir de estas evoluciones espectrales, es posible obtener el valor del rendimiento cuántico de fotoliberación (Φ_{NO}), definido como el número de moléculas de NO[•] liberadas entre el número de fotones absorbidos, representando así la eficiencia de la fotorreacción. El procedimiento mediante el cual se determina este parámetro se discute detalladamente en las Secciones 1.4.5 y 1.6.7.

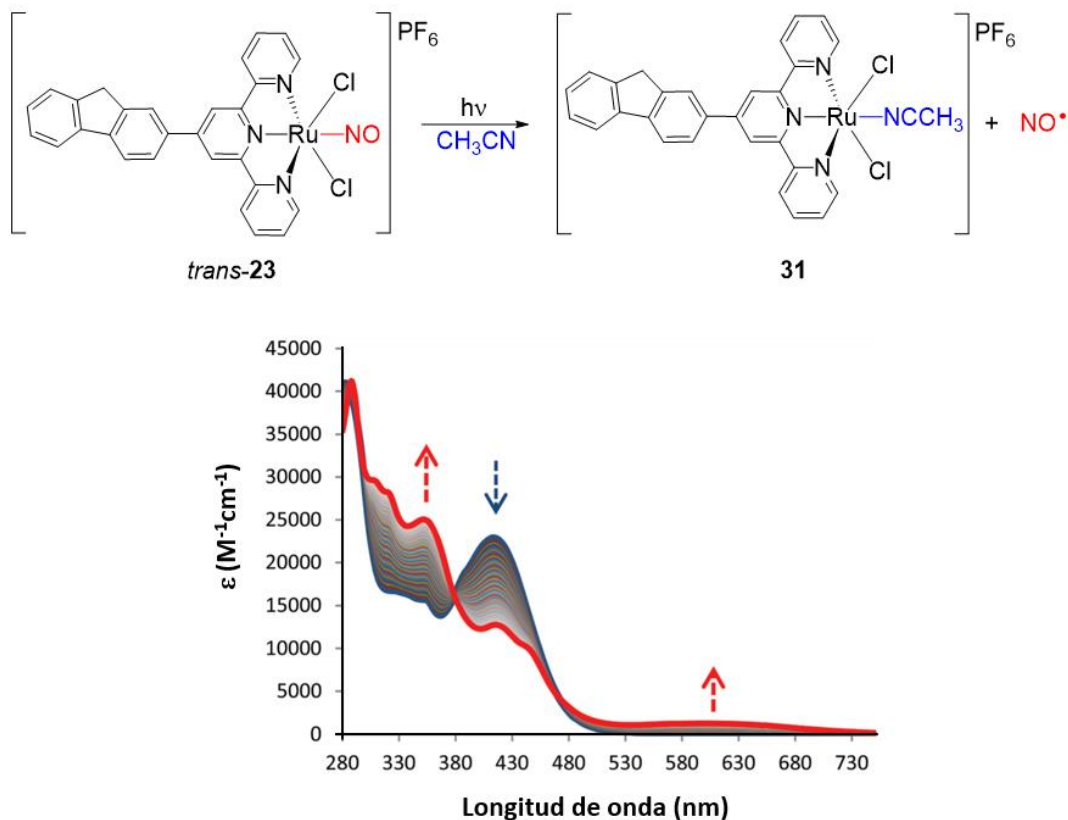
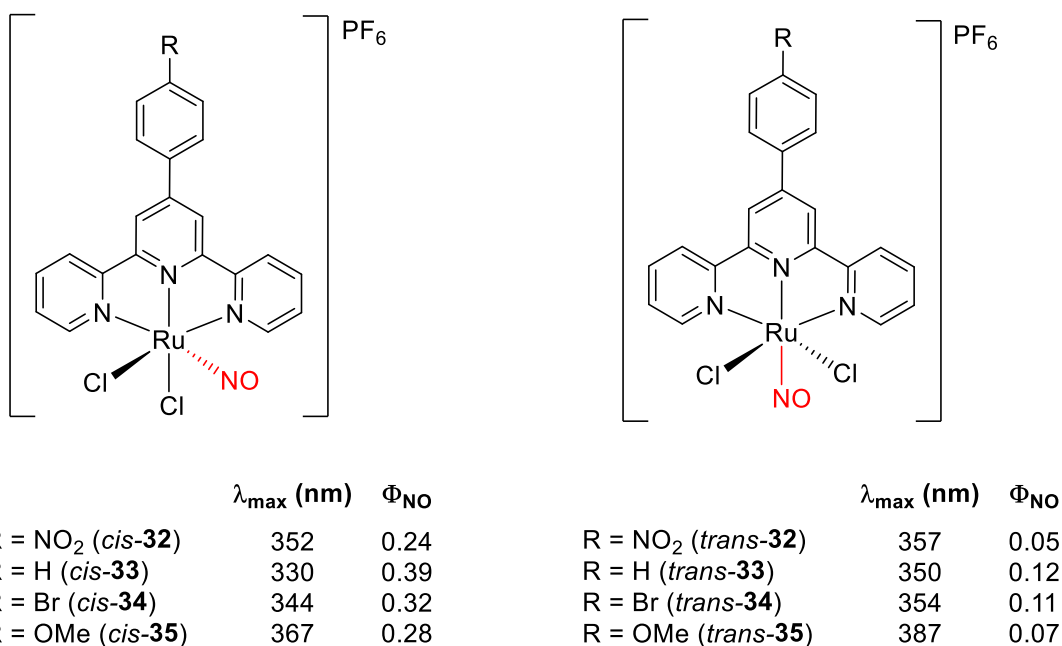


Figura 6. Evolución espectral para la fotólisis ($\lambda_{\text{irr}} = 405 \text{ nm}$) de *trans*-**23** en acetonitrilo. Adaptado con permiso de la Ref. 82.

Finalmente, es importante señalar que el mecanismo exacto por el cual se libera el radical de los nitrosilos de rutenio es aún un tema controversial y no ha sido elucidado completamente,^[85] lo cual ha complicado establecer correlaciones generales entre factores estructurales y el valor de Φ_{NO} , como lo observado para los compuestos *cis/trans*-(**32-35**) (Esquema 17) informados por nuestro grupo de trabajo, que si bien muestran una modulación clara de las propiedades fotofísicas dependiendo de los grupos electrodonadores/electroatractores presentes y de la estereoquímica en el centro metálico, resultó imposible establecer una correlación entre las propiedades electrónicas del ligante y el valor de Φ_{NO} . Sin embargo, es importante recalcar que el modelo mecanístico más

aceptado para la liberación del radical involucra varios rearrreglos geométricos del ligante nitrosilo y la transición electrónica de la molécula a través de la absorción secuencial de dos fotones de energías específicas.^[85] Además, es generalmente aceptado que buena parte del proceso de fotólisis tiene un origen en la transferencia de carga fotoinducida del ligante al fragmento Ru-NO, lo cual polariza densidad electrónica hacia orbitales moleculares con carácter antienlazante para el enlace Ru-NO, debilitándolo y produciendo la liberación del radical,^[82] por lo que usualmente las modificaciones estructurales que mejoran la transferencia de carga hacia el centro metálico tienen efectos positivos en la eficiencia cuántica.



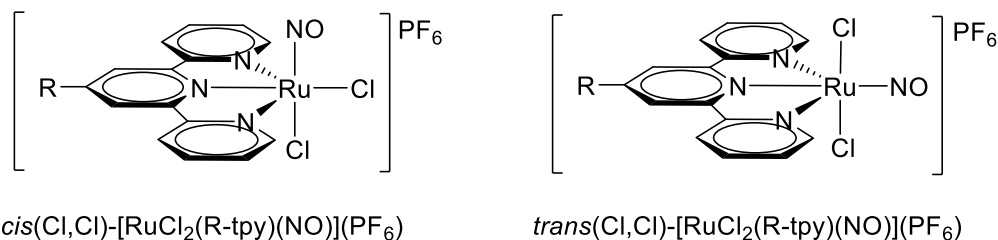
Esquema 17. Estructura y propiedades fotofísicas de nitrosilos de rutenio con ligantes tipo 2,2':6',2''-terpiridina sustituidos con fenilos funcionalizados (Ref. 49).

1.3. HIPÓTESIS

- La introducción de anillos de tienilo en la estructura del ligante terpiridínico en nitrosilos de Ru(II) con fórmulas $\text{RuCl}_2(\text{R-tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)$ y $\text{trans}(\text{Cl},\text{Cl})\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{R-tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)$ (R-tpy es un ligante tipo 2,2':6',2''-terpiridina) producirá modificaciones sustanciales en las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de los compuestos, sirviendo como una estrategia para incrementar la eficiencia de la liberación de óxido nítrico vía absorción de dos fotones.
- Será posible obtener una metodología sintética adecuada, evitando pasos de purificación por HPLC, para la obtención de nitrosilos de Ru(II) con fórmula $\text{trans}(\text{NO},\text{OH})\text{-}[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})](\text{PF}_6)$, identificados en estudios previos como potenciales agentes terapéuticos, debido a su estabilidad en medio acuoso.

1.4. OBJETIVO

- Investigar la influencia de la introducción de anillos de tienilo en las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de nitrosilos de rutenio con la fórmula general *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆), donde R-tpy es un ligante tipo 2,2':6',2''-terpiridina.



1.4.1. Objetivos particulares

- Desarrollar una estrategia sintética adecuada para la obtención de nitrosilos de rutenio con fórmula general *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆), donde R-tpy es un ligante tipo 2,2':6',2''-terpiridina, que no involucre la purificación vía HPLC de los materiales de partida. Determinar los perfiles de absorción, Φ_{NO} y la concentración de NO[•] máxima alcanzada en agua para los sistemas estables en medio acuoso.
- Estudiar la estereoselectividad del intercambio de ligante Cl→OH a partir de los isómeros *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆), para establecer si se obtiene el mismo producto, *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆), independientemente de la estereoquímica del isómero de partida.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Diseño y modelado computacional de los compuestos objetivo

Como se discutió a detalle en la Sección 1.1.5.3, para llevar a la práctica terapéutica la liberación del óxido nítrico vía absorción de dos fotones (TPA) a partir de nitrosilos de rutenio, es necesario incrementar la eficiencia de liberación del radical, en términos de $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$, a valores cercanos o superiores a 100 GM. En el presente trabajo decidimos enfocarnos al estudio de nitrosilos de Ru^{II} con dos ligantes cloruro, que como se discutió anteriormente, han mostrado los valores de Φ_{NO} más elevados en los sistemas estudiados hasta ahora por nuestro grupo; debido a esto, es posible que cambios discretos en la estructura molecular puedan permitirnos alcanzar más fácilmente eficiencias adecuadas. Dada la complejidad en la predicción estructural para maximizar Φ_{NO} , decidimos enfocarnos en maximizar el valor de σ_{TPA} , manteniendo un peso molecular bajo al emplear compuestos con arquitectura dipolar *push-pull*.

De esta manera, nuestro estudio se enfocó a la modificación del ligante tridentado, tomando como estrategia la introducción de un anillo de tienilo como puente π entre el núcleo de 2,2'-6',2''-terpiridina y su sustituyente (9H-fluoreno); como se discutió en la Sección 1.1.5.1, diversos estudios han demostrado que la introducción de este heterociclo constituye una manera atractiva y relativamente simple de incrementar sustancialmente el valor de σ_{TPA} en moléculas dipolares y multipolares. Es así como nos planteamos la introducción del anillo de tienilo en los sistemas más eficientes reportados hasta ahora, *cis*-RuFT y *trans*-RuFT (Figura 7), dando lugar a los sistemas *cis*-tph-RuFC₁T y *trans*-tph-RuFC₁T, respectivamente. Esta modificación aumenta la distancia entre el donador (fluoreno) y el aceptor (Ru-NO) y con ello su momento dipolar, lo que, de acuerdo con lo discutido en la Sección 1.1.5.1, se

traduce generalmente en un incremento de σ_{TPA} en sistemas *push-pull*.^[71f] Además, de acuerdo con las geometrías calculadas al nivel B3PW91/6-31G*, esta modificación da lugar a ligantes con ángulos interanulares reducidos, lo que debe mejorar la transferencia de carga hacia el centro metálico y con ello formar un sistema *push-pull* más eficiente, lo que, una vez más, frecuentemente se traduce en un incremento de σ_{TPA} .^[71f, 73-74]

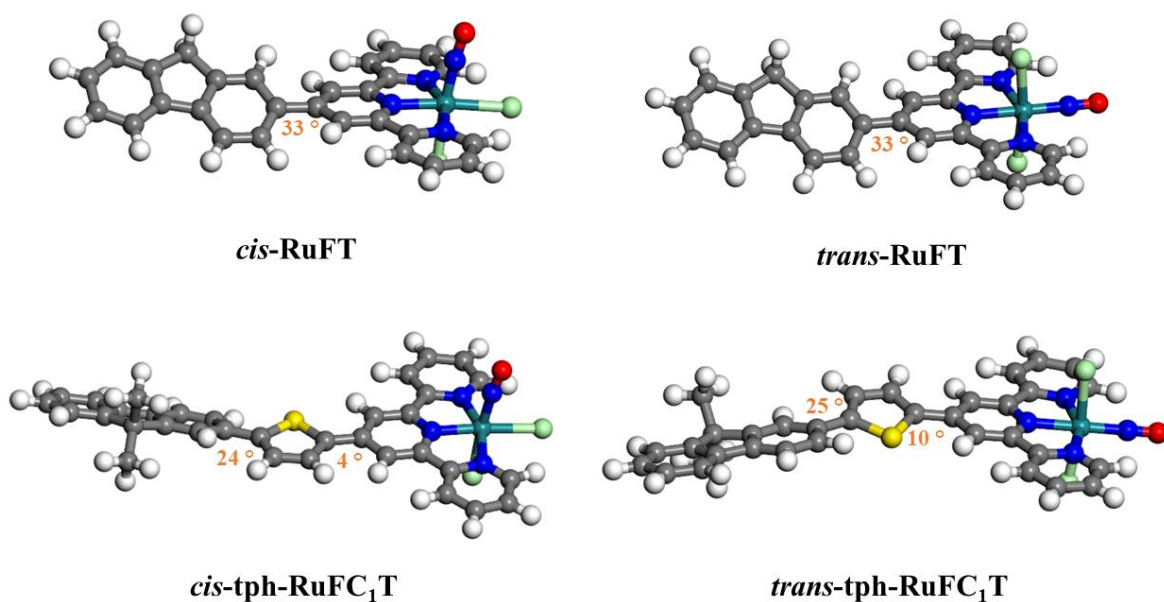


Figura 7. Geometrías optimizadas en acetonitrilo para los cationes de nitrosilos de rutenio sin incorporar (arriba) e incorporando (abajo) puentes de tienilo, al nivel de teoría B3PW91/6-31G*.

En este punto, es importante recalcar que el incremento en los valores de σ_{TPA} por la inclusión de un puente de tienilo puede asociarse a diversos factores; al introducir este heterociclo, además de extender el sistema π -conjugado y por lo tanto incrementar la longitud del eje de transferencia de carga, también se puede alterar la arquitectura electrónica de la molécula, ya que el tienilo puede potencialmente actuar también como un grupo donador eficiente, al tratarse de un sistema π -excesivo.

En vista de este complejo escenario y con la intención de investigar el origen de la modulación de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de nuestros sistemas, se decidió incluir en nuestro estudio otro grupo de compuestos cuyas geometrías optimizadas se muestran en la Figura 8. Específicamente, para evaluar si la modulación de las propiedades se origina por una participación del tiofeno como donador y no debido a la extensión del sistema π -conjugado, incluimos los sistemas Ru-PhT y Ru-tphT donde los anillos de tienilo y fenilo actúan como donadores. De la misma manera, el sistema Ru-Ph-FT, que incorpora anillos de fenilo, al contar con ejes de transferencia de carga de la misma longitud que sus análogos con tienilo, sirve como una referencia para descartar esta variable y evaluar el efecto introducido por la planaridad mejorada y el posible rol como donador del tienilo. Como puede observarse, una vez más las geometrías optimizadas muestran ángulos interanulares reducidos para los sistemas con el anillo de tienilo como grupo donador, lo cual es alentador, ya que, como se discutió anteriormente, esto puede inducir una transferencia de carga mejorada hacia el centro metálico y con ello propiedades fotofísicas y fotoquímicas mejoradas.

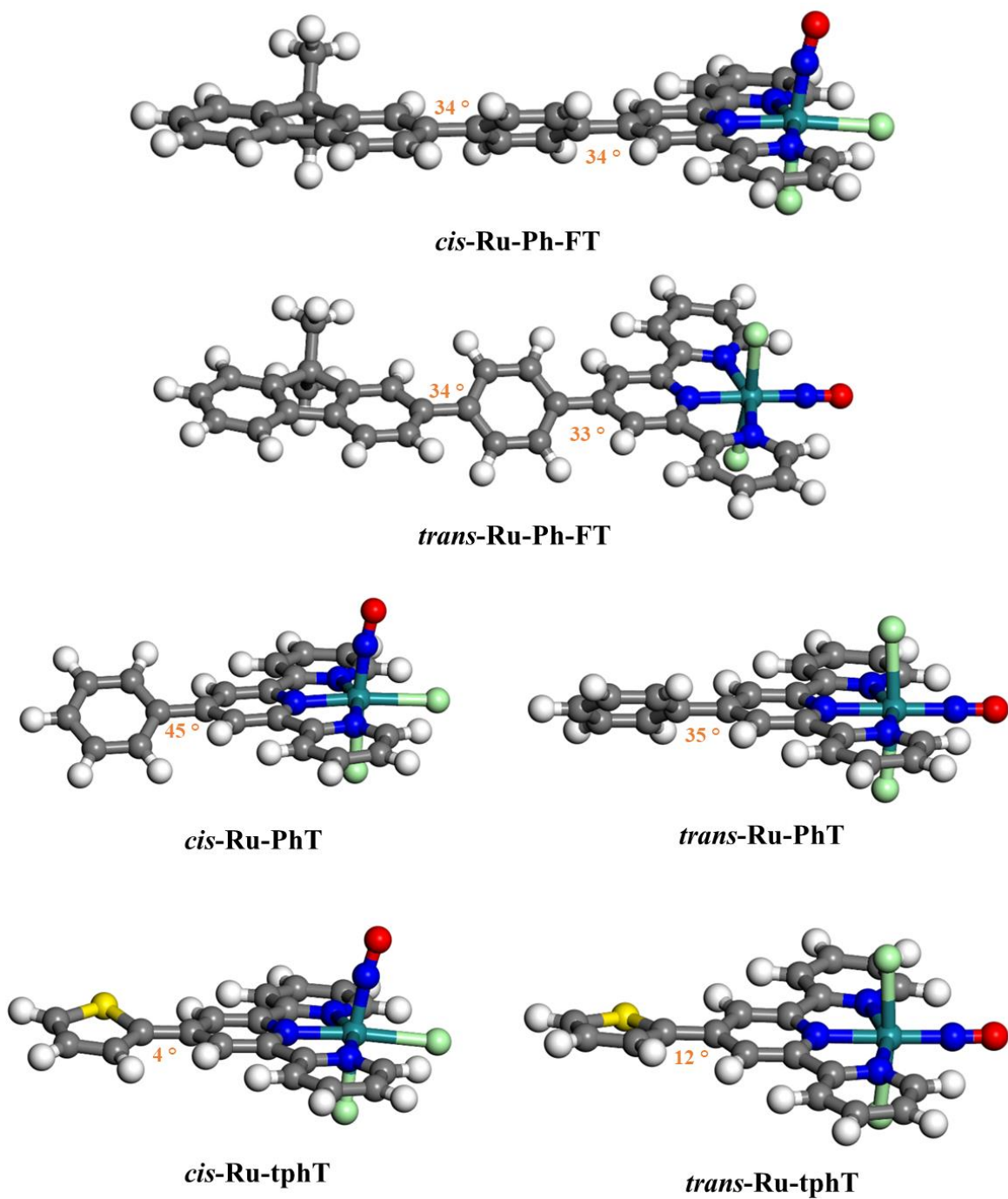


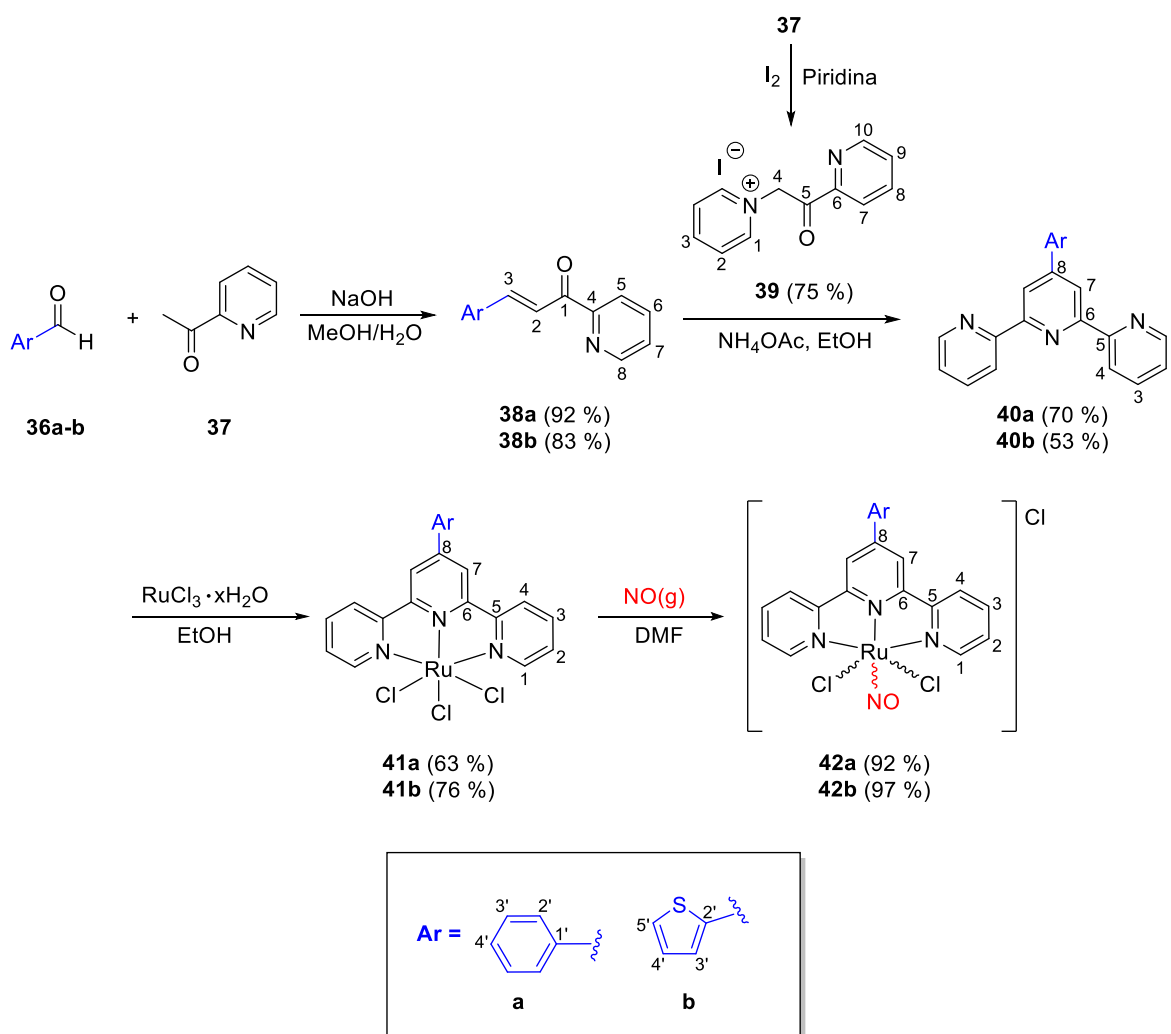
Figura 8. Geometrías optimizadas en acetonitrilo para los cationes de nitrosilos de rutenio sin incorporar (arriba, medio) e incorporando (abajo) anillos de tienilo, al nivel de teoría B3PW91/6-31G*.

1.5.2. Síntesis y caracterización estructural

Para la síntesis de los compuestos objetivo con los anillos de fenilo y tienilo como donadores se empleó la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 18, que empieza por la preparación de los ligantes tridentados para lo que se empleó la síntesis de piridinas de Kröhnke;^[86] que consistió en la condensación de Claisen-Schmidt entre los aldehídos aromáticos **36a,b** y 2-acetilpiridina (**37**) dando lugar a las azachalconas **38a,b** en rendimientos altos,^[87] seguida por la adición de Michael del enolato de la sal de piridinio **39** (obtenida por tratamiento de **37** con yodo en piridina),^[88] rindiendo en presencia de una fuente de amoníaco los ligantes **40a,b** en rendimientos moderados.^[89] La identidad de estos ligantes y de sus precursores fue corroborada por RMN-¹H, encontrándose una buena concordancia entre los resultados obtenidos y los reportados previamente en la literatura para estos compuestos. Además, fue posible obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal de los compuestos **38b** y **39** (Figura 9), permitiendo corroborar inequívocamente sus estructuras moleculares. La ausencia de estudios cristalográficos sobre el compuesto **39** nos motivó a informar un análisis estructural detallado para este compuesto (Anexo 3);^[90] es importante señalar se espera que la naturaleza del donador de Michael, como **39**, tenga un rol decisivo en el curso de reacción para la obtención de este tipo de ligantes tridentados.

Una vez obtenidos **40a,b**, se continuó con la síntesis de los compuestos objetivo. El tratamiento de soluciones etanólicas de estos ligantes con cloruro de rutenio(III) produjo los compuestos **41a,b** con rendimientos moderados debidos a la formación concomitante de la especie $[\text{Ru}(\mathbf{40a,b})_2](\text{Cl}_2)$; la identidad y pureza de estos compuestos se corroboró mediante análisis elemental, dando resultados satisfactorios. Soluciones de los compuestos **41a,b** en DMF fueron calentadas a 85 °C y burbujeadas con óxido nítrico, producido por la adición

lenta de ácido nítrico diluido sobre cobre, para rendir los compuestos finales **42a,b** en rendimientos altos; es necesario señalar que, de acuerdo a análisis por RMN-¹H (Figuras anexas S1 y S2) el crudo de reacción estaba constituido principalmente (> 98 %) por la mezcla de los isómeros *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**40a,b**)(NO)](Cl) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**40a,b**)(NO)](Cl) que por simplicidad se denominarán *cis*-**42a,b** y *trans*-**42a,b** en adelante. Los resultados de RMN-¹H para **42a**, concordaron con lo previamente informado por nuestro grupo para este compuesto.^[49]



Esquema 18. Ruta de síntesis y numeración para los compuestos **42a,b**.

Después de la purificación por HPLC en fase reversa, seguida por metátesis con NH_4PF_6 acuoso, la identidad de los compuestos *cis*-**42a,b** y *trans*-**42a,b**, como sus sales de PF_6^- , se corroboró por medio de RMN de ^1H y ^{13}C , EMAR y análisis elemental. La presencia del ligante nitrosilo se corroboró mediante espectroscopía IR, mostrando bandas intensas alrededor de $\nu = 1900$ y 1890 cm^{-1} para νNO en los isómeros *trans* y *cis*, respectivamente; estos valores son indicativos de una coordinación lineal del nitrosilo, que se presenta típicamente en el intervalo de $\nu = 2400 - 1800\text{ cm}^{-1}$, en contraste con una coordinación angular, con νNO en el intervalo $\nu = 1600 - 1400\text{ cm}^{-1}$.^[39]

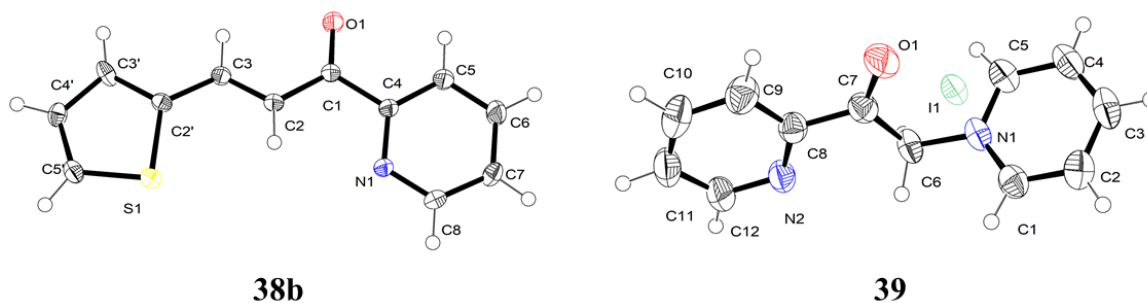


Figura 9. Estructura cristalina de los compuestos **38b** y **39**. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad para todos los átomos distintos de hidrógeno.

La asignación inequívoca de las señales de RMN de los compuestos **42a,b** se realizó empleando un conjunto de técnicas de RMN bidimensional que incluyó experimentos de correlación homonuclear (^1H - ^1H) COSY y NOESY y heteronuclear (^1H - ^{13}C) HSQC y HMBC; en todos los casos dos sistemas de espín fueron fácilmente identificados, el primero correspondiente a los sustituyentes enlazados al carbono C-8 y el segundo a los anillos de piridina laterales, que aparecen como multipletes notablemente desplazados a campo bajo debido al carácter fuertemente electroceptor de los anulares sp^2 coordinados al centro metálico. A manera de ejemplo, en la Figura 10 se muestra una comparación entre los

espectros de RMN-¹H de los isómeros *cis*-**42b** y *trans*-**42b**, donde la principal diferencia es el desplazamiento a campo bajo de la señal del hidrógeno H-1 para el isómero *cis*. Es importante señalar que la diferencia importante entre los desplazamientos químicos de los hidrógenos H-3' y H-4' ($\Delta\delta$) de alrededor de 0.7 ppm, que puede explicarse analizando el híbrido de resonancia que resulta tras la transferencia de carga del tienilo al centro metálico (Esquema 19) que deja una carga parcial en C-3' y C-5', desprotegiendo estos núcleos, mientras que C-4' permanece sin cambios. Es importante señalar que todos los nitrosilos de rutenio estudiados en esta tesis con fenilos como donadores o puentes π mostraron $\Delta\delta$ significativamente menores entre los hidrógenos en estas posiciones, lo que constituye una primera evidencia soportando la hipótesis de una transferencia de carga más efectiva debida a la introducción de los anillos de tienilo, para los que las estructuras mesoméricas B y C tendrían una mayor contribución que en sus análogos con fenilo.

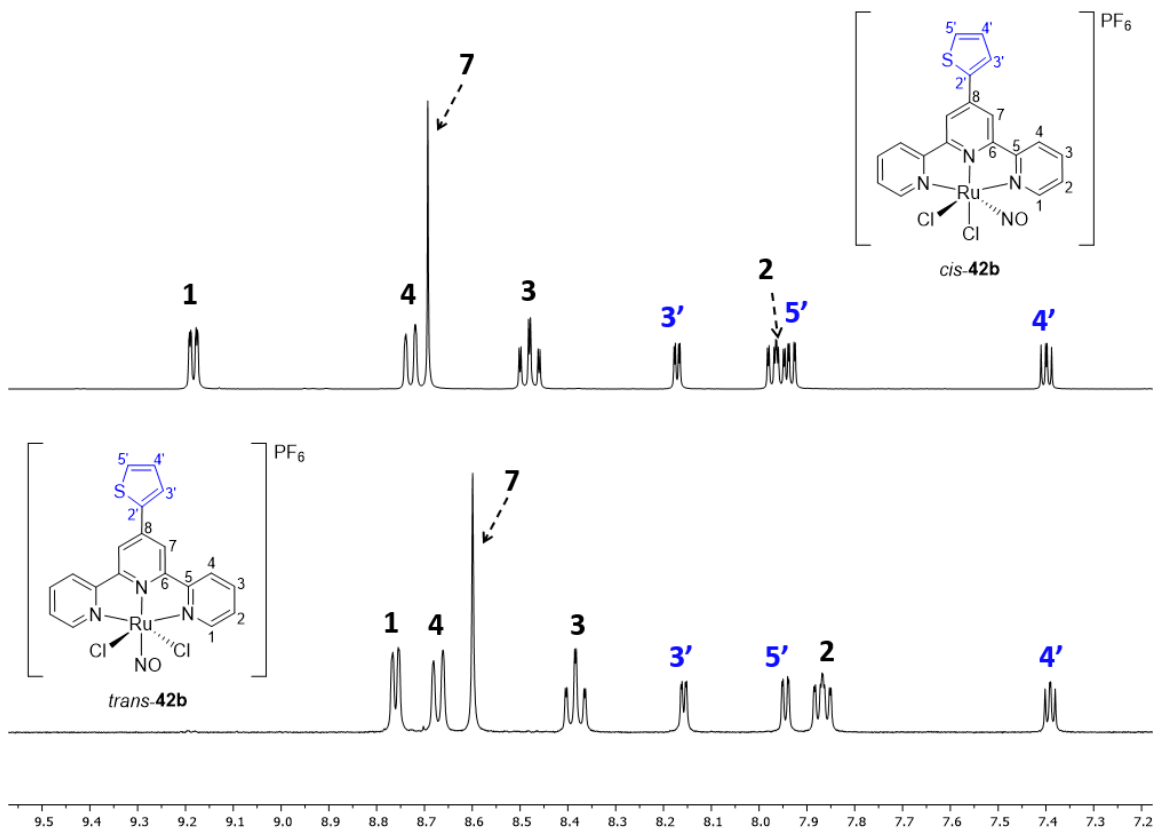
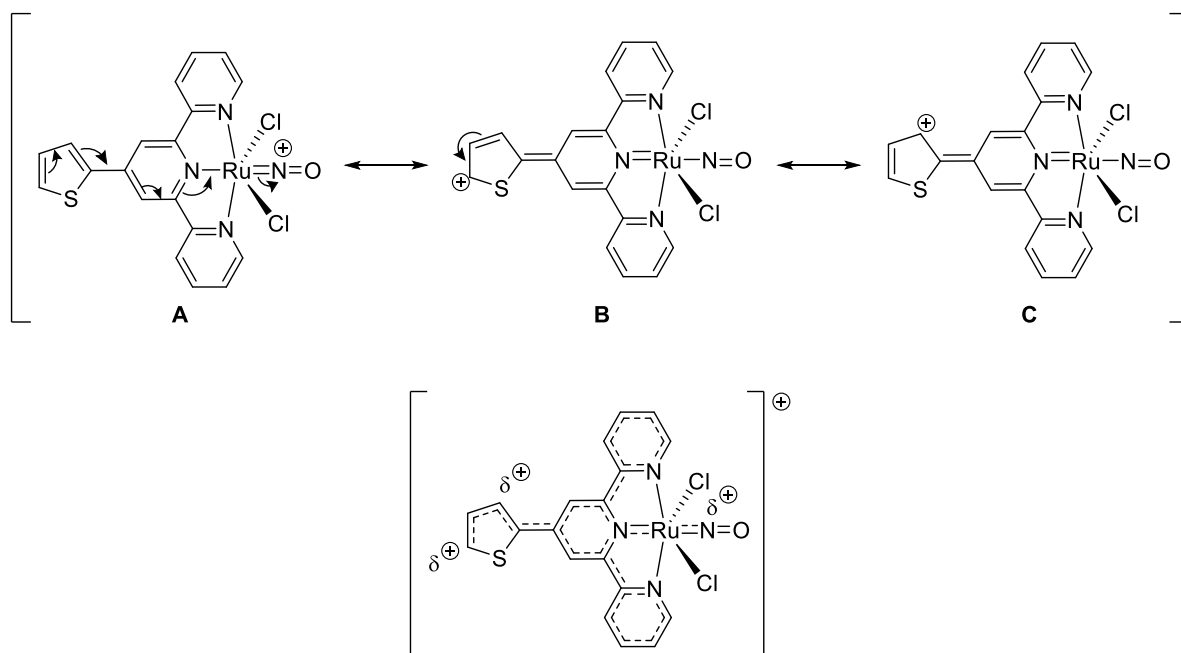


Figura 10. Comparación de los espectros de RMN- ^1H (CD_3CN , 400 MHz) para los compuestos *cis*-42b y *trans*-42b.



Esquema 19. Algunas estructuras mesoméricas e híbrido de resonancia para *trans*-**42b**.

Se lograron obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal de los compuestos *cis*-**42b** y *trans*-**42b** por difusión lenta de éter etílico en soluciones de los compuestos en acetonitrilo, con lo cual se corroboraron las estructuras de ambos compuestos (Figura 11), mientras que *cis*-**42b** cristalizó con un solo catión en la unidad asimétrica ($Z' = 1$), para *trans*-**42b** se encontraron dos cationes cristalográficamente independientes ($Z' = 2$). En la Tabla 1 se incluyen las distancias y ángulos de enlace característicos, donde se pueden apreciar ángulos cercanos a 180° para el fragmento Ru-N-O, en concordancia con la coordinación del NO \cdot como NO $^+$; la presencia de un cloruro en posición *trans* al nitrosilo en *cis*-**42b** produce una distancia N-O mayor debido a que el cloruro, al donar densidad electrónica, aumenta la retrodonación Ru \rightarrow NO y con ello la densidad electrónica en el orbital $\pi^*(\text{NO})$, reduciendo el orden de enlace N-O; esto se observa con la reducción de la distancia Ru-NO, ya que al haber una mejor retrodonación hacia el nitrosilo, se fortalece su interacción con el centro metálico.

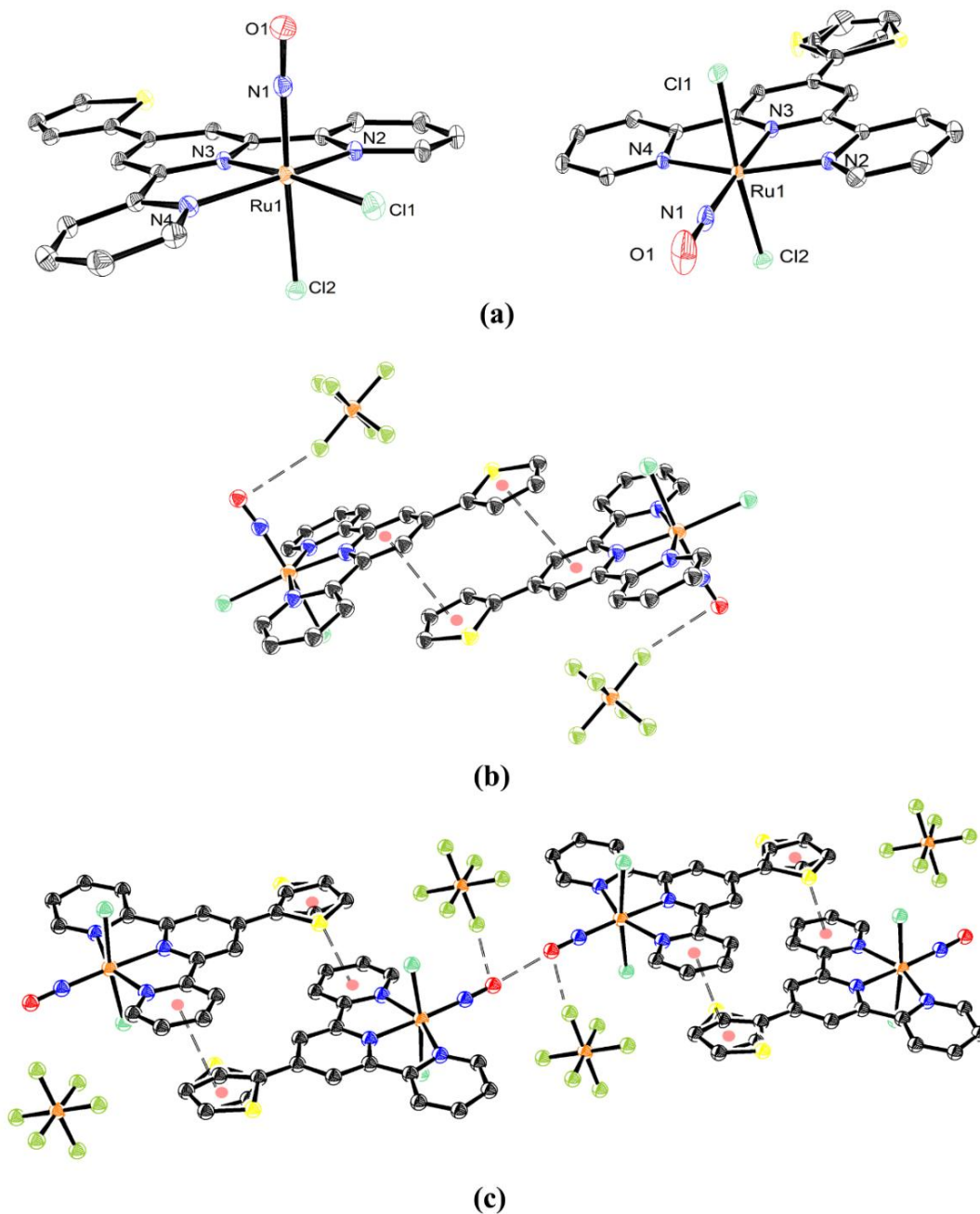


Figura 11. (a) Estructuras cristalinas para los cationes en los compuestos *cis-42b* (izquierda) y *trans-42b* (derecha). Interacciones supramoleculares relevantes en la red cristalina de (b) *cis-42b* y (c) *trans-42b*. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno se omiten por claridad.

Tabla 1. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) relevantes para *cis-42b* y *trans-42b*.

	<i>cis-42b</i>	<i>trans-42b</i>	
		mol 1	mol 2
Ru(1)-N(1)	1.7617(14)	1.777(2)	1.754(2)
Ru(1)-N(2)	2.0863(14)	2.075(2)	2.069(2)
Ru(1)-N(3)	1.9869(13)	1.999(2)	2.005(2)
Ru(1)-N(4)	2.0930(13)	2.088(2)	2.069(2)
Ru(1)-Cl(1)	2.3934(7)	2.3312(7)	2.3666(7)
Ru(1)-Cl(2)	2.3501(7)	2.3718(7)	2.3459(7)
N(1)-O(1)	1.1380(18)	1.126(3)	1.125(3)
N(1)-Ru(1)-N(3)	96.83(5)	175.59(10)	176.71(11)
N(3)-Ru(1)-N(4)	79.42(5)	78.26(9)	78.84(9)
Cl(1)-Ru(1)-Cl(2)	87.766(17)	174.80(3)	172.35(3)
Cl(1)-Ru(1)-N(1)	88.55(4)	95.67(8)	91.07(7)
Ru(1)-N(1)-O(1)	174.93(13)	175.9(3)	172.9(2)

Es importante señalar que la reducción del orden de enlace N-O debería correlacionar con una disminución del ángulo Ru-NO para *cis-42b*, que resulta el caso únicamente al compararse con una de las moléculas cristalográficamente independientes del isómero *trans* (*mol 1*), la discrepancia con respecto a *mol 2* se debe a la presencia de un contacto supramolecular Cl...O-N con una distancia de 3.264(5) Å que reduce el ángulo Ru-NO. En la Figura 12 se muestra una descripción gráfica de este conjunto de observaciones geométricas, que se encuentran en buen acuerdo con estudios previos del grupo.^[49, 82]

Para la síntesis de los compuestos objetivo con anillos de fenilo y tienilo como puentes π , fue necesario sintetizar los ligantes siguiendo la ruta sintética que se detalla en el Esquema 20 e involucra la preparación de los sintones **46** y **48a,b**; la preparación de **46** comienza por la bromación radicalaria de 9*H*-fluoreno (**43**) empleando N-bromosuccinimida,^[91] el derivado bromado correspondiente (**44**) se sometió a una reacción de alquilación en la posición C-9 empleando bromohexano y TBAB como agente de transferencia de fase para rendir **45**,^[92] que posterior a una reacción de borilación empleando *n*-BuLi como base y B(OMe)₃ como electrófilo rindió el sintón deseado (**46**) después de un tratamiento ácido.^[93] Por otra parte, los sintones **48a,b**^[94] se obtuvieron satisfactoriamente empleando una síntesis de Kröhnke modificada^[95] entre los aldehídos aromáticos **47a,b** y 2-acetilpiridina (**37**); esta reacción multicomponentes rindió los compuestos deseados en rendimientos moderados. La identidad de estos precursores sintéticos fue corroborada por RMN-¹H, encontrándose una buena concordancia entre los resultados obtenidos y los reportados previamente en la literatura para estos compuestos.

Finalmente, mediante un acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura entre **46** y **48a,b**, empleando Pd(PPh₃)₂Cl₂ como catalizador, los ligantes finales (**49a,b**) se obtuvieron satisfactoriamente. La identidad de estos ligantes se corroboró por medio de RMN de ¹H y ¹³C y EMAR; además se realizó una asignación inequívoca de las señales de RMN empleando un conjunto de técnicas de RMN bidimensional que incluyó experimentos de correlación homonuclear (¹H-¹H) COSY y NOESY y heteronuclear (¹H-¹³C) HSQC y HMBC.

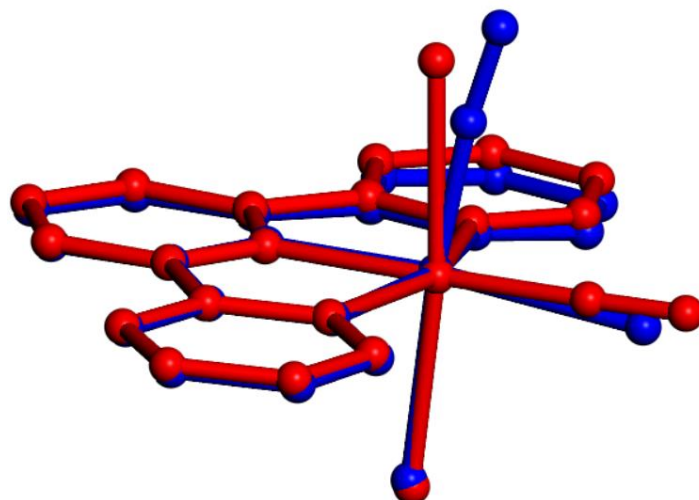
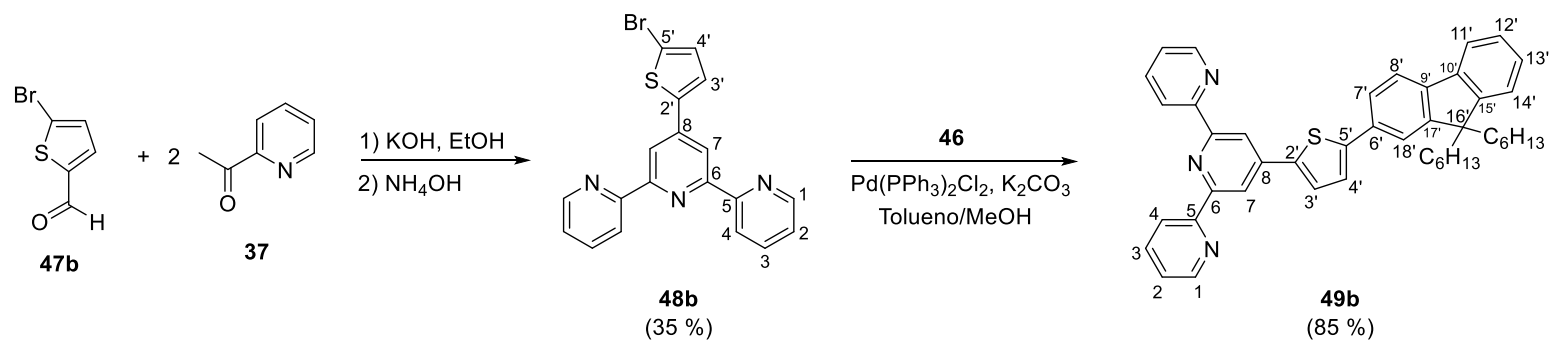
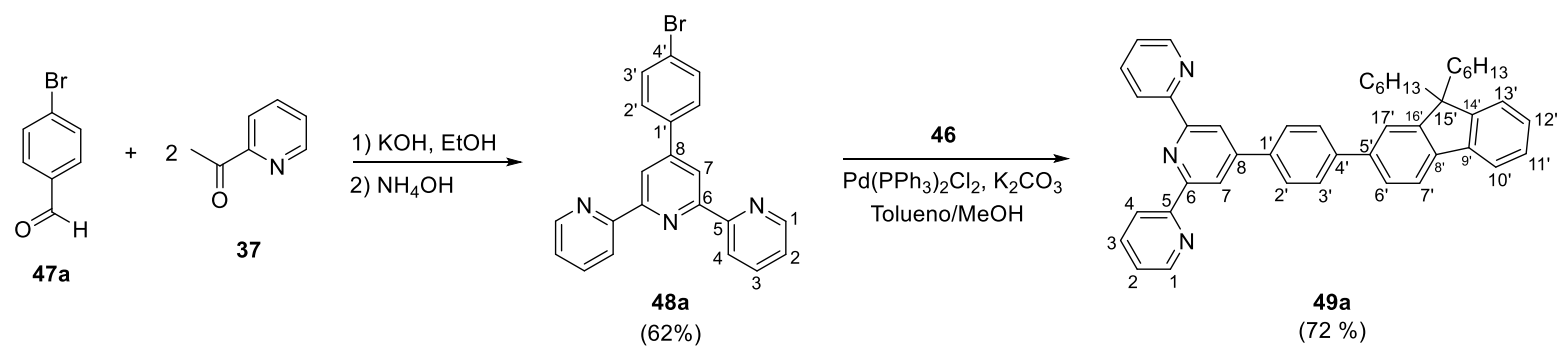
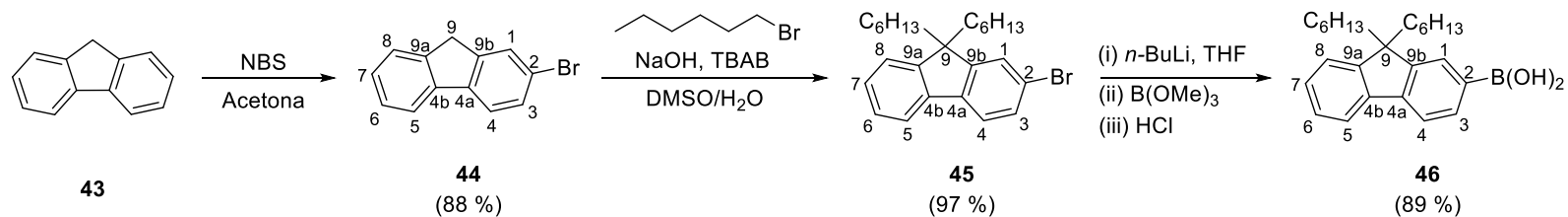
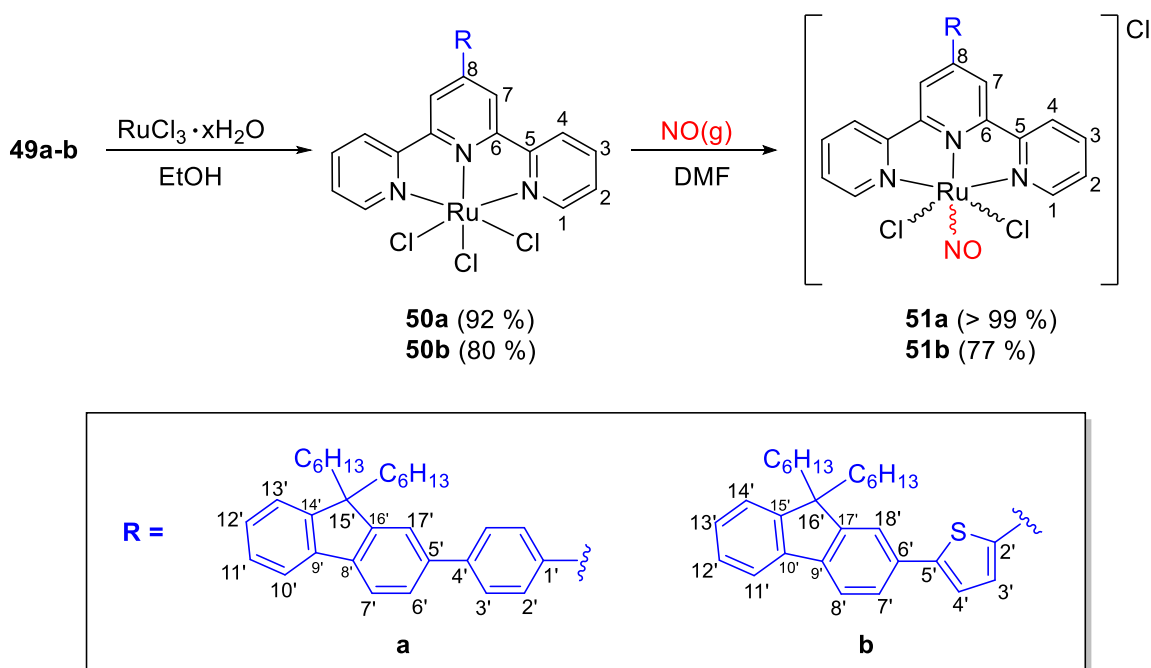


Figura 12. Superposición de las esferas de coordinación en las estructuras cristalinas de *cis*-**42b** (azul) y *trans*-**42b** (rojo). Por claridad se omiten los átomos de hidrógeno y el sustituyente de tienilo en el ligante tridentado.



Esquema 20. Síntesis y numeración para los ligantes **49a,b**.

Una vez obtenidos los ligantes **49a,b**, se realizó la síntesis de los compuestos objetivo **51a,b** (Esquema 21), los cuales fueron obtenidos en rendimientos altos siguiendo la misma ruta sintética en dos pasos explicada anteriormente para **42a,b** (*vide supra*). Después de la purificación por HPLC en fase reversa, seguida por metátesis con NH_4PF_6 acuoso, la identidad de los compuestos *cis*-**51a,b** y *trans*-**51a,b**, como sus sales de PF_6 , se estableció la estructura por medio de RMN de ^1H y ^{13}C , EMAR y análisis elemental. La presencia del ligante nitrosilo se corroboró mediante espectroscopía IR, mostrando bandas intensas alrededor de $\nu = 1910$ y 1890 cm^{-1} para *trans* y *cis*, respectivamente.



Esquema 21. Síntesis y numeración de los compuestos **51a,b**.

Al igual que con los ligantes, se realizó una asignación inequívoca de las señales de RMN para los compuestos **51a,b**. En la Figura 13 se muestra una comparación entre los espectros de RMN- ^1H para los compuestos *trans*-**51a,b**, donde se aprecia un desplazamiento a campo alto para todos los hidrógenos del núcleo de terpiridina, indicando una mejor

transferencia de carga hacia éste, lo cual se evidencia además con el $\Delta\delta$ considerablemente mayor para los hidrógenos del anillo de tienilo (H-3'/H-4') que para los del fenilo (H-2'/H-3'); de esta manera los estudios de RMN proveen una primera indicación de una transferencia de carga mejorada como consecuencia de la introducción de anillos de tienilo, tanto como puentes π como grupos donadores.

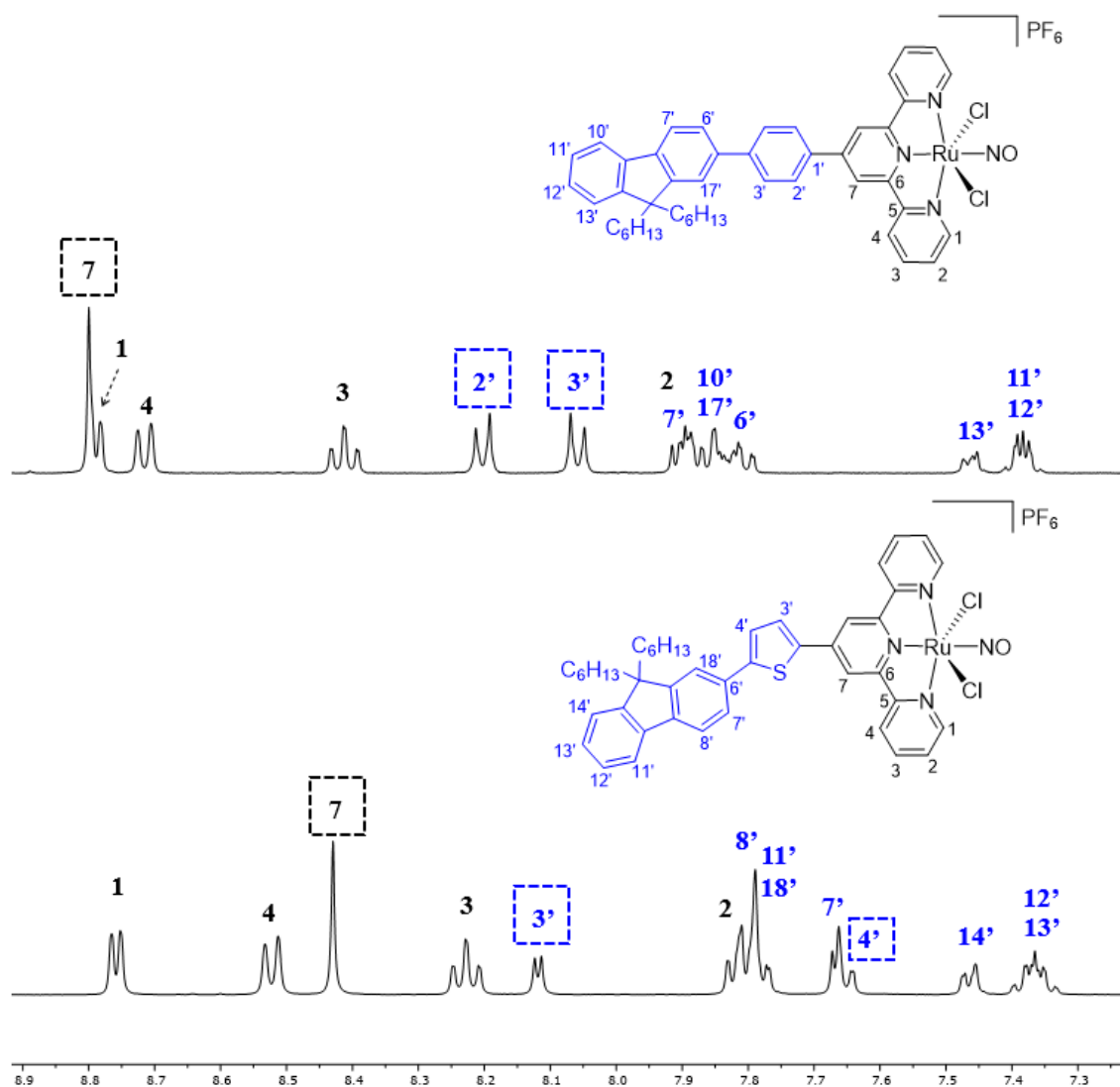


Figura 13. Comparación de los espectros de RMN-¹H (CD₃CN, 400 MHz) para *trans*-51a (arriba) y *trans*-51b (abajo).

Se lograron obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal *trans*-**51a**, con lo cual se corroboró inequívocamente su estructura molecular (Figura 14); la unidad asimétrica está compuesta por dos cationes [*trans*-**51a**]⁺ cristalográficamente independientes aunque geoméricamente similares, dos contraiones de PF₆ y una molécula desordenada de éter etílico del proceso de cristalización. En la Tabla 2 se incluyen las distancias y ángulos de enlace característicos, donde se pueden apreciar ángulos cercanos a 180 ° para el fragmento Ru-N-O, en concordancia con la coordinación del NO como NO⁺.

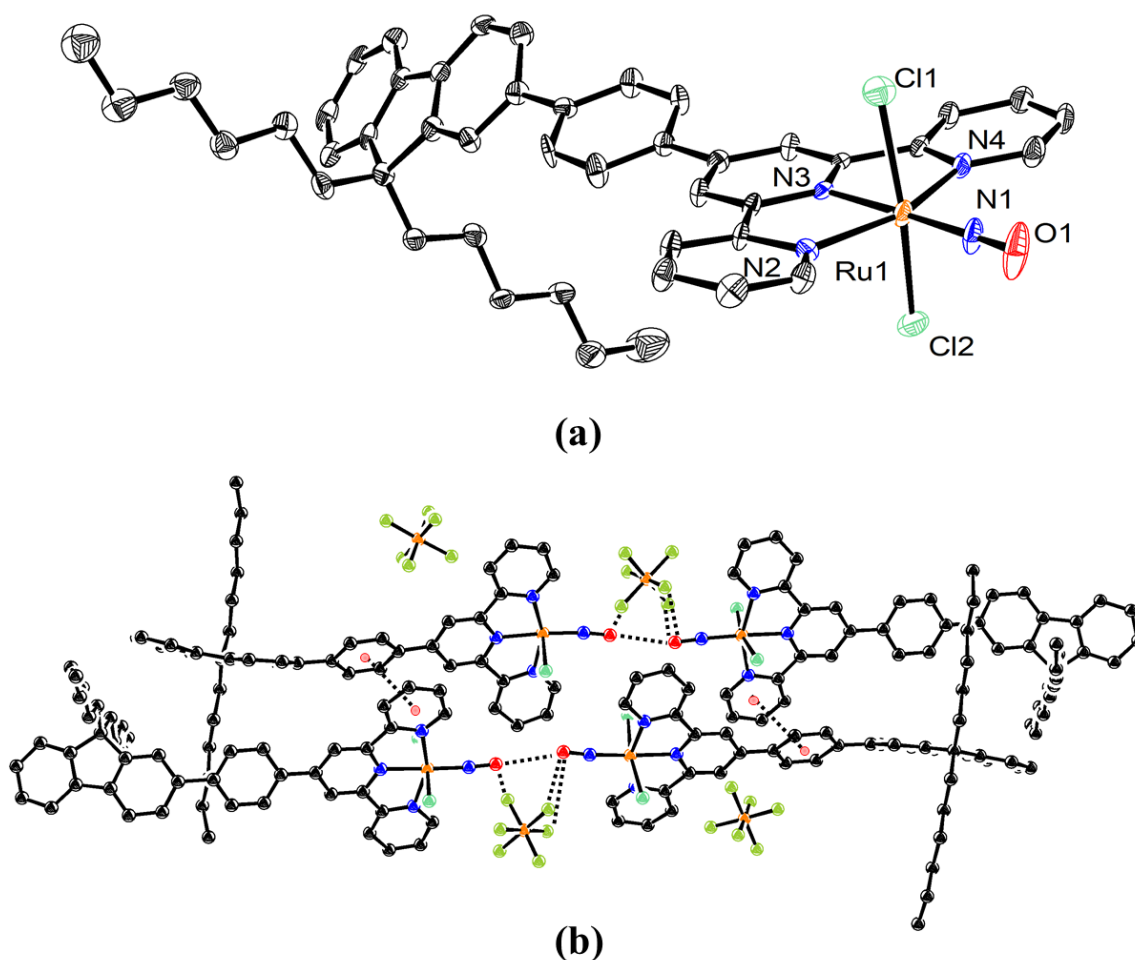


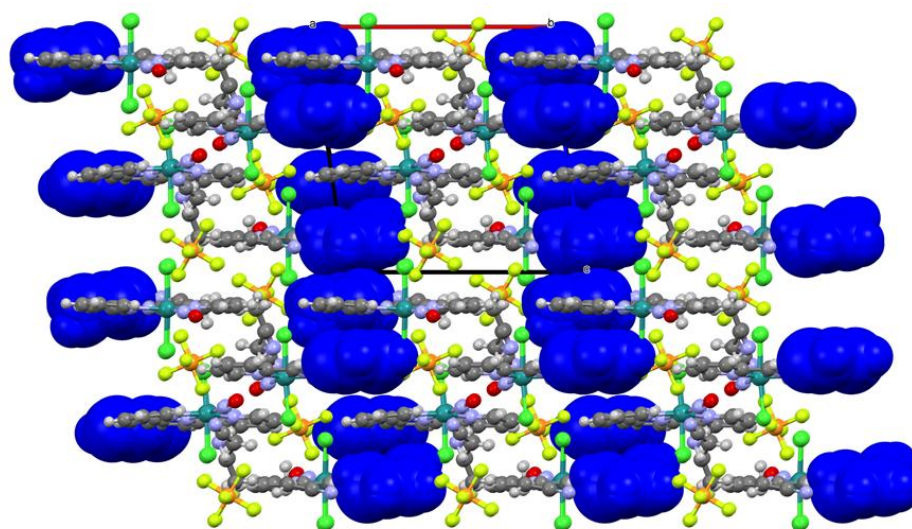
Figura 14. (a) Estructura cristalina e (b) interacciones supramoleculares relevantes para el catión en el compuesto *trans*-**51a**. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno se omiten por claridad.

Tabla 2. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) relevantes para *trans*-**51a**.

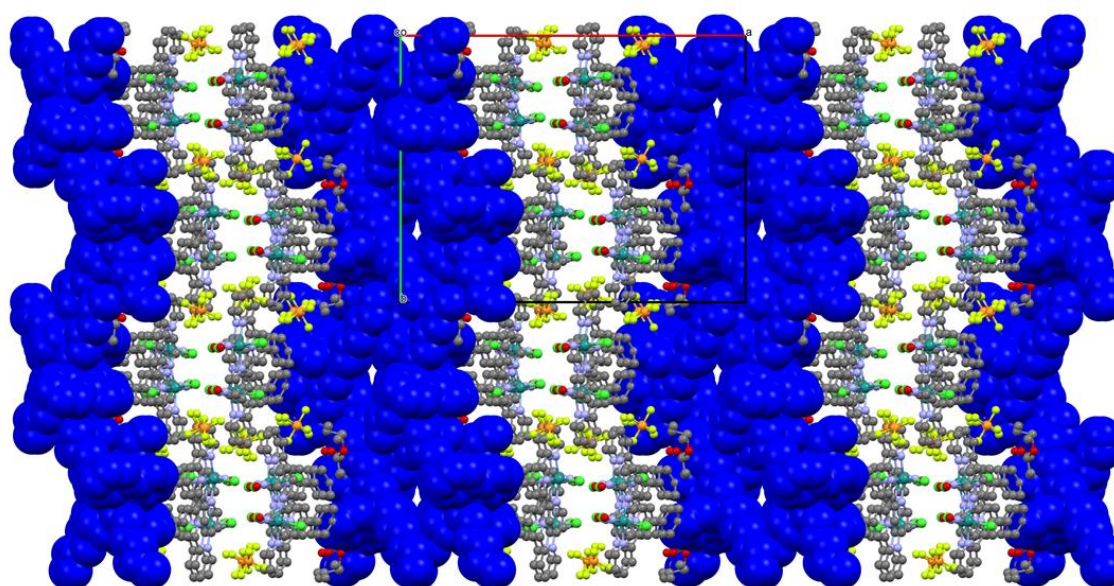
	<i>trans</i> - 51a	
	mol 1	mol 2
Ru(1)-N(1)	1.758(5)	1.761(5)
Ru(1)-N(2)	2.078(5)	2.072(4)
Ru(1)-N(3)	1.994(4)	1.996(4)
Ru(1)-N(4)	2.073(5)	2.078(4)
Ru(1)-Cl(1)	2.3557(17)	2.3546(15)
Ru(1)-Cl(2)	2.3523(17)	2.3555(15)
N(1)-O(1)	1.145(6)	1.147(6)
N(1)-Ru(1)-N(3)	176.8(2)	175.4(2)
N(3)-Ru(1)-N(4)	78.46(18)	78.44(17)
Cl(1)-Ru(1)-Cl(2)	169.20(6)	172.24(5)
Cl(1)-Ru(1)-N(1)	94.09(19)	95.08(17)
Ru(1)-N(1)-O(1)	174.8(5)	173.3(4)

En este punto es importante señalar que las estructuras cristalinas de *trans*-**42b** y *trans*-**51a** mostraron empaquetamientos cristalinos con características similares e inusuales; ambas estructuras muestran contactos supramoleculares NO...ON con distancias de 2.566 y 2.918 Å y ángulos (N-O...O) de 172.7 y 176.2 °, respectivamente. Dado que el nitrosilo está coordinado como NO⁺, el oxígeno está parcialmente cargado, haciendo este tipo de contactos entre grupos NO adyacentes, aparentemente desconocidos hasta este trabajo, poco probables de ocurrir. Debido a la carga de los fragmentos involucrados, estas interacciones

supramoleculares pueden tentativamente clasificarse como catión-catión, un tipo de interacción para la que sólo recientemente se ha encontrado evidencia cristalográfica en sales cuaternarias de amonio,^[96] con entalpías de formación para dímeros cristalográficos catión-catión de $\Delta H = -48.7$ kcal/mol, indicando una estabilización clara de la red cristalina como consecuencia de esta interacción, lo que se asoció a una compensación de las cargas positivas a través de enlaces de hidrógeno con contraiones cercanos. En el caso de *trans*-**42b** y *trans*-**51a**, los contactos catión-catión parecen estabilizarse mediante contactos cercanos o “puentes” de los cationes con contraiones cercanos de PF₆, estableciéndose contactos F...O con distancias de 2.742 – 2.948 Å. Por otra parte, se observan también apilamientos π - π desplazados^[97] entre anillos ricos en electrones (tienilo/fenilo) y anillos de piridina deficientes electrónicamente, con distancias intercentroide de 3.472 y 3.820 Å, respectivamente; dada la complementariedad de estos apilamientos, se espera que estas interacciones, relativamente fuertes,^[97b] contribuyan junto con las interacciones iónicas previamente descritas, como una importante fuerza motriz del proceso de cristalización. En su conjunto, estas interacciones resultaron en un autoensamble peculiar para ambos compuestos (Figura 15), alternando capas de grupos tienilo/fluorenilo apilados y capas de centros metálicos y contraiones orientados cara a cara, lo que colectivamente resulta en materiales cristalinos anfifílicos. Es importante señalar que la formación de materiales anfifílicos basados en fluorenos dialquilados en C-9 está bien documentada y da lugar a diversas nanoestructuras, comúnmente micelares.^[98]



(a)

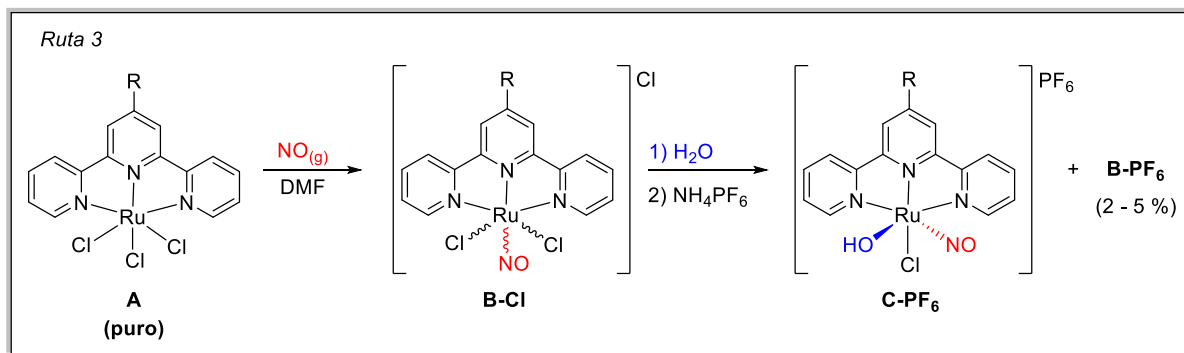
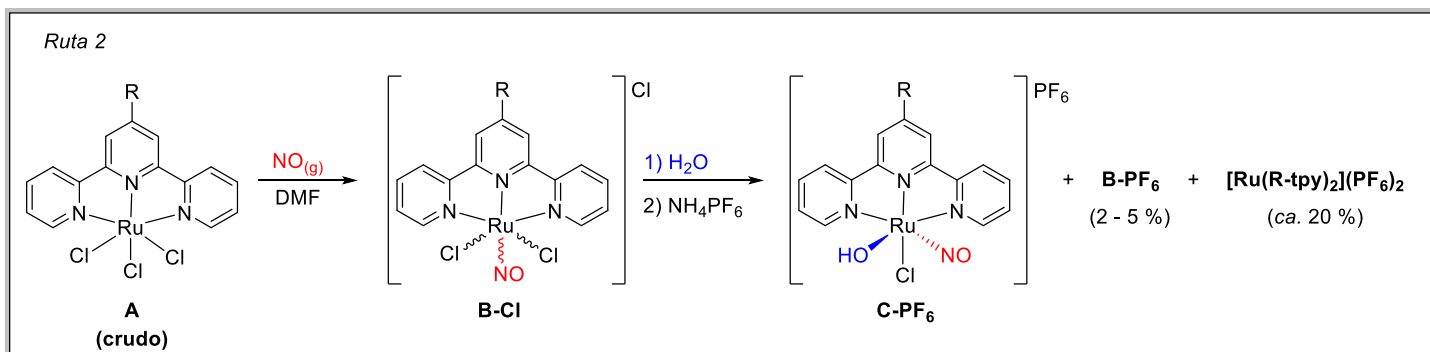
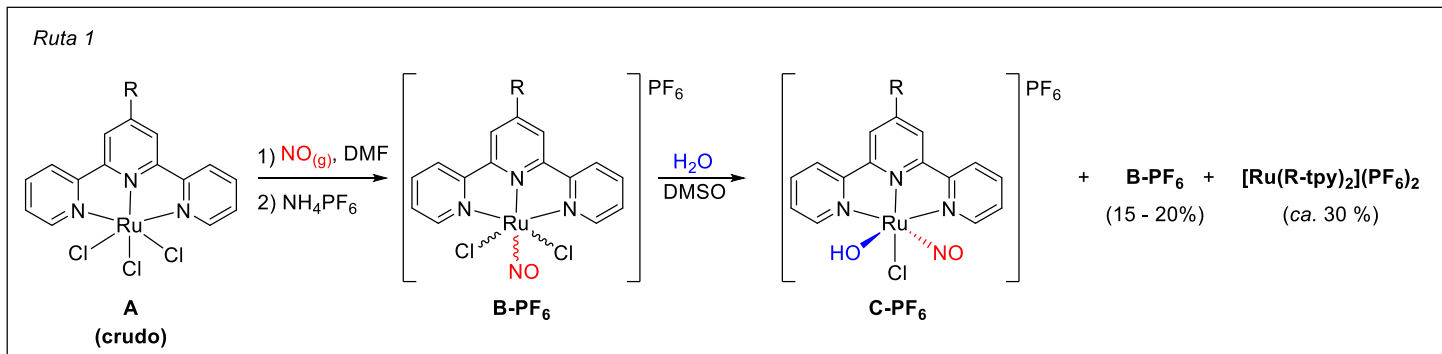


(b)

Figura 15. Proyecciones cristalográficas para (a) *trans-42b* y (b) *trans-51a* vistas a lo largo de los ejes cristalográficos *b* y *c*, respectivamente. Los fragmentos de tienilo y 9,9-dihexilfluorenilo, respectivamente, se muestran en representación *spacefill* en color azul.

Después de preparar y purificar satisfactoriamente los compuestos objetivo con dos ligantes cloruro (**42a,b**, **51a,b**), enfocamos nuestra atención a la obtención de nitrosilos de rutenio con la fórmula *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆), que como se mencionó previamente, corresponden al intercambio de ligante Cl→OH, esta esfera de coordinación fue previamente identificada como el producto de agitar una disolución purificada por HPLC de *trans*-**23** (Sección 1.1.5.3) en agua con 0.5 % de DMSO. Es importante señalar que este tipo de intercambio de ligantes se encuentra a la fecha muy pobremente descrita; antes de este trabajo sólo se encontraron dos artículos, el previamente mencionado por nuestro grupo de trabajo^[54b] y otro por Nagao y colaboradores.^[99] Esto muy probablemente responde a que, independientemente de la ruta sintética empleada, la introducción del grupo nitrosilo implica invariablemente la obtención de los isómeros *cis*(Cl,Cl) y *trans*(Cl,Cl)-[(R-tpy)RuCl₂(NO)]⁺, así como cantidades variables de la especie homoléptica indeseada [Ru(R-tpy)₂]²⁺; la purificación de estos compuestos normalmente involucra procesos tediosos y costosos de cromatografía HPLC, dificultando así la posterior exploración de derivados sintéticos.

Con la intención de desarrollar un protocolo sintético reproducible, escalable y que no involucre pasos de purificación por HPLC, se exploraron diversas rutas sintéticas (Esquema 22). Para mantener consistencia con el trabajo previo del grupo, en los primeros ensayos se emplearon los compuestos **B-PF₆**, los cuales se trataron con agua (0.5 % de DMSO) a temperatura ambiente durante la noche (*Ruta 1*); el análisis por RMN-¹H del crudo de reacción mostró la presencia de una mezcla compleja, compuesta principalmente por el producto deseado (**C-PF₆**), así como cantidades variables de materia prima y una cantidad importante de la especie homoléptica [Ru(R-tpy)₂](PF₆)₂.



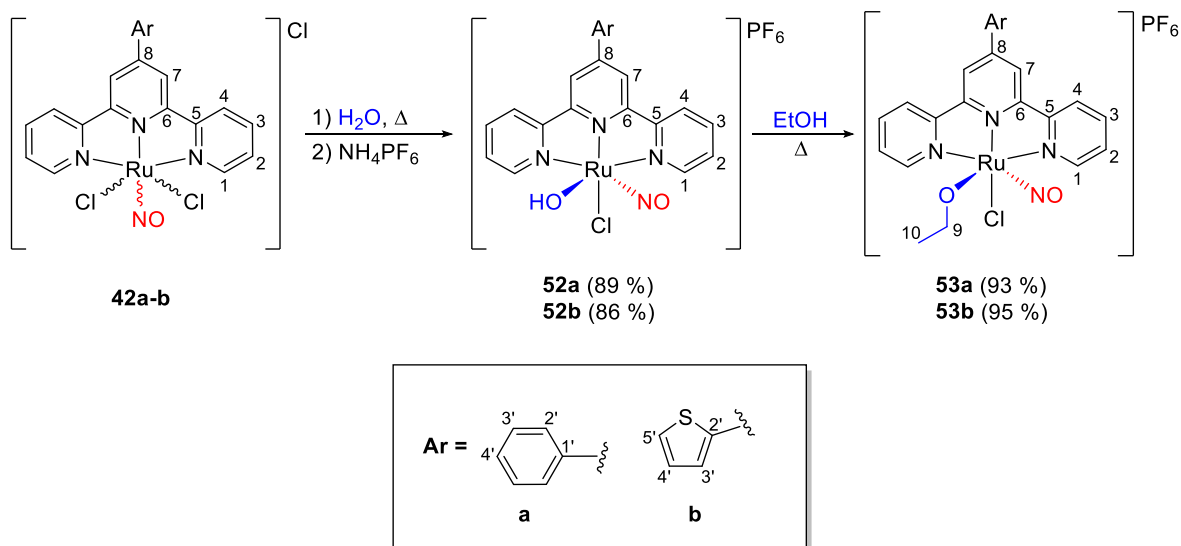
Esquema 22. Diferentes rutas sintéticas exploradas para el intercambio de ligante Cl→OH.

Después de numerosos intentos infructuosos para aislar **B-PF₆** de crudos de reacción de la *Ruta 1*, se modificó el protocolo con la intención de reducir la cantidad de subproductos, en estos ensayos, marcados como *Ruta 2*, se partió de los compuestos **B-Cl** (más solubles en agua), los cuales se trataron con agua a temperatura de reflujo durante la noche, seguido por metátesis con NH₄PF₆. Con esto se logró mejorar el rendimiento del compuesto deseado, lo cual se asoció a la mejor solubilidad en agua para la materia prima con cloruro como contraión (**B-Cl**); además esto simplificó notablemente el trabajo de reacción, al evitar la difícil remoción del DMSO.

En una última optimización de la ruta de síntesis (*Ruta 3*), se trabajó en remover el subproducto homoléptico, que dificultaba el aislamiento de los compuestos objetivo en el paso final de síntesis de la *Ruta 2*. Para lograrlo, una vez identificado el origen del compuesto homoléptico a la síntesis de los compuestos **A**, éste fue removido satisfactoriamente en el primer paso de síntesis empleando lavados con etanol caliente. Aunque este paso de purificación disminuye el rendimiento global de la síntesis, realizarlo resultó indispensable para lograr el aislamiento de los compuestos objetivo **C-PF₆**. De esta forma, siguiendo la *Ruta 3* se lograron obtener productos crudos de reacción de **C-PF₆** con purezas superiores al 98 %. Es importante señalar que se realizaron lotes partiendo de hasta 500 mg de los compuestos **B-Cl** y los resultados fueron los mismos, indicando que esta ruta es escalable y permite la obtención de cantidades adecuadas de los compuestos deseados.

La remoción de pequeñas cantidades de materia prima residuales en algunos lotes fue posible mediante recristalizaciones sucesivas por difusión lenta de éter sobre acetonitrilo, sin embargo este procedimiento resultó pobremente reproducible, por lo que se probaron técnicas cromatográficas, incluyendo cromatografía en columna con SiO₂ y alúmina básica

y neutra como fases estacionarias, sin obtener en ningún caso resultados satisfactorios. Finalmente, mediante cromatografía preparativa en capa fina se lograron obtener muestras de los compuestos deseados con pureza analítica. Como se muestra en el Esquema 23, este protocolo se aplicó satisfactoriamente a la obtención de los compuestos **52a,b**; además, como una alternativa a los métodos cromatográficos para la purificación de estos compuestos, se intentó una recristalización de etanol caliente, lo que produjo el intercambio de ligante OH→OEt para dar los compuestos **53a,b** con rendimientos elevados.



Esquema 23. Síntesis y numeración para los compuestos **52a,b** y **53a,b**.

La identidad y pureza de los compuestos **52a,b** y **53a,b** se corroboraron empleando RMN de ^1H y ^{13}C , EMAR y análisis elemental, encontrando resultados satisfactorios. Como se muestra en la Figura 16, los intercambios de ligante Cl→OH→OEt se pueden seguir fácilmente por RMN- ^1H , además de la aparición de las señales a campo alto de los hidrógenos de los ligantes -OH y -OEt, a campo bajo se observa un desplazamientos de las señales hacia menores frecuencias en el orden *trans*(NO,Cl)>*trans*(NO,OH)>*trans*(NO,OEt), lo cual es

indicativo de un mayor grado de retrodonación hacia el ligante nitrosilo debido al mayor carácter donador de los ligantes OH/OEt en comparación con el cloruro.

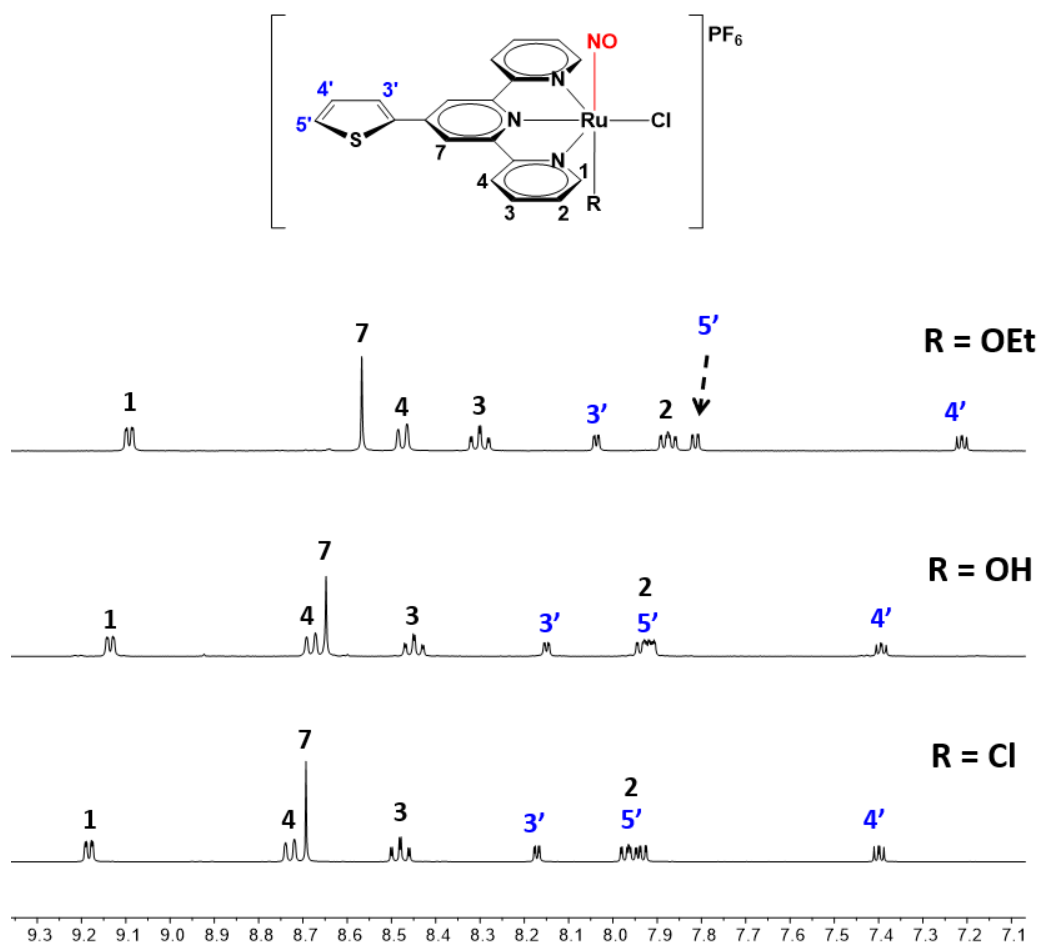


Figura 16. Comparación entre los espectros de RMN-¹H (CD₃CN, 400 MHz) para *cis-42b* (abajo), *52b* (en medio) y *53b* (arriba).

Como se muestra en la Figura 17, también se observó evidencia en los espectros de FT-IR(ATR) de una creciente retrodonación como consecuencia del reemplazo del cloruro por los ligantes -OH/-OEt, observándose como un corrimiento a menores frecuencias para el estiramiento ν NO en el orden Cl→OH→OEt, asociado a que conforme aumenta el carácter donador del ligante *trans* al NO, se favorece la retrodonación del centro metálico hacia el orbital π^* del NO, debilitando el enlace N-O y consecuentemente disminuyendo la frecuencia

observada para su estiramiento. A pesar de que estas observaciones podrían asociarse a interacciones supramoleculares ocurriendo en el sólido, tomando en cuenta que las diferencias son relativamente grandes y que correlacionan de manera clara con los resultados de RMN en disolución mencionados anteriormente, resulta razonable atribuir esta tendencia a una modulación de la retrodonación Ru→NO en vez de a diferencias en el ambiente cristalino de los compuestos.

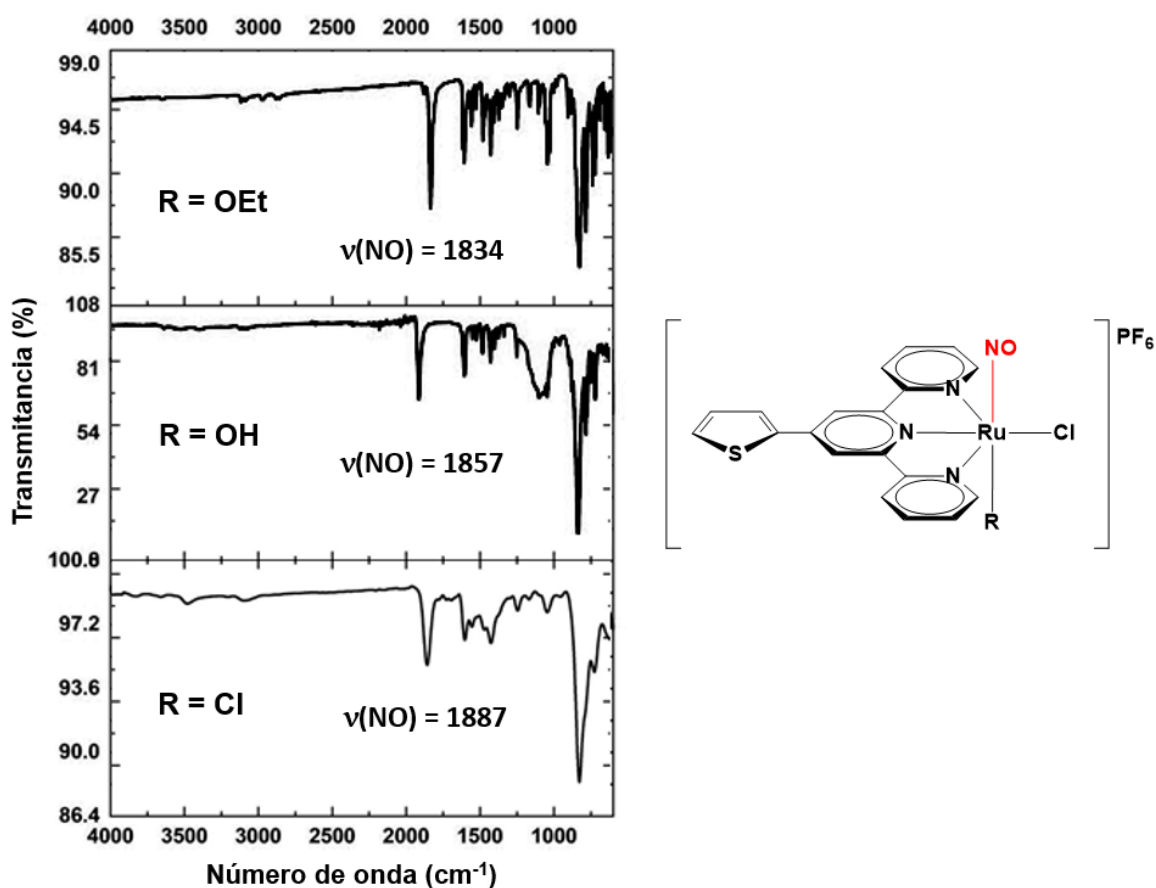


Figura 17. Comparación entre los espectros de infrarrojo (FTIR-ATR) para *cis-42b* (abajo), **52b** (en medio) y **53b** (arriba).

Se lograron obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal para los compuestos **52a,b** y **53a,b**, con lo cual se corroboraron las estructuras de estos

compuestos (Figura 18). En la Tabla 3 se incluyen las distancias y ángulos de enlace característicos, donde una vez más se aprecian ángulos cercanos a 180° para el fragmento Ru-N-O, en concordancia con la coordinación del NO como NO^+ ; además se existe una tendencia apreciable hacia distancias N-O mayores y ángulos Ru-N-O reducidos como consecuencia del reemplazo del cloruro por OH y OEt; estas modificaciones geométricas, ilustradas en la Figura 19, se asocian a una mejor retrodonación $\text{Ru} \rightarrow \text{NO}$ en los sistemas con ligantes oxigenados, en buen acuerdo con las observaciones por RMN y FT-IR (ATR) para estos compuestos.

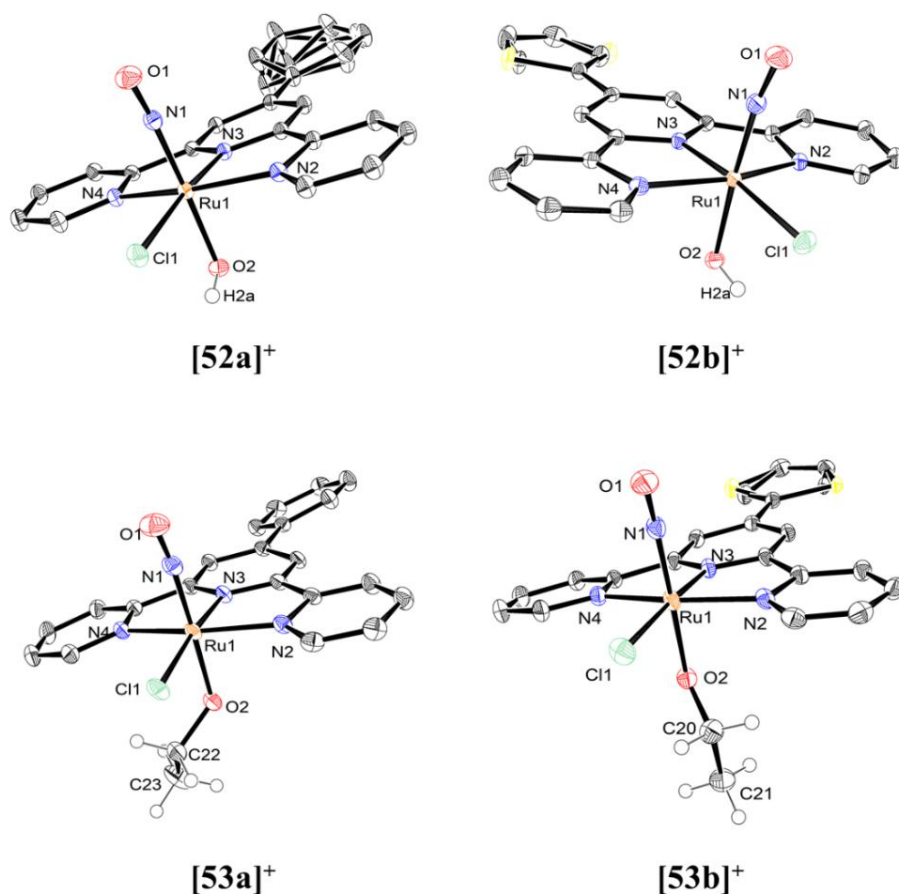


Figura 18. Estructuras cristalinas para los cationes en los compuestos **52a,b** y **53a,b**. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad para todos los átomos distintos de hidrógeno. Sólo se incluyen algunos átomos de hidrógeno por claridad.

Tabla 3. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) relevantes para **52a,b** y **53a,b**.

	52a	52b	53a	53b
Ru(1)-N(1)	1.7632(9)	1.7626(12)	1.771(2)	1.759(2)
Ru(1)-N(2)	2.0881(8)	2.0920(11)	2.097(2)	2.085(2)
Ru(1)-N(3)	1.9756(8)	1.9766(10)	1.9824(19)	1.983(2)
Ru(1)-N(4)	2.0849(8)	2.0891(11)	2.088(2)	2.085(2)
Ru(1)-Cl(1)	2.3890(2)	2.3889(3)	2.4083(7)	2.3949(7)
Ru(1)-O(2)	1.9499(8)	1.9532(9)	1.9504(18)	1.9424(17)
N(1)-O(1)	1.1469(12)	1.1494(16)	1.146(3)	1.154(3)
N(1)-Ru(1)-N(3)	98.56(4)	98.92(5)	97.12(9)	97.25(9)
N(3)-Ru(1)-N(4)	79.76(3)	79.83(4)	79.63(8)	79.71(8)
Cl(1)-Ru(1)-N(1)	87.67(3)	87.48(4)	87.19(7)	87.08(7)
N(1)-Ru(1)-O(2)	176.41(3)	176.02(5)	178.04(8)	177.57(9)
Ru(1)-N(1)-O(1)	170.57(8)	170.47(11)	171.97(19)	170.5(2)

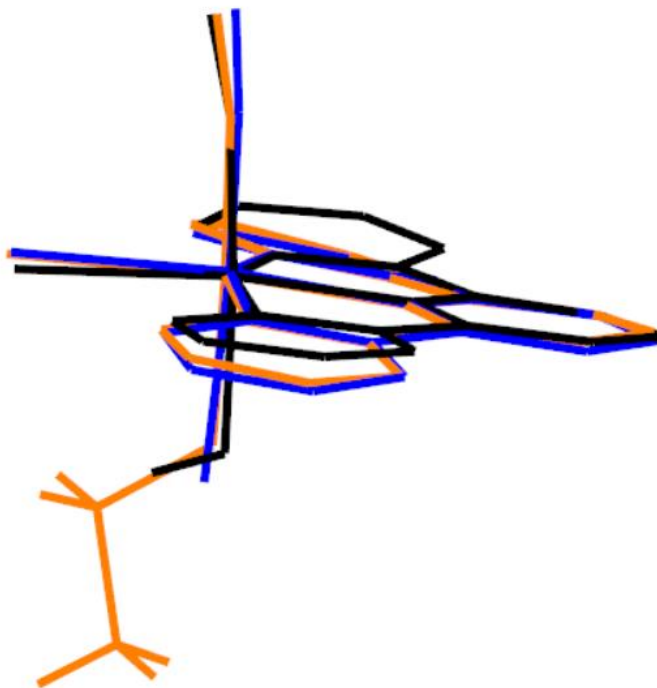


Figura 19. Superposición de las esferas de coordinación en las estructuras cristalinas de *cis*-**42b** (azul), **52b** (negro) y **53b** (naranja). Por claridad se omiten los átomos de hidrógeno y el sustituyente de tienilo en el ligante tridentado.

En la Figura 20 se muestran algunas de las interacciones supramoleculares características para estos compuestos; en el caso de **52a,b** y en el análogo con fluoreno,^[54b] los ligantes OH muestran consistentemente interacciones de enlaces de hidrógeno cíclicos con los ligantes Cl como aceptores y un descriptor $R_2^2(8)$;^[100] por otro lado para **53a,b** se observan empaquetamientos más similares al de *cis*-**42b**, con apilamientos π - π desplazados^[97] antiparalelos como la interacción supramolecular más característica.

Finalmente, es importante señalar que en esta familia de compuestos también se observó una tendencia hacia distancias N-O mayores y ángulos Ru-N-O reducidos en los compuestos con anillos de tienilo (**52b** y **53b**), indicando una mejor transferencia de carga hacia el centro metálico en comparación con sus análogos con anillos de fenilo.

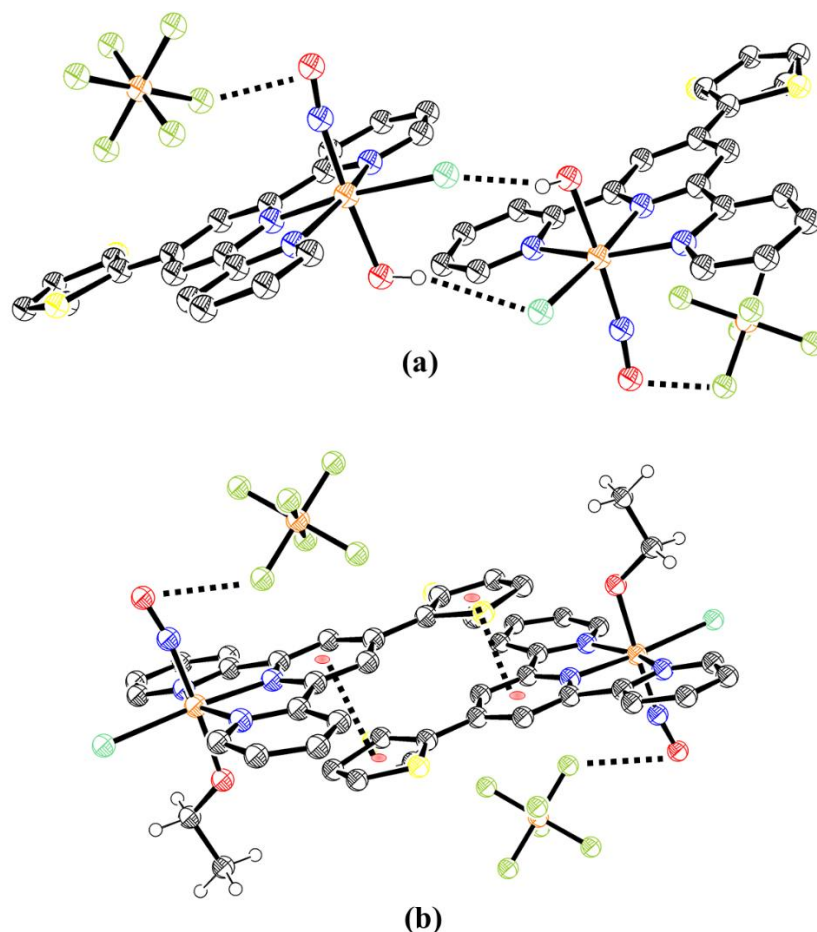


Figura 20. Interacciones supramoleculares relevantes en la red cristalina de (a) **52b** y (b) **53b**. Algunos átomos de hidrógeno y moléculas de disolvente se omiten por claridad.

1.5.3. El intercambio de ligante Cl→OH

Una característica importante acerca del intercambio de ligante Cl→OH es que, a pesar de que tres diferentes isómeros podrían ser obtenidos (Esquema 24), el análisis por RMN-¹H de los crudos de reacción mostraron la formación de un solo isómero, que como se discutió anteriormente correspondió a las especies *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆), a pesar de que se emplearan como materiales de partida las mezclas de isómeros *cis*(Cl,Cl) y *trans*(Cl,Cl)-[Ru(R-tpy)Cl₂(NO)](Cl). Remarcablemente, la misma estereoespecificidad fue observada para el intercambio de ligante OH→OEt.

en la Tabla 4, mostrando claramente que la especie energéticamente favorecida es el isómero *trans*(NO,OH), independientemente del carácter donador/aceptor del ligante tridentado.

Tabla 4. Energía libre de Gibbs (G°) relativa calculadas para los tres diferentes isómeros para los compuestos de coordinación $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{Cl})(\text{NO})(\text{OH})]^+$ en agua (PCM/B3PW91/6-31G*)

R	Isómero	Energía relativa (kcal/mol)
9 <i>H</i> -fluoreno	<i>trans</i> (Cl,NO)	+ 9.8
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+ 5.7
	<i>trans</i> (NO,OH)	0
4-(N,N-dimetilamino)fenilo	<i>trans</i> (Cl,NO)	+ 9.6
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+ 5.7
	<i>trans</i> (NO,OH)	0
4-nitrofenilo	<i>trans</i> (Cl,NO)	+ 9.3
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+ 5.9
	<i>trans</i> (NO,OH)	0

Como se ejemplifica en la Figura 21 para *cis*-**42b** y *trans*-**42b**, se encontró evidencia adicional para la formación de un sólo isómero durante el intercambio de ligante siguiendo la evolución espectral de muestras puras de estos compuestos en agua. La conversión a un sólo isómero en ambos casos puede inferirse de la presencia del mismo punto isobéptico en

$\lambda = 380 \text{ nm}$ y por el hecho de que el punto final de ambas evoluciones espectrales mostró espectros superponibles

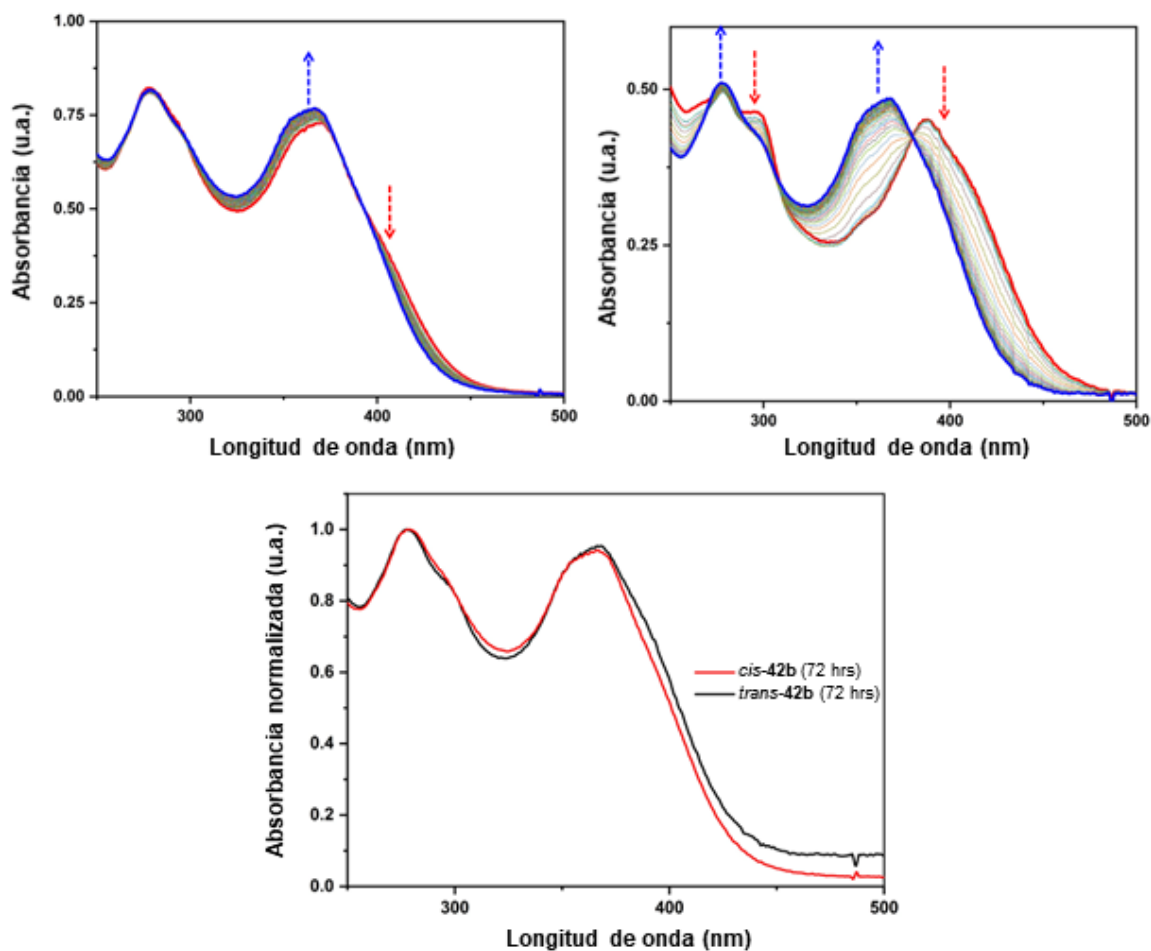
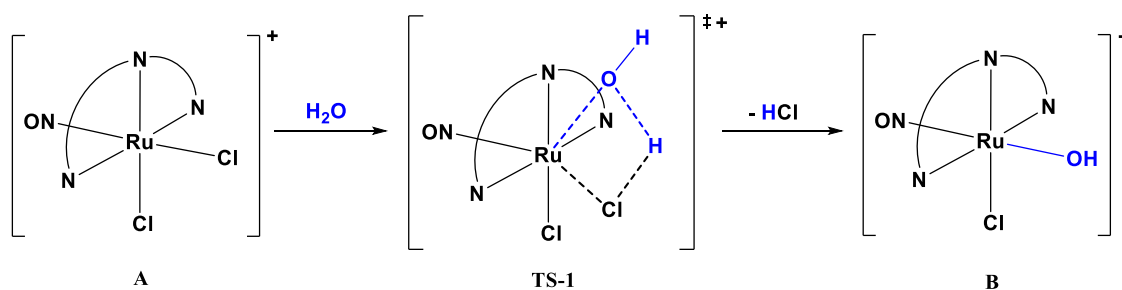


Figura 21. Evolución espectral en agua (0.5 % de DMSO) para *cis-42b* (arriba, izquierda) y *trans-42b* (arriba, derecha) a temperatura ambiente ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$, 72 hrs). Una comparación entre los puntos finales de ambos estudios se muestra abajo.

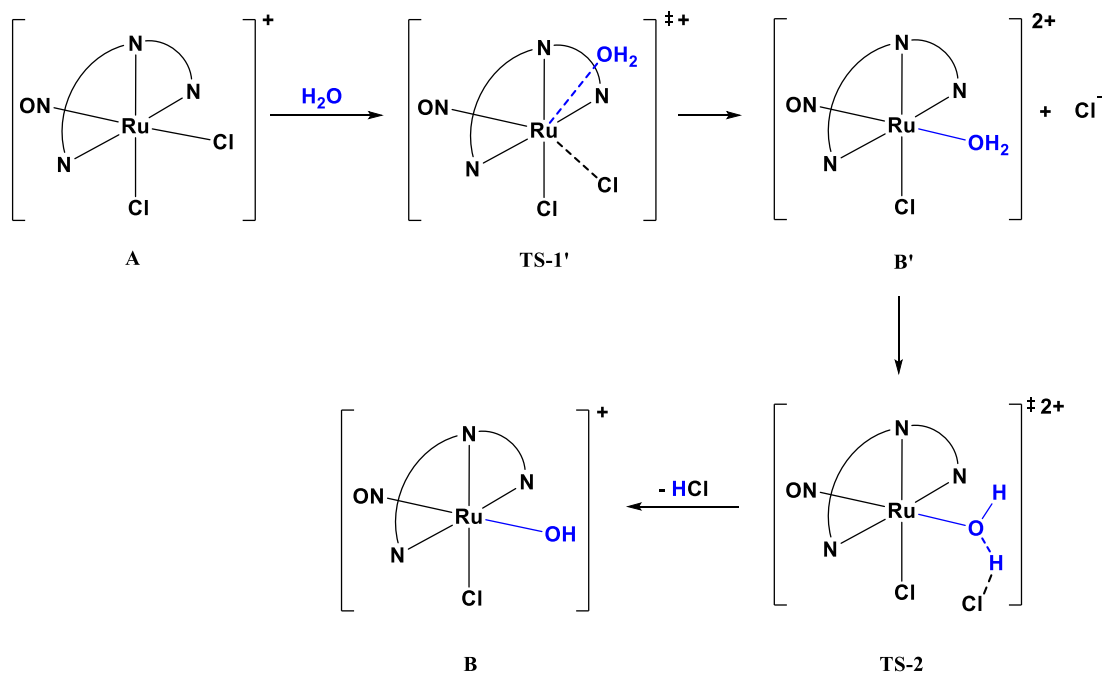
No se realizaron más investigaciones para clarificar los detalles de la formación del enlace Ru-OH; sin embargo, dado que el pH de la disolución estaba en el intervalo de 5-7, la sustitución probablemente procede a través del mecanismo de intercambio^[101] ilustrado en el Esquema 25 (*Mecanismo 1*), iniciado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua y

evitando la formación de intermediarios $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO})]^{2+}$ de alta energía (B' en el *Mecanismo 2*). Más aún, este tipo de mecanismo de intercambio, involucrando la ruptura del enlace Ru-Cl y la formación del enlace Ru-O de manera simultánea (como en TS-1), ha sido el más aceptado para reacciones de hidrólisis similares en compuestos de coordinación octaédricos de Ru^{III} ^[101-102] y Co^{III} ^[103] con geometrías para los estados de transición parecidas a la propuesta aquí para TS-1 y TS-1'.^[101-103]

Mecanismo 1:



Mecanismo 2:



Esquema 25. Dos posibles mecanismos para el intercambio de ligante Cl→OH.

1.5.4. Espectroscopía UV-Visible

La espectroscopía UV-Visible constituye una herramienta muy útil que, combinada con el análisis computacional, permite estudiar la energía y la distribución electrónica no sólo del estado fundamental de una molécula, sino también de sus diversos estados excitados, ofreciendo así información sobre el origen de las bandas espectrales observadas en los espectros de absorción. Es además una técnica particularmente relevante para este trabajo ya que, como se discutió anteriormente, hay evidencia experimental consistente (RMN, IR, DRX) indicando una mejor transferencia de carga desde los ligantes hacia el fragmento Ru-NO como consecuencia de la introducción de anillos de tienilo, no importando si el heterociclo participa como donador o como puente π ; sin embargo, hasta este punto esta conclusión es válida *sólo para el estado fundamental* de los compuestos, ya que los experimentos mencionados se realizan con baja iluminación, por lo que se espera una contribución negligible de los estados excitados a la función de onda en estas condiciones. Consecuentemente, el análisis de las transiciones electrónicas en nuestros sistemas puede aportar información relevante que indique si la transferencia de carga se ve también mejorada en el *primer estado excitado*, el cual, a diferencia del estado fundamental, frecuentemente presenta un carácter disociativo para el enlace Ru-NO, estando así directamente involucrado en la liberación del radical.

En esta sección se presenta un análisis comparativo de los perfiles de absorción de los nitrosilos de rutenio obtenidos, apoyado en cálculos de estructura electrónica en el marco de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). Para esto, las geometrías fueron optimizadas al nivel de teoría B3PW91/6-31G* y los espectros de absorción fueron calculados empleando el funcional CAM-B3LYP con la misma base de

cálculo, ya que este método mostró menores diferencias entre las energías de excitación calculadas y experimentales, en comparación con otros funcionales.

En la Figura 22 se muestra una comparación entre las geometrías experimentales (en estado sólido) y las calculadas (en fase gas) para cationes representativos de las distintas esferas de coordinación estudiadas en esta tesis, con *cis-42b* representando a la familia *cis(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆)* y los compuestos *trans-42b/trans-51a* a la familia *trans(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆)*, con arquitecturas donador-aceptor (D-A) y donador- π -aceptor (D- π -A), respectivamente. Por otra parte *52b* y *53b* representan a las familias *trans(NO,OR)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OR)(NO)](PF₆)*, donde OR = OH y OEt, respectivamente. A pesar de que las geometrías corresponden a diferentes fases, con la excepción de *trans-51a*, mostrando desviaciones importantes debidas a diversas interacciones en su estructura cristalina, en general existe una buena concordancia entre las geometrías calculadas y las experimentales, especialmente con respecto a los ángulos y distancias de enlace entre el centro metálico y los átomos directamente enlazados a éste, y para los ángulos diedros entre el anillo central de piridina y el sustituyente (tienilo/fenilo). Es importante señalar además que las geometrías calculadas muestran en todos los casos una disminución importante en estos ángulos diedros como consecuencia de la introducción de los anillos de tienilo, sin importar la esfera de coordinación del rutenio, en buen acuerdo con los resultados experimentales.

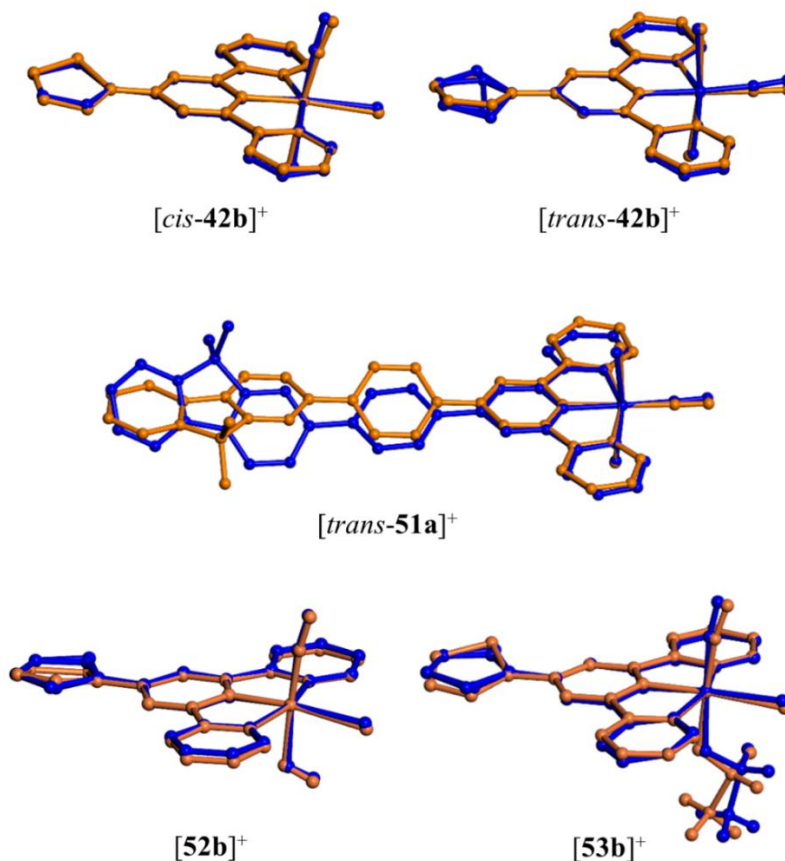


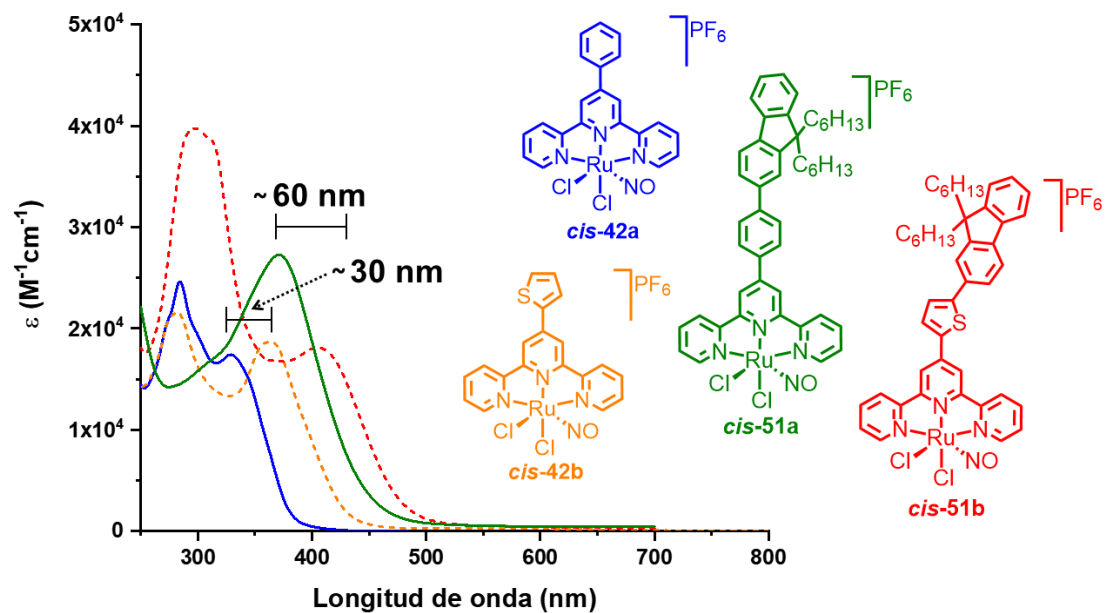
Figura 22. Comparación entre las geometrías en estado sólido (azul) y las calculadas (B3PW91/6-31G*, naranja) para los cationes de compuestos representativos. Las cadenas de *n*-hexilo en *trans*-**51a** y algunos átomos de hidrógeno se omiten por claridad.

Los resultados experimentales y calculados para los espectros de absorción de los nistrosilos de rutenio estudiados se muestran en la Tabla 5 y en las Figuras 23 y 24. Antes de presentar un análisis de orbitales moleculares para explicar las características de cada familia de compuestos, resulta conveniente hacer algunas observaciones generales. En primer lugar, es importante señalar la buena concordancia entre las energías de excitación experimentales y calculadas, mostrando desviaciones dentro del límite ampliamente aceptado para cálculos de TD-DFT (0.3 - 0.5 eV, *ca.* 40 nm),^[104] evidenciando de esta manera la fiabilidad de los resultados computacionales.

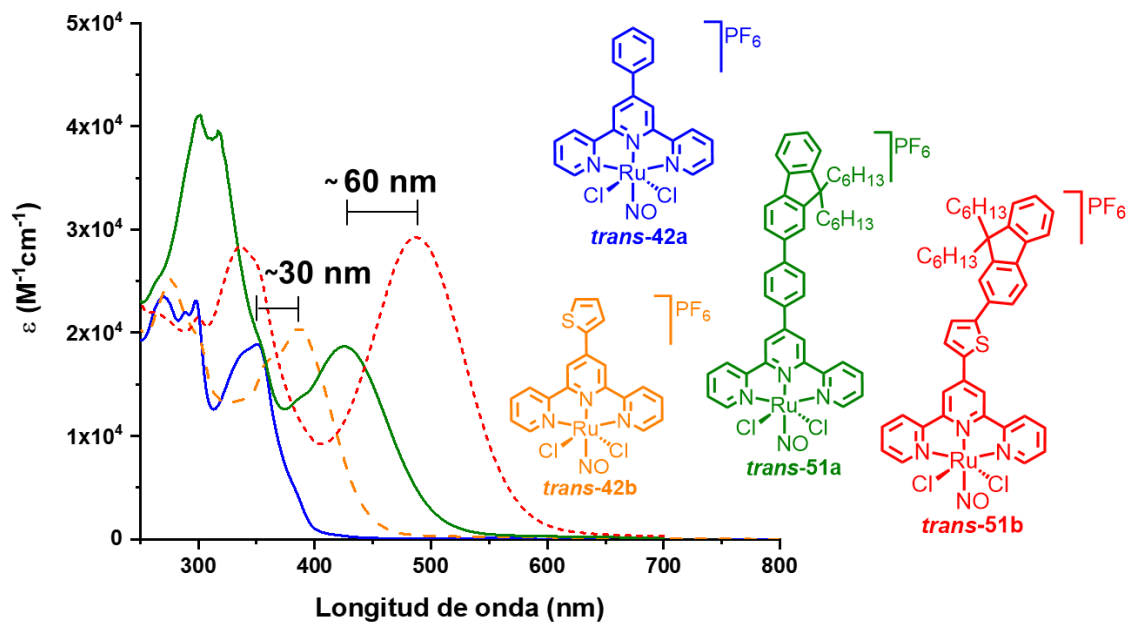
Tabla 5. Datos de UV-Vis experimentales y calculados (CAM-B3LYP/6-31G*) en acetonitrilo y transiciones electrónicas involucradas.

