



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TRABAJO FIN DE GRADO

Sondas fluorescentes en reacciones bioortogonales catalizadas por metales de transición

Xulián Fernández González

Tutores: José Luis Mascareñas Cid / María Tomás Gamasa

Dpto. de Química Orgánica, Centro de Investigaciones en Química
Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Universidad de Santiago de
Compostela

Curso Académico: 2018/2019

D. JOSÉ LUIS MASCAREÑAS CID, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dra. MARÍA TOMÁS GAMASA, Investigadora Juan de la Cierva del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN: Que la memoria adjunta, titulada “Sondas fluorescentes en reacciones bioortogonales catalizadas por metales de transición”, que presenta Xulián Fernández González, ha sido realizada bajo su dirección, en los laboratorios del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS).

Considerando que dicho trabajo constituye el trabajo fin de grado, autorizan su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela a día 5 de Julio de 2019.

Fdo.: José Luis Mascareñas Cid

Fdo.: María Tomás Gamasa

Índice:

Abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	11
2.1 Química Bioortogonal.....	12
2.1.1 Tipos de reacciones bioortogonales.....	12
2.1.2 Antecedentes de la química bioortogonal.....	13
2.1.3 Reacciones de formación de enlaces.....	15
2.1.4 Reacciones de rotura de enlaces.....	15
2.1.4.1 Rotura de N-aliloxicarbonil y O-alilo.....	15
2.1.4.2 Rotura de O-propargilo y N-propargiloxicarbonilo.....	19
2.2 Diseño de sondas fluorescentes.....	19
2.2.1 Sondas fluorescentes en la Química Bioortogonal	20
2.2.1.1 Sondas AIE.....	20
3. Objetivos.....	22
4. Resultados y discusión.....	24
4.1 Procesos de desprotección de éteres alílicos mediados por complejos de rutenio.....	25
4.2 Diseño y síntesis de sondas	25
4.2.1 Síntesis de la sonda A.....	26
4.2.2 Síntesis de la sonda B.....	28
4.2.3 Síntesis de la sonda C.....	29
4.3 Estudios en células vivas.....	30
4.3.1 Estudio de la sonda A.....	31

4.3.2 Estudio de la sonda B.....	33
4.3.3 Estudio de la sonda C.....	35
5. Conclusiones.....	37
6. Bibliografía.....	40
7. Anexos.....	43
7.1 Anexo I: Procedimiento experimental.....	44
7.2 Anexo II: Espectros.....	57

ABREVIATURAS

λ_{ex} : longitud de onda de excitación

λ_{em} : longitud de onda de emisión

δ : desplazamiento químico

μM : micromolar

AcOEt: acetato de etilo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIE: aggregation-induced emission

alloc: aliloxycarbonilo

c: cuartete

CEF: Chicken Embryonic Fibroblasts

cod: 1,5-ciclooctadieno

Cp*: pentametilciclopentadieno

CuAAC: Copper azide-alkyne cycloaddition

d: doblete

dd: doble doblete

dt: doblete triplete

dba: dibencilidenacetona

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMEM: Dubelcco's Modified Eagles's Medium

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Eq.: equivalente

EtOH: etanol

GSH: glutationa

h: horas

HeLa: Henrietta Lacks

HPLC: high performance liquid chromatography

Hz: hertzios

J: constante de acoplamiento

L: ligando

m: multiplete o señal sin resolver

Me: metilo

MeOH: metanol

mg: miligramos

min: minutos

mM: milimolar

nm: nanómetros

Nu: nucleófilo

Ph: fenilo

poc: propargiloxycarbonilo

R_f: factor de retención

RMN: resonancia magnética nuclear

ROS: Reactive oxygen species

s: singulete

t: triplete

t.a.: temperatura ambiente

TFA: ácido trifluoroacético

TLC: Thin Layer Chromatography

TON: turnover numbers

TsOH: ácido p-toluenosulfónico

1. RESUMEN

La química bioortogonal ha supuesto una revolución en los últimos años pues permite llevar a cabo reacciones en medios biológicos e incluso dentro del ambiente celular, sin que éste vea alterado sus procesos biológicos habituales. El desarrollo de un número creciente de reacciones organometálicas compatibles con medio acuosos ha impulsado el estudio de estas transformaciones en medio biológicos complejos e incluso medios celulares. De estos avances surge la necesidad de disponer de estrategias para la monitorización de estas reacciones en tiempo real en el interior celular, por ejemplo, mediante el uso de microscopía y de sondas fluorescentes.

En este estudio se plantea el diseño y síntesis de sondas fluorescentes para estudiar reacciones de desprotección de éteres alílicos promovidas por complejos de rutenio en el interior de células HeLa.

Las sondas preparadas poseen propiedades fluorescentes que se pueden modular químicamente. Esta modulación consiste en la protección de grupos hidroxilo con un grupo alilo, lo que provoca una desactivación de la fluorescencia o un cambio en la longitud de onda de emisión. La fluorescencia se ve activada de nuevo mediante la reacción de desprotección promovida por rutenio. Precisamente, esta diferencia en la señal de fluorescencia entre la sonda protegida y la sonda desprotegida nos permite controlar el avance de esta reacción bioortogonal.

Resumo:

A química bioortogonal supuxo unha revolución nos últimos anos pois permite levar a cabo reacción en medios biolóxicos e incluso dentro do ambiente celular, sen que este vexa alterado os seus procesos biolóxicos habituais. O desenvolvemento dun número crecente de reaccións organometálicas compatíbeis con medios acuosos impulsou o estudo de estas transformacións en medios biolóxicos complexos e ata en medios celulares. A partir destes avances xorde a necesidade de ter estratexias para a monitorización de estas reaccións en tempo real no interior celular, por exemplo, mediante o uso da microscopía e das sondas fluorescentes.

Neste estudo planéase o deseño e síntese de sondas fluorescentes para estudar reaccións de desprotección de éteres alílicos promovidas por complexos de rutenio no interior de células HeLa.

As sondas preparadas teñen propiedades fluorescentes que pódense modular quimicamente. Esta modulación consiste na protección de grupos hidroxilo cun grupo alilo, o que provoca unha desactivación da fluorescencia ou un cambio na lonxitude de onda de emisión. A fluorescencia vese activada de novo mediante a reacción de desprotección promovida polo rutenio. Precisamente, esta diferenza nas sinais de fluorescencia entre a sonda protexida e a sonda desprotexida permítenos controlar o avance de esta reacción bioortogonal.

Summary:

Bioorthogonal chemistry has experienced a revolution in recent years since it allows to carry out reactions in biological media and even within the cellular environment, without altering the biological processes. The development of a growing number of water compatible organometallic reactions has allowed us to study these transformations in complex biological media and even native cellular settings. These advances have prompted the need to develop new strategies for monitoring these reactions in real time inside the cell, by using microscopy and fluorescent probes.

In this study we propose the design and synthesis of new fluorescent probes to study ruthenium promoted deprotection reactions of allylic ethers inside HeLa cells.

The synthesized probes display fluorescent properties that can be chemically modulated. This modulation consists in the protection of hydroxyl groups with an allyl group, which causes a deactivation of the fluorescence or a change in the emission wavelength. The fluorescence is activated again through the ruthenium mediated deprotection reaction. Indeed, this difference in the fluorescence signal between the protected probe and the unprotected ones allows us to control the progress of bioorthogonal reaction.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Química Bioortogonal

La Química Bioortogonal se refiere a la utilización de reacciones químicas que, a pesar de ser realizadas dentro del complejo medio celular, son capaces de llevarse a cabo en sustratos definidos, sin generar efectos adversos en los diferentes procesos biológicos celulares.¹ Existen ejemplos de reacciones bioortogonales en bacterias, células o incluso organismos vivos complejos como ratones o peces cebras. Una reacción se considera bioortogonal si cumple con una serie de requisitos:

- Elevada selectividad y especificidad.
- Cinética rápida.
- Estabilidad y biocompatibilidad en medio celular tanto de los productos como de los reactivos.

2.1.1 Tipos de reacciones bioortogonales

Las reacciones bioortogonales ocurren de una manera selectiva y rápida en los diferentes sistemas biológicos. Dependiendo del tipo de proceso que tenga lugar, podemos diferenciar varios tipos de transformaciones:

- Reacción de un marcador con una biomolécula de interés (Figura 1a). Este marcaje provoca que la biomolécula sea rápidamente reconocida por un reactivo que porta un grupo fluorescente.
- Activación de sondas inteligentes (Figura 1b): mediante la reacción de un sustrato con sondas que presentan fluorescencia desactivada, se puede activar la emisión fluorescente. Se asegura así que la fluorescencia observada provenga únicamente de los productos generados.
- Liberación de prodrogas y sondas inteligentes (Figura 1c). Dentro del grupo de las sondas inteligentes existen también compuestos con la capacidad de liberar drogas o sondas inteligentes.

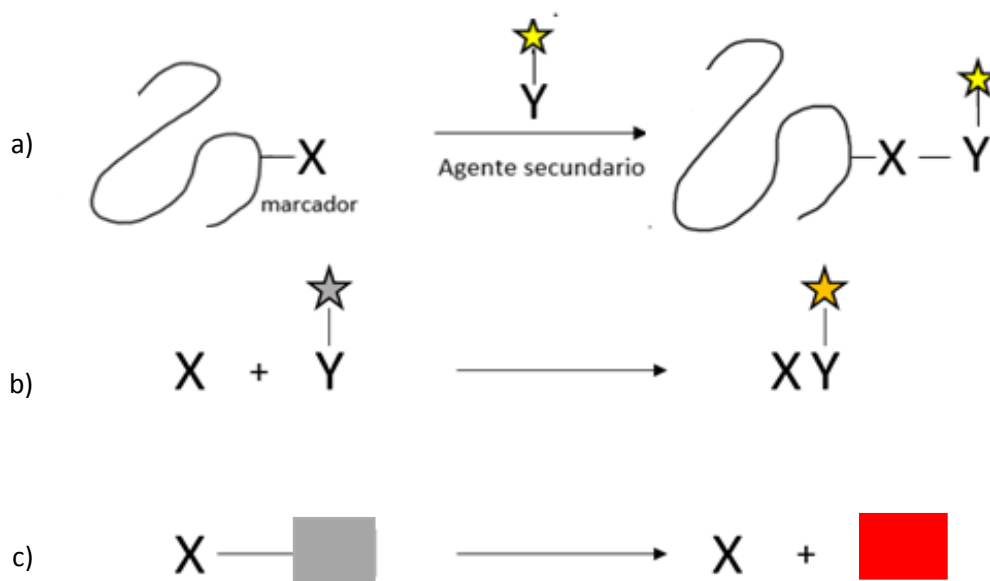


Figura 1: Tipos de reacciones bioortogonales

2.1.2 Antecedentes en la química bioortogonal

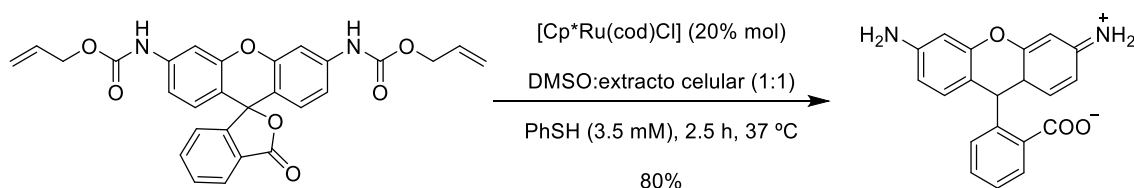
La Naturaleza cuenta con una serie de metaloenzimas que son capaces de catalizar múltiples transformaciones químicas de una manera específica y muy selectiva. Esta selectividad, especificidad y velocidad de reacción ha provocado un aumento del interés en la síntesis de metaloenzimas artificiales. A pesar de ello, los avances se han visto ralentizados debido a los problemas surgidos en su síntesis, diseño y caracterización. Como estrategia alternativa, en los últimos años se ha estudiado el empleo de metales de transición para promover reacciones bioortogonales, siendo el objetivo final el traslado de estas transformaciones no naturales a un medio tan complejo como el celular. Los progresos en este campo han convertido a este tipo de procesos en un pilar fundamental en la química bioortogonal actual.

El uso de compuestos de coordinación para promover una reacción en medio celular difiere bastante respecto a su empleo en medio artificial. En el medio celular tanto los productos como los reactivos y los complejos metálicos se ven expuestos a un ambiente complejo acuoso con una alta concentración en sales, biomoléculas, así como iones y otras especies. Todos estos componentes pueden interferir a lo largo de la reacción.

En los últimos años se ha descrito una serie de ejemplos de procesos que transcurren a través de mecanismos organometálicos que tienen lugar en medios biológicos e incluso

en medios celulares. Estos trabajos confirman, en contra de la creencia establecida, la compatibilidad de las reacciones organometálicas con los medios biológicos.

Uno de los primeros ejemplos de una reacción catalizada por un metal de transición en medio biológico data del año 1985, en el que se describe el empleo de un complejo de rutenio soluble en agua para la hidrogenación de los dobles enlaces de ácidos grasos en presencia de hidrógeno gas.² En 2002 se descubre la famosa reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre, conocida como CuAAC.³ Esta transformación es compatible con agua y presenta, además, una alta bioortogonalidad. El año 2006 constituye otra fecha importante, en la que Meggers y colaboradores demuestran la desprotección de aminas protegidas por un grupo N-aliloxycarbonilo catalizado por Ru(II) en presencia de tioles (Esquema 1).⁴ Esta reacción se puede realizar en un medio acuoso, en presencia de aire e incluso en presencia de células de mamíferos. En muchos casos, el producto que se genera es una especie fluorescente, lo que permite monitorizar el avance de la reacción mediante el uso de microscopía.



Esquema 1: Desprotección de aminas catalizado por Ru(II)

Tanto la reacción CuAAC como la desprotección de alilcarbamatos (grupos alloc) mediada por rutenio confirmaron el potencial de los metales de transición para llevar a cabo reacciones bioortogonales que no ocurren en la Naturaleza. A partir de ese momento, el estudio de diferentes metales de transición capaces de promover reacciones bioortogonales ha ido en aumento.

