

## **Síntesi de nous complexos octaèdrics de ruteni amb lligands aromàtics N-donadors com a potencials agents anticancerígens**

Estudiant: David Canyet Nicolau

Correu electrònic: [davidcanyet8@gmail.com](mailto:davidcanyet8@gmail.com)

Grau en Química

Tutora: Montserrat Rodríguez Pizarro

Correu electrònic: [montse.rodriquez@udg.edu](mailto:montse.rodriquez@udg.edu)

Data de dipòsit de la memòria: dimarts, 4 de juliol de 2023

### Agraïments:

En primer lloc, m'agradaria agrair la dedicació de la Dra. Montserrat Rodríguez. Des d'un inici, per permetre'm participar en el seu grup de recerca i per l'atenció que m'ha donat durant tots aquests mesos per tal de que aquest Treball Final de Grau sortís a la llum. Per altra banda, als meus companys i companyes de laboratori per fer més amè els dies de feina. Sense vosaltres hagués sigut una mica més difícil.

## ÍNDEX

<b>RESUM</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA</b> .....	<b>VII</b>
<b>REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT</b> .....	<b>VII</b>
<b>REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
GENERALITATS DEL RUTENI .....	1
COMPLEXOS DE RUTENI AMB LIGANDS DMSO .....	1
COMPLEXOS DE RUTENI COM A AGENTS ANTITUMORALS .....	2
TERÀPIA FOTODINÀMICA (PDT) .....	3
<b>OBJECTIVES</b> .....	<b>6</b>
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>7</b>
INSTRUMENTACIÓ .....	7
<i>Espectroscòpia 1H-RMN</i> .....	7
<i>ESI-MS</i> .....	7
<i>UV-vis</i> .....	7
<i>Voltametria cíclica</i> .....	7
SÍNTESIS DE COMPOSTOS .....	8
<i>Síntesi del lligand 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2"-terpyridine (trpy-pyr) [1]</i> .....	8
<i>Síntesi de [RuCl<sub>3</sub>(trpy-pyr)] [2]</i> .....	8
<i>Síntesi de [RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] [3]</i> .....	8
<i>Síntesi de [RuCl<sub>2</sub>(trpy-pyr)(DMSO)] [4]</i> .....	8
<i>Síntesi de [Ru(trpy-pyr)(trpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> [5]</i> .....	9
<i>Síntesi de [Ru(trpy-pyr)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> [6]</i> .....	10
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	<b>11</b>
SÍNTESI I DETERMINACIÓ ESTRUCTURAL .....	11
<i>Espectroscòpia 1H-RMN</i> .....	11
<i>Espectrometria de masses (ESI-MS)</i> .....	15
ESPECTROSCÒPIA UV-VIS .....	18
PROPIETATS ELECTROQUÍMIQUES .....	19
MESURES DE FLUORESCÈNCIA .....	23
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>26</b>

## RESUM

En el següent Treball de Fi de Grau s'ha volgut sintetitzar i caracteritzar diferents complexos de ruteni hexacoordinats per tal de avaluar-ne el seu potencial anticancerígen en mostres de cultiu biològic.

Aquests compostos s'han obtingut a partir d'una primera síntesi i caracterització del lligand 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2"-terpyridine (*trpy-pyr*) **[1]** a partir de d'*1-pyrenylaldehyde*, *2-acetyl pyridine*, *acetamide* i *ammonium acetate*. Aquest lligand tridentat serà el precursor dels complexos metàl·lics d'interès. El dos primers compostos que s'han sintetitzat són el  $[\text{RuCl}_3(\text{trpy-pyr})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  **[2]** i  $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$  **[3]**, els quals s'han utilitzat per la síntesi de tres altres complexos. El primer d'ells és el  $[\text{RuCl}_2(\text{trpy-pyr})(\text{DMSO})]$  **[4]**, preparat a partir del lligand **[1]** i el compost **[3]** en reflux sota atmosfera de nitrogen i aïllat de la llum dins la campana de gasos. Per altra banda, el  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$  **[5]** es sintetitza a partir de dues rutes sintètiques diferents. La primera per reacció del complex **[2]** i la *terpyridine* comercial, i la segona a partir del complex **[4]** i la *terpyridine* comercial. Finalment es va sintetitzar un compost simètric amb dos lligands *trpy-pyr*, el  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})_2](\text{PF}_6)_2$  **[6]**, també a partir del compost **[2]**.

Tots els compostos han sigut caracteritzats mitjançant tècniques espectroscòpiques (RMN, UV-vis) i espectromètriques (ESI-MS). També s'han avaluat les seves propietats electroquímiques (voltametria cíclica) per tal de determinar ràpidament si una reacció finalitza i no presenta producte de partida o per determinar si el producte final és relativament pur. Amb aquestes voltametries es pot observar que el compost **[4]**, que s'aconsegueix purificar sota la forma de l'isòmer *trans*-Cl, pateix un procés d'isomerització del lligand DMSO coordinat al ruteni. Per altra banda, els compostos **[5]** i **[6]** mostren un procés d'electropolimerització del grup pirè sobre l'elèctrode de grafit utilitzat.

Finalment, s'han realitzat també mesures de fluorescència dels compostos **[4]**, **[5]** i **[6]** en medi de cultiu biològic, però els compostos no mostren comportament fotoluminiscent.

## RESUMEN

En el siguiente trabajo de final de grado se ha querido sintetizar y caracterizar diferentes complejos de rutenio hexacoordinados para evaluar su potencial anticancerígeno en muestras de cultivo biológico.

Estos compuestos se han obtenido a partir de una primera síntesis y caracterización del ligando 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2"-terpyridine (*trpy-pyr*) [1] a partir de d'1-pyrenylaldehyde, 2-acetylpyridine, acetamide i ammonium acetate. Este ligando tridentado será el precursor de los complejos metálicos de interés. Los dos primeros compuestos que se han sintetizado son de  $[\text{RuCl}_3(\text{trpy-pyr})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  [2] y  $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$  [3], los cuales se han utilizado para la síntesis de tres complejos más. El primero de ellos es el  $[\text{RuCl}_2(\text{trpy-pyr})(\text{DMSO})]$  [4], preparado a partir del ligando [1] y el compuesto [3] en reflujo bajo atmosfera de nitrógeno y aislado de la luz dentro de la campana de gases. Por otro lado, el  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$  [5] se sintetiza a partir de dos rutas sintéticas diferentes. La primera por reacción del complejo [2] y la *terpyridine* comercial, y la segunda a partir del complejo [4] y la *terpyridine* comercial. Finalmente se sintetizó un compuesto simétrico con dos ligando *trpy-pyr*, el  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})_2](\text{PF}_6)_2$  [6], también a partir del compuesto [2].

Todos los compuestos han sido caracterizados mediante técnicas espectroscópicas (RMN, UV-vis) y espectrométricas (ESI-MS). También se evaluaron sus propiedades electroquímicas (voltametría cíclica) para determinar rápidamente si una reacción finaliza y no presenta producto de partida o para determinar si el producto final es relativamente puro. Con estas voltametrías se puede observar que el compuesto [4], que se consigue purificando bajo la forma del isómero *trans*-Cl, sufre un proceso de isomerización del ligando DMSO coordinado al rutenio. Por otro lado, los compuestos [5] i [6] muestran un proceso d'electropolimerización del grupo pireno sobre el electrodo de grafito utilizado.

Finalmente, se han realizado también medidas de fluorescencia de los compuestos [4], [5] y [6] en medio de cultivo biológico, pero los compuestos no muestran comportamiento fotoluminiscente.

## ABSTRACT

The following final degree thesis, different hexacoordinate ruthenium complexes have been developed and characterized in order to evaluate their potential as anticancer agents in biological samples.

These compounds have been obtained from a first synthesis and characterization of the ligand 4'-(pyrenyl)-2, 2'; 6', 2"-terpyridine (*trpy-pyr*) **[1]** starting from *1-pyrenylaldehyde*, *2-acetylpyridine*, *acetamide* and *ammonium acetate*. This tridentate ligand will be the precursor of the metallic complexes in interest. From this tridentate ligand,  $[\text{RuCl}_3(\text{trpy-pyr})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  **[2]** and  $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$  **[3]** have been synthesized and have been used for the synthesis of three more compounds. First of them is  $[\text{RuCl}_2(\text{trpy-pyr})(\text{DMSO})]$  **[4]**, which is prepared from the ligand **[1]** and the complex **[3]** in reflux, under nitrogen atmosphere in a fume hood and covered with aluminium foil, to protect it from light. On the other side,  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$  **[5]** is synthesized by two different pathways reactions. First one from complex **[2]** and commercial *terpyridine*, and the second one from complex **[4]** and commercial *terpyridine*. Finally, it's been synthesized a symmetrical compound starting from two *trpy-pyr* ligands,  $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})_2](\text{PF}_6)_2$  **[6]**, also from compound **[2]**.

All compounds have been characterized by spectroscopic (NMR, UV-vis) and spectrometric (ESI-MS). They have also been evaluated its electrochemical properties (cyclic voltammetry) to determine easily if a reaction has ended and does not present initial products or to determine if the final product is relatively pure. These voltammograms show that compound **[4]**, which is purified the *trans*-Cl isomer form, undergoes an isomerization process of the ruthenium-coordinated DMSO ligand. On the other hand, compounds **[5]** and **[6]** show an electropolymerization process of the pyrene group on the graphite electrode used.

Finally, fluorescence measurements of compounds **[4]**, **[5]** and **[6]** have also been carried out in biological samples, but the compounds do not show photoluminescent behavior.

## REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

En aquest Treball de Fi de Grau, com en qualsevol altre, un aspecte que cal tenir clar són els factors ètics que afecten al correcte redactat i tractat de dades. En la present memòria sobre la síntesi i caracterització de compostos de ruteni s'ha tingut en compte aquest factor i s'han anotat tots els passos seguits en la llibreta de laboratori per una bona repetibilitat, s'ha fet una extensa recerca bibliogràfica amb la seva correcta citació al final de la memòria i no s'ha pretès en cap moment el plagi d'altres articles, revistes o treballs anteriors. A més, a l'hora de redactar aquesta memòria no s'ha dut a terme cap tipus de manipulació de resultats dels obtinguts en les diferents síntesis.

## REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

Continuant amb un altre factor estretament relacionat amb l'ètica, es parla també de sostenibilitat. En aquestes síntesis de laboratori, cada dissolvent utilitzat s'abocava correctament en el bidó pertinent degudament etiquetat per una bona gestió de residus: dissolvents halogenats, no halogenats i metàl·lics. Per altra banda, quan calia netejar el material de laboratori, es feia amb aigua i sabó per eliminar la major part de residus, però també amb acetona per acabar d'arrossegar possibles productes insolubles en aigua. Aquesta acetona es recollia en una ampolla per la posterior destil·lació i així reutilitzar-la de nou en flascons per un futur rentat de material.

## REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

La perspectiva de gènere en la química és fonamental per abordar les desigualtats existents. La bretxa salarial persisteix avui en dia, fet que reflecteix la discriminació de gènere en àmbits científics. Els estereotips de gènere limiten l'accés i el progrés de les dones en aquest camp i per tant és imprescindible trencar-los per promoure la igualtat de gènere i incentivar-ne la participació plena i l'equitat en la investigació química. Tot i així, en el meu camp de treball i en el grup de recerca que he participat, hi ha presència dual entre homes i dones investigadors/es, on la meua PI (*principal investigator*) i cap del Treball de Fi de Grau ha sigut una dona, doctora en química inorgànica.

## ABREVIATURES

COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
$E_{1/2}$	Potencial de semi ona
$E_{pa}$	Potencial en el pic anòdic
$E_{pc}$	Potencial en el pic catòdic
ESI-MS	Espectrometria de masses de ionització electromagnètica
m/z	Massa/càrrega
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PDR	Reacció fotodinàmica (photodynamic reaction)
PDT	Teràpia fotodinàmica (photodynamic therapy)
PS	Fotosensibilitzador (photosensitizer)
ROS	Espècies reactives d'oxigen (reactive oxygen species)
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
TBAH	Hexafluorofosfat de tetrabutilamoni
TBME	Tertbutilmetilèter
<i>trpy-pyr</i>	<i>4'-(pyrenyl)-2,2';6',2''-terpyridine</i>
UV-vis	Ultraviolat-visible
VC	Voltametria cíclica



## INTRODUCCIÓ

### Generalitats del ruteni

El ruteni és l'element 44 de la taula periòdica i es troba a la segona sèrie de transició amb una configuració electrònica  $[\text{Kr}]4d^75s^1$ , per tant forma part del bloc d dels metalls. La química del ruteni ha estat estudiada conjuntament amb l'osmi, ja que al poder-se presentar en estats d'oxidació entre -2 i +8, originen una gran varietat de compostos de coordinació.<sup>1</sup>

La versatilitat sintètica i l'estabilitat cinètica dels compostos de ruteni en diferents estats d'oxidació fan que aquests complexos siguin particularment interessants en un gran nombre d'aplicacions, ja que les seves propietats i funcionalitats estan directament relacionades amb els lligands coordinats al centre metàl·lic. Per tant, aquestes propietats canviarien en funció del lligand que s'hi troba coordinat. Els complexos de ruteni amb lligands N-donadors presenten unes propietats espectroscòpiques, fotoquímiques i electroquímiques<sup>2</sup> molt interessants i això els fa estar entre els més estudiats i més utilitzats. Actualment, hi ha certs estudis que contempen l'aplicació de complexos de ruteni com a agents de tractament de quimioteràpia per a pacients amb càncers com el de mama o el de pròstata.<sup>3</sup>

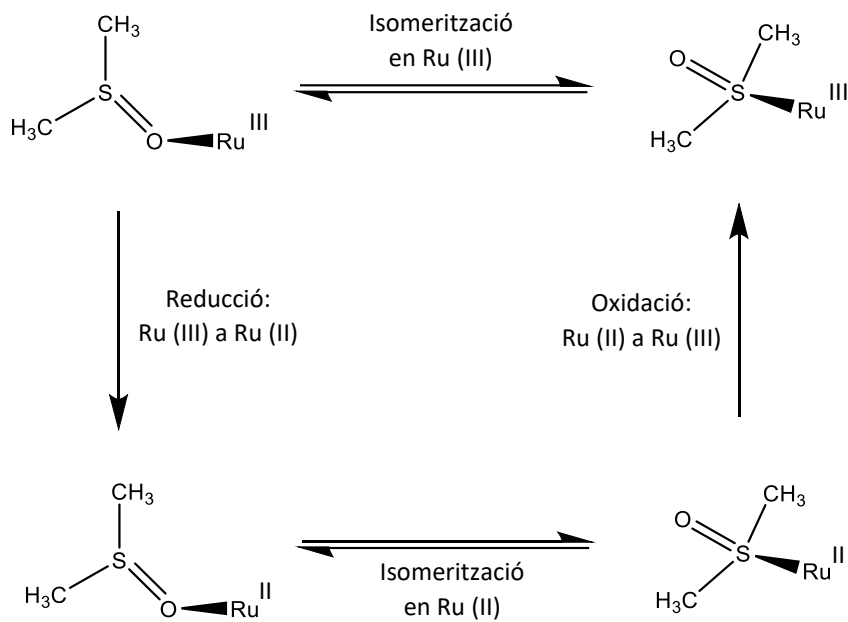
Algunes de les característiques que presenten aquests complexos de ruteni són la seva alta capacitat de transferència d'electrons, un caràcter robust de la seva esfera de coordinació o l'estabilitat dels seus estats d'oxidació elevats.