Compuesto	λ_{max} (exp), nm	λ_{max} (calc), nm	f	Componentes principales	Carácter
	(ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)				
<i>cis</i> - 42a ^a	330 (17400)	299	0.528	60 % $\chi_{113 \rightarrow 114}$	Fenilo → RuNO
<i>trans</i> - 42a ^a	350 (18800)	312	0.363	71 % $\chi_{113 \rightarrow 114}$	Fenilo → RuNO
<i>cis</i> - 42b	363 (18700)	335	0.657	49 % $\chi_{114 \rightarrow 115}$	Tienilo → RuNO
<i>trans</i> - 42b	387 (20500)	348	0.607	74 % $\chi_{114 \rightarrow 115}$	Tienilo → RuNO
<i>cis/trans</i> (Cl,Cl)					
<i>cis</i> - 51a	406 (18100)	357	0.775	49% $\chi_{164 \rightarrow 165}$ + 26% $\chi_{164 \rightarrow 167}$	Fluorenilo + fenilo → RuNO
<i>trans</i> - 51a	425 (18700)	372	0.672	62% $\chi_{164 \rightarrow 165}$	Fluorenilo + fenilo → RuNO
<i>cis</i> - 51b	472 (27300)	423	1.216	60% $\chi_{165 \rightarrow 166}$	Fluorenilo + tienilo → RuNO
<i>trans</i> - 51b	488 (29300)	429	1.267	67% $\chi_{165 \rightarrow 166}$	Fluorenilo + tienilo → RuNO
<i>trans</i> (NO,OH)					
52a	325 (19700)	292	0.469	61 % $\chi_{109 \rightarrow 110}$	fenilo → RuNO
52b	358 (21100)	327	0.751	68 % $\chi_{110 \rightarrow 111}$	tienilo → RuNO
<i>trans</i> (NO,OEt)					
53a	328 (19300)	291	0.194	50 % $\chi_{117 \rightarrow 120}$ + 21 % $\chi_{116 \rightarrow 118}$	EtO → RuNO
53b	362 (20350)	327	0.706	39 % $\chi_{118 \rightarrow 119}$ + 33 % $\chi_{117 \rightarrow 119}$	EtO + tienilo → RuNO

^a Ref. 49.



(a)



(b)

Figura 23. Espectros de absorción (4×10^{-5} M, acetonitrilo) para (a) *cis-42a,b* y *cis-51a,b* y (b) *trans-42a,b* y *trans-51a,b*. Los datos de *cis-42a* y *trans-42a* se adaptaron de la Ref. 49.

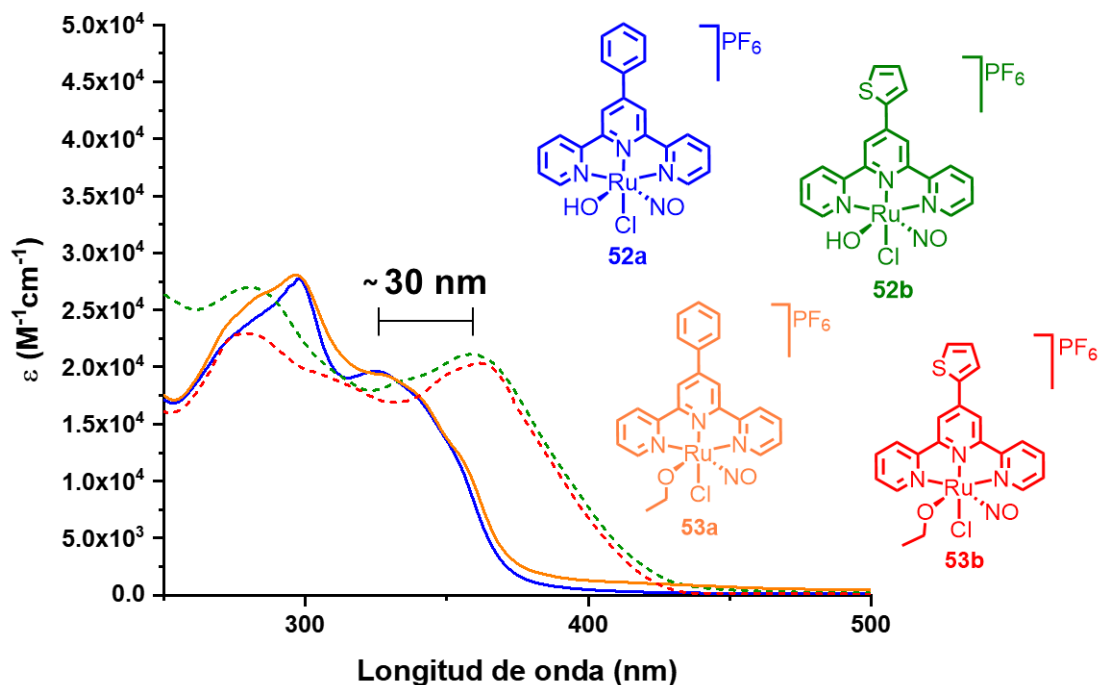


Figura 24. Espectros de absorción (4×10^{-5} M, acetonitrilo) para **52a,b** y **53a,b**.

Como se puede ver, el reemplazo estructural fenilo→tienilo produjo un desplazamiento batocrómico importante de $\lambda = 33 - 37$ nm y de $\lambda = 63 - 65$ nm, para los sistemas con arquitecturas D-A (**42a,b**) y D- π -A (**51a,b**), respectivamente. Para los sistemas D-A, el origen de este desplazamiento batocrómico resulta exclusivamente de la presencia de un sistema *push-pull* más eficiente en los derivados con anillos de tienilo ya que el reemplazo del puente π no modifica la longitud del sistema π -conjugado, sino únicamente la eficiencia del grupo donador, siendo más eficiente la transferencia de carga en los compuestos con anillos de tienilo con esta arquitectura. Como se ejemplifica en la Figura 25 para los isómeros *trans*(Cl,Cl) de los sistemas con arquitectura D-A (**42a,b**), la participación del anillo de tienilo como un donador más eficiente produce una desestabilización del orbital HOMO de alrededor de 0.4 eV, si se compara con su análogo con fenilo como donador. Con respecto a las bandas de absorción, las transiciones presentan componente predominante con carácter

HOMO-LUMO (113→114 para *trans*-**42a** y 114→115 para *trans*-**42b**), estas transiciones tienen un cambio en el momento dipolar asociado ($\Delta\mu$) mayor en 0.67 D para *trans*-**42b**, en buen acuerdo con una transferencia de carga mejorada en los sistemas D-A como consecuencia del reemplazo fenilo→tienilo. Resulta importante señalar que, como se muestra en la Sección 1.4.5., esta transferencia de carga mejorada para *trans*-**42b** correlaciona con un incremento del 50 % en Φ_{NO} comparado con el valor, previamente reportado,^[49] de *trans*-**42a**. De hecho, el valor de Φ_{NO} de *trans*-**42b** es el más alto encontrado a la fecha para un nitrosilo de rutenio *cis*(Cl,Cl).

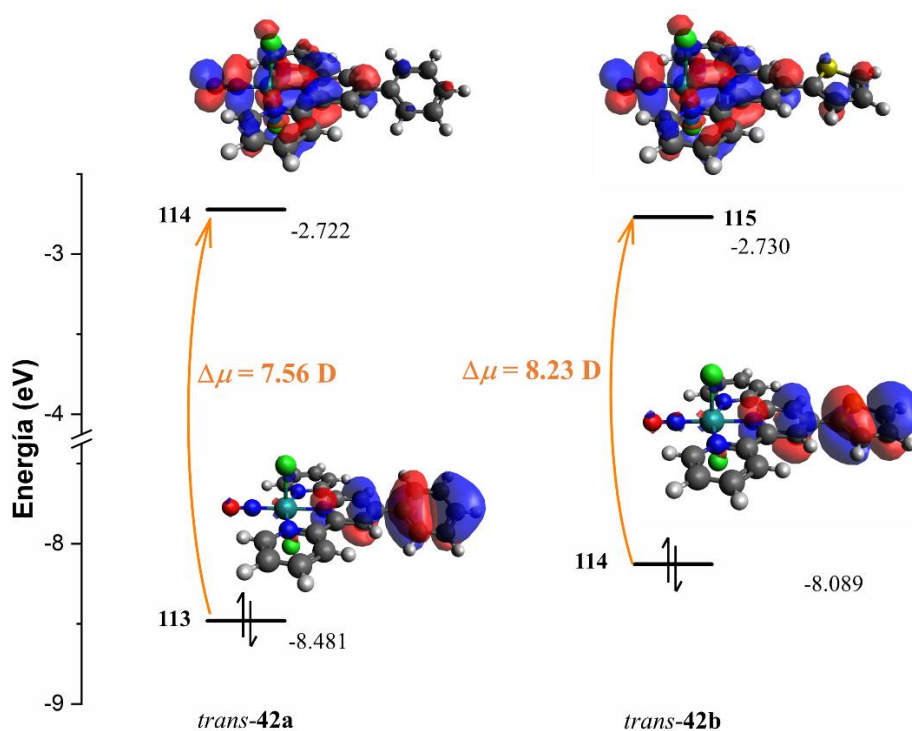


Figura 25. Energías relativas para los principales orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas con transferencia de carga ($\Delta\mu$) para *trans*-**42a,b** en acetonitrilo al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*. Los niveles ocupados y desocupados corresponden a los orbitales HOMO y LUMO, respectivamente.

Para los sistemas con arquitectura D- π -A (**51a,b**), cuyos diagramas de energía se ejemplifican con los isómeros *trans*(Cl,Cl) en la Figura 26, se encuentran transiciones principales para el máximo de absorción con carácter HOMO-LUMO (164 \rightarrow 165 para *trans*-**51a**, 165 \rightarrow 166 para *trans*-**51b**); a pesar de que en general la distribución de estos orbitales es similar en ambos casos, hay una participación mayor del anillo de tienilo al orbital HOMO, que podría muy probablemente originar la diferencia de $\Delta\mu = 6.84$ D entre estos compuestos. Una posible explicación para esto es que, a pesar de que en ambos casos el orbital HOMO está más localizado en el fragmento de fluoreno, la contribución mayor del anillo de tienilo en el caso *trans*-**51b**, acerca más la densidad electrónica del HOMO hacia el centro de la molécula, reduciendo así la magnitud de los momentos dipolares y con ello $\Delta\mu$.

Es importante señalar que a pesar de que en esta Sección se han discutido sólo los isómeros *trans*(Cl,Cl), las observaciones presentadas se extienden ampliamente a los isómeros *cis*(Cl,Cl), que de igual forma muestran una desestabilización cercana a 0.4 eV para el orbital LUMO en los sistemas D-A, que se ve significativamente reducida en los sistemas D- π -A (Figuras anexas S68-S69).

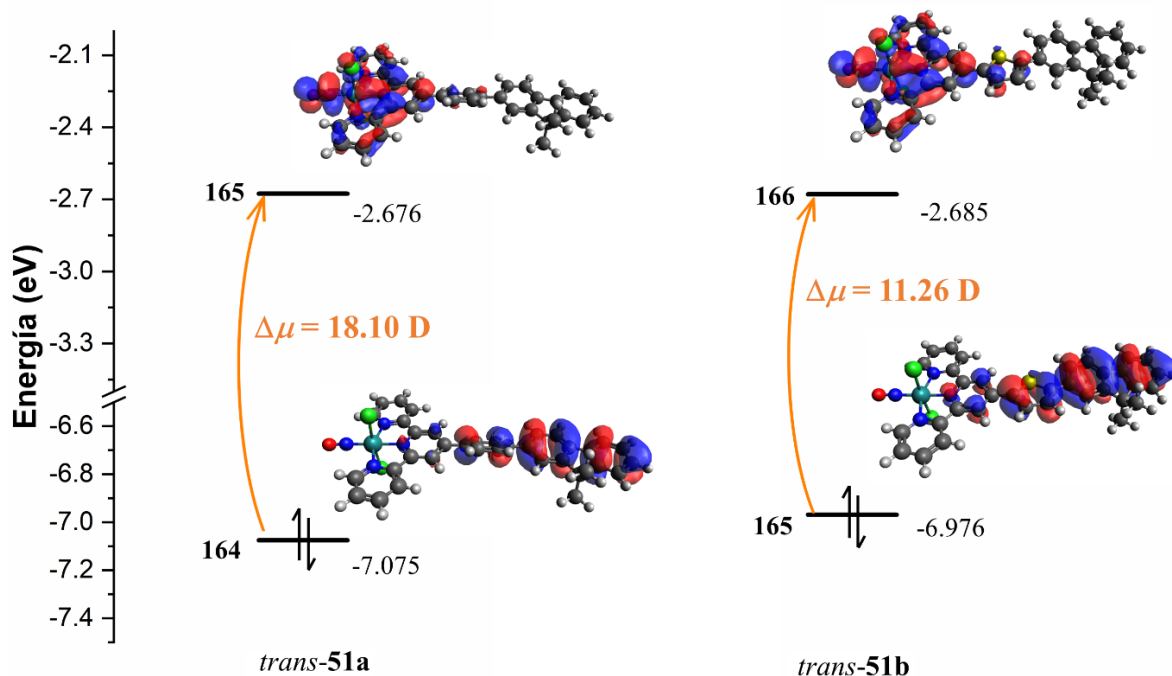


Figura 26. Energías relativas para los principales orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas con transferencia de carga ($\Delta\mu$) para *trans-51a,b* en acetonitrilo al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*. Los niveles ocupados y desocupados corresponden a los orbitales HOMO y LUMO, respectivamente.

Para concluir sobre la influencia de los anillos de tienilo introducidos, en la Figura 27 se muestra una comparación de los espectros de absorción de los compuestos *cis-24* y *trans-24*, previamente informados,^[72] con los de los *cis-51b* y *trans-51b*, cuya única diferencia estructural con los primeros es la introducción del anillo de tienilo. Como puede observarse, esta pequeña modificación del ligante tridentado incrementó sustancialmente el coeficiente de extinción molar de los compuestos en la longitud de máxima absorción y produjo un pronunciado efecto batocrómico de $\lambda = 65$ nm. Como se discutió detalladamente en la Sección 1.1.5.1., estas dos características se asocian directamente con incrementos en los valores de σ_{TPA} para compuestos dipolares *push-pull* como estos, por lo que se espera

que la introducción de estos heterociclos tenga un efecto favorable sobre la eficiencia de liberación del radical vía absorción de dos fotones.

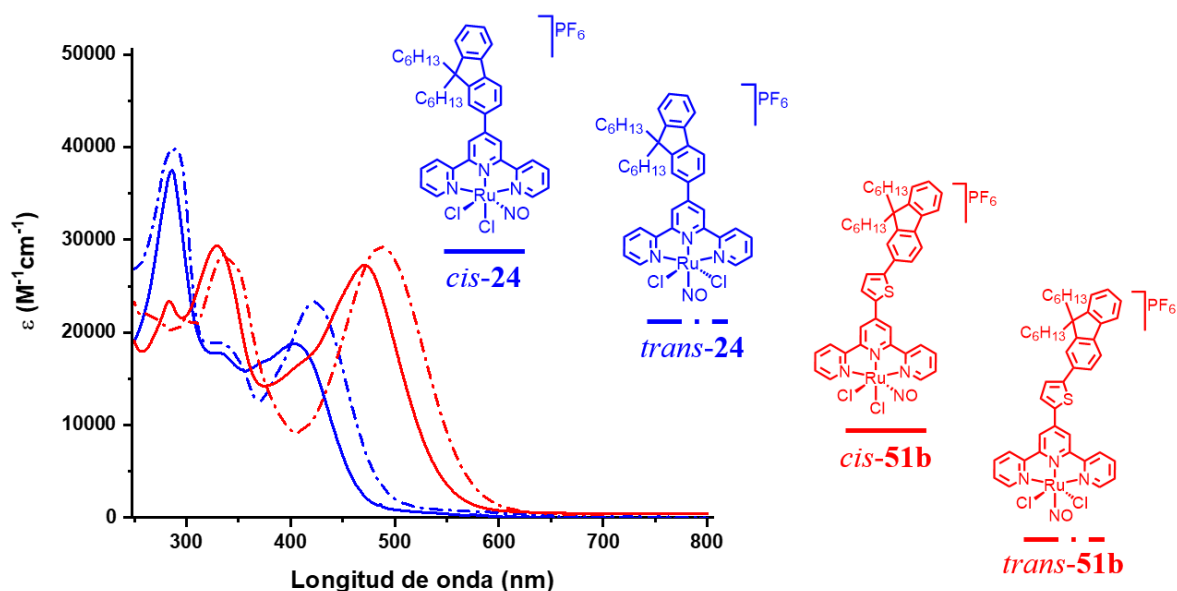


Figura 27. Comparación de los espectros de absorción (4×10^{-5} M, acetonitrilo) para *cis-24*, *trans-24*, *cis-51b* y *trans-51b*. Los datos de *cis-24* y *trans-24*, se adaptaron de la Ref. 72.

1.5.4.1. Análisis de transiciones electrónicas para los compuestos de coordinación con ligantes OH/OEt.

Con respecto a los derivados con ligantes -OH/-OEt (**52a,b** y **53a,b**) primero es importante señalar que el desplazamiento batocrómico provocado por el reemplazo estructural fenilo→tienilo también se extiende a esta serie con valores cercanos a $\lambda = 30$ nm, en buen acuerdo con lo discutido previamente, sin embargo, la descripción de las transiciones electrónicas para estas moléculas es más compleja.

De acuerdo con los resultados computacionales, independientemente del sustituyente en el ligante tridentado, el intercambio de ligante de un cloruro por -OH y -OEt produce una

desestabilización espectacular del nivel HOMO (mayor a 1 eV), más de dos veces mayor que la introducida por el reemplazo estructural fenilo→tienilo, indicando una modulación importante de la estructura electrónica introducida por los ligantes OH/OEt. Esta desestabilización del HOMO consecuentemente reduce la brecha HOMO/LUMO, lo que se ejemplifica en la Figura 28 mediante una comparación energética para los cambios de ligante en posición *trans* al nitrosilo: Cl (*cis-42b*) → OH (**52b**) → OEt (**53b**). En los tres casos, los máximos de absorción están asociados a transiciones desde el anillo de tienilo hacia el fragmento Ru-NO (HOMO→LUMO para *cis-42b* y **52b** y HOMO-1→LUMO para **53b**, en buen acuerdo con numerosas observaciones previas del grupo de investigación para compuestos con esferas de coordinación similares a la de *cis-42b*.^[49] El escenario para **53b**, sin embargo es particular, ya que el máximo de absorción tiene una composición distinta a la de *cis-42b* y **52b**; para **53b** se observa además de la transición tienilo→RuNO una segunda transición cercana en energía (HOMO→LUMO) con un carácter EtO→RuNO; siendo la contribución de esta transición incluso mayor que la de la transición tienilo→RuNO (39 y 33 %, respectivamente).

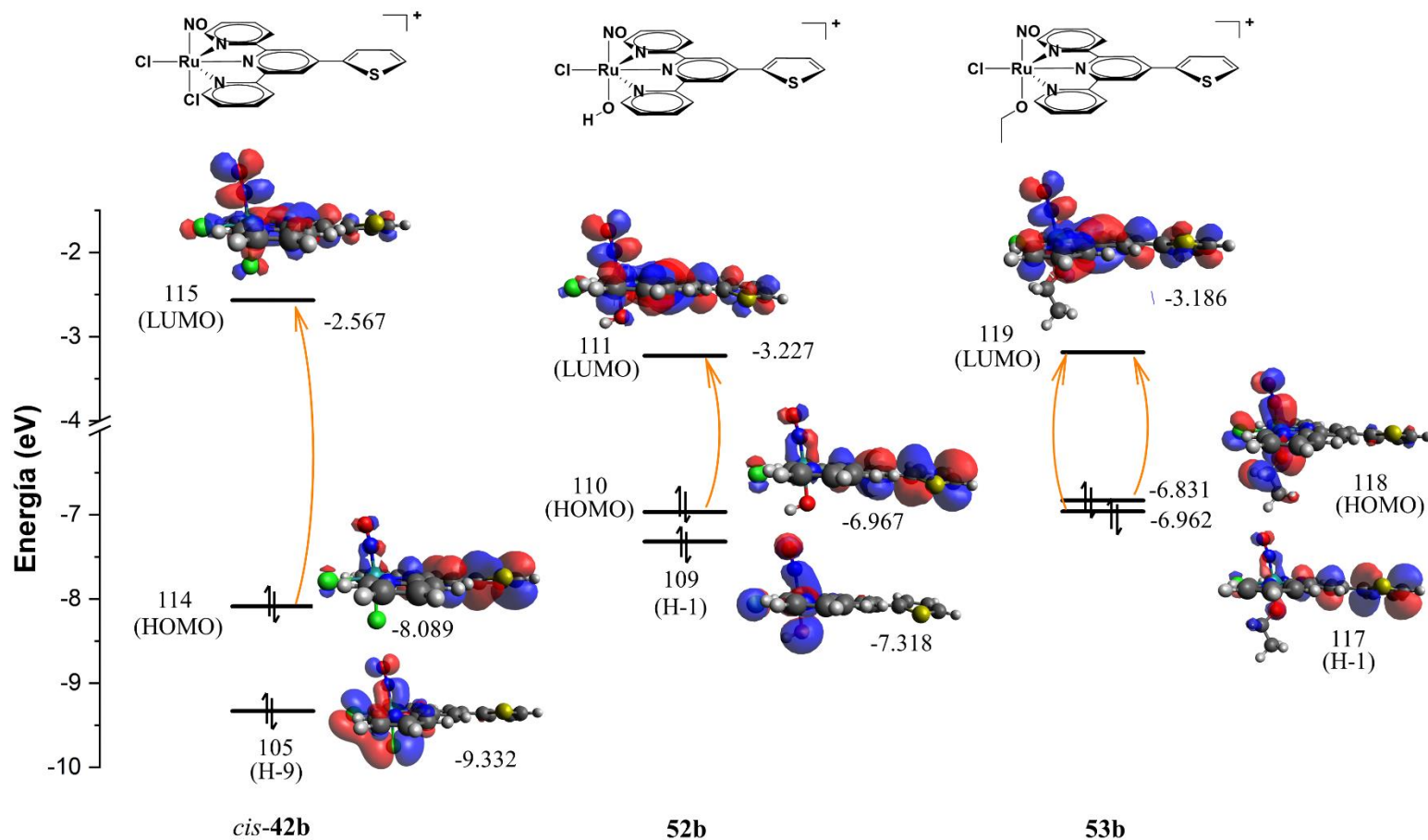


Figura 28. Energías relativas para los principales orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas con transferencia de carga ($\Delta\mu$) para los compuestos *cis*-42b, 52b y 53b en acetonitrilo al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*. Los niveles ocupados y desocupados corresponden a los orbitales HOMO y LUMO, respectivamente.

A pesar de no poder aplicarse formalmente de una manera directa, ya que los ligantes -Cl, -OH, -OEt, no forman parte de una molécula orgánica y se encuentran enlazados directamente a un metal, las constantes de Hammett, σ_p , para los tres ligantes (-Cl: 0.23, -OH: -0.37, -OEt: -0.27)^[105] proveen una explicación cualitativa para la participación del ligante -OEt en la transferencia de carga hacia el fragmento Ru-NO en los compuestos **53a,b**, previamente mencionada. No resulta sorprendente, pues, que un donador fuerte como el etanolato contribuya significativamente a la transferencia de carga hacia el nitrosilo, mientras que el cloruro, un electroatractor, no tenga una contribución importante. Siguiendo este razonamiento, sin embargo, deberíamos encontrar un escenario similar para **52b** y **53b**, ya que el grupo -OH es incluso un mejor donador que el -OEt, sin embargo este no fue el caso ya que no se encontró contribución de transiciones OH→RuNO similares a las OEt→RuNO.

La discrepancia puede muy probablemente deberse a razones estructurales en vez de electrónicas. Como se muestra en la Figura 29, existe una diferencia geométrica importante entre los compuestos con ambos ligantes, específicamente en los ángulos Ru-OH y Ru-O-CH₂CH₃, observándose un ángulo de enlace 20 ° mayor para el segundo, asociado a la, relativamente voluminosa cadena alquílica. La presencia de un ángulo Ru-OH comparativamente menor acerca al átomo de hidrógeno del OH hacia el Cl en *cis*, haciendo probable una interacción tipo enlace de hidrógeno intramolecular Ru-O-H...Cl con una distancia H...Cl de 2.58 Å. Esta interacción podría consecuentemente explicar la estabilización del orbital HOMO-1 en **52b** de cerca ca. 0.35 eV (~ 8 kcal/mol) que hace energéticamente más demandante, en comparación con **53b**, la transferencia de carga desde este orbital hacia el fragmento Ru-NO. Es importante señalar que los enlaces de hidrógeno suelen contribuir con una estabilización energética importante generalmente en el intervalo

de 1 – 15 kcal/mol^[87b] o mayor, dependiendo de diversos factores, incluyendo las distancias interatómicas y el grado de direccionalidad de la interacción.

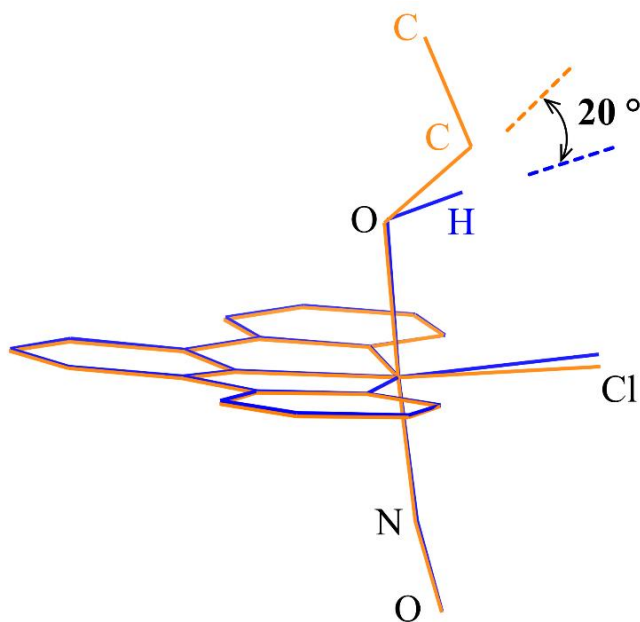


Figura 29. Superposición de las geometrías de los cationes $[52b]^+$ (azul) y $[53b]^+$ (naranja) calculadas en acetonitrilo al nivel de teoría B3PW91/6-31G*. Por claridad se omiten el sustituyente de tienilo en el ligante tridentado y algunos átomos de hidrógeno.

1.5.5. Fotoliberación de óxido nítrico

Los rendimientos cuánticos de fotoliberación del radical (Φ_{NO}) para todos los nitrosilos de rutenio se determinaron siguiendo la fotorreacción mediante espectroscopía UV-Visible. En un experimento típico, una disolución del compuesto (4×10^{-5} M, en agua o acetonitrilo) se colocó en una celda de cuarzo y se irradió empleando una lámpara LED monocromática ($\lambda_{irr} = 365, 490$ nm). Los cambios en la absorbancia de la muestra durante la irradiación se monitorearon por 10 minutos, con intervalos de 10 s entre cada lectura; la muestra fue

provista de agitación magnética y enfriamiento con agua, manteniendo una temperatura constante de 25 °C.

A partir de estas evoluciones espectrales, los valores de Φ_{NO} se determinaron a partir de la Ecuación 8,^[82] donde $\varepsilon_{Ru^{II}} \cdot [Ru^{II}]$ es la absorbancia de la muestra antes de la irradiación, I_0 es el flujo de fotones incidente (en $M^{-1} \cdot s^{-1}$), l_{irr} es la longitud del paso óptico (en cm) y F es el factor fotocinético, $F = \frac{(1-10^{-Abs})}{Abs}$, con $Abs = (\varepsilon_{Ru^{II}} \cdot [Ru^{II}] + \varepsilon_{Ru^{III}} \cdot [Ru^{III}]) \cdot l_{irr}$ (Aquí, $\varepsilon_{Ru^{II}} \cdot [Ru^{II}]$ $\varepsilon_{Ru^{III}} \cdot [Ru^{III}]$ son la absorbancia del compuesto antes de irradiar la y del fotoproducto, repectivamente, a un tiempo dado). Los valores de Φ_{NO} se obtuvieron mediante la resolución de esta ecuación diferencial, para lo que se usó el programa Sa3.3,^[106] que fue alimentado con los datos experimentales de $Abs = f(t)$, $\varepsilon_{Ru^{II}} \cdot [Ru^{II}]$, I_0 y l_{irr} .

$$\frac{d[Ru^{II}]}{dt} = -\Phi_{NO} \cdot \varepsilon_{Ru^{II}} \cdot [Ru^{II}] \cdot I_0 \cdot l_{irr} \cdot F \quad (8)$$

Dado que recientemente las investigaciones del grupo se han dirigido hacia aplicaciones biológicas,^[54b] nos interesamos en estudiar la fotoliberación en medio acuoso. Sin embargo, dado que los compuestos con dos ligantes cloruro (**42a,b** y **51a,b**) no son estables en agua, los valores de Φ_{NO} (Tabla 6) se determinaron en acetonitrilo para todos los compuestos y en agua (con 0.5 % de DMSO) sólo para **52a,b** y **53a,b** que sí resultaron estables en medio acuoso. En la Figura 30 se muestran evoluciones espectrales representativos para estos compuestos (los experimentos restantes pueden consultarse en las Figuras anexas S59 – S66); para *cis*-**42b** se observa una rápida desaparición de la banda cercana a $\lambda = 360$ nm y la aparición de una banda cerca de $\lambda = 430$ nm; de forma similar *trans*-**51b** evoluciona lentamente bajo irradiación a $\lambda = 490$ nm produciendo la desaparición de la banda cercana a

$\lambda = 480$ nm y la aparición de un hombro en $\lambda = 550$ nm y una banda adicional cercana a $\lambda = 480$ nm; la aparición de estas bandas de absorción desplazadas batocrómicamente se asocia típicamente a transferencia de carga ligante \rightarrow Ru(III) en el fotoproducto, que corresponde, como se discutió en la Sección 1.1.6, a la sustitución del ligante nitrosilo por una molécula de disolvente.

Tabla 6. Rendimientos cuánticos de foto-liberación (Φ_{NO}) determinados a partir de soluciones de los compuestos (4×10^{-5} M, 25 °C) bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm y $\lambda = 490$ nm.

	Compuesto	Disolvente	λ_{irr}, nm	Φ_{NO}	
<i>cis/trans</i> (Cl,Cl)	<i>cis-42a</i>			0.37 ^a	
	<i>trans-42a</i>			0.12 ^a	
	<i>cis-42b</i>		365	0.37	
	<i>trans-42b</i>			0.18	
	<i>cis-51a</i>	Acetonitrilo		0.16	
	<i>trans-51a</i>			0.05	
	<i>cis/trans</i> (NO,OH)	<i>cis-51b</i>		365	0.14
				490	0.005
		<i>trans-51b</i>		365	0.06
				490	0.005
<i>trans</i> (NO,OH)	52a	Acetonitrilo		0.18	
		Agua	365	0.17	
	52b	Acetonitrilo		0.17	
		Agua		0.075	
<i>trans</i> (NO,OEt)	53a	Acetonitrilo		0.38	
		Agua	365	0.09	
	53b	Acetonitrilo		0.15	
		Agua		0.10	

^a Ref. 49.

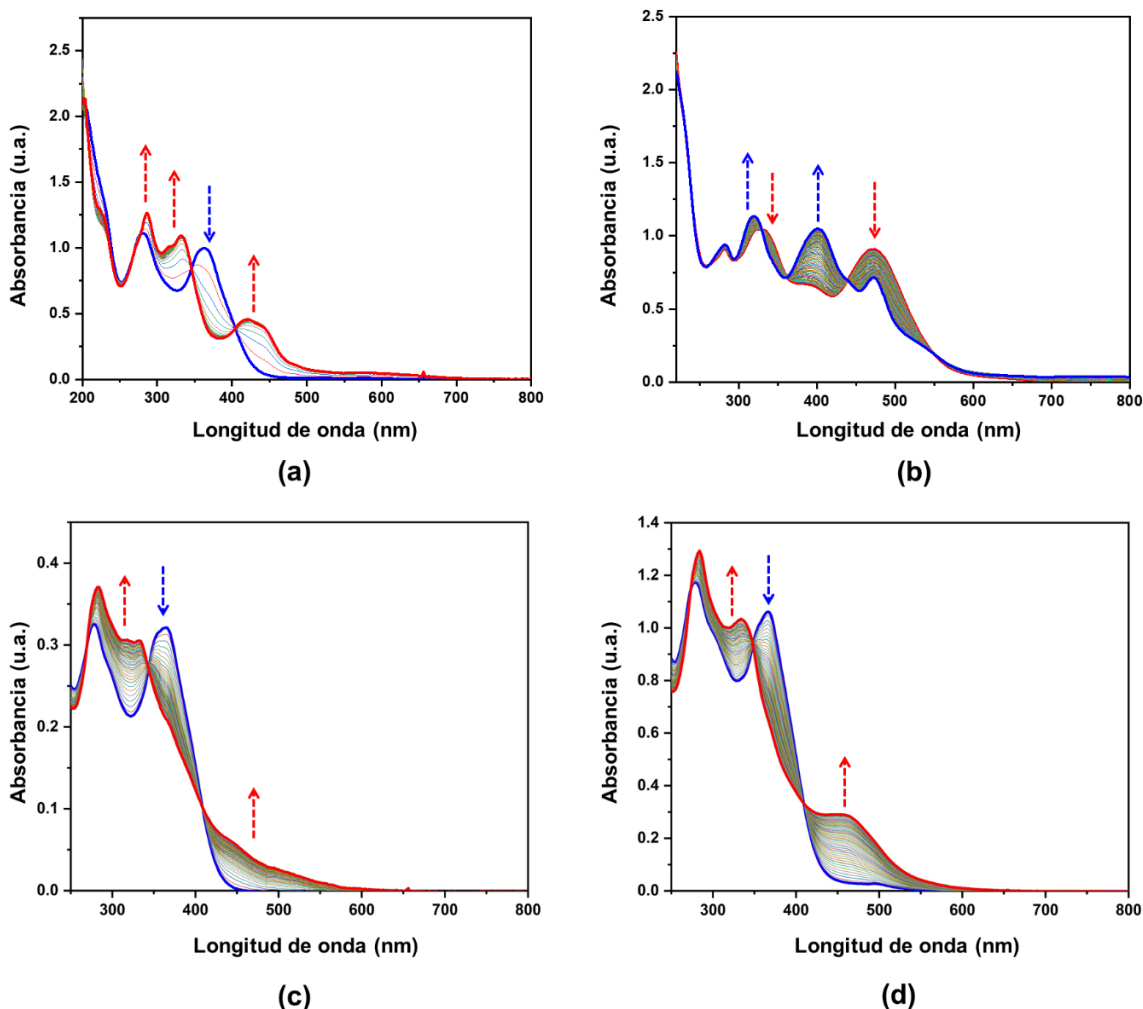


Figura 30. Evolución del espectro de absorción para (a) *cis-42b* y (b) *trans-51b* en acetonitrilo y para (c) **52b** y (d) **53b** en agua (0.5% DMSO, derecha). Con excepción de *trans-51b* con $\lambda_{irr} = 490$ nm, todos los estudios se realizaron bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

Por otra parte, las evoluciones espectrales de **52b** y **53b**, realizadas en medio acuoso, muestran la desaparición de las bandas alrededor de $\lambda = 360$ nm y la aparición de una nueva banda cerca de $\lambda = 480$ nm. Considerando la presencia de puntos isobésticos claros hasta 10 minutos de irradiación y la evidencia previa de la sustitución fotoinducida del nitrosilo por acetonitrilo^[49] así como por moléculas de agua,^[51] es razonable asumir que el fotoproducto

para **52a,b** y **53a,b** corresponde a la fórmula $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{R-tpy})(\text{Cl})(\text{OR})(\text{H}_2\text{O})]^+$, con la coordinación de una molécula de agua al centro metálico. A pesar de que no se realizaron investigaciones adicionales sobre la identidad de los fotoproductos, se emplearon diversas técnicas para corroborar que la fotorreacción corresponde efectivamente a la liberación del nitrosilo como NO^\bullet , las cuales se ilustran en la Figura 31 con los resultados para *trans*-**42b**, **52b** y **53b** como compuestos representativos de las esferas de coordinación $[\text{Ru}(\text{R-tpy})\text{Cl}_2\text{NO}]^+$, *trans*(NO,OH)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{NO})(\text{OH})\text{Cl}]^+$ y *trans*(NO,OEt)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{NO})(\text{OEt})\text{Cl}]^+$, respectivamente (detalles para experimentos adicionales se pueden encontrar en la Figura anexa S67). En el caso de *trans*-**42b**, la liberación de NO^\bullet se evidencia por el uso del test de Griess, que consiste en la observación de un colorante azo con absorción intensa en $\lambda = 548 \text{ nm}$,^[107] generado por la reacción entre iones NO_2^- generados *in situ* (como la forma oxidada del NO^\bullet) y ácido sulfanílico (Figura 31a).

Alternativamente, la liberación de NO^\bullet para **52b** fue detectada directa y cuantitativamente en agua mediante el uso de un sensor de NO^\bullet (Figura 31b), resultando en cronoamperogramas que indican concentraciones de NO^\bullet cercanas a 125 nM. Es importante recalcar que este es un resultado alentador, obtenido consistentemente para **52a,b**, **53a,b**, ya que como se discutió en la Sección 1.1.4, para que el NO^\bullet cause muerte celular por apoptosis, debe poderse liberar en concentraciones mayores a 100 nM. Finalmente, en el caso de **53b**, el uso de espectroscopía EPR permitió la observación del NO^\bullet atrapado en el compuesto de coordinación $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2]$ después de la fotoliberación inducida por irradiación con una lámpara de Hg (Figura 31c); la señal triplete resultante tiene un factor-g de 2.040 y una constante de acoplamiento hiperfino de $a_{\text{N}} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$, que se encuentran en buen acuerdo con los valores reportados en la literatura.^[108]

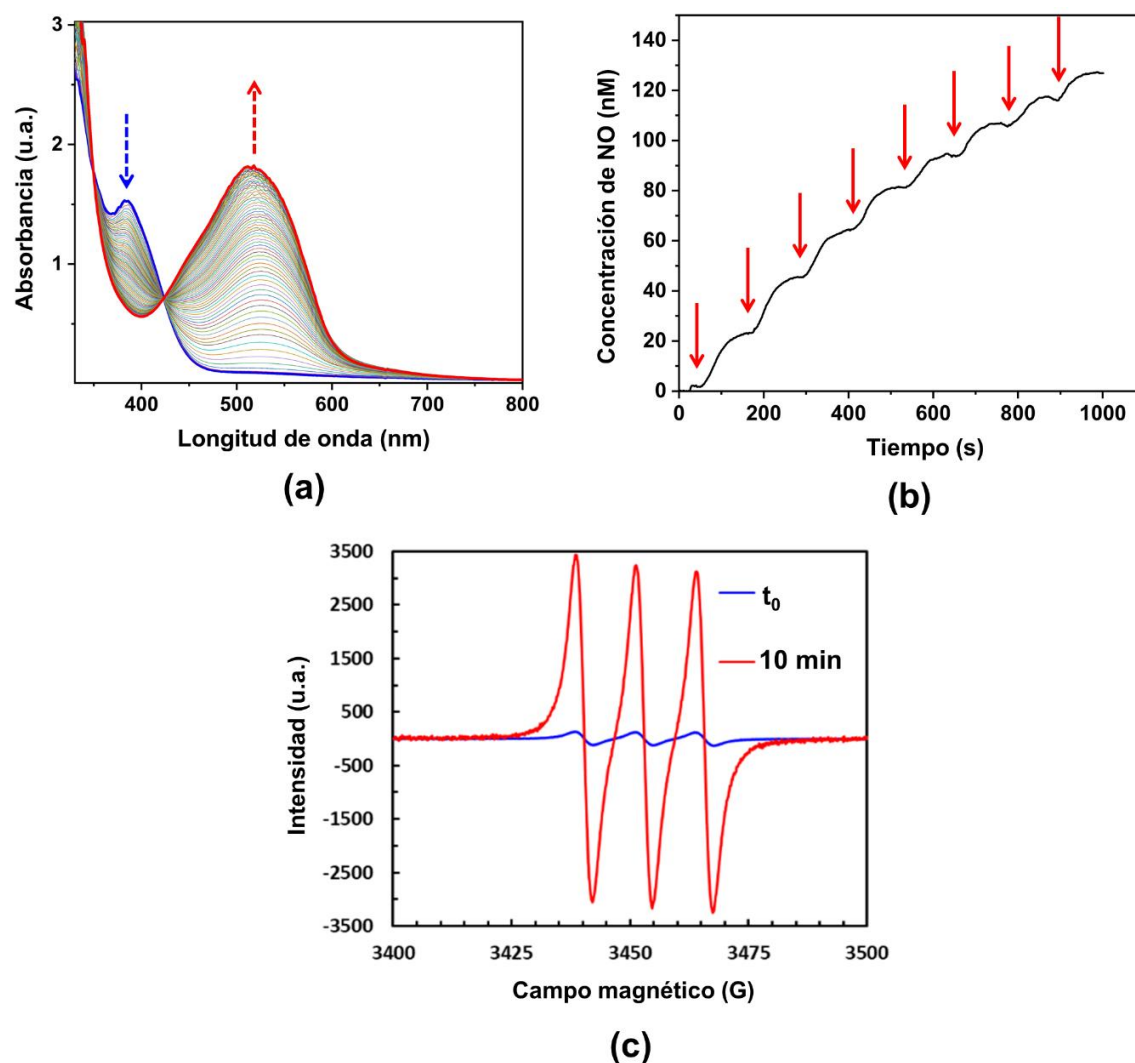


Figura 31. Experimentos representativos evidenciando la fotoliberación de NO• a temperatura ambiente (a) Evolución del espectro electrónico de *cis*-42b mostrando la formación del colorante azo en una mezcla de volúmenes iguales de la disolución del compuesto (10^{-5} M, en acetonitrilo) y del reactivo de Griess (0.04 g/mL en agua), bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm. (b) Cronoamperogramas por irradiación de 52b (400 nM en agua con 0.5 % de DMSO, 25 °C) a $\lambda = 365$ nm por periodos de 15 s (flechas rojas) cada 110 s. (c) Señal triplete de EPR por irradiación de 53b (1 mM en acetonitrilo) con una lámpara de Hg ($\lambda > 400$ nm) en presencia de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2]$, una trampa de espín selectiva a NO•.

Al analizar los valores de Φ_{NO} obtenidos (Tabla 6), resulta complicado establecer una tendencia general para las tres familias de compuestos como consecuencia de la introducción de los anillos de tienilo. En la Sección 1.4.2 se mostró evidencia experimental consistente de experimentos de RMN, IR, y DRX que muestran una transferencia de carga más eficiente para los compuestos con anillos de tienilo en el estado basal, lo cual se esperaría que produjera de una manera consistente mejores valores de Φ_{NO} , ya que la transferencia de carga hacia el centro metálico se considera un factor clave para la liberación del radical. Sin embargo, si bien esto fue así para algunos casos (por ejemplo, al comparar *trans-42a* y *trans-42b*) esta tendencia no fue general y en la mayoría de los casos el valor de Φ_{NO} , si bien notablemente elevado en muchos de los compuestos, en general permaneció invariable con respecto al reemplazo estructural fenilo→tienilo sobre el ligante tridentado. Debe señalarse que, como se discutió en la Sección 1.1.6 esta misma falta de correlación entre el grado de transferencia de carga y el valor de Φ_{NO} se ha encontrado previamente en otros estudios de nuestro grupo y puede responder a diversos factores debido al complejo mecanismo, aún en controversia, mediante el cual se libera el radical.

A pesar de estas dificultades, hay algunas observaciones valiosas con respecto a los valores de Φ_{NO} para los compuestos de coordinación estudiados. En primer lugar, es importante notar que el promedio para todos los derivados con anillos de tienilo incluidos en este trabajo tiene un valor de Φ_{NO} de 0.18 ± 0.09 bajo irradiación en acetonitrilo a $\lambda = 365$ nm, por lo que para llegar a una eficiencia real de 100 GM, estas moléculas tendrían que mostrar valores de $\sigma_{\text{TPA}} = 370 - 1100$ GM, que de acuerdo con los datos presentados en la Sección 1.1.5.1 puede probablemente ser el caso para algunos de los compuestos, particularmente para *cis-51b* y *trans-51b* que tienen sistemas π conjugados extendidos.

También es importante señalar que la evidencia experimental encontrada a través de RMN, IR, y DRX indicando consistentemente una mayor retrodonación Ru→NO para los cambios del ligante *trans* al grupo nitrosilo (Cl→OH→OEt) correlaciona satisfactoriamente al comparar los derivados *cis*-**42b**, **52b** y **53b** (Figura 32), en donde los ligantes oxigenados donan más eficientemente densidad electrónica hacia el centro metálico facilitando la retrodonación Ru→NO, fortaleciendo el enlace Ru-NO y disminuyendo consecuentemente el valor de Φ_{NO} para los derivados con ligantes oxigenados. Esto es importante porque sugiere que un posible intercambio del hidroxilo por un ligante más electroattractor que el cloruro, podría incrementar sustancialmente el valor de Φ_{NO} , haciendo necesarios valores aún menores de σ_{TPA} para alcanzar eficiencias reales más cercanas a 100 GM.

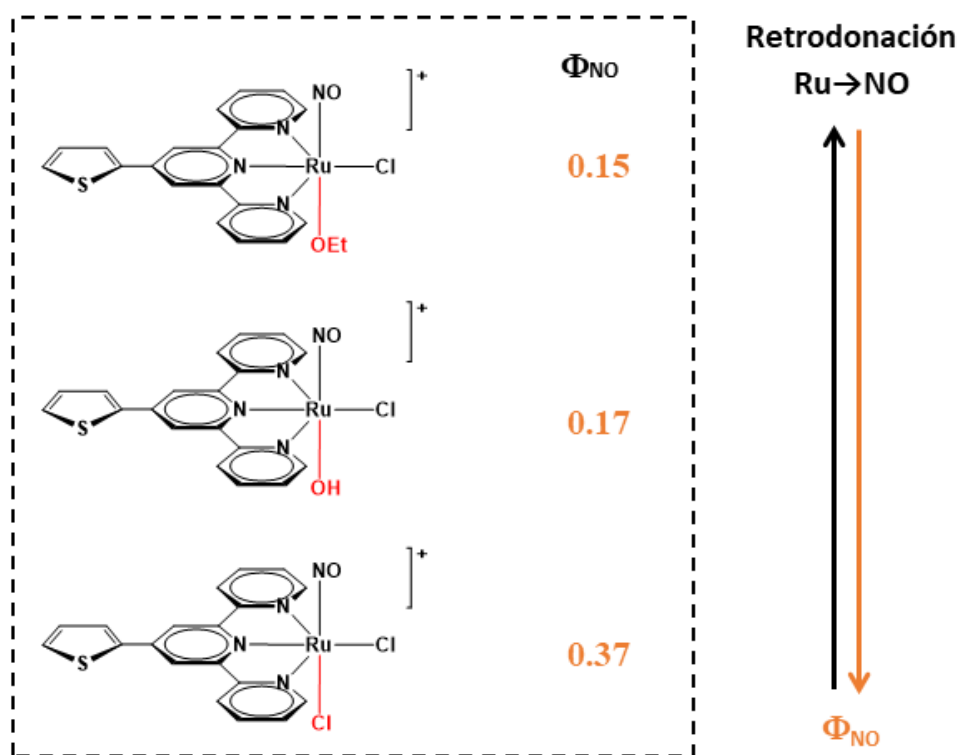
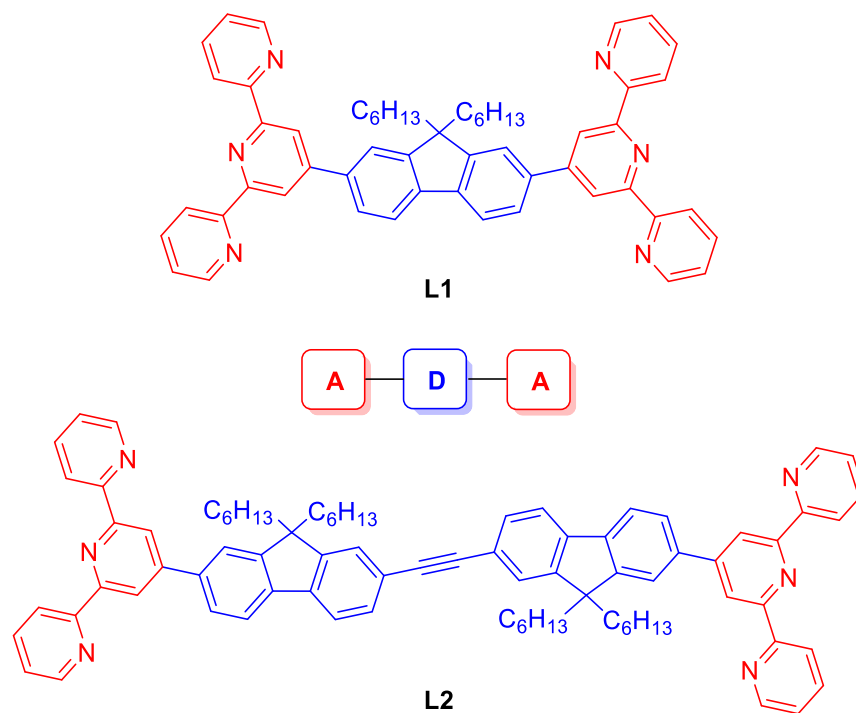


Figura 32. Comparación entre los rendimientos cuánticos para *cis*-**42b** (abajo), **52b** (en medio) y **53b** (arriba) ($\lambda = 365$ nm, acetonitrilo).

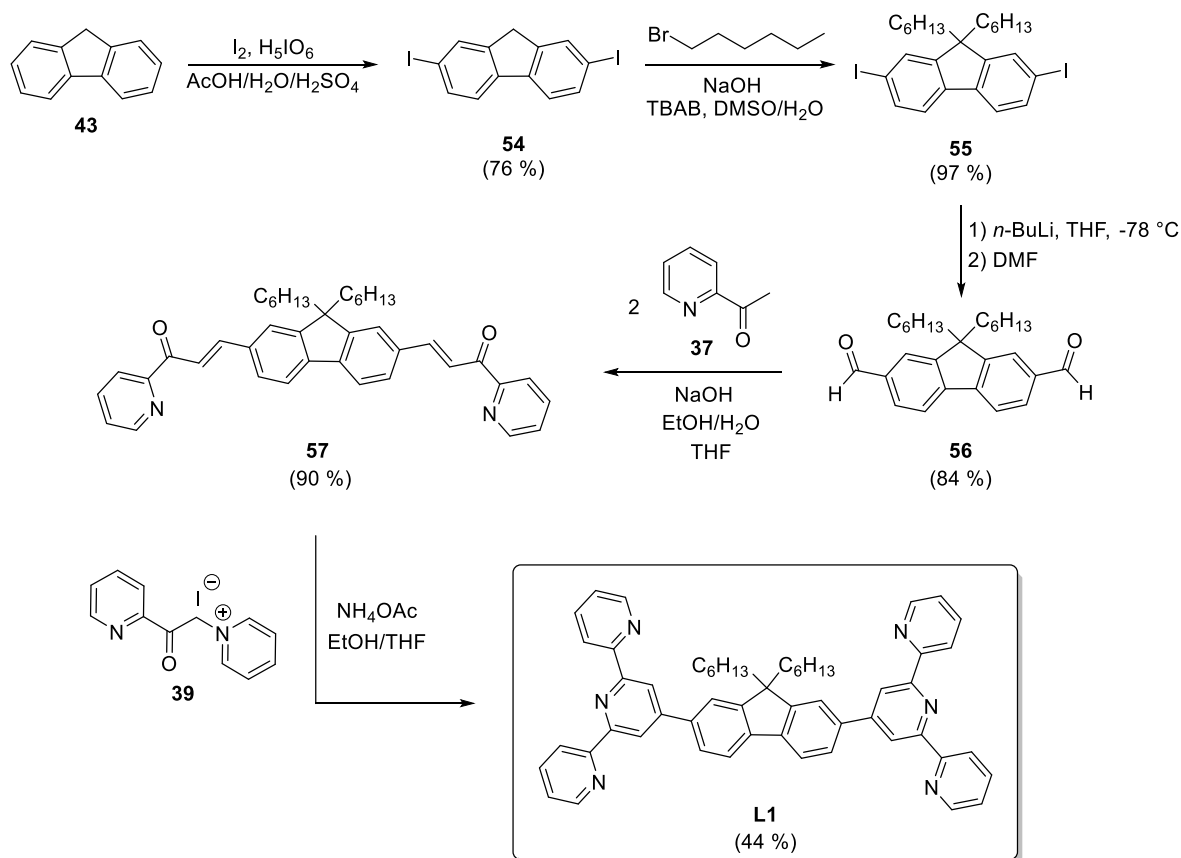
1.5.6. Otros resultados

En línea con las investigaciones realizadas sobre la influencia de la introducción de anillos de tienilo en nitrosilos de rutenio, se trabajó de manera paralela en la obtención de nitrosilos de rutenio bimetálicos. Sin embargo, dado que es un trabajo que se encuentra aún en desarrollo, aquí se presenta únicamente la síntesis de los ligantes, cuyas estructuras se muestran en el Esquema 26. La intención de desarrollar estos sistemas es incrementar los valores de σ_{TPA} , pero mediante una estrategia significativamente distinta a la planteada hasta ahora en este Capítulo, donde se ha propuesto el incremento de σ_{TPA} mediante la introducción de un anillo de tienilo en el ligante terpiridínico. Como se discutió en la Sección 1.1.5.1., los compuestos con arquitecturas multipolares generalmente muestran valores de σ_{TPA} elevados; en este caso, a partir de los ligantes **L1** y **L2** nos encontramos desarrollando nitrosilos de rutenio bimetálicos que, debido a sus arquitecturas cuadrupolares (Aceptor-Donador-Aceptor) y sus extendidos sistemas π -conjugados, es posible que muestren valores de σ_{TPA} elevados y por lo tanto liberen NO \cdot eficientemente vía absorción de dos fotones.



Esquema 26. Estructura de los ligantes cuadrupolares **L1** y **L2**.

Para la síntesis del ligante **L1** se empleó la ruta mostrada en el Esquema 27, en un primer paso se realizó la yodación del 9*H*-fluoreno (**43**) que produjo eficientemente el derivado diyodado **54**,^[109] el cual fue alquilado empleando *n*-bromohexano para dar el compuesto **55** con un rendimiento elevado;^[92] la introducción de dos grupos formilo para fue posible empleando una reacción de formilación empleando *n*-BuLi como base y DMF como electrófilo para dar **56** en un rendimiento alto;^[110] posteriormente, se realizó una doble condensación aldólica con 2-acetilpiridina (**37**) rindiendo la bis-chalcona **57** con rendimientos satisfactorios. Finalmente, empleando la síntesis de piridinas de Kröhnke fue posible obtener el ligante deseado **L1** mediante el tratamiento de **57** con la sal de piridinio **39**, para dar lugar al compuesto deseado con un rendimiento moderado.

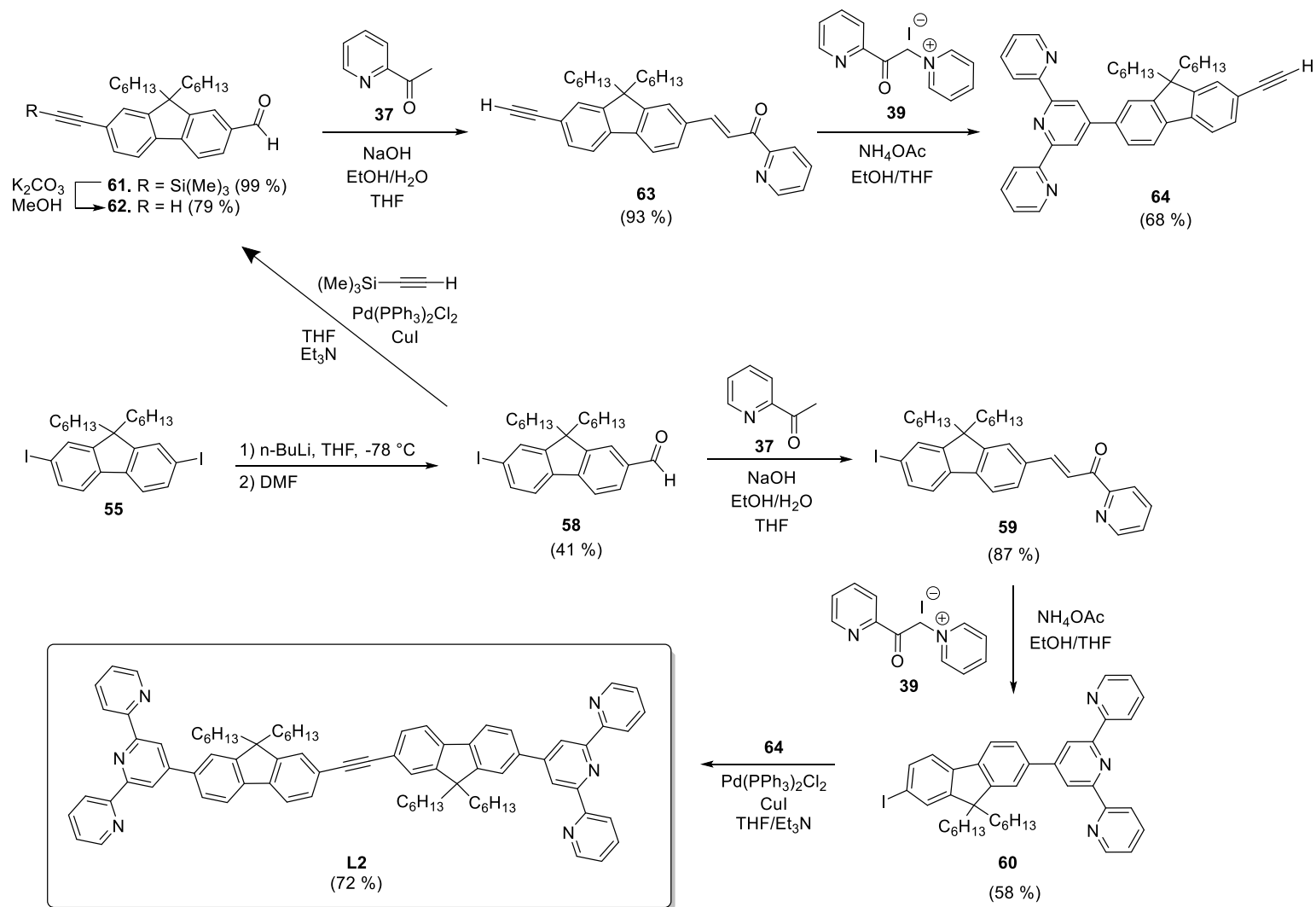


Esquema 27. Ruta de síntesis para el ligante **L1**.

Para la preparación del ligante **L2** se empleó la ruta mostrada en el Esquema 28, que involucró la preparación por separado de las terpiridinas **60** y **64**. Para la preparación se comenzó con la monoformilación de **55**, que rindió el aldehído **58** en un rendimiento moderado, éste se sometió a los pasos de condensación aldólica y síntesis de piridinas de Kröhnke previamente mencionados para dar la terpiridina **60** en rendimientos moderados. Por otra parte, **55** se sometió a un acoplamiento de Sonogashira con etiniltrimetilsilano para dar el aldehído sililado **61** en rendimientos elevados,^[111] el cual se desprotegió en condiciones básicas para rendir el aldehído acetilénico correspondiente (**62**).^[111] A partir de este aldehído se siguieron de igual forma los pasos de condensación aldólica y síntesis de piridina de Kröhnke, con lo que se obtuvo satisfactoriamente la terpiridina **64**. Finalmente, empleando

un acoplamiento de Sonogashira entre las terpiridinas **60** y **64** se obtuvo el ligante deseado (**L2**) con un rendimiento elevado. Es importante señalar que esta ruta de síntesis mostró rendimientos considerablemente mayores a los obtenidos usando derivados bromados en vez de yodados, con los cuales se encontraron eficiencias muy bajas para los pasos de acoplamiento cruzado de Sonogashira.

La identidad de los productos fue corroborada satisfactoriamente empleando RMN-¹H y RMN-¹³C, así como espectrometría de masas en algunos casos. Para los intermediarios sintéticos **54–56** y **58-61**, previamente informados, se encontró una buena concordancia entre los resultados obtenidos y los reportados en la literatura para estos compuestos.

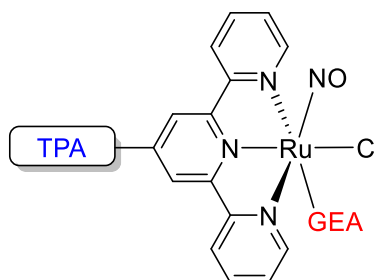


Esquema 28. Ruta de síntesis para el ligante **L2**

1.6. CONCLUSIONES

- La introducción de anillos de tienilo en los nitrosilos de rutenio estudiados tuvo una influencia profunda en sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas. En todos los casos, sin importar si el compuesto poseía una arquitectura donador-aceptor (D-A) o donador- π -aceptor (D- π -A), el anillo de tienilo mostró una participación decisiva en la transferencia de carga hacia el fragmento Ru-NO, que se encontró significativamente mejorada para los sistemas D-A (tienilo-tpy-RuNO), manifestándose en todos los casos como un desplazamiento batocrómico de $\lambda = 30 - 60$ nm, que contribuyó a que los compuestos con arquitecturas D- π -A (fluorenilo-tienilo-tpy-RuNO) mostraran una absorción intensa de luz visible, una característica muy atractiva para posibles aplicaciones en quimioterapia fotoactivada (PACT), ya que evita el uso de luz ultravioleta, potencialmente dañina, para producir la liberación del NO \cdot . Este desplazamiento batocrómico permitió demostrar satisfactoriamente la liberación del radical para *cis*-**51b** y *trans*-**51b** empleando luz visible ($\lambda = 490$ nm).
- Las soluciones acuosas de nitrosilos de rutenio con fórmulas *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆) evolucionan para dar una única especie, que resulta del intercambio de ligante Cl \rightarrow OH, dando lugar a compuestos con la fórmula *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆). Una liberación eficiente de NO \cdot de estas especies fue demostrada en medio acuoso empleando diversas técnicas, que incluyó el uso de un sensor selectivo a NO \cdot , que indicó la producción de NO \cdot en medio acuoso en concentraciones superiores a 100 nM, un requisito indispensable para inducir los procesos de muerte celular que permiten, en principio, tratar el cáncer con este tipo de compuestos de coordinación.

- Se desarrolló un protocolo sintético adecuado para la preparación de los nitrosilos de rutenio de fórmula general *trans*(NO,OH)-[Ru(R-tpy)(Cl)(OH)(NO)](PF₆). La metodología permitió la obtención de cantidades relativamente grandes (300 – 500 mg) de estos compuestos sin necesitarse los procesos tediosos y costosos de purificación para la química de las especies *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(R-tpy)(NO)](PF₆). Se encontró además que el ligante -OH puede reemplazarse con relativa facilidad por un grupo -OEt al tratarse con etanol con calentamiento moderado. La labilidad del grupo -OH, desconocida hasta este trabajo, podría permitir la obtención en un futuro de derivados interesantes empleando otros nucleófilos.
- En conjunto, los resultados del estudio de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las series de nitrosilos de rutenio con los intercambios de ligante Cl→OH→OEt, sugieren una transferencia de carga ligante→metal incrementando en el mismo sentido, lo que produce una mejor retrodonación Ru→NO. Esto resulta, sin embargo, en un fortalecimiento del enlace Ru-NO y una disminución de Φ_{NO} . Estos resultados muestran que para maximizar Φ_{NO} es más favorable la presencia de grupos electroattractores (GEA) en posición *trans* al nitrosilo, lo que, acompañado a un diseño del ligante tridentado que incremente σ_{TPA} , podría proveer sistemas con eficiencias elevadas en términos de $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$.



1.7. PARTE EXPERIMENTAL

1.7.1. Consideraciones generales

Todos los materiales de partida fueron obtenidos de casas comerciales y usados como fueron recibidos; los disolventes empleados fueron de grado analítico. A menos de que se indique lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones atmosféricas y de iluminación convencionales. Las purificaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre SiO₂; después de la elución con un sistema de disolventes adecuado, los productos se aislaron por evaporación a sequedad de la fracción principal a presión reducida. Los espectros de RMN-¹H se registraron en equipos Bruker Avance 400 y Jeol ECA 500 a 298 K usando disolventes deuterados; los desplazamientos químicos para ¹H y ¹³C son relativos a la señal residual no deuterada, fijada en $\delta = 7.26$ ppm (CDCl₃), $\delta = 1.940$ (CD₃CN), $\delta = 2.50$ ppm (DMSO-*d*₆) para RMN-¹H y $\delta = 77.00$ ppm (CDCl₃), $\delta = 1.320$ (CD₃CN) para RMN-¹³C. Los valores de las constantes de acoplamiento (*J*) están expresadas en Hertz. Los espectros de infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR (ATR). Los espectros de UV-Visible fueron obtenidos en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8454A. Los datos de espectrometría de masas de baja (EM) y alta resolución (EMAR) fueron adquiridos equipos Thermo Scientific LCQ Fleet y Agilent G1969A, respectivamente. Los análisis elementales fueron obtenidos usando un instrumento Perkin Elmer 2400 Series II.

1.7.2. Síntesis orgánica

(*E*)-3-fenil-1-(piridin-2-il)prop-2-en-1-ona (38a).^[87a] A una suspensión de benzaldehído (1.0612 g, 10 mmol) y 2-acetilpiridina (**37**) (1.2114 g, 10 mmol) en metanol (15 mL) se le agregó gota a gota NaOH_(ac) (10 mL, 1 M) a 0 °C bajo agitación magnética. La mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas; el sólido formado se colectó, se lavó con agua y metanol fríos y se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla hexano/acetato de etilo 7/3 como sistema de elución para rendir 1.9247 g (9.2 mmol, 92 %) de **38a** como un sólido amarillo claro. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.75 (m, 1H, H-8), 8.31 (dd, $J = 16.0, 0.5$ Hz, 1H, H-3), 8.20 (dd, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 1H, H-5), 7.96 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-2), 7.87 (dt, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1H, H-7), 7.76 - 7.71 (m, 2H, H-2'), 7.55 - 7.48 (m, 1H, H-6), 7.44 - 7.35 (m, 3H, H-3'/H-4').

(E)-1-(piridin-2-il)-3-(tien-2-il)prop-2-en-1-ona (38b).^[87b] Sintetizado de manera análoga a lo descrito arriba para **38a**, a partir de 2-tienilcarboxaldehído (**36b**). El producto se obtuvo en 83 % de rendimiento como un sólido amarillo cristalino. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.74 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.9$ Hz, 1H, H-8), 8.17 (dt, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 1H, H-5), 8.06 (s, 2H, H-2/H-3), 7.86 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H, H-7), 7.47 (ddd, $J = 7.6, 4.8, 1.3$ Hz, 1H, H-6), 7.44 - 7.42 (m, 1H, H-5'), 7.41 (dd, $J = 3.7, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.09 (dd, $J = 5.0, 3.7$ Hz, 1H, H-4').

Yoduro de 1-(2-oxo-2-(piridin-2-il)etil)piridinio (39).^[88] A una disolución de yodo (6.0 g, 23.8 mmol) en piridina (35 mL) se le agregó 2-acetilpiridina (**37**) (2.7 g, 23.8 mmol) y la mezcla se agitó bajo atmósfera y a temperatura de reflujo durante 2 horas. El sólido café obtenido fue colectado, lavado con cloruro de metileno (2x50 mL), co-evaporado con tolueno (3x20 mL) para remover la piridina residual y secado al vacío para rendir 5.85 g (17.9 mmol, 75 %) de un sólido gris cristalino. **RMN-¹H** δ (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9.03 (dd, $J = 6.6, 1.3$ Hz, 2H, H-1), 8.88 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 1.1$ Hz, 1H, H-10), 8.74 (tt, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H, H-3), 8.31 - 8.27 (m, 2H, H-2), 8.14 (td, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, H-8), 8.07 (dt, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, H-7), 7.84 (ddd, $J = 7.6, 4.8, 1.3$ Hz, 1H, H-9), 6.52 (s, 2H, H-4).

4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina (40a).^[89] A una mezcla de **38a** (1.0463 g, 5 mmol), **39** (1.6307 g, 5 mmol) y NH₄OAc (5.0104 g, 65 mmol) se le agregó etanol (20 mL) y la reacción se calentó a reflujo durante 12 horas. El sólido verde resultante se colectó, lavó con agua y metanol fríos y se recristalizó de etanol para rendir 1.0828 g (3.5 mmol, 70 %) de **40a** como un sólido blanco cristalino. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.75 (s, 2H, H-7), 8.73 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.8$ Hz, 2H, H-1), 8.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-4), 7.93-7.90 (m, 2H, H-2'), 7.87 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H, H-3), 7.51 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-3'), 7.45 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-4') 7.34 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.1$ Hz, 2H, H-2).

4'-tien-2-il-2,2':6',2''-terpiridina (40b).^[89] Sintetizada de manera análoga a lo descrito arriba para **40a**, a partir de **38b**. El producto se obtuvo en 53 % de rendimiento como un sólido gris claro. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.74 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.8$ Hz, 2H, H-1), 8.69 (s, 2H, H-7), 8.64 (dt, $J = 7.8, 0.9$ Hz, 2H, H-4), 7.86 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H, H-3), 7.77 (dd, $J = 3.7, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.44 (dd, $J = 5.0, 1.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.35 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.1$ Hz, 2H, H-2), 7.17 (dd, $J = 5.0, 3.7$ Hz, 1H, H-4').

2-bromo-9H-fluoreno (44).^[91] A una disolución de 9H-fluoreno (5 g, 30.1 mmol) en acetona (100 mL) se agregó N-bromosuccinimida (5.3537 g, 30.1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 3 horas, tras lo cual se vertió sobre agua/hielo (150 mL), se extrajo con diclorometano (3 x 75 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 a gradiente para rendir 6.4957 g (26.5 mmol, 88 %) de **44** como un sólido blanco. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.74 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.65 (s, 1H, H-1), 7.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.52 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-3), 7.47 (m, 1H, H-5), 7.36 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-6), 7.31 (m, 1H, H-7), 3.86 (s, 2H, H-9).

2-bromo-9,9-dihexil-fluoreno (45).^[92] A una disolución de **44** (11.4512 g, 46.73 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (0.8088 g, 2.51 mmol) en dimetilsulfóxido (135 mL) se añadió NaOH_(ac) (17.2 mL, 50 %) y se dejó agitar hasta que la disolución se tornó verde, tras lo cual se añadió 1-bromohexano (19.7 mL, 140 mmol) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de argón durante la noche, tras lo cual se vertió en agua/hielo (100 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL), se lavó con agua (3 x 125 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna usando pentano como eluyente para rendir 18.8115 g (45.5 mmol, 97 %) de **45** como un aceite amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.65 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, H-1), 7.55 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-4), 7.46 - 7.40 (m, 2H, H-8, H-3), 7.34 - 7.29 (m, 3H, H-5/H-6/H-7), 1.93 - 1.85 (m, 4H, CH₂), 1.20 - 0.99 (m, 12H, CH₂), 0.79 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, CH₃), 0.63-0.53 (m, 4H, CH₂).

Ácido (9,9-dihexil-fluoren-2-il)borónico (46).^[93] A una disolución de **45** (5 g, 12.1 mmol) en THF (60 mL) a -78 °C se agregó *n*-BuLi (9.8 mL, 1.6 M) gota a gota; la mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos a la misma temperatura, tras lo cual se agregó trimetilborato (4.0 mL, 36.3 mmol) gota a gota y la reacción se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al verterla sobre agua/hielo (100 mL), se acidificó con HCl hasta pH = 3, se extrajo con éter etílico (3 x 75 mL), se lavó con agua (3 x 75 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla pentano/acetato de etilo 6/4 a gradiente para rendir 4.0746 g (10.8 mmol, 89 %) de **45** como un sólido blanco. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.37 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-4), 8.29 (s, 1H, H-1), 7.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-3), 7.86 - 7.82 (m, 1H, H-8), 7.52 - 7.40 (m, 3H, H-5/H-6/H-7), 2.30 - 2.00 (m, 4H, CH₂), 1.24 - 1.04 (m, 12H, CH₂), 0.86-0.64 (m, 10H, CH₃/CH₂).

4'-(4-bromofenil)-2,2':6',2''-terpiridina (48a).^[94a] A una disolución de 4-bromobenzaldehído (**47a**) (2.5 g, 13.5 mmol) en etanol (40 mL) se agregó una disolución de 2-acetilpiridina (**37**) (3.0 mL, 27.0 mmol) y KOH (1.5149 g, 27.0 mmol) en etanol (22 mL) previamente agitada 30 minutos a temperatura ambiente. Después de agitarse durante 15 minutos más, se agregó NH₄OH_(ac) (25 %, 27 mL) y la mezcla se calentó a reflujo durante 12 horas. El sólido resultante se colectó, lavó con agua y metanol fríos y se purificó por recristalización de etanol para rendir 3.2498 g (0.83 mmol, 62 %) de **48a** como un sólido blanco. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.72 (ddd, *J* = 4.8, 1.8, 1.0 Hz, 2H, H-1), 8.69 (s, 2H, H-7), 8.66 (dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 2H, H-4), 7.88 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 2H, H-3), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2'), 7.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3'), 7.35 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.0 Hz, 2H, H-2).

4'-(5-bromotien-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina (48b).^[94b] Sintetizada de manera análoga a lo descrito arriba para **48a**, a partir de 5-bromotienil-2-carboxaldehído (**47b**). El producto se obtuvo en 35 % de rendimiento como un sólido blanco. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.72 (ddd, *J* = 4.8, 1.8, 1.0 Hz, 2H, H-1), 8.62 (dt, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 2H, H-4), 8.59 (s, 2H, H-7), 7.87 (td, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 2H, H-3), 7.52 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-3'), 7.35 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.0 Hz, 2H, H-2), 7.12 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-4').

4'-(4-(9,9-dihexil-fluoren-2-il)fenil)-2,2':6',2''-terpiridina (49a). A un matraz de bola que contenía **46** (0.4214 g, 1.1 mmol), **48a** (0.3938 g, 1.0 mmol), K₂CO₃ (0.2169 g, 1.2 mmol) y Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.0375 g, 0.053 mmol) se agregó una mezcla tolueno/metanol 1/1 (8 mL) y se dejó la reacción a reflujo durante 12 horas bajo atmósfera de nitrógeno. El producto formado se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla diclorometano/acetato de etilo 95/5 a gradiente para rendir 0.4679 g (0.729 mmol, 72 %) de **49a** como un sólido microcristalino blanco. **RMN-¹H** δ (500 MHz, CDCl₃): 8.82

(s, 2H, H-7), 8.76 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.8$ Hz, 2H, H-1), 8.70 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-4), 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2'), 7.90 (td, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 2H, H-3), 7.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3'), 7.79 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7'), 7.76 – 7.74 (m, 1H, H-10'), 7.66 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, H-6'), 7.64 – 7.62 (m, 1H, H-17'), 7.39 – 7.31 (m, 5H, H-2/H-11'/H-12'/H-13'), 2.04 (dt, $J = 11.1, 5.7$ Hz, 4H, CH₂), 1.15 – 1.04 (m, 12H, CH₂), 0.77 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃), 0.76 – 0.61 (m, 4H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (125 MHz, CDCl₃): 156.30 (C-5), 155.99 (C-6), 151.51 (C-16'), 151.04 (C-14'), 149.81 (C-8), 149.16 (C-1), 142.36 (C-4'), 140.80 (C-5'), 140.65 (C-9'), 139.15 (C-8'), 137.04 (C-1'), 136.89 (C-3), 127.71 (C-2'), 127.62 (C-3'), 127.11 (C-11'), 126.79 (C-12'), 125.97 (C-6'), 123.84 (C-2), 122.90 (C-13'), 121.40 (C-4/C17'), 119.99 (C-7'), 119.80 (C-10'), 118.66 (C-7), 55.18 (C-15'), 40.38 (CH₂), 31.46 (CH₂), 29.68 (CH₂), 23.74 (CH₂), 22.56 (CH₂), 14.00 (CH₃). **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₄₆H₄₈N₃ [M⁺+H]⁺: 642.3843. Encontrado: 642.3842. Error: -0.16 ppm.

4'-(5-(9,9-dihexil-fluoren-2-il)tien-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina (49b). Sintetizada de manera análoga a lo descrito arriba para **49a**, a partir de **48b**. El producto se obtuvo en 85 % de rendimiento como un líquido amarillo viscoso. **RMN-¹H** δ (500 MHz, CDCl₃): 8.78 – 8.75 (m, 2H, H-1), 8.73 (s, 2H, H-7), 8.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-4), 7.88 (td, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 2H, H-3), 7.80 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-3'), 7.74 – 7.66 (m, 3H, H-11'/H-8'/H-7'), 7.66 – 7.63 (m, 1H, H-18'), 7.45 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4'), 7.39 – 7.30 (m, 5H, H-2/H-12'/H-13'/H-14'), 2.05 – 1.99 (m, 4H, CH₂), 1.16 – 1.02 (m, 12H, CH₂), 0.77 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH₃), 0.73 – 0.61 (m, 2H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (125 MHz, CDCl₃): 156.03 (C-5/C-6), 151.61 (C-17'), 150.95 (C-15'), 149.13 (C-1), 146.85 (C-8), 143.28 (C-5'), 141.26 (C-10'), 140.48 (C-9'), 140.31 (C-2'), 136.86 (C-3), 132.61 (C-6'), 127.25 (C-7'), 126.82 (C-3'), 124.66 (C-12'), 123.92 (C-2/C-4'), 123.90 (C-13), 122.86 (C-14'), 121.33 (C-4), 120.12 (C-11'), 120.04 (C-

8'), 119.78 (C-18'), 116.57 (C-7), 55.18 (C-16'), 40.42 (CH₂), 31.46 (CH₂), 29.68 (CH₂), 23.72 (CH₂), 22.56 (CH₂), 13.98 (CH₃). **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₄₄H₄₅N₃S [M⁺+H]⁺: 648.3407. Encontrado: 648.3408. Error: 0.15 ppm.

2,7-diiodo-9H-fluoreno (54).^[109] En un matraz de fondo redondo de 500 mL se suspendió 9H-fluoreno (**43**) (10 g, 60.16 mmol) en agua (33 mL) y se agregaron ácido acético (160 mL) y ácido sulfúrico (5 mL). La reacción se calentó hasta 95 °C, con lo que se obtuvo una mezcla homogénea, después se enfrió a 80 °C y se agregaron H₅IO₆ (5 g, 22 mmol) y I₂ (10.1 g, 39.8 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas y se detuvo al enfriar en baño de agua/hielo. El sólido obtenido se colectó, se lavó con Na₂CO_{3(sat)} y agua abundante y se secó a vacío, con lo que se obtuvieron 19.1 g (45.72 mmol, 76 %) de **54** como un sólido beige. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.87 (s, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H).

9,9-dihexil-2,7-diiodo-fluoreno (55).^[92] En un matraz Schlenk se agregaron **54** (19.5 g, 46.73 mmol), TBAB (0.8 g, 2.51 mmol) y DMSO (70 mL), seguido por la adición de NaOH_(ac) (50 %, 17.2 mL) bajo atmósfera de argón. Después de que la disolución se tornó verde, se agregó 1-bromohexano y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo al vertirse en agua/hielo (200 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL), se secó con Na₂SO_{4(anh)} y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando pentano como eluyente para rendir 26.7 g (45.5 mmol, 97 %) de **55** como un sólido amarillo claro. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.67 – 7.63 (m, 4H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 1.93 – 1.85 (m, 4H), 1.17 – 1.01 (m, 12H), 0.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 0.64 – 0.51 (m, 4H).

9,9-dihexil-fluoreno-2,7-dicarbaldéido (56).^[110] Una disolución de **55** (5 g, 8.5 mmol) en THF (60 mL) se enfrió a -78 °C, seguido por la adición lenta de *n*-BuLi (1.6 M, 10.6 mL, 17 mmol) bajo atmósfera de argón. Después de agitarse durante 1 hora a esta temperatura, se agregó DMF seca (1.3 mL, 17 mmol) y la reacción se mantuvo a -78 °C durante 1 h, seguido por agitación a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo por la adición de HCl (1 M, 100 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL), se secó con Na₂SO_{4(anh)} y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando una mezcla pentano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 2.8 g (7.14 mmol, 84 %) de **56** como un aceite amarillo viscoso. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 10.03 (s, 2H), 7.90 – 7.81 (m, 6H), 2.07 – 1.97 (m, 4H), 1.03 – 0.84 (m, 12H), 0.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 0.56 – 0.44 (m, 4H).

(2*E*,2'*E*)-3,3'-(9,9-dihexil-fluoreno-2,7-diil)bis(1-(piridin-2-il)prop-2-en-1-ona) (57). En un matraz de fondo redondo de 250 mL, se suspendieron **56** (1.7 g, 4.83 mmol) y 2-acetilpiridina (**37**) (1.04 mL, 9.66 mmol) en etanol (80 mL) y THF (2 mL), seguido por la adición gota a gota de NaOH_(ac) (12.5 mL, 1 M) y agitación a temperatura ambiente durante la noche. El sólido formado se colectó, lavó con agua y recristalizó de etanol para rendir 2.3 g (3.82 mmol, 90 %) de **57** como un sólido amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.79 (ddd, *J* = 4.8, 1.8, 1.0 Hz, 2H), 8.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.22 (dt, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 7.90 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 2H), 7.78 – 7.70 (m, 6H), 7.52 (ddd, *J* = 7.8, 4.8, 1.5 Hz, 2H), 2.10 – 2.02 (m, 4H), 1.13 – 0.99 (m, 12H), 0.75 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 0.65 – 0.56 (m, 4H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 189.42, 154.45, 152.11, 148.83, 145.49, 143.05, 137.10, 134.77, 128.75, 126.87, 123.02, 122.98, 120.59, 120.19, 55.33, 40.37, 31.49,

29.61, 23.75, 22.54, 13.96. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₄₁H₄₅N₂O₂ [M⁺+H]⁺: 597.3481. Encontrado: 597.3474. Error: -1.2 ppm.

4',4''-(9,9-dihexil-fluoreno-2,7-diil)bis-2,2':6',2''-terpiridina (L1). En un matraz de fondo redondo de 250 mL se suspendieron **57** (1.1 g, 1.84 mmol), **39** (1.4 g, 4.29 mmol) y NH₄OAc (4.1 g, 53 mmol) en etanol (52 mL) y THF (2.5 mL). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 9 horas y se dejó en calentamiento moderado durante la noche. El sólido verde resultante se colectó, lavó con abundante agua y se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla pentano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 0.65 g (0.81 mmol, 44 %) de **L1** como un sólido amarillo claro. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.81 (s, 4H), 8.77 (ddd, $J = 4.8, 1.9, 1.0$ Hz, 4H), 8.69 (dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz, 4H), 7.96 – 7.85 (m, 10H), 7.36 (ddd, $J = 7.8, 4.8, 1.0$ Hz, 4H), 2.21 – 2.12 (m, 4H), 1.17 – 1.03 (m, 12H), 0.80 – 0.65 (m, 10H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 156.39, 155.95, 152.04, 150.86, 149.09, 141.53, 137.79, 136.86, 126.57, 123.77, 121.49, 121.44, 120.46, 118.99, 55.79, 40.41, 31.46, 29.58, 23.75, 22.53, 13.95.

9,9-dihexil-7-yodo-fluoreno-2-carboxaldehído (58).^[92] En un matraz Schlenk de 500 mL se disolvió **55** (20 g, 34.11 mmol) en THF seco (154 mL), seguido por la adición lenta de *n*-BuLi (1.6 M, 39.22 mmol, 24.5 mL) a -78 °C. Después de agitarse una hora a esta temperatura, se agregó DMF seca y se mantuvo la reacción a -78 °C durante una hora, seguido por agitación a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo al verterla sobre HCl (1M, 100 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL), se secó con Na₂SO_{4(anh)} y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando una mezcla pentano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 6.8 g (13.99 mmol, 41 %) de **58** como un aceite amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz,

CDCl₃): 10.05 (s, 1H), 7.87 – 7.67 (m, 5H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.01 – 1.87 (m, 4H), 1.13 – 0.97 (m, 12H), 0.74 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.63 – 0.49 (m, 4H).

(*E*)-3-(9,9-dihexil-7-yodo-fluoren-2-il)-1-(piridin-2-il)prop-2-en-1-ona (59). A un matraz que contenía **58** (3.0 g, 6.14 mmol), 2-acetilpiridina (**37**), etanol (60 mL) y THF (1 mL), se agregó gota a gota NaOH_(ac) (6.2 mL, 1 M) y la mezcla se agitó durante 7 horas a temperatura ambiente. El sólido amarillo resultante se colectó, lavó con abundante agua y recristalizó de etanol para rendir 3.2 g (5.36 mmol, 87 %) de **59** como un sólido amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.80 (dt, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.91 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.74 – 7.67 (m, 5H), 7.55 – 7.45 (m, 2H), 2.10 – 1.91 (m, 4H), 1.17 – 1.02 (m, 12H), 0.78 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.67 – 0.55 (m, 4H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 189.36, 154.39, 153.75, 150.75, 148.78, 145.43, 142.84, 139.88, 137.05, 136.03, 134.56, 132.15, 128.69, 126.83, 122.97, 122.83, 121.82, 120.14, 120.06, 93.59, 55.40, 40.19, 31.42, 29.54, 23.65, 22.51, 13.95. **EM** (ESI) *m/z*: 592.00 [M⁺+H]⁺.

4'-(9,9-dihexil-7-yodo-fluoren-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina (60). A un matraz que contenía **59** (2.8 g, 4.75 mmol), **39** (1.5 g, 4.75 mmol) y NH₄OAc (4.8 g, 62 mmol), se agregaron etanol (28 mL) y THF (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura de reflujo durante 12 horas. El sólido verde resultante se colectó, lavó con abundante agua y se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla pentano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 1.9 g (2.77 mmol, 58 %) de **60** como un sólido púrpura claro microcristalino. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.78 – 8.74 (m, 4H), 8.69 (dt, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 2H), 7.94 – 7.87 (m, 3H), 7.82 – 7.77 (m, 2H), 7.71 – 7.67 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.2 Hz, 2H), 2.14 – 1.91 (m, 4H), 1.18 – 1.02 (m, 12H), 0.77 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H),

0.63 (s, 4H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 156.39, 155.99, 153.59, 151.00, 150.80, 149.13, 141.09, 140.17, 138.08, 136.93, 135.94, 132.11, 126.65, 123.84, 121.70, 121.49, 120.26, 119.00, 93.03, 55.70, 40.27, 31.45, 29.58, 23.69, 22.56, 13.98. **EM** (ESI) m/z : 692.08 [M⁺+H]⁺.

9,9-dihexil-7-((trimetilsilil)etnil)-fluoreno-2-carboxaldehído (61).^[111] A un matraz que contenía **58** (3.0 g, 6.24 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.2 g, 0.312 mmol) y CuI (0.6 g, 3.12 mmol), se agregaron THF (100 mL), etniltrimetilsilano (4.3 mL, 31.2 mmol) y Et₃N (10 mL) gota a gota. Después de calentarse a reflujo durante 24 horas bajo atmósfera de argón, la mezcla se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla pentano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 2.8 g (6.15 mmol, 99 %) de **61** como un aceite amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 10.06 (s, 1H), 7.89 – 7.78 (m, 3H), 7.73 – 7.61 (m, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 2.05 – 1.91 (m, 4H), 1.13 – 0.97 (m, 12H), 0.76 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 0.29 (s, 9H).

7-etnil-9,9-dihexil-fluoreno-2-carboxaldehído (62).^[111] Una mezcla de **61** (2.82 g, 6.13 mmol), K₂CO₃ (1.0 g, 7.23 mmol), metanol (50 mL) y THF (1 mL) se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente; después de verter sobre agua/hielo (100 mL), la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), se secó con Na₂SO_{4(anh)} y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando una mezcla hexano/acetato de etilo 95/5 como eluyente para rendir 1.9 g (4.84 mmol) de **62** como un aceite naranja. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 10.06 (s, 2H), 7.91 – 7.79 (m, 3H), 7.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 2H), 3.19 (s, 1H), 2.00 (dt, $J = 12.2, 5.1$ Hz, 4H), 1.12 – 0.97 (m, 12H), 0.74 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 0.62 – 0.51 (m, 4H).

(E)-3-(7-etinil-9,9-dihexil-fluoren-2-il)-1-(piridin-2-il)prop-2-en-1-ona (63).

Sintetizado de manera análoga a lo descrito arriba para **59**, partiendo del aldehído **62**. El compuesto se obtuvo como un sólido amarillo claro en 93 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.77 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.87 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.75 – 7.62 (m, 4H), 7.52 – 7.46 (m, 4H), 3.17 (s, 1H), 2.09 – 1.91 (m, 4H), 1.14 – 0.98 (m, 12H), 0.75 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H), 0.67 – 0.51 (m, 4H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 189.33, 154.32, 151.65, 151.39, 148.75, 145.46, 143.00, 140.91, 137.03, 134.50, 131.24, 128.66, 126.81, 126.52, 122.95, 122.87, 121.03, 120.39, 120.07, 84.46, 77.51, 55.20, 40.23, 31.42, 29.56, 23.65, 22.49, 13.91.

4'-(7-etinil-9,9-dihexil-fluoren-2-il)-2,2':6',2''-terpiridina (64). Sintetizado de manera análoga a lo descrito arriba para **60**, partiendo de **63** como materia prima. El compuesto se obtuvo como un sólido naranja claro en 68 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 8.78 – 8.75 (m, 4H), 8.69 (dt, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 2H), 7.93 – 7.87 (m, 3H), 7.84 – 7.80 (m, 2H), 7.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 9.1, 1.3$ Hz, 2H), 7.38 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.3$ Hz, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.13 – 1.97 (m, 4H), 1.15 – 1.02 (m, 12H), 0.76 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 0.62 (p, $J = 7.9$ Hz, 4H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 156.38, 155.97, 151.64, 151.19, 150.81, 149.11, 141.30, 141.25, 138.03, 136.95, 131.23, 126.64, 126.55, 123.85, 121.53, 121.50, 120.53, 119.92, 119.04, 84.69, 77.18, 55.52, 40.34, 31.49, 29.62, 23.71, 22.57, 13.97.

Ligante L2. A un matraz de Schlenk que contenía **60** (0.40 g, 0.58 mmol), **64** (0.34 g, 0.58 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.020 g, 5 mol %) y CuI (0.11 g, 10 mol %), se agregó THF (14 mL) y Et₃N gota a gota. Después de calentarse a reflujo durante 48 horas, la reacción se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía en columna empleando una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente para rendir 0.48 g (0.42 mmol, 72 %) de **L2**.

RMN-¹H δ (400 MHz, CDCl₃): 8.80 – 8.76 (m, 8H), 8.70 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H), 7.93 – 7.81 (m, 10H), 7.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.61 (dd, $J = 9.4, 1.8$ Hz, 4H), 7.41 – 7.36 (m, 4H), 2.15 – 2.01 (m, 8H), 1.17 – 1.03 (m, 24H), 0.77 (t, $J = 7.0$ Hz, 12H), 0.66 (q, $J = 6.5, 4.9$ Hz, 8H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 156.43, 155.99, 151.91, 151.30, 150.86, 149.14, 141.50, 140.78, 137.87, 136.94, 130.75, 126.65, 125.96, 123.85, 121.99, 121.50, 120.45, 120.04, 119.03, 90.80, 55.57, 40.50, 31.56, 29.70, 23.78, 22.61, 14.00. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₈₂H₈₅N₆ [M⁺+H]⁺: 1153.6836. Encontrado: 1153.6830. Error: -0.15 ppm.

1.7.3. Síntesis de compuestos de coordinación

[**Ru(40a)Cl₃**] (**41a**).^[49] Una mezcla de **40a** (812 mg, 2.62 mmol), RuCl₃·xH₂O (0.523 g) y etanol (70 mL) fue agitada a temperatura de reflujo durante 6.5 horas. Luego, la mezcla fue concentrada a presión reducida y enfriada a 0 °C en un congelador. El precipitado rojo resultante fue colectado, lavado con etanol y éter etílico. El sólido resultante fue lavado subsecuentemente con etanol caliente (2 x 50 mL) para rendir 852 mg (1.65 mmol, 63 %) de **41a** como un sólido negro. **Análisis elemental** encontrado: C, 48.07; H, 2.73; N, 7.77. Requerido para C₂₁H₁₅Cl₃N₃Ru, 0.5 H₂O: C, 47.97; H, 3.07; N, 7.99.

[**Ru(40b)Cl₃**] (**41b**).^[112] Sintetizado de manera análoga a lo descrito arriba para **41a**, a partir del ligante **40b**. El producto se obtuvo en 76 % de rendimiento como un sólido negro. **Análisis elemental** encontrado: C, 42.72; H, 2.22, N, 7.71. Requerido para C₁₉H₁₃Cl₃N₃RuS, 0.5 H₂O: C, 42.91; H, 2.65; N, 7.90.

Preparación de la mezcla de isómeros *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(41a**)(NO)](Cl) (**42a**).**^[49] Todos los procedimientos se realizaron protegiendo los compuestos de la luz. El compuesto **41a** (822 mg, 1.59 mmol) fue disuelto en

dimetilformamida (125 mL), calentado a 85 °C y burbujeado con óxido nítrico (obtenido por la adición lenta de ácido nítrico diluido sobre cobre) durante 3 horas bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y fue concentrada a presión reducida hasta un volumen cercano a 10 mL. Después de la adición de éter etílico (100 mL) y filtración a vacío se obtuvieron 802 mg (1.47 mmol, 92 %) de un sólido naranja claro. El análisis de este sólido por medio de RMN-¹H, mostró que estaba principalmente constituido (> 98 %) de la mezcla de dos especies: los compuestos *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**42a**)(NO)](Cl) (*cis*-**42a**) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**42a**)(NO)](Cl) (*trans*-**42a**) en una proporción 7/3 (Ver Figura anexa S1). Esta mezcla fue consecuentemente usada para reacciones posteriores sin purificación por HPLC.

Preparación de la mezcla de isómeros *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(41b**)(NO)](Cl) (**42b**).** Se siguió un protocolo análogo al descrito para la síntesis de **42a**, empleando el compuesto **41b** como material de partida. El rendimiento del crudo de reacción fue de 97 %, cuyo análisis por medio de RMN-¹H mostró que estaba compuesto principalmente (> 98 %) por la mezcla de dos especies: los compuestos *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**42b**)(NO)](Cl) (*cis*-**42b**) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**42b**)(NO)](Cl) (*trans*-**42b**) en una proporción 7/3 (Ver Figura anexa S2). Se aislaron muestras analíticas de ambos isómeros como sus sales de PF₆ mediante separación por HPLC y la posterior adición de una disolución saturada de NH₄PF₆ acuoso hasta la completa precipitación de las muestras; los sólidos obtenidos fueron colectados, lavados con agua y metanol fríos y secados a vacío.

cis(Cl,Cl)-[RuCl₂(**42b**)(NO)](PF₆) (*cis*-**42b**). Sólido amarillo cristalino. RMN-¹H δ (400 MHz, CD₃CN): 9.18 (ddd, *J* = 5.5, 1.5, 0.5 Hz, 2H, H-1), 8.73 (ddd, *J* = 8.1, 1.2, 0.6 Hz, 2H, H-4), 8.69 (s, 2H, H-7), 8.48 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 2H, H-3), 8.17 (dd, *J* = 3.8, 1.1

Hz, 1H, H-3'), 7.99 – 7.91 (m, 3H, H-2, H-5'), 7.40 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1H, H-4'). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.38 (C-5), 154.79 (C-6), 154.22 (C-1), 150.07 (C-8), 143.75 (C-3), 139.18 (C-2'), 134.25 (C-5'), 132.14 (C-3'), 130.95 (C-4'), 130.51 (C-2), 127.48 (C-4), 121.66 (C-7). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1887 (vNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 34.47; H, 1.33; N, 8.70. Requerido para C₁₉H₁₃Cl₂F₆N₄OPRuS: C, 34.46; H, 1.98; N, 8.46. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS [M⁺]⁺: 516.9231. Encontrado: 516.9232. Error: 0.2 ppm. **UV-vis** λ_{\max} en nm (ϵ en M⁻¹cm⁻¹): 281 (21568), 363 (18682).

trans(Cl,Cl)-[RuCl₂(42b)(NO)](PF₆) (trans-42b). Sólido amarillo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 8.78 – 8.74 (m, 2H, H-1), 8.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-4), 8.60 (s, 2H, H-7), 8.38 (td, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 2H, H-3), 8.16 (dd, $J = 3.8, 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.95 (dd, $J = 4.7, 0.9$ Hz, 1H, H-5'), 7.87 (ddd, $J = 7.5, 5.4, 1.2$ Hz, 2H, H-2), 7.39 (dd, $J = 4.7, 3.8$ Hz, 1H, H-4'). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 154.90 (C-5), 154.10 (C-1), 153.14 (C-6), 152.95 (C-8), 142.44 (C-3), 138.05 (C-2'), 133.86 (C-5'), 131.62 (C-3'), 130.08 (C-2), 130.01 (C-4'), 126.70 (C-4), 120.41 (C-7). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1913 (vNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 34.49; H, 1.52; N, 8.69. Requerido para C₁₉H₁₃Cl₂F₆N₄OPRuS: C, 34.46; H, 1.98; N, 8.46. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS [M⁺]⁺: 516.9231. Encontrado: 516.9225. Error: -1.2 ppm. **UV-vis** λ_{\max} en nm (ϵ en M⁻¹cm⁻¹): 277 (25201), 361 (17488), 387 (20510).

[Ru(49a)Cl₃] (50a). Sintetizado de manera análoga a lo descrito para **41a**, a partir del ligante **49a**. El producto se obtuvo en 92 % de rendimiento como un sólido negro. **Análisis elemental** encontrado: C, 64.14; H, 5.85; N, 4.82. Requerido para C₄₆H₄₇Cl₃N₃Ru, H₂O: C, 63.70; H, 5.69; N, 4.84.

[Ru(49b)Cl₃] (50b). Sintetizado de manera análoga a lo descrito arriba para **41a**, a partir del ligante **49b**. El producto se obtuvo en 80 % de rendimiento como un sólido negro. **Análisis elemental** encontrado: C, 64.14; H, 5.12, N, 4.78. Requerido para C₄₄H₄₅Cl₃N₃RuS, 0.5 H₂O: C, 61.14; H, 5.36; N, 4.86.

Preparación de la mezcla de isómeros *cis*(Cl,Cl)- y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(49a)(NO)](Cl) (51a). Se siguió un protocolo análogo al descrito para la síntesis de **42a**, empleando el compuesto **50a** como material de partida. El rendimiento del crudo de reacción fue mayor a 99 %, cuyo análisis por medio de RMN-¹H mostró que estaba compuesto principalmente (> 98 %) por la mezcla de dos especies: los compuestos *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(49a)(NO)](Cl) (*cis*-**51a**) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(49a)(NO)](Cl) (*trans*-**51a**). Se aislaron muestras analíticas de ambos isómeros como sus sales de PF₆ mediante separación por HPLC y la posterior adición de una disolución saturada de NH₄PF₆ acuoso hasta la completa precipitación de las muestras; los sólidos obtenidos fueron colectados, lavados con agua y metanol fríos y secados a vacío.

***cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(49a)(NO)](PF₆) (*cis*-51a)**. Sólido naranja. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.22 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-1), 8.90 (s, 2H, H-7), 8.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 8.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2'), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'), 8.03 – 7.95 (m, 2H, H-2), 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-7'), 7.87 – 7.78 (m, 3H, H-6'/H-10'/H-17'), 7.50 – 7.44 (m, 1H, H-13'), 7.41 – 7.37 (m, 2H, H-11'/H-12'), 2.18 – 2.05 (m, 4H, CH₂) 1.15 – 0.99 (m, 12H, CH₂), 0.75 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH₃), 0.64 – 0.55 (m, 4H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.59 (C-5), 156.72 (C-6), 154.77 (C-8), 154.28 (C-1), 152.77 (C-16'), 152.07 (C-14'), 145.63 (C-4'), 143.83 (C-3), 142.68 (C-9'), 141.45 (C-8'), 139.09 (C-5'), 134.80 (C-1'), 130.52 (C-2), 129.85 (C-2'), 129.09 (C-3'), 128.63 (C-11'), 128.11 (C-

12'), 127.49 (C-4), 127.20 (C-6'), 124.10 (C-13'), 123.89 (C-7), 122.72 (C-17'), 121.26 (C-10'), 121.00 (C-7'), 40.79 (C-15'), 30.20 (CH₂), 24.67 (CH₂), 23.17 (CH₂), 14.23 (CH₃). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1882 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 56.12; H, 4.85; N, 5.33. Requerido para C₄₆H₄₇Cl₂F₆N₄OPRu: C, 55.87; H, 4.79; N, 5.67. **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₄₆H₄₇Cl₂N₄ORu [M⁺]⁺: 843.2170. Encontrado: 843.2178. Error: 0.9 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ε en M⁻¹cm⁻¹): 405 (18024), 296 (39732).

trans(Cl,Cl)-[RuCl₂(49a)(NO)](PF₆) (trans-51a). Sólido naranja. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 8.81 – 8.77 (m, 4H, H-1/H-7), 8.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4), 8.41 (td, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 2H, H-3), 8.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2'), 8.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3'), 7.92 – 7.87 (m, 3H, H-2/H-7') 7.85– 7.79 (m, 3H, H-6'/H-10'/H-17'), 7.49 – 7.45 (m, 1H, H-13'), 7.40 – 7.36 (m, 2H, H-11'/H-12'), 2.12 – 2.02 (m, 4H, CH₂), 1.13 – 1.01 (m, 12H, CH₂), 0.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 0.64 – 0.55 (m, 4H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 156.93 (C-6), 156.09 (C-5), 155.15 (C-1), 154.13 (C-8), 152.76 (C-16'), 152.08 (C-14'), 145.87 (C-4'), 143.50 (C-3), 142.71 (C-9'), 141.45 (C-8'), 139.06 (C-5'), 134.51 (C-1'), 131.08 (C-2), 129.93 (C-2'), 129.05 (C-3'), 128.64 (C-11'), 128.10 (C-12'), 127.70 (C-4), 127.22 (C-6'), 124.10 (C-13'), 123.63 (C-7), 122.76 (C-17'), 121.25 (C-10'), 121.01 (C-7'), 56.31 (C-15'), 40.78 (CH₂), 32.17 (CH₂), 30.20 (CH₂), 24.66 (CH₂), 23.17 (CH₂), 14.23 (CH₃). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1888 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 56.43; H, 5.39; N, 5.21. Requerido para C₄₆H₄₇Cl₂F₆N₄OPRu, 0.5 (C₂H₅)₂O: C, 56.20; H, 5.11; N, 5.46. **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₄₆H₄₇Cl₂N₄ORu [M⁺]⁺: 843.2170. Encontrado: 843.2194. Error: 2.8 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ε en M⁻¹cm⁻¹): 425 (18659), 303 (41090).

Preparación de la mezcla de isómeros cis(Cl,Cl)- y trans(Cl,Cl)-[RuCl₂(49b)(NO)](Cl) (51b). Se siguió un protocolo análogo al descrito arriba para la síntesis de

42a, empleando el compuesto **50b** como material de partida. El rendimiento del crudo de reacción fue de 77 %, cuyo análisis por medio de RMN-¹H mostró que estaba compuesto principalmente (> 98 %) por la mezcla de dos especies: los compuestos *cis*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**49b**)(NO)](Cl) (*cis*-**51b**) y *trans*(Cl,Cl)-[RuCl₂(**49b**)(NO)](Cl) (*trans*-**51b**) en una proporción 7/3 (Ver Figura anexa S21). Se aislaron muestras analíticas de ambos isómeros como sus sales de PF₆ mediante separación por HPLC y la posterior adición de una disolución saturada de NH₄PF₆ acuoso hasta la completa precipitación de las muestras; los sólidos obtenidos fueron colectados, lavados con agua y metanol fríos y secados a vacío.

cis(Cl,Cl)-[RuCl₂(**49b**)(NO)](PF₆) (*cis*-**51b**). Sólido rojo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.21 – 9.16 (m, 2H, H-1), 8.83 – 8.74 (m, 4H, H-4/H-7), 8.51 – 8.44 (m, 2H, H-3), 8.27 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-3'), 7.99 – 7.94 (m, 2H, H-2), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8'), 7.85 – 7.77 (m, 3H, H-7'/H-11'/H-18'), 7.75 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-4'), 7.48 – 7.45 (m, 1H, H-14'), 7.39 (dd, *J* = 5.3, 3.3 Hz, 2H, H-12'/H-13'), 2.13 – 2.06 (m, 4H, CH₂), 1.12 – 0.98 (m, 12H, CH₂), 0.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 0.61 – 0.54 (m, 4H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.44 (C-5), 154.69 (C-6), 154.23 (C-1), 153.21 (C-17'), 152.93 (C-15'), 152.04 (C-8), 149.67 (C-5'), 143.74 (C-3), 143.69 (C-10'), 141.14 (C-9'), 137.54 (C-2'), 133.91 (C-3'), 132.57 (C-6'), 130.48 (C-2), 128.97 (C-12'), 128.23 (C-4'), 127.69 (C-4), 126.97 (C-13'), 126.41 (C-14'), 124.14 (C-11'), 121.58 (C-7'), 121.47 (C-18'), 121.17 (C-8'), 121.15 (C-7), 56.34 (C-16'), 40.78 (CH₂), 32.17 (CH₂), 30.19 (CH₂), 24.63 (CH₂), 23.16 (CH₂), 14.22 (CH₃). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1891 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 52.93; H, 4.58; N, 5.39. Requerido para C₄₄H₄₅Cl₂F₆N₄OPRuS: C, 53.12; H, 4.56; N, 5.63. **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₄₄H₄₅Cl₂N₄ORuS [M⁺]⁺: 849.1735. Encontrado: 849.1741. Error: 0.7 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ε en M⁻¹cm⁻¹): 472 (27333), 330 (29349).

trans(Cl,Cl)-[RuCl₂(49b)(NO)](PF₆) (*trans*-51b). Sólido rojo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 8.76 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-1), 8.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-4), 8.43 (s, 2H, H-7), 8.26 – 8.19 (m, 2H, H-3), 8.12 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-3'), 7.84 – 7.76 (m, 5H, H-2/H-8'/H-11'/H-18'), 7.70 – 7.63 (m, 2H, H-4'/H-7'), 7.49 – 7.45 (m, 1H, H-14'), 7.40 – 7.32 (m, 2H, H-12'/H-13'), 2.14 – 2.06 (m, 4H, CH₂), 1.15 – 1.02 (m, 12H, CH₂), 0.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 0.62 (tq, *J* = 13.8, 8.0, 7.4 Hz, 4H, CH₂). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 155.76 (C-5), 155.14 (C-1), 153.97 (C-6), 153.88 (C-17'), 152.96 (C-8), 152.06 (C-15'), 149.58 (C-5'), 143.83 (C-10'), 143.23 (C-3), 141.06 (C-9'), 137.08 (C-2'), 134.33 (C-3'), 132.37 (C-6'), 131.02 (C-2), 129.00 (C-12'), 128.25 (C-13'), 127.36 (C-4), 127.04 (C-4'), 126.38 (C-7'), 124.17 (C-14'), 121.58 (C-11'), 121.44 (C-18'), 121.19 (C-8'), 120.29 (C-7), 56.34 (C-16'), 40.79 (CH₂), 32.23 (CH₂), 30.27 (CH₂), 24.73 (CH₂), 23.23 (CH₂), 14.26 (CH₃). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1896 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 52.49; H, 4.62; N, 5.45. Requerido para C₄₄H₄₅Cl₂F₆N₄OPRuS: C, 53.12; H, 4.56; N, 5.63. **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₄₄H₄₅Cl₂N₄ORuS [M⁺]⁺: 849.1735. Encontrado: 849.1740. Error: 0.6 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ε en M⁻¹cm⁻¹): 487 (29162), 337 (28382).

Procedimiento general para la síntesis de los nitrosilos de rutenio *trans*(NO,OH) en agua. Todos los procedimientos se realizaron protegiendo los compuestos de la luz. En un ensayo típico, 150 mg de la mezcla cruda de los compuestos **42a-b** fueron disueltos en agua a punto de ebullición (0.5 mg/mL) seguido por calentamiento a reflujo durante 12 horas. La disolución amarilla resultante fue concentrada a presión reducida y tratada con una disolución saturada de NH₄PF₆ en agua hasta la completa precipitación de la muestra (ca. 2 mL). El sólido amarillo-crema así obtenido fue colectado, lavado con agua y secado. En la mayoría de los ensayos en este paso el espectro de RMN-¹H mostró el consumo total de la materia

prima y la pureza del compuesto deseado por arriba del 95 %. Cuando se encontraron impurezas significativas, el producto fue purificado mediante cromatografía en capa fina preparativa usando una mezcla CH₂Cl₂/CH₃CN 1/1 como eluyente.

***trans*(NO,OH)-[Ru(40a)(NO)(OH)Cl](PF₆) (52a).** Obtenido como un sólido amarillo en 89 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.11 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-1), 8.74 (s, 2H, H-7), 8.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 8.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3), 8.07 – 8.03 (m, 2H, H-2'), 7.93 – 7.87 (m, 2H, H-2), 7.66 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, H-3', H-4'), 4.35 (br s, 1H, OH). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.31 (C-5), 156.62 (C-8), 155.04 (C-6), 153.58 (C-1), 143.38 (C-3), 136.15 (C-1'), 132.75 (C-4'), 130.70 (C-3'), 130.03 (C-2), 129.13 (C-2'), 127.03 (C-4), 123.59 (C-7). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1834 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 39.86; H, 2.18; N, 9.90. Requerido para C₂₁H₁₆ClF₆N₄O₂PRu, 0.5 CH₃CN: C, 40.13; H, 2.68; N, 9.57. **EMAR** (ESI-TOF⁺) *m/z* calculado para C₂₁H₁₆ClN₄O₂Ru [M⁺]⁺: 493.0005. Encontrado: 493.0018. Error: 2.6 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ε en M⁻¹cm⁻¹): 297 (27734), 325 (19660).

***trans*(NO,OH)-[Ru(40b)(NO)(OH)Cl](PF₆) (52b).** Obtenido como un sólido amarillo en 86 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.09 (dd, *J* = 5.4, 1.1 Hz, 2H, H-1), 8.57 (s, 2H, H-7), 8.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-4), 8.30 (td, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 2H, H-3), 8.04 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 7.88 (ddd, *J* = 7.6, 5.5, 1.3 Hz, 2H, H-2), 7.81 (dd, *J* = 5.0, 1.0 Hz, 1H, H-5'), 7.21 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H, H-4'), 4.46 (br s, 1H, OH). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.01 (C-5), 154.95 (C-6), 153.48 (C-1), 149.26 (C-8), 143.24 (C-3), 139.12 (C-2'), 133.99 (C-5'), 131.97 (C-3'), 130.83 (C-4'), 130.00 (C-2), 126.91 (C-4), 120.96 (C-7). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1857 (νNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 34.98; H, 2.21; N, 8.28. Requerido para C₁₉H₁₄ClF₆N₄O₂PRuS: C, 35.44; H, 2.19; N, 8.70. **EMAR**

(ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₁₉H₁₄ClN₄O₂RuS [M⁺]⁺: 498.9569. Encontrado: 498.9572. Error: 0.6 ppm. **UV-vis** λ_{\max} en nm (ϵ en M⁻¹cm⁻¹): 280 (27000), 358 (21103).

Procedimiento general para la síntesis de los nitrosilos de rutenio *trans*(NO,OEt).

Todos los procedimientos se realizaron protegiendo los compuestos de la luz. 100 mg de las muestras crudas de los compuestos **52a-b** fueron disueltos en 150 mL de etanol absoluto y agitados a 80 °C por tres horas. La disolución fue concentrada a presión reducida hasta un volumen cercano a 5 mL, seguido por la adición de éter etílico (100 mL). El precipitado así obtenido fue colectado, lavado con éter etílico y secado.

***trans*(NO,OEt)-[Ru(40a)(NO)(OEt)Cl](PF₆) (53a).** Obtenido como un sólido naranja claro en 93 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.16 – 9.11 (m, 2H, H-1), 8.76 (s, 2H, H-7), 8.69 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-4), 8.45 (td, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, H-3), 8.09 – 8.05 (m, 1H, 2H, H-2'), 7.93 (ddd, $J = 7.7, 5.5, 1.3$ Hz, 2H, H-2), 7.73 – 7.68 (m, 3H, H-3', H-4'), 3.84 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9), 0.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-10). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.50 (C-5), 156.71 (C-8), 155.00 (C-6), 153.57 (C-1), 143.44 (C-3), 136.47 (C-1'), 132.64 (C-4'), 130.71 (C-3'), 130.14 (C-2), 129.18 (C-2'), 126.99 (C-4), 123.80 (C-7), 66.37 (C-9), 19.80 (C-10). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1814 (vNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 41.23; H, 2.75; N, 8.62. Requerido para C₂₃H₂₀ClF₆N₄O₂PRu: C, 41.48; H, 3.03; N, 8.41. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₂₃H₂₀ClN₄O₂Ru [M⁺]⁺: 521.03210. Encontrado: 521.0338. Error: 3.26 ppm. **UV-vis** λ_{\max} en nm (ϵ en M⁻¹cm⁻¹): 297 (28077), 328 (19315).

***trans*(NO,OEt)-[Ru(40b)(NO)(OEt)Cl](PF₆) (53b).** Obtenido como un sólido naranja claro en 95 % de rendimiento. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CD₃CN): 9.16 – 9.11 (m, 2H, H-1), 8.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-4), 8.65 (s, 2H, H-7), 8.45 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, H-3), 8.15 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.95 – 7.90 (m, 3H, H-2, H-5'), 7.39 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1H, H-

4'), 3.82 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9), 0.51 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-10). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CD₃CN): 158.35 (C-5), 155.05 (C-6), 153.56 (C-1), 149.49 (C-8), 143.38 (C-3), 140.48 (C-2'), 133.81 (C-5'), 131.76 (C-3'), 130.84 (C-4'), 130.16 (C-2), 126.97 (C-4), 121.31 (C-7), 66.34 (C-9), 19.78 (C-10). **FT-IR** (ATR, cm⁻¹): 1835 (vNO). **Análisis elemental** encontrado: C, 37.33; H, 2.24; N, 8.80. Requerido para C₂₁H₁₈ClF₆N₄O₂PRuS: C, 37.54; H, 2.70; N, 8.34. **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₂₁H₁₈ClN₄O₂RuS [M⁺]⁺: 526.9882. Encontrado: 526.9887. Error: 0.9 ppm. **UV-vis** λ_{max} en nm (ϵ en M⁻¹cm⁻¹): 279 (22932), 362 (20347).

1.7.4. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Las separaciones por HPLC se realizaron en un equipo Autopurif Waters BSM 2545, equipado con una columna Xbridge C18 RP de dimensiones 150 x 19 mm con partículas de 5 μm . En un experimento típico, 250 mg de la muestra se disolvieron en dimetilsulfóxido (7 mL), se centrifugaron y filtraron a través de un filtro con 0.2 μm de tamaño de poro. La muestra fue inyectada en volúmenes de 500 μL y eluída con mezclas metanol/agua (en gradiente de 0/1 hasta 1/9) acidificadas con 0.1 % (v/v) de ácido trifluoroacético. La separación se monitoreó mediante lecturas de absorbancia en un intervalo de $\lambda = 200 - 600$ nm. Las fracciones principales fueron concentradas a presión reducida hasta un volumen cercano a 5 mL, lo que produjo la precipitación de los compuestos, los cuales fueron colectados, lavados con agua (20 mL) y metanol (20 mL) fríos y secados a vacío.

1.7.5. Métodos computacionales

Las geometrías moleculares fueron optimizadas usando el programa Gaussian 09,^[113] dentro del marco de la teoría del funcional de la densidad (DFT) al nivel de teoría B3PW91/6-31G*; el conjunto base LANL2DZ se usó para los átomos pesados de rutenio.^[114] La elección del

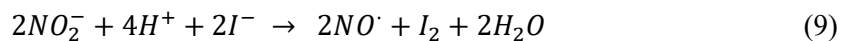
método de cálculo siguió reportes previos de nitrosilos de rutenio estructuralmente similares por el grupo de Mascharak.^[57b] Se realizaron análisis vibracionales al mismo nivel de teoría para comprobar que las geometrías correspondían a mínimos locales en las superficies de energía potencial. Los efectos del disolvente (agua, acetonitrilo) se incluyeron a través del modelo PCM.^[115] Los espectros de absorción se simularon a partir de las geometrías optimizadas al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*, se usó el funcional CAM-B3LYP para mantener consistencia con estudios previos del grupo, en los que se ha encontrado que este método provee un error menor en las energías de excitación que al usar otros funcionales.

1.7.6. Estudios de difracción de Rayos-X de monocristal

Cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal de los compuestos **38b** y **39** se obtuvieron por evaporación lenta de acetato de etilo/hexano y dimetilsulfóxido, respectivamente; para la cristalización de todos los compuestos de coordinación reportados en este trabajo se empleó la técnica de difusión lenta de vapores de éter etílico sobre soluciones concentradas de los compuestos en acetonitrilo. Los datos se colectaron en un difractómetro Bruker Kappa Apex II usando radiación MoK_α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Se realizó una corrección empírica de los datos con SADABS.^[116] Las estructuras se resolvieron empleando los programas SHELXT^[117] o SUPERFLIP^[118] y refinadas a través de SHELXL^[119] y CRYSTALS.^[120] Todos los átomos distintos de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno se asignaron a densidades electrónicas residuales; aquellos enlazados a átomos de carbono se reposicionaron geoméricamente.

1.7.7. Determinación cuantitativa de la concentración de óxido nítrico

La medición cuantitativa de la liberación de NO[•] se realizó con un detector comercial de NO[•] ami-NO 700 de Innovative Instruments Inc. La calibración del electrodo en el intervalo de 50 – 1000 nM se realizó generando NO[•] de acuerdo con la Ecuación 9.



Para la calibración, alícuotas (80 μL) de NaNO₂ acuoso (100 μM) se añadieron a 20 mL de una disolución de KI (0.03 M en H₂SO₄ 0.1 M); los cronoamperogramas se registraron a 298 K con agitación constante de la mezcla de reacción. Una vez calibrado el electrodo, se registraron cronoamperogramas tras la irradiación de 20 mL de una disolución acuosa de cada compuesto en periodos de 15 s cada 110 s para estabilizar la concentración de NO[•] entre las irradiaciones.