En esta introducción, se repasan brevemente algunas de las contribuciones más importantes. Hemos organizado los procesos en dos grupos, aquellos que implican la formación de enlaces (Figura 2a) y aquellos que suponen una rotura de enlaces (Figura 2b).

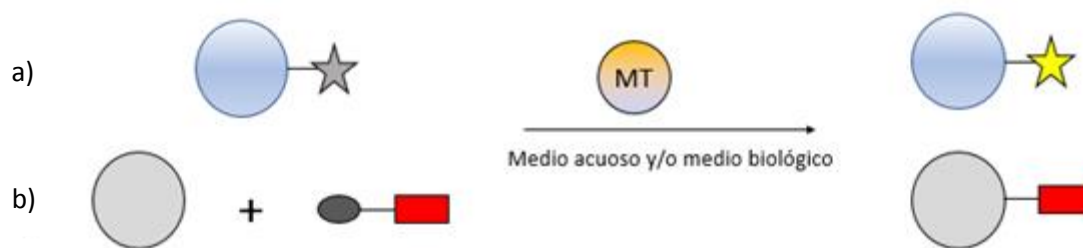


Figura 2: Transformaciones bioortogonales de formación de enlaces (a) y rotura de enlaces (b) catalizadas por complejos de metales de transición (MT)

2.1.3 Reacciones de formación de enlaces

A pesar del gran número de aplicaciones que se han descrito de la reacción CuAAC catalizada por Cu, apenas hay ejemplos en el interior de células de mamíferos.⁵ La mayoría de ellos se han realizado en bacterias o implican modificación de proteínas o azúcares en la superficie de células de mamífero.⁶

Esto se debe a la inestabilidad del Cu(I) en medios biológicos y a su toxicidad asociada. El Cu(I) posee tendencia a oxidarse al reaccionar con O₂ o H₂O₂, generando especies reactivas de oxígeno (ROS). Por eso, la introducción de ligandos coordinantes ha sido crucial para mantener la estabilidad del complejo de Cu, así como para reducir su potencial citotoxicidad.⁷

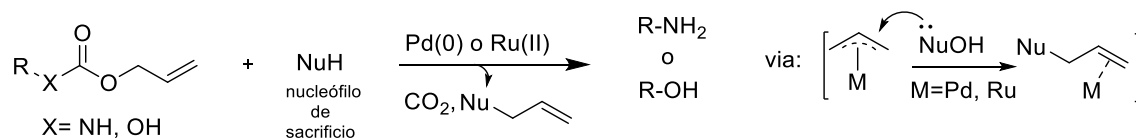
También se han descrito ejemplos de reacciones de metátesis catalizadas por Ru o Mo;⁸ reacciones Suzuki-Miyaura catalizadas por Pd;⁹ reacciones Sonogashira catalizadas por Pd;¹⁰ procesos de formación de enlace C-S/C-N catalizados por Au o Pd;¹¹ reacciones con complejos de metal-hidruro (Ru e Ir)¹² y finalmente procesos de formación de enlaces amida catalizados por Au.¹³

2.1.4 Reacciones de rotura de enlaces

2.1.4.1 Rotura de N-aliloxycarbonilo y O-alilo

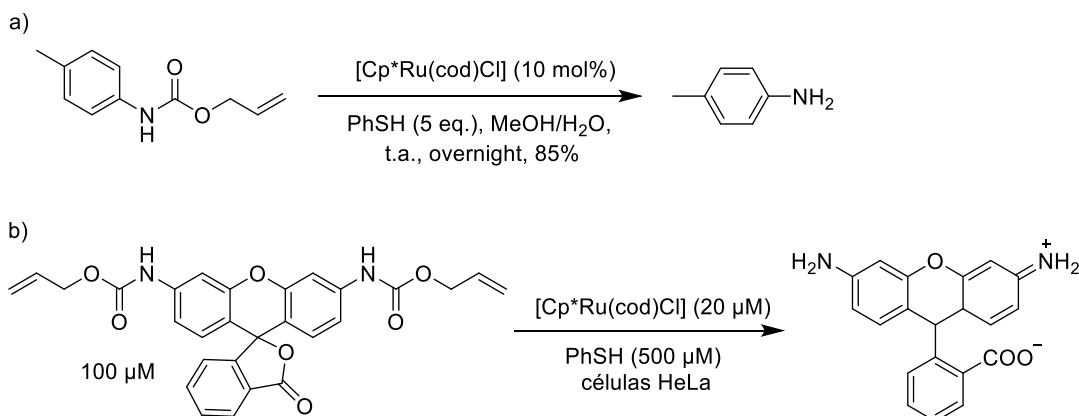
La reacción de un electrófilo alílico con un C o heteroátomo nucleófilo catalizada por un metal de transición se denomina genéricamente como sustitución alílica. Esta reacción fue descrita por Tsuji¹⁴ y años más tarde por Hata y Atkins.¹⁵

Este tipo de transformación también se ha empleado para la eliminación catalítica de grupos aliloxicarbonilo (alloc) pertenecientes a carbamatos o carbonatos, generándose los correspondientes alcoholes y aminas (Esquema 2).



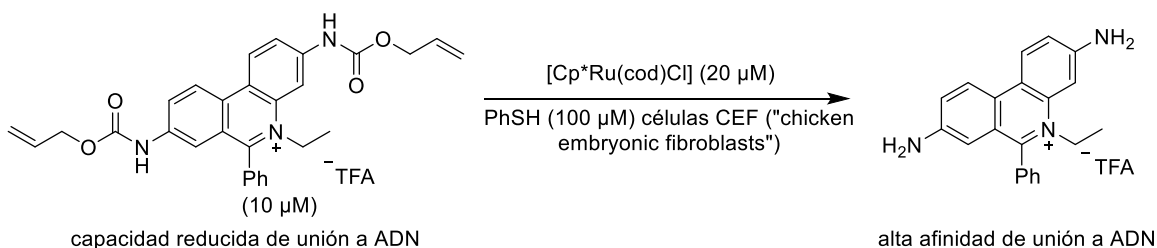
Esquema 2: Desprotección de aminas y alcoholes protegidos por aliloxicarbonilo

Como se ha mencionado antes, Meggers⁴ describió la desprotección promovida por complejos de rutenio de aminas partiendo de sus correspondientes carbamatos en agua y en presencia de tioles como nucleófilos de sacrificio. En particular, aminas protegidas por un grupo alloc reaccionan con cantidades catalíticas de [Cp*Ru(cod)Cl] en presencia de exceso de PhSH (Esquema 3a). Esta reacción puede llevarse a cabo en medio celular (células HeLa) usando alloc-rodamina 110 como sonda fluorogénica que después de la desprotección del grupo alloc, exhibe una intensa señal fluorescente (Esquema 3b).



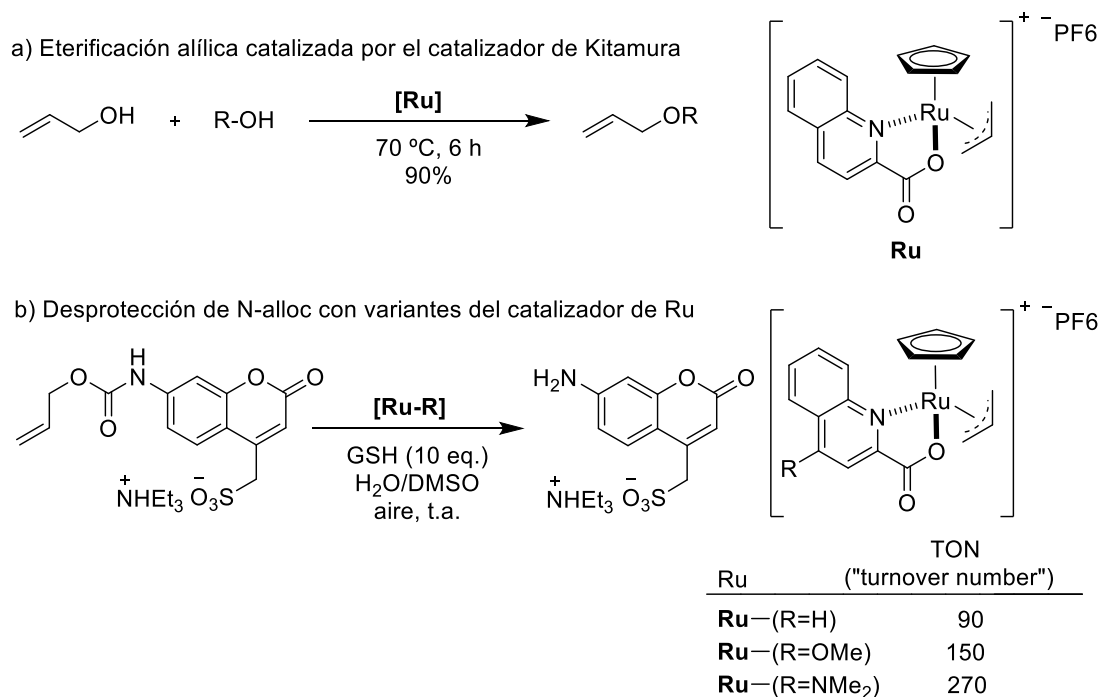
Esquema 3: Rotura de aliloxicarbonilo catalizada por Ru(II)

En este contexto, nuestro grupo de investigación en 2014 describió el primer ejemplo de una reacción de desprotección de grupos alloc que protegían agentes de unión de ADN en medios acuosos complejos e incluso en células¹⁶ (Esquema 4).



Esquema 4: Generación del agente de unión de ADN mediante una reacción de desprotección promovida por Ru

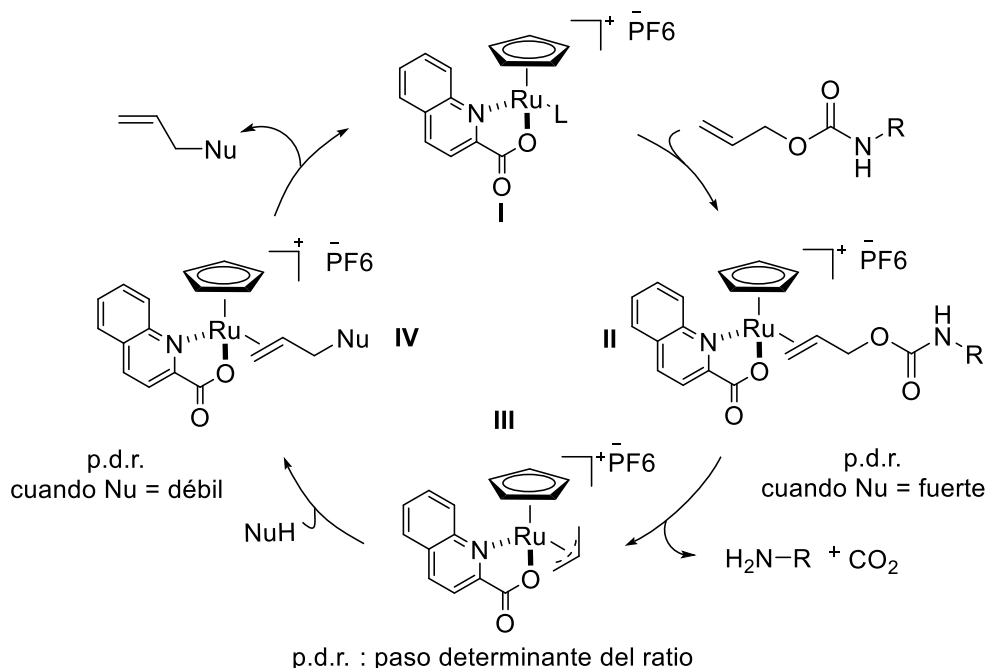
Una de las principales limitaciones de las reacciones descritas anteriormente es la necesidad de la presencia de tiofenol como nucleófilo en el medio. Para solucionar este problema Meggers y colaboradores desarrollaron un nuevo catalizador de Ru basado en el complejo de Kitamura (Esquema 5a)¹⁷ que presenta una gran eficiencia en la desprotección de grupos alloc, y que permite el uso de GSH como nucleófilo de sacrificio (Esquema 5b).



Esquema 5: Rotura catalítica de alilcarbamatos

El mecanismo propuesto se presenta en el Esquema 6. El intermedio **I** de Ru(II) experimenta un intercambio de ligando con la olefina para generar el intermedio **II**. Se forma el complejo π -alilo **III** con la consecuente liberación de la amina y CO₂. Finalmente, un ataque nucleófilo al complejo π -alilo genera el intermedio de Ru(II) **IV** recuperándose la especie catalíticamente activa **II** tras un intercambio de ligando. Cabe destacar que esta reacción se lleva a cabo sin ninguna dependencia de GSH lo que nos indica que el proceso no se ve afectado por la alta concentración de tioles en el medio celular.¹⁸ En presencia de un nucleófilo fuerte (GSH) la desprotección (formación de **III** a partir de **II**) se convierte en el paso determinante. Sin embargo, en presencia de

nucleófilos más suaves el proceso de alilación se convierte en el determinante (formación de **IV** a partir de **III**).



Esquema 6: Propuesta del mecanismo de desprotección del grupo aliloxicarbonilo

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva generación de complejos de rutenio, que están dotados de grupos directores permitiendo a los complejos dirigirse y acumularse en orgánulos específicos (mitocondrias, retículo endoplasmático, etc.). Estos complejos presentan un valor añadido, pues poseen una mejor internalización celular. Por ejemplo, el complejo **Ru0** presenta un grupo fosfonio que tiene gran afinidad hacia la mitocondria (Figura 3).¹⁹ Además, para favorecer la visualización de los complejos en el interior celular se han incorporado al grupo director fosfonio grupos fluorescentes como el pireno. La actividad intracelular de estos complejos se ha estudiado en la reacción de desprotección de alloc-rodamina 110.