### Complexos de ruteni amb lligands DMSO

La química dels complexos de metalls de transició amb lligands sulfòxid actualment rep un interès elevat degut a la gran importància d'aquests compostos com a agents antitumorals.<sup>4</sup>

En complexos de ruteni, els lligands dimetilsulfòxid (DMSO) poden estar coordinats per àtoms d'oxigen i sofre depenent de l'estat d'oxidació del metall, i en funció de l'enllaç sulfòxid, les propietats d'aquests compostos variaran.

L'enllaç M-S s'afavoreix quan existeix  $\pi$ -retrodonació d'orbitals metàl·lics a orbitals del DMSO, ja que aquest lligand té una capacitat  $\pi$ -acceptora major quan es coordina a través de sofre. Això passa amb el Ru (II), que estabilitza l'enllaç Ru-S cedint densitat d'electrons  $\pi$  als orbitals buits del lligand DMSO. Quan hi ha una oxidació de Ru (II) a Ru (III) es disminueix la capacitat de  $\pi$ -retrodonació dels orbitals metàl·lics als orbitals DMSO i l'enllaç Ru-S es debilita, produint-se en alguns casos la isomerització d'aquest, on el metall quedarà enllaçat a l'oxigen. Aquesta tendència s'ha confirmat en nombrosos complexos Ru-DMSO (veure Esquema 1), i s'explica també per la teoria d'àcids i bases durs/ous de Pearson: l'àtom de sofre del DMSO és una base de Lewis més tova i és més afí a Ru(II), que és un àcid de Lewis més tou que Ru(III). En canvi, la coordinació a través d'oxigen (base més dura) està més afavorida per a Ru(III).<sup>5</sup>



Esquema 1. Procés d'isomerització del lligand DMSO en complexos de ruteni per un canvi d'estat d'oxidació

A més, els complexos Ru(III) amb lligands S-DMSO en la seva esfera de coordinació presenten una altra característica: a causa de les propietats  $\pi$ -acceptores del S-DMSO, el seu potencial redox és especialment elevat i la seva reducció *in vivo* a Ru(II) és favorable, fent-los més làbils i, per tant, més actius.

### Complexos de ruteni com a agents antitumorals

Actualment, els compostos organometàl·lics han demostrat ser molt importants en tractaments terapèutics gràcies al seu efecte sinèrgic entre les propietats medicinals dels lligands i les característiques químiques dels metalls de transició.

Els compostos de platí, més concretament el cisplatí (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) i els seus derivats, constitueixen més del 50% en teràpies contra el càncer degut a la seva estructura. Tot i així, es planteja la necessitat de desenvolupar complexos metàl·lics que puguin ser usats en teràpies anticancerígenes com a substituïts als compostos de platí, degut al seu elevat cost d'obtenció, a la seva baixa efectivitat en certs tipus de càncer, a que diverses línies cel·lulars poden presentar resistència cap a ell i, a més, una àmplia gamma d'efectes secundaris. Per això es sintetitzen els complexos de ruteni per millorar l'activitat del cisplatí, especialment en tumors resistents.<sup>6</sup>

Els complexos de ruteni presenten menys toxicitat gràcies a la seva major selectivitat. S'ha observat que els complexos basats en ruteni s'acumulen en creixements anormals de teixits o neoplasmes gràcies a la seva tendència d'unió a la transferrina, una glicoproteïna plasmàtica que controla els nivells de ferro lliure en fluids biològics. El teixit neoplàsic sobreexpressa els receptors de transferrina tot permetent l'entrada dels complexos de ruteni a la cèl·lula per

endocitosi<sup>7</sup> i per això s'observa una major concentració d'aquests compostos en cèl·lules tumorals en comparació amb cèl·lules sanes.<sup>8</sup>

S'ha comprovat que els compostos de ruteni octaèdrics que contenen lligands polipirídics i bons grups sortints (ligands làbils) interactuen amb l'ADN intercalant-se seguint els mateixos passos que el cisplatí: s'alliberen els lligands làbils i es formen espècies *aqua* que s'uneixen a les nucleobases. Actualment, tres complexos de Ru(III) (NAMI-A, KP1019 i NKP-1339), es troben en fase d'assaigs clínics. (Figura 1)

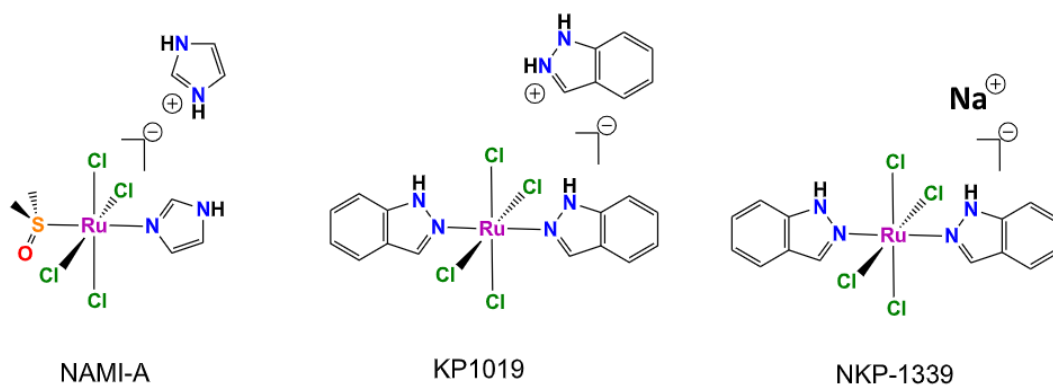


Figura 1. Estructura dels agents anticancerígens de ruteni NAMI-A, KP1019 i NKP-1339

Encara que tenen similituds estructurals, difereixen dràsticament en les activitats antitumorals. NAMI-A pot inhibir la formació de metàstasi en models de tumors animals, però no mostra efectes citotòxics directes, mentre que KP1019 ha demostrat efectes antitumorals directes contra una àmplia varietat de xenoempelts tumorals i NKP-1339 sembla induir el bloqueig de la síntesi d'ADN.<sup>9</sup>

Els tres complexos estan encara en assajos clínics, i és per això que és interessant desenvolupar més complexos amb altres lligands per tal d'avaluar els possibles mecanismes d'acció antitumoral.

D'altra banda, els complexos de ruteni poden seguir també un mecanisme d'intercalació en l'ADN, interferint en la seva replicació i portant per tant a la mort cel·lular.<sup>10</sup> Aquesta via pot estar afavorida en el cas de complexos amb lligands policíclics que tinguin una estructura estesa deslocalitzada, que podria inserir-se fàcilment entre les cadenes.<sup>11</sup>

## Teràpia fotodinàmica (PDT)

La teràpia fotodinàmica (*Photodynamic therapy*, PDT) és un tractament oncològic basat en l'aplicació d'un fotosensibilitzador (PS) i la posterior activació amb llum de la longitud d'ona i la intensitat adequades. Això crea una reacció fotodinàmica (PDR) que pot arribar a reduir i extirpar teixits tumorals i vasculars.<sup>12</sup>

La PDT va ser descoberta accidentalment fa uns 100 anys per un estudiant de medicina, Oscar Raab que, investigant la interacció de colorants fluorescents en microorganismes, va descobrir que l'aplicació d'una llum intensa al colorant, provocava una ràpida destrucció d'aquests.

La PDT aplicada al tractament del càncer consisteix en l'administració del fotosensibilitzador (de forma tòpica o intravenosa), de manera que s'acumuli de forma preferent en el teixit tumoral. Posteriorment s'exposa el teixit a una llum de longitud d'ona adequada per tal d'activar el PS, que serà diferent en funció de la seva natura.

Les diferents vies per al mecanisme de la PDT es detallen a la Figura 2.

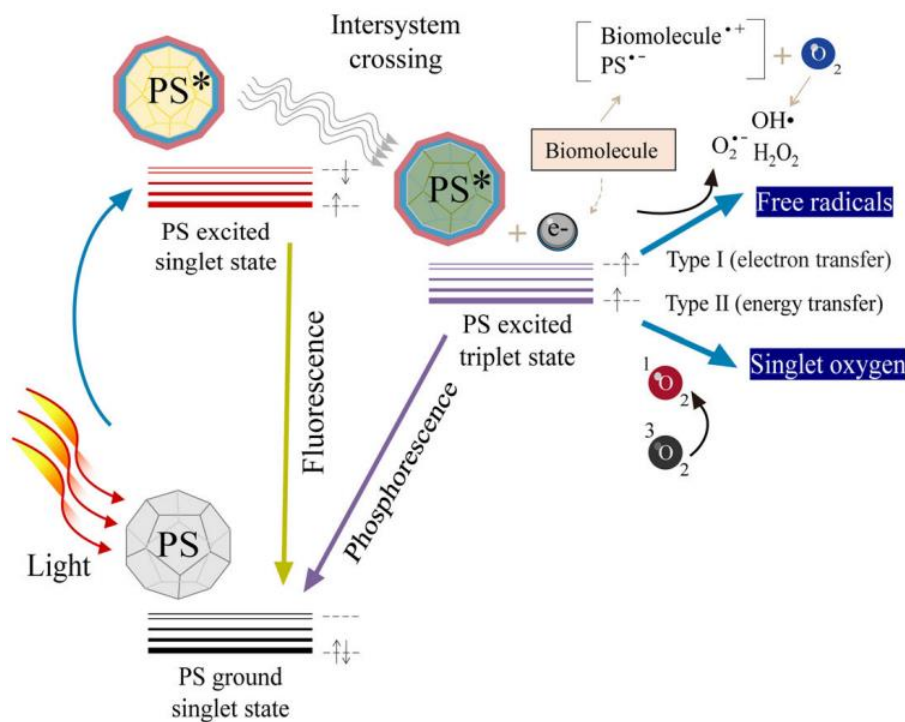


Figura 2. Vies per al mecanisme de la PDT.<sup>13</sup>

Com s'ha mencionat anteriorment, el procés comença amb l'excitació del fotosensibilitzador, i aquest estat excitat pot decaure a l'estat fonamental amb emissió de llum (fluorescència), o bé pot tenir lloc un canvi d'estat d'espín de singlet a triplet en l'estat excitat (creuament intersistema), des d'on pot retornar també a l'estat fonamental amb emissió de fosforescència. Aquestes vies de retorn a l'estat fonamental poden ser també de tipus no radiatiu (tèrmic) en els dos casos. Les vies de decaïment a l'estat fonamental no són útils per a la PDT, però un cop el fotosensibilitzador es troba en l'estat excitat triplet, poden donar-se altres mecanismes que porten a la destrucció de les cèl·lules tumorals:

- Pot perdre o guanyar electrons i fer reaccions redox amb les pròpies biomolècules, o bé amb l'oxigen ( $O_2$ ), per donar lloc a formes reduïdes com l'anió superoxo ( $O_2^-$ ) o altres espècies reactives d'oxigen (ROS) com ara els radicals hidroxil ( $HO\cdot$ ), hidroperoxil ( $HOO\cdot$ ) o superòxid ( $O_2\cdot^-$ ). Aquest mecanisme es denota com a "Type I".

- Pot transmetre l'energia a l'oxigen ( $O_2$ ) i portar-lo a la forma energèticament excitada oxigen singlet ( $^1O_2$ ), que també es considera una forma de ROS i és molt més oxidant que l'estat fonamental triplet. L'oxigen singlet és capaç d'atacar les biomolècules, i aquest mecanisme es coneix com a "Type II".

Entre els diferents fotosensibilitzadors que s'han avaluat en teràpia fotodinàmica hi ha molècules orgàniques (com per exemple el blau de metilè, o compostos amb estructures de tipus porfirina com la clorina e6) i també complexos metàl·lics d'iridi o de ruteni, que són coneguts per les propietats fotoquímiques dels seus complexos.

## OBJECTIVES

The main objective is to synthesize and characterize ruthenium compounds with N-donor ligands with potential anticancer properties.