1.7.8. Fotoquímica

Las fotólisis se siguieron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8454A, se tomó un espectro después de cada minuto, en modo de escaneo rápido. Los espectros de UV-Vis se registraron bajo irradiación con un reactor Muller equipado con un enfriador de agua y una lámpara LED monocromática. La intensidad de la luz fue medida con un equipo Thorslab PM100D. Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo con agitación constante y a una temperatura constante de 298 K. Los rendimientos cuánticos de fotoliberación (Φ_{NO}) se determinaron a partir de las evoluciones espectrales de acuerdo con lo descrito en la Sección 1.4.5.

1.8. REFERENCIAS

- [1] H. Hönigsmann, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 16-21.
- [2] A. F. McDonagh, *J. Perinatol.* **2001**, *21*, S7-S12.
- [3] A. Downes, T. P. Blunt, *Proc. R. Soc. Lond.* **1878**, *26*, 488-500.
- [4] N. R. Finsen, *BMJ* **1895**, *2*, 1412.
- [5] N. R. Finsen, *BMJ* **1903**, *1*, 1297-1298.
- [6] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1903/summary/> Consulta: 10/03/2020
- [7] D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380-387.
- [8] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, M. R. Hamblin, *Cancers* **2011**, *3*, 2516-2539.
- [9] H. v. Tappeiner, A. Jesionek, *Munch. Med. Wochenschr* **1903**, *50*, 2042-2044.
- [10] J. Seherer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1841**, *40*, 1-64.
- [11] W. Hausmann, *Biochem. Z.* **1911**, *30*, 276-316.
- [12] F. Meyer-Betz, *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **1913**, *112*, 476-503.
- [13] C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Res.* **1979**, *39*, 146-151.
- [14] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2001**, *74*, 656-669.
- [15] M. C. Berenbaum, S. L. Akande, R. Bonnett, H. Kaur, S. Ioannou, R. D. White, U. J. Winfield, *Br. J. Cancer* **1986**, *54*, 717-725.
- [16] aS. G. Bown, C. J. Tralau, P. D. C. Smith, D. Akdemir, T. J. Wieman, *Br. J. Cancer* **1986**, *54*, 43-52; bS. Stylli, J. Hill, W. Sawyer, A. Kaye, *J. Clin. Neurosci.* **1995**, *2*, 146-151.
- [17] G. M. F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. D. Freitas, C. R. Fontana, M. Chorilli, *Molecules* **2016**, *21*, 342.
- [18] B. Li, L. Lin, H. Lin, B. C. Wilson, *J. Biophotonics* **2016**, *9*, 1314-1325.
- [19] S. Bonnet, *Dalton Trans.* **2018**, 10330-10343.
- [20] aJ. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907-911; bJ. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935.
- [21] J. B. Patrick, S. M. Fiona, J. S. Peter, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 75-93.
- [22] M. R. Kim, H. Morrison, S. I. Mohammed, *Anti-Cancer Drugs* **2011**, *22*, 896-904.

- [23] A. K. Renfrew, N. S. Bryce, T. Hambley, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 15224-15234.
- [24] A. Kastl, A. Wilbuer, A. L. Merkel, L. Feng, P. D. Fazio, M. Ocker, E. Meggers, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1863-1865.
- [25] A. D. Ostrowski, B. F. Lin, M. V. Tirrell, P. C. Ford, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2950-2955.
- [26] S. Gläser, R. Mede, H. Görls, S. Seupel, C. Bohlender, R. Wyrwa, S. Schirmer, S. Dochow, G. U. Reddy, J. Popp, M. Westerhausen, A. Schiller, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 13222-13233.
- [27] (a) W. Sun, M. Parowatkin, W. Steffen, H.-J. Butt, V. Mailänder, S. Wu, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 467-473; (b) M. Frasconi, Z. Liu, J. Lei, Y. Wu, E. Strelakova, D. Malin, M. W. Ambrogio, X. Chen, Y. Y. Botros, V. L. Cryns, J.-P. Sauvage, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11603-11613; (c) W. Sun, S. Li, B. Häupler, J. Liu, S. Jin, W. Steffen, U. S. Schubert, H.-J. Butt, X.-J. Liang, S. Wu, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1603702.
- [28] A. M. Fajardo, G. A. Piazza, H. N. Tinsley, *Cancers* **2014**, *6*, 436-458.
- [29] S. Gug, S. Charon, A. Specht, K. Alarcon, D. Ogden, B. Zietz, J. Léonard, S. Haacke, F. Bolze, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303-1307.
- [30] P. Anstaett, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1821-1825.
- [31] L. N. Lameijer, D. Ernst, S. L. Hopkins, M. S. Meijer, S. H. C. Askes, S. E. L. Dévédec, S. Bonnet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11549-11553.
- [32] A. Zamora, C. A. Denning, D. K. Heidary, E. Wachter, L. A. Nease, J. Ruiz, E. C. Glazer, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 2165-2173.
- [33] A. Rosa, G. Ricciardi, E. J. Baerends, D. J. Stufkens, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2886-2897.
- [34] J. J. Woods, J. Cao, A. R. Lippert, J. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12383-12387.
- [35] (a) I. Chakraborty, S. J. Carrington, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2603-2611; (b) J. Akl, I. Sasaki, P. G. Lacroix, V. Hugues, P. Vicendo, M. Bocé, S. Mallet-Ladeira, M. Blanchard-Desce, I. Malfant, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1484-1491.

- [36] D. Crespy, K. Landfester, U. S. Schubert, A. Schiller, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6651-6662.
- [37] G. L. Miessler, P. J. Fischer, D. A. Tarr, *Inorganic Chemistry*, Pearson Education, **2013**.
- [38] D. D. Thomas, L. A. Ridnour, J. S. Isenberg, W. Flores-Santana, C. H. Switzer, S. Donzelli, P. Hussain, C. Vecoli, N. Paolocci, S. Ambs, C. A. Colton, C. C. Harris, D. D. Roberts, D. A. Wink, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 18-31.
- [39] D. M. P. Mingos, en *Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine I* (Ed.: D. M. P. Mingos), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 1-44.
- [40] L. J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, C. Napoli, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *34*, 879-886.
- [41] A. W. Girotti, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1425-1432.
- [42] P. Agvald, L. C. Adding, A. Artlich, M. G. Persson, L. E. Gustafsson, *Br. J. Pharmacol.* **2002**, 373-382.
- [43] C. Alaniz, B. Watts, *Ann. Pharmacother.* **2005**, *39*, 388-389.
- [44] A. K. Patra, R. Afshar, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2512-2515.
- [45] (a) F. DeRosa, X. Bu, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 4157-4165; (b) M. D. Leo, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1980-1981.
- [46] (a) K. J. Franz, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3722-3723; (b) K. S. Suslick, R. A. Watson, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 912-919; (c) A. A. Eroy-Reveles, Y. Leung, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7166-7167.
- [47] M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2093-2114.
- [48] P. N. Komozin, V. M. Kazakova, I. V. Miroshnichenko, N. M. Sinitsyn, *Zh. Nerog. Khim.* **1983**, *28*, 3186-3187.
- [49] S. Amabilino, M. Tasse, P. G. Lacroix, S. Mallet-Ladeira, V. Pimienta, J. Akl, I. Sasaki, I. Malfant, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 7371-7383.
- [50] A. B. Cox, R. M. Wallace, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1971**, *7*, 1191-1194.
- [51] A. B. Nikol'skij, A. M. Popov, N. V. Vasilevskij, *Koord. Khim.* **1976**, *2*, 671-677.

- [52] P. Komozin, V. Kazakova, I. Miroshnichenko, N. Sinitsyn, *Zh. Neorg. Khim.* **1983**, 28, 3186-3187.
- [53] (a) F. d. S. Oliveira, K. Q. Ferreira, D. Bonaventura, L. M. Bendhack, A. C. Tedesco, S. d. P. Machado, E. Tfouni, R. S. d. Silva, *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101, 313-320; (b) N. Xu, J. Lee, D. R. Powell, G. B. Richter-Addo, *Inorg. Chim. Acta* **2005**, 358, 2855-2860; (c) C. F. Works, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7592-7593; (d) A. K. Patra, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 7363-7365; (e) R. G. d. Lima, M. G. Saaia, D. Bonaventura, A. C. Tedesco, L. M. Bendhack, R. S. d. Silva, *Inorg. Chim. Acta* **2006**, 359, 2543-2549.
- [54] (a) P. Labra-Vázquez, M. Bocé, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, P. G. Lacroix, N. Farfán, I. Malfant, *Dalton Trans.* **2020**, 49, 3138-3154; (b) M. Bocé, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, F. Pillet, C. D. Silva, P. Vicendo, P. G. Lacroix, I. Malfant, M.-P. Rols, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 4867.
- [55] R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1996**, 47, 555-606.
- [56] (a) N. L. Fry, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 289-298; (b) T. R. deBoer, P. K. Mascharak, en *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 67 (Eds.: R. van Eldik, J. A. Olabe), Academic Press, **2015**, pp. 145-170.
- [57] (a) N. L. Fry, B. J. Heilman, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 317-324; (b) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 6904-6917; (c) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Chem. Commun.* **2008**, 3933-3935; (d) N. L. Fry, J. Wei, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 9045-9052.
- [58] T. Becker, S. Kupfer, M. Wolfram, H. Görls, U. S. Schubert, E. V. Anslyn, B. Dietzek, S. Gräfe, A. Schiller, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 15554-15563.
- [59] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press, London, **1992**.
- [60] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3244-3266.
- [61] F. Bolze, S. Jenni, A. Sour, V. Heitz, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 12857-12877.
- [62] K. Samkoe, A. Clancy, A. Karotki, B. Wilson, D. Cramb, *J. Biomed. Opt.* **2007**, 12, 034025.
- [63] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, 401, 273-294.
- [64] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7, 229-231.

- [65] T. H. Maiman, *Nature* **1960**, *187*, 493-494.
- [66] M. R. R. Vaziri, *Appl. Opt.* **2013**, *52*, 4843-4848.
- [67] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481-491.
- [68] A. M. Jones, *Environmental Biology*, Ed. Routledge, 1997, p. 24
- [69] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [70] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55-68.
- [71] (a) M. Drobizhev, N. S. Makarov, A. Rebane, G. d. I. Torre, T. Torres, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 848-859; (b) A. R. Morales, A. Frazer, A. W. Woodward, H.-Y. Ahn-White, A. Fonari, P. Tongwa, T. Timofeeva, K. D. Belfield, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1014-1025; (c) L. Beverina, J. Fu, A. Leclercq, E. Zojer, P. Pacher, S. Barlow, E. W. V. Stryland, D. J. Hagan, J.-L. Brédas, S. R. Marder, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7282-7283; (d) R. Whitby, A. Kay, M. C. Simpson, in *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization (Second Edition)* (Ed.: T. Baldacchini), William Andrew Publishing, **2020**, pp. 101-141; (e) J. Tan, Y. Zhang, M. Zhang, X. Tian, Y. Wang, S. Li, C. Wang, H. Zhou, J. Yang, Y. Tian, J. Wu, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 3256-3267; (f) B. A. Reinhardt, L. L. Brott, S. J. Clarson, A. G. Dillard, J. C. Bhatt, R. Kannan, L. Yuan, G. S. He, P. N. Prasad, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 1863-1874.
- [72] A. Enriquez-Cabrera, I. Sasaki, V. Bukhanko, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, P. G. Lacroix, R. M. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz, N. Farfán, Z. Voitenko, I. Malfant, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 1446-1456.
- [73] E. Genin, V. Hugues, G. Clermont, C. Herbivo, M. C. R. Castro, A. Comel, M. M. M. Raposo, M. Blanchard-Desce, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1756-1766.
- [74] (a) O. Mongin, L. Porrès, M. Charlot, C. Katan, M. Blanchard-Desce, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481-1498; (b) S.-i. Kato, T. Matsumoto, M. Shigeiwa, H. Gorohmaru, S. Maeda, T. Ishi-i, S. Mataka, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2303-2317.
- [75] Y. Yamashita, F. Moriyasu, S. Ono, T. Kimura, K. Kajimura, H. Someda, N. Hamato, M. Nabeshima, M. Sakai, M. Okuma, *Gastroenterol. Jpn.* **1991**, *26*, 623-627.

- [76] G. Kramer-Marek, C. Serpa, A. Szurko, M. Widel, A. Sochanik, M. Snietura, P. Kus, R. M. D. Nunes, L. G. Arnaut, A. Ratuszna, *J. Photochem. Photobiol. B* **2006**, *84*, 1-14.
- [77] H. A. Collins, M. Khurana, E. H. Moriyama, A. Mariampillai, E. Dahlstedt, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Drobizhev, V. X. D. Yang, D. Phillips, A. Rebane, B. C. Wilson, H. L. Anderson, *Nat. Photonics* **2008**, *2*, 420-424.
- [78] Q. Zou, H. Zhao, Y. Zhao, Y. Fang, D. Chen, J. Ren, X. Wang, Y. Wang, Y. Gu, F. Wu, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7949-7958.
- [79] H. Huang, B. Yu, P. Zhang, J. Huang, Y. Chen, G. Gasse, L. Ji, H. Chao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14049-14052.
- [80] (a) J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, L. Ji, H. Chao, *Biomaterials* **2015**, *56*, 140-153; (b) L. Zeng, S. Kuan, G. Li, C. Jin, L. Ji, H. Chao, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1977-1980; (c) K. Qiu, J. Wang, C. Song, L. Wang, H. Zhu, H. Huang, J. Huang, H. Wang, L. Ji, H. Chao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 18482-18492.
- [81] A. Enriquez-Cabrera, P. G. Lacroix, I. Sasaki, S. Mallet-Ladeira, N. Farfán, R. M. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz, I. Malfant, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, *2018*, 531-543.
- [82] J. Akl, I. Sasaki, P. G. Lacroix, I. Malfant, S. Mallet-Ladeira, P. Vicendo, N. Farfán, R. Santillan, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 12721-12733.
- [83] (a) X. Wang, D. M. Nguyen, C. O. Yanez, L. Rodriguez, H.-Y. Ahn, M. V. Bondar, K. D. Belfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12237-12239; (b) I. A. Mikhailov, M. V. Bondar, K. D. Belfield, A. E. Masunov, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 20719-20724; (c) C. Girardot, G. Lemercier, J. C. Mulatier, J. Chauvin, P. L. Baldeck, C. Andraud, *Dalton Trans.* **2007**, 3421-3426.
- [84] (a) M. Roose, M. Tassé, P. G. Lacroix, I. Malfant, *New J. Chem.* **2019**, *43*, 755-767; (b) V. Bukhanko, P. G. Lacroix, I. Sasaki, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, Z. Voitenko, I. Malfant, *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *482*, 195-205.
- [85] J. S. García, F. Alary, M. Boggio-Pasqua, I. M. Dixon, J.-L. Heully, *J. Mol. Model.* **2016**, *22*, 284.
- [86] W. Zecher, F. Kröhnke, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 690-697.

- [87] (a) T. Shujiang, J. Bo, Z. Yan, Z. Junyong, J. Runhong, Y. Changsheng, *Chem. Lett.* **2006**, 35, 1338-1339; (b) A. V. Afonin, A. V. Vashchenko, M. V. Sigalov, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 11199-11211.
- [88] F. Kröhnke, K. F. Gross, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 22-36.
- [89] L. X. Zhao, T. S. Kim, S. H. Ahn, T. H. Kim, E. K. Kim, W. J. Cho, H. Choi, C. S. Lee, J. A. Kim, T. C. Jeong, C. J. Chang, E. S. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2659-2662.
- [90] P. Labra-Vázquez, M. Palma-Contreras, R. Santillan, N. Farfán, *J. Mol. Struct.* **2017**, 1131, 156-162.
- [91] M. Chandrasekharam, G. Rajkumar, C. S. Rao, T. Suresh, P. Y. Reddy, J.-H. Yum, M. K. Nazeeruddin, M. Graetzel, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, 2.
- [92] J. Massin, L. Ducasse, M. Abbas, L. Hirsch, T. Toupance, C. Olivier, *Dyes Pigm.* **2015**, 118, 76-87.
- [93] G. K.-M. So, G. Cheng, J. Wang, X. Chang, C.-C. Kwok, H. Zhang, C.-M. Che, *Chem. Asian J.* **2017**, 12, 1490-1498.
- [94] (a) X. Feng, L. Yang, F. Luo, *Inorg. Chem. Commun.* **2019**, 102, 10-15; (b) E. C. Constable, E. Figgemeier, C. E. Housecroft, S. L. Kokatam, E. A. Medlycott, M. Neuburger, S. Schaffner, J. A. Zampese, *Dalton Trans.* **2008**, 6752-6762.
- [95] S. Tu, R. Jia, B. Jiang, J. Zhang, Y. Zhang, C. Yao, S. Ji, *Tetrahedron* **2007**, 63, 381-388.
- [96] W. Gamrad, A. Dreier, R. Goddard, K.-R. Pörschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 4482-4487.
- [97] (a) M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 10200-10207; (b) S. E. Wheeler, J. W. G. Bloom, *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118, 6133-6147.
- [98] (a) S. Venkataraman, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang, *Polym. Chem.* **2014**, 5, 2035-2040; (b) A. Y. Li, J. Y. Chang, K. Q. Wang, L. D. Lu, *Adv. Mat. Res.* **2006**, 11-12, 371-374; (c) J. Liu, J. Li, X. Liu, Z. Zhang, J. Zhang, G. Tu, *Org. Electron.* **2019**, 71, 36-44; (d) Y. Koizumi, S. Seki, S. Tsukuda, S. Sakamoto, S. Tagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9036-9037.
- [99] T. Hirano, K. Ueda, M. Mukaida, H. Nagao, T. Oi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 2341-2345.

- [100] J. Grell, J. Bernstein, G. Tinhofer, *Acta Cryst. B* **1999**, *55*, 1030-1043.
- [101] C. M. Aguilar, W. R. Rocha, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2030-2037.
- [102] J. Chen, L. Chen, S. Liao, K. Zheng, L. Ji, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7862-7869.
- [103] (a) C. H. Langford, H. B. Gray, *Ligand Substitution Processes*, W.A. Benjamin, **1966**;
(b) S. Ašperger, C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.* **1956**, 2862-2879; (c) S. H. Laurie, *Nature* **1966**, *211*, 181-181.
- [104] D. Jacquemin, Y. Zhao, R. Valero, C. Adamo, I. Ciofini, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 1255-1259.
- [105] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165-195.
- [106] El programa se puede descargar gratuitamente de <http://cinet.chim.pagesperso-orange.fr/>.
- [107] D. Tsikas, *J. Chromatogr. B* **2007**, *851*, 51-70.
- [108] J. Liu, Q. Duan, J. Wang, Z. Song, X. Qiao, H. J. Wang, *Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 1.
- [109] M. Hempe, L. Schnellbacher, T. Wiesner, M. Reggelin, *Synthesis* **2017**, *49*, 4489-4499.
- [110] S. Barik, W. G. Skene, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 2563-2572.
- [111] Y. Tian, W.-C. Wu, C.-Y. Chen, T. Strovas, Y. Li, Y. Jin, F. Su, D. R. Meldrum, A. K. Y. Jen, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1728-1736.
- [112] S. S. M. Fernandes, M. Belsley, C. Ciarrocchi, M. Licchelli, M. M. M. Raposo, *Dyes Pigm.* **2018**, *150*, 49-58.
- [113] Gaussian 09, Revision A.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.;

- Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [114] A. W. Ehlers, M. Böhme, S. Dapprich, A. Gobbi, A. Höllwarth, V. Jonas, K. F. Köhler, R. Stegmann, A. Veldkamp, G. Frenking, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *208*, 111-114.
- [115] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3094.
- [116] Bruker (2005), SADABS, Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [117] G. Sheldrick, *Acta Cryst. A* **2015**, *71*, 3-8.
- [118] L. Palatinus, G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 786-790.
- [119] G. Sheldrick, *Acta Cryst. A* **2008**, *64*, 112-122.
- [120] P. W. Betteridge, J. R. Carruthers, R. I. Cooper, K. Prout, D. J. Watkin, *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 1487.

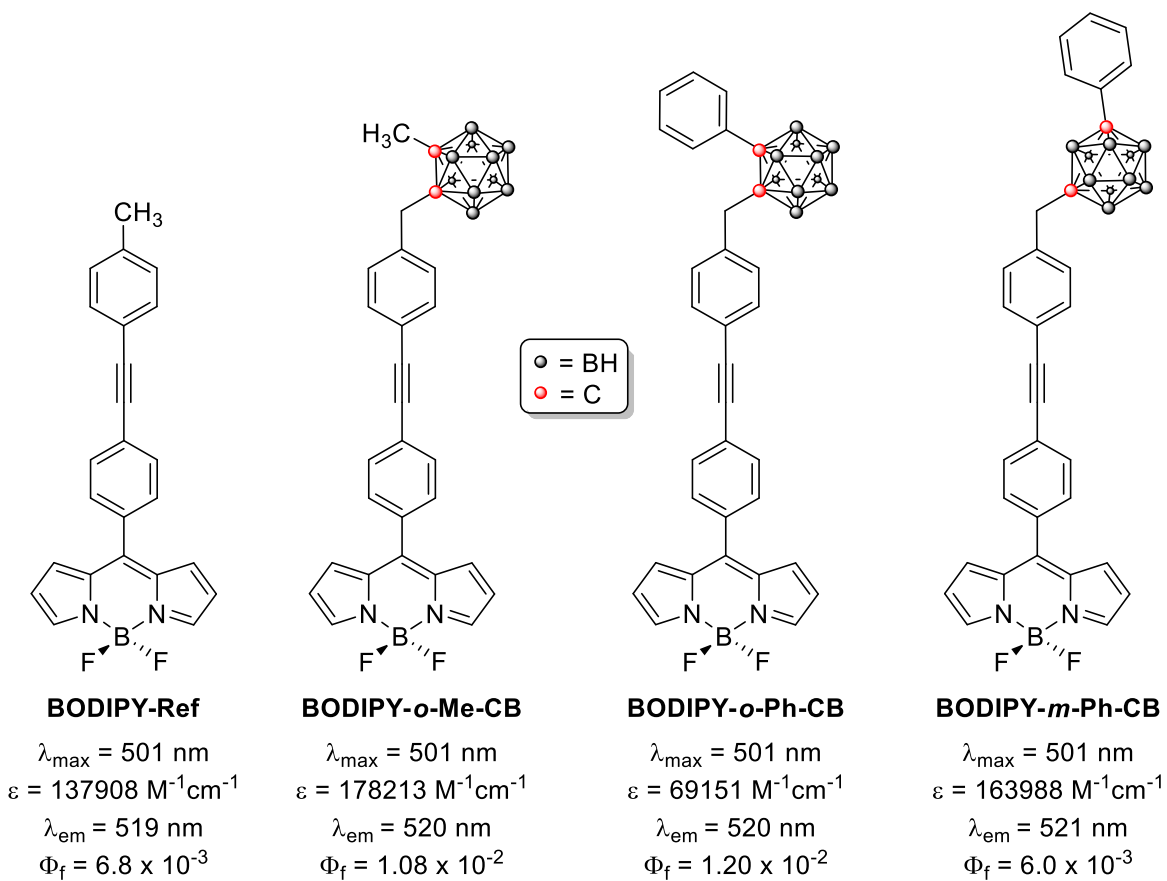
CAPÍTULO II

**CORRELACION ENTRE LA ESTRUCTURA MOLECULAR
Y LA INCORPORACION CELULAR EN UN GRUPO DE
CONJUGADOS BODIPY-CARBORANO**

CHAPTER II

**CORRELATION BETWEEN THE MOLECULAR
STRUCTURE AND CELL INCOME IN A SET OF
BODYPY-CARBORANE DYADS**

2.1. RESUMEN DE COMPUESTOS NUEVOS



(Las propiedades fotofísicas están medidas en etanol)

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Estructura y generalidades de los boranos y los carboranos

Antes de abordar la química de los carboranos, que son el tema central de este Capítulo, es conveniente empezar hablando, en un panorama más amplio y general, de los boranos, hidruros de boro comúnmente encontrados en asociaciones moleculares poliédricas. Estas especies son deficientes en electrones en el sentido de que contienen más enlaces que pares electrónicos, por lo que para describir sus estructuras en términos de enlaces localizados es necesario emplear enlaces multicéntricos.^[1]

La deficiencia electrónica de los boranos se ilustra en la Figura 33 con el diborano; a diferencia del etano, que posee 14 e^- de valencia distribuidos en 14 orbitales atómicos (AO), el diborano tiene 12 e^- de valencia distribuidos en 14 AOs. Por otro lado, a diferencia del etano, en el que todos sus enlaces son 2-centros 2-electrones ($2c-2e$), el diborano presenta, además de dos enlaces $2c-2e$ entre los átomos de boro y los hidrógenos terminales, dos enlaces 3-centros 2-electrones ($3c-2e$) entre los átomos de boro y los hidrógenos puente. Otros enlaces $3c-2e$ que no involucran átomos de hidrógeno y son comunes en boranos poliédricos se representan en la Figura 30c para interacciones B-B-B.

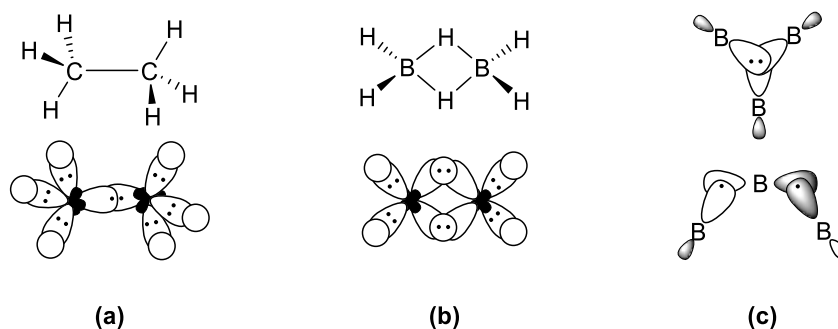


Figura 33. Estructuras de enlace-valencia para (a) etano, C₂H₆ y (b) diborano (B₂H₆) y (c) enlaces $3c-2e$ comunes entre átomos de boro.

La presencia de enlaces multicéntricos, así como de dos tipos de hidruro (puente y terminal), son características halladas de forma ubicua en los boranos de mayor complejidad. El análisis de enlace-valencia para el *closo*-[B₄H₄]²⁻,^[2] un borano de 18 e⁻ (Figura 34), permite introducir otras generalidades que serán útiles más adelante. Primero, el prefijo *closo* indica que se trata de un borano que forma una caja poliédrica totalmente cerrada. Se considera que los boros poseen hibridación *sp*, con un orbital híbrido *sp_z* mirando hacia “adentro” de la caja y otro hacia “afuera” y permitiendo la superposición orbital con el orbital *s* del hidrógeno *exo* para formar un enlace 2c-2e con éste y dejando así dos e⁻ restantes en el boro, los cuales están involucrados en la formación del esqueleto de la caja y se encuentran distribuidos en tres AOs: el orbital híbrido *sp_z* orientado hacia “adentro” de la caja y dos orbitales, *p_x* y *p_y*, tangenciales a ésta. Así, los 8 e⁻ no involucrados en enlaces B-H se reparten en los orbitales moleculares (MO) que forman el esqueleto del borano y que resultan de la combinación lineal de los 12 AOs restantes del boro, dando lugar a 5 MOs enlazantes y 7 antienlazantes.^[3] Así, la configuración electrónica más estable del *closo*-[B₄H₄]²⁻ implica una estructura dianónica, ya que el llenado de los MOs enlazantes requiere 10 e⁻ y sólo había 8 e⁻ disponibles en los AOs de los átomos de boro.

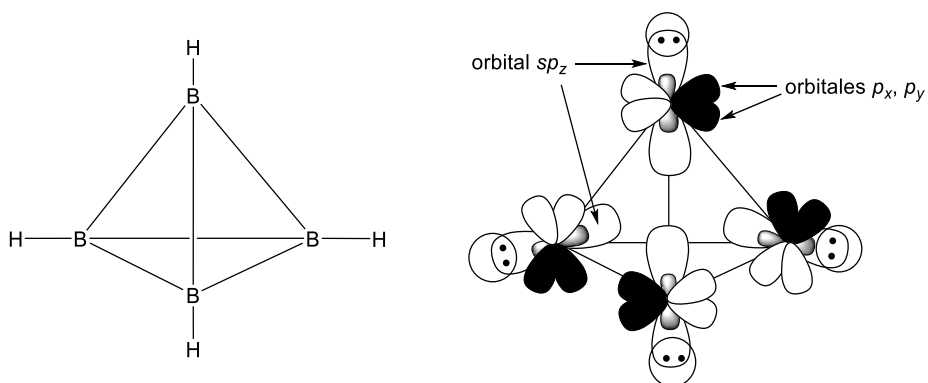
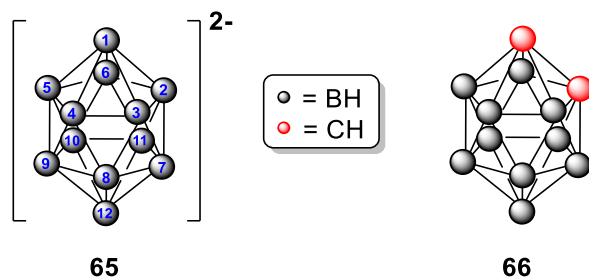


Figura 34. Estructuras de enlace-valencia para el compuesto *closo*-[B₄H₄]²⁻.

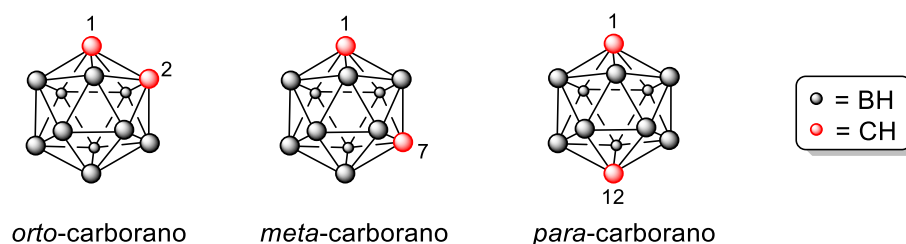
Este tipo de análisis permite entender de forma general la conectividad y geometría de boranos de mayor complejidad. Diversos autores como Lipscomb y Wade,^[4] han establecido reglas y tendencias generales para boranos polihédricos *closo*, así como para aquellos que han perdido uno o dos vértices, para los que se emplean los prefijos *nido* y *arachno*, respectivamente. Entre las generalidades, es importante señalar que para los derivados *closo*- B_nH_n , el esqueleto del borano estará compuesto por $(2n + 2) e^-$, en concordancia con lo discutido para la especie *closo*- $[B_4H_4]^{2-}$. Por otro lado, los derivados *nido* y *arachno* tendrán esqueletos formados por $(2n + 4)$ y $(2n + 6) e^-$, respectivamente.

Estas generalidades se extienden a los heteroboranos, que son cúmulos de boro en los que se han reemplazado uno o más átomos de boro por algún otro elemento. Los carboranos, en los que el reemplazo ha sido por átomos de carbono, son por mucho los heteroboranos más estudiados.^[5] En este caso, dado que el carbono tiene un e^- de valencia adicional con respecto al boro, contribuye con 3 e^- en vez de dos al esqueleto, modificando así la carga del cúmulo. Esto se ejemplifica en el Esquema 29, que muestra las estructuras del dianión *closo*- $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ (**65**) y del 1,2-dicarba-*closo*- $[C_2B_{10}H_{12}]$ (**66**), un carborano ampliamente estudiado y de central importancia para este trabajo.



Esquema 29. Estructura y numeración IUPAC para los compuestos *closo*- $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ (**65**) y 1,2-dicarba-*closo*- $[C_2B_{10}H_{12}]$ (**66**).

Los carboranos y otros cúmulos de boro poseen notables estabilidades químicas, térmicas y fotoquímicas;^[6] además, los derivados *closo*- poseen lo que se conoce como superaromaticidad^[7] o aromaticidad esférica,^[8] que se refiere a la deslocalización electrónica en 3D presente en estos cúmulos que se debe a los ubicuos enlaces multicéntricos que forman sus esqueletos. Debido a esto, muchos carboranos presentan algunas propiedades y tamaños similares a los de un anillo de benceno girando,^[9] por lo que los isómeros 1,2- 1,7 y 1,12-dicarba-*closo*-[C₂B₁₀H₁₂] se denominan coloquialmente *orto*-, *meta*- y *para*-carborano, respectivamente (Esquema 30).

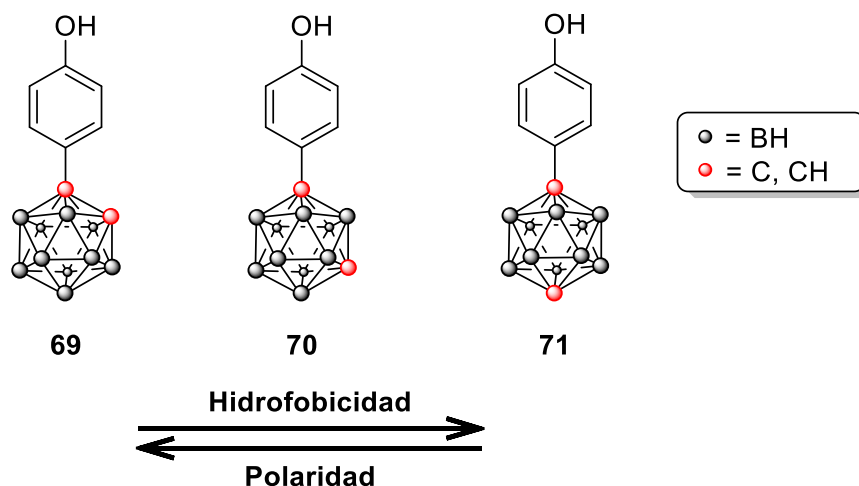


Esquema 30. Estructura y nomenclatura convencional para los diferentes isómeros del 1,12-dicarba-*closo*-[C₂B₁₀H₁₂].

A pesar de presentar tamaños y composiciones elementales cercanos, algunos cúmulos de boro en apariencia similares pueden mostrar propiedades fisicoquímicas muy diferentes. Por ejemplo, en tanto que **66** y otros cúmulos neutros suelen ser solubles en disolventes orgánicos, la carga negativa en **65** y compuestos relacionados les confiere notable solubilidad en medio acuoso.^[10] Estos cambios abruptos en las propiedades de los carboranos pueden encontrarse incluso entre los isómeros de un mismo cúmulo;^[11] la variación de la posición de los átomos de carbono del cúmulo (C_c) en los isómeros de **66**, por ejemplo, produce variaciones en el volumen de van der Waals del cúmulo, con valores de de 148, 143 y

141 Å³ para los isómeros *orto*-, *meta*- y *para*-, respectivamente.^[12] El momento dipolar (μ) también sufre una modulación importante, con valores de 4.53(5), 2.85(5) y 0.00 D, respectivamente;^[13] estas variaciones responden a la mayor electronegatividad del carbono frente al boro (2.55 vs 2.04 en la escala de Pauling),^[14] produciendo así dipolos locales orientados hacia los átomos de carbono y consecuentemente un momento dipolar neto reducido para el isómero *meta*- y cancelado en el caso del *para*-. Los enlaces B-H también se encuentran ligeramente polarizados hacia el hidrógeno, lo que se asocia con la habilidad de los cúmulos de boro para formar enlaces de hidrógeno no convencionales (denominados *enlaces de dihidrógeno*) del tipo D-H ^{δ^+} ... ^{δ^-} H-B, con energías de interacción en el intervalo de 0.96 - 6.69 kcal/mol.^[15]

De manera análoga a lo que sucede en el caso del benceno, la presencia de hidrógenos pobremente polarizados le confiere a los carboranos neutros, no sustituidos, un carácter marcadamente hidrofóbico.^[11, 15b] Algunos estudios han mostrado además que la hidrofobicidad de los carboranos puede variar con la isomería del cúmulo;^[16] por ejemplo, se encontró que los carboranos fenólicos **69**, **70** y **71** (Esquema 31) poseen coeficientes de partición ($\log P$) octanol/agua de 5.68, 5.72 y 5.86, respectivamente;^[16a] a pesar de que no se determinaron los valores de μ para estos cúmulos, resulta claro que los coeficientes de partición correlacionan bien con las polaridades relativas esperadas para estos compuestos, siendo el derivado *orto*- (**69**) del cual se espera un mayor valor de μ y con ello menor hidrofobicidad, reflejado efectivamente en un valor de $\log P$ comparativamente menor a los de **70** y **71**.



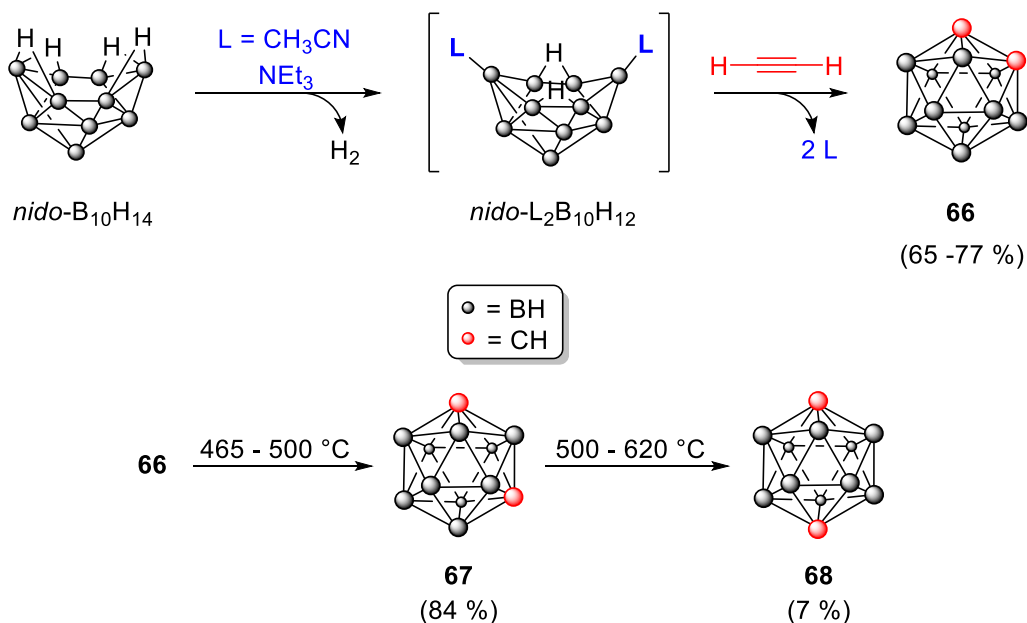
Esquema 31. Tendencias en la hidrofobicidad y polaridad para los carboranos **69-71**.

2.2.2. Síntesis y funcionalización de carboranos

Dentro de la amplia diversidad de carboranos que se han obtenido experimentalmente, el subgrupo que contiene 12 vértices ha concentrado la mayor parte de la investigación dedicada a estos heteroboranos. Estas especies se preparan convenientemente empleando reacciones de inserción de alquinos sobre el *nido*-B₁₀H₁₄,^[17] como se ejemplifica en el Esquema 32 con la preparación del *orto*-carborano (**66**); en un primer paso, la reacción procede mediante la formación del aducto *nido*-L₂B₁₀H₁₂ donde *L* es una base de Lewis, típicamente acetonitrilo o trietilamina, con el consecuente desplazamiento de una molécula de hidrógeno. El tratamiento, generalmente *in situ*, de este intermediario con acetileno produce finalmente el compuesto deseado (**66**) en rendimientos satisfactorios.^[17b]

La isomerización térmica *in vacuo* de **66**, permite la obtención del *meta*-carborano (**67**) en rendimientos altos,^[18] el cual puede someterse a una subsecuente isomerización térmica rindiendo el *para*-carborano (**68**) en rendimientos bajos,^[19] que se asocian a la descomposición del material de partida, así como a la necesidad de aislar el producto

mediante técnicas cromatográficas. El mecanismo mediante el cual transcurren estas isomerizaciones es aún un tema controversial, con propuestas mecanísticas involucrando procesos de apertura del cúmulo, así como de rotación de algunas de las caras.^[18, 20]

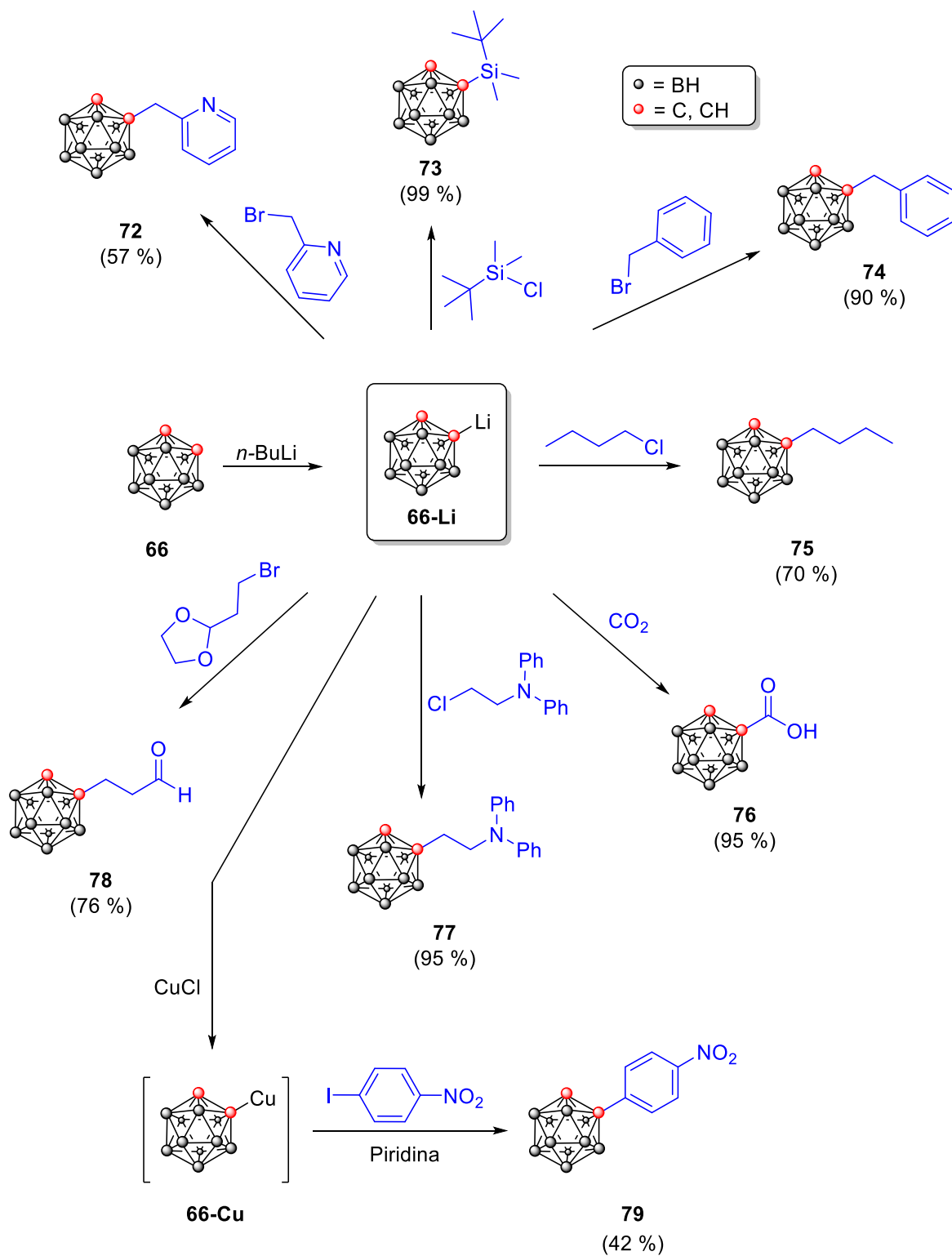


Esquema 32. Síntesis de los distintos isómeros del *closo*-[C₂B₁₀H₁₂].

Los procesos de síntesis previamente mencionados requieren el manejo de reactivos potencialmente explosivos, como el *nido*-B₁₀H₁₄, o la liberación continua de hidrógeno, de igual forma potencialmente explosiva. Sin embargo, estas transformaciones se han empleado satisfactoriamente para preparar diversos carboranos *mono*- y *di*-sustituidos con grupos alquilo, arilo o etinilo. La introducción de sustituyentes más complejos involucra diversas reacciones posteriores a los procesos de formación e isomerización del cúmulo. La mayoría de las estrategias sintéticas hacen uso de la acidez de los hidrógenos C-H debida al carácter electroatractor de los carbonos endocíclicos, una reactividad ausente para los hidrógenos B-H, lo que permite realizar reacciones de forma selectiva sobre los átomos de carbono del cúmulo.

A pesar de que en algunos casos los hidrógenos C-H del cúmulo son suficientemente ácidos para ser abstraídos con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), especialmente en el caso de *orto*-carboranos,^[21] dado que los iones fluoruro son también capaces de *decapitar* el cúmulo removiendo uno o más átomos de boro, la base más empleada para la desprotonación es el *n*-BuLi; el compuesto organolitiado resultante se hace reaccionar *in situ* con diversos electrófilos para dar lugar a una diversidad de cúmulos de boro de manera eficiente. Las posibilidades que ofrece esta estrategia sintética se ejemplifican en el Esquema 33, para el *orto*-carborano, pudiéndose obtener derivados alquilados,^[22] aminados,^[23] bencilados,^[22] sililados,^[24] formilados^[25] y carboxilados,^[26] entre otros. Existen algunos ejemplos, además, de la funcionalización de carboranos directamente con anillos aromáticos, que procede en rendimientos moderados entre organocupratos como **66-Cu**, y halogenuros de arilo.^[27]

Finalmente, es importante señalar que los *meta*- y *para*-carboranos pueden ser funcionalizados empleando la misma estrategia sintética evitando así el uso de reactivos potencialmente explosivos, partiendo alternativamente de *closo*-carboranos comercialmente disponibles. Además, estas reacciones que hacen uso de carboranos litiados pueden permitir la funcionalización de los dos átomos de carbono del cúmulo en un sólo paso si se emplean al menos dos equivalentes de la base y del electrófilo.



Esquema 33. Ejemplos representativos de la funcionalización de carboranos a través de reacciones entre carboranos monometalados y diversos electrófilos.

2.2.3. Aplicaciones de los carboranos

Como consecuencia de sus características químicas únicas, durante las últimas décadas los carboranos han pasado de ser curiosidades científicas a objetos de estudio en diversos campos, encontrando aplicaciones en catálisis,^[28] optoelectrónica^[29] y óptica no lineal,^[30] además de un uso extendido en la preparación de polímeros termorresistentes.^[31] Además, debido a sus altos contenidos en boro, alta lipoficidad y pesos moleculares bajos (típicamente debajo de 500 Da), los carboranos son excelentes candidatos para ser aplicados en terapia por captura neutrónica en boro (BNCT).^[32]

La BNCT es un tipo de radioterapia, ilustrada en la Figura 35, cuyo modo de acción se basa en la muerte controlada de células tumorales como consecuencia de la reacción nuclear producida por la irradiación de núcleos de ^{10}B con neutrones de baja energía, lo que origina la fisión de los núcleos excitados de ^{11}B resultantes y la consecuente liberación de partículas de ^7Li y ^4He , así como de radiación gamma.^[33] A pesar de que el proceso libera una gran cantidad de energía ionizante, ésta tiene un alcance muy limitado en los tejidos (5 – 9 μm), por lo que, en principio, la BNCT ofrece una forma confiable de destruir las células tumorales irradiadas, sin afectar el tejido sano circundante.^[32b]

Para poderse aplicar satisfactoriamente, la BNCT requiere que una dosis elevada de ^{10}B (20 - 50 μg , $\sim 10^9$ átomos por célula) sea efectivamente incorporada al tumor a través de fármacos con baja toxicidad en ausencia de irradiación. Debido a esto y a la baja abundancia natural del isótopo ^{10}B (19.9 %),^[34] ha sido necesario el desarrollo de fármacos capaces de introducir cantidades elevadas de ^{10}B al tumor. Una de las formas en que se ha alcanzado este fin es usando fármacos enriquecidos con este isótopo, lo cual implica, a escala

de laboratorio, rutas de síntesis que parten de precursores simples como el $^{10}\text{BF}_3$ o el $^{10}\text{B}(\text{OH})_3$,^[34c] cuya disponibilidad es limitada debido a que su obtención requiere de complejos y costosos procesos industriales que involucran generalmente la separación, en torres de destilación fraccionada, de mezclas isotópicas de aductos de BF_3 altamente reactivos y corrosivos.^[34b]

Alternativamente, otros agentes para BNCT introducen múltiples átomos de boro dentro de una misma molécula, contrarrestando de esta forma la baja abundancia del ^{10}B . Siguiendo estas dos estrategias se han logrado obtener una gran diversidad de acarreadores de boro, con los que se han podido tratar mediante BNCT diversos tipos de tumores sólidos localizados,^[35] incluyendo tipos de cáncer de difícil acceso como los gliomas avanzados,^[36] así como melanomas,^[35c] y cáncer de cabeza y cuello.^[37]

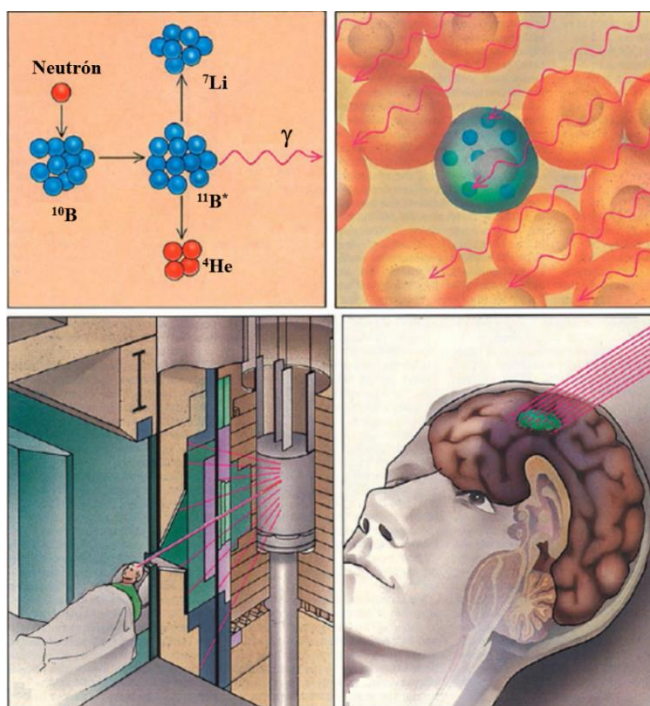
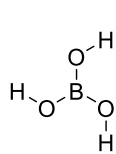
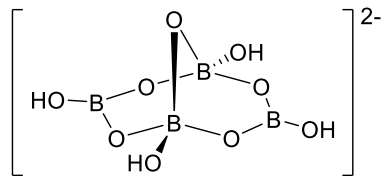


Figura 35. Representación esquemática de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT). Adaptado de la Ref. 32b.

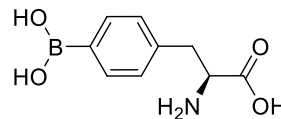
En el Esquema 34 se muestran ejemplos representativos de los fármacos usados para BNCT, que se suelen dividir en tres generaciones de compuestos.^[38] La primera generación, desarrollada durante los años 50's e inicios de los 60's, incluyó al ácido bórico (**80**) y algunos de sus derivados como el bórax (**81**);^[39] sin embargo, debido a sus bajas selectividades y pobres retenciones en los tumores, estos agentes fueron rápidamente reemplazados por los fármacos de la 2ª generación, que superan estas dificultades. Por ejemplo, la incorporación de un aminoácido en la *p*-borono-*L*-fenilalanina (**82**), facilita su incorporación celular; mientras que en el de **83**, la robustez química del esqueleto del borano dificulta su degradación, por lo que permanece más tiempo en el cuerpo y se favorece su acumulación en el tumor;^[40] estos dos fármacos, sin embargo, han mostrado una variabilidad importante en su incorporación celular, especialmente en tumores cerebrales,^[41] motivando así el desarrollo de nuevos agentes para BNCT. La tercera generación de fármacos, ejemplificada con los compuestos **84-86**,^[42] es un grupo más amplio constituido por cúmulos de boro funcionalizados con fragmentos bien reconocidos por las células humanas, entre los que figuran esteroides,^[9b, 43] bases nitrogenadas^[44] y derivados porfirínicos,^[45] entre otros.



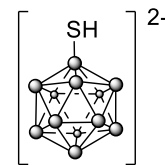
80



81



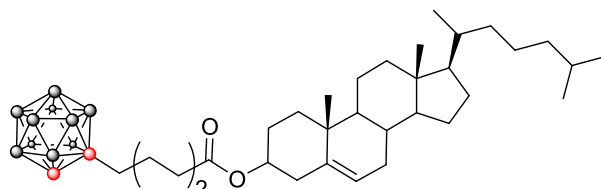
82



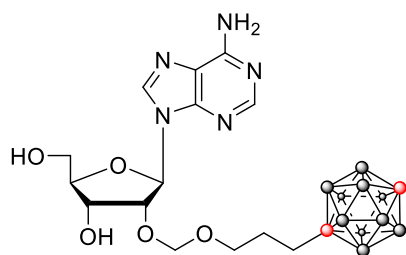
83

1ª generación

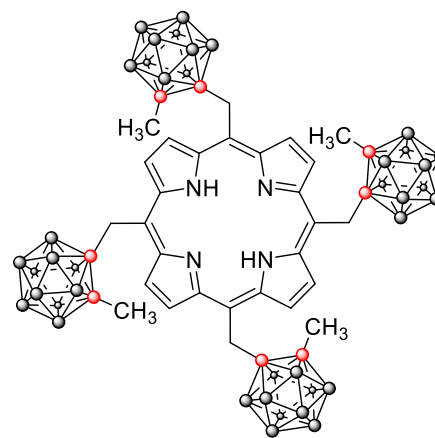
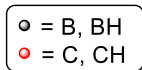
2ª generación



84



85



86

3ª generación

Esquema 34. Ejemplos representativos de compuestos para terapia por captura neutrónica en boro (BNCT).

Uno de los factores más importante para el éxito clínico de la BNCT es determinar con certeza la concentración de boro en el tumor y su proporción comparada con el tejido sano, previo a la irradiación con neutrones.^[46] En un caso ideal, la cantidad de radiación que recibe el paciente también debería ajustarse en tiempo real dependiendo de la distribución del fármaco en el tumor,^[47] lo que típicamente se estima determinando la concentración de boro de forma indirecta empleando diversas pruebas de forma continua en tomas de sangre del

paciente,^[48] necesitando asumirse que cierta proporción del boro administrado ausente en la sangre se encuentra en el tumor.

Con el objetivo de obtener una medición directa de la cantidad de boro en el tumor, la investigación en esta área se ha dirigido al desarrollo de fármacos capaces no sólo de producir el efecto terapéutico, sino también de guiar el diagnóstico y/o la localización de las células malignas dentro del tejido. Este tipo de fármacos, conocidos como agentes teragnósticos^[49] (acrónimo de *terapia* y *diagnóstico*), involucra generalmente la funcionalización de la molécula con radioisótopos^[50] y, más recientemente, con fluoróforos.^[51]

En la Figura 36 se muestra un ejemplo del uso de un radioisótopo para seguir *in vivo* la incorporación de un análogo enriquecido en ^{10}B del compuesto **82** el cual ha alcanzado pruebas clínicas de Fase II.^[52] Gracias al etiquetamiento con un átomo radiactivo de ^{18}F fue posible seguir en tiempo real la incorporación del fármaco al tumor mediante tomografía por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés), encontrándose que en la mayoría de los pacientes después de 44 minutos la concentración del fármaco en el tumor era máxima.^[50b] Sin embargo, quizá la mayor limitante de esta técnica estribe en la necesidad de etiquetar con un radioisótopo cada fármaco potencialmente útil, por lo que en los últimos años se ha buscado emplear la fluorescencia de cúmulos de boro decorados con fluoróforos como una respuesta analítica alternativa, potencialmente útil para determinar directamente la concentración de boro en el tumor evitando así el marcaje con radioisótopos.

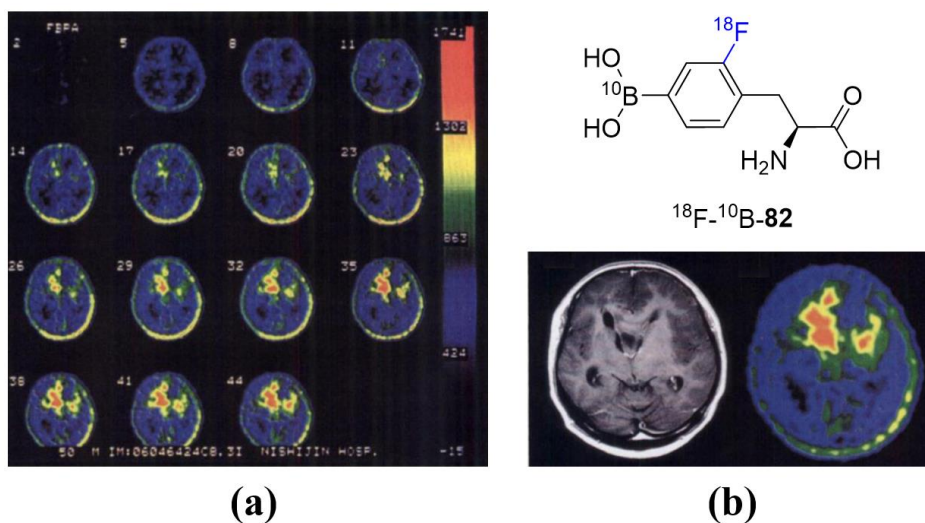
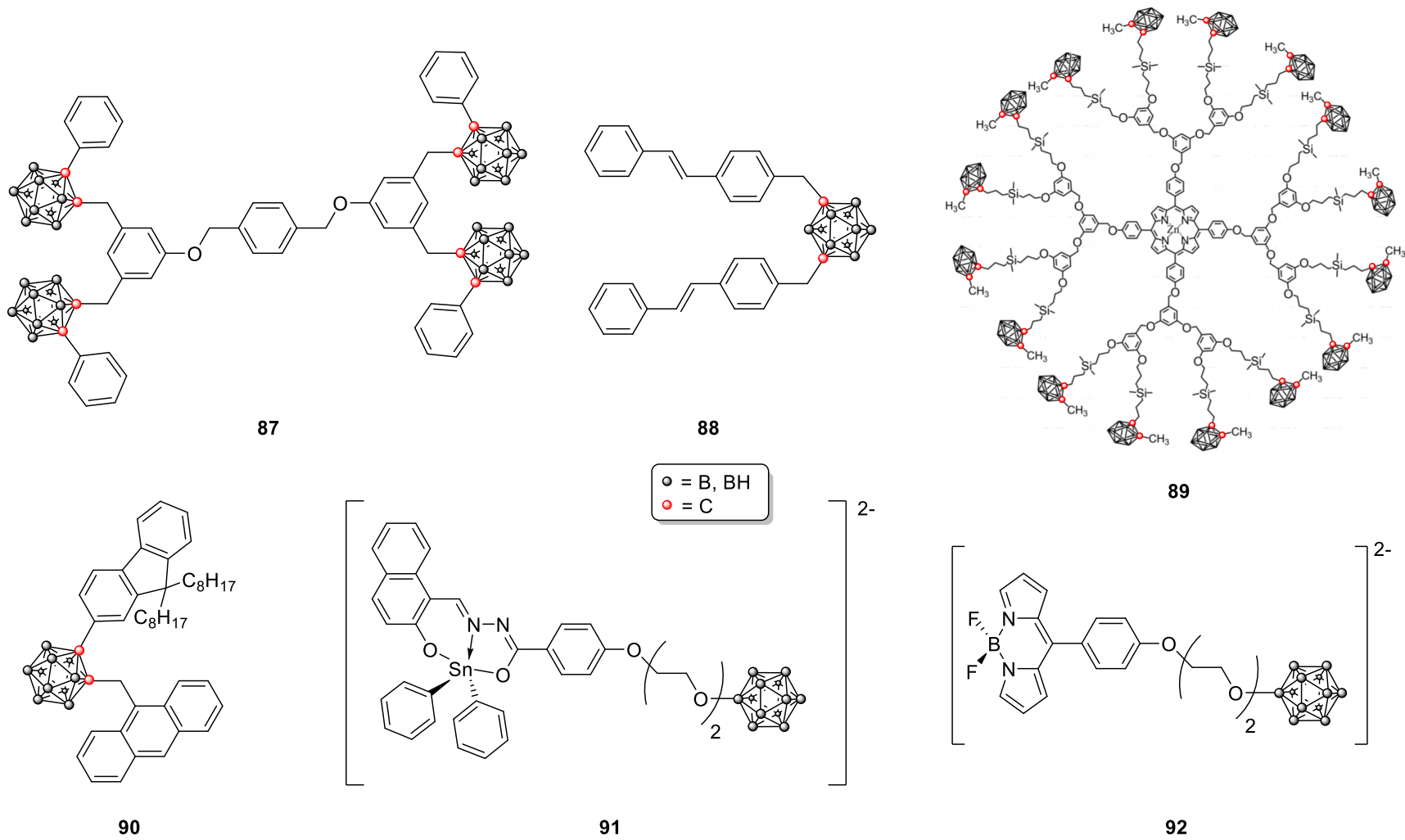


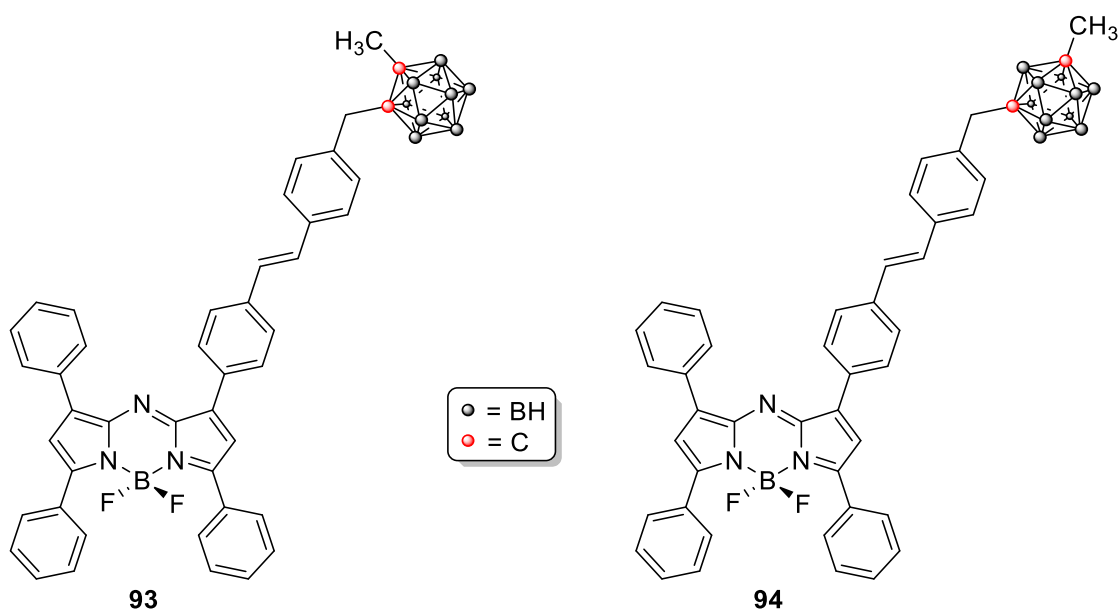
Figura 36. Monitoreo de la incorporación a tumores cerebrales de un análogo de **82** enriquecido en ^{10}B y etiquetado con ^{18}F mediante tomografía por emisión de positrones (PET). Adaptado de la Ref. 50b.

A pesar de que la terapia y el diagnóstico simultáneos (teragnosis) vía fluorescencia se ha aplicado satisfactoriamente en otro tipo de terapias,^[53] el uso de una sola molécula fluorescente para la teragnosis del cáncer vía BNCT no ha sido informado. En este contexto, en el 2007 nuestro grupo, en colaboración con el de la Dra. Rosario Núñez (ICMAB-CSIC), publicó los primeros estudios sobre carboranos fluorescentes mediante la incorporación de diversos éteres de arilo, ejemplificados con **87** en el Esquema 35.^[54] Estos se han extendido a diversos fluoróforos, incluyendo estilbenos (**88**),^[55] porfirinas (**89**)^[56] y grupos policíclicos como el 9*H*-fluoreno y el antraceno (**90**).^[57] Más recientemente se ha informado también la introducción de compuestos de coordinación de estaño (**91**)^[58] y de dipirrometenos de boro (BODIPYs, **92**),^[59] estos últimos mostrando valores de rendimiento cuántico fluorescente en un amplio intervalo ($\Phi_{\text{F}} = 0.014 - 0.84$), dependiendo tanto del tipo de fluoróforo introducido como de las características del cúmulo de boro.



Esquema 35. Ejemplos representativos de cúmulos de boro decorados con fluoróforos.

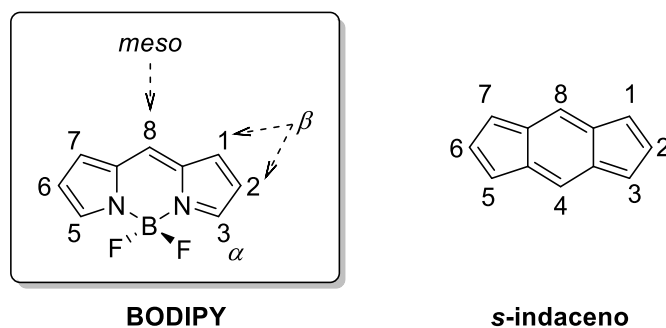
A pesar de que se ha informado la síntesis y propiedades fotofísicas de una amplia diversidad de carboranos decorados con fluoróforos, algunos de los cuales han mostrado un ingreso excepcional hacia células HeLa (de cáncer cervical) y representan así buenos agentes fluorescentes para el seguimiento de células *in vitro*, en muchas ocasiones se encuentran diferencias sorprendentes en la internalización de fluoróforos debido a cambios pequeños en sus estructuras moleculares.^[60] Esto incluye, como se ejemplifica en el Esquema 36, la frecuente observación de carboranos *orto*-sustituidos, como **93**, mostrando ingresos celulares muy pobres o nulos hacia células HeLa, en tanto que sus isómeros *meta*-, como **94**, muestran incorporaciones excepcionales.^[59b] La explicación del origen de este tipo de divergencias podría ayudar a guiar el desarrollo de carboranos fluorescentes con ingresos óptimos a células tumorales o con distribuciones subcelulares específicas.



Esquema 36. Ejemplo de dos carboranos decorados con fluoróforos que muestran una fuerte diferencia en su incorporación a células HeLa debido a la isomería *orto*-/*meta*- en el carborano.

2.2.4. Generalidades y aplicaciones de los BODIPYs

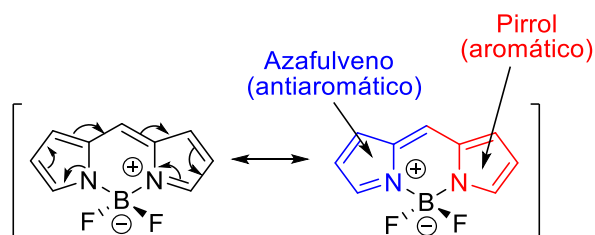
Descubiertos en 1968 por Treibs y Krauzer,^[61] los derivados del 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno, coloquialmente llamados BODIPYs (un acrónimo de *B*oron *D*IPYrromethene), son compuestos tricíclicos que contienen un átomo de boro tetracoordinado (Esquema 37). En ellos, el boro forma parte de un anillo de 6 miembros y se encuentra coordinado a dos nitrógenos pirrólicos; las dos valencias restantes se ocupan, en la mayoría de las ocasiones, en la formación de enlaces covalentes con átomos de flúor.



Esquema 37. Estructura y numeración para el 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (BODIPY) y el *s*-indaceno.

A diferencia de los boranos, en los que la formación de enlaces multicéntricos sucede de forma ubicua, en los BODIPYs el átomo de boro se enlaza exclusivamente a través de enlaces clásicos de 2 centros-2 electrones. No obstante, a pesar de romper la regla de Hückel al poseer un sistema π de 12 e^- , los BODIPYs presentan también un carácter aromático importante, evidenciado por sus elevadas estabilidades térmicas que contrastan con las del *s*-indaceno, el análogo totalmente hidrocarbonado de los BODIPYs, del cual deriva su nomenclatura IUPAC, y que es una molécula formalmente antiaromática e inestable en disolución a temperatura ambiente.^[62]

La aromaticidad de los BODIPYs comúnmente se asocia a la rigidez que provee el átomo de boro,^[63] conduciendo a una estructura plana a lo largo de la cual ocurre una deslocalización electrónica eficiente, solamente interrumpida en el átomo de boro, como revelan sus estructuras cristalinas con distancias de enlace equivalentes para ambos anillos pirrólicos, incluyendo los enlaces N-B. Sin embargo, quizás la razón más importante por la que los BODIPYs muestran un carácter aromático sea la alternancia entre estructuras mesoméricas pirrólicas (aromáticas) y azafulvénicas (antiaromáticas) para los anillos de pirrol,^[64] las primeras de las cuales están naturalmente ausentes en el *s*-indaceno (Esquema 38).



Esquema 38. Algunas estructuras mesoméricas para los BODIPYs mostrando la alternancia entre formas pirrólicas y azafulvénicas para los anillos laterales.

Los BODIPYs presentan propiedades fotofísicas atractivas,^[65] incluyendo bandas intensas de absorción ($\epsilon > 20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con máximos generalmente en el intervalo $\lambda = 490 - 650 \text{ nm}$; además tienen buenas eficiencias cuánticas fluorescentes, generalmente dentro del intervalo $\Phi_F = 0.3 - 0.9$, con bandas de emisión angostas y desplazamientos de Stokes pequeños.^[66] Por otra parte, estos compuestos tienen buenas estabilidades térmicas y fotofísicas, además de ser resistentes a condiciones fisiológicas, así como a la acción de ácidos concentrados y de bases pobremente nucleofílicas.^[67]

Una amplia diversidad de grupos funcionales pueden introducirse eficientemente al núcleo del BODIPY, produciendo cambios importantes de sus propiedades fotofísicas,

siendo las sustituciones en las posiciones C-8 (*meso*-), C-3/C-5 (C- α) y C-2/C-6 (C- β) las más empleadas debido a su accesibilidad sintética. La modulación de las propiedades fotofísicas de estos colorantes debido a la introducción de diversos sustituyentes ha sido estudiada sistemáticamente,^[65b-c] resultando en amplios intervalos de absorción y emisión. La funcionalización en la posición *meso*- con grupos electrodonadores y electroattractores produce pronunciados (ca. ± 100 nm) desplazamientos hipsocrómicos y batocrómicos, respectivamente, al compararse con el BODIPY no sustituido, que presenta una absorción centrada en $\lambda = 505$ nm.^[65b] Por otra parte, la funcionalización en las posiciones C- α y C- β , se asocia con aumentos importantes en el coeficiente de extinción molar, así como con pronunciados desplazamientos batocrómicos,^[65c] que se ilustran en la Figura 37 con los espectros de absorción y emisión de algunos BODIPYs comerciales funcionalizados en C- α .

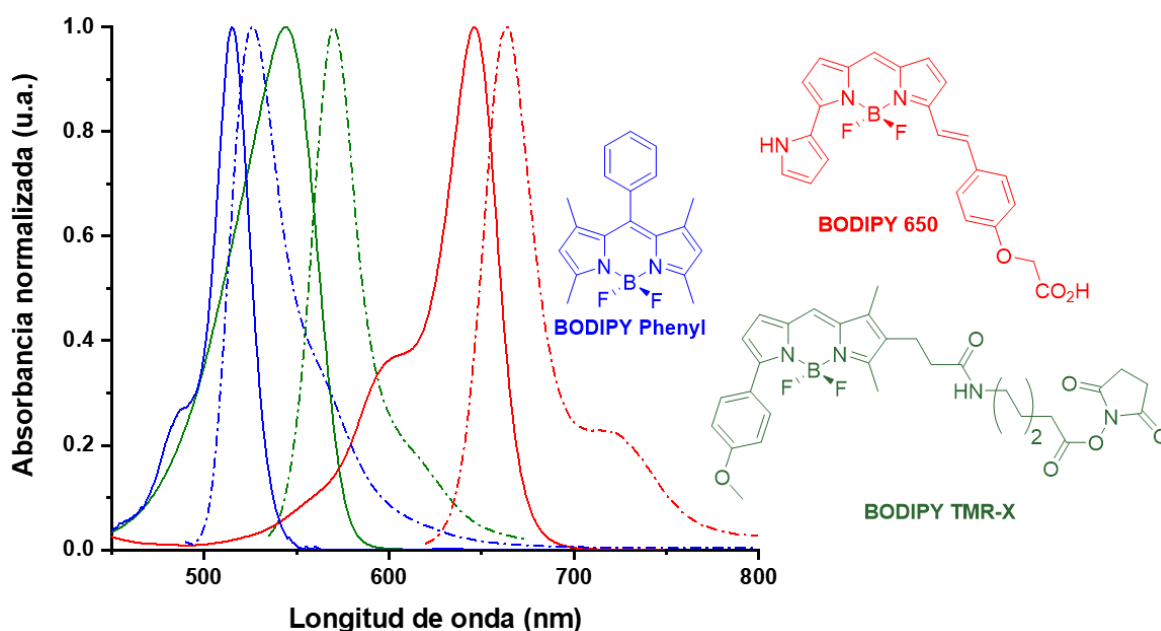


Figura 37. Espectros normalizados de absorción (líneas sólidas) y emisión (líneas discontinuas) en cloroformo para algunos BODIPYs comerciales.^[68]

Los BODIPYs fueron denominados en el 2007 como “*El Dorado*” de las herramientas fluorescentes,^[69] como un reconocimiento de la relevancia y el amplio interés que ha atraído esta familia de fluoróforos durante las últimas décadas, debido en buena parte a su notable versatilidad química y sus atractivas propiedades fotofísicas.^[70] Debido a esto, se han encontrado aplicaciones muy diversas para estos fluoróforos, incluyendo su uso como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica,^[71] en imagen celular por microscopía confocal^[72] y en la fabricación de diodos orgánicos emisores de luz (OLEDs)^[73] y de dispositivos fotovoltaicos,^[74] entre otras. Además, dado que su respuesta fluorescente puede modularse por la aplicación de diversos estímulos, los BODIPYs han sido empleados satisfactoriamente como sensores de viscosidad^[75] y de diversos analitos.^[76]

Los BODIPYs también se han usado en el diagnóstico de enfermedades; muy recientemente se publicaron estudios que muestran en experimentos *in vivo*^[77] y *ex vivo*,^[78] la posibilidad de localizar y estimar la concentración, mediante espectroscopía de fluorescencia, de derivados de BODIPY en tiempo real (Figura 38). El compuesto **95**, constituido por un fármaco eficaz para tratar el mal de Chagas unido covalentemente a un BODIPY, mostró rápidamente concentraciones elevadas del fluoróforo localizadas en los órganos en donde se aloja *Trypanosoma cruzi*, el parásito que causa dicha enfermedad, puesto que el fármaco mantenía su actividad antiparasitaria, constituye un ejemplo exitoso de teragnosis. Por otra parte, **96** mostró afinidad por las placas β -amiloides relacionadas a la enfermedad de Alzheimer, mostrando consecuentemente mayores intensidades fluorescentes en cerebros de ratones con este padecimiento, en comparación con los ratones silvestres.

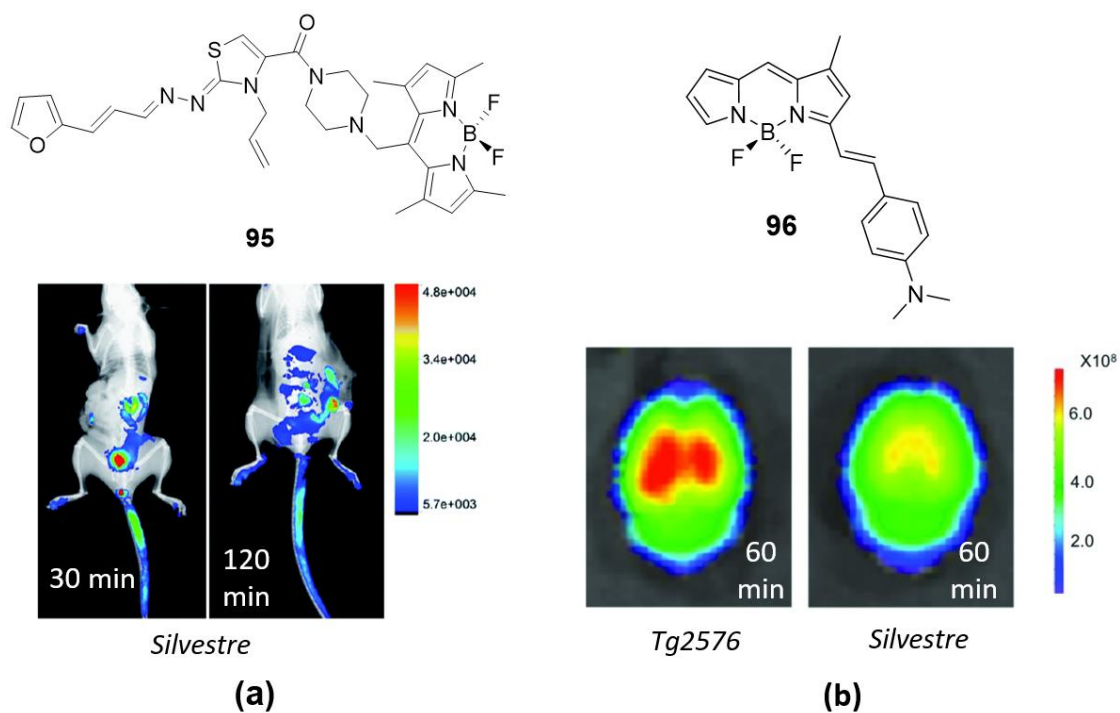


Figura 38. Ejemplos de aplicación de BODIPYs en la obtención de imágenes en sistemas de ratones silvestres o con Alzheimer (Tg2576) en experimentos (a) *in vivo* y (b) *ex vivo* (cerebro). Adaptado con permiso de las Referencias 77 y 78.

Más aún, muy recientemente se han reportado agentes teragnósticos para terapia contra cáncer basados en BODIPYs, permitiendo visualizar en tiempo real la localización y el tamaño de los tumores y al mismo tiempo producir muerte celular, mostrando resultados prometedores en ratones.^[79] A manera de ejemplo, en la Figura 39 se muestran los resultados de un experimento *in vivo*, en el que **97** resultó capaz de reducir significativamente el tamaño de tumores en ratones con cáncer cervical.^[79a]

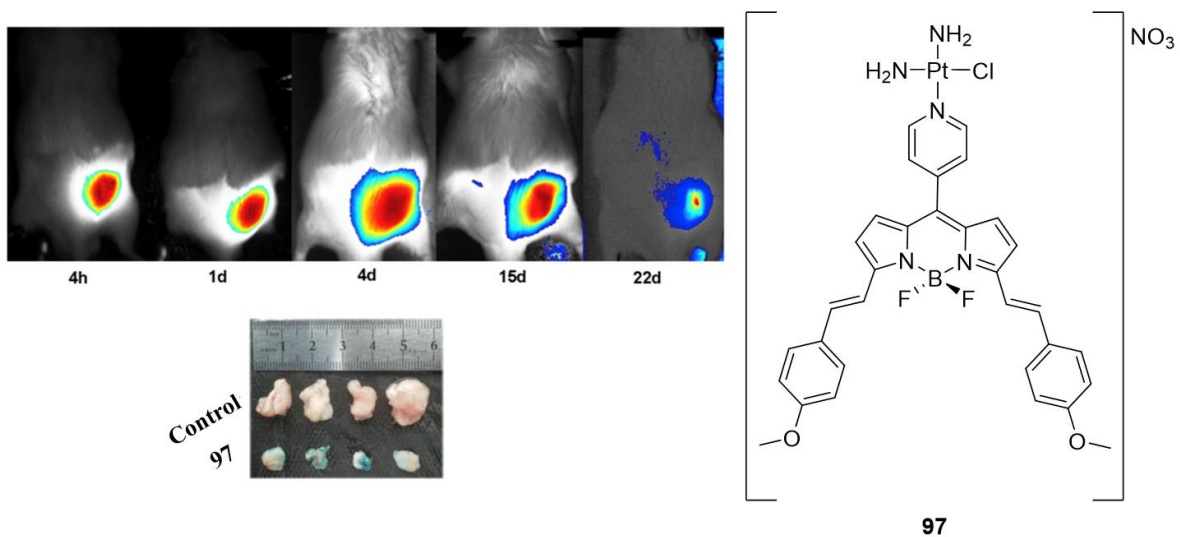


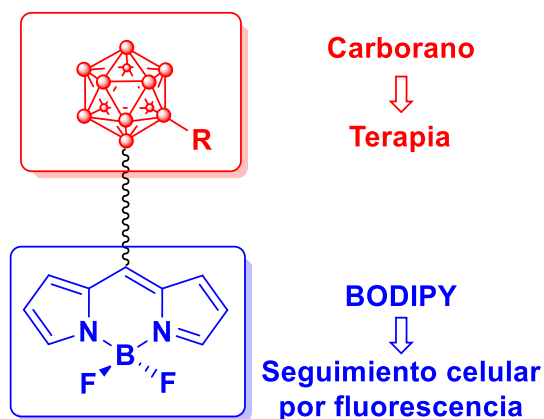
Figura 39. Monitoreo mediante espectroscopía de fluorescencia de la reducción del tamaño de tumores cervicales en ratones empleando un BODIPY como agente teragnóstico. Adaptado con permiso de la Ref. 79a.

2.3. HIPÓTESIS

Mediante el estudio de la influencia de variaciones en parámetros moleculares como la masa molecular, el momento dipolar y el coeficiente de partición sobre la permeabilidad celular y la localización subcelular de diversos conjugados BODIPY-carborano, será posible establecer una explicación para las marcadas diferencias en la incorporación celular que suelen presentar derivados de carboranos funcionalizados con diversos fluoróforos.

2.4. OBJETIVO

- Estudiar la influencia de variaciones en la masa molecular, el momento dipolar y el coeficiente de partición, sobre la permeabilidad celular y la distribución subcelular de un grupo de carboranos funcionalizados con BODIPYs, con posibles aplicaciones como agentes duales para terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) y como marcadores fluorescentes para el seguimiento de células *in vitro*.

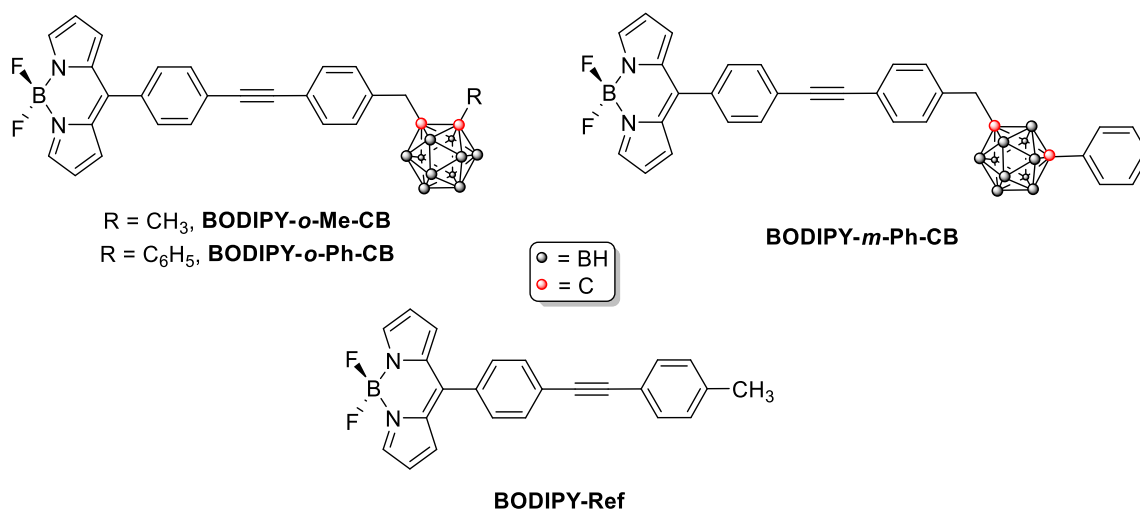


2.5. RESULTADOS

2.5.1. Diseño de los fluoróforos objetivo

Como se discutió en la Sección 2.1.3., de manera frecuente se han observado inesperadas e importantes variaciones en la permeabilidad celular de carboranos funcionalizados con fluoróforos, a pesar de poseer estructuras muy similares, incluso en muchos casos siendo la isomería presente en el carborano la única diferencia estructural.

La mayoría de las reglas empíricas para diseño de fármacos, como las de Lipinski^[80] y Ghose,^[81] coinciden en el peso molecular y la lipofilidad, en términos del coeficiente de partición octanol/agua ($\log P$), como factores críticos que determinan si un fármaco será capaz de permear o no al interior celular. Tomando esto en cuenta, decidimos investigar un grupo de carboranos funcionalizados con BODIPYs que nos permitiera evaluar el impacto de estas dos variables (peso molecular y $\log P$) sobre la permeabilidad celular. Los compuestos objetivo se muestran en el Esquema 39, donde **BODIPY-*o*-Me-CB** y **BODIPY-*o*-Ph-CB** tienen carboranos *orto*-sustituidos; para ellos, se espera que la variación del sustituyente R de metilo a fenilo provea un cambio en el peso molecular, sin alterar significativamente otros parámetros. Por otro lado, al pasar de **BODIPY-*o*-Ph-CB** a su isómero *meta*- (**BODIPY-*m*-Ph-CB**), el peso molecular permanece constante, pero se espera una diferencia muy importante en sus momentos dipolares, lo cual debe modular de forma sustancial el valor de $\log P$, de acuerdo con lo discutido en la Sección 2.1.1.



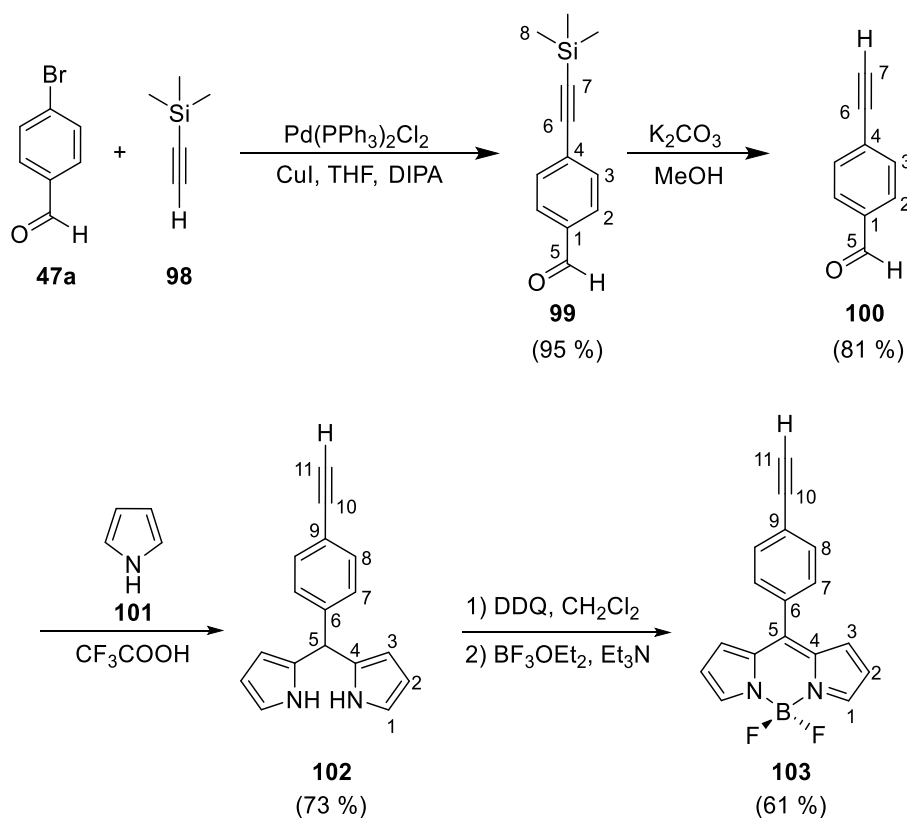
Esquema 39. Estructura de los compuestos objetivo.

Por lo tanto, estas comparaciones podrían ayudarnos a establecer la influencia, por separado, de estos parámetros sobre la permeabilidad celular de los compuestos. Finalmente, **BODIPY-Ref**, que no tiene un carborano, se incluyó como un compuesto de referencia para evaluar cómo los distintos carboranos introducidos afectan la permeabilidad celular del fluoróforo.

2.5.2. Síntesis y caracterización

La síntesis de los compuestos objetivo comenzó por la preparación del BODIPY **103**, siguiendo la ruta de síntesis presentada en el Esquema 40 que comenzó con un acoplamiento cruzado de Sonogashira entre 4-bromobenzaldehído (**47a**) y etiniltrimetilsilano (**98**), obteniéndose el aldehído sililado **99**^[87] con un rendimiento alto, el que después de una reacción de desprotección con K_2CO_3 produjo el aldehído acetilénico **100**^[88] con un rendimiento moderado, el cual fue tratado con un exceso de pirrol y catálisis ácida para dar lugar al dipirrometano **102**,^[89] el cual fue oxidado con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) y coordinado con BF_3OEt_2 en presencia de Et_3N para dar lugar al

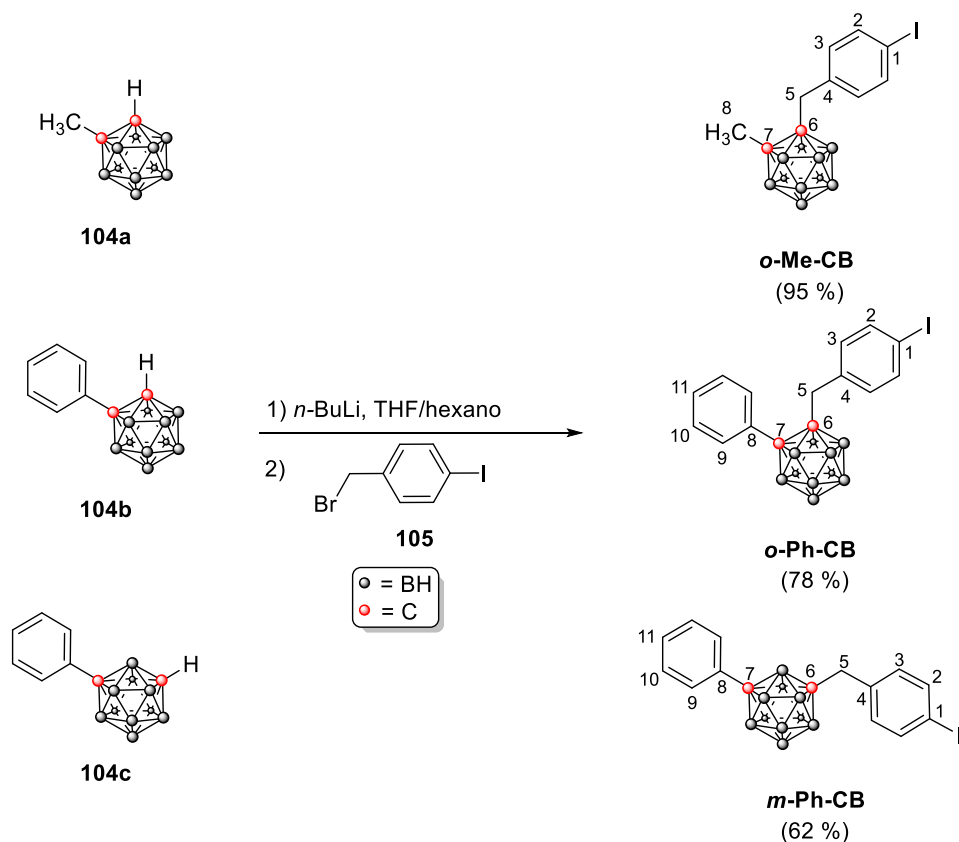
BODIPY **103**^[90] con rendimientos moderados. Con un rendimiento global de 34 %, la ruta de síntesis empleada representa una mejora sustancial con respecto a la única síntesis informada para este fluoróforo,^[90] con un rendimiento global de 8 % a partir de **99**. La identidad de este sintón se corroboró mediante RMN de ¹H, ¹³C, ¹⁹F y ¹¹B, encontrándose las señales características para el alquino terminal en $\delta = 3.26$ ppm (H-11) y $\delta = 82.51$ (C-10), 79.88 ppm (C-11), así como una señal triple en $\delta = 0.27$ ppm en el espectro de RMN-¹¹B y una señal cuádruple en $\delta = -145.04$ ppm en el espectro de RMN-¹⁹F, corroborando así la introducción del puente de BF₂ en **103**.



Esquema 40. Síntesis y numeración para el *meso*-(4-etinilfenil)-BODIPY (**103**).

Por otro lado, como se muestra en el Esquema 41, se sintetizaron los carboranos de partida *o*-Me-CB, *o*-Ph-CB y *m*-Ph-CB empleando una metodología previamente informada,^[82] que

consistió en una reacción de litiación de los carboranos comerciales **104a-c**; los intermediarios metalados correspondientes se hicieron reaccionar *in situ* con 4-bromometil-yodobenceno (**105**) como electrófilo para dar lugar a los carboranos yodados deseados en rendimientos moderados a buenos. La identidad de estos derivados fue corroborada mediante RMN- $^1\text{H}\{^11\text{B}\}$, con las señales de los anillos aromáticos apareciendo como señales múltiples en $\delta = 7.77 - 6.57$ ppm, la del metileno H-5 como una señal simple en $\delta = 3.40 - 3.05$ ppm y la de los hidruros de boro como señales múltiples y anchas en el intervalo $\delta = 2.91 - 2.10$ ppm. Los resultados espectroscópicos estuvieron en buen acuerdo con lo reportado previamente para estos compuestos.^[82]



Esquema 41. Síntesis y numeración para los carboranos de partida *o*-Me-CB, *o*-Ph-CB y *m*-Ph-CB.

Fue posible obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal para el compuesto ***m*-Ph-CB** (Figura 40), que no mostró diferencias significativas en ángulos o distancias de enlace al compararse con la estructura de su isómero *orto*- (***o*-Ph-CB**).^[82]

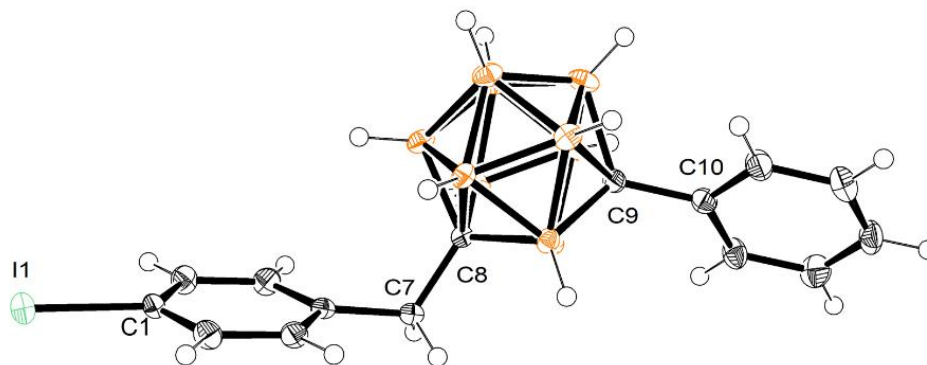
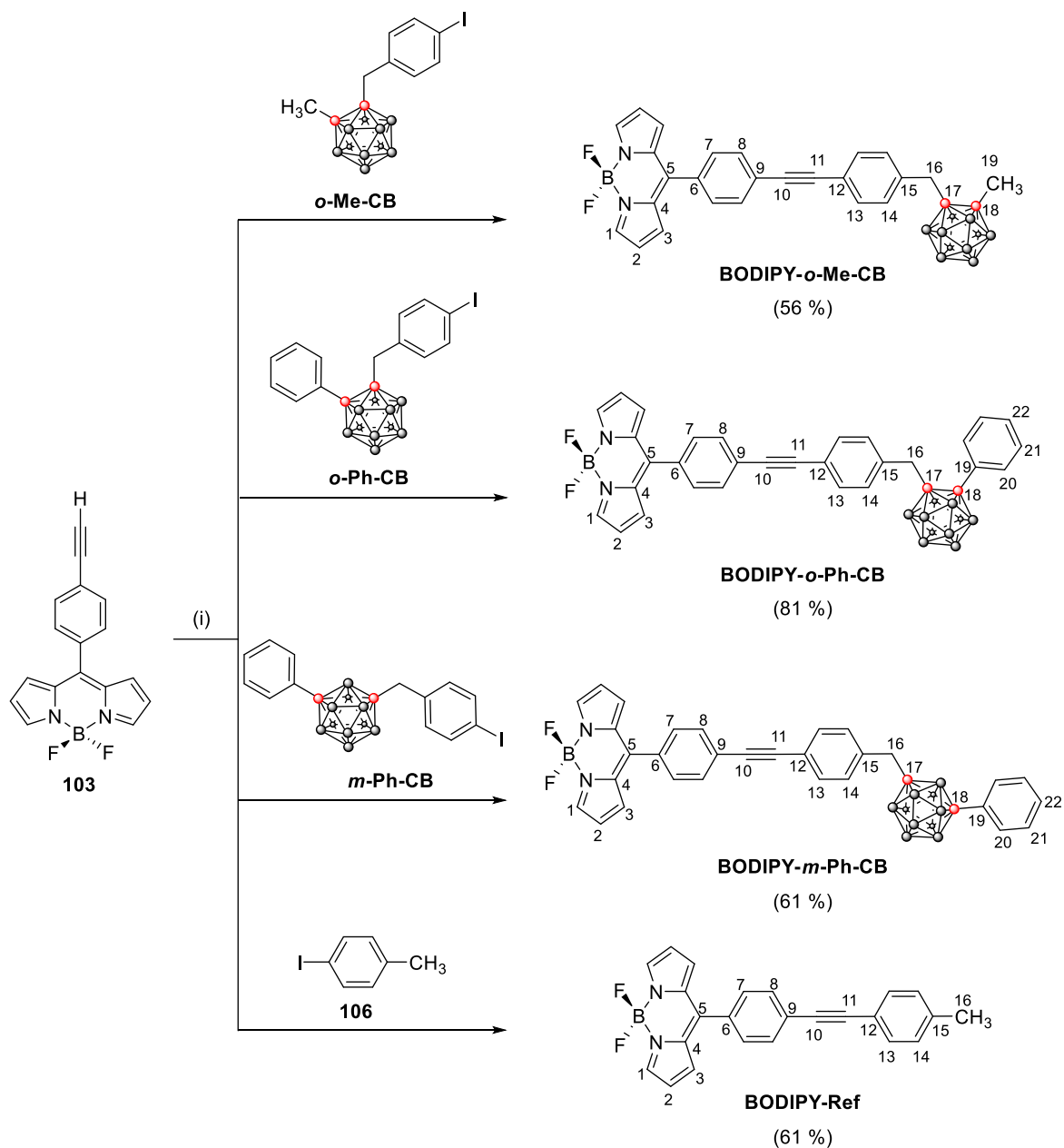


Figura 40. Estructura cristalina para ***m*-Ph-CB**. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad para todos los átomos distintos de hidrógeno. Ángulos seleccionados [°]: C7-C8 1.530(5), C8-B1 1.710(5), C9-B1 1.708(5), C9-C10 1.511(4), I1-C1 2.086(3).

Finalmente, los fluoróforos objetivo se obtuvieron mediante un acoplamiento cruzado de Sonogashira entre el **BODIPY 1** y ***o*-Me-CB**, ***o*-Ph-CB**, ***m*-Ph-CB** y 4-yodotolueno (**95**), como se muestra en el Esquema 42, obteniéndose los compuestos deseados en rendimientos moderados a buenos. La identidad de estos compuestos se estableció usando técnicas de RMN de ¹H, ¹³C, ¹¹B y ¹⁹F, así como EMAR. La asignación inequívoca de las señales de RMN de ¹H y ¹³C se realizó empleando técnicas de RMN bidimensionales, incluyendo experimentos de correlación homonuclear ¹H-¹H (COSY, NOESY) y heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC/HMBC).



Esquema 42. Síntesis y numeración para los BODIPYs objetivo. Reactivos y condiciones:

(i) Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, THF, Et₃N, reflujo.

Las señales de los hidruros de boro del cúmulo aparecen como señales múltiples anchas de $\delta = 1.74$ a 2.96 ppm debido a la presencia de acoplamiento $^1\text{H}-^{11}\text{B}/^1\text{H}-^{10}\text{B}$. Los hidrógenos alifáticos del metileno (H-16) aparecieron en $\delta = 3.12 - 3.49$ ppm, a frecuencias mayores a la de los hidrógenos del grupo metilo (H-6) en **BODIPY-Ref** ($\delta = 2.39$ ppm),

como se ejemplifica en la Figura 41, lo cual está en buen acuerdo con el efecto electroattractor de los boranos,^[83] explicando así la desprotección de estos núcleos. A pesar de que este efecto está presente en las resonancias de C-16, con $\delta = 21.55$ ppm para **BODIPY-Ref** y $\delta = 40.78$ - 43.01 ppm para los derivados con carboranos, los desplazamientos químicos de los anillos aromáticos no se vieron afectados, sugiriendo así un efecto electroattractor localizado y poca comunicación entre el núcleo del BODIPY y los cúmulos de boro. Esta observación se encuentra en buen acuerdo con las propiedades fotofísicas de estos compuestos, que se discuten en la Sección 2.4.3. y que muestran poca comunicación electrónica entre estos dos fragmentos submoleculares.

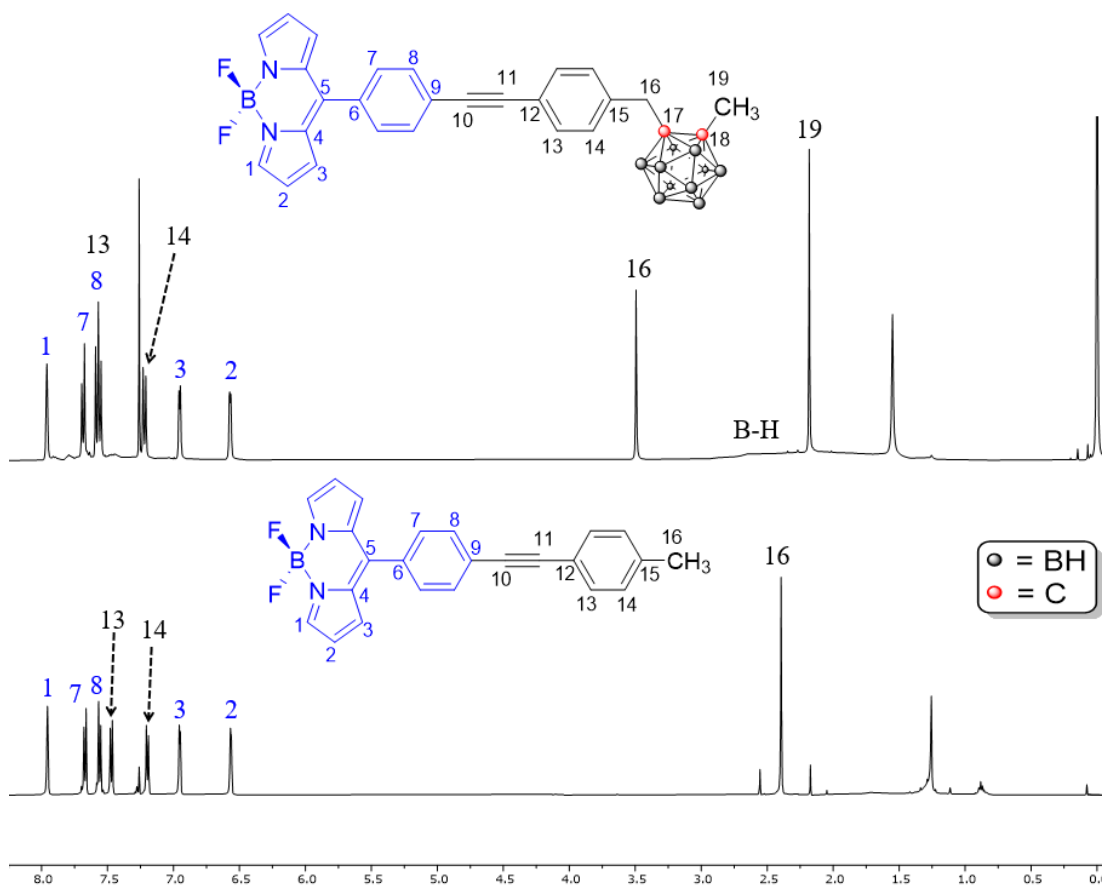


Figura 41. Comparación entre los espectros de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) para **BODIPY-*o*-Me-CB** (arriba) y **BODIPY-Ref** (abajo).

Fue posible obtener cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal para los fluoróforos objetivo, con lo cual se corroboró inequívocamente sus estructuras moleculares (Figura 42). Exceptuando a **BODIPY-Ref**, que cristalizó con una sola molécula por unidad asimétrica ($Z' = 1$), todos los demás BODIPYs cristalizaron con $Z' = 2$; mientras que en el caso de **BODIPY-*o*-Me-CB** la unidad asimétrica está compuesta por dos moléculas de fluoróforo geoméricamente cercanas, **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB** cristalizaron con una molécula del fluoróforo y una molécula desordenada de *n*-hexano, del proceso de cristalización.

En la Tabla 7 se muestran las distancias y ángulos de enlace relevantes para estas estructuras; como puede observarse, comparado con la estructura de ***m*-Ph-CB**, la introducción del fragmento BODIPY no alteró significativamente las distancias de enlace relacionadas al cúmulo de boro, con distancias de enlace entre los carbonos del cúmulo (C8-C9 para ***m*-Ph-CB**, C25-C26 para los demás) y los átomos de carbono directamente enlazados a estos permanecieron sin cambios, a pesar de que el núcleo de BODIPY es un grupo electroattractor fuerte, lo que se asocia comúnmente con la carga positiva deslocalizada en el esqueleto hidrocarbonado de su estructura tricíclica. Esta observación está en buen acuerdo con la falta de deslocalización electrónica entre los cúmulos de boro y los núcleos de BODIPY, como evidencian los resultados de RMN previamente mencionados y las propiedades fotofísicas de estos compuestos, que se discuten en la Sección 2.4.3.

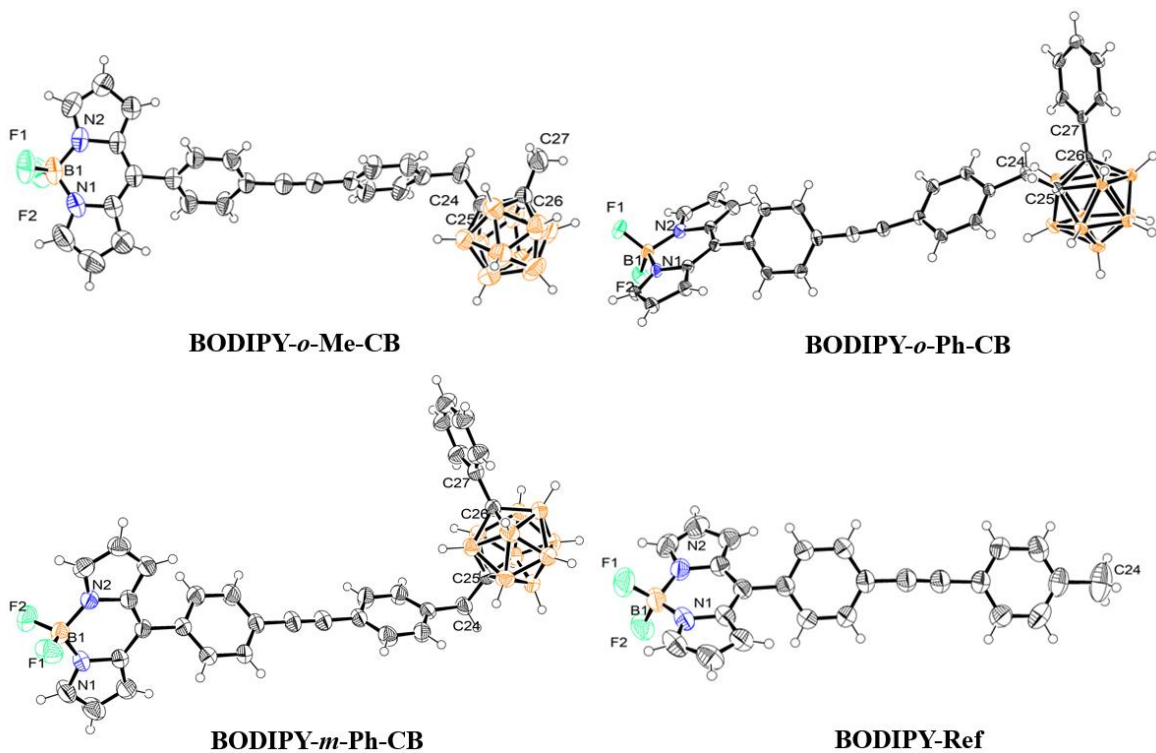


Figura 42. Estructura cristalina para los fluoróforos objetivo. Los elipsoides térmicos están dibujados al 50 % de probabilidad para todos los átomos distintos de hidrógeno. Por claridad, sólo se muestra una de las moléculas cristalográficamente independientes para **BODIPY-*o*-Me-CB**.

Tabla 7. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) representativos para los fluoróforos objetivo.

	BODIPY-Ref	BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB
B(1)-F(1)	1.380(2)	1.375(3)	1.3888(17)	1.386(3)
B(1)-F(2)	1.385(2)	1.382(3)	1.3779(18)	1.372(3)
B(1)-N(1)	1.531(3)	1.532(4)	1.5489(19)	1.527(4)
B(1)-N(2)	1.542(3)	1.537(4)	1.545(2)	1.536(4)
C(24)-C(25)	-	1.532(3)	1.5299(18)	1.530(3)
C(25)-C(26)	-	1.674(3)	1.7158(17)	2.673(4)
C(26)-C(27)	-	1.517(4)	1.5011(18)	1.508(3)
F(1)-B(1)-F(2)	108.29(15)	108.6(2)	109.91(11)	108.5(2)
N(1)-B(1)-N(2)	106.18(14)	106.4(2)	105.62(10)	106.7(2)

En este punto, dos estructuras de cristal merecen más atención. Como se mencionó anteriormente, tanto **BODIPY-*o*-Ph-CB** como **BODIPY-*m*-Ph-CB**, que difieren sólo en la posición de los átomos C anulares del carborano, cristalizaron con moléculas de *n*-hexano desordenadas en una relación BODIPY/*n*-hexano 2/1. No obstante, sus autoensamblajes son considerablemente divergentes, ya que se pueden observar entornos cristalográficos notablemente diferentes para las moléculas de *n*-hexano. Como se muestra en la Figura 43, en el caso del **BODIPY-*o*-Ph-CB**, las moléculas de disolvente están confinadas dentro de poros supramoleculares formados por la disposición antiparalela de pares de fluoróforos que se extienden a través del eje *a* cristalográfico; por el contrario, en el caso del **BODIPY-*m*-Ph-CB** las moléculas de *n*-hexano están muy estrechamente rodeadas por moléculas de fluoróforos. Es importante señalar que, mientras que en el isómero *orto*- no se observan contactos cercanos para las moléculas de disolvente, en el isómero *meta*- se encontraron 12 contactos cercanos disolvente-fluoróforo (menores que la suma de los radios de van der Waals). Esto sugiere que, mientras que en el primer caso las moléculas de *n*-hexano se mueven libremente a través de los canales supramoleculares, en el segundo caso las moléculas de disolvente están densamente atrapadas dentro de la red cristalina, lo que da lugar a estas interacciones supramoleculares.

Con el fin de proporcionar evidencia teórica acerca de las diferencias en la solvatación en estado sólido de estos compuestos, se estimaron, mediante cálculos de DFT al nivel de teoría M06-2X/6-311+G**, las energías libres de Gibbs (G°) asociadas a la reacción mostrada en la Ecuación 10.



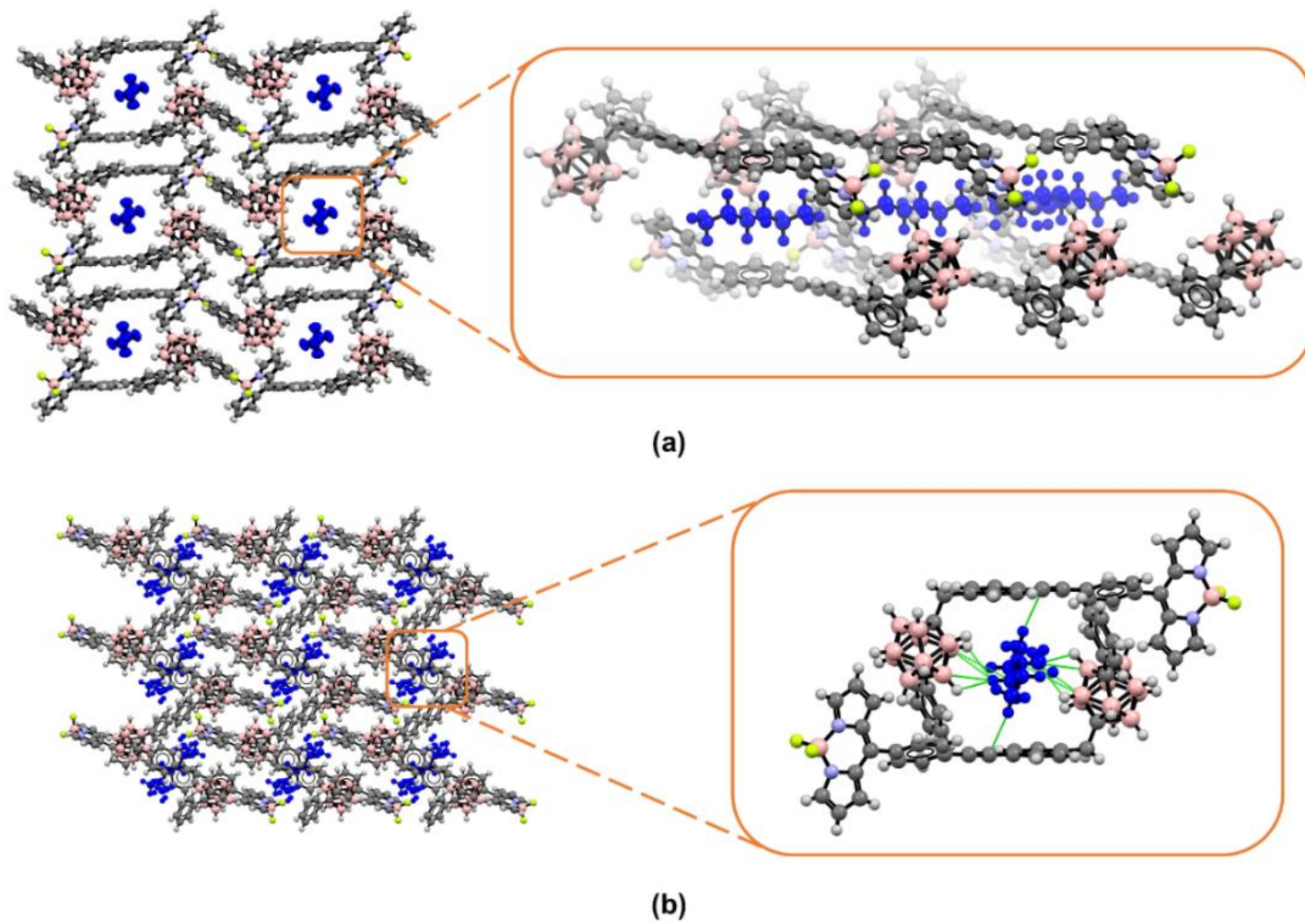


Figura 43. Proyecciones cristalográficas para (a) **BODIPY-*o*-Ph-CB** y (b) **BODIPY-*m*-Ph-CB** a lo largo de los ejes cristalográficos *a* y *b*, respectivamente. Las moléculas de *n*-hexano desordenadas se muestran en azul.

Es importante señalar que este enfoque se basa en una única interacción hexano-BODIPY (una molécula de hexano explícito bajo una simulación PCM con la constante dieléctrica del hexano). Por lo tanto, si bien puede permitir una explicación de las observaciones en las estructuras cristalinas, no es totalmente relevante para establecer el comportamiento completo de los diferentes isómeros en presencia de un disolvente, por lo que los resultados se analizaron detalladamente.

Las geometrías optimizadas para las asociaciones **BODIPY-*o*-Ph-CB**/hexano y **BODIPY-*m*-Ph-CB**/hexano se muestran en la Figura 44. Ambos modelos iniciales se construyeron asumiendo que la interacción de las moléculas de disolvente más cercanas con los fluoróforos, en estado sólido (datos de Rayos-X), pueden explicar la mayor parte de la interacción en disolución. Bajo tal suposición, ΔG° es igual a $+6.74 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $+2.42 \text{ kcal mol}^{-1}$, para **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB**, respectivamente. Por lo tanto, la afinidad por el *n*-hexano parece claramente reducida en el caso del isómero *orto*-, en buen acuerdo con las estructuras cristalinas.

Evidencia computacional adicional para explicar las diferentes interacciones fluoróforo/hexano mencionadas, fue obtenida comparando la polaridad relativa de **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB**, y por lo tanto de su afinidad con el hexano, mediante cálculos de DFT. Los momentos dipolares calculados son de 8.22 D y 4.86 D para **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB**, respectivamente. Estos valores confirman que la solvatación con un disolvente no polar (*n*-hexano) es menos favorable para el fluoróforo más polar (**BODIPY-*o*-Ph-CB**). Como se discute a detalle más adelante (Sección 2.4.4.), estas observaciones en estado sólido correlacionan bien con los mayores valores de $\log P$

observados para **BODIPY-*m*-Ph-CB** en comparación con el isómero *orto*-, indicando una afinidad mayor por disolventes no polares. Aunque formalmente no es posible una comparación directa, ya que los experimentos de Rayos-X y las mediciones de $\log P$ se realizan en diferentes fases, no es sorprendente descubrir que el isómero más lipofílico **BODIPY-*m*-Ph-CB** interactúa con moléculas de *n*-hexano no polares mientras que para **BODIPY-*o*-Ph-CB** las moléculas de *n*-hexano permanecen aisladas de los cúmulos.

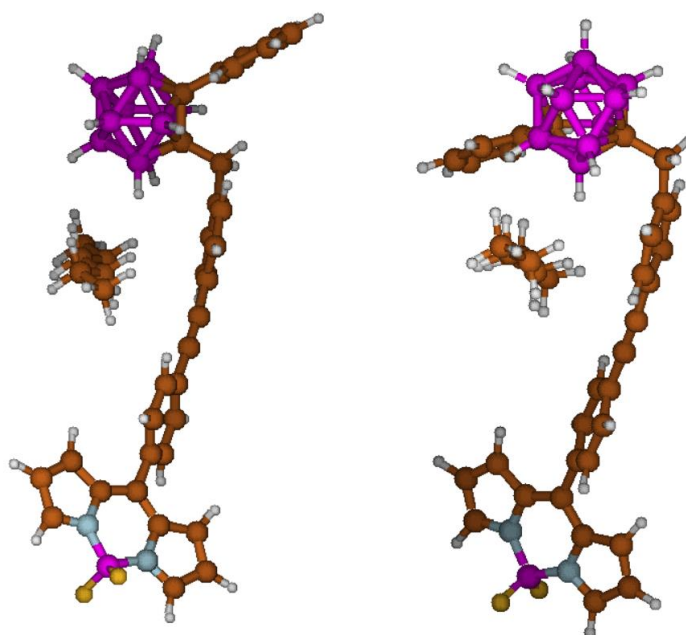


Figura 44. Geometrías calculadas para **BODIPY-*o*-Ph-CB** (izquierda) y **BODIPY-*m*-Ph-CB** (derecha) con una molécula de *n*-hexano.