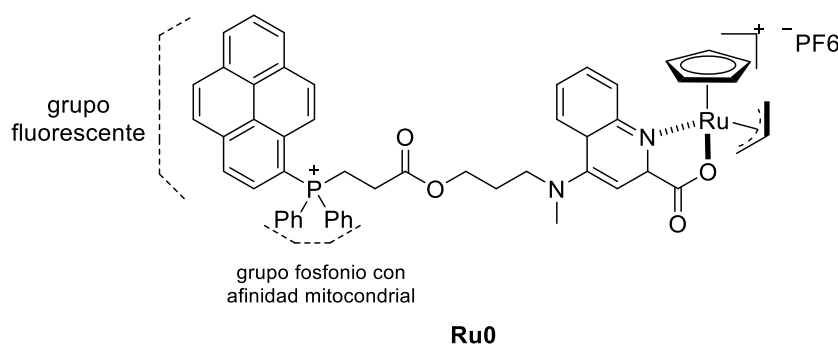
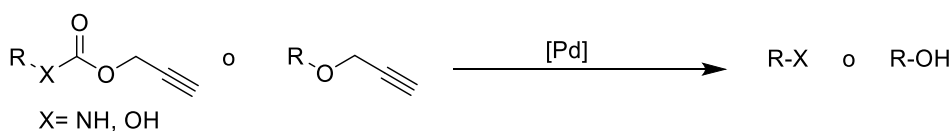


Figura 3: Complejo de Rutenio con grupo director con afinidad hacia las mitocondrias

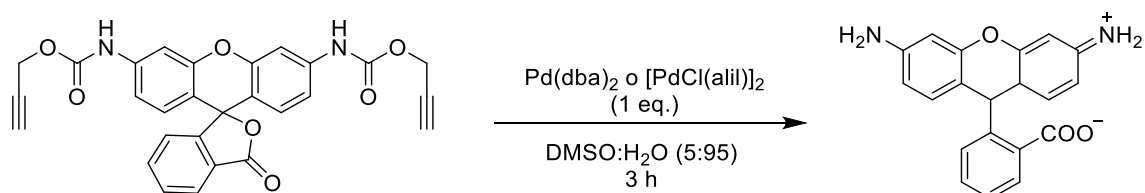
2.1.4.2 Rotura de *O*-propargilo y *N*-propargiloxicarbonilo (poc)

La desprotección de amina protegidas con el grupo propargiloxicarbonilo o alcoholes propargílicos ha sido descrita con complejos de Pd(0), Pd (II) y Pd(IV) (Esquema 7).²⁰



Esquema 7: Rotura del grupo protector propargiloxicarbonilo

El primer ejemplo de desprotección propargílica catalizada por complejos de Pd fue desarrollado por Chen y colaboradores.^{20a} Se trata de la desprotección de poc-rodamina 110 (Esquema 8).



Esquema 8: Desprotección de grupo propargiloxicarbonilo

La rotura del enlace *O*-alenilo constituye otro ejemplo de reacción bioortogonal promovida por complejos de Pd.²¹

2.2 Diseño de sondas fluorescentes

En las últimas décadas se han desarrollado métodos que permiten la detección de biomoléculas de una manera efectiva (HPLC, ELISA, etc). Sin embargo, estos métodos necesitan de un instrumental especializado y complicado que requiere conocimientos previos del operador. En los últimos años las sondas fluorescentes han aparecido como sustitutas idóneas de los métodos anteriores, debido a su gran sensibilidad y especificidad, la posibilidad de realizar una detección al momento, una respuesta rápida, baja citotoxicidad, bioortogonalidad, y la compatibilidad con células vivas, tejidos e incluso pequeños animales vivos.²²

Algunos parámetros a tener en cuenta a la hora del diseño de sondas son:

- La reacción de la sonda tiene que presentar una alta especificidad y selectividad. Estas sondas deben de ser capaces de realizar su función incluso estando en un medio tan complicado como el biológico.
- La sonda debe presentar baja citotoxicidad, un requerimiento indispensable en la química bioortogonal a desarrollar.
- La sonda debe presentar una alta permeabilidad que le permita una fácil internalización intracelular.
- La señal fluorescente debe ser intensa, así como fotoestable en el tiempo.
- La excitación ideal de la sonda debería producirse en longitudes de ondas cercanas al rojo lejano o cercanas al infrarrojo. Longitudes menores provocarían daño celular.

2.2.1 Sondas fluorescentes en la Química Bioortogonal

A pesar de que la química bioortogonal se encuentra en un proceso de expansión constante y de los esfuerzos en el desarrollo de nuevas transformaciones biocompatibles, existe un número muy limitado de sondas que nos permitan llevar a cabo una monitorización en tiempo real de los procesos en las células vivas.

Para la detección de los productos generados necesitamos una técnica muy potente como es la microscopía de fluorescencia. Y por ello, las sondas fluorogénicas son más necesarias que nunca. Se trata de estructuras que presentan fluorescencia latente mediante modulación química. En este trabajo la modulación será la protección de grupos funcionales. La modulación química puede tanto activar como desactivar la fluorescencia (ON->OFF), provocar que la sonda protegida y la sonda desprotegida emitan a longitudes de onda diferentes (ON->ON), etc. Mediante un proceso adecuado de activación, se consigue activar las sondas fluorogénicas y convertirlas en las correspondientes sondas fluorescentes.

2.2.1.1 Sondas AIE

Dentro de los diferentes tipos de sondas fluorescentes existe una clase que merece mención especial: las sondas AIE (“aggregation-induced emisión”).²³ Antes del descubrimiento de estas sondas, se conocía que la agregación de las moléculas conducía a una disminución de la señal de fluorescencia. Precisamente, en las sondas AIE ocurre

el proceso contrario. Mientras que en disolución presentan una nula emisión de fluorescencia, si se encuentran en un estado agregado exhiben una emisión de fluorescencia intensa característica. Las sondas AIE presentan poca citotoxicidad, bioortogonalidad y una alta estabilidad en la emisión de fluorescencia, lo que las convierte en sondas con una alta aplicación en la monitorización de reacciones bioortogonales.

Las sondas AIE fueron descritas por primera vez por Tang y colaboradores en el año 2001,²⁴ y desde ese momento, su estudio ha experimentado un gran auge.

Aunque el mecanismo no está del todo claro, se ha propuesto que la restricción de la rotación intramolecular, así como de las vibraciones intramoleculares y, por tanto, de los movimientos internos de la molécula, son los causantes de esta emisión anómala de fluorescencia.^{23c}



Ilustración 1:²⁵ Ejemplos de la emisión de diferentes sondas AIE en disolución (S) y en estado agregado (A)

3. OBJETIVOS

Nuestro principal objetivo en este trabajo es el diseño y síntesis de sondas que nos permiten monitorizar en tiempo real reacciones bioortogonales promovidas por complejos de metales de transición en medios celulares.

En concreto, en este trabajo se estudiará la reacción de desprotección de éteres alílicos, mediada por complejos de rutenio.

Para ello se van a diseñar sondas fluorescentes que presentan un fenol en su estructura. La protección del alcohol con un grupo alilo provoca un cambio en las propiedades fluorescentes de las moléculas. La desprotección de este grupo promovida por complejos de rutenio genera una señal fluorescente que permite evaluar el avance de la reacción en el interior celular.

Tabla 1: Cronograma de actividades

	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Búsqueda bibliográfica	X	X					
Síntesis de sondas		X	X	X	X		
Experimentos en células				X	X	X	
Seminarios CiQUS	X	X	X	X	X	X	
Seminarios grupo	X	X	X	X	X	X	
Escritura del trabajo						X	X

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Procesos de desprotección de éteres alílicos mediados por complejos de rutenio

Dada la amplia experiencia y conocimiento en este campo, este grupo ha desarrollado una serie de complejos de rutenio activos en la desprotección de éteres alílicos en el interior celular (Figura 4a).¹⁹ Se trata de especies biocompatibles, no citotóxicas y estables en el medio celular. Además, se ha conseguido dirigir y acumular complejos en compartimentos celulares específicos. La estructura de estos complejos (Figura 4b) se basa en el complejo desarrollado por Meggers que a su vez es una modificación del de Kitamura.¹⁷ El complejo consta de tres elementos importantes: un ligando 2-quinolidincarboxilato (**Ru1** y **Ru2**) o 8-hidroxiquinolina (**Ru3**) al que se le une una cadena con la adecuada hidrofobicidad para permitir la internalización celular que a su vez sirve de punto de anclaje para el tercer elemento, el grupo director hacia el compartimento celular deseado. Para facilitar su visualización en medio celular el grupo director posee un grupo fluorescente aromático que proporciona fluorescencia al complejo (pireno, **Ru1** y **Ru2**). A continuación, se presentan los complejos usados a lo largo de este trabajo:

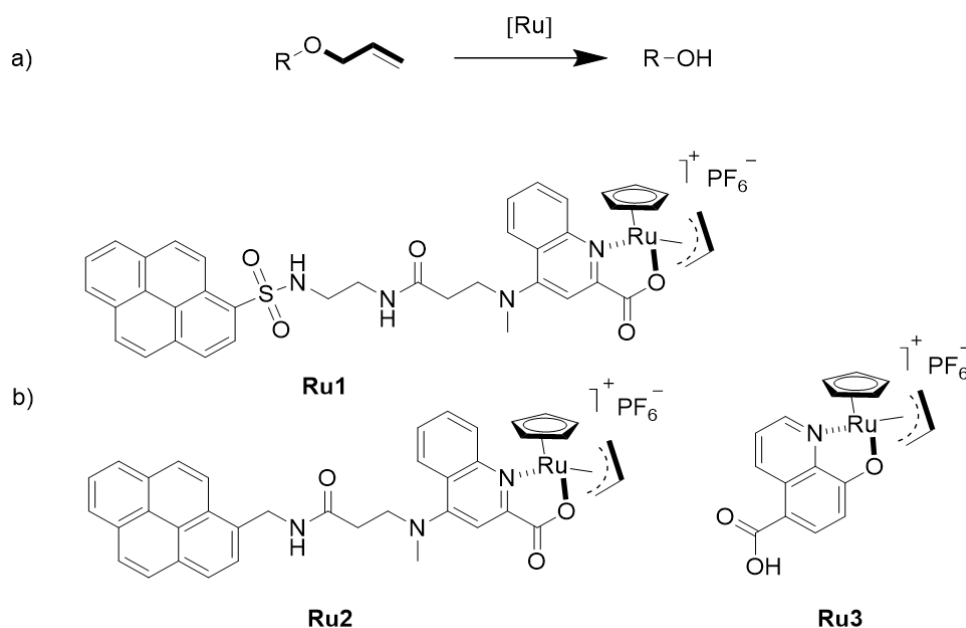


Figura 4: a) Reacción de desprotección promovida por Ru(II); b) Complejos de Ru usados en este trabajo

4.2 Diseño y síntesis de sondas

El número de sondas fluorogénicas desarrolladas es muy escaso, cuando se compara con el número creciente de transformaciones que se pueden llevar a cabo en medios celulares. Esto puede ser debido, en parte, a la complejidad del medio celular, así como

a la falta de reacciones promovidas por metales de transición bioortogonales adecuadas.

En este trabajo pretendemos preparar sondas fluorogénicas que se activan mediante una reacción de desprotección promovida por complejos de rutenio. Las sondas fluorogénicas presentan un éter alílico mientras que los productos fluorescentes poseen un grupo hidroxilo libre. El cambio en las propiedades fluorescentes se debe, precisamente, a este cambio en el grupo funcional presente en la sonda.

Tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva se ha seleccionado una serie de sondas fluorescentes que se muestran en la Figura 5.^{25,26} Todas ellas constan de un grupo funcional hidroxilo libre que será protegido con un grupo alilo, lo que provoca una regulación de la emisión de fluorescencia. Estas moléculas protegidas presentan fluorescencia residual, mientras que sus análogas desprotegidas poseen una fluorescencia intensa. Las diferencias entre las distintas señales emitidas por las sondas protegidas/desprotegidas son de gran utilidad para la monitorización de reacciones bioortogonales, aportando una gran sensibilidad y facilidad de interpretación.

Además, las sondas sonda A y B son sondas tipo AIE que presentan una serie de propiedades idóneas para ser una sonda efectiva en medio celular, como son la baja citotoxicidad, gran biocompatibilidad y excelente fotoestabilidad.