The specific objectives are:

- Synthesis of the 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2''-terpyridine (*trpy-pyr*) ligand

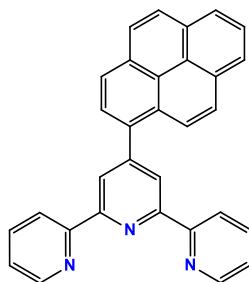


Figura 3. Structure of 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2''-terpyridine ligand

- Synthesis of new ruthenium complexes containing the *trpy-pyr* ligand in combination with other ligands such as terpyridine, chlorido (Cl) or dimethyl sulfoxide (DMSO) ligands.

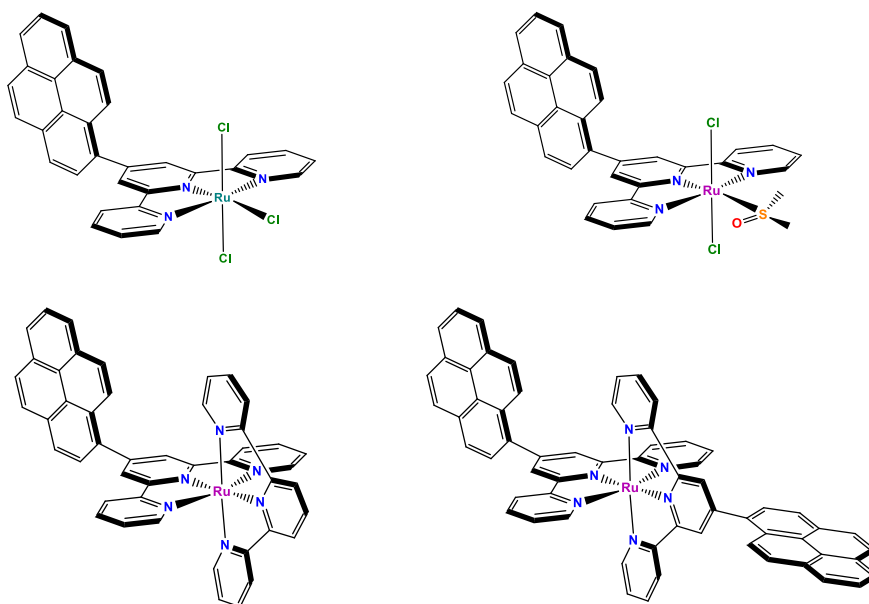


Figura 4. Structure of the target complexes

- Spectroscopical and electrochemical characterization of the different complexes.
- Testing solubility and fluorescence of the compounds in cell culture media in order to assess the conditions to evaluate their potential as antitumor agents.

## METODOLOGIA

### Instrumentació

#### Espectroscòpia <sup>1</sup>H-RMN

Per a realitzar les anàlisi de ressonància de protó s'ha utilitzat un espectròmetre *Bruker DPX* de 400MHz. Les mostres que s'han portat a l'instrument, han sigut dissoltes amb dissolvents deuterats adients per cada una d'elles: DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, acetona-d<sub>6</sub> o metanol-d<sub>4</sub>.

#### ESI-MS

Els experiments ESI-MS s'han dut a terme a través d'un cromatògraf *Navigator LC/MS de Thermo Quest Finnigan*.

#### UV-vis

Per les anàlisis d'espectroscòpia UV-vis s'ha utilitzat un espectrofotòmetre *Cary 50 Scan* amb una cel·la de quars d'1cm d'amplada.

#### Voltametria cíclica

Les mesures de voltametria cíclica s'han fet utilitzant un potenciostat *IJ-Cambria IH-660*. Els elèctrodes que s'han fet servir son:

- Elèctrode de referència: elèctrode saturat de calomelans (SCE)
- Elèctrode auxiliar: fil de platí
- Elèctrode de treball: disc de grafit de 3 mil·límetres de diàmetre

Les dissolucions utilitzades per registrar les voltametries han sigut de diclorometà amb una concentració de 0.1M de TBAH.

Els valors d' $E_{1/2}$  que es calculen en aquesta memòria s'han estimat mitjançant l'equació (eq. 1) a partir de la mitjana dels potencials dels pics anòdics i catòdics.

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (\text{eq. 1})$$

## Síntesis de compostos

### Síntesi del lligand 4'-(pyrenyl)-2,2';6',2''-terpyridine (*trpy-pyr*) [1]

Per a la síntesi del lligand [1] s'ha seguit un protocol descrit anteriorment a la bibliografia<sup>14</sup>: en un baló de fons rodó s'addicionen 0.916 grams d'*1-pyrenylaldehyde*, 0.95 grams (880µL) de *2-acetyl*, 5.61 grams d'*acetamide* i 4.13 grams d'*ammonium acetate*. Es porta a reflux durant 3 hores a 180°C sota agitació magnètica. Un cop passades les 3 hores, la dissolució que ara presenta un color marró-vermellós, es deixa refredar fins a una temperatura de 120°C i s'hi afegeixen 4.80 grams de NaOH prèviament dissolts en 9.6mL d'aigua destil·lada. Aquesta solució es manté durant 2 hores a la temperatura mencionada i sense agitació. Finalitzat aquest temps, es deixa refredar el cru amb aspecte oliós a temperatura ambient i es fa una extracció líquid-líquid amb cloroform. Seguidament s'asseca la fase orgànica amb sulfat de magnesi, es filtra per gravetat i s'evapora a sequedat al rotavapor. El producte que s'obté presenta un aspecte oliós de color verd fosc. Per purificar-lo es realitza una columna cromatogràfica de sílice començant amb hexà com a eluent i augmentant progressivament la polaritat amb acetat d'etil fins arribar a una relació hexà:acetat d'etil 8:2. **Rendiment:** 13.72 % (258.3mg). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.7788, s, H<sub>5</sub>, H<sub>15</sub>; 8.7672, d, J<sub>4-5</sub>=0.02 Hz, J<sub>16-15</sub>=0.02 Hz, H<sub>4</sub>, H<sub>16</sub>; 8.6991, d, J<sub>1-2</sub>=0.01 Hz, J<sub>19-18</sub>=0.01 Hz, H<sub>1</sub>, H<sub>19</sub>; 8.1511, m, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>; 7.9242, t, J<sub>3-1/2</sub>=0.02 Hz, J<sub>17-16/18</sub>=0.02 Hz, H<sub>3</sub>, H<sub>17</sub>; 7.3650, t, J<sub>2-1/3</sub>=0.01 Hz, J<sub>18-17/19</sub>=0.01 Hz, H<sub>2</sub>, H<sub>18</sub>. L'esquema de numeració per a l'assignació de senyals és el que es mostra a la Figura 5 (apartat de Resultats i discussió).

### Síntesi de [RuCl<sub>3</sub>(trpy-pyr)] [2]

En un baló de fons rodó s'afegeixen 0.268 grams de lligand [1] i 0.152 grams de RuCl<sub>3</sub>·2.53 H<sub>2</sub>O en una solució d'etanol absolut:metanol 7:3. Tot seguit s'addicionen 0.248 grams de LiCl (10 equivalents respecte el RuCl<sub>3</sub>) i es porta a reflux durant 3 hores i sota agitació magnètica. Es deixa refredar a temperatura ambient i es redueix el volum al rotavapor. Precipita un sòlid fosc que es filtra al buit i es renta amb TBME. **Rendiment:** 59.48 % (299mg).

### Síntesi de [RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] [3]

En un baló de fons rodó s'addicionen 0.6 grams de RuCl<sub>3</sub>·2.53 H<sub>2</sub>O en 6mL de DMSO i es porta a reflux durant 12 minuts a una temperatura de 150°C sota agitació magnètica. Un cop finalitzat, es traspasa el cru de la reacció de color ataronjat a un vas de precipitats i s'hi afegeixen 10mL d'acetona per fer precipitar un sòlid groc que es filtra al buit i es renta amb acetona. **Rendiment:** 52.20 % (600.5mg).

### Síntesi de [RuCl<sub>2</sub>(trpy-pyr)(DMSO)] [4]

En un baló de fons rodó de dues boques s'aboquen 0.15 grams de [3] i 0.134 grams de lligand [1]. Tot seguit s'afegeixen 10mL de cloroform prèviament desoxigenat sota bombolleig de nitrogen. Es posa a reflux sota atmosfera de N<sub>2</sub> i aïllat de la llum durant 6 hores amb agitació magnètica. Un cop finalitzat el reflux, es deixa refredar el cru de la reacció amb aspecte granatós i es porta al congelador. Precipita un sòlid fosc que es filtra al buit i es renta 3 cops amb TBME. Es purifica el producte mitjançant columna de sílice utilitzant acetat d'etil:etanol absolut 9:1 com



a mescla d'elució. **Pes obtingut:** 34.4mg. **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.4394, d, J<sub>1-2</sub>=0.01 Hz, J<sub>19-18</sub>=0.01 Hz, H<sub>1</sub>, H<sub>9</sub>; 8.4172, s, H<sub>5</sub>, H<sub>15</sub>; 8.3786-8.1141, m, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>; 7.8117, t, J<sub>3-2/4</sub>=0.02 Hz, J<sub>17-16/18</sub>=0.02 Hz, H<sub>3</sub>, H<sub>17</sub>; 7.4620, t, J<sub>2-1/3</sub>=0.02 Hz, J<sub>18-17/19</sub>=0.02 Hz, H<sub>2</sub>, H<sub>18</sub>; 3.8217, s, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>. L'esquema de numeració per a l'assignació de senyals és el que es mostra a la Figura 6 (apartat de Resultats i discussió). **ESI-MS:** 706 [M+Na]<sup>+</sup>, 648 [M-Cl]<sup>+</sup>, 570 [M-Cl-dmso]<sup>+</sup>. **UV-vis:** (DMSO) [λ<sub>màx</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>): 280 (21213), 328 (21237), 524 (3644)]. **VC:** E<sub>1/2</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 0.1M TBAH) = 0.696 V (Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup>) respecte SCE; calculat a partir de la Figura 14.

### Síntesi de [Ru(trpy-pyr)(trpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> [5]

Aquest compost s'ha sintetitzat a partir de dues vies sintètiques diferents, que es descriuen a continuació.

#### Mètode A:

En un baló de fons rodó de dues boques s'aboquen 0.05 grams de [2] i 0.024 grams de 2,2':6',2''-terpyridine. Tot seguit s'afegeixen 30mL d'etanol, prèviament desoxigenat sota bombolleig de nitrogen, juntament amb 2mL de trietilamina i es posa a reflux sota atmosfera de N<sub>2</sub> durant 4 hores amb agitació magnètica. Un cop finalitzat el reflux, es deixa refredar el cru de la reacció i es porta al congelador. Precipita un producte secundari que es filtra per gravetat. Finalment s'afegeixen al filtrat 10mL de solució aquosa saturada de KPF<sub>6</sub>, es redueix el volum al rotavapor fins que apareix un precipitat i es filtra al buit, rentant amb TBME. **Pes obtingut:** 277.9mg.

#### Mètode B:

En un baló de fons rodó de dues boques s'aboquen 42.0mg de [4] i 14.8mg de 2,2':6',2''-terpyridine. Tot seguit s'afegeixen 45mL d'etanol absolut prèviament desoxigenat sota bombolleig de nitrogen. Es posa a reflux sota atmosfera de N<sub>2</sub> durant 6 hores amb agitació magnètica. El cru de reacció es filtra per gravetat i es redueix el volum de la dissolució resultant al rotavapor. Tot seguit s'afegeixen 15mL de solució aquosa saturada de KPF<sub>6</sub>, i es porta al congelador durant 15 minuts per tal de formar un precipitat que es filtra al buit i es renta amb TBME. **Rendiment:** 80,47 % (54mg)

La caracterització d'aquest complex s'ha dut a terme a partir del Mètode A. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-d) δ 9.4362, s, H<sub>16</sub>, H<sub>26</sub>; 9.1236, d, J<sub>5-6</sub>=0.02 Hz, J<sub>7-6</sub>=0.02 Hz, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>; 8.9918, d, J<sub>15-14</sub>=0.02 Hz, J<sub>27-28</sub>=0.02 Hz, H<sub>15</sub>, H<sub>27</sub>; 8.8714, d, J<sub>4-3</sub>=0.02 Hz, J<sub>8-9</sub>=0.02 Hz, H<sub>4</sub>, H<sub>8</sub>; 8.7422, d, J<sub>18-17</sub>=0.02 Hz, H<sub>18</sub>; 8.6517, d, J<sub>25-24</sub>=0.02 Hz, H<sub>25</sub>; 8.5638, t, J<sub>6-5</sub>=0.02 Hz, J<sub>6-7</sub>=0.02 Hz, H<sub>6</sub>; 8.5389, d, J<sub>24-25</sub>=0.02 Hz, H<sub>24</sub>; 8.4637, 8.4461, 8.4049, m, H<sub>17</sub>, H<sub>21</sub>, H<sub>23</sub>; 8.3931, s, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>; 8.2142, dd, J<sub>22-21/23</sub>=0.02 Hz, H<sub>22</sub>; 8.0738, t, J<sub>9-10/8</sub>=0.02 Hz, J<sub>3-2/4</sub>=0.02 Hz, H<sub>9</sub>, H<sub>3</sub>; 8.0122, t, J<sub>14-13/15</sub>=0.02 Hz, J<sub>28-27/29</sub>=0.02 Hz, H<sub>14</sub>, H<sub>28</sub>; 7.7495, d, J<sub>1-2</sub>=0.01 Hz, J<sub>11-10</sub>=0.01 Hz, H<sub>1</sub>, H<sub>11</sub>; 7.4944, d, J<sub>12-13</sub>=0.01 Hz, J<sub>30-29</sub>=0.01 Hz, H<sub>12</sub>, H<sub>30</sub>; 7.3725, t, J<sub>2-1/3</sub>=0.02 Hz, J<sub>10-9/11</sub>=0.02 Hz, H<sub>2</sub>, H<sub>10</sub>; 7.2896, t, J<sub>13-12/14</sub>=0.02 Hz, J<sub>29-28/30</sub>=0.02 Hz, H<sub>13</sub>, H<sub>29</sub>. L'esquema de numeració per a l'assignació de senyals és el que es mostra a la Figura 7 (apartat de Resultats i discussió). **ESI-MS:** 913 [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 803 [M-2PF<sub>6</sub>+Cl]<sup>+</sup>, 384 [M-2PF<sub>6</sub>]<sup>2+</sup>. **UV-**

**vis:** (DMSO) [ $\lambda_{\text{màx}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ): 276 (7640), 316 (7833), 496 (2600). **VC:**  $E_{1/2}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 0.1M TBAH) = 1.241 V ( $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ ) respecte SCE; calculat a partir de la Figura 17a.

