



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LIGANTES  $\pi$ -EXPANSIVOS CICLOMETALADOS SOBRE LA  
ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE COMPLEJOS DE RUTENIO(II)**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Jorge Andrés Solís Ruiz

TUTOR DR. RONAN LE LAGADEC  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LIGANTES  $\pi$ -EXPANSIVOS CICLOMETALADOS  
SOBRE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE COMPLEJOS DE  
RUTENIO(II)**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. Jorge Andrés Solís Ruiz**

**DR. RONAN LE LAGADEC  
INSTITUTO DE QUÍMICA**



Ciudad de México, marzo de 2020

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens	Facultad de Química, UNAM
Vocal Dr. Anatoly Yatsimirsky	Facultad de Química, UNAM
Vocal Dr. Jean Michel Grevy Macquart	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Vocal Dr. David Morales Morales	Instituto de Química, UNAM
Secretario Dr. José Ivan Castillo Pérez	Instituto de Química, UNAM

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio de Química Inorgánica 2

Instituto de Química, UNAM

## **NOMBRE DEL TUTOR**

Dr. Ronan Le Lagadec

## **SUSTENTANTE**

M. en C. Jorge Andrés Solís Ruiz

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que siempre han estado conmigo

A Naty por ser parte fundamental en esta etapa de mi vida

En especial a mi madre, por su apoyo y por sus humildes pero sabios consejos:

*“Lo que tiene que ser, será... a su tiempo y en su momento; solo hay que confiar y esperar con paciencia”*

*...siempre lo tendré presente.*

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM quien me formó como profesional.

Al Dr. Ronan Le Lagadec, por haber confiado en mí, pero sobre todo por su amistad.

A Natalia Muñoz por su valioso apoyo durante la escritura de esta tesis, pero sobre todo por su paciencia hacia mí

A mi comité tutor el Dr. Ronan Le Lagadec, el Dr. Juventino García Alejandre y el Dr. Ivan Castillo Pérez por la paciencia, guía y sus importantes consejos.

Al Dr. Christian Gaidon y su grupo de trabajo por permitirme colaborar en una estancia de investigación en Estrasburgo, Francia.

A los miembros del jurado por sus aportaciones a este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros que conocí en Inorgánica 2.

A los técnicos de los laboratorios M. en C. Virginia Gómez Vidales y la Q. María de la Paz Orta Pérez

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el proyecto A1-S-15068 y por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (CVU/BECARIO 486695/277723), así como una beca mixta para una estancia de investigación en Estrasburgo, Francia.

A ECOS Nord (Proyecto 279063), por la beca otorgada durante la estancia de investigación en Estrasburgo, Francia.

DGAPA-PAPIIT por los proyectos IN-207316 y IN-207419

Al programa de maestría y doctorado en ciencias químicas por el financiamiento para presentar este proyecto en el participar en el 8° Encuentro de Química Inorgánica, septiembre de 2017. Hermosillo, Sonora, México.

Parte del trabajo desarrollado en esta tesis está contenido en el artículo:

Solís-Ruiz, J. A.; Barthe, A.; Riegel, G.; Saavedra-Díaz, R. O.; Gaiddon, C.; Le Lagadec, R. Light Activation of Cyclometalated Ruthenium Complexes Drives towards Caspase 3 Dependent Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, 208, 111080. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111080>.

El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

Poster 5° Simposio Latino Americano de Química Inorgánica Biológica, octubre 2016. Querétaro México.

Poster: 8° Encuentro de Química Inorgánica, septiembre de 2017. Hermosillo, Sonora, México.

Poster: Simposio del 75 Aniversario del Instituto de Química, UNAM, 2016.

Poster: Simposio Interno del Instituto de Química, UNAM, 2017, 2019.

## Abstract

Since the discovery of cisplatin, the synthesis of metal-based drugs has become one of the most active fields in the investigation of antitumor chemotherapy. Platinum derivatives exert their cytotoxic properties through the formation of adducts with DNA that result in cell death. However, they present severe side effects such as neurotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity. At present, ruthenium(II) complexes, such as those synthesized by our working group,  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$  or  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ , have been thoroughly investigated as an alternative to platinum drugs, due to their attractive chemical and biological properties. The purpose of the present study was to evaluate the cytotoxicity of new cyclometalated ruthenium compounds, in two human gastric cancer cell lines before and after being irradiated with visible light and to investigate the influence in the cytotoxicity produced by the  $\pi$ -expansive ligands. Series of organometallic compounds were prepared with an increased  $\pi$  conjugation in the ligand, making use of the cyclometalation reaction. The antitumor properties of the obtained compounds were investigated under light and dark conditions. Several compounds are highly toxic towards gastric cancer cells, in dark conditions, although it was observed that when irradiated with visible light, the cytotoxic activity is enhanced, ( $\text{IC}_{50}$  values = 1.30–0.10  $\mu\text{M}$ ). Therefore, several of the organometallic complexes ruthenium(II) with  $\pi$ -expansive ligands prepared in this work represent a potent class of cytotoxic agents in gastric cancer cell lines such as AGS and KATO III.



## Resumen

Desde el descubrimiento del cisplatino, la síntesis de medicamentos a base de metales se convirtió en uno de los campos más activos en la investigación de la quimioterapia antitumoral. Los derivados del platino ejercen sus propiedades citotóxicas a través de la formación de aductos con el ADN que dan como resultado la muerte celular. Sin embargo, presentan efectos secundarios severos como, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. En la actualidad los complejos de rutenio(II), como los sintetizados por nuestro grupo de trabajo,  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{PF}_6$  o  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ , han sido investigados ampliamente como una alternativa a los medicamentos con platino, debido a que presentan atractivas propiedades químicas y biológicas. El propósito del presente estudio fue evaluar la citotoxicidad de nuevos compuestos ciclometalados de rutenio, en dos líneas celulares de cáncer gástrico humano antes y después de ser irradiados con luz visible e investigar la influencia de los ligantes  $\pi$ -expansivos. Se prepararon series de compuestos organometálicos con un aumento de la conjugación  $\pi$  en el ligante, haciendo uso de la reacción de ciclometalación. Las propiedades antitumorales de los compuestos obtenidos se investigaron en condiciones de luz y oscuridad. Varios compuestos son altamente citotóxicos para células cancerosas, en condiciones de oscuridad. Sin embargo, se observó que al ser irradiados con luz visible, la actividad citotóxica presenta un incremento (valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 1.30 y 0.10  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, varios de los complejos organometálicos de rutenio(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos preparados en este trabajo, representan una potente clase de agentes citotóxicos en líneas celulares de cáncer gástrico como AGS y KATO III.

## ÍNDICE

**Abstract**

**Resumen**

- 1. Introducción**
- 2. Antecedentes**
  - 2.1. El cáncer**
  - 2.2. Tipos de tratamiento para el cáncer**
  - 2.3. Los fármacos de platino en la quimioterapia actual**
  - 2.4. Posibles alternativas para la quimioterapia del cáncer**
  - 2.5. Complejos derivados de rutenio**
  - 2.6. Complejos de rutenio en fases clínicas**
  - 2.7. Compuestos con ligantes  $\pi$ -expansivos**
  - 2.8. Terapia fotodinámica**
- 3. Hipótesis**
- 4. Objetivos**
- 5. Resultados**
  - 5.1. Síntesis y caracterización**
  - 5.2. Cristalografía**
  - 5.3. Estudios electroquímicos**
  - 5.4. Absorción electrónica**
  - 5.5. Estabilidad de los complejos organometálicos**
  - 5.6. Lipofilicidad**
  - 5.7. Citotoxicidad**
  - 5.8. Evaluación de la influencia de la lipofilicidad sobre la citotoxicidad**
  - 5.9. Interacciones con ADN**
  - 5.10. Ensayos de Western blot**
  - 5.11. Especies reactivas de oxígeno**
  - 5.12. Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR**
- 6. Conclusiones**

- 7. Sección experimental**
  - 7.1. Materiales y reactivos**
  - 7.2. Síntesis de los ligantes**
  - 7.3. Síntesis de los complejos**
  - 7.4. Cristalografía**
  - 7.5. Estudios de estabilidad**
  - 7.6. Lipofilicidad**
  - 7.7. Líneas celulares y cultivos de tejido**
  - 7.8. Ensayos de la inhibición celular**
  - 7.9. Interacciones con ADN**
  - 7.10. Ensayos de Western blot**
  - 7.11. Especies reactivas de oxígeno (ROS)**
  - 7.12. Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR**
- 8. Referencias**
- 9. Anexos**

## 1. Introducción

Uno de los componentes más importantes del desarrollo del ser humano es el crecimiento celular. El hombre puede llegar a tener hasta 1000 billones de células aproximadamente, a partir de las sucesivas divisiones después de la fecundación. Cuando el hombre es joven, la multiplicación celular predomina sobre la muerte celular, lo cual se traduce en un aumento de tamaño o crecimiento del ser humano. En el adulto, el proceso de división celular y el de muerte celular se encuentran en equilibrio dando lugar a un estado estacionario, donde el número de células permanece relativamente constante.

En el organismo adulto, no todas las subpoblaciones celulares se comportan de la misma manera. Existen células que abandonan el ciclo celular para diferenciarse y su renovación es escasa o nula, como sucede con las neuronas, a diferencia de otras como las de la piel que se regeneran de manera constante. Finalmente, se encuentra un grupo de células denominado quiescente, es decir, no está en división, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular.<sup>1</sup> La célula puede permanecer en quiescente por días, semanas, o incluso años, sin embargo, puede recibir nuevamente señales, sobre todo extracelulares, y entonces son estimuladas a salir del estado quiescente y entran de nuevo a la fase de crecimiento e iniciar un nuevo ciclo de división.<sup>2</sup> Esto ocurre a las células encargadas de restablecer los linajes hematopoyéticos, o las células hepáticas. Todos éstos, constituyen ejemplos concretos del riguroso control al que se encuentra sometido el crecimiento celular, el cual responde siempre a las necesidades específicas del organismo. Si estos controles que regulan la multiplicación celular no funcionan de manera adecuada, la célula comienza a crecer y a dividirse, aunque no sea necesario. Cuando la descendencia de estas células, heredan la tendencia a proliferar sin control, el resultado es un clon que se expande indefinidamente y se forma un tumor. Estos tumores pueden ser benignos o malignos, los cuales son capaces de invadir y diseminarse hasta llegar a la metástasis.<sup>3</sup>

Las células cancerosas son normalmente células altamente especializadas que han retrocedido a una etapa mucho más simple, más primitiva y que, a diferencia de una célula no cancerosa, se dividen continuamente, aunque de manera ineficiente.

Las células cancerosas a diferencia de las células sanas son más vulnerables a los fármacos contra el cáncer. Sin embargo, los tejidos normales con altos índices mitóticos (por ejemplo, médula ósea, bazo, timo y epitelio intestinal) también son vulnerables a los medicamentos contra el cáncer.<sup>4</sup>

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de casos. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en México se registraron 72,600 casos de muerte en el mismo año, a causa de cáncer.<sup>5</sup>

En la actualidad, el incremento del cáncer se asocia a factores ambientales, como la radiación, la contaminación, exposición a diversos químicos e incluso a la comida que se consume. Sin embargo, hay evidencia de que el cáncer existe desde hace muchos siglos atrás ya que se ha encontrado crecimientos cancerosos en fósiles de dinosaurios.<sup>6</sup> De igual manera existen papiros de los egipcios, escritos entre el siglo XV y XVI antes de Cristo, en los que mencionan la enfermedad. El primer caso documentado de cáncer humano es de hace 2700 años.<sup>7</sup>

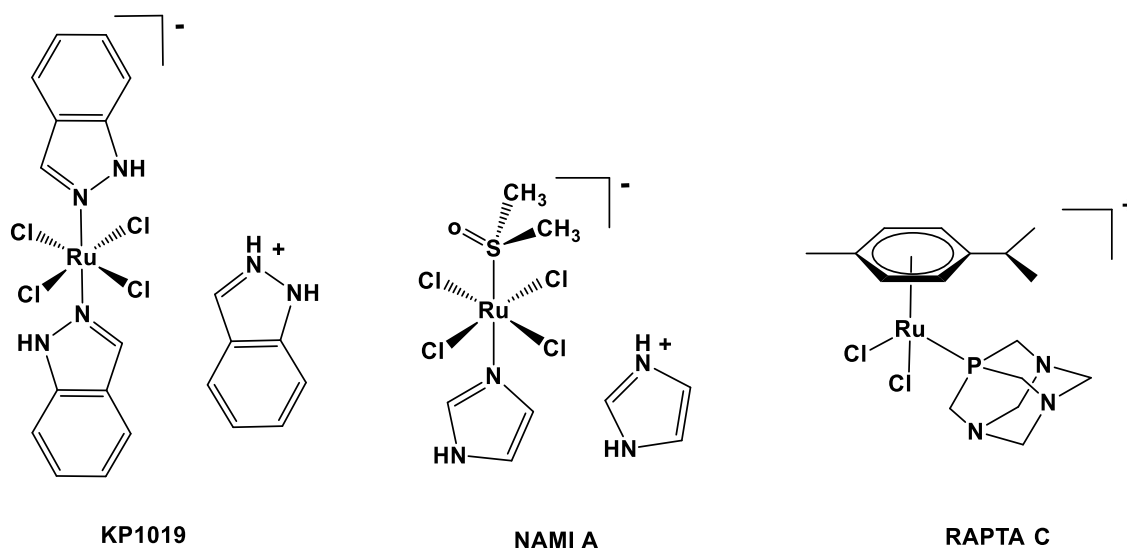
Existen muchos tipos de cáncer, así como distintas causas que lo originan. Debido al panorama anterior, la comunidad científica busca tratamientos que puedan detener, reducir o mejor aún, destruir el tumor canceroso, tendiendo como principal objetivo salvar al mayor número de pacientes y ayudarlos a tener una mejor calidad de vida.

Los medicamentos a base de platino como el cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, son utilizados regularmente en el tratamiento del cáncer. A pesar de ser efectivos, su uso es limitado por sus graves efectos secundarios.<sup>8</sup>

Se han investigado varios complejos de rutenio como una alternativa para la quimioterapia contra el cáncer. Entre algunas de las propiedades conocidas de

estos complejos se ha reportado que tienen disponibilidad de seis sitios de coordinación que conducen a varias combinaciones de ligantes, presentan una lenta velocidad de intercambio de ligantes, una buena estabilidad en un ambiente biológico y una amplia gama de potenciales redox que permite posibles interferencias con macromoléculas biológicas.

Algunos complejos de rutenio como el KP1019 (indazolio- bis-indazoltetracloro- rutenato), RAPTA-C ( $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_{14})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$ ) y NAMI-A (imidazolio trans- imidazol dimetil sulfóxido tetracloro rutenato),<sup>9</sup> (figura 1.1), han demostrado tener propiedades únicas en cuanto a selectividad y actividad antitumoral. Con los resultados obtenidos, se espera que en un futuro cercano, estos complejos de rutenio puedan llegar a ser fármacos autorizados para el tratamiento del cancer.<sup>9</sup>



**Figura 1.1** Algunos complejos de rutenio con actividad antitumoral.

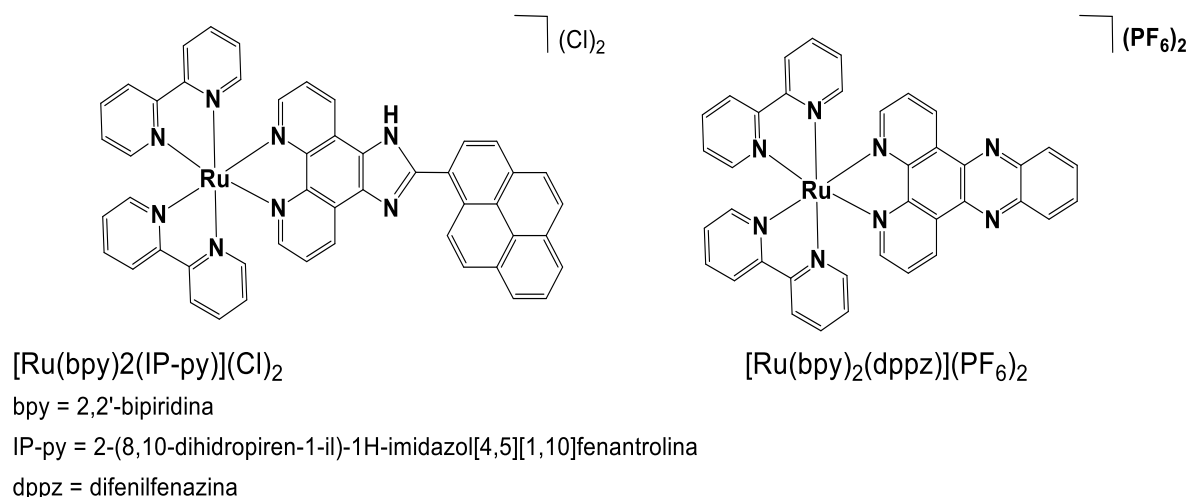
Se sabe que varios grupos de investigación han estudiado compuestos de rutenio(III) organometálicos o de coordinación, como el KP1019 que se aprecia en la figura 1.1, el cual ha llegado a ensayos clínicos de fase II.<sup>10</sup> Con lo anterior, varios grupos de investigación se han enfocado a estudiar la actividad biológica de complejos de Ru(II) y Ru(III).<sup>11</sup>

En investigaciones anteriores, nuestro grupo reportó resultados de ensayos de actividad citotóxica, realizados a células cancerosas con una serie de derivados rutenaciclados. Dichos resultados fueron comparados con los obtenidos con complejos de rutenio y cisplatino ya reportados. En dicho trabajo se evaluó la actividad citotóxica en líneas celulares (A-172, HCT-116 y RDM-4) y se encontró que los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con el compuesto ortorutenado derivado de fenilpiridina que contiene un ligante bidentado N<sup>N</sup>, presenta una actividad de mismo orden de magnitud que el cisplatino.<sup>12</sup> Dicha actividad citotóxica está relacionado con el hecho de que se sabe que los complejos de rutenio que contienen ligantes bipyridina o fenantrolina presentan propiedades anticancerosas.<sup>13, 14</sup>

En varios trabajos en los que colabora nuestro grupo, se han utilizado nuevos compuestos organometálicos de Ru(II) con el objetivo de conocer la actividad biológica que ellos presentan. Se encontró que estos compuestos pueden interactuar con moléculas biológicas, y pueden usarse como mediadores muy eficientes en la transferencia de electrones, hacia o desde sitios activos oxidados o reducidos de enzimas redox.<sup>15-19</sup> Asimismo algunos complejos mostraron una alta citotoxicidad en las células de cáncer de estómago (AGS, KATO III) y colon (HCT116 y SW480).<sup>20</sup> Para complementar los estudios que existen actualmente, hemos sintetizado una serie de ligantes bidentados para preparar una serie de nuevos compuestos ciclometalados de Ru(II) y se han evaluado sus propiedades biológicas, con el objetivo de expandir el conocimiento de la actividad citotóxica al someterlos a luz visible.

Por otra parte y no ajeno al tema que estudiamos, se ha observado en trabajos anteriores con células humanas cancerígenas de leucemia HL-60 y células de melanoma humano SK-MEL-28,<sup>21</sup> que la actividad citotóxica de los compuestos de rutenio ciclometalados con ligantes  $\pi$ -expansivos, (Figura 1.2), aumenta después de ser irradiados con luz visible durante 57 minutos, asimismo se ha encontrado que los compuestos con ligantes  $\pi$ -expansivos, son capaces de generar especies reactivas de oxígeno, ya que el ligante  $\pi$ -expansivo puede

actuar como un fotosensibilizador, el cual en presencia de luz y oxígeno producen oxígeno singlete, capaz de matar a las células cancerosas.<sup>22</sup>



**Figura 1.2** Complejos de polipiridinicos de Ru(II) con ligantes bipyridina y ligantes  $\pi$ -expansivos, capaces de producir especies reactivas de oxígeno al ser irradiados con luz visible.<sup>22</sup>

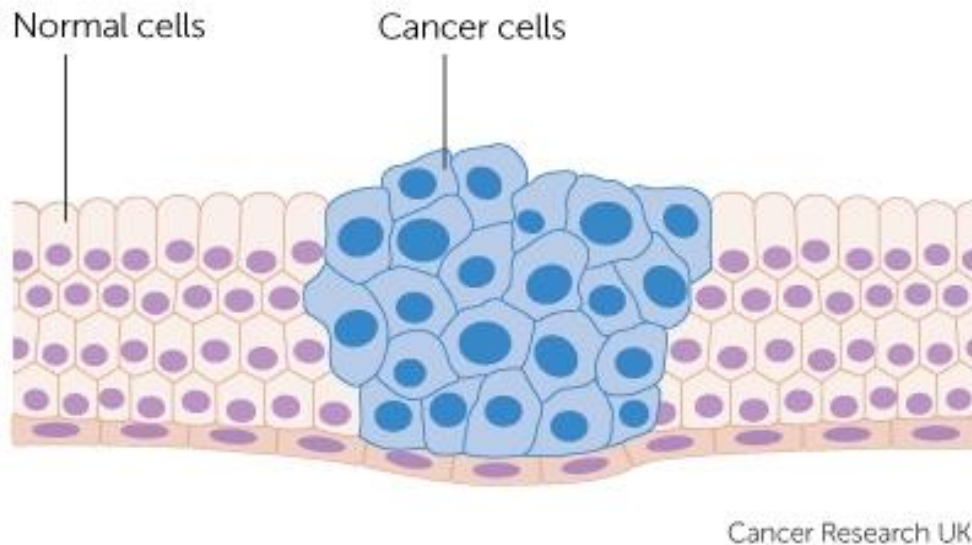
En este trabajo nos enfocamos en comprender el mecanismo de acción para explicar el efecto citotóxico de los complejos organometálicos de rutenio, antes y después de ser irradiados con luz visible. Tomando en cuenta los estudios previos de nuestro grupo,<sup>20</sup> pensamos que los complejos de Ru(II), podrían alterar algunas oxidoreductasas involucradas en procesos cancerosos. Un segundo mecanismo de acción podría ser la interacción del compuesto con el ADN, el cual es un mecanismo de acción ya conocido y que presenta el cisplatino. Lo más importante en este estudio es poder conocer cual o cuales son los mecanismos de acción que se activan con la irradiación con luz visible, conocer cuál es la influencia de los ligantes  $\pi$ -expansivos en el momento de la irradiación, todo con el objetivo de ampliar el campo de estudio de los compuestos organometálicos de Ru(II) y poder conocer cómo actúan biológicamente.



## 2. Antecedentes

### 2.1. El cáncer

El cáncer es una enfermedad que inicia cuando cambios genéticos hacen que una o varias células comiencen a crecer y a multiplicarse sin control hasta formar un tumor, figura 2.1.



**Figura 2.1** División incontrolada de células anormales formando un tumor.

El lugar donde empieza el cáncer se denomina cáncer primario o sitio primario. Las células del sitio primario pueden crecer de manera incontrolable, separarse y extenderse a diferentes tejidos del cuerpo. Estas células que se han separado pueden crecer y formar otros tumores, que se conocen como cánceres secundarios o metástasis. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático. Allí pueden comenzar a convertirse en nuevos tumores.<sup>23</sup>

En términos generales, a nivel mundial, el cáncer es una enfermedad que va en aumento y es considerada como una de las principales causas de muerte. Tan solo en el 2012, se registraron 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de

personas fallecidas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su Informe mundial sobre el cáncer 2014.<sup>24</sup>

Cuatro años después, en 2018, el número de casos de cáncer ascendió a 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes.<sup>25</sup>

El panorama del cáncer en México es similar al que se tiene a nivel mundial, ya que esta enfermedad se posiciona en la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Además, de acuerdo con cálculos de organismos internacionales, los cánceres de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población en general. La Sociedad Mexicana de Oncología considera que las elevadas cifras de muertes por cáncer se deben a los diagnósticos tardíos. El 60% de los casos de cáncer en México es detectado en etapas avanzadas.<sup>26</sup> Para los hombres, los cánceres más mortales son de próstata, de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico, en ese orden; mientras que para las mujeres son el de seno, cervicouterino, de hígado, colorrectal y ovario, en ese orden.<sup>25</sup> Estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud indican que en México, en el 2015, por cada 100 mil habitantes, el cáncer de próstata ocasionó la muerte de 13 varones, en tanto que el de mama provocó 11 decesos de mujeres.<sup>27</sup>

## **2.2. Tipos de tratamiento para el cáncer.**

Durante muchos años los compuestos orgánicos han liderado el campo de la medicina para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en la actualidad la química inorgánica se ha abierto paso en el área de la quimioterapia y en la búsqueda de agentes de diagnóstico, utilizando los metales de transición y la infinidad de complejos que se pueden obtener a partir de ellos, debido a los muchos estados de oxidación que pueden adoptar, sus variados números de coordinación, sus diversas geometrías y la gran cantidad de ligantes con los que se pueden enlazar.<sup>28</sup>

En la actualidad existe una variedad de tratamientos para combatir el cáncer, sin embargo, todos producen efectos secundarios. Uno de ellos es la radiación de haz externo o radioterapia, este actúa atacando a las células cancerosas con altas dosis de radiación, mata o daña las células en un área específica. Otra alternativa es la radiación interna o braquiterapia, la cual utiliza pequeños implantes radiactivos de 5-7 mm de longitud que son introducidos en el cuerpo humano donde se encuentra el tumor. Esta radioactividad mata a las células cancerosas.<sup>29</sup>

La cirugía para extirpar el tumor también es muy utilizada. El objetivo es extraer la mayor cantidad posible del tumor, pero con este tipo de tratamiento, no es posible combatir el cáncer que se ha diseminado o el cáncer que está en la sangre, como la leucemia. Existen otros tipos de cirugía como, por ejemplo, la criocirugía, la cual utiliza nitrógeno líquido o gas argón para congelar el tejido anormal. Se pueden tratar algunos cánceres de piel, retinoblastoma y manchas precancerosas en la piel o cuello uterino. La cirugía con láser utiliza fuertes rayos de luz para cortar el tejido. Es efectiva para áreas muy pequeñas. La luz láser a veces también puede reducir el tamaño de los tumores.<sup>29</sup>

La inmunoterapia, también denominada terapia biológica, o bioterapia, utiliza el sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer, o bien estimula su sistema inmunológico o marca las células cancerosas para que su sistema inmunitario pueda encontrarlas y destruirlas más fácilmente.<sup>29</sup>

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan en más células. Puede causar efectos secundarios porque mata las células del cuerpo que crecen rápidamente, incluidas las de la sangre, la boca, el sistema digestivo y los folículos capilares. Hay más de 100 tipos de medicamentos para la quimioterapia.<sup>29,30</sup>

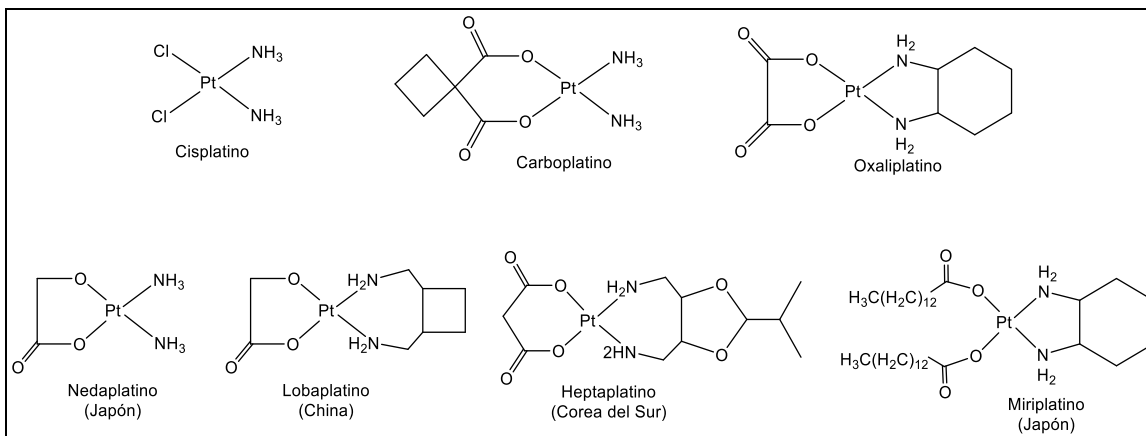
El platino es uno de los metales de transición que se ha usado en fármacos para la quimioterapia. Con este metal se sintetizó el fármaco conocido clínicamente

como cisplatino ( $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ )<sup>31,32</sup> y que ha sido muy exitoso y es utilizado desde 1978.

Con el uso del cisplatino se inició una nueva etapa de tratamientos contra el cáncer. Este fármaco fue descubierto en 1960 por Barnett Rosenberg<sup>33</sup> cuando realizaba estudios sobre el crecimiento de células de *Escherichia coli*, en una disolución amortiguadora de cloruro de amonio. En dichos estudios, notó una disminución de la densidad celular al aplicar una carga eléctrica, producida por unos electrodos de platino inmersos en la disolución. Asimismo, Rosenberg observó que después de un tiempo sin la carga eléctrica, la densidad de la población celular volvía a crecer. Por lo tanto, con estas observaciones pudo determinar que ese efecto era propio de los productos generados por la electrolisis del platino y no del campo eléctrico, que también se generaba. Este indicio fue lo que llevó al descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino.<sup>33</sup>

Después de la aprobación del cisplatino por la FDA (Food and Drug Administration) en 1978, otros compuestos de Pt(II) (Figura 2.2), fueron introducidos en todo el mundo: carboplatino y oxaliplatino, y solo en determinados países se aprobó el uso de los fármacos nedaplatino, lobaplatino, heptaplatino, miriplatino.<sup>34-36</sup>

El cisplatino es un complejo inorgánico que presenta una geometría cuadrada plana. Dicho complejo fue sintetizado en 1845 por Michel Peyrone, posteriormente se logró diferenciar la estructura molecular de los isómeros *cis* y *trans*. Esto dio como resultado, 50 años después, que se sentaran las bases de la teoría de coordinación química, establecida por Alfred Werner, quien fue merecedor del premio Nobel de química en el año 1913.<sup>37, 38</sup>

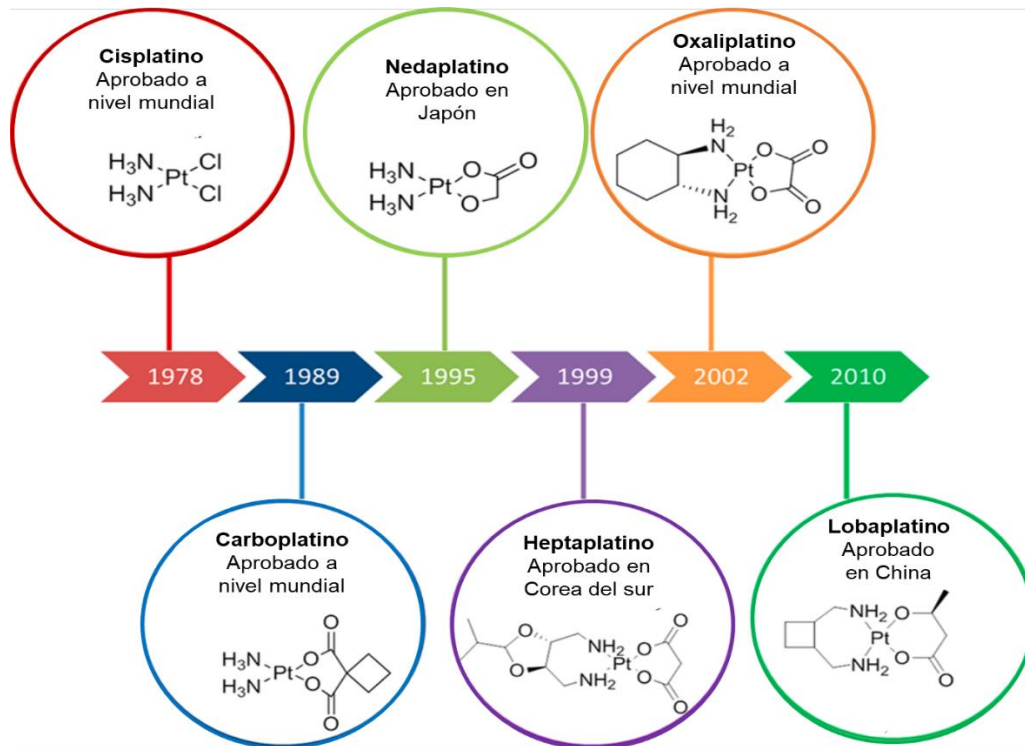


**Figura 2.2** Complejos de Pt(II) aprobados para ser usados en el tratamiento del cáncer, unos a nivel mundial y otros en algunos países.

### 2.3. Los fármacos de platino en la quimioterapia actual

A pesar de haber grandes avances para tratar de combatir esta enfermedad, aún se requieren agentes de quimioterapia de amplio espectro.<sup>36</sup> Los medicamentos de platino constituyen una clase principal de agentes quimioterapéuticos. De hecho, se ha informado que casi la mitad de todos los pacientes con cáncer que requieren quimioterapia son tratados con un medicamento de platino.<sup>39</sup> A pesar de la introducción de cisplatino en el entorno clínico hace más de 40 años, solo tres medicamentos de platino han sido aprobados hasta la fecha a nivel mundial, mientras que otros tres, solamente se usan en Japón, Corea del Sur y China, respectivamente. En la figura 2.3, se muestra un orden cronológico del desarrollo clínico de algunos complejos de platino, que se han abierto paso como agentes quimioterapéuticos.<sup>40</sup>

Dichos agentes de platino carecen de selectividad celular, por lo que las células que proliferan rápidamente, (folículos capilares, médula ósea y tracto gastrointestinal), son particularmente vulnerables a los efectos fuera del objetivo. Esta falta de selectividad celular puede conducir al desarrollo de efectos secundarios.<sup>30, 41</sup>



**Figura 2.3** Evolución histórica de alguno de los complejos de platino más relevantes.

Un paciente puede experimentar varios efectos secundarios <sup>8</sup> como:

- Nefrotoxicidad, la cual es un daño a los riñones que afecta las funciones de filtración, reabsorción y excreción.
- Mielosupresión, esta es una afección en la que disminuye la actividad de la médula ósea, lo que hace que haya menos glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.
- Neurotoxicidad, la cual es el daño causado al sistema nervioso principalmente como neuropatía sensorial periférica.
- Anafilaxia, la cual es una reacción alérgica grave en todo el cuerpo causada por el fármaco.
- Citopenias, las cuales son unas afecciones en la que hay un número de células sanguíneas más bajas que el nivel normal.
- Hepatotoxicidad, daño en las sinusoides hepáticas, vasos sanguíneos que sirven para llevar oxígeno al hígado, tal daño conduce a la dilatación y

obstrucción sinusoidal, lo que resulta en una función hepática reducida con signos visibles en el paciente de dolor abdominal e hinchazón.

- Ototoxicidad, es un daño en el oído interno que da como resultado el deterioro de la audición y el equilibrio del paciente.
- Cardiotoxicidad, toxicidad que afecta al corazón e incluye daño directo al músculo cardíaco o daño indirecto, a través de cambios electrofisiológicos, que afectan el ritmo sinusal del corazón.
- Toxicidad gastrointestinal, produce náuseas y vómitos, diarrea, dolor estomacal y anorexia.
- Alopecia, daño causado a los folículos pilosos que provoca pérdida de cabello.

Los efectos secundarios pueden requerir que a los pacientes se les prescriban reducciones de dosis en sus medicamentos de platino de entre 25 y 100%.

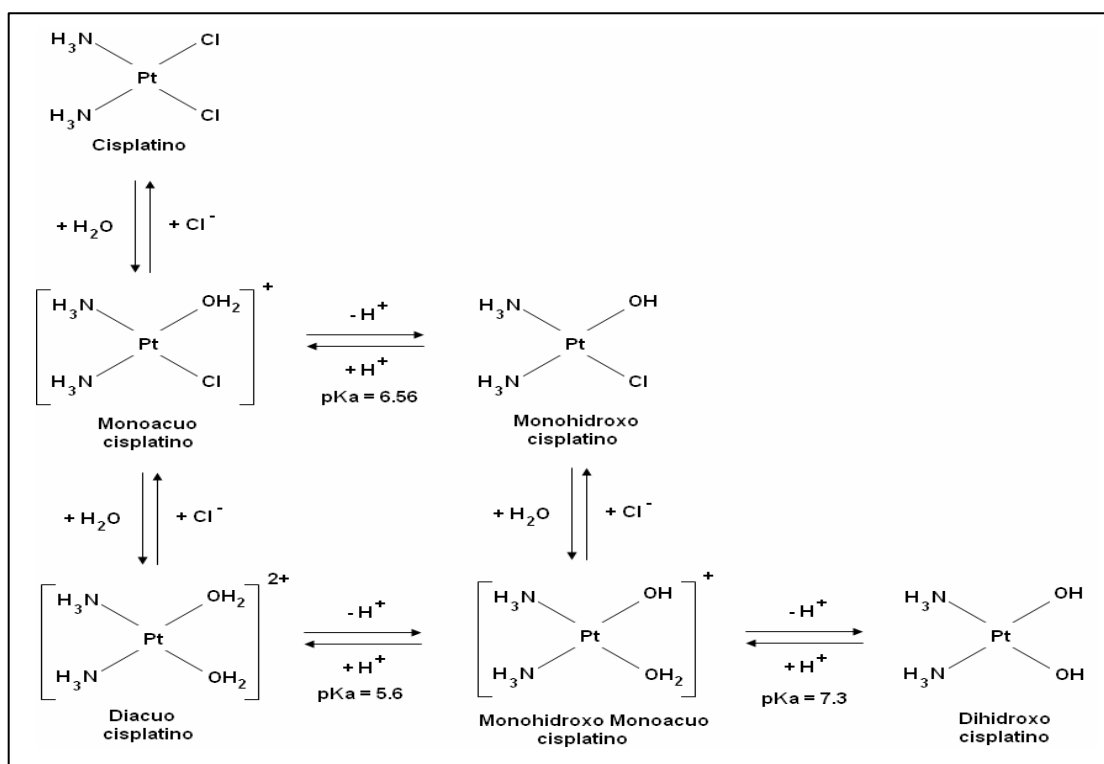
Asimismo a los pacientes comúnmente se les prescriben fármacos adicionales para tratar los efectos secundarios, que pueden incluir antieméticos, antibióticos y factores de crecimiento mieloide, suplementos de magnesio, bloqueadores de citoquinas de anticuerpos monoclonales y antioxidantes.<sup>8</sup>

Por otra parte y también relacionado con la selectividad y la resistencia, se ha demostrado que algunos tumores exhiben resistencia desde el inicio del tratamiento, mientras que otros pueden desarrollar resistencia después del tratamiento inicial.<sup>42</sup> Esto también puede provocar una complicación terapéutica adicional, ya que los tumores que no responden al cisplatino, exhiben resistencia cruzada a diversos fármacos no relacionados.<sup>43</sup> En total, un paciente con cáncer puede experimentar cualquier combinación de alrededor de 40 efectos secundarios específicos.

Hasta ahora son tres los compuestos de platino más utilizados en la terapia contra el cáncer: el cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. De los cuales el cisplatino y el carboplatino han dominado en la terapia contra el cáncer de ovario.

El cisplatino se administra por vía intravenosa, una vez en la circulación sanguínea, una fracción se une a proteínas plasmáticas, principalmente a

aquellas que poseen grupos tioles. El cisplatino que queda de manera libre se internaliza a la célula por medio de difusión pasiva, ya dentro de la célula al haber una baja concentración de cloruros, se hidroliza fácilmente (figura 2.4), estableciéndose un equilibrio entre aproximadamente el 30% del cisplatino inicial y los productos *cis*-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (monoacuocisplatino), *cis*-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (diacuocisplatino) y los complejos hidroxilo *cis*-[PtCl(OH)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], *cis*-[Pt(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] y *cis*-[Pt(OH)(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Dicho equilibrio depende tanto de la concentración de iones Cl<sup>-</sup> como del pH del medio.<sup>44-46</sup> Generalmente, se acepta que él cisplatino es hidrolizado en la célula y son las especies hidratadas resultantes las que reaccionan con el ADN, inhibiendo los procesos de replicación y transcripción.

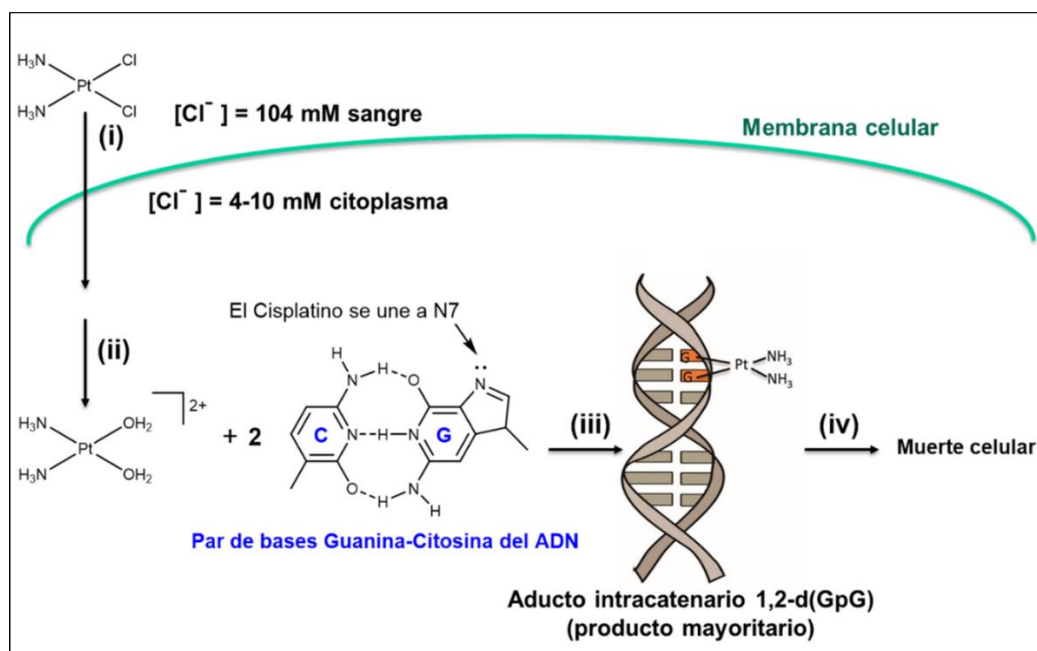


**Figura 2.4** Diagrama de especies en la hidrolisis del cisplatino.<sup>44-46</sup>

Se cree que la reacción de las especies hidratadas con el ADN es la responsable de la actividad antitumoral de los complejos del platino. De todos los productos



de hidrólisis del cisplatino, los mayores efectos tóxicos se le atribuyen al complejo *cis*-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.<sup>47</sup> Dicha especie, es muy reactiva hacia los centros nucleofílicos de biomoléculas, debido a que el H<sub>2</sub>O es mejor grupo saliente que el Cl<sup>-</sup>, por lo tanto, la especie puede unirse al ADN mediante enlaces covalentes para crear aductos Pt-ADN. Los aductos que se forman predominantemente son entrecruzamientos intracatenarios guanina (GG) a través de un enlace del platino con el átomo de nitrógeno N7 de la guanina, pero también se pueden formar monoaductos y entrecruzamientos intercatenarios. El daño inducido por los aductos formados puede interferir con los mecanismos normales de transcripción y/o replicación del ADN.<sup>48</sup> Eventualmente, estas interrupciones de transcripción en los mecanismos del ADN desencadenarían procesos citotóxicos que conducen a la muerte de la célula cancerosa, (figura 2.5).<sup>44</sup> Asimismo, se sabe que el cisplatino forma una gran cantidad de aductos en el ADN mitocondrial, por lo tanto también podría ser un blanco para el cisplatino.<sup>50</sup>



**Figura 2.5** Mecanismo de acción del cisplatino que comprende (i) captación celular, (ii) hidrólisis / activación, (iii) formación de enlaces con el ADN y (iv) activación de mecanismos que conducen a la apoptosis.

El carboplatino tiene dos grupos amino en configuración *cis* y forma aductos similares a los del cisplatino. Sin embargo, el carboplatino es más estable y menos reactivo que el cisplatino debido a que el 1,1-ciclobutanodicarboxilato grupo presente en el carboplatino es menos lábil que los cloruros presentes en el cisplatino, dando como resultado una menor respuesta citotóxica hacia células cancerosas, al no poder hidrolizarse fácilmente.

Cada fármaco produce una serie de efectos secundarios que pueden ser, náuseas, vómitos, diarrea, caída del cabello, pérdida de apetito, fatiga, fiebre, dolor muscular, estreñimiento entre otros más. Sin embargo, el principal efecto secundario que produce cada fármaco es distinto. El cisplatino produce principalmente nefrotoxicidad, el carboplatino mielosupresión y el oxaliplatino neurotoxicidad. Además, los pacientes requieren un control exhaustivo de sus niveles bioquímicos, monitoreo de la función renal y hepática y, dependiendo del fármaco, pruebas de audición.

#### **2.4. Posibles alternativas para la quimioterapia del cáncer**

Debido a los efectos secundarios causados por los fármacos a base de platino, los científicos se encuentran en una búsqueda constante de nuevos agentes antitumorales que sean menos tóxicos y más efectivos.<sup>51</sup> El progreso en la química de coordinación en el campo medicinal, depende en gran medida de comprender no solo la termodinámica (equilibrios y estructuras) sino también la cinética y los mecanismos de reacción de los complejos metálicos, especialmente en condiciones biológicamente relevantes.<sup>52</sup> Entre los complejos que en la actualidad son prometedores para llegar a ser fármacos contra el cáncer, destacan los que tienen metales en su estructura como por ejemplo Pd, Ir, Au, Os y Ru. Sin embargo, los mejores resultados obtenidos son con complejos de rutenio.<sup>53</sup>

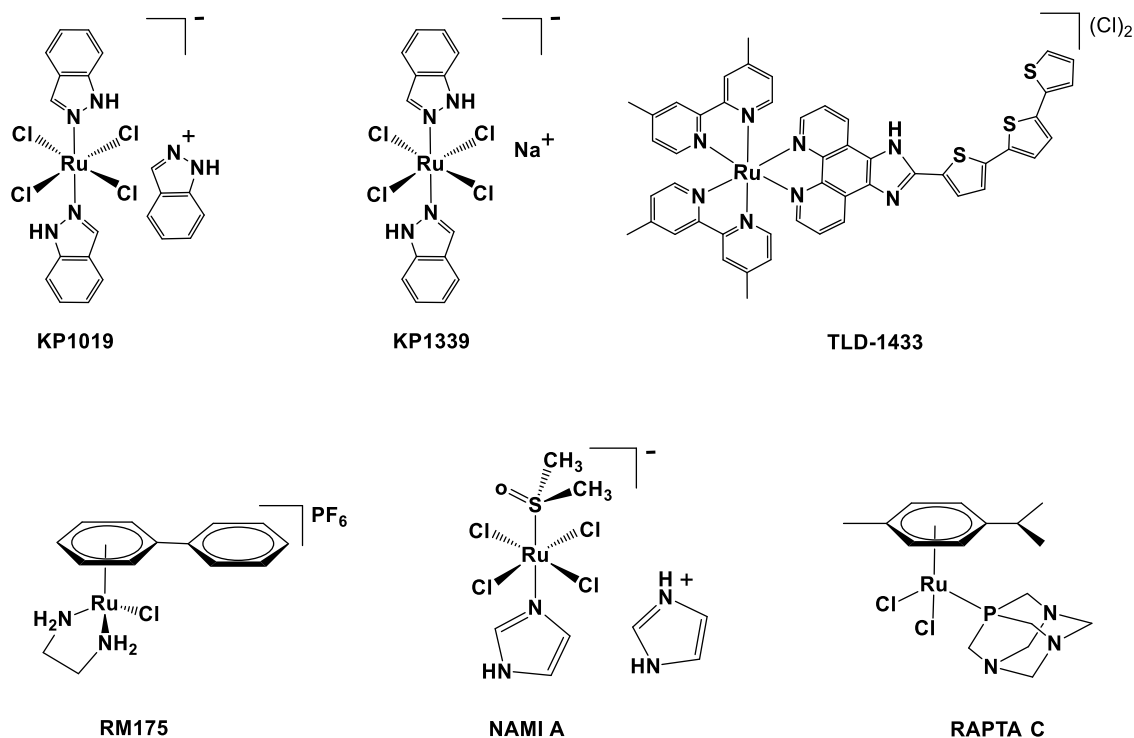
A pesar de tener ya cerca de 20 años de investigación sobre el uso del rutenio en terapia contra el cáncer, son pocos los complejos de coordinación de rutenio que han avanzado en terapias clínicas, debido a que no se ha logrado conocer

con claridad el o los mecanismos de acción de esta clase de complejos o porque no logran avanzar a las siguientes fases de estudio debido a no cumplir con los requisitos necesarios. Entre ellos se encuentra el KP1019,<sup>54</sup> y recientemente el TLD1433 (Figura 2.6), siendo el primer fotosensibilizador basado en Ru(II) que se encuentra en ensayos clínicos en humanos.<sup>55</sup>

Durante este tiempo, se ha llegado a producir una gran cantidad de fármacos candidatos, con excelente actividad citotóxica *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, aún es necesario desarrollar un fármaco que cumpla con las fases de estudios clínicos para llegar a ser una alternativa viable a los fármacos aprobados de platino, usados para tratamiento del cáncer.

En la actualidad, los grupos de investigación se han centrado en desarrollar nuevos complejos, tomando en cuenta las propiedades de los compuestos ya conocidos, como por ejemplo el NKP1339, NAMI-A, RM175 y RAPTA-C (Figura 2.6). En particular, el objetivo es mejorar las propiedades modificando las características (mayor lipofilicidad, menor potencial redox), que presentan los complejos anteriores, buscando nuevas estructuras y coordinando nuevos ligantes para obtener compuestos que puedan llegar a ser fármacos para el tratamiento del cáncer.

Es importante continuar con el desarrollo de los complejos de rutenio teniendo en cuenta que no se centran únicamente en las interacciones con el ADN, como lo hace el cisplatino, sino que prometen interactuar con una amplia de gama de blancos terapéuticos.<sup>11</sup>



**Figura 2.6** Complejos de Ru(II) y Ru(III) candidatos a ser fármacos para el tratamiento del cáncer.

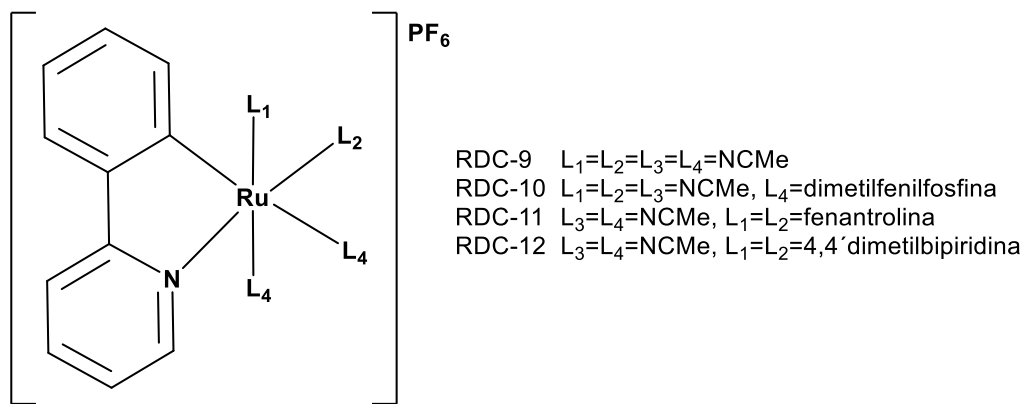
## 2.5. Complejos de rutenio

Los complejos basados en rutenio parecen ser especialmente atractivos ya que exhiben tres propiedades importantes para las aplicaciones biológicas, estas son: 1) presentan una cinética de intercambio de ligantes similar a la de los complejos de platino(II); 2) tienen diferentes estados de oxidación que son accesibles bajo condiciones fisiológicas; 3) el rutenio imita al hierro al unirse a la albumina y la transferrina, los cuales son acarreadores del hierro y por tanto podrían reducir su toxicidad.<sup>56, 57</sup> Siguiendo esta tendencia, ya varios compuestos de rutenio(II) han sido descritos por tener actividad antitumoral.<sup>58, 59</sup>

El grupo de trabajo de Barton *et al.*,<sup>60–64</sup> logró desarrollar varios compuestos de coordinación, que en su estructura molecular presenta un centro metálico de Ru(II) con ligantes bidentados, entre los que destacan el [Ru(2,2'-bipiridina)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>, [Ru(1,10-fenantrolina)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> y el [Ru(4,7-difenil-1,10-fenatrolina)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>, por tener

actividad biológica en células cancerosas. La importancia de estos trabajos radica en que estos complejos, además de ser luminiscentes, son capaces de unirse al ADN, tanto electrostáticamente como por intercalación, siendo de gran importancia para poder entender los mecanismos de acción involucrados. En 1990 aparece el compuesto  $[\text{Ru}(\text{bipiridina})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) siendo uno de los primeros complejos de coordinación que presenta ligantes  $\pi$ -expansivos en su estructura,<sup>52</sup> tema que profundizaremos más adelante.

En 2005 Gaiddon et al., realizaron ensayos biológicos con complejos ciclometalados de rutenio llamados compuestos derivados de rutenio (RDC, por sus siglas en inglés), figura 2.7, varios compuestos de esta serie son organometálicos que contienen un átomo de Ru(II) unido covalentemente a un átomo de carbono y por coordinación a los átomos de nitrógeno. Algunos de los RDC presentan analogía estructural con los complejos de rutenio(II), anticancerígenos anteriormente publicados.<sup>60-63, 65</sup> El objetivo fue conocer la actividad citotóxica de los complejos en varias líneas celulares, como por ejemplo, en células A172 y HS683 ambas derivadas de un glioblastoma, otras dos derivadas de neuroblastoma (N2A, SH5Y), tres más derivadas de linfoblastoma (RDM4, TK6) y adenocarcinoma (HCT116) y una línea celular de riñón de embrión humano (HEK 293), se encontró que varios de los complejos tuvieron un efecto antiproliferativo equivalente al cisplatino o incluso mayor.<sup>66</sup>



**Figura 2.7** Ejemplos de RDCs (compuestos derivados de rutenio).<sup>66</sup>

Por otra parte, se han realizado más estudios utilizando complejos ciclometalados de rutenio(II) como los RDC <sup>12, 67, 68</sup> y que han sido eficientes agentes anticancerígenos, uno de ellos es el  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2](\text{Cl})_2$  (phpyH = 2-fenilpiridina, bpy = 2,2'-bipiridina), desarrollado por el grupo de trabajo de Le Lagadec.<sup>20</sup> Dicho compuesto se destaca porque el potencial redox que presenta, le otorga la capacidad de inhibir parcialmente la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, (LDH, por sus siglas en inglés). La LDH es una enzima redox que a menudo se sobreexpresa en las células cancerosas, y que permite la supervivencia de dichas células, en un ambiente metabólico estresante. Asimismo la actividad citotóxica en células de carcinoma colorrectal humano HCT116, adenocarcinoma colorrectal humano SW480, adenocarcinoma gástrico humano AGS y carcinoma gástrico humano KATOIII, fue mucho mayor en el RDC en comparación con su homólogo estructural,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ , bpy = 2, 2'-bipiridina) que no presenta enlaces Ru-C. <sup>20</sup>

Los mecanismos de acción de los RDC no son del todo claros, sin embargo, se ha encontrado que son capaces de inducir estrés oxidativo así como estrés de la respuesta de proteína desplegada (UPR, por sus siglas en inglés).<sup>67, 69</sup> Por otra parte también se ha encontrado que los RDC son capaces de producir apoptosis en líneas celulares tumorales derivadas de glioblastomas, neuroblastomas y tumores linfoides.<sup>66</sup> Asimismo los RDC son capaces de producir daño en el ADN. Posterior a este daño, se produce la estimulación de múltiples mecanismos de reconocimiento y reparación de daños que conduce a la activación de la familia de factores de transcripción p53, que median la detención del crecimiento celular y la apoptosis.<sup>66</sup> Se ha demostrado que los complejos de rutenio que en su estructura molecular contienen ligantes areno, son capaces de inducir el estrés del retículo endoplásmico a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). <sup>70</sup> Por otra parte la estructura molecular del ligante areno puede ser el responsable de definir algunos cambios en las propiedades fisicoquímicas del complejo, tales como la estabilidad, la reactividad y la hidrofobicidad, que son

de gran importancia para influir en su mecanismo de acción hacia células tumorales.<sup>70</sup>

## 2.6. Complejos de rutenio en fases clínicas

La importancia de los complejos de rutenio ha llevado a tres de ellos a las fases clínicas. Un caso en particular es el del NAMI-A figura 2.6, que llegó hasta la fase II de estudios clínicos. Dicho compuesto fue sintetizado por el grupo de Alessio y Sava, contiene cloruro, imidazol y dimetilsulfóxido (DMSO) en una geometría octaédrica, tiene un centro metálico de Ru(III). Los complejos que contienen un centro metálico de Ru(III) son considerados profármacos ya que a menudo son menos reactivos que los complejos que contienen un centro metálico de Ru(II) y por tanto, requieren ser activados por reducción *in vivo* para poder coordinarse de manera más eficiente a las biomoléculas.<sup>71,72</sup> La reducción de Ru(III) a Ru(II), en compuestos que contienen ligantes cloruro, favorece la hidrólisis de este tipo ligantes. Esto podría facilitar la reacción entre el ADN y los complejos de rutenio antes mencionados.<sup>73</sup>

El NAMI-A fue utilizado por primera vez en un estudio de fase I / II en 32 pacientes que padecían una forma avanzada de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).<sup>74</sup> El complejo se administró por vía intravenosa en combinación con gemcitabina, que se usa regularmente junto con cisplatino en este tipo de cáncer. Los resultados del ensayo indicaron que dicha combinación de NAMI-A y gemcitabina afectó la calidad de vida de los pacientes, con efectos secundarios que incluyen trastornos gastrointestinales, neutropenia y enzimas hepáticas elevadas. Entonces fue considerado como "*insuficientemente eficaz para su uso posterior*", poniéndolo fuera de los ensayos clínicos.<sup>71,74</sup>

Otro compuesto que aún continúa en fases clínicas de estudio, es el NKP1339, figura 2.6.<sup>72</sup> Este complejo presenta similitud estructural con el complejo NAMI-A. Su modo de acción es a través de la unión con las proteínas de la sangre, por enlaces no covalentes, probablemente por interacciones hidrofóbicas,<sup>56</sup> asimismo, tiene la capacidad de interactuar con las bases de guanina del ADN.<sup>73</sup> Durante la activación, el ion metálico se reduce, y la especie Ru(II) es

responsable de la formación del aducto de ADN. También se sabe que induce la detención del ciclo celular a través de mecanismos atribuidos a su actividad redox en las células cancerosas.<sup>72</sup>

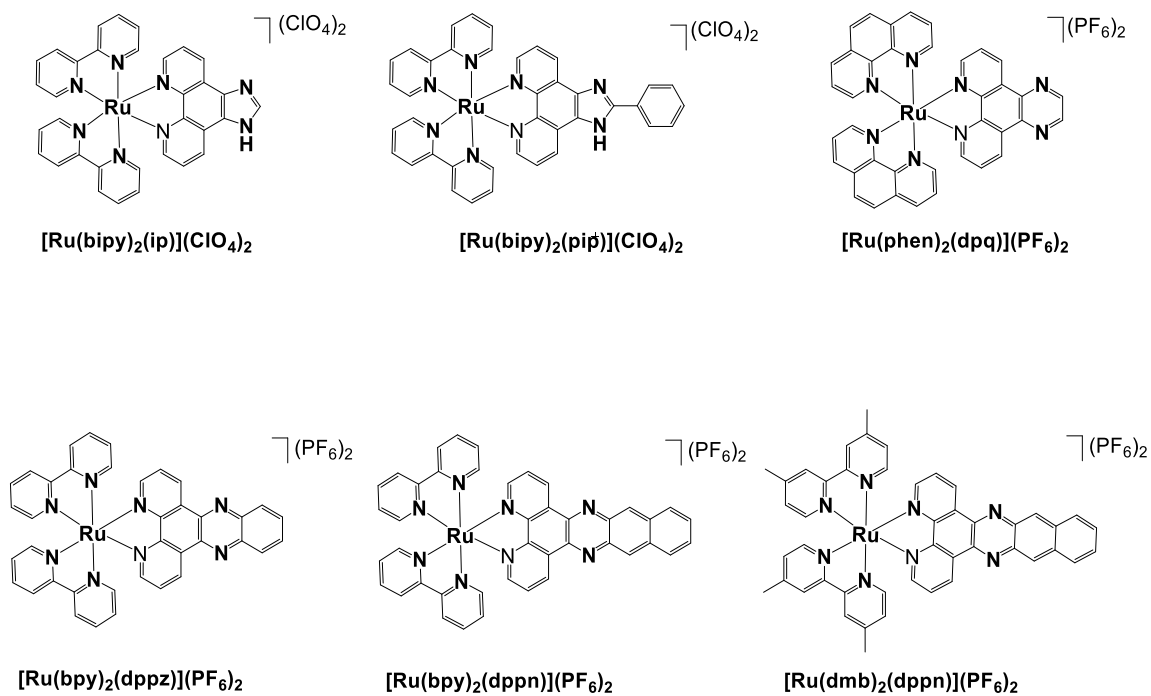
El compuesto TLD1433 (Figura 2.6), un compuesto de Ru(II), tiene la capacidad de actuar como fotosensibilizador, siendo candidato para ser usado en terapia fotodinámica (PDT), (procedimiento terapéutico mínimamente invasivo que junto con luz de longitud de onda entre 600-800 nm, puede producir actividad citotóxica selectiva hacia las células malignas),<sup>75</sup> tema que se discutirá posteriormente. Dicho compuesto completó con éxito la fase I de estudios clínicos en humanos y actualmente se encuentra en fase II. (ClinicalTrials.gov, número de identificación NCT03945162).<sup>55,76,77</sup> A pesar de que existen muchos compuestos de Ru(II),<sup>21,60-63,78,79</sup> que continúan en estudios preclínicos, no se ha logrado obtener un complejo con las características necesarias para usarse en la quimioterapia contra el cáncer.