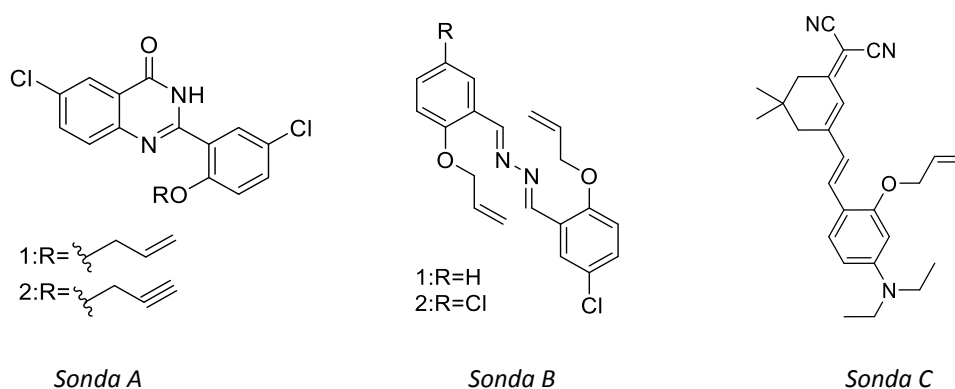
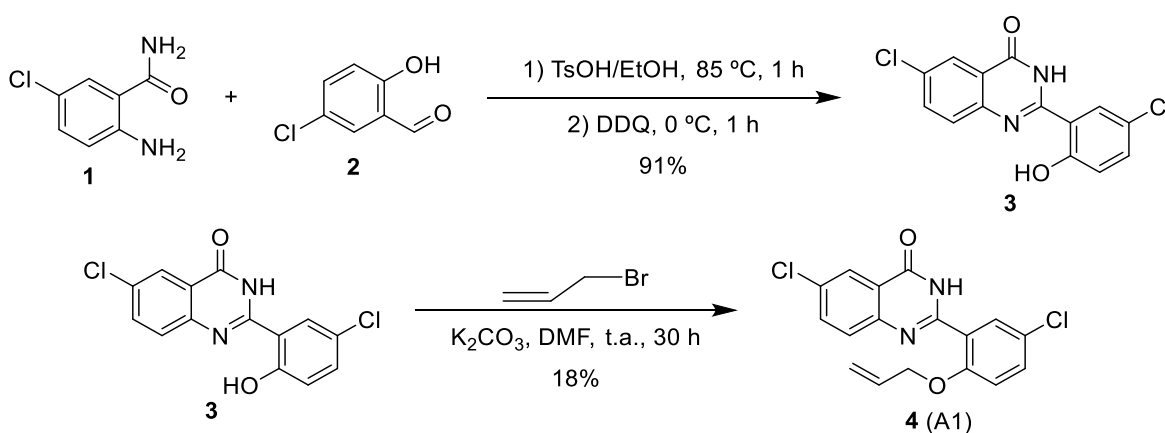


Figura 5: Sondas sintetizadas en este trabajo

4.2.1 Síntesis de la sonda A

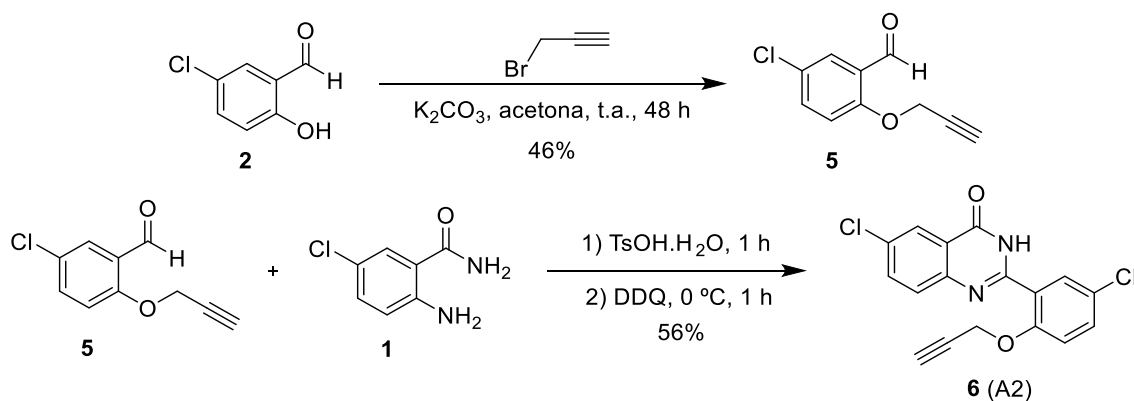
La sonda A es una sonda OFF-ON, en la que la protección del grupo hidroxilo provoca la emisión casi imperceptible de fluorescencia y su desprotección conduce a la formación

de agregados que aumentan considerablemente el grado de emisión de fluorescencia, entrando esta sonda en la categoría de sondas AIE.^{26a} La síntesis de la sonda A1 se obtiene mediante 2 pasos de reacción. En primer lugar, se hace reaccionar 2-amino-5-clorobenzamida **1** con 5-cloro-2-hidroxibenzaldehído **2** en presencia de ácido p-toluensulfónico, EtOH y DDQ. El producto 6-cloro-2-(5-cloro-2-hidroxifenil)quinazolin-4(3H)-ona **3** se obtuvo con un rendimiento del 91%. A continuación, mediante tratamiento con bromuro de alilo en presencia de K₂CO₃ y DMF se aísla 2-(2-(aliloxi)-5-clorofenil)-6-cloroquinazolin-4(3H)-ona **4** (A1) con un rendimiento del 18% (Esquema 9 y Anexo I).²⁷



Esquema 9: Ruta sintética de la Sonda A1

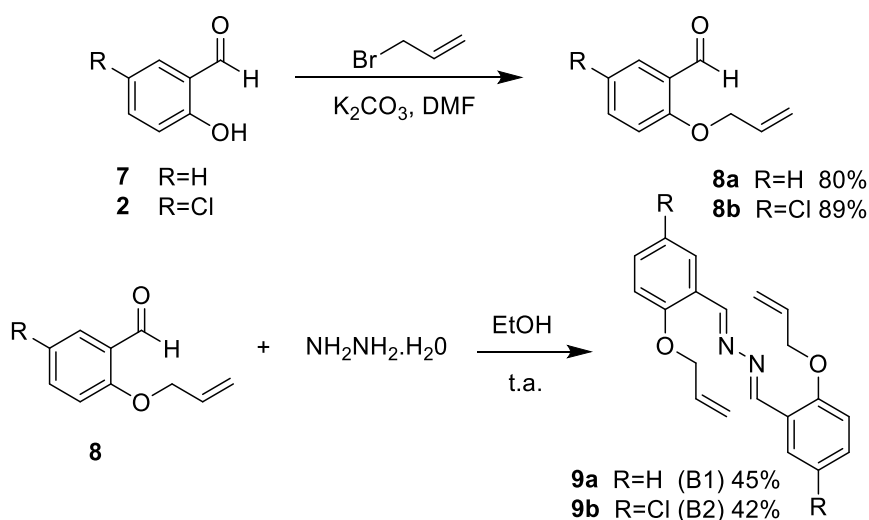
También se ha preparado una sonda con el grupo OH protegido con un grupo propargilo (sonda A2). Como se ha comentado en la introducción, se han descrito reacciones de desprotección de éteres propargílicos promovidas por complejos de paladio.²⁰ Por ello, aunque no es el objetivo de este trabajo, este compuesto se presenta como un sustrato adecuado para futuros estudios de reactividad de este metal. La síntesis de la sonda A2 consta de 2 pasos. Primeramente la reacción de 5-cloro-2-hidroxibenzaldehído **2** con bromuro de propargilo en presencia de K₂CO₃ y acetona, conduce al 5-cloro-2-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldehído **5** con un rendimiento del 46%. A continuación, mediante tratamiento con 2-amino-5-clorobenzamida **1** en presencia de ácido p-toluensulfónico y DDQ se obtiene el producto **6** (A2) deseado con un rendimiento del 57% (Esquema 10). En esta ruta sintética se invierte el orden de los pasos de reacción con respecto a la síntesis de A1. Este cambio de protocolo pretende minimizar la posible generación de un producto O-propargilado y N-propargilado.



Esquema 10: Ruta sintética de la sonda A2

4.2.2 Síntesis de la sonda B

La sonda B es una sonda OFF-ON, en la que la protección del grupo hidroxilo provoca la desactivación casi total de la fluorescencia y su desprotección permite la formación de agregados aumentando así la emisión de fluorescencia.²⁵ Esta sonda también se considera una sonda AIE. La síntesis de las sondas B1 y B2 constan de 2 pasos de reacción. En primer lugar, el tratamiento de salicilaldehído **7** con bromuro de alilo en presencia de K_2CO_3 y DMF conduce a la obtención de 2-(aliloxi)benzaldehído **8**. En segundo lugar, la reacción de **8** disuelto en EtOH con hidrazina monohidratada genera la sonda **9** (B1 y B2) deseada (Esquema 11).

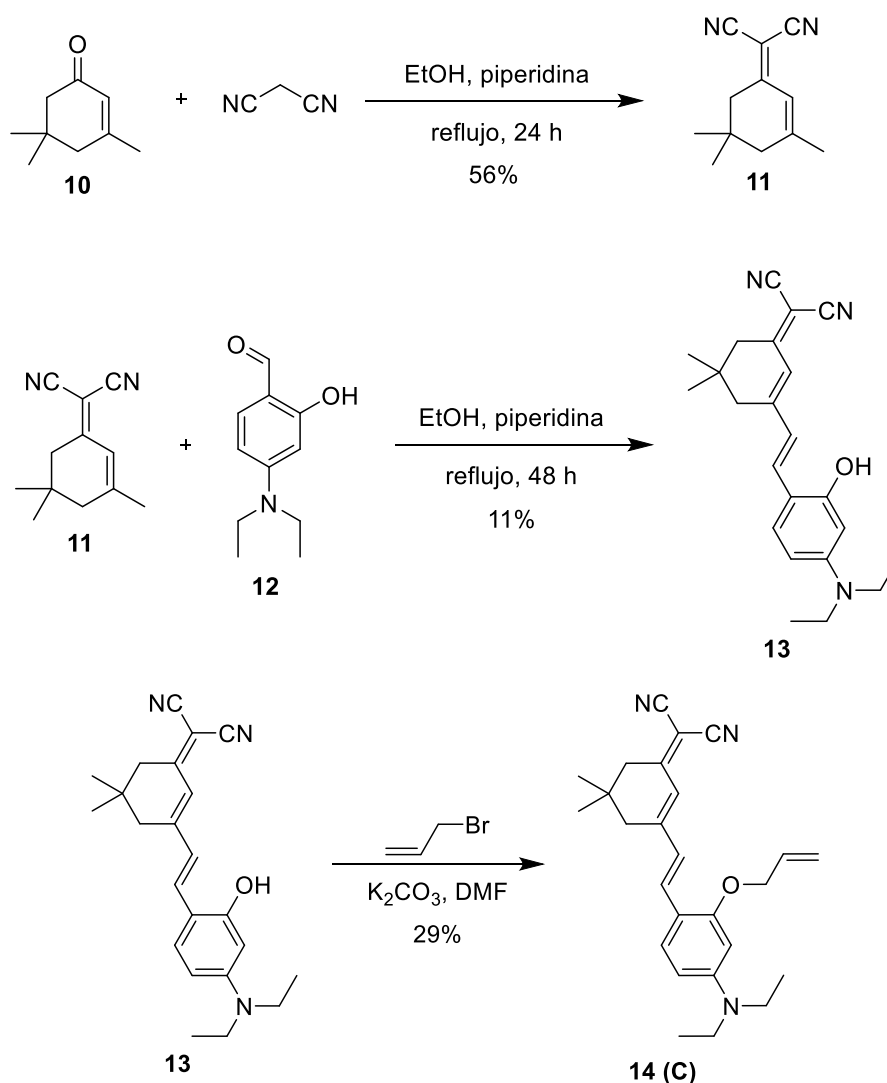


Esquema 11: Ruta sintética de las sondas B1 y B2

4.2.3 Síntesis de la sonda C

La sonda C es una sonda ON-ON^{26b} debido a que la protección del grupo hidroxilo provoca un cambio en las propiedades fluorescentes de las moléculas: sustrato y producto emiten a diferentes longitudes. Esto nos permitirá identificar claramente el estado de la reacción en medio celular. La síntesis de la sonda C consta de 3 pasos de reacción. En primer lugar, el tratamiento de isoforona **10** con malononitrilo en presencia de EtOH y piperidina, da lugar a la formación del producto 2-(3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ilideno) malononitrilo **11** con un rendimiento del 56%. En segundo lugar, reacción de 2-(3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ilideno)malononitrilo **11** con 4-(dietilamino)-2-hidroxibenzaldehído **13** en presencia de EtOH y piperidina conduce al producto **13** con un rendimiento del 11%.

A continuación, se obtiene **14** (C) con un rendimiento del 29% por tratamiento de **13** con bromuro de alilo en presencia de K₂CO₃ y DMF (Esquema 12 y Anexo I).



Esquema 12: Ruta sintética de la sonda C

4.3 Estudios en células vivas

Una vez sintetizadas las sondas, estudiaremos su comportamiento en medio celular. Trabajaremos con células de cáncer cérvico-uterino (células HeLa). Debido a la complejidad del medio celular, así como las características intrínsecas del medio, trabajar en medio celular difiere mucho del trabajo en laboratorio. Los resultados que se presentan a continuación son el resultado de numerosos experimentos realizados a lo largo de la elaboración de este trabajo, hasta conseguir unas condiciones óptimas y de alta reproducibilidad.

Como ya se ha comentado anteriormente, las diferentes sondas se van a estudiar en la reacción de desprotección mediada por complejos de rutenio. Se probarán los tres

complejos mostrados en la Figura 4. Asimismo, se optimizarán también concentraciones y tiempos de reacción, aunque sólo se mostrarán las condiciones finales optimas.

4.3.1 Estudio de la sonda A1

Las células son incubadas con 50 μM de complejo de rutenio (**Ru1**) durante 30 min en el medio de cultivo celular DMEM (“Dulbecco’s modified Eagles’s medium”) (400 μL). A continuación, se realizan 3 lavados con DMEM fresco (400 μL), para así evitar que quede complejo en el medio extracelular que pueda reaccionar con la sonda. De este modo garantizamos que la reacción ocurre únicamente de manera intracelular. Las células se incuban con sonda A (100 μM) durante 30 min. En paralelo se realizan los controles correspondientes: células incubadas únicamente con la sonda A (100 μM), células incubadas únicamente con el complejo **Ru1** (50 μM), así como células incubadas únicamente con el producto (100 μM) todos ellos durante 30 min.

Para finalizar, se lavan las células con DMEM (2X400 μL) para eliminar restos extracelulares y se transfieren a los portaobjetos para facilitar su visionado. Se realizan capturas de imagen de las muestras gracias al equipo y diferentes filtros presentes en el instrumento.