2.5.3. Propiedades fotofísicas

Las propiedades fotofísicas de los compuestos objetivo se estudiaron mediante espectroscopías UV-Visible y de fluorescencia, los resultados se muestran en la Figura 45 y en la Tabla 8, donde se puede observar que aunque hay algunas variaciones en los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos fluorescentes (Φ_F), la forma y las

energías asociadas a las transiciones electrónicas permanecen prácticamente inalteradas independientemente del sustituto en los carbonos del cúmulo (metilo/fenilo) o del isómero de cúmulo introducido, en comparación con **BODIPY-Ref**. Por otro lado, tanto los datos de cálculo como los experimentales coinciden bien con la observación de tres máximos de absorción locales situados alrededor de $\lambda = 500, 380$ y 280 nm, que, como se muestra en la Figura 46, están asociados a transiciones con carácter HOMO→LUMO, HOMO-1→LUMO y HOMO-1→LUMO+1. La longitud de onda de los máximos de emisión de todos los compuestos se encuentra cercana a $\lambda = 520$ nm bajo irradiación a $\lambda = 450$ nm, independientemente del tipo carborano introducido, lo que sugiere que no existe una comunicación electrónica importante entre el BODIPY y el cúmulo de boro. Es importante señalar, sin embargo, que los valores de Φ_F encontrados permiten el uso de estos fluoróforos en el estudio de células *in vitro* por microscopía confocal.

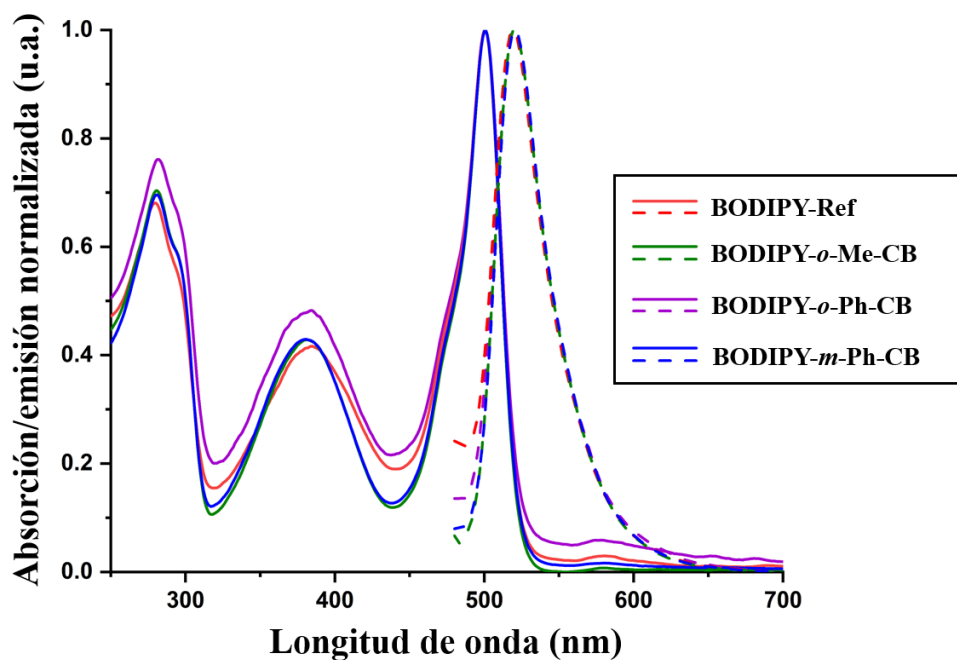


Figura 45. Espectros normalizados de absorción (líneas sólidas) y emisión (líneas discontinuas) en etanol para los BODIPYs objetivo (1×10^{-5} M, temp. ambiente).

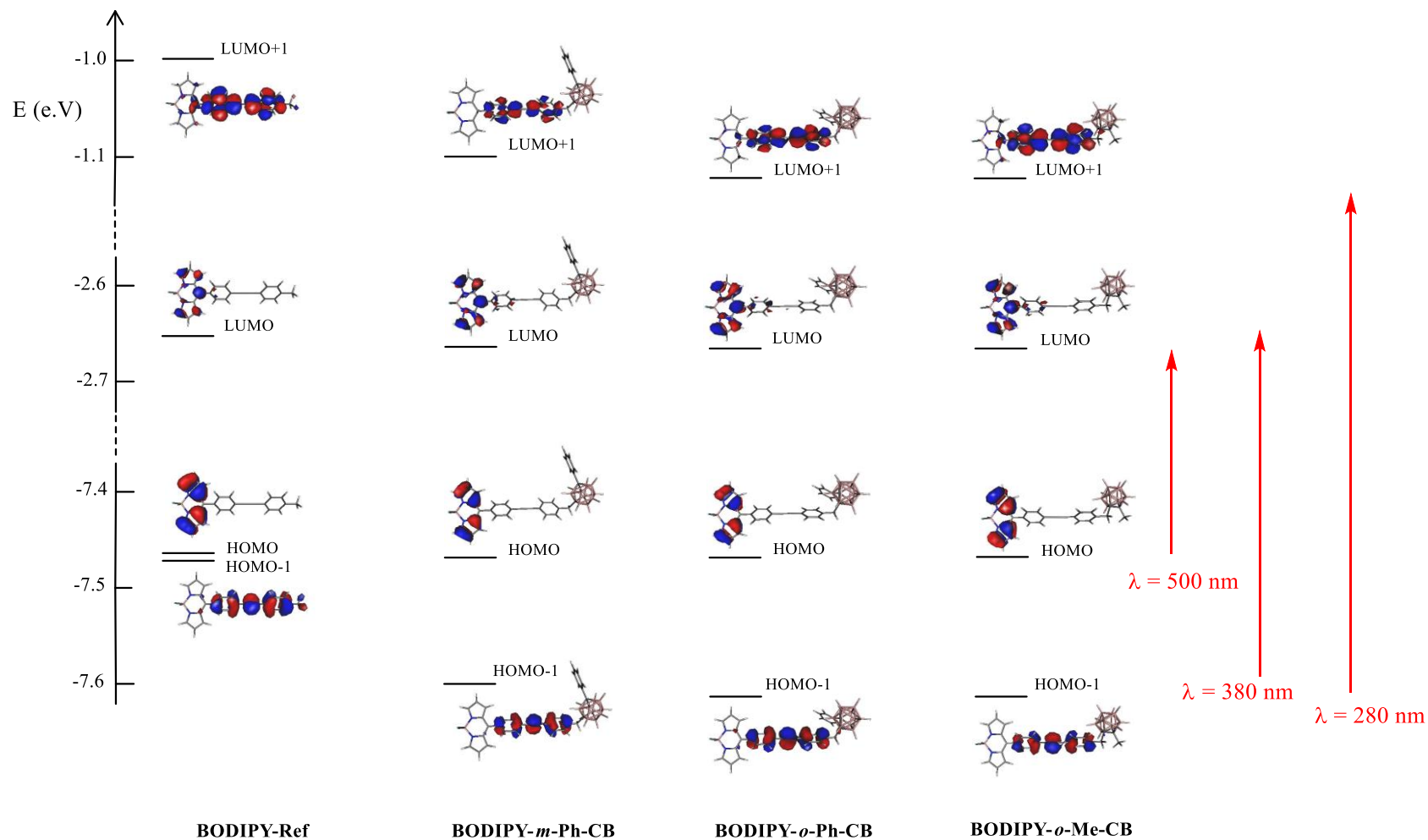


Figura 46. Principales transiciones electrónicas involucradas en los tres máximos de absorción locales para los fluoróforos objetivo. Calculadas en etanol al nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p).

Tabla 8. Datos experimentales y calculados (M06-2X/6-311+G**) de UV-Visible y espectroscopía de fluorescencia para los fluoróforos objetivo. Tanto los resultados teóricos como los experimentales fueron medidos o calculados en etanol.

	UV-Vis			TD-DFT			λ_{em} (nm)	Φ_f^a
	λ_{max} (nm) [ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)]			λ_{max} (nm) [f]				
BODIPY-Ref	280 [94309]	381 [35036]	501 [137908]	275 [0.770]	374 [0.792]	425 [0.510]	519	0.0068
BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	280 [127502]	381 [59536]	501 [178213]	275 [0.870]	367 [0.886]	426 [0.505]	520	0.0108
BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	280 [53213]	381 [79293]	501 [69151]	275 [0.829]	367 [0.884]	426 [0.505]	520	0.0120
BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	280 [114067]	381 [71390]	501 [163988]	275 [0.839]	368 [0.876]	426 [0.502]	521	0.0060

^a Obtenido por irradiación a $\lambda = 450$ nm, usando Rodamina B como estándar con $\Phi_f = 0.5$ en etanol.^[84]

2.5.4. Incorporación celular y localización intracelular

La distribución subcelular de los fluoróforos se estudió en cultivos de células HeLa (cáncer cervical) las cuales fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C en presencia de los fluoróforos (10 μ M); los cultivos fueron subsecuentemente analizados por microscopía confocal con lecturas en los canales verde ($\lambda_{exc} = 486$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm) y rojo ($\lambda_{exc} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm). Como se muestra en la Figura 47a-b, **BODIPY-Ref** y **BODIPY-*m*-Ph-CB** mostraron las mejores características de permeabilidad y localización en esta línea celular; es importante señalar que, dado que ambos fluoróforos presentaron los valores más bajos de Φ_f , la mayor intensidad fluorescente observada dentro de las células en las microscopías confocales necesariamente implica una eficiencia mucho mayor en la incorporación de estos fluoróforos al interior celular. Contrastantemente, los derivados *orto*- (**BODIPY-*o*-Me-CB** y **BODIPY-*o*-Ph-CB**) mostraron un ingreso celular muy pobre, que

experimentalmente se observó como una fuerte aglomeración (nucleación) en la superficie de las células. Mediante ensayos “low-dose”, esto es, incrementando lentamente la concentración de los derivados *orto*- de 1 a 10 μM , se logró observar una mejor incorporación celular (Figura 47c-d). Mientras que **BODIPY-*o*-Me-CB** mostró una distribución citosólica con una aglomeración de partículas todavía sutil (sin afinidad con la membrana), **BODIPY-*o*-Ph-CB** presentó una localización en la membrana perinuclear, aunque no específica. Es importante señalar que **BODIPY-*m*-Ph-CB** tiene excelentes características de distribución fluorescente, con afinidad por la membrana plasmática en una amplia gama de concentraciones de fluoróforo (10 a 40 μM), sin tener casi ninguna variación en dicha distribución subcelular. En la Figura anexa S86 se incluye una comparación entre la localización subcelular de **BODIPY-*m*-Ph-CB** y la del localizador de membrana plasmática comercial CellMask®, mostrando distribuciones subcelulares muy similares. Remarcablemente, **BODIPY-Ref** también exhibió una interesante permeabilidad celular con una localización no específica en la zona perinuclear. Además, este fluoróforo fue capaz de localizarse específicamente en vesículas apoptóticas y vesículas celulares en ensayos con estrés oxidativo celular inducido a través de un estímulo del cultivo con H_2O_2 ,^[85] resultando en vesículas bien contrastadas bajo la iluminación del canal verde, confirmando así la fuerte afinidad de este fluoróforo por estructuras celulares membranales.

En resumen, se encontraron comportamientos muy diferentes para los cuatro fluoróforos estudiados, con **BODIPY-Ref** y **BODIPY-*m*-Ph-CB** mostrando un excelente ingreso celular y una afinidad importante por estructuras membranales, comparables a marcadores de membrana comerciales. Contrastantemente, **BODIPY-*o*-Me-CB** y **BODIPY-*o*-Ph-CB** mostraron una permeabilidad muy pobre, con poca o nula afinidad por estructuras

membranales. Resulta evidente que existe una influencia importante de la estructura de los fluoróforos sobre su permeabilidad al interior celular, en buena concordancia con estudios previos discutidos en la Sección 2.1.3., que han mostrado que cambios sutiles en la estructura molecular, particularmente en la isomería (*orto-/meta-*) del cúmulo, producen cambios drásticos, no explicados hasta ahora, sobre la permeabilidad de los fluoróforos.

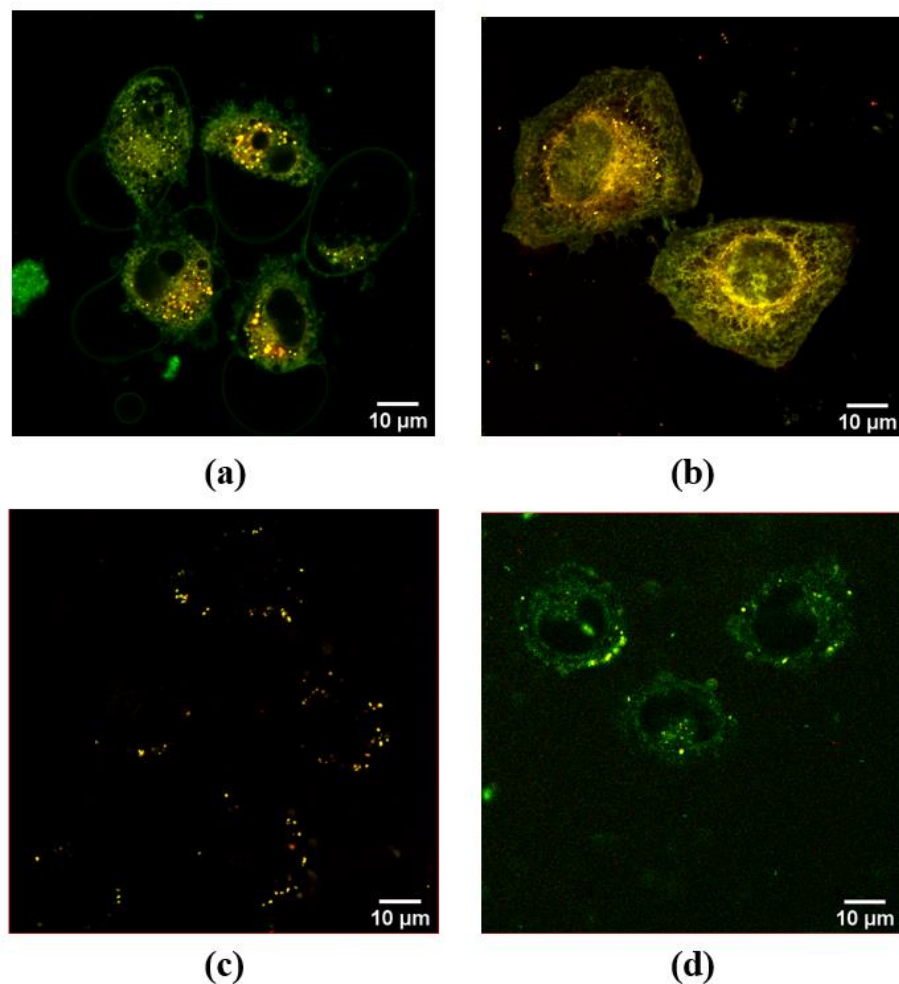


Figura 47. Microscopía confocal de células HeLa vivas tratadas con (a) **BODIPY-Ref** (b) **BODIPY-*m*-Ph-CB** (c) **BODIPY-*o*-Me-CB** y (d) **BODIPY-*o*-Ph-CB** a una concentración 10 μM. Las imágenes fueron tomadas después de 30 minutos de incubación y se obtuvieron por sobreposición de los canales verde ($\lambda_{exc} = 486$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm) y rojo ($\lambda_{exc} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm).

En la Tabla 9 se muestran las masas moleculares de los fluoróforos, así como sus momentos dipolares calculados al nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) y sus coeficientes de partición ($\log P$), determinados a partir de mezclas octanol/agua mediante mediciones de la intensidad fluorescente en ambas fases, siguiendo un protocolo informado.^[86] Estos parámetros se determinaron con la intención de proveer una explicación a las divergentes permeabilidades celulares que presentaron los fluoróforos, tomando en cuenta que, como se discutió en la Sección 2.4.1., diversas reglas empíricas coinciden en estos parámetros como decisivos para que un fármaco sea o no permeable al medio intracelular, estando favorecidas moléculas con altas lipofilicidades y masas moleculares bajas. De los datos presentados para los compuestos estudiados, resulta evidente que en este caso la masa molecular no tuvo un papel decisivo, puesto que **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB**, con masas idénticas, mostraron permeabilidades muy diferentes. El parámetro que sí tuvo un rol decisivo en el grupo de fluoróforos estudiados fue $\log P$, ya que los compuestos con los valores más altos (**BODIPY-Ref** y **BODIPY-*m*-Ph-CB**) mostraron las mayores permeabilidades al interior celular, lo cual se puede explicar razonablemente como una consecuencia de una mejor interacción con las bicapas lipídicas que forman las estructuras membranales en las células, con las que este par de fluoróforos hidrofóbicos tendrían mayor afinidad.

Desde un punto de vista estructural, las diferencias en $\log P$ para todos los fluoróforos correlaciona satisfactoriamente con los cambios en sus momentos dipolares, siendo que a mayor momento dipolar, disminuye $\log P$ y con ello la lipofilicidad del fluoróforo y su permeabilidad celular. Notablemente, estas observaciones constituyen evidencia adicional para explicar los autoensamblajes divergentes en las estructuras cristalinas de **BODIPY-*m*-Ph-CB** y su isómero *orto*-, para el primero de los cuales se encontró una afinidad por una

molécula de *n*-hexano (no polar), que está ausente en su isómero *orto*-, como se discutió en la Sección 2.4.2.

Tabla 9. Coeficientes de partición ($\log P$), momentos dipolares (μ) y masas moleculares para los fluoróforos objetivo.

	$\log P^a$	μ (D) ^b	Masa molecular (Da)
BODIPY-Ref	0.324	8.29	383.21
BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	-0.166	10.07	538.46
BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	-0.211	8.22	600.52
BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	0.677	4.86	600.52

^aObtenidos usando un protocolo de partición octanol/agua^[86] ^bCalculados al nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p).

Finalmente, resulta imprescindible señalar que, aunque el conjunto de evidencias encontradas en este estudio demuestran que las variaciones en $\log P$ (y no en la masa molecular) explican el origen de las divergentes permeabilidades celulares y localizaciones subcelulares para los fluoróforos estudiados, es necesario extender estos estudios a un mayor número de carboranos fluorescentes para correlacionar un intervalo mayor de valores de $\log P$ y momentos dipolares con la permeabilidades al interior celular. De esta manera, mediante la estimación computacional del momento dipolar estático de una molécula, podría eventualmente guiarse el diseño de moléculas con potencial uso en BNCT y que a la vez cuenten con permeabilidades celulares óptimas y puedan ser seguidos, además, mediante espectroscopía de fluorescencia.

2.6. CONCLUSIÓN

La eficiencia en el ingreso celular y la localización subcelular de un conjunto de carboranos funcionalizados con un BODIPY fueron investigados por microscopía confocal en células HeLa vivas, mostrando comportamientos marcadamente divergentes para moléculas estructuralmente similares. La justificación de estas diferencias se proporcionó a partir de una detallada caracterización estructural y físico-química de estos cúmulos, apoyada por una combinación de mediciones experimentales y cálculos teóricos de DFT. En conjunto, nuestros resultados muestran que las diferencias en el ingreso celular y la distribución subcelular de los fluoróforos se originan en una importante variación en sus momentos dipolares y sus coeficientes de partición, lo que modula la capacidad de estas moléculas para interactuar con los microambientes lipofílicos de las células.

2.7. PARTE EXPERIMENTAL

2.7.1. Consideraciones generales

Todos los materiales de partida fueron obtenidos de casas comerciales y usados como fueron recibidos; los disolventes empleados fueron de grado analítico. A menos de que se indique lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones atmosféricas y de iluminación convencionales. Las purificaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre SiO₂; después de la elución con un sistema de disolventes adecuado, los productos se aislaron por evaporación a sequedad de la fracción principal a presión reducida. Los espectros de RMN-¹H se registraron en equipos Jeol ECA 500, Varian MR-400 y Bruker ARX 300 a 298 K usando disolventes deuterados; los desplazamientos químicos para ¹H y ¹³C son relativos a la señal residual del disolvente no deuterado fijada en $\delta = 7.26$ ppm (CDCl₃) para RMN-¹H

y $\delta = 77.00$ ppm (CDCl_3) para $\text{RMN-}^{13}\text{C}$. Los experimentos de $\text{RMN-}^{11}\text{B}$ y $\text{RMN-}^{19}\text{F}$ se realizaron empleando BF_3OEt_2 y CFCl_3 como referencias externas, respectivamente. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz. Los datos de espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) fueron adquiridos en un equipo Agilent G1969A MS-TOF. Los espectros de absorción y emisión fueron adquiridos a temperatura ambiente en celdas de cuarzo, utilizando equipos Varian Cary-50 y HORIBA FluoroMax, respectivamente.

2.7.2. Síntesis

4-((trimetilsilil)etiniz)benzaldehído (99).^[87] A una disolución de 4-bromobenzaldehído (**47a**) (2 g, 10.86 mmol), CuI (0.21 g, 10 mol %), Pd(PPh_3) $_2\text{Cl}_2$ (0.38 g, 5 mol %) en THF (60 mL) se añadió etiniltrimetilsilano (**98**) (3.1 mL, 21.4 mmol) y ($i\text{Pr}$) $_2\text{NH}$ (2.5 mL, 17.84 mmol) gota a gota. Después de calentarse a reflujo durante 3 horas con agitación magnética, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo negro resultante se redisolvió en cloruro de metileno (80 mL), se lavó con $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{ac})}$ saturado (2 x 30 mL), salmuera (2 x 30 mL) y agua (2 x 30 mL); la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad bajo presión reducida. La reacción se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla hexano/acetato de etilo 98/2 como eluyente para rendir 2.1 g (10.317 mmol, 95 %) de **99** como un sólido blanco. **RMN- ^1H** δ (400 MHz, CDCl_3): 10.00 (s, 1H, H-5), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2), 7.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3), 0.27 (s, 9H, H-8). **RMN- ^{13}C** δ (100 MHz, CDCl_3): 182.38 (C-5), 143.72 (C-1), 135.76 (C-2), 133.08 (C-3), 132.43 (C-4), 104.58 (C-6), 96.32 (C-7), -0.48 (C-8).

4-etinilbenzaldehído (100).^[88] Una disolución de **99** (2 g, 9.88 mmol) y K_2CO_3 (0.24 g, 1.75 mmol) en metanol (20 mL) se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se vertió sobre agua con hielo (300 mL). El sólido café resultante se colectó y lavó con agua (3 x 75 mL). La reacción se purificó por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 965.7 mg (7.42 mmol, 75 %) de **100** como un sólido beige. **RMN-¹H** δ (400 MHz, $CDCl_3$): 10.02 (s, 1H, H-5), 7.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3), 3.29 (s, 1H, H-7). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, $CDCl_3$): 191.34 (C-5), 135.91 (C-1), 132.67 (C-2), 129.45 (C-3), 82.59 (C-6), 81.04 (C-7).

Meso-(4-etinilfenil)-dipirrometano (102).^[89] A una disolución de **100** (0.94 g, 7.26 mmol) en pirrol (**101**, 30 mL) se añadió ácido trifluoroacético (0.09 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 45 minutos. La mezcla de reacción se vertió sobre agua/hielo (150 mL), se extrajo con cloruro de metileno (2 x 75 mL), la fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El pirrol residual se removió por co-distilación con metanol y hexano a 70 °C bajo presión reducida. La reacción se purificó por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo 9/1 como eluyente para rendir 1.31 g (5.29 mmol, 73 %) de **102** como un sólido amarillo claro. **RMN-¹H** δ (400 MHz, $CDCl_3$): 7.88 (s, 2H, NH), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-8), 7.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-7), 6.69 (td, $J = 2.6, 1.6$ Hz, 2H, H-1), 6.18 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H, H-2), 5.91 (dddd, $J = 3.4, 2.5, 1.5, 0.9$ Hz, 2H, H-3), 5.46 (s, 1H, H-5), 3.07 (s, 1H, H-11). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, $CDCl_3$): 143.07 (C-6), 132.50 (C-7), 131.99 (C-4), 128.52 (C-8), 120.85 (C-9), 117.59 (C-1), 108.66 (C-2), 107.57 (C-3), 83.57 (C-10), 77.38 (C-11), 43.94 (C-5).

Meso-(4-etinilfenil)-BODIPY (103).^[90] A una disolución de **102** (1.03 g, 4.19 mmol) en cloruro de metileno seco (50 mL) se agregó DDQ (1.05 g, 4.61 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 45 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió a 0 °C seguido por la adición de trietilamina (1.3 mL) y BF₃OEt₂ (5.7 mL, 46 mmol) gota a gota. La reacción se calentó a reflujo por 2 horas más y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de verter la mezcla sobre agua/hielo (100 mL), se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 75 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente para rendir 0.75 g (2.57 mmol, 61 %) de **103** como un sólido rojo. **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.95 (s, 2H, H-1), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-7), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-8), 6.91 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H-3), 6.56 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, H-2), 3.26 (s, 1H, H-11). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 146.15 (C-5), 144.48 (C-1), 134.69 (C-4), 134.02 (C-9), 132.11 (C-8), 131.37 (C-3), 130.40 (C-7), 124.85 (C-6), 118.76 (C-2), 82.51 (C-10), 79.88 (C-11). **RMN-¹¹B** δ (128 MHz, CDCl₃): 0.27 (t, *J* = 29.0 Hz). **RMN-¹⁹F** δ (376 MHz, CDCl₃): -145.04 (q, *J* = 29.0 Hz).

Yoduro de 4-(1-metil-carboran-2-il)bencilo (*o*-Me-CB).^[82] A un matraz de fondo redondo que contenía una disolución fría (0 °C) de 1-metil-1,2-carborano (**104a**) (0.16 g, 1.025 mmol) en THF (7.5 mL) se agregó *n*-BuLi (0.9 mL, 1.47 M) gota a gota y la reacción se agitó bajo atmósfera de argón durante 1 hora, seguido por la adición de 4-bromometil-yodobenceno (**105**) (0.30 g, 1.025 mmol) en THF (3.0 mL). La mezcla se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente, se vertió sobre salmuera (100 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo 95/5 como

eluyente para rendir 362.9 mg (0.97 mmol, 95 %) de ***o*-Me-CB** como un sólido blanco. **RMN-¹H{¹¹B}** δ (300 MHz, CDCl₃): 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3), 3.40 (s, 2H, H-5), 2.15 (s, 3H, H-8), 2.33 – 2.11 (m, 10H, B-H).

Yoduro de 4-(1-fenil-carboran-2-il)bencilo (*o*-Ph-CB).^[82] Preparado como se describe arriba para ***o*-Me-CB** a partir de 1-fenil-1,2-carborano (**104b**). Rendimiento: 78 %. **RMN-¹H{¹¹B}** δ (300 MHz, CDCl₃): 7.77 – 7.68 (m, 2H, H-2), 7.65 – 7.42 (m, 5H, H-9/H-10/H-11), 6.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3), 3.05 (s, 2H, H-5), 2.91 – 2.10 (m, 10H, B-H).

Yoduro de 4-(1-fenil-carboran-3-il)bencilo (*m*-Ph-CB).^[82] Preparado como se describe arriba para ***o*-Me-CB** a partir de 1-fenil-1,3-carborano (**104c**). Rendimiento: 62 %. **RMN-¹H{¹¹B}** δ (300 MHz, CDCl₃): 7.68 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H-2), 7.39 (d, 2H, *J* = 6 Hz, H-9), 7.33 – 7.23 (m, 3H, H-10/H-11), 6.90 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H-3), 3.24 (s, 2H, H-5), 2.90 – 2.22 (m, 10H, BH).

Síntesis de los BODIPYs objetivo.

A un matraz de fondo redondo que contenía el BODIPY **103** (1 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.05 mmol), CuI (0.1 mmol) y un yoduro de carboranilbencilo (***o*-Me-CB**, ***o*-Ph-CB**, ***m*-Ph-CB**) o 4-yodotolueno (**106**) (1 mmol), se agregó THF (30 mL) y trietilamina (30 mL) gota a gota. La mezcla se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente, se calentó a reflujo durante 2 horas y se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo resultante se redisolvió en cloruro de metileno (100 mL), se lavó con NH₄Cl_(ac) saturado (3 x 40 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad a presión reducida. La reacción se purificó por cromatografía en columna usando mezclas hexano/acetona como eluyente para rendir los compuestos objetivo como sólidos naranjas a rojizos.

BODIPY-*o*-Me-CB. Sólido rojo. Rendimiento: 154 mg (56 % a partir de 0.51 mmol de **103**). **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.96 (s, 2H, H-1), 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-8), 7.61 – 7.48 (m, 4H, H-7, H-13), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, H-3), 6.57 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H, H-2), 3.49 (s, 2H, H-16), 2.18 (s, 3H, H-19), 2.64 - 1.89 (m, 10H, B-H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 146.34 (C-5), 144.35 (C-1), 135.59 (C-15), 134.69 (C-4), 133.60 (C-9), 131.91 (C-13), 131.59 (C-8), 131.39 (C-3), 130.57 (C-7), 130.47 (C-14), 125.90 (C-6), 122.56 (C-12), 118.74 (C-2), 91.48 (C-11), 89.15 (C-10), 77.20 (C-18), 74.79 (C-17), 41.04 (C-16), 23.71 (C-19). **RMN-¹¹B** δ (128 MHz, CDCl₃): -0.69 (t, $J = 28.8$ Hz, 1B, BF₂), -5.61 (d, $J = 270.5$ Hz, 4B, BH), -9.13 – -12.58 (m, 6B, BH). **RMN-¹⁹F** δ (376 MHz, CDCl₃): -144.89 (q, $J = 28.8$ Hz). **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para C₂₇H₂₉B₁₁N₂F [M⁺-F]⁺: 521.3338. Encontrado: 521.3356. Error: 3.45 ppm.

BODIPY-*o*-Ph-CB. Sólido rojo. Rendimiento: 248 mg (81 % a partir de 0.51 mmol de **103**). **RMN-¹H** δ (400 MHz, CDCl₃): 7.96 (s, 2H, H-1), 7.75 – 7.70 (m, 2H, H-20), 7.68 – 7.65 (m, 2H, H-8), 7.57 (dt, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 2H, H-7), 7.55 – 7.52 (m, 1H, H-22), 7.50 – 7.47 (m, 2H, H-21), 7.44 (dt, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2H, H-13), 6.95 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H, H-3), 6.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-14), 6.58 – 6.55 (m, 2H, H-2), 3.12 (s, 2H, H-16), 2.96 – 1.95 (m, 10H, BH). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, CDCl₃): 146.35 (C-5), 144.34 (C-1), 135.84 (C-15), 134.71 (C-4), 133.56 (C-9), 131.67 (C-13), 131.56 (C-8), 131.48 (C-20), 131.37 (C-3), 130.95 (C-22), 130.70 (C-19), 130.55 (C-7), 130.19 (C-14), 129.11 (C-21), 125.95 (C-6), 122.30 (C-12), 118.70 (C-2), 91.59 (C-11), 89.01 (C-10), 83.70 (C-18), 81.45 (C-17), 40.78 (C-16). **RMN-¹¹B** δ (128 MHz, CDCl₃): -0.69 (t, $J = 28.9$ Hz, 1B, BF₂), -4.29 (br s, 2B, BH), -8.99 – -15.94 (m, 8B, BH). **RMN-¹⁹F** δ (376 MHz, CDCl₃): -144.90 (q, $J = 28.9$ Hz). **EMAR** (ESI-TOF⁺)

m/z calculado para $C_{32}H_{31}B_{11}N_2F [M^+-F]^+$: 583.3495. Encontrado: 583.3519. Error: 4.11 ppm.

BODIPY-*m*-Ph-CB. Sólido naranja. Rendimiento: 73 mg (61 % a partir de 0.2 mmol de **103**). **RMN-¹H** δ (400 MHz, $CDCl_3$): 7.96 (s, 2H, H-1), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-8), 7.55 (dd, $J = 15.4, 8.3$ Hz, 4H, H-7, H-13), 7.36 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 2H, H-20), 7.29 – 7.23 (m, 3H, H-21, H-22), 7.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, H-3), 6.59 – 6.55 (m, 2H, H-2), 3.30 (s, 2H, H-16), 2.68 – 1.74 (m, 10H, B-H). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, $CDCl_3$): 146.40 (C-5), 144.34 (C-1), 137.59 (C-15), 135.14 (C-19), 134.73 (C-4), 133.53 (C-9), 131.85 (C-13), 131.56 (C-8), 131.38 (C-3), 130.56 (C-7), 130.06 (C-14), 128.64 (C-22), 128.31 (C-21), 127.76 (C-20), 126.05 (C-6), 122.01 (C-12), 118.72 (C-2), 91.79 (C-11), 88.86 (C-10), 77.20 (C-18), 75.63 (C-17), 43.01 (C-16). **RMN-¹¹B** δ (128 MHz, $CDCl_3$): -0.69 (t, $J = 28.8$ Hz, 1B, BF_2), -6.22 – -15.41 (m, 10B, BH). **RMN-¹⁹F** δ (376 MHz, $CDCl_3$): -144.90 (q, $J = 28.8$ Hz). **EMAR** (ESI-TOF⁺) m/z calculado para $C_{32}H_{31}B_{11}N_2F [M^+-F]^+$: 583.3495. Encontrado: 583.3502. Error: 1.19 ppm.

BODIPY-Ref. Sólido rojo. Rendimiento: 88 mg (45 % a partir de 0.51 mmol de **103**). **RMN-¹H** δ (400 MHz, $CDCl_3$): 7.95 (br s, 2H, H-1), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-7), 7.56 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-8), 7.47 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-13), 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, H-3), 6.58 – 6.55 (m, 2H, H-2), 2.39 (s, 3H, H-16). **RMN-¹³C** δ (100 MHz, $CDCl_3$): 146.51 (C-5), 144.24 (C-1), 139.10 (C-15), 134.70 (C-4), 133.21 (C-9), 131.63 (C-13), 131.47 (C-8), 131.39 (C-3), 130.53 (C-7), 129.24 (C-14), 126.42 (C-6), 119.54 (C-12), 118.67 (C-2), 92.56 (C-11), 87.73 (C-10), 21.55 (C-16). **RMN-¹¹B** δ (128 MHz, $CDCl_3$): -0.68 (t, $J = 28.8$ Hz). **RMN-¹⁹F** δ (376 MHz, $CDCl_3$): -144.86 (q, $J = 28.8$ Hz). **EMAR** (ESI-

TOF⁺) m/z calculado para C₂₄H₁₈BF₂N₂ [M⁺]⁺: 383.1531. Encontrado: 383.1544. Error: 3.39 ppm.

2.7.3. Estudios de difracción de Rayos-X de monocristal

Cristales adecuados para difracción de Rayos-X de monocristal de los compuestos ***m*-Ph-CB**, **BODIPY-Ref**, **BODIPY-*o*-Me-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*m*-Ph-CB** se obtuvieron por evaporación lenta de acetato de etilo/hexano 1/2. Los datos se colectaron en difractómetros Oxford Diffraction Gemini "A" (***m*-Ph-CB**) y Bruker D8 Venture CMOS (**BODIPY-Ref**, **BODIPY-*o*-Me-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB**, **BODIPY-*m*-Ph-CB**) usando radiación MoK_α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) a 130 y 300 K. Se realizó una corrección empírica de los datos con SADABS.^[91] La primera solución se obtuvo mediante métodos directos con SHELXS-2018 y la estructura se refinó usando SHELXL-2018.^[92] Todas las manipulaciones se realizaron a través del programa ShelXle.^[93] Todos los átomos distintos de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente en coordenadas idealizadas. Los programas Mercury 3.7 y ORTEP-3 fueron usados para preparar las ilustraciones.^[94]

2.7.4. Métodos computacionales

Las geometrías de **BODIPY-Ref**, **BODIPY-*m*-Ph-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB** y **BODIPY-*o*-Me-CB** se optimizaron al nivel de teoría M06-2X/6-31G* a través del programa Gaussian-09,^[95] dentro del marco de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Los cálculos fueron realizados asumiendo la presencia de etanol como disolvente, el cual se modeló a través del modelo de polarización continua (PCM).^[96] Para los cálculos referidos a la interacción de fluoróforos con hexano, no se tomó otro efecto del disolvente además de la presencia de una sola molécula de hexano en la cercanía al cúmulo. Seleccionamos el funcional M06-2X

siguiendo reportes previos de Jacquemin,^[97] quien sugiere este funcional como el método más razonable para moléculas basadas en BODIPYs. Los espectros de UV-Visible se calcularon al nivel de teoría M06-2X/6-311+G**.

2.7.5. Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía fueron tomadas usando un microscopio Zeiss LSM 880, manteniendo una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C durante los experimentos. Células HeLa fueron cultivadas en placas de 8 pozos (iBidi, Alemania) a una densidad de 20,000 células por pozo un día antes de los experimentos en medio MEM α con 10% de suero fetal bovino (FBS) e incubadas en presencia de los fluoróforos por 30 minutos. Las células fueron lavadas después por duplicado con MEM α sin FBS y analizadas en el microscopio.

2.8. REFERENCIAS

- [1] K. Wade, en *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry, Vol. 18* (Eds.: H. J. Emeléus, A. G. Sharpe), Academic Press, **1976**, pp. 1-66.
- [2] N. S. Hosmane, en *Advanced Inorganic Chemistry* (Ed.: N. S. Hosmane), Academic Press, Boston, **2017**, pp. 171-195.
- [3] A. Papakondylis, A. Mavridis, *Comput. Theor. Chem.* **2017**, *1115*, 217-222.
- [4] (a) A. F. Mark, W. Ken, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1315-1323; (b) R. Hoffmann, W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 2872-2883.
- [5] (a) A. F. Armstrong, J. F. Valliant, *Dalton Trans.* **2007**, 4240-4251; (b) R. Núñez, M. Tarrés, A. Ferrer-Ugalde, F. F. de Biani, F. Teixidor, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14307-14378.
- [6] (a) J. Cabrera-González, A. Ferrer-Ugalde, S. Bhattacharyya, M. Chaari, F. Teixidor, J. Gierschner, R. Núñez, *J. Mater. Chem.* **2017**, *5*, 10211-10219; (b) A. Ferrer-Ugalde, E. J. Juárez-Pérez, F. Teixidor, C. Viñas, R. Núñez, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17021-17030; (c) A. González-Campo, B. Boury, F. Teixidor, R. Núñez, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4344-4353.
- [7] W. N. Lipscomb, A. R. Pitochelli, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5833-5834.
- [8] Z. Chen, R. B. King, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3613-3642.
- [9] (a) J. Poater, M. Solà, C. Viñas, F. Teixidor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12191-12195; (b) P. Stockmann, M. Gozzi, R. Kuhnert, M. B. Sárosi, E. Hey-Hawkins, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3497-3512.
- [10] M. Tarrés, E. Canetta, E. Paul, J. Forbes, K. Azzouni, C. Viñas, F. Teixidor, A. J. Harwood, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7804.
- [11] M. Scholz, E. Hey-Hawkins, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7035-7062.
- [12] M. G. Davidson, T. G. Hibbert, J. A. K. Howard, A. Mackinnon, K. Wade, *Chem. Commun.* **1996**, 2285-2286.
- [13] A. W. Laubengayer, W. R. Rysz, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1513-1514.
- [14] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 91^{ava} edición, (Ed.: W. M. Haynes), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL., **2010**, pp. 9-77

- [15] (a) S. J. Grabowski, J. Leszczynski, en *Practical Aspects of Computational Chemistry: Methods, Concepts and Applications* (Eds.: J. Leszczynski, M. K. Shukla), Springer Netherlands, Dordrecht, **2010**, pp. 255-275; (b) Z. J. Lesnikowski, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2007**, *72*, 1646-1658; (c) R. Custelcean, J. E. Jackson, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1963-1980.
- [16] (a) K. Yamamoto, Y. Endo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2389-2392; (b) J. L. Fauchère, K. Q. Do, P. Y. C. Jow, C. Hansch, *Experientia* **1980**, *36*, 1203-1204.
- [17] (a) R. A. Wiesboeck, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1642-1643; (b) T. L. Heying, J. W. Ager, S. L. Clark, D. J. Mangold, H. L. Goldstein, M. Hillman, R. J. Polak, J. W. Szymanski, *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1089-1092.
- [18] D. Grafstein, J. Dvorak, *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1128-1133.
- [19] S. Papetti, T. L. Heying, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2295-2295.
- [20] (a) W. N. Lipscomb, *Science* **1966**, *153*, 373-378; (b) B. M. Gimarc, D. S. Warren, J. J. Ott, C. Brown, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 1598-1605.
- [21] H. Nakamura, K. Aoyagi, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1167-1171.
- [22] C. Vinas, R. Benakki, F. Teixidor, J. Casabo, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3844-3845.
- [23] (a) C.-H. Lee, I. D. Yang, J.-D. Lee, H. Nakamura, J. Ko, S. O. Kang, *Synlett* **2004**, *2004*, 1799-1801; (b) X. Wang, G.-X. Jin, *Organometallics* **2004**, *23*, 6319-6322.
- [24] F. A. Gomez, M. F. Hawthorne, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1384-1390.
- [25] P. Dozzo, R. A. Kasar, S. B. Kahl, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8053-8057.
- [26] R. A. Kasar, G. M. Knudsen, S. B. Kahl, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2936-2940.
- [27] R. Coult, M. A. Fox, W. R. Gill, P. L. Herbertson, J. A. H. MacBride, K. Wade, *J. Organomet. Chem.* **1993**, *462*, 19-29.
- [28] Z. Yinghuai, N. S. Hosmane, *J. Organomet. Chem.* **2013**, *747*, 25-29.
- [29] (a) R. Furue, T. Nishimoto, I. S. Park, J. Lee, T. Yasuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7171-7175; (b) K.-R. Wee, Y.-J. Cho, S. Jeong, S. Kwon, J.-D. Lee, I.-H. Suh, S. O. Kang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17982-17990.
- [30] (a) X.-Q. Li, C.-H. Wang, M.-Y. Zhang, H.-Y. Zou, N.-N. Ma, Y.-Q. Qiu, *J. Organomet. Chem.* **2014**, *749*, 327-334; (b) J. Wang, W.-Y. Wang, X.-Y. Fang, Y.-Q. Qiu, *J. Mol. Model.* **2015**, *21*, 95.
- [31] R. Núñez, I. Romero, F. Teixidor, C. Viñas, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5147-5173.

- [32] (a) S. Sumitani, Y. Nagasaki, *Polym. J.* **2012**, *44*, 522-530; (b) R. F. Barth, Z. Zhang, T. Liu, *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 36.
- [33] H. Shiba, K. Takeuchi, R. Hiramatsu, M. Furuse, N. Nonoguchi, S. Kawabata, T. Kuroiwa, N. Kondo, Y. Sakurai, M. Suzuki, K. Ono, S. Oue, E. Ishikawa, H. Michiue, S.-I. Miyatake, *Neurol. Med. Chir.* **2018**, *58*, 487-494.
- [34] (a) I. Uluisik, H. C. Karakaya, A. Koc, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2018**, *45*, 156-162; (b) A. L. Conn, J. E. Wolf, *Ind. Eng. Chem.* **1958**, *50*, 1231-1234; (c) J. A. Coderre, D. D. Joel, P. L. Micca, M. M. Nawrocky, D. N. Slatkin, *Radiat. Res.* **1992**, *129*, 290-296.
- [35] (a) Z. Zhang, Y. Chong, X. Chen, C. Jin, L. Yang, T. Liu, *Appl. Radiat. Isot.* **2015**, *106*, 161-165; (b) S.-I. Miyatake, S. Kawabata, K. Yokoyama, T. Kuroiwa, H. Michiue, Y. Sakurai, H. Kumada, M. Suzuki, A. Maruhashi, M. Kirihata, K. Ono, *J. Neuro-Oncol.* **2008**, *91*, 199; (c) J. Hiratsuka, N. Kamitani, R. Tanaka, E. Yoden, R. Tokiya, M. Suzuki, R. F. Barth, K. Ono, *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 38.
- [36] S.-I. Miyatake, S. Kawabata, R. Hiramatsu, T. Kuroiwa, M. Suzuki, N. Kondo, K. Ono, *Neurol. Med. Chir.* **2016**, *56*, 361-371.
- [37] L.-W. Wang, Y.-W. H. Liu, F.-I. Chou, S.-H. Jiang, *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 37.
- [38] T.-Z. Yuan, S.-Q. Xie, C.-N. Qian, *Thorac. Cancer* **2019**, *10*, 2195-2199.
- [39] J. T. Godwin, L. E. Farr, W. H. Sweet, J. S. Robertson, *Cancer* **1955**, *8*, 601-615.
- [40] F. Ali, N. S. Hosmane, Y. Zhu, *Molecules* **2020**, *25*, 828.
- [41] (a) J. H. Goodman, W. Yang, R. F. Barth, Z. Gao, C. P. Boesel, A. E. Staubus, N. Gupta, R. A. Gahbauer, D. M. Adams, C. R. Gibson, A. K. Ferketich, M. L. Moeschberger, A. H. Soloway, D. E. Carpenter, B. J. Albertson, W. F. Bauer, M. Z. Zhang, C. C. Wang, *Neurosurgery* **2000**, *47*, 608-622; (b) H. Koivunoro, E. Hippeläinen, I. Auterinen, L. Kankaanranta, M. Kulvik, J. Laakso, T. Seppälä, S. Savolainen, H. Joensuu, *Appl. Radiat. Isot.* **2015**, *106*, 189-194.
- [42] R. F. Barth, M. H. Vicente, O. K. Harling, W. S. Kiger, K. J. Riley, P. J. Binns, F. M. Wagner, M. Suzuki, T. Aihara, I. Kato, S. Kawabata, *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, 146.
- [43] D. A. Feakes, J. K. Spinler, F. R. Harris, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11177-11186.
- [44] K. Bednarska, A. B. Olejniczak, A. Piskala, M. Klink, Z. Sulowska, Z. J. Lesnikowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6621-6629.

- [45] (a) V. I. Bregadze, I. B. Sivaev, I. A. Lobanova, R. A. Titeev, D. I. Brittal, M. A. Grin, A. F. Mironov, *Appl. Radiat. Isot.* **2009**, *67*, S101-S104; (b) M. W. Renner, M. Miura, M. W. Easson, M. G. H. Vicente, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 145-157.
- [46] R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. H. Vicente, T. E. Blue, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3987-4002.
- [47] A. Wittig, J. Michel, R. L. Moss, F. Stecher-Rasmussen, H. F. Arlinghaus, P. Bendel, P. L. Mauri, S. Altieri, R. Hilger, P. A. Salvadori, L. Menichetti, R. Zamenhof, W. A. G. Sauerwein, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *68*, 66-90.
- [48] Z. Yong, Z. Song, Y. Zhou, T. Liu, Z. Zhang, Y. Zhao, Y. Chen, C. Jin, X. Chen, J. Lu, *Chinese J. Cancer Res.* **2016**, *28*, 634 - 640.
- [49] S. M. Bentzen, *Lancet Oncol.* **2005**, *6*, 112-117.
- [50] (a) F. A. Verburg, A. Heinzl, H. Hänscheid, F. M. Mottaghy, M. Luster, L. Giovanella, *Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging* **2014**, *41*, 199-201; (b) Y. Imahori, S. Ueda, Y. Ohmori, T. Kusuki, K. Ono, R. Fujii, T. Ido, *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 325-333.
- [51] (a) Z. Feng, X. Yu, M. Jiang, L. Zhu, Y. Zhang, W. Yang, W. Xi, G. Li, J. Qian, *Theranostics* **2019**, *9*, 5706-5719; (b) N. Ding, Z. Li, X. Tian, J. Zhang, K. Guo, P. Wang, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 13172-13175.
- [52] K. Hirose, A. Konno, S. Yoshimoto, K. Ono, N. Otsuki, J. Hatazawa, J. Hiratsuka, Y. Takai, *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, v460.
- [53] Y. Yang, L. Jing, X. Li, L. Lin, X. Yue, Z. Dai, *Theranostics* **2017**, *7*, 466-481.
- [54] F. Lerouge, C. Viñas, F. Teixidor, R. Núñez, A. Abreu, E. Xochitiotzi, R. Santillan, N. Farfán, *Dalton Trans.* **2007**, 1898-1903.
- [55] J. Cabrera-González, C. Viñas, M. Haukka, S. Bhattacharyya, J. Gierschner, R. Núñez, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 13588-13598.
- [56] J. Cabrera-González, E. Xochitiotzi-Flores, C. Viñas, F. Teixidor, H. García-Ortega, N. Farfán, R. Santillan, T. Parella, R. Núñez, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 5021-5031.
- [57] (a) A. Ferrer-Ugalde, A. González-Campo, C. Viñas, J. Rodríguez-Romero, R. Santillan, N. Farfán, R. Sillanpää, A. Sousa-Pedrares, R. Núñez, F. Teixidor, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9940-9951; (b) M. Chaari, J. Cabrera-González, Z. Kelemen, C.

- Viñas, A. Ferrer-Ugalde, D. Choquesillo-Lazarte, A. Ben Salah, F. Teixidor, R. Núñez, *J. Organomet. Chem.* **2018**, 865, 206-213.
- [58] B. M. Muñoz-Flores, J. Cabrera-González, C. Viñas, A. Chávez-Reyes, H. V. R. Dias, V. M. Jiménez-Pérez, R. Núñez, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 5601-5612.
- [59] (a) M. Chaari, N. Gaztelumendi, J. Cabrera-González, P. Peixoto-Moledo, C. Viñas, E. Xochitiotzi-Flores, N. Farfán, A. Ben Salah, C. Nogués, R. Núñez, *Bioconjugate Chem.* **2018**, 29, 1763-1773; (b) C. Bellomo, M. Chaari, J. Cabrera-González, M. Blangetti, C. Lombardi, A. Deagostino, C. Viñas, N. Gaztelumendi, C. Nogués, R. Nuñez, C. Prandi, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 15622-15630; (c) S. Xuan, N. Zhao, Z. Zhou, F. R. Fronczek, M. G. H. Vicente, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 2109-2117; (d) J. H. Gibbs, H. Wang, N. V. S. D. K. Bhupathiraju, F. R. Fronczek, K. M. Smith, M. G. H. Vicente, *J. Organomet. Chem.* **2015**, 798, 209-213.
- [60] R. Ziessel, G. Ulrich, J. H. Olivier, T. Bura, A. Sutter, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7978-7980.
- [61] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, 208-223.
- [62] M. Nendel, B. Goldfuss, K. N. Houk, K. Hafner, *Comput. Theor. Chem.* **1999**, 461-462, 23-28.
- [63] Z. Lin, A. W. Kohn, T. Van Voorhis, *J. Phys. Chem. C* **2020**, 124, 3925-3938.
- [64] N. Menges, *Comput. Theor. Chem.* **2015**, 1068, 117-122.
- [65] (a) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932; (b) K. Petrushenko, K. B. Petrushenko, *Spectrochim. Acta A* **2015**, 138, 623-627; (c) R. S. Llano, E. A. Zaballa, J. Bañuelos, C. Fernando, A. Gómez Durán, J. L. B. Vázquez, E. P. Cabrera, I. L. Arbeloa en *Photochemistry and Photophysics – Fundamentals to Applications* (Eds.: S. Saha, S. Mondal), IntechOpen, **2018**, pp. 21-40.
- [66] N. Boens, B. Verbelen, M. J. Ortiz, L. Jiao, W. Dehaen, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 399, 213024.
- [67] L. Yang, R. Simionescu, A. Lough, H. Yan, *Dyes Pigm.* **2011**, 91, 264-267.
- [68] Datos obtenidos de <http://www.fluorophores.tugraz.at/> (Fecha de consulta: 2 de Mayo de 2020).
- [69] R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, 31, 496-501.
- [70] J. Bañuelos, *Chem. Rec.* **2016**, 16, 335-348.

- [71] (a) A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77-88; (b) V.-C. Alejandro, F.-P. Mónica, A.-P. Xelha, R. Mario, R.-O. Gabriel, F. Norberto, R.-G. Eva, *Polyhedron* **2020**, *176*, 114207.
- [72] L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, L. He, W. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 622-661.
- [73] L. Bonardi, H. Kanaan, F. Camerel, P. Jolinat, P. Retailleau, R. Ziessel, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 401-413.
- [74] H. Klfout, A. Stewart, M. Elkhalfa, H. He, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 39873-39889.
- [75] (a) E. Xochitiotzi-Flores, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Romero-Ávila, R. Santillan, N. Farfán, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 4500-4512; (b) J. A. Levitt, P.-H. Chung, M. K. Kuimova, G. Yahioğlu, Y. Wang, J. Qu, K. Suhling, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 662-672.
- [76] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130-1172.
- [77] G. Rodríguez, J. Nargoli, A. López, G. Moyna, G. Álvarez, M. Fernández, C. A. Osorio-Martínez, M. González, H. Cerecetto, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 7983-7989.
- [78] M. Ono, H. Watanabe, H. Kimura, H. Saji, *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 319-324.
- [79] (a) Y. Liu, Z. Li, L. Chen, Z. Xie, *Dyes Pigm.* **2017**, *141*, 5-12; (b) E. Kitteringham, D. Wu, S. Cheung, B. Twamley, D. F. O'Shea, D. M. Griffith, *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *182*, 150-157; c) E. Bodio, F. Denat, C. Goze, *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1159-1183.
- [80] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [81] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55-68.
- [82] A. Ferrer-Ugalde, J. Cabrera-González, E. J. Juárez-Pérez, F. Teixidor, E. Pérez-Inestrosa, J. M. Montenegro, R. Sillanpää, M. Haukka, R. Núñez, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 2091-2104.
- [83] A. M. Spokoyny, C. W. Machan, D. J. Clingerman, M. S. Rosen, M. J. Wiester, R. D. Kennedy, C. L. Stern, A. A. Sarjeant, C. A. Mirkin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 590-596.
- [84] T. Karstens, K. Kobs, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871-1872.
- [85] E. Palacios-Serrato, D. Araiza-Olivera, A. Jiménez-Sánchez, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 3888-3895.

- [86] L. F. Yousif, K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2081-2088.
- [87] B. Zhang, H. Mao, R. Matheu, J. A. Reimer, S. A. Alshimri, S. Alshihri, O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 11420-11424.
- [88] R. Makiura, R. Usui, Y. Sakai, A. Nomoto, A. Ogawa, O. Sakata, A. Fujiwara, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 1352-1360.
- [89] P. D. Rao, S. Dhanalekshmi, B. J. Littler, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7323-7344.
- [90] M. Benstead, G. A. Rosser, A. Beeby, G. H. Mehl, R. W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 992-999.
- [91] Bruker (2005), SADABS, Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [92] G. Sheldrick, *Acta Cryst. A* **2008**, *64*, 112-122.
- [93] C. B. Hubschle, G. M. Sheldrick, B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.* **2011**, *44*, 1281-1284.
- [94] (a) C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453-457; (b) L. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- [95] Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [96] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3094.
- [97] A. Charaf-Eddin, B. Le Guennic, D. Jacquemin, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 49449-49456.

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo se centró en la exploración de estrategias químicas para ayudar a resolver algunas de las limitaciones que aún presentan dos terapias modernas contra el cáncer: la quimioterapia fotoactivada por liberación de NO[•] y la terapia por captura neutrónica en boro (abreviadas como PACT y BNCT, respectivamente, por sus siglas en inglés). Ambas terapias se han desarrollado durante las últimas décadas debido a la necesidad de contar con tratamientos que permitan tratar más selectivamente este padecimiento, evitando o minimizando el daño a tejidos saludables, que suelen causar las quimioterapias y radioterapias convencionales.

La PACT vía liberación de NO[•] es una estrategia elegante para producir la muerte de células tumorales por la liberación fotoinducida de cantidades elevadas de este radical pequeño y bien reconocido por las células humanas. Sin embargo, su aplicación se encuentra limitada aún por las modestas eficiencias de liberación del radical, específicamente cuando el proceso se produce mediante absorción de dos fotones, con eficiencias dadas por el producto $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$, donde Φ_{NO} es el *rendimiento cuántico de fotoliberación* y σ_{TPA} la *sección transversal de absorción de dos fotones*. Para resolver esta limitante, en el **Capítulo 1** se exploró la introducción de un anillo de tienilo como una modificación estructural discreta sobre el ligante polipiridínico en nitrosilos de Ru^{II}, con la intención de obtener sistemas con mayores eficiencias. Los resultados encontrados demuestran una participación decisiva de este heterociclo en la transferencia de carga hacia el fragmento Ru-NO, con desplazamientos batocrómicos asociados de $\lambda = 30 - 60$ nm, así como incrementos sustanciales en los coeficientes de extinción molar, dos características que se asocian comúnmente con incrementos importantes del valor de σ_{TPA} en moléculas con topologías similares a las

estudiadas. Los desplazamientos batocrómicos de estas moléculas permitieron además que los compuestos más prometedores liberaran NO[•] bajo irradiación con luz visible ($\lambda = 490$ nm), una característica muy atractiva para las posibles aplicaciones en PACT, ya que esto evita el uso de luz ultravioleta, potencialmente dañina, para producir la liberación del NO[•]. Fue posible además desarrollar un proceso de síntesis práctico, escalable y selectivo para nitrosilos de rutenio estables en agua, a partir de los cuales se demostró una liberación eficiente de NO[•] en medio acuoso, alcanzando concentraciones del radical superiores a 100 nM, las cuales son un requisito para inducir los procesos de muerte celular que dan lugar a las posibles aplicaciones terapéuticas para este tipo de compuestos de coordinación.

Por otro lado, la BNCT es un tipo de radioterapia en la que la destrucción del tumor se produce administrando un fármaco rico en boro, seguido por la irradiación del tumor con neutrones de baja energía, provocando la fisión de núcleos de ¹⁰B y la liberación de la energía ionizante que produce la muerte celular. La aplicación de la BNCT requiere de la determinación precisa de la concentración de boro dentro del tumor, para lo que los métodos actuales presentan diversas desventajas. La introducción de fluoróforos a los fármacos representa una alternativa atractiva, potencialmente capaz de proveer información en tiempo real sobre la localización y concentración del fármaco en el organismo. A pesar de que con este fin se han desarrollado una diversidad de fármacos fluorescentes para BNCT, el ingreso de estos acarreadores de boro a las células tumorales resulta generalmente impredecible.

En este contexto, en el **Capítulo 2** de este trabajo se presentó la evaluación del ingreso a células HeLa (de cáncer cervical) para un grupo de carboranos (cúmulos de boro y carbono) funcionalizados con dipirrometenos de boro (BODIPYs) como fluoróforos. Las diferencias en la estructura molecular de los compuestos estudiados permitió evaluar la influencia de

variaciones en la masa molecular, el momento dipolar estático y la lipofilidad, sobre la permeabilidad y localización subcelular de los fluoróforos, encontrándose que la lipofilidad y el momento dipolar tuvieron una influencia decisiva sobre la facilidad con que los compuestos permearon al medio intracelular, en tanto que las variaciones en la masa molecular exploradas no tuvieron una influencia importante.

Los resultados encontrados establecen así una primera explicación de los parámetros moleculares cuyas variaciones dan origen a las divergentes permeabilidades y localizaciones subcelulares que suelen mostrar este tipo de compuestos, además de que proveen herramientas de diseño para continuar con el desarrollo de carboranos fluorescentes que puedan ser exitosamente aplicados en terapia contra cáncer mediante BNCT.

Como una conclusión final, si bien es necesario seguir resolviendo las limitaciones que presentan las terapias contra el cáncer que constituyen el tema central de este trabajo, es esperanzador ver el grado de madurez que ya han alcanzado. Debido a que estas investigaciones están enfocadas a la necesidad real de mejorar los tratamientos disponibles para las personas que lamentablemente sufren de este padecimiento, es importante que los esfuerzos se centren cada vez menos en aspectos fundamentales de estas terapias y se dirijan más a implementar sus aplicaciones. En este sentido, es importante continuar con el estudio de la toxicidad de las moléculas para PACT más prometedoras tanto en células sanas como tumorales en ausencia y presencia de luz. Sería además deseable desarrollar nitrosilos de Ru^{II} que incorporen fluoróforos en sus estructuras, de manera similar a los agentes para BNCT presentados en este trabajo, resultando en moléculas multifuncionales que liberen NO[•] y cuya biodistribución pueda ser eventualmente monitoreada mediante espectroscopía de fluorescencia.

GENERAL CONCLUSIONS

This work focused on exploring chemical strategies to help resolve some of the limitations still present in two modern cancer therapies: photoactivated chemotherapy by NO[•] release and boron-neutron capture therapy (abbreviated as PACT and BNCT, respectively). Both therapies have been developed during the last decades due to the need for treatments that allow a more selective treatment of this condition, avoiding or minimizing the damage to healthy tissues, which is usually caused by conventional chemotherapies and radiotherapies.

PACT via NO[•] release is an elegant strategy to produce the death of tumor cells by the photo-induced release of high amounts of this small radical, well recognized by human cells. However, its application is still limited by the modest efficiencies of photorelease, specifically when the process occurs by two-photon absorption, with efficiencies given by the product $\Phi_{NO} \times \sigma_{TPA}$, where Φ_{NO} is the photorelease quantum yield and σ_{TPA} is the two-photon absorption cross section. To solve this limitation, in **Chapter 1** the introduction of a thienyl ring was explored as a discrete structural modification on the polypyridine ligand in Ru^{II} nitrosyls, aimed at obtaining systems with higher efficiencies. The results found demonstrate a decisive participation of this heterocycle in the load transfer to the Ru-NO fragment, with associated bathochromic displacements of $\lambda = 30 - 60$ nm, as well as substantial increases in the molar extinction coefficients, two characteristics that are commonly associated with significant increases in the value of σ_{TPA} in molecules with similar topologies to those studied in this work. The bathochromic displacements of these molecules also allowed the most promising systems to release NO[•] under visible light irradiation ($\lambda = 490$ nm), a very attractive feature for prospective applications in PACT, since this avoids

the use of potentially harmful ultraviolet light to produce NO[•] release. It was also possible to develop a practical, scalable and selective synthetic process for water-stable ruthenium nitrosils, from which an efficient release of NO[•] in aqueous media was demonstrated, reaching concentrations of the radical above 100 nM, which are required to induce the cell death processes that give rise to the possible therapeutic applications for these systems.

On the other hand, BNCT is a type of radiotherapy in which the destruction of the tumor occurs by administering a boron-rich drug, followed by the irradiation of the tumor with low energy neutrons, causing the fission of ¹⁰B nuclei and the release of the ionizing energy that produces cell death. The application of BNCT requires the precise determination of the concentration of boron within the tumor, for which current methods have diverse disadvantages. The introduction of fluorophores to BNCT drugs represents an attractive alternative, potentially capable of providing real-time information on the location and concentration of the drug in the body. Although a variety of fluorescent drugs have been developed for this purpose, the entry of these boron carriers into the tumor cells is generally unpredictable.

In this context, **Chapter 2** of this work presented the evaluation of the entry into HeLa cells (cervical cancer) for a group of carboranes (boron and carbon clusters) functionalized with boron dipyrromethenes (BODIPYs) as fluorophores. The differences in the molecular structure of the studied compounds allowed to evaluate the influence of variations in the molecular weight, the static dipole moment and the lipophilicity, on the permeability and subcellular location of the fluorophores. It was found that the lipophilicity and the dipole moment had a decisive influence on the ease with which the compounds permeated into the

intracellular medium, while the variations in the molecular mass explored did not have an important influence.

The results found thus establish a first explanation of the molecular parameters whose variations give rise to the divergent subcellular permeabilities and locations that this type of compounds usually show, besides providing design tools to continue with the development of fluorescent carboranes that can be successfully applied in cancer therapy by means of BNCT.

As a final conclusion, while it is necessary to continue working on the limitations of the cancer therapies that are the focus of this work, it is encouraging to see the degree of maturity that they have already reached. Because this research is focused on the real need to improve the treatments available to people who unfortunately suffer from this condition, it is important that efforts are less focused on fundamental aspects of these therapies and are more directed towards implementing their applications. In this sense, it is important to continue with the study of the toxicity of the most promising PACT molecules in both healthy and tumour cells in the absence and presence of light. It would also be desirable to develop Ru^{II} nitrosyls that incorporate fluorophores in their structures, similar to the agents for BNCT presented in this work, resulting in multifunctional molecules able to release NO[•] and whose biodistribution could eventually be followed by fluorescence spectroscopy.

ANEXO I

ESPECTROSCOPIA

Y MATERIALES COMPLEMENTARIOS

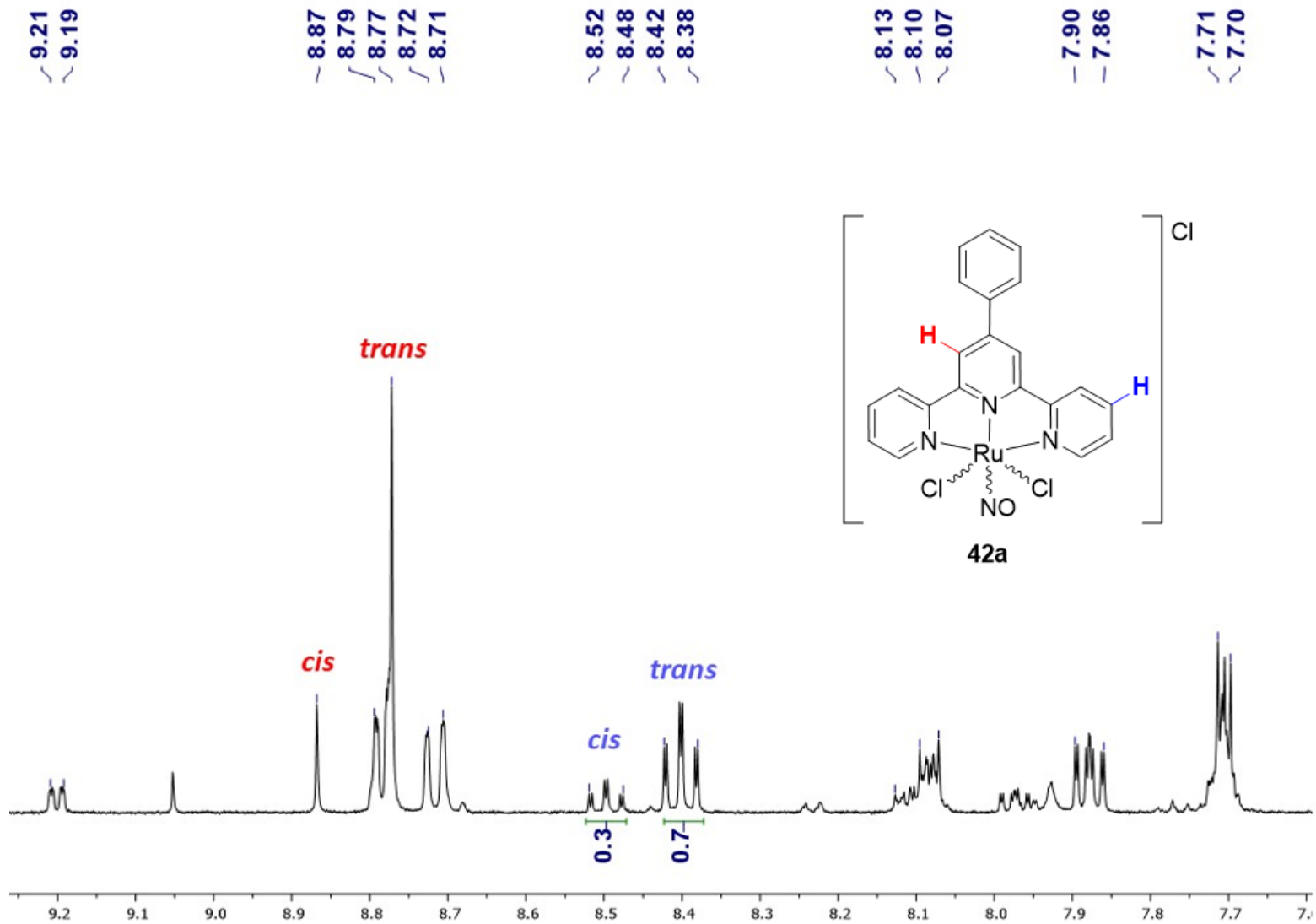


Figura S1. Espectro de RMN-¹H para **42a** (400 MHz, CD₃CN).

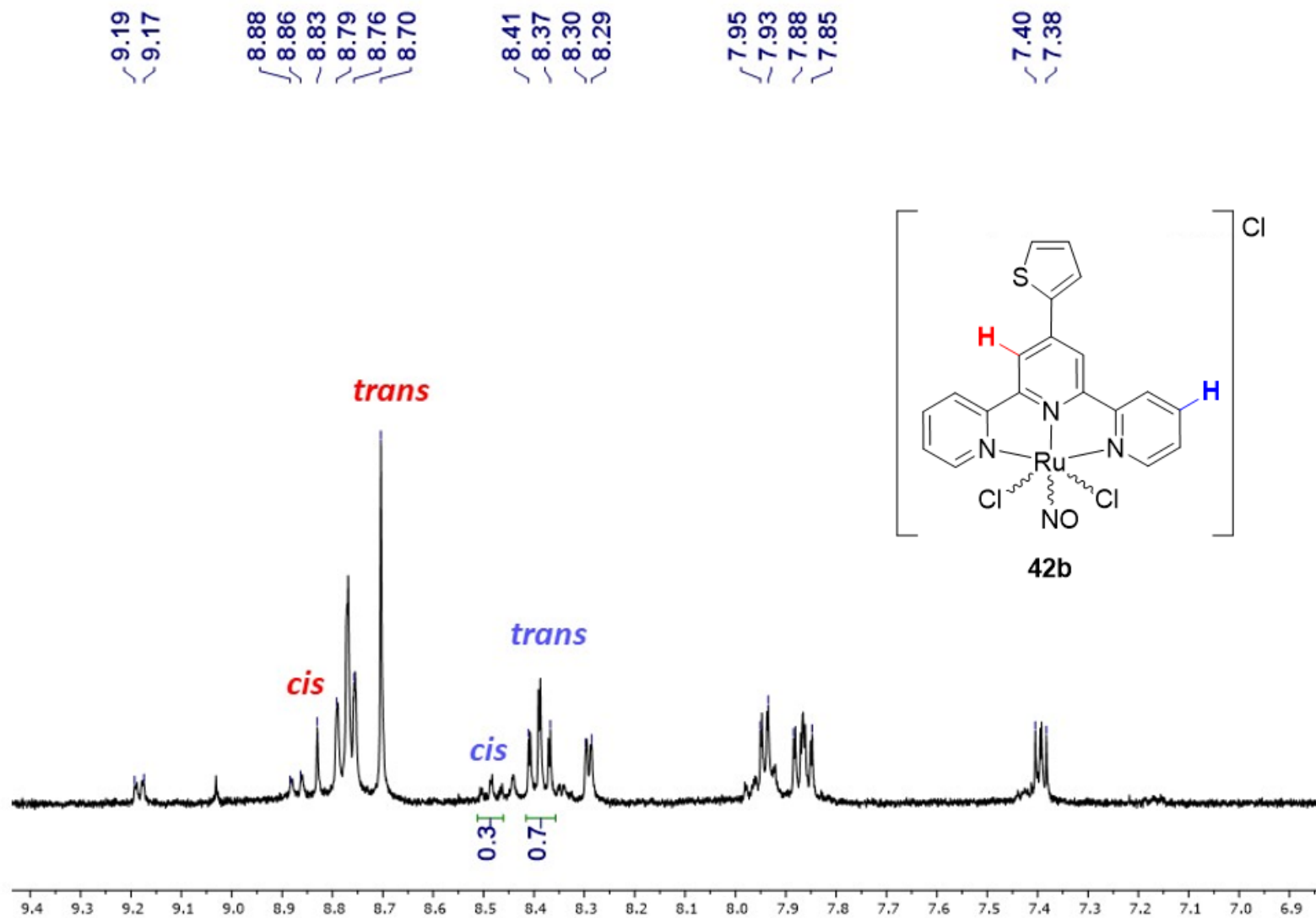


Figura S2. Espectro de RMN- ^1H para **42b** (400 MHz, CD_3CN).

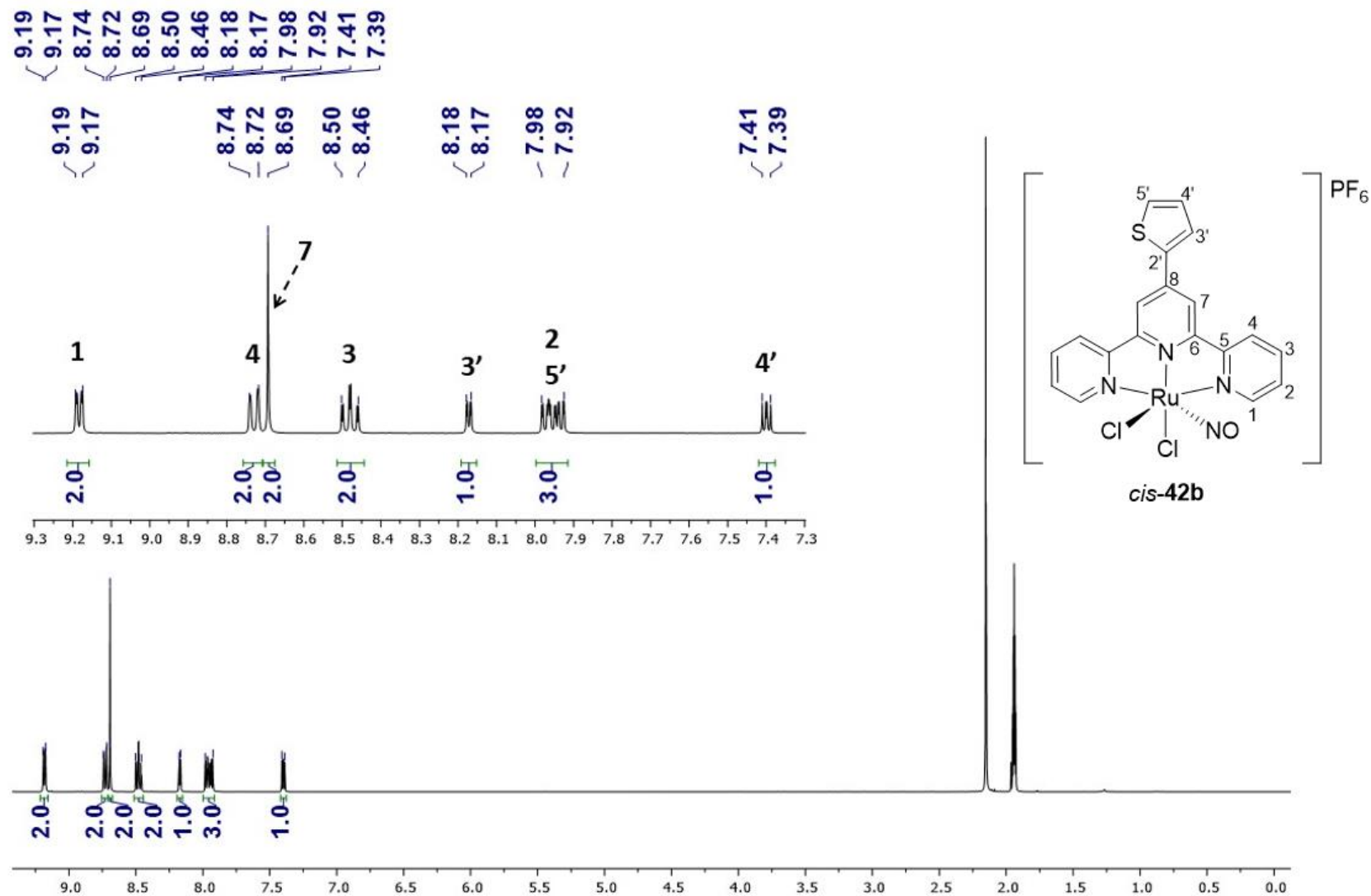


Figura S3. Espectro de RMN- ^1H para *cis*-42b (400 MHz, CD_3CN).

Cone voltage = 30 V
Xevo G2 YCA210
PLVT45B 83 (0.526) AM2 (Ar,20000.0,0.00,0.00); Cm (76:92-47:62x2.000)

27-Jun-2019 09:32:26
1: TOF MS ES+
3.44e6

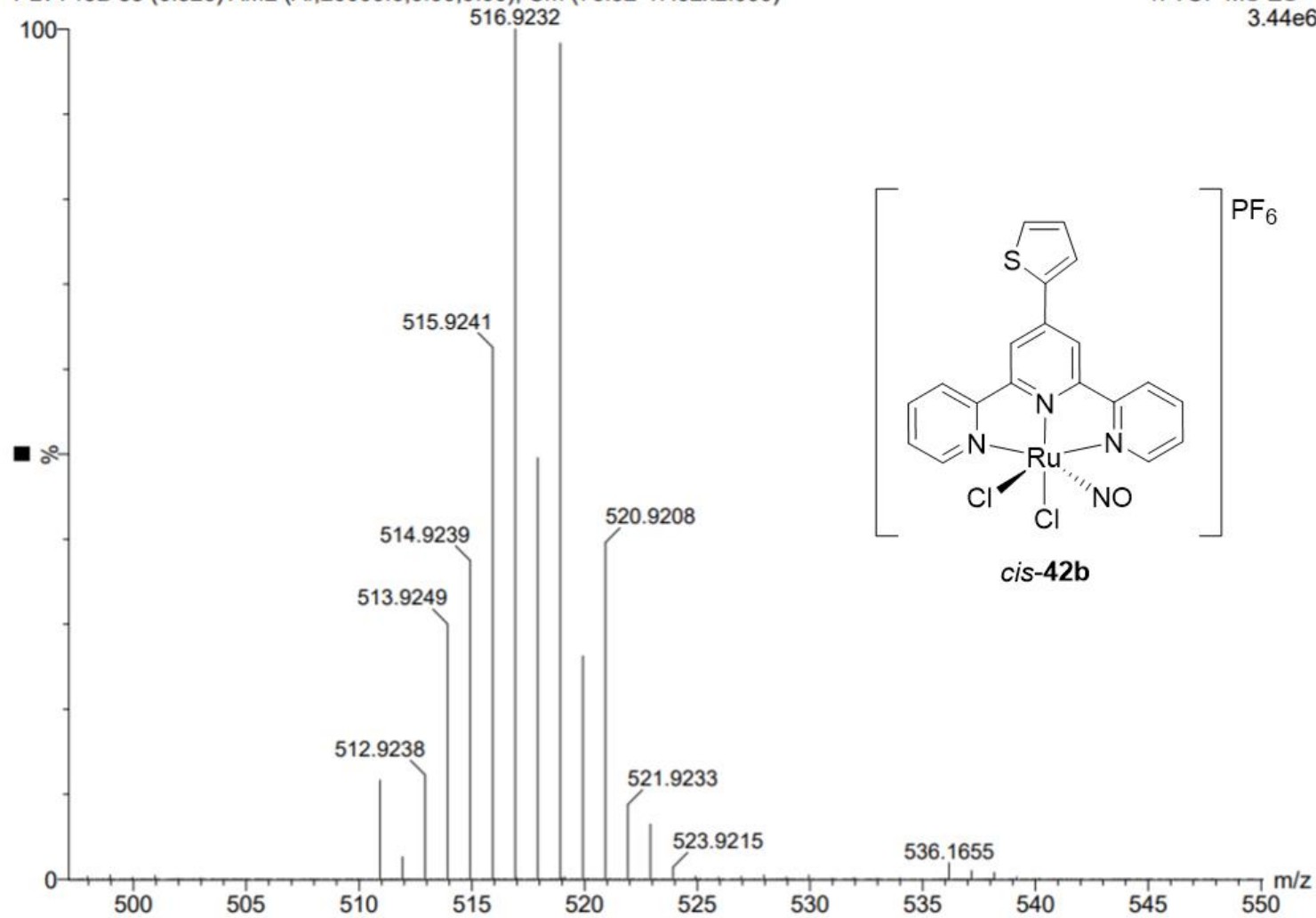


Figura S5. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *cis-42b*.

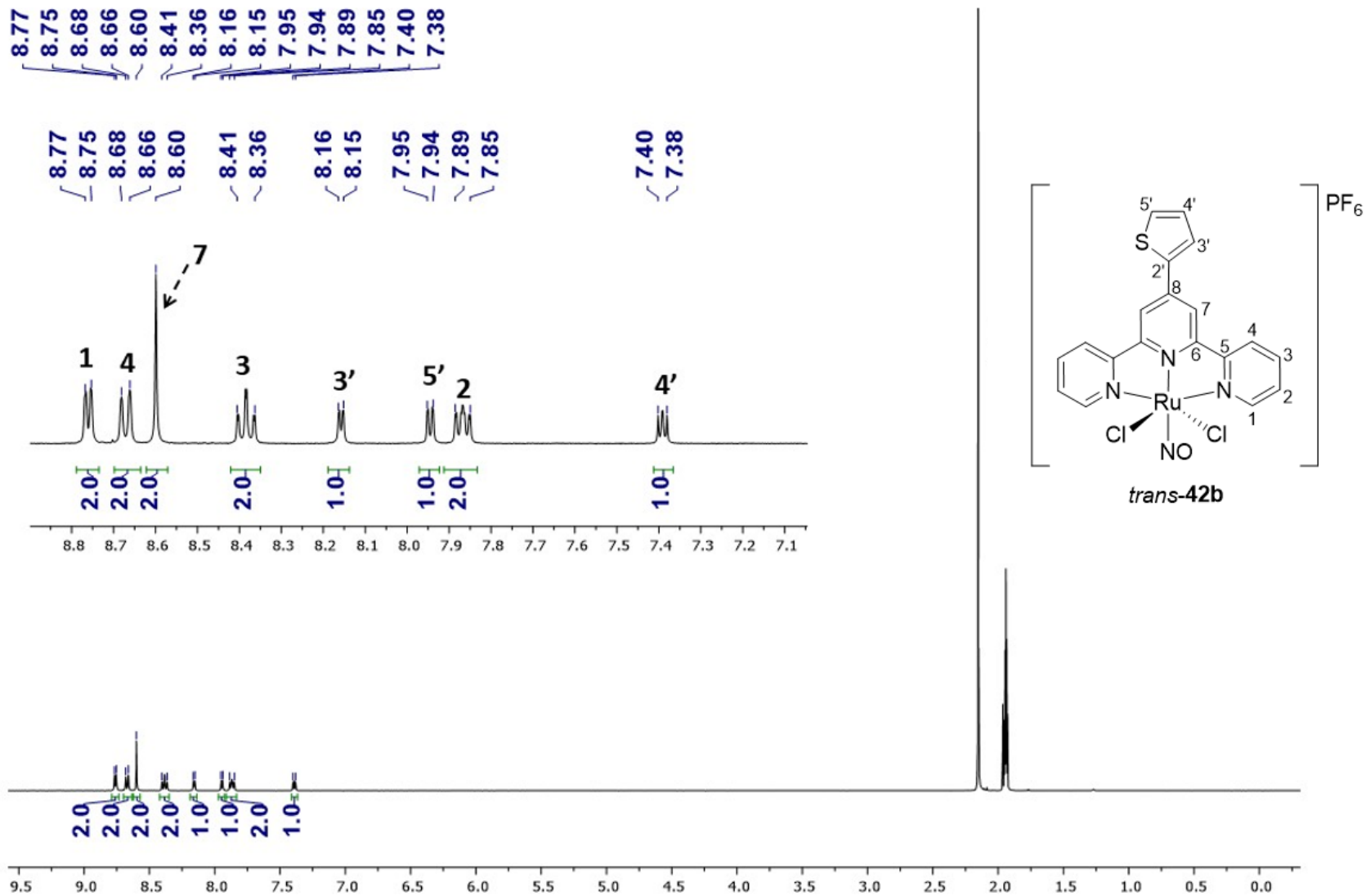


Figura S6. Espectro de RMN- ^1H para *trans*-42b (400 MHz, CD_3CN).

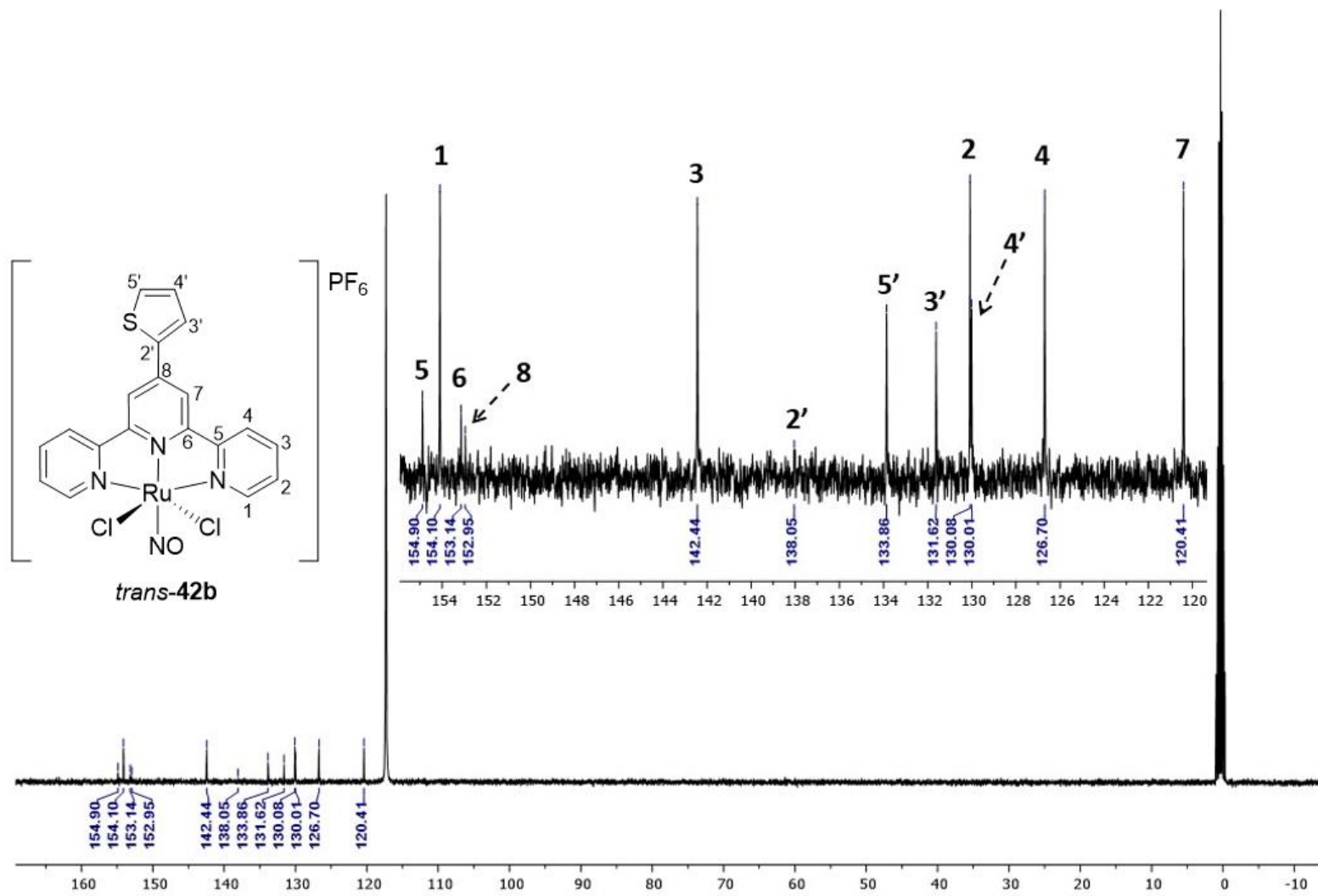


Figura S7. Espectro de RMN- ^{13}C para *trans-42b* (100 MHz, CD_3CN).

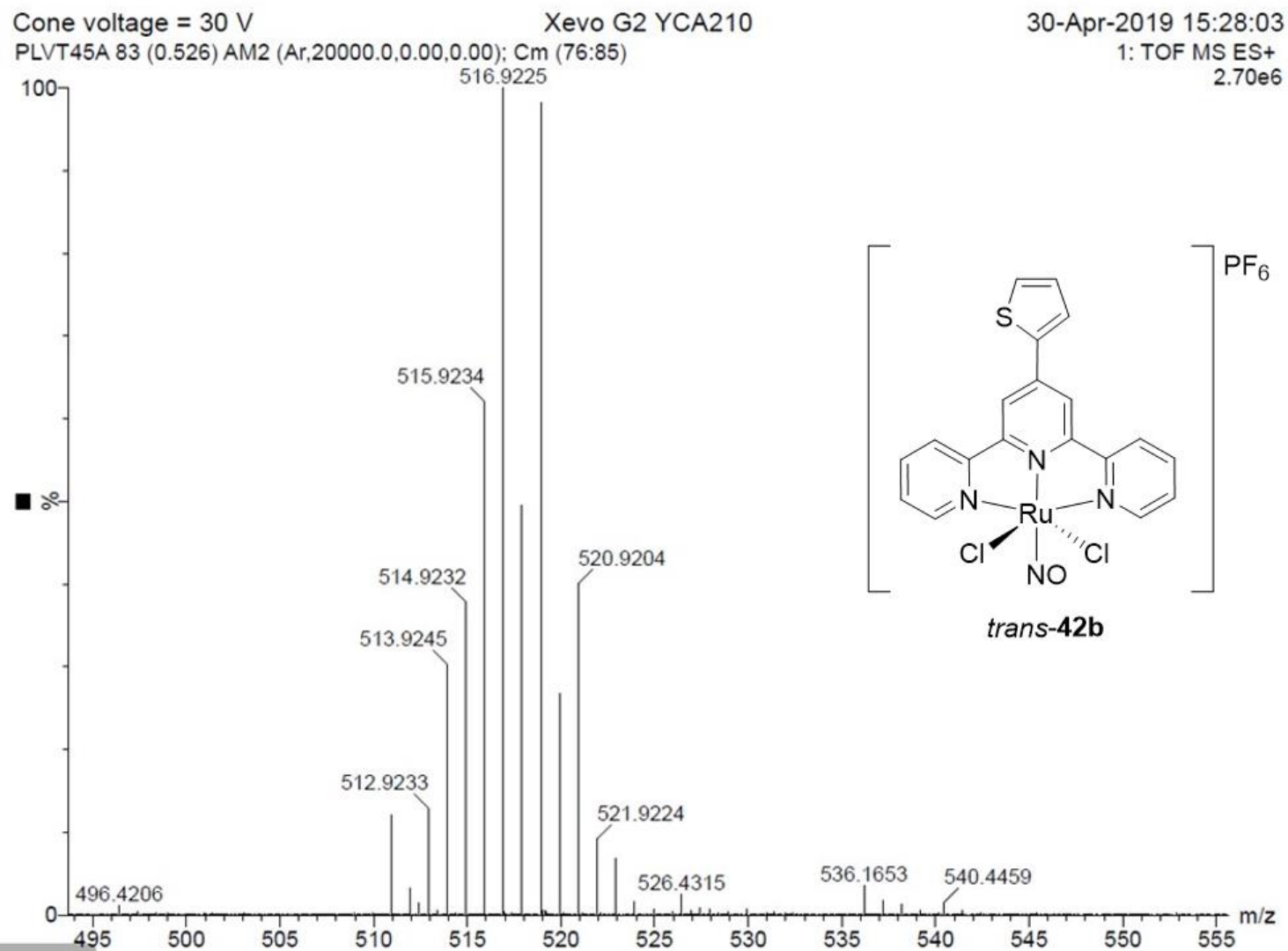


Figura S8. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *trans-42b*.

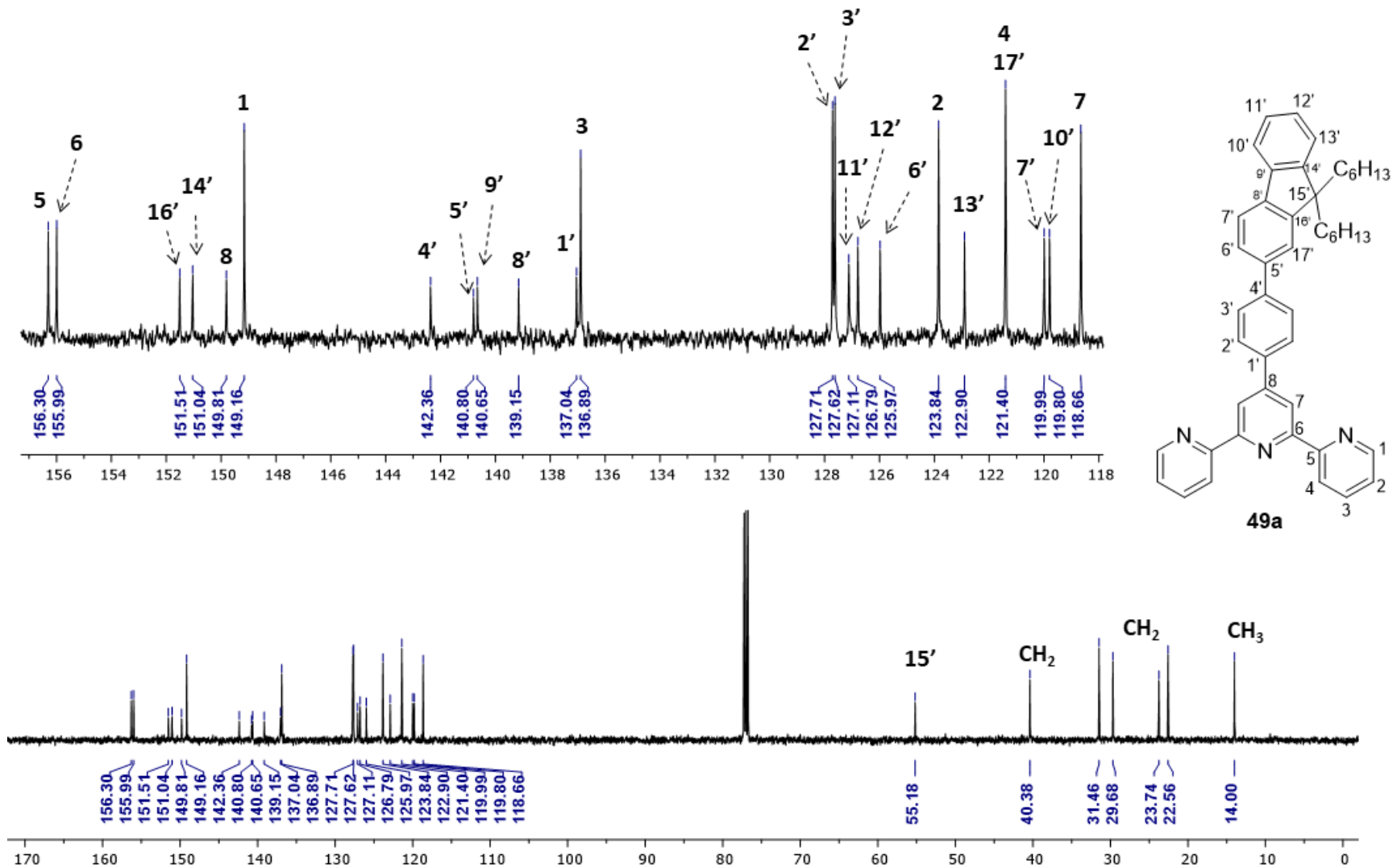


Figura S10. Espectro de RMN- ^{13}C para **49a** (125 MHz, CDCl_3).

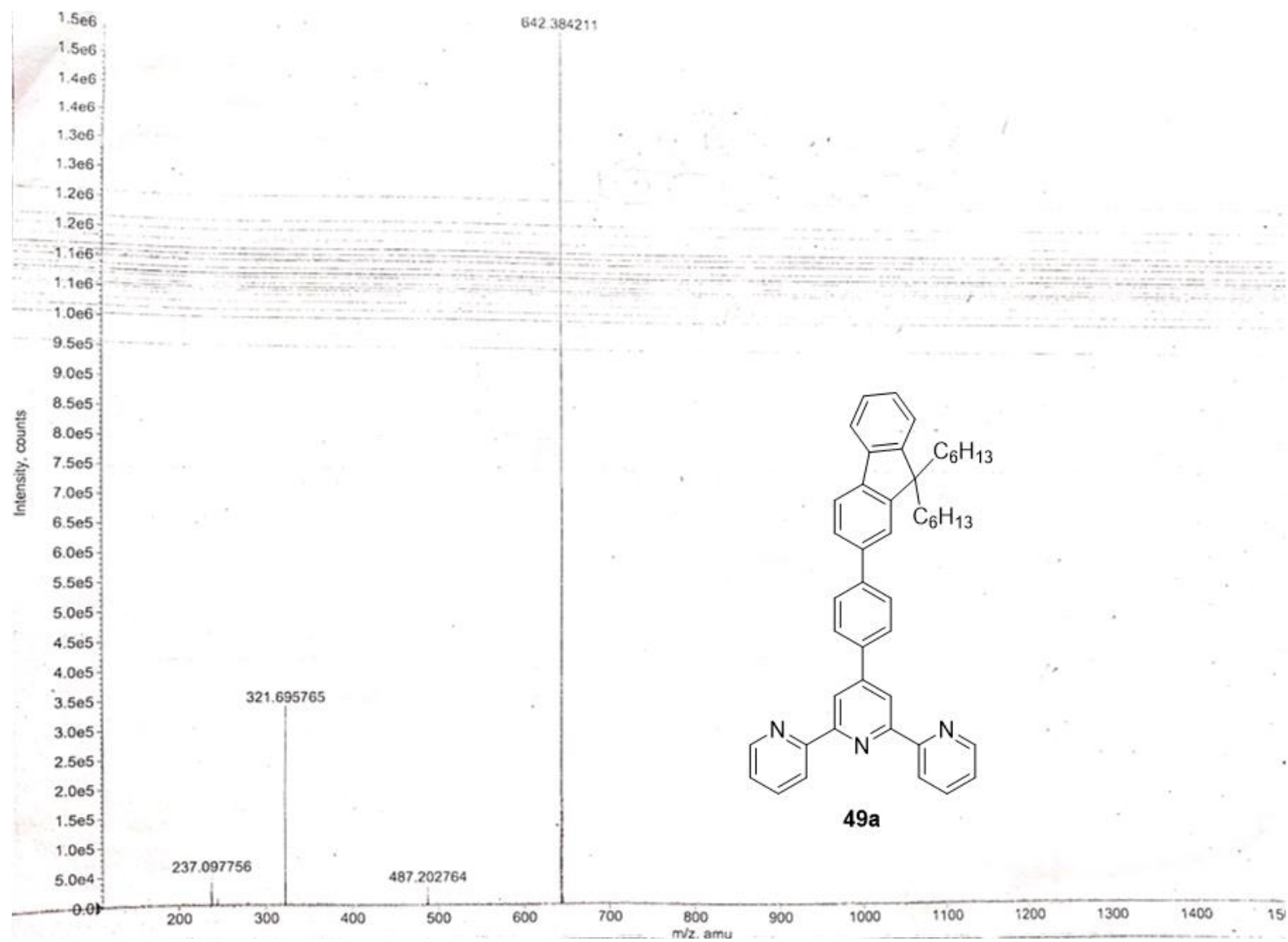


Figura S11. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para 49a.

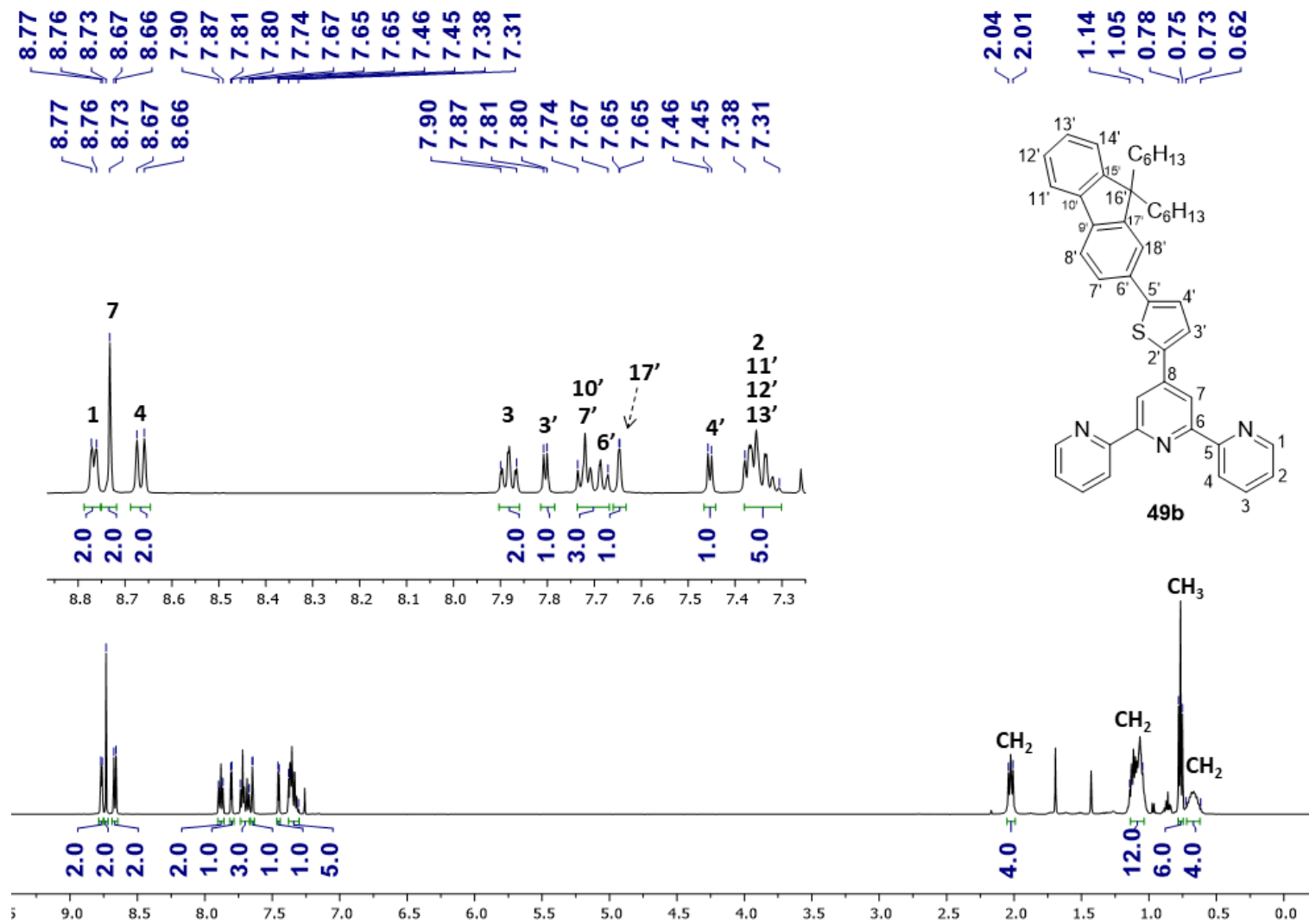


Figura S12. Espectro de RMN-¹H para **49b** (500 MHz, CDCl₃).

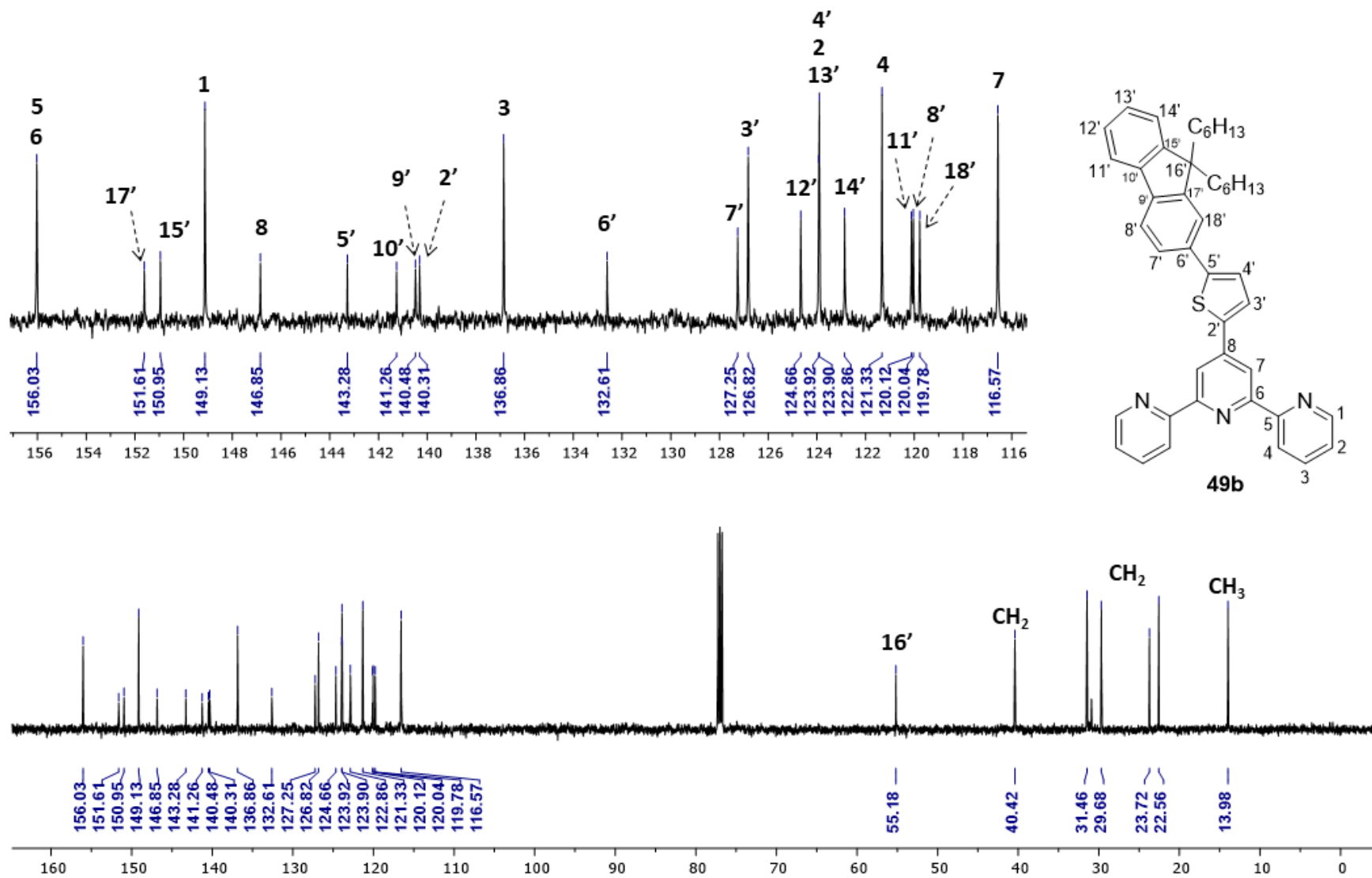


Figura S13. Espectro de RMN- ^{13}C para **49b** (125 MHz, CDCl_3).

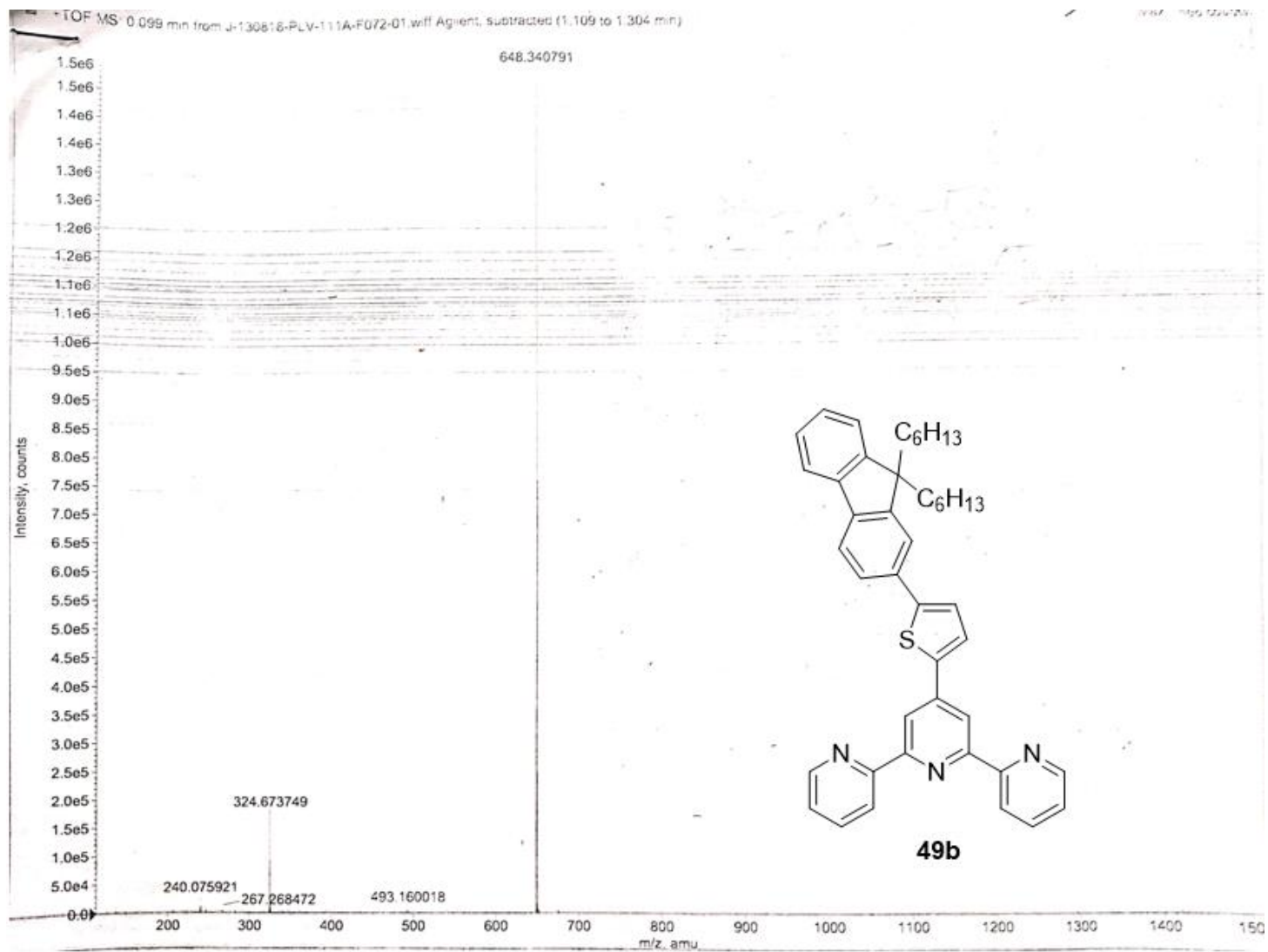


Figura S14. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **49b**.

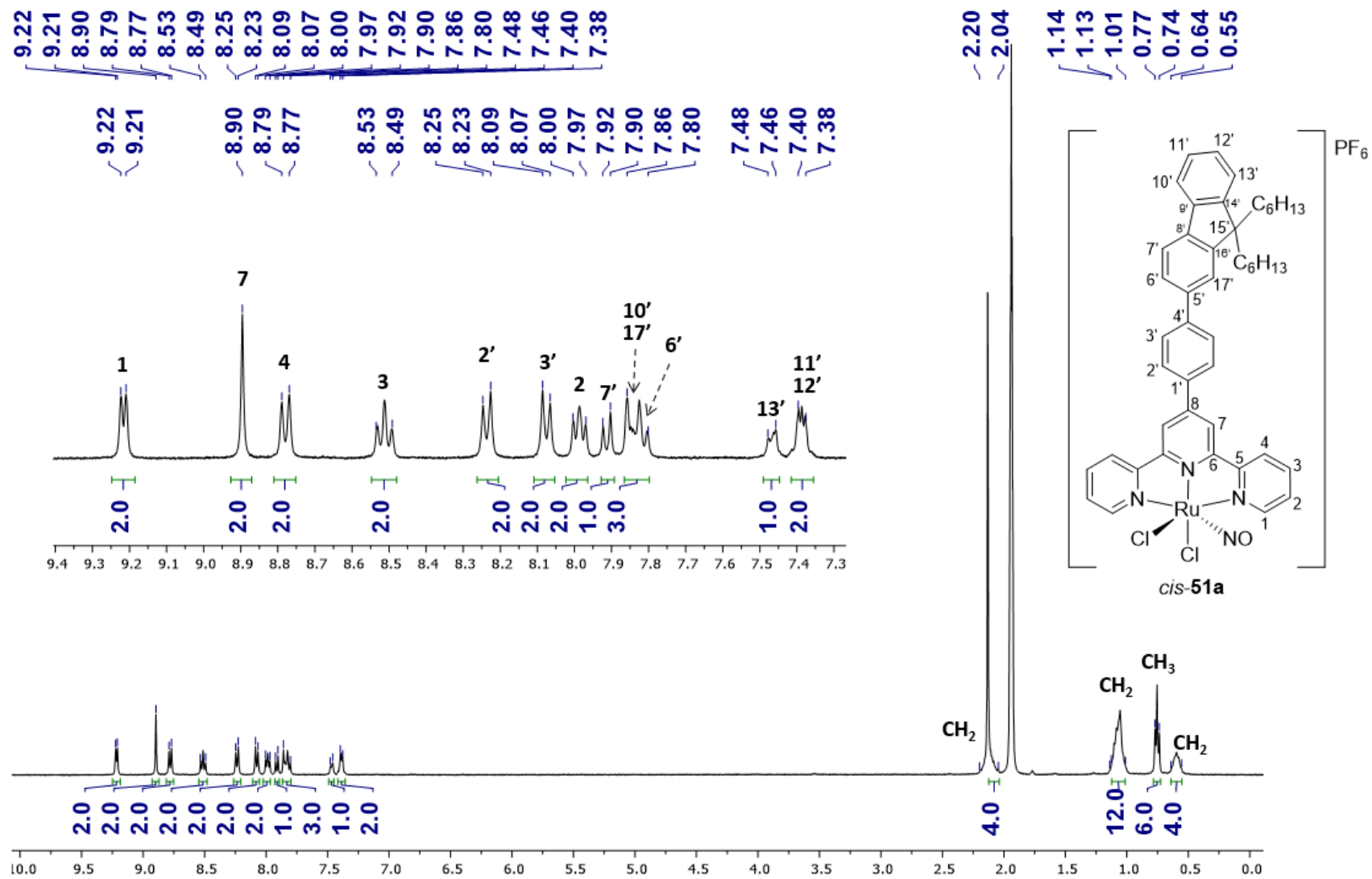


Figura S15. Espectro de RMN- ^1H para *cis*-51a (400 MHz, CD_3CN).

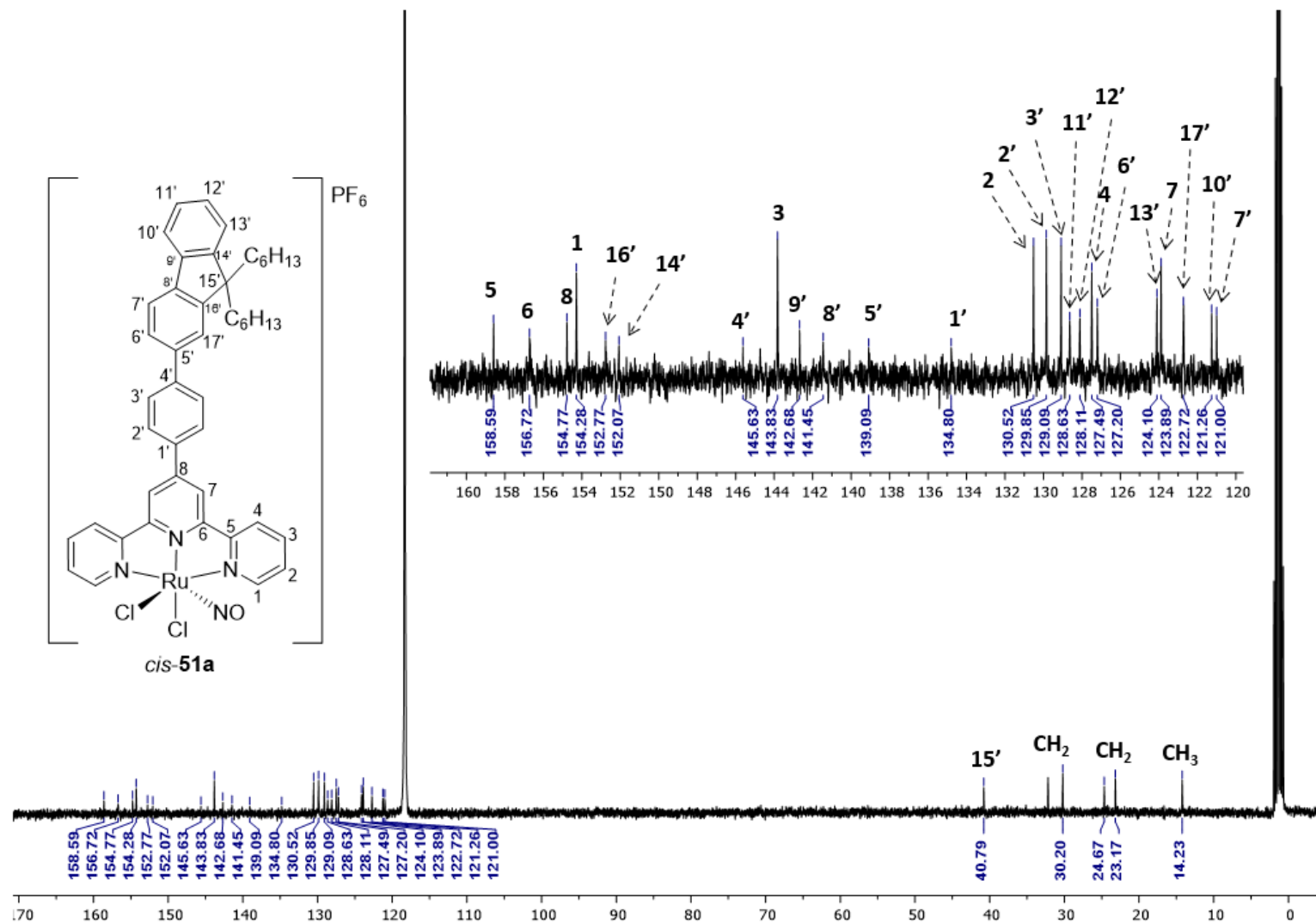


Figura S16. Espectro de RMN-¹³C para *cis-51a* (100 MHz, CD₃CN).