## 2.7. Compuestos con ligantes $\pi$ -expansivos

Entre los compuestos que se encuentran en ensayos clínicos se encuentra el TLD1433, que tiene un ligante  $\pi$ -expansivo en su estructura. En este tipo de ligantes, el sistema conjugado  $\pi$  se expande conforme aumenta el sistema aromático del mismo. El grupo de *Barton*, es pionero en sintetizar compuestos de coordinación de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos.<sup>60-63</sup> Uno de ellos es el  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ , figura 2.8 se ha observado que presenta transferencia de carga que se dirige desde el centro del metal al anillo de fenazina, (dipiridofenazina), siendo la clave para producir la fotoluminiscencia.<sup>64</sup> Este tipo de ligantes tiene la capacidad de actuar como fotosensibilizador. En los ensayos biológicos realizados con este complejo, se descubrió que presenta toxicidad en líneas celulares de cáncer SK-MEL-28 y HL60, el mecanismo de acción es a través de la intercalación del compuesto con el ADN, esto debido a la estructura plana extendida del ligante dipiridofenazina (dppz) que es capaz de intercalarse en la estructura del ADN.<sup>21</sup>



Años más tarde, se sintetizaron compuestos organometálicos análogos al de coordinación de *Barton et. al.* así como otros compuestos con ligantes que en su estructura molecular presentan ligantes  $\pi$ -expansivos. Entre dichos compuestos (Figura 2.8), se encuentra los de coordinación  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ip})](\text{ClO}_4)_2$ , ip = imidazofenantrolina,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pip})](\text{ClO}_4)_2$ , pip = fenilimidazofenantrolina y el  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpq})](\text{PF}_6)_2$ , dpq = difenilquinoxalina, que presentan todos un mecanismo de acción por intercalación en el ADN.<sup>78,79</sup>



**Figura 2.8** Compuestos de coordinación de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos con propiedades fototóxicas.<sup>64, 78-80</sup>

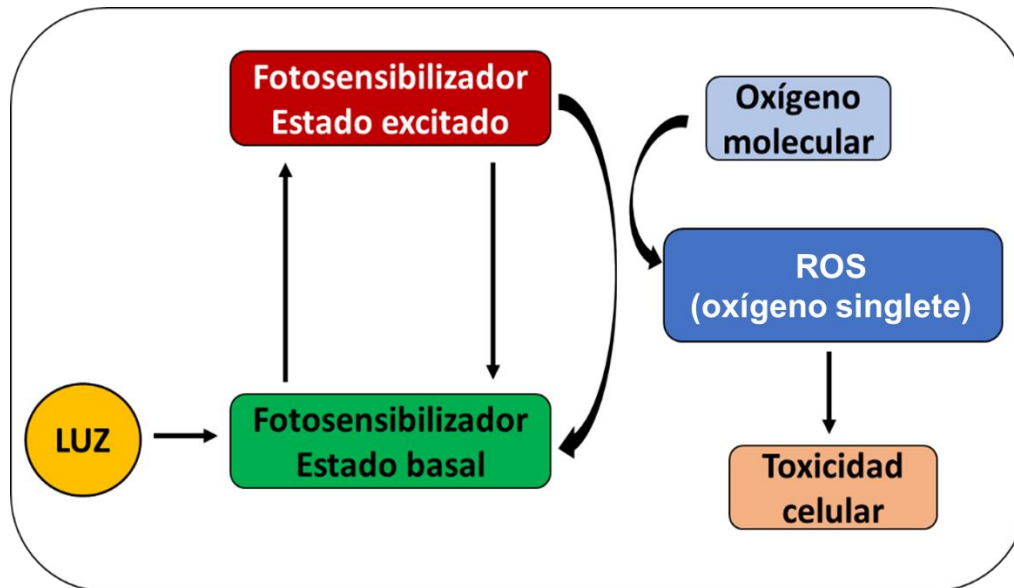
Después de conocer que esta clase de compuestos presentan luminiscencia y que además al ser irradiados con luz visible, se vuelven citotóxicos, se iniciaron estudios para conocer que tanto influye el tipo de ligante  $\pi$ -expansivo en los compuestos al realizar ensayos biológicos. El grupo de trabajo de *Reichardt et. al.*, realizó estudios fotobiológicos en los cuales investigó la correlación entre la fotocitotoxicidad y el tiempo de vida en estado excitado, que exhibieron los

complejos de Ru(II), entre ellos el  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})](\text{PF}_6)_2$ ,  $\text{dppn}$  = benzodipiridofenazina,  $[\text{Ru}(\text{dimetil-bpy})_2(\text{dppn})](\text{PF}_6)_2$ ,<sup>81,82</sup> ver figura 2.8. Para los estudios utilizaron modelos *in vitro* de células de melanoma humano SKMEL28 y células de leucemia humana HL60, para evaluar la fotocitotoxicidad inducida por los compuestos cuando se activaron con luz visible de banda ancha o con luz roja monocromática. Los complejos con tiempo de vida (media) del estado excitado más largo, fueron los más fototóxicos hacia las células cancerosas evaluadas,<sup>80</sup> siendo capaces de actuar como fotosensibilizadores y que junto con el oxígeno molecular, al ser irradiados con luz, son capaces de producir especies reactivas de oxígeno, en particular se pudo determinar que la especie producida es el oxígeno singlete.<sup>80,82</sup>

## 2.8. Terapia fotodinámica

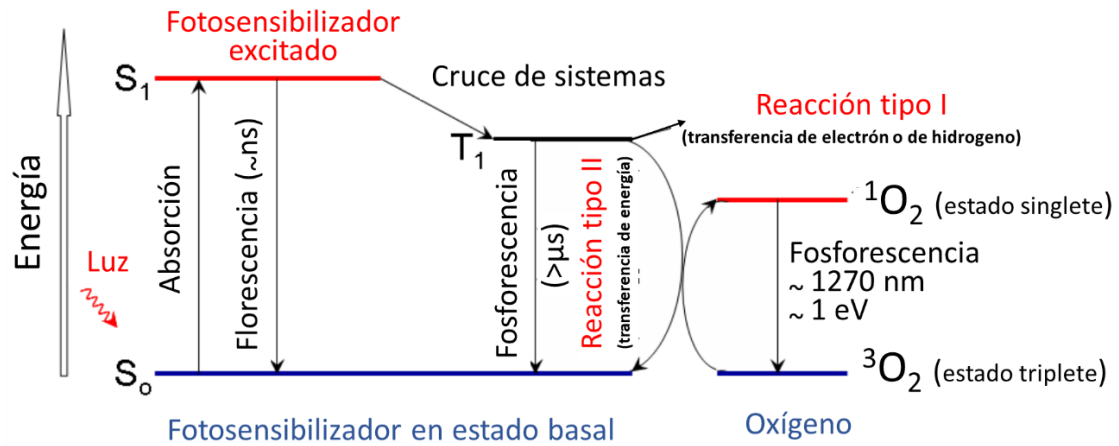
Los experimentos para probar combinaciones de reactivos y luz condujeron a la terapia fotodinámica (PDT, Photodynamic Therapy), la cual es un procedimiento terapéutico mínimamente invasivo, clínicamente aprobado, que puede producir actividad citotóxica selectiva hacia las células malignas, puede utilizarse para varias enfermedades, entre ellas las de la piel y en especial para el tratamiento de cáncer.<sup>75</sup>

La PDT ha sido utilizada en oftalmología, en tratamientos para enfermedades cardiovasculares, dermatológicas, reumatológicas y en el tratamiento y la detección de cáncer y lesiones precancerosas.<sup>83</sup> La PDT requiere tres elementos: luz, un fotosensibilizador y oxígeno. Cuando el fotosensibilizador se expone a longitudes de onda específicas, pasa de un estado basal a un estado excitado. A medida que regresa al estado basal, libera energía, que se transfiere al oxígeno para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como el oxígeno singlete y los radicales libres (Figura 2.9).<sup>83</sup>



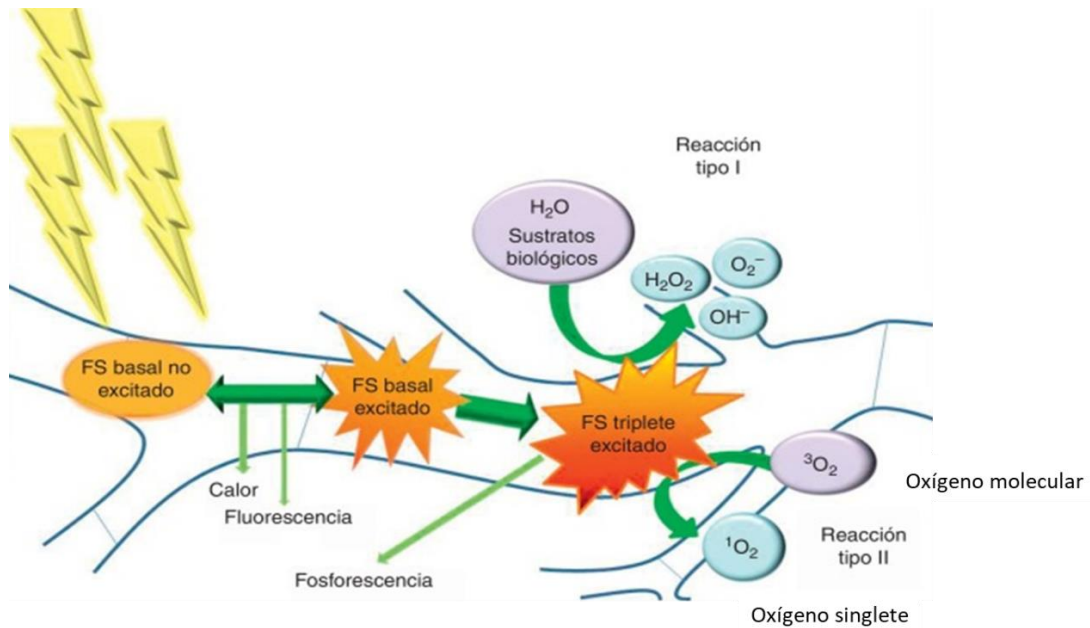
**Figura 2.9** Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica (PDT).

La exposición a la luz lleva una molécula fotosensibilizadora desde el estado basal singlete ( $S_0$ ) a un estado singlete excitado ( $S_1$ ). La molécula en  $S_1$  puede experimentar un cruce entre sistemas a un estado triplete excitado ( $T_1$ ) y luego puede reaccionar directamente con una molécula orgánica en un microambiente celular, adquiriendo un átomo de hidrógeno o un electrón para formar un radical, entonces se produce el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), asimismo puede ocurrir una reducción de un electrón de  $O_2^-$  dando lugar al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que a su vez puede sufrir reducción de un electrón y formar a un radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), a través de una reacción de tipo I o, es más probable que ocurra la reacción tipo II, en la cual la molécula transfiere su energía al oxígeno molecular ( $^3O_2$ ) y formar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Figura 2.10), especie reactiva de oxígeno que es el principal agente citotóxico implicado en la PDT.<sup>75</sup>



**Figura 2.10** Proceso de fotosensibilización.

Ambas reacciones tipo I y tipo II (Figura 2.11), ocurren simultáneamente,<sup>84</sup> y la relación entre estos procesos depende del tipo de sensibilizador utilizado, del tipo longitud de onda  $\lambda$  (nm), y oxígeno, así como la afinidad de unión del sensibilizador por el sustrato.



**Figura 2.11** Reacciones tipo I y tipo II en el proceso de fotosensibilización.

Debido a la alta reactividad y la corta vida media de los ROS, la PDT<sup>85</sup> afecta directamente a las células que están próximas al área de producción de ROS (áreas de localización de fotosensibilizadores). La vida media del oxígeno singlete en sistemas biológicos es  $<0.04 \mu\text{s}$ , y, por lo tanto, el radio de acción del oxígeno singlete es  $<0.02 \mu\text{m}$ .<sup>85</sup>

Las especies reactivas de oxígeno se producen en casi todas las células eucariotas. Estas moléculas son responsables de regular varios procesos fisiológicos, como la proliferación, la migración, la diferenciación y el metabolismo.<sup>86</sup> Las cantidades excesivas de ROS pueden reaccionar con moléculas vitales que incluyen lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las propiedades estructurales y funcionales de las moléculas diana (blanco terapéutico) y conduce a una amplia disfunción y lesión tisular.<sup>87</sup>

El oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$ , representa una forma muy reactiva de oxígeno y puede reaccionar rápidamente con blancos biológicos, causando daños oxidativos tóxicos, daño celular, que finalmente pueden inducir la muerte celular.<sup>22,88</sup> Por otra parte el oxígeno singlete generado en los sistemas biológicos, puede servir como molécula de señalización y como iniciador de oxidaciones biológicas perjudiciales.<sup>89</sup>

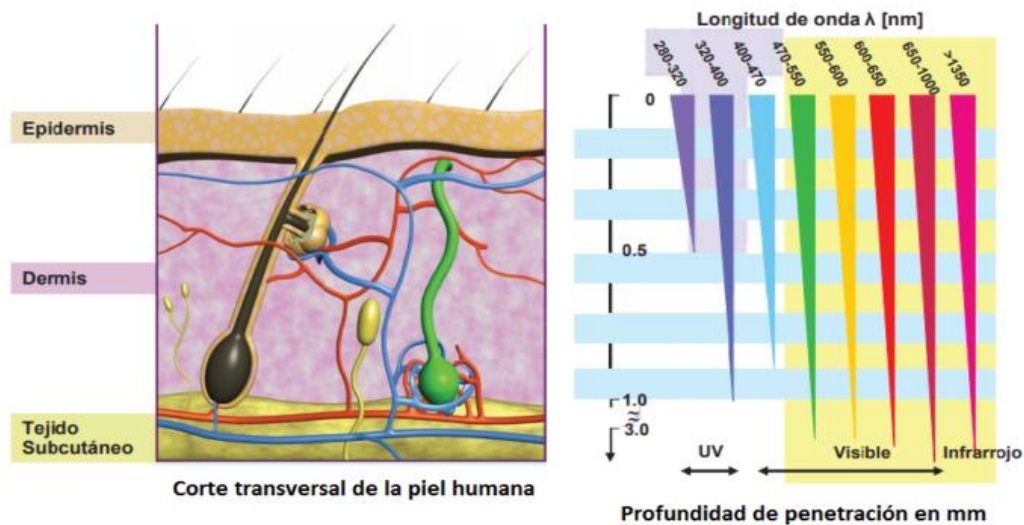
Las reacciones de la PDT ocurren en la periferia inmediata del fotosensibilizador, por lo tanto, las respuestas biológicas al fotosensibilizador se activan solo en las áreas particulares de tejido que han sido expuestas a la luz. Sin embargo, la eficacia de la PDT es aún limitada debido a las características químicas de los fotosensibilizadores disponibles. Por ejemplo, la dependencia del oxígeno impide la actividad en los tumores hipóxicos, los fotosensibilizadores orgánicos pueden presentar escasa solubilidad en agua y retención en los tejidos, que finalmente puede provocar fotosensibilidad prolongada.<sup>83, 90</sup>

Por otra parte, se encuentra la importancia de utilizar luz con la longitud de onda adecuada, ya que dependiendo de la profundidad a la que se quiera llegar en el tejido, se requiere de una longitud específica.<sup>75</sup>

La luz azul penetra menos eficientemente a través del tejido, mientras que las radiaciones roja e infrarroja penetran más profundamente (Figura 2.12). La región entre 600 y 1200 nm a menudo se denomina ventana óptica de tejido. Sin embargo, se sabe que la luz que se encuentra por debajo de aproximadamente 850 nm tiene mayor capacidad de generar  $^1\text{O}_2$ .<sup>91</sup>

Ninguna fuente de luz es ideal para todas las indicaciones de PDT, incluso con el mismo fotosensibilizador. Por lo tanto, la elección de la fuente de luz debe basarse en la absorción del fotosensibilizador (espectros de excitación y acción de fluorescencia), del tipo de enfermedad a tratar (ubicación, tamaño de las lesiones, accesibilidad y características del tejido), entre otras más. Tanto los láseres como otras fuentes de luz, han sido utilizados para PDT de manera eficaz.<sup>92</sup>

Los diodos emisores de luz (LED) son fuentes de luz alternativas con un ancho de banda espectral relativamente estrecho (500 a 700 nm), pero suficientes para generar  $^1\text{O}_2$ . Es bastante factible implantar una fuente de luz en órganos sólidos en lo profundo del cuerpo. La elección de combinaciones óptimas de los fotosensibilizadores, fuentes de luz y parámetros de tratamiento es crucial para una PDT exitosa.<sup>75</sup>

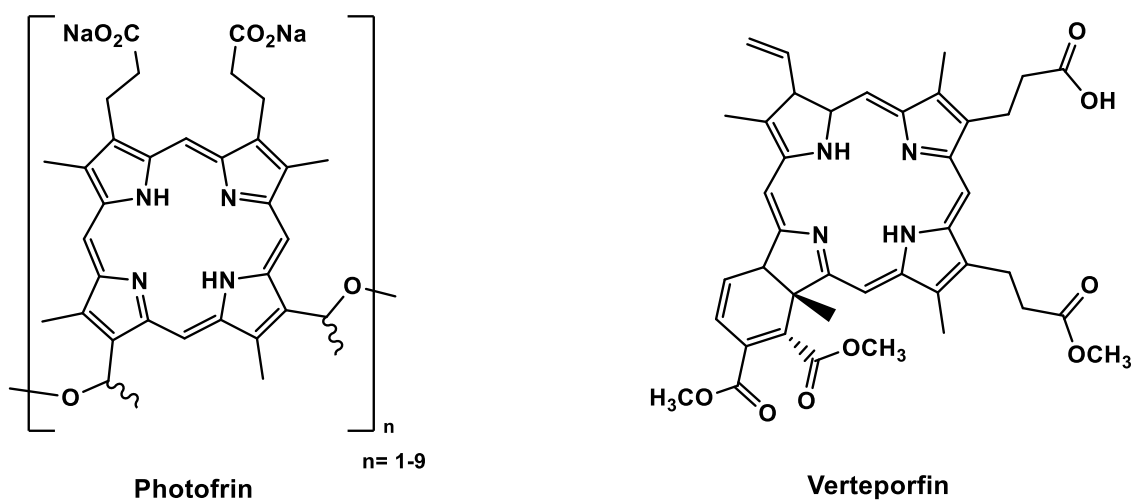


**Figura 2.12** Penetración de la luz en el tejido dependiendo de la longitud de onda

La PDT para el cáncer es un tratamiento aprobado que utiliza luz visible como desencadenante para que sensibilizadores sean capaces de generar especies reactivas, entre ellas el oxígeno singlete.<sup>83</sup> Las propiedades terapéuticas de la luz se conocen desde hace miles de años,<sup>93</sup> pero a partir del año 1993, se desarrolló la terapia fotodinámica, utilizando Photofrin como fotosensibilizador para el tratamiento profiláctico del cáncer de vejiga (Figura 2.13), descubierto en 1983 por Thomas Dougherty.<sup>94</sup>

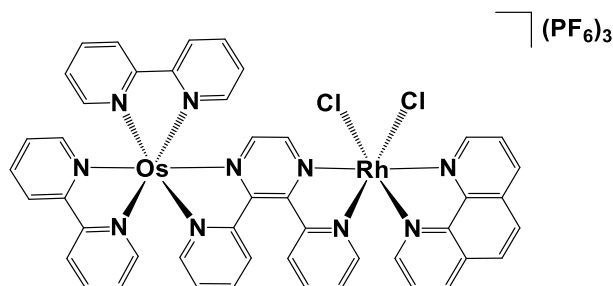
Actualmente puede ser usado para el tratamiento de cáncer cervical, endobronquial, esofágico, de vejiga y cánceres gástricos.<sup>83</sup> Hasta 2003, la aplicación más popular de PDT fue en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad y otras enfermedades oculares relacionadas con la neovascularización.<sup>95</sup>

En 1999, Verteporfin (Novartis Inc., Basilea, Suiza) (Figura 2.13), fue aprobado en Canadá para su uso en la PDT para el tratamiento del carcinoma de células basales.<sup>83</sup>



**Figura 2.13** Estructura del Photofrin y Verteporfin.

Desde años atrás, varios grupos están investigando complejos metálicos fotoactivos como agentes PDT alternativos.<sup>80</sup> Los complejos polipiridínicos de Ru(II) tienen propiedades de absorción ajustables,<sup>96</sup> y se sabe que cuando se exponen a la luz visible o UV pueden unirse al ADN de diferentes maneras.<sup>97</sup> También se ha informado que los complejos bimetalícos como el  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{dpp})\text{RhCl}_2(\text{phen})](\text{PF}_6)_3$  figura 2.14, pueden dañar el ADN cuando se activan con luz de baja energía de alrededor de 645 nm.<sup>98</sup>



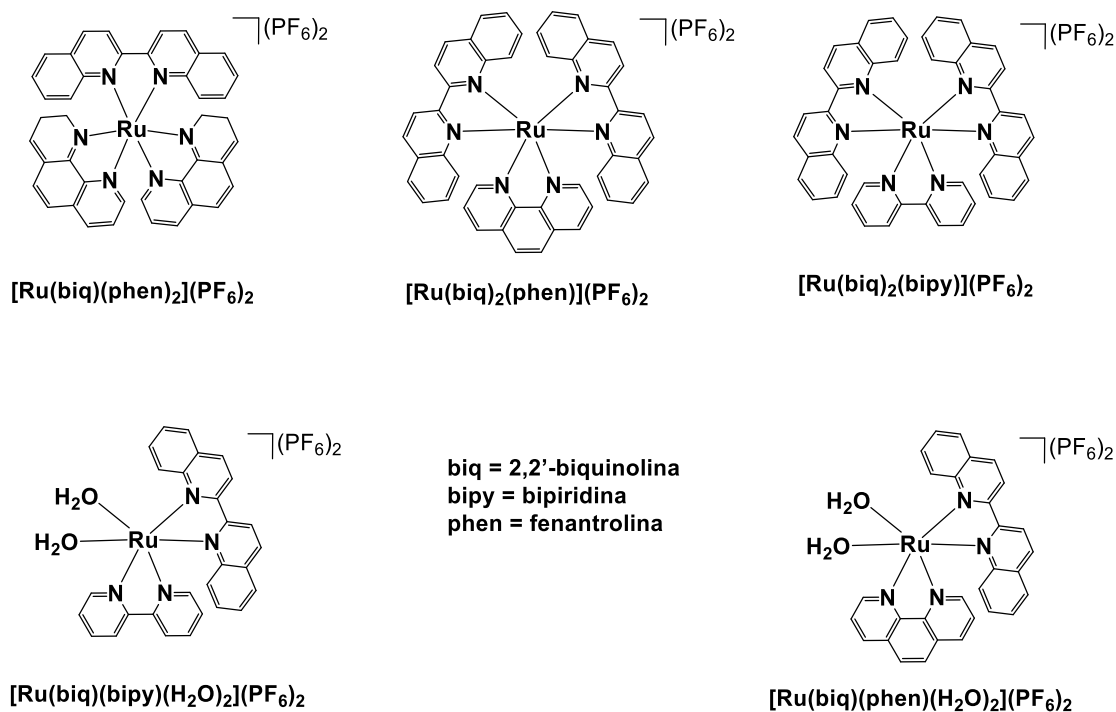
**Figura 2.14** Estructura del  $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{dpp})\text{RhCl}_2(\text{phen})](\text{PF}_6)_3$ .<sup>98</sup>

El grupo de trabajo de *Wachter*, en 2012, desarrolló complejos polipiridínicos de Ru(II) que contienen ligantes biquinolina en su estructura,  $[\text{Ru}(\text{biq})(\text{phen})_2](\text{PF}_6)_2$  y  $[\text{Ru}(\text{biq})_2(\text{phen})](\text{PF}_6)_2$ ,<sup>99</sup> ver figura 2.15. Con los compuestos mencionados, se realizaron estudios biológicos en células HL60, logrando producir sistemas que pueden interactuar con el ADN después de ser activados con luz visible e infrarroja para generar oxígeno singlete.<sup>99</sup> Siendo estas especies, las responsables de la citotoxicidad durante la irradiación, ya que en las mismas condiciones pero sin irradiar, la toxicidad que presentan es baja. Dichos complejos se evaluaron en células cancerosas HL-60, se determinó que son capaces de intercalarse con el ADN y sus valores de citotoxicidad encontrados son:  $\text{IC}_{50}$  de 52.2  $\mu\text{M}$  en condiciones de oscuridad y 15.8  $\mu\text{M}$  después de la irradiación con luz.

En 2014 Albani *et al.*, utilizaron los compuestos de *Wachter et al.*,<sup>99</sup> y otros modificados. Encontraron que los complejos de Ru(II)  $[\text{Ru}(\text{biq})_2(\text{phen})](\text{PF}_6)_2$  y



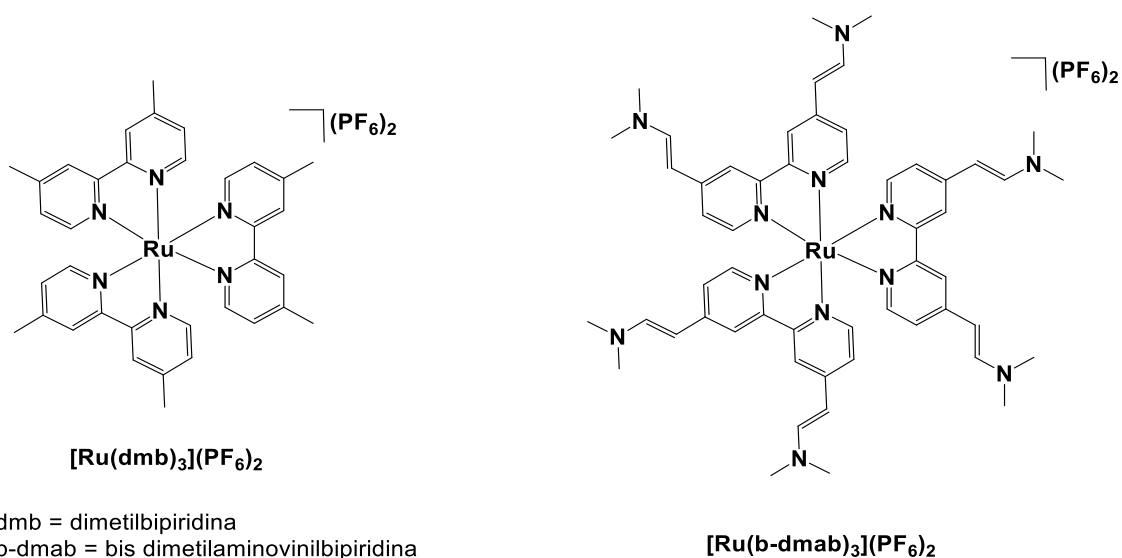
$[\text{Ru}(\text{biq})_2(\text{bpy})](\text{PF}_6)_2$ , experimentan el intercambio de uno de los ligantes (biq), cuando se irradian con luz (longitud de onda de 630 nm) en una solución acuosa. Posterior a la irradiación, forman los correspondientes complejos  $[\text{Ru}(\text{biq})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{PF}_6)_2$  y  $[\text{Ru}(\text{biq})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{PF}_6)_2$  (Figura 2.15). Dichos complejos son capaces de formar enlaces covalentes con el ADN de manera similar al cisplatino, de modo que estas lesiones en el ADN pueden causar la muerte celular.<sup>100</sup>



**Figura 2.15** Complejos polipiridínicos de Ru(II) capaces de formar enlaces covalentes con el ADN al ser irradiados.<sup>99,100</sup>

Recientemente se evaluaron compuestos polipiridínicos basados en el complejo de coordinación  $[\text{Ru}(\text{bipy}_3)(\text{PF}_6)_2$ , en el cual los ligantes de bipyridina fueron modificados con grupos metilo o grupos N,N-dimetilvinilamina, para formar nuevos complejos con las siguientes estructuras,  $[\text{Ru}(\text{dmb})_3](\text{PF}_6)_2$  y  $[\text{Ru}(\text{b-dmab})_3](\text{PF}_6)_2$  (Figura 2.16).<sup>22</sup> Dichos compuestos pueden tener un

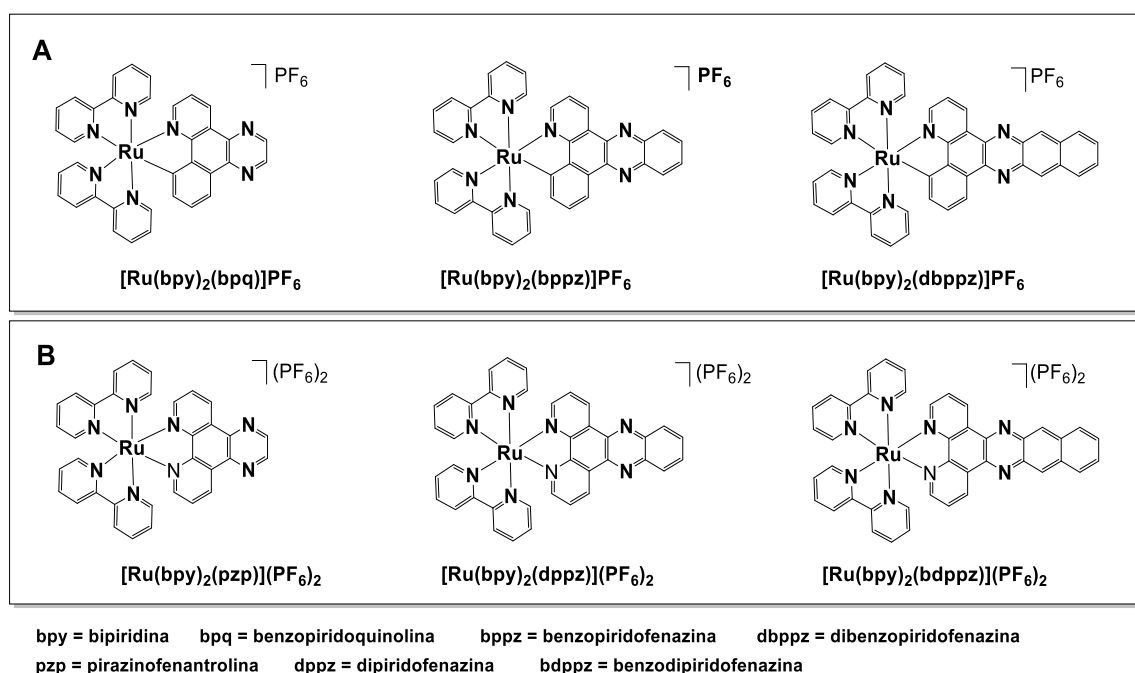
comportamiento como fotosensibilizadores y la capacidad de generar oxígeno singlete cuando son irradiados con luz, incrementando la citotoxicidad hacia células de cáncer HL-60. Los valores de citotoxicidad encontrados son: IC<sub>50</sub> de 200 μM en condiciones de oscuridad y de 146 μM a condiciones de irradiación con luz.<sup>22</sup> A pesar del incremento de la citotoxicidad obtenido después de la irradiación, los valores no son relevantes ya que en los mismos ensayos se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 10.5 μM para el cisplatino en condiciones de oscuridad. Sin embargo, se logró determinar que la irradiación con luz sobre los compuestos evaluados en este trabajo, es capaz de incrementar la actividad citotóxica al provocar la formación de oxígeno singlete.<sup>22</sup>



**Figura 2.16** Complejos citotóxicos de Ru(II) que se comportan como fotosensibilizadores capaces de generar oxígeno singlete produciendo fototoxicidad.<sup>22</sup>

El grupo de trabajo de McFarland en 2016, realizó un estudio donde su principal objetivo fue investigar la influencia de los ligandos ciclometalados π-expansivos, en las propiedades fotofísicas y fotobiológicas de los compuestos organometálicos de Ru(II) (Figura 2.17 A).<sup>21</sup> Las propiedades de estos compuestos difieren sustancialmente de sus contrapartes de coordinación (Figura 2.17 B). Por ejemplo, se determinó que la serie de los compuestos

organometálicos, presentan fosforescencia, así como alta producción de oxígeno singlete, otorgándoles mayor capacidad citotóxica que la serie de complejos de coordinación. Lo más importante fueron los resultados de los estudios biológicos con células de melanoma humano SK-ML-28 y HL-60, en donde evaluaron la capacidad citotóxica que presenta cada compuesto de ambas series, antes y después de ser irradiados con luz visible durante 60 minutos. Tres de los complejos organometalicos ciclometalados de Ru(II), fueron muy citotóxicos para las células cancerosas en la oscuridad (valores de  $IC_{50} = 1-2 \mu M$ ). Sin embargo, después de la irradiación con luz, la citotoxicidad alcanzó valores del orden nanomolar,  $IC_{50} = 0.2 \mu M$ . Cabe destacar que la citotoxicidad obtenida con los complejos de coordinación, en los mismos ensayos en condiciones de oscuridad y después de ser irradiados, rondaron una  $IC_{50} > 300 \mu M$ , por lo que se puede mencionar que la irradiación con luz, no presenta efecto significativo en estos complejos de coordinación de Ru(II) por lo cual puede mencionarse que dichos compuestos no son fototóxicos.



**Figura 2.17** Complejos fotocitotóxicos de Ru(II), A) con ligantes (C-N)  $\pi$ -expansivos y B) con ligantes (N-N)  $\pi$ -expansivos, capaces de generar oxígeno singlete.<sup>21</sup>

Sorprendentemente, el complejo ciclometalado que presenta el ligante más  $\pi$ -expansivo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dbppz})]\text{PF}_6$ , no presentó citotoxicidad en la oscuridad ( $\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ ) pero fue muy citotóxico después de la irradiación con luz, alcanzando valores del orden nanomolar con una  $\text{IC}_{50} = 0.2 \mu\text{M}$  y  $0.7 \mu\text{M}$ , en células SK-ML-28 y células HL-60 respectivamente.

Además de la excelente fotocitotoxicidad, el compuesto  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{dbppz})]\text{PF}_6$  presentó fluorescencia intracelular de color verde intenso y que no fue producida por el complejo análogo de coordinación,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{bdppz})]\text{PF}_6$ . Esta funcionalidad hace que el complejo  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{dbppz})]\text{PF}_6$ , sensible a la luz, sea un potencial agente teranóstico. Este estudio puede ser tomado como referencia para continuar sintetizando compuestos organometálicos de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, similares a los ya conocidos de McFarland *et. al.* 2014 y evaluar la capacidad citotóxica y fototóxica que estos presenten.

Aún no se conoce con claridad el mecanismo de acción que presentan los compuestos polipiridínicos de rutenio(II) frente a células cancerosas, cuando estos son irradiados con luz visible.

El análisis con diferentes marcadores biológicos, así como ensayos de intercalación con ADN, permitirá conocer los mecanismos de acción involucrados en la citotoxicidad, de tal manera que se pueda determinar la importancia que tiene la irradiación con luz visible en la actividad anticancerosa de los complejos ciclometalados polipiridínicos de rutenio con ligantes  $\pi$ -expansivos.

### **3. Hipótesis**

La ciclometalación de nuevos ligantes  $\pi$ -expansivos derivados de la benzoquinolina y de la fenazina modificará las propiedades químicas y electrónicas de los complejos de rutenio(II), los cuales al ser irradiados con luz blanca, incrementarán su desempeño como agentes anticancerosos.

## **4. Objetivos**

### **Generales**

Preparar nuevos complejos ciclotalados de rutenio(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, y evaluar su actividad citotóxica antes y después de ser irradiados con luz blanca.

### **Específicos**

Preparar nuevos ligantes derivados de la benzoquinolina y de la fenazina.

Ciclotalalar los ligantes preparados al rutenio

Realizar estudios electroquímicos con los complejos.

Evaluar la lipofilicidad de los complejos.

Realizar estudios de toxicidad en líneas celulares de cáncer humano.

Realizar estudios con marcadores proteicos y estudios de interacción con ADN para proponer mecanismos de acción.

## 5. Resultados

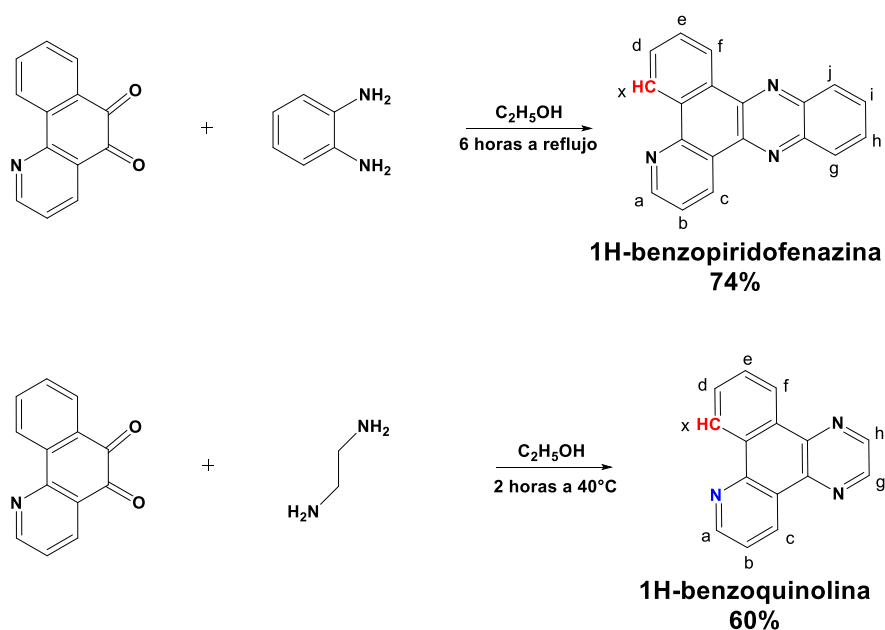
En esta sección se analizarán los resultados obtenidos al estudiar el impacto de los complejos organometálicos de rutenio, sobre la citotoxicidad en líneas cancerosas de adenocarcinoma gástrico. Para ello primero se analizó la lipofilicidad y la estabilidad de los complejos organometálicos en diferentes disolventes, por espectrometría de UV-Vis. Se realizaron estudios de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT para conocer la actividad citotóxica ( $IC_{50}$ ), que presentan los compuestos frente a distintas líneas de cáncer gástrico.

Asimismo, se realizaron estudios de Western blot con el objetivo de conocer si los compuestos son capaces de expresar las distintas proteínas (p53, Caspasa-3, p-gH2AX y ATF4), y así poder conocer la ruta de acción de cada compuesto. Se realizaron ensayos por resonancia paramagnética electrónica con varios compuestos, para determinar si tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno.

Cabe mencionar que los ensayos en células cancerosas se realizaron, como parte de una estancia de investigación en la Universidad de Estrasburgo en Francia, bajo la tutela del Dr. Christian Gaidon y su grupo de trabajo.

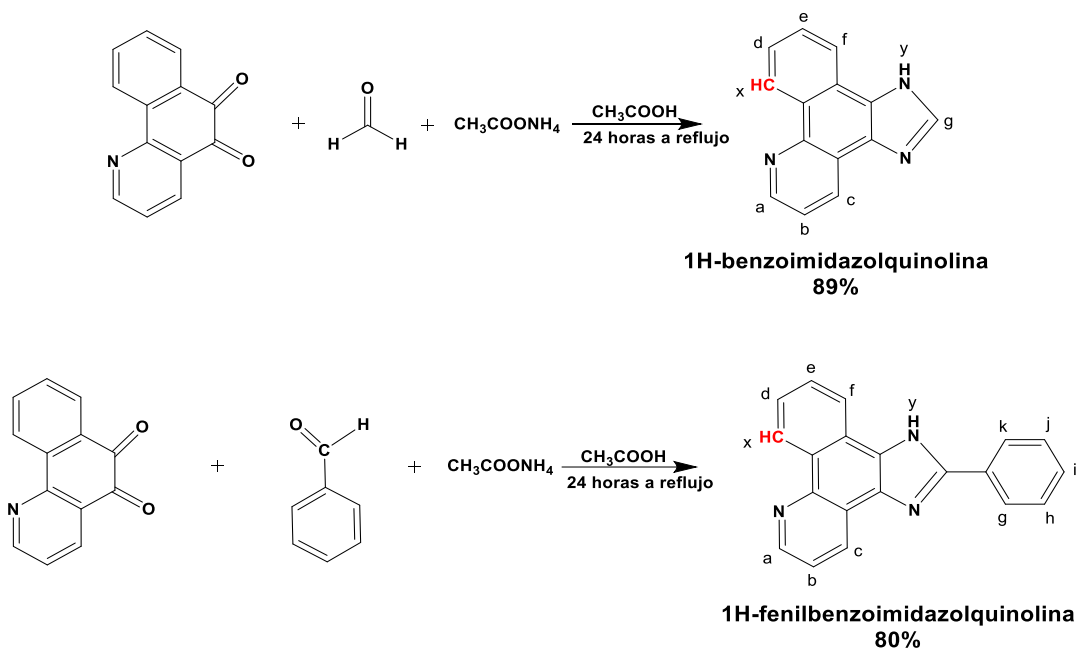
## 5.1. Síntesis y caracterización.

Para la síntesis de los ligantes, primero se sintetizó el precursor 7,8-benzoquinolin-5,6-diona, siguiendo la metodología descrita en la literatura<sup>21</sup>. El ligante 1H-benzopiridofenazina (bppz-H, **a**) y el ligante 1H-benzoquinoxalina (bpq-H, **b**) se prepararon de acuerdo con los métodos publicados para los compuestos relacionados.<sup>21,79,101</sup> En la figura 5.1 se puede observar la ruta de la síntesis. Por otro lado, los ligantes 1H-benzoimidazolquinolina (biq-H, **c**) y 1H-fenilbenzoimidazolquinolina (pbiq-H, **d**) que contienen un grupo imidazol, se sintetizaron a partir de la modificación de una ruta de síntesis<sup>78</sup> (Figura 5.2).



**Figura 5.1** Síntesis de los ligantes  $\pi$ -expansivos, 1H-benzopiridofenazina (bppz-H, **a**) y 1H-benzoquinoxalina (bpq-H, **b**)

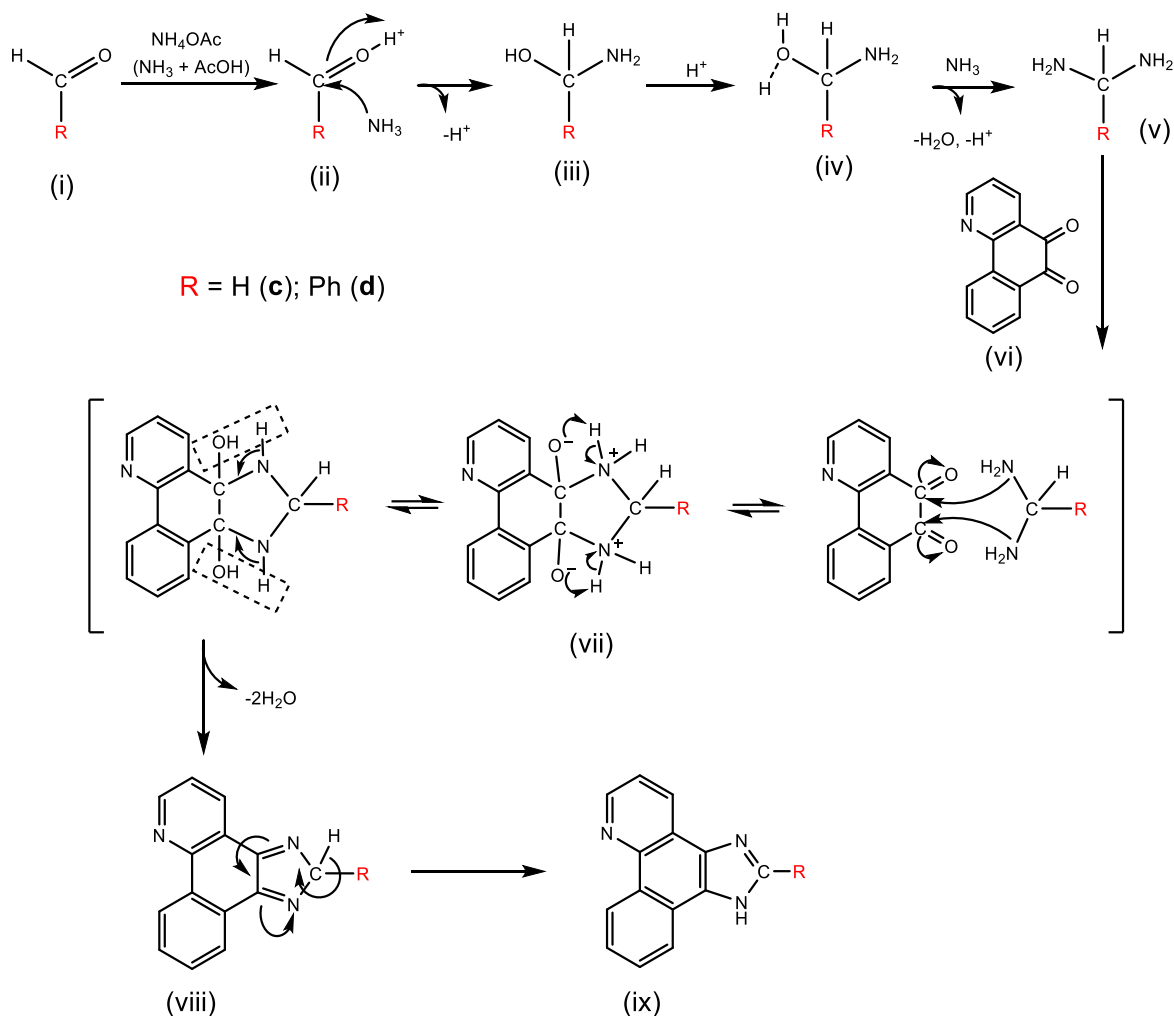




**Figura 5.2** Síntesis de los ligantes  $\pi$ -expansivos, 1H-benzoimidazolquinolína (biq-H, **c**) y fenilbenzoimidazolquinolína (pbiq-H, **d**).

La reacción entre la 7,8-benzoquinolína-5,6-diona y el formaldehído (para el ligante **c**) y benzaldehído (para el ligante **d**) y acetato de amonio en un medio ácido a reflujo durante 24 horas, (figura 5.3) conduce a los compuestos deseados dando sólidos amarillos con buenos rendimientos.

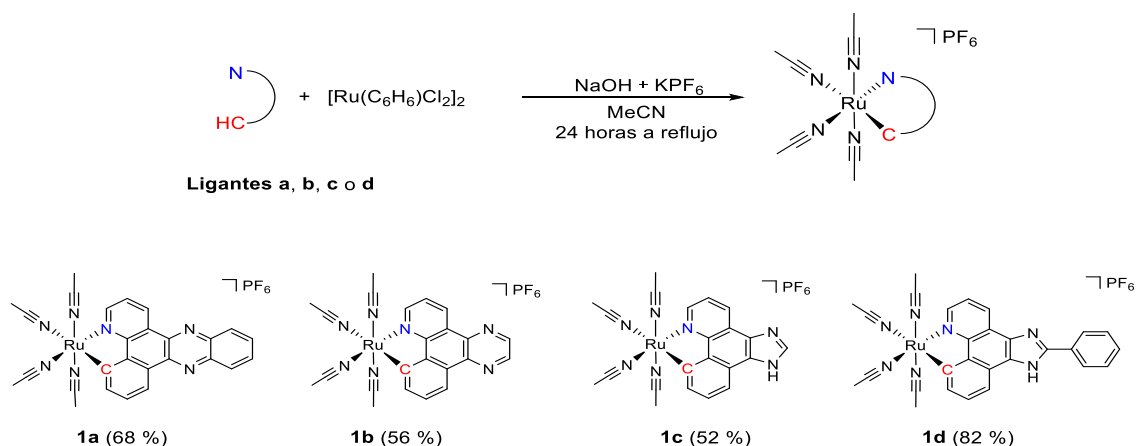
En la figura 5.3 se describe el mecanismo de reacción de la síntesis de los ligantes **c** y **d**, la cual se lleva a cabo mediante una reacción de condensación entre el aldehído, (formaldehído para el ligante **c** y benzaldehído para el ligante **d**), y la diona. La reacción inicia con la protonación del aldehído (i) la cual posteriormente debido a las condiciones del medio de reacción ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2(\text{aq}) \rightarrow \text{NH}_3(\text{aq}) + \text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq})$ ), continua con el ataque del amoniaco al carbonilo (ii), para formar el compuesto (iii), posteriormente este se protona nuevamente (iv) y reacciona con amoniaco liberando agua y formando la diamina (v), después junto con la diona (vi), sucede una doble reacción de condensación dando como resultado el compuesto (vii). Se liberan dos moléculas de agua y ocurre un reordenamiento (viii) para formar el compuesto deseado (ix).<sup>102</sup>



**Figura 5.3** Mecanismo de reacción para la síntesis de los ligantes **c** y **d**.<sup>102</sup>

Los ligantes **c** y **d** fueron caracterizados por medio de espectroscopia infrarroja, <sup>1</sup>H-RMN y por análisis elemental. Por medio de cristalización por difusión lenta se obtuvieron cristales del ligante **d** adecuados para estudios cristalográficos por difracción de rayos X, los detalles se discuten en la sección experimental.

El siguiente paso clave fue la ciclometalación de los ligantes a través de una modificación del método publicado para la ciclometalación de la 2-fenilpiridina a partir de  $[(\eta^6\text{-benceno})\text{RuCl}_2]_2$  en presencia de una base NaOH y KPF<sub>6</sub> en MeCN, para obtener los complejos del tipo  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$ , donde C~N es el ligante  $\pi$ -expansivo, (Figura 5.4).<sup>65</sup>



**Figura 5.4** Síntesis de los complejos  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$ .<sup>65</sup>

La temperatura del acetonitrilo a reflujo y el tiempo de reacción de 24 horas fueron necesarios para obtener los compuestos  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$  ( $\text{C}\sim\text{N}$  = ligante bppz, bpq, biq ó pbq), como sólidos amarillos. Sin embargo, no son estables en condiciones de  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , por lo tanto, fue necesario trabajar bajo condiciones de atmosfera inerte. Los rendimientos estuvieron por arriba del 50%.

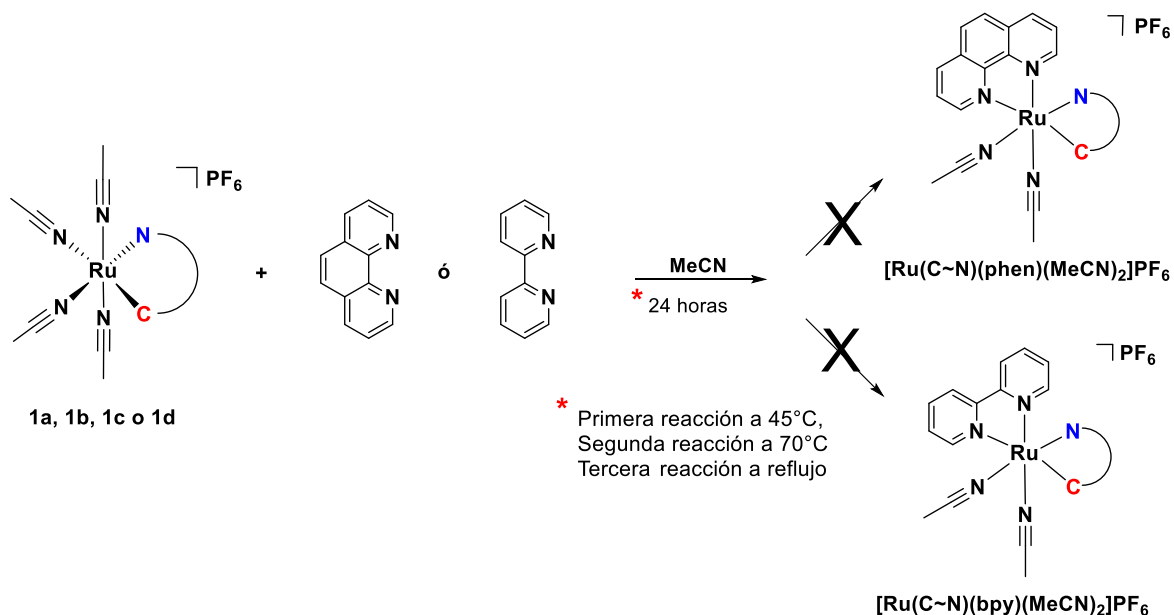
En la  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_2$ ) de los ligantes **a** y **b**, se pudo corroborar que las señales concuerdan con las ya reportadas.<sup>21</sup> Haciendo un análisis de estas, se puede observar que el protón denominado x en ambos ligantes (figura 5.2), es el que se encuentra a campo más bajo, (9.57 ppm en el ligante **a** y 9.58 ppm en el ligante **b**) comparado con los protones f y c (9.45 y 9.32 ppm respectivamente en el ligante **a**; 9.49 y 9.40 ppm respectivamente en el ligante **b**, por lo tanto el protón x al estar a campo más bajo que los otros ya mencionados, es el que se encuentra más desprotegido y es más probable que en ese sitio se lleve a cabo la reacción de ciclometalación. La estructura del compuesto **1a** fue corroborada con la difracción de rayos X (figura 5.10). Por otra parte, se pudo observar en los ligantes **c** y **d**, que el protón denominado x también se encuentra a campo más bajo que los protones f y c lo cual nos lleva a concluir que el comportamiento es el mismo en la reacción de ciclometalación para sintetizar la serie de compuestos **1a-1d**.

El complejo catiónico  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$  se utilizó en las reacciones de intercambio debido a que sus ligantes MeCN son lábiles, por tal motivo se espera

que puedan reaccionar con ligantes bipyridina y fenantrolina para formar los complejos deseados.<sup>103, 104</sup>

Con la finalidad de obtener los compuestos antes mencionados, se realizó una reacción en la cual se utilizó MeCN como medio de reacción.<sup>104</sup> Inicialmente se agregó el compuesto  $[\text{Ru}(\text{C}=\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$  y seguidamente un equivalente del ligante phen o bpy, según lo deseado. Rápidamente se observó cambio de coloración de amarillo a morado. La reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas a 45°C. Se esperaba que solamente se llevara a cabo la sustitución de dos ligantes MeCN por uno de bipyridina o fenantrolina, dependiendo del caso. Posterior a las 24 horas de reacción, se procedió a separar el producto final, a través de una columna de alúmina, utilizando una mezcla de disolventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  (90/10), como fase móvil. Los resultados no fueron satisfactorios ya que se obtuvo una mezcla de color café que no fue posible separar. Con el objetivo de obtener los compuestos se realizó otra reacción en la cual se incrementó la temperatura de reacción a 70°C, finalmente fue realizada una tercera reacción donde la temperatura se mantuvo a reflujo, manteniendo agitación constante durante las 24 horas de reacción. A pesar del cambio de temperatura, solo se obtuvo una mezcla de color café que no fue posible de purificar.

Las reacciones se llevaron a cabo bajo las condiciones que se muestran en a figura 5.5.

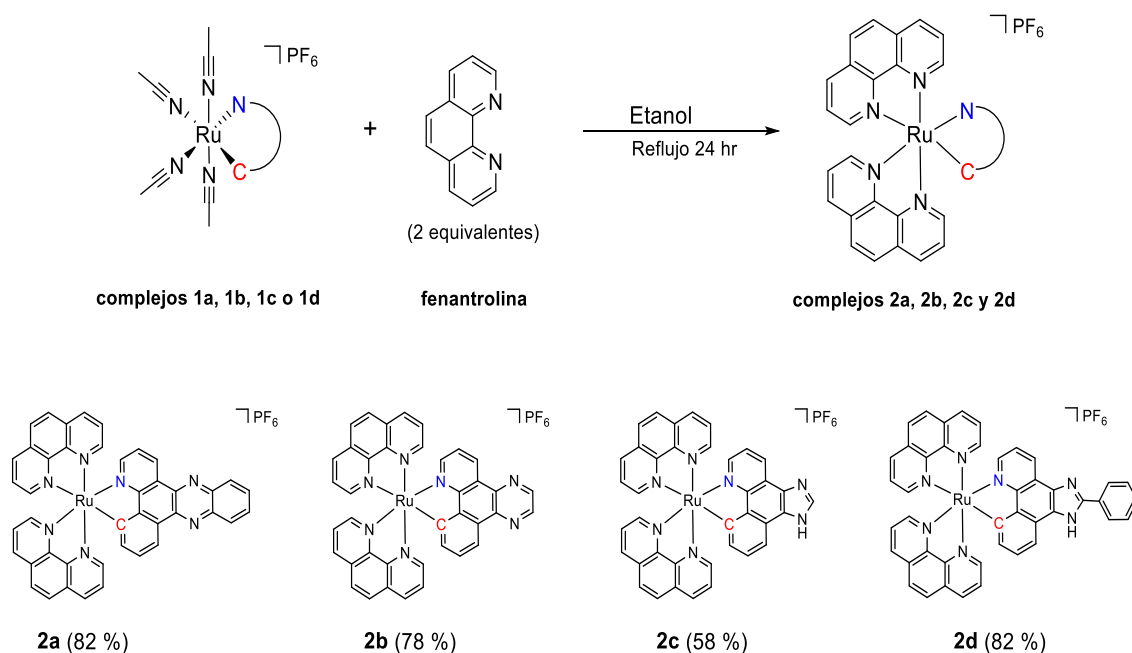


**Figura 5.5** Intentos de síntesis de los complejos  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{phen})(\text{MeCN})_2]\text{PF}_6$  y  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{bpy})(\text{MeCN})_2]\text{PF}_6$ .

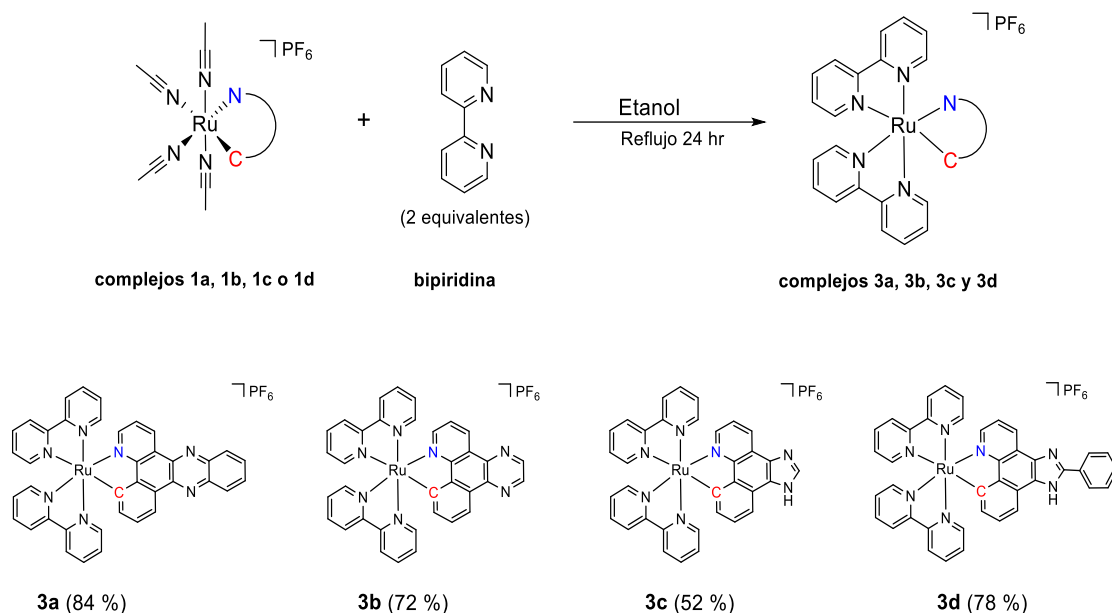
En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se pueden observar señales que pertenecen al producto deseado, pero también hay señales que posiblemente pertenecen al compuesto que no presenta ligandos MeCN, series **2** y **3**, que se mencionan más adelante. Debido a lo anterior se tomó la decisión de realizar la síntesis de los compuestos que presentan dos ligandos bipyridina o fenantrolina y el ligando de ciclometalación  $\pi$ -expansivo, síntesis que se describe a continuación.

La sustitución de los ligandos acetonitrilo por dos ligandos 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipyridina en etanol a temperatura de reflujo condujo a los complejos deseados, serie **2**  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$  ( $\text{C}\sim\text{N}$  = ligante bppz, bpq, biq ó pbiq) y serie **3**  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$  ( $\text{C}\sim\text{N}$  = ligante bppz, bpq, biq ó pbiq), como sólidos de color rojo y con rendimientos excelentes, (figura 5.6 y 5.7 respectivamente). El tiempo de reacción fue en principio de 6 horas, con rendimientos que rondan el 50%. Sin embargo, el aumento del tiempo de reacción, hasta 24 horas, permitió obtener rendimientos por arriba del 70%, excepto para los compuestos **2c** y **3c** que fue de 58% y 52% respectivamente.

Cabe mencionar que anteriormente Sainuddin et al.,<sup>21</sup> han reportado la síntesis de los compuestos **3a** y **3b** con rendimientos del 25%, partiendo de  $[\text{Ru}(\text{N}\sim\text{N})_2\text{Cl}_2]$ , donde N~N es un ligante de coordinación. Para preparar los mismo complejos, utilizamos la ruta de síntesis ya reportada por nuestro grupo de trabajo,<sup>104</sup> a partir del compuesto  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$  para posteriormente preparar los compuestos  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{N}\sim\text{N})_2]\text{PF}_6$ . Los rendimientos obtenidos fueron superiores alcanzando valores de 84% para el **3a**, 74% para el **3b** y de más del 70% para **2a**, **2b**, **2d** y **3d**.

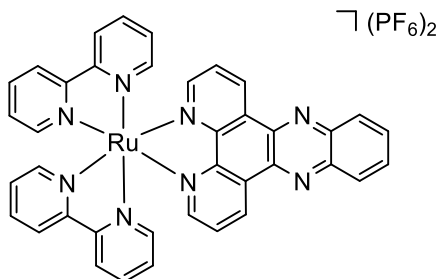


**Figura 5.6** Complejos de ciclometalados de rutenio(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, serie **2**, preparados en este trabajo.



**Figura 5.7** Complejos de ciclometalados de rutenio(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, serie **3**, preparados en este trabajo.

También se preparó el compuesto de coordinación  $[\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})_2](\text{PF}_6)_2$  (**CC-8**) (Figura 5.8), reportado previamente por Barton *et al.*<sup>62</sup> Dicho complejo se utilizó en los estudios biológicos para comparar los resultados con los del complejo ciclometalado **3a** debido a que presentan una estructura similar, asimismo para resaltar la importancia del enlace sigma Ru-C que presentan los compuestos sintetizados en este trabajo.



**Figura 5.8** Estructura del complejo  $[\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})_2](\text{PF}_6)_2$ .<sup>62</sup>

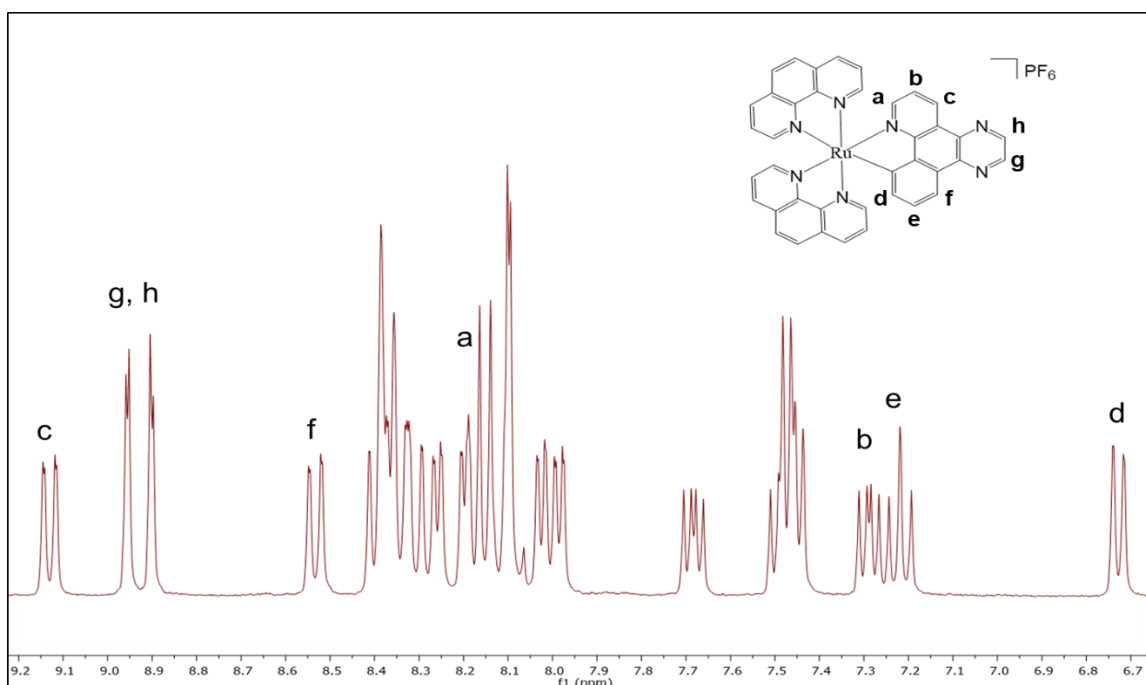
Todos los complejos fueron caracterizados por las técnicas usuales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, IR, análisis elemental, espectrometría de masas. Los valores del desplazamiento químico en RMN se encuentran dentro de los valores esperados para complejos con ligantes bidentados polipiridínicos, las señales correspondientes a los protones de los ligantes  $\pi$ -expansivos, se encuentran desplazados a campo alto en comparación con los ligantes  $\pi$ -expansivos libres, esto como consecuencia del efecto electroattractor del rutenio.