### Síntesi de $[\text{Ru}(\text{trpy-pyr})_2](\text{PF}_6)_2$ [6]

En un baló de fons rodó de dues boques s'afegeixen 0.05 grams de [2] i 0.045 grams de lligand [1]. Tot seguit s'afegeixen 30mL d'etanol, prèviament desoxigenat sota bombolleig de nitrogen juntament amb 2ml de trietilamina i es posa a reflux sota atmosfera de  $\text{N}_2$  durant 4 hores amb agitació magnètica. Un cop finalitzat el reflux, es filtra per gravetat en calent. Finalment s'afegeixen 10mL de solució aquosa saturada de  $\text{KPF}_6$ , es redueix el volum al rotavapor fins que apareix un precipitat, que es filtra al buit i es renta amb TBME. **Pes obtingut:** 248.5mg.  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz, acetona-d)  $\delta$  9.4192, s,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{15}$ ; 9.0294, d,  $J_{4-3}=0.02$  Hz,  $J_{16-17}=0.02$  Hz  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_{16}$ ; 8.7381, d,  $J_{6-7}=0.02$  Hz,  $\text{H}_6$ ; 8.6258, d,  $J_{14-13}=0.02$  Hz,  $\text{H}_{14}$ ; 8.5507, d,  $J_{13-14}=0.02$  Hz,  $\text{H}_{13}$ ; 8.4677, d,  $J_{10-11}=0.02$  Hz,  $\text{H}_{10}$ ; 8.4473, d,  $J_{12-11}=0.02$  Hz,  $\text{H}_{12}$ ; 8.3878, s,  $\text{H}_{8,9}$ ; 8.3788, d,  $J_{7-6}=0.02$  Hz,  $\text{H}_7$ ; 8.2152, t,  $J_{11-10/12}=0.02$  Hz,  $\text{H}_{11}$ ; 8.1183, t,  $J_{3-2/4}=0.02$  Hz,  $J_{17-16/18}=0.02$  Hz,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_{17}$ ; 8.0142, d,  $J_{1-2}=0.01$  Hz,  $J_{19-18}=0.01$  Hz,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_{19}$ ; 7.4307, t,  $J_{2-1/3}=0.02$  Hz,  $J_{18-19/17}=0.02$  Hz,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_{19}$ . L'esquema de numeració per a l'assignació de senyals és el que es mostra a la Figura 8 (apartat de Resultats i discussió). **ESI-MS:** 1113  $[\text{M-PF}_6]^+$ , 1003  $[\text{M-2PF}_6+\text{Cl}]^+$ , 484  $[\text{M-2PF}_6]^{2+}$ . **UV-vis:** (DMSO) [ $\lambda_{\text{màx}}$ , nm ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ): 278 (20384), 316 (17260), 496 (6776). **VC:**  $E_{1/2}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 0.1M TBAH) = 1.27 V ( $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ ) respecte SCE; calculat a partir de la Figura 18a.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### Síntesi i determinació estructural

#### Espectroscòpia $^1\text{H}$ -RMN

La primera síntesi que té lloc en aquest Treball de Fi de Grau és la del lligand *trpy-pyr* [1] a partir d'*1-pyrenylaldehyde*, *2-acetyl pyridine*, *acetamide* i *ammonium acetate*. Aquests quatre reactius es porten a reflux durant 3 hores a  $180^\circ\text{C}$  i un cop ha tingut lloc tot el procés de reacció, el sòlid resultant es purifica mitjançant cromatografia en columna de sílice.

El lligand [1] es caracteritza amb espectroscòpia  $^1\text{H}$ -RMN en cloroform deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ), espectre del qual és pot observar a la Figura 5. En aquest espectre s'han pogut assignar els protons del lligand, però agrupant els del grup pirè com a únic multiplet, ja que els senyals no es diferencien prou per a fer una assignació completa (*veure Metodologia*). Tot i així, es pot determinar que el senyal singlet que apareix a un desplaçament químic de 8.14 ppm, correspon als protons  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{13}$  i  $\text{H}_{14}$ , que degut a la lliure rotació del grup pirè, originen un senyal singlet al mateix desplaçament químic.

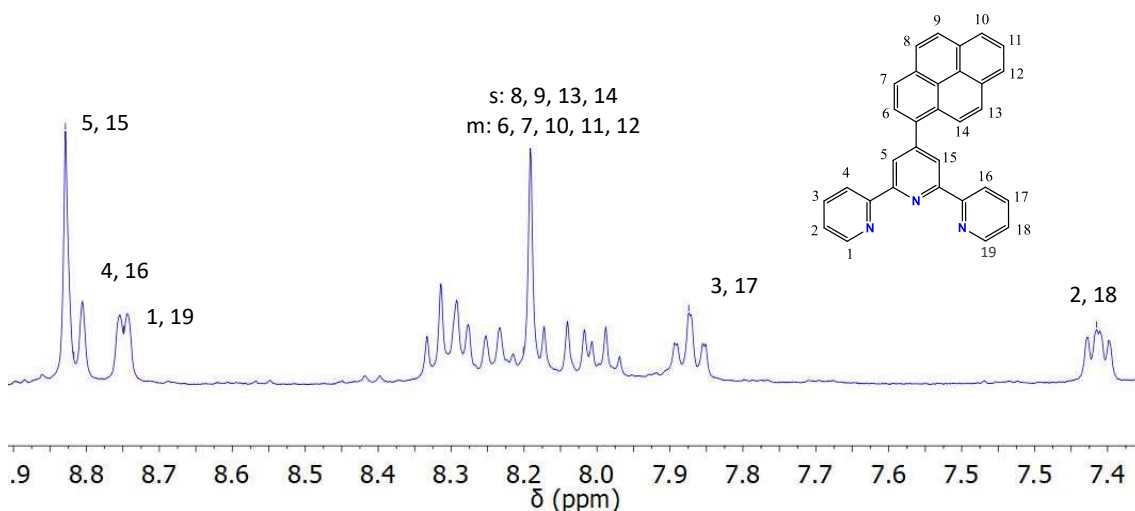
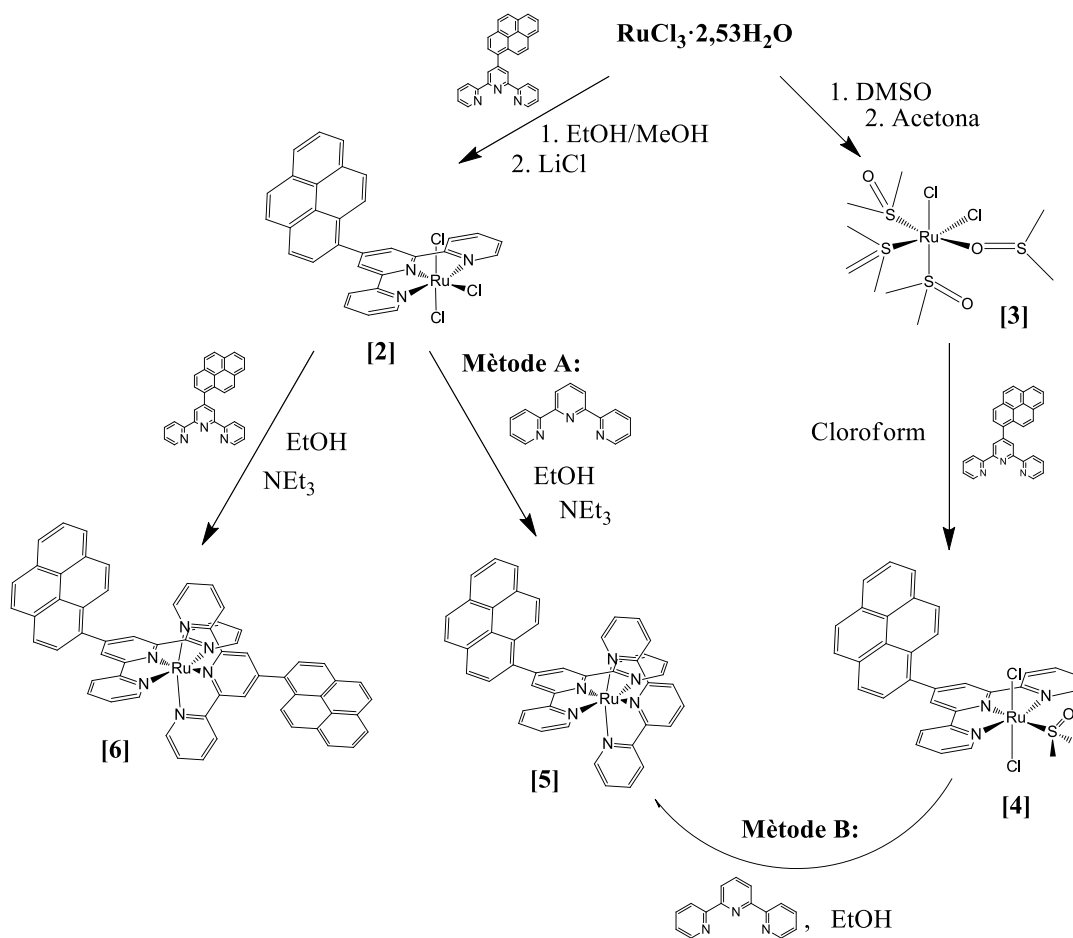


Figura 5. Esquema de numeració del lligand *trpy-pyr* [1] i el corresponent espectre  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$

Un cop sintetitzat el lligand [1], es plantegen les síntesis dels complexos [4], [5] i [6]. Tal i com es pot veure a la ruta sintètica de l'Esquema 2, han sigut també necessàries les síntesis dels complexos [2] i [3] com a compostos intermediaris.



Esquema 2. Rutes sintètiques per les síntesi dels complexos [4], [5] i [6] amb els intermedis [2] i [3]

Tot observant l'Esquema 2, es pot veure que es parteix de RuCl<sub>3</sub>·2,53 H<sub>2</sub>O comercial tant per la síntesi del complex [2] com del complex [3]. Pel primer d'ells, es fa reaccionar el triclòrid de ruteni (III) amb el lligand [1] prèviament sintetitzat en una mescla d'etanol absolut : metanol (7:3) i LiCl a reflux. Pel següent intermedi, el complex [3], també es parteix del RuCl<sub>3</sub>·2,53 H<sub>2</sub>O i es porta a reflux durant pocs minuts amb DMSO com a dissolvent.

Per obtenir el compost [4], s'utilitza el complex [3], tot reaccionant amb el lligand *trpy-pyr* [1] i cloroform com a dissolvent portant-ho a reflux sota atmosfera de nitrogen. Per altra banda, per a sintetitzar els compostos [5] i [6] es fa reaccionar el complex precursor [2] amb *terpyridine* comercial i amb el lligand [1] respectivament, sota atmosfera de nitrogen i en presència de trietilamina per reduir el centre metàl·lic de Ru(III) a Ru(II). El complex metàl·lic [5] també es va voler sintetitzar per una altra via (mètode B, Esquema 2) partint de [4] i *terpyridine* comercial usant etanol absolut com a dissolvent, però va originar millors resultats el mètode A.

Tots els productes s'han caracteritzat per espectroscòpia de <sup>1</sup>H-RMN i, en alguns casos, estudis *COSY* i *NOESY* per assignar els senyals de l'espectre de protó. A continuació es descriuen els espectres <sup>1</sup>H-RMN dels complexos [4], [5] i [6].

A la Figura 6 es representa l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN per al complex  $[\text{RuCl}_2(\text{trpy-pyr})(\text{DMSO})]$  **[4]**, registrat en  $\text{CDCl}_3$ , junt amb la numeració dels protons de la seva estructura.