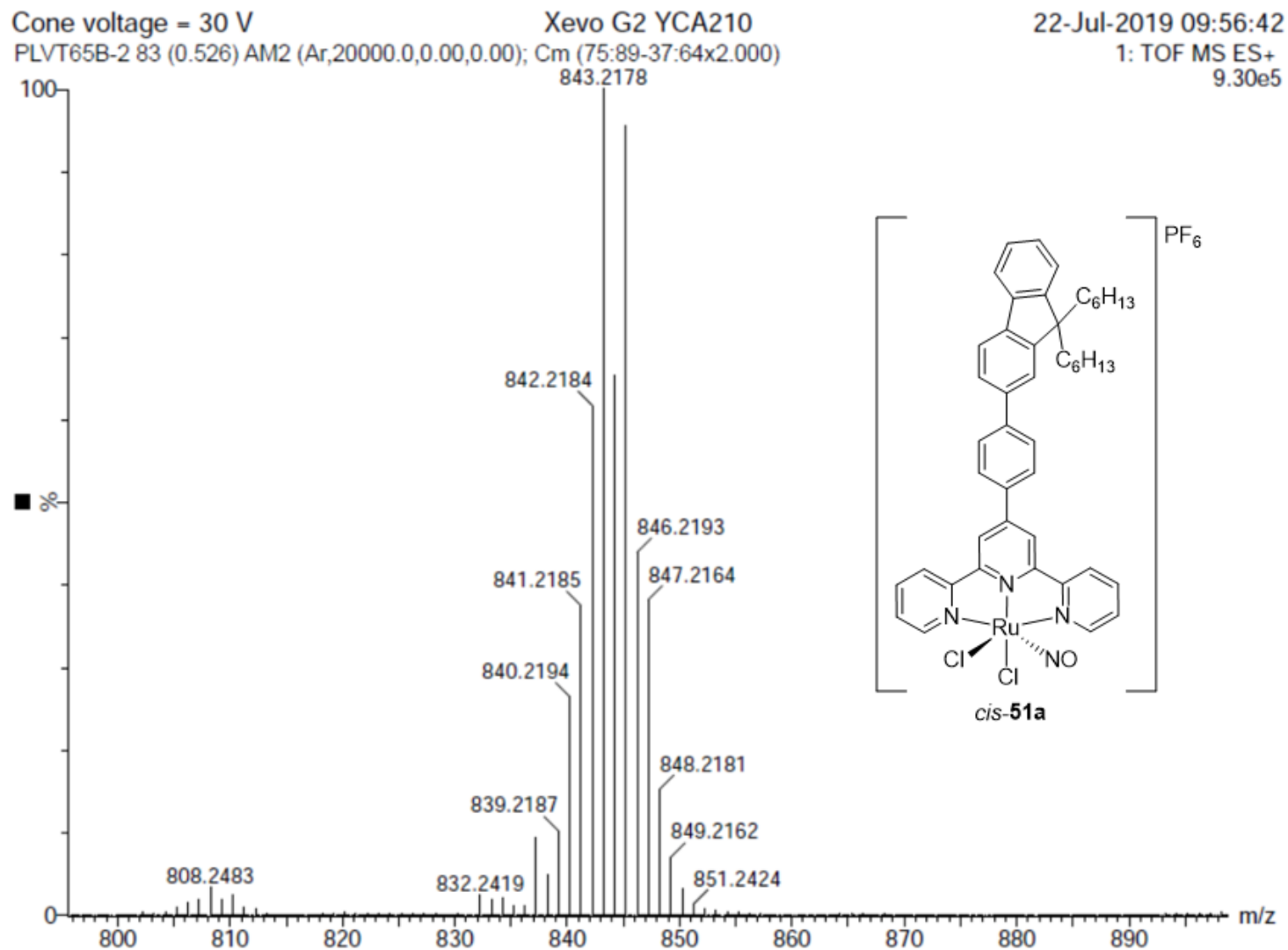


Figura S17. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *cis-51a*.

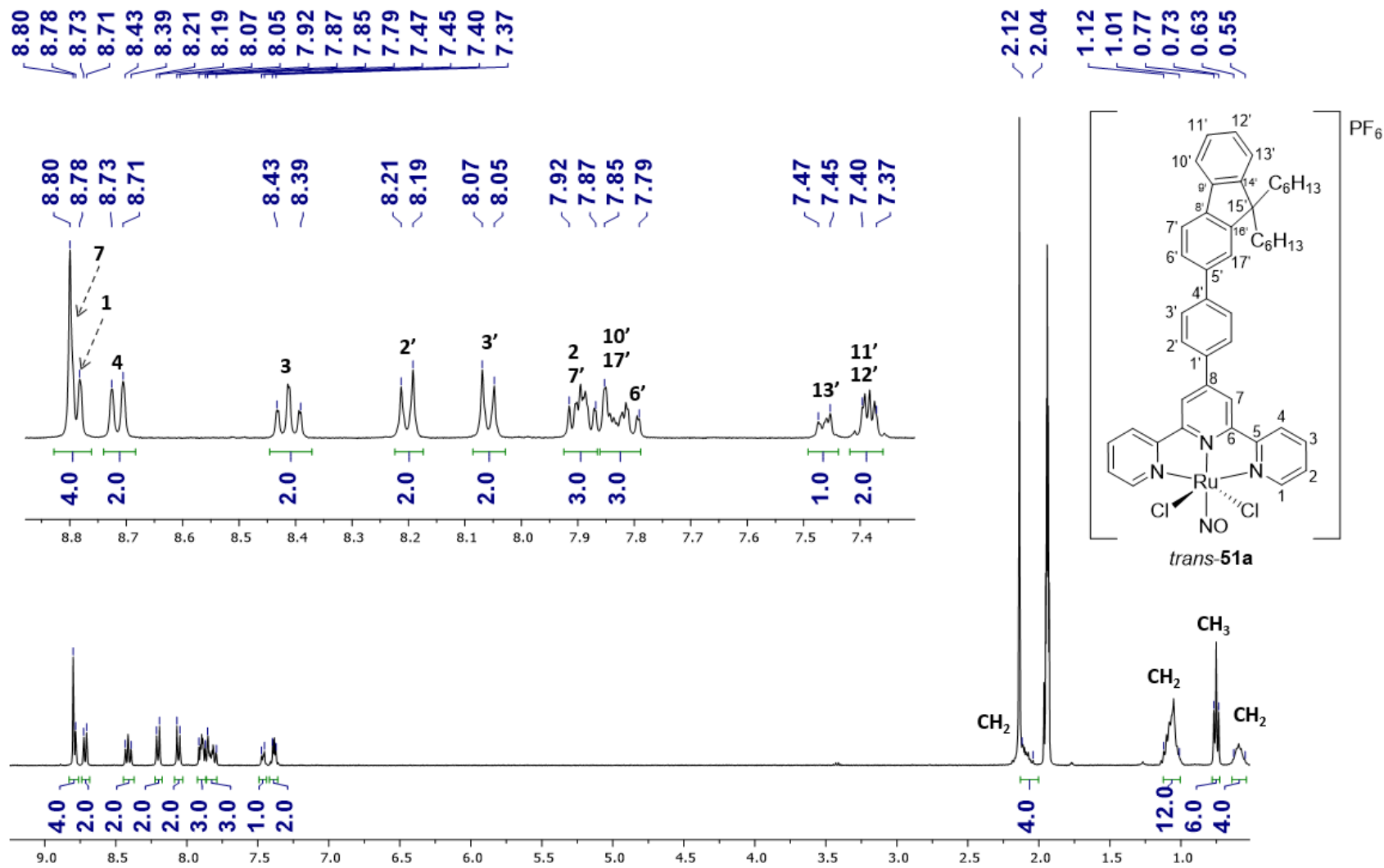


Figura S18. Espectro de RMN- ^1H para *trans*-51a (400 MHz, CD_3CN).

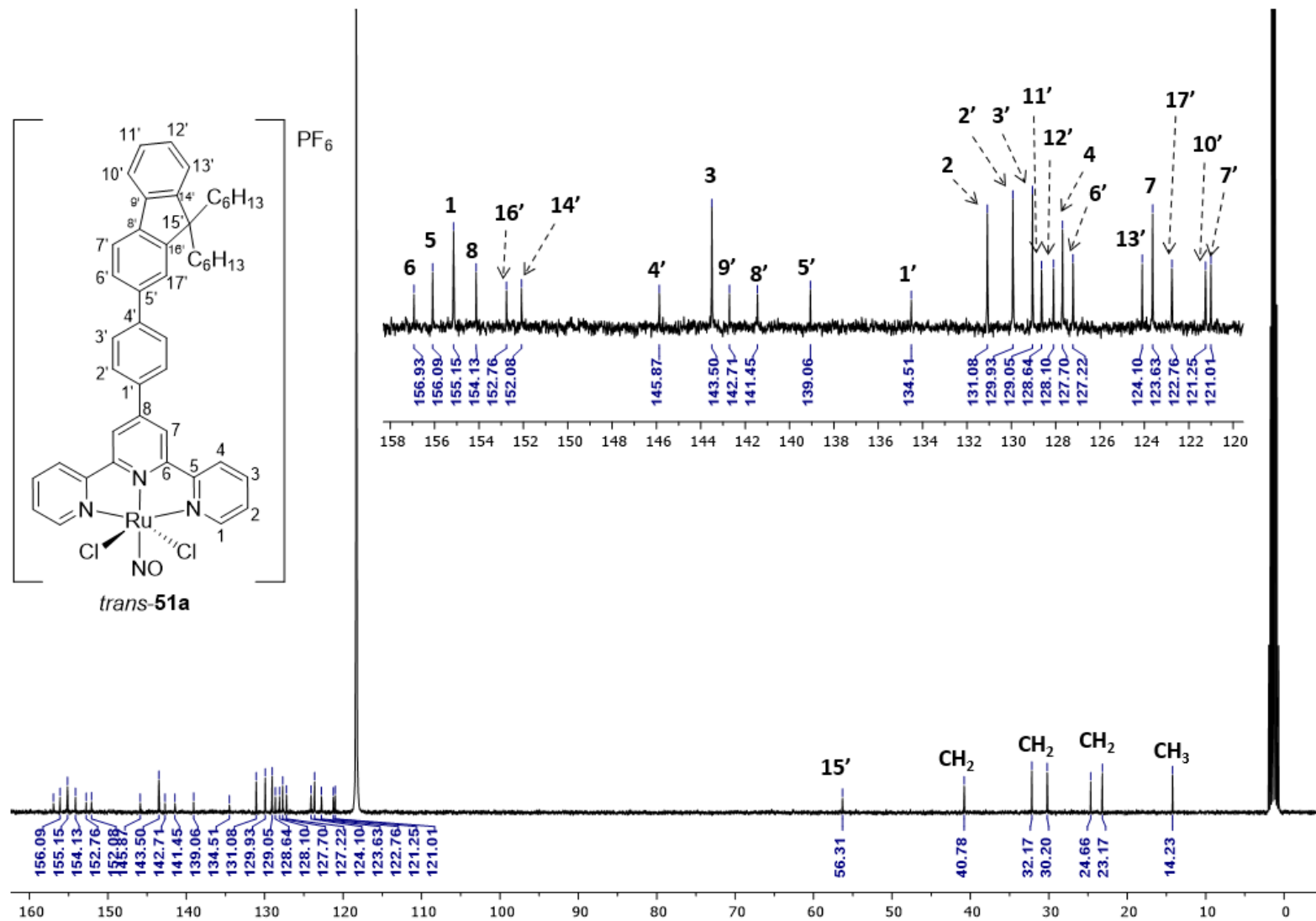


Figura S19. Espectro de RMN-¹³C para *trans*-51a (100 MHz, CD₃CN).

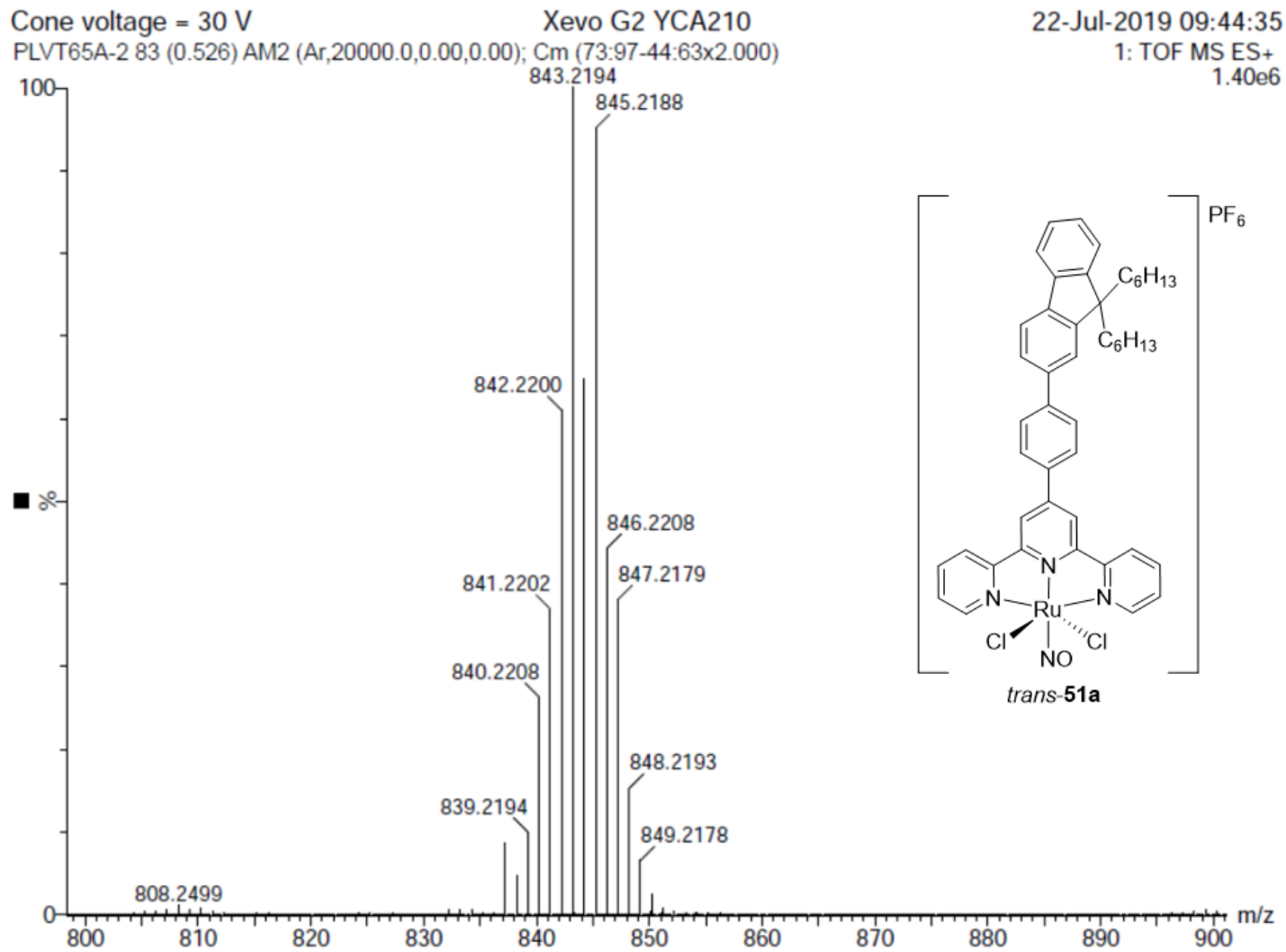


Figura S20. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *trans*-51a.

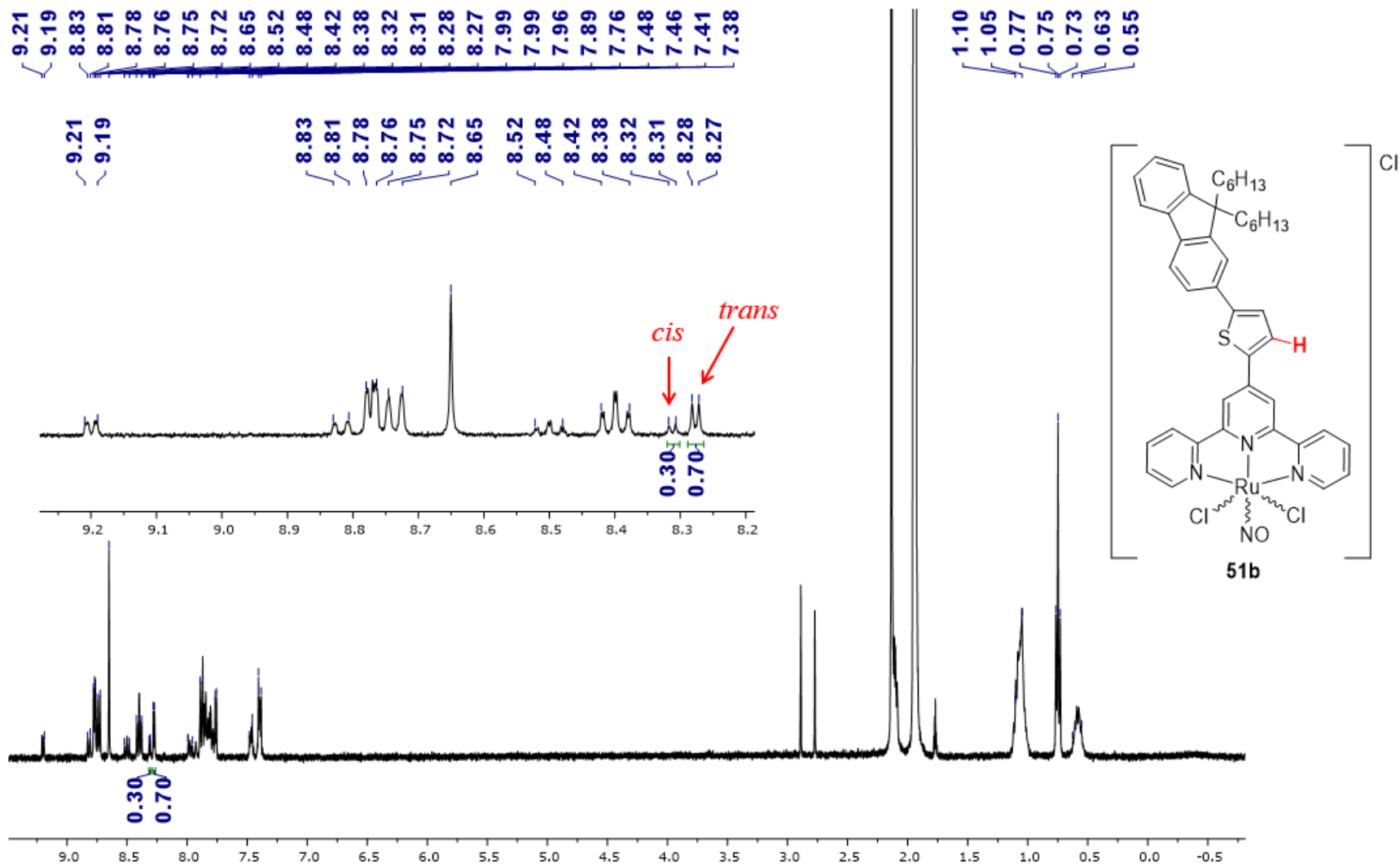


Figura S21. Espectro de RMN- ^1H para **51b** (400 MHz, CD_3CN).

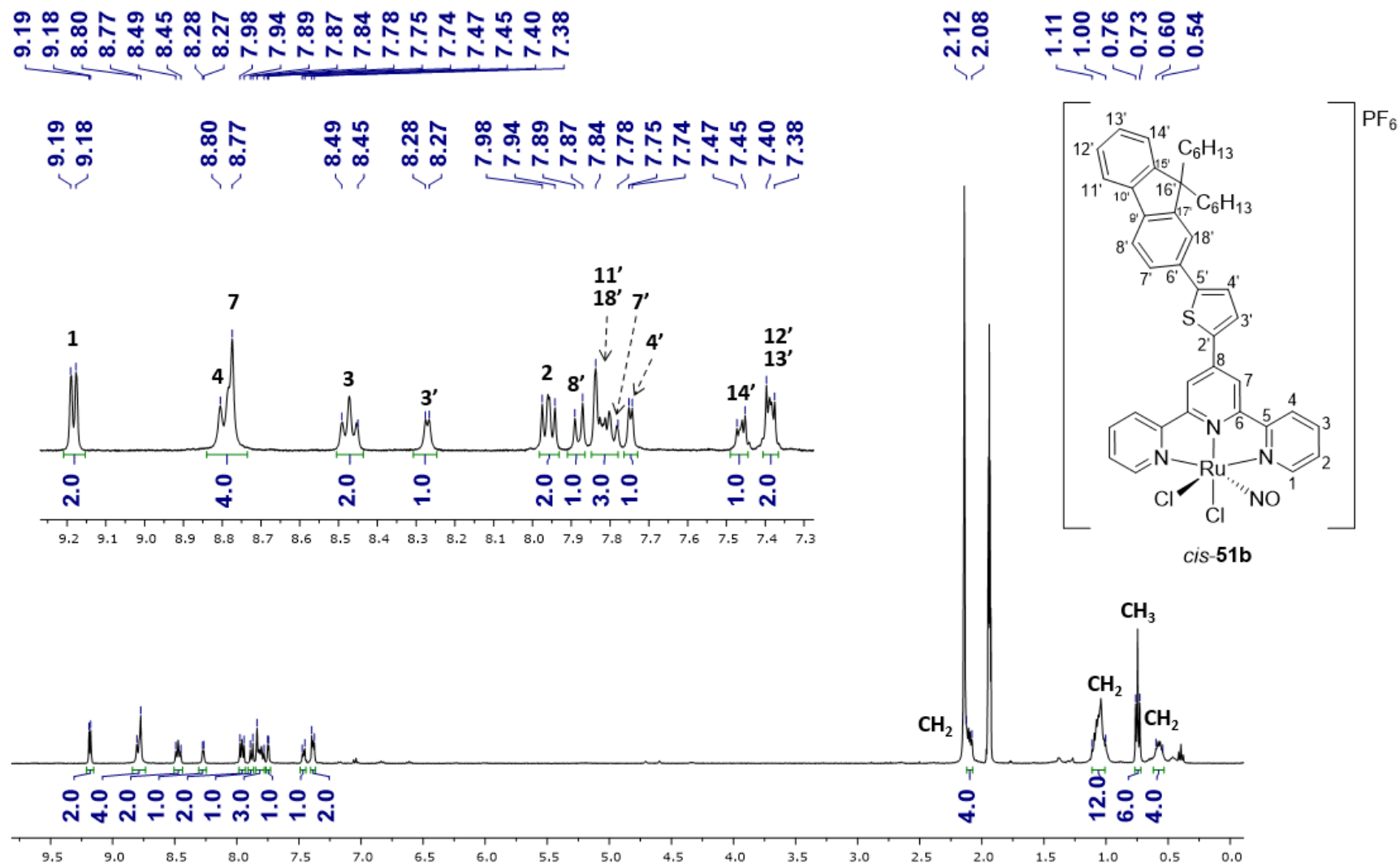


Figura S22. Espectro de RMN- ^1H para *cis*-51b (400 MHz, CD_3CN).

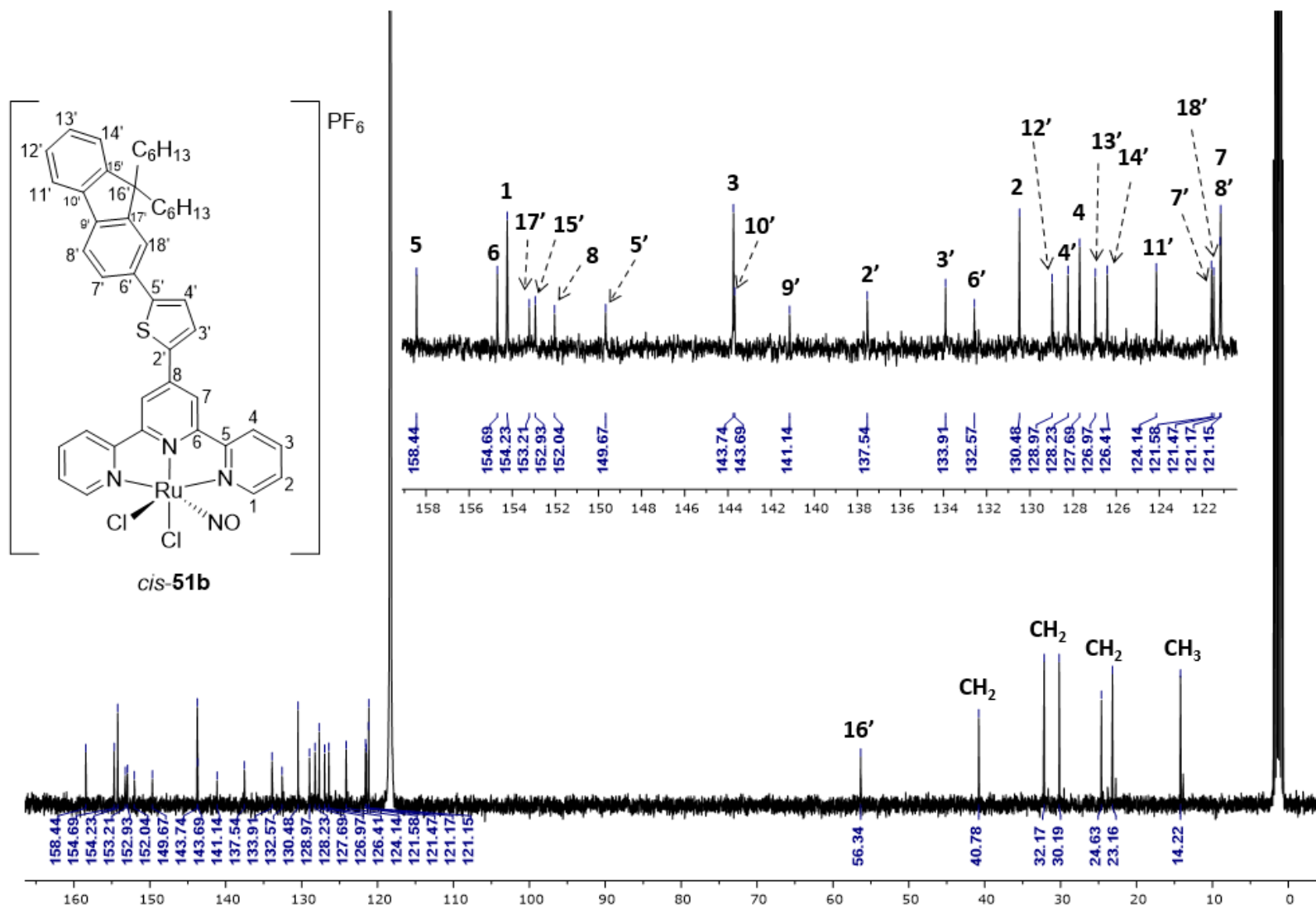


Figura S23. Espectro de RMN- ^{13}C para *cis-51b* (100 MHz, CD_3CN).

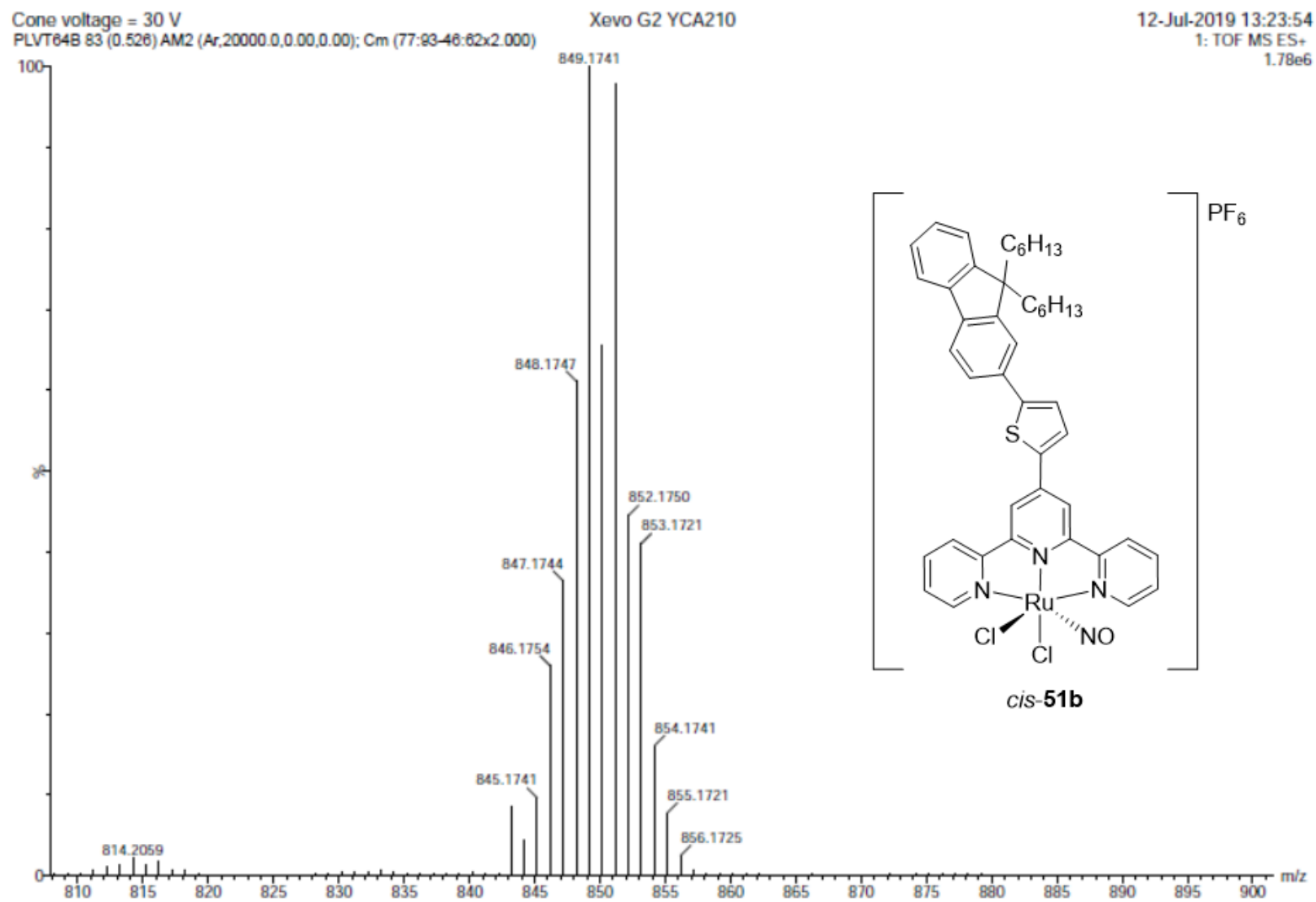


Figura S24. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *cis-51b*.

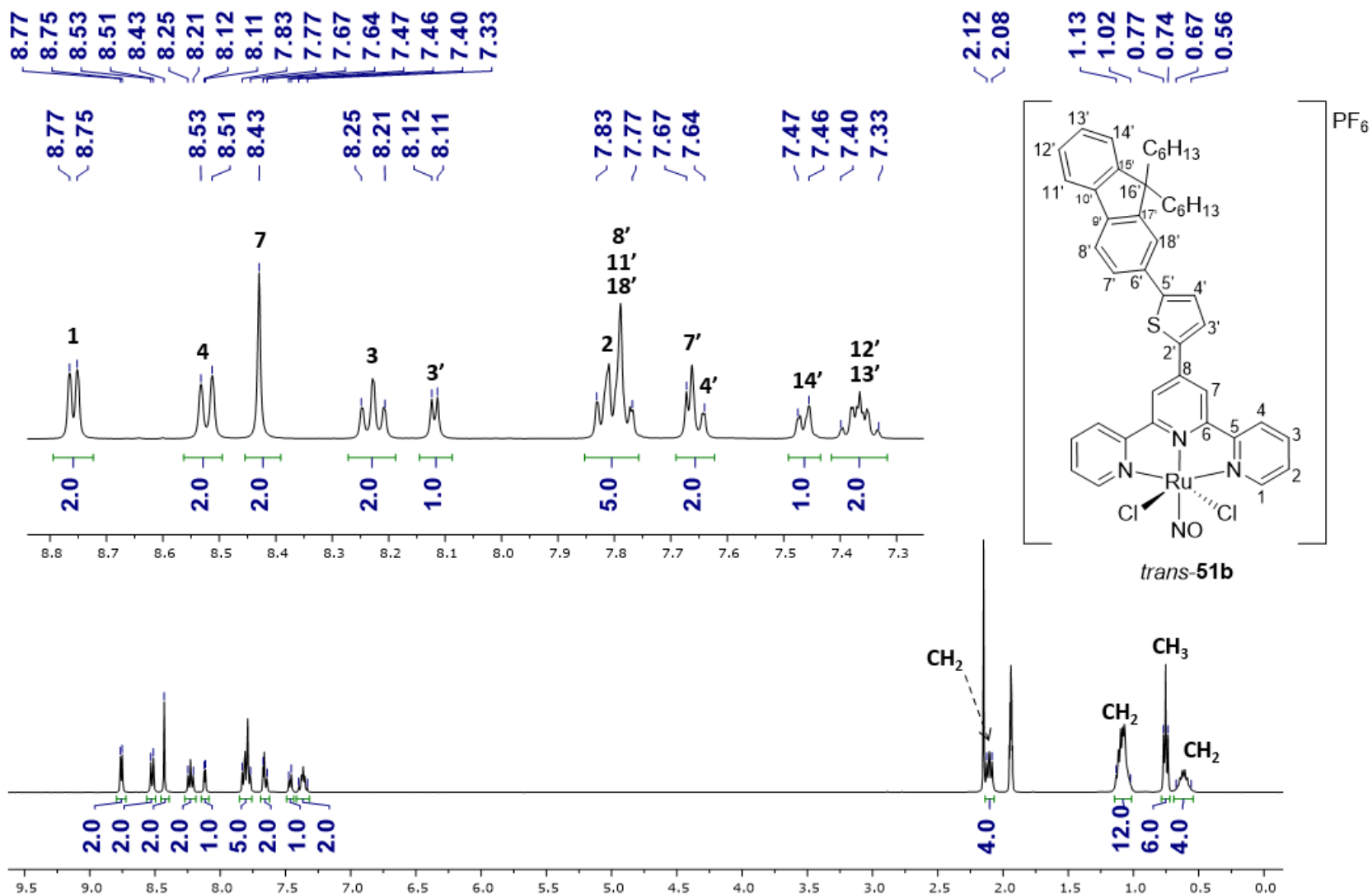


Figura S25. Espectro de RMN-¹H para *trans*-51b (400 MHz, CD₃CN).

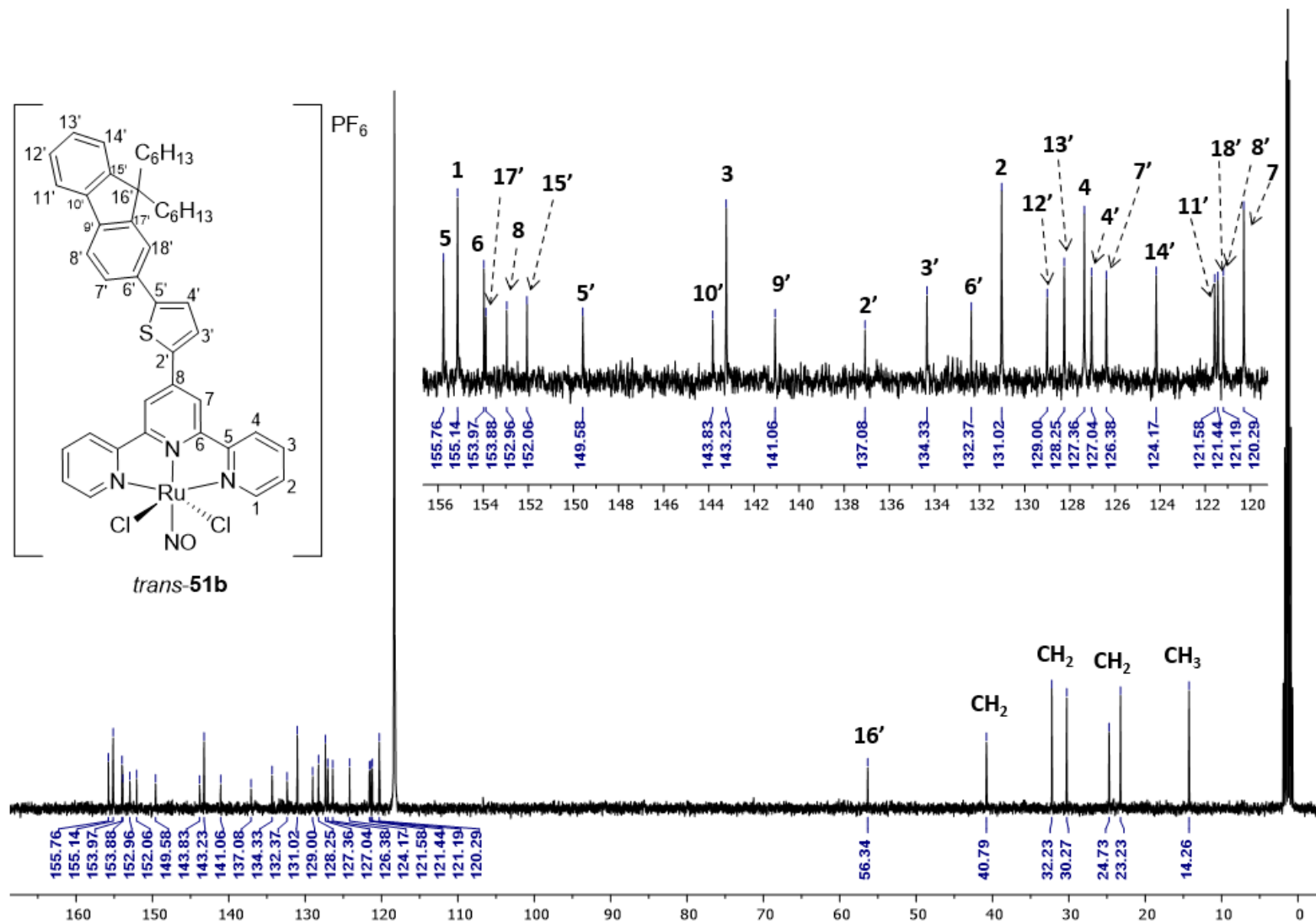


Figura S26. Espectro de RMN-¹³C para *trans*-51b (100 MHz, CD₃CN).

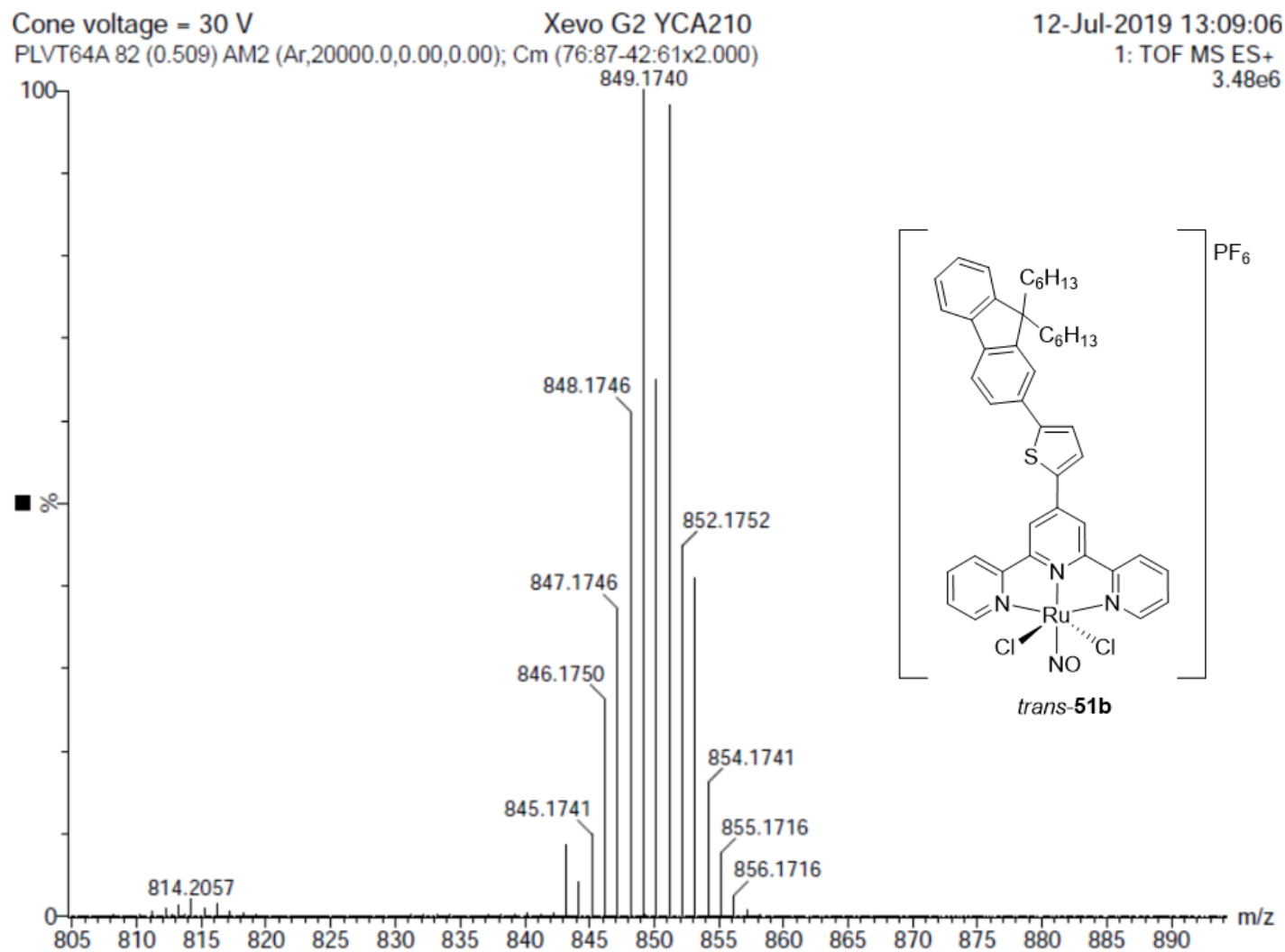


Figura S27. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para *trans*-**51b**.

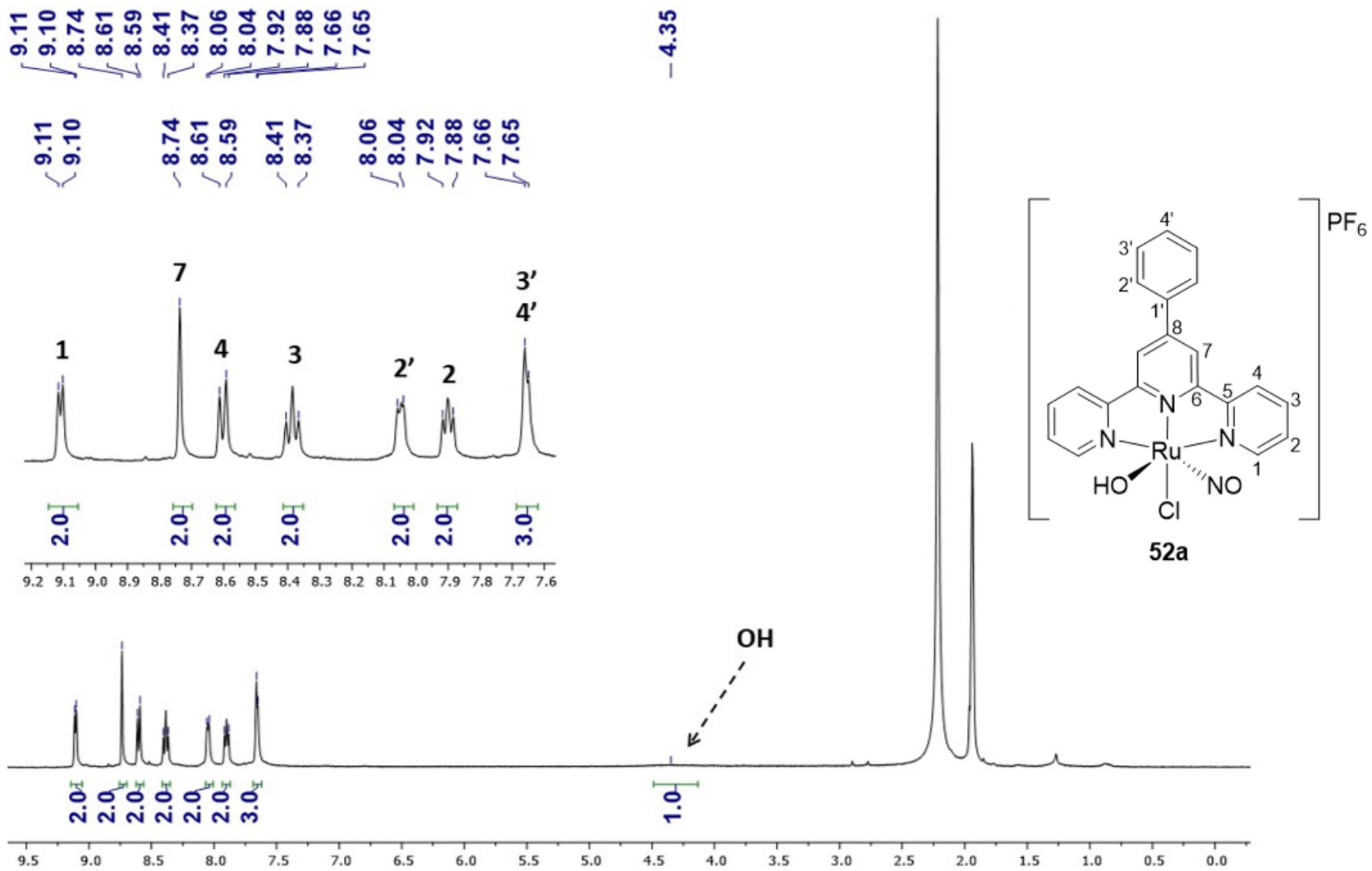


Figura S28. Espectro de RMN-¹H para **52a** (400 MHz, CD₃CN).

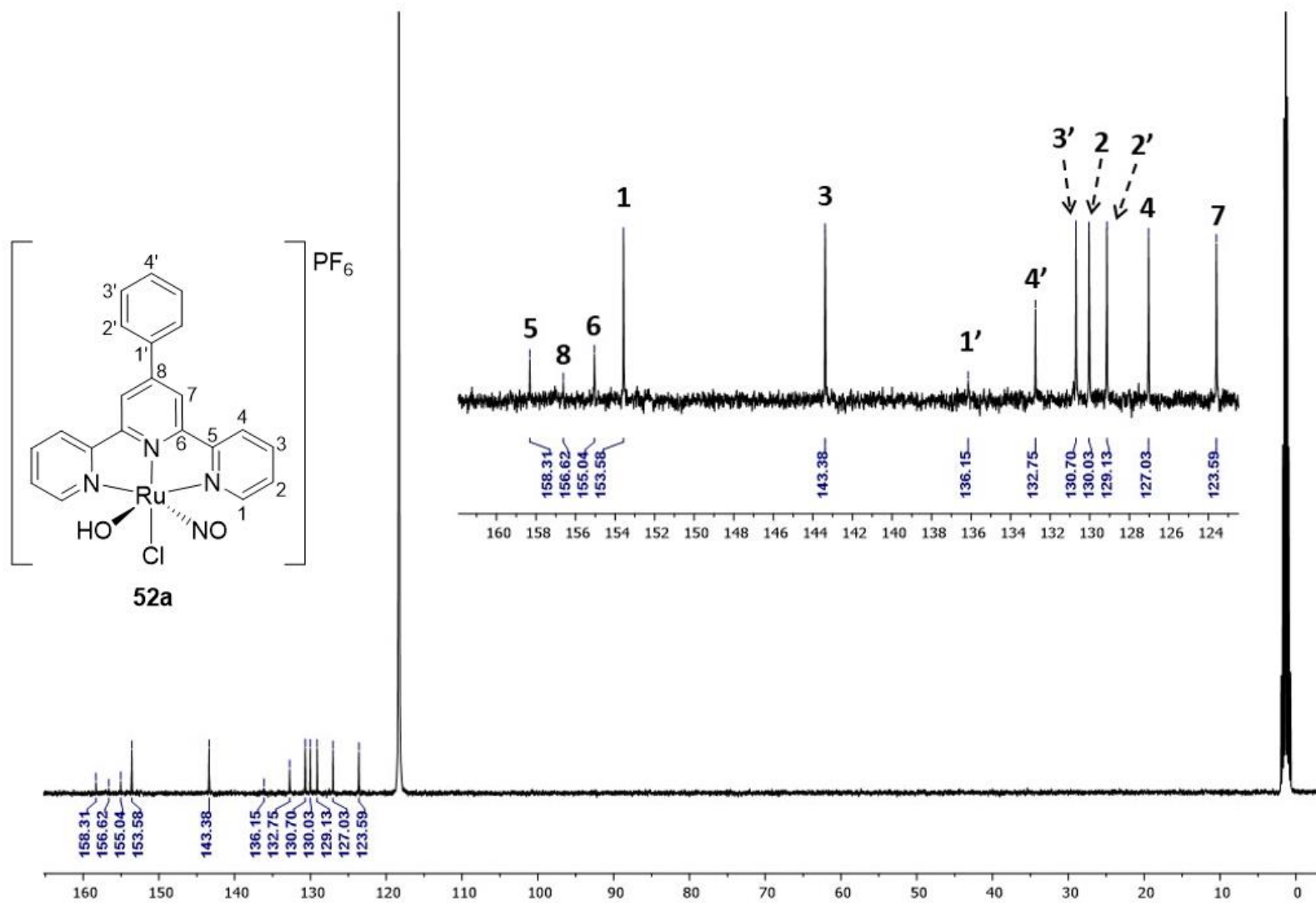


Figura S29. Espectro de RMN- ^{13}C para **52a** (100 MHz, CD_3CN).

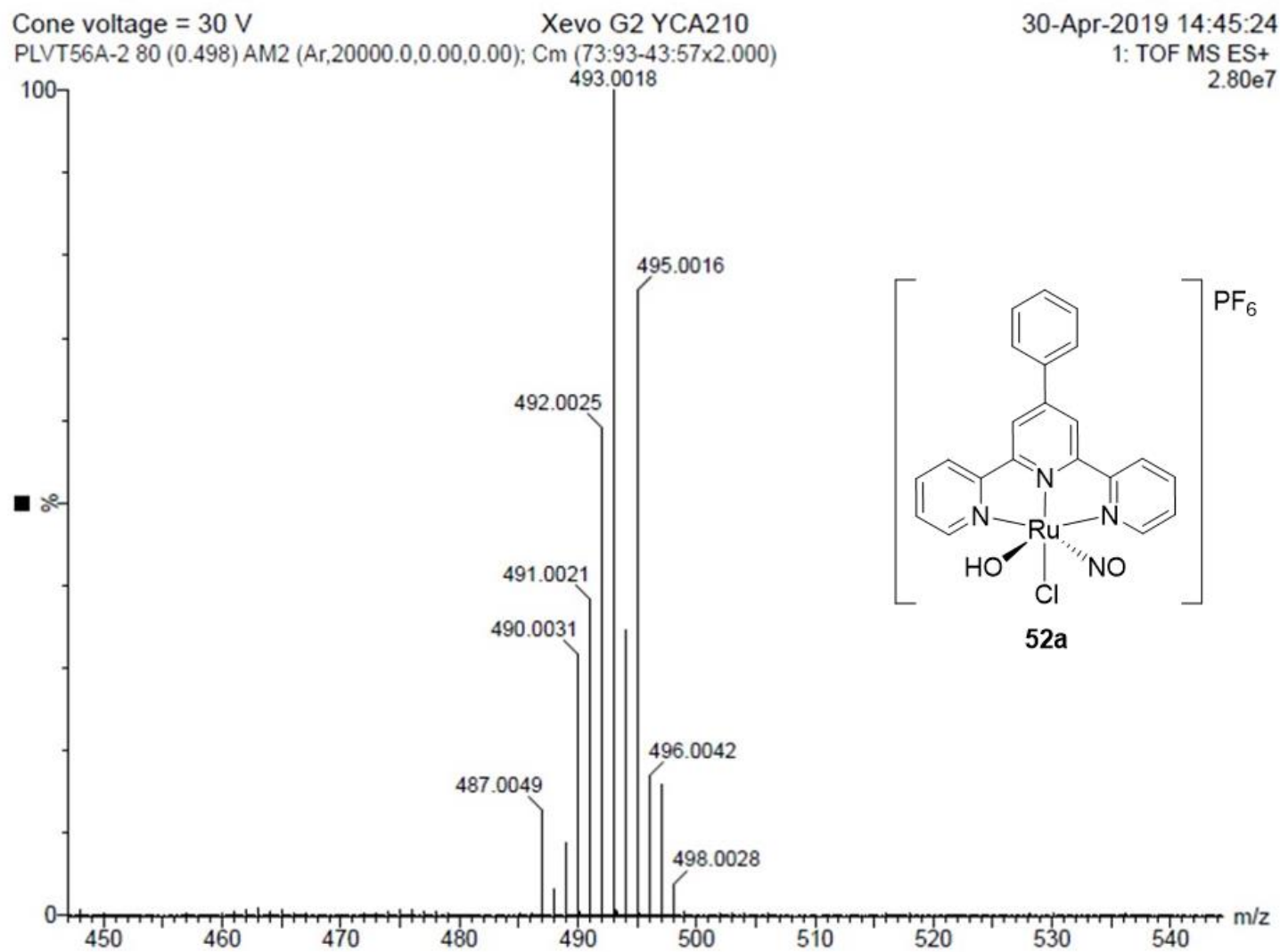


Figura S30. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **52a**.

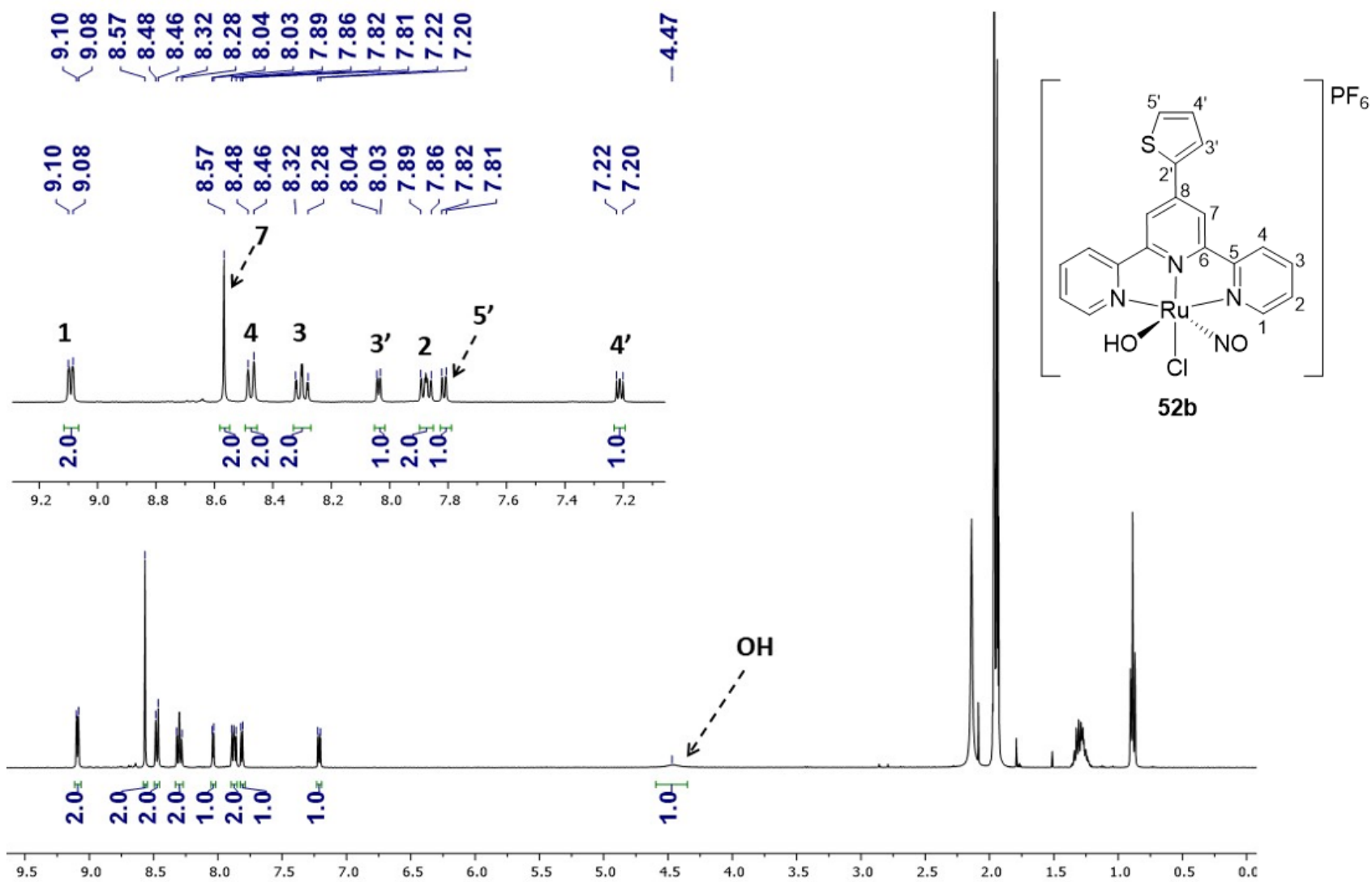


Figura S31. Espectro de RMN-¹H para **52b** (400 MHz, CD₃CN).

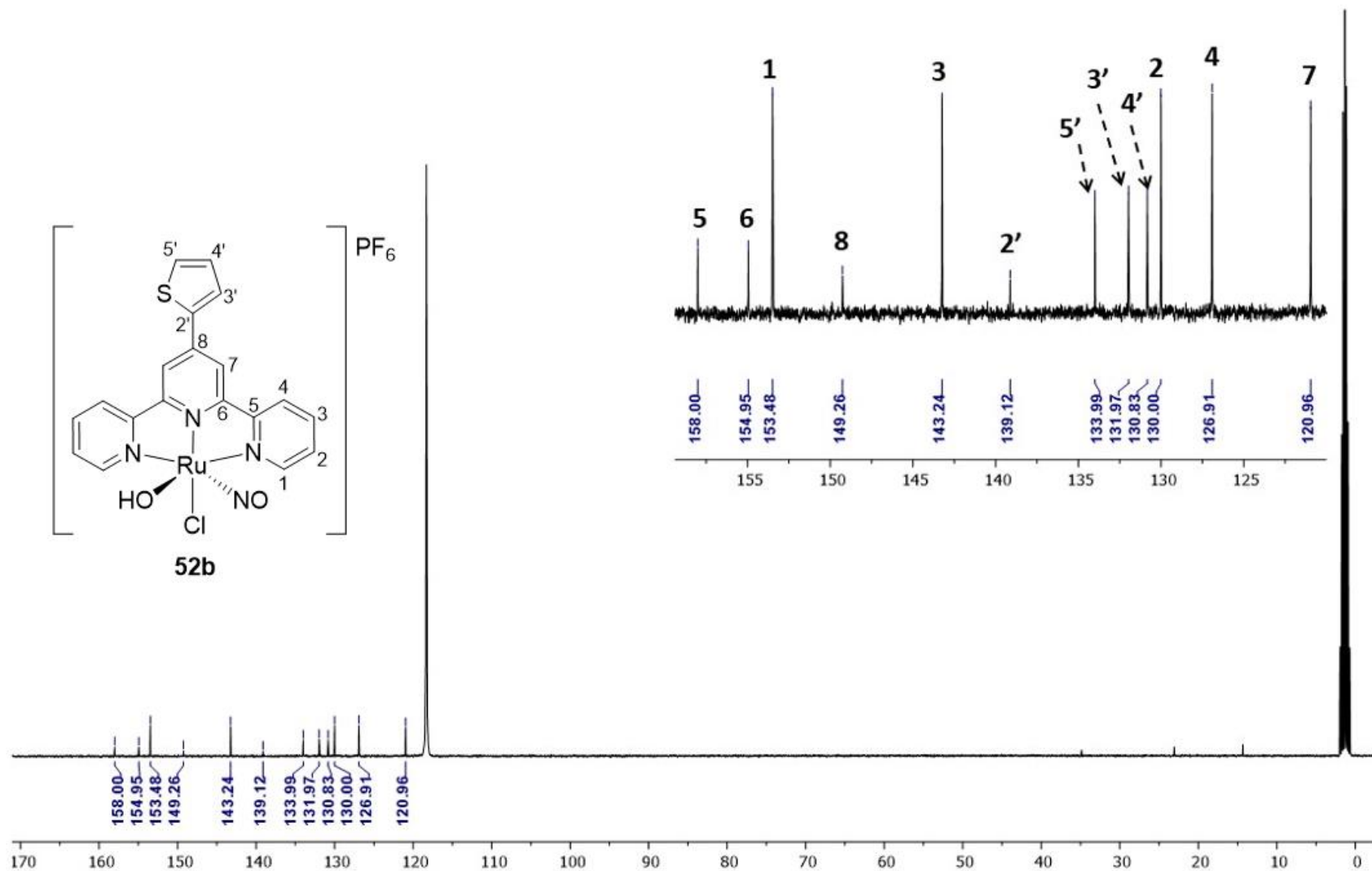


Figura S32. Espectro de RMN- ^{13}C para **52b** (100 MHz, CD_3CN).

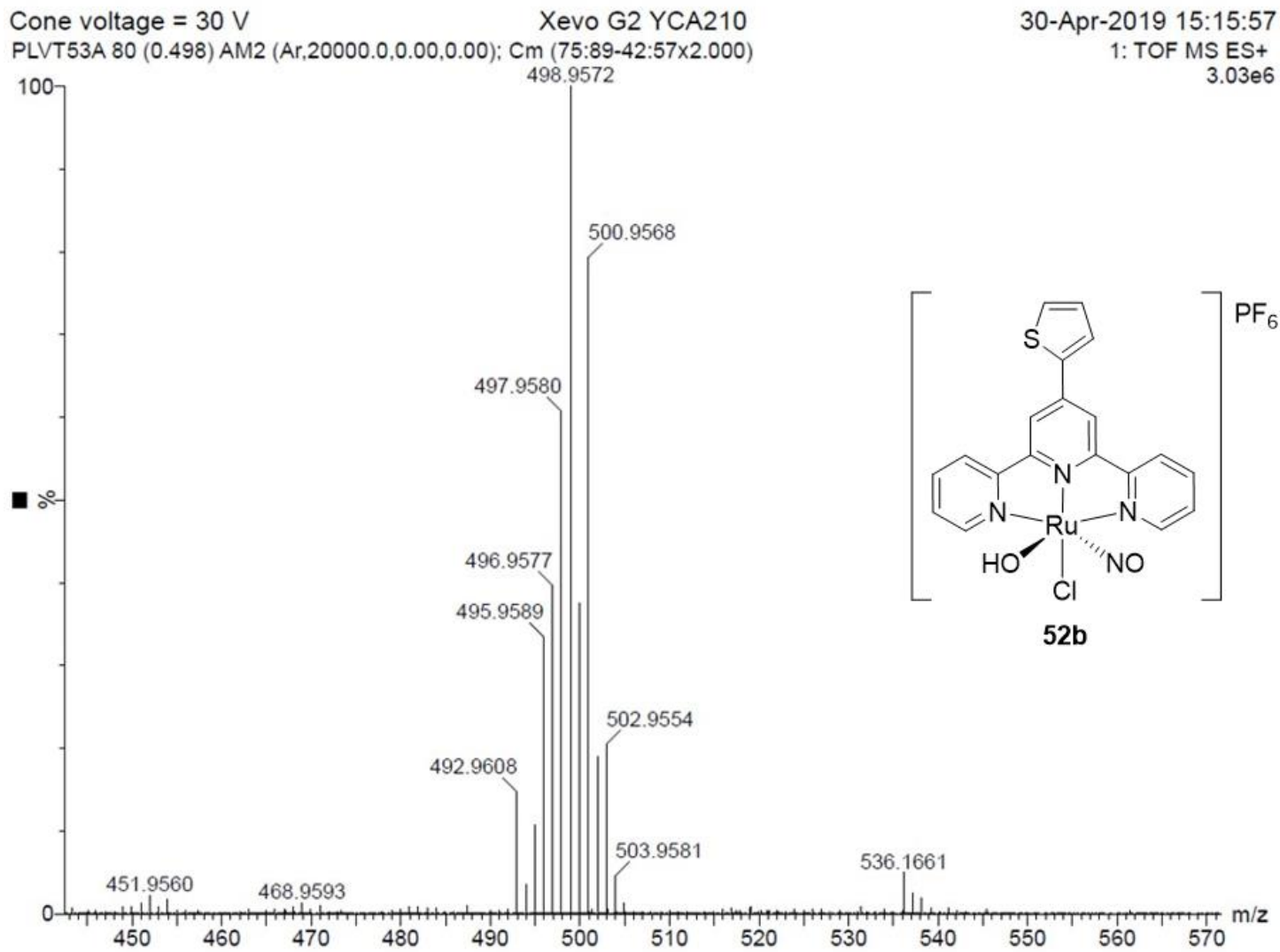


Figura S33. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **52b**.

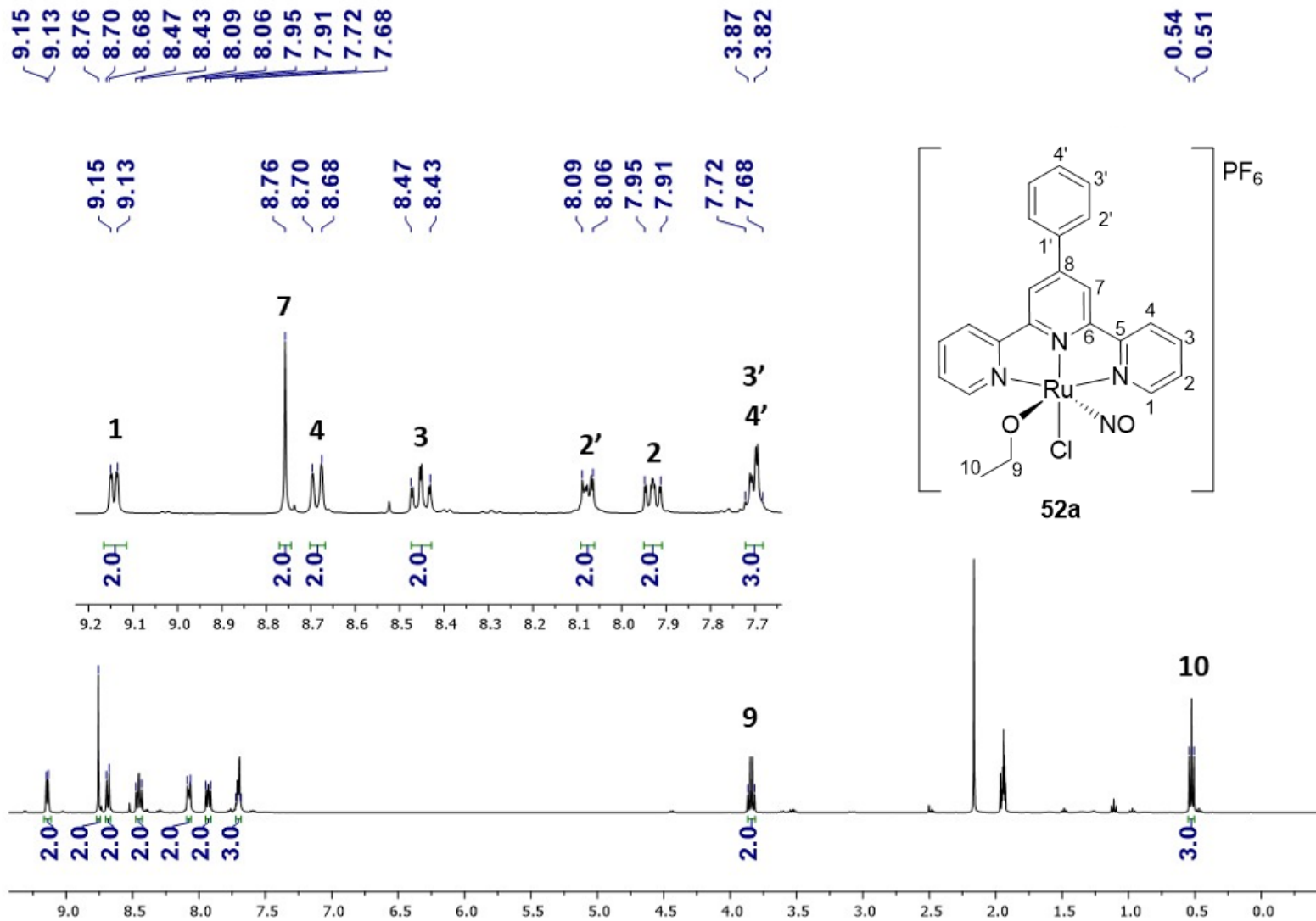


Figura S34. Espectro de RMN- ^1H para **53a** (400 MHz, CD_3CN).

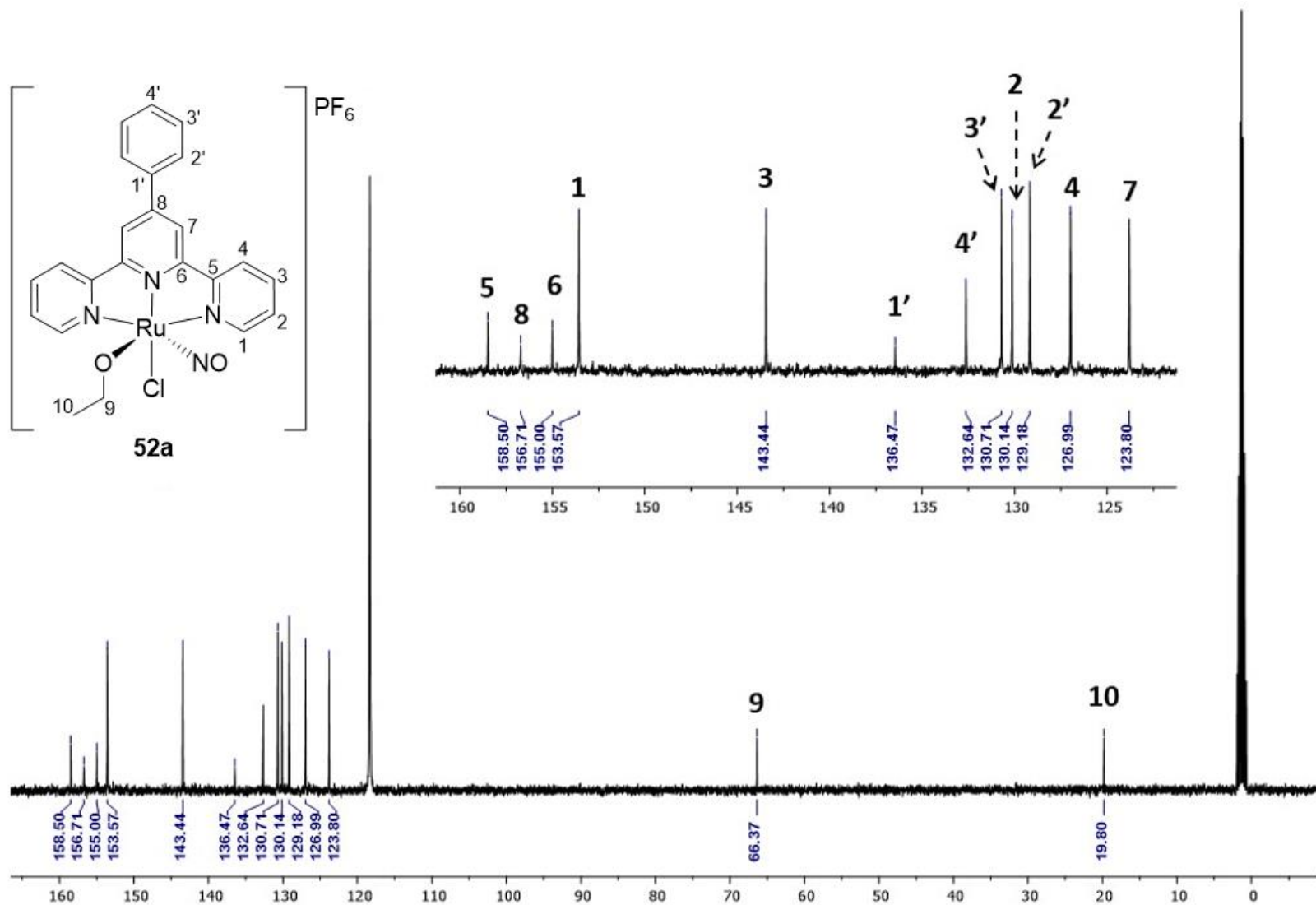


Figura S35. Espectro de RMN- ^{13}C para **53a** (100 MHz, CD_3CN).

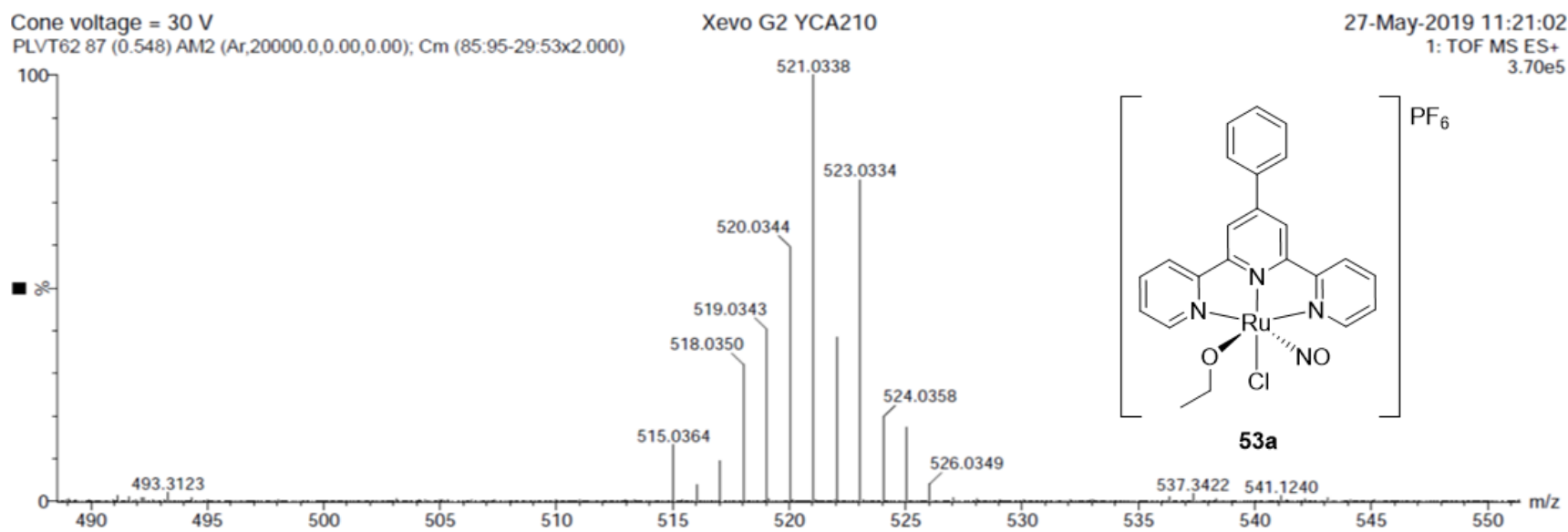


Figura S36. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **53a**.

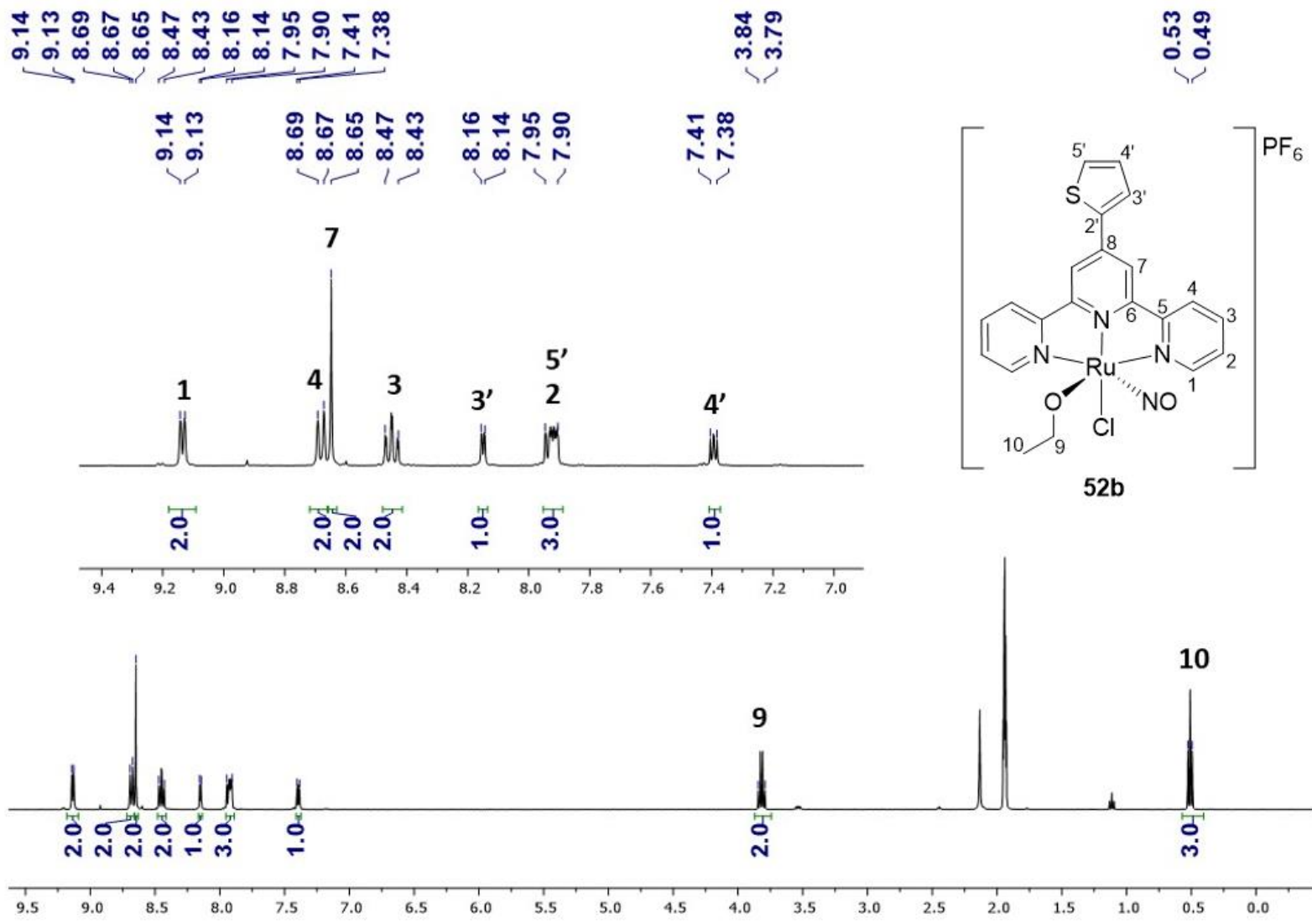


Figura S37. Espectro de RMN- ^1H para **53b** (400 MHz, CD_3CN).

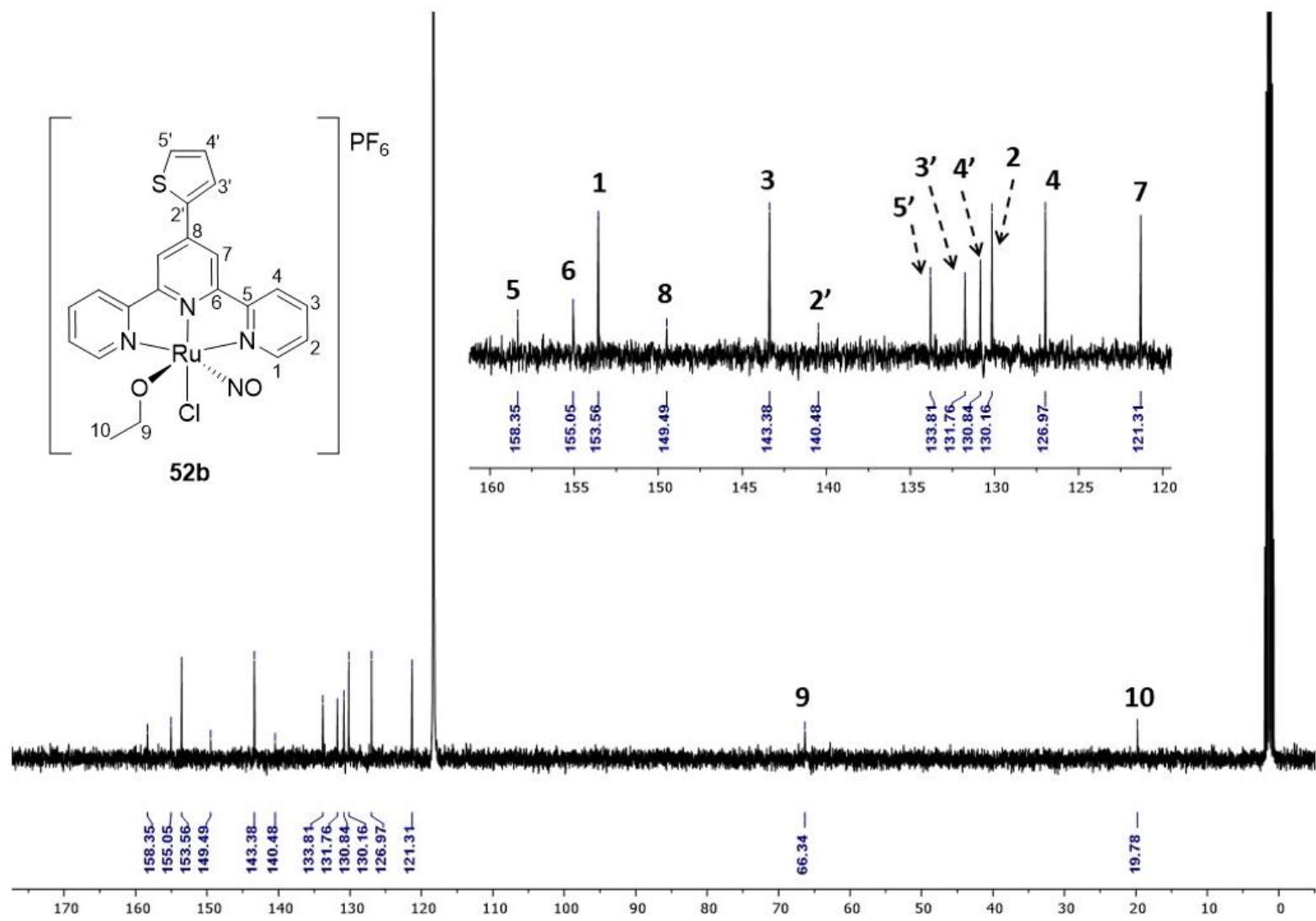


Figura S38. Espectro de RMN- ^{13}C para **53b** (100 MHz, CD_3CN).

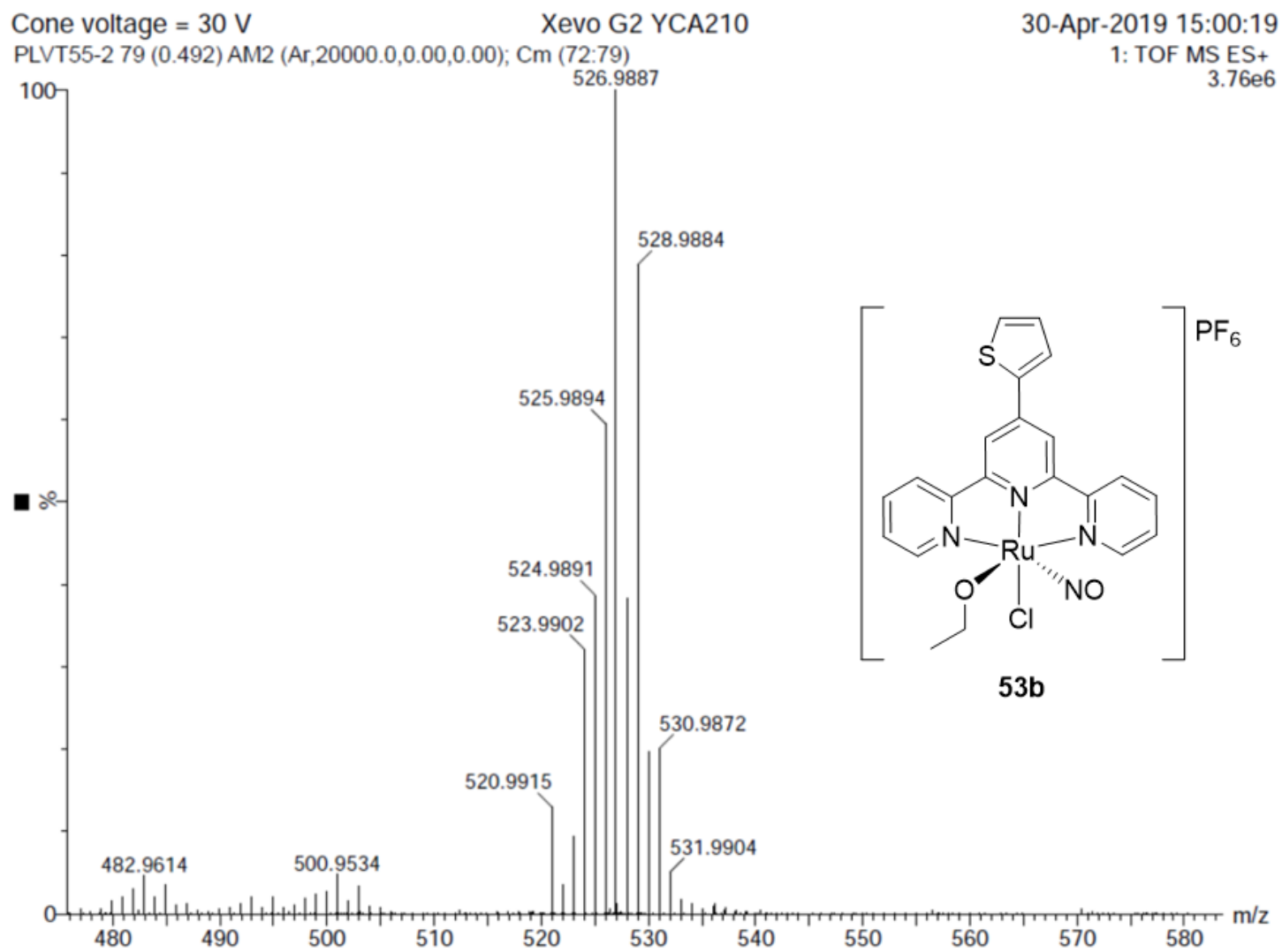


Figura S39. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **53b**.

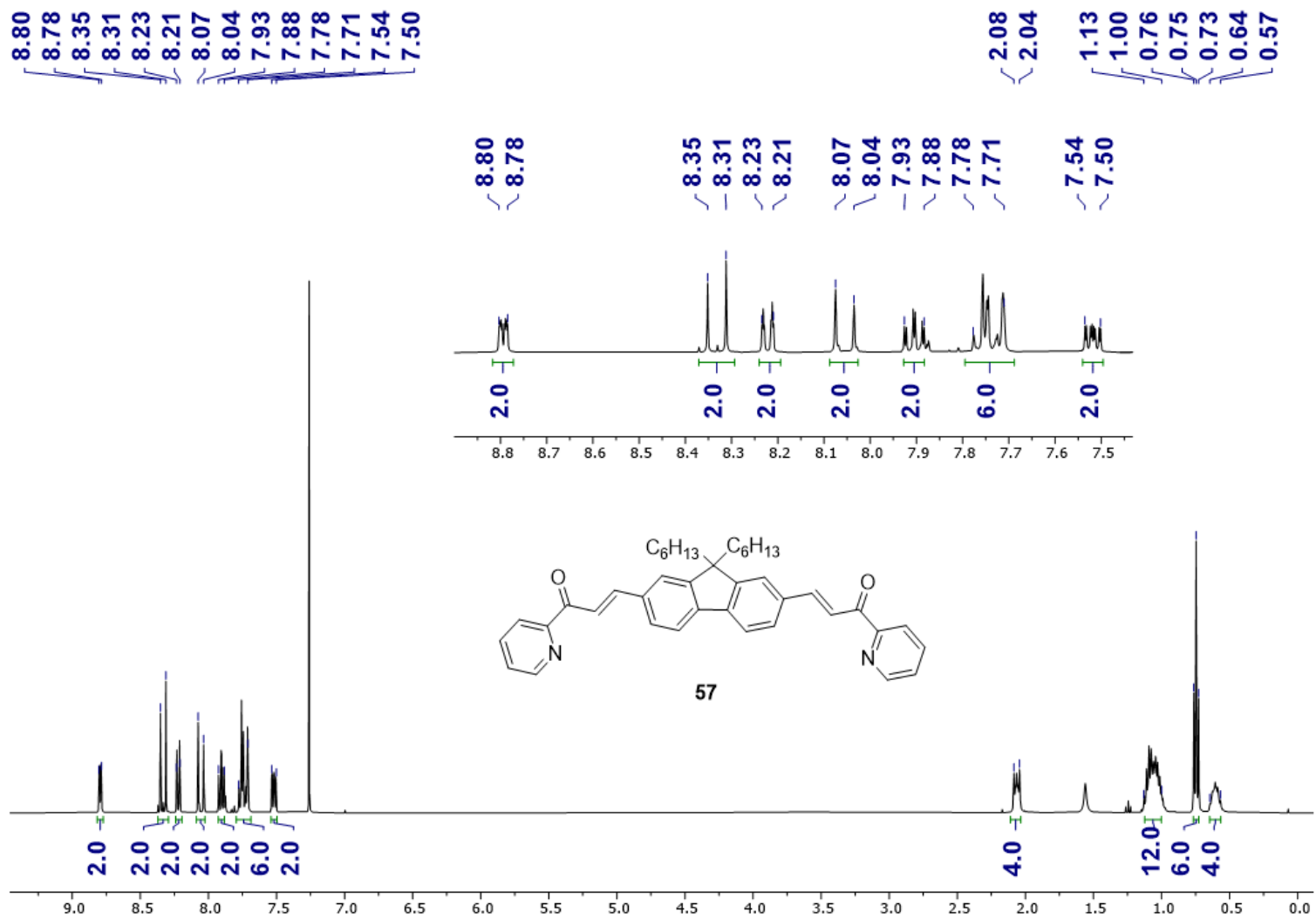


Figura S40. Espectro de RMN- 1H para **57** (400 MHz, $CDCl_3$).

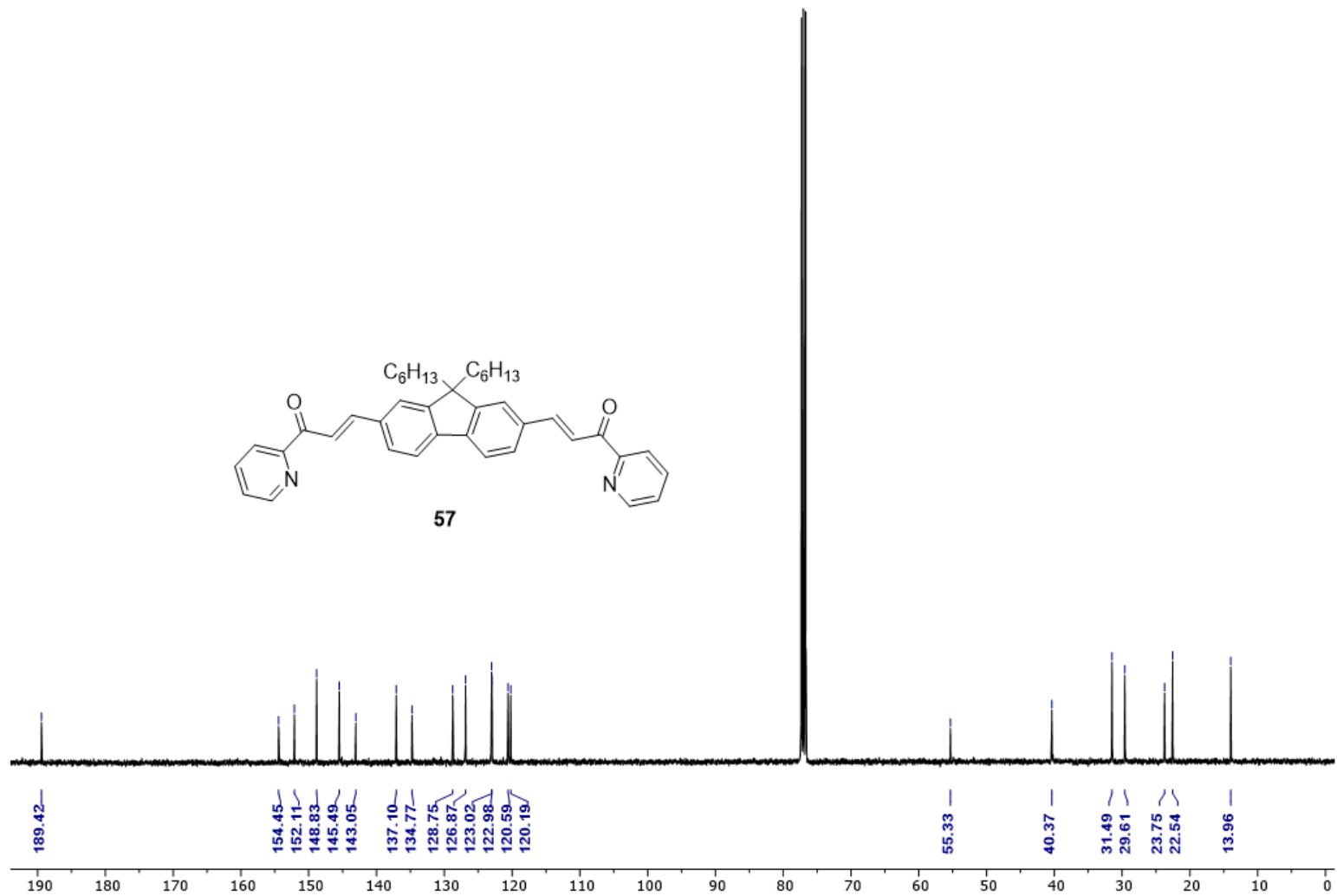


Figura S41. Espectro de RMN- ^{13}C para **57** (100 MHz, $CDCl_3$).

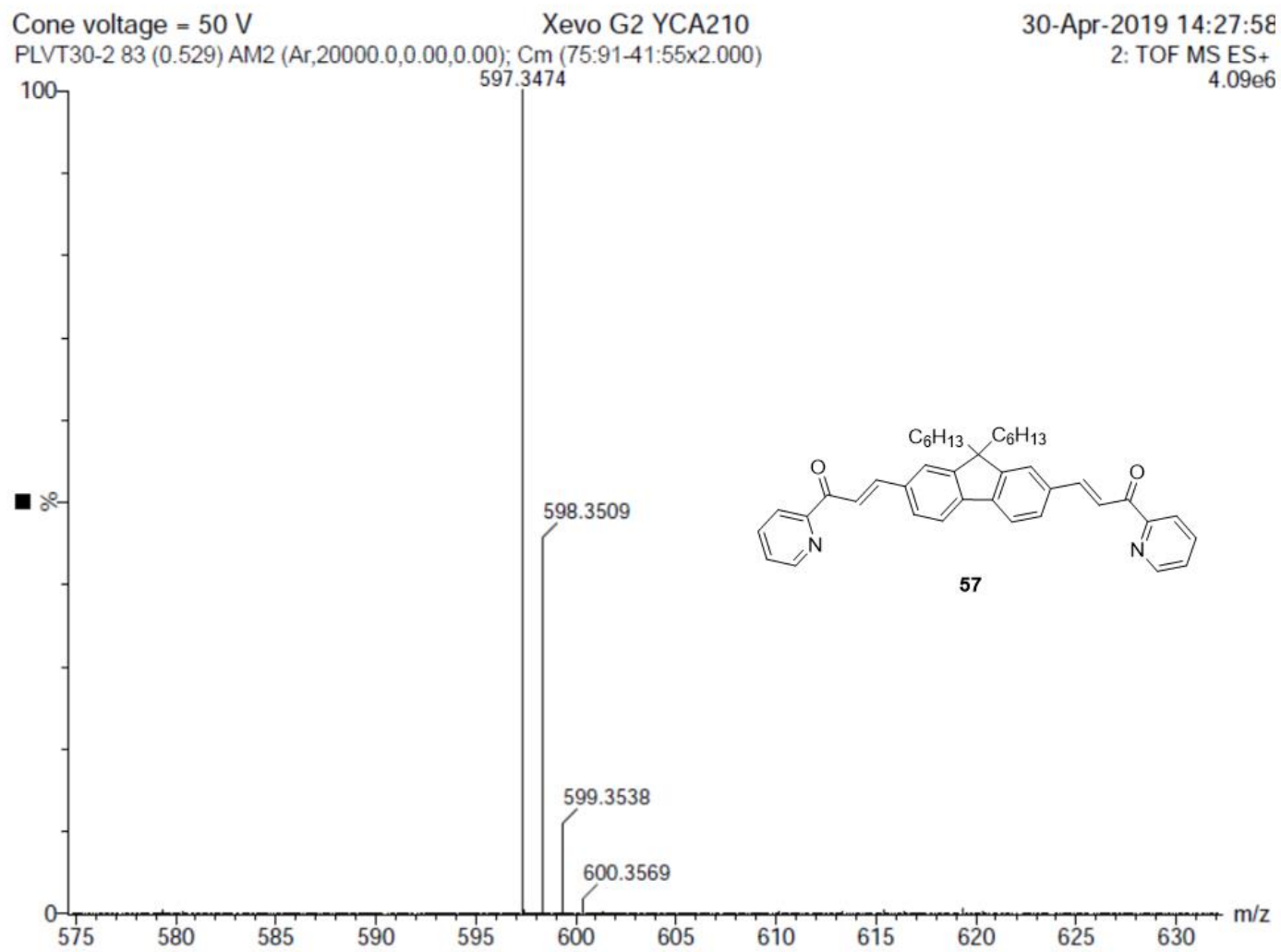


Figura S42. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **57**.

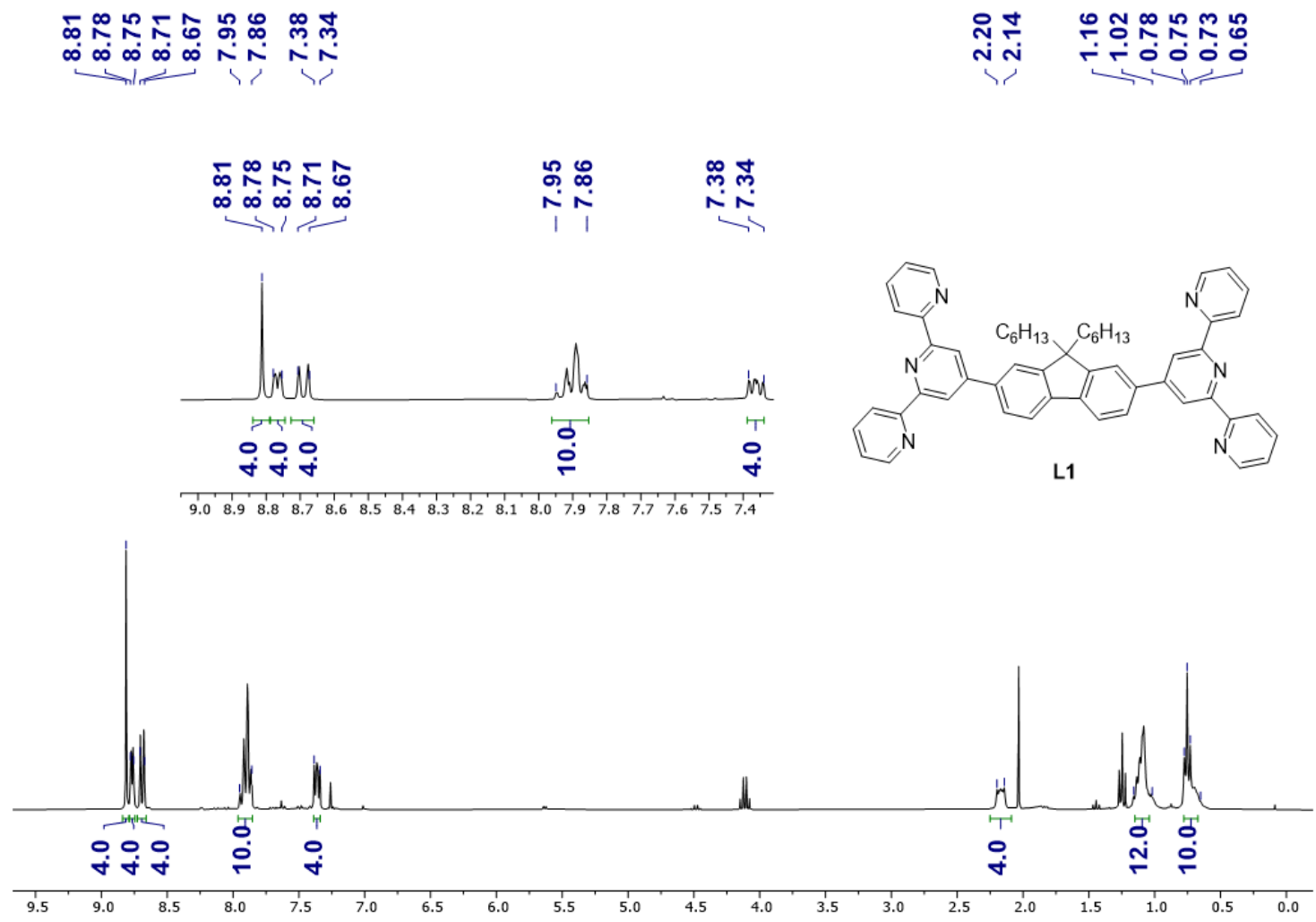


Figura S43. Espectro de RMN-¹H para **L1** (400 MHz, CDCl₃).

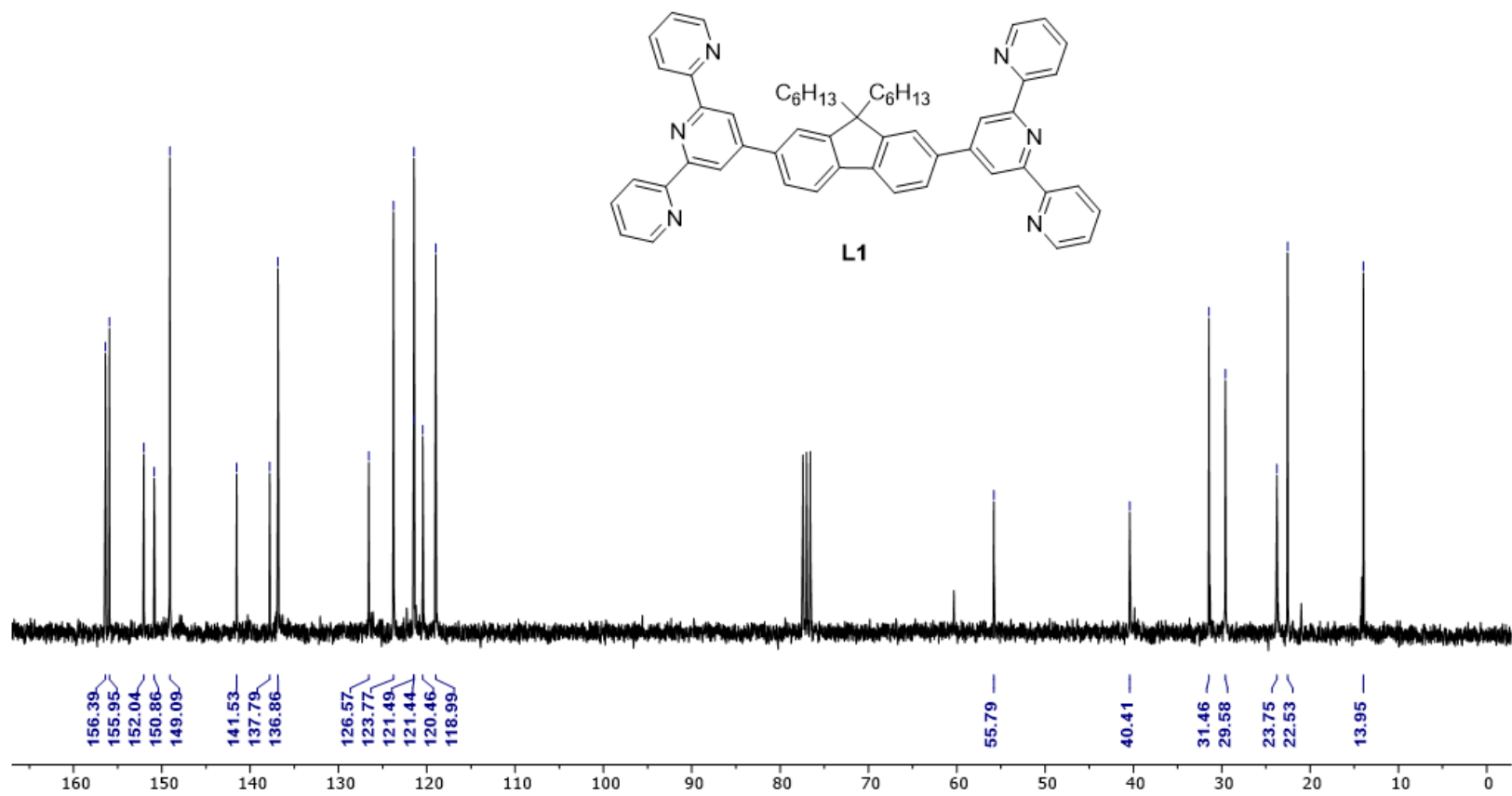


Figura S44. Espectro de RMN-¹³C para L1 (100 MHz, CDCl₃).

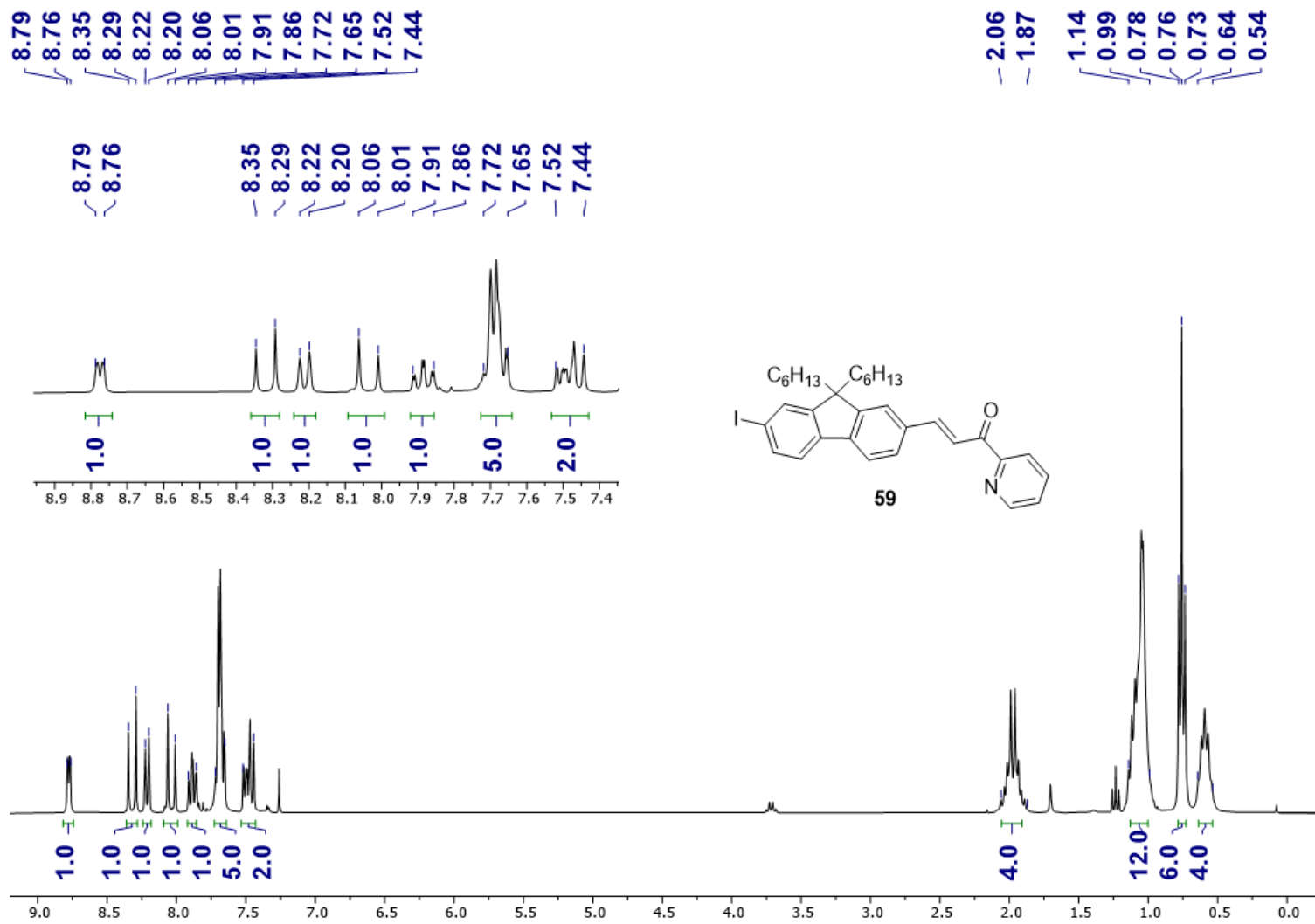


Figura S45. Espectro de RMN-¹H para **59** (400 MHz, CDCl₃).

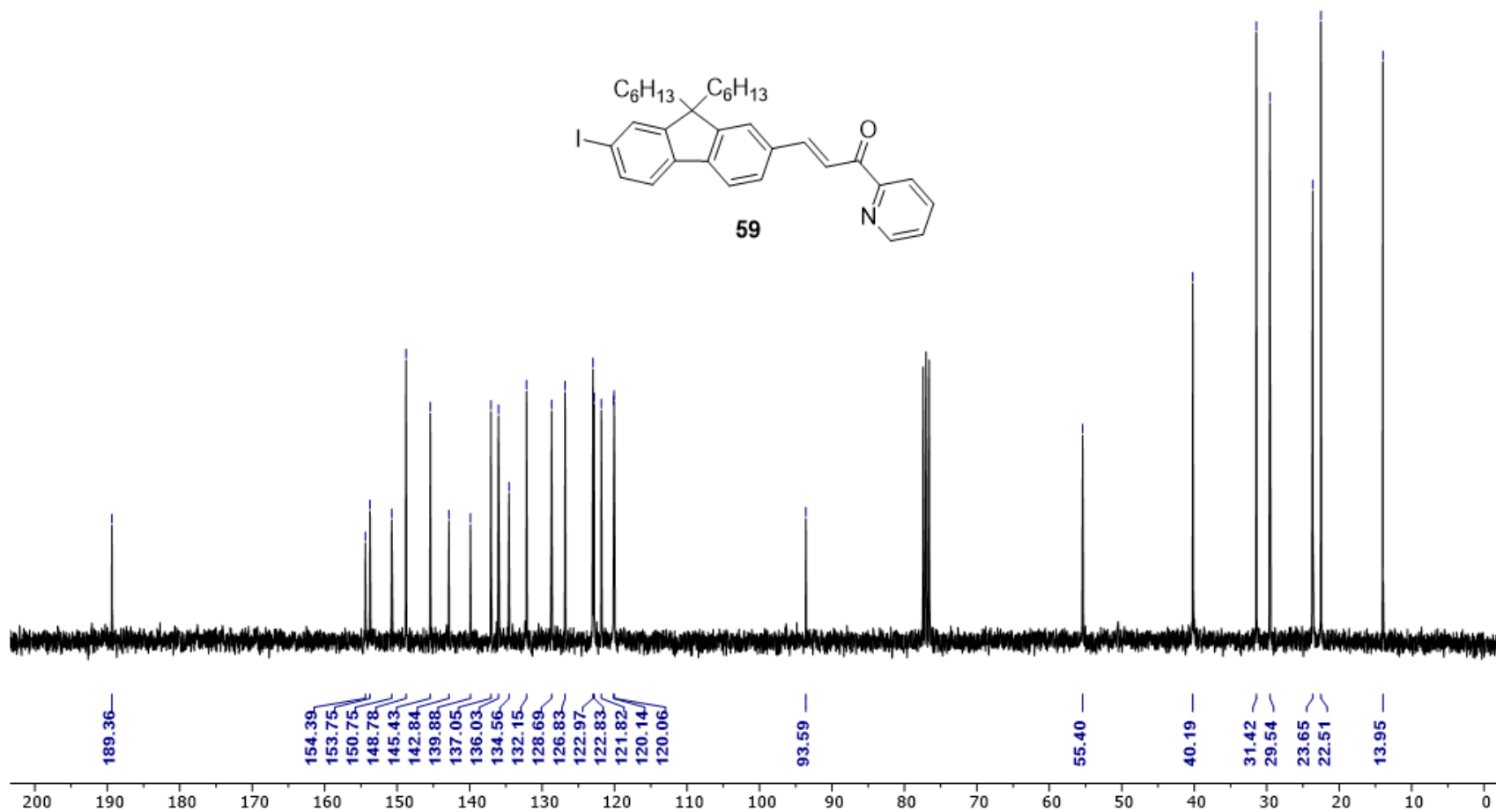


Figura S46. Espectro de RMN- ^{13}C para **59** (100 MHz, $CDCl_3$).

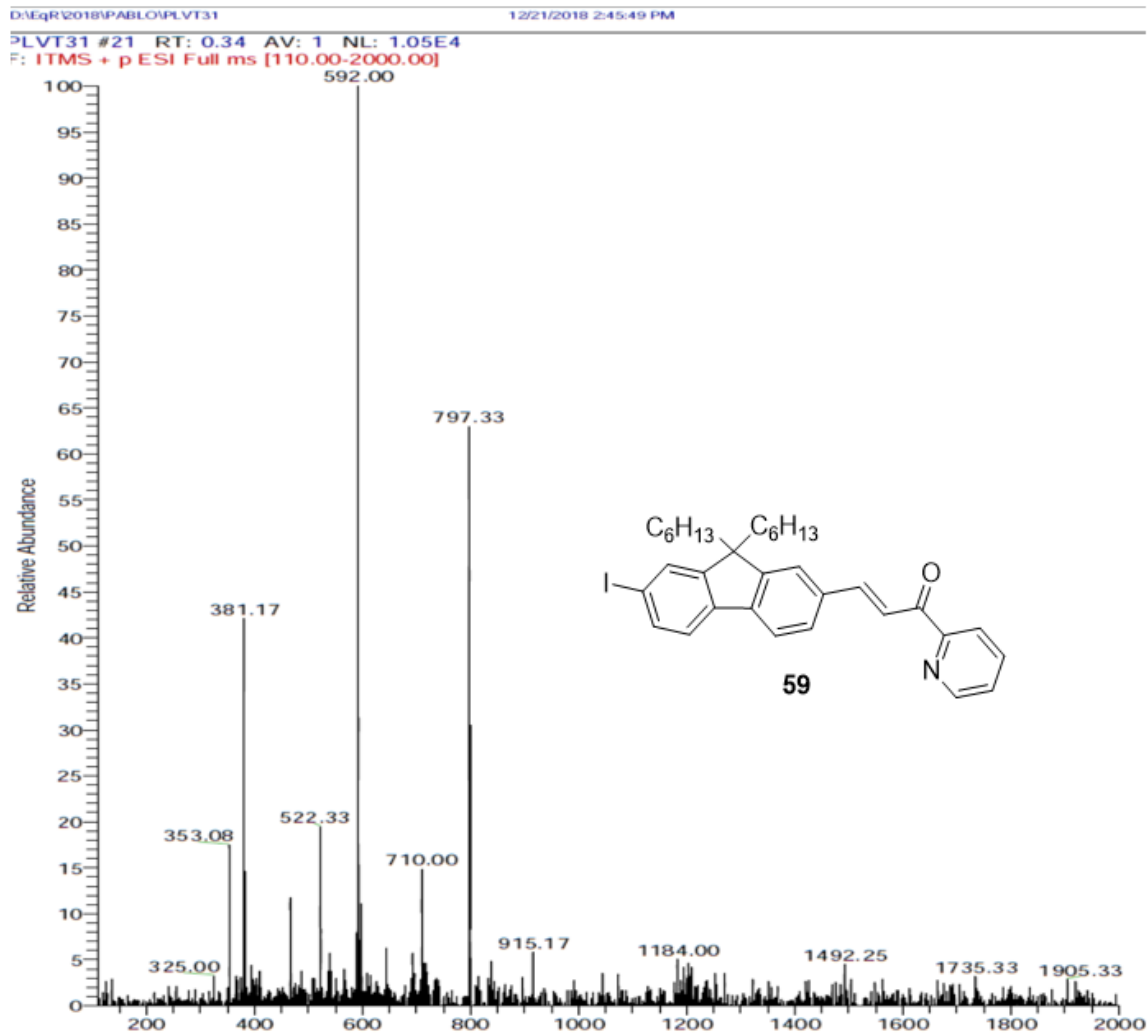


Figura S47. Espectro EM (ESI) para **59**.

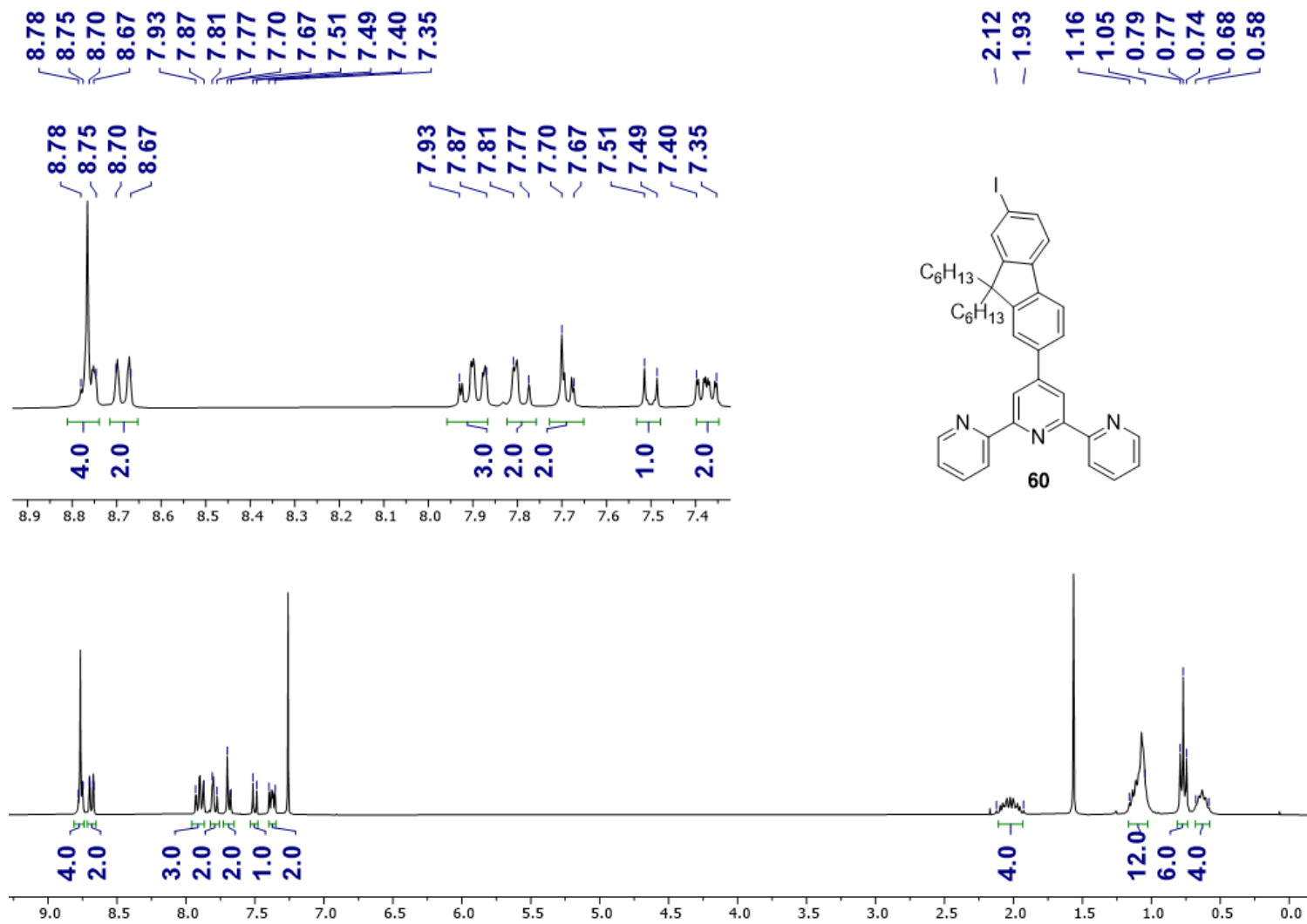


Figura S48. Espectro de RMN- ^1H para **60** (400 MHz, CDCl_3).