Se logró la asignación de los protones a pesar de tener muchas señales sobrepuestas (multipletes). Asimismo, la distancia de enlace Ru-C más corta que las del enlace Ru-N *trans* y *cis*, fue clave para lograr la asignación de los protones en los complejos. Las distorsiones en el compuesto permiten que los hidrógenos del anillo que forma el enlace Ru-C se acerquen al centro metálico mientras que los hidrógenos de los anillos del ligante bipyridina o fenantrolina *trans* al carbono, experimentan repulsión, alejándose del centro metálico, el impacto fue mayor para el hidrógeno c que se encuentra cercano al enlace Ru-C, que ahora es el más desprotegido en los complejos.

En el espectro de RMN del complejo **2b** (Figura 5.9), se puede observar que el hidrógeno d, adyacente al carbono quelante del ligante C-N es protegido debido a la corta distancia de enlace Ru-C del anillo dando lugar a un doblete a campo sustancialmente más alto (6.73 ppm) que las otras señales de protones aromáticos del complejo. La otra señal que nos otorgó información muy importante fue producida por el protón c y se puede observar como un doblete a campo sustancialmente más bajo (9.13 ppm) que el resto de las señales aromáticas, debido al alargamiento del enlace Ru-N y cercano al anillo de pirazina, Antes de la ciclometalación en el caso de los ligantes **b**, la señal para el protón c se aparece a 9.32 ppm. Este efecto de proximidad se vio respaldado por la aparición de señales desprotegidas correspondientes a los protones g y h cerca de 8.96-8.9 ppm. Curiosamente, las señales para los protones g y h de **2a** (Figura 9A del anexo), se desplazaron a campo más alto cerca de 8.30-8.22 ppm, lo que subraya la influencia del aumento de la conjugación  $\pi$ , también se puede observar que los singletes correspondientes a los metilos del acetonitrilo en



aproximadamente 2 ppm, para la serie **1a-1d** (figuras 5A-8A), señales que desaparecieron después de la sustitución de los ligantes de acetonitrilo por dos de fenantrolina para la serie **2** y dos de bipyridina para la serie **3**. En general el análisis realizado para el complejo **2b** es similar al que presentan los demás complejos que se pueden apreciar en las figuras 11A-16A de la sección de anexos.

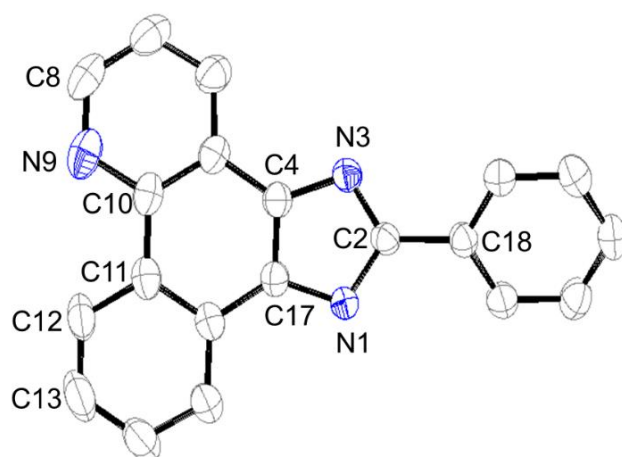


**Figura 5.9** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **2b**.

Por IR se corroboró la presencia del anión hexafluorofosfato y el grupo nitrilo del acetonitrilo para los compuestos **1a-1d** y posteriormente el anión hexafluorofosfato para las series **2** y **3**.

## 5.2. Cristalografía

Se obtuvieron cristales adecuados para estudios de difracción de rayos X. Uno de los cristales fue del ligante **d**, la estructura se muestra en la figura 5.10.



**Figura 5.10** Representación de la estructura del ligante **d** con 50% de probabilidad, los átomos de hidrogeno son omitidos para una mejor claridad en la estructura.

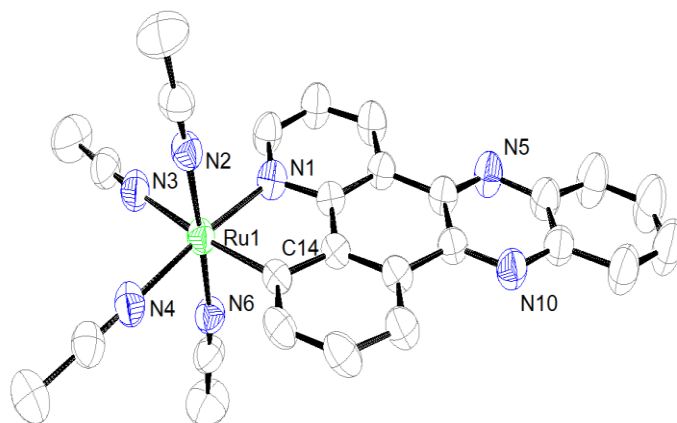
Las distancias de enlace seleccionadas y los ángulos se resumen en la tabla S1, los datos cristalográficos se muestran en la tabla S2, ambas tablas se encuentran en la sección de anexos.

También se logró la cristalización de los complejos **1a**, **2b** y **3a**. Los tres compuestos cristalizaron con la técnica por difusión lenta. La primera fase fue diclorometano, en el cual se disolvió el compuesto la segunda fase fue de éter dietílico para los compuestos **1a** y **2b**, para el compuesto **3a** se utilizó hexano como segunda fase.

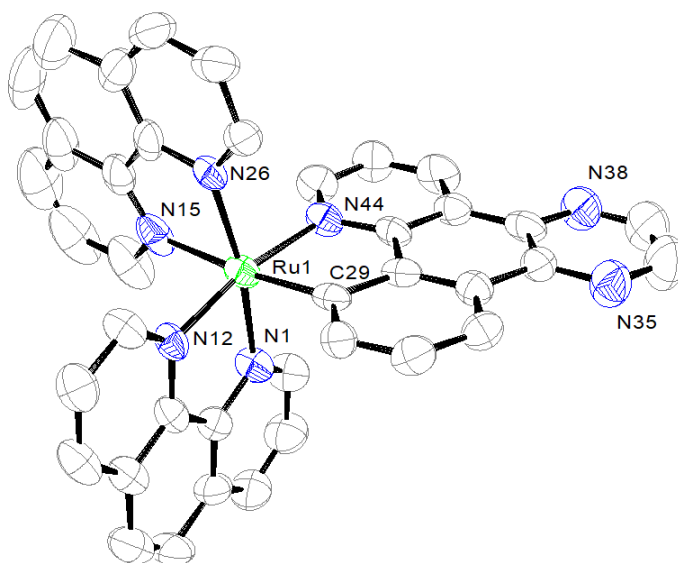
La estructura molecular del compuesto **1a**, se muestra en la figura 5.11 y para los compuestos **2b** y **3a** se muestran en la figura 5.12 y figura 5.13 respectivamente.

Las distancias de enlace seleccionadas y los ángulos se resumen en las Tablas S1 y S2. Los datos cristalográficos se muestran en la Tabla S3. Los tres complejos presentan una geometría octaédrica ligeramente distorsionada. Las distancias de enlace alrededor del centro de rutenio son similares para todos los compuestos. El enlace de rutenio-nitrógeno *trans* al rutenio-carbono (2.125(4), 2.138(6) y 2.111(12) Å para **1a**, **2b**, **3a**, respectivamente) es claramente alargado

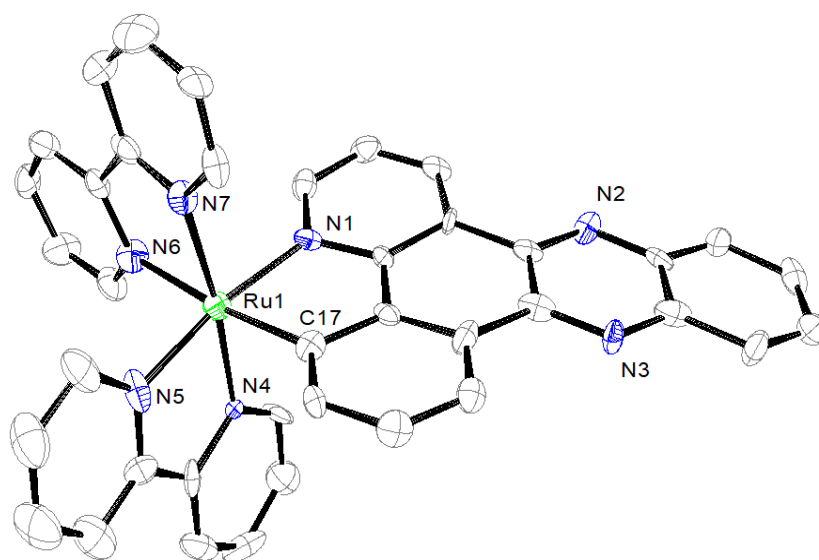
en los tres casos cuando se compara con los otros enlaces de rutenio-nitrógeno ( $2.005 \pm 3$  a  $2.069(4)$  Å para **1a**,  $2.038(5)$  a  $2.090(5)$  Å para **2b** y  $2.048(13)$  a  $2.074(11)$  Å para **3a**), debido a una fuerte influencia *trans*, como ya se informó para complejos ciclometalados similares<sup>103</sup>.



**Figura 5.11** Representación de la estructura del compuesto **1a**, con 50% de probabilidad, los átomos de hidrogeno y el contraión  $\text{PF}_6^-$ , son omitidos para una mejor claridad en la estructura.



**Figura 5.12** Representación de la estructura del compuesto **2b** con 50% de probabilidad, los átomos de hidrogeno y el contraión  $\text{PF}_6^-$ , son omitidos para una mejor claridad en la estructura.



**Figura 5.13** Representación de la estructura del compuesto **3a** con 50% de probabilidad, los átomos de hidrogeno y el contraión  $\text{PF}_6^-$ , son omitidos para una mejor claridad en la estructura.

### 5.3 Estudios electroquímicos

Como parte de la caracterización de los compuestos es importante determinar los potenciales de oxidorreducción de los complejos en particular Ru(II)/Ru(III). Además, se ha reportado cierta correlación entre la actividad citotóxica y potencial redox.<sup>20</sup> Las propiedades redox de los complejos se estudiaron mediante voltamperometría cíclica en acetonitrilo. En todos los casos, se puede observar una onda de un electrón cuasi-reversible entre 0.554 y 0.621 V (frente a Ag/AgCl) que se puede atribuir a la oxidación de Ru(II)/Ru(III). Los potenciales redox para el proceso de Ru (II)/Ru(III) se resumen en la Tabla 4.

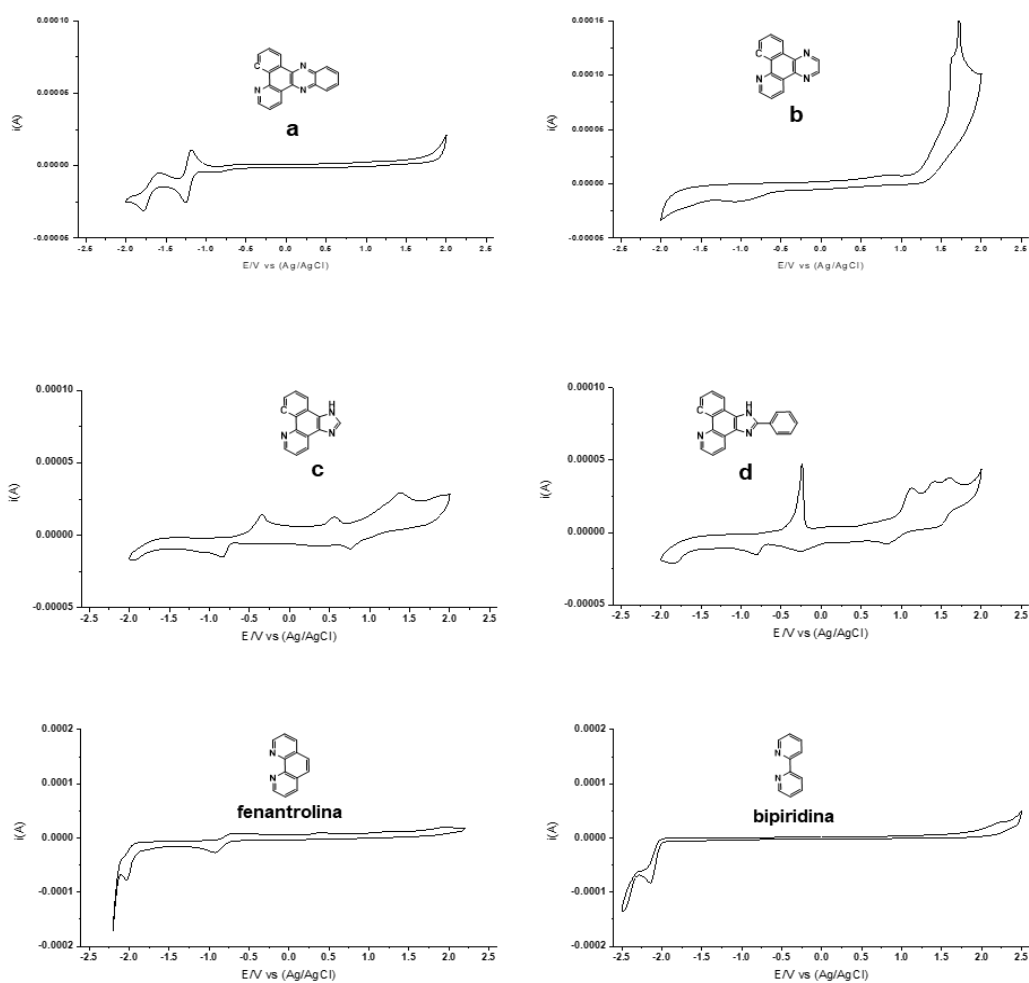
**Tabla 4** Datos de electroquímicos, electrodo de referencia Ag/AgCl, [Complejo] = 3 mM en acetonitrilo, (n-Bu)<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> 0.1 M, velocidad de barrido 100 mVs<sup>-1</sup>, temperatura 25°.

Complejo	E <sup>0</sup> (Ru <sup>II</sup> /Ru <sup>III</sup> ) (V)
<b>2a</b>	0.621
<b>3a</b>	0.614
<b>2b</b>	0.616
<b>3b</b>	0.610
<b>2c</b>	0.561
<b>3c</b>	0.554
<b>2d</b>	0.574
<b>3d</b>	0.562
<b>CC-8</b>	1.48

Complementariamente se realizó el estudio electroquímico de los ligantes **a**, **b**, **c**, **d**, bipyridina y fenantrolina (Figura 5.14). Se observa que el ligante **a** presenta dos procesos reversibles entre -1.0 y -2.0 V. Por otra parte, en el compuesto **b** solo se observa un evento de reducción en -1.1 V, los compuestos **c** y **d** presentan varios procesos de oxidación y de reducción irreversibles en toda la ventana escaneada. Asimismo la fenantrolina presenta un proceso reversible en -0.8 V y uno irreversible en -2.1, finalmente la bipyridina solamente tiene un proceso de reducción en -2.2 V.

El objetivo de realizar la voltamperometría cíclica a los ligantes fue solamente para saber si alguno de ellos presenta un proceso de oxidación reducción en el

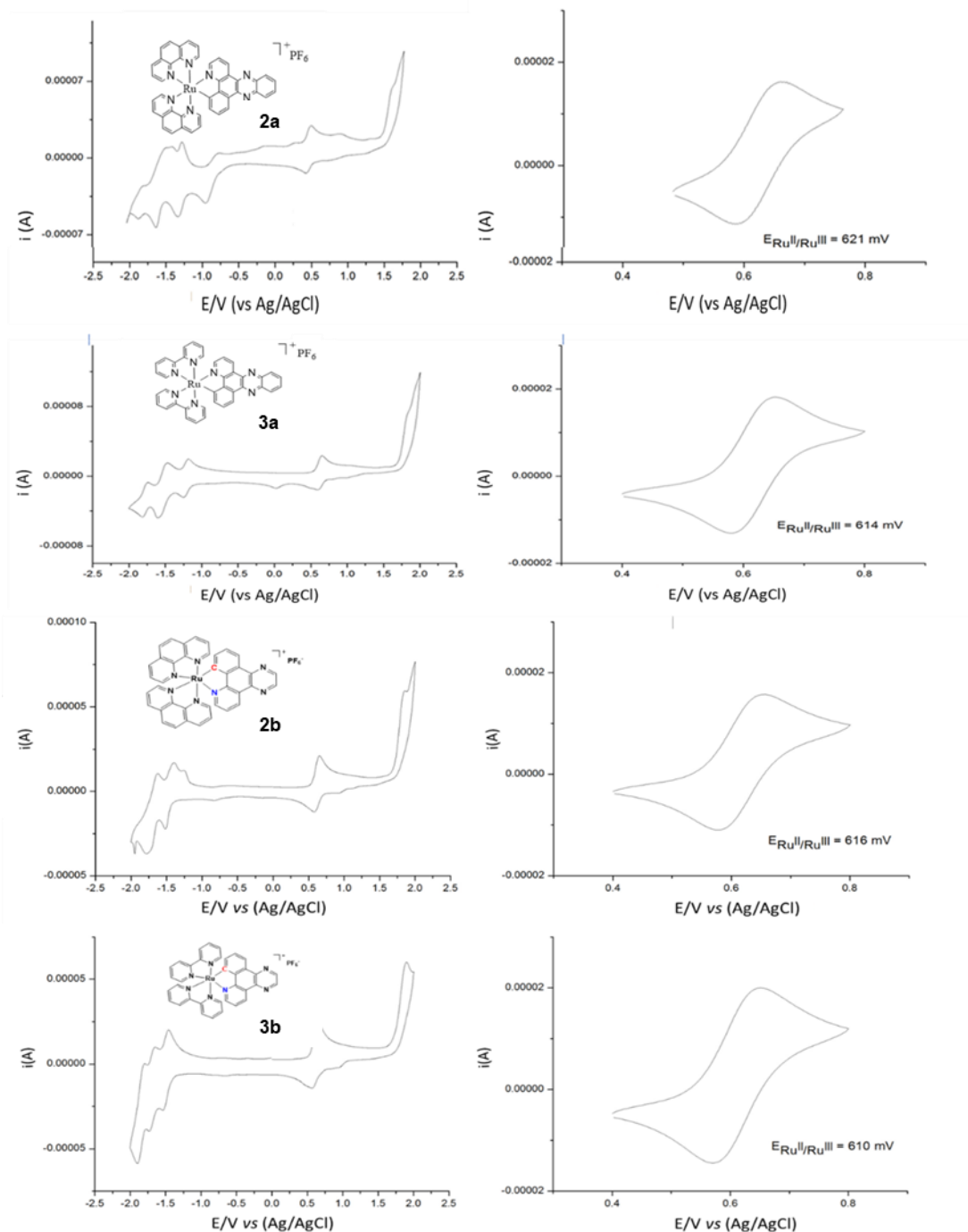
intervalo entre 0.554 y 0.621 V (frente a Ag/AgCl), intervalo donde se llevó a cabo el proceso redox atribuido a metal de los complejos de Ru(II). Se determinó que los ligantes presentan procesos distintos a los del proceso redox del metal y que estos procesos pueden aparecer en el voltamograma de los complejos a valores que van desde -0.8 V hasta -2.2 V. Con lo anterior se corroboró que los valores redox que se encuentran en el intervalo 0.554 y 0.621 V (frente a Ag/AgCl), son exclusivamente del proceso redox del metal de los complejos de Ru(II).



**Figura 5.14** Voltamperogramas cíclicos de los ligante **a**, **b**, **c**, **d**, fenantrolina y bipyridina. (electrodo de referencia Ag/AgCl, [Ligante] = 3 mM en acetonitrilo, (n-Bu)<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> 0.1 M, velocidad de barrido 100 mVs<sup>-1</sup> a 25° C).

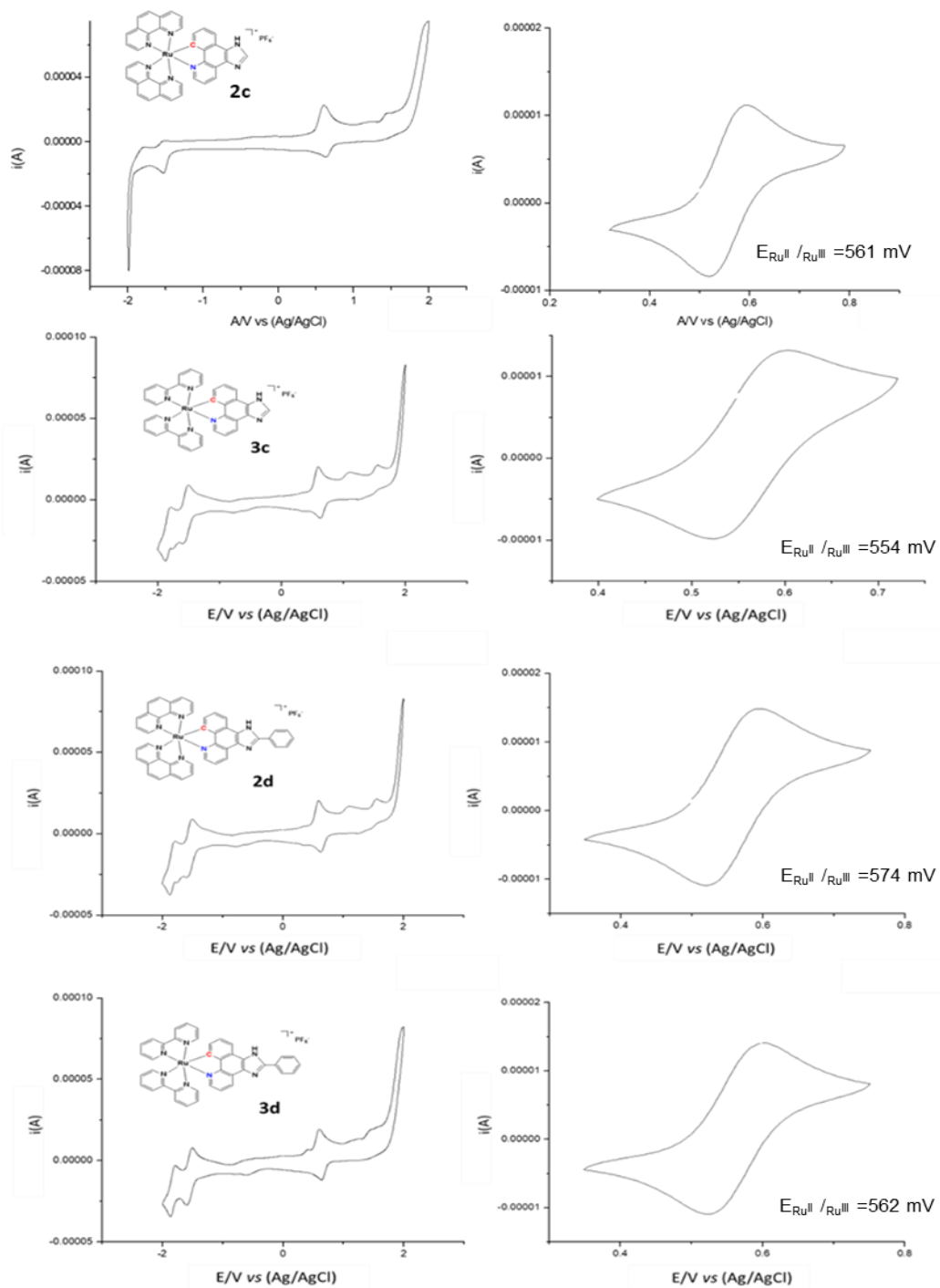
Los voltamperogramas cíclicos se muestran en las figuras 5.15 y 5.16. El potencial redox complejo de coordinación **CC-8** fue de 1.48 V vs Ag/AgCl, mayor a los valores de los compuestos de la serie **2** y **3**. Esto puede ser debido a que el metal en **CC-8** posee menor densidad electrónica comparado con los complejos de la serie **2** y **3**, con mayor densidad electrónica otorgada por el enlace metal-carbono, y por otro lado el complejo **CC-8** es dicatiónico mientras que los complejos organometálicos son monocationicos, ambas características dificultan su oxidación en comparación con los complejos de la serie **2** y **3**.

Al escanear en la dirección negativa, se pueden apreciar eventos de reducción de un electrón secuenciales y reversibles entre -2.0 y -1.0 V, dos de los cuales pertenecen al ligante bpy en los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3d**, o al ligante phen en los compuestos **2a**, **2b**, y **2d**. También en los compuestos **2a**, **3a**, **2b** y **3b**, se observa un tercer evento de reducción que pertenecen al ligante  $\pi$ -expansivo. Estas características son típicas de ligantes bidentados polipiridínicos coordinados a un centro metálico.<sup>105,106</sup>



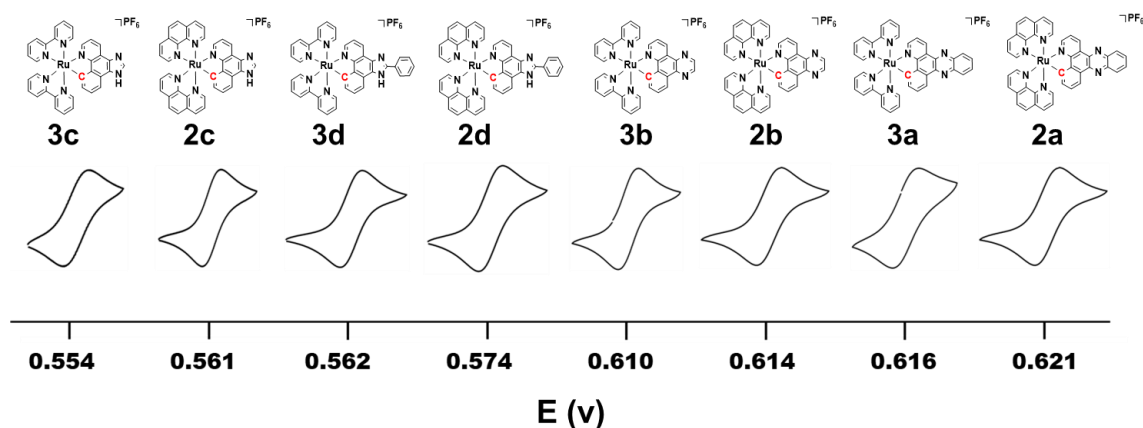
**Figura 5.15** Voltamperogramas cíclicos de los complejos **2a**, **3a**, **2b** y **3b**. En la parte izquierda el voltamperograma completo y en la parte derecha el del par redox Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup>. (electrodo de referencia Ag/AgCl, [Complejo] = 3 mM en acetonitrilo, (n-Bu)<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> 0.1 M, velocidad de barrido 100 mVs<sup>-1</sup> a 25° C).





**Figura 5.16** Voltamperogramas cíclicos de los complejos **2c**, **3c**, **2d** y **3d**. En la parte izquierda el voltamperograma completo y en la parte derecha el del par redox Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup>. (electrodo de referencia Ag/AgCl, [Complejo] = 3 mM en acetonitrilo, (n-Bu)<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> 0.1 M, velocidad de barrido 100 mVs<sup>-1</sup> a 25° C).

En la figura 5.17, se puede observar que los valores de potencial redox son mayores para los compuestos que tienen ligantes con grupo quinoxalina (**2a** y **3a**) o pirazina (**2b** y **3b**). Claramente se observa que los compuestos que presentan ligantes fenantrolina serie **2**, tienen un potencial redox mayor a los compuestos de la serie **3**, que presentan ligantes bipyridina. Esto puede ser debido a que la fenantrolina es menos donadora  $\pi$  que la bipyridina.<sup>17</sup> Además de los ligantes fenantrolina, serie **2**, o bipyridina serie **3**, los compuestos **2c** y **3c** presentan un ligante derivado de la benzoquinolina con un grupo imidazol y en los compuestos **2d** y **3d** un ligante derivado de la benzoquinolina con un grupo fenilimidazol. Dichos compuestos son los que presentan menor sistema  $\pi$  conjugado de todos los compuestos estudiados, a tener un ligante más donador, por lo tanto, requieren menor energía para llevar a cabo el proceso de oxidación del metal. En la figura 5.14 se puede observar que el sistema  $\pi$  conjugado y el potencial redox que presentan los compuestos, incrementa de izquierda a derecha.



**Figura 5.17** Voltamperogramas cíclicos de los complejos ciclometalados de rutenio(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, preparados en este trabajo, electrodo de referencia Ag/AgCl, [Complejo] = 3 mM en acetonitrilo,  $(n\text{-Bu})_4\text{NPF}_6$  0.1 M, velocidad de barrido  $100 \text{ mVs}^{-1}$  a  $25^\circ \text{C}$ .

Por otra parte se observa que el compuesto **3a**, presenta un potencial redox menor que el de su contraparte de coordinación **CC-8**, esto se debe a que el enlace  $\sigma$  metal-carbono otorga densidad electrónica al complejos **3a**<sup>107</sup> permitiendo que dicho complejo se oxide más fácil que el **CC-8**, asimismo este fragmento ortometalado es un elemento crucial para brindar rigidez al complejo. Se ha reportado que este tipo de ligante C-N, reduce el potencial redox de los complejos,<sup>15</sup> por lo tanto el enlace  $\sigma$  metal-carbono reduce de manera importante los potenciales de oxidorreducción de los complejos organometálicos comparado con los análogos de coordinación como el complejo **CC-8**, que tiene un potencial redox de 1.48 V.<sup>108</sup>

#### 5.4. Absorción electrónica

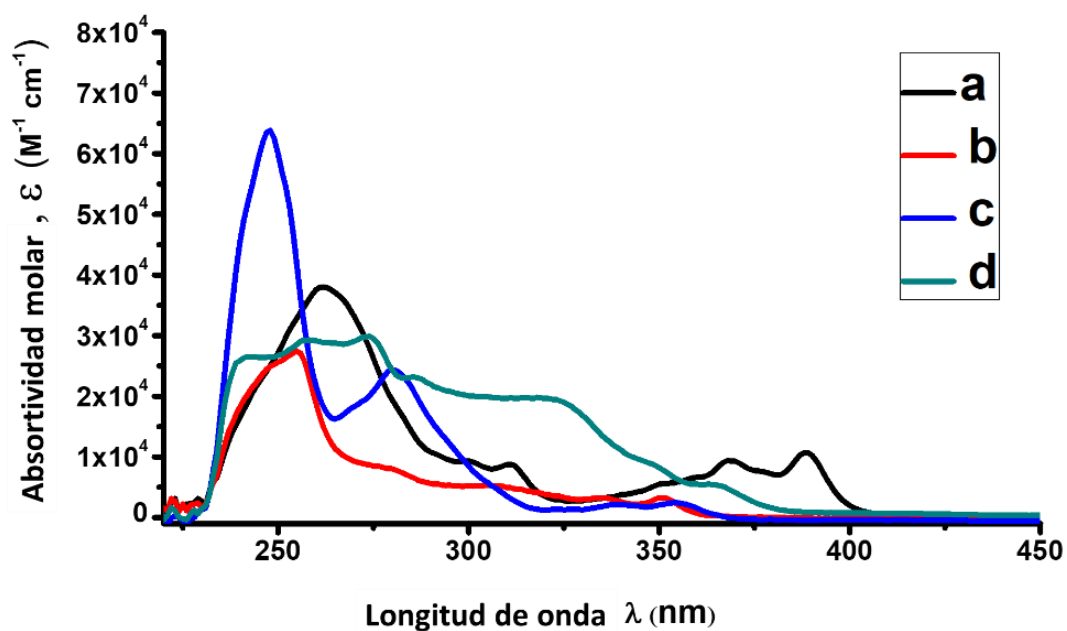
Los espectros de absorción UV-vis de los ligantes y de los complejos fueron medidos en dicloroetano a 37°C, la concentración fue de  $10^{-5}$  M. Los espectros de los ligantes **a** y **b** son similares con bandas absorción en la región de 225-300 nm para **a** y 225-260 nm para **b**, que se asignan a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  centradas en el ligante.<sup>109</sup> Esto es consistente con las estructuras porque el ligante **a** presenta un sistema conjugado  $\pi$  más extendido que **b**.

En el caso de los ligantes **c** y **d**, se puede observar una banda intensa para el ligante **c** en la región 225-270 nm, centrada en 248 nm y para el ligante **d**, se observa una banda muy ancha en la región de 225-280 nm, debido a que presenta un sistema  $\pi$  más extendido que el ligante **c** (figura 5.18).

Lo anterior puede ser debido a que el ligante **c**, presente una contribución electrónica que es de mayor energía que las que se presentan en el ligante **d**. Debido a la estructura del ligante **d**, se espera que tenga mayor deslocalización del sistema  $\pi$ , por lo tanto, es de esperarse que se presenten varias transiciones electrónicas. Este comportamiento es consistente con la naturaleza de las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>109</sup> En la table 6 se puede observar el máximos de absorción a diferentes longitudes de onda ( $\lambda_{max}$ ), según sea el ligante.

**Tabla 6** Datos fotofísicos de los ligantes **a**, **b**, **c** y **d** ( $C_2H_4Cl_2$ ,  $10^{-5}$  M a  $37^\circ C$ ).

Ligante	$\lambda(nm)$ , [ $\epsilon$ ( $\times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ )]
<b>a</b>	261 (0.5381), 311 (0.1233), 368 (0.1303), 388 (0.1515)
<b>b</b>	255 (0.5422), 308 (0.0992), 334 (0.0702), 350 (0.0697)
<b>c</b>	248 (0.6007), 280 (0.2304), 340 (0.0219), 355 (0.0243)
<b>d</b>	258 (0.2253), 273 (0.2270), 285 (0.1696), 320 (0.1531)



**Figura 5.18** Espectro de absorción de los ligantes en  $C_2H_4Cl_2$ ,  $10^{-5}$  M a  $37^\circ C$ .

En todos los complejos, (Tabla 7), se puede observar una banda de absorción de alrededor de 250-300 nm debido a las transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  de los ligantes **a-d**.<sup>21, 109</sup> Sin embargo, el complejo **3c** el cual tiene al ligante **c**, presenta una baja contribución para esta transición centrada a 249 nm.

Estos complejos también muestran dos conjuntos de bandas de absorción de baja energía entre 320 y 700 nm (Figura 5.19), que se asignan a las transiciones MLCT; la banda de absorción de menor energía, 450-700 nm, pertenece a transiciones del metal al ligante bipyridina o fenantrolina (Ru $\rightarrow$ N-N), mientras que la banda de absorción de mayor energía 345-450 nm, está asignada a la transición del metal al ligante **a-d** (Ru $\rightarrow$ C-N).<sup>21, 100, 109</sup>

Cuando un complejo presenta un ligante más  $\pi$ -expansivo (**2a** y **3a**), da lugar a absorciones que se producen en longitudes de onda ligeramente más cortas y notablemente, se forman nuevas bandas entre 300 y 450 nm, comparado con los complejos que presentan un ligante menos  $\pi$ -expansivo (**2c** y **3c**). Estas características se atribuyeron a transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  de mayor longitud de onda (con posible contribución de las transiciones  $n\text{-}\pi^*$ ) centradas en los ligantes de ciclometalación más  $\pi$ -expansivos.<sup>21</sup>

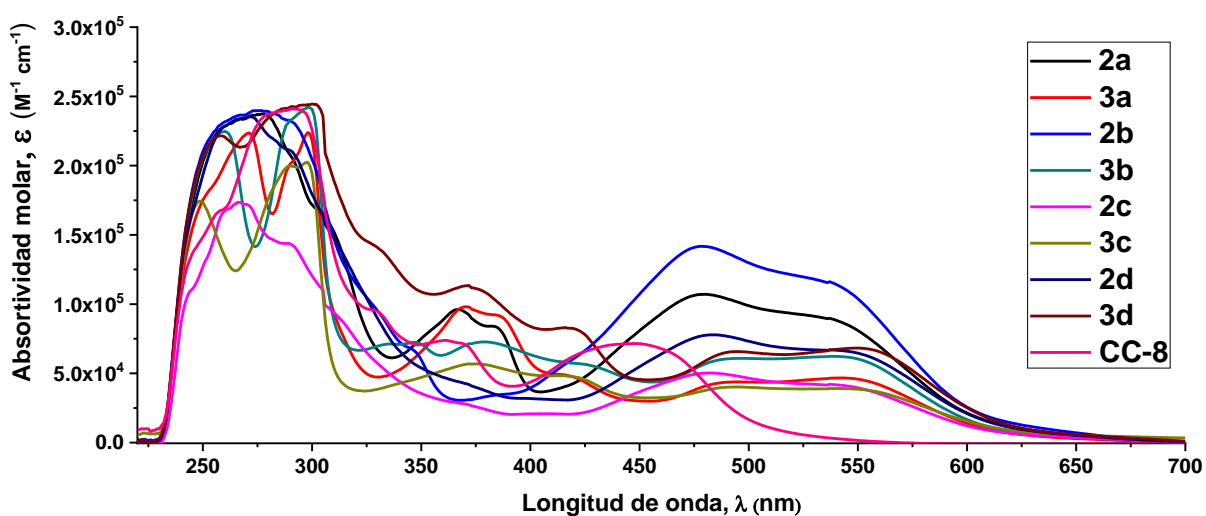
**Tabla 7** Datos fotofísicos de los compuestos **2a**, **3a**, **2b**, **3b**, **2d**, **3d**, **3c**, **CC-8** (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, 10<sup>-5</sup> M a 37°C).

Complejo	$\lambda(\text{nm})$ , [ $\epsilon$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )]
<b>2a</b>	259 [2.27], 277 [2.37], 304 [1.66], 367 [0.96], 382 [0.84], 479 [1.07], 537 [0.89]
<b>3a</b>	271 [2.23], 298 [2.44], 370 [0.98], 382 [0.92], 416 [0.48], 495 [0.46], 549 [0.46]
<b>2b</b>	273 [2.39], 290 [2.32], 327 [1.00], 345 [0.68], 385 [0.34], 478 [1.41], 537 [1.16]
<b>3b</b>	260 [2.24], 298 [2.42], 348 [0.72], 378 [0.72], 421 [0.57], 490 [0.60], 540 [0.62]
<b>2c</b>	266 [1.74], 290 [1.44], 304 [1.12], 368 [0.28], 483 [0.50], 538 [0.42]

---

<b>3c</b>	249 [1.74], 290 [1.99], 298 [2.02], 375 [0.56], 414 [0.48], 495 [0.40], 537 [0.39]
<b>2d</b>	272 [2.35], 289 [2.11], 372 [0.41], 483 [0.77], 537 [0.66]
<b>3d</b>	259 [2.21], 302 [2.44], 328 [1.42], 372 [1.13], 416 [0.83], 495[0.65], 549 [0.69]
<b>CC-8</b>	258 [1.67], 287 [2.40], 291 [2.41], 327 [0.95], 361 [0.78], 443 [0.71]

---



**Figura 5.19** Espectro de absorción de los complejos de Ru(II) en C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, 10<sup>-5</sup> M a 37°C.

Por otro lado, y con el objetivo de conocer el comportamiento de los compuestos en una solución con parámetros similares a los utilizados en las pruebas biológicas, se realizaron ensayos con los compuestos a una concentración de 10<sup>-5</sup> M a 37 °C, en una solución acuosa con un 0.5% de dimetilsulfóxido. Se aprecia el mismo patrón de absorción (Figura 26A en la sección anexo), que el observado en las pruebas realizadas con dicloroetano con la misma concentración de complejo, discutido en el apartado anterior.

## 5.5. Estudios de estabilidad

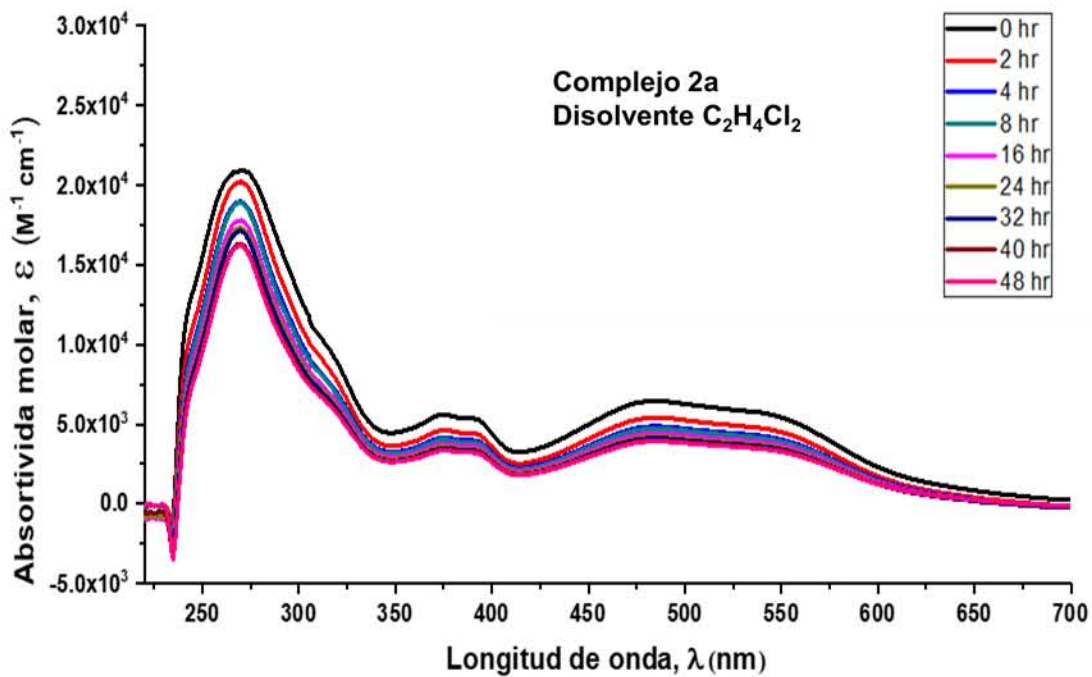
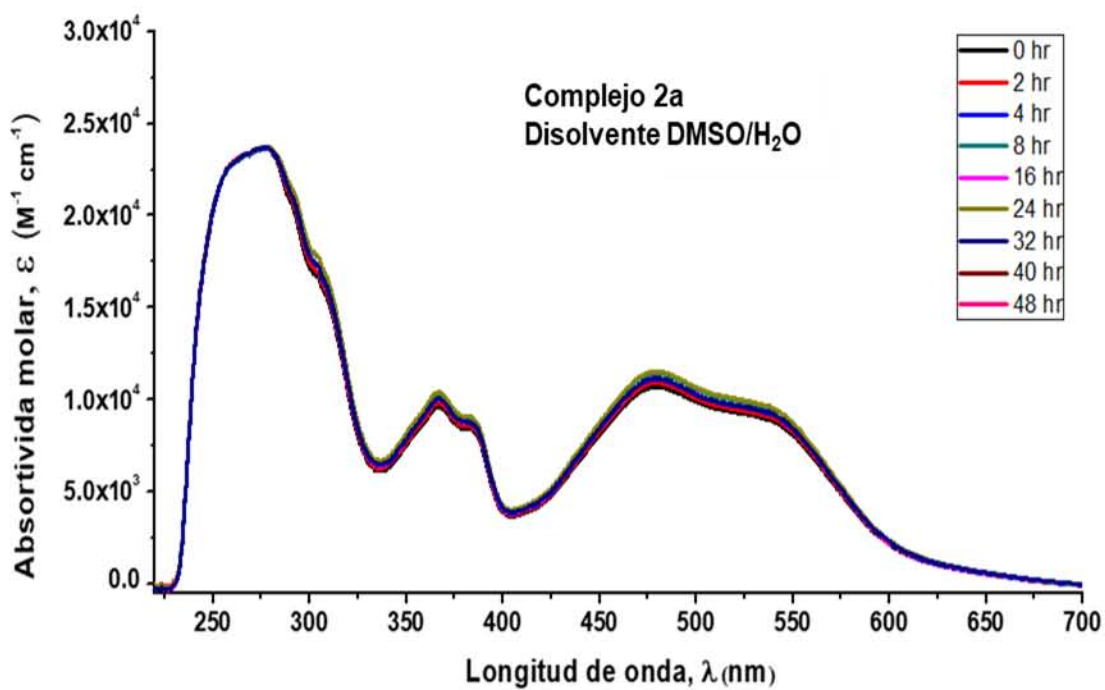
La estabilidad de los complejos de rutenio en solución acuosa se evaluó mediante espectroscopía UV-Vis, durante 48 horas manteniendo la temperatura a 37°C. La concentración de los complejos fue de  $1 \times 10^{-5}$  M en una disolución acuosa que contenía 0.5% de DMSO. Con el objetivo de comparar la estabilidad en distintos disolventes, se realizaron ensayos con los complejos a la misma concentración, pero utilizando dicloroetano como disolvente.

En los ensayos realizados con dicloroetano como disolvente, se observa que los complejos **2a**, **3a**, **2b**, **3b** y **2d** (Figuras 5.20-5.23 y 5.25 respectivamente), presentan una ligera descomposición. Sin embargo, se puede observar que cuando se utilizó DMSO/H<sub>2</sub>O como disolvente con los mismos compuestos, la descomposición fue menor durante todo el ensayo.

Caso contrario se presenta en el compuesto **2b** (Figura 5.22), ya que presenta mayor descomposición cuando fue utilizado DMSO/H<sub>2</sub>O como disolvente, teniendo un comportamiento contrario a los compuestos anteriormente mencionados.

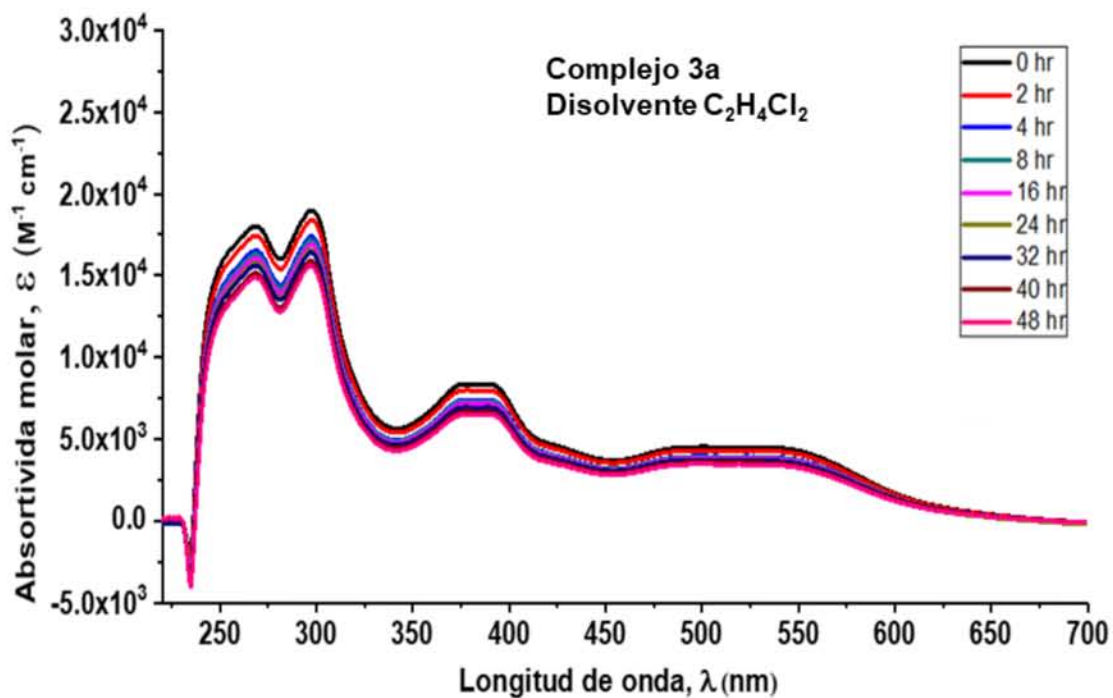
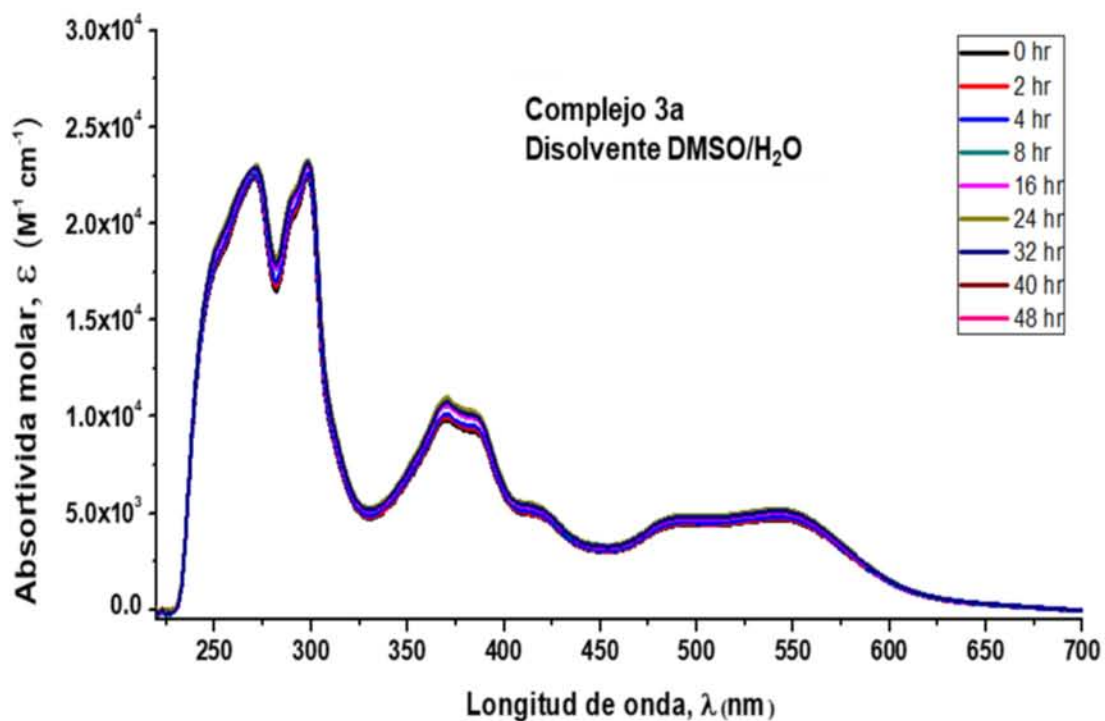
Los compuestos **3c**, **3d** y **CC-8** (Figuras 5.24, 5.26 y 5.27 respectivamente), no presentan descomposición durante todo el tiempo en que se llevaron a cabo los ensayos, el comportamiento es similar en ambos disolventes utilizados.

Después de conocer los resultados de los complejos preparados en este trabajo, se determinó que, a pesar de que varios complejos presentan una ligera descomposición, todos presentan suficientemente estabilidad para poder ser utilizados en los estudios biológicos propuestos, particularmente para la evaluación de su citotoxicidad en células cancerosas, ya que dicho ensayo se lleva a cabo en un periodo de tiempo de 48 horas.

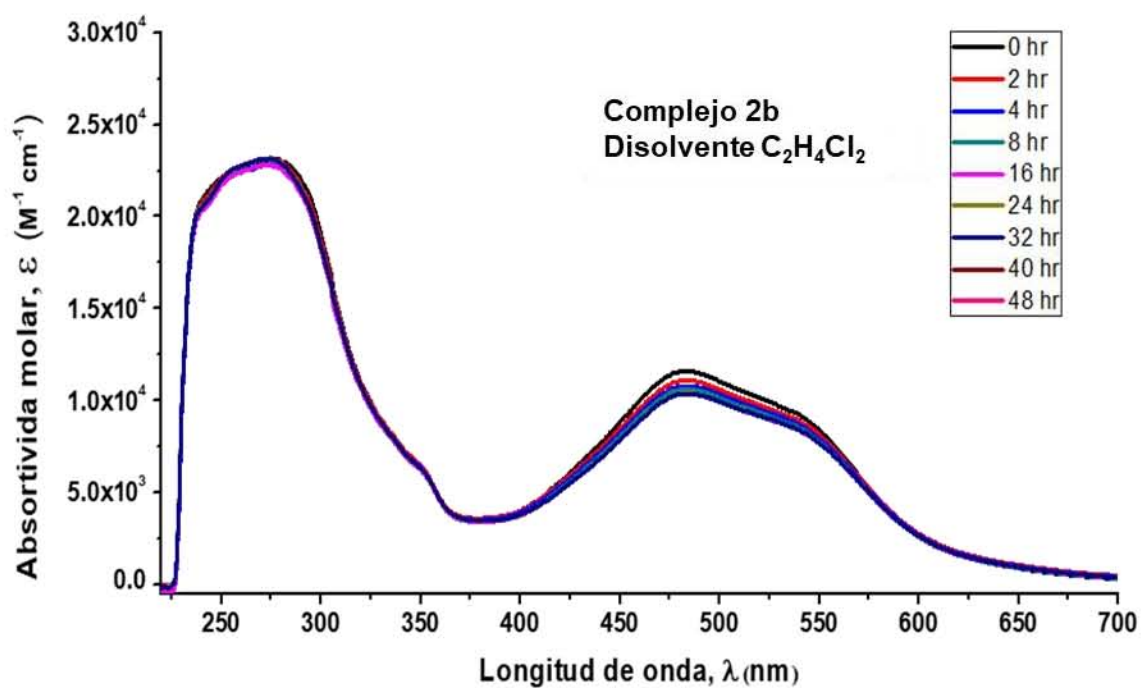
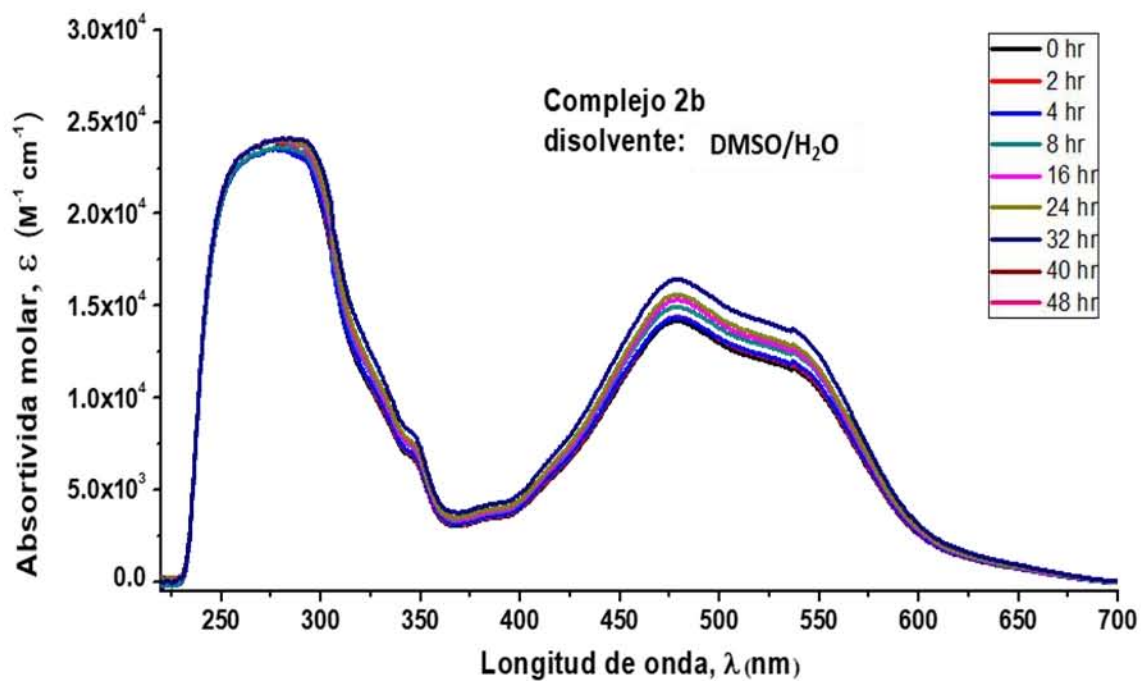


**Figura 5.20** Espectro UV-vis del complejo **2a**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.

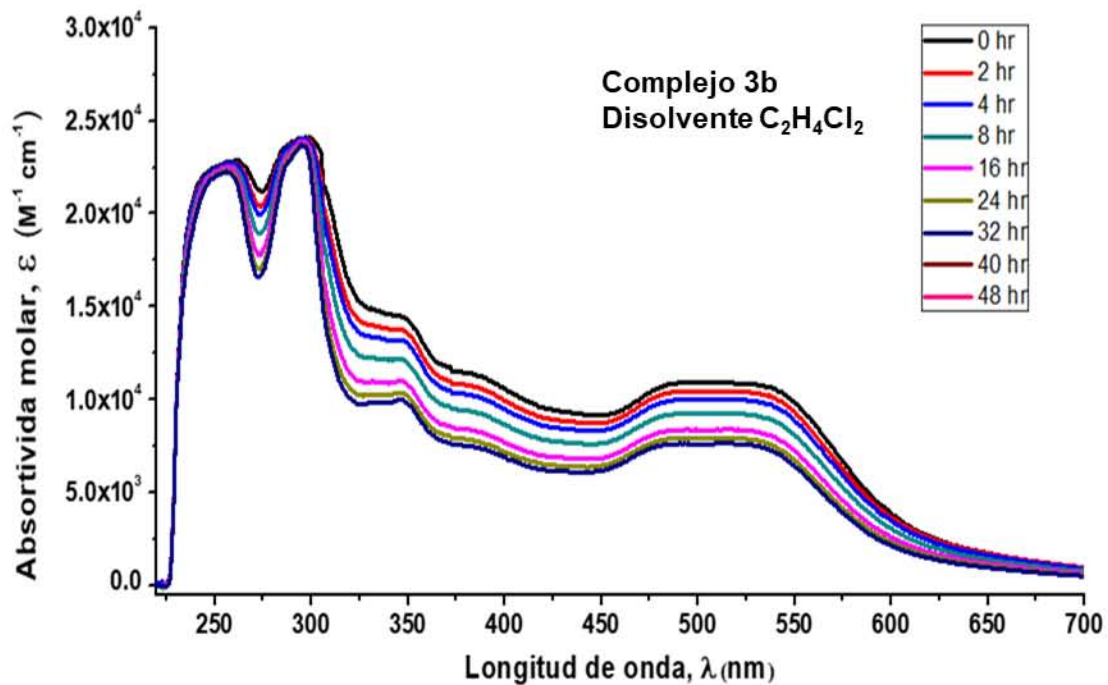
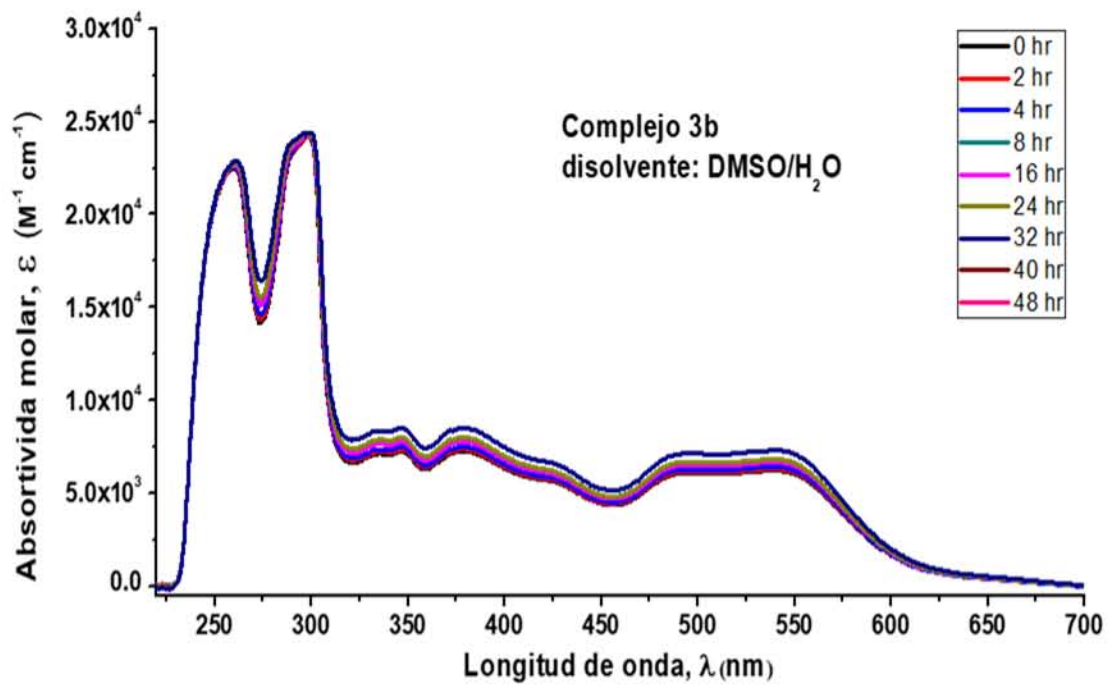




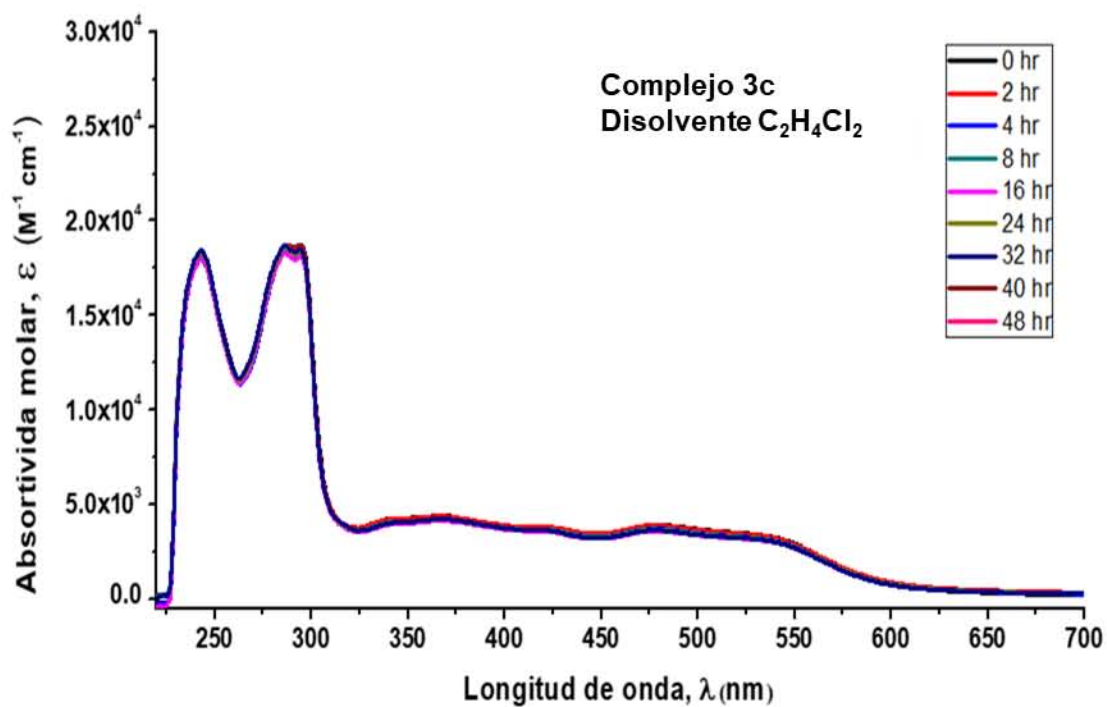
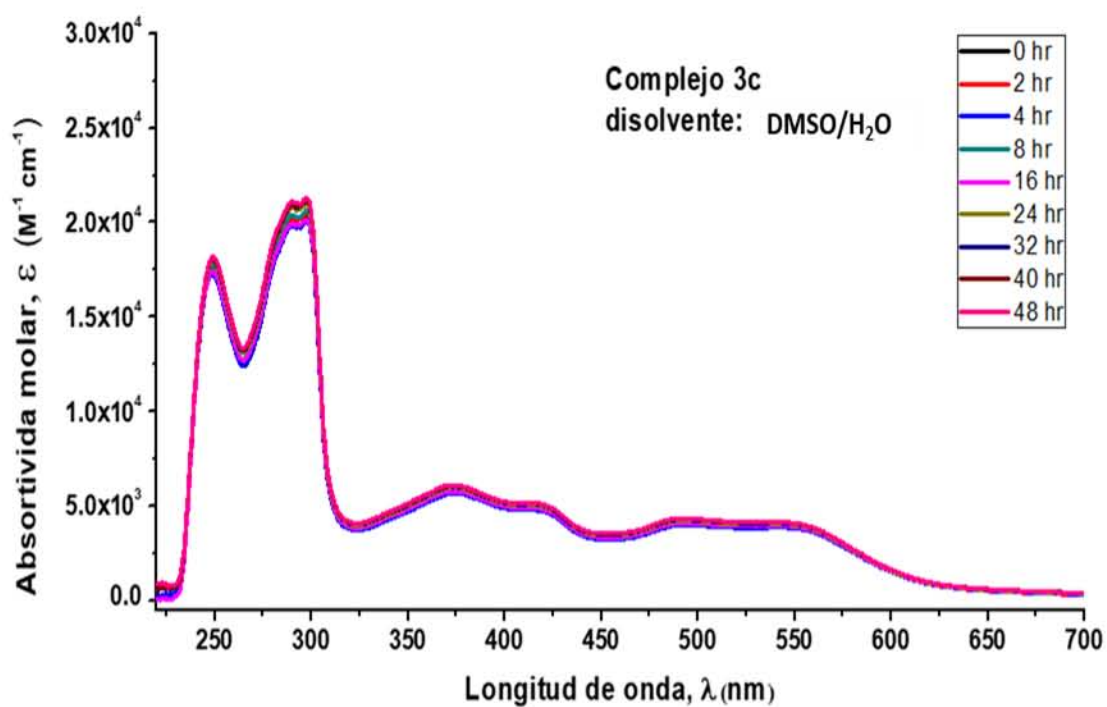
**Figura 5.21** Espectro UV-vis del complejo **3a**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ C$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.