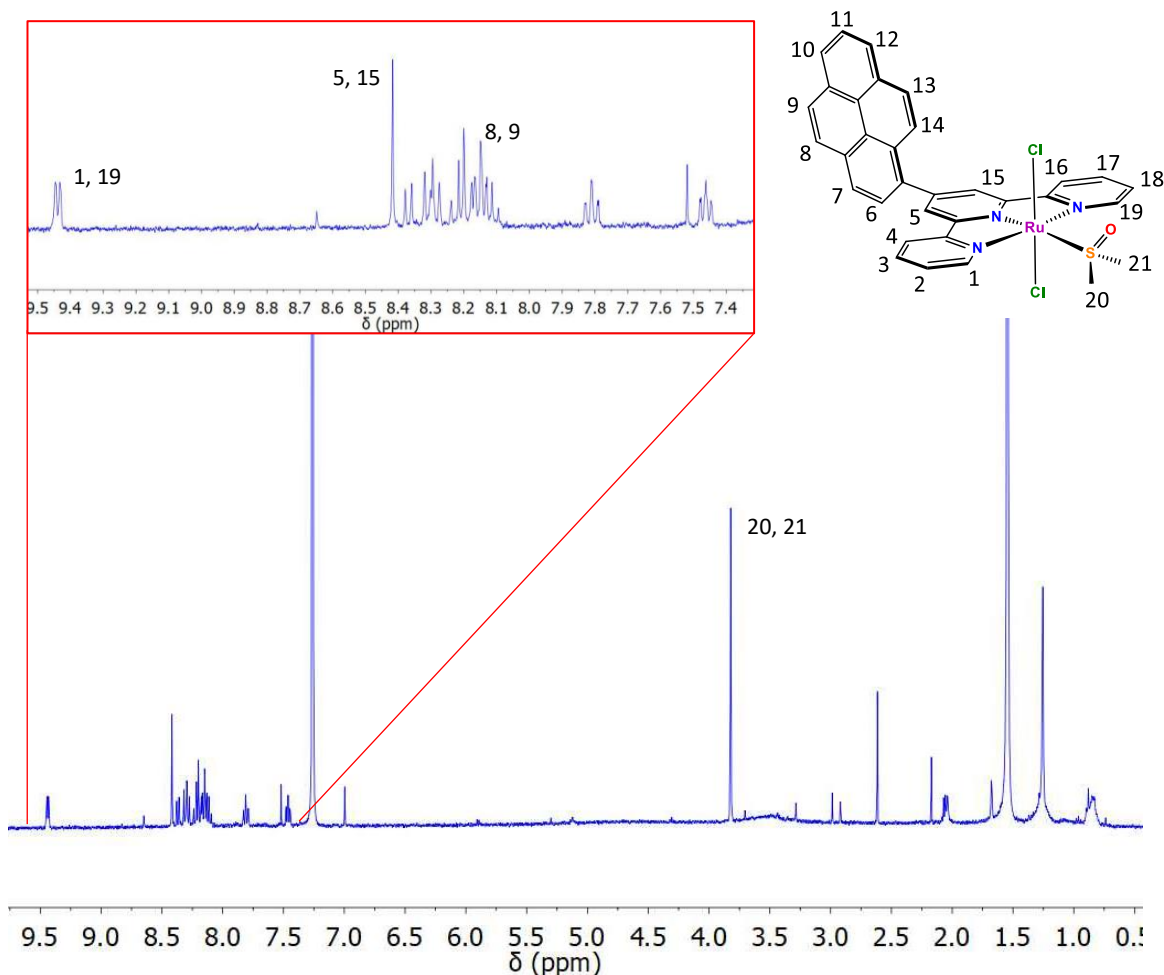


Figura 6. Esquema de numeració per al complex **[4]** i el corresponent espectre  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ .

A la síntesi del complex **[4]**, el sòlid inicialment aïllat correspon a una barreja de dos isòmers del producte: per una banda l'isòmer *trans*-Cl (representat a la Figura 6), a on els dos lligands cloro es troben en *trans* entre sí i el lligand DMSO es troba al mateix pla que el lligand tridentat *trpy-pyr* i, per una altra banda, l'isòmer *cis*-Cl, a on els dos lligands Cl es troben a  $90^\circ$  i un d'ells és coplanar amb el lligand tridentat. A partir de cromatografia en columna s'aconsegueix aïllar únicament l'isòmer *trans*-Cl, per al que s'ha registrat l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN que es mostra a la Figura 6.

A l'espectre s'observa principalment un senyal doblet molt desapantallat a un desplaçament químic de 9.43 ppm, que correspon als protons de les posicions  $\text{H}_1$  i  $\text{H}_{19}$ . Aquests protons es troben a valors de desplaçament especialment alts per la seva proximitat al lligand monodentat DMSO, coplanar amb *trpy-pyr*. El fenomen de desapantallament tindria lloc de manera similar per a l'isòmer *cis*-Cl a causa de la proximitat amb un lligand cloro (com s'ha descrit per altres complexos de ruteni amb lligands de tipus polipiridil<sup>15,16</sup>), per tant l'assignació de l'espectre a

l'isòmer *trans*-Cl s'ha fet en base a la descripció dels complexos anàlegs, descrits a la literatura,<sup>17</sup> que contenen el lligand *trpy* en lloc de *trpy-pyr*, i també als resultats de les voltametries cícliques realitzades a la mescla de compostos i a l'isòmer finalment aïllat, que s'explicaran més endavant a la secció de *Propietats electroquímiques* (Figura 14).

A part d'aquest senyal doblet, també s'observa un singlet a 8.4 ppm corresponent als protons H<sub>5</sub> i H<sub>15</sub> i un singlet a un desplaçament químic de 3.82 ppm dels 6 protons del DMSO, que indica que els dos metils tenen entorn magnètic similar a causa de la simetria del complex (H<sub>20</sub> i H<sub>21</sub>).

Seguidament, es pot veure l'espectre de protó per al complex [5] a la Figura 7.

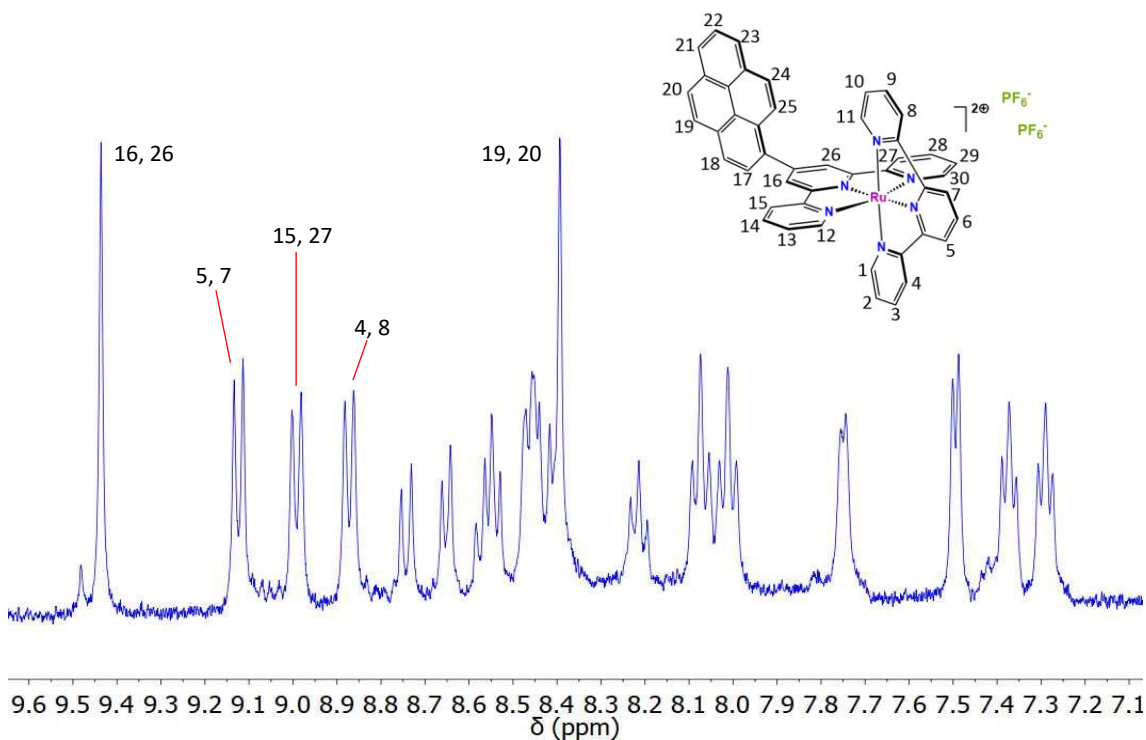


Figura 7. Esquema de numeració per al complex [5] i el corresponent espectre <sup>1</sup>H-RMN en DMSO-d.

D'aquesta representació anterior en destaquen els dos senyals singlets que apareixen a desplaçaments químics de 9.44 ppm i 8.39 ppm, corresponents als protons de l'anell central del lligand *trpy-pyr* (H<sub>16</sub> i H<sub>26</sub>) i a dos protons químicament equivalents del pirè (H<sub>19</sub> i H<sub>20</sub>), respectivament. Les assignacions dels protons dels anells piridil s'han pogut fer gràcies als experiments COSY i NOESY. Concretament, l'espectre NOESY permet assignar el doblet de 8.99 ppm als protons H<sub>15</sub> i H<sub>27</sub>, ja que s'observa un senyal NOE entre aquests protons i el singlet a 9.44 ppm. Això permet identificar i assignar, a partir del COSY, la resta de protons piridil de *trpy-pyr*. De forma similar, es pot identificar un segon NOE que té lloc entre els protons H<sub>5</sub>+H<sub>7</sub> i H<sub>4</sub>+H<sub>8</sub> del lligand *trpy* i que, amb ajuda del COSY, permet assignar també els protons d'aquest lligand. Finalment, per a l'assignació del grup pirè s'utilitza el COSY juntament amb els valors esperats de desplaçament químic que es poden trobar a les taules de referència.<sup>18</sup>

Finalment, a la Figura 8 s'hi troba l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN per al complex simètric [6].

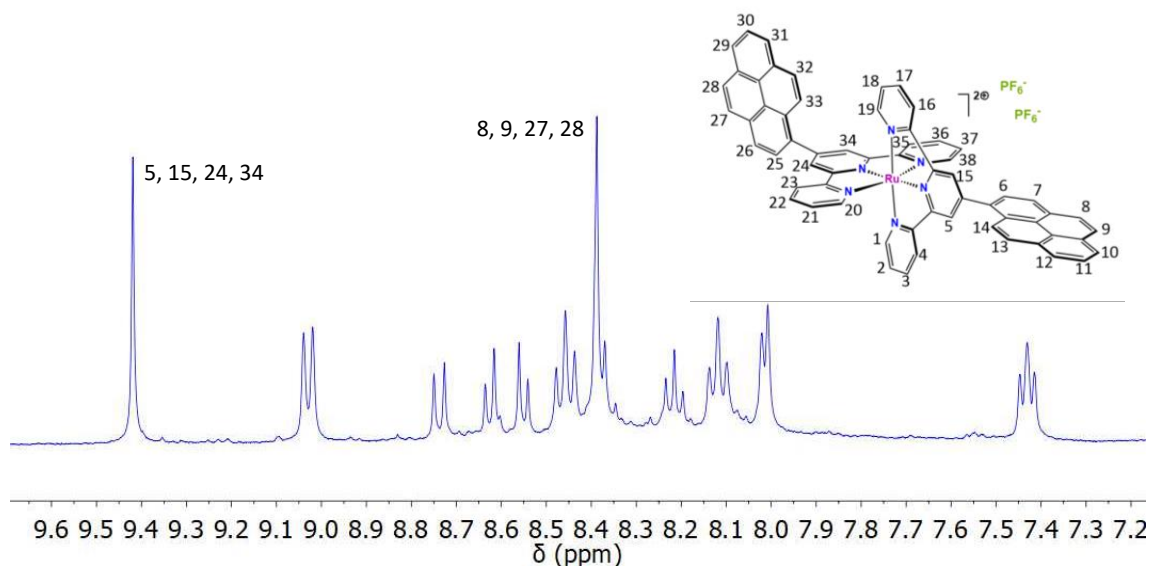


Figura 8. Esquema de numeració per al complex [6] i el corresponent espectre  $^1\text{H}$ -RMN en acetona-d.

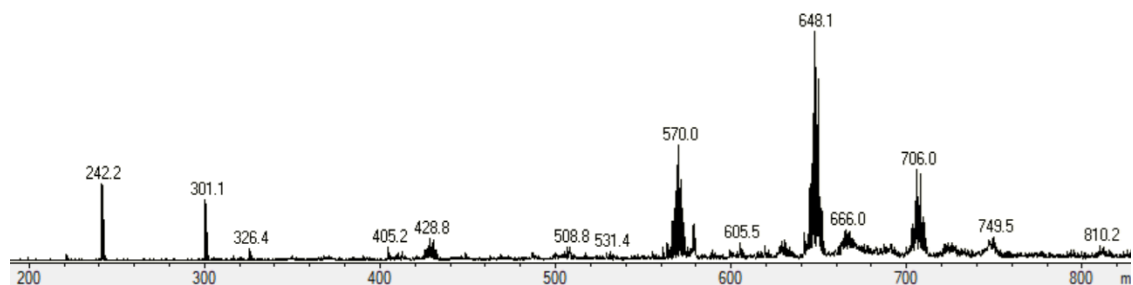
Aquí, a primera vista es veu un espectre més senzill degut a la simetria que presenta aquest complex ja que el centre metàl·lic de ruteni es troba coordinat a dos lligands *trpy-pyr*. De la mateixa manera que al complex anterior i com s'ha vist a la Figura 7, també destaquen els senyals singlets a 9.42 ppm ( $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{15}$ ,  $\text{H}_{24}$  i  $\text{H}_{34}$ ) i a 8.39 ppm ( $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{27}$  i  $\text{H}_{28}$ ). Com en el cas del complex [5], s'han pogut assignar tots els senyals gràcies als espectres NOESY i COSY, i a les taules de referència per al desplaçament químic dels protons en diferents entorns. La resta d'assignacions es troba descrita a l'apartat de metodologia.

### Espectrometria de masses (ESI-MS)

L'espectrometria de masses es basa en la ionització d'una substància originant espectres en funció de la massa i càrrega dels fragments ionitzats. S'ha realitzat l'espectre ESI-MS dels compostos [4], [5] i [6] dissolts en una mescla aigua/acetona.