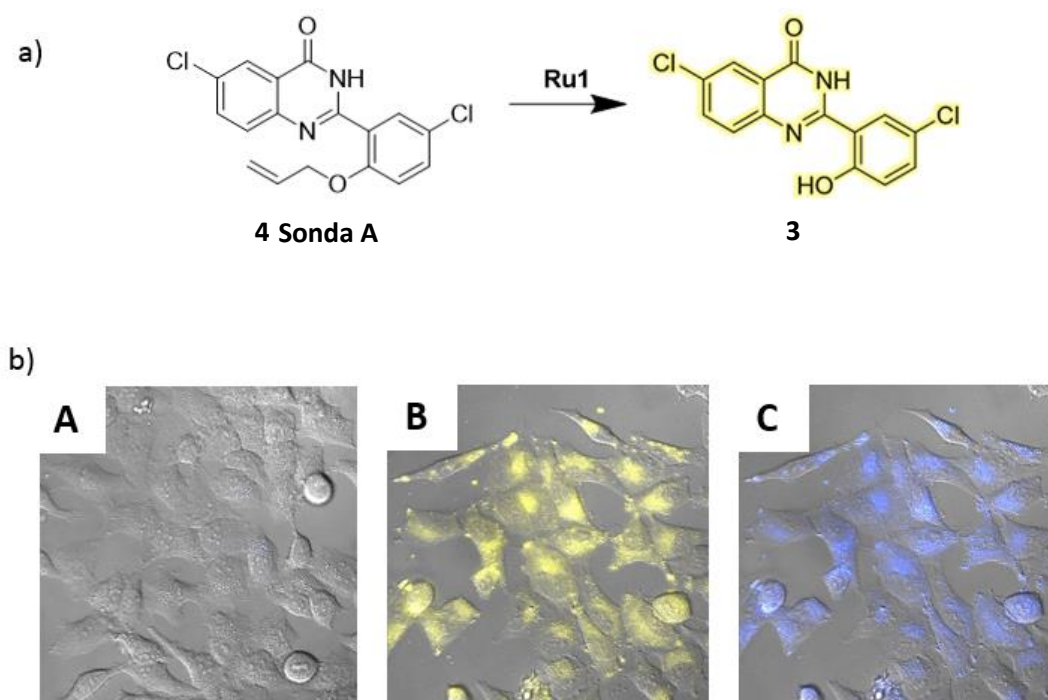


Figura 6: a) Reacción de desprotección que tiene lugar en medio celular; b) Micrografías de fluorescencia en células HeLa: (A) Células tratadas con sonda A; B) Células tratadas con **Ru1** y sonda A ($\lambda_{ex}=385$ nm, $\lambda_{em}>520$ nm); C) Células tratadas con **Ru1** y sonda A ($\lambda_{ex}=385$ nm, $\lambda_{em}=450-500$ nm)

En la Figura 6 se recogen las imágenes de estos estudios. En el panel A aparecen células tratadas únicamente con la sonda A. Como se puede observar, no existe señal fluorescente, lo que corrobora el comportamiento adecuado de este compuesto como sonda fluorogénica. En los paneles B y C se muestra la señal intensa de fluorescencia generada intracelularmente tras la incubación con el complejo y el sustrato, siguiendo el protocolo previamente especificado. La sonda presenta fluorescencia al excitar a 385 nm con longitudes de emisión entre 520-550 y 450-500 nm (paneles B y C, respectivamente). También cabe destacar que en estos paneles se observa la formación característica de un agregado que presenta una fluorescencia muy intensa propia de los AIEs.

Se confirma que la señal fluorescente emitida corresponde con el producto de reacción, al incubar directamente las células con producto (Figura 7, paneles A y B). También demostramos que la señal residual del complejo (fluorescencia del grupo pireno) no interfiere en la señal del producto (Figura 7, paneles C y D).

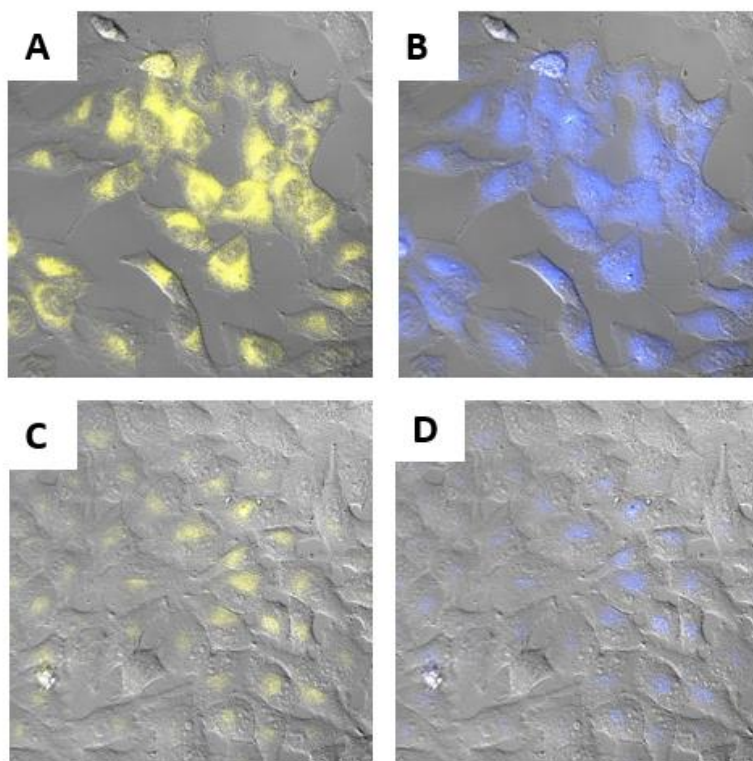
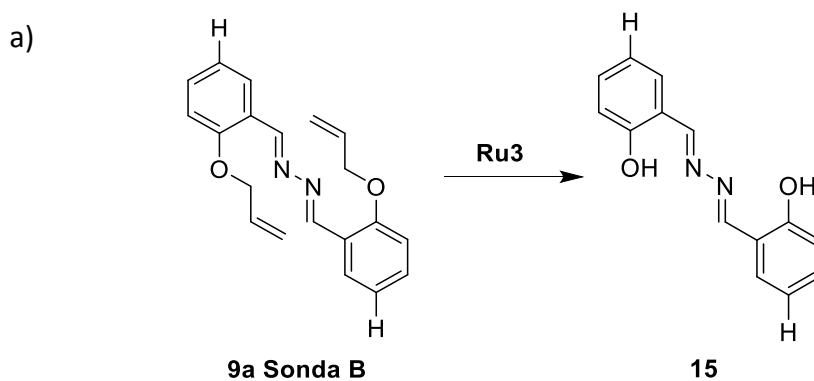


Figura 7: (A, B): Células tratadas con el producto **3**: A) ($\lambda_{ex}=385\text{ nm}$, $\lambda_{em}>520\text{ nm}$); B) ($\lambda_{ex}=385\text{ nm}$, $\lambda_{em}=450-500\text{ nm}$); (C, D) Células tratadas con **Ru1**: C) ($\lambda_{ex}=385\text{ nm}$, $\lambda_{em}>520\text{ nm}$); D) ($\lambda_{ex}=385\text{ nm}$, $\lambda_{em}=450-500\text{ nm}$)

4.3.2 Estudio de la sonda B1

Las células son incubadas con 50 μM del complejo **Ru3** durante 30 min en DMEM (400 μL). A continuación, se realizan los 3 lavados pertinentes con DMEM (400 μL). Las células se incuban con sonda B1 (100 μM) durante 90 min (Figura 8). De nuevo, en paralelo se realizan los controles correspondientes (células incubadas únicamente con la sonda B1 durante 90 min, células incubadas únicamente con los complejos durante 30 min (50 μM), así como células incubadas únicamente con el producto durante 90 min (100 μM).



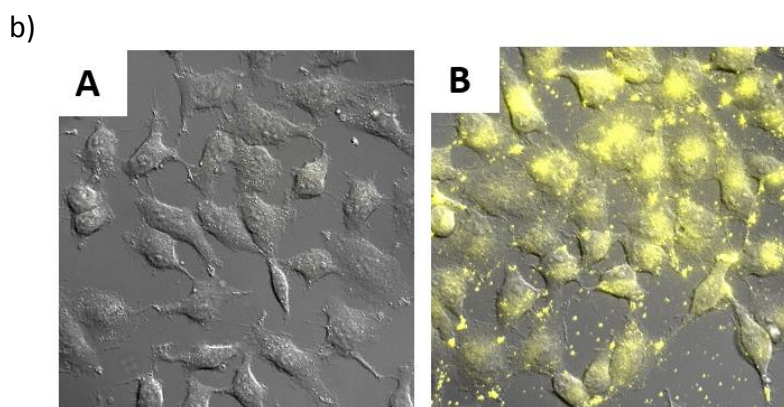


Figura 8: a) Reacción de desprotección que tiene lugar en medio celular; b) Micrografías de fluorescencia en células HeLa: A) Células tratadas con sonda B1; B) Células tratadas con **Ru3** y sonda B1 ($\lambda_{ex}=385\text{ nm}$, $\lambda_{em}>520\text{ nm}$)

En la Figura 8 se muestran las imágenes procesadas de estos experimentos. En el panel A las células han sido tratadas únicamente con la sonda B1. Como se puede observar, no existe señal fluorescente, tal y como cabe esperar de una sonda fluorogénica. En el panel B se muestra la señal intensa de fluorescencia generada intracelularmente tras la incubación con el complejo **Ru3** y el sustrato, siguiendo el protocolo previamente especificado. La sonda presenta fluorescencia al excitar a 385 nm con longitudes de emisión a partir de 520 nm. Al igual que en el caso interior, aparece en el panel B de la Figura 8 un agregado que presenta una fluorescencia muy intensa propia de los AIEs.

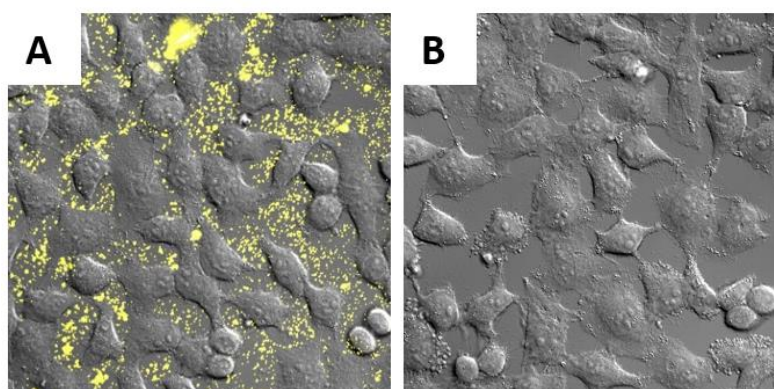


Figura 9: Micrografías de fluorescencia en células HeLa: A) Células tratadas con el producto **16**; B) Células tratadas con **Ru3**

En la Figura 9, panel A, se muestran células incubadas únicamente con el producto. Es llamativa la formación de un precipitado fluorescente extracelular. Esto significa que el producto precipita y forma agregados fluorescentes en el medio celular, lo que impide

su internalización. Sin embargo, cuando las células se incuban con la sonda B1 (Figura 8 panel A) no se observan estos precipitados. Esto es debido a que la protección del grupo OH impide la agregación, favoreciendo por tanto su internalización y la posterior generación del producto en el interior de las células. En el panel B, se observa la nula emisión de fluorescencia por parte del complejo **Ru3**.

4.3.3 Estudio de la sonda C

Las células son incubadas con 50 μM de los complejos de rutenio **Ru1** y **Ru2** durante 30 min en DMEM (400 μL). A continuación, se realizan los 3 lavados pertinentes con DMEM (400 μL). Las células se incuban con la sonda C (100 μM) durante 4 h. De nuevo, en paralelo se realizan los controles correspondientes (células incubadas únicamente con la sonda C durante 4 h (100 μM), células incubadas únicamente con los complejos (50 μM) durante 30 min, así como de células incubadas únicamente con el producto (100 μM) durante 4 h.

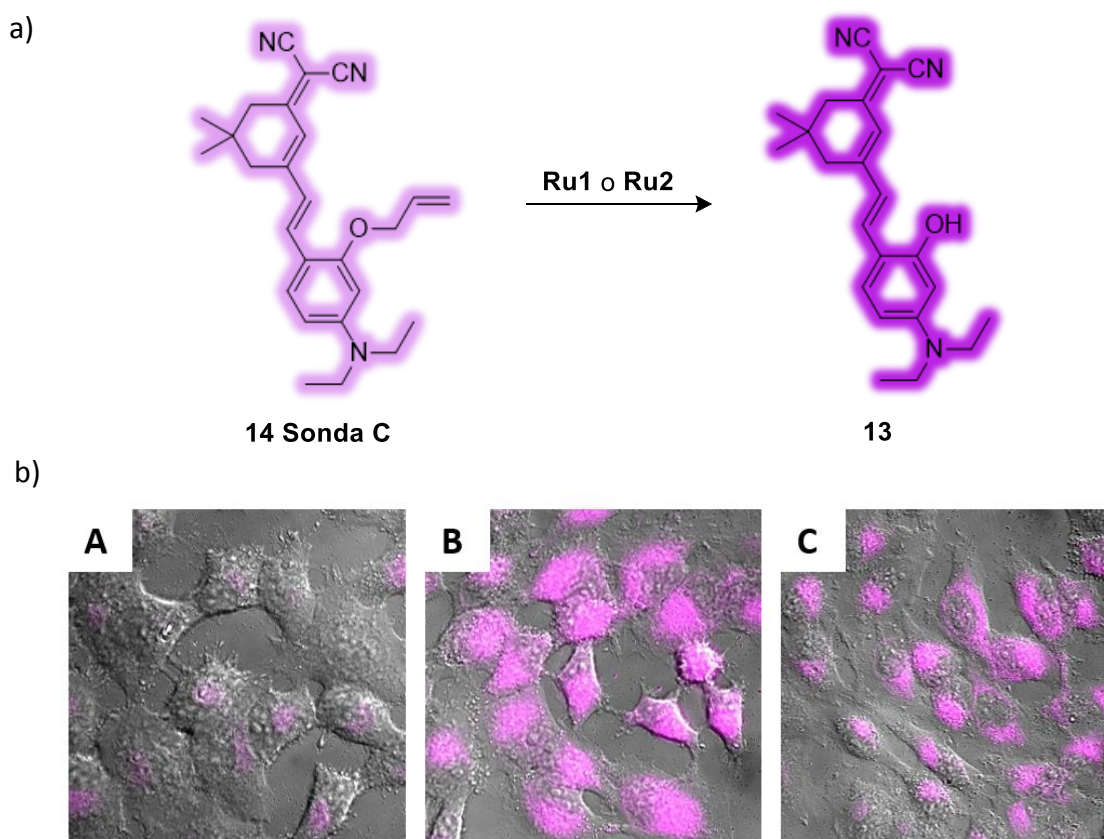


Figura 10: a) Reacción de desprotección que tiene lugar en medio celular; b) Micrografías de fluorescencia en células HeLa: A) Células tratadas con sonda C; B) Células tratadas con **Ru1** y sonda C; C) Células tratadas con **Ru2** y sonda C ($\lambda_{\text{ex}}=650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=675\text{-}725 \text{ nm}$)

Al igual que en los casos anteriores podemos observar los resultados de los experimentos en las imágenes recogidas en la Figura 10. En el panel A se muestran células tratadas únicamente con la sonda C protegida. Como se puede comprobar existe una emisión de fluorescencia residual. Los paneles B y C desvelan un aumento en la intensidad de la señal de fluorescencia al incubar con el sustrato las células previamente tratadas con los complejos de rutenio, siguiendo el protocolo previamente especificado. La sonda presenta fluorescencia al excitar a 650 nm con longitudes de emisión entre 700-750 nm.