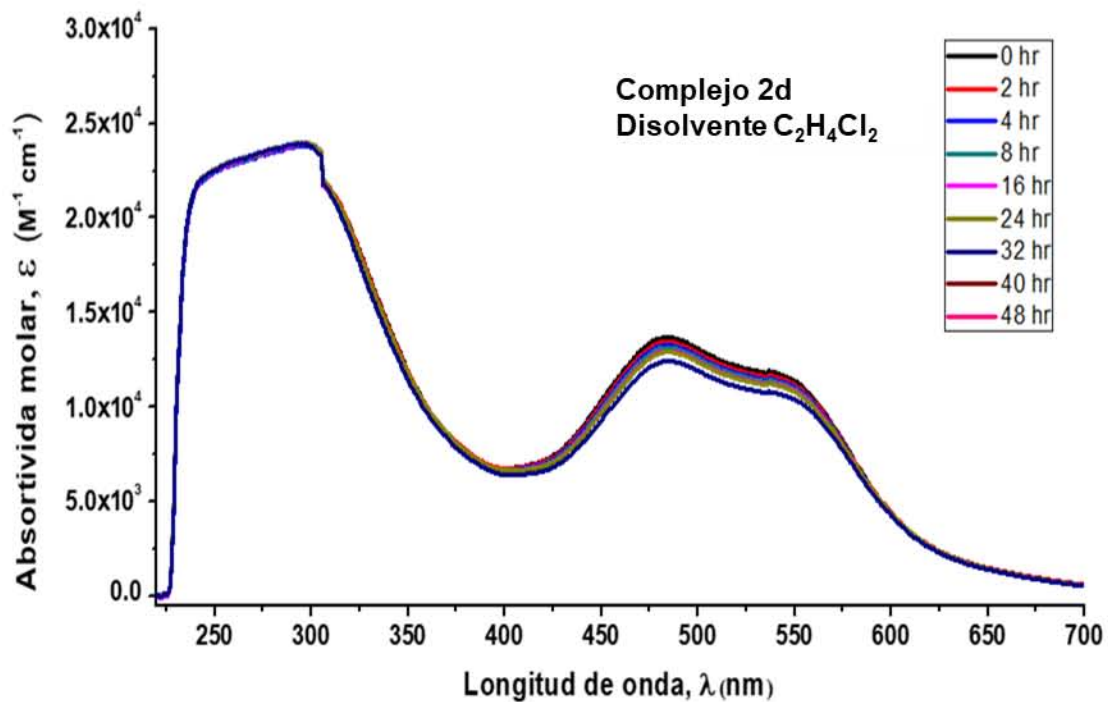
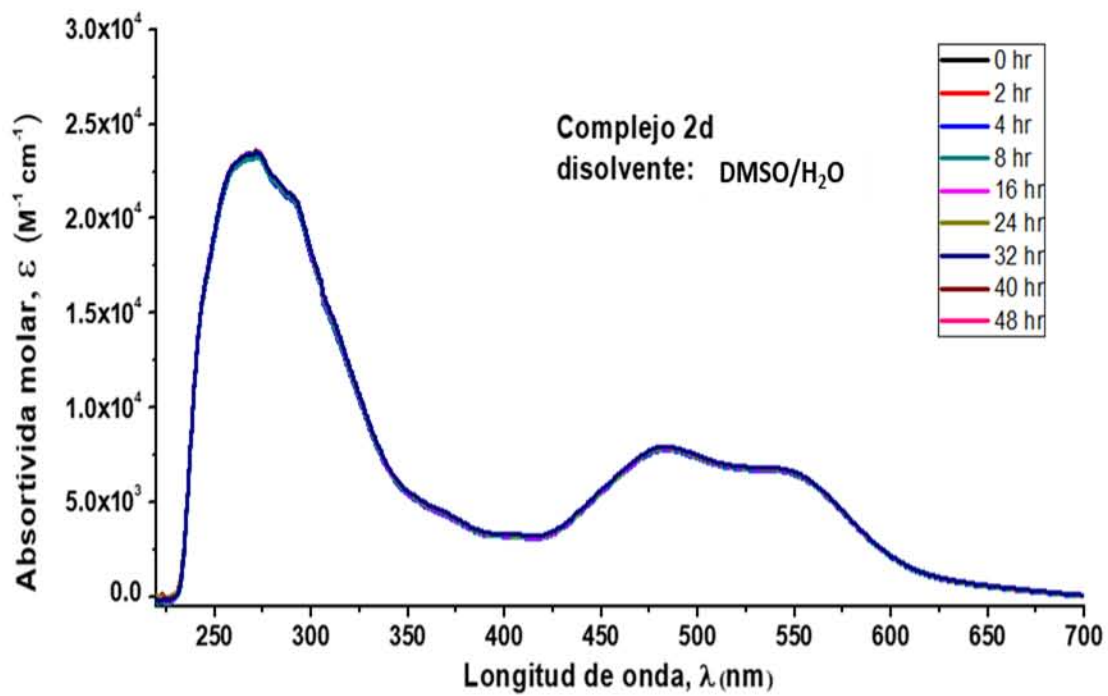
**Figura 5.22** Espectro UV-vis del complejo **2b**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.



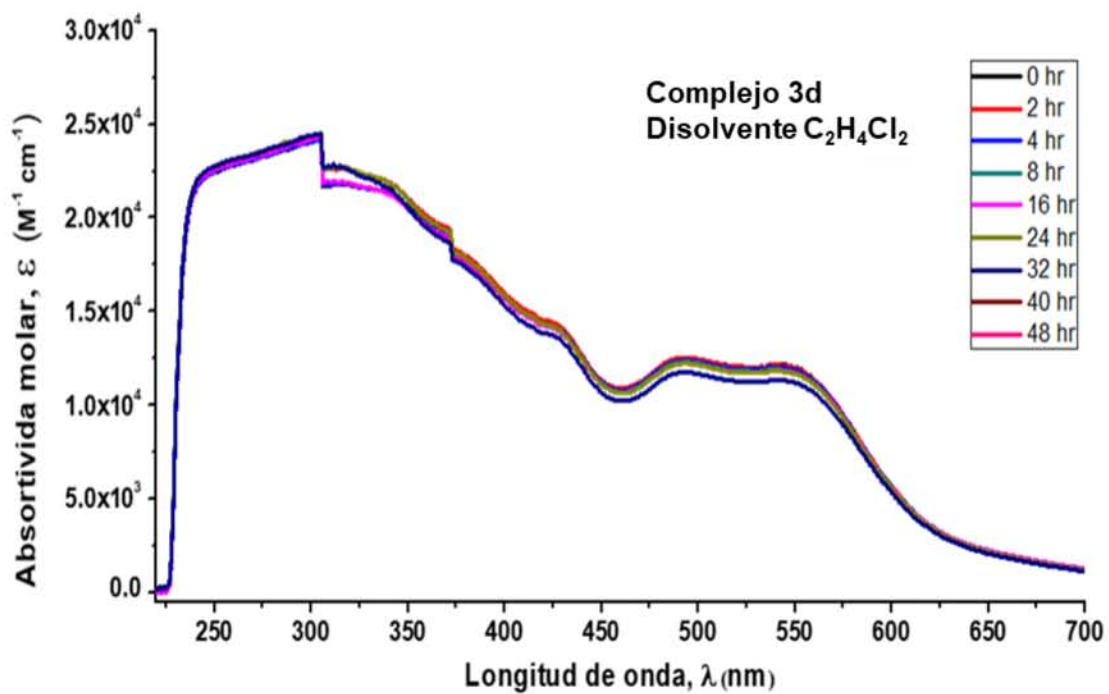
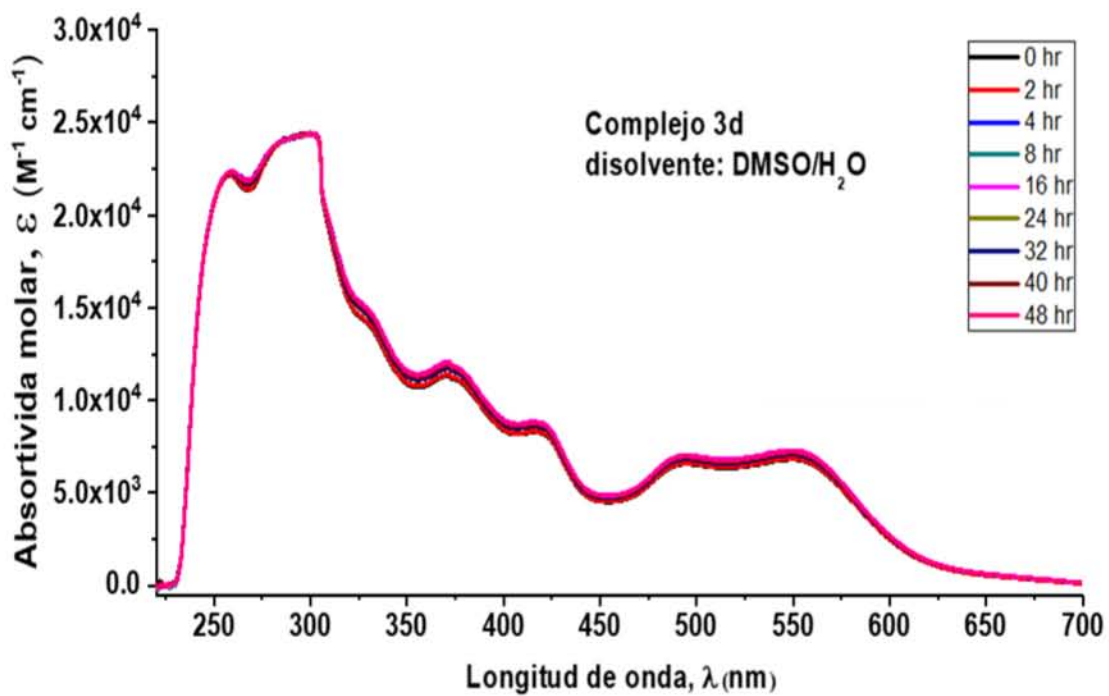
**Figura 5.23** Espectro UV-vis del complejo **3b**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.



**Figura 5.24** Espectro UV-vis del complejo **3c**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.

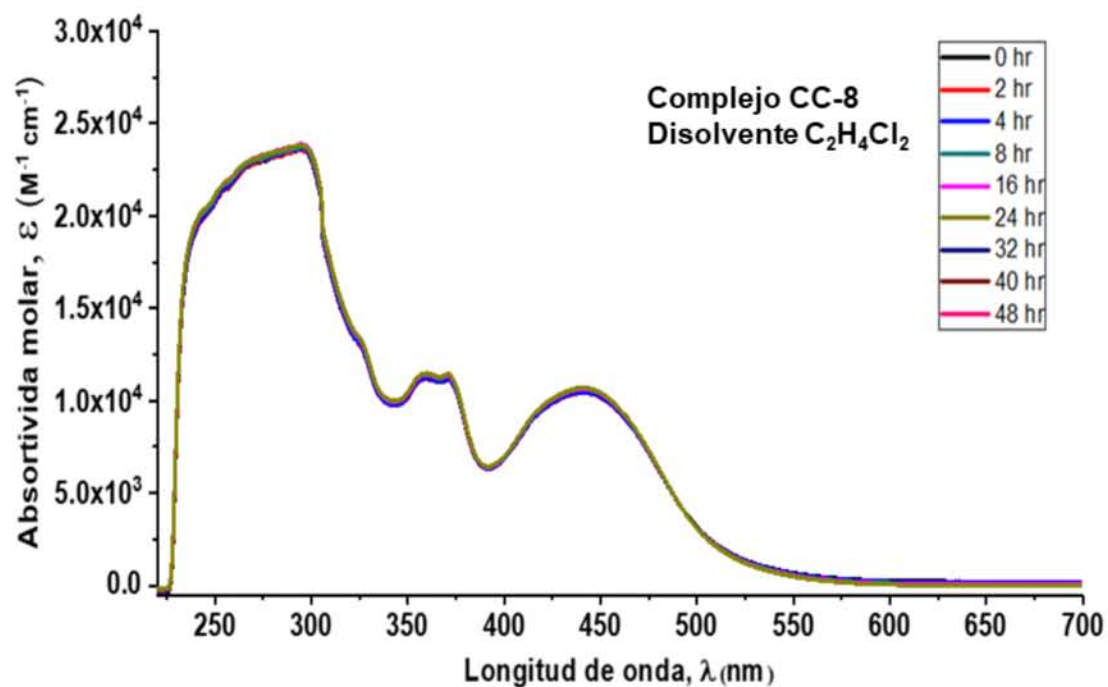
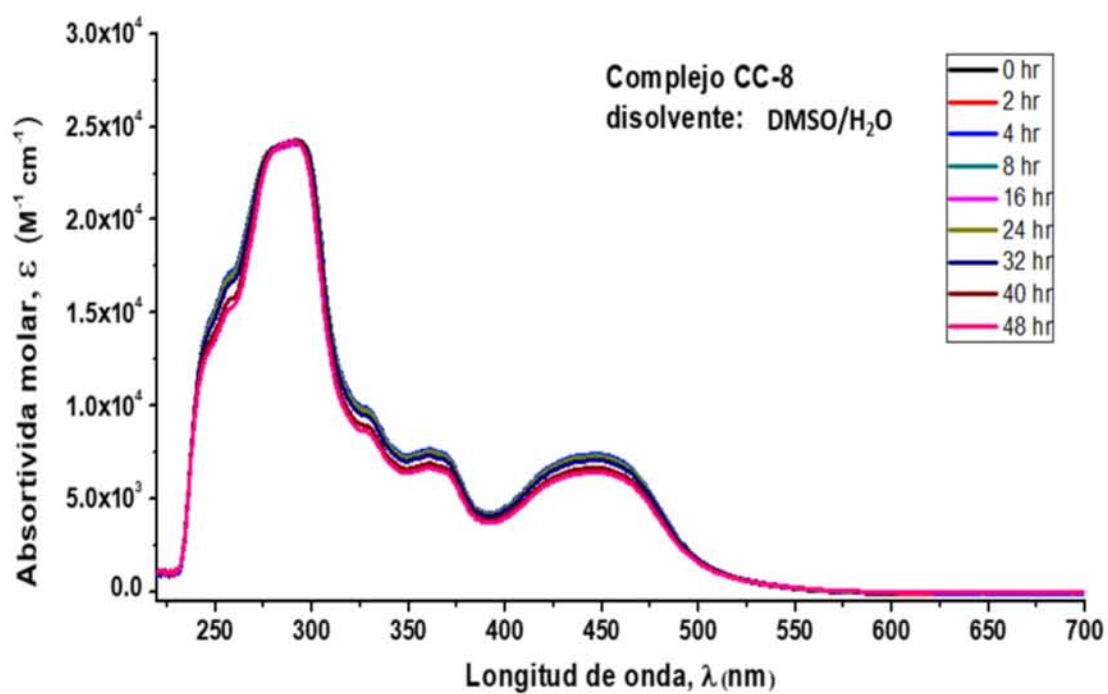


**Figura 5.25** Espectro UV-vis del complejo **2d**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.



**Figura 5.26** Espectro UV-vis del complejo **3d**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.





**Figura 5.27** Espectro UV-vis del complejo **CC-8**. ( $1 \times 10^{-4}$  M a  $37^\circ\text{C}$ ) en distintos disolventes, agua con 0.5% de dimetilsulfóxido y dicloroetano.

## 5.6. Lipofilicidad

La lipofilicidad de los compuestos ciclometalados se evaluó por el coeficiente de partición octanol-agua ( $\log P_{o/w}$ ), utilizando el método de "shake flask"<sup>110</sup>. El  $\log P_{o/w}$  es un parámetro cuantitativo que representa la solubilidad relativa de una sustancia determinada en un sistema compuesto por dos fases inmiscibles entre sí, a una temperatura específica. Una de las fases está constituida por un disolvente orgánico, de baja polaridad, mientras que la otra generalmente acuosa, de alta polaridad. Es por esto que  $\log P$  representa el grado de lipofilicidad de una sustancia.

La expresión matemática de  $\log P$  es:

$$\log P = o/w$$

Donde:

$o$  = Concentración molar del compuesto en la fase orgánica

$w$  = Concentración molar del compuesto la fase acuosa

Por lo tanto, a un mayor valor de  $\log P$ , se puede afirmar que la sustancia presenta mayor afinidad por la fase orgánica y por consiguiente su carácter lipofílico es mayor.<sup>111</sup>

Los resultados se resumen en la Tabla 7. Varios compuestos presentan valores altos de  $\log P_{o/w}$ , se espera que el mayor carácter lipofílico del compuesto puede facilitar su absorción celular y mejorar la actividad contra las células cancerosas.<sup>112(a)</sup>

Se ha demostrado que los derivados de rutenio ciclometalados son más lipofílicos que sus homólogos de coordinación, esto puede ser debido a que al presentar un carbono más en su estructura, se reduce la carga catiónica del complejo<sup>107</sup> y como consecuencia se reduce la polaridad, provocando mayor lipofilicidad.<sup>113</sup> Por tal motivo, los compuestos ciclometalados tienden a solubilizarse con mayor facilidad en la fase orgánica por lo consiguiente, presentan valores mayores de  $\log P_{o/w}$ , que los de coordinación que tienden a solubilizarse en fase acuosa.<sup>112(a)</sup> De hecho,



de todos los compuestos estudiados, el valor menor de log P, se observó para el derivado de coordinación **CC-8**.

Se puede observar que el complejo **2a** tiene la mayor lipofilicidad, seguido de **2d**, debido a que dichos complejos son los que presentan el mayor carácter aromático al tener una cantidad mayor de anillos aromáticos en su estructura comparado con los demás complejos.

También se puede observar que en cada par de compuestos con el mismo ligante (**a, b, c** ó **d**), los valores del log  $P_{o/w}$  son más altos para los complejos de la serie **2** que contienen ligantes fenantrolina al poseer un anillo aromático más por cada ligante comparado con los complejos que contienen ligantes bipyridina (serie **3**), de nueva cuenta se pone en evidencia que el sistema aromático es el principal encargado de otorgar lipofilicidad, mientras mayor sea dicho sistema, mayor será el carácter lipofílico del complejo.<sup>112(b)</sup>

Si se considera que la captación celular debería aumentar con la lipofilicidad y que la captación afecta la citotoxicidad, entonces se espera que el compuesto **2a** sea el compuesto más citotóxico de la serie. Sin embargo, la citotoxicidad de los compuestos evaluados está dada por la suma de varios mecanismos de acción implicados, que cada complejo presenta dependiendo de varios factores, entre ellos la estructura, el potencial redox y la capacidad para generar especies reactivas de oxígeno, temas que más adelante se discutirán.

**Tabla 7** Coeficiente de partición los complejos de Ru(II), ( $\log P_{o/w}$ ) a 25°C.

Complejo	$\log P_{o/w}$
<b>2a</b>	$1.95 \pm 0.18$
<b>3a</b>	$1.18 \pm 0.14$
<b>2b</b>	$1.0 \pm 0.24$
<b>3b</b>	$-0.17 \pm 0.01$

<b>2c</b>	0.22 ± 0.06
<b>3c</b>	-0.54 ± 0.08
<b>2d</b>	1.34 ± 0.16
<b>3d</b>	0.83 ± 0.10
<b>CC-8</b>	-1.15 ± 0.20

### 5.7. Citotoxicidad

La actividad biológica de los complejos se evaluó en dos líneas celulares diferentes de cáncer gástrico, células KATO III y AGS, utilizando la prueba MTT después de 48 horas de tratamiento. Se tomó la decisión de evaluar los compuestos preparados en este trabajo, en estas dos líneas celulares mencionadas, debido a que el cáncer gástrico es el quinto más común y representa la segunda incidencia más alta de muerte relacionada con el cáncer a nivel mundial.<sup>114</sup> Asimismo Chow *et al.*, demostraron que el cisplatino no presenta buena actividad citotóxica en dichas líneas celulares, sin embargo aún no se conoce con claridad porque presentan resistencia a dicho fármaco.<sup>115</sup>

Previamente se ha demostrado que algunos complejos ciclometalados de Ru(II), como el complejo **3a**, tienen la capacidad de incrementar su actividad citotóxica después de ser irradiados con luz visible.<sup>21</sup> En estos ensayos comparamos la actividad de nuestros complejos en células que siempre se mantuvieron en la oscuridad con células que fueron irradiadas con luz visible durante 60 minutos, con las condiciones descritas en la parte experimental. Se calculó la IC<sub>50</sub> de cada compuesto y se resumen en la Tabla 8.

Todos los complejos ciclometalados mostraron una alta actividad, con valores de IC<sub>50</sub> en el rango micromolar, y se encontró que eran hasta 321 veces más citotóxicos que el complejo de coordinación **CC-8** descrito anteriormente.<sup>64</sup>

Cabe mencionar que los valores de  $IC_{50}$  del cisplatino en las mismas líneas de cáncer AGS y KATO III, son de 11.0 y 29.0  $\mu M$  respectivamente en condiciones de oscuridad. Por lo tanto, nuestros complejos presentan mejor actividad citotóxica hasta 26 y 46 veces más en AGS y KATO III respectivamente que el cisplatino en las mismas condiciones.

En cada ensayo se utilizó una muestra control de células sin tratar con complejo de Ru(II), dichas células no presentaron cambio alguno, en condiciones de oscuridad ni después de ser irradiadas con luz visible durante 60 minutos.

En particular, el complejo **3a** (el análogo ciclometalado de **CC-8**) mostró valores de  $IC_{50}$  de 0.41 y 1.3  $\mu M$  para células KATO III y AGS, respectivamente, mientras que la  $IC_{50}$  para **CC-8** está por encima de 95  $\mu M$  para ambas líneas celulares. Esta diferencia en la citotoxicidad, en primera instancia, puede deberse a las propiedades tal como el potencial redox y la lipofilicidad, otorgadas por el enlace carbono-metal en los complejos de rutenio.<sup>107,112(a)</sup>

Otra propiedad que pudiera estar implicada es la capacidad de los complejos para interactuar con las enzimas redox, como ya hemos reportado en trabajos previos, con compuestos organometálicos de rutenio(II) como los sintetizados en este trabajo.<sup>20</sup>

En general la diferencia puede estar dada por la suma de los mecanismos de acción que en particular presenta cada compuesto. Los complejos **2a** y **2b** fueron los más activos en las células KATO III y AGS, respectivamente. Es importante destacar que el compuesto **2b** mostró los índices fototóxicos más altos ( $IF = IC_{50}$  en la oscuridad /  $IC_{50}$  después de la irradiación),<sup>116</sup> con  $IF = 5.70$  y  $3.50$  seguido por el complejo **3b** con valores de  $IF = 3.37$  y  $2.56$  para las células KATO III y AGS respectivamente.

**Tabla 8** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los compuestos de Ru(II) en dos líneas celulares diferentes de cáncer gástrico, células KATO III y AGS, en condiciones de oscuridad e irradiación durante 60 minutos. El índice de fototoxicidad (IF) se calculó como la relación de IC<sub>50</sub> obtenida en condiciones de oscuridad, dividida por los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos después de la irradiación.

Complejo	KATO III			AGS		
	Oscuridad	Luz	IF	Oscuridad	Luz	IF
<b>Cisplatino</b>	11.0			29.00		
<b>2a</b>	0.38 ± 0.03	0.32 ± 0.05	1.19	1.30 ± 0.12	0.52 ± 0.04	2.50
<b>3a</b>	0.41 ± 0.02	0.35 ± 0.05	1.17	1.30 ± 0.10	0.75 ± 0.08	1.73
<b>2b</b>	0.57 ± 0.04	0.10 ± 0.03	5.70	0.63 ± 0.03	0.18 ± 0.03	3.50
<b>3b</b>	0.91 ± 0.09	0.27 ± 0.06	3.37	0.87 ± 0.04	0.34 ± 0.05	2.56
<b>2d</b>	0.46 ± 0.07	0.44 ± 0.12	1.05	0.70 ± 0.02	0.50 ± 0.07	1.29
<b>3d</b>	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.08	1.05	0.85 ± 0.05	0.67 ± 0.09	1.40
<b>3c</b>	5.12 ± 0.02	4.89 ± 0.15	1.04	5.01 ± 0.29	3.88 ± 0.85	1.27
<b>CC-8</b>	100.0 ± 5.0	95.0 ± 8.0	1.05	106.00 ± 5.0	100.00 ± 3.0	1.06

En la figura 5.28, se presentan las curvas de viabilidad celular de los complejos **2a**, **3a**, **2b**, y **3b**, evaluados en células KATO III. Se puede observar dos comportamientos de la curva de viabilidad vs concentración. El primer tipo de curva es para los compuestos evaluados en condiciones de oscuridad. La viabilidad de las células disminuyó lentamente al aumentar la concentración de cada compuesto, se alcanzó el 50% de viabilidad cuando los valores rondaron entre 0.38 μM y hasta 0.91 μM, la viabilidad celular continuó decreciendo lentamente hasta llegar al 0%. El comportamiento que presentan las curvas de supervivencia en los compuestos que son irradiados con luz visible, es diferente

al anterior. Claramente se puede observar que la viabilidad celular disminuyó al aumentar la concentración de cada compuesto, se alcanzó el 50% de viabilidad cuando los valores rondaron entre 0.10  $\mu\text{M}$  y hasta 0.35  $\mu\text{M}$ .

Así mismo, se puede observar que el 0% de la viabilidad celular se alcanza con concentraciones cercanas a 0.8  $\mu\text{M}$ . Este comportamiento es más claro para los compuestos **2a** y **2b**, compuestos que tienen ligantes fenantrolina en su estructura. Estos ligantes podrían estar actuando como mejores fotosensibilizadores que los ligantes bipyridina que se encuentran en la estructura los compuestos **3a** y **3b**.

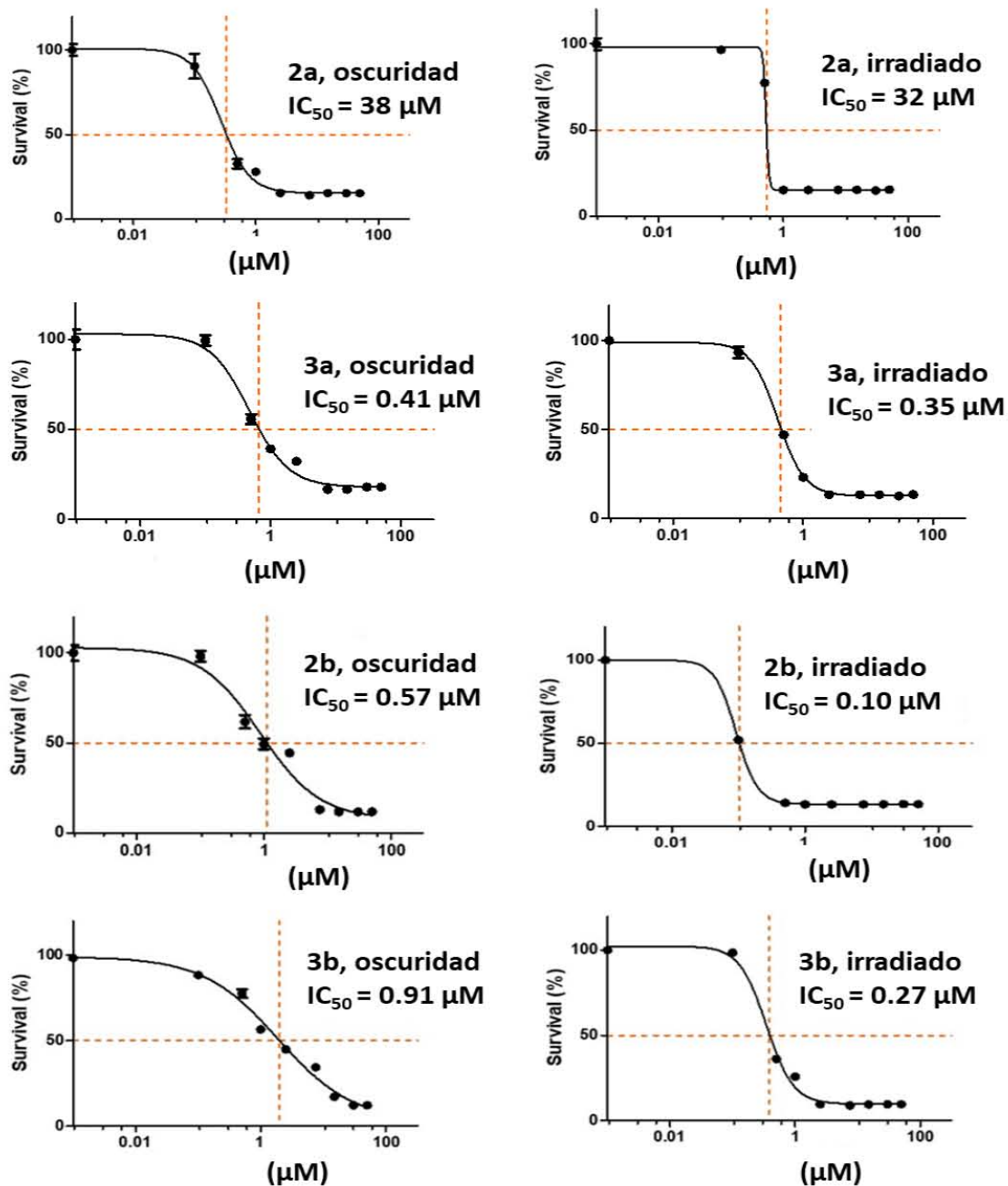
Por otra parte, las curvas de viabilidad celular, de los complejos **3c**, **2d**, y **3d**, (Figura 5.29), fueron similares en ambas condiciones, oscuridad y luz. La caída de la curva fue lenta conforme el aumento de la concentración de cada compuesto, se alcanzó la el 50% de viabilidad entre 0.44  $\mu\text{M}$  hasta 4.22  $\mu\text{M}$  antes de continuar cayendo lentamente. Con el compuesto **CC-8** el 50% de viabilidad se alcanzó por encima de 95.0  $\mu\text{M}$  en ambas condiciones evaluadas.

Las curvas de viabilidad celular de los complejos **2a**, **3a**, **2b**, **3b**, **3c**, **2d**, **3d** y **CC-8** evaluados en células AGS (figuras 5.30 y 5.31), presentan el mismo comportamiento que se discutió en los ensayos con células KATO III. La diferencia es que los valores de  $\text{IC}_{50}$  son un poco mayores (menor actividad citotóxica), para cada compuesto comparado con los valores obtenidos en los ensayos con células KATO III, como se puede observar en la tabla 8.

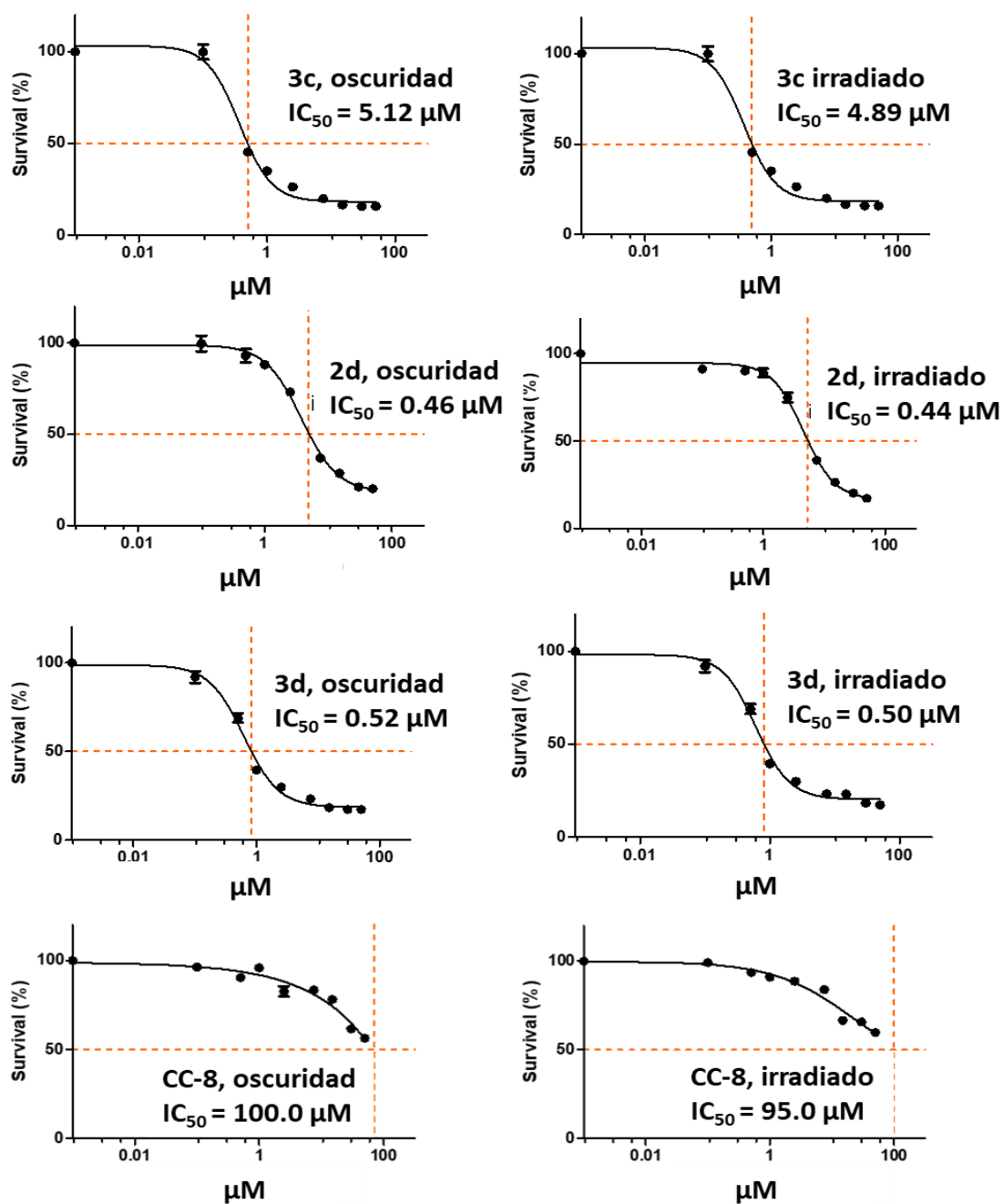
La menor citotoxicidad de los compuestos en células AGS puede estar relacionada, con la capacidad del gen supresor p53 para activar enzimas capaces de reparar el daño que producen los complejos en el ADN, por lo que la capacidad citotóxica de los compuestos se reduce. Sin embargo cuando el daño es irreparable el mismo gen p53, tiene la capacidad de detener el ciclo celular para evitar su replicación y posteriormente producir apoptosis.<sup>117</sup>

El comportamiento discutido para las células AGS no es el mismo para las células KATO III, ya que estas últimas carecen del gen supresor p53 por lo consiguiente no tienen de la capacidad de reparación del daño ocurrido en el ADN, causado

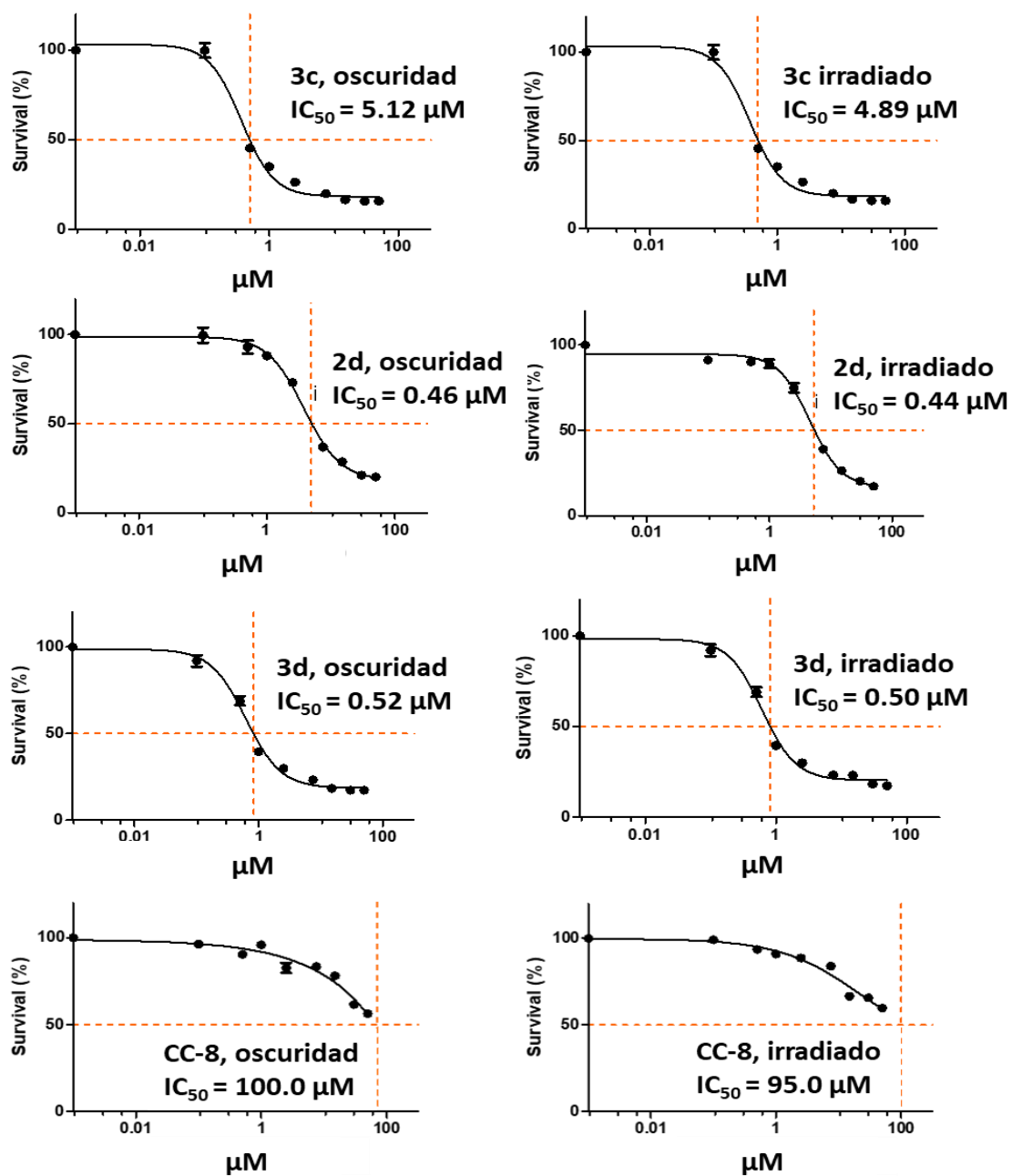
por los complejos, esta puede ser la razón de que en las células KATO III la  $IC_{50}$  se alcance con menor concentración de complejo comparado con las células AGS.



**Figura 5.28** Curvas de viabilidad celular de los complejos **2a**, **3a**, **2b**, y **3b** en la línea celular KATO III, utilizada para estimar la  $IC_{50}$ .

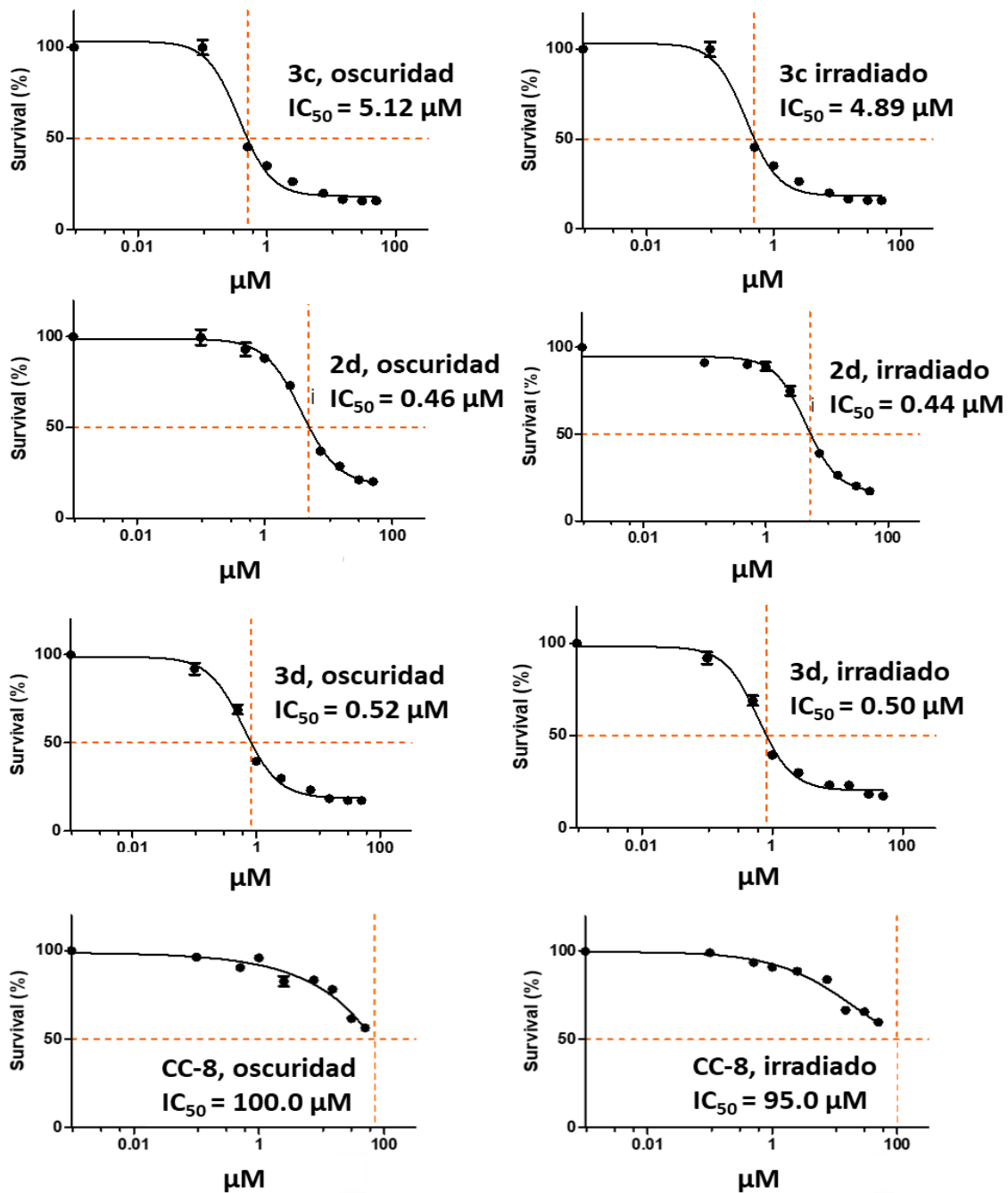


**Figura 5.29** Curvas de viabilidad celular de los complejos **3c**, **2d**, **3d**, y **CC-8** en la línea celular KATO III, utilizadas para estimar la IC<sub>50</sub>.



**Figura 5.30** Curvas de viabilidad celular de los complejos **2a**, **3a**, **2b**, y **3b** en la línea celular AGS, utilizadas para estimar la  $\text{IC}_{50}$ .





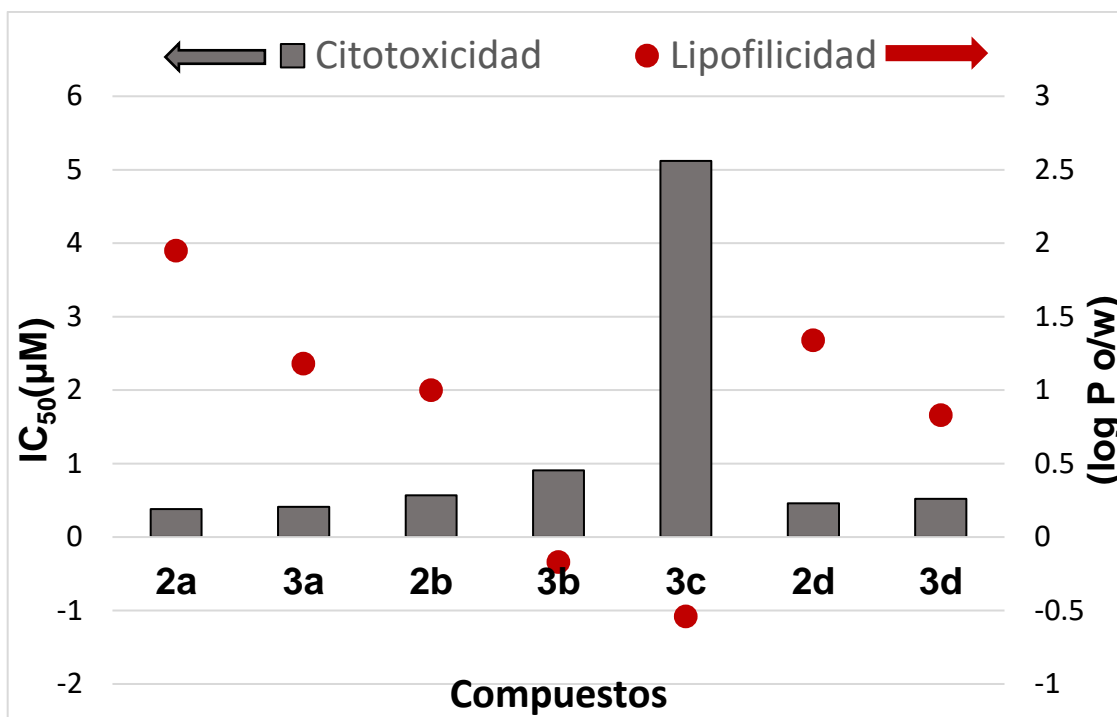
**Figura 5.31** Curvas de viabilidad celular de los complejos **3c**, **2d**, **3d**, y **CC-8** en la línea celular AGS, utilizadas para estimar la IC<sub>50</sub>.

### **5.8. Evaluación de la influencia de la lipofilicidad sobre la citotoxicidad.**

Habiendo obtenido los resultados de citotoxicidad se realizó el análisis para conocer como la lipofilicidad ( $\log P_{o/w}$ ), puede influir en la actividad de cada compuesto. Cabe mencionar que los valores tomados de  $IC_{50}$ , son los obtenidos en los ensayos con células KATO III, cuando estos se realizaron a condiciones de oscuridad.

La lipofilicidad es una propiedad que puede ayudar a los compuestos para llegar al blanco terapéutico, al estar implicada en capacidad del compuesto para atravesar la pared celular y de tal manera llegar al interior de la célula. En la figura 5.32, se observa que los compuestos **2a**, **3a**, **2b**, **2d** y **3d** presentan alta lipofilicidad y también alta citotóxicidad.

Asimismo, se observa que los compuestos **3b** y **3c**, son los menos lipofílicos por lo tanto tienen menor capacidad de atravesar la pared de las células cancerosas, y presentan baja actividad citotóxica. Cabe mencionar que, aunque se aprecia que los valores altos de citotoxicidad van de acuerdo con la alta lipofilicidad, la citotoxicidad no puede ser atribuida a la capacidad que tiene los complejos para atravesar la pared celular, estrictamente está dada por los mecanismos de acción que cada complejo pudiera desencadenar dentro de la célula cancerosa.



**Figura 5.32** Relación lipofilicidad-citotoxicidad de los complejos de Ru(II). Valores de IC<sub>50</sub> para células KATO III en condiciones de oscuridad.

### 5.9. Interacciones con ADN

Estudios previos demostraron que los compuestos **CC-8** y **3b** podían interactuar *in vitro* con pequeñas moléculas de circulares de ADN llamadas plásmido y que el compuesto **3b** es capaz dañar el plásmido cuando es irradiado con luz visible.<sup>21</sup> Debido a lo anterior, se decidió realizar los ensayos utilizando los compuestos antes mencionados, **CC-8** y **3b** y el compuesto sintetizado en este trabajo **2b**, ya que este es el que presentó mayor citotoxicidad bajo irradiación con luz en los ensayos biológicos con células de cáncer. El objetivo fue conocer si el compuesto **2b**, al ser irradiado, es capaz de provocar daño al plásmido y compararlo con el daño que provocan los compuestos **3b** y **CC-8**, al ser irradiados con luz visible durante 60 minutos.

Se prepararon dos series de muestras, ambas series contenían a los compuestos **2b**, **3b** y **CC-8** y plásmido (PCDNA3). La primera serie se incubó durante 3 horas en condiciones de oscuridad, la segunda serie fue irradiada durante la primera

hora de incubación y seguidamente, se mantuvo en la oscuridad durante las siguientes dos horas. Posteriormente, se realizó el ensayo del cambio de la movilidad electroforética en gel de agarosa (Figura 5.33), con el objetivo de conocer como cada compuesto puede afectar la integridad estructural del plásmido.

La intensidad de la coloración que se observa en cada carril es propia del plásmido retenido en la columna, dicha retención se debe al grado de intercalación del complejo en la estructura del plásmido. Cuando existe una alta interacción, la movilidad será lenta incluso puede provocar que el plásmido no sea capaz de migrar hasta la parte final del gel, por lo tanto, mientras más intenso sea el color (coloración blanca), que presenta el carril, mayor será la retención del plásmido.

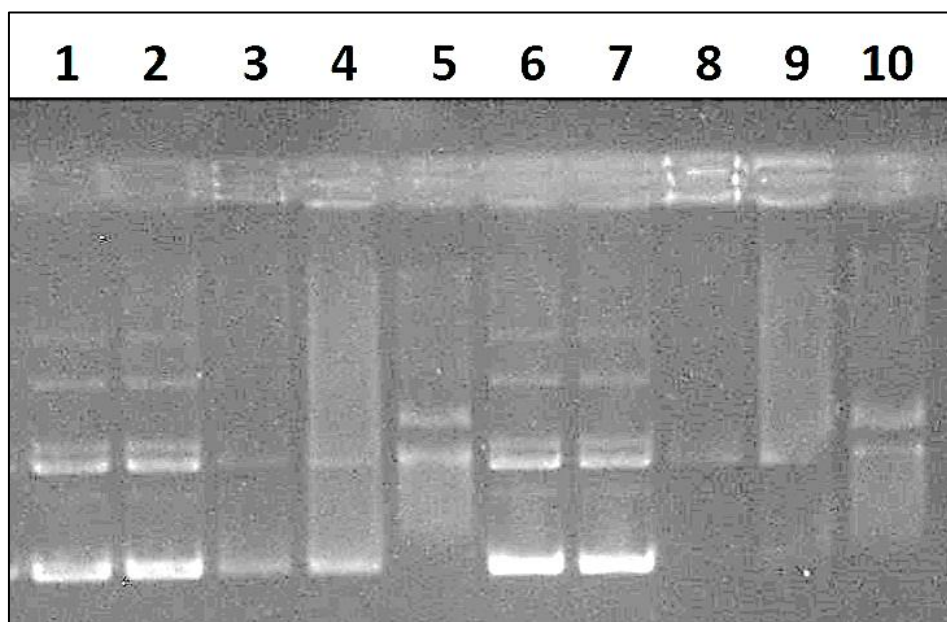
Los resultados de la electroforesis indican que se produce interacción del ADN plasmídico con los compuestos **2b** (carriles 3 y 8), **3b** (carriles 4 y 9) y **CC-8** (carriles 5 y 10), debido a que la movilidad de las muestras cambia significativamente, con respecto a la movilidad de la muestra que solamente contiene plásmido, carriles 1, 2, 6 y 7. Comparando los compuestos **2b** y **3b**, se puede observar un patrón de movilidad distinto entre ambos, el compuesto **2b** presenta menos grado de interacción ya que la intensidad de coloración (blanca), es menor que la que presenta la muestra con el compuesto **3b**.

Al analizar los resultados de las muestras irradiadas en el carril 8 (**2b**) y el carril 9 (**3b**), se puede observar que la intensidad de la coloración fue mayor cerca de la parte media de la columna, pero en la parte final de la columna, ya no se observa coloración blanca. El análisis anterior nos indica que hubo mayor interacción después de la irradiación de las muestras **2b** y **3b**.

Con lo observado se puede interpretar que la irradiación presenta influencia en la interacción del compuesto con el plásmido, lo anterior podría provocar mayor muerte celular ya que la intercalación con ADN es un mecanismo de acción que conduce a la apoptosis.<sup>56</sup>

El cambio en el patrón de migración provocado en las muestras que contienen al compuesto **CC-8** a condiciones de oscuridad, es similar al presentado después de la irradiación con luz visible, lo anterior nos demuestra que la irradiación no tiene efecto sobre el grado de intercalación del compuesto sobre el plásmido.

Los resultados de este ensayo pueden ayudar a entender por qué hay incremento en la citotóxica de los compuesto **2b** y **3b** después de ser irradiados, ya que se espera que incremente la inteacción de los compuestos con el plásmido y consecuentemente se produzca mayor daño celular, que a condiciones oscuras. La interacción de los compuestos con el plásmido de ADN, puede sumarse a los otros mecanismos de acción que cada compuesto pudiera presentar (interacciones redox con enzimas de la célula, estrés oxidativo, daño provocado por ROS), y tener como resultado una mayor actividad citotóxica.



**Figura 5.33** Ensayos de cambio de movilidad en gel de pequeñas moléculas de ADN llamadas plásmido, usando los complejos **2b**, **3b** y **CC-8**. Carriles 1 y 2: solo plásmido (oscuridad). Carril 3: plásmido + 100  $\mu$ M del complejo **2b** (oscuridad). Carril 4: plásmido + 100  $\mu$ M del complejo **3b** (oscuridad). Carril 5: plásmido + 100  $\mu$ M del complejo **CC-8** (oscuridad). Carriles 6 y 7: solo plásmido (irradiado con luz visible). Carril 8: plásmido + 100  $\mu$ M del complejo **2b** (irradiado con luz visible).

Carril 9: plásmido de ADN  $\mu\text{M}$  del complejo **3b** (irradiado con luz visible). Carril 10: plásmido + 100  $\mu\text{M}$  del complejo **CC-8** (irradiado con luz visible).

### 5.10 Ensayos de Western blot

Tratando de tener un panorama más claro sobre los mecanismos de acción involucrados en la citotoxicidad que presentan los complejos, decidimos realizar ensayos de Western blot, pero debido a la poca disponibilidad de los equipos, reactivos y tiempo, se decidió realizar estos estudios con dos complejos. El primer compuesto es el organometálico **2b**, que presentó alta actividad citotóxica, el otro compuesto fue el de coordinación **CC-8**, que presentó baja actividad citotóxica en ambas líneas celulares de cáncer evaluadas.

En estos ensayos se utilizaron células de cáncer gástrico AGS, con el objetivo de conocer que mecanismo de acción presentan los compuestos en condiciones de oscuridad y al ser irradiados con luz visible durante 60 minutos.

Elegimos investigar al gen p53, las proteínas ATF4, gamma-H2AX y la caspasa-3. La p53 es un gen supresor que se activa por diferentes tipos de daño, incluido el provocado al ADN,<sup>117</sup> asimismo tiene la capacidad de activar enzimas capaces de reparar el daño producido en el ADN. Sin embargo cuando el daño es irreparable el mismo gen p53, es capaz de detener el ciclo celular para evitar su replicación y posteriormente provocar la apoptosis.<sup>118</sup>

En los resultados experimentales se puede apreciar que el compuesto **2b** es capaz de inducir expresión del gen p53, sin embargo la irradiación provoca una leve disminución de la expresión (Figura 5.34). Asimismo, cuando se usó el compuesto **CC-8**, se pudo observar que existe expresión del gen p53, la cual presenta un incremento después de la irradiación con luz visible (figura 5.34).

Las células cancerosas experimentan estrés debido a la activación de genes que aumentan los procesos bioenergéticos. Las tasas de síntesis de proteínas deben controlarse a un nivel crítico para mantener la supervivencia de las células cancerosas durante el desarrollo del tumor. Por ejemplo, la síntesis de proteínas

debe de ir de acuerdo con la capacidad de plegamiento de estas, regulado por el retículo endoplásmico (RE) y de esa manera evitar una sobreproducción de proteínas mal plegadas que pudieran causar una alteración de la homeostasis del RE conocida como estrés del RE, dicha alteración puede conducir a muerte celular.<sup>119-121</sup> Las células utilizan distintas vías de respuesta para superar el estrés ambiental y fisiológico.<sup>120</sup> Una de las vías de respuesta al estrés del RE es la activación del factor de transcripción 4 (ATF4). Una vez expresado, el ATF4 impulsa la transcripción de genes implicados en la respuesta antioxidante, la autofagia, la biosíntesis de aminoácidos y el transporte. Se ha demostrado que el estrés del RE puede ser inducido por complejos de rutenio.<sup>115</sup>

En la figura 5.34 se puede apreciar que, en condiciones de oscuridad, las células tratadas con **2b**, inducen alta expresión de ATF4, pero después de la irradiación con luz visible, la expresión se reduce significativamente. Esto significa que dicho compuesto en condiciones de oscuridad es capaz de provocar la alteración de la homeostasis en la célula, provocando estrés en el RE que, a su vez, es capaz de producir muerte celular. Este proceso puede ser mencionado como un mecanismo de acción por la vía del estrés oxidativo. Asimismo, se puede observar que la muestra que contiene al complejo **CC-8**, no tiene expresión de dicha proteína en ambas condiciones.

Cuando existe daño en el ADN, se activan señales que conducen al arresto del ciclo celular, la reparación del daño y finalmente la sobrevivencia o la inducción de apoptosis. La ruptura de doble cadena de ADN se correlaciona con muerte celular. En respuesta a dicho evento ocurre la fosforilación de la proteína histona H2AX (p- $\gamma$ H2AX).<sup>122</sup>

En la figura 5.34, se puede observar que la muestra que contiene al compuesto **2b**, en condiciones oscuras, no expresa p- $\gamma$ H2AX. Sorprendentemente en respuesta a la activación de la luz, **2b** puede inducir fuertemente la expresión de p- $\gamma$ H2AX. Este comportamiento nos demuestra que la irradiación con luz visible juega un papel importante en el incremento de la citotoxicidad del compuesto **2b**, ya que al expresar la proteína p- $\gamma$ H2AX se confirma que existe ruptura de doble

cadena de ADN, que pudiera ser irreparable, lo cual puede causar apoptosis. Curiosamente el compuesto **CC-8** no indujo expresión de la proteína, este resultado nos puede indicar que no es capaz de producir ruptura de doble cadena de ADN como lo produce el compuesto **2b**.

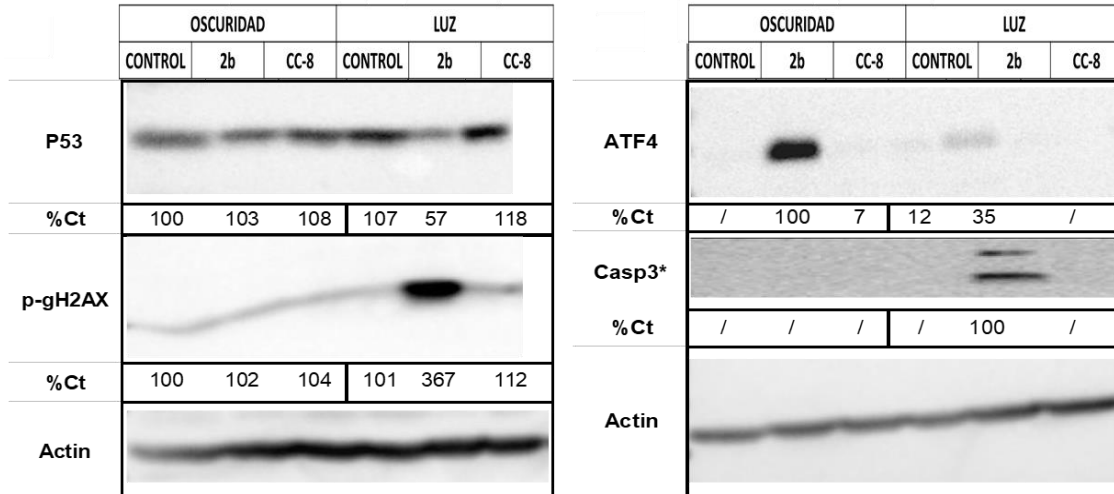
La apoptosis puede ponerse de manifiesto cuando se detecta la escisión de caspasa-3.<sup>123</sup> Esta enzima pertenece a una familia que se activa en cascada cuando la gravedad del daño es tal que la célula no puede ser reparada, por lo tanto, se activan mecanismos para provocar apoptosis.<sup>124</sup> Por tanto, al detectar la escisión de caspasa-3, es posible deducir que se están llevando a cabo mecanismos apoptóticos. La escisión de la caspasa-3 ha sido detectada en varios tipos de cáncer como, por ejemplo: cáncer de piel, cáncer de mama, neuroblastoma y cáncer del sistema linfático.<sup>124</sup>

En lo que respecta a determinación de escisión de caspasa-3, en la figura 5.34 se puede observar que la muestra que contiene al compuesto **2b** no presenta escisión de dicha enzima a condiciones de oscuridad, pero cuando la muestra es irradiada con luz visible durante 60 minutos, se puede apreciar una fuerte escisión de caspasa-3. Cabe mencionar que el compuesto **CC-8** no se observa escisión de la enzima en ambas condiciones.