En el cas del complex [4], es poden observar tres ions majoritaris: un pic a  $m/z = 570(+)$ , originat per la pèrdua d'un lligand clorur i el lligand dmsu ( $[\text{M}-\text{Cl}-\text{dmsu}]^+$ ), un altre a  $m/z = 648(+)$ , resultant de la pèrdua d'un lligand clorur ( $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ ), i un tercer a  $m/z = 706(+)$ , que és un adducte del complex amb catió sodi ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ). A la Figura 9 es pot observar un fragment de l'espectre obtingut experimentalment i també la simulació teòrica de la distribució isotòpica corresponent a l'adducte  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :

a)



b)

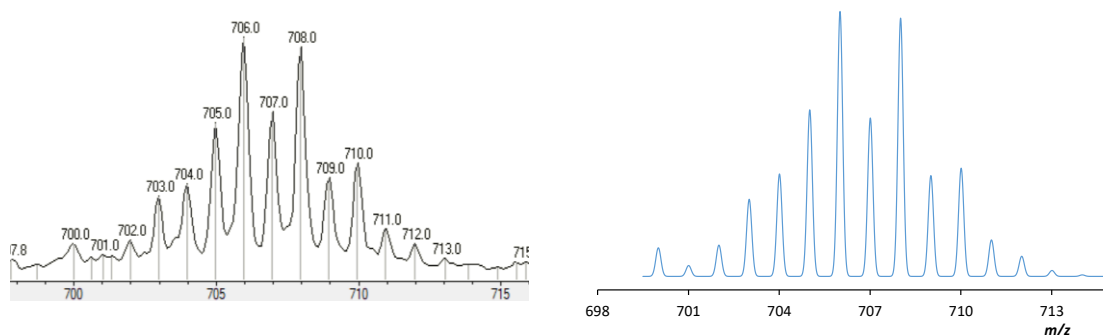


Figura 9. **a)** Espectre ESI-MS obtingut per al compost **[4]** en el rang de  $m/z$  entre 200 i 830. **b)** Pic observat (esquerra) i simulació teòrica (dreta) per a l'adducte del complex amb un catió sodi,  $[M+Na]^+$ .

Per al compost **[5]**, es pot detectar el pic dicarregat corresponent al fragment catiònic del complex a  $m/z = 384(2+)$ ,  $[M-2PF_6]^{2+}$ , i també dos adductes: un d'ells entre aquest fragment catiònic i un dels seus anions hexafluorofosfat ( $m/z = 913(+)$ ,  $[M-PF_6]^+$ ), i l'altre entre el fragment catiònic i un anió clorur ( $m/z = 803(+)$ ,  $[M-2PF_6+Cl]^+$ ) (Figura 10):



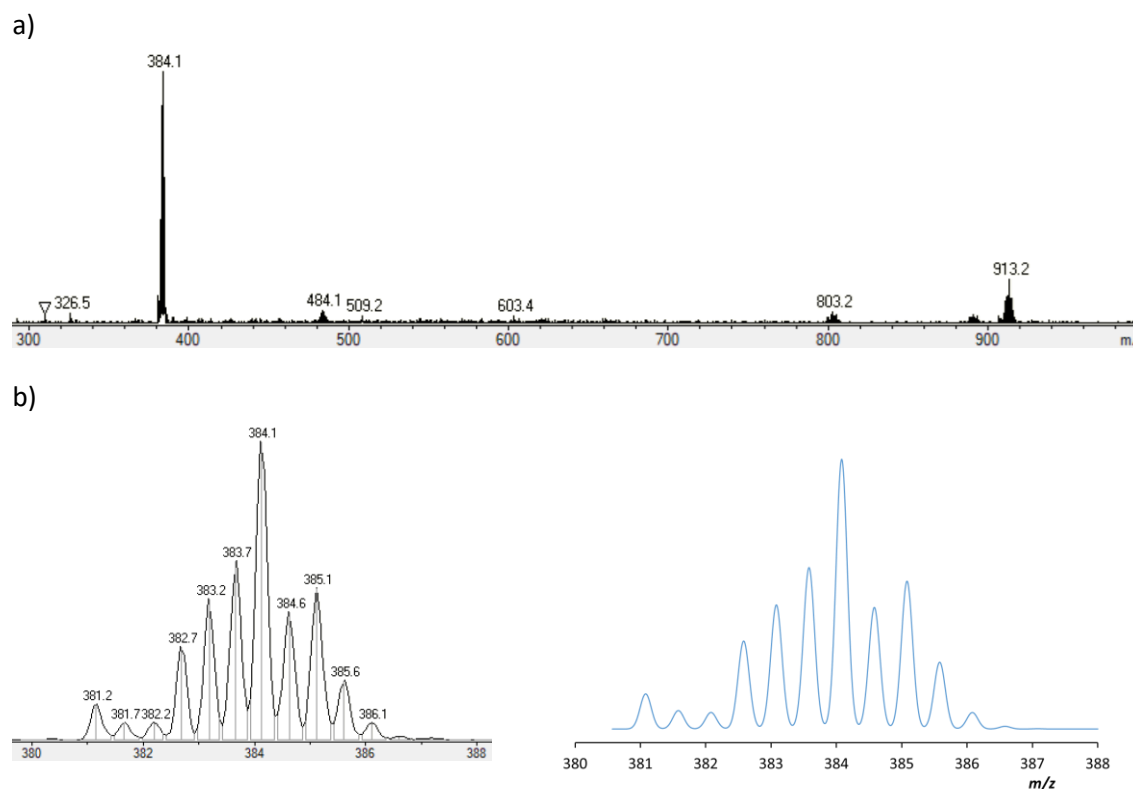
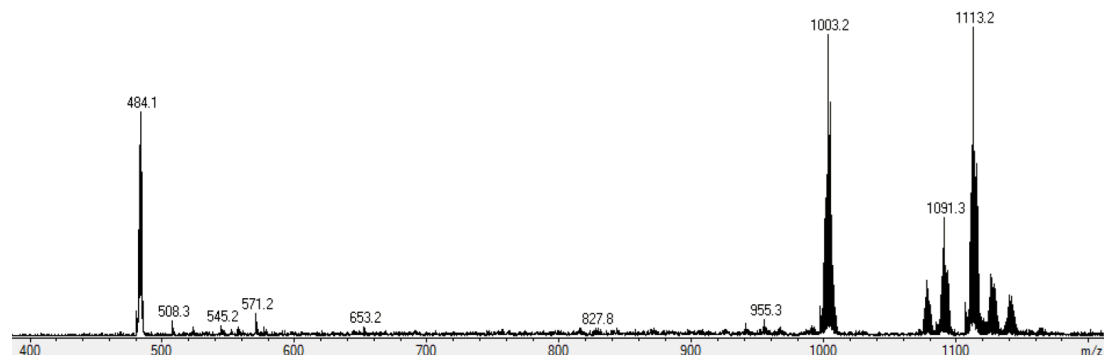


Figura 10. **a)** Espectre ESI-MS obtingut per al compost **[5]** en el rang de  $m/z$  entre 300 i 1000. **b)** Pic observat (esquerra) i simulació teòrica (dreta) per al fragment catiònic dicarregat del complex ( $[M-2PF_6]^{2+}$ ).

Finalment, per al compost **[6]**, es poden trobar pics anàlegs als descrits anteriorment per al compost **[5]**: el corresponent pic dicarregat del fragment catiònic del complex a  $m/z = 484(2+)$ ,  $[M-2PF_6]^{2+}$ , l'adducte amb un dels anions hexafluorofosfat ( $m/z = 1113(+)$ ,  $[M-PF_6]^+$ ), i un adducte amb un anió clorur ( $m/z = 1003(+)$ ,  $[M-2PF_6+Cl]^+$ ) (Figura 11):

a)



b)

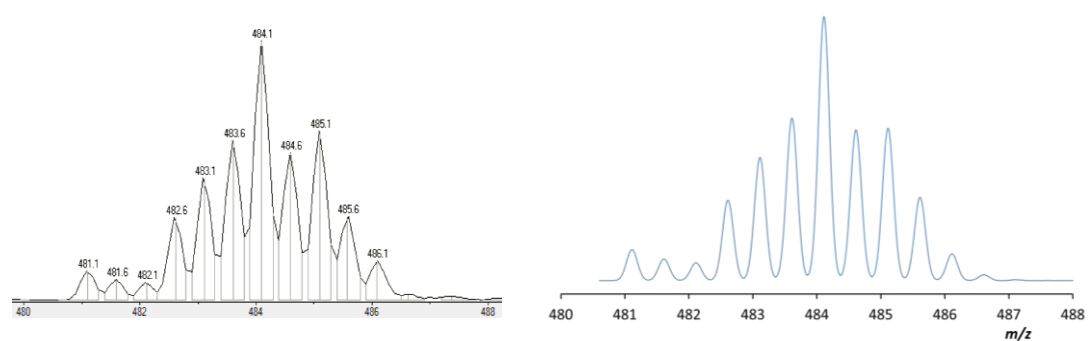


Figura 11. **a)** Espectre ESI-MS obtingut per al compost **[6]** en el rang de  $m/z$  entre 400 i 1200. **b)** Pic observat (esquerra) i simulació teòrica (dreta) per al fragment catiònic dicarregat del complex ( $[M-2PF_6]^{2+}$ ).

## Espectroscòpia UV-vis

També s'ha registrat un espectre UV-vis pels complexos **[4]**, **[5]** i **[6]** utilitzant DMSO com a dissolvent. Les concentracions que es van preparar van ser de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-5}$  M i se'n pot observar el resultat a la Figura 12.

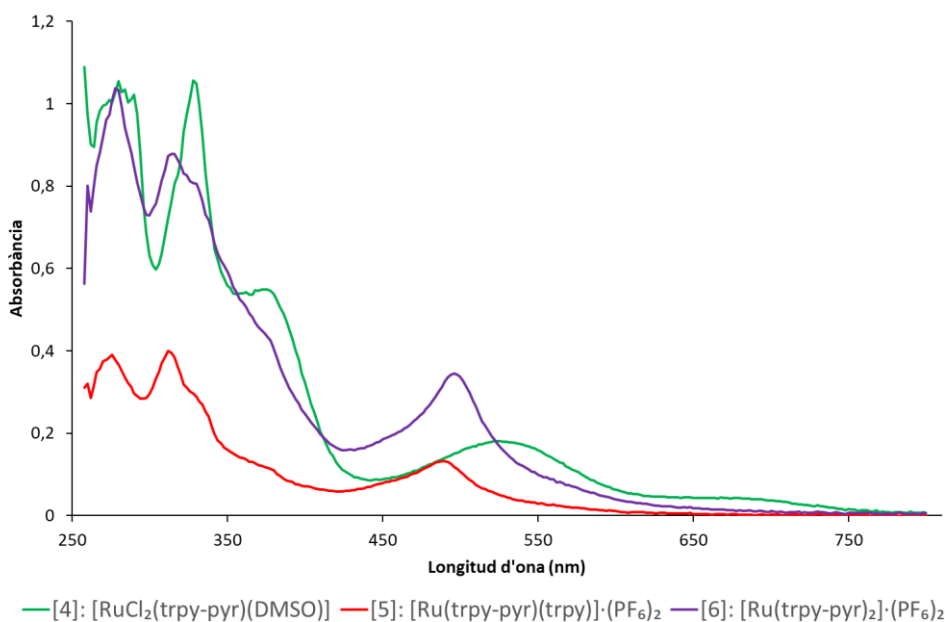


Figura 12. Espectre UV-vis per als complexos [4], [5] i [6] en DMSO

Tal i com es pot veure a la Figura anterior (Figura 12), els tres espectres mostren bandes a dos rangs de longituds d'ona diferents. Les que s'observen a longituds d'ona més baixes, entre 250-350nm, corresponen a les bandes de transició  $\pi \rightarrow \pi^*$  intramoleculares del lligand [1] i/o del lligand *trpy*. Per altra banda, les bandes de longitud d'ona al voltant dels 500nm corresponen a les transicions MLCT; és a dir, transferències de càrrega entre orbitals *d* del metall i orbitals  $\pi$  antienllaçants ( $\pi^*$ ) dels lligands aromàtics en els respectius complexos.

En el cas del complex [4], es pot observar que la longitud d'ona de màxima absorció per a la banda MLCT és major que la que presenten els altres dos compostos. Això es pot explicar perquè aquest complex té dos lligands clorur, que són de tipus  $\pi$ -donador i indueixen camp més feble que els lligands aromàtics dels complexos [5] i [6] en l'entorn octaèdric del complex. Aquest efecte  $\pi$ -donador dels lligands clorur fa desestabilitzar en energia els orbitals  $t_{2g}$  del complex que és on es troben els electrons i, per tant, les transicions cap a orbitals buits són menys energètiques.

### Propietats electroquímiques

Al llarg de tot aquest treball, s'han caracteritzat tots els complexos sintetitzats mitjançant voltametria cíclica. Aquesta caracterització, que estudia les propietats redox dels compostos, ha servit també per identificar *in situ* si el producte presentava impureses, o per fer seguiment del cru de reacció per veure si ja havia finalitzat.

Les VC es van dur a terme utilitzant diclorometà com a dissolvent, contenint TBAH 0.1M com a electròlit de suport, i s'ha utilitzat un elèctrode calomelans de KCl saturat (SCE) com a referència.

A continuació es pot veure la Figura 13 la VC obtinguda per al complex [2]:

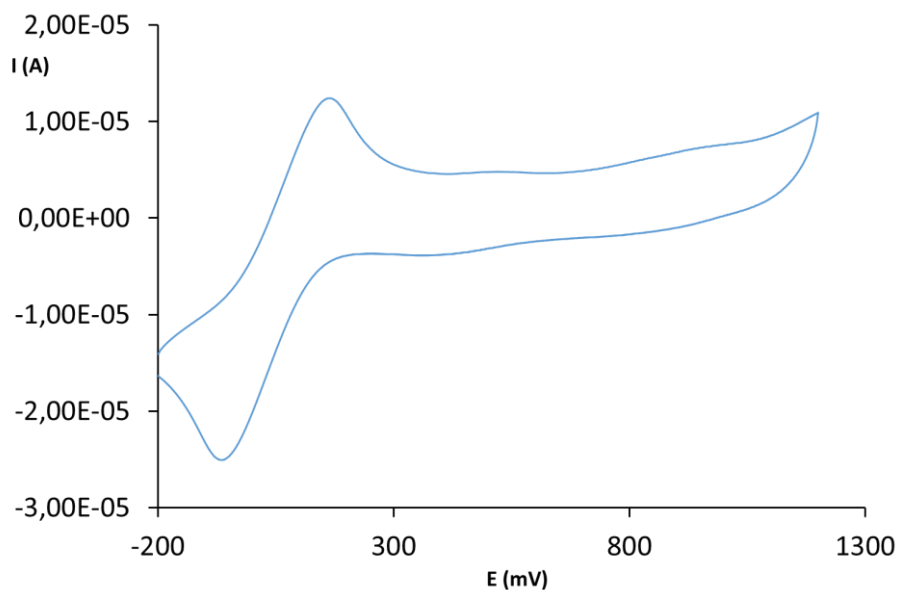


Figura 13. Voltametria cíclica per al complex [2] en diclorometà + 0.1M TBAH

El fet d'obtenir un valor de potencial d'ona mitja relativament baix ( $E_{1/2} = 0.116$  V), s'explica gràcies a que aquest complex presenta 3 lligands de tipus clorur, que són  $\pi$ -donadors i que per tant cedeixen densitat electrònica al metall, fent que sigui més favorable la seva oxidació.