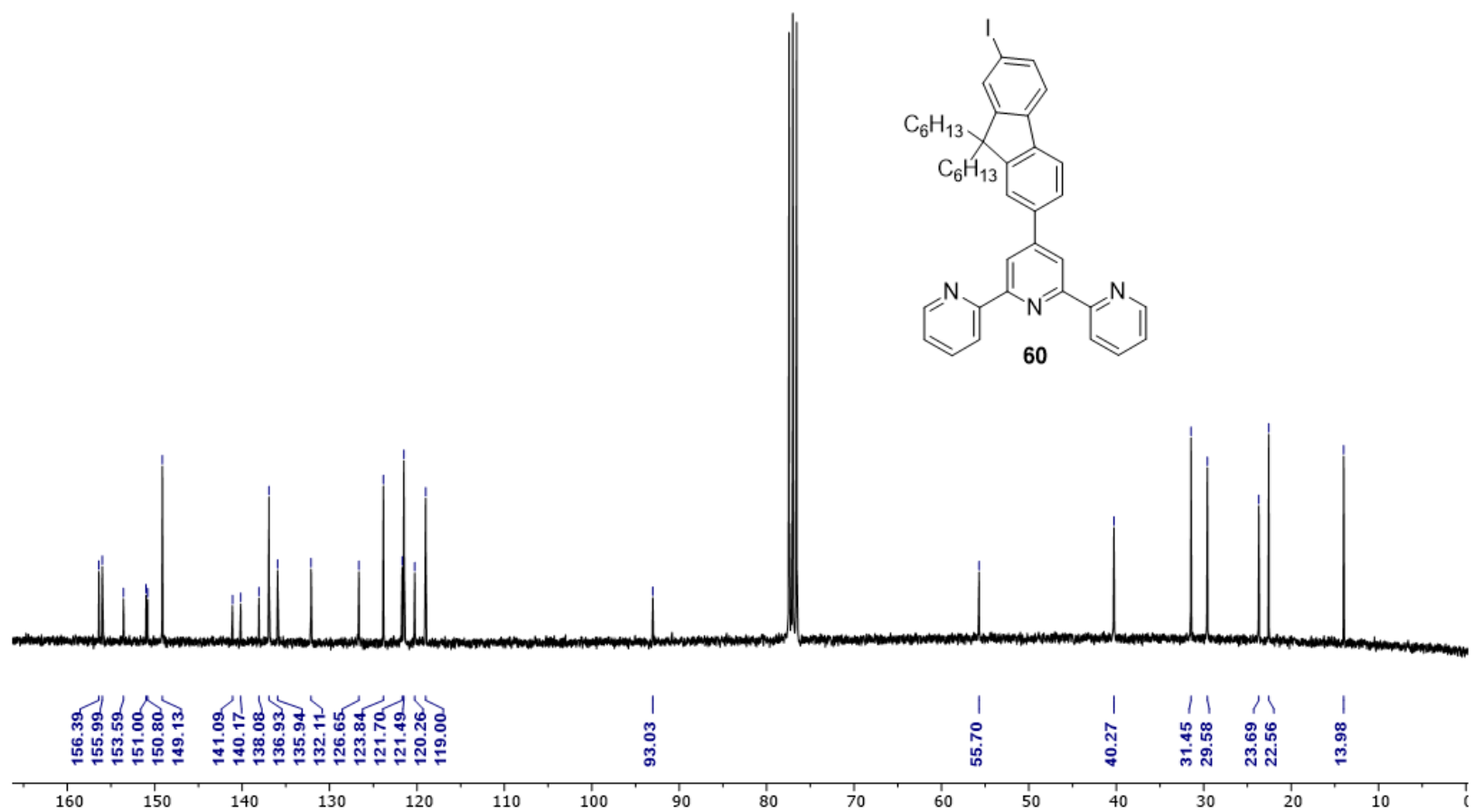


Figura S49. Espectro de RMN-¹³C para **60** (100 MHz, CDCl₃).

PLVT034 #19-41 RT: 0.31-0.68 AV: 12 NL: 1.86E4

F: ITMS + p ESI Full ms [110.00-2000.00]

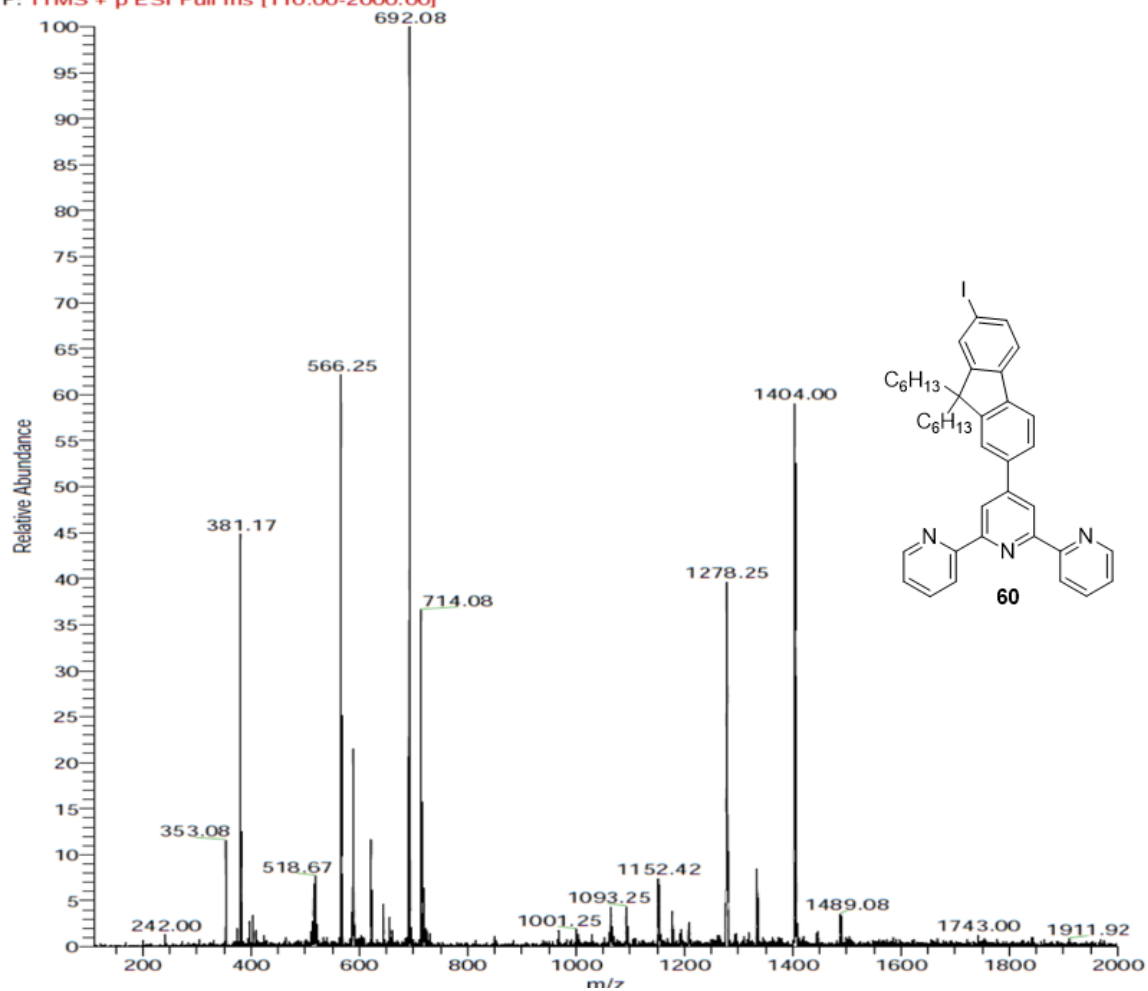


Figura S50. Espectro EM (ESI) para **60**.

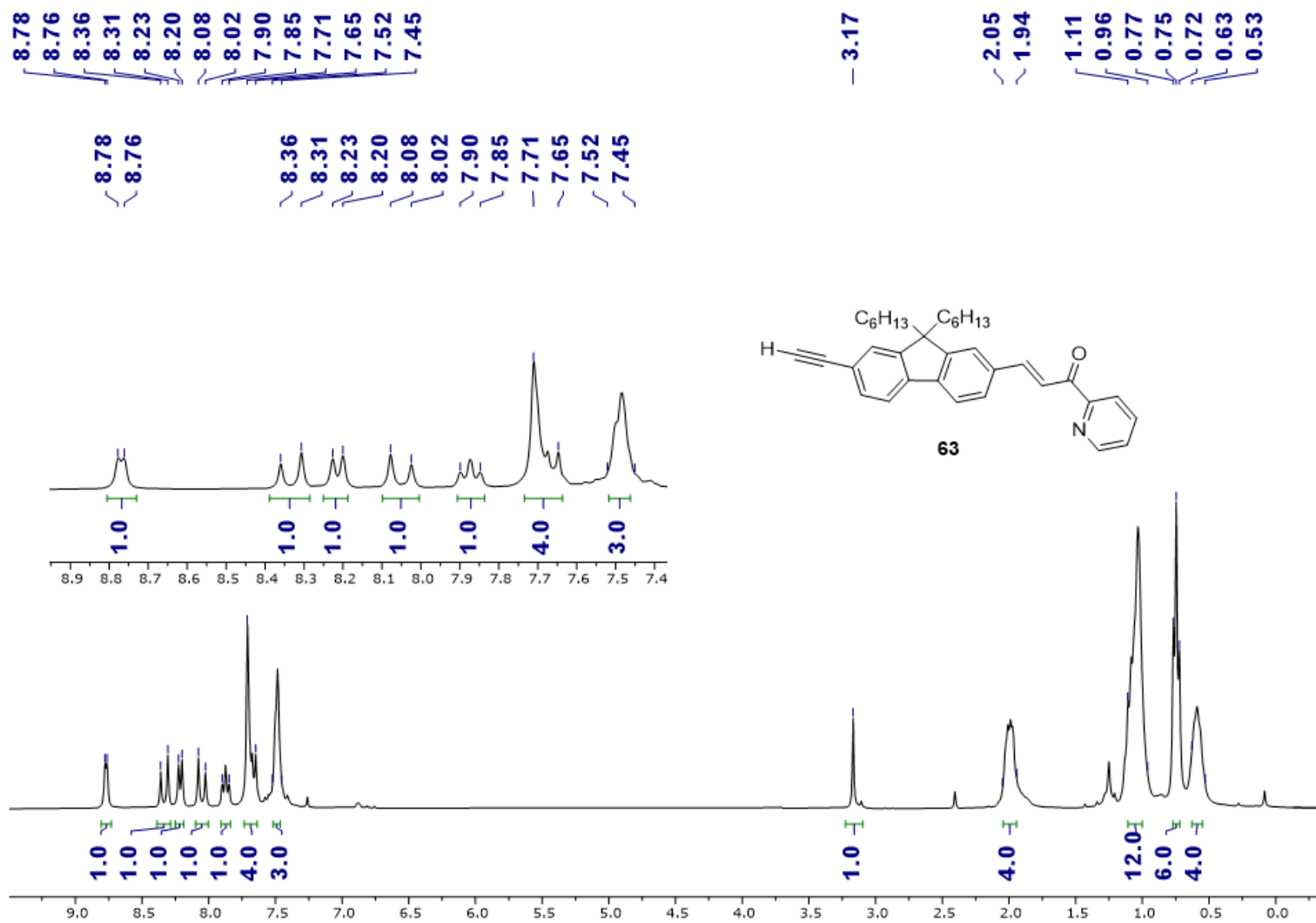


Figura S51. Espectro de RMN-¹H para **63** (400 MHz, CDCl₃).

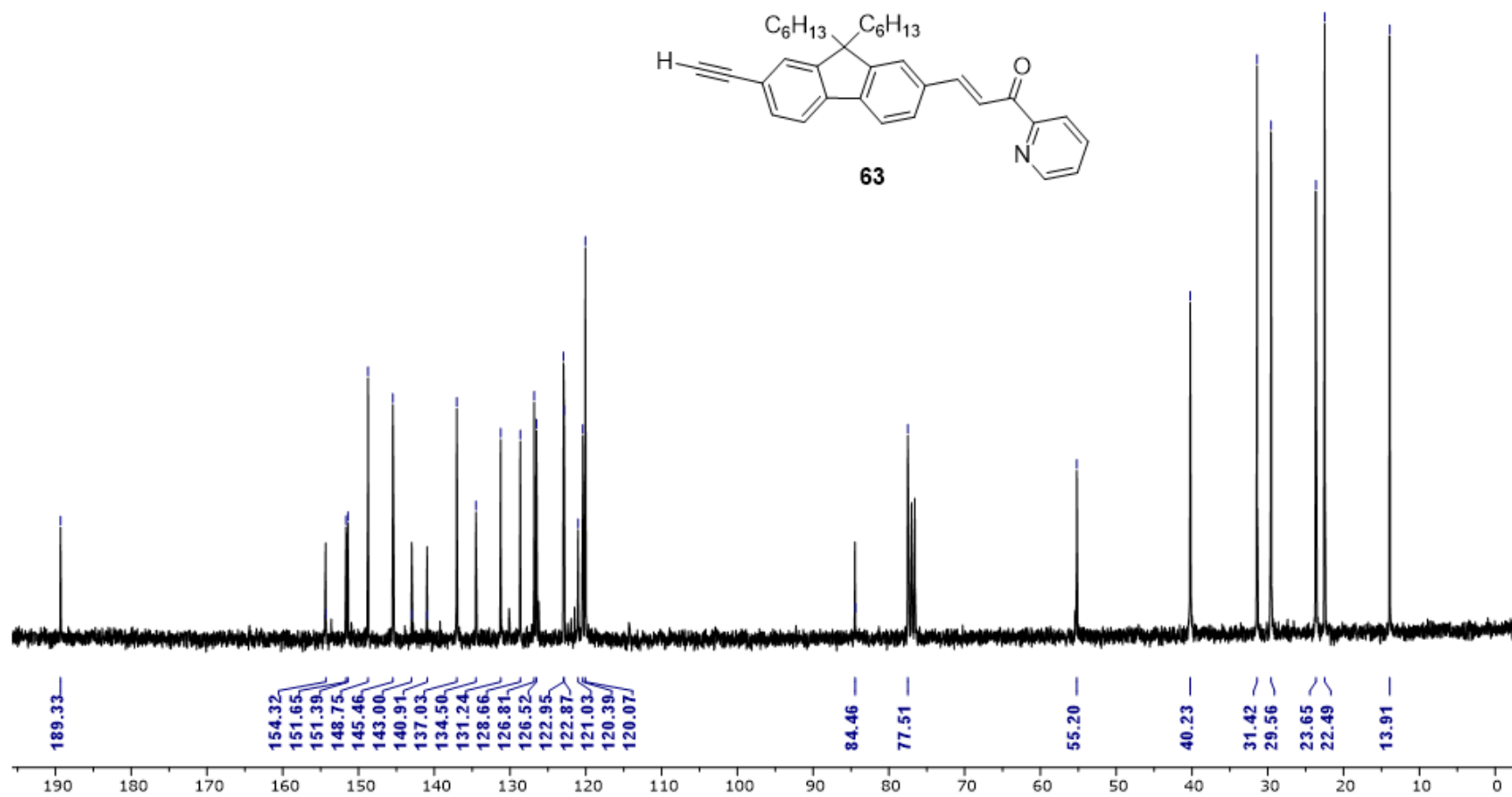


Figura S52. Espectro de RMN- ^{13}C para **63** (100 MHz, $CDCl_3$).

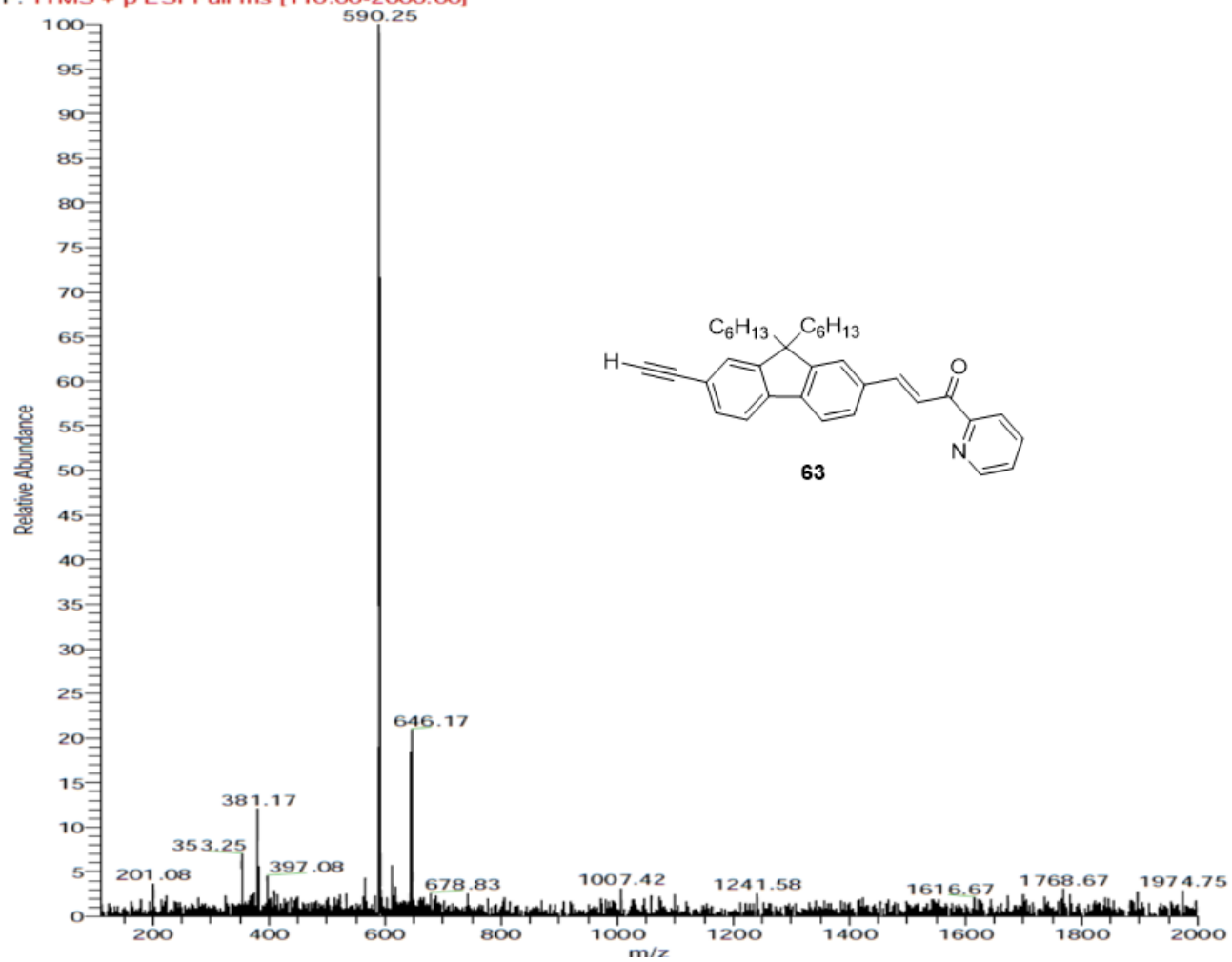
PLVT13B #17 RT: 0.27 AV: 1 NL: 7.00E3
F: ITMS + p ESI Full ms [110.00-2000.00]

Figura S53. Espectro EM (ESI) para **63**.

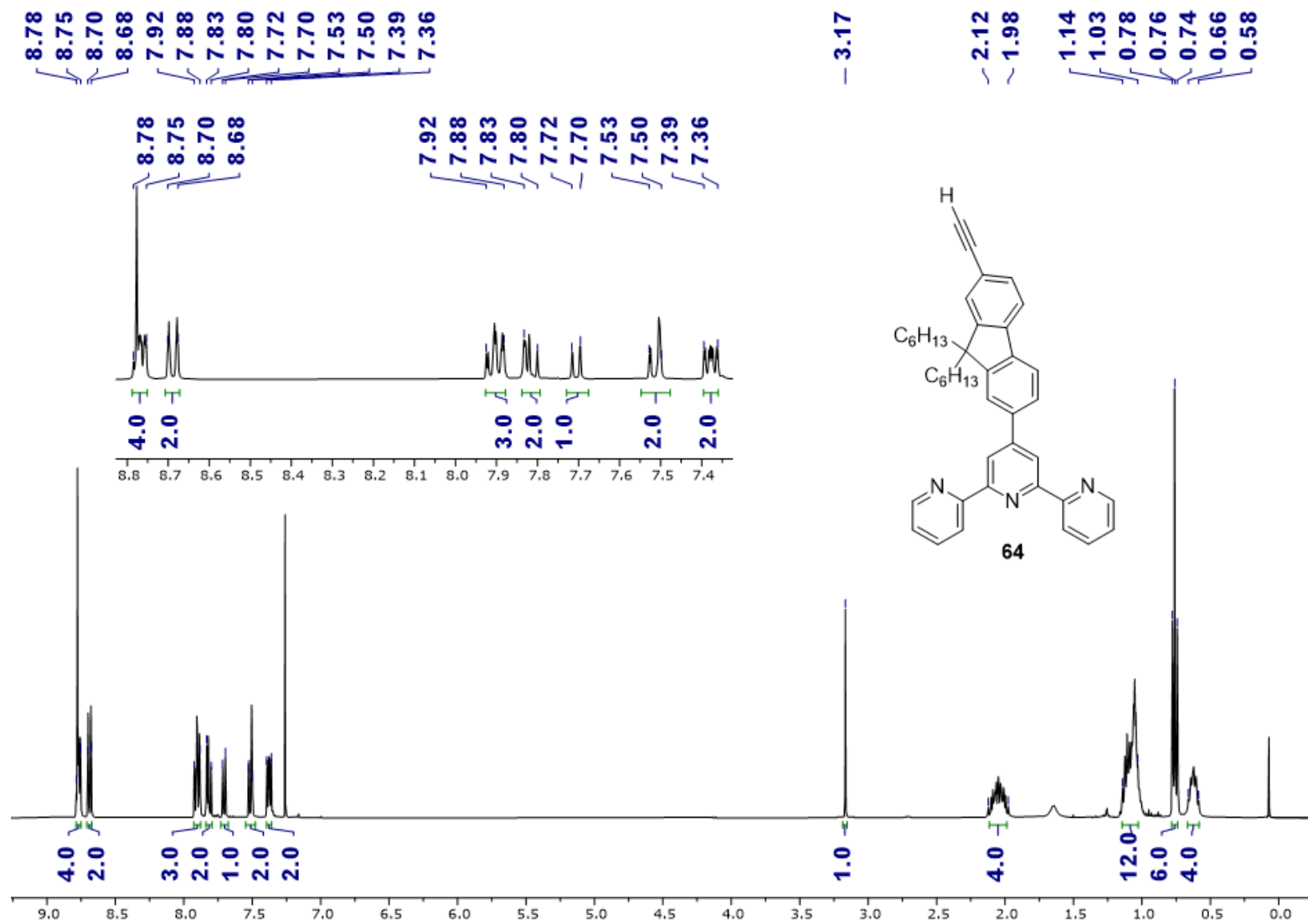


Figura S54. Espectro de RMN- ^1H para **64** (400 MHz, CDCl_3).

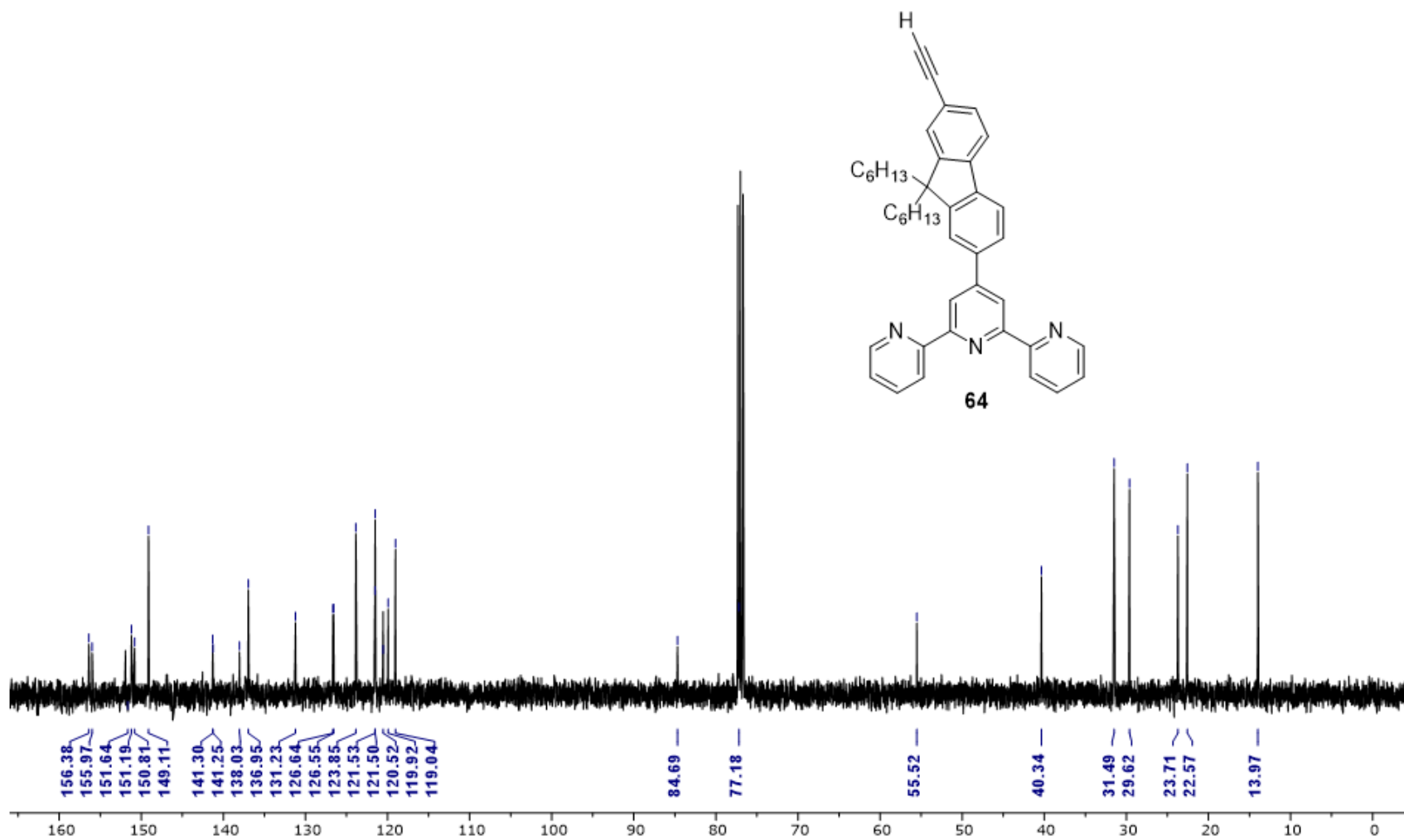


Figura S55. Espectro de RMN-¹³C para **64** (100 MHz, CDCl₃).

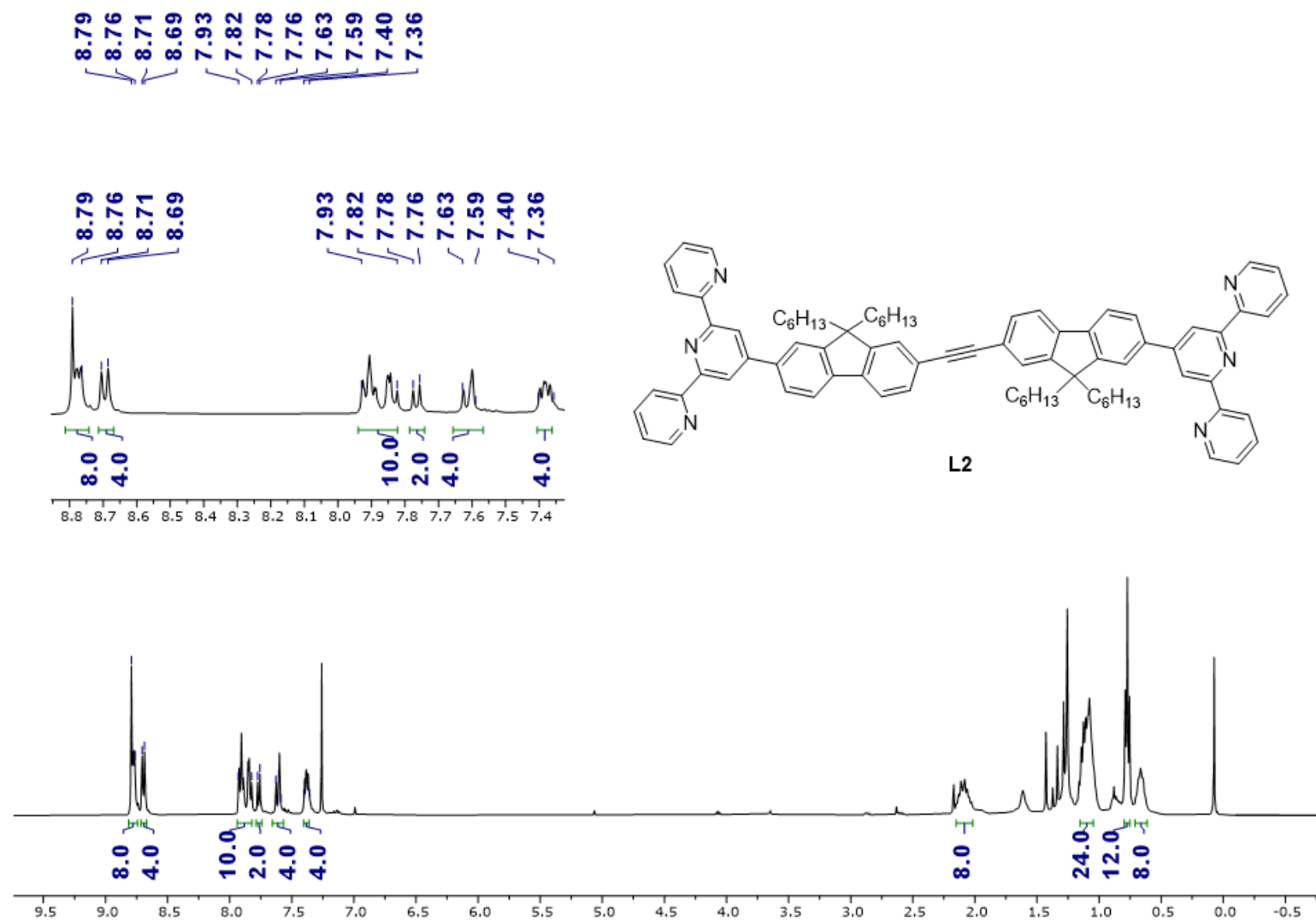


Figura S56. Espectro de RMN-¹H para **L2** (400 MHz, CDCl₃).

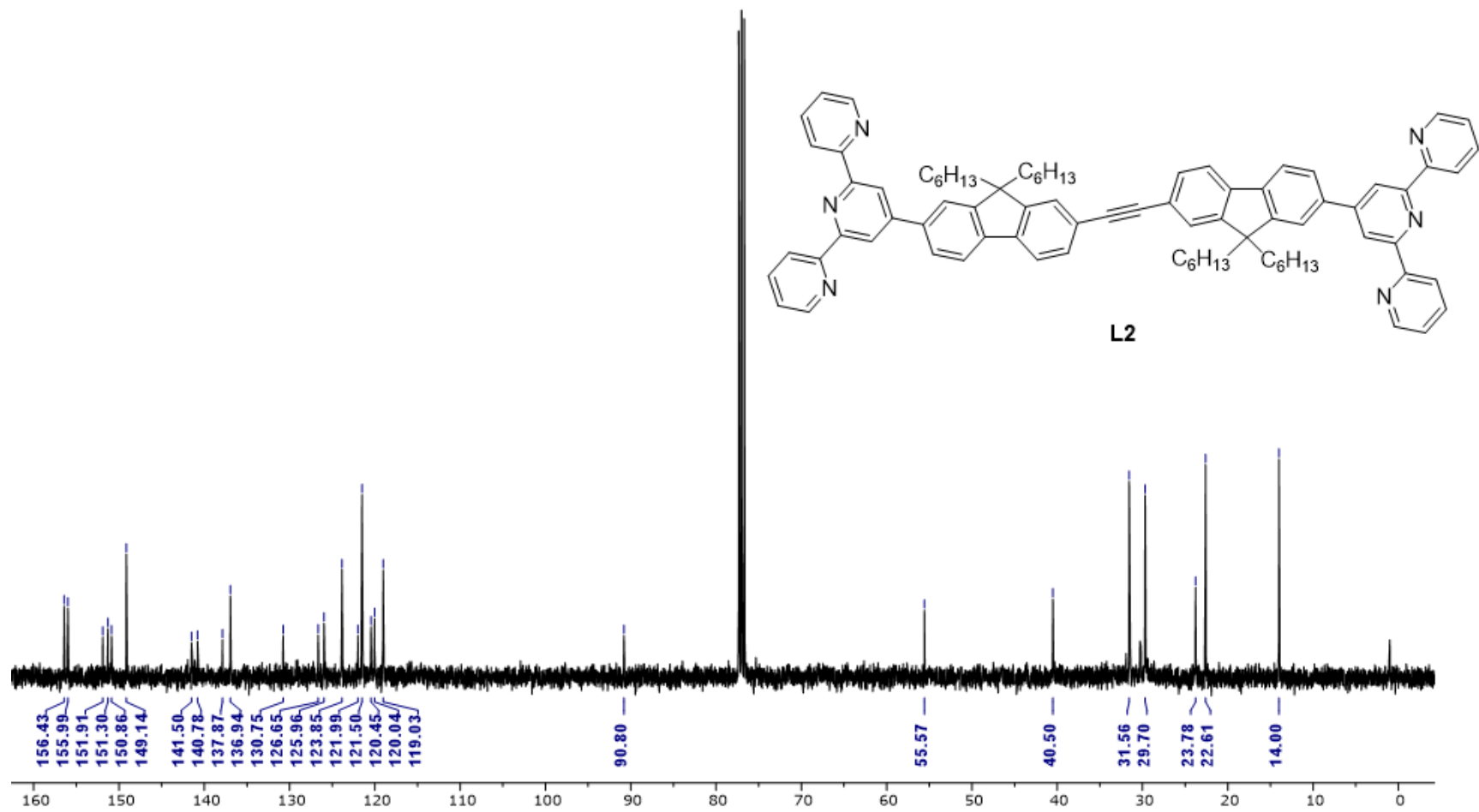


Figura S57. Espectro de RMN- ^{13}C para **L2** (100 MHz, $CDCl_3$).

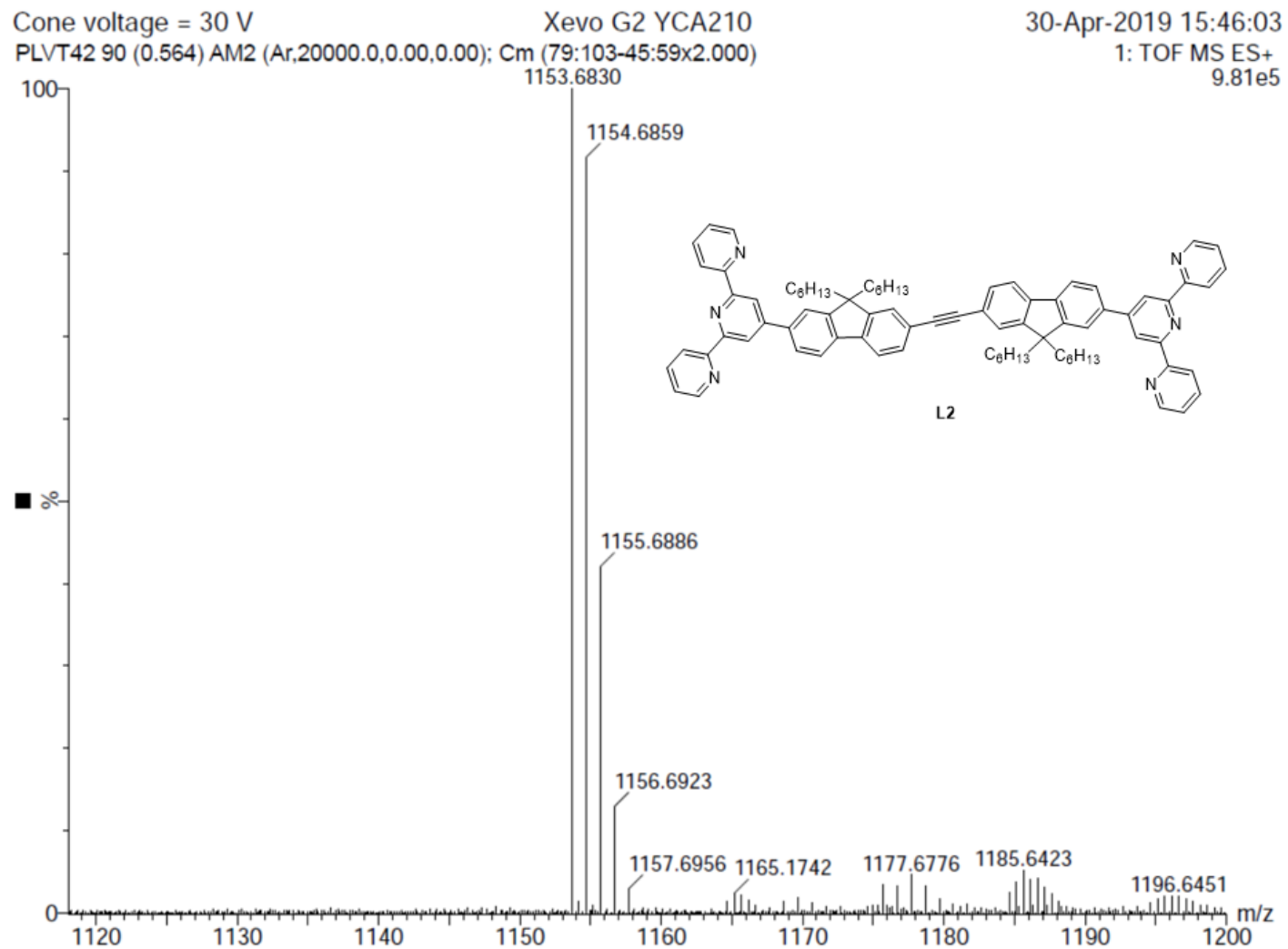


Figura S58. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para L2.

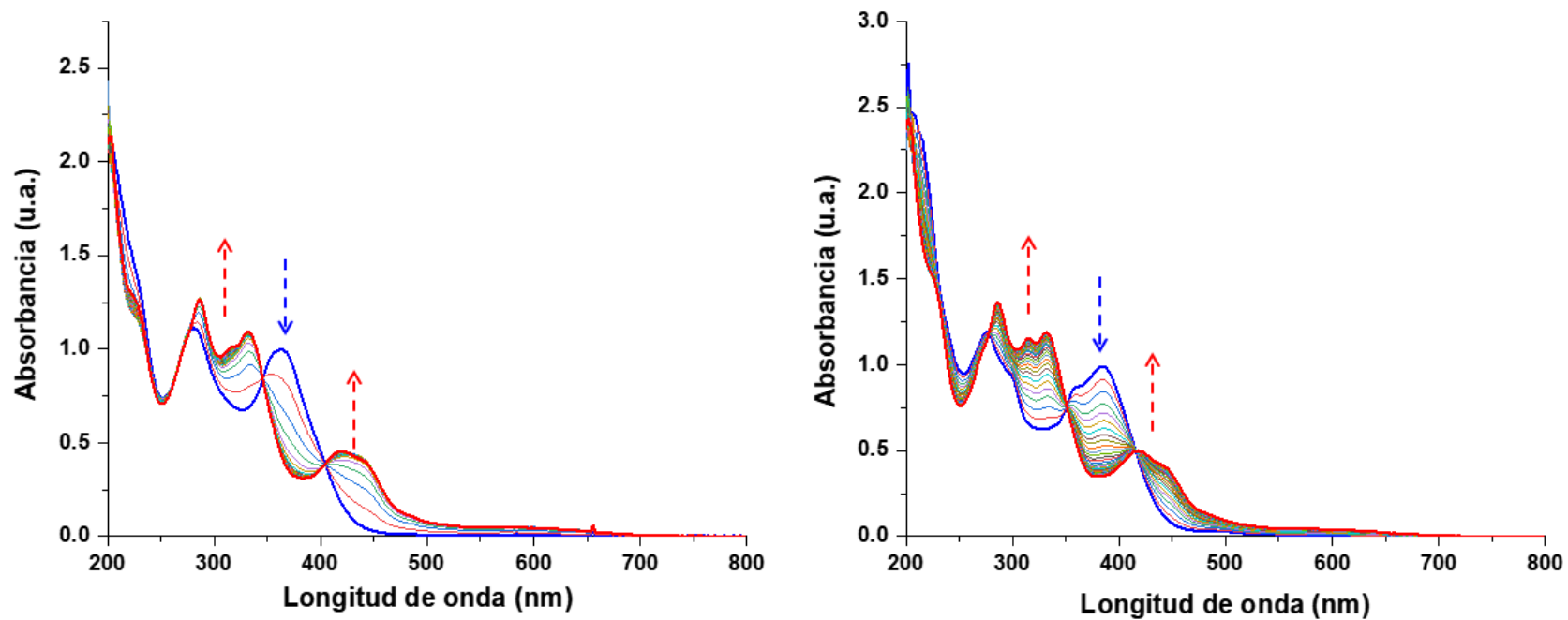


Figura S59. Evolución del espectro de absorción para *cis*-42b (izquierda) y *trans*-42b (derecha) en acetonitrilo bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

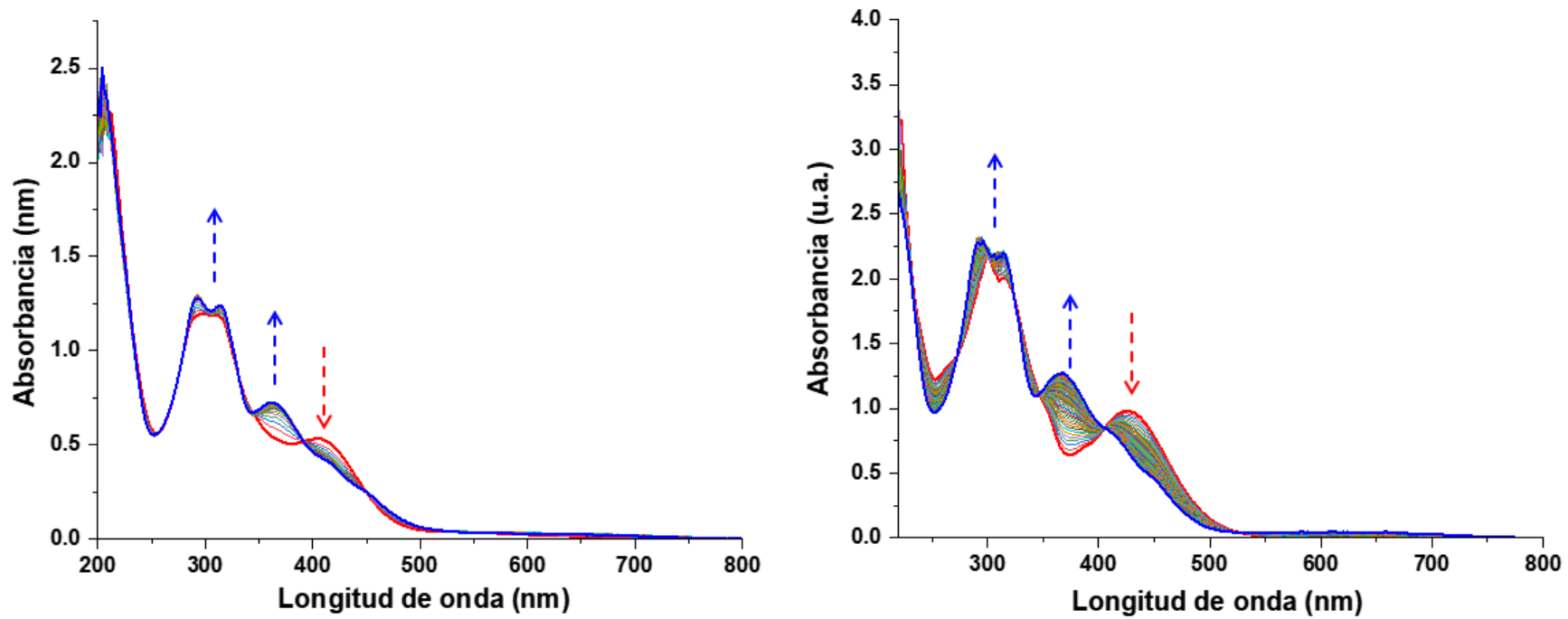


Figura S60. Evolución del espectro de absorción para *cis*-51a (izquierda) y *trans*-51a (derecha) en acetonitrilo bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

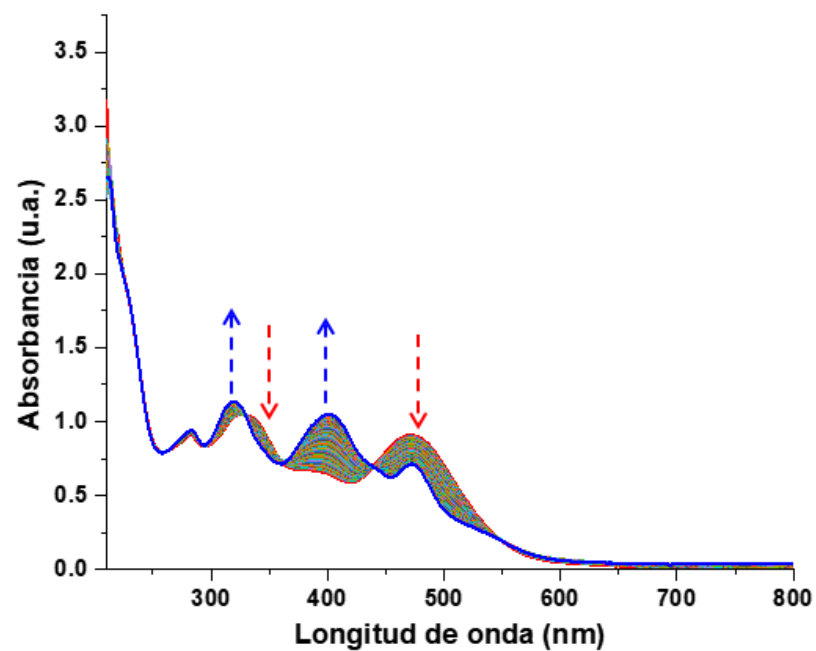
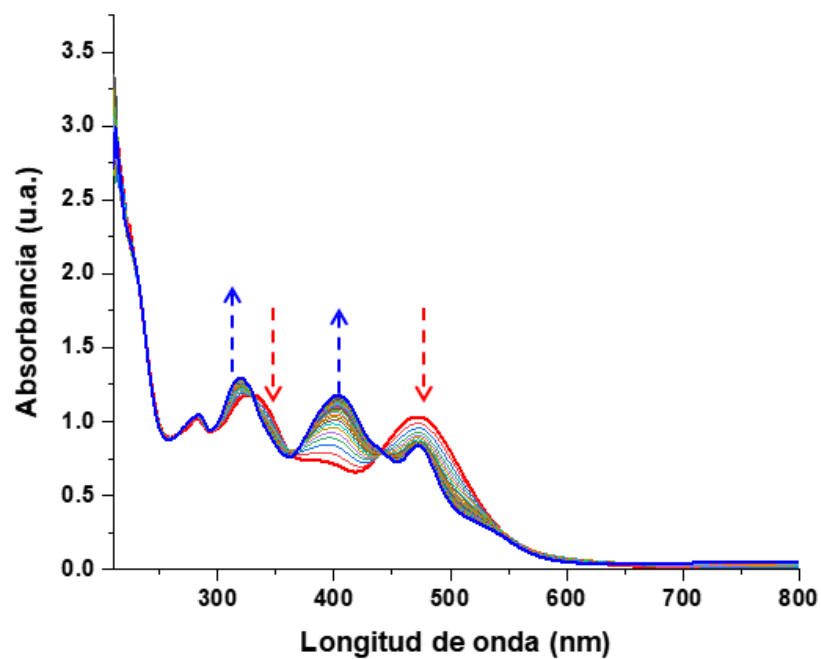


Figura S61. Evolución del espectro de absorción para *cis*-51b en acetonitrilo bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm (izquierda) y $\lambda = 490$ nm (derecha) a temperatura ambiente.

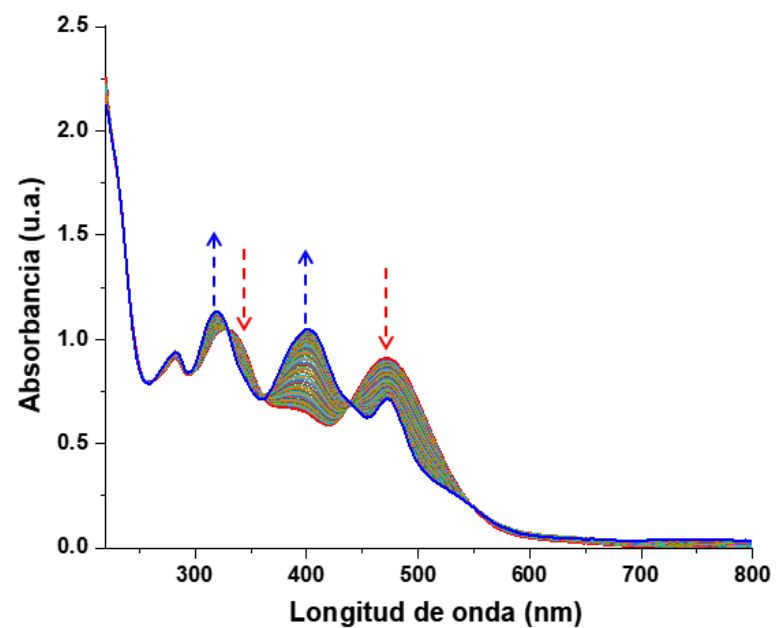
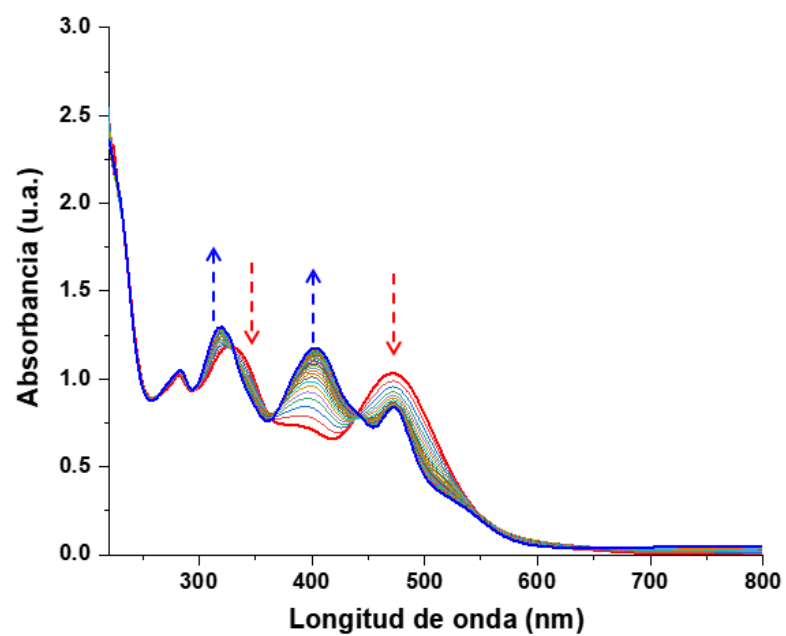


Figura S62. Evolución del espectro de absorción para *trans*-51b en acetonitrilo bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm (izquierda) y $\lambda = 490$ nm (derecha) a temperatura ambiente.

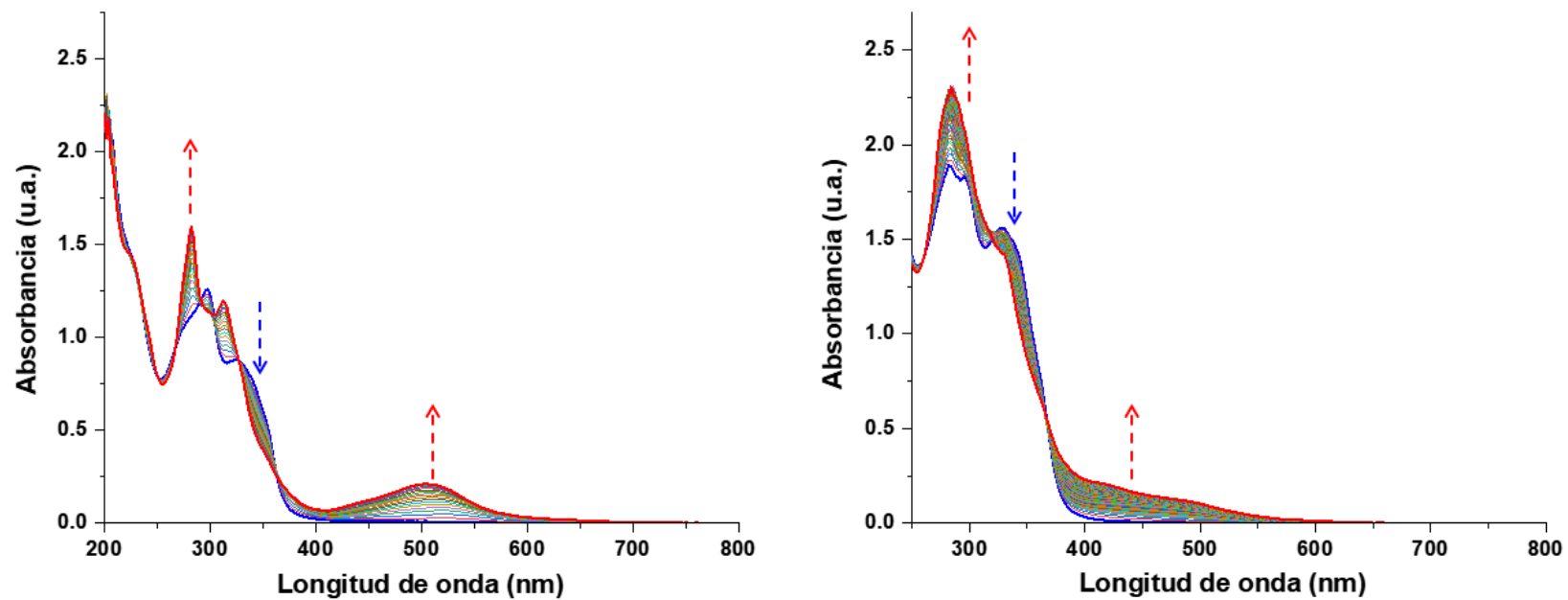


Figura S63. Evolución del espectro de absorción para **52a** en acetonitrilo (izquierda) y agua (0.5% DMSO, derecha) bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

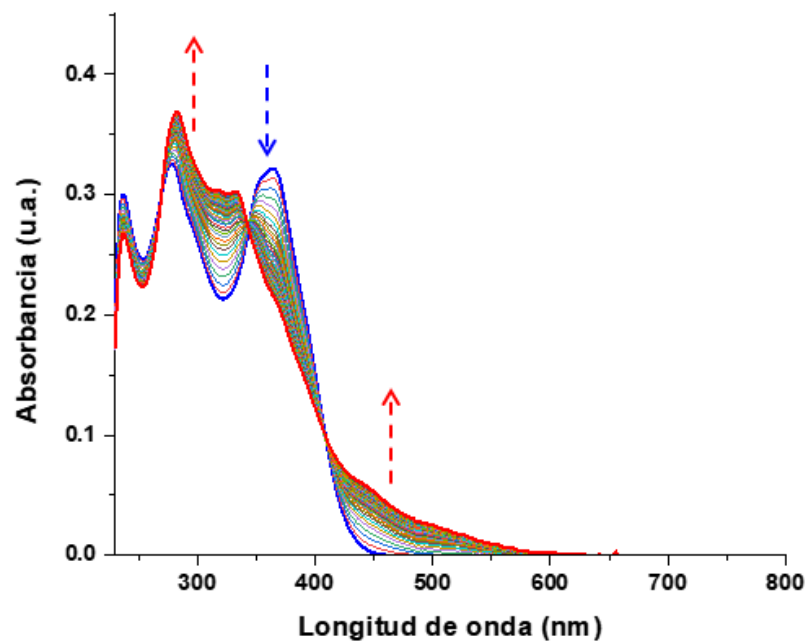
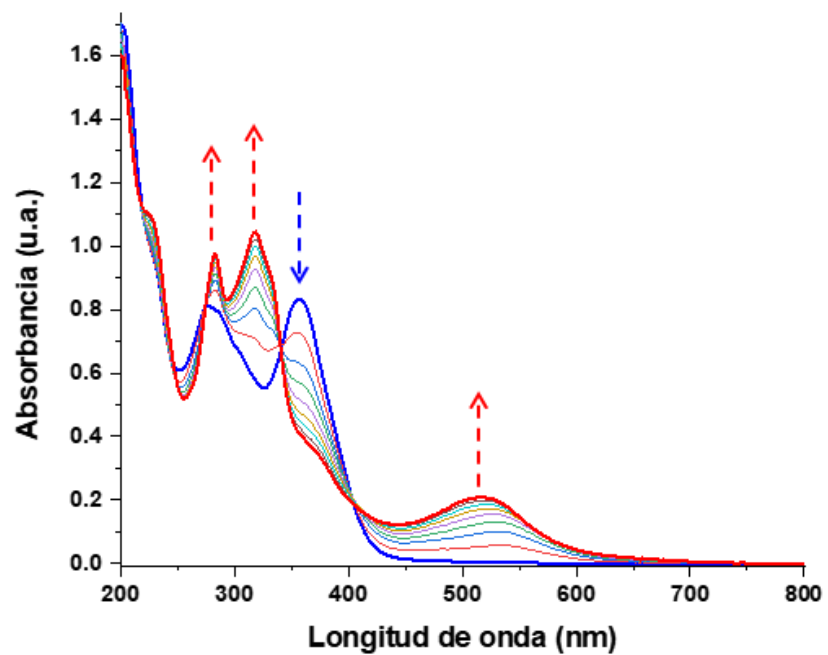


Figura S64. Evolución del espectro de absorción para **52b** en acetonitrilo (izquierda) y agua (0.5% DMSO, derecha) bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

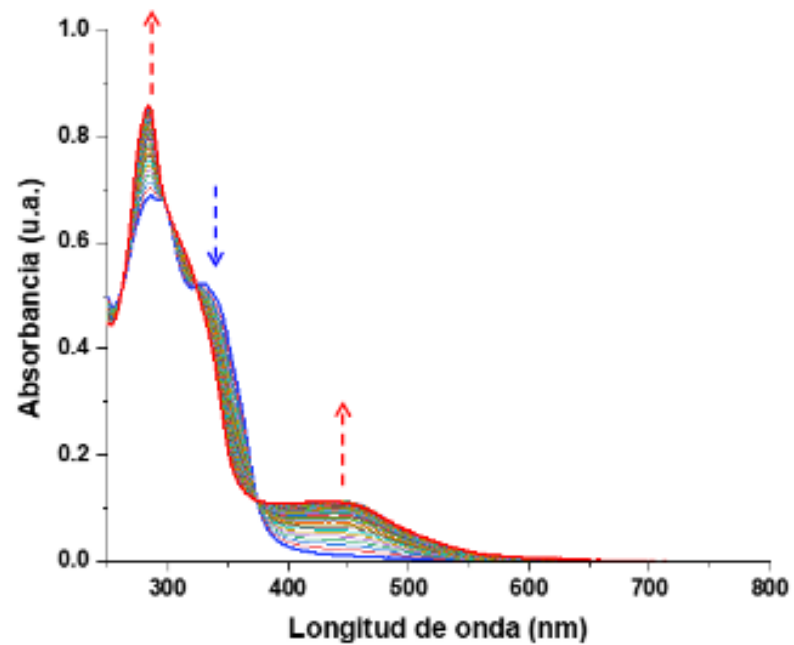
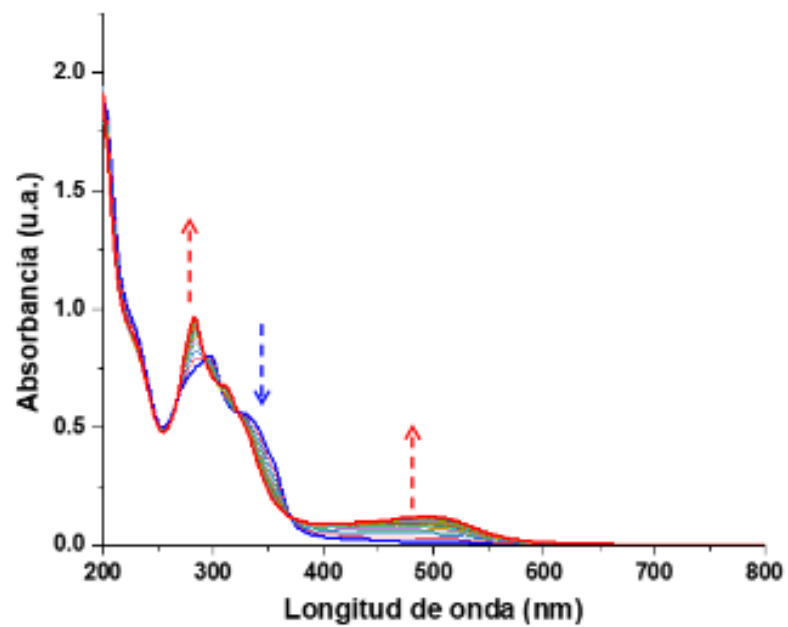


Figura S65. Evolución del espectro de absorción para **53a** en acetonitrilo (izquierda) y agua (0.5% DMSO, derecha) bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

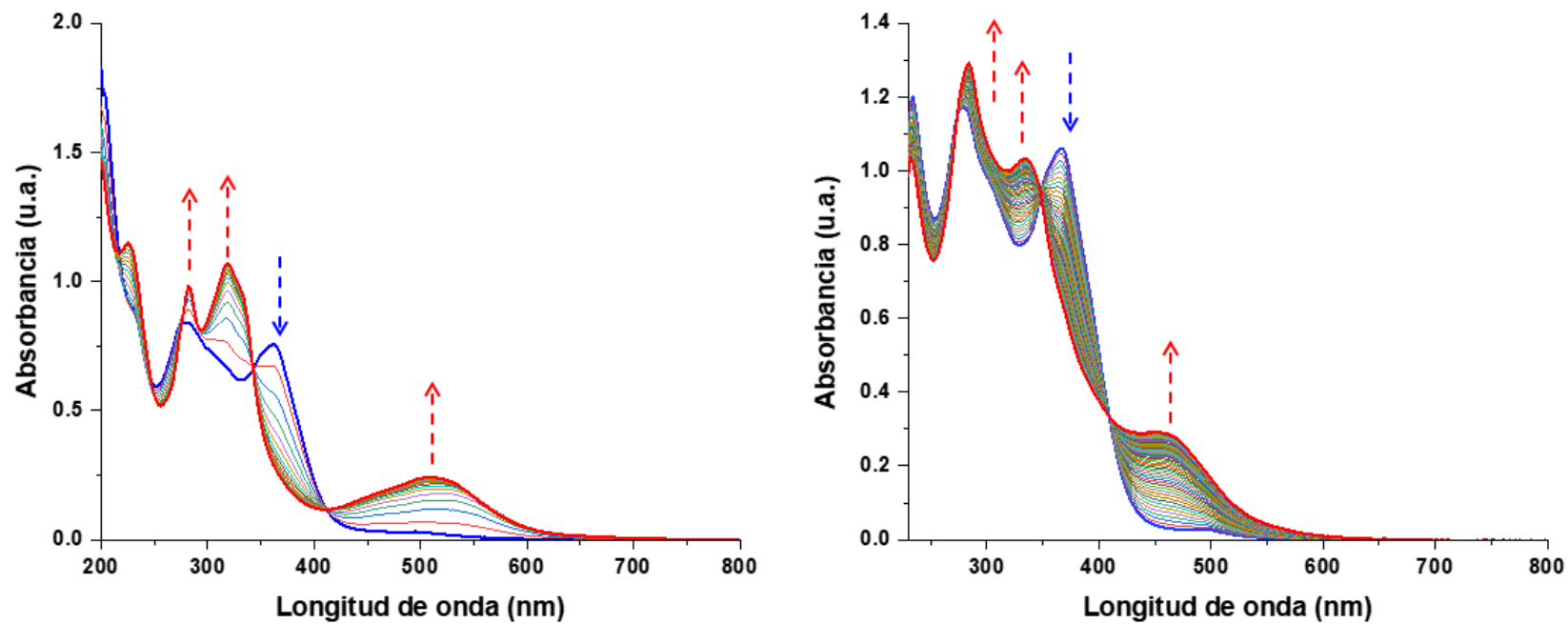


Figura S66. Evolución del espectro de absorción para **53b** en acetonitrilo (izquierda) y agua (0.5% DMSO, derecha) bajo irradiación a $\lambda = 365$ nm a temperatura ambiente.

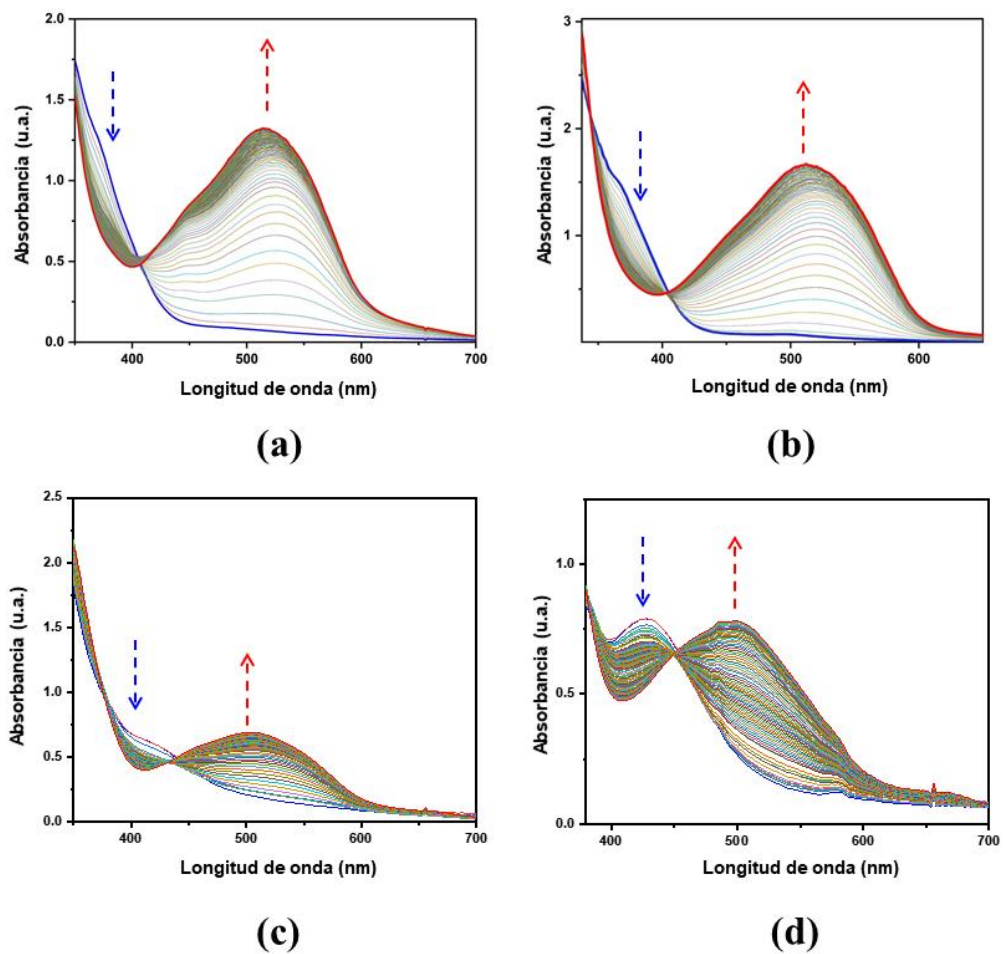


Figura S67. Evolución del espectro de absorción para (a) *cis-42b* (b) **52b** (c) *cis-51a* y (d) *trans-51a* mostrando la formación del colorante azo tras la irradiación a $\lambda = 365$ nm en presencia del reactivo de Griess. Salvo **52b**, medido en agua (0.5 % DMSO), todas las mediciones se hicieron en acetonitrilo a temperatura ambiente.

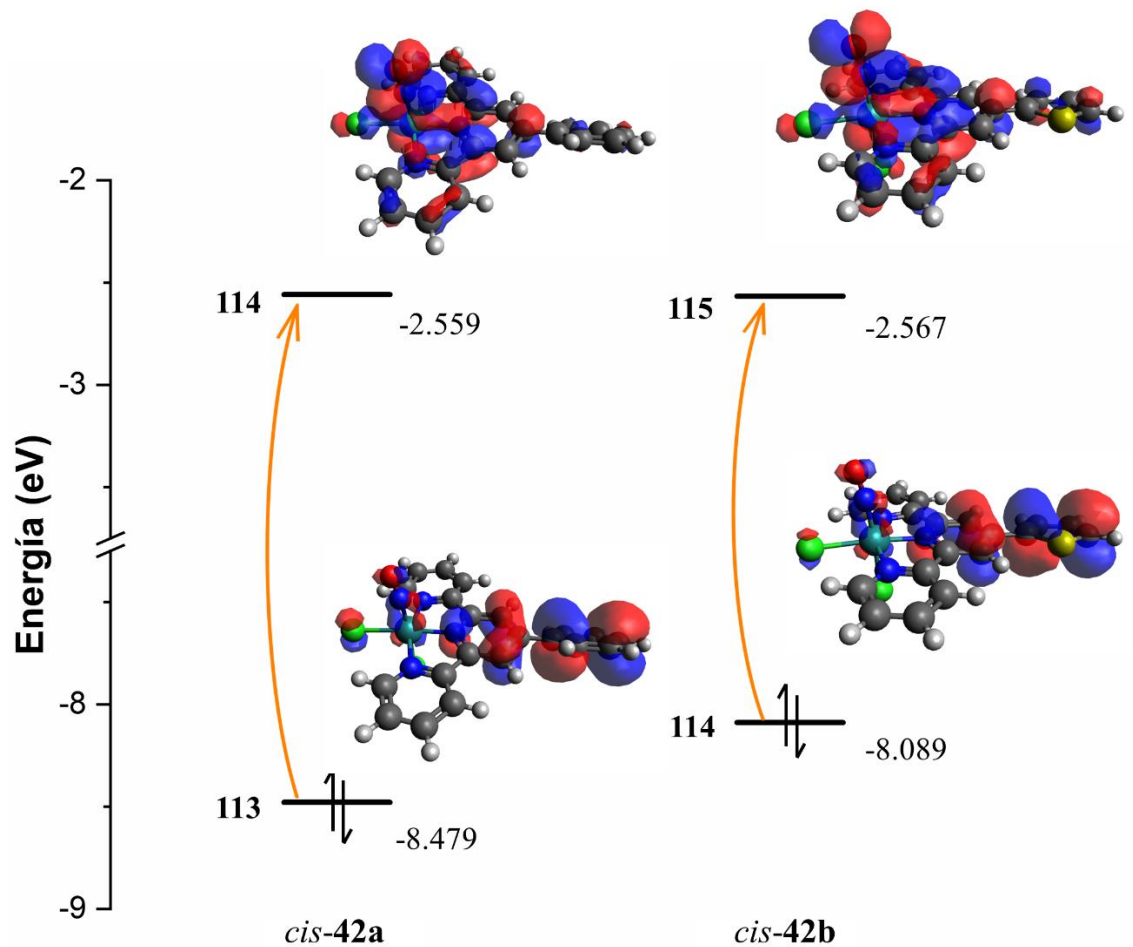


Figura S68. Energías relativas para los principales orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas con transferencia de carga ($\Delta\mu$) para *cis-42a-b* en acetonitrilo al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*. Los niveles ocupados y desocupados corresponden a los orbitales HOMO y LUMO, respectivamente.

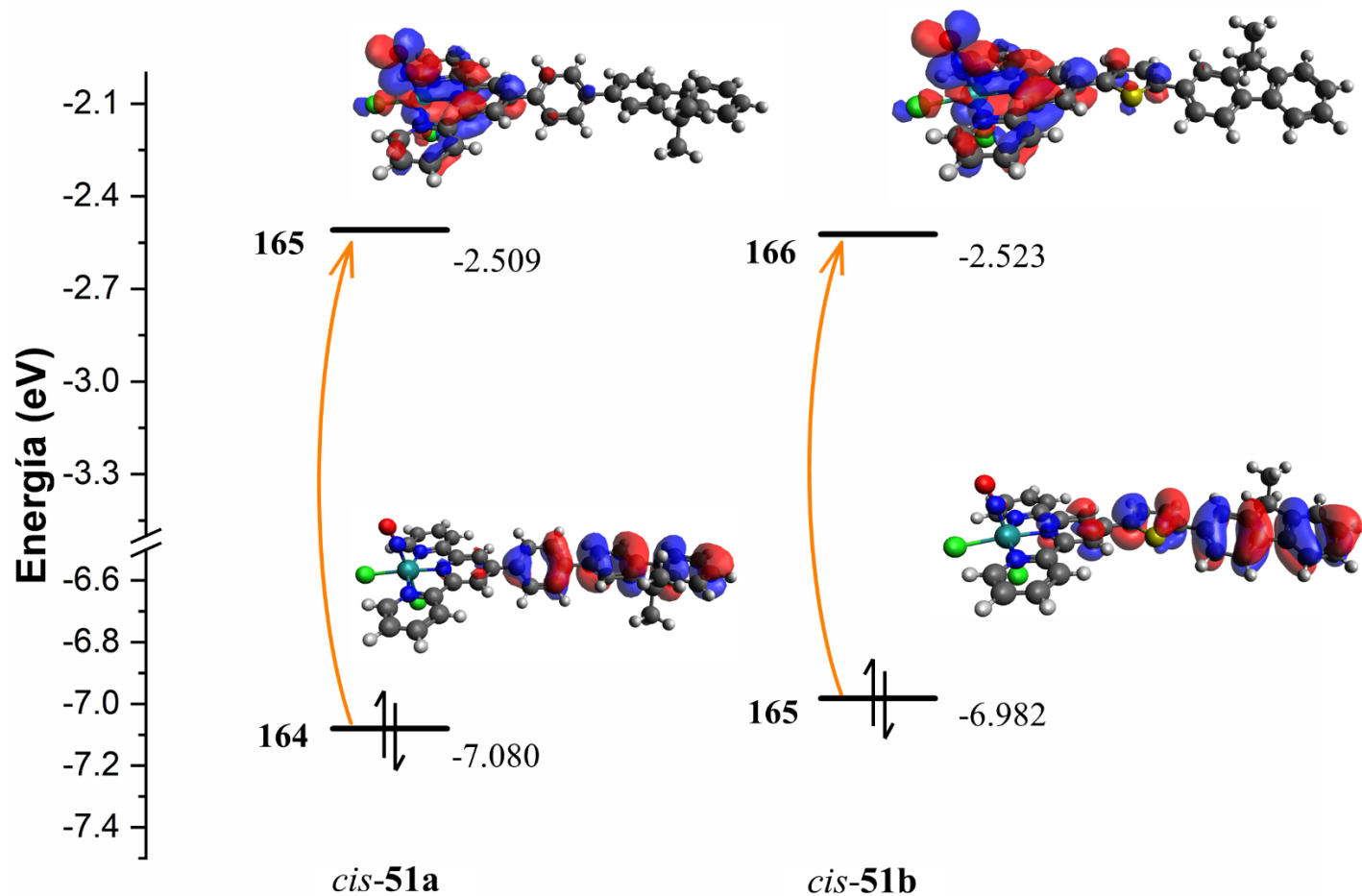


Figura S69. Energías relativas para los principales orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas con transferencia de carga ($\Delta\mu$) para *cis-51a-b* en acetonitrilo al nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31G*. Los niveles ocupados y desocupados corresponden a los orbitales HOMO y LUMO, respectivamente.

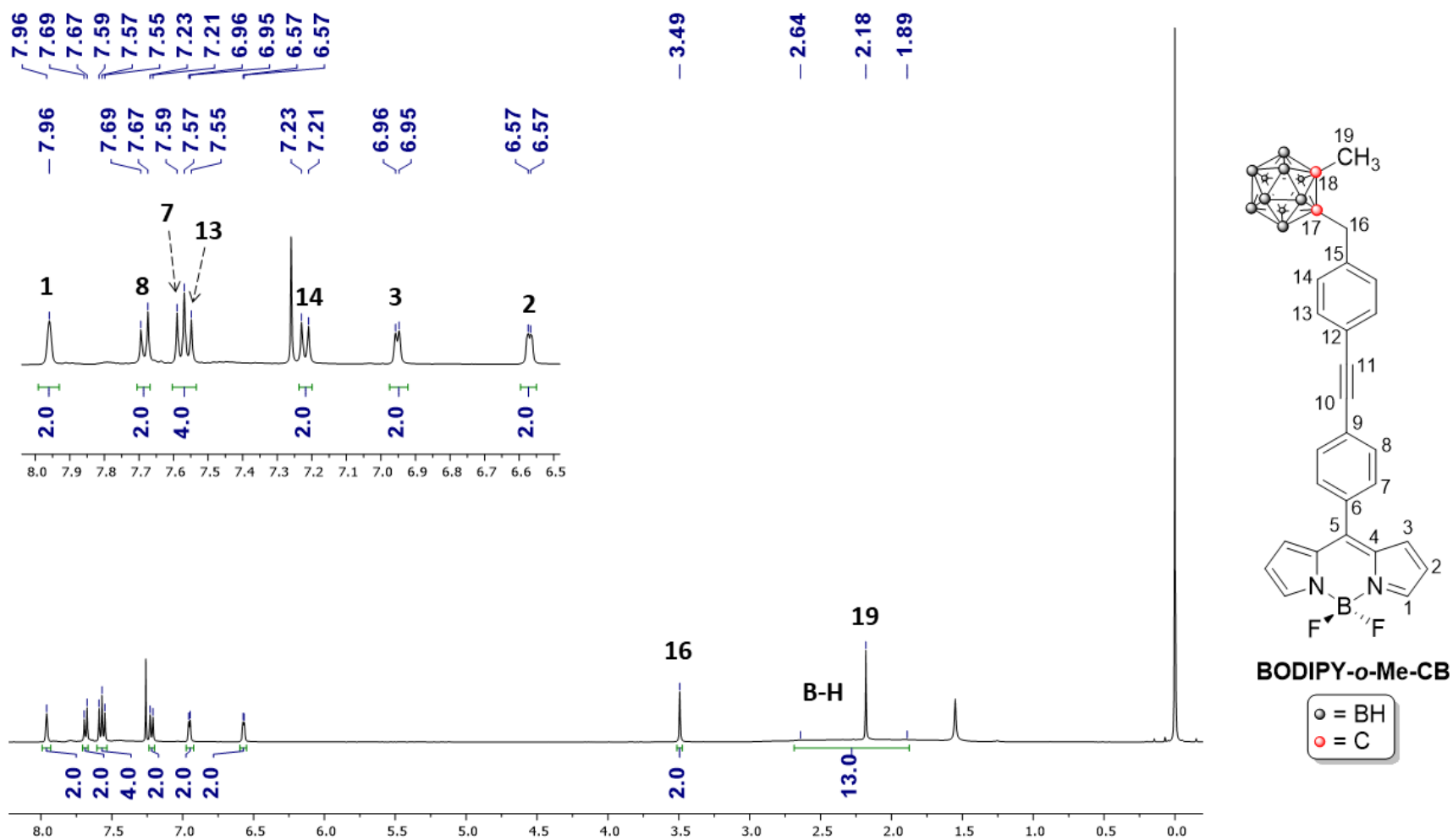


Figura S70. Espectro de RMN- ^1H para **BODIPY-*o*-Me-CB** (CDCl_3 , 400 MHz).

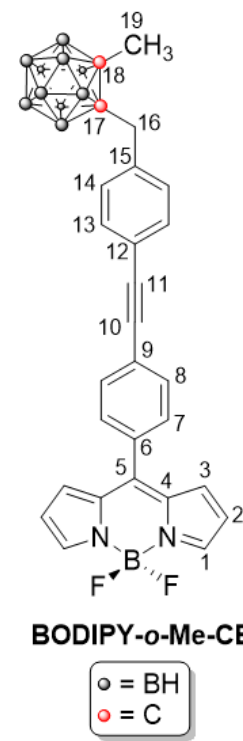
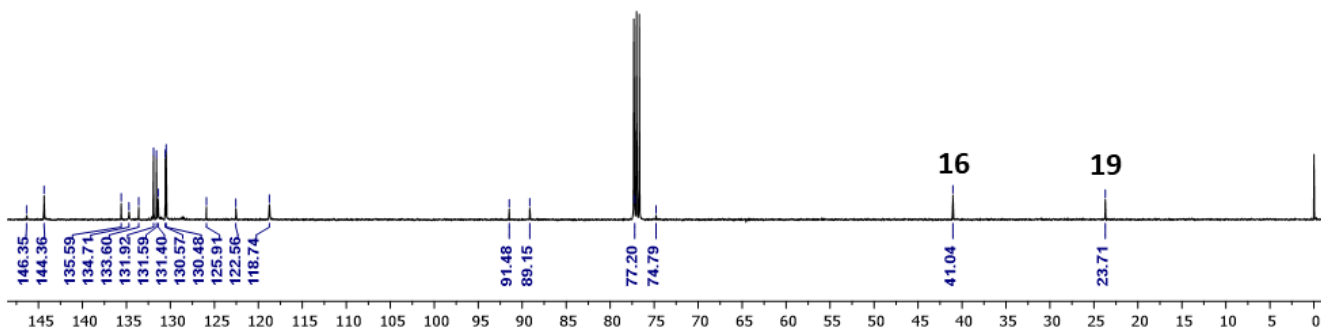
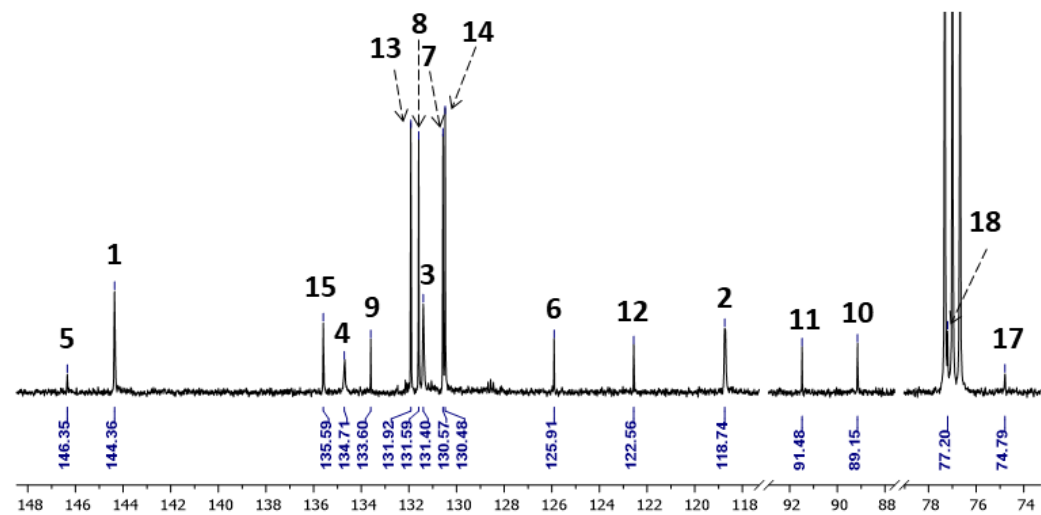


Figura S71. Espectro de RMN-¹³C para **BODIPY-*o*-Me-CB** (CDCl₃, 100 MHz).

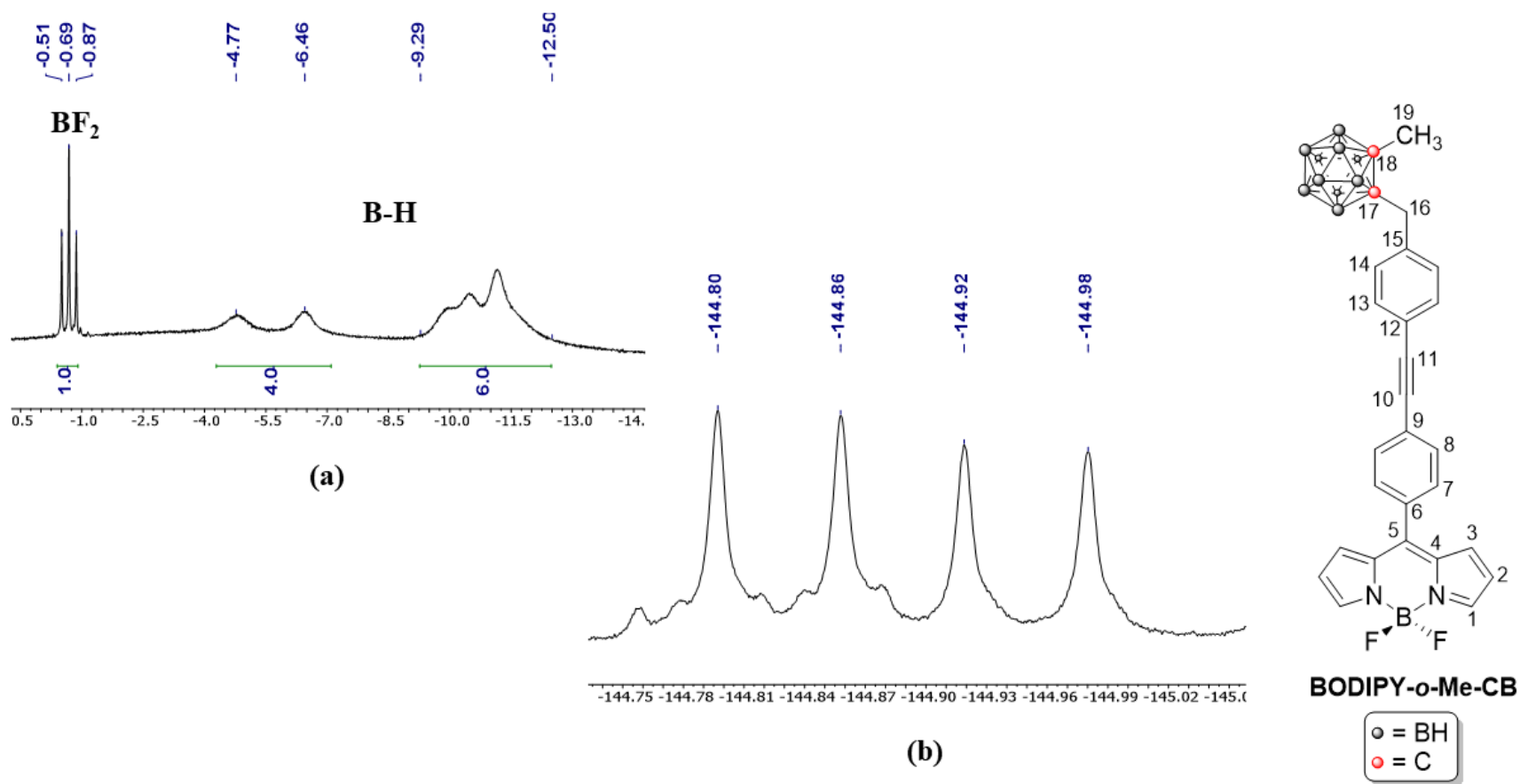


Figura S72. Espectros (a) RMN- ^{11}B (128 MHz) y (b) RMN- ^{19}F (CDCl_3 , 376 MHz) para **BODIPY-*o*-Me-CB** en CDCl_3 .

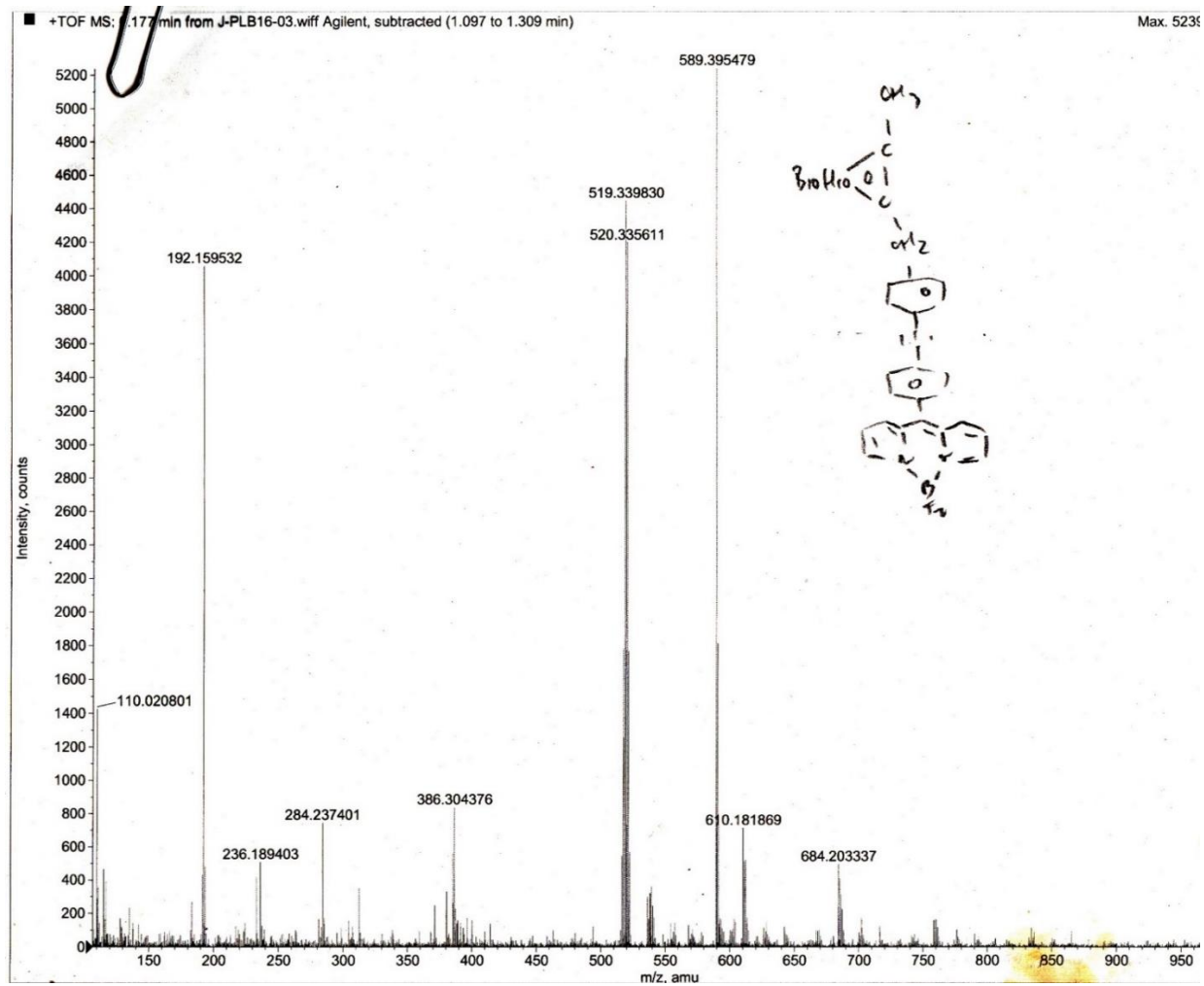


Figura S73. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **BODIPY-*o*-Me-CB**.

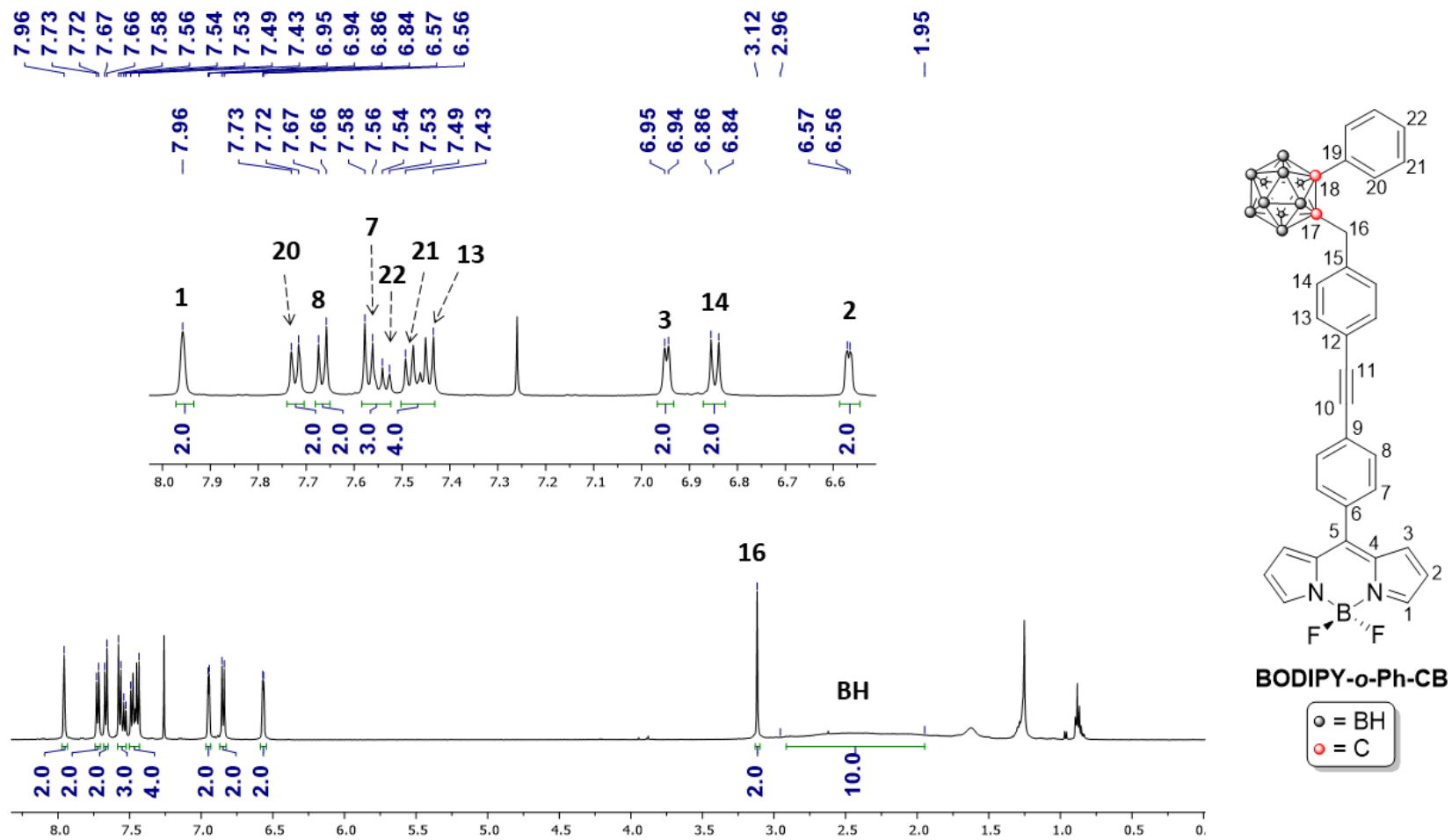


Figura S74. Espectro de RMN- ^1H para **BODIPY-*o*-Ph-CB** (CDCl_3 , 400 MHz).

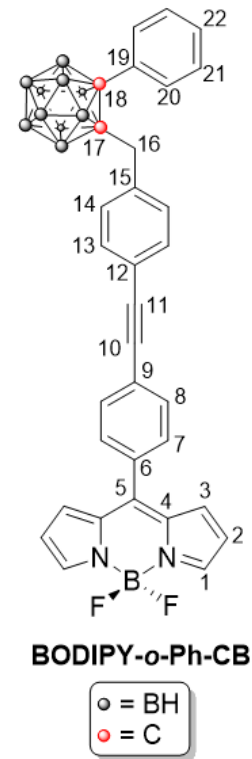
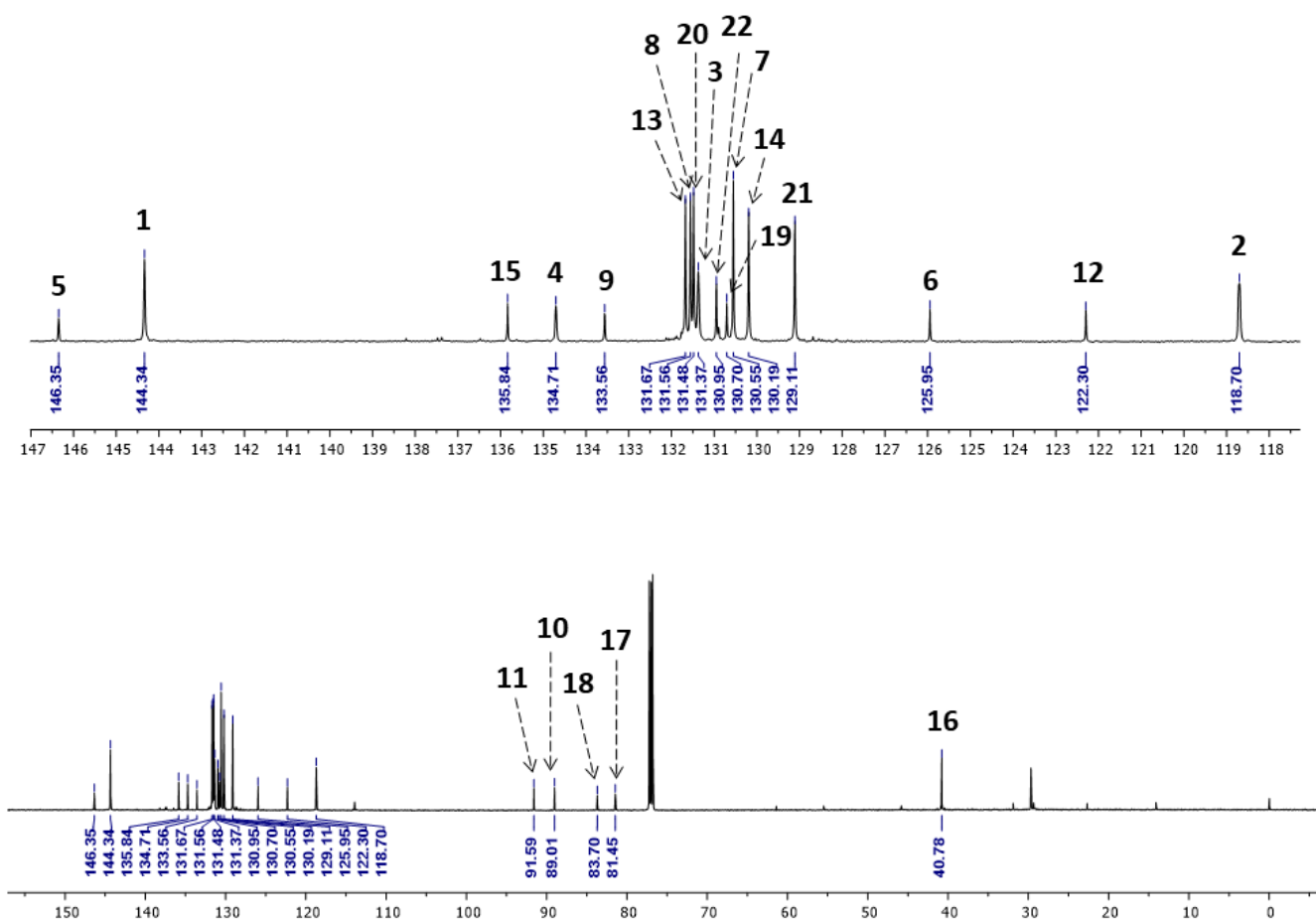


Figura S75. Espectro de RMN-¹³C para **BODIPY-*o*-Ph-CB** (CDCl₃, 100 MHz).

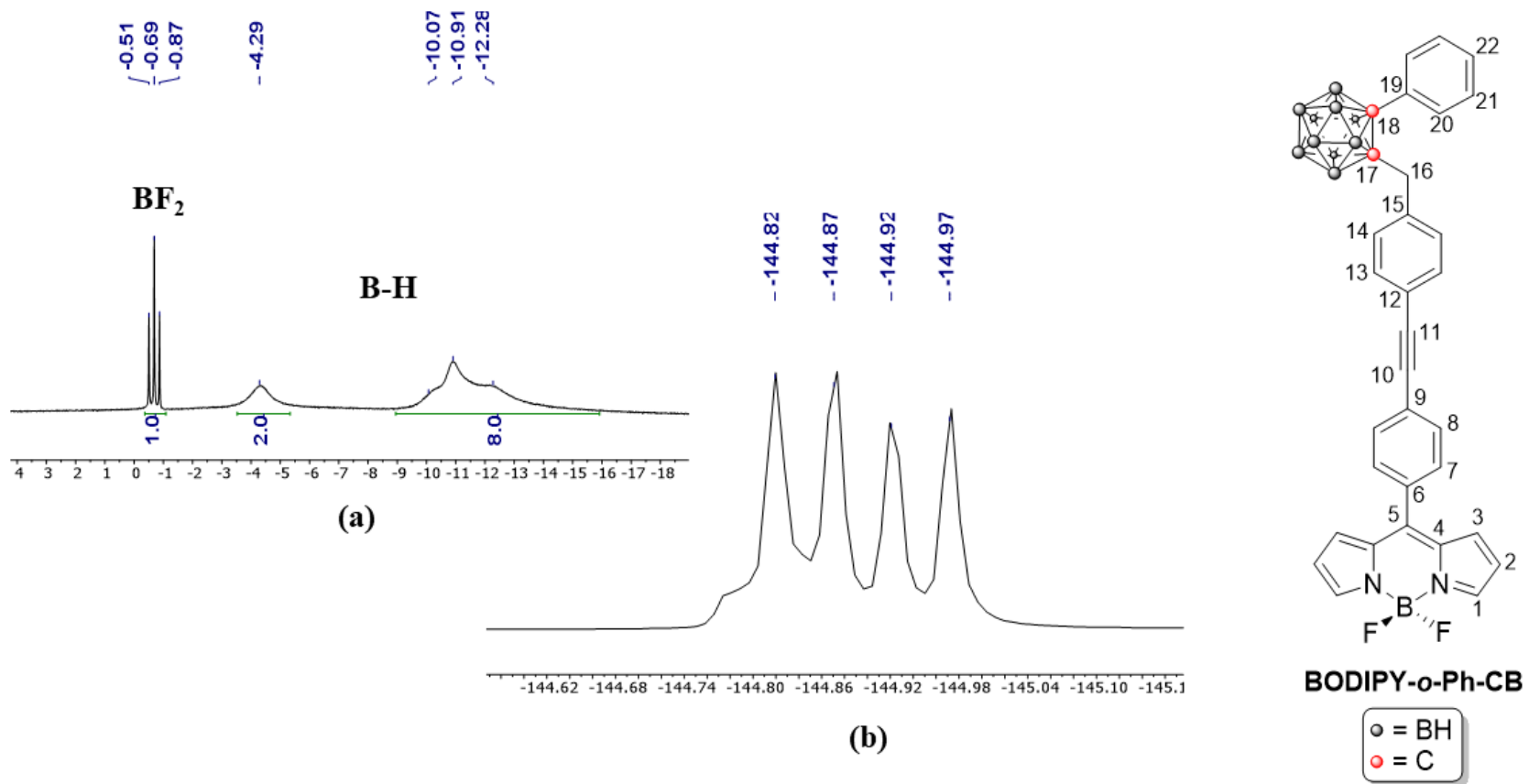


Figura S76. Espectros (a) RMN- ^{11}B (128 MHz) y (b) RMN- ^{19}F (CDCl_3 , 376 MHz) para **BODIPY-*o*-Ph-CB** en CDCl_3 .

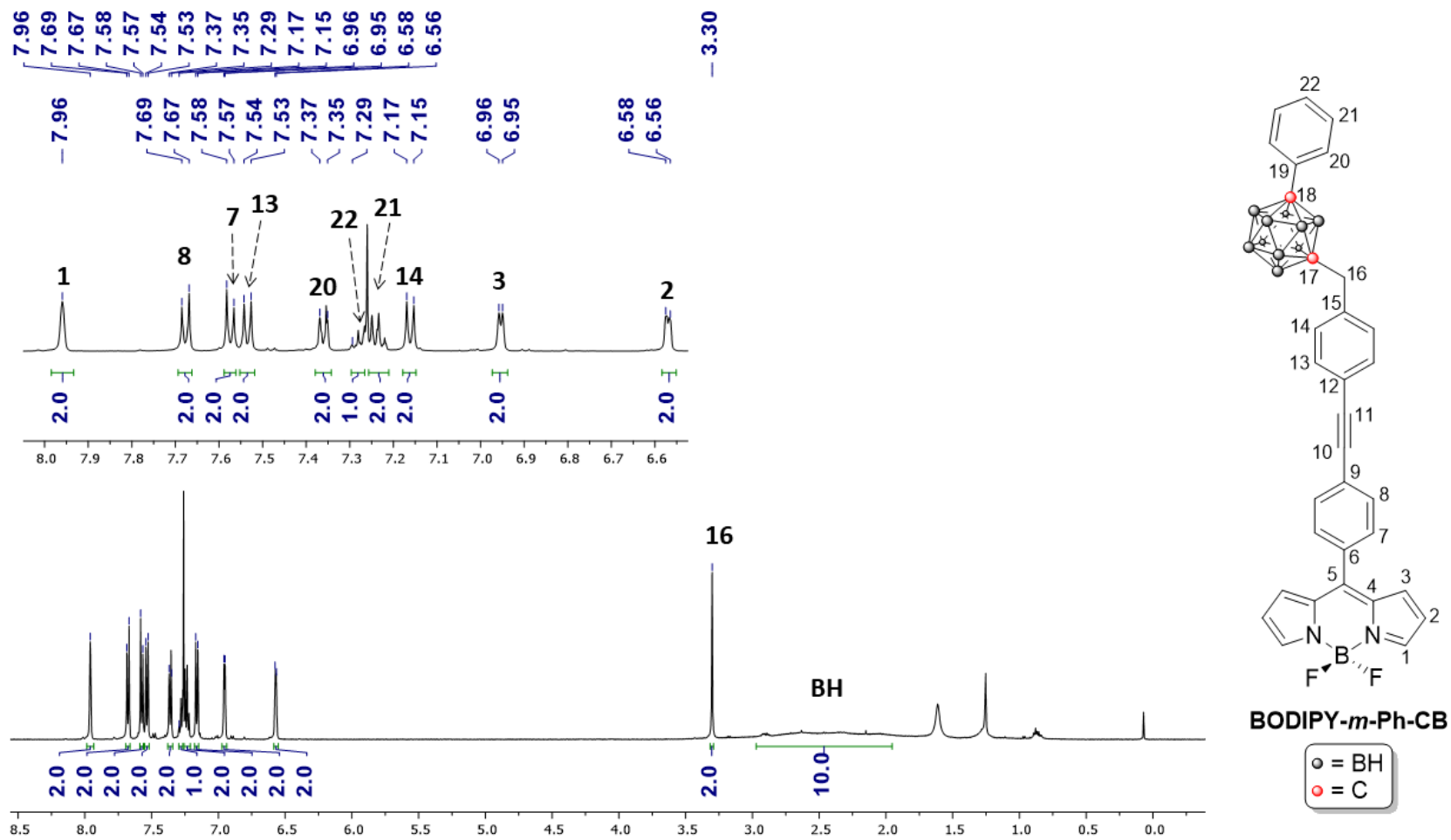


Figura S78. Espectro de RMN- ^1H para **BODIPY-*m*-Ph-CB** (CDCl_3 , 400 MHz).

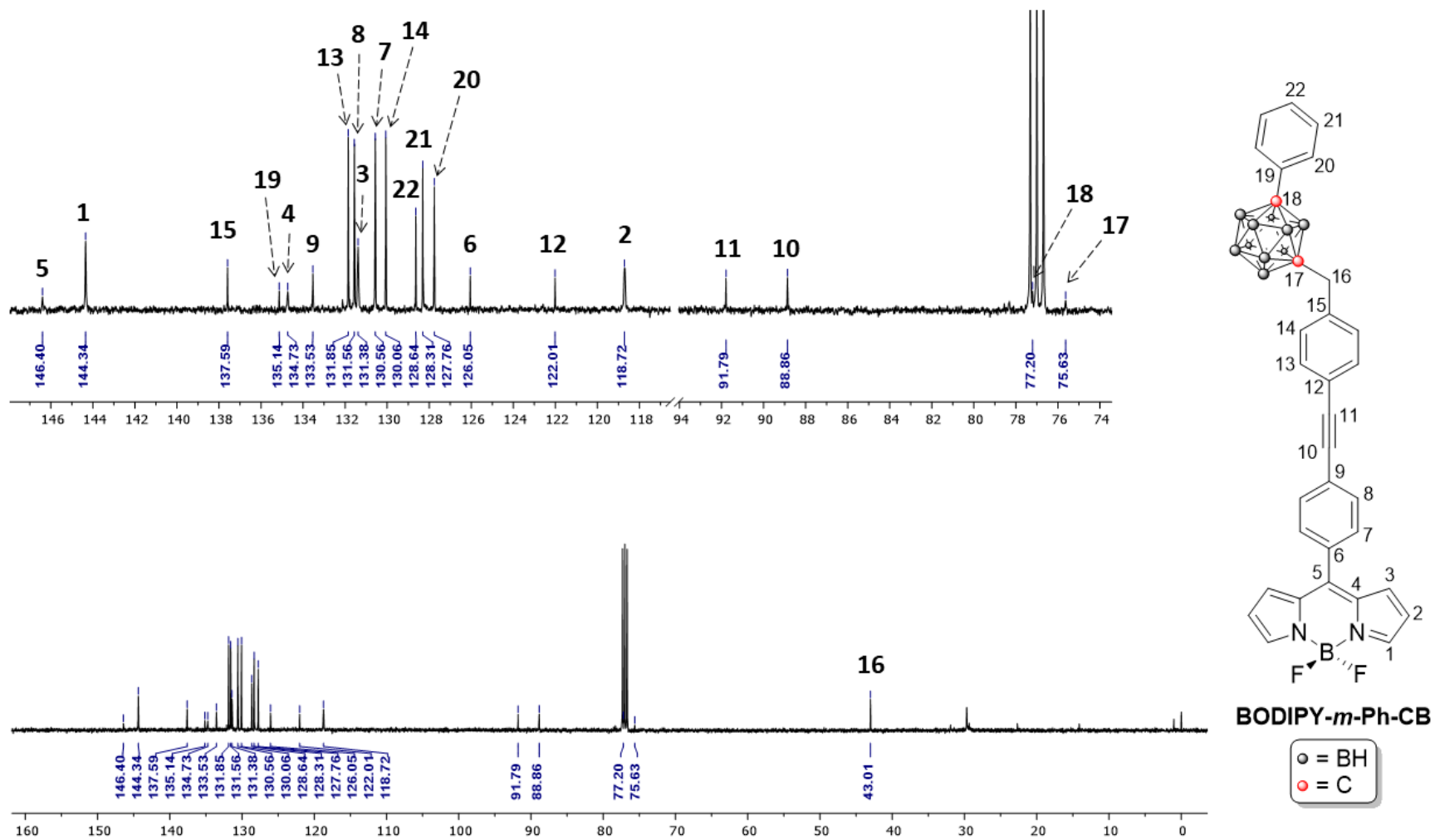


Figura S79. Espectro de RMN- ^{13}C para BODIPY-*m*-Ph-CB (CDCl_3 , 100 MHz).

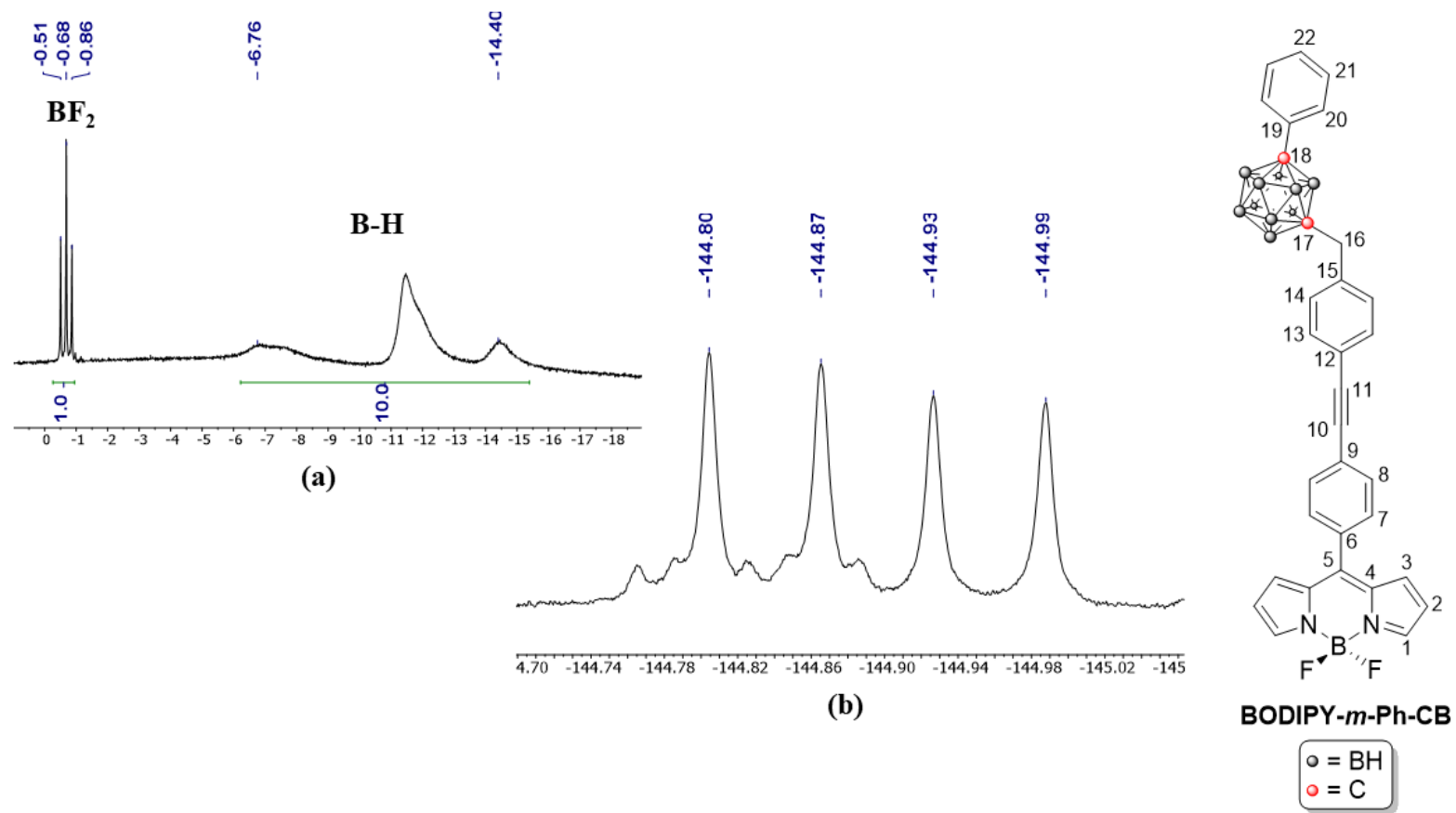


Figura S80. Espectros (a) RMN- ^{11}B (128 MHz) y (b) RMN- ^{19}F (CDCl_3 , 376 MHz) para **BODIPY-*m*-Ph-CB** en CDCl_3 .

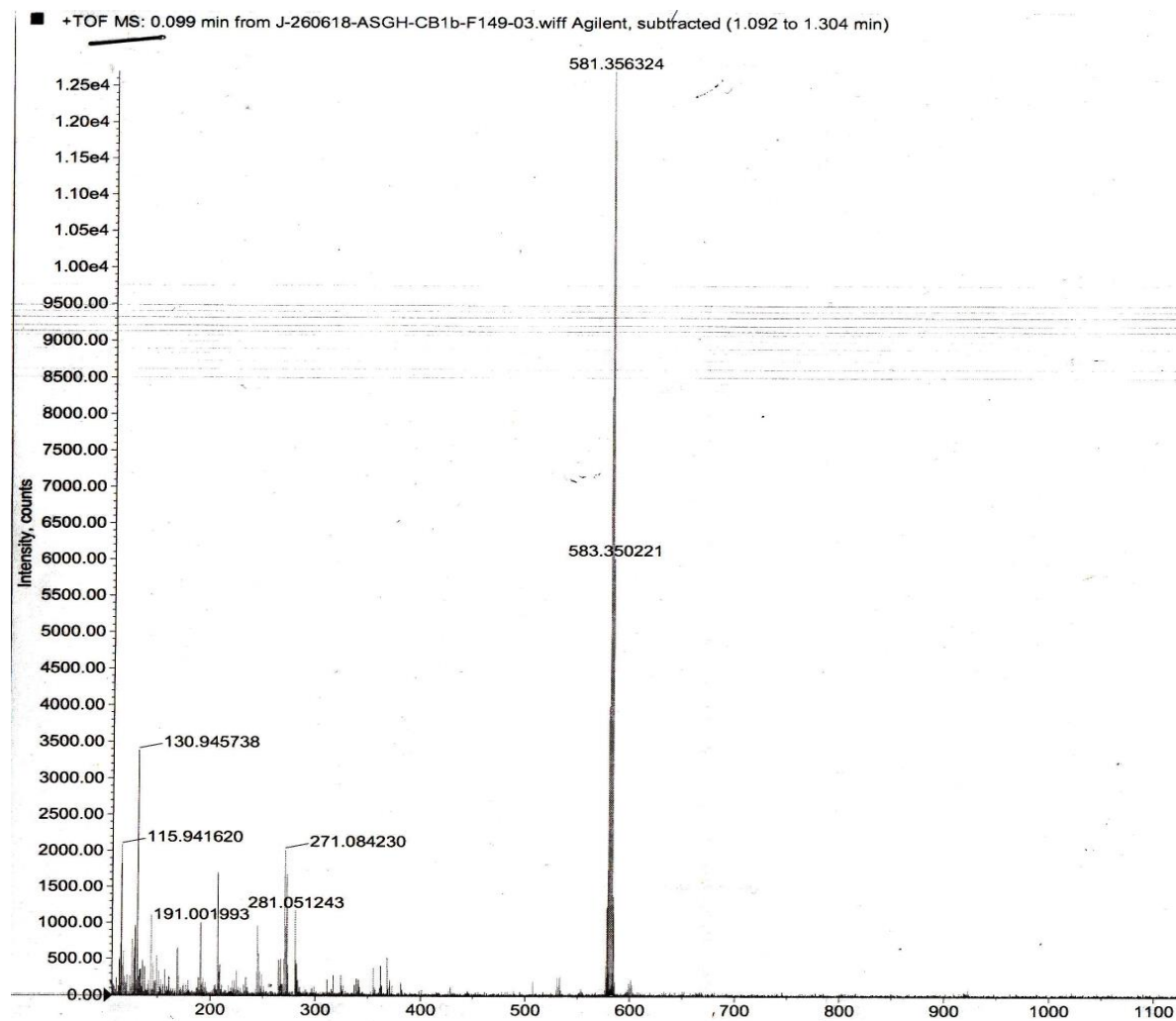


Figura S81. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **BODIPY-*m*-Ph-CB**.