Lo anterior nos lleva a establecer que la irradiación con luz sobre las muestras que contienen al compuesto **2b**, provocan una apoptosis dependiente de caspasa-3 que a su vez se relaciona con un mayor daño en el ADN, constatado con la fuerte expresión la proteína p-γH2AX.

En este estudio se pudo determinar que el complejo **2b** doble actividad que puede ajustarse hacia diferentes modos de acción, lo cual podría ayudar a evitar los mecanismos de resistencia de las células cancerosas.



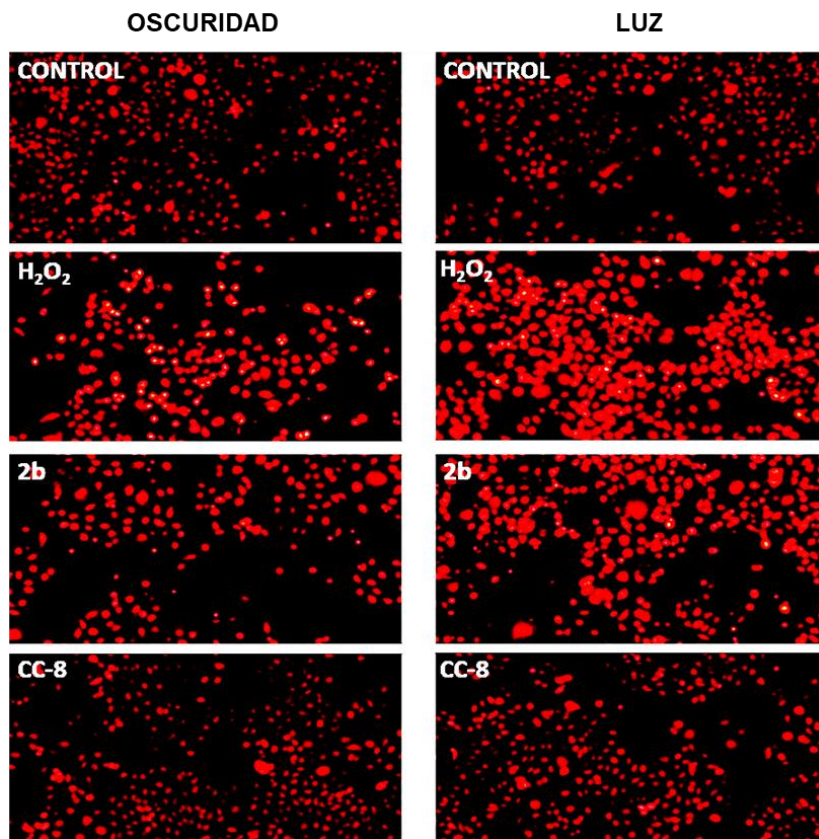


**Figura 5.34** Las células AGS se trataron con los complejos **2b** y **CC-8** a la concentración de  $IC_{50}$  (en condiciones oscuras) durante 6 horas, otra serie fue tratada con condiciones de luz, irradiadas durante 1 hora. Las células no tratadas (Ct) se tomaron como control. Las proteínas se extrajeron de estas condiciones y se separaron a través de un gel llamado SDS PAGE. Se realizó un experimento de transferencia western usando un anticuerpo contra p53, p-gH2AX, ATF4 y caspasa-3, posteriormente se usó actina como control de carga. El porcentaje de cada anticuerpo se indica en relación con  $(IC_{50}) / (Ct)$  y se corrige con el nivel de actina.

### 5.11 Especies reactivas de oxígeno

Se realizó un ensayo para conocer si se producen especies reactivas de oxígeno al irradiar las muestras. Se llevó a cabo la incubación de las células con un indicador fluorescente llamado dihidroetidio, el cual se utiliza con frecuencia como una prueba para detectar ROS.<sup>68</sup> Esta molécula es oxidada por especies reactivas, entre ellas el  $^1O_2$ , y forma un producto fluorescente, 2-hidroxi-etidio, que es capaz de intercalarse en ADN celular, generando una fuerte fluorescencia

roja<sup>125</sup> (Figura 5.35). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utilizó como un control positivo, ya que se sabe que es capaz de oxidar al dihidroetidio.<sup>126</sup>



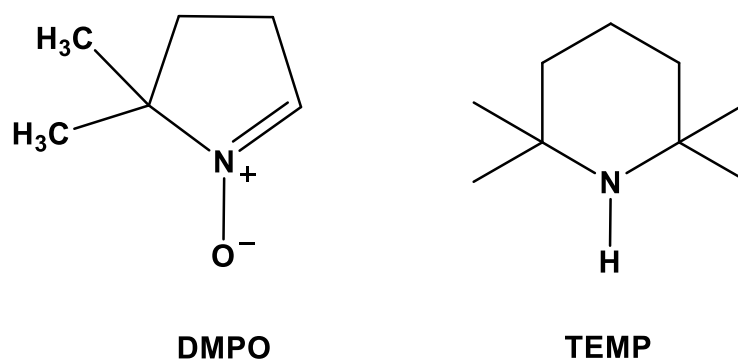
**Figura 5.35** Las células AGS se trataron con los complejos **2b** y **CC-8** con las concentraciones  $\mu\text{M}$ , obtenidas de la  $\text{IC}_{50}$  (en condiciones oscuras) durante 6 horas. Otra serie fue irradiada con luz visible durante 60 minutos. La producción de ROS se evaluó usando el indicador fluorescente dihidroetidio.

### 5.12 Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR

Para abordar ampliamente el tema de producción de ROS, se utilizó la Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por sus siglas en inglés), como técnica complementaria, la cual es un método muy útil para la detección directa de radicales libres en concentraciones tan bajas como  $1 \mu\text{M}$ . La EPR se destaca de otros métodos debido a su capacidad única para detectar radicales de corta o

larga vida con alta especificidad y sensibilidad. En particular es difícil medir las ROS directamente *in vivo*, pero la técnica de atrapamiento de spin se utiliza para superar este problema. Usando el método de atrapamiento de spin, se permite que las ROS reaccionen con trampas especialmente seleccionadas, para producir especies menos reactivas y más estables que pueden ser fácilmente detectadas por EPR.<sup>127</sup>

Para las ROS de vida corta, la técnica de atrapamiento de spin consiste en la formación de un aducto entre el radical libre y una trampa de spin que puede ser la 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) o 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMP) (Figura 5.36). Estos tipos de aducto tienen una vida media relativamente grande, por lo tanto, es posible su detección mediante un espectrómetro EPR.<sup>128</sup> La técnica de EPR se ha convertido en una herramienta esencial para la detección de ROS en sistemas biológicos.



**Figura 5.36** Estructura química de las trampas de spin.<sup>129, 130</sup>

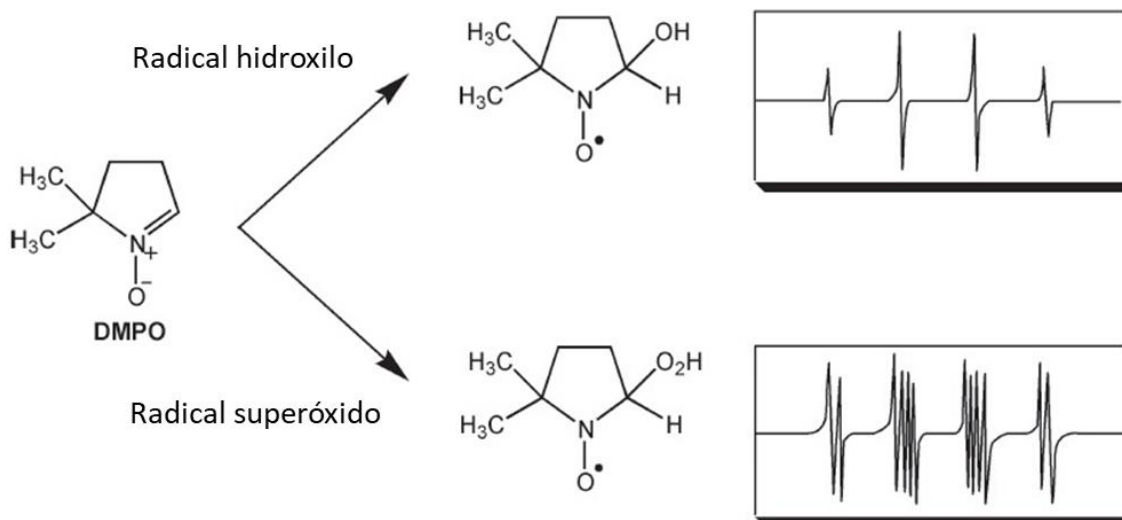
Un radical libre contiene un electrón no apareado en su orbital externo, el cual puede ser extremadamente reactivo y participar fácilmente en reacciones químicas con componentes celulares vitales dentro del cuerpo. Estas reacciones ocurren a través de una cadena de reacciones oxidativas que causan daño

tisular. Las ROS son responsables de causar daño a las proteínas, los lípidos y el ADN.<sup>131</sup>

Aunque una cantidad excesiva de ROS puede causar daño, también juega papeles importantes en los procesos fisiológicos del cuerpo humano. Entre las especies importantes se encuentran el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).<sup>132</sup>

Para conocer qué ROS se producen al irradiar los complejos con luz visible, se realizaron ensayos de EPR con dos trampas de *spin*. La primera utilizada fue la DMPO, que reacciona con el superóxido ( $O_2^-$ ) y con radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) para formar aductos, los cuales pueden generar señales características en EPR. La intensidad de la señal del aducto depende de la cantidad de aductos formados durante la reacción entre las ROS y la trampa de *spin* (Figura 5.37).

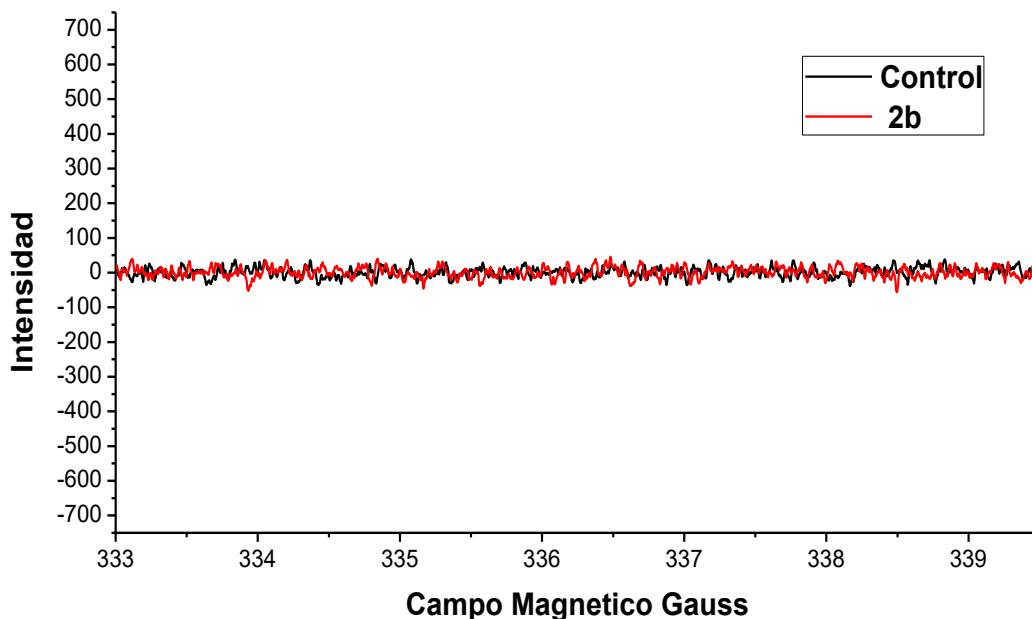
De acuerdo con el trabajo de Sainuddin y colaboradores,<sup>21</sup> los ligandos  $\pi$ -expansivos modifican las propiedades fotofísicas y fotobiológicas de los compuestos organometálicos de Ru(II). Dichos compuestos tienen la capacidad de actuar como fotosensibilizadores siendo capaces de generar oxígeno singlete (especie reactiva de oxígeno), cuando se encuentran en las condiciones adecuadas.



**Figura 5.37** Aductos formados y su respectivo espectro de EPR.<sup>129</sup>

Los ensayos se realizaron colocando la muestra que contiene el compuesto, en una celda plana de cuarzo con una longitud de 0.2 mm, posteriormente fueron irradiadas empleando luz visible durante 30 minutos con lámpara LED (0.75 A, 3W). La calibración externa del campo magnético se llevó a cabo utilizando un gaussímetro de precisión JEOL ES-FC5. La adquisición y manipulación de los espectros se realizó utilizando el programa ES-IPRIT / TE. Todos los detalles adicionales se describen en la sección experimental.

En primer lugar, analizamos el compuesto **2b**, que produjo mejores resultados en los ensayos citotóxicos y se espera que sea el que genere la mayor cantidad de ROS. En los resultados obtenidos de los ensayos con EPR, no se observa alguna señal característica de los aductos que se pueden formar con la trampa de spin DMPO (Figura 5.38), es decir, el compuesto **2b**, no tiene la capacidad de generar superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o radicales hidroxilos (\*OH).

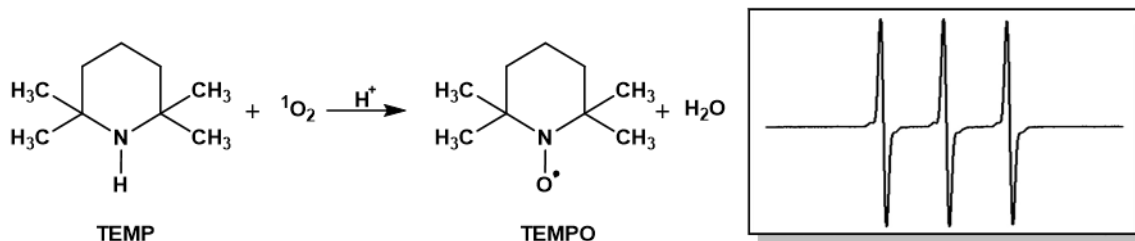


**Figura 5.38** Intensidad de la señal producida por el aducto DMPO, después de irradiar el complejo **2b** y una muestra sin complejo (control). La muestra fue **2b**/DMPO 1:1, en la cual la concentración del complejo es de  $1 \times 10^{-3}$  M en etanol equilibrada con aire y DMPO a una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M. El control EtOH/DMPO 1:1 de etanol y DMPO una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M, ambas se irradiaron durante 30 min con luz visible utilizando una lámpara LED (0.75 A, 3W).

Tomando en cuenta estudios donde se demostró que los compuestos organometálicos de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bq})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bppz})]\text{PF}_6$  (**3a**),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dbppz})]\text{PF}_6$ ), son capaces de generar oxígeno singlete,<sup>21</sup> decidimos realizar un ensayo para determinar la especie reactiva de oxígeno. Para el siguiente ensayo se utilizó la trampa de spin 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, TEMP la cual reacciona específicamente con el  $^1\text{O}_2$ <sup>133, 134</sup> para formar el radical estable (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo, conocido como TEMPO y que puede ser detectado por EPR.

Cabe mencionar que se utiliza el etanol como medio de reacción, el cual tiene la función de generar protones para llevar a cabo la reacción de formación de la

especie paramagnética TEMPO, la cual produce un espectro característico (Figura 5.39), en EPR.<sup>134, 135</sup>



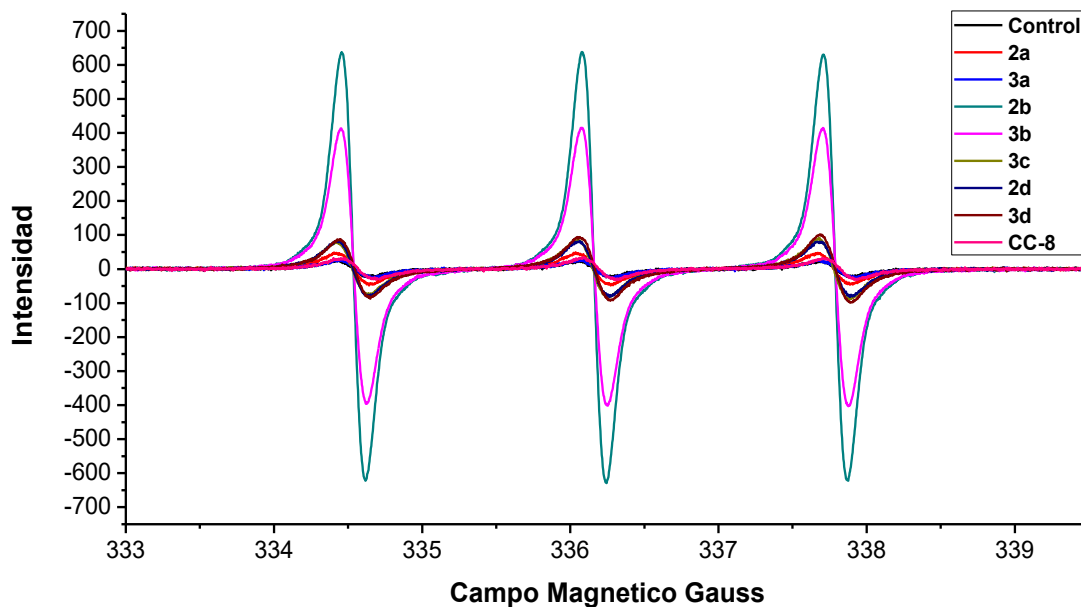
**Figura 5.39** Oxidación del TEMP por oxígeno singlete para la formación del radical TEMPO y su respectivo espectro de EPR.<sup>130, 135, 136</sup>

Los ensayos se realizaron colocando la muestra que contiene el compuesto en una celda plana de cuarzo con una longitud de 0.2 mm, posteriormente fueron irradiadas empleando luz visible durante 30 minutos con lámpara LED (0.75 A, 3W).

En los resultados obtenidos utilizando los compuestos organometálicos de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, claramente se aprecia que la intensidad de las señales de TEMPO es distinta para cada muestra irradiada, esto puede ser debido a que cada compuesto tiene diferente capacidad para interactuar con el oxígeno del medio y con la luz aplicada, para generar el oxígeno singlete, el cual reacciona con el TEMP para formar el radical TEMPO. Después de la reacción aparece la señal, la intensidad de la misma depende de la cantidad de radical TEMPO que se haya producido.<sup>137</sup>

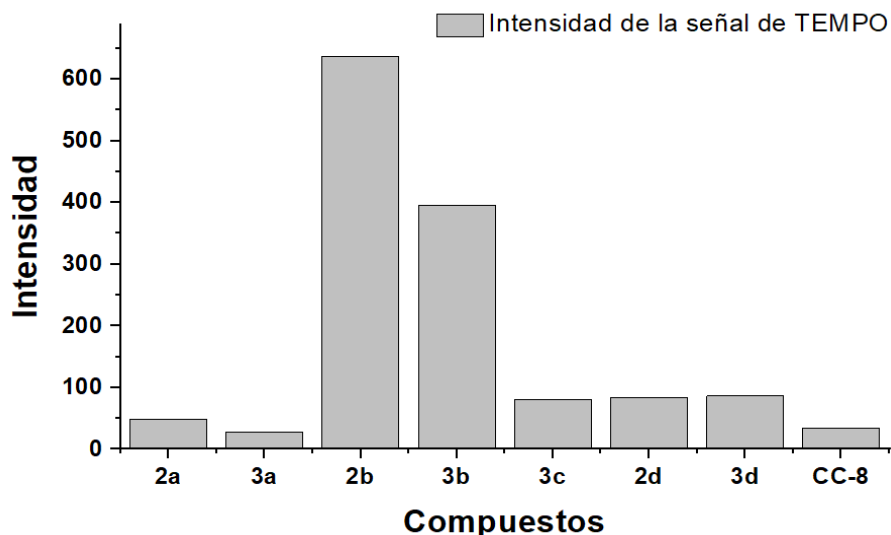
En las figuras 5.40 y 5.41 se puede apreciar que la muestra con el compuesto **2b** es la que generó la señal más intensa del radical TEMPO en EPR, por lo tanto se puede mencionar que este compuesto es el que genera mayor cantidad de oxígeno singlete después de la irradiación, seguido de la muestra que contiene al compuesto **3b**. Así mismo se observa que la muestra que contiene el

compuesto **CC-8**, es la que produjo la señal menos intensa del radical TEMPO, por lo tanto, produce menos oxígeno singlete.



**Figura 5.40** Intensidad de la señal producida por el radical del radical TEMPO en EPR. La muestra fue de complejo de Ru(II)/TEMP 1:1, en la cual la concentración del complejo es de  $1 \times 10^{-3}$  M en etanol equilibrada con aire y TEMP a una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M. El control EtOH/TEMP 1:1 de etanol y TEMP una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M, ambas se irradiaron durante 30 min con luz visible utilizando una lámpara LED (0.75 A, 3W).





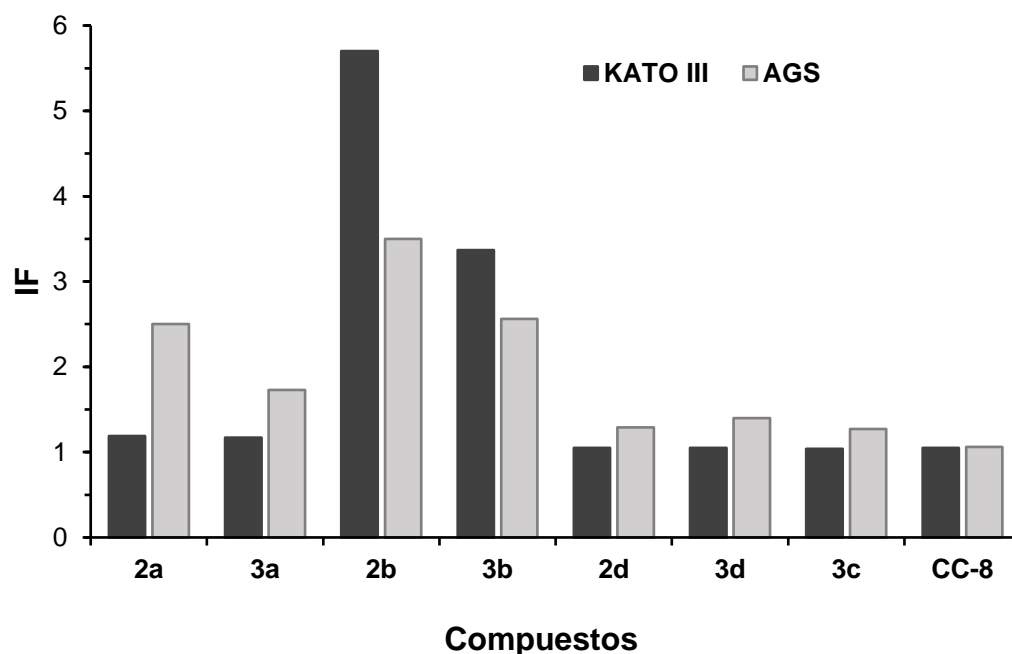
**Figura 5.41** Intensidad de la señal producida por el radical TEMPO emitidas en EPR después de 30 minutos de irradiar las muestras que contienen distintos complejos de Ru(II).

Con estos resultados se puede entender que los compuestos organometálicos de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, como los sintetizados en este trabajo, pueden actuar como sensibilizadores y ser capaces de generar ROS, en particular oxígeno singlete. En los ensayos se utilizó una lámpara LED que emite una longitud de onda de 590-650 nm.<sup>75, 138</sup>

Lo anterior pone en evidencia que los ligantes  $\pi$ -expansivos aquí sintetizados, fueron pieza clave para lograr que los compuestos organometálicos de Ru(II), tengan la capacidad de actuar como fotosensibilizadores.

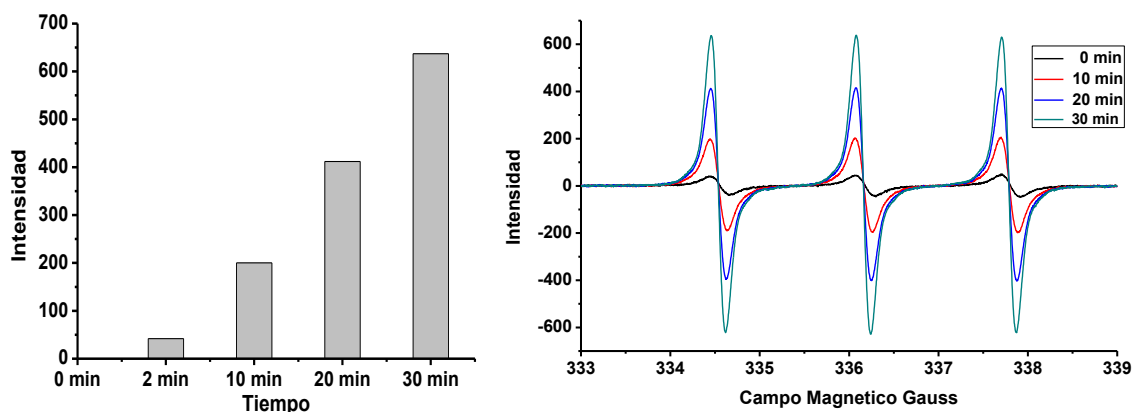
El índice de fototoxicidad (Figura 5.42) claramente reveló que las muestras que contienen a los compuestos **2b** y **3b** son las que generan mayor citotoxicidad después de ser irradiadas con luz visible durante 60 minutos, los valores de índice de fototoxicidad obtenidos con el compuesto **2b** son de 5.7 y 3.5, seguido por las muestras que contienen el compuesto **3b** con valores de 3.37 y 2.56 en células KATO III y AGS respectivamente. Con los resultados obtenidos se puede mencionar que la producción de oxígeno singlete probablemente es la

responsable del incremento de la actividad citotóxica que presentan varios compuestos, después de la irradiación con luz visible, en los ensayos realizados con células cancerosas de KATO III y AGS.



**Figura 5.42** Índice de fototoxicidad (IF) los complejos de Ru(II) calculado como la relación de  $IC_{50}$  obtenida en condiciones de oscuridad, dividida por los valores de  $IC_{50}$  obtenidos después de la irradiación con luz visible durante 60 minutos.

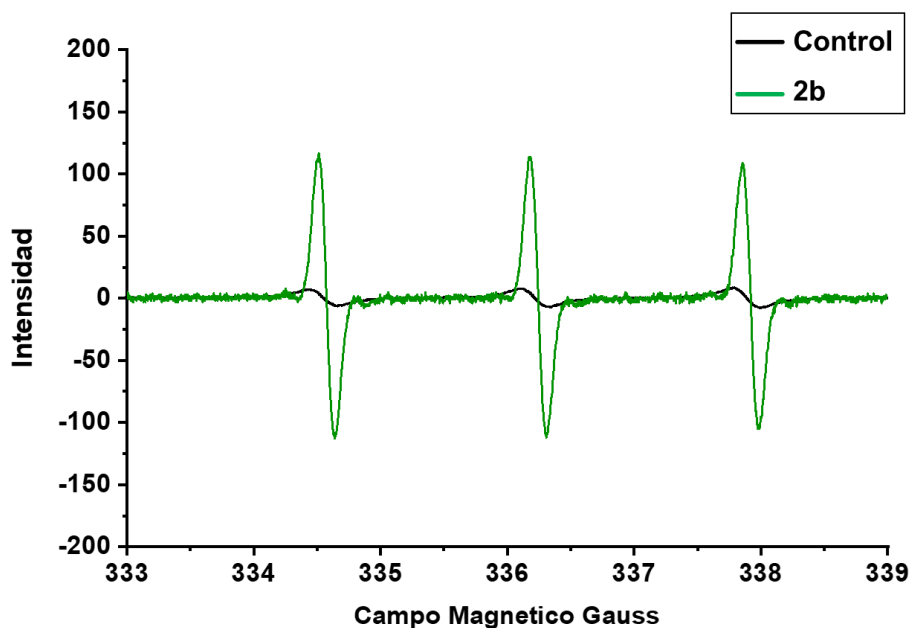
Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos para conocer cómo a través del tiempo, el compuesto **2b**, va produciendo un incremento en la intensidad de la señal en la EPR, (figura 5.43). Se puede observar que el incremento es proporcional al tiempo de irradiación, por lo que al mantenerse irradiado el compuesto, la producción oxígeno siguió incrementando.



**Figura 5.43** Intensidad de la señal del radical TEMPO producida durante la irradiación con luz visible, por las muestras tratadas con el compuesto **2b**. La muestra fue de complejo **2b**/TEMP 1:1, en la cual la concentración del complejo es de  $1 \times 10^{-3}$  M en etanol equilibrada con aire y TEMP a una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M. la muestra se irradió durante 30 min con luz visible utilizando una lámpara LED (0.75 A, 3W).

Con el objetivo de reproducir las condiciones utilizadas en los ensayos biológicos de citotoxicidad, se realizaron ensayos de EPR utilizando la trampa de spin, TEMP, y el compuesto en un medio de RPMI 1640 (medio del Instituto Roswell Park Memorial) que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10% y solución de penicilina / estreptomicina al 1% con 1% DMSO.

En la figura 5.44 se puede observar la formación de la señal característica para el radical TEMPO en EPR, a los 30 minutos de ser irradiada la muestra, empleando luz visible proveniente de una lámpara LED (0.75 A, 3W). Con lo anterior se corroboró que también en el medio biológico es posible la generación de  $^1\text{O}_2$ .



**Figura 5.44** Intensidad de la señal producida por el radical TEMPO en EPR, después de irradiar el complejo **2b**. La muestra fue de **2b**/TEMP 1:1, en la cual la concentración del complejo es de  $1 \times 10^{-3}$  M en RPMI 1640 equilibrada con aire y TEMP a una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M. El control RPMI 1640 equilibrada con aire/TEMP 1:1 de etanol y TEMP una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M, ambas muestras se irradiaron durante 30 min con luz visible utilizando una lámpara LED (0.75 A, 3W).

## 6. Conclusiones

Se realizó la síntesis y caracterización de nuevos complejos ciclometalados de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos. Se pudo establecer que la adición de ligantes  $\pi$ -expansivos en la estructura de los complejos confiere propiedades fisicoquímicas y fotofísicas adecuadas para hacer que éstos puedan interactuar con células cancerosas.

En los ensayos de citotoxicidad, se encontró que todos los compuestos ciclometalados de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos presentan superior actividad inhibitoria a la del cisplatino frente a dos líneas celulares de cáncer gástrico, AGS y KATO III, mientras que el complejo de coordinación **CC-8** no presentó citotoxicidad, además la actividad de los compuestos **2a**, **3a**, **2b** y **3b**, incrementó hasta 5 veces después de ser irradiados durante 60 minutos con luz visible.

Por medio de ensayos de fluorescencia se determinó que los compuestos generan especies reactivas de oxígeno, y que el incremento de la citotoxicidad está relacionado con la especie  $^1O_2$ , la cual fue confirmada por resonancia paramagnética electrónica. Por otra parte, se pudo observar por medio de ensayos de movilidad de plásmido de ADN, que los compuestos **2b** y **3b** son capaces de intercalarse con el plásmido ADN, lo que indica que dichos compuestos podrían causar daño al ADN celular, mientras que el **CC-8** solamente presento evidencia de interacción con el ADN siendo, probablemente su único mecanismo de acción, pero con  $IC_{50}$  mayores a 100  $\mu M$  que se consideran no citotóxicos. Esto pone en evidencia la relevancia del enlace sigma Ru-C en los compuestos ciclometalados, ya que además de otorgar mayor lipofilidad que ayudaría a la captación celular, también otorga un potencial redox menor al del compuesto de coordinación, de tal manera que los complejos ciclometalados podrían tener interacción con las enzimas redox de las células, el cual podría ser un mecanismo de acción adicional al que presenta el compuesto **CC-8**.

El compuesto **2b** fue el que presentó la mayor citotoxicidad, y mediante ensayos de Western blot se pudo confirmar que es capaz de producir daño en el ADN al

expresar la proteína p-gammaH2AX, un indicador de daño en el ADN. Asimismo, es capaz de producir estrés del retículo endoplásmico, confirmado con la expresión de la proteína ATF4.

Es importante destacar que la exposición a la luz cambia el modo de acción de los complejos **2b** y **3b** hacia la activación de una apoptosis dependiente de caspasa 3 que se correlaciona con un mayor daño en el ADN. Como tal, estos complejos muestran doble actividad citotóxica que puede ajustarse a diferentes modos de acción y podría considerarse como una posible forma de evitar los mecanismos de resistencia de las células cancerosas.

Finalmente se establece que la capacidad citotóxica de cada compuesto ciclotometalado de Ru(II) con ligantes  $\pi$ -expansivos, está dada por uno o varios mecanismos de acción, como son: daño al ADN de las células, generación de estrés del retículo endoplásmico y la interacción con enzimas redox de las células cancerosas.

## 7. Sección experimental

### 7.1 Materiales y reactivos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera inerte (nitrógeno o argón) utilizando un sistema de Schlenk. Todos los disolventes se secaron utilizando procedimientos establecidos y se destilaron bajo nitrógeno antes de su uso.

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron. El  $\text{RuCl}_3$  comercial se adquirió de Pressure Chemical Company. El compuesto benzoquinolina-5,6-diona<sup>79</sup>, 1H-benzopirido[3,2]fenazina (bppz-H, **a**)<sup>79</sup>, benzopirido[3,2]quinoxalina (bpq-H, **b**)<sup>139</sup>,  $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ <sup>140</sup> y el complejo **CC-8**<sup>62</sup> se prepararon de acuerdo con la literatura.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se llevaron a cabo en un equipo JEOL GX 300 (300.5296 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5682 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Las muestras fueron disueltas en los respectivos disolventes deuterados  $\text{CD}_3\text{CN}$  y  $\text{CDCl}_3$ . Se tomó como referencia el disolvente deuterado utilizado, los desplazamientos químicos están en ppm, y las constantes de acoplamiento están en Hz.

Los ensayos de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) se llevaron a cabo en un espectrómetro EPR (Jeol JES-TE300), operado en el modo de Banda X a una frecuencia de modulación de 100 KHz, con una cavidad cilíndrica (modo TE011). Cada muestra fue colocada en una celda plana de cuarzo (cuarzo sintético, Wilmad Glass Company) con una longitud de trayectoria de 0.2 mm. La calibración externa del campo magnético se llevó a cabo utilizando un gaussímetro de precisión JEOL ES-FC5. La adquisición y manipulación de los espectros se realizó utilizando el programa ES-IPRIT / TE.

Los espectros de masas ( $\text{FAB}^+$ ) se obtuvieron utilizando un instrumento JEOL JMS-SX102A con alcohol m-nitrobencílico como matriz. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Alpha ATR marca Bruker. Los análisis elementales se realizaron en un equipo Exeter Analytical CE-440. Las

mediciones electroquímicas se realizaron en un potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT 12 con interfaz de PC. Se usó una configuración de tres electrodos con un electrodo de vítreo, un electrodo de referencia Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de Pt. Antes de cada medición, el electrodo de trabajo se pulió con una pasta de diamante y se enjuagó con acetona y agua destilada. Las muestras fueron de una disolución de 3 mM de complejo y 0.1 M de hexafluorofosfato de tetra-n-butilamonio en 3 ml de acetonitrilo.

Se utilizó un equipo UV-Vis 2600 Shimadzu para medir las absorbancias de los compuestos utilizando celdas de cuarzo de 1 mm de longitud. Se utilizó un controlador de temperatura, para trabajar en las celdas a 37°C.

Se utilizó el equipo de flujo laminar PSM Flux Laminar Herasafe KS Thermo Scientific Type KS12 para la manipulación celular. Para el mantenimiento de las células a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se utilizó una incubadora Thermo Scientific Serie 800 WJ. El conteo celular se realizó con una cámara de Malassez. Para obtener los valores de supervivencia celular se utilizó un equipo de TrisStar Multimode Reader LB 942 marca Berthold Technologies.

Para centrifugar se utilizaron los equipos VWR MicroStar 17R, Eppendorf centrifuge 5810.

Se utilizaron los microscopios de la marca Lavobert Microscope, Zeiss Axio y Apotome Zeiss.

## **7.2. Síntesis de los ligantes**

**1H-benzoimidazoquinolina (biq-H, c).** Se sintetizó a partir de una mezcla de 522 mg (2.5 mmol) de 7,8-benzoquinolina-5,6-diona, 105 mg (3.5 mmol) de formaldehído, 3.50 g (50 mmol) de acetato de amonio y 7.0 ml de ácido acético glacial. Esta mezcla se calentó a reflujo durante tres horas, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua (25 ml) y se agregaron gota a gota 10 ml de solución acuosa de amoníaco, hasta obtener un precipitado amarillo, que se filtró y se lavó con agua. El sólido amarillo se secó al vacío (460 mg, 84%).



Análisis elemental calculado para  $C_{14}H_8N_3 \cdot 0.5C_2H_7NO_2$ : C, 69.89; H, 4.89; N, 19.02. Encontrado: C, 69.56; H, 4.00; N, 18.69.  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.58 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 9.25 (d, 1H, H<sup>a</sup>), 8.94 (d,  $J = 2.7$ , 1H, H<sup>x</sup>), 8.80 (d,  $J = 6.4$ , 1H, H<sup>f</sup>), 8.48-8.38 (m, 2H, H<sup>c</sup> + H<sup>g</sup>), 7.85-7.62 (m, 3H, H<sup>b</sup> + H<sup>d</sup> + H<sup>e</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

**1H-fenilbenzoimidazoquinolina (pbiq-H,d)**. Se sintetizó a partir de una mezcla de 522 mg (2.5 mmol) de 7,8-benzoquinolina-5,6-diona, 371 mg (3.5 mmol) de benzaldehído, 3.85 g (50 mmol) de acetato de amonio y 7 ml de ácido acético glacial. Esta mezcla se calentó a reflujo durante tres horas, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua (25 ml) y se agregaron gota a gota 10 ml de solución acuosa saturada de amonio hasta obtener un precipitado amarillo, que se filtró y se lavó con agua. El sólido amarillo se secó al vacío (590 mg, 80%). Análisis elemental calculado para  $C_{20}H_{12}N_3 \cdot 0.4CH_3COOH$ : C, 78.23; H, 4.61; N, 13.16. Encontrado: C, 78.26; H, 4.17; N, 13.56.  $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  13.61 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 9.26 (d, 1H, H<sup>a</sup>), 8.99-8.84 (m, 2H, H<sup>x</sup> + H<sup>f</sup>), 8.57 (d,  $J = 7.4$ , 1H, H<sup>c</sup>), 8.36-8.26 (m, 2H, H<sup>g</sup> + H<sup>k</sup>), 7.90-7.46 (m, 6H, H<sup>b</sup> + H<sup>d</sup> + H<sup>e</sup> + H<sup>h</sup> + H<sup>i</sup> + H<sup>j</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

### 7.3. Síntesis de los complejos

**[Ru(bppz)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1a)**. A una suspensión de  $[(\eta^6-C_6H_6)RuCl_2]_2$  (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) y KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) en 100 ml de acetonitrilo se añadió 1H-benzopirido[2,3]fenazina (bppz-H, **a**), (422 mg, 1.51 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo oscuro se disolvió en 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El complejo fue aislado mediante cromatografía en columna, utilizando Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fase estacionaria y utilizando una mezcla 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN como eluyente. La fracción de color amarillo se recogió y se evaporó hasta sequedad. La cristalización se llevó a cabo por difusión lenta, primero se disolvió el complejo en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1) y posteriormente se agregó dietiléter, como segunda fase. Se obtuvieron

cristales de color naranja, que se lavaron con dietiléter y se secaron al vacío (354 mg, 68%). Análisis elemental calculado para  $C_{27}H_{22}F_6N_7PRu$ : C, 46.96; H, 3.21; N, 14.20. Encontrado: C, 46.62; H, 3.19; N, 13.97. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 505 (10) [M-MeCN]<sup>+</sup>, 423 (9) [M-3MeCN]<sup>+</sup>, 381 (4) [M-4MeCN]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2275 (MeCN), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 8.88-8.75, (m, 2H, H<sup>c</sup> + H<sup>f</sup>), 8.11 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>a</sup>), 7.87-7.75 (m, 3H, H<sup>d</sup> + H<sup>g</sup> + H<sup>i</sup>), 7.49-7.38 (m, 2H, H<sup>h</sup> + H<sup>j</sup>), 7.19-7.05 (m, 2H, H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1. <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), 183.27, 161.76, 155.00, 144.33, 142.89, 142.05, 141.85, 140.35, 132.84, 131.30, 131.12, 130.79, 129.79, 129.75, 128.80, 125.48, 124.31, 122.36, 122.11.

**[Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1b)**. A una suspensión de [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) y KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) en 100 ml de acetonitrilo se añadió 1H-benzopirido[2,3]quinoxalina (bpq-H, **b**), (347 mg, 1.51 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo oscuro se disolvió en 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El complejo fue aislado mediante cromatografía en columna, utilizando Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fase estacionaria y utilizando una mezcla 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN como eluyente. La fracción de color amarillo se recogió y se evaporó hasta sequedad. La cristalización se llevó a cabo por difusión lenta, primero se disolvió el complejo en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1) y posteriormente se agregó hexano, como segunda fase. Se obtuvieron cristales de color naranja, que se lavaron con dietiléter y se secaron al vacío (290 mg, 56%). Análisis elemental calculado para  $C_{23}H_{20}F_6N_7PRu.0.6C_6H_{14}$ : C, 46.16; H, 4.14; N, 14.16. encontrado: C, 46.51; H, 3.68; N, 14.01. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2275 (MeCN), 1576, 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.27 (d, *J* = 5.3, 1H, H<sup>c</sup>), 9.20 (d, *J* = 8.1, 1H, H<sup>a</sup>), 8.94 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>f</sup>), 8.88 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>d</sup>), 8.46 (d, *J* = 7.9, 1H, H<sup>g</sup>), 8.30 (d, *J* = 7.2, 1H, H<sup>h</sup>), 7.64-7.53 (m, 2H, H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

**[Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1c).** A una suspensión de [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) y KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) en 100 ml de acetonitrilo se añadió 1H-benzoimidazo[4,5]quinolina (biq-H, **c**), (347 mg, 1.51 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo oscuro se disolvió en 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El complejo fue aislado mediante cromatografía en columna, utilizando Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fase estacionaria y utilizando una mezcla 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN como eluyente. La fracción de color amarillo se recogió y fue reducida aproximadamente hasta a 1 ml, por evaporación. La adición de 10 ml de éter dietílico causó la precipitación de un sólido amarillo. Posteriormente se llevó a cabo la cristalización por difusión lenta, primero se disolvió el complejo en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1) y posteriormente se agregó hexano, como segunda fase. Se obtuvieron cristales de color naranja, que se lavaron con dietiléter y se secaron al vacío (247 mg, 54%). Análisis elemental calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.5 C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>·0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 42.89; H, 3.95; N, 13.73. encontrado: C, 43.27; H, 3.45; N, 13.49. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2275 (MeCN), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.32 (s, 1H, H<sup>γ</sup>), 9.08 (d, J = 5.4 1H, H<sup>a</sup>), 8.64 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 8.11-8.03 (m, 2H, H<sup>c</sup> + H<sup>f</sup>), 7.53-7.40 (m, 3H, H<sup>b</sup> + H<sup>d</sup> + H<sup>e</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

**[Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1d).** A una suspensión de [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) y KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) en 100 ml de acetonitrilo se añadió 1H-fenilbenzoimidazo[4,5]quinolina (pbiq-H, **d**), (447 mg, 1.51 mmol). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo oscuro se disolvió en 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El complejo fue aislado mediante cromatografía en columna, utilizando Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fase estacionaria y utilizando una mezcla 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN como eluyente. La fracción de color amarillo se recogió y fue reducida aproximadamente hasta a 1 ml. La adición de 10 ml de éter dietílico causó la precipitación de un sólido amarillo. La cristalización se llevó a cabo por difusión lenta, primero se disolvió el complejo en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1) y posteriormente se agregó hexano, como segunda fase. Se obtuvieron cristales de color naranja, que se lavaron con

dietiléter y se secaron al vacío (436 mg, 82%).  $C_{28}H_{24}F_6N_7PRu \cdot 0.45C_6H_{14}$ : C, 49.60; H, 4.11; N, 13.19. encontrado: C, 50.03; H, 3.69; N, 13.64 ATR-IR ( $cm^{-1}$ ), 2274 (MeCN), 826 ( $PF_6^-$ ).  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3CN$ ),  $\delta$  12.47 (s, 1H,  $H^y$ ), 9.10 (d,  $J = 5.0$ , 1H,  $H^a$ ), 8.75 (d,  $J = 7.5$ , 1H,  $H^c$ ), 8.35, (d,  $J = 7.1$ , 2H,  $H^g + H^k$ ), 8.08 (t, 2H,  $H^h + H^j$ ), 7.57-7.39 (m, 5H,  $H^b + H^f + H^d + H^e + H^i$ ). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

Cabe mencionar que no fue posible caracterizar mediante espectrometría de masas los compuestos **1b**, **1c** y **1d**, debido a que presentan poca estabilidad en condiciones de  $O_2$  y  $H_2O$ . Sin embargo, se pudo preparar y caracterizar ambas series de compuesto **2** y **3**, con excelentes rendimientos.

**[Ru(bppz)(phen) $_2$ ]PF $_6$  (2a).** Una mezcla de 150 mg (0,22 mmol)  $[Ru(bppz)(MeCN)_4]PF_6$  (**1a**) y 100 mg (0.55 mmol) de 1,10-fenantrolina en 100 ml de etanol se calentó a reflujo durante 24 horas. El precipitado resultante se filtró al vacío y fue aislado por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de 95/5  $CH_2Cl_2:EtOH$  como eluyente. La cristalización se llevó a cabo por difusión lenta, primero se disolvió el complejo en una mezcla  $CH_2Cl_2:MeCN$  (5:1) y posteriormente se agregó dietiléter, como segunda fase. Se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (160 mg, 82%). Análisis elemental calculado para:  $C_{39}H_{22}F_6N_7PRu \cdot 0.5CH_2Cl_2$ : C, 56.23; H, 2.93; N, 10.55. Encontrado: C, 56.48; H, 2.83; N 10.14. ATR-IR ( $cm^{-1}$ ), 828 ( $PF_6^-$ ). MS (FAB $^+$ ): m/z (%) 742 (19)  $[M]^+$ , 562 (10)  $[M-phen]^+$ , 382 (4)  $[M - 2 phen]^+$ .  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3CN$ ),  $\delta$  9.19 (d,  $J = 7.6$ , 1H,  $H^c$ ), 8.55-8.44 (m, 3H,  $H^f + phen$ ), 8.39-8.31 (m, 2H, phen), 8.30-8.22 (m, 5H, phen +  $H^g + H^i$ ), 8.19-8.06 (m, 4H, phen +  $H^j + H^h$ ), 8.02 (d,  $J = 5.3$ , 1H,  $H^a$ ), 7.98-7.89 (m, 3H, phen), 7.61-7.64 (m, 1H,  $H^b$ ), 7.52-7.45 (m, 3H, phen), 7.28-7.16 (m, 2H, phen +  $H^e$ ), 6.74 (d,  $J = 7.2$ , 1H,  $H^d$ ). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

**[Ru(bpq)(phen)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (2b).** Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 68.5 mg (0.1 mmol) de [Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1b**) y 45 mg (0.25 mmol) de 1,10-fenantrolina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / éter dietílico, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (68.7 mg, 78%). Análisis elemental calculado para: C<sub>39</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 55.99; H, 2.89; N, 11.15. Encontrado: C, 56.02; H, 3.09; N, 10.78. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 692 (8) [M]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.13, (dd, *J* = 8.1, 1.4, 1H, H<sup>c</sup>), 8.96 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>g</sup>), 8.9 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>h</sup>), 8.53 (dd, *J* = 8.2, 1.3, 1H, H<sup>f</sup>), 8.43-8.29 (m, 5H, phen), 8.28-8.24 (m, 1H, phen), 8.22-8.08 (m, 5H, H<sup>a</sup> + phen) 8.05-7.97. (m, 2H, phen) 7.71-7.65 (m, 1H, phen), 7.53-7.43 (m, 3H, phen), 7.32-7.26 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.22 (t, *J* = 7.6, 1H, H<sup>e</sup>), 6.73 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

**[Ru(biq)(phen)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (2c).** Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 62.8 mg (0.1 mmol) de [Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1c**) y 45 mg (0.25 mmol) de 1,10-fenantrolina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (47.9 mg, 58%). Análisis elemental calculado para: C<sub>38</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu.0.7 hexano: C, 57.27; H, 3.85; N, 11.08. Encontrado: C, 57.71; H, 3.42; N, 11.07. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 692 (8) [M]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.90 (s, 1H, H<sup>v</sup>), 9.08, (dd, *J* = 4.3, 1.8, 1H, H<sup>c</sup>), 8.67-8.49 (m, 2H, phen), 8.38 (d, *J* = 1.8, 1H, H<sup>f</sup>), 8.36-8.31 (m, 3H, H<sup>a</sup> + phen), 8.16-8.06 (m, 5H, phen), 8.05-8.00 (m, 2H, phen), 7.90 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 7.80 (dd, *J* = 5.3, 1.4, 1H, phen) 7.72-7.63 (m, 2H, phen), 7.51-7.38 (m, 3H, phen), 7.24-7.18 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.11 (t, *J* = 8.7 1H, H<sup>e</sup>), 6.50 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

**[Ru(pbiq)(phen)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (2d).** Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 246 mg (0.35 mmol) de [Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1d**)

y 157 mg (0.87 mmol) de 1,10-fenantrolina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (258 mg, 82%). Análisis elemental calculado para: C<sub>44</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 57.64; H, 3.10; N, 9.97. Encontrado: C, 57.47; H, 2.87; N 9.78. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 742 (19) [M]<sup>+</sup>, 562 (10) [M-phen]<sup>+</sup>, 382 (4) [M - 2 phen]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.73, (s, 1H, H<sup>y</sup>), 8.70 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.53 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.40-8.29 (m, 3H, phen), 8.28-8.19 (m, 4H, H<sup>a</sup> + phen), 8.17-8.08 (m, 5H, phen), 8.03 (d, *J* = 5.3, 1H, phen), 7.83-7.74 (m, 2H, H<sup>g</sup> + H<sup>k</sup>), 7.68 (dd, *J* = 8.2, 5.0, 1H, H<sup>i</sup>), 7.62-7.54 (m, 2H, H<sup>h</sup> + H<sup>j</sup>), 7.53-7.41 (m, 4H, phen), 7.28-7.21, (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.16 (t, *J* = 7.5, 1H, H<sup>e</sup>), 6.53 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

**[Ru(bppz)(bipy)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (3a).** Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 124 mg (0.18 mmol) de [Ru(bppz)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1a**) y 70 mg (0.45 mmol) de 2,2-bipiridina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se produjeron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (126 mg, 84%). Análisis elemental calculado para: C<sub>39</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu.0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 53.84; H, 2.93; N 11.13. Encontrado: C, 54.14; H, 2.98; N, 10.97. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 694 (21) [M]<sup>+</sup>, 538 (17) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.28, (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.57 (d, *J* = 7.8, 1H, H<sup>f</sup>), 8.50 (d, *J* = 8.2, 1H, bipy), 8.43-8.35 (m, 2H, bipy), 8.34-8.27 (m, 3H, bipy + H<sup>g</sup> + H<sup>j</sup>), 8.08-8.02 (m, 2H, bipy), 8.00- 7.90 (m, 4H, bipy + H<sup>a</sup> + H<sup>h</sup> + H<sup>i</sup>), 7.13-7.05 (m, 2H, bipy), H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 6.87 (d, *J* = 7.2, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

**[Ru(bpq)(bipy)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (3b).** Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 240 mg (0.35 mmol) de [Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1b**) y 136 mg (0.87 mmol) de 2,2-bipiridina. La cristalización se realizó por difusión lenta

a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (198 mg, 72%). Análisis elemental calculado para: C<sub>35</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 53.30; H, 3.07; N, 11.43. Encontrado: C, 53.37; H, 2.99; N, 11.63. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 644 (4) [M]<sup>+</sup>, 488 (2) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.16, (dd, *J* = 8.1, 1.4, 1H, H<sup>c</sup>), 8.96 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>g</sup>), 8.90 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>h</sup>), 8.52-8.29 (m, 5H bipy + H<sup>f</sup>), 8.08-7.95 (m, 4H, bipy + H<sup>a</sup>), 7.92-7.85 (m, 2H, bipy), 7.79-7.69 (m, 3H, bipy), 7.51-7.45 (m, 1H, bipy), 7.44-7.26 (m, 3H, bipy + H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 7.10-7.00 (m, 2H, bipy), 6.86 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.1.

**[Ru(biq)(bipy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (3c)**. Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 220 mg (0.35 mmol) de [Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1c**) y 136 mg (0.87 mmol) de 2,2-bipiridina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (141 mg, 52%). Análisis elemental calculado para: C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu.0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 50.59; H, 3.08; N, 11.97. Encontrado: C, 50.41; H, 3.45; N, 11.70. MS (FAB<sup>+</sup>): m/z (%) 632 (17) [M]<sup>+</sup>, 476 (8) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.45, (s, 1H, H<sup>y</sup>), 8.43 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.22 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.13-8.07 (m, 2H, bipy), 8.03 (d, 1H, H<sup>a</sup>), 7.89 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 7.69-7.64 (m, 3H, bipy), 7.63-7.52 (m, 3H, bipy), 7.50-7.36 (m, 4H, bipy), 7.22-7.16 (m, 1H, bipy), 7.10-7.04 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.03-7.94, (m, 2H, bipy + H<sup>e</sup>), 6.78-6.72 (m, 2H, bipy), 6.37 (d, *J* = 7.18, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

**[Ru(pbiq)(bipy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (3d)**. Siguiendo la metodología utilizada para la síntesis del compuesto **2a**, a partir de 246 mg (0.35 mmol) de [Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1d**) y 136 mg (0.87 mmol) de 2,2-bipiridina. La cristalización se realizó por difusión lenta a partir de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeCN (5: 1) / hexano, se formaron cristales de color púrpura oscuro, que se lavaron con éter dietílico y fueron secados al vacío (215 mg, 72%).

Análisis elemental calculado para: C<sub>40</sub>H<sub>28</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 56.34; H, 3.31; N, 10.46. Encontrado: C, 56.26; H, 3.21; N, 10.09. MS (FAB+): m/z (%) 708 (9) [M]<sup>+</sup>, 552 (5) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub>), 744, 724 (C-H, ort of Ar). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.72, (s, 1H, H<sup>v</sup>), 8.70 (d, J = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.47 (d, J = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.37-8.31 (m, 2H, bipy) 8.29-8.19 (m, 3H, bipy + H<sup>a</sup>), 8.04-7.92 (m, 3H, bipy), 7.88-7.76 (m, 4H, bipy + H<sup>g</sup> + H<sup>k</sup>), 7.73-7.62 (m, 3H, bipy + H<sup>i</sup>), 7.60-7.43 (m, 4H, bipy + H<sup>h</sup> + H<sup>j</sup>), 7.36-7.23 (m, 3H, bipy + H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 7.04-6.98 (m, 2H, bipy), 6.65 (d, J = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>). Los protones se asignan de acuerdo con la figura 5.2.

#### 7.4 Cristalografía

Se logró la formación de cristales de color naranja con el ligante **d** y cristales de color púrpura oscuro con los compuestos **1a**, **2b** y **3a**, los cristales fueron aptos para la técnica de difracción de rayos-X. El ensayo se realizó en un difractómetro Bruker Smart Apex equipado con radiación de Mo<sup>o</sup> (λ = 0.71073 Å) con detector bidimensional CCD por la técnica de monocristal. Para su análisis se montaron en fibras de vidrio. Los datos de intensidad de rayos X se midieron a 298 K para el ligante **d**, 296 K para el compuesto **1a**, 298 K para compuesto **2b** y 150 K para el compuesto **3a**. Los cuadros se integraron con el paquete de software Bruker SAINT. Las estructuras se resolvieron mediante el método de Patterson y se refinaron utilizando el método de cuadrados mínimos a F<sup>2</sup> utilizando SHELXL-2014/7.<sup>141</sup>

#### 7.5. Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad se realizaron en celdas de cuarzo, se utilizaron disoluciones 1 μM de cada complejo, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu 2600 UV-Vis. Se evaluaron dos series en distintitos disolventes, una serie fue utilizando dicloroetano y otra serie en agua que contiene DMSO al 0.5% (preparado a partir de una solución stock de 20 mM en DMSO). Los espectros se registraron cada dos horas durante 48 horas, la temperatura fue constante a 37 °C.



## 7.6. Lipofilicidad

La lipofilicidad de cada complejo se determinó experimentalmente con el coeficiente de partición ( $\log P_{o/w}$ ). El método utilizado fue el llamado matraz agitado (*shake flask*)<sup>110,113,142</sup> en el que se utiliza un buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.00 como fase acuosa y 1-octanol como fase orgánica. Se preparó una disolución  $1 \times 10^{-5}$  M del complejo en 1-octanol, luego se mezcló vigorosamente con la fase acuosa en una proporción de uno a uno durante 5 minutos, agitando vigorosamente en una placa de agitación magnética. La mezcla se deja durante un período de 6 horas para lograr una buena separación de las fases. La concentración del complejo en ambas fases se calcula mediante espectroscopia UV-vis a 25°C.

## 7.7 Líneas celulares y cultivo de tejidos

El adenocarcinoma gástrico humano AGS y el carcinoma gástrico humano KATO III se adquirieron de ATCC® (Manassa, VA). Las células AGS se cultivaron en RPMI 1640 (medio Roswell Park Memorial Institute) que contenía un 10% de FBS y un 1% de penicilina/estreptomicina. Las células KATOIII se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 20% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron en células con 20 pases sucesivos de cultivo.<sup>20, 115, 142</sup>

## 7.8. Ensayos de la inhibición celular (determinación de la citotoxicidad)

La actividad de antiproliferación en células cancerosas se determinaron utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células se cultivaron a 10,000 células por pozo (100  $\mu$ l) en placas de 96 pozos Cellstar® (Greiner Bio-One), durante 24 horas. Posteriormente, las células cancerosas se expusieron a los compuestos de Ru(II) a diferentes concentraciones durante 48 horas. En el caso de las muestras tratadas con luz

visible, se irradiaron durante 60 minutos con una lámpara LED 0.75 A 3W ( $\lambda_e = 590 \text{ nm}$ , la dosis de luz fue de  $20.3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). La distancia entre la lámpara y la placa de 96 pozos fue de 20 cm y la temperatura durante la irradiación se mantuvo constante a  $37^\circ \text{ C}$ . Posteriormente se incubaron durante 47 horas junto con las que no se trataron con luz. Luego, el ensayo MTT se realizó como se describió anteriormente<sup>143</sup>. La inhibición de la viabilidad celular se evaluó con referencia al valor de  $\text{IC}_{50}$ , que se define como la concentración necesaria para una reducción del 50% de la supervivencia en función de las curvas de supervivencia. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  se calcularon a partir de las curvas de dosis-respuesta (viabilidad celular frente a la concentración del compuesto de Ru(II)). Los experimentos se realizaron en 8 repeticiones para cada concentración de compuesto y se llevaron a cabo al menos tres veces de forma independiente. En cada ensayo se utilizó una muestra (control), de células sin tratar con complejo de Ru(II).

### **7.9 Interacciones con ADN**

Los experimentos de interacción de ADN se realizaron usando plásmido de ADN (0.20 mg en 10  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5), las muestras fueron incubadas junto con 10  $\mu\text{L}$  de compuesto 100  $\mu\text{M}$ , usando como disolvente agua con 1% de DMSO. Los compuestos utilizados fueron el **2b**, **3b** y **CC-8**. Se prepararon dos series, una para ser irradiada durante una hora con luz visible y la otra serie se mantuvo en condiciones de oscuridad. Se utilizó una muestra control del plásmido tratado con las mismas condiciones que las muestras que contienen compuesto. Después de la irradiación, se añadió a las muestras 4  $\mu\text{L}$  de gel (0.025% de azul de bromofenol, 40% de glicerol). Los complejos se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos y luego se tiñeron con bromuro de etidio para observar el desplazamiento del ADN. Las bandas se visualizaron utilizando el sistema Gel Doc-It Imaging (UVP) con el software Vision Works.

### **7.10 Ensayos de Western blot**

Las células se lisaron, (proceso de ruptura de la membrana celular), con buffer de lisis, (Lysis Buffer) NP40 (Tris-HCl 125 mM pH 6.7, NaCl 150 mM, NP40 0.5%, glicerol al 10%). Las proteínas (30 µg) se desnaturalizaron y se cargaron en una SDS-PAGE. Los ensayos de Western blot se realizaron utilizando anticuerpos contra P53 (DO-1 sc-126, Santa Cruz Biotechnology®, 1/1000), p-gH2AX (05-636 Merck®, 1/1000), ATF4 (clon W16016A, BioLegend®, 1 / 500), caspasa-3 escindida (9661 Cell signalling®, 1/1000) y Actina (clon C4, Chemicon®, 1/10000). Los anticuerpos secundarios (anti-rabbit, anti-rat, anti-mouse: Sigma, MA) se incubaron a 1: 5000 dependiendo del anticuerpo primario. La carga se controló con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizaron cuantificaciones de transferencia Western usando el generador de imágenes Pxi y Genetools (Syngene™, Beacon House Nuffield Road Cambridge CB4 1TF, Reino Unido).<sup>144</sup> La intensidad de las bandas se indica como un porcentaje (%) relativo al control cuando una banda está presente en la condición de control.

### **7.11. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para la medición de las especies reactivas de oxígeno, las células AGS se sembraron en placas negras de 96 pozos y se trataron durante 6 horas. Después del tratamiento, las células se incubaron con una solución de PBS, 10% de FBS y 50 µM de dihidroetidina durante 30 minutos. Se tomaron fotos con un microscopio fluorescente y se determinó el porcentaje de ROS producido por las muestras.

### **7.12. Determinación de especies reactivas de oxígeno por EPR**

Los experimentos para medir la fotogeneración de  $^1\text{O}_2$  se llevaron a cabo en un espectrómetro EPR (Jeol JES-TE300), manteniendo la irradiación con luz visible durante tiempo que duró el ensayo. La detección de  $^1\text{O}_2$  se basa en la reacción específica entre  $^1\text{O}_2$  y TEMP que produce un aducto de radical TEMP- $^1\text{O}_2$  estable

(conocido como TEMPO). La detección de  $^1\text{O}_2$  se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento: la muestra fue de complejo de Ru(II)/TEMP 1:1, en la cual la concentración del complejo es de  $1 \times 10^{-3}$  M en etanol equilibrada con aire y TEMP a una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M. El control EtOH/TEMP 1:1 de etanol puro y TEMP una concentración de  $4 \times 10^{-3}$  M, ambas se irradiaron durante 30 min con luz visible utilizando una lámpara LED (0.75 A, 3W). Se generó una señal del aducto TEMPO que indica la fotoproducción de  $^1\text{O}_2$ . Los parámetros EPR fueron los siguientes: campo central,  $334.5 \pm 4$  mT; frecuencia de microondas, 9.43 GHz; ancho de modulación,  $5.0 \times 1$  mT; constante de tiempo, 0.1 s; amplitud,  $10.0 \times 1$ . La temperatura se mantuvo a  $25^\circ\text{C}$ . En cada caso, los parámetros EPR se mantuvieron constantes, al igual que la concentración de TEMP; las muestras fueron irradiadas directamente dentro de la cavidad EPR. La cantidad de TEMPO producida por reacción fotoquímica se determinó comparando la intensidad integrada del espectro EPR con la de la concentración conocida de TEMPO comercial.