A la Figura 14 es pot observar la voltametria obtinguda per al complex [4] en diclorometà un cop purificat per cromatografia, i també la voltametria de la mescla inicialment aïllada de la síntesi:

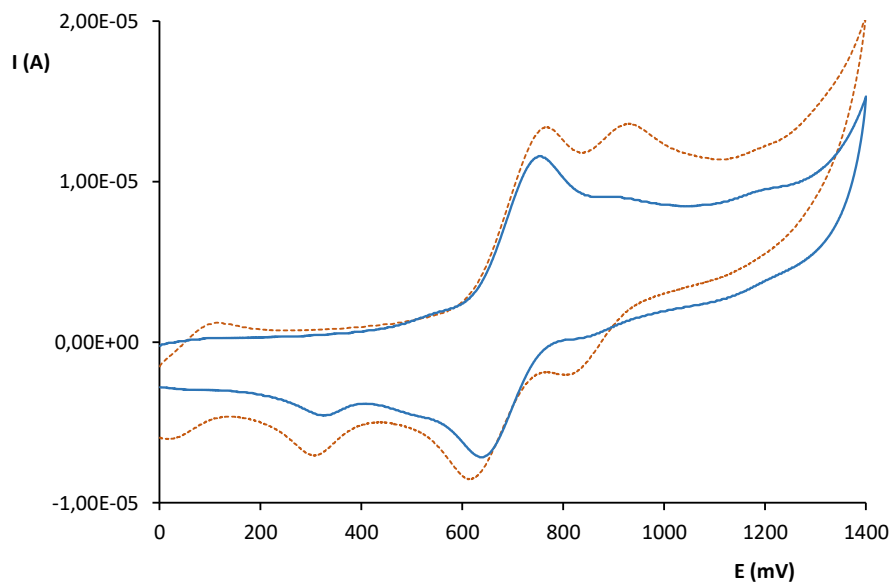


Figura 14. Voltametries cícliques registrades en diclorometà + 0.1M TBAH per a la barreja inicial d'isòmers del complex [4] (línia taronja puntejada) i per al complex final purificat (línia blava).

Com es pot veure, a la voltametria registrada per al sòlid sense purificar (línia puntejada a la Figura 14) s'observen diverses ones. A potencial  $E_{1/2} = 0.696$  V respecte SCE es pot apreciar una

ona reversible corresponent al parell redox  $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$  del complex **[4]** (isòmer *trans*-Cl finalment purificat), junt amb una segona ona menys intensa, també reversible, a  $E_{1/2} = 0.872 \text{ V}$ , que correspon al mateix parell redox de l'isòmer *cis*-Cl del complex. Es pot veure també una ona minoritària al voltant de 0.1 V que s'associa a un subproducte de la reacció.

Un cop es purifica el producte, s'obté la voltametria representada amb una línia blava contínua a la figura. Es pot apreciar que, a més de l'ona reversible descrita anteriorment per al parell redox  $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$  del complex, es pot observar un pic catòdic a  $E_{\text{pc}} = 0.32 \text{ V}$ , que correspon a la reducció  $\text{Ru}(\text{III}) \rightarrow \text{Ru}(\text{II})$  d'una porció del complex que ha patit isomerització d'enllaç del lligand DMSO. Com s'ha comentat a la introducció (Esquema 1), els cations metàl·lics amb un estat d'oxidació més elevat són àcids de Lewis més durs i s'afavoreix la coordinació dels lligands DMSO a través de l'àtom d'oxigen, que és una base de Lewis més dura que el sofre. Quan es comença fent un escombrat cap a valors positius de potencial a la VC, es produeix l'oxidació de  $\text{Ru}(\text{II})$  a  $\text{Ru}(\text{III})$  (a un valor de potencial anòdic  $E_{\text{pa}}$  d'aproximadament 0.77 V) i subseqüentment una part del complex oxidat pateix la isomerització d'enllaç. El complex isomeritzat és formalment una espècie química diferent, i el seu potencial redox  $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$  és més baix que el del compost original perquè el DMSO enllaçat a través de l'oxigen és un lligand amb menys capacitat  $\pi$ -acceptora. A la Figura 15, s'hi troba el perfil electroquímic de la caracterització del complex **[5]**, corresponent al complex metàl·lic amb un lligand tridentat *trpy-pyr* **[1]** i un lligand *terpyridine*.

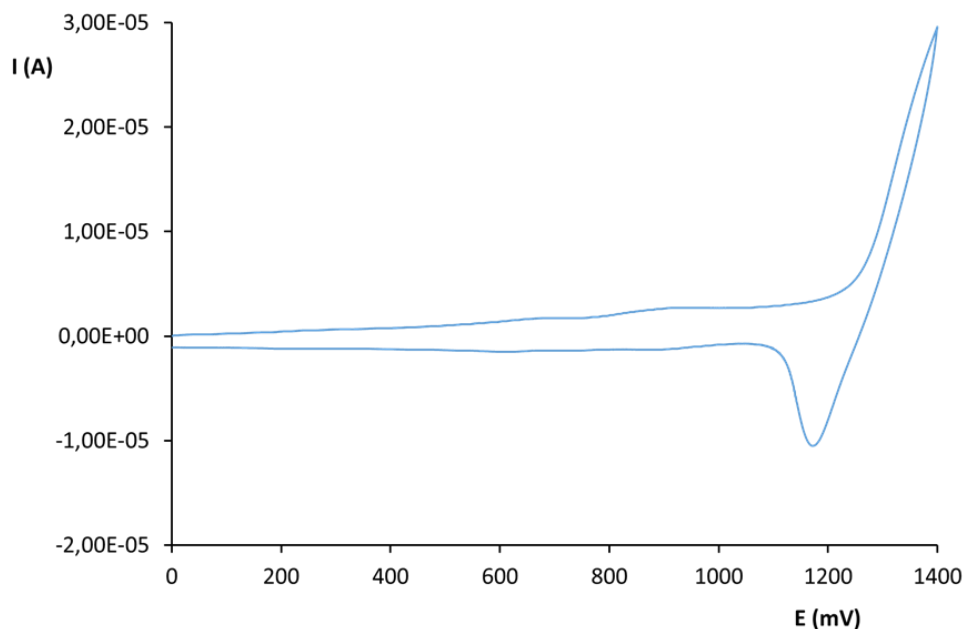


Figura 15. Voltametria cíclica per al complex **[5]** en diclorometà + 0.1M TBAH

El que es pot observar en aquesta figura és únicament un pic catòdic corresponent a la oxidació del complex a un potencial de  $E_{\text{pc}} = 1.172 \text{ V}$  respecte SCE. Aquest comportament és similar al que presenta el complex **[6]**, que conté dos lligands *trpy-pyr* **[1]**, i per al que s'obté la voltametria que es pot observar a la Figura 16, amb un pic catòdic a  $E_{\text{pc}} = 1.061 \text{ V}$  respecte SCE.

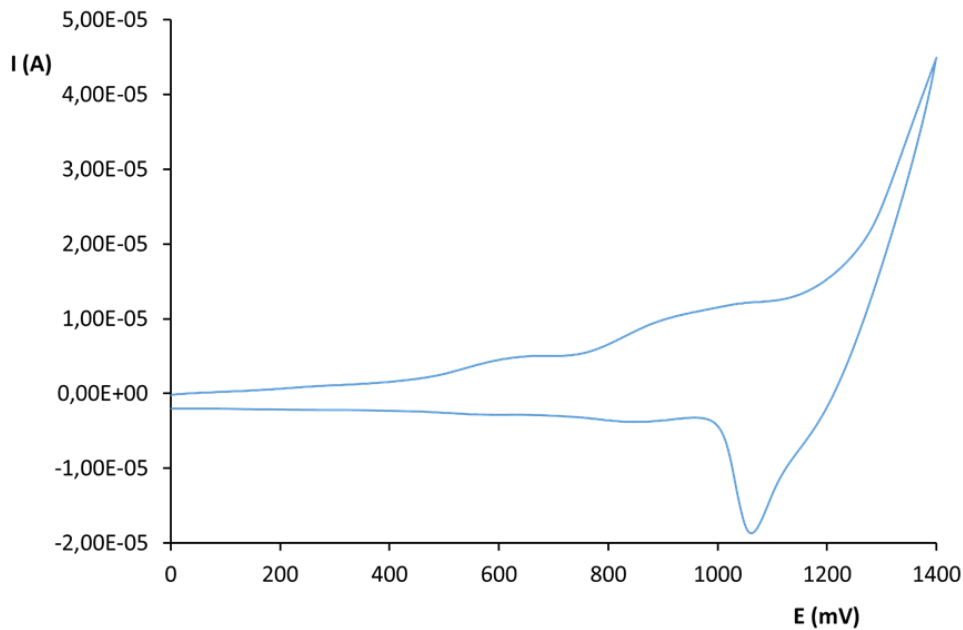


Figura 16. Voltametria cíclica per al complex [6] en diclormetà + 0.1M TBAH

D'una banda, els valors de potencial de pic catòdic ( $E_{pc}$ ) per als dos complexos indica que el seu potencial d'ona mitja,  $E_{1/2}$ , presentaria un valor clarament superior a 1 V en cas de poder-se determinar. Aquest fet és coherent amb l'estructura dels dos complexos, en què l'esfera de coordinació del metall està constituïda únicament per anells aromàtics, de tipus  $\pi$ -acceptor, que dificulten l'oxidació del centre metàl·lic.

D'altra banda, l'augment abrupte de la intensitat a valors de potencial superiors a 1.2 V sembla indicar que es produeix algun tipus d'oxidació irreversible que, generalment, s'associa a oxidacions de substrats orgànics o bé localitzades sobre els lligands. Aquesta oxidació pot tenir lloc sobre el grup pirè dels lligands que, a més, es coneix que pot patir polimerització induïda per la seva oxidació.<sup>19</sup> Així, es comprova si en els complexos [5] i [6] té lloc aquest procés enregistrant set cicles consecutius de voltametria cíclica, ja que aquest procediment permet detectar l'acumulació del complex sobre l'elèctrode de grafit per l'augment de la intensitat de l'ona associada al complex, com s'ha descrit també per a altres grups electropolimeritzables com el pirrol.<sup>20</sup> Quan els elèctrodes es transfereixen a una cel·la amb solució neta de diclormetà + TBAH 0.1M, es pot detectar l'ona corresponent al complex ancorat.

A la Figura 17 s'observa l'enregistrament d'aquestes dues VC pel complex [5] i a la Figura 18 pel complex [6].

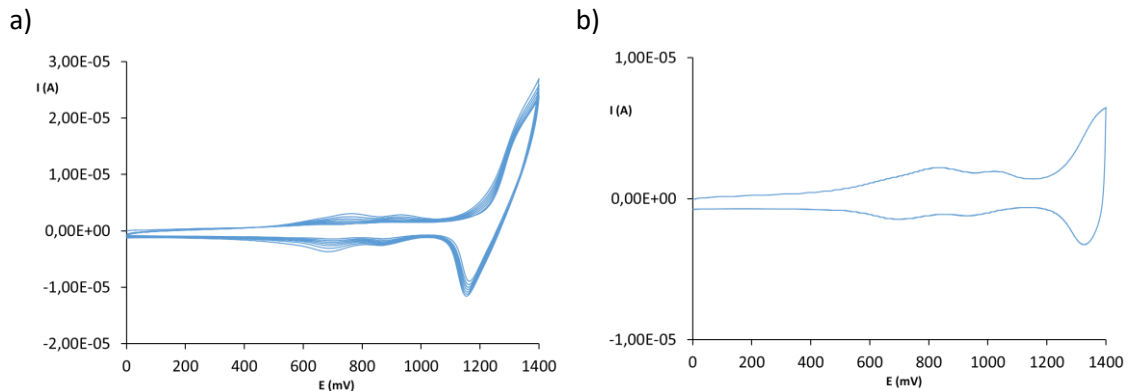


Figura 17. a) Set cicles consecutius de VC per al complex [5] en diclorometà + 0.1M TBAH.  
b) VC enregistrada amb els mateixos elèctrodes en solució neta de diclorometà + 0.1M TBAH.