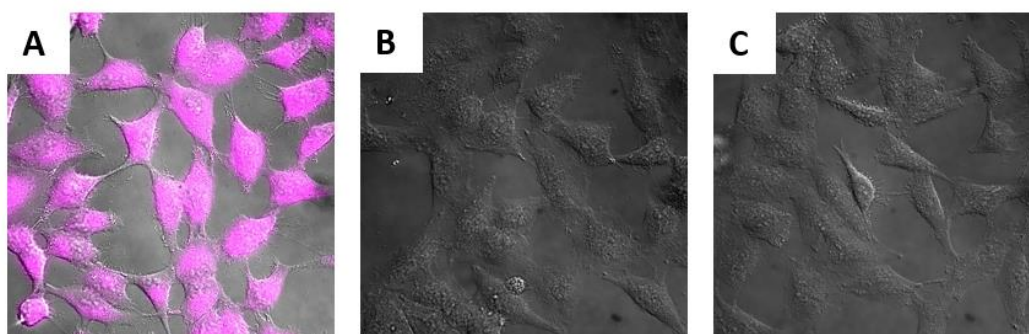


Figura 11: A) Células tratadas con el producto **13** durante 4 h ($\lambda_{ex}=650$ nm, $\lambda_{em}=675-725$ nm); B) Células tratadas con **Ru1**; C) Células tratadas con **Ru2**

La Figura 11, panel A, muestra células incubadas únicamente con el producto, observándose emisión similar de fluorescencia. En el panel B y C se observa como **Ru1** y **Ru2** no presentan emisión de fluorescencia en las longitudes de onda utilizadas.

Teniendo en cuenta toda la información adquirida a lo largo de este estudio en células vivas, se puede concluir que las sondas sintetizadas son sondas bioortogonales. Las células no ven alterada su morfología tras el tratamiento con las mismas. Asimismo, tampoco se observa un descenso en su viabilidad. Además, son sustratos fácilmente internalizables. Finalmente son desprotegidas en el interior de las células por los complejos de rutenio. Por todo ello, cumplen con el objetivo de poder monitorizar el avance de una reacción intracelular, pudiendo diferenciarse perfectamente las distintas señales de fluorescencia emitidas por los sustratos y los productos.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha planteado el diseño y síntesis de sondas fluorescentes que permiten la monitorización en tiempo real de una reacción bioortogonal en el interior de células vivas.

Se han preparado 4 sondas fluorogénicas tipo AIE (**4**, **6**, **9a** y **9b**) que exhiben altos niveles de fluorescencia en estado agregado. También se ha sintetizado la sonda fluorescente ON->ON **14** en la que el sustrato y el producto emiten a longitudes de onda diferentes (favoreciendo así la monitorización de los procesos). Además, presenta la ventaja añadida de emitir en el IR, convirtiéndose en una sonda ideal para futuros estudios en organismos más complejos.

Estas sondas fluorescentes se han utilizado para estudiar reacciones de desprotección de éteres alílicos promovidas por complejos de rutenio en el interior de células vivas HeLa.

Las sondas presentan baja citotoxicidad y alta biocompatibilidad al no observarse ningún efecto adverso.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos animan a profundizar en la investigación del uso de sondas fluorescente como sustratos en reacciones promovidas por rutenio. Asimismo, también se puede modificar su estructura para ser empleadas en reacciones mediadas por otros metales de transición. La química bioortogonal está aún en su infancia dentro de la química biológica, pero sus potenciales aplicaciones auguran un gran futuro apoyado en el desarrollo de la microscopía fluorescente.

Conclusiones:

Neste traballo planeouse o deseño e síntese de sondas fluorescentes que permiten a monitorización en tempo real dunha reacción bioortogonal no interior de células vivas.

Presentáronse 4 sondas fluoroxénicas tipo AIE (**4**, **6**, **9a** y **9b**) que exhiben altos niveis de fluorescencia en estado agregado- Tamén se sintetizou a sonda fluorescente ON->ON **14** na que o substrato e o produto emiten a lonxitudes de onda diferentes (favorecendo así a monitorización dos procesos). Ademais, presenta a vantaxe engadida de emitir no IR, converténdose nunha sonda ideal ara futuros estudos en organismos máis complexos.

Estas sondas fluorescentes utilizáronse para estudar reaccións de desprotección de éteres alílicos promovidas por complexos de rutenio no interior de células vivas HeLa.

As sondas presentan baixa citotoxicidade e alta bioortogonalidade ao non observarse ningún efecto adverso.

Os resultados obtidos neste traballo anímánnos a afondar na investigación do uso de sondas fluorescentes como substratos en reaccións promovidas por complexos de rutenio. Asimesmo, tamén se pode modificar a súa estrutura para ser empregadas en reaccións mediadas por outros metais de transición. A química bioortogonal está aínda na súa infancia , pero as súas potenciais aplicacións auguran un gran futuro apoiado no desenvolvemento da microscopía fluorescente

Conclusions:

In this work, the design and synthesis of fluorescent probes that allow real-time monitoring of a bioorthogonal reaction inside living cells has been proposed.

Four AIE-type fluorogenic probes (**4**, **6**, **9a** and **9b**) have been prepared that exhibit high levels of fluorescence in an aggregated state. The fluorescent probe ON-> ON **14** was also synthesized in which the substrate and the product emit at different wavelengths (thus favoring the monitoring of the processes). In addition, it presents the added advantage of emitting in the IR, becoming an ideal probe for future studies in more complex organisms.

These fluorescent probes have been used to study deprotection reactions of allylic ethers promoted by ruthenium complexes inside living HeLa cells.

The probes show low cytotoxicity and high biocompatibility since adverse effects are not appreciated.

The results obtained in this work encourage us to further explore the use of fluorescent probes as substrates in reactions promoted by ruthenium. Likewise, its structure can also be modified to be used in reactions mediated by other transition metals. Bioorthogonal chemistry is still in its infancy within biological chemistry, but its potential applications augur a great future supported by the development of fluorescent microscopy.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 (a) T. Völker, E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 48; (b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974.
- 2 L. Vigh, F. Joó, Á. Cséplö, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *146*, 241.
- 3 (a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596; (b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 305.
- 4 C. Streu, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645.
- 5 (a) Y. Bai, X. Feng, H. Xing, Y. Xu, B. K. Kim, N. Baig, T. Zhou, A. A. Gewirth, Y. Lu, E. Oldfield, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11077; (b) S. Li, L. Wang, F. Yu, Z. Zhu, D. Shobaki, H. Chen, M. Wang, J. Wang, G. Qin, U. J. Erasquin, L. Ren, Y. Wang, C. Cai, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2107; (c) J. Miguel-Ávila, M. Tomás-Gamasa, A. Olmos, P. J. Pérez, J. L. Mascareñas, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 1947.
- 6 (a) A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164; (b) V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912; (c) J. Clavadetscher, S. Hoffmann, A. Lilienkamp, L. Mackay, R. M. Yusop, S. A. Rider, J. J. Mullins, M. Bradley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15662.
- 7 (a) V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. D. Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696; (b) C. Wang, D. Wang, S. Yu, T. Cornilleau, J. Ruiz, L. Salmon, D. Astruc, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5424; (c) T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- 8 (a) N. Calderon, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 127; (b) K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4490; (c) A. Fürstner, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6505.
- 9 J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1634.
- 10 K. Kodama, S. Fukuzawa, H. Nakayama, K. Sakamoto, T. Kigawa, T. Yabuki, N. Matsuda, M. Shirouzu, K. Takio, S. Yokoyama, K. Tachibana, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 232.
- 11 (a) K. K.-Y. Kung, H.-M. Ko, J.-F. Cui, H.-C. Chong, Y.-C. Leung, M.-K. Wong, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11899; (b) E. V. Vinogradova, C. Zhang, A. M. Spokoyny, B. L. Pentelute, S. L. Buchwald, *Nature* **2015**, *526*, 687.
- 12 S. Betanzos-Lara, Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, B. Qamar, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3897.

- 13 K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3579.
- 14 J. Tsuji, H. Takahashi, M. Morikawa, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *6*, 4387.
- 15 (a) G. Hata, K. Takahashi, A. Miyake, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1970**, 1392; (b) K. E. Atkins, W. E. Walker, R. M. Manyik, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3821.
- 16 M. I. Sánchez, C. Penas, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1901.
- 17 (a) T. Völker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10536; (b) H. Saburi, S. Tanaka, M. Kitamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1730.
- 18 G. Y. Tonga, Y. Jeong, B. Duncan, T. Mizuhara, R. Mout, R. Das, S. T. Kim, Y.-C. Yeh, B. Yan, S. Hou, V.M. Rotello, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 597.
- 19 M. Tomás-Gamasa, M. Martínez-Calvo, J. R. Couceiro, J. L. Mascareñas, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12538.
- 20 (a) J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352; (b) M. Martínez-Calvo, J. Couceiro, P. Destito, J. Rodríguez, J. Mosquera, J. L. Mascareñas, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 6055.
- 21 J. Wang, S. Zheng, Y. Liu, Z. Zhang, Z. Lin, J. Li, G. Zhang, X. Wang, J. Li, P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15118.
- 22 Y. Fu, N. S. Finney, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29051.
- 23 (a) Y. Chen, J. W. Y. Lam, R. T. K. Kwok, B. Liu, B. Z. Tang, *Mater. Horiz.* **2019**, *6*, 428; (b) Z. He, C. Ke, B. Z. Tang, *ACS Omega* **2018**, *3*, 3267; (c) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718.
- 24 J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, B. Z. Tang, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **2001**, 381, 1740.
- 25 W. Tang, Y. Xiang, A. Tong, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2163.
- 26 (a) K. K. Sadhu, E. Lindberg, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 16664; (b) H. Zhang, X. Xia, H. Zhao, G. Zhang, D. Jiang, X. Xue, J. Zhang, *Dyes Pigments* **2019**, *163*, 183.
- 27 Se obtiene un rendimiento bajo porque se aísla también el producto que presenta tanto el nitrógeno como el oxígeno protegidos con el grupo alilo.

7. ANEXOS

7.1 Anexo I: Procedimiento experimental

Condiciones de trabajo y disolventes

Las reacciones fueron realizadas con disolventes anhidros de la casa comercial Sigma Aldrich o Fisher; en caso de utilizar como disolvente agua se obtuvo a partir de un sistema de purificación de agua MilliQ integral con dispensador Q-POD de la marca Merck. Los disolventes empleados en procesos de extracción y en cromatografía de columna se emplearon con el grado de pureza adecuado y sin previa purificación. Las fracciones orgánicas procedentes de extracciones acuosas se secaron con sulfato de magnesio anhidro.

Para reacciones a altas temperaturas se utilizaron baños de silicona y placas metálicas provistas de termómetro de contacto.

Las adiciones de disoluciones y disolventes se llevaron a cabo vía jeringa de plástico y agujas de la casa comercial Braun.

Para la cromatografía en capa fina se utilizó gel de sílice F-254 Merck, con revelado mediante exposición a la luz ultravioleta (254 nm, 365 nm), y revelado al calor de capa fina previamente tratados con disolución reveladora de permanganato: K_2CO_3 (0.4 M), NaOH (0.015 M), $KMnO_4$ (0.05 M) en H_2O . Los factores de retención (R_f) descritos se han obtenido sobre gel de sílice. En la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice Sílicagel 60A de Acros Organics.

Los productos y los crudos se concentraron eliminando los elementos volátiles a presión reducida con un rotavapor Buchi y posterior tratamiento con alto vacío.

Técnicas analíticas e instrumentales

1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se realizaron en $CDCl_3$, salvo que se indique lo contrario, y se registraron en los espectrómetros AMX-300 (300.13 MHz para 1H y 75.37 MHz para ^{13}C).

Los espectros se procesaron con la ayuda del programa MestreNova®.

Los valores de los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm), y se encuentran referidos a la señal residual del disolvente, 1H (7.26 ppm) y ^{13}C

(77.16). Las multiplicidades en los espectros de ^{13}C se han asignado mediante técnicas DEPT. Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad de las señales son las siguientes:

^1H : (s) = singulete, (d) = doblete, (dd) = doble doblete, (dt) = doble triplete, (t) = triplete, (c) = cuadruplete, y (m) = multiplete o señal sin resolver.

2. Microscopía electrónica

Para la visualización celular se utilizó una cámara Andorzilla montada en un microscopio Nikon TiE. Las imágenes fueron procesadas con ImageJ y NIS software (Nikon).

Los parámetros empleados son los siguientes:

Para el NiKon (Semrock): Cubo de filtros DAPI-1160B-000: BP 387/11 nm, LP 447/60 nm and DM 409 nm; Cubo de filtros FITC-3540C-000: BP 482/35 nm, LP 536/40 nm y DM 506 nm; Cubo de filtros TRITC-B-000: BP 543/22 nm, LP 593/40 nm y DM 562 nm.

3. Espectroscopía de masas

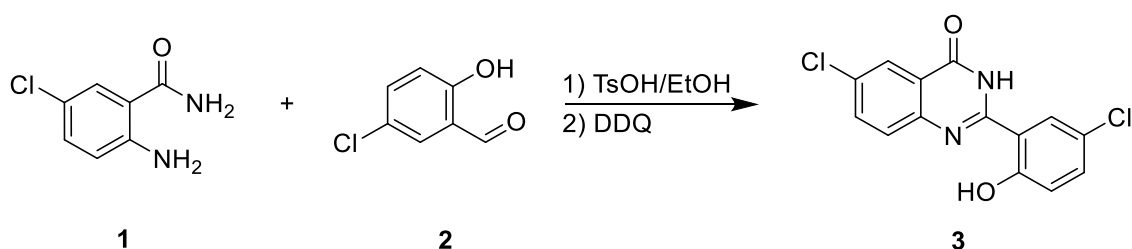
El seguimiento de las reacciones se ha realizado por espectroscopía de masas: Bruker amaZon SL con trampa iónica.