Para determinar la capacidad del compuesto de rutenio **2b**, para producir  $\text{O}_2^-$ . Se usó 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) como trampa de spin. Las condiciones experimentales fueron similares a las utilizadas en la fotoproducción de  $^1\text{O}_2$ .

## 8. Referencias

1. Karp G (2008) *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*, Quinta edición. McGraw Hill
2. Rodríguez-Fragoso L, Hernández-Baltasar E, Reyes-Esparza JA (2004) El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotechnol Apl* 21:60–69
3. Mitra S, Ganguli S, Chakrabarti J (2018) Introduction. *Cancer Noncoding RNAs* 1–23
4. Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F (1990) Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: Bourdeau, P. (Ed.), *Short-term Toxic Tests Non-genotoxic Effects*. John Wiley & Sons Ltd. New York. 75–97
5. Organización mundial de la salud (2014) ENT Perfiles de países, México. [https://www.who.int/nmh/countries/2014/mex\\_es.pdf](https://www.who.int/nmh/countries/2014/mex_es.pdf)
6. Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M, Martin LD (2003) Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften* 90:495–500
7. Faguet GB (2015) A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer* 136:2022–2036
8. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ (2018) The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* 47:6645–6653
9. Beijnen JH, Sava G, Bergamo A, Schellens JHM, Gaiddon C (2012) Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. *J Inorg Biochem* 106:90–99
10. Novak MS, Büchel GE, Keppler BK, Jakupec MA (2016) Biological properties of novel ruthenium- and osmium-nitrosyl complexes withazole heterocycles. *J Biol Inorg Chem* 21:347–356
11. Coverdale J, Laroia-McCarron T, Romero-Canelón I (2019) Designing

ruthenium anticancer drugs: What have we learnt from the key drug candidates? *Inorganics* 7:1-15

12. Leyva L, Sirlin C, Rubio L, Franco C, Le Lagadec R, Spencer J, Bischoff P, Gaiddon C, Loeffler JP, Pfeffer M (2007) Synthesis of cycloruthenated compounds as potential anticancer agents. *Eur J Inorg Chem* 3055–3066
13. Wee HA, Dyson PJ (2006) Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy. *Eur J Inorg Chem* 4003–4018
14. Nováková O, Kašpárková J, Vrána O, van Vliet PM, Reedijk J, Brabec V (1995) Correlation between cytotoxicity and DNA binding of polypyridyl ruthenium complexes. *Biochemistry* 34:12369–12378
15. Ryabov AD, Sukharev VS, Alexandrova L, Le Lagadec R, Pfeffer M (2001) New synthesis and new bio-application of cyclometalated ruthenium(II) complexes for fast mediated electron transfer with peroxidase and glucose oxidase. *Inorg Chem* 40:6529–6532
16. Ryabov AD, Soukharev VS, Alexandrova L, Le Lagadec R, Pfeffer M (2003) Low-potential cyclometalated osmium(II) mediators of glucose oxidase. *Inorg Chem* 42:6598–6600
17. Ryabov AD, Le Lagadec R, Estevez H, Toscano RA, Hernandez S, Alexandrova L, Kuruva VS, Fischer A, Sirlin C, Pfeffer M (2005) Synthesis, characterization, and electrochemistry of biorelevant photosensitive low-potential orthometalated ruthenium complexes. *Inorg Chem* 44:222–230
18. Ryabov AD, Kurova VS, Ivanova E V., Le Lagadec R, Alexandrova L (2005) Redox mediation and photomechanical oscillations involving photosensitive cyclometalated Ru(II) complexes, glucose oxidase, and peroxidase. *Anal Chem* 77:1132–1139
19. Le Lagadec R, Alexandrova L, Estevez H, Pfeffer M, Laurinavičius V, Razumiene J, Ryabov AD (2006) Bis-ruthena(III)cycles  $[\text{Ru}(\text{C}\Omega\text{N})_2(\text{N}$

- $\text{C}\text{N}\text{N}]\text{PF}_6$  as low-potential mediators for PQQ alcohol dehydrogenase ( $\text{C}\text{N}\text{N} =$  2-phenylpyridinato or 4-(2-tolyl)-pyridinato,  $\text{N}\text{N}\text{N} =$  bpy or phen). *Eur J Inorg Chem* 2:2735–2738
20. Rico Bautista H, Saavedra Díaz RO, Shen LQ, Orvain C, Gaiddon C, Le Lagadec R, Ryabov AD (2016) Impact of cyclometalated ruthenium(II) complexes on lactate dehydrogenase activity and cytotoxicity in gastric and colon cancer cells. *J Inorg Biochem* 163:28–38
  21. Sainuddin T, McCain J, Pinto M, Yin H, Gibson J, Hetu M, McFarland SA (2016) Organometallic Ru(II) photosensitizers derived from  $\pi$ -expansive cyclometalating ligands: Surprising theranostic PDT effects. *Inorg Chem* 55:83–95
  22. Karges J, Blacque O, Goldner P, Chao H, Gasser G (2019) Towards long wavelength absorbing photodynamic therapy photosensitizers via the extension of a  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  core. *Eur J Inorg Chem* 3704–3712
  23. Cancer Research UK (2017) About cancer. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>
  24. Stewart BW, Wild CP (2014) World cancer report 2014. *Int Agency Res Cancer, World Heal Organ* 1–630
  25. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2018) GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data. *Cancer J Clin* 68:13–15
  26. COPREDOC (2016) Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer. *Soc Mex Oncol* 1–25
  27. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud enfermedades transmisibles y análisis de salud (2017) Información y análisis de salud: Situación de salud para las américas: Indicadores básicos. 1–20
  28. Sadler PJ (1991) Inorganic chemistry and drug design. *Adv Inorg Chem* 36:1–48

29. Martin LJ (2019) Cancer treatment types.  
<https://www.webmd.com/cancer/immunotherapy-approach-19/basics/slideshow-cancer-treatments>
30. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 93:52–79
31. Reedijk J (1996) Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem Commun* 801–806
32. Bernges F, Holler E (1991) The reaction of platinum(II) complexes with DNA. Kinetics of intrastrand crosslink formation in vitro. *Nucleic Acids Res* 19:1483–1489
33. Rosenberg B, Vancamp L (1969) Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nat Publ Gr* 223:582–587
34. Lebwohl D, Canetta R (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34:1522–1534
35. Tanaka K, Kunimatzu T, Shimakura J, Hanada M (2011) Development of miriplatin, a novel antitumor platinum for hepatocellular carcinoma. *Medicine* 1–12
36. Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7:573–584
37. Kauffman GB, Pentimalli R, Doldi S, Hall MD (2010) Michele Peyrone (1813-1883), discoverer of Cisplatin. *Platin Met Rev* 54:250–256
38. Werner A (1893) Beitrag zur konstitution anorganischer verbindungen. *Zeitschrift für Anorg Chemie* 3:267–330
39. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ (2014) Understanding and improving platinum anticancer drugs - phenanthriplatin. *Anticancer Res* 34:471–476



40. Kenny RG, Marmion CJ (2019) Toward multi-targeted platinum and ruthenium drugs - A new paradigm in cancer drug treatment regimens? *Chem Rev* 119:1058–1137
41. Florea AM, Büsselberg D (2011) Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)* 3:1351–1371
42. Wong E, Giandornenico CM (1999) Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 99:2451–2466
43. Ozols RF (1990) Ovarian cancer, part II: Treatment. *Curr Probl Dermatol* 2:34–63
44. Miller SE, House DA (1989) The hydrolysis products of cis-diamminedichloroplatinum(II) I. The kinetics of formation and anation of the cis-diammine(aqua)chloroplatinum(II) cation in acidic aqueous solution. *Inorg Chim Acta* 161:131–137
45. Miller SE, House DA (1989) The hydrolysis products of cis-dichlorodiammineplatinum(II) 2. The kinetics of formation and anation of the cis-diamminedi(aqua)platinum(II) cation. *Inorg Chim Acta* 166:189–197
46. Miller SE, House DA (1990) The hydrolysis products of cis-dichlorodiammineplatinum(II) 3. Hydrolysis kinetics at physiological pH. *Inorg Chim Acta* 173:53–60
47. Ramos Y, Hernández C (2009) Avances recientes en la determinación analítica del cisplatino y sus productos de hidrólisis. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 40:3–10
48. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59:657–663
49. Johnstone T, Suntharalingam K, Lippard S (2015) Third row transition metals for the treatment of cancer. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 373:20140185

50. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM (2003) Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103:645–662
51. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR (1999) Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev* 99:2511–2533
52. Guo Z, Sadler PJ (1999) Metals in Medicine. *Angew Chemie Int Ed* 38:1512–1531
53. Zhang P, Sadler PJ (2017) Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *J Organomet Chem* 839:5–14
54. Lentz F, Drescher A, Lindauer A, Henke M, Hilger RA, Hartinger CG, Scheulen ME, Dittrich C, Keppler BK, Jaehde U (2009) Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. *Anticancer Drugs* 20:97–103
55. Monro S, Colón KL, Yin H, Roque J, Konda P, Gujar S, Thummel RP, Lilge L, Cameron CG, McFarland SA (2019) Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. *Chem Rev* 119:797–828
56. Michael J C (2002) Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev* 232:69–93
57. Allardyce CS, Dyson PJ (2001) Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platin Met Rev* 45:62–69
58. Mor E, Aird RE, Chen H, Cu J (2001) Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J Med Chem* 6:3616–3621
59. Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris RE, Chen H, Sadler PJ, Jodrell DI (2002) In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *British J Cancer* 86:1652–1657

60. Kumar C V., Barton JK, Turro NJ (1985) Photophysics of ruthenium complexes bound to double helical DNA. *J Am Chem Soc* 107:5518–5523
61. Barton JK (1986) Metals and DNA: Molecular Left-Handed complements. *J Science* 233:727–734
62. Barton JK, Goldberg JM, Kumar C V., Turro NJ (1986) Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: Tuning the stereoselectivity. *J Am Chem Soc* 108:2081–2088
63. Barton JK, Danishefsky AT, Goldberg JM (1984) Tris(phenanthroline)ruthenium(II): Stereoselectivity in binding to DNA. *J Am Chem Soc* 106:2172–2176
64. Friedman AE, Chambron JC, Sauvage JP, Turro NJ, Barton JK (1990) A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sup>2+</sup>. *J Am Chem Soc* 112:4960–4962
65. Fernandez S, Pfeffer M, Ritleng V, Sirlin C (1999) An effective route to cycloruthenated N-ligands under mild conditions. *Organometallics* 18:2390–2394
66. Gaidon C, Jeannequin P, Bischoff P, Pfeffer M, Sirlin C, Loeffler JP (2005) Ruthenium(II)-derived organometallic compounds induce cytostatic and cytotoxic effects on mammalian cancer cell lines through p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1403–1411
67. Meng X, Leyva ML, Jenny M, Gross I, Benosman S, Fricker B, Harlepp S, Hébraud P, Boos A, Wlosik P, Bischoff P, Sirlin C, Pfeffer M, Loeffler J-P, Gaidon C (2009) A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP. *Cancer Res* 69:5458–5466
68. Fetzer L, Boff B, Ali M, Xiangjun M, Collin JP, Sirlin C, Gaidon C, Pfeffer M (2011) Library of second-generation cycloruthenated compounds and evaluation of their biological properties as potential anticancer drugs: passing

the nanomolar barrier. *Dalton Trans* 40:8869–8878

69. Vidimar V, Meng X, Klajner M, Licon C, Fetzer L, Harlepp S, Hébraud P, Sidhoum M, Sirlin C, Loeffler JP, Mellitzer G, Sava G, Pfeffer M, Gaiddon C (2012) Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 84:1428–1436
70. Chow MJ, Licon C, Pastorin G, Mellitzer G, Ang WH, Gaiddon C (2016) Structural tuning of organoruthenium compounds allows oxidative switch to control ER stress pathways and bypass multidrug resistance. *Chem Sci* 7:4117–4124
71. Alessio E (2017) Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: A personal perspective. *Eur J Inorg Chem* 1549–1560
72. Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK (2014) NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem Sci* 5:2925–2932
73. Artner C, Holtkamp HU, Hartinger CG, Meier-Menches SM (2017) Characterizing activation mechanisms and binding preferences of ruthenium metallo-prodrugs by a competitive binding assay. *J Inorg Biochem* 177:322–327
74. Leijen S, Burgers SA, Baas P, Pluim D, Tibben M, Van Werkhoven E, Alessio E, Sava G, Beijnen JH, Schellens JHM (2015) Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest New Drugs* 33:201–214
75. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J (2011) Photodynamic therapy of cancer: An update. *A Cancer J Clin* 61:250–281

76. Ghosh G, Colón KL, Fuller A, Sainuddin T, Bradner E, McCain J, Monro SMA, Yin H, Hetu MW, Cameron CG, McFarland SA (2018) Cyclometalated ruthenium(II) complexes derived from  $\alpha$ -oligothiophenes as highly selective cytotoxic or photocytotoxic agents. *Inorg Chem* 57:7694–7712
77. McFarland SA, Mandel A, Dumoulin-White R, Gasser G (2020) Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology?. *Curr Opin Chem Biol* 56:23–27
78. li J, Wu J, Ye B, Wang L, Ji L, Zhou J, Li R (1997) Bis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complexes with imidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline or 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10] phenanthroline. *J Chem Soc, Dalton Trans* 1395–1401
79. Collins JG, Sleeman AD, Aldrich-Wright JR, Greguric I, Hambley TW (2002) A  $^1\text{H}$  NMR study of the DNA binding of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Inorg Chem* 37:3133–3141
80. Reichardt C, Monro S, Sobotta FH, Colón KL, Sainuddin T, Stephenson M, Sampson E, Roque J, Yin H, Brendel JC, Cameron CG, McFarland S, Dietzek B (2019) Predictive strength of photophysical measurements for in vitro photobiological activity in a series of Ru(II) polypyridyl complexes derived from  $\pi$ -extended ligands. *Inorg Chem* 58:3156–3166
81. Yin H, Stephenson M, Gibson J, Sampson E, Shi G, Sainuddin T, Monro S, McFarland SA (2014) In vitro multiwavelength PDT with 3IL States: Teaching old molecules new tricks. *Inorg Chem* 53:4548–4559
82. Wang L, Yin H, Javed MA, Hetu M, Wang C, Monro S, Zhu X, Kilina S, McFarland SA, Sun W (2017)  $\pi$ -Expansive heteroleptic ruthenium(II) complexes as reverse saturable absorbers and photosensitizers for photodynamic therapy. *Inorg Chem* 56:3245–3259
83. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3:380–387

84. Henderson BW, Dougherty TJ (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 55:145–157
85. Moan J, Berg K (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 53:549–553
86. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, Harrison DG, Bhatnagar A (2016) Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system. *Circulation Res* 119:39–75
87. Aprioku JS (2013) Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil* 14:158–172
88. Conti L, Bencini A, Ferrante C, Gellini C, Paoli P, Parri M, Pietraperzia G, Valtancoli B, Giorgi C (2019) Highly charged ruthenium(II) polypyridyl complexes as effective photosensitizer in photodynamic therapy. *Chem - A Eur J* 25:10606–10615
89. Briviba K, Klotz L (1997) Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* 378:1259–1265
90. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT (2009) Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 85:1053–1074
91. Juzeniene A, Nielsen KP (2006) Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25:7–28
92. Brancalion L, Moseley H (2002) Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 17:173–186
93. Hill, M. D. Daniell JS (1991) A history of photodynamic therapy. *Aust NZ J Surg* 61:340–348

94. Dougherty TJ (1983) Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. *Photochem Photobiol* 38:377–379
95. Lombard L, Conradie M (2002) Recent advances in the management of prolactinomas. *J Endocrinol Metab Diabetes South Africa* 7:65–70
96. Juris A, Balzani V, Barigelletti F, Campagna S, Belser P, von Zelewsky A (1988) Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. *Coord Chem Rev* 84:85–277
97. Fleisher MB, Waterman KC, Turro NJ, Barton JK (1986) Light-induced cleavage of DNA by metal complexes. *Inorg Chem* 25:3549–3551
98. Wang J, Higgins SLH, Winkel BSJ, Brewer KJ (2011) A new Os, Rh bimetallic with O<sub>2</sub> independent DNA cleavage and DNA photobinding with red therapeutic light excitation. *Chem Commun* 47:9786–9788
99. Wachter E, Heidary DK, Howerton BS, Parkin S, Glazer EC (2012) Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window. *Chem Commun* 48:9649–9651
100. Albani BA, Peña B, Dunbar KR, Turro C (2014) New cyclometallated Ru(II) complex for potential application in photochemotherapy? *Photochem Photobiol Sci* 13:272–280
101. Klocc K, Mlochowski J, Szulc Z (1977) Synthesis of azafluorenones. *J Prakt Chem* 319:959–967
102. Nagargoje D, Mandhane P, Shingote S, Badadhe P, Gill C (2012) Ultrasound assisted one pot synthesis of imidazole derivatives using diethyl bromophosphate as an oxidant. *Ultrason Sonochem* 19:94–96
103. Boff B, Ali M, Alexandrova L, Espinosa-Jalapa NA, Saavedra-Díaz RO, Le Lagadec R, Pfeffer M (2013) Rational synthesis of heteroleptic tris(chelate) ruthenium complexes [Ru<sup>II</sup>(2-Ph-2'-Py)(LΛL)(L'ΛL')]PF<sub>6</sub> by selective substitution of the ligand Trans to the ruthenated phenyl ring. *Organometallics* 32:5092–5097

104. Molina B, Alexandrova L, Le Lagadec R, Sansores LE, Rios-Jara D, Espinosa-Magana F, Salcedo R (2012) Hybridization vs. bond stretching isomerism in Ru(II) cyclometalated complexes of 2-phenylpyridine. *Molecules* 17:34–47
105. Liu YJ, Chao H, Tan LF, Yuan YX, Wei W, Ji LN (2005) Interaction of polypyridyl ruthenium (II) complex containing asymmetric ligand with DNA. *J Inorg Biochem* 99:530–537
106. Ngo KT, Lee NA, Pinnace SD, Szalda DJ, Weber RT, Rochford J (2016) Probing the noninnocent  $\pi$ -bonding influence of N-carboxyamidoquinolate ligands on the light harvesting and redox properties of ruthenium polypyridyl complexes. *Inorg Chem* 55:2460–2472
107. Djukic JP, Sortais JB, Barloy L, Pfeffer M (2009) Cycloruthenated compounds - Synthesis and applications. *Eur J Inorg Chem* 817–853
108. Cerón-Camacho R, Morales-Morales D, Hernandez S, Le Lagadec R, Ryabov AD (2008) Easy access to bio-inspired osmium(II) complexes through electrophilic intramolecular C(sp<sup>2</sup>)-H bond cyclometalation. *Inorg Chem* 47:4988–4995
109. Muro-Small ML, Yarnell JE, McCusker CE, Castellano FN (2012) Spectroscopy and photophysics in cyclometalated Ru<sup>II</sup>-bis(bipyridyl) complexes. *Eur J Inorg Chem* 4004–4011
110. Leo A, Hansch C, Elkins D (1971) Partition coefficients and their uses. *Chem Rev* 71:525–616
111. Organisation for Economic Co-operation and Development & Organisation for Economic Co-operation and Development (Contributor.) (1995) Test no. 107: partition coefficient (n-octanol/water) : shake flask method. *OECD Paris*
112. (a) Huang H, Zhang P, Chen H, Ji L, Chao H (2015) Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium(II) complexes: Anticancer activities against 2D and 3D cancer models. *Chem - Eur J* 21:715–725, (b) Pena B,



- Saha S, Barhoumi R, Burghardt RC, Dunbar KR (2018) Ruthenium(II)-polypyridyl compounds with  $\pi$ -extended nitrogen donor ligands induce apoptosis in human lung adenocarcinoma (A549) cells by triggering caspase-3/7 pathway. *Inorg. Chem* 57:12777–12786.
113. Poynton FE, Bright SA, Blasco S, Williams DC, Kelly JM, Gunnlaugsson T (2017) The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for: In vitro cellular and in vivo applications. *Chem Soc Rev* 46:7706–7756
114. Mihmanli M, Ilhan E, Idiz UO, Alemdar A, Demir U (2016) Recent developments and innovations in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 22:4307–4320
115. Chow MJ, Babak M V., Wong DYQ, Pastorin G, Gaiddon C, Ang WH (2016) Structural determinants of p53-independence in anticancer ruthenium-arene Schiff-base complexes. *Mol Pharm* 13:2543–2554
116. Mari C, Pierroz V, Rubbiani R, Patra M, Hess J, Spingler B, Oehninger L, Schur J, Ott I, Salassa L, Ferrari S, Gasser G (2014) DNA intercalating Ru<sup>II</sup> polypyridyl complexes as effective photosensitizers in photodynamic therapy. *Chem - A Eur J* 20:14421–14436
117. Licona C, Spaety M-E, Capuozzo A, Ali M, Santamaria R, Armant O, Delalande F, Van Dorsselaer A, Cianferani S, Spencer J, Pfeffer M, Mellitzer G, Gaiddon C (2016) A ruthenium anticancer compound interacts with histones and impacts differently on epigenetic and death pathways compared to cisplatin. *Oncotarget* 8:2568–2584
118. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J (2009) Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 8th ed. Saunders (Elsevier)
119. Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887–894

120. Tameire F, Verginadis II, Leli NM, Polte C, Conn CS, Ojha R, Salas Salinas C, Chinga F, Monroy AM, Fu W, Wang P, Kossenkov A, Ye J, Amaravadi RK, Ignatova Z, Fuchs SY, Diehl JA, Ruggero D, Koumenis C (2019) ATF4 couples MYC-dependent translational activity to bioenergetic demands during tumour progression. *Nature Cell Biol* 21:889-899
121. Xuan B, Qian Z, Torigoi E, Yu D (2009) Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Virol* 83:3463–3474
122. (a) Kuo LJ, Yang LX (2008) Gamma-H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Brooklyn)* 22:305–310, (b) Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM (2009) H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma* 118:683-692
123. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O’Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, Zhou L, Shen J, Han G, Wang XJ, Thorburn J, Thorburn A, Jimeno A, Raben D, Bedford JS, Li CY (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* 17:860–866
124. Chrysomali E, Nikitakis NG, Tosios K, Sauk JJ, Papanicolaou SI (2003) Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96:566–572
125. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) Free radicals in biology and medicine. Fifth Edition. Oxford University Press 1-905
126. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65:45–80
127. Khan N, Wilmot CM, Rosen GM, Demidenko E, Sun J, Joseph J, O’Hara J, Kalyanaraman B, Swartz HM (2003) Spin traps: In vitro toxicity and stability of radical adducts. *Free Radical Biol Med* 34:1473–1481

128. Suzen S, Gurer-Orhan H, Saso L (2017) Detection of reactive oxygen and nitrogen species by electron paramagnetic resonance (EPR) technique. *Molecules* 22:1–9
129. Villamena FA (2017) EPR Spin Trapping. *React Species Detect Biol* 163–202
130. Hakala-Yatkin M, Tyystjärvi E (2011) Inhibition of photosystem II by the singlet oxygen sensor compounds TEMP and TEMPD. *Biochim Biophys Acta* 1807:243–250
131. Shirinzadeh H, Eren B, Gurer-Orhan H, Suzen S, Özden S (2010) Novel indole-based analogs of melatonin: Synthesis and in vitro antioxidant activity studies. *Molecules* 15:2187–2202
132. Shaeib F, Banerjee J, Maitra D, Diamond MP, Abu-Soud HM (2013) Impact of hydrogen peroxide-driven fenton reaction on mouse oocyte quality. *Free Radical Biol Med* 58:154–159
133. Lion Y, Gandin E, Van de Vorst A (1980) On the production of nitroxide radicals by singlet oxygen reaction: an EPR study. *Photochem Photobiol* 31:305–309
134. Hideg É, Deák Z, Hakala-Yatkin M, Karonen M, Rutherford AW, Tyystjärvi E, Vass I, Krieger-Liszkay A (2011) Pure forms of the singlet oxygen sensors TEMP and TEMPD do not inhibit photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1807:1658–1661
135. Hadjur C, Jeunet A, Jardon P (1994) Photosensitization by hypericin: Electron spin resonance (ESR) evidence for the formation of singlet oxygen and superoxide anion radicals in an in vitro model. *J Photochem Photobiol B Biol* 26:67–74
136. Gómez-Vidales V, Granados-Oliveros G, Nieto-Camacho A, Reyes-Solís M, Jiménez-Estrada M (2014) Cacalol and cacalol acetate as photoproducts of singlet oxygen and as free radical scavengers, evaluated by EPR

spectroscopy and TBARS. *RSC Adv* 4:1371–1377

137. Zang L-Y, Van Kuijk FJGM, Misra BR, Misra HP (1995) The specificity and product of quenching singlet oxygen by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine. *Biochem Mol Biol Int* 37:283–293
138. Allison RR, Sibata CH (2010) Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 7:61–75
139. Wu J-Z, Ye B-H, Wang L, Ji L-N, Zhou J-Y, Li R-H, Zhou Z-Y (1997) Bis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complexes with imidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline or 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline. *J Chem Soc Dalton Trans* 1395–1402
140. Zelonka RA, Baird MC (1972) Benzene complexes of ruthenium(II). *Can J Chem* 50:3063–3072
141. Sheldrick G (2015) SHELXL. *Acta Crystallogr* 71:3–8
142. Chow MJ, Babak M V, Tan KW, Cheong MC, Pastorin G, Gaiddon C, Ang WH (2018) Induction of the endoplasmic reticulum stress pathway by highly cytotoxic organoruthenium schiff-base complexes. *Mol Pharm* 15:3020–3031
143. Benosman S, Meng X, Von Grabowiecki Y, Palamiuc L, Hritcu L, Gross I, Mellitzer G, Taya Y, Loeffler JP, Gaiddon C (2011) Complex regulation of p73 isoforms after alteration of amyloid precursor polypeptide (APP) function and DNA damage in neurons. *J Biol Chem* 286:43013–43025
144. Spaety ME, Gries A, Badie A, Venkatasamy A, Romain B, Orvain C, Yanagihara K, Okamoto K, Jung AC, Mellitzer G, Pfeffer S, Gaiddon C (2019) HDAC4 levels control sensibility toward cisplatin in gastric cancer via the p53-p73/BIK pathway. *Cancers (Basel)* 11:1–18

## 9. Anexos

**Tabla S1** Distancias de enlace seleccionadas (Å) y ángulos seleccionados (°) para el ligante **d**.

Distancias de enlace seleccionadas (Å)		Ángulos seleccionados (°)	
N(1)-C(2)	1.359(2)	C(2)-N(1)-C(17)	106.73(15)
N(1)-C(17)	1.380(2)	N(3)-C(2)-N(1)	112.39(16)
C(2)-N(3)	1.323(2)	N(3)-C(2)-C(18)	123.64(16)
C(2)-C(18)	1.471(2)	N(1)-C(2)-C(18)	123.81(16)
N(3)-C(4)	1.383(2)	C(2)-N(3)-C(4)	104.74(15)
C(8)-N(9)	1.333(3)	C(17)-C(4)-N(3)	110.37(16)
N(9)-C(10)	1.373(3)	C(2)-N(1)-C(17)	106.73(15)
C(10)-C(11)	1.455(3)	C(4)-C(17)-N(1)	105.73(16)
C(11)-C(12)	1.388(3)	C(8)-N(9)-C(10)	119.1(2)
C(12)-C(13)	1.354(4)	N(9)-C(10)-C(11)	118.97(19)
		C(12)-C(11)-C(10)	120.33(19)
		C(13)-C(12)-C(11)	120.1(2)

**Tabla S2** Datos cristalográficos para el ligante **d**.

<b>Ligante d</b>	
<b>Formula empírica</b>	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>
<b>Peso molecular</b>	295.33
<b>Temperatura</b>	298(2) K
<b>Longitud de onda</b>	0.71073 Å
<b>Sistema de cristal</b>	Monoclínico
<b>Dimensiones de la celda</b>	a = 10.3656(9) Å      α = 90° b = 15.8461(13) Å      β = 106.628(2)° c = 9.2257(7) Å      γ = 90°
<b>Densidad (calculada)</b>	1.1351 mg/m <sup>3</sup>
<b>Volumen</b>	1452.0(2) Å <sup>3</sup>
<b>Z</b>	4
<b>Coefficiente de absorción</b>	0.082 mm <sup>-1</sup>
<b>F(000)</b>	616
<b>Tamaño del cristal</b>	0.371 x 0.296 x 0.075 mm <sup>3</sup>
<b>Rango θ de colección de datos (°)</b>	2.420 a 25.358
<b>Rangos de índice</b>	-12 ≤ h ≤ 12, -19 ≤ k ≤ 18, - 11 ≤ l ≤ 11
<b>Reflexiones independientes</b>	2635 [R(int) = 0.0554]
<b>Corrección de absorción</b>	Semiempírico de equivalentes
<b>Transmisión Max. y min.</b>	0.7452 y 0.6529
<b>Método de refinamiento</b>	Cuadrados mínimos de matriz completa en F <sub>2</sub>
<b>Datos / restricciones / parámetros</b>	2635 / 1 / 212
<b>Calidad de ajuste en F<sub>2</sub></b>	1.047
<b>Índices R finales [I &gt; 2σ(I)]</b>	R1 = 0.0545, wR2 = 0.1481
<b>Índices R (todos los datos)</b>	R1 = 0.0696, wR2 = 0.1641
<b>máximo-mínimo de densidad electrónica residual (eÅ<sup>-3</sup>)</b>	0.320 y -0.229

**Tabla S1** Distancias de enlace seleccionadas (Å) para los complejos **1a**, **2b** y **3a**.

<b>1a</b>		<b>2b</b>		<b>3a</b>	
Ru(1)-N(2)	2.005(3)	Ru(1)-C(29)	2.029(7)	Ru(1)-C(17)	2.043(1)
Ru(1)-N(6)	2.013(3)	Ru(1)-N(12)	2.038(5)	Ru(1)-N(5)	2.048(1)
Ru(1)-C(14)	2.042(3)	Ru(1)-N(1)	2.052(5)	Ru(1)-N(7)	2.052(1)
Ru(1)-N(1)	2.061(3)	Ru(1)-N(26)	2.066(5)	Ru(1)-N(4)	2.056(1)
Ru(1)-N(4)	2.069(4)	Ru(1)-N(44)	2.090(5)	Ru(1)-N(1)	2.074(1)
Ru(1)-N(3)	2.125(4)	Ru(1)-N(15)	2.138(6)	Ru(1)-N(6)	2.111(1)

**Tabla S2** Ángulos seleccionados ( $^{\circ}$ ) para los complejos **1a**, **2b** y **3a**.

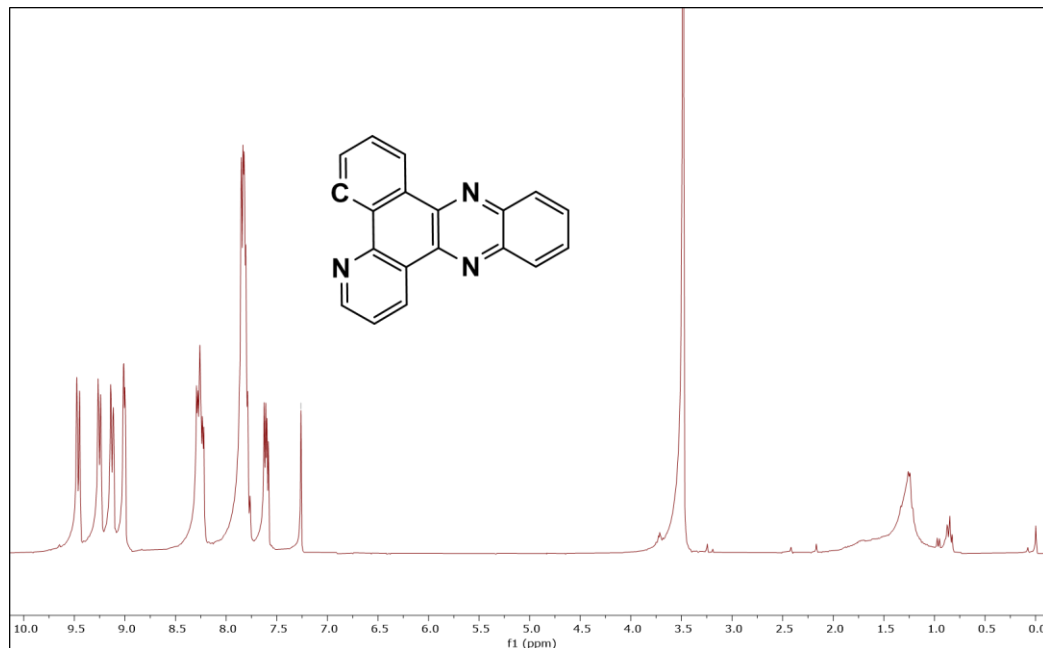
<b>1a</b>		<b>2b</b>		<b>3a</b>	
N(2)-Ru(1)-N(6)	177.50(1)	C(29)-Ru(1)-N(12)	91.7(2)	C(17)-Ru(1)-N(5)	90.6(5)
N(2)-Ru(1)-C(14)	88.67(1)	C(29)-Ru(1)-N(1)	92.2(2)	C(17)-Ru(1)-N(7)	98.0(5)
N(6)-Ru(1)-C(14)	93.22(1)	N(12)-Ru(1)-N(1)	79.9(2)	N(5)-Ru(1)-N(7)	97.5(5)
N(2)-Ru(1)-N(1)	92.29(1)	C(29)-Ru(1)-N(26)	96.2(2)	C(17)-Ru(1)-N(4)	88.4(5)
N(6)-Ru(1)-N(1)	89.65(1)	N(12)-Ru(1)-N(26)	95.39(1)	N(5)-Ru(1)-N(4)	78.5(5)
C(14)-Ru(1)-N(1)	80.36(1)	N(1)-Ru(1)-N(26)	170.5(2)	N(7)-Ru(1)-N(4)	172.4(5)
N(2)-Ru(1)-N(4)	89.76(1)	C(29)-Ru(1)-N(44)	80.1(2)	C(17)-Ru(1)-N(1)	81.2(5)
N(1)-Ru(1)-N(3)	92.86(1)	N(12)-Ru(1)-N(44)	169.1(2)	N(5)-Ru(1)-N(1)	170.3(5)
N(2)-Ru(1)-N(4)	89.76(1)	N(1)-Ru(1)-N(44)	93.1(2)	N(7)-Ru(1)-N(1)	88.8(5)
N(6)-Ru(1)-N(4)	88.43(1)	N(26)-Ru(1)-N(44)	92.7(2)	N(4)-Ru(1)-N(1)	96.1(5)
C(14)-Ru(1)-N(4)	95.45(1)	C(29)-Ru(1)-N(15)	173.9(2)	C(17)-Ru(1)-N(6)	174.2(5)
N(1)-Ru(1)-N(4)	175.29(1)	N(12)-Ru(1)-N(15)	91.5(2)	N(5)-Ru(1)-N(6)	94.5(5)
N(2)-Ru(1)-N(3)	92.09(1)	N(1)-Ru(1)-N(15)	93.4(2)	N(7)-Ru(1)-N(6)	78.6(5)
N(6)-Ru(1)-N(3)	86.22(1)	N(26)-Ru(1)-N(15)	78.4(2)	N(4)-Ru(1)-N(6)	95.2(4)
C(14)-Ru(1)-N(3)	173.21(1)	N(44)-Ru(1)-N(15)	97.3(2)	N(1)-Ru(1)-N(6)	94.0(5)



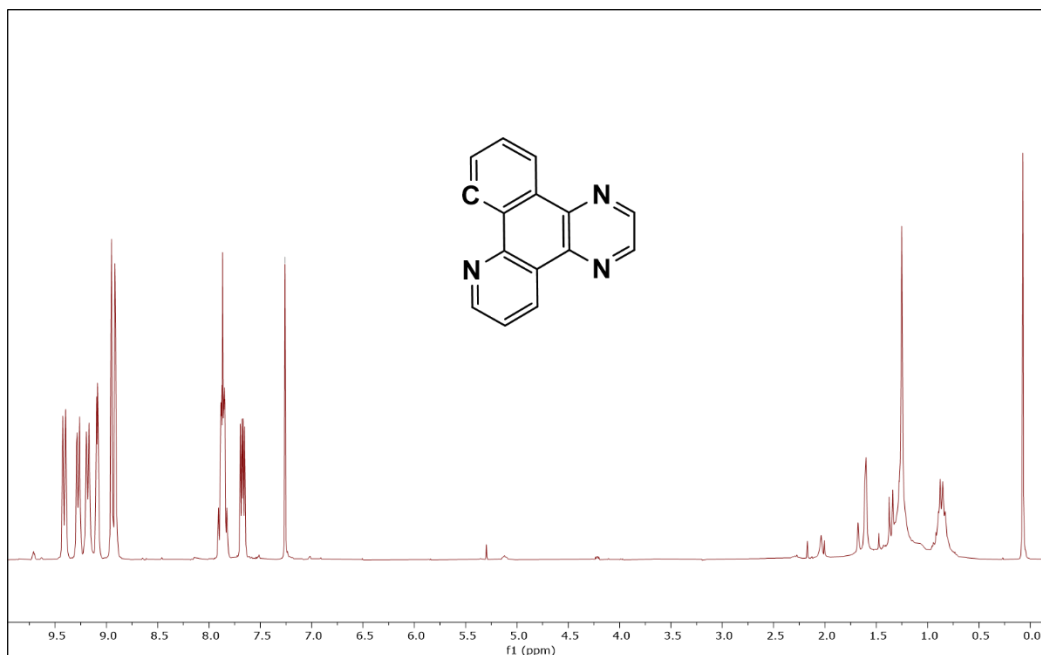
**Tabla S3** Datos cristalográficos para los compuestos **1a**, **2b** y **3a**.

	<b>1a</b>	<b>2b</b>	<b>3a</b>
<b>Formula empírica</b>	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> F <sub>6</sub> N <sub>7</sub> PRu	C <sub>39</sub> H <sub>24</sub> F <sub>6</sub> N <sub>7</sub> PRu	C <sub>43</sub> H <sub>36</sub> F <sub>6</sub> N <sub>7</sub> OPRu
<b>Peso molecular</b>	690.55	836.69	912.83
<b>Temperatura</b>	296(2) K	298(2) K	150(2) K
<b>Longitud de onda</b>	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
<b>Sistema de cristal</b>	Monoclínico	Monoclínico	Ortorrómbico
<b>Grupo espacial</b>	P 21/c	C2/c	P212121
<b>Dimensiones de la celda</b>	a = 19.8249(7) Å α = 90° b = 8.3603(3) Å β = 114.7920(10)° c = 18.8330(6) Å γ = 90°	a = 12.8663(6) Å α = 90° b = 23.6336(12) Å β = 98.242(2)° c = 24.0807(12) Å γ = 90°	a = 10.0730(10) Å α = 90° b = 10.3369(10) Å β = 90° c = 37.568(4) Å γ = 90°
<b>Densidad (calculada)</b>	1.619 mg/m <sup>3</sup>	1.534 mg/m <sup>3</sup>	1.550 mg/m <sup>3</sup>
<b>Volumen</b>	2833.74(17) Å <sup>3</sup>	7246.8(6) Å <sup>3</sup>	3911.7(7) Å <sup>3</sup>
<b>Z</b>	4	4	4
<b>Coeficiente de absorción</b>	0.680 mm <sup>-1</sup>	0.548 mm <sup>-1</sup>	0.516 mm <sup>-1</sup>
<b>F(000)</b>	1384	3360	1856
<b>Tamaño del cristal</b>	0.298 x 0.112 x 0.054 mm <sup>3</sup>	0.326 x 0.205 x 0.106 mm <sup>3</sup>	0.400 x 0.160 x 0.040 mm <sup>3</sup>
<b>rango θ de colección de datos (°)</b>	2.167 a 25.352	2.332 a 25.423	2.168 a 25.374
<b>Rangos de índice</b>	-23<=h<=23, -9<=k<=10, -22<=l<=22	-15<=h<=15, -28<=k<=28, -25<=l<=29	-12<=h<=10, -12<=k<=12, -45<=l<=45
<b>Reflexiones recogidas</b>	38499	51597	27820
<b>Reflexiones independientes</b>	5168 [R(int) = 0.0783]	6627 [R(int) = 0.0931]	7122 [R(int) = 0.0974]
<b>Corrección de absorción</b>	Analítica	Semiempirico de equivalentes	Semiempirico de equivalentes
<b>Transmisión Max. y min.</b>	0.9676 y 0.8809	0.7452 y 0.6703	0.7452 y 0.6312

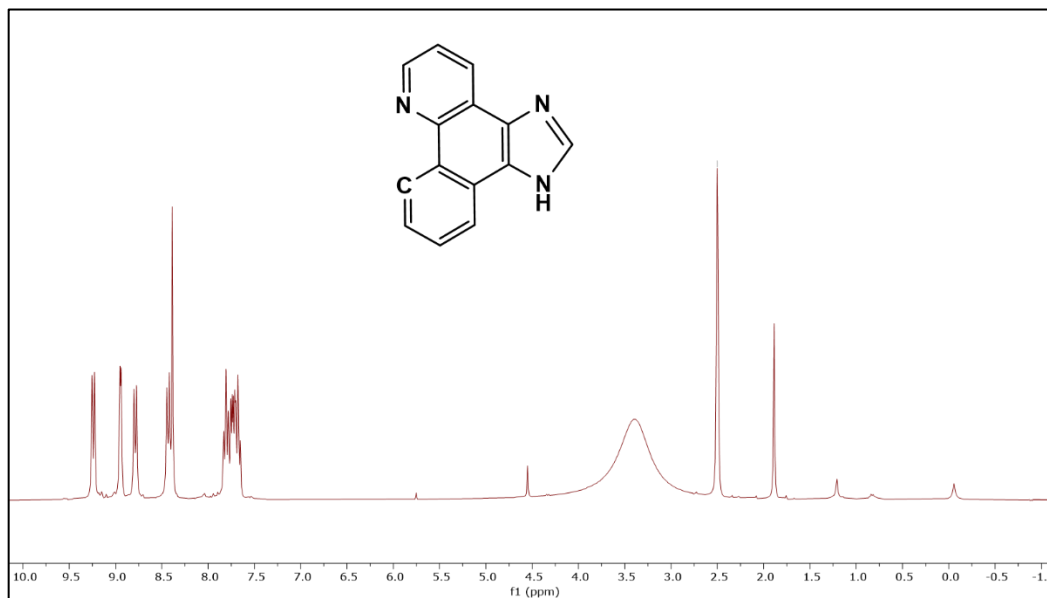
<b>Método de refinamiento</b>	Cuadrados mínimos de matriz completa en F2	Cuadrados mínimos de matriz completa en F2	Cuadrados mínimos de matriz completa en F2
<b>Datos / restricciones / parámetros</b>	5168 / 231 / 438	6627 / 582 / 678	7122 / 0 / 534
<b>Calidad de ajuste en F2</b>	1.034	1.156	1.166
<b>Índices R finales [I &gt; 2σ(I)]</b>	R1 = 0.0432 wR2 = 0.0994	R1 = 0.0807 wR2 = 0.1427	R1 = 0.0980 wR2 = 0.1664
<b>Índices R (todos los datos)</b>	R1 = 0.0583 wR2 = 0.1078	R1 = 0.1286 wR2 = 0.1621	R1 = 0.1319 wR2 = 0.1809
<b>máximo-mínimo de densidad electrónica residual (eÅ<sup>-3</sup>)</b>	0.526 y -0.564	0.799 y -0.616	0.842 y -1.202



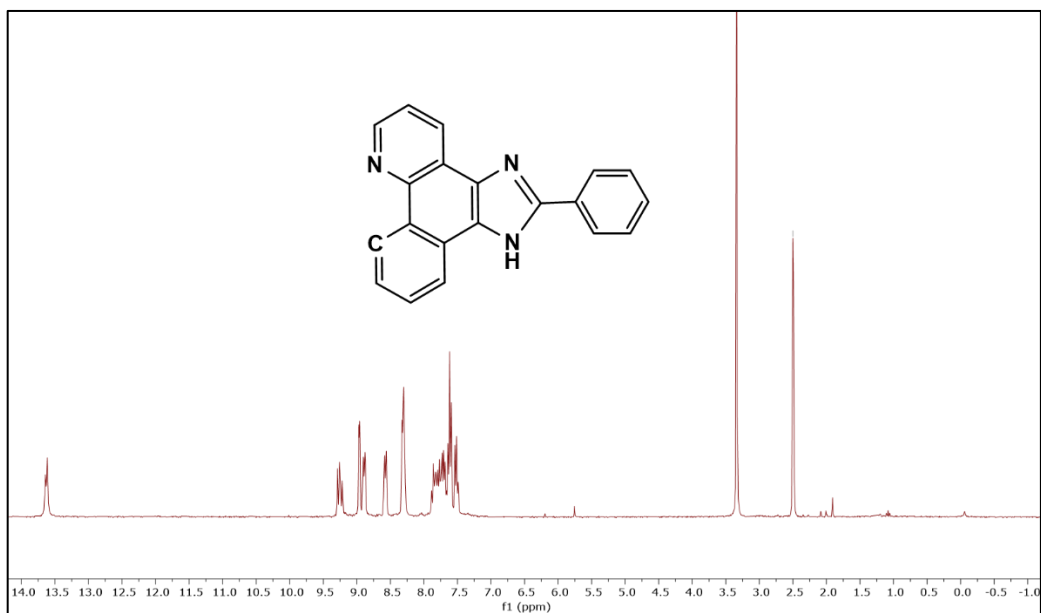
**Figura 1A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ligante **a**.



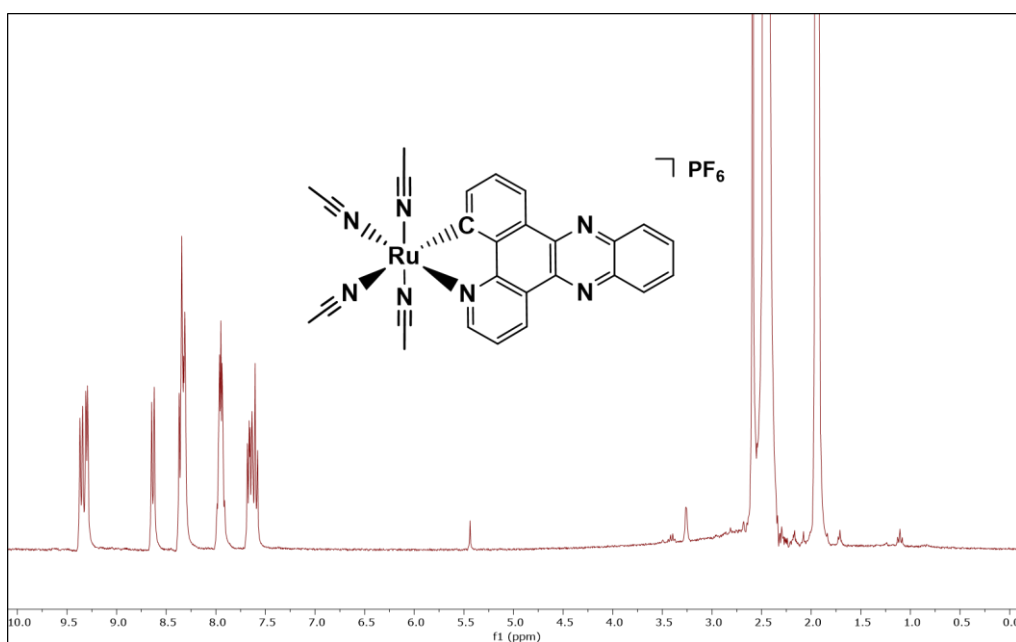
**Figura 2A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del ligante **b**.



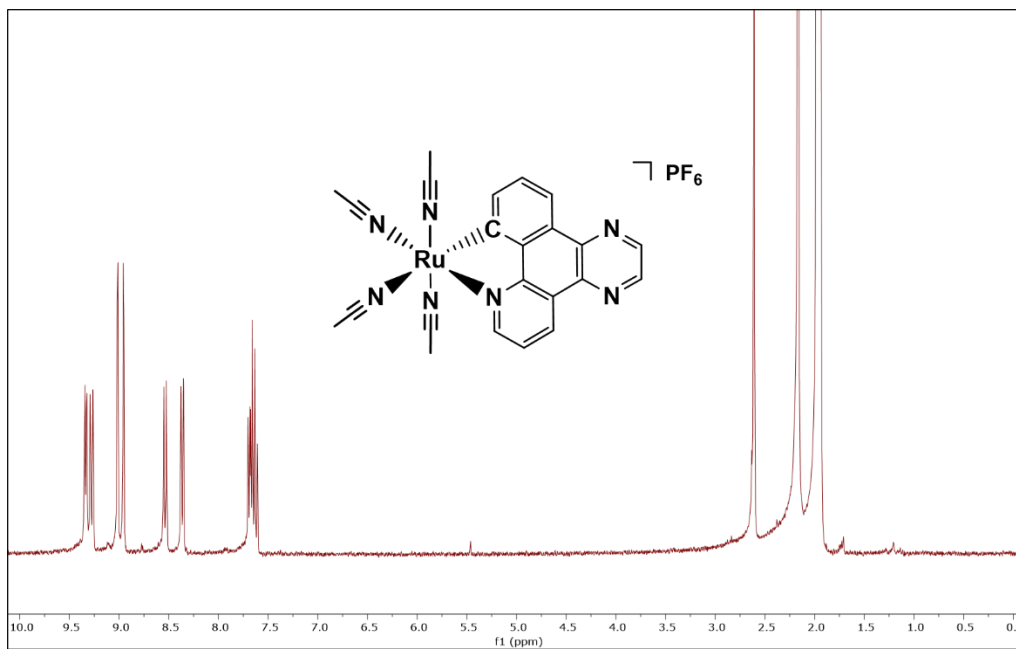
**Figura 3A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del ligante **c**.



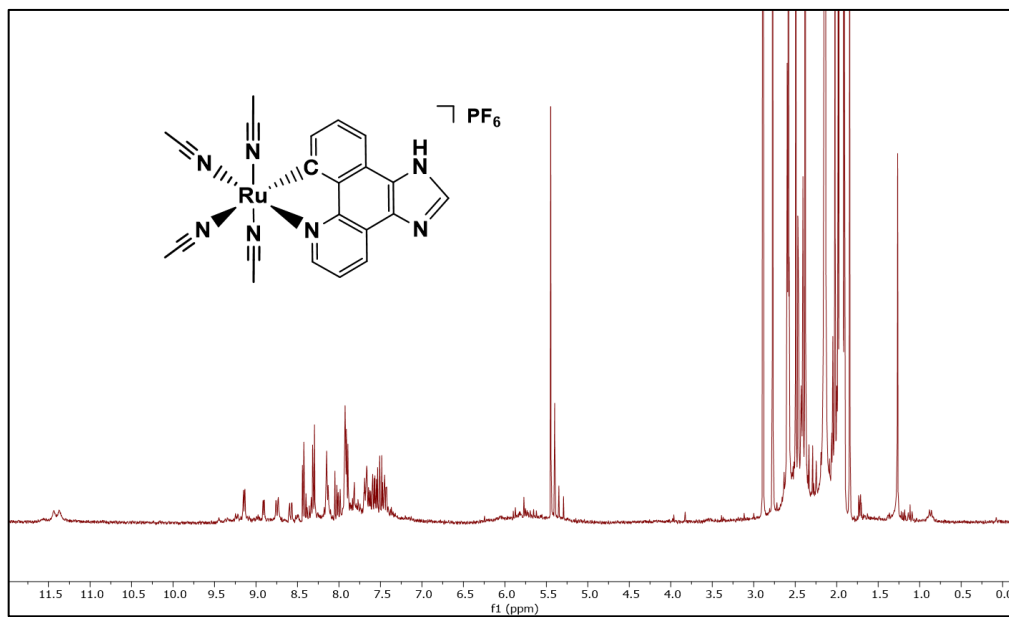
**Figura 4A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del ligante **d**.



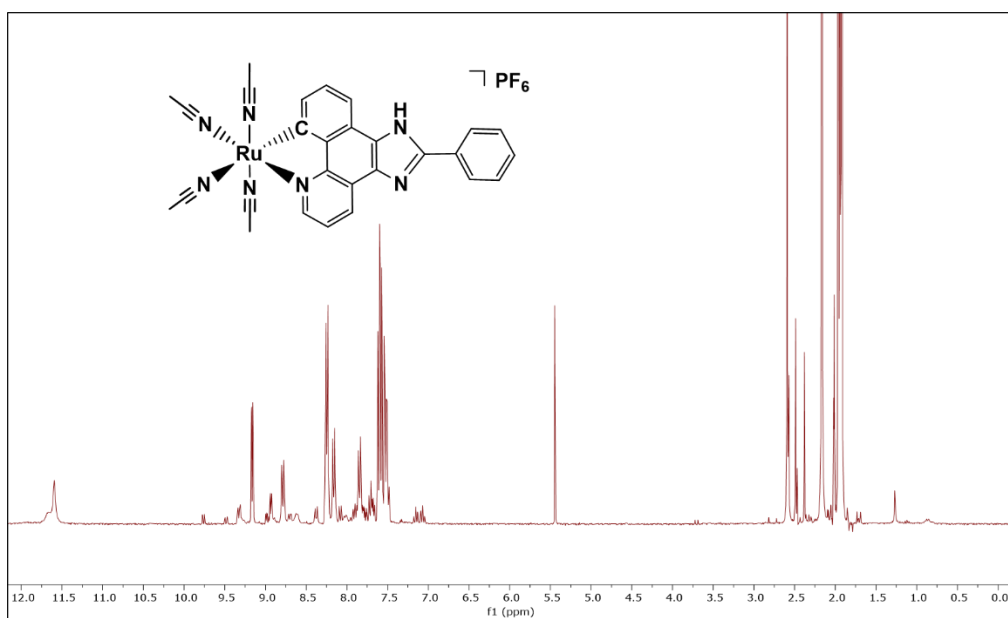
**Figura 5A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **1a**.



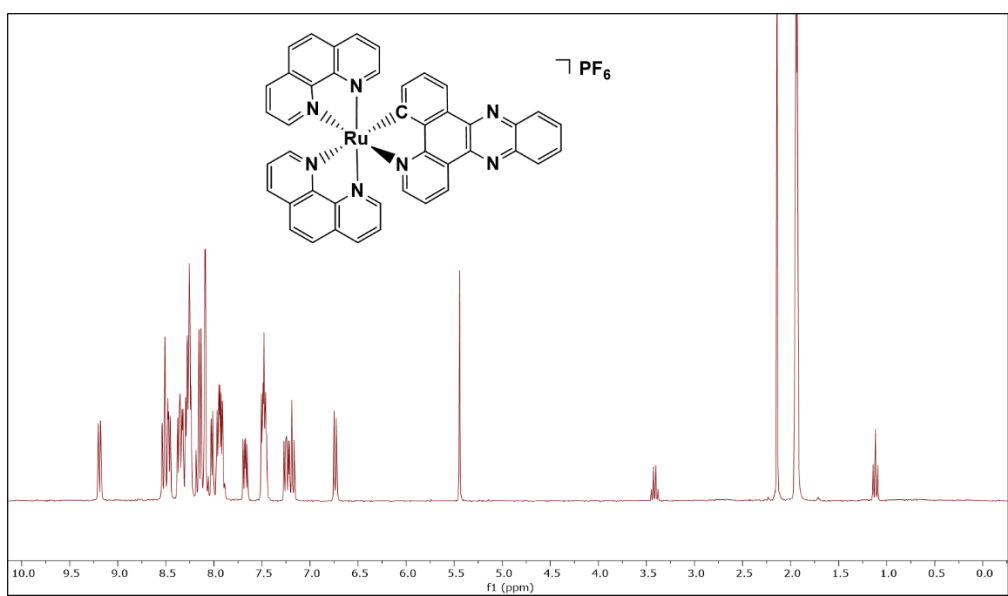
**Figura 6A**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **1b**.



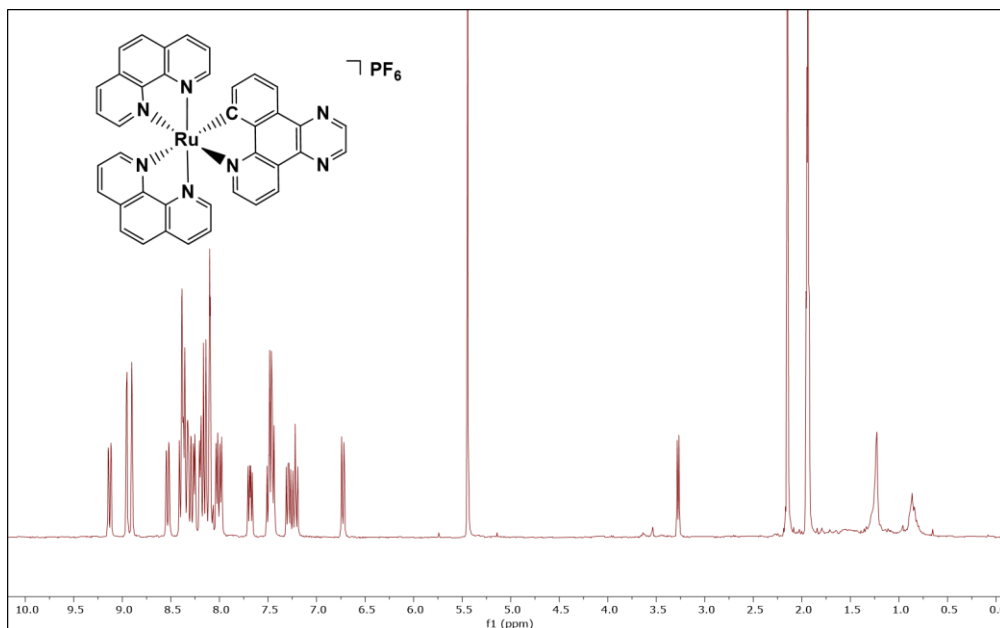
**Figura 7A** Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **1c**.



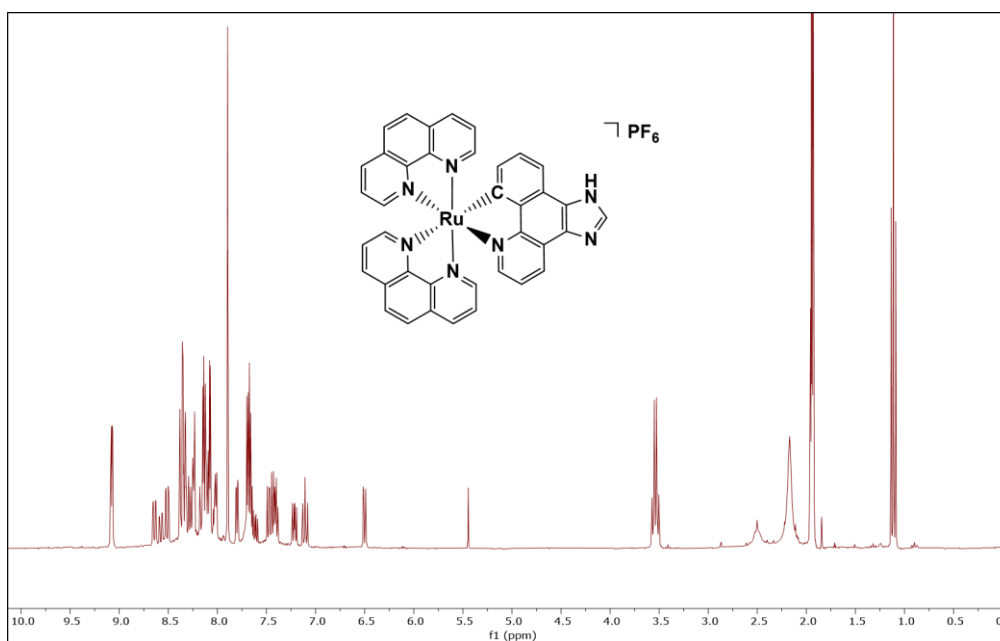
**Figura 8A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **1d**.



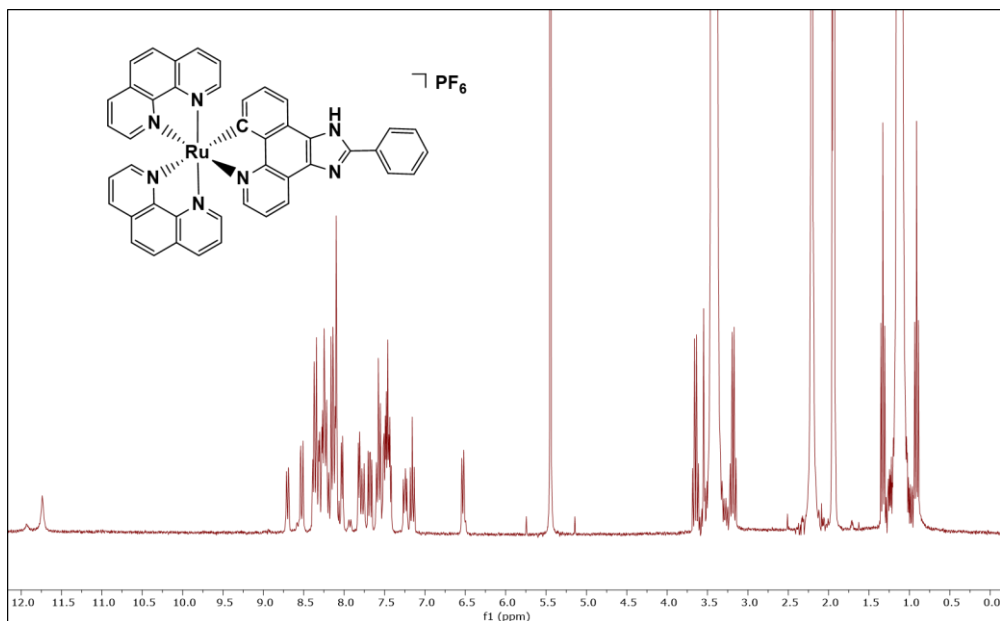
**Figura 9A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **2a**.