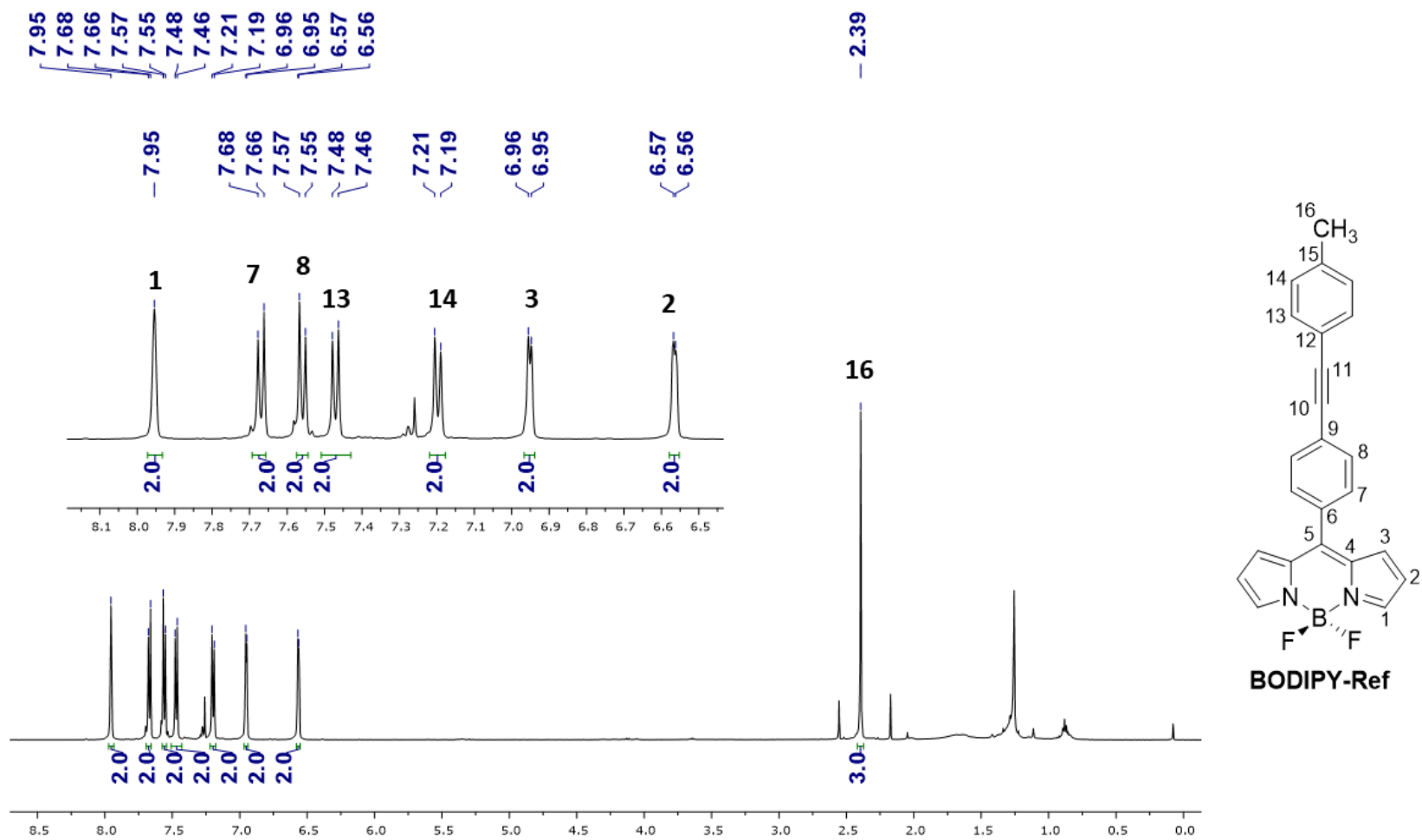


Figura S82. Espectro de RMN- ^1H para **BODIPY-Ref** (CDCl_3 , 400 MHz).

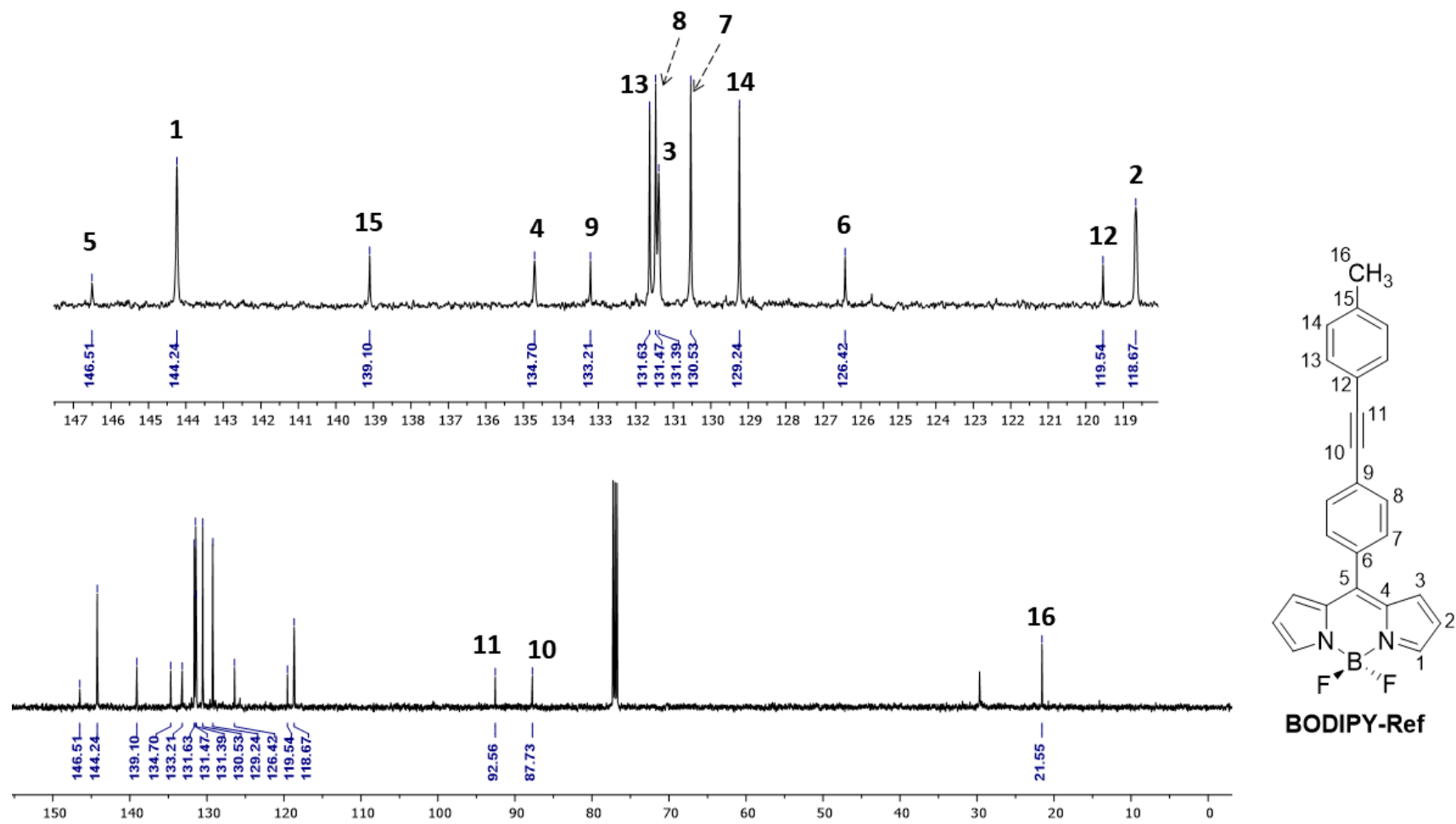
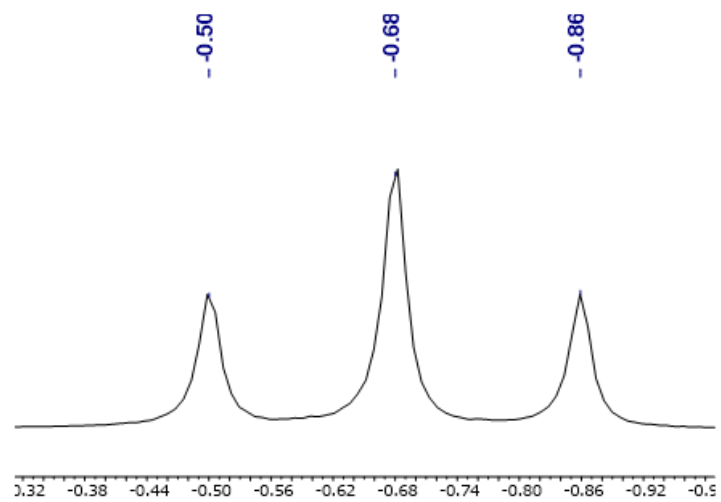
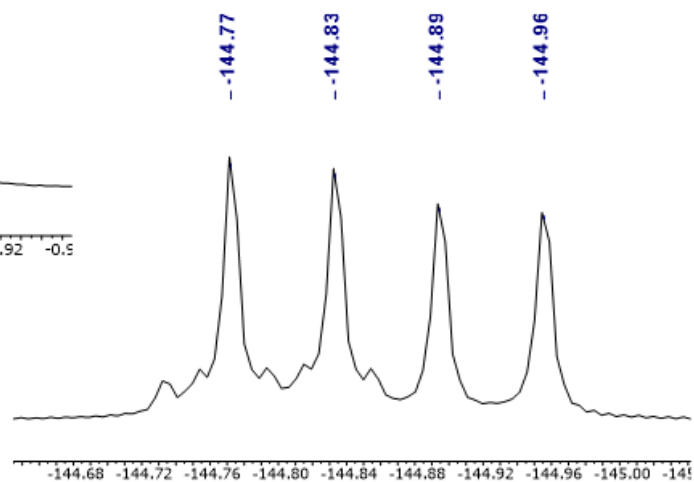


Figura S83. Espectro de RMN- ^{13}C para **BODIPY-Ref** (CDCl_3 , 100 MHz).



(a)



(b)

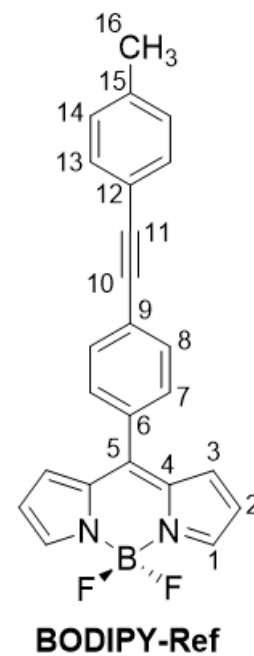


Figura S84. Espectros (a) RMN- ^{11}B (128 MHz) y (b) RMN- ^{19}F (CDCl_3 , 376 MHz) para **BODIPY-Ref** en CDCl_3 .

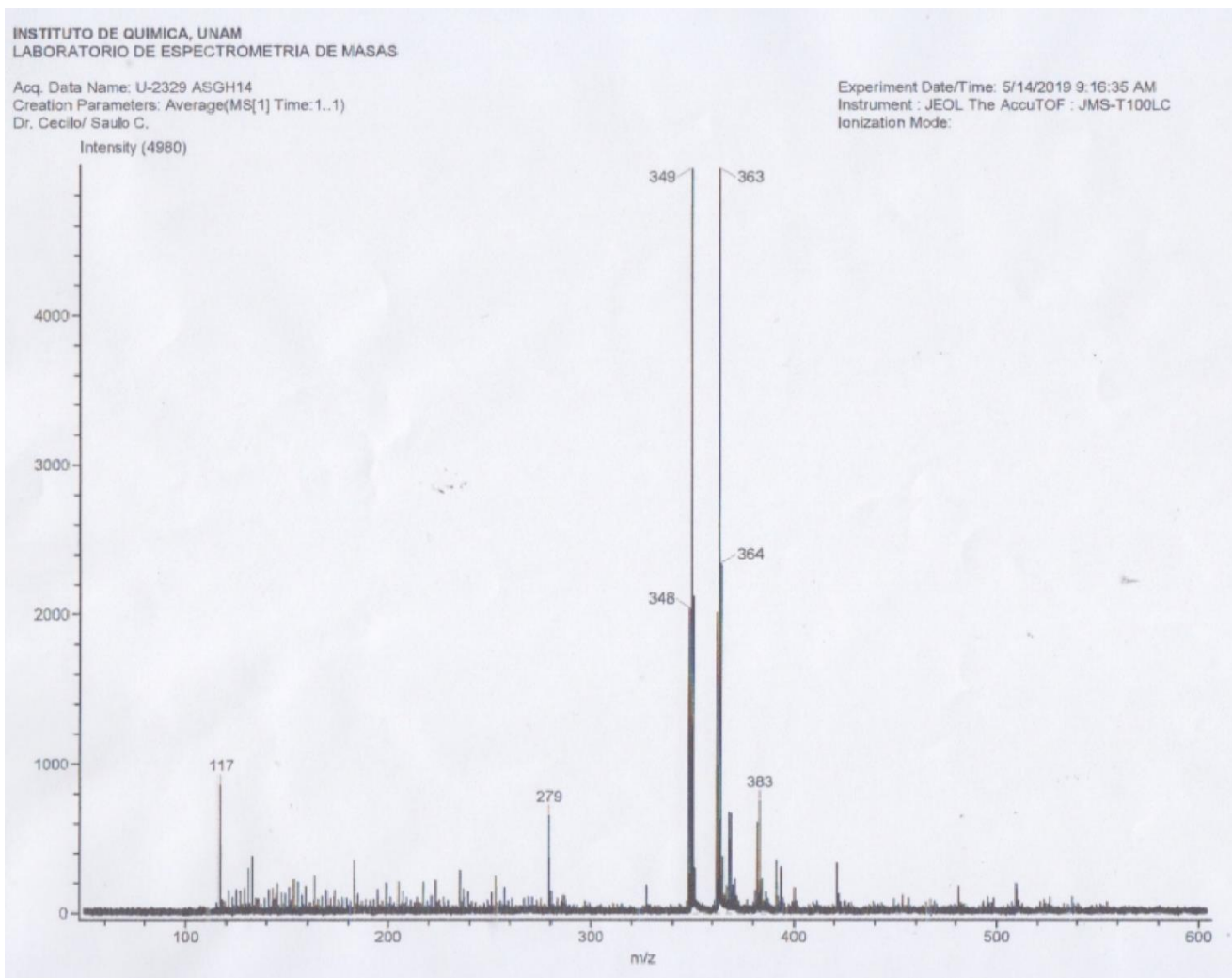


Figura S85. Espectro EMAR (ESI-TOF⁺) para **BODIPY-Ref**.

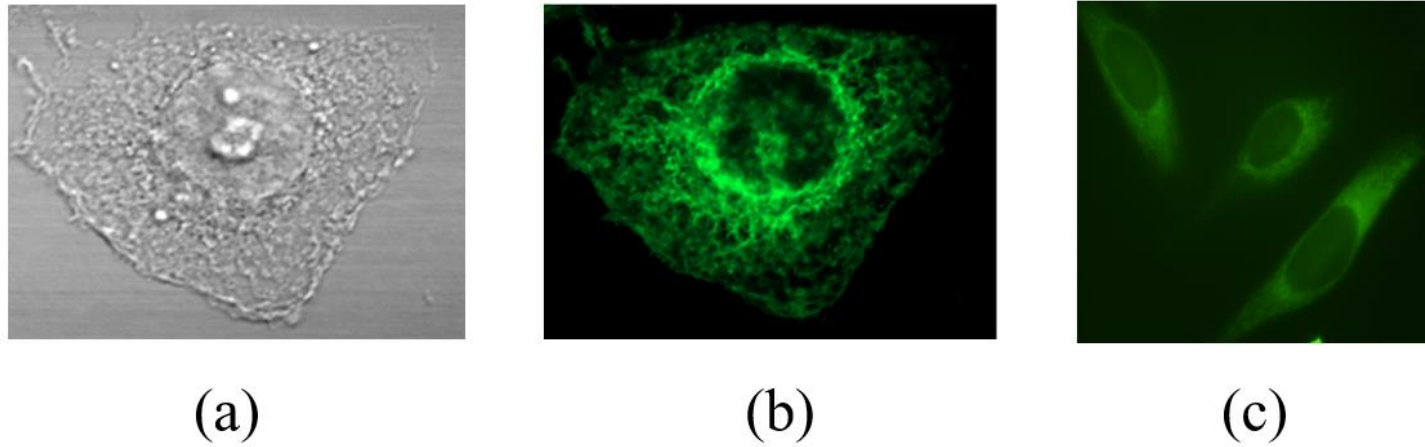


Figura S86. Microscopías confocales en células HeLa después de 30 minutos de incubación con **BODIPY-*m*-Ph-CB** (10 μ M) vistas en los canales (a) de campo claro y (b) verde ($\lambda_{\text{exc}} = 486 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$). (c) Localización comparativa usando el marcador comercial CellMask™ selectivo para membrana celular visto en el canal verde ($\lambda_{\text{exc}} = 486 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$) después de la incubación por 30 minutos.

ANEXO II

TABLAS CRISTALOGRÁFICAS

Tabla S1. Datos cristalográficos.

	38b	39	<i>cis-42b</i>	<i>trans-42b</i>	<i>trans-51a</i>
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₉ NOS	C ₁₂ H ₁₁ IN ₂ O	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₄ ORuS, PF ₆ , CH ₃ CN	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₄ ORuS, PF ₆ , CH ₃ CN, 0.25H ₂ O	C ₄₆ H ₄₇ Cl ₂ N ₄ ORu, PF ₆ , 0.5(C ₄ H ₁₀ O)
Temperatura (K)	130(2)	293(2)	115(2)	113(2)	100(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	<i>C2/c</i>	<i>P2₁/c</i>	<i>P2₁/n</i>	<i>P 1</i>	<i>P2₁/n</i>
a (Å)	25.0002(19)	7.5629(3)	16.243(5)	13.3561(5)	30.557(2)
b (Å)	6.2272(3)	21.5694(7)	16.243(5)	14.1266(5)	23.5786(15)
c (Å)	15.1670(12)	7.8166(3)	21.148(8)	14.3152(5)	12.8398(8)
α (°)	90	90	90	104.9716(16)	90
β (°)	118.728(10)	104.4770(10)	93.548(10)	96.3207(16)	92.388(2)
γ (°)	90	90	90	97.3251(17)	90
Volumen (Å ³)	2070.6(3)	1234.61(8)	2521.3(14)	2558.96(16)	9243.0(10)
Z	8	4	4	4	4
Densidad calculada (g/cm ³)	1.381	1.755	1.853	1.836	1.474
Intervalo de colección (°)	3.501 - 29.467	2.938 - 27.497	2.93 - 34.97	1.49 - 28.31	1.85 - 24.21
Reflecciones colectadas	7310	12180	129329	61829	166265
Reflecciones únicas	2496	2816	11066	12669	14805
Índices R finales	R ₁ = 0.0462, wR ₂ = 0.1092	R ₁ = 0.0238, wR ₂ = 0.0583	R ₁ = 0.0305, wR ₂ = 0.0665	R ₁ = 0.0352, wR ₂ = 0.0469	R ₁ = 0.0564, wR ₂ = 0.1151
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0638 wR ₂ = 0.1214	R ₁ = 0.0289, wR ₂ = 0.0612	R ₁ = 0.0413, wR ₂ = 0.0715	R ₁ = 0.0396, wR ₂ = 0.0396	R ₁ = 0.1171, wR ₂ = 0.1428

Tabla S1 (continuada).

	52a	52b	53a	53b	m-Ph-CB
Fórmula empírica	C ₂₁ H ₁₆ CIN ₄ O ₂ Ru, PF ₆ , CH ₃ CN	C ₁₉ H ₁₄ CIN ₄ O ₂ RuS, PF ₆ , CH ₃ CN	C ₂₃ H ₂₀ CIN ₄ O ₂ Ru, PF ₆	C ₂₁ H ₁₈ CIN ₄ O ₂ RuS, PF ₆	C ₁₅ H ₂₁ B ₁₀ I
Temperatura (K)	110(2)	110(2)	100(2)	100(2)	130(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Ortorrómbico
Grupo espacial	<i>C2/c</i>	<i>C2/c</i>	<i>P 1</i>	<i>P 1</i>	<i>P2₁2₁2₁</i>
a (Å)	22.9917(8)	22.9490(8)	11.012(2)	7.6895(4)	7.7896(3)
b (Å)	17.2990(6)	16.5682(7)	11.092(2)	10.6774(6)	11.6611(5)
c (Å)	14.1597(5)	14.2190(6)	11.139(2)	15.5498(9)	20.9589(9)
α (°)	90	90	75.537(7)	80.941(2)	90
β (°)	114.003(2)	112.0015(12)	79.228(7)	85.288(2)	90
γ (°)	90	90	70.732(7)	69.984(2)	90
Volumen (Å ³)	5144.8(3)	5012.7(3)	1235.5(4)	1184.07(12)	1903.81(14)
Z	8	8	2	2	4
Densidad calculada (g/cm ³)	1.753	1.815	1.790	1.88	1.522
Intervalo de colección (°)	3.78 - 37.83	1.56 - 30.53	1.90 - 29.57	1.33 - 28.40	3.89 - 29.94
Reflecciones colectadas	105871	77701	47404	68687	7955
Reflecciones únicas	13630	7610	6911	5944	4458
Índices R finales	R ₁ = 0.0252, wR ₂ = 0.0627	R ₁ = 0.0214, wR ₂ = 0.0361	R ₁ = 0.0341, wR ₂ = 0.0801	R ₁ = 0.0315, wR ₂ = 0.0429	R ₁ = 0.0246, wR ₂ = 0.0574
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0310 wR ₂ = 0.0674	R ₁ = 0.0271, wR ₂ = 0.2002	R ₁ = 0.0460, wR ₂ = 0.0863	R ₁ = 0.0369, wR ₂ = 0.0490	R ₁ = 0.0273, wR ₂ = 0.0588

Tabla S1 (continuada).

	BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	BODIPY-Ref
Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₉ B ₁₁ F ₂ N ₂	C ₃₂ H ₃₁ B ₁₁ F ₂ N ₂ , 0.5(C ₆ H ₁₄)	C ₃₂ H ₃₁ B ₁₁ F ₂ N ₂ , 0.5(C ₆ H ₁₄)	C ₂₄ H ₁₇ BF ₂ N ₂
Temperatura (K)	299(2)	293(2)	297(2)	294(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Triclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$
a (Å)	14.8970(7)	8.2770(4)	10.6616(7)	7.6541(5)
b (Å)	15.5300(7)	11.8101(8)	12.0496(8)	7.8995(5)
c (Å)	26.5342(11)	18.2600(10)	13.4696(8)	16.6764(11)
α (°)	90	86.936(5)	89.052(2)	100.375(2)
β (°)	103.5900(10)	80.300(4)	89.018(2)	97.336(2)
γ (°)	90	79.934(5)	88.341(2)	103.098(2)
Volumen (Å ³)	5966.8(5)	1731.82(18)	1729.21(19)	950.97(11)
Z	8	2	2	2
Densidad calculada (g/cm ³)	1.199	1.218	1.236	1.335
Intervalo de colección (°)	2.20 - 26.45	3.51 - 30.00	2.25 - 23.27	2.52 - 30.13
Reflecciones colectadas	190178	17155	32185	78656
Reflecciones únicas	11516	6305	4577	5606
Índices R finales	R ₁ = 0.0591, wR ₂ = 0.1273	R ₁ = 0.0534, wR ₂ = 0.1339	R ₁ = 0.0679, wR ₂ = 0.1686	R ₁ = 0.0551, wR ₂ = 0.1298
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.1370 wR ₂ = 0.1613	R ₁ = 0.0685, wR ₂ = 0.1467	R ₁ = 0.0943, wR ₂ = 0.1891	R ₁ = 0.1284, wR ₂ = 0.1606

ANEXO III

PUBLICACIONES



Chemistry A European Journal

 **Chemistry
Europe**
European Chemical
Societies Publishing

Accepted Article

Title: Tuning the cell uptake and subcellular distribution in BODIPY-carboranyl dyads: An experimental and theoretical study.

Authors: Pablo Labra-Vázquez, Ricardo Flores-Cruz, Aylin Galindo-Hernández, Justo Cabrera-González, Cristian Guzmán-Cedillo, Arturo Jiménez-Sánchez, Pascal G. Lacroix, Rosa Santillan, Norberto Farfán, and Rosario Núñez

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Chem. Eur. J.* 10.1002/chem.202002600

Link to VoR: <https://doi.org/10.1002/chem.202002600>

WILEY-VCH

Tuning the cell uptake and subcellular distribution in BODIPY-carboranyl dyads: An experimental and theoretical study.

Pablo Labra-Vázquez,^{a,d} Ricardo Flores-Cruz,^b Aylin Galindo-Hernández,^a Justo Cabrera-González,^c Cristian Guzmán-Cedillo,^a Arturo Jiménez-Sánchez,^b Pascal G. Lacroix,^d Rosa Santillan,^e Norberto Farfán,^{*,a} and Rosario Núñez^{*,c}

^a *Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.*

^b *Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.*

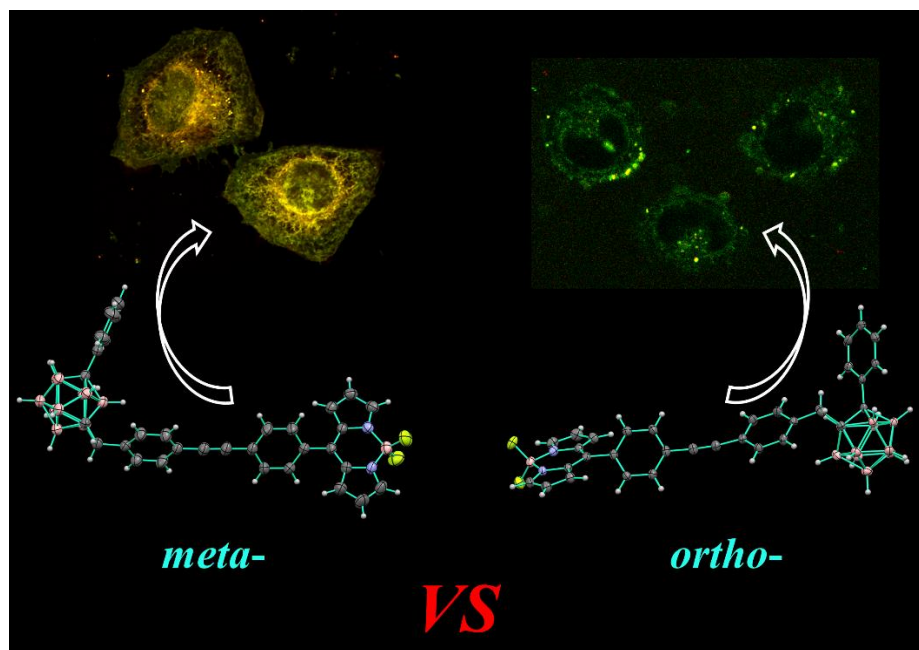
^c *Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), Campus de la UAB, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.*

^d *Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, 205 route de Narbonne, F-31077, Toulouse, France.*

^e *Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000, Ciudad de México, México.*

Accepted Manuscript

For Table-of-Contents use only.



Round 1! Fluorophores bearing carborane clusters often display remarkably different cell incomes, with recurrent higher permeabilities for *meta*-carboranes compared to *ortho*-isomers. Here, we study a set of BODIPY-carborane dyads to provide an explanation for these differences, which originate from important variations in their partition coefficients and static dipole moments.

ABSTRACT

A set of BODIPY-carboranyl dyads synthesized by a Sonogashira cross-coupling reaction, where different C-substituted *ortho*- and *meta*-carboranyl fragments have been linked to a BODIPY fluorophore is described. Chemical, photophysical and physicochemical analyses are presented, including NMR and SXRD experiments, optical absorption/emission studies and log *P* measurements. These studies, supported by DFT computations (M06-2X/6-31G**) provide an explanation to the largely divergent cell income that these fluorescent carboranyl-based fluorophores display, for which a structural or physicochemical explanation remains elusive. By studying the cell uptake efficiency and subcellular localization for our set of dyads on living HeLa cells, we tracked the origins of these differences to significant variations in their static dipole moments and partition coefficients, which tune their ability to interact with lipophilic microenvironments in cells. Remarkably, *m*-carboranyl-BODIPY derivatives with a higher lipophilicity are much better internalised by cells than their homologous with *o*-carborane, suggesting that *m*-isomers are potentially better theranostic agents for *in vitro* bioimaging and boron carriers for BNCT.

1. INTRODUCTION

Dicarba-*closo*-dodecaboranes (icosahedral 12-vertex species usually named carboranes, $C_2B_{10}H_{12}$) are chemically intriguing boron clusters bearing two endocyclic carbon atoms.^[1] They possess remarkable chemical, thermal and photochemical stabilities,^[2] and spherical aromaticity through σ -delocalized electron densities, owed to the ubiquitous occurrence of multicentered bonds within their skeletons.^[3] Consequently, these boranes display some electronic properties and sizes similar to those of a rotating benzene ring^[4] and, accordingly, isomers 1,2- 1,7- and 1,12-*closo*- $C_2B_{10}H_{12}$ are typically named *ortho*-, *meta*- and *para*-carboranes, respectively. In this sense, it has been demonstrated that the different electronic properties of carborane isomers can notably change the photophysical behaviour of fluorophores linked through a carbon cluster atom (C_c).^[2a, 5] Their unique characteristics have given carborane derivatives increasing research interest during the last decade in diverse fields, including catalysis,^[6] optoelectronics^[7] nonlinear optics,^[8] and materials science,^[9] particularly in the preparation of highly thermally stable polymers.^[2c] Moreover, carboranes show low toxicity and high stability in biological systems,^[10] and their hydrophobic nature has proved to enhance the diffusion across the cellular membranes of carborane-bearing drugs.^[11] Owing to these features, one of the largest field of study covers the potential of carborane-based molecules in biomedical applications, in especial as candidates to be used as agents for boron neutron capture therapy (BNCT).^[4b, 12] This anti-cancer therapy relies on the controlled cell death due to ionizing radiation released from ^{10}B nuclei after irradiation with thermal neutrons.^[13]

Currently, one of the most outstanding areas of development is the design of new fluorophores as efficient *in vitro* imaging probes to be applied in optical imaging. The

integration of one imaging agent with a target drug in a single system leads to the development of a theranostic agent, allowing simultaneously diagnosis and treatment of a specific disease. Nevertheless, relevant structure-related properties such as subcellular biodistribution and dynamic of fluorescent-derived carboranes are still an unmet need. To move towards this goal, several chemical architectures containing carborane fragments have been synthesized by our group,^[14] however their molecular structures cannot be easily related to their subcellular distribution and function, even though some correlation of general physicochemical observables has been reported to be helpful on achieving specific biological properties for a great variety of compounds.^[1b, 10d, 15]

Among the wide family of fluorophores addressed to bioimaging and chemosensing, BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene) dyes have found an increased interest due to their unique spectroscopic properties,^[16] synthetic versatility,^[17] low toxicity and good stability under physiological conditions.^[18] Furthermore, synthesis of BODIPYs bearing carborane^[19] and metallacarborane clusters^[20] have been reported and their photophysical properties assessed. Although some of the studied BODIPY-carboranyl dyads have displayed exceptional cellular uptake toward HeLa cells, making these clusters good candidates for *in vitro* cell tracking, it is often encountered that small changes in the molecular structure deeply modify their cellular internalization ability.^[19f, g]

There exists a consistent evidence suggesting that cell permeability towards carborane-based compounds is directly influenced by the lipophilic character of the compounds,^[21] which depends on the partition coefficient that in turn is modulated by the dipole moment and the van der Waals volume of the molecule.^[22] According to this, we decided to investigate a new set of BODIPY-carboranyl dyads specifically intended to correlate these

structural parameters, not only with their cellular uptake efficiency but also with their subcellular distribution features.

The target compounds are shown in Chart 1. **BODIPY-*o*-Me-CB** and **BODIPY-*o*-Ph-CB** have disubstituted *ortho*-carborane cages, where the difference substituents linked to the adjacent C_c (methyl and phenyl) is expected to yield a significant change in the van der Waals volume, while the dipole moment should be similar. Conversely, when comparing **BODIPY-*o*-Ph-CB** with **BODIPY-*m*-Ph-CB**, the van der Waals volume is expected to be relatively unaltered, whereas there should be a significant change in the static dipole moments between both isomers, in agreement with previous reports on the chemistry of carboranes.^[1b] Thus, these comparisons would allow us to establish separately the influence of these structural features on the cellular uptake efficiency. Finally, **BODIPY-Ref**, having no carborane fragment, was included as a reference compound to evaluate how the insertion of different C-substituted *o*- and *m*-carboranyl units into the BODIPY fluorophore influence the cellular uptake and biodistribution.

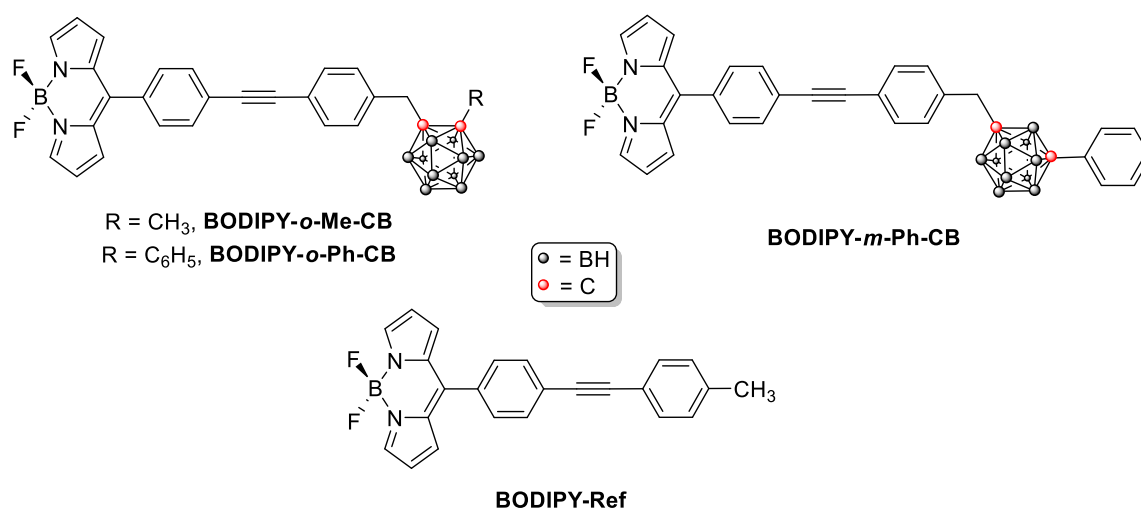


Chart 1. BODIPY derivatives under investigation.

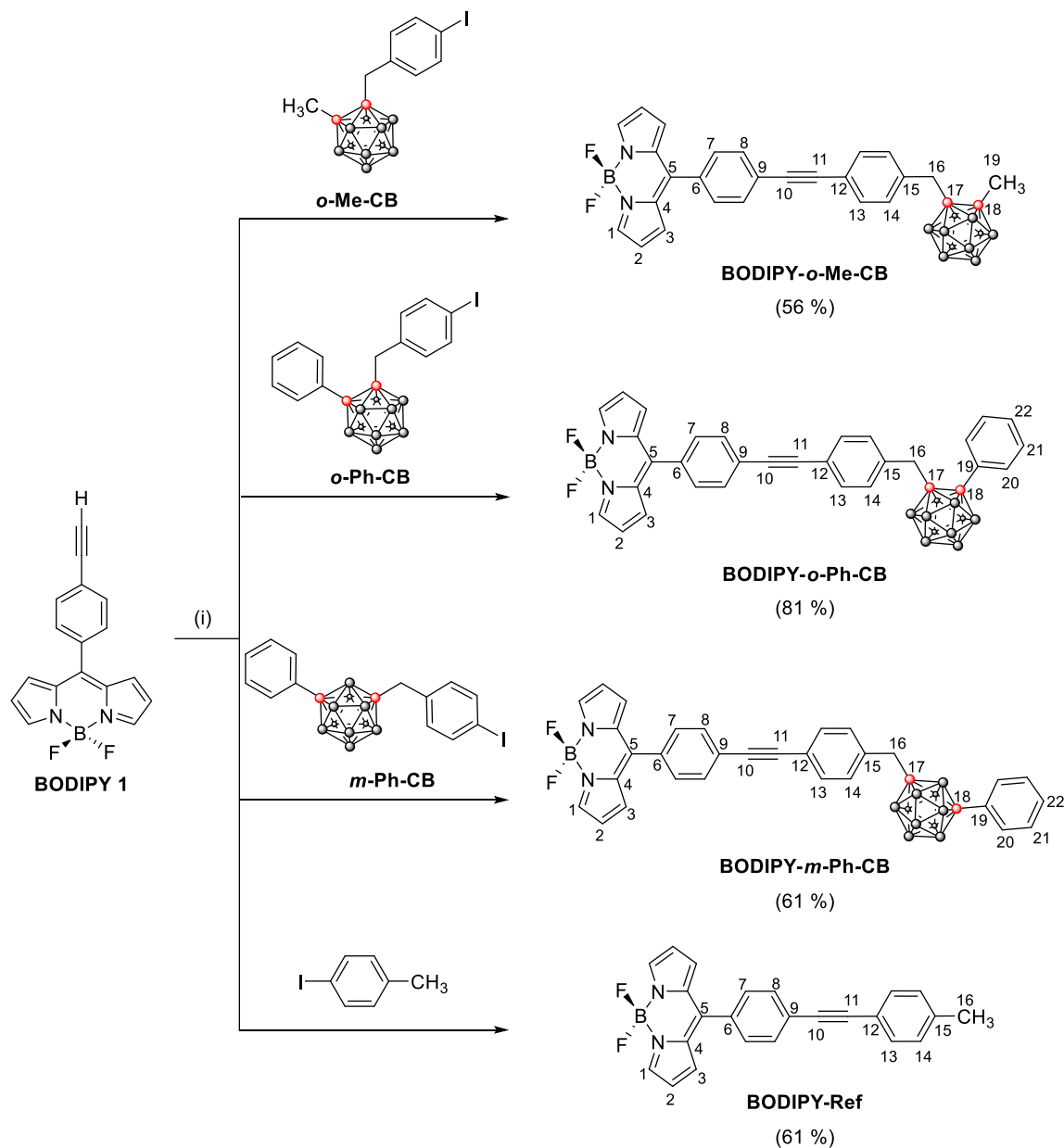
2. RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization

The synthesis of the target compounds (Scheme 1) was carried out employing a Sonogashira cross-coupling reaction as the key synthetic step from **BODIPY 1**, which was coupled to 4-iodotoluene and the carboranyl derivatives *o*-Me-CB, *o*-Ph-CB and *m*-Ph-CB (further synthetic details are gathered in the SI),^[5] to produce the fluorophores in moderate to good yields. The identity of these compounds was established using multinuclear ¹H, ¹³C{¹H}, ¹¹B and ¹⁹F-NMR and HRMS and SXRD experiments (Details are gathered in the Supporting Information).

The unambiguous assignment of the ¹H and ¹³C{¹H} signals for the target compounds was carried out with the help of homonuclear ¹H-¹H (COSY, NOESY) and heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC/HMBC) 2D-NMR experiments. Signals from the B-H protons of the clusters appeared as broad multiplets, from $\delta = 1.74$ to 2.96 ppm, due to the ubiquitous ¹H-¹¹B and ¹H-¹⁰B scalar couplings. Aliphatic protons from the methylene (H-16) in the carboranyl fluorophores appeared in the $\delta = 3.12 - 3.49$ ppm interval; resonating at higher frequencies when compared to the protons of the methyl group in **BODIPY-Ref** (H-16) with $\delta = 2.39$ ppm. This observation is in good agreement with the broadly recognized inductive electron-withdrawing nature of boranes,^[23] here providing a rationale to the iterative deshielding of these nuclei. Although this influence further echoes strongly on the resonance of C-16, with $\delta = 21.55$ ppm for **BODIPY-Ref** and $\delta = 40.78 - 43.01$ ppm for the carboranyl derivatives, the chemical shifts for the aromatic nuclei of the 4 fluorophores were seemingly unaffected, suggesting a localized withdrawing effect and a rather low electronic coupling between the carboranyl and BODIPY cores. This result matches well with the optical spectra and the DFT

computations for these compounds (*vide infra*), which confirmed the lack of electronic communication between the two sub-molecular fragments. ^{11}B NMR spectra also confirmed the formation of the expected compounds showing for all of them similar patterns, with one resonance at -0.60 ppm assigned to the BF_2 group and broad resonances in the range from δ -6 to -15 ppm characteristic from *closo*-carborane clusters.



Scheme 1. Synthesis and numbering for the target BODIPY derivatives. Reagents and general conditions: (i) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI , THF , Et_3N , reflux.

X-Ray Diffraction Studies

Crystals of ***m*-Ph-CB** and all of the target BODIPY derivatives suitable for single-crystal X-ray diffraction analysis were grown by room temperature evaporation of their saturated solutions in acetone/*n*-hexane mixtures. Excepting **BODIPY-Ref**, which crystallized with a single fluorophore molecule per asymmetric unit ($Z' = 1$), all the other BODIPY derivatives crystallized with $Z' = 2$. In the **BODIPY-*o*-Me-CB**, the asymmetric unit is composed by two fluorophore molecules crystallographically independent yet geometrically close. **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB** crystallized with one molecule of the fluorophore and half of a disordered *n*-hexane coming from the crystallization process. Figures 1-2 show the molecular structures for these compounds including relevant distances and angles (further crystallographic details are gathered in Table 1). No significant differences in bond lengths and angles were found for ***m*-Ph-CB** when compared to the previously reported crystal structure of its *ortho*- isomer, ***o*-Ph-CB**.^[5] The introduction of the BODIPY fluorophore did not alter significantly the bond lengths related to the dicarbaborane cluster as compared with ***m*-Ph-CB**. Indeed, bond lengths among the annular C_c atoms (C8-C9 for ***m*-Ph-CB**, otherwise C25-C26) and the C atoms directly attached to them remained unchanged, even though the BODIPY core is a strong withdrawing group owed to the delocalized positive charge within its tricyclic framework. This observation is in good agreement with the lack of electronic coupling between the carboranyl and BODIPY sub-molecular fragments as evidenced by the NMR and DFT studies (*vide infra*). Furthermore, the delocalization within the BODIPY core is further evidenced by the almost equal N1-B1/N2-B1 distances and N1-B1-F1/N2-B1-F2 angles, depicting similar bond strengths among these atoms.

Table 1. Crystal Structure and Refinement Data

	<i>m</i>-Ph-CB	BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	BODIPY-Ref
empirical formula	C ₁₅ H ₂₁ B ₁₀ I	C ₂₇ H ₂₉ B ₁₁ F ₂ N ₂	C ₃₂ H ₃₁ B ₁₁ F ₂ N ₂ , 0.5(C ₆ H ₁₄)	C ₃₂ H ₃₁ B ₁₁ F ₂ N ₂ , 0.5(C ₆ H ₁₄)	C ₂₄ H ₁₇ BF ₂ N ₂
temperature (K)	130(2)	299(2)	293(2)	297(2)	294(2)
crystal system	Orthorhombic	Monoclinic	Triclinic	Triclinic	Triclinic
space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ /n	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1
a (Å)	7.7896(3)	14.8970(7)	8.2770(4)	10.6616(7)	7.6541(5)
b (Å)	11.6611(5)	15.5300(7)	11.8101(8)	12.0496(8)	7.8995(5)
c (Å)	20.9589(9)	26.5342(11)	18.2600(10)	13.4696(8)	16.6764(11)
α (deg)	90	90	86.936(5)	89.052(2)	100.375(2)
β (deg)	90	103.5900(10)	80.300(4)	89.018(2)	97.336(2)
γ (deg)	90	90	79.934(5)	88.341(2)	103.098(2)
volume (Å) ³	1903.81(14)	5966.8(5)	1731.82(18)	1729.21(19)	950.97(11)
Z	4	8	2	2	2
density (g·cm ⁻³)	1.522	1.199	1.218	1.236	1.335
Crystal size (mm)	0.41 x 0.36 x 0.32	0.40 x 0.32 x 0.19	0.45 x 0.26 x 0.12	0.25 x 0.25 x 0.12	0.52 x 0.39 x 0.26
θ range (deg)	3.89 - 29.94	2.20 - 26.45	3.51 - 30.00	2.25 - 23.27	2.52 - 30.13
reflns collected/unique	7955/4458	190178/11516	17155/6305	32185/4577	78656/5606
final <i>R</i> indices	R ₁ = 0.0246	R ₁ = 0.0591	R ₁ = 0.0534	R ₁ = 0.0679	R ₁ = 0.0551
[<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	wR ₂ = 0.0574	wR ₂ = 0.1273	wR ₂ = 0.1339	wR ₂ = 0.1686	wR ₂ = 0.1298
<i>R</i> indices	R ₁ = 0.0273	R ₁ = 0.1370	R ₁ = 0.0685	R ₁ = 0.0943	R ₁ = 0.1284
(all data)	wR ₂ = 0.0588	wR ₂ = 0.1613	wR ₂ = 0.1467	wR ₂ = 0.1891	wR ₂ = 0.1606

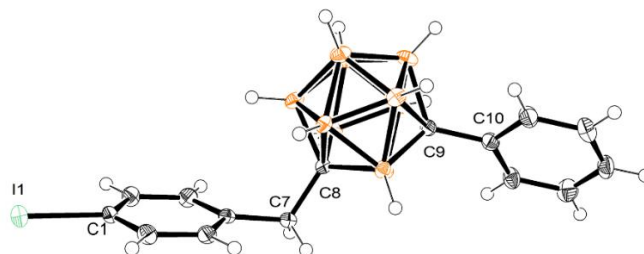


Figure 1. Solid-state structure for *m*-Ph-CB. Thermal ellipsoids are drawn at 50 % probability for every atom other than hydrogen. Selected bond lengths [Å]: C7-C8 1.530(5), C8-B1 1.710(5), C9-B1 1.708(5), C9-C10 1.511(4), I1-C1 2.086(3).

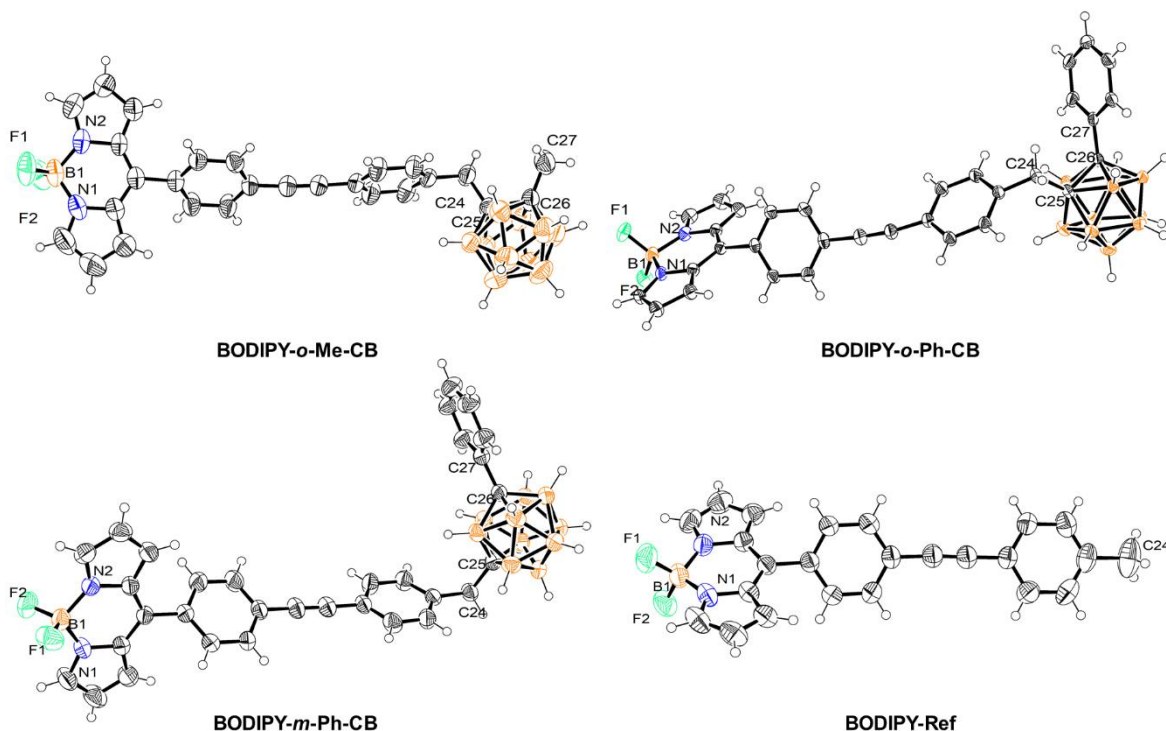


Figure 2. Solid-state structure for the target BODIPY derivatives with the thermal ellipsoids drawn at 50 % probability for every atom other than hydrogen. Selected bond lengths [Å] and angles [°] for **BODIPY-*o*-Me-CB**: B1-F1 1.375(3), B1-F2 1.382(3), B1-N1 1.532(4), B1-N2 1.537(4), C24-C25 1.532(3), C25-C26 1.674(3), C26-C27 1.517(4); F1-B1-F2 108.6(2), N1-B1-N2 106.4(2). For **BODIPY-*o*-Ph-CB**: B1-F1 1.3888(17), B1-F2 1.3779(18), B1-N1 1.5489(19), B1-N2 1.545(2), C24-C25 1.5299(18), C25-C26 1.7158(17), C26-C27 1.5011(18); F1-B1-F2 109.91(11), N1-B1-N2 105.62(10). For **BODIPY-*m*-Ph-CB**: B1-F1 1.386(3), B1-N1 1.527(4), B1-N2 1.536(4), B1-F2 1.372(3), C24-C25 1.530(3), C26-C27 1.508(3); F1-B1-F2 108.5(2), N1-B1-N2 106.7(2). For **BODIPY-Ref**: B1-F1 1.380(2), B1-F2 1.385(2), B1-N1 1.531(3), B1-N2 1.542(3); F1-B1-F2 108.29(15), N1-B1-N2 106.18(14). For clarity, only one of the crystallographically independent molecules is presented for **BODIPY-*o*-Me-CB**.

At this point, two crystal structures deserve further attention. As mentioned earlier, both **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB** differing only on the position of the annular C_c atoms within the dicarbaborane cluster, crystallized with disordered *n*-hexane molecules in a BODIPY/*n*-hexane 2/1 ratio. Nonetheless, their self-assemblies are considerably divergent, as markedly different crystallographic environments for the *n*-hexane molecules can be observed. As depicted in Figure 3, for **BODIPY-*o*-Ph-CB** the solvent molecules are confined within supramolecular pores formed by the antiparallel *head-to-tail* arrangement of pairs of fluorophores, spreading through the crystallographic *a* axis. Contrastingly, for **BODIPY-*m*-Ph-CB**, the *n*-hexane molecules are very closely surrounded by fluorophore molecules. Importantly, in the *ortho*-isomer no close contacts are observed for the solvent molecules, whereas in the *meta*- one, 12 solvent-fluorophore short contacts (less than the sum of van der Waals radii) were found. This suggests that in the first case the *n*-hexane molecules move freely throughout the supramolecular channels, whilst in the latter one the solvent molecules are densely trapped within the crystal lattice, resulting in these supramolecular interactions.

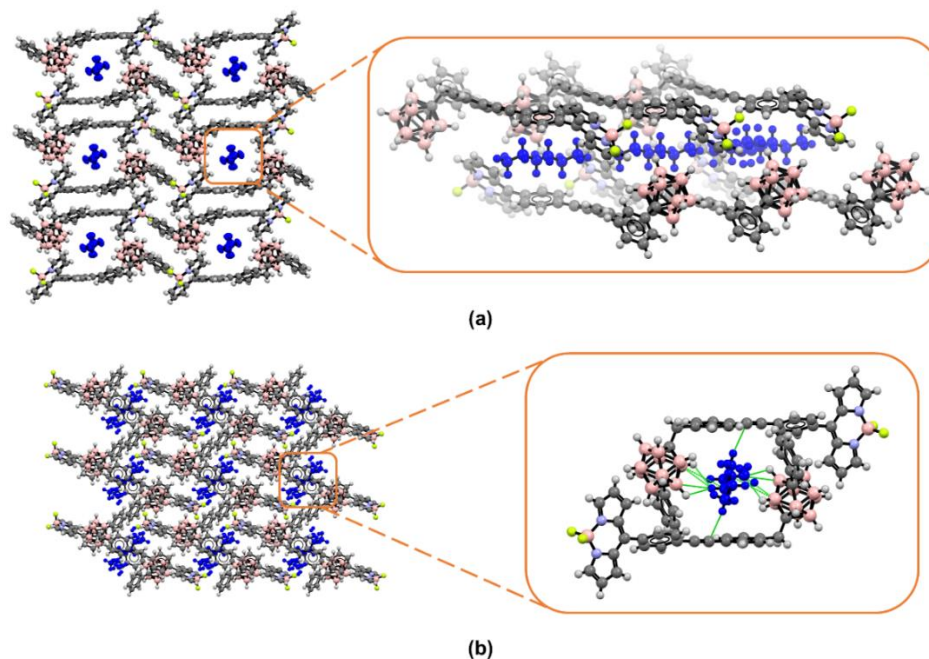


Figure 3. Crystallographic projections for (a) **BODIPY-*o*-Ph-CB** and (b) **BODIPY-*m*-Ph-CB** along the crystallographic *a* and *b* axes, respectively. Disordered *n*-hexane molecules are shown in blue.

In order to provide theoretical insights to support these observations, the difference in the solvation of the different species may tentatively be related to the DFT computation of the ΔG° (Gibbs free energies), that is associated to the following reaction:



It is important to point out that this approach is based on a single hexane-BODIPY interaction (one explicit hexane along with a polarizable continuum model simulation for hexane). Therefore, it cannot be fully relevant to establish the complete behavior of the different isomers in the presence of solvent. Therefore, it must be used with care. The optimized geometries for both **BODIPY-*o*-Ph-CB** – hexane and **BODIPY-*m*-Ph-CB** –

hexane interacting species are shown in Figure 4. Both starting models were built assuming that the molecules of solvent closest to the BODIPY-carboranyl dyads, in the solid state (present X-ray data), can account for most of the solvation interaction. Under such assumption ΔG° is equal to +6.74 kcal mol⁻¹ and +2.42 kcal mol⁻¹, for **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB**, respectively. Therefore, the affinity for hexane appears clearly reduced in the case of the *ortho* isomer, in agreement with the X-ray structures.

An additional computational insight on the relative polarity of **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB**, and hence their affinity to hexane is available by DFT. The computed dipole moments are equal to 8.22 D and 4.86 D for **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB**, respectively. These values confirm that the solvation in non-polar medium (hexane) is less favorable for the more polar **BODIPY-*o*-Ph-CB** species.

As discussed in detail later, these solid-state observations correlate well with the higher partition coefficients ($\log P$) values observed for **BODIPY-*m*-Ph-CB** compared to **BODIPY-*o*-Ph-CB**. Although formally, a direct comparison is not possible as the SXRD experiments and $\log P$ measurements are performed in different phases, it is not surprising to find out that the more lipophilic isomer **BODIPY-*m*-Ph-CB** interacts with non-polar *n*-hexane molecules, while for **BODIPY-*o*-Ph-CB** the *n*-hexane molecules remain isolated from the clusters.

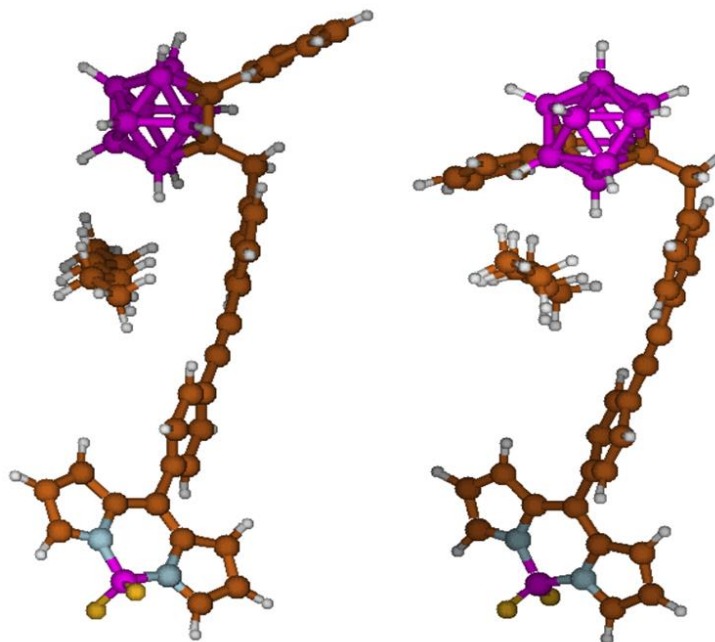


Figure 4. Computed geometries for **BODIPY-*o*-Ph-CB** (left) and **BODIPY-*m*-Ph-CB** (right) with one molecule of hexane.

Photophysical Properties and TD-DFT Computations

The photophysical properties of the target compounds were analysed by means of UV-Vis and fluorescence spectroscopies. Figure 5 shows the absorption and emission spectra for these fluorophores and Table 2 contains a summary of their experimental and computed photophysical properties. From Figure 5 it might be observed that the shape and energies associated to the electronic transitions remain practically unaltered regardless the substituent at the C_c (Me or Ph) or the cluster isomer, when compared with the **BODIPY-Ref**. Only some differences in the extinction coefficients and fluorescence intensities were appreciated (Table 2). Both computation and experimental data match well with the observation of three local absorption maxima located around 500 nm, 380 nm, and 280 nm, which are readily attributed to transitions 1 → 2, 1 → 3, and 1 → 7, respectively. These closely related

transitions involve the dominant contribution of HOMO \rightarrow LUMO, HOMO-1 \rightarrow LUMO, and HOMO-1 \rightarrow LUMO+1 orbitals for transitions 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, and 1 \rightarrow 7, respectively. These sets of orbitals are shown in Figure 6, with their related energies. Regarding the electronic spectra, the contribution of the carboranyl cluster fragments appears negligible in all of them, leading to the expectations that the four BODIPY derivatives exhibit similar UV-Vis spectra. The wavelength of the emission maxima for all the compounds is centred at $\lambda_{em} = 519$ nm (Figure 5) ($\lambda_{exc} = 450$ nm), regardless of the type of carboranyl group introduced, suggesting that there is not an important electronic communication between the BODIPY and the carborane cage. Moreover, the fluorescence quantum yields (Φ_f) of *o*-carboranyl-BODIPY dyads are two-fold the Φ_f of the non-substituted **BODIPY-Ref**, whereas a similar value is obtained for the *m*-carborane derivative, indicating that linking the cluster to the BODIPY produces an enhancement of the fluorescence efficiency of the fluorophores (Table 2). Due to the solution-state photophysical behaviour described above, these compounds were explored as fluorophores for *in vitro* imaging by confocal microscopy.

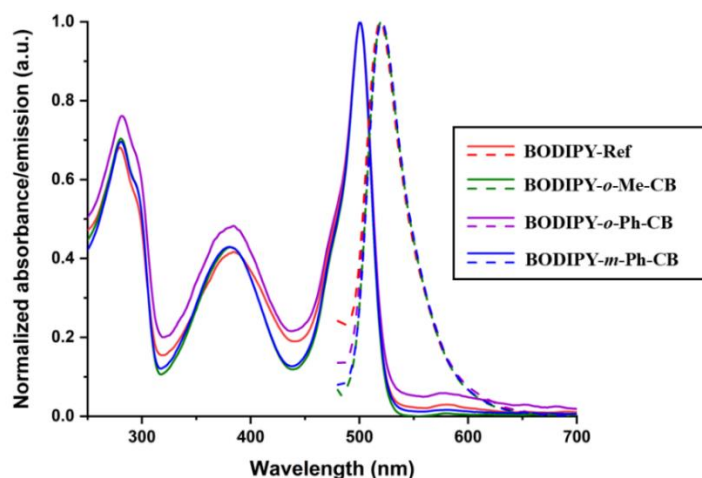


Figure 5. Normalized absorption (solid lines) and emission (dashed lines) spectra in ethanol for the target BODIPY derivatives.

Table 2. Experimental and computed UV-Vis data and relative fluorescence quantum yields (Φ_f) for the target BODIPY derivatives. Both computed and experimental values were measured/computed in ethanol.

	UV-Vis			TD-DFT			λ_{em} (nm)	Φ_f^a
	λ_{max} (nm) [ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)]			λ_{max} (nm) [f]				
BODIPY-Ref	280 [94309]	381 [35036]	501 [137908]	275 [0.770]	374 [0.792]	425 [0.510]	519	0.0068
BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	280 [127502]	381 [59536]	501 [178213]	275 [0.870]	367 [0.886]	426 [0.505]	520	0.0108
BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	280 [53213]	381 [79293]	501 [69151]	275 [0.829]	367 [0.884]	426 [0.505]	520	0.0120
BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	280 [114067]	381 [71390]	501 [163988]	275 [0.839]	368 [0.876]	426 [0.502]	521	0.0060

^a Obtained by irradiation at $\lambda = 450$ nm, using Rhodamine B as standard with $\Phi_f = 0.5$ in ethanol.^[24]

Cellular Uptake and Intracellular Localization

The fluorescence properties of all the dyads allow us to assess their subcellular distribution in live HeLa cells cultures, at different concentrations, by confocal microscopy at the green ($\lambda_{exc} = 486$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm) and red ($\lambda_{exc} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm) channel setups (Fig. 7, S17 and S18); this is because in confocal microscopy-spectrally resolved studies, the fluorescence spectral bands of many fluorescence localizers can be strongly widespread *in vitro* conditions. In fact, we observed fluorescence signal at higher wavelengths (up to 550 nm), which spatially correlate with the stronger green channel. As shown in Figure 7a-b, **BODIPY-Ref** and **BODIPY-*m*-Ph-CB** showed the best permeability and localization characteristics in this cell line. On the contrary, the *ortho*-derivatives **BODIPY-*o*-Me-CB** and **BODIPY-*o*-Ph-CB** poorly translocate the cell membrane probably because their less lipophilic character strongly favoured aggregation in the cell surface. Nonetheless, by using a low-dose stimulation with the *ortho*-derivatives, a better intake was observed (Figure 7c-

d). While **BODIPY-*o*-Me-CB** exhibited a cytosolic distribution with still subtle particle agglomeration (having no membrane affinity), **BODIPY-*o*-Ph-CB** shows a perinuclear membrane localization, although non-specific. Importantly, the *meta*-derivative **BODIPY-*m*-Ph-CB** showed excellent fluorescence distribution features, where the plasma membrane was mostly localized in a wide range of fluorophore concentrations, from 10 to 40 μM , having almost no variation in such subcellular distribution. Bright-field images as well as comparison with commercial plasma membrane localizer using CellMask® is shown in the Supporting Information (Fig. S19). It is worth mentioning that **BODIPY-Ref** also exhibited interesting membrane permeability with a non-specific localization in the perinuclear zone. Further, this fluorophore was able to specifically localize apoptotic vesicles and cellular blebs during cell oxidative stress.^[25] The low-dose stimulus with H_2O_2 was used in order for the blebs to be well-contrasted under the green channel illumination, allowing a bright in-plane bleb visualization with clean green-emission on these membranes.

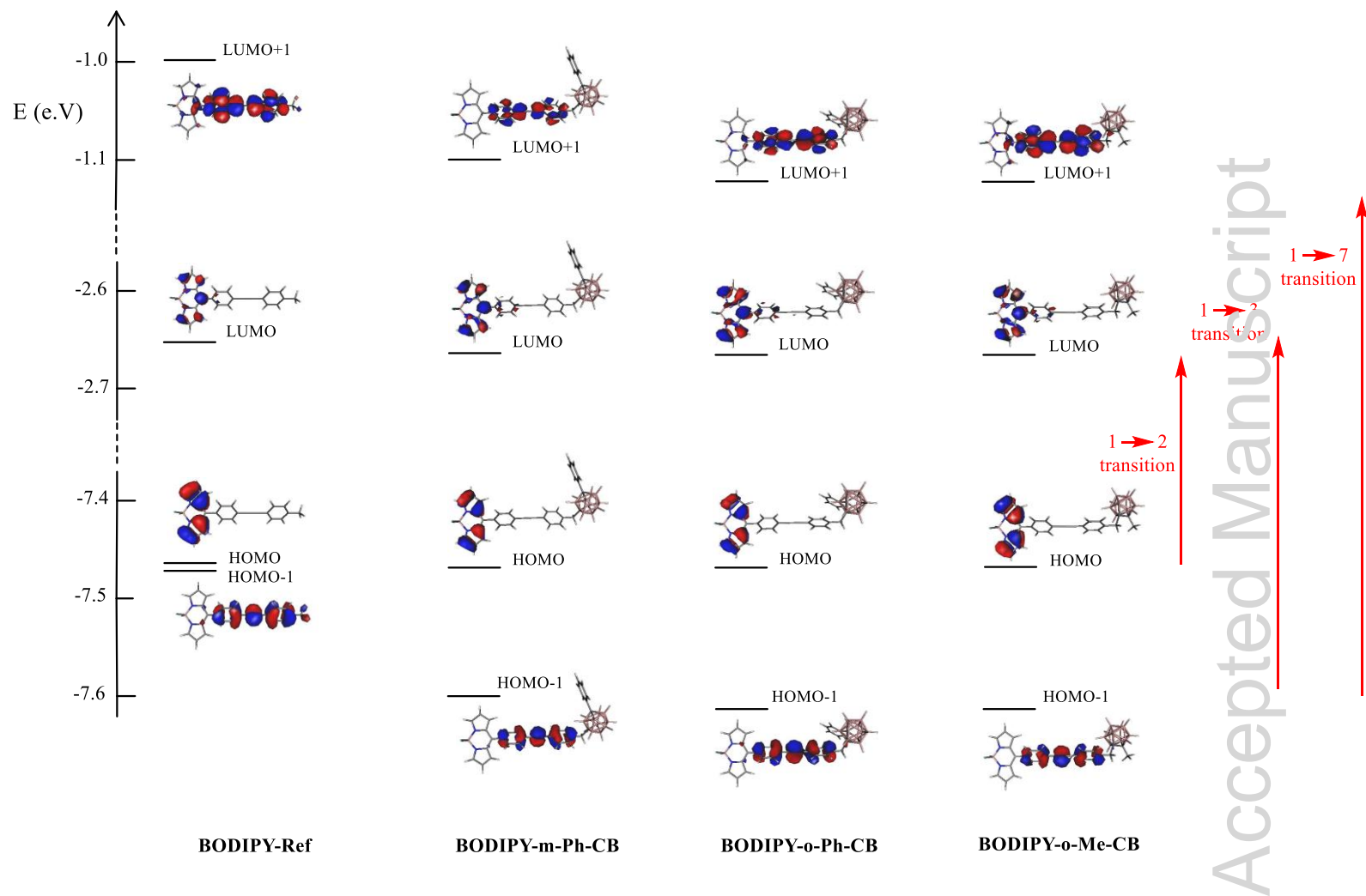


Figure 6. Dominant frontier orbitals involved in the three intense 1 → 2, 1 → 3, and 1 → 7 electronic transitions for **BODIPY-Ref**, **BODIPY-*m*-Ph-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*o*-Me-CB**.

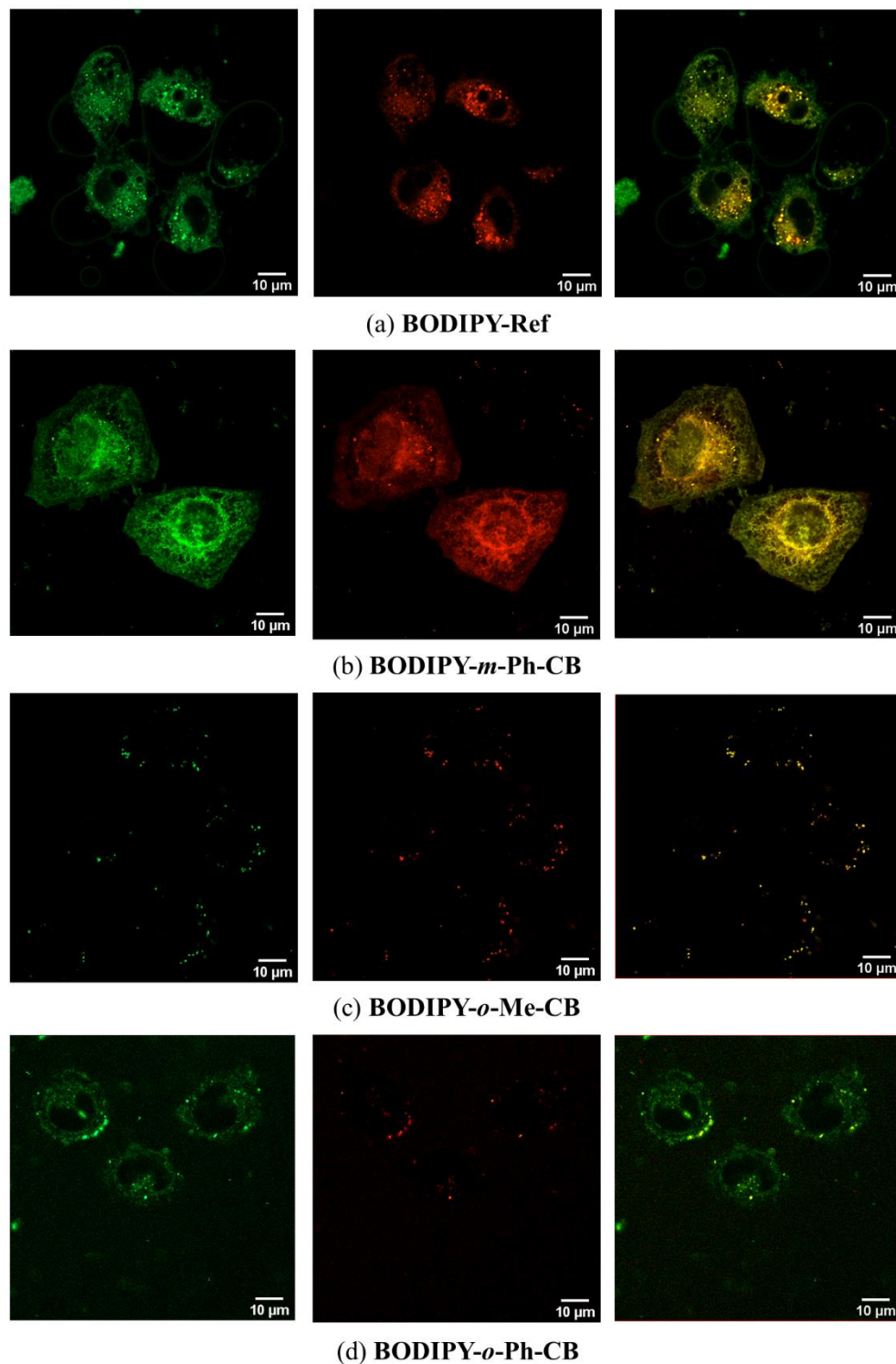


Figure 7. Confocal images of 10 μ M fluorophores in live HeLa cells after 30 min incubation. Panels from left to right show the confocal green channel ($\lambda_{\text{exc}} = 486$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 500$ nm), red channel ($\lambda_{\text{exc}} = 535$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 610$ nm) and merged channels, respectively.

At this point, we were motivated to investigate the origin of the divergent cell uptake efficiency and subcellular localization of these molecules, with the most striking differences arising from **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*m*-Ph-CB**. The molecular structure of these two compounds differ exclusively on the position of the endocyclic C_c atoms, however they displayed completely different self-assemblies and fluorophore-cells interactions. Having in mind that the theoretical computations discussed earlier (*vide supra*) suggested a higher affinity of **BODIPY-*m*-Ph-CB** for non-polar molecules as *n*-hexane than its homologous *ortho*-isomer, we wondered if a difference in lipophilicity would provide an explanation for the divergent confocal microscopy results. Thus, as the lipophilic partition of some organic fluorophores is determined by their partition coefficients ($\log P$),^[26] we measured $\log P$ for these fluorophores (Table 3, Figure S20). Those molecules showing the best cell internalization also possessed the higher $\log P$ values, which correlate with a higher lipophilicity of **BODIPY-Ref**, **BODIPY-*m*-Ph-CB** and consequently a better interaction with the cell membranes. To gain further insight on these observations, we determined the van der Waals volume of these molecules and computed by DFT their static molecular dipoles. These two parameters could help us to rationalize the differences in $\log P$ and consequently in the internalization of the fluorophores into the cells. Both the molecular volume and the polarity of a molecule have long been recognized as critical factors determining its permeability.^[27] Although a correlation between $\log P$ and the size/volume of the molecules is absent, a negative proportional relationship of $\log P$ and the dipole moment appears to be present, correlating low polarities with higher $\log P$ values. Although this correlation provides a satisfactory explanation for the marked differences observed in the cell intake of fluorophores, further studies would be needed to correlate a larger interval of $\log P$ values and dipolar moments with the cell intake of carboranyl derivatives. In this

manner, the straightforward DFT computation of static dipole moments could eventually guide the design of fluorescent carboranyl derivatives with potential theragnostic applications.

Table 3. Partition coefficients ($\log P$), dipolar moments (μ) and van der Waals volumes (V_{vdw}).

	$\log P^a$	μ (D) ^b	V_{vdw} (Å ³ /molecule) ^c
BODIPY-Ref	0.324	8.29	950.97
BODIPY-<i>o</i>-Me-CB	-0.166	10.07	1491.71
BODIPY-<i>o</i>-Ph-CB	-0.211	8.22	1595.85
BODIPY-<i>m</i>-Ph-CB	0.677	4.86	1589.56

^a $\log P$ values were calculated using a octanol:water partitioning protocol.^[28] ^b Computed at the M06-2X/6-31G(d,p) level of theory. ^c Computed from the crystal structures using CSD-Materials.^[29]

As a final remark, we would like to stress the significance of these results, as they provide an explanation for the specific and recurrent observation that diverse fluorophores bearing *meta*-carboranyl derivatives show better cell incomes than those of their *ortho*-counterparts.^[19g] Furthermore, the high lipophilicity of *meta*-isomers correlates well with their subcellular distributions, as these species generally localize in lipophilic membranous organelles. The understanding of the reasons behind this specific behaviour paves the way for designing new and better fluorescent carboranes for *in vitro* cell imaging.

3. CONCLUSIONS

The cell uptake efficiency and subcellular localization of a set of boron-dipyrromethene difluoride (BODIPY) dyes decorated with C_c-substituted carboranyl derivatives were investigated by confocal microscopy on living HeLa cells. They exhibited markedly

divergent behaviours depending on the cluster isomer linked to the BODIPY core, whereas not great alterations with the substituents at C_c was observed. A rationale for these differences was provided from a detailed structural and physicochemical characterization of these clusters, supported by a combination of experimental measurements and theoretical DFT computations. Altogether, our results show that the differences in cell income and subcellular distribution of the fluorophores originate from an important variation in their static dipole moments and partition coefficients, which modulates the ability of these molecules to interact with the lipophilic microenvironments in cells. It can be highlighted that these properties are indeed related to the type of cluster isomer linked to the BODIPY, being the *m*-carborane derivatives better internalized than their *ortho*- analogues. This evidence provides a molecular design strategy for improving the prospective applications of BODIPY-carboranyl dyads as potential fluorescence imaging agents and boron carriers for BNCT.

4. EXPERIMENTAL

General Experimental Considerations

Materials. All starting materials were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. Solvents were purified by distillation over appropriate drying agents. Starting materials, **BODIPY 1**, *o*-Me-CB, *o*-Ph-CB and *m*-Ph-CB were obtained following modified literature procedures;^[5, 30] spectroscopic data is in good agreement.

Instrumentation. NMR spectra were recorded on Jeol ECA 500, Varian MR-400 and Bruker ARX 300 spectrometers using deuterated solvents; chemical shifts for ¹H and ¹³C NMR data are relative to the residual nondeuterated solvent signal, fixed at $\delta = 7.26$ ppm for ¹H-NMR

and $\delta = 77.00$ ppm for ^{13}C -NMR. Infrared spectra were registered on a FT-IR Varian ATR spectrometer. HRMS data was acquired using an Agilent G1969A MS TOF spectrometer.

Synthesis of the Target BODIPY Derivatives.

General Sonogashira Cross-Coupling procedure. To a round-bottom flask filled with **BODIPY 1** (1 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.05 mmol), CuI (0.1 mmol) and a carboranyl benzyl iodide (*o*-Me-CB, *o*-Ph-CB, *m*-Ph-CB) or 4-iodotoluene (1 mmol) as coupling partner, were added THF (30 mL) and triethylamine (30 mL). The mixture was magnetically stirred overnight at room temperature, heated to reflux for 2 hours and evaporated under reduced pressure, the resulting residue was dissolved in methylene chloride (100 mL), washed with saturated ammonium chloride (3x40 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and purified through a chromatographic column packed with silica gel and eluted with hexane/acetone mixtures.

BODIPY-*o*-Me-CB. Red solid. Yield: 56 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.96 (s, 2H, H-1), 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-8), 7.61 – 7.48 (m, 4H, H-7, H-13), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, H-3), 6.57 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H, H-2), 3.49 (s, 2H, H-16), 2.18 (s, 3H, H-19), 2.64 - 1.89 (m, 10H, B-H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 146.34 (C-5), 144.35 (C-1), 135.59 (C-15), 134.69 (C-4), 133.60 (C-9), 131.91 (C-13), 131.59 (C-8), 131.39 (C-3), 130.57 (C-7), 130.47 (C-14), 125.90 (C-6), 122.56 (C-12), 118.74 (C-2), 91.48 (C-11), 89.15 (C-10), 77.20 (C-18), 74.79 (C-17), 41.04 (C-16), 23.71 (C-19). $^{11}\text{B-NMR}$ (CDCl_3 , 128 MHz) δ -0.69 (t, $J = 28.8$ Hz, 1B, BF_2), -5.61 (d, $J = 270.5$ Hz, 4B, BH), -9.13 – -12.58 (m, 6B, BH). $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3 , 376 MHz) δ -144.89 (q, $J = 28.7$ Hz). **HRMS** (ESI-

TOF⁺) m/z : [M⁺-F]⁺ Observed: 521.3356. Anal. calcd. for C₂₇H₂₉B₁₁N₂F: 521.3338. Error: 3.45 ppm.

BODIPY-*o*-Ph-CB. Red solid. Yield: 81 %. **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.96 (s, 2H, H-1), 7.75 – 7.70 (m, 2H, H-20), 7.68 – 7.65 (m, 2H, H-8), 7.57 (dt, J = 8.2, 1.5 Hz, 2H, H-7), 7.55 – 7.52 (m, 1H, H-22), 7.50 – 7.47 (m, 2H, H-21), 7.44 (dt, J = 8.5, 2.0 Hz, 2H, H-13), 6.95 (d, J = 4.2 Hz, 2H, H-3), 6.85 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-14), 6.58 – 6.55 (m, 2H, H-2), 3.12 (s, 2H, H-16), 2.96 – 1.95 (m, 10H, BH). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ 146.35 (C-5), 144.34 (C-1), 135.84 (C-15), 134.71 (C-4), 133.56 (C-9), 131.67 (C-13), 131.56 (C-8), 131.48 (C-20), 131.37 (C-3), 130.95 (C-22), 130.70 (C-19), 130.55 (C-7), 130.19 (C-14), 129.11 (C-21), 125.95 (C-6), 122.30 (C-12), 118.70 (C-2), 91.59 (C-11), 89.01 (C-10), 83.70 (C-18), 81.45 (C-17), 40.78 (C-16). **¹¹B-NMR** (CDCl₃, 128 MHz) δ -0.69 (t, J = 28.8 Hz, 1B, BF₂), -4.29 (br s, 2B, BH), -8.99 – -15.94 (m, 8B, BH). **¹⁹F-NMR** (CDCl₃, 376 MHz) δ -144.90 (q, J = 28.9 Hz). **HRMS** (ESI-TOF⁺) m/z : [M⁺-F]⁺ Observed: 583.3519. Anal. calcd. for C₃₂H₃₁B₁₁N₂F: 583.3495. Error: 4.11 ppm.

BODIPY-*m*-Ph-CB. Orange solid. Yield: 61 %. **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.96 (s, 2H, H-1), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-8), 7.55 (dd, J = 15.4, 8.3 Hz, 4H, H-7, H-13), 7.36 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 2H, H-20), 7.29 – 7.23 (m, 3H, H-21, H-22), 7.16 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, J = 4.1 Hz, 2H, H-3), 6.59 – 6.55 (m, 2H, H-2), 3.30 (s, 2H, H-16), 2.68 – 1.74 (m, 10H, B-H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ 146.40 (C-5), 144.34 (C-1), 137.59 (C-15), 135.14 (C-19), 134.73 (C-4), 133.53 (C-9), 131.85 (C-13), 131.56 (C-8), 131.38 (C-3), 130.56 (C-7), 130.06 (C-14), 128.64 (C-22), 128.31 (C-21), 127.76 (C-20), 126.05 (C-6), 122.01 (C-12), 118.72 (C-2), 91.79 (C-11), 88.86 (C-10), 77.20 (C-18), 75.63 (C-17), 43.01 (C-16). **¹¹B-NMR** (CDCl₃, 128 MHz) δ -0.69 (t, J = 28.8 Hz, 1B, BF₂), -6.22 – -15.41 (m, 10B, BH).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 376 MHz) δ -144.90 (q, J = 28.8 Hz). **HRMS** (ESI-TOF⁺) m/z : [M⁺-F]⁺ Observed: 583.3502. Anal. calcd. for C₃₂H₃₁B₁₁N₂F: 583.3495. Error: 1.19 ppm.

BODIPY-Ref. Red solid. Yield: 45 %. **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.95 (br s, 2H, H-1), 7.67 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-7), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-8), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-13), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-14), 6.95 (d, J = 4.0 Hz, 2H, H-3), 6.58 – 6.55 (m, 2H, H-2), 2.39 (s, 3H, H-16). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ 146.51 (C-5), 144.24 (C-1), 139.10 (C-15), 134.70 (C-4), 133.21 (C-9), 131.63 (C-13), 131.47 (C-8), 131.39 (C-3), 130.53 (C-7), 129.24 (C-14), 126.42 (C-6), 119.54 (C-12), 118.67 (C-2), 92.56 (C-11), 87.73 (C-10), 21.55 (C-16). **¹⁹F-NMR** (CDCl₃, 376 MHz) δ -144.86 (q, J = 28.8 Hz). **¹¹B-NMR** (CDCl₃, 128 MHz) δ -0.68 (t, J = 28.8 Hz). **HRMS** (ESI-TOF⁺) m/z : [M⁺+H]⁺ Observed: 383.1544. Anal. calcd. for C₂₄H₁₈BF₂N₂: 383.1531. Error: 3.39 ppm.

Single X-Ray Diffraction studies. The intensity data were collected on Oxford Diffraction Gemini "A" (*m-Ph-CB*) and Bruker D8 Venture CMOS (**BODIPY-Ref**, **BODIPY-*o*-Me-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB**, **BODIPY-*m*-Ph-CB**) diffractometers equipped with CCD area detectors ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073 \text{ \AA}$, monochromator: graphite) at 130 K and room temperature, respectively. The crystals were mounted on conventional MicroLoops.TM All heavier atoms were found by Fourier map difference and refined anisotropically. All reflection data set were corrected for Lorentz and polarization effects. The first structure solution was obtained using the SHELXS-2018 program and the SHELXL-2018 was applied for refinement and output data.^[31] All software manipulations were performed through the ShelXle program.^[32] Mercury 3.7 and ORTEP-3 were used to prepare artwork representations.^[33]

CCDC 1975442-1975446 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <https://summary.ccdc.cam.ac.uk/structure-summary-form> (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033).

Steady State Spectroscopy. Absorption spectra were acquired in a 10 mm path-length quartz-cell Cary-50 (Varian) spectrophotometer with dual beam, Czerny-Turner monochromator, 190–1100 nm wavelength range, approximately 1.5 nm fixed spectral bandwidth, full spectrum Xe pulse lamp, dual Si diode detectors, quartz overcoated optics, scan rates up to 24000 nm/min, at room temperature (20 ± 1 °C) under aerated conditions. Fluorescence experiments were measured on a FluoroMax spectrofluorometer from HORIBA Scientific with Vertically mounted, CW, 150 W Ozone-free xenon arc lamp. Emission: R928P photon counting PMT (185-850 nm) and reference photodiode for monitoring lamp output at room temperature (20 ± 1 °C) under aerated conditions. All the photophysical measurements were performed on 1 mM solutions of the analytes in ethanol.

Optical Microscopy. The microscopy images were taken using an inverted Zeiss LSM 880 microscope maintaining 5% CO₂ and 37°C during the experiments. HeLa cells were seeded in 8 well μ -slides (iBidi, Germany) at a density of 20000 cells per well one day prior to experiments in MEM alpha with 10% FBS. On treatment day, cells were washed once in MEM alpha with no FBS, and incubated with compounds at different concentrations, from 10 to 40 μ M, for 30 minutes. Cells were then washed twice in MEM alpha with no FBS and imaged. No signs of apoptotic or morphologically altered cells were observed during these experiments.

Computational Methods. **BODIPY-Ref**, **BODIPY-*m*-Ph-CB**, **BODIPY-*o*-Ph-CB** and **BODIPY-*o*-Me-CB** were fully optimized at the M06-2X/6-31G* level, using the Gaussian-09 program package^[34] within the framework of the Density Functional Theory (DFT). The computation were performed assuming the presence of ethanol as the solvent, which was modeled by the Polarizable Continuum Model (SCRF=PCM method).^[35] For the computations devoted to the interaction with hexane (Equation 1), no other solvent effect was taken into account than the presence of one molecule of hexane in the vicinity of the cluster. We selected the M06-2X hybrid functional following the previous report by Jacquemin,^[36] who recommends M06-2X as the most reasonable DFT method for molecules based on the BODIPY units. The optimized coordinates are provided in Supplementary Materials. The UV-vis spectra were computed at the M06-2X/6-311+G** level.^[36]

AUTHOR INFORMATION

* E-mail: rosario@icmab.es

* E-mail: norberto.farfan@gmail.com

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work has been performed within the framework of the French-Mexican International Laboratory (LIA-LCMMC). Authors acknowledge support from PAPIIT (IN222819) and CONACyT. The work was supported by Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO (CTQ2016-75150-R) and Generalitat de Catalunya (2017/SGR/1720). Doctoral

scholarships were granted by CONACyT to P.L.-V (337958) and R. F.-C. (576635). We thank María E. Ochoa (CINVESTAV-IPN), Marco A. Leyva (CINVESTAV-IPN) and Flor R. Vega (FQ-UNAM) for NMR/HRMS experiments, SXRD experiments and technical support, correspondingly.

Keywords

Carborane, BODIPY, imaging, BNCT, theranostic

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information Available: Synthesis of the starting materials, ^1H , ^{13}C NMR and HRMS spectra, atomic coordinates for the four DFT-optimized BODIPY derivative, confocal images and plots of $\log P$.

REFERENCES

- [1] a) R. N. Grimmes, *Carboranes*, Academic Press, Boston, **2016** b) M. Scholz and E. Hey-Hawkins, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7035-7062; c) N. S. Hosmane, *Boron Science: New Technologies and Applications*, Taylor & Francis, Boca Roca, **2012**.
- [2] a) J. Cabrera-González, A. Ferrer-Ugalde, S. Bhattacharyya, M. Chaari, F. Teixidor, J. Gierschner and R. Núñez, *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5*, 10211-10219; b) A. Ferrer-Ugalde, E. J. Juárez-Pérez, F. Teixidor, C. Viñas and R. Núñez, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17021-17030; c) R. Núñez, I. Romero, F. Teixidor and C. Viñas, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5147-5173.
- [3] a) Z. Chen and R. B. King, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3613-3642; b) J. Poater, M. Solà, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4372-4372.
- [4] a) J. Poater, M. Solà, C. Viñas and F. Teixidor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12191-12195; b) P. Stockmann, M. Gozzi, R. Kuhnert, M. B. Sárosi and E. Hey-Hawkins, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3497-3512.

- [5] A. Ferrer-Ugalde, J. Cabrera-González, E. J. Juárez-Pérez, F. Teixidor, E. Pérez-Inestrosa, J. M. Montenegro, R. Sillanpää, M. Haukka and R. Núñez, *Dalton Trans.* **2017**, 46, 2091-2104.
- [6] Y. Zhu and N. S. Hosmane, *J. Organomet. Chem.* **2017**, 849-850, 286-292.
- [7] a) R. Furue, T. Nishimoto, I. S. Park, J. Lee and T. Yasuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 7171-7175; b) K.-R. Wee, Y.-J. Cho, S. Jeong, S. Kwon, J.-D. Lee, I.-H. Suh and S. O. Kang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17982-17990; c) R. Núñez, M. Tarrés, A. Ferrer-Ugalde, F. F. de Biani and F. Teixidor, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 14307-14378.
- [8] a) X.-Q. Li, C.-H. Wang, M.-Y. Zhang, H.-Y. Zou, N.-N. Ma and Y.-Q. Qiu, *J. Organomet. Chem.* **2014**, 749, 327-334; b) J. Wang, W.-Y. Wang, X.-Y. Fang and Y.-Q. Qiu, *J. Mol. Model.* **2015**, 21, 95.
- [9] a) A. Saha, E. Oleshkevich, C. Vinas and F. Teixidor, *Adv. Mater.* **2017**, 29, 1704238; b) E. A. Qian, A. I. Wixtrom, J. C. Axtell, A. Saebi, D. Jung, P. Rehak, Y. Han, E. H. Mouilly, D. Mosallaei, S. Chow, M. S. Messina, J. Y. Wang, A. T. Royappa, A. L. Rheingold, H. D. Maynard, P. Král and A. M. Spokoyny, *Nat. Chem.* **2017**, 9, 333-340; c) L. Gan, A. Chidambaram, P. G. Fonquernie, M. E. Light, D. Choquesillo-Lazarte, H. Huang, E. Solano, J. Fraile, C. Viñas, F. Teixidor, J. A. R. Navarro, K. C. Stylianou and J. G. Planas, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 8299-8311; d) F. Tan, A. López-Periago, M. E. Light, J. Cirera, E. Ruiz, A. Borrás, F. Teixidor, C. Viñas, C. Domingo and J. G. Planas, *Adv. Mater.* **2018**, 30, 1800726.
- [10] a) *Boron-Based Compounds*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, **2018** b) J. F. Valliant, K. J. Guenther, A. S. King, P. Morel, P. Schaffer, O. O. Sogbein and K. A. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 173-230; c) I. B. Sivaev and V. V. Bregadze, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2009, 1433-1450; d) C. Gianpiero, D. Anis, R. Aikaterini, T. Eirini, V. S. Ioannis, F. G. Dimitrios and T. John, *MedChemComm* **2017**, 8, 67-72; e) H. S. Ban and H. Nakamura, *Chem. Rec.* **2015**, 15, 616-635; f) M. A. Soriano-Ursúa, B. C. Das and J. G. Trujillo-Ferrara, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, 24, 485-500.
- [11] F. Issa, M. Kassiou and L. M. Rendina, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 5701-5722.
- [12] a) C. Viñas, R. Núñez, I. Bennour and F. Teixidor, *Curr. Med. Chem.* **2019**, 26, 5036-5076; b) C. Viñas, *Future Med. Chem.* **2013**, 5, 617-619; c) Z. J. Leśnikowski, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 7738-7758; d) C. Viñas, *Future Med. Chem.* **2013**, 5, 617-619.

- [13] a) R. F. Barth, P. Mi and W. Yang, *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 35; b) S.-I. Miyatake, S. Kawabata, K. Yokoyama, T. Kuroiwa, H. Michiue, Y. Sakurai, H. Kumada, M. Suzuki, A. Maruhashi, M. Kirihata and K. Ono, *J. Neuro-Oncol.* **2009**, *91*, 199-206; c) J. Hiratsuka, N. Kamitani, R. Tanaka, E. Yoden, R. Tokiya, M. Suzuki, R. F. Barth and K. Ono, *Cancer Commun.* **2018**, *38*, 38; d) K. Hu, Z. Yang, L. Zhang, L. Xie, L. Wang, H. Xu, L. Josephson, S. H. Liang and M.-R. Zhang, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *405*, 213139; e) H. Nakamura and M. Kirihata in *Neutron Capture Therapy*, (Eds.: W. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, Y. Nakagawa), Springer, **2012**, pp. 99-116; f) M. Sibrian-Vazquez and M. G. H. Vicente in *Boron Tumor-Delivery for BNCT: Recent Developments and Perspectives*, (Ed. N. S. Hosmane), Taylor & Francis, Boca Roca, **2012**, pp. 209-242.
- [14] a) F. Lerouge, C. Viñas, F. Teixidor, R. Núñez, A. Abreu, E. Xochitiotzi, R. Santillan and N. Farfán, *Dalton Trans.* **2007**, 1898-1903; b) F. Lerouge, A. Ferrer-Ugalde, C. Viñas, F. Teixidor, R. Sillanpää, A. Abreu, E. Xochitiotzi, N. Farfán, R. Santillan and R. Núñez, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7541-7550; c) J. Cabrera-González, C. Viñas, M. Haukka, S. Bhattacharyya, J. Gierschner and R. Núñez, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 13588-13598; d) J. Cabrera-González, E. Xochitiotzi-Flores, C. Viñas, F. Teixidor, H. García-Ortega, N. Farfán, R. Santillan, T. Parella and R. Núñez, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 5021-5031; e) A. Ferrer-Ugalde, A. González-Campo, C. Viñas, J. Rodríguez-Romero, R. Santillan, N. Farfán, R. Sillanpää, A. Sousa-Pedrares, R. Núñez and F. Teixidor, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9940-9951; f) M. Chaari, J. Cabrera-González, Z. Kelemen, C. Viñas, A. Ferrer-Ugalde, D. Choquesillo-Lazarte, A. Ben Salah, F. Teixidor and R. Núñez, *J. Organomet. Chem.* **2018**, *865*, 206-213.
- [15] a) J. L. Fauchère, K. Q. Do, P. Y. C. Jow and C. Hansch, *Experientia* **1980**, *36*, 1203-1204; b) K. Yamamoto and Y. Endo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2389-2392.
- [16] a) A. Bessette and G. S. Hanan, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3342-3405; b) R. Ziessel, G. Ulrich and A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496-501.
- [17] a) J. Bañuelos, *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 335-348; b) G. Ulrich, R. Ziessel and A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184-1201.
- [18] T. Kowada, H. Maeda and K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953-4972.
- [19] a) S. Xuan, N. Zhao, Z. Zhou, F. R. Fronczek and M. G. H. Vicente, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2109-2117; b) J. H. Gibbs, H. Wang, N. V. S. D. K. Bhupathiraju, F. R. Fronczek, K. M. Smith and M. G. H. Vicente, *J. Organomet. Chem.* **2015**, *798*, 209-213; c) I. Nar, A.

- Atsay, A. Buyruk, H. Pekbelgin Karaoğlu, A. K. Burat and E. Hamuryudan, *New J. Chem.* **2019**, *43*, 4471-4476; d) S.-Y. Kim, Y.-J. Cho, H.-J. Son, D. W. Cho and S. O. Kang, *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 3391-3397; e) E. Berksun, I. Nar, A. Atsay, İ. Özçeşmeci, A. Gelir and E. Hamuryudan, *Inorg. Chem. Front.* **2018**, *5*, 200-207; f) R. Ziessel, G. Ulrich, J. H. Olivier, T. Bura and A. Sutter, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7978-7980; g) C. Bellomo, M. Chaari, J. Cabrera-González, M. Blangetti, C. Lombardi, A. Deagostino, C. Viñas, N. Gaztelumendi, C. Nogués, R. Nuñez and C. Prandi, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 15622-15630.
- [20] M. Chaari, N. Gaztelumendi, J. Cabrera-González, P. Peixoto-Moledo, C. Viñas, E. Xochitiotzi-Flores, N. Farfán, A. Ben Salah, C. Nogués and R. Núñez, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1763-1773.
- [21] a) M. Chaari, Z. Kelemen, D. Choquesillo-Lazarte, N. Gaztelumendi, F. Teixidor, C. Viñas, C. Nogués and R. Núñez, *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 5324-5337; b) M. Tarrés, E. Canetta, E. Paul, J. Forbes, K. Azzouni, C. Viñas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7804.
- [22] a) I. Moriguchi, Y. Kanada and K. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 1799-1806; b) K. N. Reddy and M. A. Locke, *Water Air Soil Pollut.* **1996**, *86*, 389-405.
- [23] A. M. Spokoyny, C. W. Machan, D. J. Clingerman, M. S. Rosen, M. J. Wiester, R. D. Kennedy, C. L. Stern, A. A. Sarjeant and C. A. Mirkin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 590-596.
- [24] T. Karstens and K. Kobs, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871-1872.
- [25] E. Palacios-Serrato, D. Araiza-Olivera and A. Jiménez-Sánchez, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 3888-3895.
- [26] A. Jiménez-Sánchez, E. K. Lei and S. O. Kelley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 8891-8895.
- [27] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [28] L. F. Yousif, K. M. Stewart, K. L. Horton and S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2081-2088.
- [29] C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot and S. C. Ward, *Acta Crystallogr. B* **2016**, *72*, 171-179.
- [30] M. Benstead, G. A. Rosser, A. Beeby, G. H. Mehl and R. W. Boyle, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 992-999.

- [31] G. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112-122.
- [32] C. B. Hubschle, G. M. Sheldrick and B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.* **2011**, *44*, 1281-1284.
- [33] a) C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453-457; b) L. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- [34] Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [35] J. Tomasi, B. Mennucci and R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3094.
- [36] A. Charaf-Eddin, B. Le Guennic and D. Jacquemin, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 49449-49456.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2020, **49**, 3138

Chemical and photochemical behavior of ruthenium nitrosyl complexes with terpyridine ligands in aqueous media†

Pablo Labra-Vázquez,^{a,b} Mathilde Bocé,^a Marine Tassé,^a Sonia Mallet-Ladeira,^a Pascal G. Lacroix,^{a*} Norberto Farfán^{b*} and Isabelle Malfant^{b*}

The synthesis and behavior in water of a set of various *cis*(Cl,Cl)-[R-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) and *trans*(Cl,Cl)-[R-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) (R = fluorenyl, phenyl, thiophenyl; tpy = 2,2':6',2''-terpyridine) complexes are presented. In any case, one chlorido ligand is substituted by a hydroxo ligand and the final species arises as a single *trans*(NO,OH) isomer, whatever the nature of the starting *cis/trans*(Cl,Cl) complexes. Six X-ray crystal structures are presented for *cis*(Cl,Cl)-[thiophenyl-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) (*cis*-**3a**), *trans*(Cl,Cl)-[thiophenyl-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) (*trans*-**3a**), *trans*(NO,OH)-[phenyl-tpyRu(Cl)(OH)(NO)](PF₆) (**4a**), *trans*(NO,OH)-[thiophenyl-tpyRu(Cl)(OH)(NO)](PF₆) (**4b**), *trans*(NO,OH)-[phenyl-tpyRu(Cl)(OEt)(NO)](PF₆) (**5a**), and *trans*(NO,OH)-[phenyl-tpyRu(Cl)(OEt)(NO)](PF₆) (**5b**) compounds. The different *cis/trans*(Cl,Cl) complexes exhibit an intense low-lying transition in the $\lambda = 330\text{--}390$ nm range, which appears to be slightly blue-shifted after Cl \rightarrow OH substitution. In water, both *cis/trans*(Cl,Cl) isomers are converted to a single *trans*(NO,OH) isomer in which one chlorido- is replaced by one hydroxo-ligand, which avoids tedious separation workout. The water stable *trans*(NO,OH)-species all release NO with quantum yields of 0.010 to 0.075 under irradiation at 365 nm. The properties are discussed with computational analysis performed within the framework of Density Functional Theory.

Received 20th December 2019,

Accepted 11th February 2020

DOI: 10.1039/c9dt04832d

rsc.li/dalton

Introduction

Ruthenium nitrosyl (Ru–NO) complexes are a class of intriguing photo-reactive species, with either metal nitrosyl to metal isonitrosyl ([metal–NO] \leftrightarrow [metal–ON]) switching properties¹ or nitric oxide (NO[•]) releasing capabilities.^{2,3} As for their switching properties, a nearly 100% solid state isomerization was observed in [RuCl(NO)py₄](PF₆)₂·1/2H₂O (py = pyridine),⁴ with great potential applications in data storage, holography and real-time optical technologies.^{5–8} As NO[•] donors, they have been attracting growing research activity in relation to the recognition of the numerous biological functions of NO[•] (e.g. blood pressure regulation, stimulation of immune response, neurotransmission and cytotoxic activity in tumor cells).^{9,10} Due to the increasing number of papers dedicated to

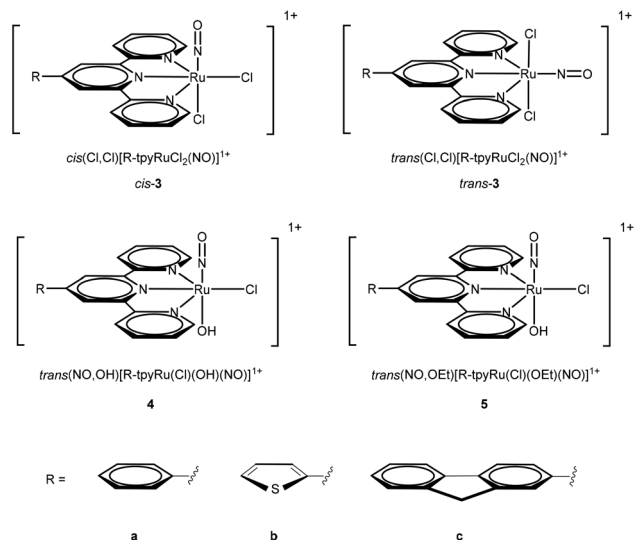
the NO[•] delivery in the current literature,¹¹ and although our initial interest in ruthenium–nitrosyl complexes was centered on the concept of “molecular switch”, we were gradually encouraged to consider these materials as NO[•] donors as well. Indeed, intense research activity is dedicated to NO[•] donors capable of releasing NO[•] locally and quantitatively.^{12,13} Among them, Ru–NO complexes appear to be especially promising in relation to their usually low toxicity, good chemical stability and capability to release NO[•] under irradiation, exclusively,^{2,14,15} taking advantage of the noninvasive character and precise control of light.

Our first investigations of NO[•] release were undertaken on different sets of *cis*(Cl,Cl)[R-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) and *trans*(Cl,Cl)[R-tpyRuCl₂(NO)](PF₆) compounds in which R-tpy stands for 4'R-2,2':6',2''-terpyridine (Scheme 1). In these species, various R substituents were introduced, such as a fluorenyl (c in Scheme 1),¹⁶ or a set of donor/acceptor-substituted phenyls¹⁷ were used to modulate the “push-pull” charge transfer character towards the highly withdrawing Ru–NO unit, in an attempt to optimize the two-photon absorption (TPA) response of the species. Indeed, the use of the TPA technique has become a powerful tool in life sciences by virtue of its low damage effects, high spatial selectivity and

^aLaboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France. E-mail: pascal.lacroix@lcc-toulouse.fr

^bFacultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1968710–1968715. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/C9DT04832D



Scheme 1 Ruthenium nitrosyl complexes under investigation.

deep penetration into biological tissues.^{18,19} Therefore, the TPA response of these compounds is an important parameter to determine. Due to a lack of fluorescence, the properties were evaluated by the Z-scan technique,²⁰ in which the standard conditions require the use of organic solvents, as organics provide a largely dominant class of optical molecular materials. Indeed, recording TPA data in water by Z-scan is not well documented and not fully relevant for our complexes with TPA cross-sections in the 100–200 GM range,²¹ due to their modest solubility and to the significant contribution of the solvent to the TPA signal.^{22–25} Therefore, and for homogeneity reasons, we have conducted the entire physicochemical investigations in acetonitrile, which was found to be a better solvent. However, at a more fundamental level, development of optical materials as biological materials requires the investigation of the chemical and physical properties of the active species in aqueous media. Along these lines, we have recently observed that low concentrations of “terpyridine Ru–NO” complexes (10^{-6} mol L⁻¹) could make bacteria (*Staphylococcus epidermidis*) 100 times more sensitive to methicillin.²⁶ In addition, we have observed that the nature of the active complex in aqueous solution was not $[\text{R-tpyRuCl}_2(\text{NO})]^+$ but $[\text{R-tpyRuCl}(\text{OH})(\text{NO})]^+$, in which a chlorido ligand has surprisingly been replaced by a hydroxo ligand.

In the present contribution, and following this first observation, we wish to report the complete chemical behavior of $[\text{R-tpyRuCl}_2(\text{NO})]^+$ complexes in water and their photorelease capabilities compared with those previously observed in organic media. The selected complexes for this investigation are shown in Scheme 1. The synthesis of the compounds is reported first, with their characterization and crystal structures. A computational analysis is reported to provide theoretical support to the experimental data, within the framework of density functional theory (DFT).

Results and discussion

Synthesis and characterization

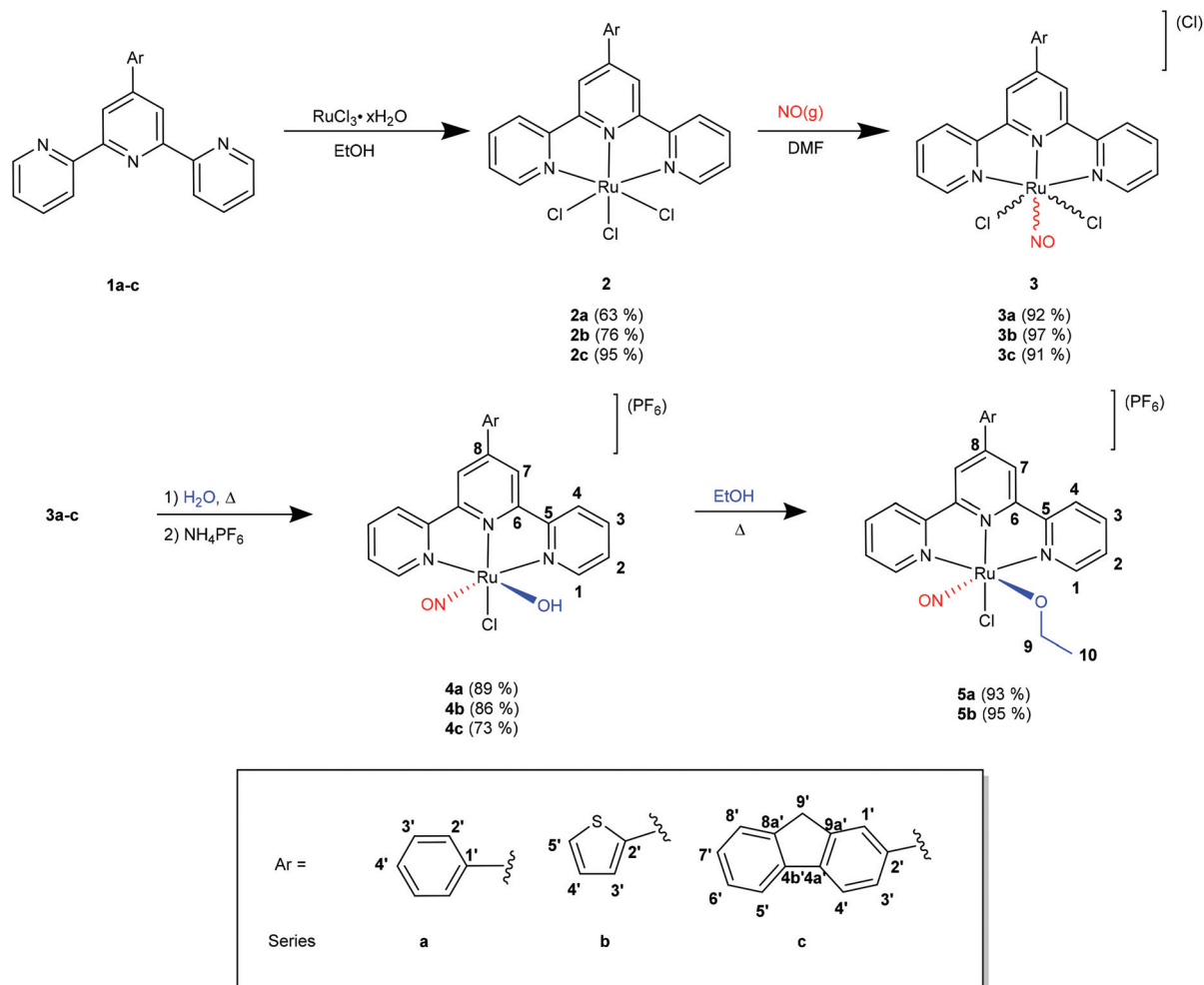
The synthesis of the target complexes was carried out in 3 steps from the 4'-substituted terpyridyl ligands **1a–c** (Scheme 2), which were accessed through the Kröhnke pyridine synthesis.^{27,28} The first step involved the introduction of the Ru^{III} metal center by treatment of ethanolic solutions of the ligands with RuCl₃·xH₂O, yielding complexes **2a–c**. This reaction proceeded with moderate yields due to the concomitant formation of the homoleptic species $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{R-tpy})_2]^{2+}$, which was identified as an important by-product in this reaction.

After purification, warm solutions of **2a–c** in DMF were bubbled with nitric oxide for 3–5 hours yielding ruthenium nitrosyls **3a–c** in high yields by ligand exchange of one chlorido ligand for NO⁺. By these means we obtained crude materials composed mainly of the *cis*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(**1a–c**)Cl₂(NO)](Cl) (*cis*-**3a–c**) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(**1a–c**)Cl₂(NO)](Cl) (*cis*-**3a–c**) isomers, as evidenced by ¹H-NMR analysis of these mixtures (see ESI, Fig. S1–S3[†]). Although our primary objective lies in studying water-stable complexes **4a–c**, we were able to isolate analytical samples of previously unknown *cis*-**3b** and *trans*-**3b** as their PF₆ salts after HPLC purification followed by methathesis with NH₄PF₆.

Finally, the target *trans*(NO,OH)-[Ru^{II}(**1a–c**)(NO)(OH)Cl](PF₆) complexes (**4a–c**) were obtained from crude samples of **3a–c**, which led to these compounds after refluxing in water overnight, with a notorious change in the reaction color from orange to yellow. In several attempts, after concentrating the reaction mixtures *in vacuo*, pure samples of these complexes were obtained in high yields after treatment with NH₄PF₆. Nonetheless, in some cases, especially for **4b**, further chromatographic workup was necessary.

Moreover, we found that the hydroxo ligand in the *trans*(NO,OH) complexes **4a–c** could be readily replaced by an ethanolate during a short thermal treatment with ethanol. This solventolysis produced the *trans*(NO,OEt) complexes **5a–b** in excellent yields. By following the UV-vis photokinetics of these complexes in water, we found that the ligand exchange process is not reversible at room temperature, and thus we were further interested in investigating if these complexes possessed NO[•] releasing capabilities when irradiated in water. It was interesting to find that while the OH → OEt replacement takes place easily in crude samples of compounds **4a–c**, no product is observed when attempting the ligand exchange reaction to convert directly **3a** to **5a**, even after long reaction times. This observation is in disagreement with the fact that chloride is usually regarded as a better leaving group than hydroxide.

Unambiguous assignment of the ¹H and ¹³C spectra was performed aided by ¹H, ¹³C monodimensional NMR techniques as well as by 2D heteronuclear HMQC/HMBC (¹H–¹³C) and homonuclear (¹H–¹H) COSY/NOESY experiments. In every case, two spin systems were readily identified in the COSY experiments, one belonging to the 2,2':6',2''-terpyridyl core whose protons appear as very deshielded multiplets due to



Scheme 2 Synthesis and numbering for complexes **4a–c** and **5a–b**.

long-range through-bond spin-state transmission within the aromatic system including hydrogens H-1 to H-4, and a second spin system usually upfielded, belonging to the substituent attached to the terpyridyl core (phenyl, thien-2-yl, 9H-fluorenyl).

As illustrated in Fig. 1 along the **b** series, the Cl \rightarrow OH \rightarrow OEt ligand exchange can be readily traced by means of $^1\text{H-NMR}$, where most of the signals from the 2,2':6',2''-terpyridyl core are upfielded as the σ -withdrawing chlorido ligand is replaced by $-\text{OH}$ and furthermore by $-\text{OEt}$. Nevertheless, such a trend does not match exactly the Hammett constants for these ligands: Cl ($\sigma_p = 0.227$), OEt ($\sigma_p = -0.24$) and OH ($\sigma_p = -0.37$),²⁹ and even though it explains the upfield shift when going from $-\text{Cl}$ to $-\text{OH}$, it does not explain the upfield shift from $-\text{OH}$ to $-\text{OEt}$. Nonetheless, the overall shielding of the hydrogens within the terpyridyl ligands suggests that the electron density of the Ru–NO submolecular fragment decreases in the order OEt > OH > Cl, and thus the Cl to OR ligand exchange decreases Ru–NO π -backdonation in the opposite order (Cl > OH > OEt), with an associated reduction of the N–O bond order. As discussed below (*vide infra*), these preliminary

observations correlated well with the results obtained by using infrared spectroscopy and X-Ray diffraction experiments.

X-ray diffraction studies

Crystals of *cis*-**3b**, *trans*-**3b**, **4a–b** and **5a–b** suitable for X-ray crystallographic analyses were grown by slow diffusion of diethyl ether into saturated solutions of the analytes in acetonitrile at room temperature. The molecular structures and main crystallographic data for these complexes are presented in Fig. 2, and Table 1, respectively.

With the exception of *trans*-**3b**, for which two crystallographically independent yet geometrically closely-related complexes are found in its asymmetric unit, all the other compounds crystallize with a single complex per asymmetric unit. Also, with the exception of compounds **5a–b**, all crystallize as acetonitrile solvates, with the solvent molecule in close contact with the electron-deficient hydrogen H-1; nevertheless, despite short C(1)–H(1)⋯N(acetonitrile) distances being observed (2.4–2.8 Å), the geometries lie considerably far from linear (with 98–140° D–H⋯A angles), postulating a nonclassical hydrogen bonding interaction.

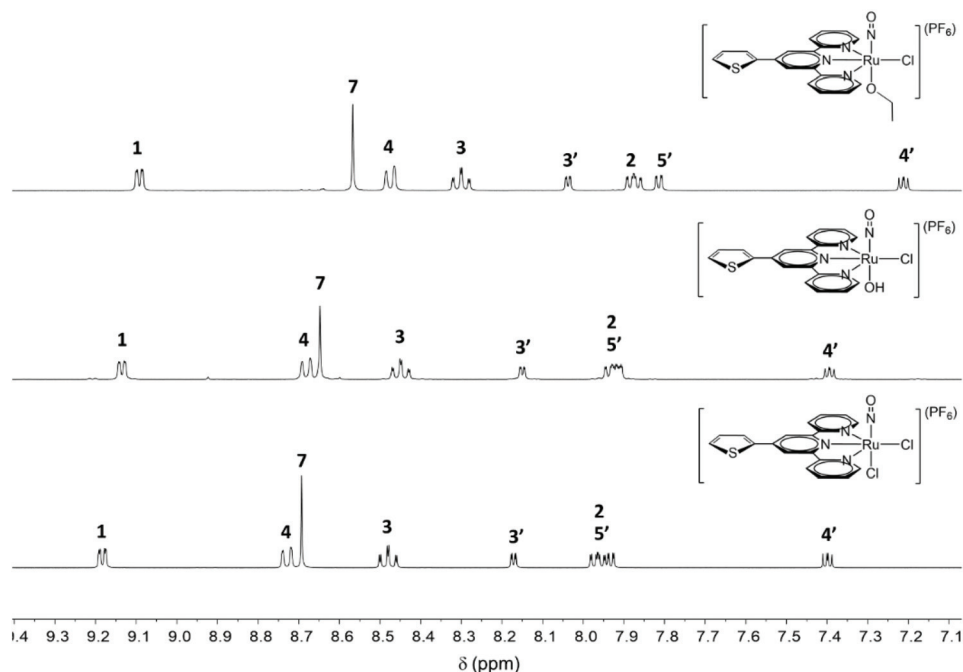


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of selected complexes *cis-3b* (bottom), *4b* (center) and *5b* (top) [400 MHz, CD_3CN]. See Scheme 2 for the numbering.

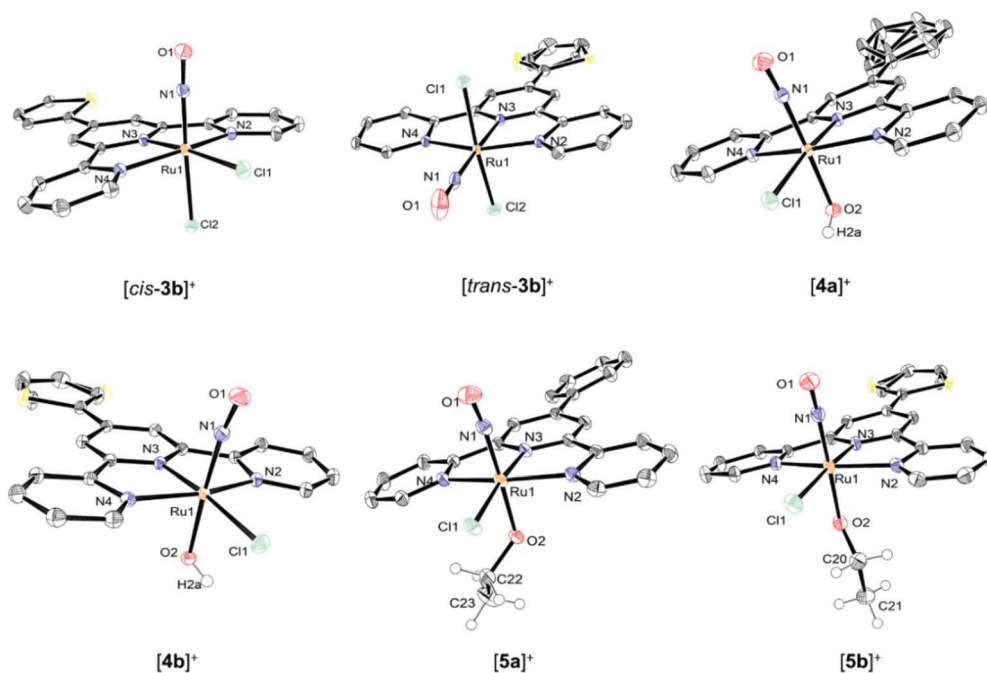


Fig. 2 Molecular structures of complexes *cis-3b*, *trans-3b*, *4a-b* and *5a-b*. Only selected hydrogen atoms are shown for clarity. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability for every atom other than hydrogen.