Reactivos comerciales y sustratos de partida

Los reactivos comerciales se han adquirido con el mayor grado de pureza accesible y se han empleado sin previa purificación.

Síntesis y caracterización de sustratos

6-Cloro-2-(5-cloro-2-hidroxifenil)quinazolin-4(3H)-ona **3**



En un matraz de 50 mL se introducen 2-amino-5-clorobenzamida **1** (0.17 g, 1 mmol, 1 eq.), 5-cloro salicilaldehído **2** (0.16 g, 1 mmol, 1 eq.), Ts-OH.H₂O (0.02 g, 0.1 mmol, 0.1 eq.) y EtOH (10 mL). La disolución de color rojizo/naranja intenso se calienta a 80 °C bajo agitación y reflujo durante 1 h.

Finalizada la hora, la disolución (ahora con una tonalidad amarillenta) se enfría con un baño de hielo. Se añade DDQ (0.23 g, 1 mmol, 1 eq.) agitando la mezcla durante 1 h a 0°C, observándose la formación de un precipitado color crema. Se filtra el sólido y se lava con EtOH frío (2x10 mL). Tras la eliminación de disolventes a presión reducida, se obtiene 0.280 g del producto **3** como un sólido blanquecino/grisáceo.

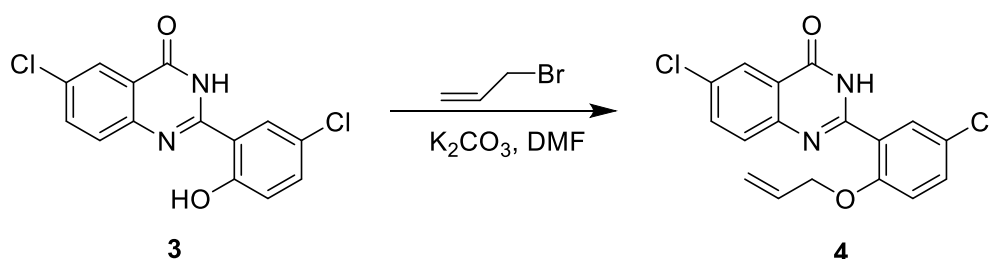
Aspecto: sólido blanquecino/grisáceo

Rendimiento: 91%

R_f (MeOH): 0.8

Los datos espectroscópicos de **3** están de acuerdo con los descritos por K. K. Sadhu, E. Lindberg, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16664.

2-[2-(Aliloxi)-5-clorofenil]-6-cloroquinazolin-4(3H)-ona **4**



En un matraz de 50 mL se disuelve **3** (0.10 g, 0.33 mmol, 1 eq.) en DMF (1mL). Una vez disuelto, se añaden K₂CO₃ (0.05 g, 0.39 mmol, 1.2 eq.) y bromuro de alilo (67μL, 0.78 mmol, 2.4 eq.). La disolución con coloración amarillenta se agita durante 15h a temperatura ambiente. La reacción es monitorizada por TLC. Cuando el proceso finaliza (desaparición del sustrato **3** a las 30 h) se elimina el disolvente a presión reducida. Acto seguido añadimos H₂O (10 mL) y CH₂Cl₂ (10 mL) para la separación las distintas fases. La fase acuosa es extraída dos veces con CH₂Cl₂ (2x10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía flash sobre sílica gel, usando como eluyente hexano/AcOEt 3:1. Se obtienen 20.1 mg de producto **4** como un aceite incoloro.

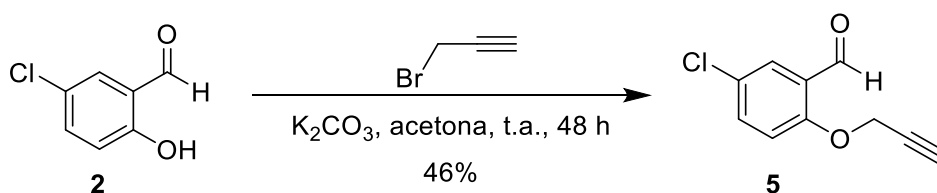
Aspecto: aceite incoloro

R_f (Hexano/AcOEt 3:1): 0.36

Rendimiento: 18%

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 11.01 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.24 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.71 (t, 2H, CH_{Ar}), 7.35 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.01 (d, 1H, CH_{Ar}), 6.12 (m, 1H, CH=CH₂), 5.48 (m, 2H, CH=CH₂), 4.79 (s, 2H, OCH₂).

5-Cloro-2-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldehido **5**



En un matraz de 50 ml se disuelve **2** (1 g, 6.38 mmol, 1 eq.) en acetona (16 mL). Una vez disuelto, se añaden K₂CO₃ (1.32 g, 9.57 mmol, 1.5 eq.) y bromuro de propargilo (2 g, 9.57 mmol, 3 eq.). La disolución con coloración parda se agita durante 48 h a temperatura ambiente. La reacción es monitorizada por TLC. Cuando el proceso finaliza (desaparición del sustrato **2**) se elimina el disolvente a presión reducida. Acto seguido añadimos H₂O (250 mL) y CH₂Cl₂ (250 mL) para la separación de las diferentes fases. La fase acuosa es extraída dos veces con CH₂Cl₂ (2x250 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de la reacción se purifica

mediante cromatografía flash sobre sílica gel, usando como eluyente hexano/AcOEt 3:1. Se obtiene 528 mg de producto **5** como un sólido blanquecino.

Aspecto: sólido blanquecino

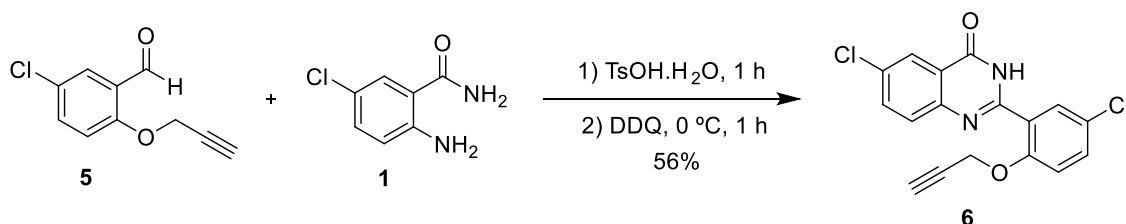
R_f (Hexano/AcOEt 3:1): 0.36

Rendimiento: 46%

Los datos espectroscópicos de **5** están de acuerdo con los descritos por S. Vedachalam, Q. Wong, B. Maji, J. Zeng, J. Ma, X. Liu, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353, 219.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 10.39 (s, 1H, CHO), 7.79 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.50 (dd, 1H, CH_{Ar}), 7.08 (d, 1H, CH_{Ar}), 4.82 (d, 2H, CH₂), 2.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H, C≡CH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 188.1, 158.1, 135.2, 128.0, 127.4, 126.3, 114.9, 77.3, 76.7, 56.7.

6-Cloro-2-[5-cloro-2-(prop-2-in-1-iloxi)fenil]quinazolin-4(3H)-ona **6**



En un matraz de 100 mL se añade 5-cloro-2-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldehido **5** (0.22 g, 1.12 mmol, 1 eq.), 2-amino-5-clorobenzamida **1** (0.190 g, 1.12 mmol, 1 eq.), TsOH.H₂O (0.02 g, 1.12 mmol, 0.1 eq.) y EtOH (10 mL). La disolución de color crema se calienta a 80 °C a reflujo durante 1 h.

Una vez pasada la hora, la disolución se enfría con un baño de hielo. Se añade DDQ (0.25 g, 1.12 mmol, 1 eq.) agitando la mezcla durante 1 h a 0 °C, observándose la formación de un precipitado color blanquecino. Se filtra el sólido y se lava con EtOH frío (3x10 mL). Tras la eliminación de disolventes a presión reducida, se obtiene 0.22 g del producto **6** como un sólido blanquecino/grisáceo.

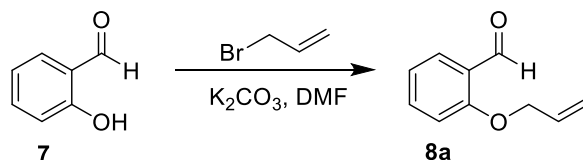
Aspecto sólido blanquecino/grisáceo

R_f (Hexano/AcOEt 3:1): 0.21

Rendimiento: 57%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 10.74 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.26 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (t, 2H, CH_{Ar}), 7.48 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.15 (d, 1H, CH_{Ar}), 4.95 (m, 2H, OCH_2), 2.65 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$).

2-(Aliloxi)benzaldehido **8a**



En un matraz de 50 mL se introduce salicilaldehido **7** (0.61 g, 5 mmol, 1 eq.) que se disuelve en 15 mL de DMF. A continuación, se añade K_2CO_3 (0.83 g, 6 mmol, 1.2 eq.). Finalmente se adiciona bromuro de alilo (0.72 g, 6 mmol, 1.2 eq.). La disolución se agita durante 15 h a temperatura ambiente.

El avance de la reacción se controla mediante TLC. Transcurridas 15 h se observa la desaparición completa de los productos de partida. Se procede a la adición de H_2O (50 mL) y CH_2Cl_2 (25 mL), separándose las diferentes fases. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3x25 mL). La fase orgánica se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl (50 mL). La fase orgánica resultante se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y se seca el disolvente con presión reducida. El DMF remanente se elimina mediante la línea de alto vacío. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía flash sobre sílica gel usando hexano/AcOEt 3:1 como eluyente. Se obtienen 0.65 g de producto **8a** como un sólido blanco.

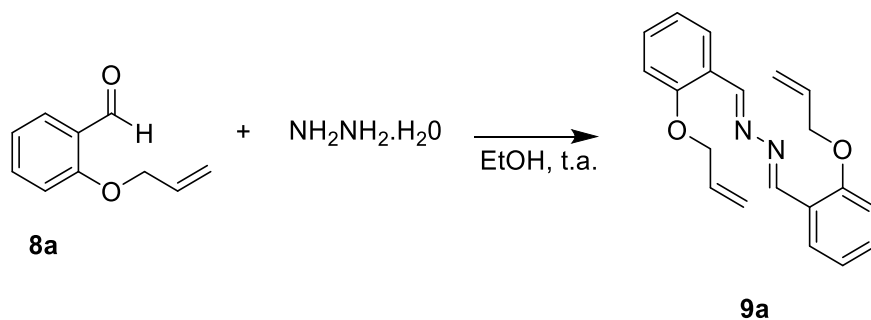
Aspecto: sólido blanco

R_f (Pentano/EtOAc 95:5): 0.23

Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los descritos por K. Hirano, A. T. Biju, I. Piel, F. Glorius, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14190.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 10.49 (s, 1H, CHO), 7.79 (dd, 1H, H_{Ar}), 7.51-7.45 (m, 1H, H_{Ar}), 7.00-6.92 (m, 2H, H_{Ar}), 6.03 (ddt, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.41 (ddd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.29 (dd, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.61 (dt, 2H, OCH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 189.6, 160.9, 135.9, 132.4, 128.3, 125.0, 120.8, 118.0, 112.9, 69.1.

1,2-bis[(E)-2-(Aliloxi)benzilideno]hidrazina 9a



En un matraz de 100 mL, se introduce 2-(aliloxi)benzaldehido **8a** (0.41 g, 2.55 mmoles, 2.05 eq.) que se disuelven en 20 mL de EtOH. Se adiciona hidracina monohidratada (60 μ L, 1.24 mmol, 1 eq.) lentamente. La disolución de coloración amarilla se agita a temperatura ambiente durante 24 h.

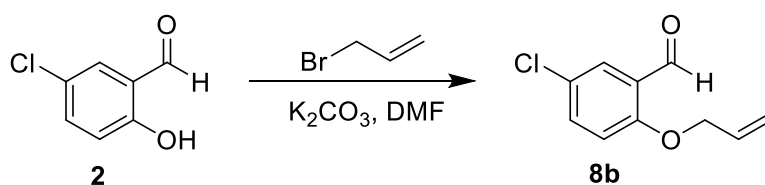
Finalizado este tiempo, se observa la aparición de un precipitado amarillo. El precipitado se filtra y se lava con EtOH frío (3x30 mL). Tras la eliminación del disolvente a presión reducida, se obtienen 0.37g de producto **9a** como un sólido amarillo.

Aspecto: sólido amarillo

Rendimiento: 45%

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 9.13 (s, 2H, -CH=N), 8.13 (dt, 2H, H_{Ar}), 7.40 (t, 2H, H_{Ar}), 7.02 (t, 2H, H_{Ar}), 6.93 (d, 2H, H_{Ar}), 6.08 (m, 2H, 2x -CH=CH₂), 5.47 (d, 2H, CH=CH₂), 5.31 (d, 2H, CH=CH₂), 4.62 (d, 4H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 157.8 (2xC_{Ar}), 157.8 (2xC=N), 133.2 (2xCH=CH₂), 132.5 (2xCH_{Ar}), 127.7 (2xCH_{Ar}), 123.4 (2xC_{Ar}), 121.3 (2xCH_{Ar}), 118.1 (2xCH=CH₂), 112.7 (2xCH_{Ar}), 69.4 (2x-OCH₂).

2-(Aliloxi)-5-clorobenzaldehido 8b



En un matraz de 50 mL se introduce 5-clorosalicilaldehido **2** (0.78 g, 5 mmol, 1 eq.) que se disuelve en 15 mL de DMF. A continuación, se añade K₂CO₃ (0.83 g, 6 mmol, 1.2 eq.).

Finalmente se adiciona bromuro de alilo (0.72 g, 6 mmol, 1.2 eq.). La disolución se agita durante 15 h a temperatura ambiente.