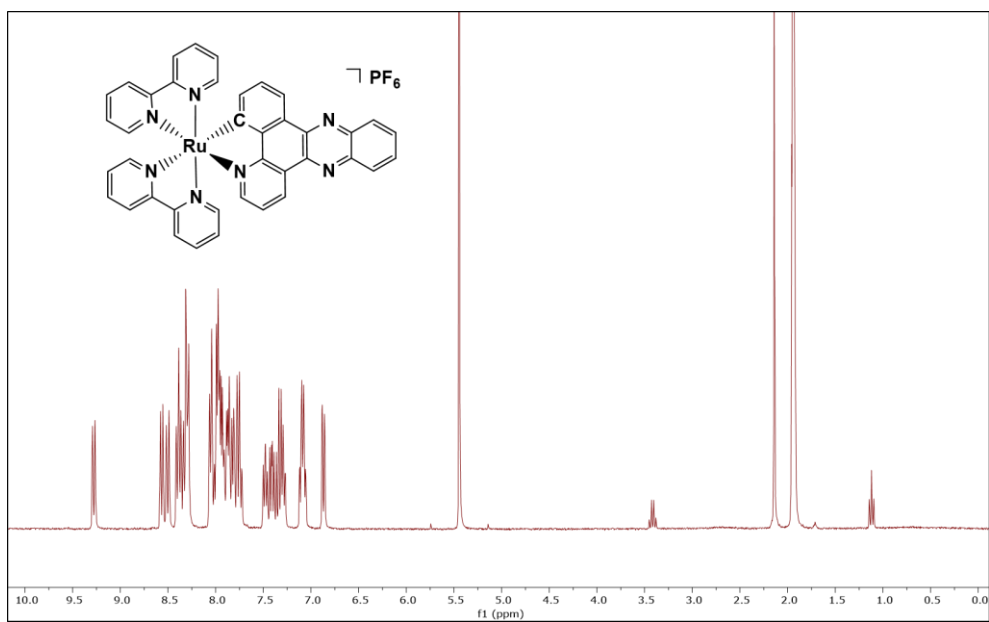
**Figura 10A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **2b**.



**Figura 11A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **2c**.

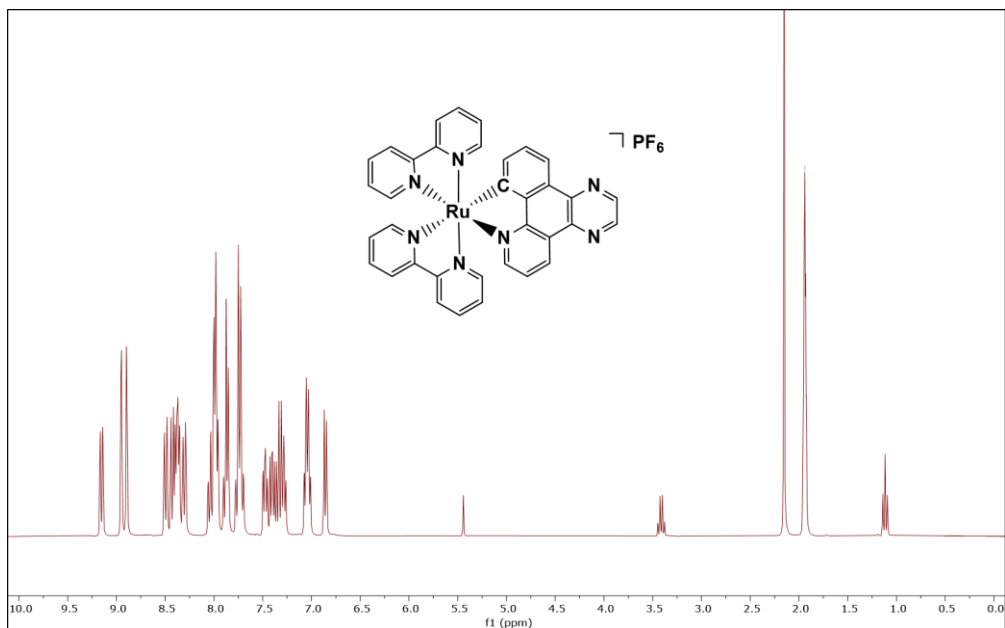


**Figura 12A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **2d**.

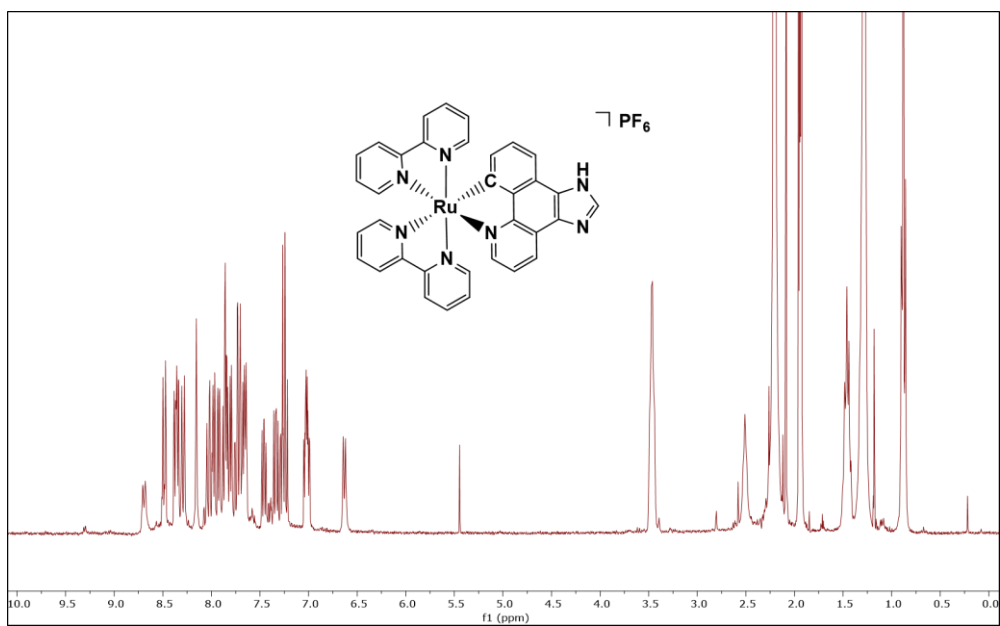


**Figura 13A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **3a**.

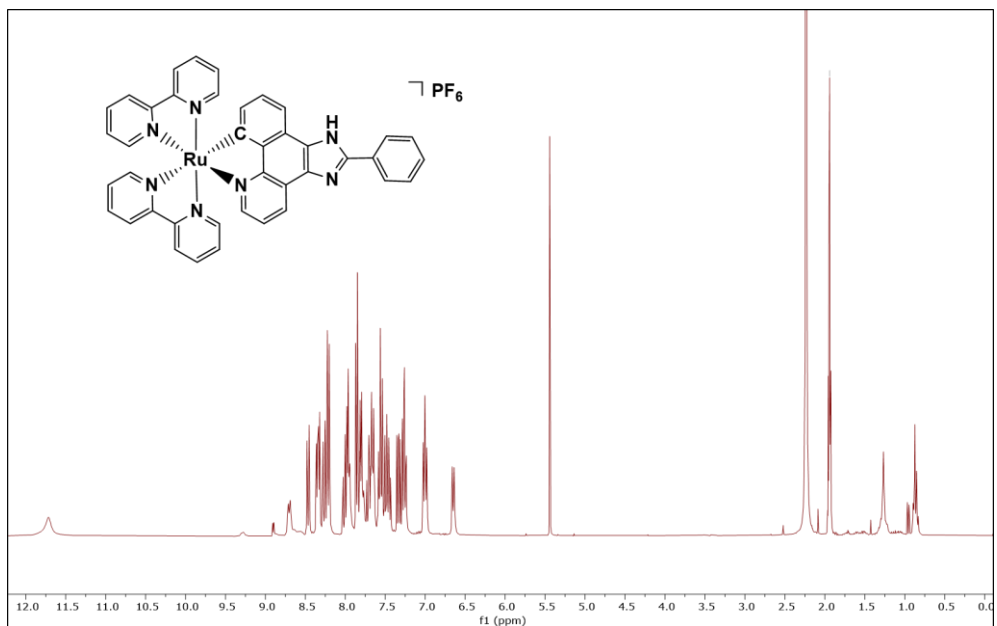




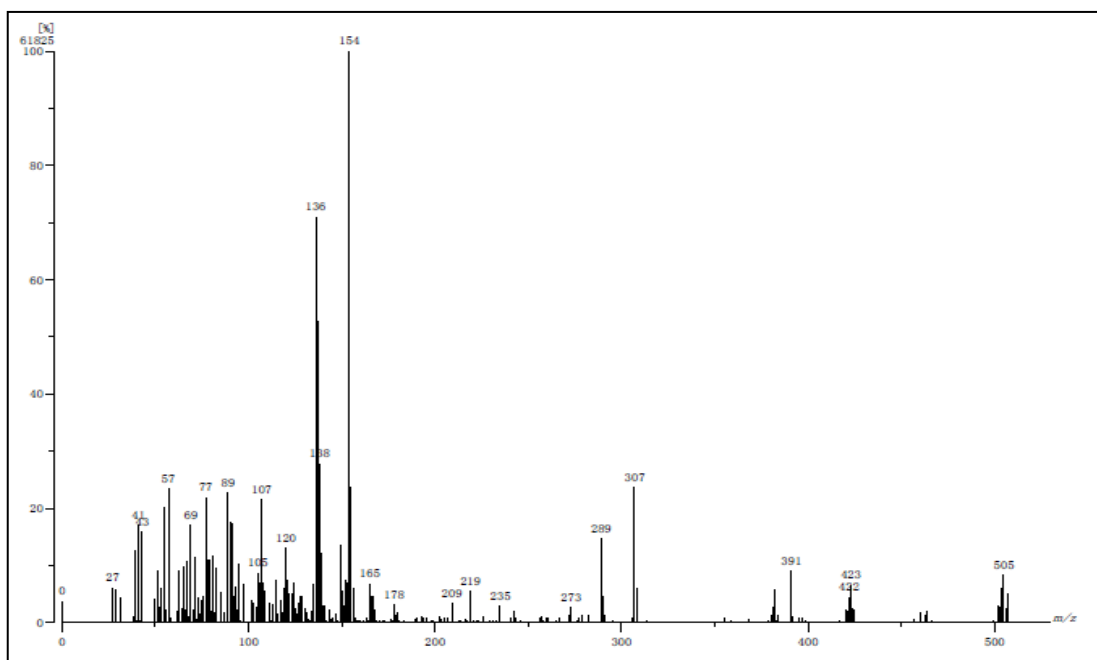
**Figura 14A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **3b**.



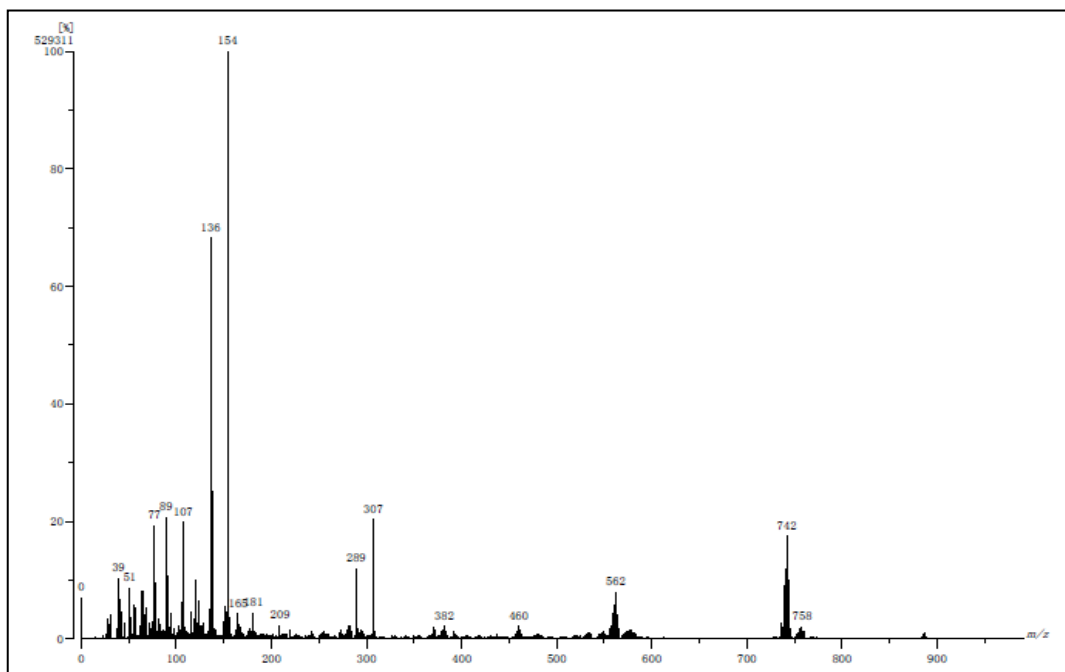
**Figura 15A** Espectro <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) del complejo **3c**.



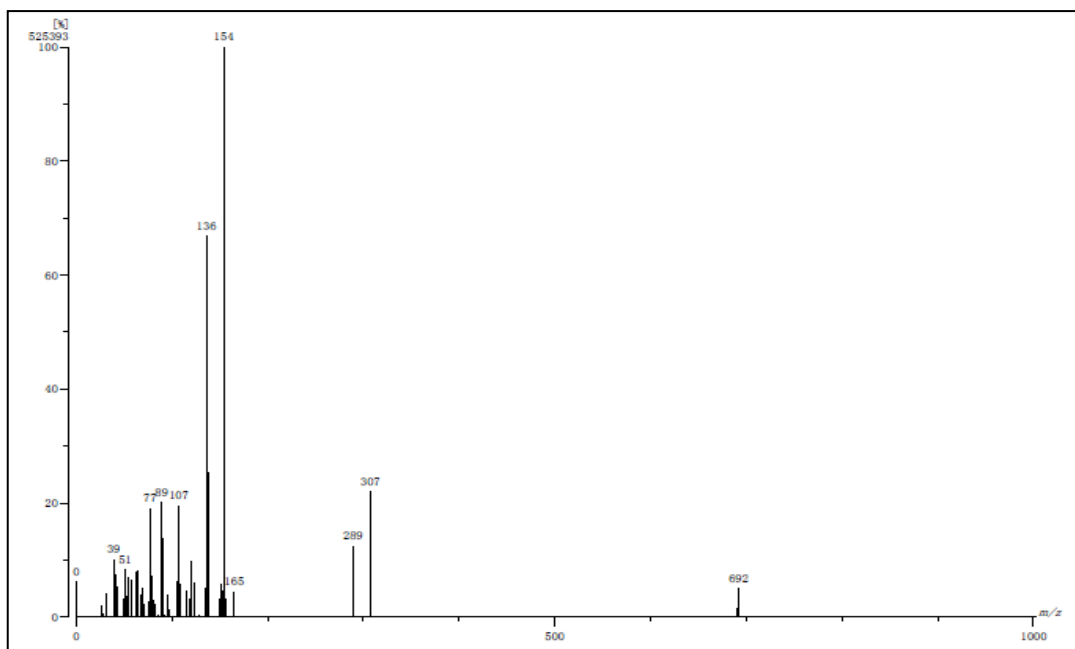
**Figura 16A** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) del complejo **3d**.



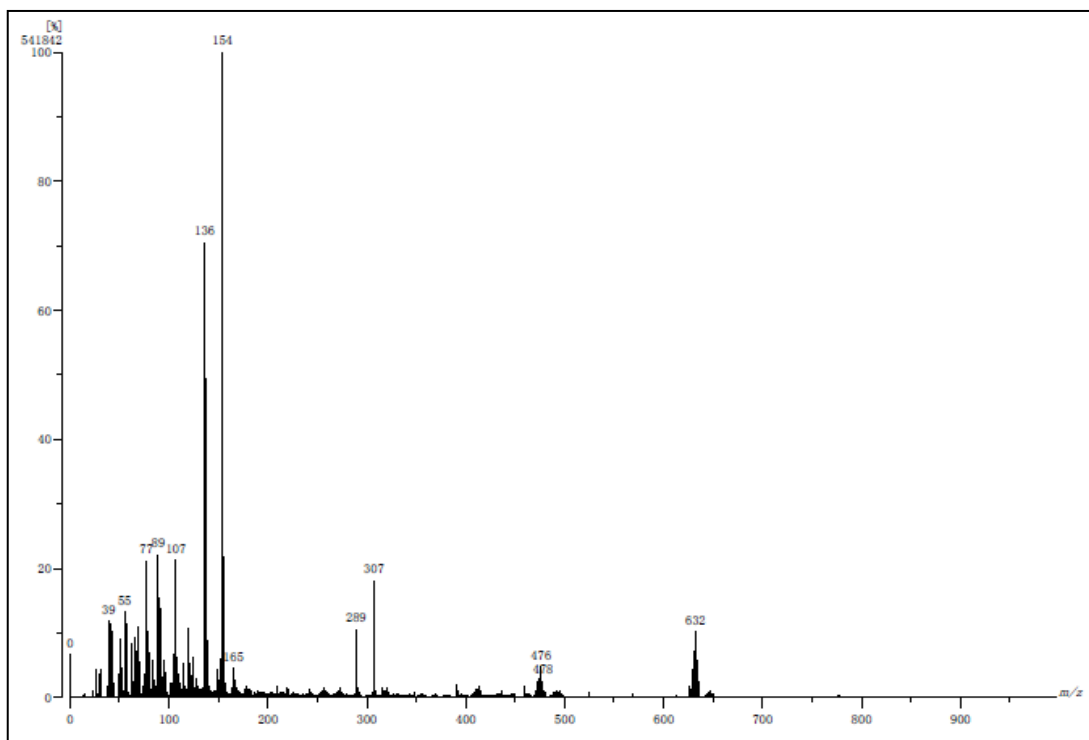
**Figura 17A** Espectro de masas ( $\text{FAB}^+$ ) para el complejo **1a**.



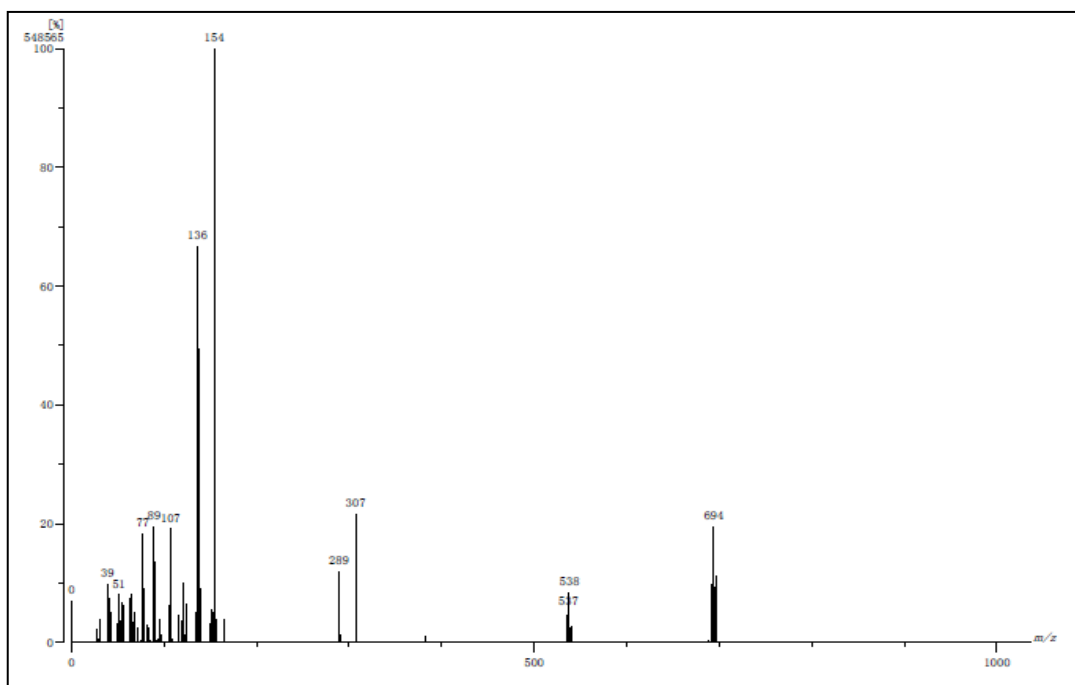
**Figura 18A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **2a**.



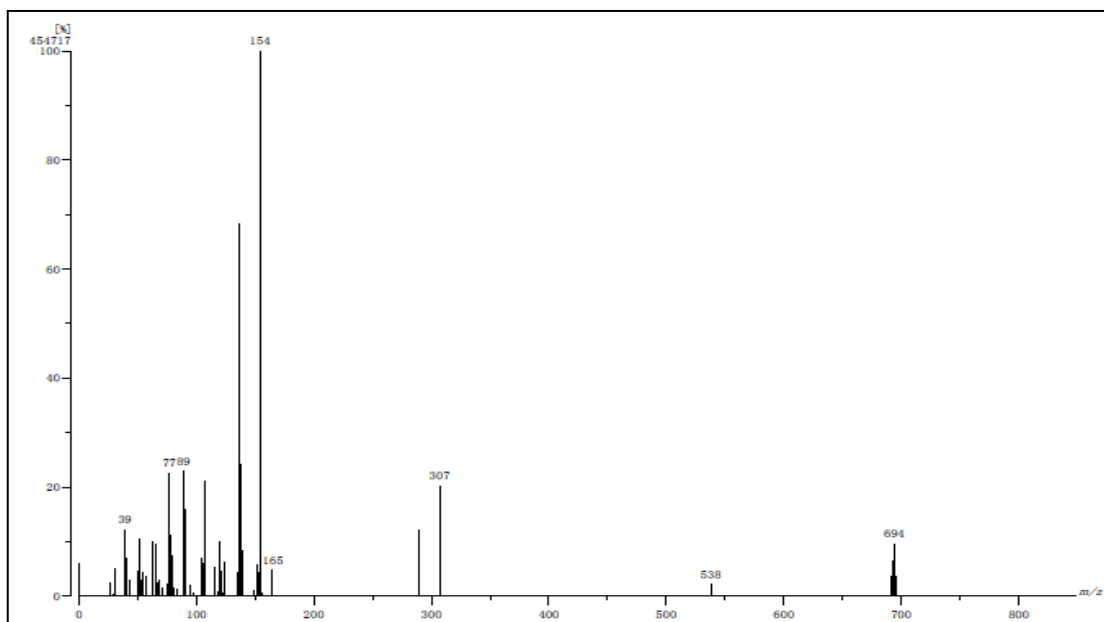
**Figura 19A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **2b**.



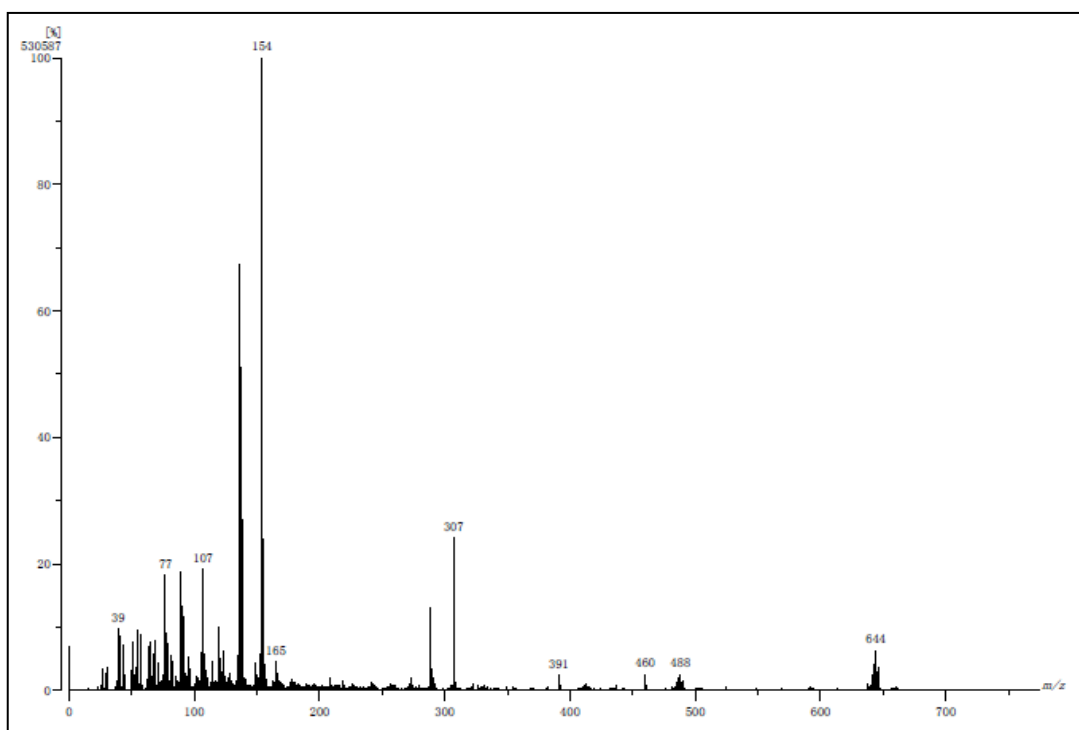
**Figura 20A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **2d**.



**Figura 21A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **3a**.



**Figura 22A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **3b**.



**Figura 23A** Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo **3c**

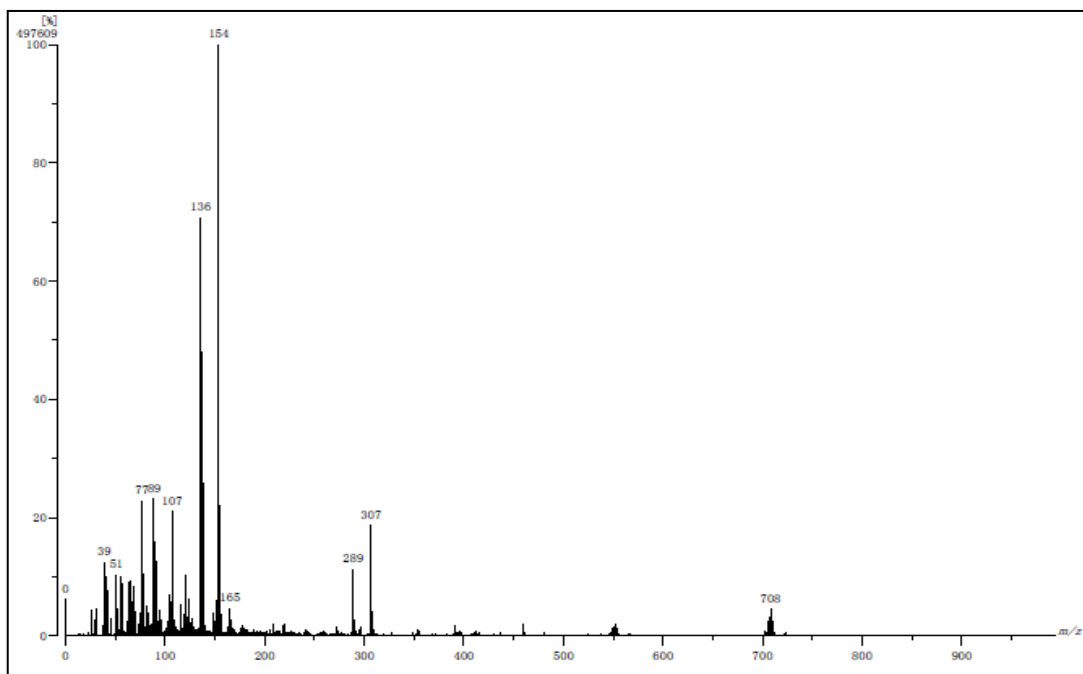


Figura 24A Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo 3d.

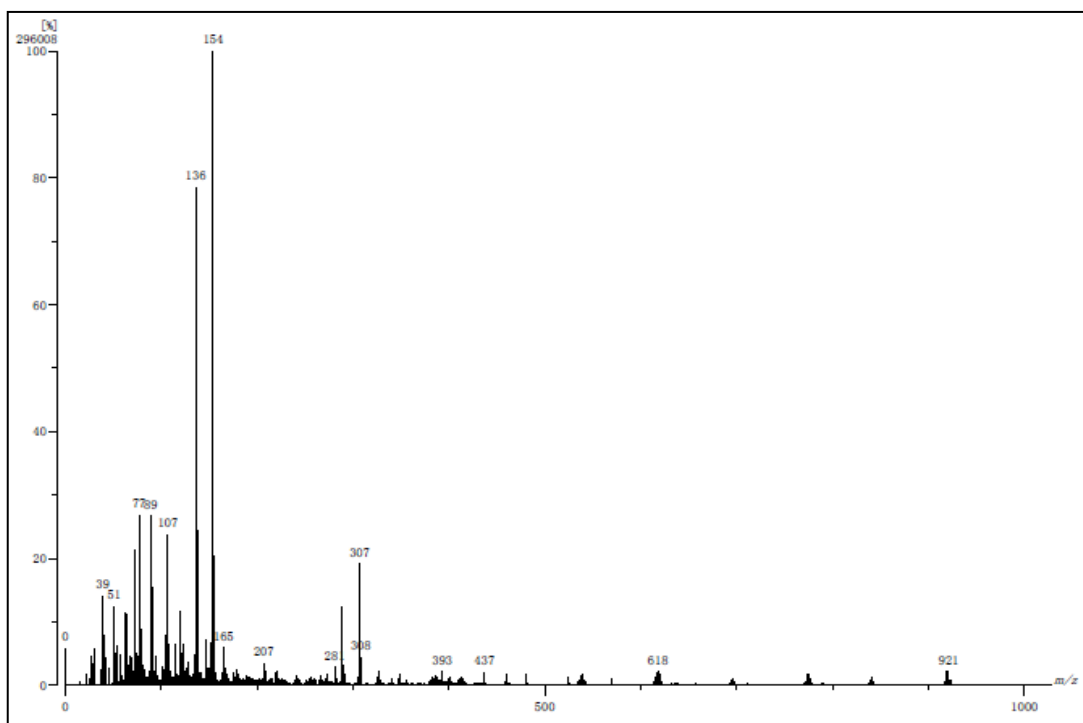
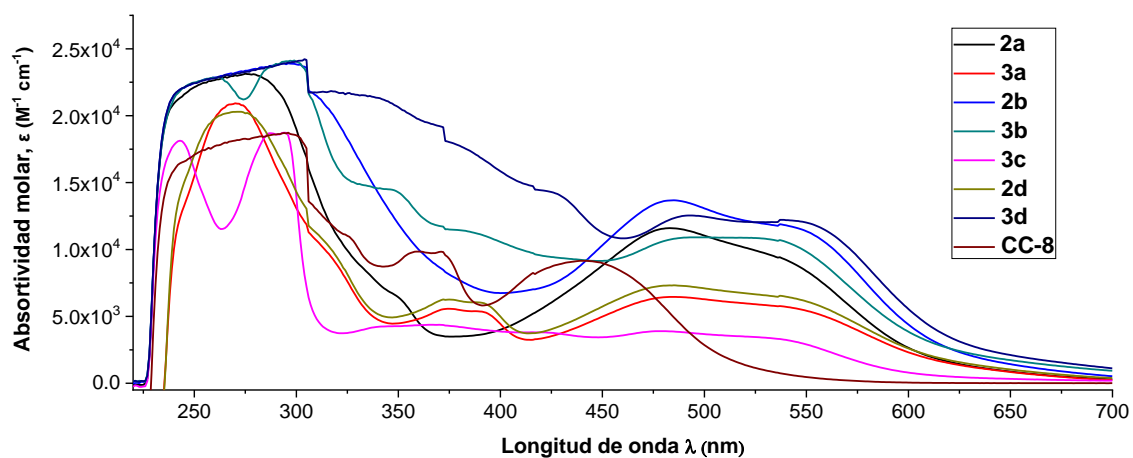


Figura 25A Espectro de masas (FAB<sup>+</sup>) para el complejo CC-8.



**Figura 26A** Espectro de absorción de los complejos de Ru(II) a una concentración de  $10^{-5}$  M en agua con 0.5% de dimetilsulfóxido a 37°C.



## Light activation of cyclometalated ruthenium complexes drives towards caspase 3 dependent apoptosis in gastric cancer cells

Jorge Andrés Solís-Ruiz<sup>a</sup>, Anaïs Barthe<sup>b</sup>, Gilles Riegel<sup>b</sup>, Rafael Omar Saavedra-Díaz<sup>c</sup>, Christian Gaiddon<sup>b,\*</sup>, Ronan Le Lagadec<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Strasbourg Université, Inserm UMR\_S U1113, IRFAC, 3 Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

<sup>c</sup> Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Básicas, Carretera Cunduacán-Jalpa Km. 1, 86690 Cunduacán, Tabasco, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Ruthenium  
Cyclometalation  
Photoactivation  
Gastric cancer  
DNA damage

### ABSTRACT

Polypyridyl ruthenium complexes have been intensively investigated for their remarkable antiproliferative properties and some are currently being tested in clinical trials. Here, we investigated the impact of illumination on the biological properties of a series of new cyclometalated ruthenium compounds with increased  $\pi$ -conjugation. We determined that various of these complexes display a bivalent biological activity as they are highly cytotoxic by themselves in absence of light while their cytotoxicity can significantly be elevated towards an  $IC_{50}$  in the nanomolar range upon illumination. In particular, we showed that these complexes are particularly active ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ) on two gastric cancer cell lines (AGS, KATO III) that are resistant towards cisplatin ( $IC_{50} > 25 \mu M$ ). As expected, light activation leads to increased production of singlet oxygen species *in vitro* and accumulation of reactive oxygen species *in vivo*. Importantly, we established that light exposure shifts the mode of action of the complexes towards activation of a caspase 3-dependent apoptosis that correlates with increased DNA damage. Altogether, this study characterizes novel ruthenium complexes with dual activity that can be tuned towards different mode of action in order to bypass cancer cell resistance mechanisms.

### 1. Introduction

Since the discovery of cisplatin, metal-based drugs turned out to be one of the most active fields in antitumor chemotherapy research. Platinum derivatives exert their cytotoxic properties through the formation of DNA adducts, which activate several signaling transduction pathways leading to cell growth arrest or cell death [1]. However, this poor selectivity is mostly responsible for the severe side effects of platinum drugs, such as neurotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity [2]. Due to their attractive chemical properties, ruthenium (II) and (III) complexes are extensively investigated as potential alternative of platinum drugs. For instance, ruthenium derivatives frequently present octahedral geometry which allows the availability of 6 coordination sites leading to multiple combinations of ligands, along with a slow rate of ligand exchange, compatible with a reasonable stability in biological conditions. Ruthenium complexes also present a broad range of redox potentials permitting interferences with biomacromolecules such as redox enzymes [3,4]. As such, the anticancer properties of numerous ruthenium derivatives bearing a wide variety of ligands have been evaluated *in vitro* and *in vivo* and many displayed promising anticancer

or anti-metastatic activities, especially against cisplatin-resistant tumors, while presenting a general lower toxicity on healthy tissues compared to cisplatin [5–7]. However, the modes of action of most of ruthenium-based compounds remain unclear and probably involve various cellular targets. Getting a better understanding of the functions that metal compounds play on a mechanistic level would benefit the applications of new metal-based therapies into the clinic. For instance, in a recent work, the classification of specified metal-based drugs according to their main mode of action was carried out [8]. For example, it is known that some ruthenium compounds can bind DNA through a different pathway than cisplatin [9–12]. Moreover, the presence of ruthenium allows specific ranges of redox potentials that have been shown to correlate with the cytotoxicity [13,14]. One particular class of ruthenium derivatives, ruthenium(II) polypyridyl complexes, has been exhaustively studied due to their attractive long-lived triplet metal-to-ligand charge transfer (MLCT) excited states and redox properties [15–17]. In recent years, such complexes have also been studied as light-responsive agents in photobiological applications, such as photodynamic therapy (PDT) or photoactivated chemotherapy (PACT) [18–21]. For instance, ruthenium(II) complex TLD-1433 (bearing an

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [gaiddon@unistra.fr](mailto:gaiddon@unistra.fr) (C. Gaiddon), [ronan@unam.mx](mailto:ronan@unam.mx) (R. Le Lagadec).



imidazo[4,5-*f*][1,10]phenanthroline ligand appended to an  $\alpha$ -terthienyl substituent, which acts as a photosensitizer, is currently being tested in phase II clinical trials [22,23]. As for the mechanisms of action, ruthenium(II) polypyridyl complexes with extended aromatic ligands have been shown to interact with DNA through intercalation and electrostatic interactions [19,24–26]. Recent studies indicate that various ruthenium(II) complexes can undergo photoinduced ligand exchange forming covalent bonds with DNA in a manner similar to cisplatin, resulting in cell death [27]. Additionally, studies showed that ruthenium(II) complexes containing 1,10-phenanthroline (phen) ligand can exhibit high cytotoxicity upon irradiation with visible light, while presenting a much lower activity under dark conditions [28]. Our research groups have extensively studied the biological properties of series of ruthenium(II) complexes bearing cyclometalated phenylpyridine (phpy) derivatives, which were found to be able to interact with biomacromolecules and could be used as very efficient mediators for the electron transfer to or from oxidized or reduced active sites of redox enzymes [29–32]. Our ruthenium derived compounds (RDC's) have also displayed very interesting anticancer properties [32–36]. In particular, we demonstrated the importance of the  $\sigma$  ruthenium-carbon bond on the cytotoxic activity. For instance, while cyclometalated  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bipy})_2]\text{Cl}$  ( $\text{bipy} = 2,2'$ -bipyridine) displayed  $\text{IC}_{50}$  values (concentration of drugs inducing 50% of the maximal effect) in the low micromolar ranges for gastric and colon cancer cells (AGS, KATO III, HCT116 and SW480), its coordination analog  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3](\text{Cl})_2$  was almost nontoxic with  $\text{IC}_{50}$  above 200  $\mu\text{M}$  for the same cell lines [14]. Recently, McFarland et al. studied the luminescent properties and cytotoxic activity of a series of 4 ruthenium(II) complexes bearing cyclometalated  $\pi$ -expansive ligands, and they found that the extend of the  $\pi$ -conjugation plays a crucial role. While 3 of the studied complexes were highly cytotoxic on HL-60 cells and SK-MEL-28 cancer cell lines in the dark, only the compound with the largest  $\pi$ -system showed an increased activity after irradiation by visible light [37]. Similar results on SK-MEL-28 cancer cells were observed with complexes bearing cyclometalated  $\pi$ -expansive ligands substituted by  $\alpha$ -oligothiophenes [38]. However, little is known about the mechanism of action of these compounds in the dark and after exposure to light, albeit authors suggested that the DNA aggregating properties of the compounds may be involved. To gain a better understanding of the molecular pathways involved in the cytotoxicity exhibited by cyclometalated ruthenium complexes, we prepared a series of 8 complexes of the type  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{N}\sim\text{N})_2]^+$ , where  $\text{C}\sim\text{N}$  is a  $\pi$ -expansive cyclometalated ligand and  $\text{N}\sim\text{N}$  is either 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine. The biological activity of the complexes has been assessed on two different cell lines from gastric cancer, KATO III and AGS cells. Gastric cancer remains a healthcare issue due to its incidence in the world (third most common) and its aggressiveness [39]. For instance, the survival median is about 10 months and the survival rate at 5 years is below 25%, indicating that more than 75% of the tumors are insensitive or become resistant to the platinum-based chemotherapy commonly used to treat this pathology. This dramatic clinical situation highlights the low response of gastric cancer towards different types of therapies, including targeted therapies and immunotherapies. Hence, finding new therapeutic solutions that would be efficient on gastric cancer is of prime concern.

## 2. Experimental section

### 2.1. Materials and reagents

All reactions were carried out in an inert atmosphere (dinitrogen or argon) using conventional Schlenk glassware, all solvents were dried using established procedures and distilled under dinitrogen before use. All reagents were purchased from Sigma Aldrich and used as received. Commercial  $\text{RuCl}_3$  was purchased from Pressure Chemical Company. Benzo[*h*]quinoline-5,6-dione [40], benzo[*a*]pyrido[3,2-*c*]phenazine (a)

[41], benzo[*f*]pyrido[3,2-*h*]quinoxaline (b) [42],  $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$  [43], and complex CC-8 [44], were prepared according to the literature.

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a JEOL GX300 spectrometer in  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{CD}_3\text{CN}$ . The  $\delta$  scale is used throughout; chemical shifts are in ppm, and the coupling constants are in Hz. Two-dimensional displacement correlated experiments (COSY) were used to assign chemical shifts. Mass spectra ( $\text{FAB}^+$ ) were obtained using a JEOL JMS-SX102A instrument with *m*-nitrobenzyl alcohol as the matrix. Infrared spectra were recorded on an Alpha ATR spectrometer from Bruker. Elemental analyses were obtained on an Exeter Analytical CE-440. Electrochemical measurements were performed on an AUTOLAB PGSTAT 12 potentiostat-galvanostat with PC interface. A three-electrode configuration was used with a BAS working glassy carbon electrode, Ag/AgCl reference electrode and auxiliary Pt electrode. Before each measurement, the working electrode was polished with a diamond paste and rinsed with acetone and distilled water. All potential scans were carried out at a scanning speed of 100  $\text{mVs}^{-1}$  in 3 mM solutions in acetonitrile and 0.1 M of tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate. The UV-vis absorption spectra were carried out in a Shimadzu 2600 UV-vis spectrophotometer in quartz cuvettes.

### 2.2. Synthesis of the ligands

#### 2.2.1. 1*H*-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (c)

A mixture of 522 mg (2.5 mmol) of 7,8-benzoquinoline-5,6-dione, 105 mg (3.5 mmol) of formaldehyde, 3.50 g (50 mmol) of ammonium acetate and 7.0 mL of glacial acetic acid was heated to reflux for 3 h, then left to cool to room temperature. Water (25 mL) was added and 10 mL of saturated aqueous ammonium solution was added dropwise until a yellow precipitate is obtained, which was filtered off and washed with water. The yellow solid was dried under vacuum (460 mg, 84%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  13.58 (s, 1H,  $\text{H}^y$ ), 9.25 (d,  $J = 8.1$ , 1H,  $\text{H}^a$ ), 8.94 (d,  $J = 2.7$ , 1H,  $\text{H}^x$ ), 8.80 (d,  $J = 6.4$ , 1H,  $\text{H}^f$ ), 8.48–8.38 (m, 2H,  $\text{H}^c + \text{H}^g$ ), 7.85–7.62 (m, 3H,  $\text{H}^b + \text{H}^d + \text{H}^e$ ).

#### 2.2.2. 2-phenyl-1*H*-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (d)

A mixture of 522 mg (2.5 mmol) of 7,8-benzoquinoline-5,6-dione, 371 mg (3.5 mmol) of benzaldehyde, 3.85 g (50 mmol) of ammonium acetate and 7 mL of glacial acetic acid, was heated to reflux for 1 h, then left to cool to room temperature. Water (25 mL) was added and 10 mL of saturated aqueous ammonium solution was added dropwise until a yellow precipitate is obtained, which was filtered off and washed with water. The yellow solid was dried under vacuum (590 mg, 80%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  13.61 (s, 1H,  $\text{H}^y$ ), 9.25 (dd,  $J = 13.1$ , 8.0, 1H,  $\text{H}^a$ ), 8.99–8.84 (m, 2H,  $\text{H}^x + \text{H}^f$ ), 8.57 (d,  $J = 7.4$ , 1H,  $\text{H}^c$ ), 8.36–8.26 (m, 2H,  $\text{H}^g + \text{H}^k$ ), 7.90–7.46 (m, 6H,  $\text{H}^b + \text{H}^d + \text{H}^e + \text{H}^h + \text{H}^i + \text{H}^j$ ).

### 2.3. Synthesis of the complexes

#### 2.3.1. $[\text{Ru}(\text{bppz})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$ (1a)

To a suspension of  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$  (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) and  $\text{KPF}_6$  (695 mg, 5 mmol) in 100 mL of acetonitrile was added benzo[*a*]pyrido[2,3-*c*]phenazine (bppzH, a), (422 mg, 1.51 mmol). The mixture was stirred at reflux for 24 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the dark residue was dissolved in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solution was passed through  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , using a 10:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  mixture as eluent. The bright yellow fraction was collected and evaporated to dryness. Crystallization from  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeCN}$  (5:1)/diethylether (slow diffusion) gave orange crystals, which were washed with diethylether and dried under vacuum (354 mg, 68%). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_7\text{PRu}$ : C, 46.96; H, 3.21; N, 14.20. Found: C, 46.62; H, 3.19; N, 13.97. MS ( $\text{FAB}^+$ ):  $m/z$  (%) 505 (10)  $[\text{M}-\text{MeCN}]^+$ , 423 (9)  $[\text{M}-3\text{MeCN}]^+$ , 381 (4)  $[\text{M}-4\text{MeCN}]^+$ . ATR-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ), 2275 (MeCN), 828 ( $\text{PF}_6^-$ ).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$  8.88–8.75 (m, 2H,  $\text{H}^c + \text{H}^f$ ), 8.11 (d,  $J = 8.0$ , 1H,  $\text{H}^a$ ), 7.87–7.75 (m, 3H,  $\text{H}^d + \text{H}^g + \text{H}^j$ ), 7.49–7.38

(m, 2H, H<sup>h</sup> + H<sup>i</sup>), 7.19–7.05 (m, 2H, H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>). <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), 183.27, 161.76, 155.00, 144.33, 142.89, 142.05, 141.85, 140.35, 132.84, 131.30, 131.12, 130.79, 129.79, 129.75, 128.80, 125.48, 124.31, 122.36, 122.11.

### 2.3.2. [Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1b)

To a suspension of [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) and KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) in 100 mL of acetonitrile was added benzo[*f*]pyrido[2,3-*h*]quinoxaline (bpqH, **b**), (347 mg, 1.51 mmol). The mixture was stirred at reflux for 24 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the dark residue was dissolved in 20 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solution was passed through Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, using a 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN mixture as eluent. The bright yellow fraction was collected and concentrated to about 1 mL. Addition of 10 mL of diethyl ether caused precipitation of a yellow solid which was filtered off and dried under vacuum (290 mg, 56%). Recrystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/hexane (slow diffusion) gave yellow crystals, which were washed with hexane and dried under vacuum. Anal. Calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.6C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: C, 46.16; H, 4.14; N, 14.16. Found: C, 46.51; H, 3.68; N, 14.01. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2275 (MeCN), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.27 (d, *J* = 5.3, 1H, H<sup>c</sup>), 9.20 (d, *J* = 8.1, 1H, H<sup>a</sup>), 8.94 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>f</sup>), 8.88 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>d</sup>), 8.46 (d, *J* = 7.9, 1H, H<sup>g</sup>), 8.30 (d, *J* = 7.2, 1H, H<sup>h</sup>), 7.64–7.53 (m, 2H, H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>).

### 2.3.3. [Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1c)

To a suspension of [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) and KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) in 100 mL of acetonitrile was added 1H-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (biqH, **c**), (330 mg, 1.51 mmol). The mixture was stirred at reflux for 24 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the dark residue was dissolved in 20 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solution was filtered through Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, using a 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN mixture as eluent. The bright yellow fraction was collected and concentrated to about 1 mL. Addition of 10 mL of diethyl ether caused precipitation of a yellow solid which was filtered off and dried under vacuum (247 mg, 52%). Recrystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/hexane (slow diffusion) gave yellow crystals, which were washed with hexane and dried under vacuum. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.5C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>·0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 42.89; H, 3.95; N, 13.73. Found: C, 43.27; H, 3.45; N, 13.49. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2275 (MeCN), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.32 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 9.08 (d, *J* = 5.4, 1H, H<sup>a</sup>), 8.64 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 8.11–8.03 (m, 2H, H<sup>c</sup> + H<sup>f</sup>), 7.53–7.40 (m, 3H, H<sup>b</sup> + H<sup>d</sup> + H<sup>e</sup>).

### 2.3.4. [Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (1d)

To a suspension of [(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (378 mg, 0.75 mmol), NaOH (75 mg, 2.5 mmol) and KPF<sub>6</sub> (695 mg, 5 mmol) in 100 mL of acetonitrile was added 2-phenyl-1H-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (pbiqH, **d**), (447 mg, 1.51 mmol). The mixture was stirred at reflux for 24 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the dark residue was dissolved in 20 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solution was filtered through Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, using a 10:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN mixture as eluent. The bright yellow fraction was collected and concentrated to about 1 mL. Addition of 10 mL of diethyl ether caused precipitation of a yellow solid which was filtered off and dried under vacuum (436 mg, 82%). Recrystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/hexane (slow diffusion) gave yellow crystals, which were washed with hexane and dried under vacuum. Anal. Calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.45C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: C, 49.60; H, 4.11; N, 13.19. Found: C, 50.03; H, 3.69; N, 13.64. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 2274 (MeCN), 826 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 12.47 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 9.10 (d, *J* = 5.0, 1H, H<sup>a</sup>), 8.75 (d, *J* = 7.5, 1H, H<sup>c</sup>), 8.35 (m, 2H, H<sup>g</sup> + H<sup>k</sup>), 8.08 (t, 2H, H<sup>h</sup> + H<sup>j</sup>), 7.57–7.39 (m, 5H, H<sup>b</sup> + H<sup>f</sup> + H<sup>d</sup> + H<sup>e</sup> + H<sup>i</sup>).

### 2.3.5. [Ru(bppz)(phen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2a)

A mixture of 150 mg (0.22 mmol) of [Ru(bppz)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1a**) and 100 mg (0.55 mmol) of 1,10-phenanthroline in 100 mL of ethanol was heated to reflux for 24 h. The resulting precipitate was vacuum

filtered and purified by silica gel column chromatography using a 95/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH mixture as eluent. After evaporation of the solvent a purple solid was obtained. Crystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/diethylether (slow diffusion) gave dark purple crystals, which were washed with diethylether and dried under vacuum (160 mg, 82%). Anal. Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 56.23; H, 2.93; N, 10.55. Found: C, 56.48; H, 2.83; N 10.14. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 742 (19) [M]<sup>+</sup>, 562 (10) [M-phen]<sup>+</sup>, 382 (4) [M - 2 phen]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.19 (d, *J* = 7.6, 1H, H<sup>c</sup>), 8.55–8.44 (m, 3H, H<sup>f</sup> + phen), 8.39–8.31 (m, 2H, phen), 8.30–8.22 (m, 5H, phen + H<sup>g</sup> + H<sup>j</sup>), 8.19–8.06 (m, 4H, phen + H<sup>i</sup> + H<sup>h</sup>), 8.02 (d, *J* = 5.3, 1H, H<sup>b</sup>), 7.98–7.89 (m, 3H, phen), 7.61–7.64 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.52–7.45 (m, 3H, phen), 7.28–7.16 (m, 2H, phen + H<sup>e</sup>), 6.74 (d, *J* = 7.2, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.6. [Ru(bpq)(phen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2b)

Following the method used for **2a**, starting from 68.5 mg (0.1 mmol) of [Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1b**) and 45 mg (0.25 mmol) of 1,10-phenanthroline, purple crystals were obtained (68.7 mg, 78%). Anal. Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 55.99; H, 2.89; N, 11.15. Found: C, 56.02; H, 3.09; N, 10.78. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 692 (8) [M]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.13 (dd, *J* = 8.1, 1.4, 1H, H<sup>c</sup>), 8.96 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>g</sup>), 8.9 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>h</sup>), 8.53 (dd, *J* = 8.2, 1.3, 1H, H<sup>f</sup>), 8.43–8.29 (m, 5H, phen), 8.28–8.24 (m, 1H, phen), 8.22–8.08 (m, 5H, H<sup>a</sup> + phen) 8.05–7.97. (m, 2H, phen) 7.71–7.65 (m, 1H, phen), 7.53–7.43 (m, 3H, phen), 7.32–7.26 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.22 (t, *J* = 7.6, 1H, H<sup>e</sup>), 6.73 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.7. [Ru(biq)(phen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2c)

Following the method used for **2a**, starting from 62.8 mg (0.1 mmol) of [Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1c**) and 45 mg (0.25 mmol) of 1,10-phenanthroline, a purple solid was obtained. Crystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/hexane (slow diffusion) gave dark purple crystals, which were washed with diethylether and dried under vacuum (47.9 mg, 58%). Anal. Calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.7C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: C, 57.27; H, 3.85; N, 11.08. Found: C, 57.71; H, 3.42; N, 11.07. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 692 (8) [M]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.90 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 9.08 (dd, *J* = 4.3, 1.8, 1H, H<sup>c</sup>), 8.67–8.49 (m, 2H, phen), 8.38 (d, *J* = 1.8, 1H, H<sup>f</sup>), 8.36–8.31 (m, 3H, H<sup>g</sup> + phen), 8.16–8.06 (m, 5H, phen), 8.05–8.00 (m, 2H, phen), 7.90 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 7.80 (dd, *J* = 5.3, 1.4, 1H, phen) 7.72–7.63 (m, 2H, phen), 7.51–7.38 (m, 3H, phen), 7.24–7.18 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.11 (t, *J* = 8.7, 1H, H<sup>e</sup>), 6.50 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.8. [Ru(pbiq)(phen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2d)

Following the method used for **2a**, starting from 246 mg (0.35 mmol) of [Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1d**) and 157 mg (0.87 mmol) of 1,10-phenanthroline, purple crystals were obtained (258 mg, 82%). Anal. Calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 57.64; H, 3.10; N, 9.97. Found: C, 57.47; H, 2.87; N 9.78. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 742 (19) [M]<sup>+</sup>, 562 (10) [M-phen]<sup>+</sup>, 382 (4) [M - 2 phen]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.73 (s, 1H, H<sup>y</sup>), 8.70 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.53 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.40–8.29 (m, 3H, phen), 8.28–8.19 (m, 4H, H<sup>a</sup> + phen), 8.17–8.08 (m, 5H, phen), 8.03 (d, *J* = 5.3, 1H, phen), 7.83–7.74 (m, 2H, H<sup>g</sup> + H<sup>k</sup>), 7.68 (dd, *J* = 8.2, 5.0, 1H, H<sup>i</sup>), 7.62–7.54 (m, 2H, H<sup>h</sup> + H<sup>j</sup>), 7.53–7.41 (m, 4H, phen), 7.28–7.21 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.16 (t, *J* = 7.5, 1H, H<sup>e</sup>), 6.53 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.9. [Ru(bppz)(bipy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (3a)

Following the method used for **2a**, starting from 124 mg (0.18 mmol) of [Ru(bppz)(MeCN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub> (**1a**) and 70 mg (0.45 mmol) of 2,2'-bipyridine, a purple solid was obtained. Crystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeCN (5:1)/hexane (slow diffusion) gave dark purple crystals, which were washed with diethylether and dried under vacuum (126 mg, 84%). Anal. Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 53.84; H, 2.93; N 11.13. Found: C, 54.14; H, 2.98; N, 10.97. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%)

694 (21) [M]<sup>+</sup>, 538 (17) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.28, (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.57 (d, *J* = 7.8, 1H, H<sup>f</sup>), 8.50 (d, *J* = 8.2, 1H, bipy), 8.43–8.35 (m, 2H, bipy), 8.34–8.27 (m, 3H, bipy + H<sup>g</sup> + H<sup>i</sup>), 8.08–8.02 (m, 2H, bipy), 8.00–7.90 (m, 4H, bipy + H<sup>g</sup> + H<sup>h</sup> + H<sup>i</sup>), 7.13–7.05 (m, 2H, bipy, H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 6.87 (d, *J* = 7.2, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.10. [Ru(bpq)(bipy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (3b)

Following the method used for **2a**, starting from 240 mg (0.35 mmol) of [Ru(bpq)(MeCN)<sub>4</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (**1b**) and 136 mg (0.87 mmol) of 2,2'-bipyridine, purple crystals were obtained (198 mg, 72%). Anal. Calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 53.30; H, 3.07; N, 11.43. Found: C, 53.37; H, 2.99; N, 11.63. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 644 (4) [M]<sup>+</sup>, 488 (2) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 9.16, (dd, *J* = 8.1, 1.4, 1H, H<sup>c</sup>), 8.96 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>g</sup>), 8.90 (d, *J* = 2.1, 1H, H<sup>h</sup>), 8.52–8.29 (m, 5H bipy + H<sup>f</sup>), 8.08–7.95 (m, 4H, bipy + H<sup>a</sup>), 7.92–7.85 (m, 2H, bipy), 7.79–7.69 (m, 3H, bipy), 7.51–7.45 (m, 1H, bipy), 7.44–7.26 (m, 3H, bipy + H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 7.10–7.00 (m, 2H, bipy), 6.86 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.11. [Ru(biq)(bipy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (3c)

Following the method used for **2a**, starting from 220 mg (0.35 mmol) of [Ru(biq)(MeCN)<sub>4</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (**1c**) and 136 mg (0.87 mmol) of 2,2'-bipyridine, purple crystals were obtained (141 mg, 52%). Anal. Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu·0.5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 50.59; H, 3.08; N, 11.97. Found: C, 50.41; H, 3.45; N, 11.70. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 632 (17) [M]<sup>+</sup>, 476 (8) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.45, (s, 1H, H<sup>c</sup>), 8.43 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.22 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.13–8.07 (m, 2H, bipy), 8.03 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>a</sup>), 7.89 (s, 1H, H<sup>g</sup>), 7.69–7.64 (m, 3H, bipy), 7.63–7.52 (m, 3H, bipy), 7.50–7.36 (m, 4H, bipy), 7.22–7.16 (m, 1H, bipy), 7.10–7.04 (m, 1H, H<sup>b</sup>), 7.03–7.94, (m, 2H, bipy + H<sup>e</sup>), 6.78–6.72 (m, 2H, bipy), 6.37 (d, *J* = 7.18, 1H, H<sup>d</sup>).

### 2.3.12. [Ru(pbiq)(bipy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (3d)

Following the method used for **2a**, starting from 246 mg (0.35 mmol) of [Ru(pbiq)(MeCN)<sub>4</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (**1d**) and 136 mg (0.87 mmol) of 2,2'-bipyridine purple crystals were obtained (215 mg, 72%). Anal. Calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>28</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>PRu: C, 56.34; H, 3.31; N, 10.46. Found: C, 56.26; H, 3.21; N, 10.09. MS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* (%) 708 (9) [M]<sup>+</sup>, 552 (5) [M-bipy]<sup>+</sup>. ATR-IR (cm<sup>-1</sup>), 828 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN), δ 11.72, (s, 1H, H<sup>c</sup>), 8.70 (d, *J* = 8.0, 1H, H<sup>c</sup>), 8.47 (d, *J* = 8.2, 1H, H<sup>f</sup>), 8.37–8.31 (m, 2H, bipy), 8.29–8.19 (m, 3H, bipy + H<sup>a</sup>), 8.04–7.92 (m, 3H, bipy), 7.88–7.76 (m, 4H, bipy + H<sup>g</sup> + H<sup>h</sup>), 7.73–7.62 (m, 3H, bipy + H<sup>i</sup>), 7.60–7.43 (m, 4H, bipy + H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 7.36–7.23 (m, 3H, bipy + H<sup>b</sup> + H<sup>e</sup>), 7.04–6.98 (m, 2H, bipy), 6.65 (d, *J* = 7.1, 1H, H<sup>d</sup>).

## 2.4. Crystallography

Crystalline brown prisms for **1a** and crystalline black prisms for **3a** and **2b** were grown independently from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/diethyl ether (**1a**, **2b**) or CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane (**3a**) and mounted on glass fibers. The X-ray intensity data were measured at 150 K for **3a**, 298 K for **2b** and at 296 K for **1a** on a Bruker SMART APEX CCD-based X-ray diffractometer system equipped with a Mo-target X-ray tube (λ = 0.71073 Å). The detector was placed at a distance of 5.0 cm from the crystals in all cases. A total of 1800 frames were collected with a scan width of 0.3 in ω and an exposure time of 10 s/frame. The frames were integrated with the Bruker SAINT Software package using a narrow-frame integration algorithm. The integration of the data was done using a monoclinic unit cell for **1a** and **2b** and a orthorhombic unit cell for **3a**, to yield a total of 38,499 for **1a**, 27,820 for **3a**, and 51,597 for **2b** reflections to a maximum 2θ angle of 50.00, of which 5168 [R(int) = 0.0783], 7122 [R(int) = 0.0974], 6627 [R(int) = 0.0931], for **1a**, **3a** and **2b**, respectively, were independent. The structures were solved by Patterson method and refined by full matrix least-square procedures on F<sup>2</sup>. The

remaining atoms were located via a few cycles of least squares refinements and difference Fourier maps. Hydrogen atoms were input at calculated positions and allowed to ride on the atoms to which they are attached. Thermal parameters were refined for hydrogen atoms on the aromatic groups using a Ueq = 1.2 Å to precedent atom in all cases. For all complexes, the final cycle of refinement was carried out on all non-zero data using SHELXL-2014/7 [45]. The PF<sub>6</sub><sup>-</sup> anion is disordered and was refined in two major contributors and refined anisotropically.

## 2.5. UV-vis spectrometry

The stability studies were performed using a Shimadzu 2600 UV-vis spectrophotometer in 1 cm × 1 cm quartz cuvettes at 37 °C with 1 × 10<sup>-5</sup> M solutions of each sample in 1,2-dichloroethane, (prepared from 20 mM stock solution). Spectra were recorded every 2 h for 48 h.

## 2.6. EPR studies

Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR) determinations were carried out in an EPR spectrometer (Jeol JES-TE300), operated in the X-Band mode at a modulation frequency of 100 KHz, with a cylindrical cavity (TE<sub>011</sub> mode). The individual samples were placed in a quartz flat cell (synthetic quartz, Wilmad Glass Company) with a path length of 0.2 mm. The external calibration of the magnetic field was carried out using a JEOL ES-FC5 precision gaussmeter. The acquisition and manipulation of spectra were performed using the ESI-PRIT/TE program.

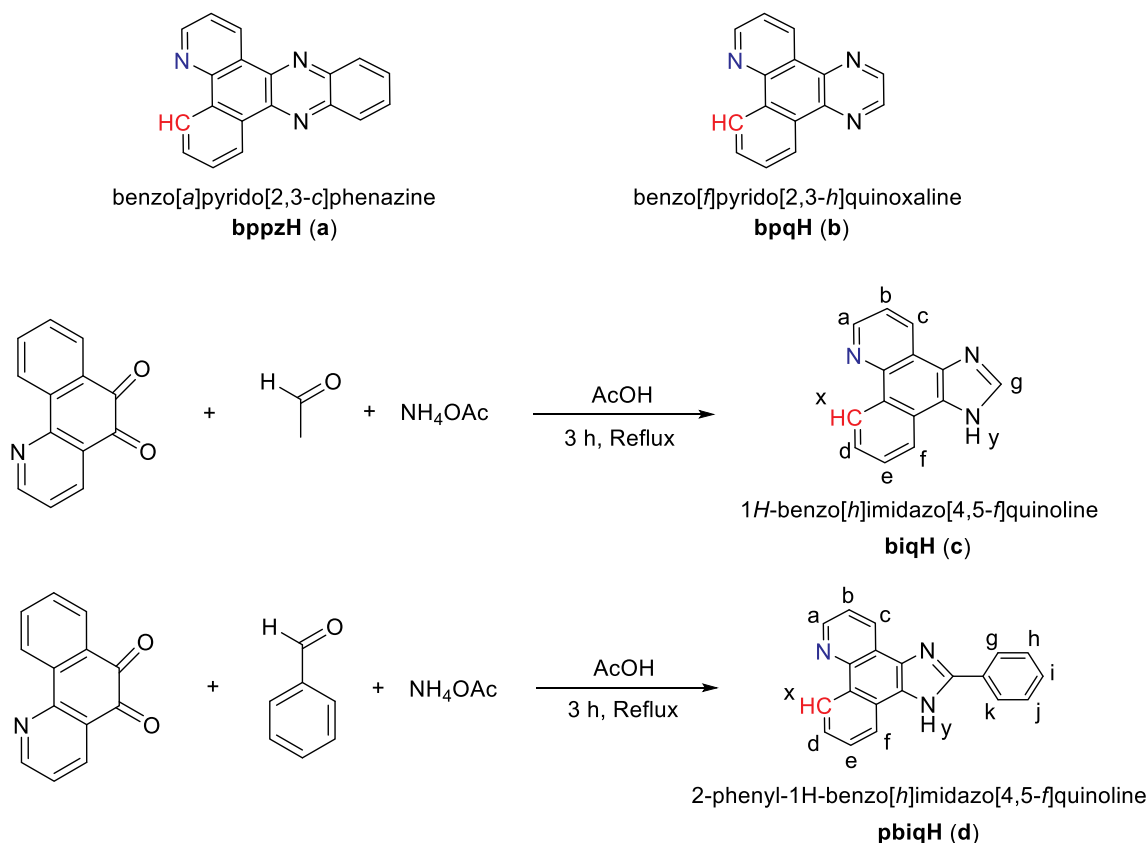
The detection of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> is based on the specific reaction between <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and 2,2,6,6-tetramethyl piperidine (TEMP) that yields a stable radical adduct (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO). The detection of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was carried out according to the following procedure. Samples of ruthenium compounds (1 × 10<sup>-3</sup> M) and TEMP (4 × 10<sup>-3</sup> M) in an air-equilibrated ethanol solution at room temperature were irradiated for up to 30 min with visible light (LED lamp 0.75 A, 3 W), generating a TEMPO signal that indicated the photoproduction of <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. The EPR parameters were as follows: center field, 334.5 ± 4 mT; microwave frequency, 9.43 GHz; modulation width, 5.0 × 1 mT; time constant, 0.1 s; amplitude, 10.0 × 1. In each case, the EPR parameters were held constant, as was the concentration of TEMP; the samples were irradiated directly within the EPR cavity. To determine the ability of the ruthenium compound **2b**, to produce O<sub>2</sub><sup>-</sup>. 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), was used as spin-trap. The experimental conditions were similar to those used in <sup>1</sup>O<sub>2</sub> photoproduction.