Selected bond lengths and angles are gathered in Table 2, for the coordination spheres of the 6 reported structures. Similar to other ruthenium nitrosyls with $\{\text{Ru}(\text{NO})\}^6$ Enemark-Feltham notations³⁰ such as $[\text{RuCl}_5\text{NO}]^{2+}$ and $[\text{RuNO}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$, the present complexes possess $\text{Ru}(1)-\text{N}(1)-\text{O}(1)$ angles close to 180° , however with a tendency for reduced angles in the com-

plexes in which $-\text{Cl}$ is replaced by $-\text{OH}$ and $-\text{OEt}$ (*4a-c*, *5a-b*). This observation suggests that the $\text{Ru}-\text{NO}$ π -backbonding is enhanced in the latter systems. Accordingly, when comparing a series with the same terpyridyl ligand, e.g. *cis-3b*, *4b* and *5b*, the $\text{N}(1)-\text{O}(1)$ bond distance follows $5b > 4b > cis-3b$. Both reduced angles and enhanced bond lengths are consistent

Table 1 Crystal structure and refinement data

	<i>cis-3b</i>	<i>trans-3b</i>	4a	4b	5a	5b
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₄ ORuS PF ₆ , CH ₃ CN	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₄ ORuS PF ₆ , CH ₃ CN, 0.25(H ₂ O)	C ₂₁ H ₁₆ ClN ₄ O ₂ Ru PF ₆ , CH ₃ CN	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₄ O ₂ RuS PF ₆ , CH ₃ CN	C ₂₃ H ₂₀ Cl N ₄ O ₂ Ru PF ₆	C ₂₁ H ₁₈ ClN ₄ O ₂ RuS PF ₆
Temperature (K)	115(2)	113(2)	110(2)	110(2)	100(2)	100(2)
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic	Triclinic	Triclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>C</i> 2/ <i>c</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	16.243(5)	13.3561(5)	22.9917(8)	22.9490(8)	11.012(2)	7.6895(4)
<i>b</i> (Å)	7.354(2)	14.1266(5)	17.2990(6)	16.5682(7)	11.092(2)	10.6774(6)
<i>c</i> (Å)	21.148(8)	14.3152(5)	14.1597(5)	14.2190(6)	11.139(2)	15.5498(9)
α (°)	90	104.9716(16)	90	90	75.537(7)	80.941(2)
β (°)	93.548(10)	96.3207(16)	114.003(2)	112.0015(12)	79.228(7)	85.288(2)
γ (°)	90	97.3251(17)	90	90	70.732(7)	69.984(2)
Volume (Å ³)	2521.3(14)	2558.96(16)	5144.8(3)	5012.7(3)	1235.5(4)	1184.07(12)
<i>Z</i>	4	4	8	8	2	2
Density (g cm ⁻³)	1.853	1.836	1.753	1.815	1.790	1.88
Crystal size (mm)	0.6 × 0.32 × 0.2	0.15 × 0.12 × 0.05	0.2 × 0.2 × 0.2	0.18 × 0.15 × 0.15	0.2 × 0.06 × 0.04	0.13 × 0.10 × 0.06
θ range (°)	2.93–34.97	1.49–28.31	3.78–37.83	1.56–30.53	1.90–29.57	1.33–28.40
Reflns collected/unique	129 329/11 066	61 829/12 669	105 871/13 630	77 701/7610	47 404/6911	68 687/5944
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0305 <i>wR</i> ₂ = 0.0665	<i>R</i> ₁ = 0.0352 <i>wR</i> ₂ = 0.0469	<i>R</i> ₁ = 0.0252 <i>wR</i> ₂ = 0.0627	<i>R</i> ₁ = 0.0214 <i>wR</i> ₂ = 0.0361	<i>R</i> ₁ = 0.0341 <i>wR</i> ₂ = 0.0801	<i>R</i> ₁ = 0.0315 <i>wR</i> ₂ = 0.0429
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0413 <i>wR</i> ₂ = 0.0715	<i>R</i> ₁ = 0.0396 <i>wR</i> ₂ = 0.0622	<i>R</i> ₁ = 0.0310 <i>wR</i> ₂ = 0.0674	<i>R</i> ₁ = 0.0271 <i>wR</i> ₂ = 0.2002	<i>R</i> ₁ = 0.0460 <i>wR</i> ₂ = 0.0863	<i>R</i> ₁ = 0.0369 <i>wR</i> ₂ = 0.0490

Table 2 Selected bond lengths and angles

Selected bonds (Å)	<i>cis-3b</i>	<i>trans-3b</i>		4a	4b	4c^a	5a	5b
		Mol 1	Mol 2					
Ru(1)–N(1)	1.7617(14)	1.777(2)	1.754(2)	1.7632(9)	1.7626(12)	1.761(3)	1.771(2)	1.759(2)
Ru(1)–N(2)	2.0863(14)	2.075(2)	2.069(2)	2.0881(8)	2.0920(11)	2.086(3)	2.097(2)	2.085(2)
Ru(1)–N(3)	1.9869(13)	1.999(2)	2.005(2)	1.9756(8)	1.9766(10)	1.981(3)	1.9824(19)	1.983(2)
Ru(1)–N(4)	2.0930(13)	2.088(2)	2.069(2)	2.0849(8)	2.0891(11)	2.081(3)	2.088(2)	2.085(2)
Ru(1)–Cl(1)	2.3934(7)	2.3312(7)	2.3666(7)	2.3890(2)	2.3889(3)	2.4020(8)	2.4083(7)	2.3949(7)
Ru(1)–Cl(2)	2.3501(7)	2.3718(7)	2.3459(7)	—	—	—	—	—
Ru(1)–O(2)	—	—	—	1.9499(8)	1.9532(9)	1.950(2)	1.9504(18)	1.9424(17)
N(1)–O(1)	1.1380(18)	1.126(3)	1.125(3)	1.1469(12)	1.1494(16)	1.147(4)	1.146(3)	1.154(3)
Selected angles (°)								
N(1)–Ru(1)–N(3)	96.83(5)	175.59(10)	176.71(11)	98.56(4)	98.92(5)	97.43(12)	97.12(9)	97.25(9)
N(3)–Ru(1)–N(4)	79.42(5)	78.26(9)	78.84(9)	79.76(3)	79.83(4)	79.51(11)	79.63(8)	79.71(8)
Cl(1)–Ru(1)–Cl(2)	87.766(17)	174.80(3)	172.35(3)	—	—	—	—	—
Cl(1)–Ru(1)–N(1)	88.55(4)	95.67(8)	91.07(7)	87.67(3)	87.48(4)	88.47(9)	87.19(7)	87.08(7)
N(1)–Ru(1)–O(2)	—	—	—	176.41(3)	176.02(5)	176.27(11)	178.04(8)	177.57(9)
Ru(1)–N(1)–O(1)	174.93(13)	172.9(3)	—	170.57(8)	170.47(11)	173.8(3)	171.97(19)	170.5(2)

^a Data for **4c** are from Ref. 26.

with a decreasing N–O bond order. Furthermore, these observations correlate well with previous discussions on the NMR spectra and with the infrared spectroscopy of these complexes as discussed below.

Some of the most intriguing supramolecular interactions within the crystal packing of this family of complexes are presented here with those observed for the *cis-3b* and *trans-3b* isomers. As exemplified in Fig. 3, the crystal packing of these complexes, which possess electron-rich thiophene rings, showed clear examples of offset π -stacking,^{31,32} formed by the alignment of pairs of complexes in a displaced anti-parallel fashion, putting alternating electron-deficient (central or lateral pyridine) and electron-rich (thiophene) rings close to each other. Given the complementarity of the interaction and the short distances between the pyridine and thiophene ring

centroids (e.g. 3.472 Å for *cis-3b*), this interaction is likely one of the main driving forces for the crystallization process, as the resulting arrangement contributes to reduced electrostatic repulsion along the crystal lattice.

As depicted in Fig. 3b, the scenario is different for the *trans-3b* isomer, which features an unprecedented short distance (2.566 Å) between the oxygens of two neighboring nitrosyls. Given the quasi linearity of the Ru–NO bond, these oxygen atoms are expected to be positively charged, making this close contact rather unlikely to occur. Nonetheless, further analysis of the crystal structure suggests that this arrangement is stabilized by the closeness of two PF₆[−] counterions at the sides of the nitrosyls as well as by a complementary offset π -stacking interaction with an inter-centroid distance of 3.577 Å, in this case involving the thio-

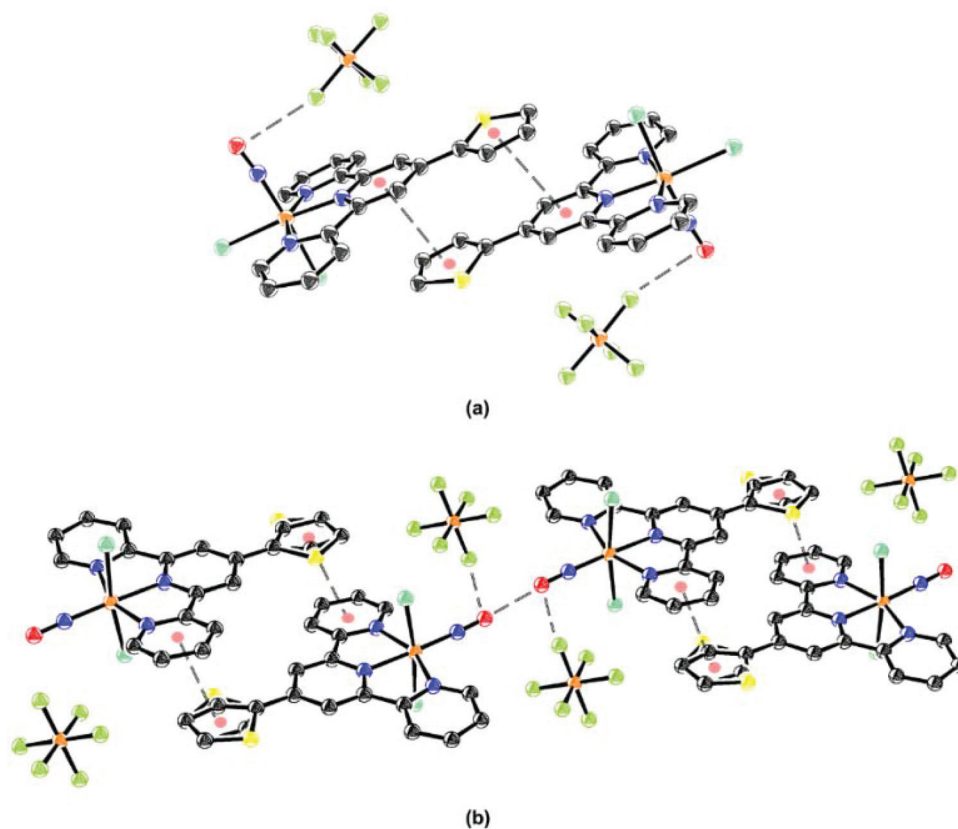


Fig. 3 Supramolecular interactions within the crystal packing of (a) *cis*-**3b** and (b) *trans*-**3b**. Hydrogen atoms and solvent molecules are omitted for clarity.

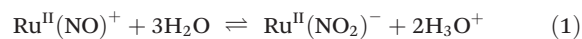
phene ring and one of the lateral rings of a neighboring complex.

Infrared spectroscopy

All of the ruthenium nitrosyl complexes were studied by means of FT-IR (ATR) spectroscopy. Of particular interest to the current work were the energies of the ν NO band, as it holds firsthand information on the electron density present on the nitrosyl ligands and hence on the intramolecular charge transfer within the complexes. The experimental data are presented in Table 3. The values fall in the 1814–1913 cm^{-1} range in any case, in agreement with linear or quasi-linear Ru–NO bonds as those observed in the SXR D experiments (*vide supra*). The most valuable information comes from comparing a series with the same terpyridyl ligand. For example, the energy of the ν NO band decreases in the order: *cis*-**3b** > *trans*-**3b** > **4b**

> **5b** and, accordingly, the degree of π -backdonation to the NO ligand should decrease in the opposite order. Indeed, this process brings electron density into π^* antibonding orbitals, thus reducing the bond order and hence the ν NO frequency. These observations are in full agreement with the previously discussed NMR and structural data (*vide supra*).

The analyses of ν NO frequency provide additional and important information on the stability of ruthenium nitrosyl complexes. Indeed, some of our [tpyRuNO] species were reported to possess a high sensitivity to water, according to the following non-redox reaction:



This deleterious reaction is especially observed when the chlorido ligands are replaced by bipyridine.^{21c} ν NO frequencies higher than 1920 cm^{-1} indicate that the degree of the posi-

Table 3 DFT computed ν NO frequencies (in cm^{-1}) compared with experimental data, for the ruthenium–nitrosyl derivatives

	<i>cis</i> - 3a	<i>trans</i> - 3a	<i>cis</i> - 3b	<i>trans</i> - 3b	4a	4b	5a	5b
Computation	2007	2015	2005	2012	1966	1964	1953	1952
Experimental	1911 ^a 1897 ^a	1907 ^a	1887	1913	1834	1857	1814	1835

^a Data from Ref. 17.

tively charged residue on NO is high, which reflects the tendency of NO to be subjected to nucleophilic attacks, thus leading to the formation of $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}_2)^-$ depicted in eqn (1). By contrast, νNO frequencies equal to or lower than 1900 cm^{-1} indicate a good stability in aqueous media.^{33,34} The latter case is that observed here ($1814\text{ cm}^{-1} \leq \nu\text{NO} \leq 1913\text{ cm}^{-1}$), which indicates that the RuNO units are stable in water.

The chlorido to hydroxo ligand exchange

Examples of ligand exchange reactions in ruthenium nitrosyl complexes with the general formula $[(\text{R-tpy})\text{RuCl}_2(\text{NO})]^+$, where R-tpy is any functionalized 2,2':6',2''-terpyridine ligand, remain very scarce to date. To the best of our knowledge, only two reports on such reactions have been published, one by Nagao,³⁵ and one recent report by our group.²⁶ This may in turn be due to the fact that, despite the synthetic route employed, the synthesis of the starting materials invariably yields complex mixtures containing both the *cis*(Cl,Cl)- and *trans*(Cl,Cl)- $[(\text{R-tpy})\text{RuCl}_2(\text{NO})]^+$ isomers, as well as varying amounts of homoleptic $[\text{Ru}(\text{R-tpy})_2]^{2+}$ species. The purification of these compounds typically requires costly and tedious HPLC procedures,¹⁷ thus precluding most further synthetic derivatizations. Nevertheless, Nagao *et al.* showed that *trans*(Cl,Cl)- $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_2(\text{NO})](\text{PF}_6)$ undergoes ligand exchange reactions either with water or NaNO_2 in methanol to yield *trans*(NO,OH)- $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NO})(\text{OH})](\text{Cl})](\text{PF}_6)$ and *trans*(NO,OCH₃)- $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NO})(\text{OCH}_3)(\text{Cl})](\text{PF}_6)$, respectively, in low to moderate yields. Our synthetic approach was significantly different, as we encountered several problems when trying to perform the ligand exchange in water from complexes containing the PF_6^- counterion as these species were notably less soluble in water when compared to their Cl^- salts. Also, our protocol involved the use of crude starting materials containing only minimum amounts (typically below 3%) of the undesired homoleptic species, thus greatly simplifying the purification of the final products.

The observation of the replacement of one chlorido ligand by a hydroxo ligand in any case is further supported by a theoretical investigation. Indeed, the Gibbs free energies (ΔG°) were computed for the following equations:



The resulting ΔG° values of $-64.8\text{ kcal mol}^{-1}$, $-64.9\text{ kcal mol}^{-1}$, and $-61.0\text{ kcal mol}^{-1}$ for eqn (2), (3), and (4), respectively, indicate a clear tendency for the chlorido to hydroxo substitution. No further investigation was undertaken to clarify the details of the formation of the Ru–OH bond. Nevertheless, and as the pH of the solution is in the 5–7 range, the substitution likely proceeds through a concerted mechanism, thus avoiding the formation of unstable high energy $[\text{Ru}(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO})]$ intermediates.

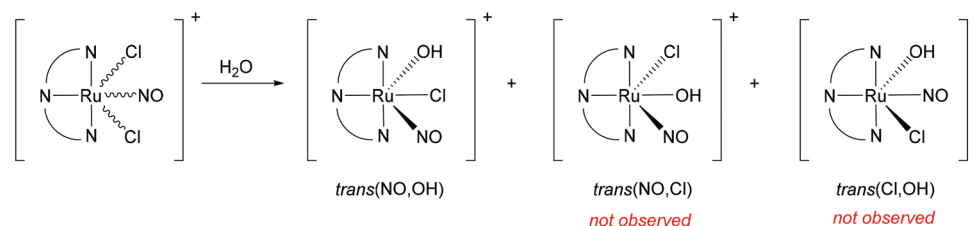
The most striking feature of the chlorido to hydroxo ligand exchange is that, while three different isomers could be expected (Scheme 3), ¹H-NMR analysis of the crude products evidenced the formation of a single final isomer, *trans*(NO, OH)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})](\text{PF}_6)$ (**4a–c**), even though mixtures of both *cis*(Cl,Cl) and *trans*(Cl,Cl)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})\text{Cl}_2(\text{NO})](\text{Cl})$ isomers are used as starting materials.

The Gibbs energies were computed for the three different isomers, to provide theoretical support to this observation. In order to determine if the relative stabilities are influenced by the electronic capabilities of the R-tpy terpyridine fragments, the computations were performed on complexes in which R is either a strongly electron rich dimethylaminophenyl (DMAphen) substituent or a strongly electron withdrawing nitrophenyl (NO₂phen) substituent. The results are gathered in Table 4. Clearly, the data reveal that the relative energies of the isomers do not depend on the donor/acceptor character of the R substituent. The computation extended to the case of fluorenylterpyridine containing complex **4c** confirms that the *trans*(NO,OH) isomer is invariably the most stable species in any case. Along these lines, the (Cl →

Table 4 Relative Gibbs free energies (G°) for the three isomers of $[\text{R-tpyRu}(\text{Cl})(\text{NO})(\text{OH})]^+$ computed in water, with νNO frequencies

R	Isomer	Relative energies ^a (in kcal mol ⁻¹)
Fluorene 4c	<i>trans</i> (Cl,NO)	+9.8
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+5.7
	<i>trans</i> (NO,OH)	0
DMAphen	<i>trans</i> (Cl,NO)	+9.6
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+5.7
	<i>trans</i> (NO,OH)	0
NO ₂ phen	<i>trans</i> (Cl,NO)	+9.3
	<i>trans</i> (Cl,OH)	+5.9
	<i>trans</i> (NO,OH)	0

^a For each (R = fluorene, DMAphen and NO₂phen) containing complexes, the reference energy ($G^\circ = 0$) is that of the most stable isomer.



Scheme 3 Potential outcome for the Cl to OH ligand exchange.

OH) substitution reaction occurring in water could appear to be an elegant means of avoiding the usually tedious workout required for the separation of the starting *trans*(Cl,Cl) and *cis*(Cl,Cl) isomer mixture obtained in the initial synthesis of the [(terpyridine)RuCl₂(NO)]⁺ species.

As exemplified in Fig. 4 with *cis*-3b and *trans*-3b, further evidence for the formation of a single isomer during the chlorido to hydroxo ligand exchange from compounds 3a–c was found by independently following the spectral evolution of pure samples of both *cis*(Cl,Cl) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru(R-tpy)Cl₂(NO)] (PF₆) complexes in water (details of additional experiments can be found in the ESI, Fig. S29†).

A clean conversion to a single isomer can thus be inferred from the presence of the same isosbestic point at $\lambda = 380$ nm for both isomers and by the fact that the end point of both kinetics yielded superimposable spectra.

UV-visible spectroscopy

Mapping of the electronic structure of these complexes was conducted by means of UV-Vis spectroscopy in acetonitrile (Fig. 5). The results can be summarized as follows: (i) all ruthenium nitrosyl complexes feature a strong band ($\epsilon > 20\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) located at around $\lambda = 300$ nm, which accounts for local

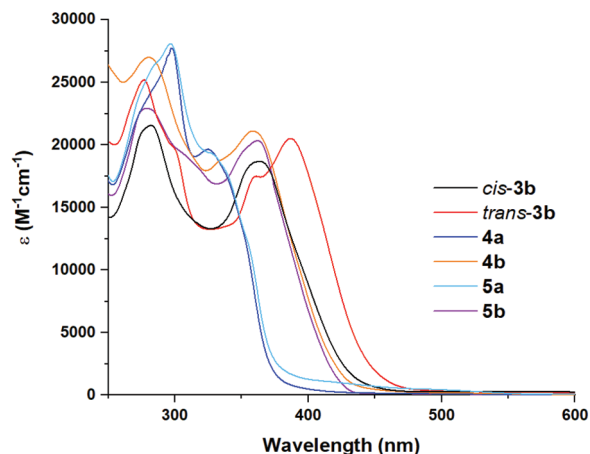


Fig. 5 UV-visible spectra in acetonitrile for compounds *cis*-3b, *trans*-3b, 4a–b and 5a–b.

π - π^* excitations within the 4'-substituted 2,2':6',2''-terpyridyl ligand and (ii) low-lying and less intense transitions are located at around $\lambda = 400$ nm, accounting for strong intramolecular charge transfer towards the nitrosyl substituents.

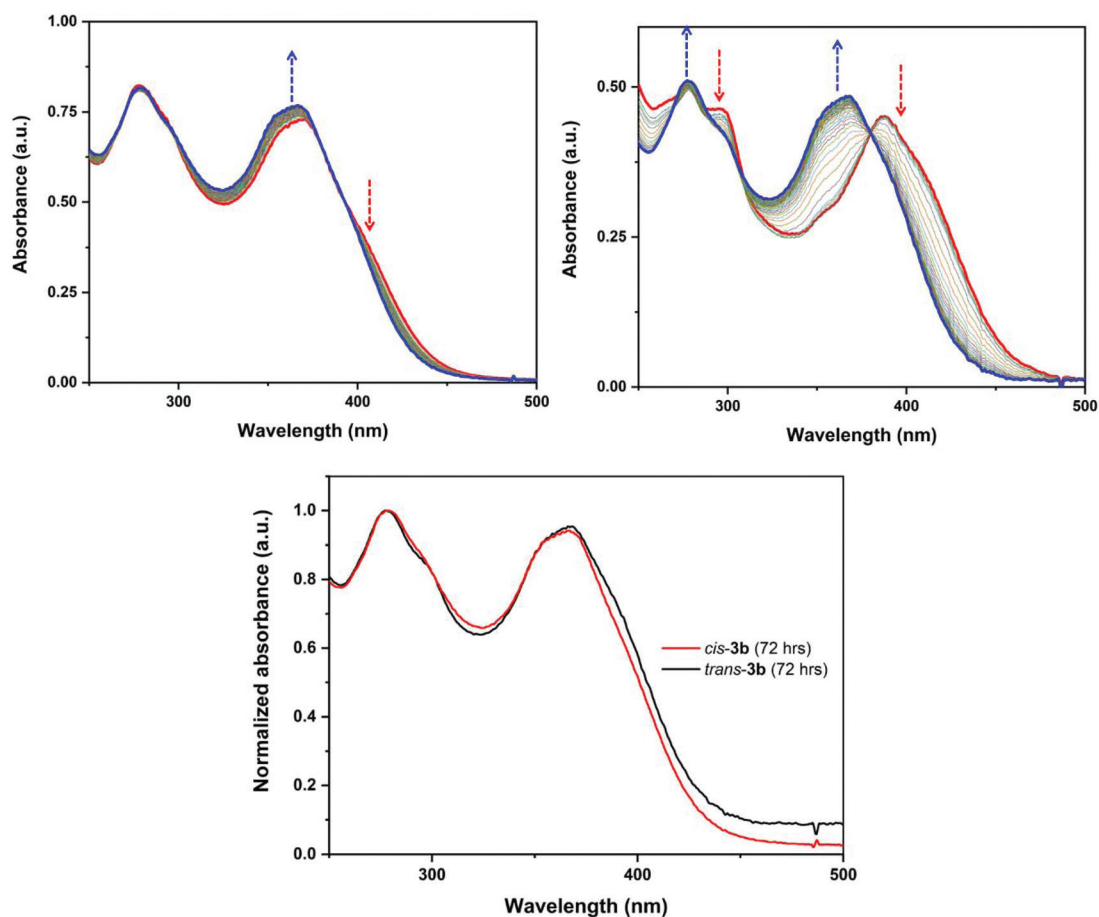


Fig. 4 Spectral evolution in water (0.5% of DMSO) for *cis*-3b (top, left) and *trans*-3b (top, right) at room temperature (4×10^{-5} M, 72 h). A comparison between the end points for both kinetics is shown in the bottom.

Table 5 UV-visible low-lying transition recorded in acetonitrile for the ruthenium–nitrosyl complexes and related TD-DFT-computed data

	UV-visible λ_{\max} (nm)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	TD-DFT λ_{\max} (nm)	f
<i>cis</i> - 3a	330 ^a	17 400 ^a	299	0.528
<i>trans</i> - 3a	350 ^a	18 800 ^a	312	0.363
<i>cis</i> - 3b	363	18 700	335	0.657
<i>trans</i> - 3b	387	20 500	348	0.607
	361	17 500	327	0.138
4a	325	19 700	292	0.469
4b	358	21 100	327	0.751
4c	380	23 000	343	0.962
5a	328	19 300	291	0.194
			289	0.250
5b	362	20 350	327	0.706

^a Ref. 17.

These electronic features are fully consistent with our previous investigations of terpyridine-based RuNO complexes.^{16,17,36}

The UV-visible data (λ_{\max} and ϵ) for the low-lying transitions of the complexes are gathered in Table 5 along with those of the *cis*-**3a** and *trans*-**3a** species, previously investigated. The comparison leads to the following conclusions: (i) there is a slight bathochromic shift in the *trans*(Cl,Cl) isomers with respect to the *cis*(Cl,Cl) isomers within the **3a–b** series related to the better overlap, and hence stronger push–pull character towards the nitrosyl substituent when it lies in the same plane than the terpyridyl ligand in the complexes; (ii) there is a global red shift of about 20 nm on going from the phenyl to the thiophenyl substituents, in relation to an increased donating capability and better planarity within the thiophenyl-terpyridine unit; and (iii) along the phenyl (**a**) or thiophenyl (**b**) series having the same terpyridyl ligand and nitrosyl in the axial (*cis*) position, the energy of the low-lying transitions follows the order: **5** \approx **4** > *cis*-**3**. To determine the origin of these various effects, the details of the TD-DFT computed transitions are provided in Table 6.

The data gathered in Table 6 reveal that low-energy transitions always possess a dominant HOMO \rightarrow LUMO contribution in the case of complexes **3** and **4**, in which the coordi-

nation spheres correspond to tpyRuCl₂(NO) and tpyRu(Cl)(OH)(NO), respectively. More precisely, the examination of the orbitals (Fig. 6) shows that the electronic effect associated with these transitions involves a charge transfer from the electron rich substituent of the terpyridine ligand to the electron withdrawing RuNO fragment. Using a thiophenyl substituent (**b**) clearly increases the energy of the HOMO levels by about 0.4 eV *versus* that of the phenyl substituent (**a**), which leads to red-shifted push–pull transitions (Table 5). These features are in agreement with our previous reports on terpyridine-RuCl₂(NO) species, where the energy of the occupied level, and hence that of the charge transfer transition towards RuNO, is related to the donor/acceptor character of the substituent present on terpyridine.^{16a,17,36} Interestingly, the case of complexes **5**, where the hydroxo ligand is replaced by an ethanolato ligand, appears to be different. Contrary to the situation encountered with the OH ligand, the p orbital of the oxygen atom of OEt (orbital 117 (HOMO) in **5a** and orbital 117 (HOMO–1) in **5b**) is involved in the charge transfer. Furthermore, its contribution becomes dominant in **5a** (50% of the effect in transition 1 \rightarrow 12, in Table 6). The difference on going from **4a** (OH) to **5a** (OEt) can tentatively be related to structural effects, and is depicted in Fig. 7. Due to hydrogen bonding, the Cl–Ru–O–H torsion angle is equal to 0 degree in **4a**. This implies that orbital 108 (HOMO–1, p orbital of the oxygen of the hydroxo) is orthogonal to orbital 112 (LUMO+2, the RuNO fragment with a strong contribution of d_{xz}). In other words, orbital 108 adds no contribution to the 109 \rightarrow 110 based transition. By contrast, the Cl–Ru–O–C torsion angle is equal to 30 degrees in **5a**, arising from the hindrance effect induced by the ethyl chain. Therefore, the p orbital of the oxygen atom (117, HOMO) can overlap with orbital 120 (LUMO+2, RuNO fragment), thus adding a significant contribution to the charge transfer towards the nitrosyl.

NO photo-release

As our investigations have recently started to move towards biological applications,²⁶ we were interested in studying the photo-release capabilities of this family of complexes in water.

Table 6 Main electronic transitions, with absorption maxima (λ_{\max}), oscillator strength (f) and composition of the configuration interaction, computed by TD-DFT for **3a–b**, **4a–b**, and **5a–b**

Compounds	UV-vis spectra	Transitions	λ_{\max} (nm)	f	Main composition ^a	Character
<i>cis</i> - 3a	330 nm	1 \rightarrow 12	299	0.528	60% $\chi_{113 \rightarrow 114}$	Phenyl \rightarrow RuNO
<i>trans</i> - 3a	350 nm	1 \rightarrow 10	312	0.363	71% $\chi_{113 \rightarrow 114}$	Phenyl \rightarrow RuNO
<i>cis</i> - 3b	363 nm	1 \rightarrow 7	335	0.657	49% $\chi_{114 \rightarrow 115}$	Thiophenyl \rightarrow RuNO
<i>trans</i> - 3b	387 nm	1 \rightarrow 8	348	0.607	74% $\chi_{114 \rightarrow 115}$	Thiophenyl \rightarrow RuNO
	361 nm	1 \rightarrow 9	327	0.138	39% $\chi_{113 \rightarrow 115}$ + 26% $\chi_{111 \rightarrow 115}$	R-tpyRuCl ₂ \rightarrow RuNO
4a	325 nm	1 \rightarrow 10	292	0.469	61% $\chi_{109 \rightarrow 110}$	Phenyl \rightarrow RuNO
4b	358 nm	1 \rightarrow 8	327	0.751	68% $\chi_{110 \rightarrow 111}$	Thiophenyl \rightarrow RuNO
5a	328 nm	1 \rightarrow 12	291	0.194	50% $\chi_{117 \rightarrow 120}$ + 21% $\chi_{116 \rightarrow 118}$	EtO \rightarrow RuNO
		1 \rightarrow 13	289	0.250	31% $\chi_{117 \rightarrow 120}$ + 24% $\chi_{116 \rightarrow 118}$	EtO + phenyl \rightarrow RuNO
5b	362 nm	1 \rightarrow 9	327	0.706	39% $\chi_{118 \rightarrow 119}$ + 33% $\chi_{117 \rightarrow 119}$	EtO + thiophenyl \rightarrow RuNO

^a Orbital 113(114) is the HOMO(LUMO) for **3a**, 114(115) the HOMO(LUMO) for **3b**, 109(110) the HOMO(LUMO) for **4a**, 110(111) the HOMO(LUMO) for **4b**, 117(118) the HOMO(LUMO) for **5a**, and 118(119), the HOMO(LUMO) for **5b**.

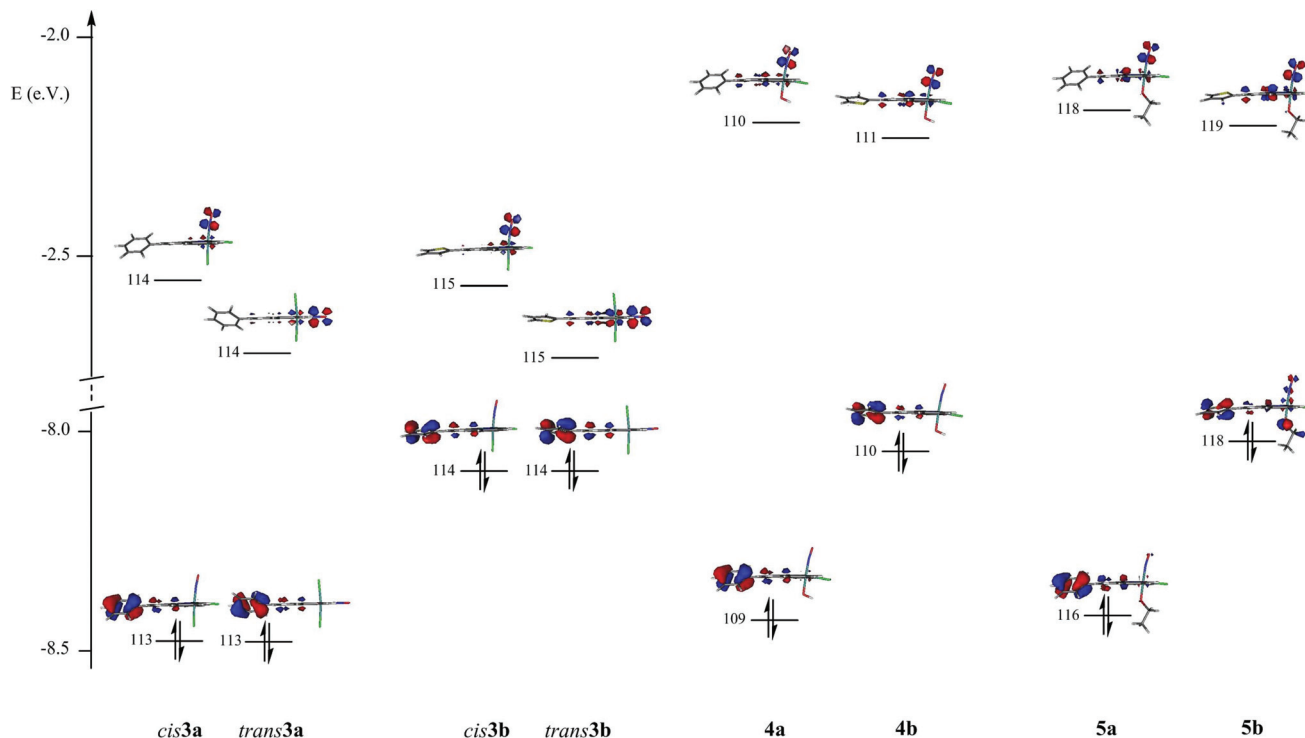


Fig. 6 Selected orbitals and related energies, in the ruthenium nitrosyl complexes **3a–b**, **4a–b**, and **5a–b**. Occupied levels are the HOMO orbitals except for **5a**, where orbital 116 is the HOMO–1. Empty levels are the LUMO in any case.

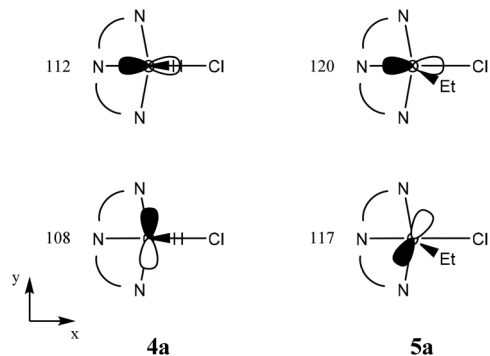
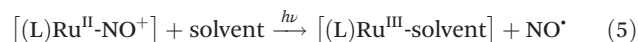


Fig. 7 Difference in overlaps between the p orbitals of the oxygen atom (bottom) and the d_{xz} orbitals of the ruthenium atom (top), in **4a** (left) and **5a** (right). Orbitals 108(112) are the HOMO–1(LUMO+2) in **4a**, orbitals 117(120) are the HOMO–1(LUMO+2) in **5a**.

However, *cis-3a–c* and *trans-3a–c* are not stable in water and undergo an evolution towards **4a–c**. For this reason, the photochemical quantum yield (Φ_{NO}) measurements were conducted in both acetonitrile and water, under irradiation at $\lambda = 365$ nm. Representative examples of the resulting spectral evolution are shown in Fig. 8 with that of **4b** and **5b** featuring the disappearance of the band around $\lambda = 360$ nm and the appearance of a new band near $\lambda = 480$ nm (details of the experiments on the other complexes can be found in the ESI, Fig. S25–S28†).

The photoreactivity of ruthenium(II) nitrosyl complexes has been well documented over the last 40 years and was reviewed by Mascharak.² The resulting release of nitric oxide is followed by the formation of a ruthenium(III) photoproduct according to the following equation:



Owing to the presence of apparent isosbestic points, which suggest the formation of a single product up to 10 minutes of irradiation, and taking into account our previous observation of the efficient substitution of NO^{\bullet} by MeCN after irradiation of **3c** in acetonitrile,^{16b} it can be assumed that the photoproducts obtained in water correspond to the formula $[\text{R-tpyRu}^{\text{III}}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$, with the introduction of a molecule of water in the coordination sphere of the ruthenium center. No other investigations were conducted to clarify unambiguously the nature and exact structure of the photoproduct obtained in water. However, various techniques provide evidence that the observed photoreaction corresponds to the NO^{\bullet} release depicted in eqn (5). This is illustrated in the series of *trans-3b*, **4b** and **5b** thiophenyl containing compounds as representative examples of the $[\text{Ru}(\text{R-tpy})\text{Cl}_2\text{NO}]^+$, *trans*(NO, OH)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{NO})(\text{OH})\text{Cl}]^+$ and *trans*(NO, OEt)- $[\text{Ru}(\text{R-tpy})(\text{NO})(\text{OEt})\text{Cl}]^+$ families, respectively. These representative experiments are gathered in Fig. 9 (details of the experiments on the other complexes can be found in the ESI, Fig. S30†). In the case of *trans-3b*, the NO^{\bullet} release is evidenced by the use of the

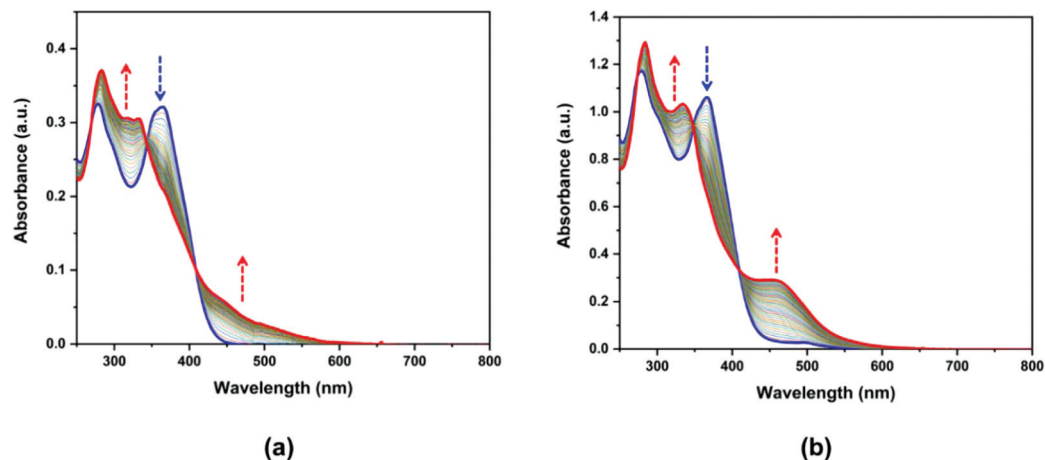


Fig. 8 Evolution of the absorption of spectra of (a) **4b** and (b) **5b** in water (0.5% DMSO) under irradiation at room temperature ($\lambda = 365$ nm, 10 min).

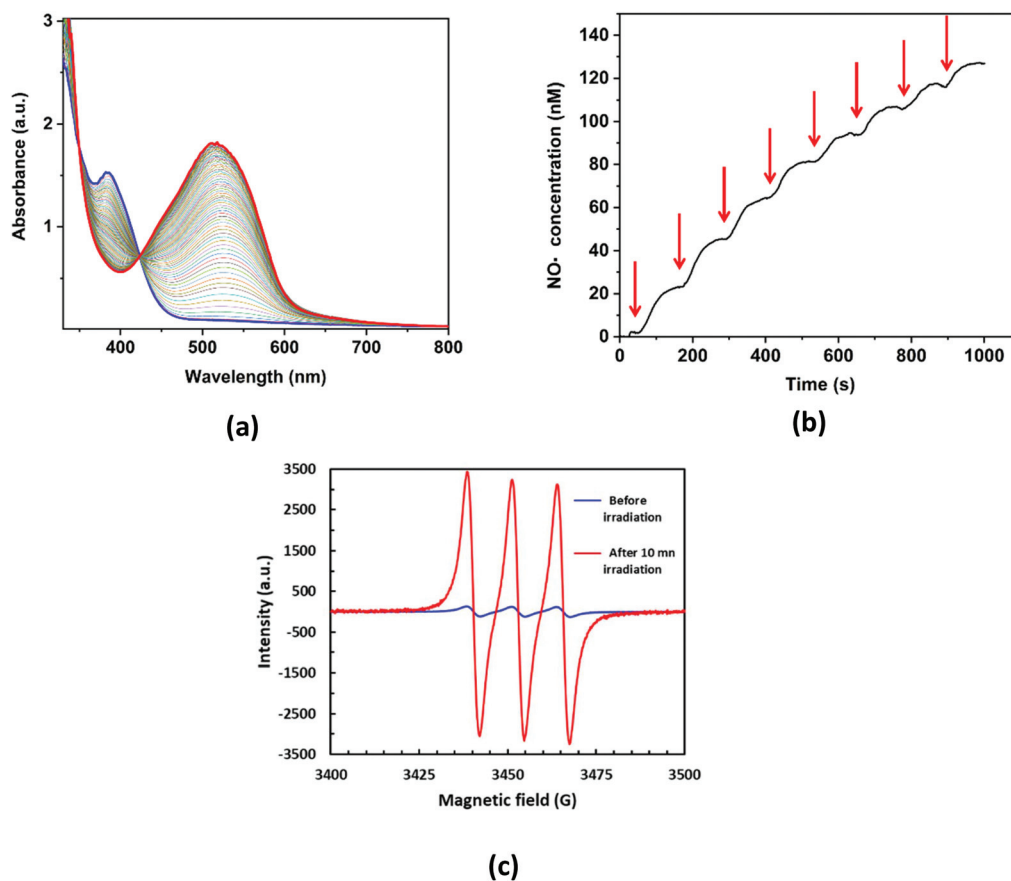


Fig. 9 Representative experiments evidencing NO[•] photo-release. (a) Evolution of the electronic spectra for *cis*-**3a** in acetonitrile showing the formation of the azo dye after irradiation at $\lambda = 365$ nm in the presence of the Griess Reagent. (b) Chronoamperograms of NO[•] release upon irradiation of **4b** (400 nM in water) at $\lambda = 365$ nm during steps of 15 s (red arrows) every 110 s. (c) Triplet EPR signal after irradiation of **5b** (in acetonitrile) with a Hg lamp ($\lambda > 400$ nm) in the presence of the NO[•] selective [Fe^{II}(MGD)₂] spin trap.

Griess test which consists of the observation of an azo dye with strong absorption at $\lambda = 548$ nm, generated by the reaction of NO₂⁻ (oxidized form of NO[•]) through *in situ* reaction with sulfanilic acid (Fig. 9a).³⁷

Alternatively, the NO[•] release from **4b** can be detected directly and quantitatively in water by the use of a NO[•] sensor (Fig. 9b), and the resulting chronoamperogram indicates a NO[•] concentration of up to 125 nM. Finally, in the case of **5b**,

Table 7 Quantum yield of photorelease (ϕ_{NO}) under irradiation at $\lambda = 365$ nm

	3a		3b		4a	4b	4c	5a	5b
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>					
ϕ_{NO} in MeCN	0.37 ^a	0.12 ^a	0.37	0.18	0.18	0.17	0.15	0.38	0.15
ϕ_{NO} in H ₂ O	—	—	—	—	0.17	0.075	0.04	0.09	0.10

^a Ref. 17.

EPR spectroscopy allowed a direct observation of NO[•] grafted on a spin trap complex [Fe^{II}(MGD)₂] after photorelease induced by irradiation with a Hg lamp. The resulting triplet signal possesses a *g*-factor of 2.040 and a hyperfine coupling constant of $a_{\text{N}} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$, which are in good agreement with the values reported in the literature (Fig. 9c).³⁸

The quantum yields of photo-release (ϕ_{NO}), which correspond to the number of NO[•] released per [Ru(NO)]* excited state promoted under irradiation, are gathered in Table 7. In the case of **3a–b**, which are not stable in water for a long period of time, no ϕ_{NO} values can be measured precisely.

As can be seen, although a direct correlation of ϕ_{NO} with structural features is not evident, all these complexes display satisfactory NO[•] photo-release efficiencies, with ϕ_{NO} values higher than 0.12 in acetonitrile, in any case. There is a clear tendency for reduced ϕ_{NO} values in water, although the magnitude of lowering changes significantly from one compound to another.

Experimental section

Materials and equipment

All starting materials were obtained from Alfa-Aesar; the solvents were of analytical grade and used without further purification. Compounds **1a–c**,^{16a,28,39} **2a–c**,^{16a,17,40} **3a**,¹⁷ and **3c**^{16a} were obtained following modified literature protocols; spectroscopic data were in good agreement. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer at 298 K using deuterated solvents; chemical shifts for ¹H- and ¹³C-NMR data are relative to the residual nondeuterated solvent signal, fixed at $\delta = 7.26$ ppm (CDCl₃), $\delta = 1.940$ (CD₃CN) for ¹H-NMR and $\delta = 77.00$ ppm (CDCl₃), $\delta = 1.320$ (CD₃CN) for ¹³C-NMR. Coupling constant (*J*) values are given in Hertz. Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer, using a diamond ATR. UV-visible spectra were obtained on a Hewlett Packard 8454A spectrometer. HRMS data were acquired using an Agilent G1969A MS TOF spectrometer. Elemental analyses were performed at LCC using a PerkinElmer 2400 series II Instrument.

Syntheses

4'-Phenyl-2,2':6',2''-terpyridine (1a). To a stirring solution of benzaldehyde (2 g, 18.8 mmol) in ethanol (65 mL) was added a solution of 2-acetylpyridine (4.2 mL, 37.6 mmol) and KOH (2.110 g, 37.6 mmol) in ethanol (60 mL) previously stirred at

room temperature for 30 minutes. The resulting mixture was allowed to stir for 15 minutes, followed by addition of 25% NH₄OH (40 mL) and heating to reflux for 7 hours. The reaction was chilled using an ice/water bath and the resulting precipitate was collected and washed with water and cold ethanol. After recrystallization from boiling ethanol, 3.742 g (64%) of **1a** as a white solid was obtained. ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): 8.75 (s, 2H, H-7), 8.73 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.8 Hz, 2H, H-1), 8.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4), 7.93–7.90 (m, 2H, H-2'), 7.87 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 2H, H-3), 7.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-3'), 7.45 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-4'), 7.34 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.1 Hz, 2H, H-2). HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for C₂₁H₁₆N₃: 310.1339. Found: 310.1340. Error: 0.5 ppm.

4'-(Thien-2-yl)-2,2':6',2''-terpyridine (1b). **1b** was synthesized as described above for **1a**, from 2-thiophenecarboxaldehyde. The ligand was obtained in 52% yield as a pale green solid. ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): 8.74 (ddd, *J* = 4.8, 1.6, 0.8 Hz, 2H, H-1), 8.69 (s, 2H, H-7), 8.64 (dt, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 2H, H-4), 7.86 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 2H, H-3), 7.77 (dd, *J* = 3.7, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 7.74 (dd, *J* = 5.0, 1.0 Hz, 1H, H-5'), 7.35 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.1 Hz, 2H, H-2), 7.17 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H, H-4'). HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for C₁₉H₁₄N₃S: 316.0903. Found: 316.0904. Error: 0.5 ppm.

4'-(9H-Fluoren-2-yl)-2,2':6',2''-terpyridine (1c). To a suspension of 9H-fluorene-2-carbaldehyde (1.50 g, 7.72 mmol) and 2-acetylpyridine (0.86 mL, 7.72 mmol) in methanol (11.6 mL), aqueous NaOH (1 M, 7.7 mL) was added dropwise at 0 °C under magnetic stirring. After stirring for 7 hours at room temperature, the yellow precipitate formed was collected and washed with water and cold methanol to yield 1.26 g (4.24 mmol) of (*E*)-3-(9H-fluoren-2-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-en-1-one as a yellow solid.⁴¹ An ethanolic (20 mL) solution of this intermediate was refluxed in the presence of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide⁴² (1.38 g, 4.24 mmol) and NH₄OAc (4.25 g, 55 mmol) overnight to obtain a greenish solid, which was purified by column chromatography (hexanes/ethyl acetate 7/3) to obtain 1.40 g (3.52 mmol, 46%) of the title compound as a yellow solid. ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): δ 8.80 (s, 2H, H-7), 8.75 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.8 Hz, 2H, H-1), 8.69 (dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 2H, H-4), 8.10 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-1'), 7.95 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H-3'), 7.90–7.86 (m, 3H, H-3, H-4'), 7.84 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-5'), 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-8'), 7.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-6'), 7.37–7.32 (m, 3H, H-2, H-7'), 3.99 (s, 2H, H-9'). HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for C₂₈H₂₀N₃: 398.1652. Found: 398.1656. Error: 1.1 ppm.

[Ru^{III}(1a)Cl₃] (2a). A mixture of 1a (812 mg, 2.62 mmol), RuCl₃·xH₂O (0.523 g) and ethanol (70 mL) was stirred under reflux for 6.5 hours. Then, the mixture was concentrated *in vacuo* and chilled to 0 °C in a freezer. The resulting red precipitate was collected and washed with chilled ethanol and diethyl ether. The wine-colored crude product was subsequently washed twice with boiling ethanol (50 mL) to obtain 852 mg (1.65 mmol, 63%) of 2a as a black solid. Elemental analysis found: C, 48.07; H, 2.73; N, 7.77. Required for C₂₁H₁₅Cl₃N₃Ru, 1/2H₂O: C, 47.97; H, 3.07; N, 7.99.

[Ru^{III}(1b)Cl₃] (2b). 2b was synthesized as described above for 2a, from ligand 1b. The title complex was obtained in 76% yield as a black solid. Elemental analysis found: C, 42.72; H, 2.22, N, 7.71. Required for C₁₉H₁₃Cl₃N₃RuS, 1/2H₂O: C, 42.91; H, 2.65; N, 7.90.

[Ru^{III}(1c)Cl₃] (2c). 2c was synthesized as described above for 2a, from ligand 1c. The title complex was obtained in 95% yield as a black solid. Elemental analysis found: C, 51.53; H, 2.98; N, 6.33. Required for C₂₈H₁₉Cl₃N₃Ru, 2.5H₂O: C, 51.74; H, 3.72; N, 6.47.

Preparation of a mixture of isomers of *cis*(Cl,Cl)- and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1a)(NO)Cl₂](Cl) complexes (3a). Compound 2a (822 mg, 1.59 mmol) was dissolved in dimethylformamide (125 mL) and warmed up to 85 °C. Gaseous nitric oxide, obtained by the dropwise addition of diluted HNO₃ on copper, was bubbled under an argon atmosphere for 3–5 hours. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and it was concentrated *in vacuo* to a final volume of ca. 10 mL. After addition of a large excess of diethyl ether, 802 mg of a pale orange powder was obtained (1.47 mmol, 92%). As evidenced by ¹H-NMR, this crude product was mainly (>98%) comprised of a mixture of two species, namely the *cis*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1a)(NO)Cl₂](Cl) (*cis*-3a) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1a)(NO)Cl₂](Cl) (*trans*-3a) isomers in a *trans/cis* 7/3 ratio (see ESI, Fig. S1†). This mixture was consequently used for the following reactions without any further purification.

Preparation of a mixture of isomers of *cis*(Cl,Cl)- and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1b)(NO)Cl₂](Cl) complexes (3b). 3b was prepared as described above for 3a from complex 2b. The yield of the crude orangish product was 97%. According to ¹H-NMR, this crude mixture was mainly (>98%) comprised of the *cis*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1b)(NO)Cl₂](Cl) (*cis*-3b) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1b)(NO)Cl₂](Cl) (*trans*-3b) isomers in a *trans/cis* 7/3 ratio (see ESI, Fig. S2†). Analytical samples of both *cis*-3b and *trans*-3b isomers were isolated as their PF₆ salts after HPLC purification followed by metathesis employing aqueous NH₄PF₆.

***cis*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1b)(NO)Cl₂](PF₆) (*cis*-3b).** Pale yellow solid ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.18 (ddd, *J* = 5.5, 1.5, 0.5 Hz, 2H, H-1), 8.73 (ddd, *J* = 8.1, 1.2, 0.6 Hz, 2H, H-4), 8.69 (s, 2H, H-7), 8.48 (td, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 2H, H-3), 8.17 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 7.99–7.91 (m, 3H, H-2, H-5'), 7.40 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H, H-4'). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN): 158.38 (C-5), 154.79 (C-6), 154.22 (C-1), 150.07 (C-8), 143.75 (C-3), 139.18 (C-2'), 134.25 (C-5'), 132.14 (C-3'), 130.95 (C-4'), 130.51 (C-2), 127.48 (C-4), 121.66 (C-7). FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1887 (νNO). Elemental analysis found: C, 34.47; H, 1.33; N, 8.70. Required for

C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS, PF₆: C, 34.46; H, 1.98; N, 8.46. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS: 516.9231. Found: 516.9232. Error: 0.2 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ε in M⁻¹ cm⁻¹): 281 (21 568), 363 (18 682).

***trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1b)(NO)Cl₂](PF₆) (*trans*-3b).** Yellow solid. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 8.78–8.74 (m, 2H, H-1), 8.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 8.60 (s, 2H, H-7), 8.38 (td, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 2H, H-3), 8.16 (dd, *J* = 3.8, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 7.95 (dd, *J* = 4.7, 0.9 Hz, 1H, H-5'), 7.87 (ddd, *J* = 7.5, 5.4, 1.2 Hz, 2H, H-2), 7.39 (dd, *J* = 4.7, 3.8 Hz, 1H, H-4'). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN): 154.90 (C-5), 154.10 (C-1), 153.14 (C-6), 152.95 (C-8), 142.44 (C-3), 138.05 (C-2'), 133.86 (C-5'), 131.62 (C-3'), 130.08 (C-2), 130.01 (C-4'), 126.70 (C-4), 120.41 (C-7). FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1913 (νNO). Elemental analysis found: C, 34.49; H, 1.52; N, 8.69. Required for C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS, PF₆: C, 34.46; H, 1.98; N, 8.46. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for C₁₉H₁₃Cl₂N₄ORuS: 516.9231. Found: 516.9225. Error: -1.2 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ε in M⁻¹ cm⁻¹): 277 (25 201), 361 (17 488), 387 (20 510).

Preparation of a mixture of isomers of *cis*(Cl,Cl) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1c)(NO)Cl₂](Cl) complexes (3c). 3c was prepared as described above for 3a from complex 2c. In agreement with previous observations,¹⁷ in this case after stopping the reaction, an orangish precipitate was formed which corresponded to the pure *trans*(Cl,Cl) isomer according to ¹H-NMR. It was obtained in 28% yield. The filtrate was concentrated under reduced pressure to yield a second orange powder which corresponded to the mixture of the *cis*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1c)(NO)Cl₂](Cl) (*cis*-3c) and *trans*(Cl,Cl)-[Ru^{II}(1c)(NO)Cl₂](Cl) (*trans*-3c) isomers in a *trans/cis* 1/1 ratio (Fig. S3†). The combined yield was 91%.

General procedure for the synthesis of *trans*(NO,OH) complexes in water

In a typical run, 150 mg of the crude *trans/cis* mixture of complexes (3a–c) was dissolved in boiling water (ca. 0.5 mg mL⁻¹) followed by refluxing overnight. The resulting yellowish solution was concentrated *in vacuo* and treated with a small amount of NH₄PF₆. The cream to yellow solid thus obtained was collected, washed with water and dried. In most cases, at this step ¹H-NMR showed the complete depletion of the starting material and the purity of the desired complex to be above 95%. When significant impurities were observed, the product was further purified by preparative TLC on SiO₂ using 1/1 CH₂Cl₂/CH₃CN as an eluent.

***trans*(NO,OH)-[Ru^{II}(1a)(NO)(OH)Cl](PF₆) (4a).** 4a was obtained as a yellow solid in 89% yield. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.11 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-1), 8.74 (s, 2H, H-7), 8.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4), 8.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3), 8.07–8.03 (m, 2H, H-2'), 7.93–7.87 (m, 2H, H-2), 7.66 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H, H-3', H-4'), 4.35 (br s, 1H, OH). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN): 158.31 (C-5), 156.62 (C-8), 155.04 (C-6), 153.58 (C-1), 143.38 (C-3), 136.15 (C-1'), 132.75 (C-4'), 130.70 (C-3'), 130.03 (C-2), 129.13 (C-2'), 127.03 (C-4), 123.59 (C-7). FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1834 (νNO). Elemental analysis found: C, 39.86; H, 2.18; N, 9.90. Required for C₂₁H₁₆ClN₄O₂RuPF₆; 1/2CH₃CN: C, 40.13; H, 2.68; N, 9.57. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for

$C_{21}H_{16}ClN_4O_2Ru$: 493.0005. Found: 493.0018. Error: 2.6 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ϵ in $M^{-1} cm^{-1}$): 297 (27 734), 325 (19 660).

***trans*(NO,OH)-[Ru^{II}(1b)(NO)(OH)Cl](PF₆) (4b).** 4b was obtained as a yellow solid in 86% yield. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.09 (dd, $J = 5.4, 1.1$ Hz, 2H, H-1), 8.57 (s, 2H, H-7), 8.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-4), 8.30 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, H-3), 8.04 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.88 (ddd, $J = 7.6, 5.5, 1.3$ Hz, 2H, H-2), 7.81 (dd, $J = 5.0, 1.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.21 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1H, H-4'), 4.46 (br s, 1H, OH). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN): 158.01 (C-5), 154.95 (C-6), 153.48 (C-1), 149.26 (C-8), 143.24 (C-3), 139.12 (C-2'), 133.99 (C-5'), 131.97 (C-3'), 130.83 (C-4'), 130.00 (C-2), 126.91 (C-4), 120.96 (C-7). FT-IR (ATR, cm^{-1}): 1857 (ν NO). Elemental analysis found: C, 34.98; H, 2.21; N, 8.28. Required for $C_{19}H_{14}ClN_4O_2RuS$, PF₆: C, 35.44; H, 2.19; N, 8.70. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for $C_{19}H_{14}ClN_4O_2RuS$: 498.9569. Found: 498.9572. Error: 0.6 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ϵ in $M^{-1} cm^{-1}$): 280 (27 000), 358 (21 103).

***trans*(NO,OH)-[Ru^{II}(1c)(NO)(OH)Cl](PF₆) (4c).** 4c was obtained as a yellow solid in 73% yield. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.23 (dd, $J = 5.7$ Hz, 1.4 Hz, 2H, H-1), 8.96 (2H, s, H-7), 8.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-4), 8.52 (td, $J = 7.8$ Hz, 1.5 Hz, 2H, H-3), 8.40 (s, 1H, H-1'), 8.24–8.16 (m, 2H, H-3', H-4'), 8.06–7.98 (m, 3H, H-2, H-5'), 7.95 (br s, 1H, OH), 7.72 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-8'), 7.55–7.45 (m, 2H, H-6', H-7'), 4.16 (s, 2H, H-9').

General procedure for the synthesis of *trans*(NO,OEt) complexes

100 mg of crude samples of complexes 4a–c were dissolved in 150 mL of absolute ethanol and stirred at 80 °C for 3 hours. The solution was then concentrated to ca. 5 mL followed by addition of diethyl ether. The precipitate thus obtained was collected, washed with diethyl ether and dried.

***trans*(NO,OEt)-[Ru^{II}(1a)(NO)(OEt)Cl](PF₆) (5a).** 5a was obtained as a pale orange solid in 93% yield. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.16–9.11 (m, 2H, H-1), 8.76 (s, 2H, H-7), 8.69 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-4), 8.45 (td, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, H-3), 8.09–8.05 (m, 1H, 2H, H-2'), 7.93 (ddd, $J = 7.7, 5.5, 1.3$ Hz, 2H, H-2), 7.73–7.68 (m, 3H, H-3', H-4'), 3.84 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9), 0.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-10). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN): 158.50 (C-5), 156.71 (C-8), 155.00 (C-6), 153.57 (C-1), 143.44 (C-3), 136.47 (C-1'), 132.64 (C-4'), 130.71 (C-3'), 130.14 (C-2), 129.18 (C-2'), 126.99 (C-4), 123.80 (C-7), 66.37 (C-9), 19.80 (C-10). FT-IR (ATR, cm^{-1}): 1814 (ν NO). Elemental analysis found: C, 41.23; H, 2.75; N, 8.62. Required for $C_{23}H_{20}ClN_4O_2Ru$, PF₆: C, 41.48; H, 3.03; N, 8.41. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for $C_{23}H_{20}ClN_4O_2Ru$: 521.03210. Found: 521.0338. Error: 3.26 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ϵ in $M^{-1} cm^{-1}$): 297 (28 077), 328 (19 315).

***trans*(NO,OEt)-[Ru^{II}(1b)(NO)(OEt)Cl](PF₆) (5b).** 5b was obtained as a pale orange solid in 95% yield. ¹H-NMR δ (400 MHz, CD₃CN): 9.16–9.11 (m, 2H, H-1), 8.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-4), 8.65 (s, 2H, H-7), 8.45 (td, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 2H, H-3), 8.15 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.95–7.90 (m, 3H, H-2, H-5'), 7.39 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1H, H-4'), 3.82 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9), 0.51 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-10). ¹³C-NMR δ (100 MHz, CD₃CN):

158.35 (C-5), 155.05 (C-6), 153.56 (C-1), 149.49 (C-8), 143.38 (C-3), 140.48 (C-2'), 133.81 (C-5'), 131.76 (C-3'), 130.84 (C-4'), 130.16 (C-2), 126.97 (C-4), 121.31 (C-7), 66.34 (C-9), 19.78 (C-10). FT-IR (ATR, cm^{-1}): 1835 (ν NO). Elemental analysis found: C, 37.33; H, 2.24; N, 8.80. Required for $C_{21}H_{18}N_4O_2SRuCl$, PF₆: C, 37.54; H, 2.70; N, 8.34. HRMS (ESI-TOF⁺) anal. calcd for $C_{21}H_{18}N_4O_2SRuCl$: 526.9882. Found: 526.9887. Error: 0.9 ppm. UV-vis λ_{max} in nm (ϵ in $M^{-1} cm^{-1}$): 279 (22 932), 362 (20 347).

Single X-ray diffraction studies

Data were collected on a Bruker Kappa Apex II diffractometer equipped with a sealed X-Ray tube source (*cis*-3b and 5b) or with a 30 W air-cooled microfocus source (*trans*-3b, 4a, 4b and 5a), using MoK α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). An Oxford Cryosystems Cryostream cooler device was used to collect the data at low temperature. Phi- and omega-scans were performed for data collection. An empirical absorption correction with SADABS was applied.⁴³ The structures were solved by the intrinsic phasing method (SHELXT),⁴⁴ or with SUPERFLIP,⁴⁵ and refined by means of least-squares procedures on F^2 with SHELXL,⁴⁶ and on F with CRYSTALS.⁴⁷ All non-hydrogen were refined anisotropically. Hydrogen atoms were located in a difference map but those attached to carbon atoms were repositioned geometrically and then refined using a riding model.

CCDC numbers 1968710–1968715 contain the supplementary crystallographic data for this paper.†

Computational methods

The molecular geometries of the ruthenium nitrosyl complexes were fully optimized using the Gaussian-09 program package,⁴⁸ within the framework of Density Functional Theory (DFT) at the B3PW91/6-31G* level (see ESI, Table S31†). B3PW91 was selected following the previous report on ruthenium–nitrosyl by Mascharak,⁴⁹ who stated that this hybrid functional outperforms other methods in numerous cases of ruthenium complexes, especially when back bonding ligands (like NO) are present.⁵⁰ The LANL2DZ pseudo-potential was used to account for relativistic effects on the ruthenium atom.⁵¹ Vibrational analyses were performed at the same level to verify that the stationary points correspond to minima on the potential energy surfaces. Solvent effects (water, acetonitrile) were modeled using the Polarizable Continuum Model (SCRF = PCM method).⁵² The TD-DFT computations of the UV-vis spectra were carried out on the optimized geometries at the CAM-B3LYP/6-31G* level. The CAM-B3LYP and PBE0 methods were tested for consistencies with our previous investigations on Ru(NO) complexes. We observed a tendency for over-estimated transition energies with CAM-B3LYP and under-estimated energies with PBE0. Finally, we selected CAM-B3LYP for which a blue shift was observed for the computed values with average values of 2700 cm^{-1} for the thiophenyl containing species and 3500 cm^{-1} for the phenyl containing complexes. Although significantly larger than the commonly found discrepancy of 2500 cm^{-1} observed in small organic molecules, the present values were still acceptable due to large molecular

sizes, heavy ruthenium atoms, and sizeable charge transfer effects.⁵³ Molecular orbitals were plotted by using the GABEDIT free software.^{54,55}

NO calibration

The quantitative determination of NO production was performed with a commercial NO detector (ami-NO 700) from Innovative Instruments Inc. Calibration of the electrode in the range of 50–1000 nM was performed by generating NO according to the following reaction:



For each calibration, aliquots (80 μL) of aqueous NaNO_2 ($\sim 100 \mu\text{M}$) were added to 20 mL of a 0.03 mol L^{-1} solution of KI in 0.1 mol L^{-1} H_2SO_4 . Chronoamperograms were registered at a fixed temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) while stirring the solution in order to maintain a constant rate of oxidation of the produced NO at the electrode surface. The typical sensitivity of the electrode was about 100 pA nM^{-1} . During the photolysis measurements, the NO sensor was positioned outside the light path. Besides, chronoamperograms of an aqueous solution were systematically registered upon irradiation in order to subtract the light interference. Then, chronoamperograms were registered upon irradiation of 20 mL of an aqueous solution of each complex in steps of 15 s every 110 s in order to stabilize the intensity between each step.

Photochemistry

Kinetic studies on the photolysis reactions were carried out with a diode array Hewlett Packart 8454A spectrophotometer. The optical fiber was fixed laterally from the cuvette. Absorption spectra were taken after each minute, in fast scan mode. The UV-visible spectra were recorded under irradiation realized with a Muller reactor device equipped with a cooling water filter and monochromatic LEDs (see above). The light intensity was determined by using a power-meter from Thorlabs (PM100D). The sample solutions were placed in a quartz cuvette of 1 cm path-length stirred continuously. The temperature was maintained at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ during the whole experiment.

Quantum yield measurements: the quantum yield (ϕ_A) was determined by the program Sa3.3 written by D. Lavabre and V. Pimienta.^{56,57} It allows the resolution of the differential equation:

$$\frac{d[\text{Ru}^{\text{II}}]}{dt} = -\Phi \cdot \epsilon_{\text{Ru}^{\text{II}}} \cdot [\text{Ru}^{\text{II}}] \cdot I_0 \cdot l_{\text{irr}} \cdot F \quad (7)$$

where F is the photokinetic factor $F = (1 - 10^{-\text{Abs}})/\text{Abs}$ with $\text{Abs} = (\epsilon_{\text{Ru}^{\text{II}}}[\text{Ru}^{\text{II}}] + \epsilon_{\text{Ru}^{\text{III}}}[\text{Ru}^{\text{III}}]) \cdot l_{\text{irr}}$, Φ is the photochemical quantum yield, I_0 is the incident photon flux (in $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$), $\epsilon_{\text{Ru}^{\text{II}}}$ (in $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) is the molar extinction coefficient of the ruthenium nitrosyl complexes and l_{irr} is the length of the optical irradiation path. The equation was fitted with the experimental data $\text{Abs} = f(t)$ and 2 parameters ϕ_A and ϵ_B (ϵ_B is the molar extinction coefficient measured at the end of the

reaction). λ_{obs} was chosen to correspond to a large difference between molar extinction coefficients at the initial and final times of the photochemical reaction. Simulation and optimization procedures were performed by using numerical integration and a non-linear minimization algorithm for the fitting of the model to the experimental data (see ESI, Table S32†).

Conclusion

We have investigated a set of *cis*(Cl,Cl)- and *trans*(Cl,Cl)-ruthenium nitrosyl complexes built up from various substituted terpyridine ligands, initially regarded as optical materials. The full characterization of such systems implies the separation of the *cis/trans* isomers at the end of the synthetic process. By contrast, their behavior in water indicates the irreversible substitution of one chloride by one hydroxo ligand leading to a single and stable *trans*(NO,OH) isomer, in any case, thus avoiding the tedious separation step, encountered in $\text{L-RuCl}_2(\text{NO})$ chemistry. Moreover, the resulting water stable species exhibits NO^* releasing capabilities under irradiation, which indicates its potential uses in biological media, in relation to the widely recognized importance of nitric oxide in biology.

Conflicts of interest

The authors state that there are no conflicts to declare.

Acknowledgements

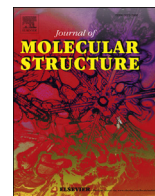
The work has been performed within the framework of the French-Mexican International Laboratory (LIA-LCMMC). The authors thank Carine Duhayon (LCC-CNRS) for her help with the record of X-ray data and acknowledge the financial support of CNRS (France), CONACyT (Mexico), and PAPIIT (Mexico). PLV thanks CONACyT for an academic scholarship (337958). MB thanks the University Paul Sabatier (COMUE) and the Région Midi-Pyrénées through the RuNOthérapie grant.

Notes and references

- (a) P. Coppens, I. Novozhilova and A. Kovalevsky, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 861; (b) L. Khadeeva, W. Kaszub, M. Lorenc, I. Malfant and M. Buron-Le Cointe, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 4117; (c) A. A. Mikhailov, E. Wenger, G. A. Kostin and D. Schaniel, *Chem. – Eur. J.*, 2019, **25**, 7569.
- (a) N. L. Fry and P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 289; (b) M. J. Rose and P. K. Mascharak, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 2093; (c) M. J. Rose and P. K. Mascharak, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 238.
- (a) E. Tfouni, M. Krieger, B. R. McGarvey and D. W. Franco, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **236**, 57–69; (b) E. Tfouni,

- D. R. Truzzi, A. Tavares, A. J. Gomes, L. E. Figueiredo and D. W. Franco, *Nitric Oxide*, 2012, **26**, 38.
- 4 (a) D. Schaniel, B. Cormary, I. Malfant, L. Valade, T. Woike, B. Delley, K. W. Kraemer and H.-U. Guedel, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 3717; (b) B. Cormary, I. Malfant, M. Buron-Le Cointe, L. Toupet, B. Delley, D. Schaniel, N. Mockus, T. Woike, K. Fejfarova, V. Petricek and M. Dusek, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, 2009, **65**, 612; (c) B. Cormary, S. Ladeira, K. Jacob, P. G. Lacroix, T. Woike, D. Schaniel and I. Malfant, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 7492.
- 5 *Photorefractive materials and their application*, ed. P. Günter and J. P. Huignard, Springer, Berlin, 1988.
- 6 T. Woike, W. Kirchner, G. Shetter, T. Barthel, K. Hyung-sang and S. Haussühl, *Opt. Commun.*, 1994, **106**, 6.
- 7 J. Ashley, M.-P. Bernal, G. W. Burr, H. Coufal, H. Guenther, J. A. Hoffnagle, C. M. Jefferson, B. Marcus, R. M. Macfarlane and R. M. Shelby, *IBM J. Res. Dev.*, 2000, **44**, 341.
- 8 S. Kawata and Y. Kawata, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 1777.
- 9 L. J. Ignarro, *Nitric oxide biology and pathobiology*, Academic Press, San Diego, 1st edn, 2000.
- 10 S. Singh and A. K. Gupta, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **67**, 1211.
- 11 Dialing “ruthenium nitrosyl” as a key word in the SciFinder data base leads to a number of annual entries within the general topic of “NO’ release”, which was roughly multiplied by 5 during the last 20 years.
- 12 H. J. Xiang, M. Guo and J. G. Liu, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, 1586–1595.
- 13 V. Jiang and H. Berke, Nitrosyl Complexes in Inorganic Chemistry, Biochemistry and Medicine, in *Structure and Bonding (special issue)*, ed. D. Michael and P. Mingos, Springer, Berlin, Germany, 2014, vol. 153–154.
- 14 P. C. Ford, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 190–200.
- 15 For recent reports on NO’ release from ruthenium nitrosyl complexes, see: (a) A. A. Mikhailov, V. A. Vorobyev, V. A. Nadolinny, Y. V. Patrushev, Y. S. Yudina and G. A. Kostin, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2019, **373**, 37–44; (b) E. Orłowska, M. V. Babak, O. Doemoetoer, E. A. Enyedy, P. Rapta, M. Zalibera, L. Bucinsky, M. Malcek, C. Govind, V. Karunakaran, Y. C. S. Farid, T. E. McDonnell, D. Luneau, D. Schaniel, W. H. Ang and V. B. Arion, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 10702–10717; (c) M. A. Crisalli, L. P. Franco, B. R. Silva, A. K. M. Holanda, L. M. Bendhack, R. S. Da Silva and P. C. Ford, *J. Coord. Chem.*, 2018, **71**, 1690–1703; (d) R. Kumar, S. Kumar, M. Bala, A. Ratnam, U. P. Singh and K. J. Ghosh, *Organomet. Chem.*, 2018, **863**, 77–83; (e) M. Guo, H. J. Xiang, Y. Wang, Q. L. Zhang, L. An, S. P. Yang, Y. Ma, Y. Wang and J. G. Liu, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 3253–3256.
- 16 (a) J. Akl, I. Sasaki, P. G. Lacroix, I. Malfant, S. Mallet-Ladeira, P. Vicendo, N. Farfán and R. Santillan, *Dalton Trans.*, 2014, **45**, 12721; (b) J. Akl, I. Sasaki, P. G. Lacroix, V. Hugues, P. Vivendo, M. Bocé, S. Mallet-Ladeira, M. Blanchard-Desce and I. Malfant, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 1484.
- 17 S. Amabilino, M. Tassé, P. G. Lacroix, S. Mallet-Ladeira, V. Pimienta, J. Akl, I. Sasaki and I. Malfant, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 7371.
- 18 M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning and H. L. Anderson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 3244.
- 19 B. Strehmel and V. Strehmel, Two-photon physical, organic, and polymer chemistry: theory, techniques, chromophore design, and applications, in *Advances in Photochemistry*, ed. D. C. Neckers, W. S. Jenks and T. Wolff, J. Wiley & Sons, Inc., 2007, vol. 29, pp. 111–341.
- 20 E. W. Van Stryland and M. Sheik-Bahae, in *Characterization Techniques and Tabulations for Organic Nonlinear Materials*, ed. M. G. Kuzyk and C. W. Dirk, Marcel Dekker, Inc., 1998, pp. 655–682.
- 21 (a) A. Enriquez-Cabrera, I. Sasaki, V. Bukhanko, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, P. G. Lacroix, R. M. Barba-Barba, G. Ramos, N. Farfán, Z. Voitenko and I. Malfant, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, 1446; (b) A. Enriquez-Cabrera, P. G. Lacroix, I. Sasaki, S. Malet-Ladeira, N. Farfan, R. M. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz and I. Malfant, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2018, 531; (c) M. Roose, I. Sasaki, V. Bukhanko, S. Mallet-Ladeira, R. M. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz, A. Enriquez-Cabrera, N. Farfán, P. G. Lacroix and I. Malfant, *Polyhedron*, 2018, **151**, 100.
- 22 C. B. Marble, J. E. Clary, G. D. Noojin, S. P. O’Connor, D. T. Nodurft, A. W. Wharmby, B. A. Rockwell, M. O. Scully and V. V. Yakovlev, *Opt. Lett.*, 2018, **43**, 4196.
- 23 A. V. Sokolov, L. M. Naveira, M. P. Poudel, J. Strohaber, C. S. Trendafilova, W. C. Buck, J. Wang, B. D. Strycker, C. Wang, H. Schuessler, A. Kolomenskii and G. W. Kattawar, *Appl. Opt.*, 2010, **49**, 513.
- 24 K. Kamada, K. Matsunaga, A. Yoshino and K. Ohta, *J. Opt. Soc. Am. B*, 2003, **20**, 529.
- 25 A. Dragonmir, J. G. McInerney and D. N. Nikogosyan, *Appl. Opt.*, 2002, **41**, 4365.
- 26 M. Bocé, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, F. Pillet, C. Da Silva, P. Vicendo, P. G. Lacroix, I. Malfant and M. P. Rols, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 1.
- 27 W. Zecher and F. Kröhnke, *Chem. Ber.*, 1961, **94**, 690.
- 28 J. Wang and G. S. Hanan, *Synlett*, 2005, 1251.
- 29 D. H. McDaniel and H. C. Brown, *J. Org. Chem.*, 1958, **23**, 420.
- 30 J. H. Enemark and R. D. Feltham, *Coord. Chem. Rev.*, 1974, **13**, 339.
- 31 M. O. Sinnokrot and C. D. Sherrill, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 10200.
- 32 S. E. Wheeler and J. W. G. Bloom, *J. Phys. Chem. A*, 2014, **118**, 6133.
- 33 J. B. Godwin and T. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1971, **10**, 471.
- 34 K. Karidi, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, M. Lutz, L. Spek and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10282.
- 35 T. Hirano, K. Ueda, M. Mukaida, H. Nagao and T. Oi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 2341.
- 36 I. Sasaki, S. Amabilino, S. Mallet-Ladeira, M. Tassé, A. Sournia-Saquet, P. G. Lacroix and I. Malfant, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 11241.

- 37 D. Tsikas, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, **851**, 51.
- 38 J. Liu, Q. Duan, J. Wang, Z. Song, X. Qiao and H. J. Wang, *Biomed. Opt.*, 2015, **20**, 1.
- 39 M. N. Patel, D. S. Gandhi, P. A. Parmar and H. N. Joshi, *J. Coord. Chem.*, 2012, **65**, 1926.
- 40 S. S. M. Fernandes, M. Belsley, C. Ciarrocchi, M. Licchelli and M. M. M. Raposo, *Dyes Pigm.*, 2018, **150**, 49.
- 41 P. Labra-Vázquez, A. Z. Lugo-Aranda, M. Arcos-Ramos, R. Maldonado-Domínguez, M. d. P. Carreon-Castro, R. Santillan and N. Farfán, *J. Mol. Struct.*, 2015, **1101**, 116.
- 42 P. Labra-Vázquez, M. Palma-Contreras, R. Santillan and N. Farfán, *J. Mol. Struct.*, 2017, **1131**, 156.
- 43 Bruker, *SADABS*, Bruker AXS Inc., Madison, WI, 2005.
- 44 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Adv.*, 2015, **71**, 3.
- 45 L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 786.
- 46 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 2008, **64**, 112.
- 47 P. W. Betteridge, J. R. Carruthers, R. I. Cooper, K. Prout and D. J. Watkin, *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, **36**, 1487.
- 48 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2016.
- 49 M. J. Rose and P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 6904–6917.
- 50 P. Hirva, M. Haukka, M. Jakonen and M. A. Moreno, *J. Mol. Model.*, 2008, **14**, 171–181.
- 51 A. W. Ehlers, M. Böhme, S. Dapprich, A. Gobbi, A. Höllwarth, V. Jonas, K. L. Köhler, R. Stegmann, A. Vedkamp and G. Frenking, *Chem. Phys. Lett.*, 1993, **208**, 111–114.
- 52 J. Tomasi, B. Mennucci and R. Cammi, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2999.
- 53 D. Laurent and D. Jacquemin, *Int. J. Quantum Chem.*, 2013, **113**, 2019.
- 54 A. R. Allouche, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 174.
- 55 *GABEDIT*: <http://gabedit.sourceforge.net/>.
- 56 V. Pimienta, C. Frouté, M. H. Deniel, D. Lavabre, R. Guglielmetti and J. C. Micheau, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1999, **122**, 199 (ref. 35).
- 57 Sa3.3 software can be downloaded at <http://cinetchim.pagesperso-orange.fr/>.



Vibrational, structural and electronic study of a pyridinium salt assisted by SXR D studies and DFT calculations

Pablo Labra-Vázquez^a, Miguel Palma-Contreras^a, Rosa Santillan^b, Norberto Farfán^{a,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., Mexico

^b Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D.F., Apdo, Postal 14-740, 07000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2016

Received in revised form

8 November 2016

Accepted 10 November 2016

Available online 14 November 2016

Keywords:

Pyridinium salt

Polypyridyl compounds

Non-linear optics

DFT

X-ray diffraction

ABSTRACT

The molecular structure of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (C₁₂H₁₁IN₂O) is discussed using an experimental (FT-IR/ATR, NMR, SXR D) and theoretical (DFT, B3LYP/6-311G**) approach. Compound **2** crystallized in the monoclinic *P2₁/c* space group with 4 molecules per unit cell and unit cell dimensions *a* = 7.5629 Å (3), *b* = 21.5694 Å (7), *c* = 7.8166 Å (3). The crystal packing is governed by ion-dipole contacts and π - π stacking. High electrostatic potential at the ethanone hydrogens was derived from DFT calculations, further explaining the acidity and reactivity of the molecule as a Michael donor.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pyridinium salts are heterocycles bearing a quaternary (usually alkylated or acylated) annular nitrogen. The positive charge delocalized within the ring confers these compounds unique chemical and physical properties that have been exploited in diverse areas. Relevant applications include numerous synthetic strategies to obtain and modify a myriad of heterocycles [1–5], as well as improvements in the development of amphiphilic polymers [6,7] and advanced organoelectronic [8,9] and photonic [10] materials.

The reactivity of pyridinium salts has been at the focus of intense research since the early 60's. The first investigations by the group of F. Kröhnke, reported that these compounds could be cleaved to yield aromatic amines or enamines, and that the pyridinium group could also be used as a leaving group in S_N2 reactions [11]. Such observations paved the way to the report by Zecher and Kröhnke of their famous pyridine synthesis from pyridinium salts and α,β -unsaturated ketones [12], that has become one of the most used synthetic methodologies for pyridine-containing organic compounds.

Particularly, 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide

has been widely employed as Michael donor in the synthesis of 2,2'-bipyridines (bpy) and 2,2':6,2''-terpyridines (tpy), among other polypyridyl ligands (Scheme 1) [13]. However, a common issue in the synthesis of these compounds is the concomitant formation of colored by-products that significantly lower the yields, particularly when the α,β -unsaturated carbonyl counterpart is poorly activated towards 1,4-addition, i.e. when electron donating groups are present. Only few studies dealing with this issue have been published, with kinetic factors usually invoked (stoichiometry or concentration) to explain the formation of such species [14–16].

As part of our ongoing program on devising efficient nitric oxide (NO) photo-releasing Ru(II) tpy complexes [17–19], we became interested in further unveiling the factors that affect the overall synthetic yields of the tpy ligands *via* the Kröhnke route. To date, this remains poorly described although the reactivity of the Michael donor is expected to play a pivotal role. Thus, herein we report a structural study of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide comprising vibrational, spectral and theoretical approaches.

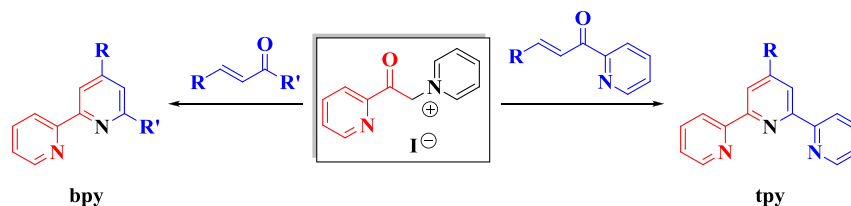
2. Results and discussion

2.1. Synthesis and NMR characterization

Treatment of 2-acetylpyridine (**1**) with a solution of iodine in

* Corresponding author.

E-mail address: norberto.farfán@gmail.com (N. Farfán).



Scheme 1. Use of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (center) as Michael donor in the synthesis of 2,2'-bipyridine (bpy) and 2,2':6',2''-terpyridine (tpy) ligands.

pyridine followed by heating to reflux, yielded the corresponding pyridinium salt (**2**) in moderate yields via an Ortoleva-King reaction (Scheme 2). The identity of the compound was confirmed by high resolution mass spectrometry, showing a peak at m/z 199.0869 for the $[M-I]^+$ ion.

The ^1H NMR spectrum of **2** is characterized by the signal of the methylene hydrogens (H-4), appearing as a highly deshielded singlet at $\delta = 6.52$ ppm due to negative inductive effects from both the carbonyl group and the quaternary nitrogen of the pyridinium ring. The COSY (^1H - ^1H) experiment allowed the distinction of two unique spin systems corresponding to the pyridine (H-7 to H-10) and pyridinium (H-1 to H-3) rings. Given the lack of overlap between the signals from these spin systems and the magnetic equivalence of hydrogens within the pyridinium ring a straightforward and unequivocal assignment of the ^1H NMR signals was achieved.

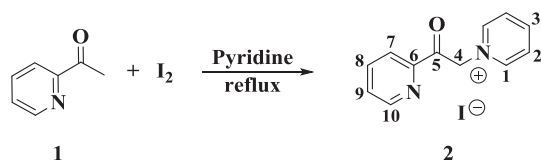
In a similar manner, the ^{13}C NMR spectrum of **2** showed characteristic signals at $\delta = 67.18$ and $\delta = 192.05$ ppm as expected for the methylene (C-4) and the carbonyl group (C-5) resonances, correspondingly. Of particular relevance was the presence of through-bond spin states transmission between hydrogens H-7/H-4 and the carbonyl group (C-5) and between the methylene carbon (C-4) and the *ortho* hydrogens of the pyridinium ring (H-1), both correlations derived from the HMBC (^1H - ^{13}C) experiment further confirmed the NMR assignments.

Unambiguous assignment of the ^1H and ^{13}C chemical shifts of compound **2** was performed with the aid of 2D-NMR techniques, including homonuclear (^1H - ^1H) COSY/NOESY and heteronuclear (^1H - ^{13}C) HSQC/HMBC experiments. Fig. 1 summarizes the most relevant interactions observed.

2.2. Structural analysis from X-Ray diffraction and DFT studies

Compound **2** crystallized in the monoclinic $P2_1/c$ space group with 4 molecules per unit cell. As depicted in Fig. 2, the acylpyridine fragment adopts a *transoid* conformation, which may be attributed to electronic repulsion between the lone pairs of the oxygen in the carbonyl group and those in the annular nitrogen of the pyridine ring. Crystal data and structure refinement details are listed in Table 1.

It can be seen that in the solid state conformer of compound **2**, the pyridine and ethanone moieties are nearly coplanar, with a minimal torsion angle of 0.38° (C7-C6-C5-C4). The most remarkable deviations from planarity arise from a 69.13° dihedral angle



Scheme 2. Synthesis and numbering of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**).

formed between the planes containing the pyridinium (C-1 to C-3) and pyridine (C-6 to C-8) rings (Fig. 3) and from a 13.73° torsion angle (C6-C5-C4-N).

The main intermolecular interactions occurring within the crystal lattice of compound **2** are (a) π - π stacking between two adjacent pyridinium rings with anti-parallel arrangement (3.718 Å inter-centroid distance) and (b) ion-dipole contacts between an iodine atom and both H-4 (3.062 Å) and C-5 (3.635 Å). Due to these interactions, compound **2** exhibits a centrosymmetric arrangement of infinite alternating pairs of pyridinium salts with face-to-face orientation (Fig. 4).

The geometry of compound **2** was optimized at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory, with the crystal structure geometry used as input. Main deviations from the solid state conformation (Fig. 5) were observed in (a) the interplanar angle between the planes containing the pyridinium (C-1 to C-3) and pyridine (C-6 to C-8) rings (solid state: 69.13° , DFT: 54.75°) and (b) the distance between the pyridinium ring centroid and the iodide counterion (solid state: 4.749 Å, DFT: 3.847 Å).

2.3. Vibrational assignments

Vibrational modes of compound **2** were studied by solid-state FT-IR (ATR) spectroscopy and analytical DFT computation of both the IR and RAMAN spectra at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory from the equilibrium geometry. As expected for a molecule with 27 atoms and C_1 symmetry, 75 normal modes are predicted by the DFT computation, all of which are expected to be IR and Raman active. A comparison between the experimental and predicted IR spectra is shown in Fig. 6.

As depicted in Fig. 7, although the DFT method employed overestimated the vibrational frequencies, a good correlation between the experimental and theoretical values was found, ensuring the reliability of the computed frequencies.

Further improvement was achieved using an appropriate scaling factor of 0.967 [20]. Supplementary Table S1 shows the full final frequencies and intensities of the vibrational modes of compound **2**, along with their assignments aided by the total energy distribution (TED) calculation as implemented in VEDA 4 computer program [21].

2.3.1. C-H and C-C vibrations

The methylene $-\text{CH}_2-$ fragment in the ethanone moiety of compound **2** gives rise to six fundamental vibrations, exhibiting out of phase C-H stretching at $\tilde{\nu} = 3045$ and $\tilde{\nu} = 2832$ cm^{-1} and HCH in phase bending at $\tilde{\nu} = 1404$ cm^{-1} . Lower frequency vibrations, namely the wagging, twisting and rocking resonate at $\tilde{\nu} = 1332$, $\tilde{\nu} = 1213$ and $\tilde{\nu} = 952$ cm^{-1} , correspondingly.

Vibrational modes involving aromatic hydrogens from the pyridinium and pyridine rings proved ubiquitous in the vibrational spectrum. Vibrations including changes in the C-H bond length lie at the 3262 to 2967 cm^{-1} region as sharp and intense bands. On the other hand, in plane and out of plane HCC bending vibrations spanned from 1631 to 1027 cm^{-1} and from 909 to 417 cm^{-1} ,

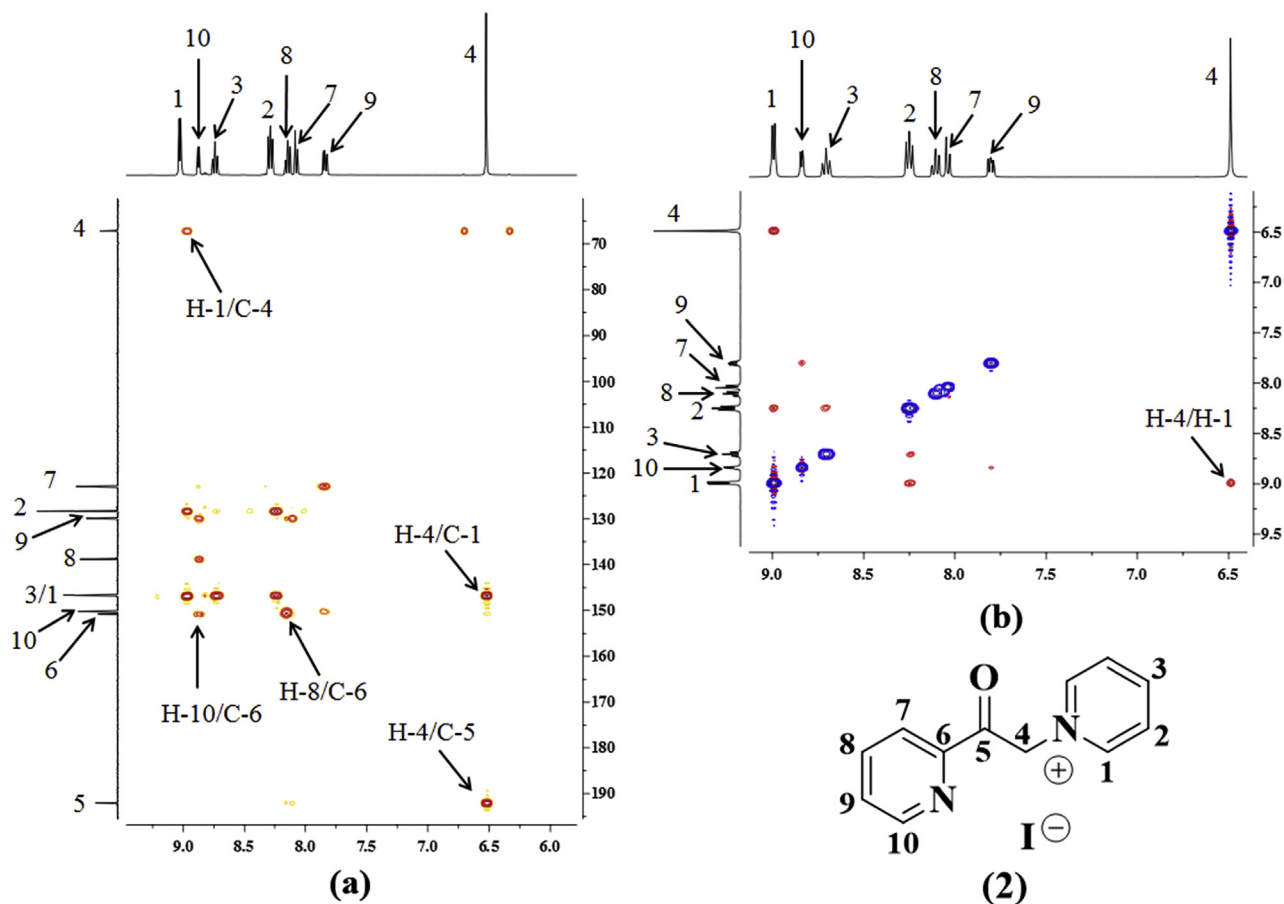


Fig. 1. Relevant 2D-NMR interactions observed in the (a) HMBC (^1H - ^{13}C) and (b) NOESY (^1H - ^1H) experiments for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) (CDCl_3 , 400 MHz).

respectively. These fundamental vibrations constitute mixed normal modes in which the corresponding C=C stretches are constantly involved.

2.3.2. C-N and C-O vibrations

The C=O stretch from compound **2** appears at $\tilde{\nu} = 1711\text{ cm}^{-1}$ as a sharp and strong band, while the C=N bond from the pyridinium ring resonates strongly at $\tilde{\nu} = 1332\text{ cm}^{-1}$.

Additional fundamental vibrations involving these groups occur at lower frequencies. The carbonyl group participates in CCO in plane bending vibrations which originate low energy bands such as those observed at $\tilde{\nu} = 653\text{ cm}^{-1}$ which include the C-6 atom from the pyridine ring according to the DFT calculations, that also predicted OCCO out of plane bends experimentally observed at $\tilde{\nu} = 567$ and $\tilde{\nu} = 417\text{ cm}^{-1}$.

2.4. Non-linear optical analysis

Non-linear optics (NLO) is a research field of increasing interest with potential applications in emerging technologies such as 3D data storage, microfabrication, photonic devices and molecular machines, as well as biological uses, e.g. in two-photon fluorescence imaging and photodynamic therapy [22]. The susceptibility of a material to produce a given NLO phenomenon is related to the macroscopic polarizability of its electron densities, which relies on the local electronic delocalization within the molecule, the molecular dipole moment and the symmetry elements of the bulk materials [23,24].

For second order nonlinear applications, such as second harmonic generation, molecules should ideally possess intense dipole moments (μ), low polarizability coefficients (α), high first order hyperpolarizability coefficients (β) and non-centrosymmetric

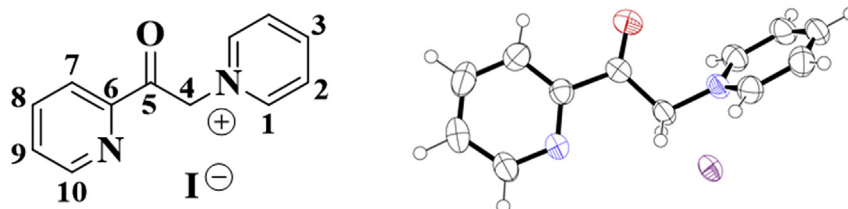
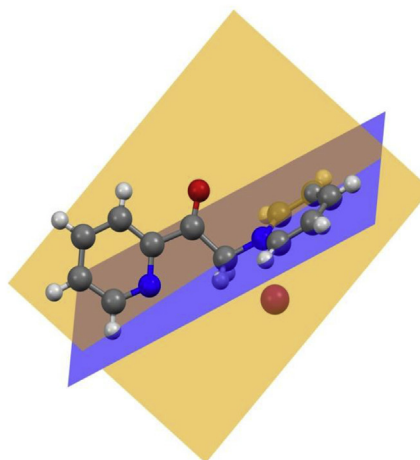
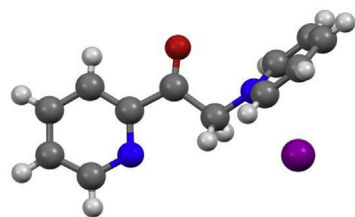
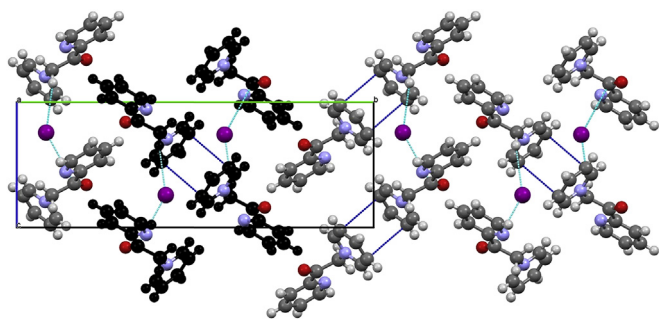


Fig. 2. ORTEP drawing of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) with the thermal ellipsoids drawn at 50% probability for every atom other than hydrogen.

Table 1
Crystal structure and refinement.

Compound	2
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₁ IN ₂ O
Formula weight	326.13
Temperature	293 K
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P2₁/c</i>
a (Å)	7.5629 (3)
b (Å)	21.5694 (7)
c (Å)	7.8166 (3)
α (°)	90.0
β (°)	104.477 (1)
γ (°)	90.0
Volume (Å ³)	1234.61 (8)
Z	4
Density (g·cm ⁻³)	1.755
Crystal size (mm)	0.1 × 0.1 × 0.1
θ Range (°)	2.938 to 27.497
Index ranges	-9 ≤ h ≤ 9, -28 ≤ k ≤ 27, -10 ≤ l ≤ 9
Nref	2835
R (reflections)	0.0237 (2474)
wR ₂ (reflections)	0.0604 (2816)

**Fig. 3.** Dihedral angle formed between the planes containing the pyridinium and pyridine rings in compound **2**.**Fig. 4.** Crystal structure of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) viewed along the crystallographic *a* axis.

supramolecular architectures, among other desired macroscopic features like high transparency in the visible spectrum and thermal stability of the molecular materials [23].

A DFT study of these parameters was performed for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory from the equilibrium geometry (Table 2). It was

found that the molecule has an intense dipole moment and a moderate β value, i.e. comparable with that of urea ($\beta = 0.3728 \times 10^{-30}$ esu). Such characteristics, along with the potential of using the ethanone-pyridine submolecular fragment as a bidentate ligand, render this compound as an interesting building block for molecular materials with enhanced NLO properties.

2.5. Electronic properties

The electronic absorption spectrum of **2** showed two intense bands at $\lambda = 255$ nm and $\lambda = 450$ nm. Aiming to characterize the electronic transitions involved, the molecule was fully optimized using the triple- ζ 6-311G(d,p) polarized basis set and several DFT functionals; the resulting equilibrium geometries were used in the TD-DFT calculation of the electronic transitions of **2**. As shown in Table 3, none of the calculations with the iodide counterion omitted in the starting geometry were able to reliably reproduce the experimental electronic spectrum, indicating a relevant role of the iodine atom during photoexcitation. Nonetheless, once the full molecule was taken into account, all of the DFT methods predicted

a redshift in the λ_{max} of compound **2**, with the B3LYP hybrid functional yielding the most accurate prediction of the electronic transitions. It may therefore be assumed that the presence of the iodide counterion produces charge stabilization in the molecular ground and first excited states, acting as an electron donor towards the pyridinium ring.

It was also found that the first excited state of compound **2** is mainly populated by the electronic transition between the frontier molecular orbitals (FMOs), namely the highest occupied and lowest unoccupied molecular orbitals (HOMO and LUMO, respectively). As shown in Fig. 8, the HOMO is mainly located at the iodide counterion, whereas the LUMO shows a higher contribution of the pyridine (C-6 to C-10) and ethanone (C-4, C-5) fragments.

The absence of covalent bonds between the submolecular fragments containing each of the FMOs, suggests that the first excited state of **2** is reached *via* through-space electronic polarization from the iodide counterion to the pyridinium ring, this is further confirmed by Natural Bonding Orbital (NBO) analysis of the molecule, that provided a localized description of the involved molecular orbitals and allowed us to characterize this process as an electronic $n-\pi^*$ transition.

The Molecular Electrostatic Potential Map (MEP) for compound

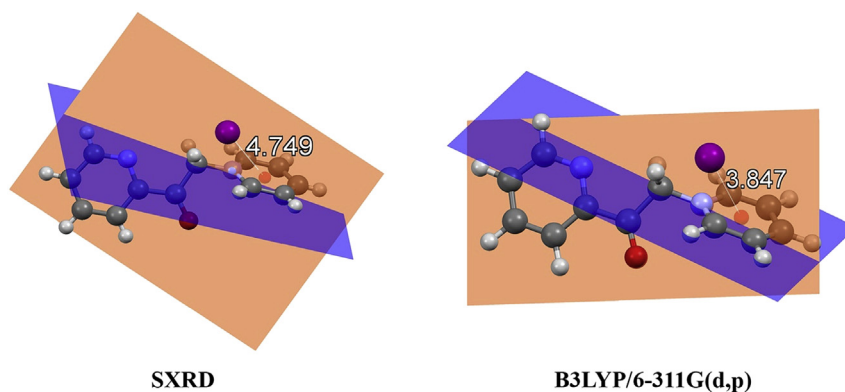


Fig. 5. The solid state and equilibrium conformers of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (2).

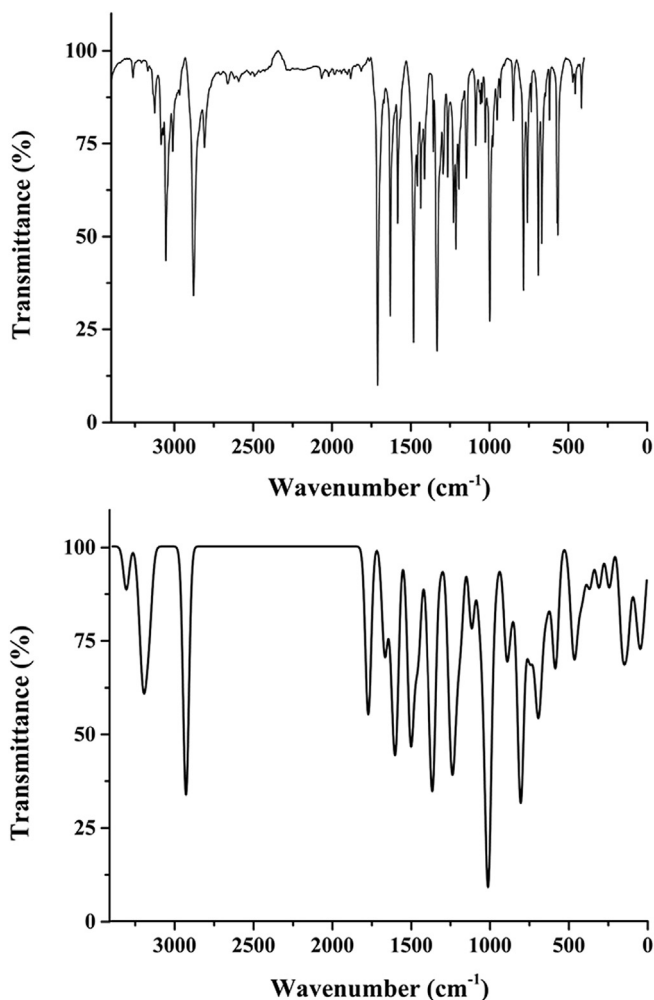


Fig. 6. Experimental (FT-IR/ATR, top) and computed (B3LYP/6-311G**, bottom) vibrational spectra for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (2).

2 is presented in Fig. 9 with the green and blue regions having the strongest repulsion and attraction to negative potential, correspondingly. It can be seen that not only the pyridinium ring and the iodine counterion have a predominant contribution to the HOMO, but also they hold most of the electronic density in the molecule. Moreover, the methylene hydrogens show high electrostatic potential, which helps explaining their remarkable acidity and thus

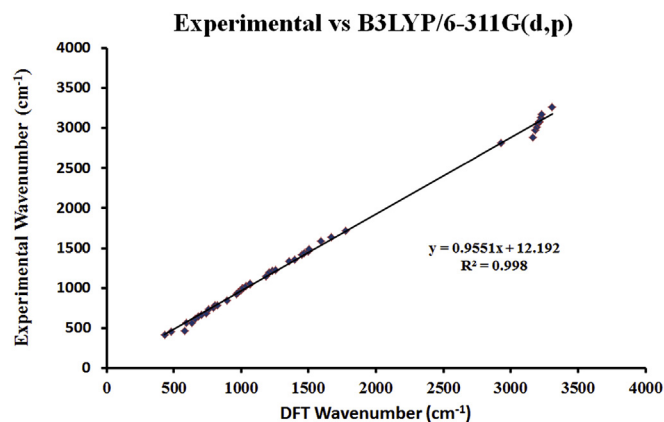


Fig. 7. Experimental FT-IR (ATR) vs computed (B3LYP/6-311G**) frequencies for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (2).

Table 2

Electric dipole moment, linear polarizability and first order hyperpolarizability for compound 2 (B3LYP/6-311G**).

Dipole moment, μ		Polarizability, α		First order hyperpolarizability, β	
Parameter	D	Parameter	esu ($\times 10^{-24}$)	Parameter	esu ($\times 10^{-33}$)
μ_x	-7.6710	α_{xx}	-14.0224	β_{xxx}	-885.1476
μ_y	7.9674	α_{xy}	4.3863	β_{xxy}	114.4244
μ_z	1.3135	α_{yy}	-17.4952	β_{xyy}	366.8940
μ	11.1377	α_{xz}	-0.2859	β_{yyy}	-147.9256
		α_{yz}	0.7187	β_{xxx}	-161.6970
		α_{zz}	-16.4646	β_{xyz}	62.5282
		α_{tot}	24.4832	β_{yyz}	205.4760
				β_{xzz}	200.6097
				β_{yzz}	-96.7801
				β_{zzz}	24.3257
				β_{tot}	415.5692

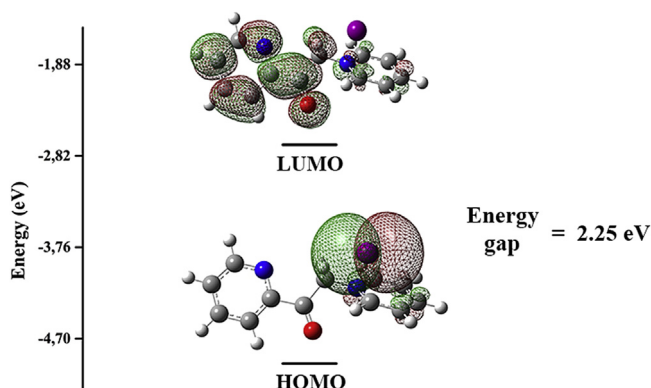
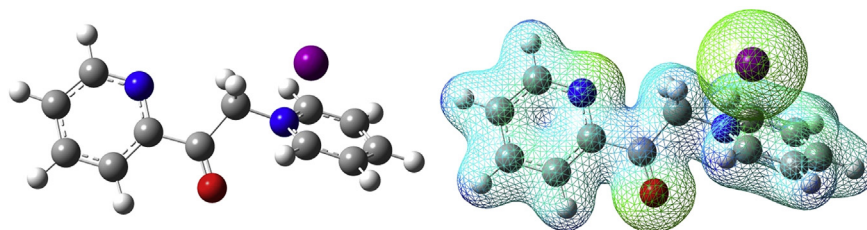
the ability of the molecule to yield the corresponding enolate upon deprotonation, which has been widely used as a Michael donor in 1,4-additions.

3. Conclusions

The molecular structure of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide was studied using a combination of experimental and theoretical approaches. The positive charge delocalized within the pyridinium ring dictates its crystal packing, which is dominated

Table 3Experimental and TD-DFT calculated absorption maxima for pyridinium salt **2** and the cationic fragment [**2-I**]⁺ employing the 6-311G(d,p) basis set (DMSO, nm).

	Experimental	B3LYP	PBE0	ω B97X-D	CAM-B3LYP	M06-2X	LC-BLYP
[2-I] ⁺	—	288	271	242	236	238	229
2	450	414	379	316	316	329	258

**Fig. 8.** Frontier orbitals plots for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) at the B3LYP/6-311G(d,p) level of theory.**Fig. 9.** Molecular Electrostatic Potential map for 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) (B3LYP/6-311G**).

by ion-dipole contacts and π - π stackings. Theoretical calculations show that the molecule holds a moderate first order hyperpolarizability (β) and that its electronic density is mainly located at the pyridinium ring, with high electrostatic potential at the ethanone hydrogens. This helped further understanding the acidity of these nuclei and the readiness of the molecule to act as Michael donor. Further studies dealing with comparing the stability of the enolate formed upon deprotonating this pyridinium salt with that of other Michael donors commonly used in the synthesis of polypyridyl compounds are ongoing.

4. Experimental

4.1. General considerations

Reactions were performed under an atmosphere of nitrogen (chromatographic grade) and monitored by TLC on pre-coated silica gel plates (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄) and spots were visualized by exposure to a UV₂₅₄ lamp. Melting points were measured in a Barnstead Electrothermal 9300 apparatus and are uncorrected. IR experiments were registered in a PerkinElmer Spectrum 400 spectrometer. NMR experiments were recorded in DMSO-*d*₆ solution using a Varian MR-400 instrument; chemical shifts are relative to the residual DMSO-*d*₅ signal, fixed on $\delta = 2.50$ ppm for ¹H and $\delta = 39.52$ ppm for ¹³C. HRMS data was acquired in an Agilent Technologies MS TOF spectrometer. Starting materials were purchased from commercial sources and used without further

purification. Physical and spectral data for compound **2** is in good agreement with that previously reported [25].

1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**). To a solution of iodine (6.0 g, 23.8 mmol) in pyridine (35 mL) was added 2-acetylpyridine (**1**) (2.7 mL, 23.8 mmol) and the mixture was magnetically stirred under reflux for 2 h. The brown solid thus formed was collected, washed with methylene chloride (2 \times 50 mL), coevaporated with toluene (3 \times 20 mL) to remove residual pyridine and dried *in vacuo* to yield 5.85 g (17.9 mmol, 75%) of the title compound as a grayish crystalline solid. Melting point: 189–190 °C (Lit: 188–189) [25]. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.03 (dd, *J* = 6.6, 1.3 Hz, 2H, H-1), 8.88 (ddd, *J* = 4.8, 1.6, 1.4 Hz, 1H, H-10), 8.74 (tt, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, H-3), 8.31–8.27 (m, 2H, H-2), 8.14 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H-8), 8.07 (dt, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H-7), 7.84 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.3 Hz, 1H, H-9), 6.52 (s, 2H, H-4). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.05 (C-5), 150.82 (C-6), 150.18 (C-10),

146.96 (C-3), 146.75 (C-1), 138.81 (C-8), 129.91 (C-9), 128.36 (C-2), 122.92 (C-7), 67.18 (C-4). HRMS (ESI-TOF⁺) *m/z*: [M⁺-I] Observed: 199.0869, required for C₁₂H₁₂N₂O: 199.0866, error: 1.48 ppm.

4.2. X-ray crystal structure determination

Crystals of 1-[2-oxo-2-(2-pyridinyl)ethyl]pyridinium iodide (**2**) suitable for single-crystal X-ray diffraction studies were obtained by room temperature evaporation of a saturated solution of the analyte in dimethyl sulfoxide.

The intensity data were collected on an Enraf Nonius Kappa diffractometer with a CCD area detector ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073$ Å, monochromator: graphite) at 293 K. The crystals were mounted on conventional MicroLoops.™ All heavier atoms were found by Fourier map difference and refined anisotropically. All reflection data set were corrected for Lorentz and polarization effects. The first structure solution was obtained using the SHELXS-97 program and the SHELXL-97 was applied for refinement and output data [26]. All software manipulations were done under the WinGX environment program set [27]. The programs Mercury 3.7 and ORTEP-3 were used to prepare artwork representations [28,29].

CCDC 1500500 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <https://summary.ccdc.cam.ac.uk/structure-summary-form> (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033).

4.3. Computational details

Theoretical calculations were performed within the framework of the Density Functional Theory using the *Gaussian 09W* software package [30]. The triple- ζ 6-311G(d,p) polarized basis set was used for all atoms including iodine [31,32]. Several functionals were tested: B3LYP, PBE0, CAM-B3LYP and the long-range corrected ω B97X-D, LC-BLYP and M06-2X. The popular B3LYP functional yielded the most accurate prediction of the electronic and vibrational spectra and was consequently used to perform the full set of computations from the optimized geometry. Single-Point energies were computed at the same level of theory. TD-DFT computation of excitation energies were achieved in dimethylsulfoxide under the Polarizable Continuum Model.

Acknowledgements

Thanks are due to CONACYT for financial support and the scholarships granted to P.L.-V. (337958) and M.P.-C. (730609) and to PAIP and PAPIIT 216616 for financial support. Authors would like to express their gratitude to M. Romero-Ávila (FQ-UNAM) and M. E. Ochoa (CINVESTAV-IPN) for technical assistance and to M. A. Leyva and G. Cuellar (CINVESTAV-IPN) for X-Ray diffraction studies and HRMS analyses, correspondingly.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.11.033>.

References

- [1] D.L. Comins, A.H. Abdullah, Regioselective addition of Grignard reagents to 1-acylpyridinium salts. A convenient method for the synthesis of 4-alkyl(aryl) pyridines, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 4315–4319.
- [2] R. Yamaguchi, E. Hata, T. Matsuki, M. Kawansi, An efficient regio- and stereoselective synthesis of (+, -)-monomarine I via the highly regioselective.alpha.-alkynylation of a 1-acylpyridinium salt, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 2094–2096.
- [3] T. Damiano, D. Morton, A. Nelson, Photochemical transformations of pyridinium salts: mechanistic studies and applications in synthesis, *Org. Biomol. Chem.* 5 (2007) 2735–2752.
- [4] I. Sasaki, J.-C. Daran, G. Commenges, The simple production of nonsymmetric quaterpyridines through Kröhnke pyridine synthesis, *Beilstein J. Org. Chem.* 11 (2015) 1781–1785.
- [5] M. Ziegler, V. Monney, H. Stoeckli-Evans, A. Von Zelewsky, I. Sasaki, G. Dupic, J.-C. Daran, G.G.A. Balavoine, Complexes of new chiral terpyridyl ligands. Synthesis and characterization of their ruthenium(II) and rhodium(III) complexes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1999) 667–675.
- [6] P. Madaan, V.K. Tyagi, Quaternary pyridinium salts: a review, *J. Oleo Sci.* 57 (2008) 197–215.
- [7] A. Roosjen, J. Šmisterová, C. Driessen, Joachim T. Anders, A. Wagenaar, D. Hoekstra, R. Hulst, Jan B.F.N. Engberts, Synthesis and characteristics of biodegradable pyridinium amphiphiles used for in vitro DNA delivery, *Eur. J. Org. Chem.* 2002 (2002) 1271–1277.
- [8] Z. Liu, H. F. H. Xu, H. Wang, J. Wu, Y. Tian, A- π -D- π -A pyridinium salts: synthesis, crystal structures, two-photon absorption properties and application to biological imaging, *CrystEngComm* 17 (2015) 5562–5568.
- [9] A.K. Nedeltchev, H. Han, P.K. Bhowmik, Solution, thermal and optical properties of novel poly(pyridinium salt)s derived from conjugated pyridine diamines, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 48 (2010) 4408–4418.
- [10] M. Jazbinsek, L. Mutter, P. Gunter, Photonic applications with the organic nonlinear optical crystal DAST, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 14 (2008) 1298–1311.
- [11] F. Kröhnke, Syntheses using pyridinium salts (IV), *Angew. Chem. Int. Ed.* 2 (1963) 380–393.
- [12] W. Zecher, F. Kröhnke, Eine neue Synthese substituierter Pyridine, I. Grundzüge der Synthese, *Chem. Ber.* 94 (1961) 690–697.
- [13] F. Kröhnke, The specific synthesis of pyridines and oligopyridines, *Synthesis* 1 (1976) 1–24.
- [14] P. Korall, A. Börje, P.-O. Norrby, B. Åkermark, High yield preparation of 4'-(4-Bromophenyl)-2,2':6,2''-terpyridine by a condensation reaction. Determination of the stereochemistry of two complex by-products by a combination of molecular mechanics and NMR spectroscopy, *Acta Chem. Scand.* 51 (1997) 760–766.
- [15] E.C. Constable, G. Zhang, C.E. Housecroft, M. Neuburger, S. Schaffner, Phase-separated hydrogen-bonded chloride ion–water–oxonium ion sheets and protonated 4'-(4-bromophenyl)-2,2':6,2''-terpyridine stacks, and condensation products of 2-acetylpyridine and benzaldehydes revisited, *CrystEngComm* 11 (2009) 1014–1021.
- [16] U. Siemeling, J. Vor der Brüggel, U. Vorfeld, A. Stammler, H.-G. Stammler, Large scale synthesis of 4'-(4-Bromophenyl)-2,2':6,2''-terpyridine and nature of the mysterious green by-product, *Z. Naturforsch.* 58b (2003) 443–446.
- [17] J. Akl, C. Billot, P.G. Lacroix, I. Sasaki, S. Mallet-Ladeira, I. Malfant, R. Arcos-Ramos, M. Romero, N. Farfán, Molecular materials for switchable nonlinear optics in solid state, based on Ruthenium-nitrosyl complexes, *New J. Chem.* 37 (2013) 3518–3527.
- [18] J. Akl, I. Sasaki, P.G. Lacroix, I. Malfant, S. Mallet-Ladeira, P. Vicendo, N. Farfán, R. Santillan, Comparative photo-release of nitric oxide from isomers of substituted terpyridinenitrosylruthenium (II) complexes: experimental and computational investigations, *Dalton Trans.* 43 (2014) 12721–12733.
- [19] P. Labra-Vázquez, A.Z. Lugo-Aranda, M. Maldonado-Domínguez, R. Arcos-Ramos, M.d.P. Carreon-Castro, R. Santillan, N. Farfán, On the molecular structure of (E)-3-(9H-fluoren-2-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-en-1-one, theoretical calculations and SXRD studies, *J. Mol. Struct.* 1101 (2015) 116–123.
- [20] A.P. Scott, L. Radom, Harmonic vibrational Frequencies: an evaluation of Hartree–Fock, Møller–Plesset, quadratic configuration interaction, density functional theory, and semiempirical scale factors, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16502–16513.
- [21] M.H. Jamroz, *Vibrational Energy Distribution Analysis VEDA 4*, Warsaw, 2004.
- [22] M. Pawlicki, H.A. Collins, R.G. Denning, H.L. Anderson, Two-photon absorption and the design of two-photon dyes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 3244–3266.
- [23] T.P. Radhakrishnan, Molecular structure, symmetry, and shape as design elements in the fabrication of molecular crystals for second harmonic generation and the role of molecules-in-materials, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008).
- [24] G.S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, P.N. Prasad, Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 1245–1330.
- [25] F. Kröhnke, K.F. Gross, Beispiele zur King-Reaktion, *Chem. Ber.* 92 (1959) 22–36.
- [26] G. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A* 64 (2008) 112–122.
- [27] L.J. Farrugia, WingGX suite for single crystal small molecule crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [28] C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J.V.D. Streek, Mercury: visualization and analysis of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 39 (2006) 453–457.
- [29] L.J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows-a version of ORTEP-III with graphical user interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [30] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, M.J. J. A., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adam, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc, Wallingford CT, 2009.
- [31] D. Feller, The role of databases in support of computational chemistry calculations, *J. Comput. Chem.* 17 (1996) 1571–1586.
- [32] K.L. Schuchardt, B.T. Didier, T. Elsethagen, L. Sun, V. Gurumoorthi, J. Chase, J. Li, T.L. Windus, Basis set Exchange: a community database for computational sciences, *J. Chem. Inf. Model.* 47 (2007) 1045–1052.