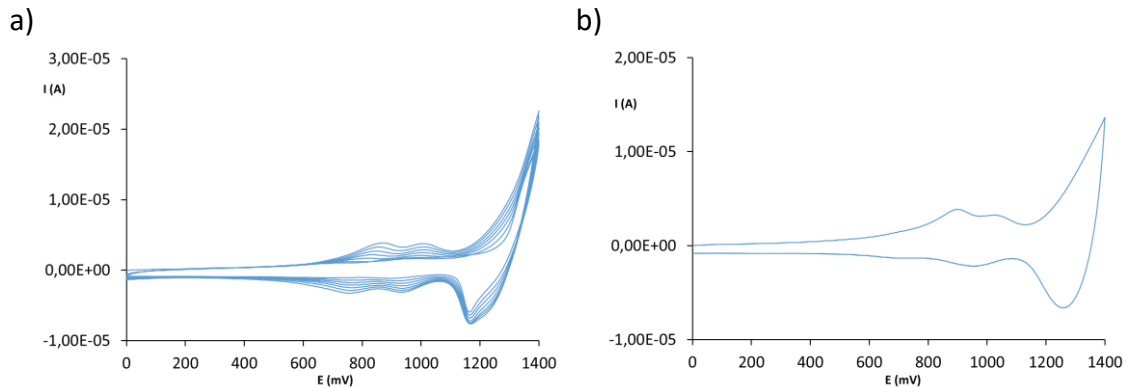


Figura 18. a) Set cicles consecutius de VC per al complex [6] en diclorometà + 0.1M TBAH.  
b) VC enregistrada amb els mateixos elèctrodes en solució neta de diclorometà + 0.1M TBAH.

En tots dos casos s'observa que la intensitat va augmentant amb els diferents escombrats de potencial i que, en transferir els elèctrodes a solucions netes d'electròlit, es detecta la presència de compost immobilitzat. A la literatura s'ha descrit una oxidació irreversible del grup pirè que, utilitzant un elèctrode SCE com a referència, es trobaria al voltant de 1.1 V.<sup>21</sup> Si l'escombrat de potencial supera aquest valor, com és el cas dels experiments realitzats, permet la seva electropolimerització.

### Mesures de fluorescència

L'objectiu final dels complexos descrits és la seva aplicació com a agents antitumorals. Quan es porten a terme assajos d'activitat, que sempre són inicialment *in vitro* (sobre línies cel·lulars), és interessant poder fer un seguiment dels compostos per tal de determinar si són capaços de superar les membranes de les cèl·lules i dels diferents orgànuls, com per exemple els mitocondris, que són l'objectiu de molts dels tractaments anticancerígens perquè són els responsables de la respiració cel·lular.

Un mètode relativament senzill de fer el seguiment dels compostos és per imatgeria de fluorescència: si els compostos són fluorescents, es pot traçar un mapa de la seva situació al voltant o a l'interior de les cèl·lules al llarg del temps. Amb aquesta idea, es van fer mesures de fluorescència dels compostos [4], [5] i [6] en solucions 50 mM utilitzant com a dissolvent un medi aquós adequat per al creixement cel·lular. Es van provar diferents longituds d'ona d'excitació, però no es va arribar a observar fluorescència. Aquest fet indica que el lligand, que sí presenta fluorescència en la seva forma lliure,<sup>22</sup> no manté aquesta propietat un cop coordinat a ruteni. La Figura 19 mostra l'emissió dels complexos obtinguda a partir de l'excitació a 300 nm.

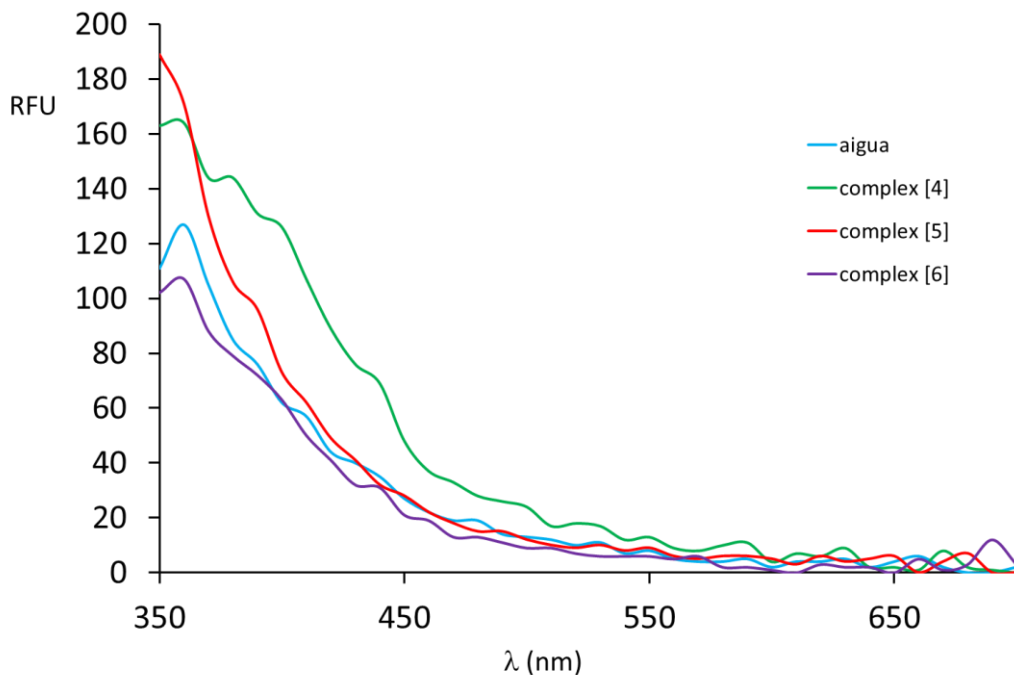


Figura 19. Espectres d'emissió dels compostos [4], [5] i [6] en medi de cultiu, per excitació a 300 nm.

Els valors obtinguts per als tres compostos indiquen que no hi ha una fluorescència rellevant, per tant no serà possible fer-ne el seguiment per aquesta tècnica. Tanmateix, això pot suposar un avantatge des del punt de vista de la seva activitat en PDT ja que, si es tenen en compte els diferents processos involucrats un cop s'excita el fotosensibilitzador (Figura 2), els decaïments per fluorescència o fosforescència són rutes que competeixen amb la capacitat de generar espècies oxidants que puguin produir un dany a les cèl·lules. Els compostos s'avaluaran en un futur com a anticancerígens tant amb irradiació de llum (PDT) com sense.



## CONCLUSIONS

The synthesis of the *trpy-pyr* ligand, **[1]**, has been successfully achieved though in moderate yield. <sup>1</sup>H-NMR analysis confirms that the expected compound is obtained.

The *trpy-pyr* ligand is easily coordinated to Ru(III) or Ru(II) precursors to obtain respectively complexes [RuCl<sub>3</sub>(*trpy-pyr*)], **[2]**, and [RuCl<sub>2</sub>(*trpy-pyr*)(DMSO)], **[4]**. In the case of complex **[4]**, the *trans*-Cl isomer is isolated after column chromatography and displays a DMSO bond linkage isomerism upon oxidation during the cyclic voltammetry analysis. Complex **[2]** shows a particularly low redox Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup> potential arising from the coordination of three π-donor chlorido ligands.

The synthesis of complex [Ru(*trpy-pyr*)(*trpy*)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, **[5]**, has been carried out through two distinct synthetic pathways, but higher purity is attained when using complex **[2]** as precursor ('Method A'). This procedure is also used to obtain the symmetrical [Ru(*trpy-pyr*)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> complex **[6]**. A detailed assignment of the <sup>1</sup>H-NMR resonances has been performed for both compounds.

Cyclic voltammetry experiments on compounds **[5]** and **[6]** reveal that pyrene group electropolymerization takes place in both cases. After successive scans, anchoring of the complexes onto the glassy carbon working electrode is evidenced. The pyrene group oxidation presumably overlaps the anodic Ru(II)→Ru(III) oxidation wave and the corresponding E<sub>1/2</sub> redox potential could not be determined, but values above 1 V vs. SCE are expected.

The fluorescence of complexes **[4]**, **[5]** and **[6]** has been measured in cell culture media to assess the possibility of tracking their position inside the cells in antitumor essays *in vitro*, but the complexes do not display photoluminescent properties. Future tests concerning their ability to generate ROS are pending.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Griffith, W. P. Ruthenium Oxo Complexes as Organic Oxidants. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21* (3), 179. <https://doi.org/10.1039/cs9922100179>.
- (2) Vos, J. G.; Kelly, J. M. Ruthenium Polypyridyl Chemistry; from Basic Research to Applications and Back Again. *Dalton Trans.* **2006**, No. 41, 4869. <https://doi.org/10.1039/b606490f>.
- (3) Bergamo, A.; Sava, G. Ruthenium Complexes Can Target Determinants of Tumour Malignancy. *Dalton Trans.* **2007**, No. 13, 1267. <https://doi.org/10.1039/b617769g>.
- (4) Baranoff, E.; Collin, J.-P.; Furusho, J.; Furusho, Y.; Laemmel, A.-C.; Sauvage, J.-P. Photochemical or Thermal Chelate Exchange in the Ruthenium Coordination Sphere of Complexes of the Ru(Phen)<sub>2</sub>L Family (L = Diimine or Dinitrile Ligands). *Inorg. Chem.* **2002**, *41* (5), 1215–1222. <https://doi.org/10.1021/ic011014o>.
- (5) Smith, M. K.; Gibson, J. A.; Young, C. G.; Broomhead, J. A.; Junk, P. C.; Keene, F. R. Photoinduced Ligand Isomerization in Dimethyl Sulfoxide Complexes of Ruthenium(II). *European Journal of Inorganic Chemistry* **2000**, *2000* (6), 1365–1370. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(200006\)2000:6<1365::AID-EJIC1365>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(200006)2000:6<1365::AID-EJIC1365>3.0.CO;2-Z).
- (6) Kostova, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *CMC* **2006**, *13* (9), 1085–1107. <https://doi.org/10.2174/092986706776360941>.
- (7) Ellahioui, Y.; Prashar, S.; Gómez-Ruiz, S. Anticancer Applications and Recent Investigations of Metallodrugs Based on Gallium, Tin and Titanium. *Inorganics* **2017**, *5* (1), 4. <https://doi.org/10.3390/inorganics5010004>.
- (8) Rilak, A.; Bratsos, I.; Zangrando, E.; Kljun, J.; Turel, I.; Bugarčić, Ž. D.; Alessio, E. New Water-Soluble Ruthenium(II) Terpyridine Complexes for Anticancer Activity: Synthesis, Characterization, Activation Kinetics, and Interaction with Guanine Derivatives. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (12), 6113–6126. <https://doi.org/10.1021/ic5005215>.
- (9) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (8), 2925–2932. <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>.
- (10) Pal, M.; Nandi, U.; Mukherjee, D. Detailed Account on Activation Mechanisms of Ruthenium Coordination Complexes and Their Role as Antineoplastic Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *150*, 419–445. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.015>.
- (11) Patel, K. K.; Plummer, E. A.; Darwish, M.; Rodger, A.; Hannon, M. J. Aryl Substituted Ruthenium Bis-Terpyridine Complexes: Intercalation and Groove Binding with DNA. *J Inorg Biochem* **2002**, *91* (1), 220–229. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(01\)00423-8](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(01)00423-8).
- (12) Allison, R. R.; Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* **2013**, *46* (1), 24. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>.
- (13) Sai, D. L.; Lee, J.; Nguyen, D. L.; Kim, Y.-P. Tailoring Photosensitive ROS for Advanced Photodynamic Therapy. *Exp Mol Med* **2021**, *53* (4), 495–504. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7>.
- (14) Gulyani, A.; Srinivasa Gopalan, R.; Kulkarni, G. U.; Bhattacharya, S. Twisted Aromatics, 9-Anthryl and 1-Pyrenyl Terpyridines Organize into Novel Multi-Directional ‘Ladder-like’ Motifs in the Solid State. *Journal of Molecular Structure* **2002**, *616* (1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00280-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00280-6).
- (15) Dakkach, M.; Fontrodona, X.; Parella, T.; Atlamsani, A.; Romero, I.; Rodríguez, M. A Novel Carbene Ruthenium Complex as Reusable and Selective Two-Electron Catalyst for Alkene

- Epoxidation. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (2–3), 231–238. <https://doi.org/10.1002/adsc.201000686>.
- (16) Dakkach, M.; Atlamsani, A.; Parella, T.; Fontrodona, X.; Romero, I.; Rodríguez, M. New Aqua N-Heterocyclic Carbene Ru(II) Complexes with Two-Electron Process as Selective Epoxidation Catalysts: An Evaluation of Geometrical and Electronic Effects. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (9), 5077–5087. <https://doi.org/10.1021/ic302863h>.
- (17) Ziessel, R.; Grosshenny, V.; Hissler, M.; Stroh, C. Cis-[Ru(2,2':6',2''-Terpyridine)(DMSO)Cl<sub>2</sub>]: Useful Precursor for the Synthesis of Heteroleptic Terpyridine Complexes under Mild Conditions. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (14), 4262–4271. <https://doi.org/10.1021/ic049822d>.
- (18) Pretsch, E. *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*, 2a. Ed.; Springer-Verlag Ibérica, 1998.
- (19) Lu, G.; Shi, G. Electrochemical Polymerization of Pyrene in the Electrolyte of Boron Trifluoride Diethyl Etherate Containing Trifluoroacetic Acid and Polyethylene Glycol Oligomer. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2006**, *586* (2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.10.020>.
- (20) Dakkach, M.; Fontrodona, X.; Parella, T.; Atlamsani, A.; Romero, I.; Rodríguez, M. Polypyrrrole-Functionalized Ruthenium Carbene Catalysts as Efficient Heterogeneous Systems for Olefin Epoxidation. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (26), 9916–9923. <https://doi.org/10.1039/C4DT00698D>.
- (21) Le Goff, A.; Reuillard, B.; Cosnier, S. A Pyrene-Substituted Tris(Bipyridine)Osmium(II) Complex as a Versatile Redox Probe for Characterizing and Functionalizing Carbon Nanotube- and Graphene-Based Electrodes. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8736–8742. <https://doi.org/10.1021/la401712u>.
- (22) Guesmi, N. E. Solvent Effect on the Photophysical Properties of Terpyridine Incorporating Pyrene Moiety: Estimation of Dipole Moments by Solvatochromic Shift Methods. *J Fluoresc* **2023**. <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03210-6>.