## 2.7. Lipophilicity measurements

The lipophilicity of each complex was determined experimentally with the partition coefficient (Log P<sub>o/w</sub>). The method used was the “shake flask” [46], in which a buffer of phosphates 0.01 M at pH 7.00 is used as an aqueous phase and 1-octanol as an organic phase. A 1 × 10<sup>-5</sup> M solution of the complex is prepared in octanol, then mixed with the aqueous phase in a one to one ratio for 5 min, stirring vigorously in a magnetic stirring plate. The mixture is left for a period of 6 h to achieve a good separation of the phases. Concentration of the complex in both phases is then calculated by UV-vis spectroscopy. Each measurement was repeated 3 times.

## 2.8. Cell lines and tissue culture

The human gastric adenocarcinoma AGS, and human gastric carcinoma KATO III were acquired from ATCC® (Manassa, VA). AGS cells were cultured in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. KATO III cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 20% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All cell lines were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.



**Scheme 1.** Ligands used in this study and numbering used for  $^1\text{H}$  NMR assignments.

Experiments were performed on cells within 20 passages.

### 2.9. Inhibition of cell viability assay

The anti-proliferation activities on cancer cells were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were seeded at 10,000 cells per well (100  $\mu\text{L}$ ) in Cellstar<sup>®</sup> 96-well plates (Greiner Bio-One) and incubated for 24 h. Thereafter, cancer cells were exposed to drugs at different concentration for 48 h. To obtain the different concentrations of the ruthenium compounds (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 7.5, 15.0, 30.0 and 50.0  $\mu\text{M}$ ), a 50 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) was first prepared, from which aliquots were taken to prepare each solution of different concentration, using RPMI 1640 containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The concentration of DMSO decreased from 1% in the 50  $\mu\text{M}$  sample to 0.002% in the 0.1  $\mu\text{M}$  sample. Cisplatin was obtained as a stock solution (3.3 mM) prepared in water. In the case of treatment with visible light, the cells were irradiated with a 3 watts LED lamp ( $\lambda_e = 590 \text{ nm}$ , light dose =  $20.3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) during 60 min. The distance between the lamp and the 96-well plate was 20 cm and the temperature during irradiation was kept constant at 37  $^\circ\text{C}$ . To evaluate the impact of light on cells, all experiments included untreated cells that were exposed to light under the same condition. Subsequently, the 96-well plates were incubated for 47 h together with those that were not treated with light. Then the MTT assay was performed as previously described [47]. Inhibition of cell viability was evaluated with reference to the  $\text{IC}_{50}$  value, which is defined as the concentration needed for a 50% reduction of survival based on the survival curves.  $\text{IC}_{50}$  values were calculated from the dose-response curves (cell viability vs. drug concentration). The experiments were performed in 8 replicates for each drug concentration and were carried out at least three times independently.

### 2.10. DNA interactions

The DNA interactions of the ruthenium compounds were assessed according to a general plasmid DNA gel mobility shift assay with 20  $\mu\text{L}$  total sample volumes in 0.5 mL microfuge tubes. Transformed pUC19 plasmid (2.2  $\mu\text{L}$ , 95% form I) was added to 10  $\mu\text{L}$  of 10 mM Tris-HCl buffer supplemented with 100 mM NaCl (pH 7.5). The dilutions of the Ru compounds were prepared in doubly distilled water ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) and added in 5- $\mu\text{L}$  aliquots to the appropriate tubes to yield final Ru concentrations of 100  $\mu\text{M}$ . Then,  $\text{ddH}_2\text{O}$  was added to bring the final assay volumes to 20  $\mu\text{L}$  (2.8  $\mu\text{L}$ ). Control samples with no metal complex received 7.8  $\mu\text{L}$  of water. Sample tubes were kept at 37  $^\circ\text{C}$  in the dark or irradiated. Light treatments employed visible light during 1 h with lamp (LED 0.75 A, 3 W). After treatment, all samples (dark and light) were quenched by the addition of 4  $\mu\text{L}$  of gel loading buffer (0.025% bromophenol blue, 40% glycerol). Samples (11.8  $\mu\text{L}$ ) were loaded onto 1% agarose gels cast with  $1 \times \text{TAE}$  (Tris-acetate-EDTA) buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.2) and electrophoresed in  $1 \times \text{TAE}$  at  $8 \text{ V cm}^{-1}$  for 30 min. The gels were stained with  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ethidium bromide (in  $1 \times \text{TAE}$ ) for 45 min. The bands were visualized using the Gel Doc-It Imaging system (UVP) with Vision Works software.

### 2.11. Western blotting

Cells were lysed with NP40 Lysis Buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.7, NaCl 150 mM, NP40 0.5%, 10% Glycerol). Proteins (30  $\mu\text{g}$ ) were denatured and loaded onto a SDS-PAGE. Western blots were performed using antibodies against p-gH2AX (05-636 Merck<sup>®</sup>, 1/1000), cleaved caspase-3 (9661 Cell signaling<sup>®</sup>, 1/1000), and Actin (clone C4, Chemicon<sup>®</sup>, 1/10000). Secondary antibodies (anti-rabbit, anti-rat, anti-mouse: Sigma, MA) were incubated at 1:5000 depending on the primary antibody. Loading was controlled with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).



## 2.12. ROS production measurement

AGS cells were seeded in black 96-well plates and treated for 6 h. After treatment, cells were incubated with a solution of phosphate-buffered saline (PBS), 10% FBS and 50  $\mu\text{M}$  of dihydroethidine for 30 min. Photos are taken with a fluorescent microscope and positive cells were counted.

## 3. Results and discussion

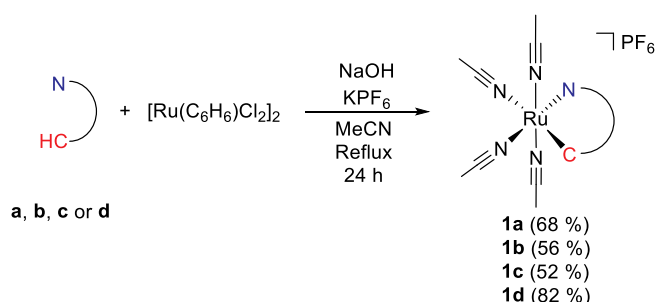
### 3.1. Chemistry

#### 3.1.1. Synthesis

Ligands benzo[*a*]pyrido[2,3-*c*]phenazine (bppzH, **a**) and benzo[*f*]pyrido[2,3-*h*]quinoxaline (bpqH, **b**) were prepared according to published methods for related compounds [37,40,41]. Additionally, ligands 1H-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (biqH, **c**) and 2-phenyl-1H-benzo[*h*]imidazo[4,5-*f*]quinoline (pbqH, **d**) were synthesized from the modification of reported synthetic routes, as shown in Scheme 1 [42]. The reaction between 7,8-benzoquinoline-5,6-dione, formaldehyde (for biqH) or benzaldehyde (for pbqH) and ammonium acetate in the presence of an excess of glacial acetic acid at reflux temperature for 3 h lead to the desired compounds as yellow solids in excellent yields ( $\geq 80\%$ ). NMR spectra showed that the ligands were pure enough for further reactions (Figs. S1 and S2).

The next key step was the cyclometalation of the ligands through a modification of the published method used for the cycloruthenation of 2-phenylpyridine, starting from  $[\eta^6\text{-benzene}]\text{RuCl}_2$  in the presence of NaOH and  $\text{KPF}_6$  in acetonitrile [48]. Increase of the reaction temperature and time was necessary to allow the isolation of compounds  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$  (**1a-d**, C~N = bppz, bpq, biq and pbq respectively) as air-sensitive yellow solids in good to excellent yields (Scheme 2). Despite repeated attempts, due to the readily decomposition of compounds **1b-d** upon exposition to ambient conditions, satisfactory elemental analysis data were difficult to obtain. However, complexes could be used for further reactions without prejudice.

Subsequent substitution of the acetonitrile ligands by two equivalents of 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine in ethanol at reflux temperature lead to the desired complexes  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$  (**2a-d**) and  $[\text{Ru}(\text{C}\sim\text{N})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$  (**3a-d**) as air-stable purple solids in good yields (Scheme 3). Complexes are soluble in halogenated solvents, acetone, acetonitrile, DMSO and ethanol. Despite the additional step of isolation and purification of complexes **1**, we found this method more efficient and versatile than the route involving the use of  $[\text{Ru}(\text{N}\sim\text{N})\text{Cl}_2]$  precursors, which has previously been reported for the synthesis of **3a** and **3b** in 25% yields [37]. Finally, the coordination compound  $[\text{Ru}(\text{dppz})(\text{bipy})_2](\text{PF}_6)_2$  (**CC-8**, Scheme 3), previously reported by Barton et al. [44], was also prepared for the sake of comparison in the biological studies as it bears a similar structure with cyclometalated complex **3a** and to highlight the importance of the Ru-C  $\sigma$ -bond.



Scheme 2. Synthesis of complexes **1a-d**.

#### 3.1.2. Crystallography

Crystals suitable for X-ray diffraction studies were obtained for complexes **1a**, **2b** and **3a** by slow diffusion of diethyl ether into a dichloromethane solution. The molecular structures of the compounds are shown in Fig. 1 and selected bond distances and angles are summarized in Tables S1 and S2. Crystallographic data are shown in Table S3. All three complexes present a slightly distorted octahedral geometry. Bond distances around the ruthenium center are similar for all compounds. The ruthenium-nitrogen bond *trans* to the ruthenium-carbon (2.125, 2.138 and 2.111 Å for **1a**, **2b**, **3a**, respectively) is clearly elongated in all three cases when compared to the other ruthenium-nitrogen bonds (2.005 to 2.069 Å for **1a**, 2.038 to 2.090 Å for **2b** and 2.043 to 2.074 Å for **3a**), due to a strong *trans* influence, as already reported for similar cyclometalated complexes [49].

#### 3.1.3. Electrochemical studies

Redox properties of the ruthenium complexes were studied by cyclic voltammetry in acetonitrile. In all cases, a quasi-reversible one electron wave can be observed between 0.561 and 0.621 V (vs Ag/AgCl) that can be attributed to the Ru(II) to Ru(III) oxidation. Between -2.0 and -1.0 V, series of features can be observed which are typical of bidentate polypyridyl ligands coordinated to a metal center [50,51]. Voltammograms are shown in Fig. 2 (**2a** and **3a**) and Figs. S3-S8 (**2b-d** and **3b-d**). Redox potentials for the Ru(II)/Ru(III) process are summarized in Table S4. As previously described for similar ruthenium cyclometalated compounds, the Ru-C  $\sigma$ -bond greatly reduces the redox potentials when compared to the analogous coordination compounds, and this was reflected in the much higher value observed for the Ru(II)/Ru(III) wave for **CC-8** complex (1.48 V vs Ag/AgCl) [30].

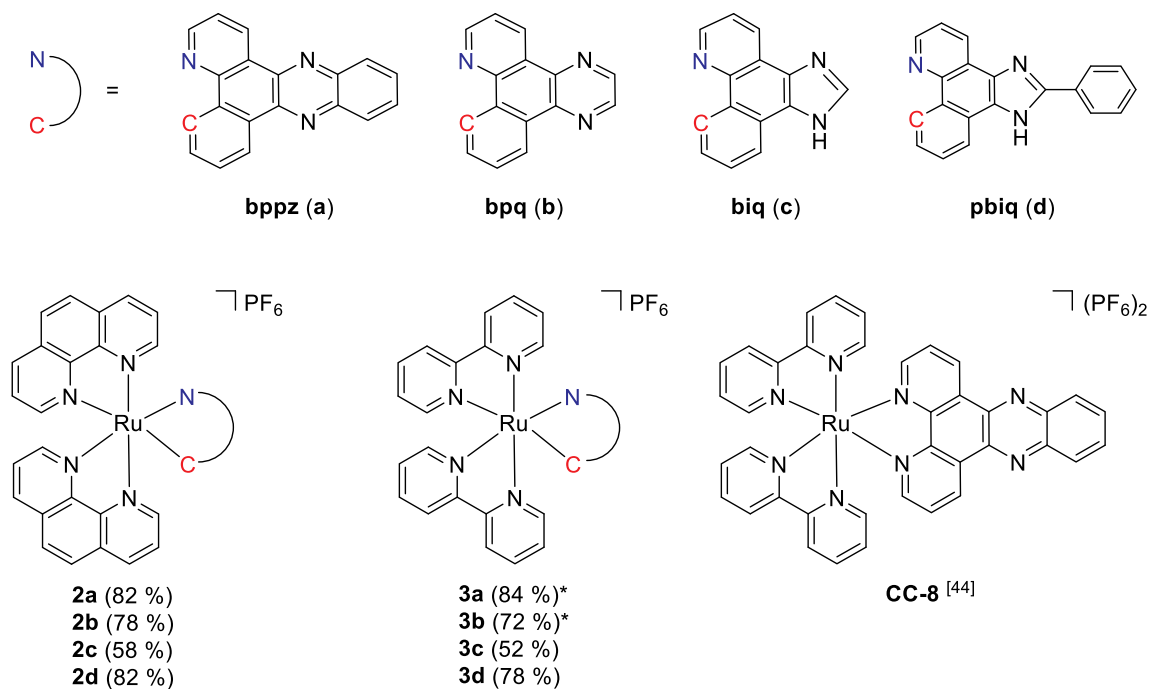
#### 3.1.4. Electronic absorption

The UV-vis absorption spectra of the ligands and complexes were measured in dichloroethane at 37 °C, the concentration was  $1 \times 10^{-5}$  M Fig. 3. Spectra of ligands **a** and **b** are similar with one intense band in the 225–300 nm region for **a** and 225–260 nm for **b**. This is consistent with the structures because ligand **a** presents a more extended  $\pi$  conjugated system than **b**. In the case of ligands **c** and **d**, 2 and 3 maximum peaks can be observed respectively, in the 225–300 nm region. This behavior is consistent with the  $^1\pi, \pi^*$  nature of the transitions. Ligand **a** shows 2 more bands at 360 nm and 390 nm. Maximum wavelengths absorptions ( $\lambda_{\text{max}}$ ) are shown in Table S5.

All complexes exhibit typical MLCT transition centered around 480 nm and two bands corresponding to  $\pi\text{-}\pi^*$  electronic transitions in the ligands **a-d** (292–298 nm), phen (270 nm) and bipy (260 nm) respectively. Complexes **2a**, **2b**, **2d** present another absorption band at 270 nm for  $\pi\text{-}\pi^*$  transitions from phenanthroline ligands while in complexes **3a**, **3b**, **3c**, **3d** the band is observed around 260 nm for the bipyridine ligands. Complexes show an absorption band in the visible region at 480 nm, which is more intense for complexes bearing phenanthroline. Another less intense band is centered around 537 nm. Those bands are mainly characterized as d-d transition from the metal center. Maximum wavelengths absorptions ( $\lambda_{\text{max}}$ ) are shown in Table S6. With the objective of knowing the behavior of the compounds in conditions similar to that used in the biological assays, their electronic absorption was measured in an aqueous solution containing 0.5% of DMSO at a concentration of  $1 \times 10^{-5}$  M at 37 °C. As the complexes are almost insoluble in water, a  $2 \times 10^{-3}$  M stock solution in DMSO was first prepared and dilutions with distilled water were made, until reaching the required concentration. Spectra were similar to those observed in dichloroethane.

#### 3.1.5. Stability studies

The stability of the ruthenium complexes in water solution was evaluated by UV-vis spectroscopy. Complexes were dissolved in water containing 0.5% DMSO, the concentration was  $1 \times 10^{-4}$  M and the solutions were monitored by UV-vis, keeping the temperature at 37 °C.



Scheme 3. Ruthenium(II) complexes prepared in this study (\*previously reported in 25% yields [37]).

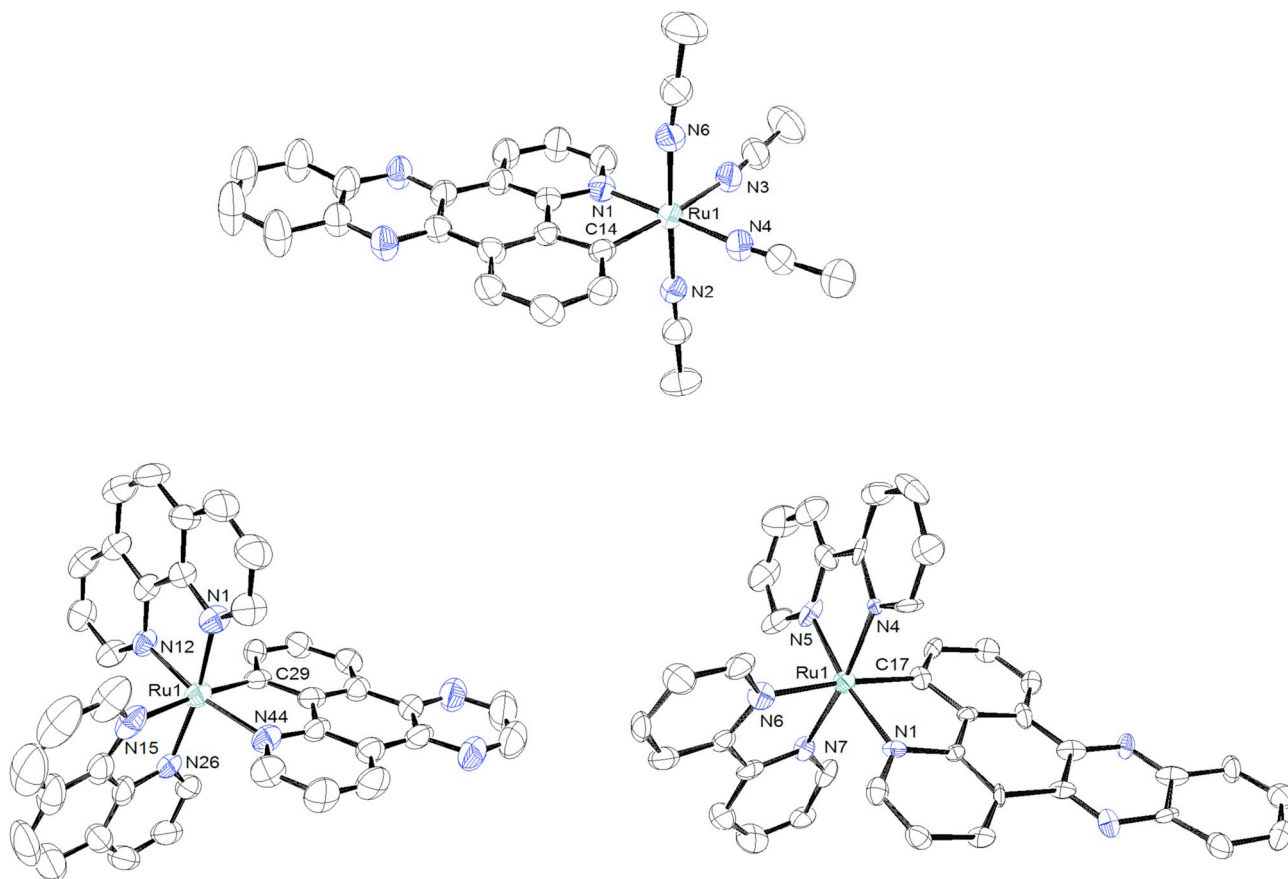


Fig. 1. ORTEP representation of complexes **1a** (top), **2b** (bottom left) and **3a** (bottom right) with 50% of probability, hydrogen atoms and  $\text{PF}_6^-$  are omitted for clarity.

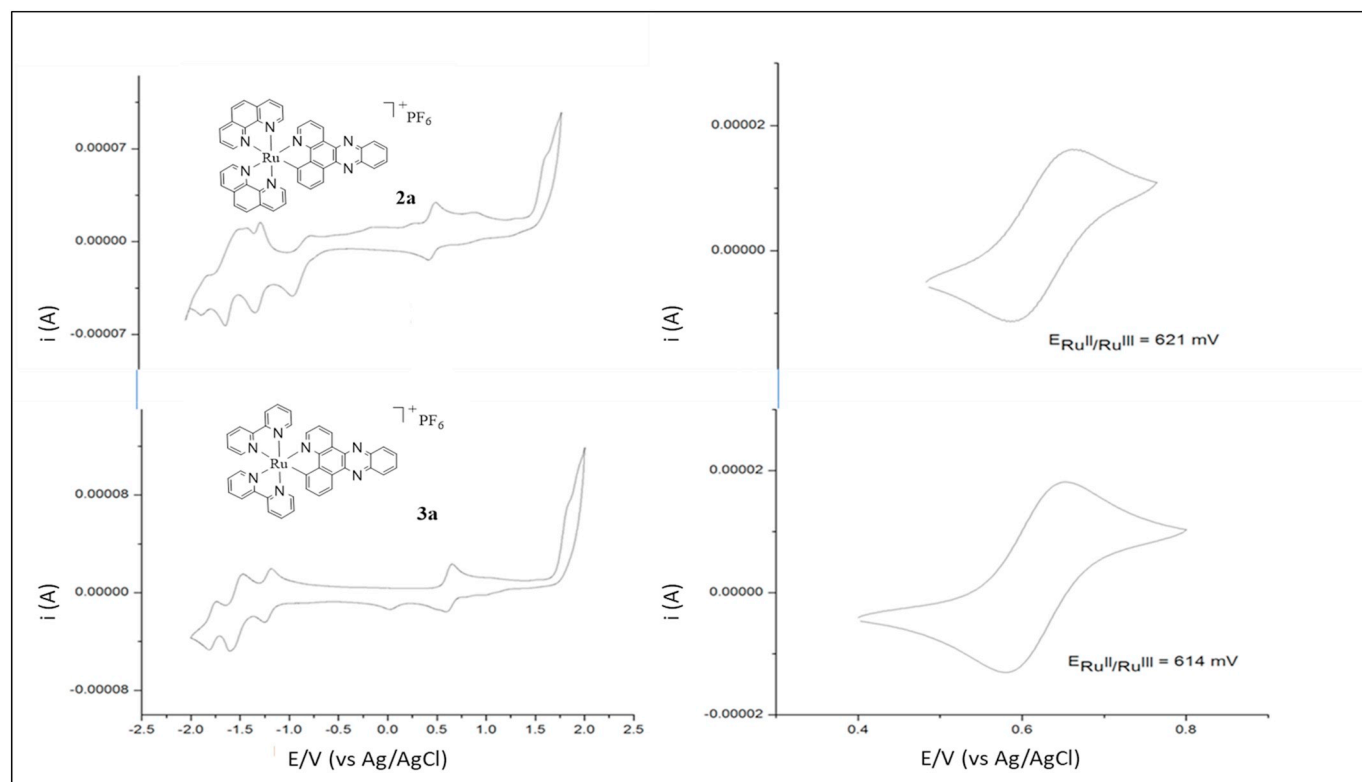


Fig. 2. Cyclic voltammograms of complexes **2a** and **3a** (Ag/AgCl, [Ru] = 3 mM in acetonitrile,  $n\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  0.1 M, scan rate  $100 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

After 48 h almost no decomposition of the complex was observed, meaning that they are sufficiently stable for the proposed biological studies, particularly for the evaluation of their cytotoxicity in cancer cells.

### 3.1.6. Partition coefficient

The lipophilicities of the cyclometalated compounds were assessed by their octanol-water partition coefficients ( $\log P_{o/w}$ ) using the “shake flask” method [46]. Results are summarized in Table 1. A more positive  $\log P_{o/w}$  indicates preferential solubility of a compound in the octanol

layer, while a negative  $\log P_{o/w}$  indicates a preference for water. Cyclometalated ruthenium derivatives have been shown to be more lipophilic than their coordination counterparts and as such displaying more positive  $\log P_{o/w}$  values [52]. In fact, of all compounds studied the most negative value was observed for coordination derivative CC-8. We can see that complex **2a** is the one with the highest lipophilicity, followed by **2d**. As expected, due to the more extended aromatic system, in each pair of compounds with the same ligand (**a**, **b**, **c** or **d**), the values of  $\log P_{o/w}$  are higher for complexes **2** bearing phenantroline than for complexes **3** bearing bipyridine.

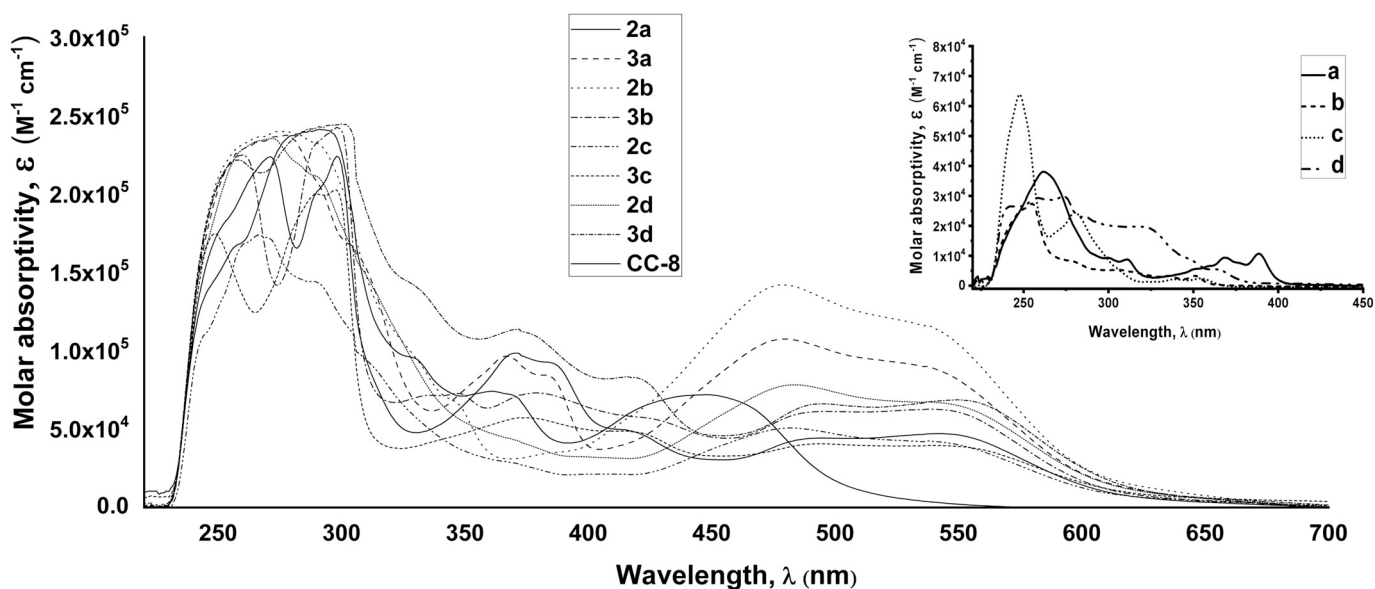


Fig. 3. Absorption spectra of ligands and complexes ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}_2$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  at  $37^\circ\text{C}$ ).

**Table 1**  
Partition coefficient ( $\log P_{o/w}$ ) of complexes.

Complex	$\log P_{o/w}$
<b>2a</b>	1.95 ± 0.18
<b>3a</b>	1.18 ± 0.14
<b>2b</b>	1.0 ± 0.24
<b>3b</b>	-0.17 ± 0.01
<b>2c</b>	0.22 ± 0.06
<b>3c</b>	-0.54 ± 0.08
<b>2d</b>	1.34 ± 0.16
<b>3d</b>	0.83 ± 0.10
CC-8	-1.15 ± 0.20

### 3.2. Biology

#### 3.2.1. Light irradiation further increases compounds cytotoxicity

To test the cytotoxicity and the mechanisms of cell death induced by the complexes, based on the lack of therapeutic solution for this aggressive cancer, gastric cancer cells were used (see [Introduction](#)). The activity of the complexes has been assessed on two different cell lines from gastric cancer, KATO III and AGS cells using MTT test after 48 h of treatment. AGS cells express a wildtype form of the p53 tumor suppressor gene, while the metastatic gastric cancer cells KATO III have a deletion of p53. As it has previously been shown that ruthenium complexes such as complex **3a** can be activated by light [37], we compared the activity of our complexes on cells that were always kept in the dark with cells that were illuminated with white light for 1 h. Absolute  $IC_{50}$  were calculated and are summarized in [Table 2](#) and the survival curves (survival vs. concentration expressed in  $\mu M$ ) are shown in Figs. S9–S24. All cyclometalated complexes displayed higher activity than cisplatin, with  $IC_{50}$  values in the low micromolar range, and were found to be up to 100-fold more cytotoxic than CC-8 complex (the coordination analog of **3a**) previously described [53].  $IC_{50}$  decrease induced by light activation correlated with morphological changes in cells characteristic of cell death ([Fig. 4A](#)). In particular, complex **3a** displayed  $IC_{50}$  values of 0.41 and 1.30  $\mu M$  for KATO III and AGS cells, respectively, while  $IC_{50}$  for CC-8 were above 100  $\mu M$  for both cell lines. This difference in cytotoxicity illustrates the importance of the  $\sigma$  carbon-metal bond in the biological activity of the ruthenium complexes. With the exception of **3c** and CC-8,  $IC_{50}$  were relatively close and around 1  $\mu M$ . As these two complexes have the lowest  $\log P_{o/w}$  values, this indicated that the lipophilicity accounts significantly for the cytotoxicity of the complexes, likely by impacting on the cellular uptake. More subtle differences can be detected between compounds depending on the cell lines. For instance, **2a** was the most active in KATO III but one of the least active in AGS indicating that additional factors are likely involved to dictate the biological activity of the complexes, as recently showed with the expression of *ABCB1* and *EGFR* [54]. Some of the compounds were less active in the p53 mutated cells, KATO III. A similar tendency has

**Table 2**

$IC_{50}$  values ( $\mu M$ ) at 48 h for cells kept under dark conditions and cells irradiated for 1 h (see [Experimental section](#) for conditions). Phototoxic index (PI) were calculated as the ratio of  $IC_{50}$  obtained in the dark, divided by the values of  $IC_{50}$  obtained after irradiation. Newly characterized compounds with high PI are underlined.

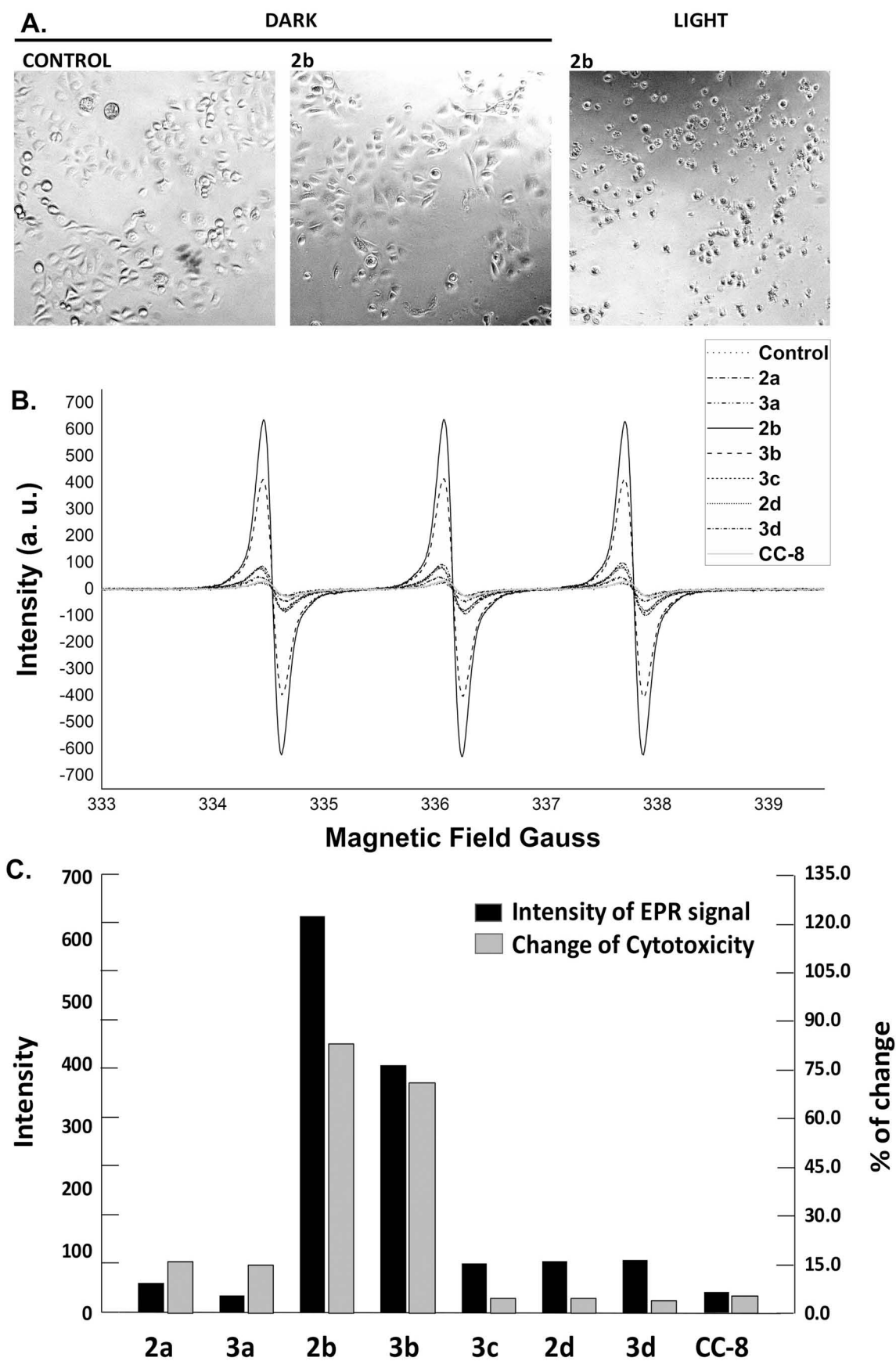
Compound	KATO III			AGS		
	Dark	Light	PI	Dark	Light	PI
cisplatin	11.0			29.00		
<b>2a</b>	0.38 ± 0.03	0.32 ± 0.05	1.19	1.30 ± 0.12	0.52 ± 0.04	2.50
<b>3a</b>	0.41 ± 0.02	0.35 ± 0.05	1.17	1.30 ± 0.10	0.75 ± 0.08	1.73
<u><b>2b</b></u>	0.57 ± 0.04	0.10 ± 0.03	5.70	0.63 ± 0.03	0.18 ± 0.03	3.50
<u><b>3b</b></u>	0.91 ± 0.09	0.27 ± 0.06	3.37	0.87 ± 0.04	0.34 ± 0.05	2.56
<b>2c</b>	5.12 ± 0.02	4.89 ± 0.15	1.05	5.01 ± 0.29	3.88 ± 0.85	1.29
<b>2d</b>	0.46 ± 0.07	0.44 ± 0.12	1.05	0.70 ± 0.02	0.50 ± 0.07	1.40
<b>3d</b>	0.52 ± 0.03	0.50 ± 0.08	1.04	0.85 ± 0.05	0.67 ± 0.09	1.27
CC-8	100.0 ± 5.0	95.0 ± 8.0	1.05	106.00 ± 5.0	100.00 ± 3.0	1.06

already been observed with other ruthenium complexes in a broader panel of cell lines [33,54]. This is rather counterintuitive as p53 is a pro-apoptotic protein involved in stress response, and so far, no satisfactory explanations have been provided. Importantly, compound **2b** displayed the highest phototoxic indexes (PI =  $IC_{50}$  in the dark/ $IC_{50}$  upon irradiation [55]), with PI = 5.70 and 3.50 for KATO III and AGS cells respectively. This rise in activity was more important when compared to complex **3b** which has previously been described (PI around 3 in both cell lines) [37], but significantly lower than for related coordination complexes which displayed PI up to 300 with different cell lines [55,57,58]. However, it is noteworthy that such high PI (300) is intrinsically linked to the extremely low cytotoxicity ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) of these compounds in absence of light, which makes them typical derivatives suitable for PDT. In contrast, compounds **2b** and **3b** already present a high cytotoxicity in the dark ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ), which makes them more suitable for classical cytotoxic chemotherapy. However, our observation that their cytotoxicity might be increased upon illumination brings an interesting perspective on possible optimization of their use and mode of action. For instance, compounds **2b** and **3b** showed higher  $IC_{50}$  values, 4.3 and 6.7  $\mu M$  respectively, in non-cancerous but immortalized KMST6 human fibroblastic cells, suggesting that despite their high cytotoxicity they can display a certain selectivity for cancer cells. It remains to establish the relevance of such results *in vivo*.

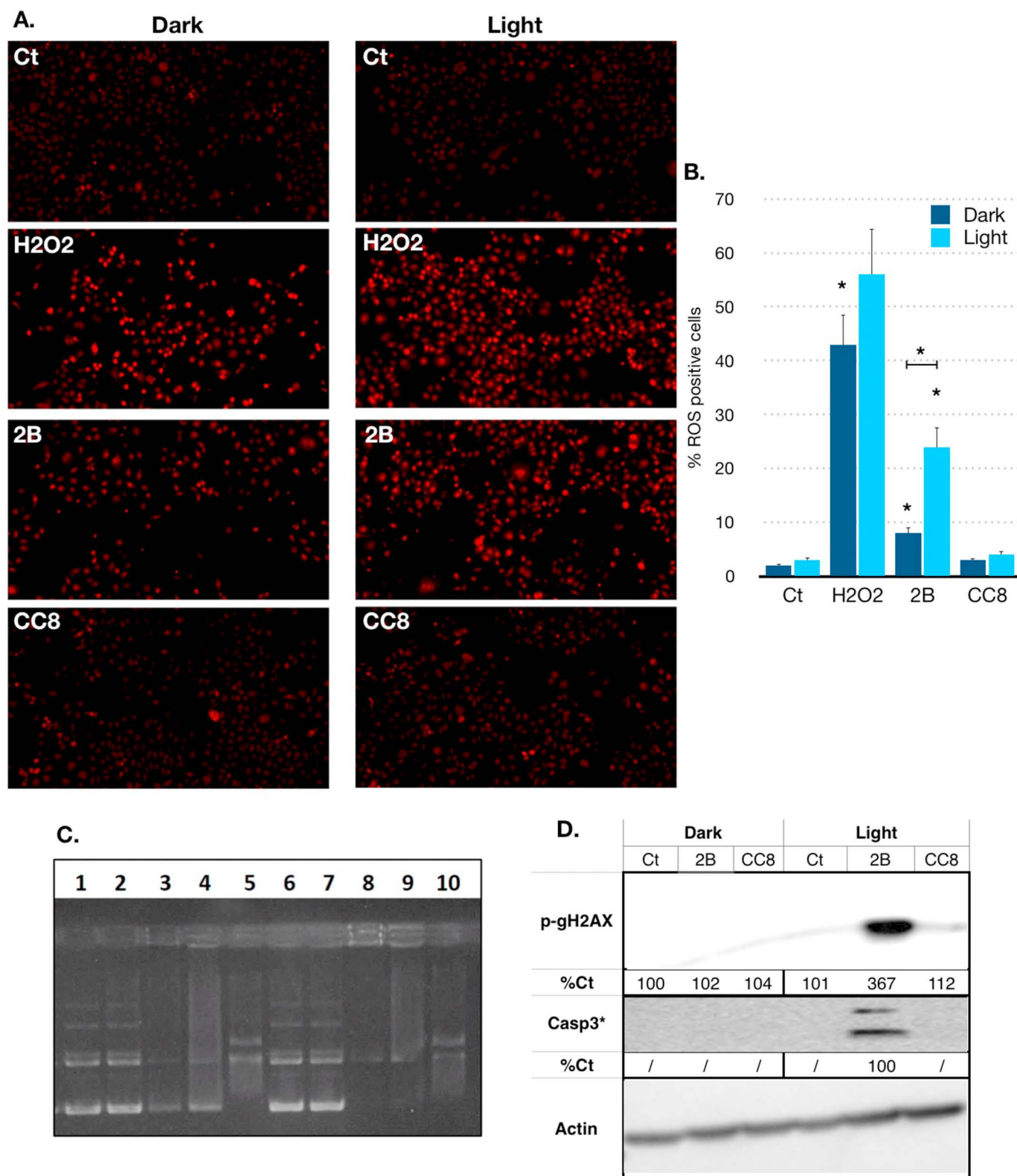
#### 3.2.2. Light irradiation induces reactive oxygen species production in cells

The proposed mode of action of compounds used in photodynamic therapy involves the generation of reactive oxygen species (ROS) in cells that generates alteration of different cellular constituents [16]. In order to determine the nature of the ROS produced upon irradiation with our compounds, EPR experiments were performed using spin traps. First assays were performed with 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), which is known to react with superoxide and hydroxyl radicals. However, upon irradiation for 30 min of a solution of **2b** ( $1 \times 10^{-3} M$ ) and DMPO ( $4 \times 10^{-3} M$ ) in ethanol at room temperature, no EPR signal was detected ([Fig. S25](#)). Next, 2,2,6,6-tetramethyl piperidine (TEMP) was used as a spin trap. TEMP reacts specifically with singlet oxygen ( $^1O_2$ ) forming (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl) oxyl (TEMPO), which presents a characteristic signal in EPR [56]. When a mixture of complex **2b** ( $1 \times 10^{-3} M$ ) and TEMP ( $4 \times 10^{-3} M$ ) in ethanol was irradiated at room temperature for 30 min with visible light in the presence of TEMP, the EPR spectra clearly showed the formation of TEMPO, meaning that  $^1O_2$  is produced. When compound **2b** was used as a photosensitizer, a linear initial rate of increase of the signal intensity of the spin adduct was observed for at least 20 min ([Fig. S26](#)). The same experiment was performed with the other ruthenium complexes. However, [Fig. 4B](#) remarkably shows that the amount of ROS produced after 30 min by **2b** is much higher than for any other compounds. In particular, CC-8 does almost not generate ROS under such conditions. We correlated the amount of singlet oxygen produced by





**Fig. 4.** A. AGS cells were treated with **2b** for 24 h and microscopical analysis revealed morphological differences upon light activation. B. EPR spectra at room temperature of a solution of complex **2b** ( $1 \times 10^{-3}$  M) and TEMP ( $4 \times 10^{-3}$  M) in ethanol after irradiation for 30 min. C. Intensity of the EPR signals after 30 min of irradiation (left), and change produced in the cytotoxic activity on KATO III cells of ruthenium(II) complexes (right), after 60 min of irradiation with visible light (see [Discussion](#) for details).



**Fig. 5.** A. AGS cells were treated with **2b** and **CC-8** at the  $IC_{50}$  (of dark conditions) for 6 h and then illuminated with white light or not for 1 h. Non-treated cells (Ct) were taken as control. Cells were treated with  $H_2O_2$  100  $\mu M$  as positive control. ROS production was assessed by dihydroethidium and ROS positives cells. B. ROS positive cells were counted, and statistics were performed on replicates. Student *t*-test are considered as significant with  $p < 0,5$ . \*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ . C. DNA gel mobility shift assays of complexes **2b**, **3b** and **CC-8**. Lanes 1 and 2: DNA plasmide only (dark). Lane 3: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **2b** (dark). Lane 4: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **3b** (dark). Lane 5: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **CC-8** (dark). Lanes 6 and 7: DNA plasmide only (after irradiation by visible light). Lane 8: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **2b** (after irradiation by visible light). Lane 9: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **3b** (after irradiation by visible light). Lane 10: DNA plasmide + 100  $\mu M$  of complex **CC-8** (after irradiation by visible light). D. Proteins were extracted from these conditions and Western blot analysis reveal phospho-gH2AX (p-gH2AX), Caspase-3 (casp3\*) cleavage and Actin.

each compound with their cytotoxicity upon light activation. Fig. 4C shows that the compounds that are the most able to produce singlet oxygen display the highest cytotoxicity upon illumination.

### 3.2.3. Impact of light activation on cell death pathways

To verify that reactive oxygen species were produced upon light activation, we incubated the cells with the fluorescent probe dihydroethidium (Fig. 5A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used a positive control. AGS cells treated with **2b** present a high ROS production after 6 h of treatment. Remarkably, this ROS induction is even higher when the cells treated by **2b** were exposed to light during 1 h (Fig. 5A, B). Interestingly, under the same conditions, CC-8 did not induce changes in its ability to produce ROS. ROS production is a inducer of DNA damages. In addition, previous studies showed that compounds CC-8 and **3b** were able to interact with purified DNA *in vitro* and that **3b** could cleave DNA upon irradiation with light [37]. In particular, studies with cervical cancer cells showed that a coordination complex, [Ru(bipy)<sub>2</sub>-dppz-7-methoxy](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Ru65) [55,57,58], with a structure related to those synthesized in this work, presented cytotoxicity after being irradiated with UV-A, due to the generation of <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. This complex is able to intercalate in the DNA and promote the oxidation of guanine resulting in damage in the double helix, as well as generating endoplasmic reticulum stress, leading to rapid cell death through classic apoptotic pathways. As our complexes tend to be more active on cells with mutated p53 (see Table 2), a known DNA damage response mechanism [33,54], we wanted to establish whether DNA was also targeted by our complex.

Therefore, we compared the DNA binding and cleaving activity of **2b** with **3b** and CC-8. Complexes were incubated with plasmidic DNA (PCDNA3) for 3 h and then irradiated with light for 1 h. Then, plasmidic DNAs were separated on an agarose gel (Fig. 5C). Incubation of plasmidic DNA with **2b** changed significantly the mobility of the DNA on the gel, indicating interaction and cleavage, similarly to **3b**. Change in migration with **2b** and **3b** was different from the changes caused by CC-8, indicating a different type of interaction with DNA. Irradiation with light further increased the change in migration caused by **2b** and **3b**. These results indicate that the cytotoxicity of **2b** might involve DNA interaction and damage, and that those interactions might be improved by irradiation with light.

As complex **2b** displayed the highest photoactivation, we thus decided to further investigate the molecular mechanisms involved. We first assessed the ability of the compound to induce several stress pathways in dark and light (1 h). First, we investigated whether light activation could induce the phosphorylation of gH2AX, a marker of double strand DNA damage [59]. Compound CC-8 did not change gH2AX phosphorylation status, in contrast to **2b** that strongly induced it upon light activation (Fig. 5D). To understand the impact of DNA damage upon light activation, we analyzed the cleavage of caspase 3, a marker for apoptosis. We observed that illumination of cells treated with **2b** displayed a strong activation of the caspase 3 cleavage. Hence, illumination of **2b** favors DNA damages and caspase 3 cleavage. Interestingly, CC-8 did not induce any changes in response to light activation.

## 4. Conclusions

Seven organometallic ruthenium(II) complexes bearing increased  $\pi$ -conjugation on the cyclometalated ligand were prepared and fully characterized. All complexes displayed an elevated cytotoxic activity on 2 gastric cancer cell lines resistant to cisplatin (AGS and KATO III) which was further enhanced upon irradiation by visible light for two of them. EPR studies allowed to link such increment in the activity to the photoproduction of singlet oxygen which can activate a caspase 3-dependent apoptosis connected with increased DNA damage. As such, our new series of ruthenacycles display a dual activity that can be tuned towards different mode of action and could be considered as a possible

way to bypass cancer cell resistance mechanisms.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We thank financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project A1-S-15068 and scholarship 277723 to J. A. Solís-Ruiz), DGAPA-PAPIIT (Projects IN-207316 and IN-207419) and ECOS Nord (Project 279063). We thank Virginia Gómez Vidales and María de la Paz Orta Pérez for their help in obtaining EPR spectra and for performing elemental analysis.

## Appendix A. Supplementary data

Crystallographic data, cyclic voltammograms, survival curves (survival vs. concentration) used to estimate the IC<sub>50</sub> values and EPR spectra.

CCDC 1889278 (**1a**), 1,889,279 (**2b**) and 1,959,512 (**3a**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif). Supplementary data to this article can be found online at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111080>.

## References

- [1] F. Bernges, E. Holler, The reaction of platinum(II) complexes with DNA. Kinetics of intrastrand crosslink formation *in vitro*, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 1483–1489.
- [2] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, *Dalton Trans.* 47 (2018) 6645–6653.
- [3] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, New trends for metal complexes with anticancer activity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2010) 197–206.
- [4] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Antitumour metal compounds: more than theme and variations, *Dalton Trans.* (2008) 183–194.
- [5] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects, *Platin. Met. Rev.* 45 (2001) 62–69.
- [6] P.J. Dyson, G. Sava, Metal-based antitumour drugs in the post genomic era, *Dalton Trans.* 35 (2006) 1929–1933.
- [7] J.H. Beijnen, G. Sava, A. Bergamo, J.H.M. Schellens, C. Gaiddon, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 90–99.
- [8] E. Boros, P.J. Dyson, G. Gasser, Classification of metal-based drugs according to their mechanisms of action, *Chem* 6 (2020) 41–60.
- [9] V. Brabec, DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71 (2002) 1–68.
- [10] M. Klajner, P. Hebraud, C. Sirlin, C. Gaiddon, S. Harlepp, DNA binding to an anticancer organo-ruthenium complex, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 14041–14047.
- [11] X. Meng, M.L. Leyva, M. Jenny, I. Gross, S. Benosman, B. Fricker, S. Harlepp, P. Hébraud, A. Boos, P. Wlosik, P. Bischoff, C. Sirlin, M. Pfeffer, J.-P. Loeffler, C. Gaiddon, A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP, *Cancer Res.* 69 (2009) 5458–5466.
- [12] V. Vidimar, X. Meng, M. Klajner, C. Licona, L. Fetzter, S. Harlepp, P. Hébraud, M. Sidhoum, C. Sirlin, J.P. Loeffler, G. Mellitzer, G. Sava, M. Pfeffer, C. Gaiddon, Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1428–1436.
- [13] L. Fetzter, B. Boff, M. Ali, M. Xiangjun, J.P. Collin, C. Sirlin, C. Gaiddon, M. Pfeffer, Library of second-generation cycloruthenated compounds and evaluation of their biological properties as potential anticancer drugs: passing the nanomolar barrier, *Dalton Trans.* 40 (2011) 8869–8878.
- [14] H. Rico Bautista, R.O. Saavedra Díaz, L.Q. Shen, C. Orvain, C. Gaiddon, R. Le Lagadec, A.D. Ryabov, Impact of cyclometalated ruthenium(II) complexes on lactate dehydrogenase activity and cytotoxicity in gastric and colon cancer cells, *J. Inorg. Biochem.* 163 (2016) 28–38.
- [15] A. Notaro, G. Gasser, Monomeric and dimeric coordinatively saturated and substitutionally inert Ru(II) polypyridyl complexes as anticancer drug candidates, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 7317–7337.
- [16] A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. von Zelewsky, Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence, *Coord. Chem. Rev.* 84 (1988) 85–277.
- [17] A. Juris, S. Campagna, V. Balzani, G. Gremaud, A. von Zelewsky, Absorption



- spectra, luminescence properties, and electrochemical behavior of tris-heteroleptic ruthenium(II) polypyridine complexes, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 3652–3655.
- [18] J.D. Knoll, C. Turro, Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.* 282–283 (2015) 110–126.
- [19] L. Wang, H. Yin, M.A. Javed, M. Hetu, C. Wang, S. Monro, X. Zhu, S. Kilina, S.A. McFarland, W. Sun,  $\pi$ -Expansive heteroleptic ruthenium(II) complexes as reverse saturable absorbers and photosensitizers for photodynamic therapy, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 3245–3259.
- [20] S. Monro, K.L. Colón, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R.P. Thummel, L. Lilge, C.G. Cameron, S.A. McFarland, Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433, *Chem. Rev.* 119 (2019) 797–828.
- [21] S. Bonnet, Why develop photoactivated chemotherapy? *Dalton Trans.* 47 (2018) 10330–10343.
- [22] S.A. McFarland, A. Mandel, R. Dumoulin-White, G. Gasser, Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Curr Opin in Chem Biol* 56 (2020) 23–27.
- [23] J. Fong, K. Kasimova, Y. Arenas, P. Kaspler, S. Lazic, A. Mandel, L. Lilge, A novel class of ruthenium-based photosensitizers effectively kills in vitro cancer cells and in vivo tumors, *Photochem Photobiol Sci* 14 (2015) 2014–2023.
- [24] B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, J.R. Aldrich-Wright, Metal complex interactions with DNA, *Dalton Trans.* 44 (2015) 3505–3526.
- [25] F.E. Poynton, S.A. Bright, S. Blasco, D.C. Williams, J.M. Kelly, T. Gunnlaugsson, The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for: in vitro cellular and in vivo applications, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 7706–7756.
- [26] A. Mihailovic, I. Vladescu, M. McCauley, E. Ly, M.C. Williams, E.M. Spain, M.E. Nuñez, Exploring the interaction of ruthenium(II) polypyridyl complexes with DNA using single-molecule techniques, *Langmuir* 22 (2006) 4699–4709.
- [27] B.A. Albani, B. Peña, K.R. Dunbar, C. Turro, New cyclometallated Ru(II) complex for potential application in photochemotherapy? *Photochem Photobiol Sci* 13 (2014) 272–280.
- [28] E. Wachter, D.K. Heidary, B.S. Howerton, S. Parkin, E.C. Glazer, Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9649–9651.
- [29] A.D. Ryabov, R. Le Lagadec, H. Estevez, R.A. Toscano, S. Hernandez, L. Alexandrova, V.S. Kuruva, A. Fischer, C. Sirlin, M. Pfeffer, Synthesis, characterization, and electrochemistry of bio-relevant photosensitive low-potential orthometalated ruthenium complexes, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 222–230.
- [30] A.D. Ryabov, V.S. Sukharev, L. Alexandrova, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, New synthesis and new bio-application of cyclometalated ruthenium(II) complexes for fast mediated electron transfer with peroxidase and glucose oxidase, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 6529–6532.
- [31] A.D. Ryabov, V.S. Kurova, E.V. Ivanova, R. Le Lagadec, L. Alexandrova, Redox mediation and photomechanical oscillations involving photosensitive cyclometalated Ru(II) complexes, glucose oxidase, and peroxidase, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1132–1139.
- [32] R. Le Lagadec, L. Alexandrova, H. Estevez, M. Pfeffer, V. Laurinavičius, J. Razumiene, A.D. Ryabov, Bis-ruthena(III)cycles  $[\text{Ru}(\text{C}\pi\text{N})_2(\text{N}\pi\text{N})]\text{PF}_6$  as low-potential mediators for PQQ alcohol dehydrogenase ( $\text{C}\pi\text{N} = 2\text{-phenylpyridinato or } 4\text{-}(2\text{-tolyl})\text{-pyridinato, N}\pi\text{N} = \text{bpy or phen}$ ), *Eur. J. Inorg. Chem.* 2 (2006) 2735–2738.
- [33] V. Vidimar, C. Licona, R. Cerón-Camacho, E. Guerin, P. Coliat, A. Venkatasamy, M. Ali, D. Guenot, R. Le Lagadec, A.C. Jung, J.N. Freund, M. Pfeffer, G. Mellitzer, G. Sava, C. Gaiddon, A redox ruthenium compound directly targets PHD2 and inhibits the HIF1 pathway to reduce tumor angiogenesis independently of p53, *Cancer Lett.* 440–441 (2019) 145–155.
- [34] M.J. Chow, M.V. Babak, K.W. Tan, M.C. Cheong, G. Pastorin, C. Gaiddon, W.H. Ang, Induction of the endoplasmic reticulum stress pathway by highly cytotoxic organoruthenium Schiff-base complexes, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 3020–3031.
- [35] M.J. Chow, M. Alfiean, G. Pastorin, C. Gaiddon, W.H. Ang, Apoptosis-independent organoruthenium anticancer complexes that overcome multidrug resistance: self-assembly and phenotypic screening strategies, *Chem. Sci.* 8 (2017) 3641–3649.
- [36] C. Licona, M.-E. Spaety, A. Capuozzo, M. Ali, R. Santamaria, O. Armant, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, S. Cianferani, J. Spencer, M. Pfeffer, G. Mellitzer, C. Gaiddon, A ruthenium anticancer compound interacts with histones and impacts differently on epigenetic and death pathways compared to cisplatin, *Oncotarget* 8 (2016) 2568–2584.
- [37] T. Sainuddin, J. McCain, M. Pinto, H. Yin, J. Gibson, M. Hetu, S.A. McFarland, Organometallic Ru(II) photosensitizers derived from  $\pi$ -expansive cyclometalating ligands: surprising theranostic PDT effects, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 83–95.
- [38] G. Ghosh, K.L. Colón, A. Fuller, T. Sainuddin, E. Bradner, J. McCain, S.M.A. Monro, H. Yin, M.W. Hetu, C.G. Cameron, S.A. McFarland, Cyclometalated ruthenium(II) complexes derived from  $\alpha$ -oligothiophenes as highly selective cytotoxic or photocytotoxic agents, *Inorg. Chem.* 57 (2018) 7694–7712.
- [39] S. Fehim, R. Bouhaous, M. Diaf, A.M. Drici, M.B. Khaled, Epidemiological profile of gastric cancer in the northwestern region of Algeria: about 116 cases, *J. Gastrointest Oncol* 8 (2017) 659–664.
- [40] J.G. Collins, A.D. Sleeman, J.R. Aldrich-Wright, I. Greguric, T.W. Hambley, A  $^1\text{H}$  NMR study of the DNA binding of ruthenium(II) polypyridyl complexes, *Inorg. Chem.* 37 (2002) 3133–3141.
- [41] K. Klocz, J. Mlochowski, Z. Szulc, Synthesis of azafluorenones, *J. Prakt. Chem.* 319 (1977) 959–967.
- [42] J. Ji, J. Wu, B. Ye, L. Wang, L. Ji, J. Zhou, R. Li, Bis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complexes with imidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline or 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 1395–1401.
- [43] R.A. Zelonka, M.C. Baird, Benzene complexes of ruthenium(II), *Can. J. Chem.* 50 (1972) 3063–3072.
- [44] J.K. Barton, J.M. Goldberg, C.V. Kumar, N.J. Turro, Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2081–2088.
- [45] G. Sheldrick, SHELXL, *Acta Crystallogr.* 71 (2015) 3–8.
- [46] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525–616.
- [47] S. Benosman, X. Meng, Y. Von Grabowiecki, L. Palamiuc, L. Hritcu, I. Gross, G. Mellitzer, Y. Taya, J.P. Loeffler, C. Gaiddon, Complex regulation of p73 isoforms after alteration of amyloid precursor polypeptide (APP) function and DNA damage in neurons, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43013–43025.
- [48] S. Fernandez, M. Pfeffer, V. Ritzler, C. Sirlin, An effective route to cycloruthenated N-ligands under mild conditions, *Organometallics* 18 (1999) 2390–2394.
- [49] B. Boff, M. Ali, L. Alexandrova, N.A. Espinosa-Jalapa, R.O. Saavedra-Díaz, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, Rational synthesis of heteroleptic tris(chelate) ruthenium complexes  $[\text{Ru}^{\text{II}}(2\text{-Ph-}2'\text{-Py})(\text{L/L}')(\text{L}'/\text{L}'')]\text{PF}_6$  by selective substitution of the ligand trans to the ruthenated phenyl ring, *Organometallics* 32 (2013) 5092–5097.
- [50] K.T. Ngo, N.A. Lee, S.D. Pinnace, D.J. Szalda, R.T. Weber, J. Rochford, Probing the noninnocent  $\pi$ -bonding influence of N-carboxyamidoquinolate ligands on the light harvesting and redox properties of ruthenium polypyridyl complexes, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 2460–2472.
- [51] Y.J. Liu, H. Chao, L.F. Tan, Y.X. Yuan, W. Wei, L.N. Ji, Interaction of polypyridyl ruthenium (II) complex containing asymmetric ligand with DNA, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 530–537.
- [52] H. Huang, P. Zhang, H. Chen, L. Ji, H. Chao, Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium(II) complexes: anticancer activities against 2d and 3d cancer models, *Chem. Eur. J.* 7 (2015) 715–725.
- [53] A.E. Friedman, J.C. Chambron, J.P. Sauvage, N.J. Turro, J.K. Barton, A molecular light switch for DNA:  $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})^{2+}$ , *J. Am. Chem. Soc.* (1990).
- [54] C. Licona, J.-B. Delhorme, G. Riegel, V. Vidimar, R. Cerón-Camacho, B. Boff, A. Venkatasamy, C. Tomasetto, Figueiredo P. da Silva, C. Gomeze, D. Rognan, J.-N. Freund, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, I. Gross, G. Mellitzer, C. Gaiddon, Anticancer activity of ruthenium and osmium cyclometalated compounds: identification of ABCB1 and EGFR as resistance mechanisms, *Inorg Chem Front* 7 (2020) 678–688, <https://doi.org/10.1039/C9QI01148J> Advance Article.
- [55] C. Mari, V. Pierroz, R. Rubbiani, M. Patra, J. Hess, B. Spingler, L. Oehninger, J. Schur, I. Ott, L. Salassa, S. Ferrari, G. Gasser, DNA intercalating Ru(II) polypyridyl complexes as effective photosensitizers in photodynamic therapy, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 14421–14436.
- [56] L.-Y. Zang, F.J.G.M. Van Kuijk, B.R. Misra, H.P. Misra, The specificity and product of quenching singlet oxygen by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37 (1995) 283–293.
- [57] V. Pierroz, R. Rubbiani, C. Gentili, M. Patra, C. Mari, G. Gasser, S. Ferrari, Dual mode of cell death upon the photo-irradiation of a Ru(II) polypyridyl complex in interphase or mitosis, *Chem. Sci.* 7 (2016) 6115–6124.
- [58] M. Jakubaszek, B. Goud, S. Ferrari, G. Gasser, Mechanisms of action of Ru(II) polypyridyl complexes in living cells upon light irradiation, *Chem. Commun.* 54 (2018) 13040–13059.
- [59] A. Ivashkevich, C.E. Redon, A.J. Nakamura, R.F. Martin, O.A. Martin, Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research, *Cancer Lett.* 327 (2012) 123–133.