El avance de la reacción se controla mediante TLC. Transcurridas 15 h se observa la desaparición completa de los productos de partida. Se procede a la adición de H₂O (50 mL) y CH₂Cl₂ (25 mL), separándose las diferentes fases. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3x25 mL). La fase orgánica se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl (50mL). La fase orgánica resultante se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se seca el disolvente con presión reducida. El DMF remanente se elimina mediante la línea de alto vacío. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía flash sobre silica gel usando hexano/AcOEt 3:1 como eluyente. Se obtienen 0.87 g de producto **8b** como un sólido blanco.

Aspecto: sólido blanco

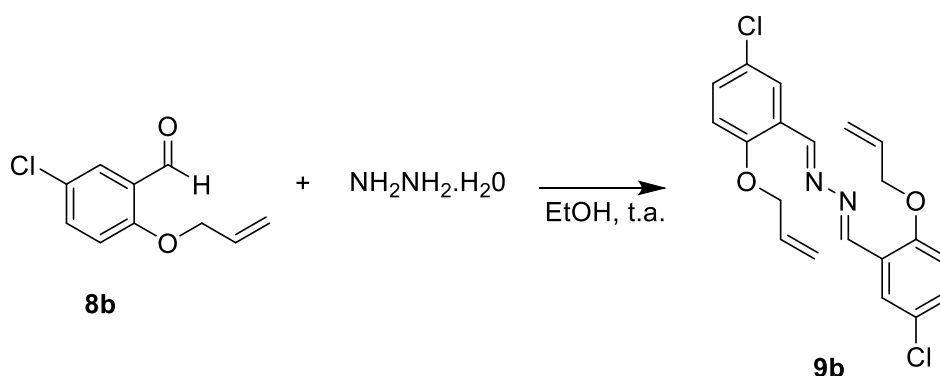
Rendimiento: 89%

R_f= (Pentano/EtOAc 95:5): 0.30

Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los descritos por K. Hirano, A. T. Biju, I. Piel, F. Glorius, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14190.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 10.43 (s, 1H, CHO), 7.75 (d, 1H, H_{Ar}), 7.48-7.40 (m, 1H, H_{Ar}), 6.92 (d, 1H, H_{Ar}), 6.12-5.96 (m, 1H, CH=CH₂), 5.43 (dd, 1H, CH=CH₂), 5.34 (dd, 1H, CH=CH₂), 4.63 (dd, 2H, OCH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.5, 159.4, 135.4, 132.0, 128.0, 126.6, 126.0, 118.6, 114.6, 69.7.

1,2-bis[(E)-2-(Aliloxi)-5-clorobenzilideno]hidrazina **9b**



En un matraz de 100 mL, se introduce 2-(aliloxi)-5-clorobenzaldehído **8b** (0.5 g, 2.55 mmol, 2.05 eq.) que se disuelven en 20 mL de EtOH. Se adiciona hidracina monohidratada (60 μ L, 1.24 mmol, 1 eq.) lentamente. La disolución de coloración amarilla se agita a temperatura ambiente durante 24 h.

Finalizado este tiempo, se observa la aparición de un precipitado amarillo. El precipitado se filtra y se lava con EtOH frío (3x30 mL). Tras la eliminación del disolvente a presión reducida se obtienen 0.42 g de producto **9b** como un sólido amarillo.

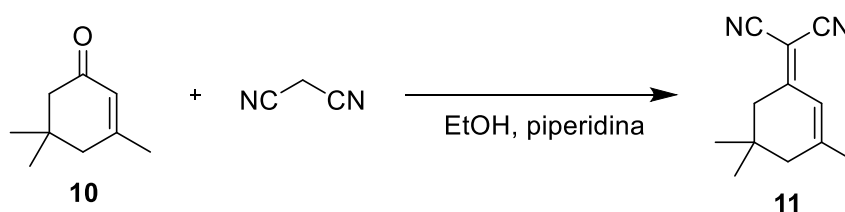
Aspecto: sólido amarillo

Rendimiento: 42%

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 9.05 (s, 2H, CH=N), 8.13 (d, 2H, H_{Ar}), 7.38 (dd, 1H, H_{Ar}), 7.35 (d, 1H, H_{Ar}), 6.89 (d, 2H, H_{Ar}), 6.01 (m, 2H, CH=CH₂), 5.46 (d, 2H, CH=CH₂), 5.36 (d, 2H, CH=CH₂), 4.64 (d, 4H, 2xOCH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 157.1 (2xC_{Ar}), 157.0 (2xHC=N), 132.7 (2xCH=CH₂), 132.2 (2xCH_{Ar}), 127.3 (2xCH_{Ar}), 126.6 (2xC_{Ar}), 124.7 (2xC_{Ar}), 118.5 (2xCH=CH₂), 114.2 (2xCH_{Ar}), 69.8 (2xOCH₂).

2-(3,5,5-Trimetilciclohex-2-en-1-ilideno)malononitrilo **11**



En un schlenk bajo atmosfera de N₂ se introduce la isoforona **10** (0.92 g, 6.67 mmol, 1eq.) y 10 mL de EtOH. Sobre la disolución resultante, se adiciona malononitrilo (0.53 g, 8.07 mmol, 1.2eq.) y 116 μ L de piperidina. La disolución de color marrón se calienta a 80 C a reflujo, bajo atmósfera de N₂ durante 12h.

Finalizado este tiempo, la disolución adquiere una tonalidad más oscura. Se elimina el disolvente a presión reducida. A continuación, se añade H₂O (10 mL) y CH₂Cl₂ (10mL) separándose las fases. La fase acuosa es extraída dos veces con CH₂Cl₂ (2X10mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y el disolvente es eliminado a presión

reducida. Se observa la aparición de un sólido violeta que se purifica mediante cromatografía flash sobre sílica gel usando hexano/AcOEt 2:1 como eluyente. Se obtienen 700 mg de producto **11** como un sólido amarillo/blanquecino.

Aspecto: sólido amarillo/blanquecino

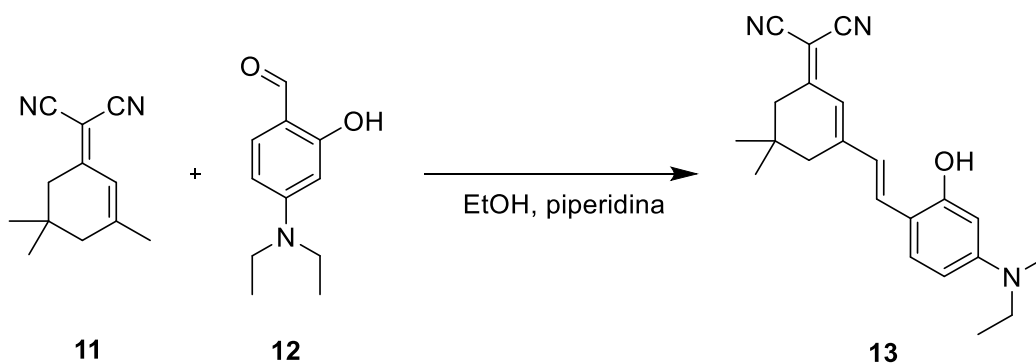
R_f (Hexano/AcOEt 2:1): 0.37

Rendimiento: 56%

Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los descritos por H. Zhang, X. Xia, H. Zhao, G. Zhang, D. Jiang, X. Xue, J. Zhang, *Dyes and Pigments* **2019**, *163*, 183.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 6.61 (s, 1H, CH), 2.51 (s, 2H, CH₂), 2.17 (s, 2H, CH₂), 2.03 (s, 3H, CH₃), 1.01 (s, 6H, 2xCH₃).

(E)-2-(3-(4-(dietilamino)-2-hidroxitiril)-5,5-dimetilciclohex-2-en-1-ilideno)malononitrilo **13**



En un matraz de 50 mL se disuelven **11** (0.26 g, 1.14 mmol, 1 eq.) y (4-dietilamino)-2-hidroxibenzaldehído **12** (0.22 g, 1.14 mmol, 1 eq.) en 10 mL de EtOH. Se añaden 12 gotas de piperidina. La disolución de color violeta se calienta a 80 °C durante 48 h.

Finalizadas las 48 h, se realiza una monitorización de la reacción mediante TLC. Se observa la desaparición completa de **11** y **12** tras las 48 h. El disolvente es eliminado mediante presión reducida. Se añaden H₂O (10 mL) y CH₂Cl₂ (10 mL) y se separan las fases. La fase acuosa se extrae tres veces con CH₂Cl₂ (3X10 mL). La fase orgánica resultante se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y finalmente el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía flash sobre

sílica gel usando CH₂Cl₂/MeOH 100:1. Se obtienen 47mg del producto **13** como un sólido violeta.

Aspecto: sólido violeta

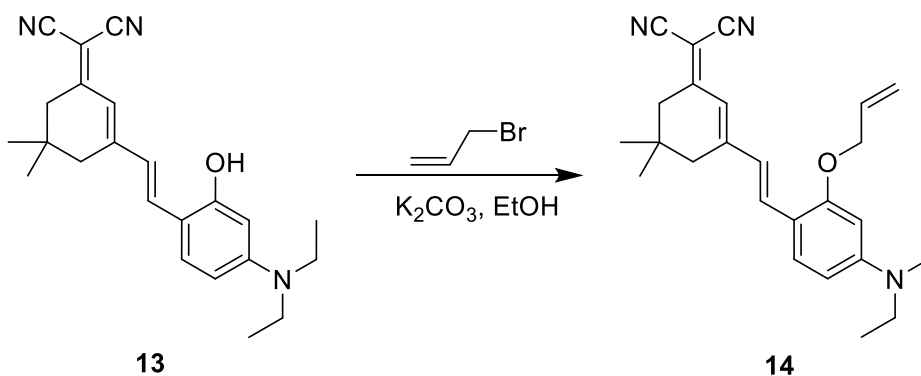
R_f (CH₂Cl₂/MeOH 100:1): 0.45

Rendimiento: 11%

Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los descritos por H. Zhang, X. Xia, H. Zhao, G. Zhang, D. Jiang, X. Xue, J. Zhang, *Dyes and Pigments* **2019**, *163*, 183.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.38 (d, 1H, CH), 7.34 (d, 1H, CH), 6.89 (d, 1H, -CH=CH-), 6.72 (s, 1H, H_{Ar}), 6.31 (d, 1H, CH), 6.06 (s, 1H, H_{Ar}), 3.37 (q, 4H, 2xCH₂-CH₃), 2.55 (s, 2H, CH₂), 2.55 (s, 2H, CH₂), 1.20 (t, 6H, 2xCH₃-CH₂), 1.05 (s, 6H, 2xCH₃).

(E)-2-(3-(2-(aliloxi)-4-(dietilamino)stiril)-5,5-dimetilciclohex-2-en-1-ilideno)malononitrilo **14**



Se disuelve **13** (0.05 mg, 1.3 mmol, 1 eq.) con 3 mL de EtOH en un matraz de 25mL. La disolución adquiere un color azul. Se adiciona de manera sucesiva K₂CO₃ (0.02mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) y bromuro de alilo (26.82 μL, 0.31 mmol, 2.4 eq.). La disolución se calienta a 80 °C.

El avance de la reacción se monitoriza mediante TLC. Se observa la completa desaparición de **13** tras 48 h. El disolvente es eliminado mediante presión reducida. Se añade H₂O (10 mL) y CH₂Cl₂ (10 mL) y se separan las fases. La fase acuosa será extraída con CH₂Cl₂(3x10 mL). La fase orgánica recogida se lavará con una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica resultante se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y finalmente el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de la reacción se

purifica mediante cromatografía flash sobre sílica gel utilizando CH₂Cl₂/MeOH 100:1. Se obtienen 15 mg de producto **14**, como un sólido violeta.

Aspecto: sólido violeta

Rendimiento: 29%

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 100:1): 0.71

Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los descritos por H. Zhang, X. Xia, H. Zhao, G. Zhang, D. Jiang, X. Xue, J. Zhang, *Dyes and Pigments* **2019**, *163*, 183.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 7.44 (d, 1H, CH), 7.41 (d, 1H, CH), 6.86 (d, 1H, -CH=CH-), 6.71 (s, 1H, H_{Ar}), 6.32 (d, 1H, CH), 6.11 (s, 1H, CH), 6.11 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.48 (d, 1H, CH=CH₂), 5.36 (d, 1H, CH=CH₂), 4.63 (m, 2H, OCH₂), 3.39 (q, 4H, 2xCH₂-CH₃), 2.55 (s, 2H, CH₂), 2.46 (s, 2H, CH₂), 1.20 (t, 6H, 2xCH₃-CH₂), 1.07 (s, 6H, 2xCH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 169.5 (C_{Ar}), 159.3 (C_{Ar}), 156.8 (C_{Ar}), 150.9 (C_{Ar}), 133.7 (CH), 133.7 (CH), 129.4 (CH), 124.2 (CH), 121.0 (CH), 117.8 (CH=CH₂), 114.9 (C_{Ar}), 114.1 (C), 113.1 (CN), 111.3 (CN), 105.5 (CH), 95.61 (CH), 69.4 (OCH₂), 44.8 (2xCH₂-CH₃), 43.2 (2xCH₂), 39.3 (CH), 32.1 (C), 28.2 (2xCH₃), 12.8 (2xCH₃-CH₂).

Estudios en células

De manera general, se han realizado los experimentos con células HeLa usando DMEM (Dubelcco's Modified Eagles's Medium) como medio. Los cultivos de células en proliferación se mantuvieron en una incubadora humidificada con 5% CO₂ a 37 °C. Los experimentos se realizan con células HeLa con un período de incubación de 48 h.

Reacciones promovidas por rutenio utilizando la sonda A1:

Los experimentos en células vivas se llevan a cabo en placas de doce pocillos. Se incuban las células con catalizador **Ru1** (50 μM) y DMEM (400 μL) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con DMEM (400 μL). A continuación, se añade el sustrato (100 μM) y se incuban las células 30 minutos. Antes de su observación in vivo mediante microscopía de fluorescencia de las células, es necesario lavar con DMEM (2x400 μL) y transferir las células a portaobjetos para facilitar su visionado. Se realizan

capturas de imagen de las muestras gracias al equipo y diferentes filtros presentes en el instrumento.

Reacciones promovidas por rutenio utilizando la sonda B1:

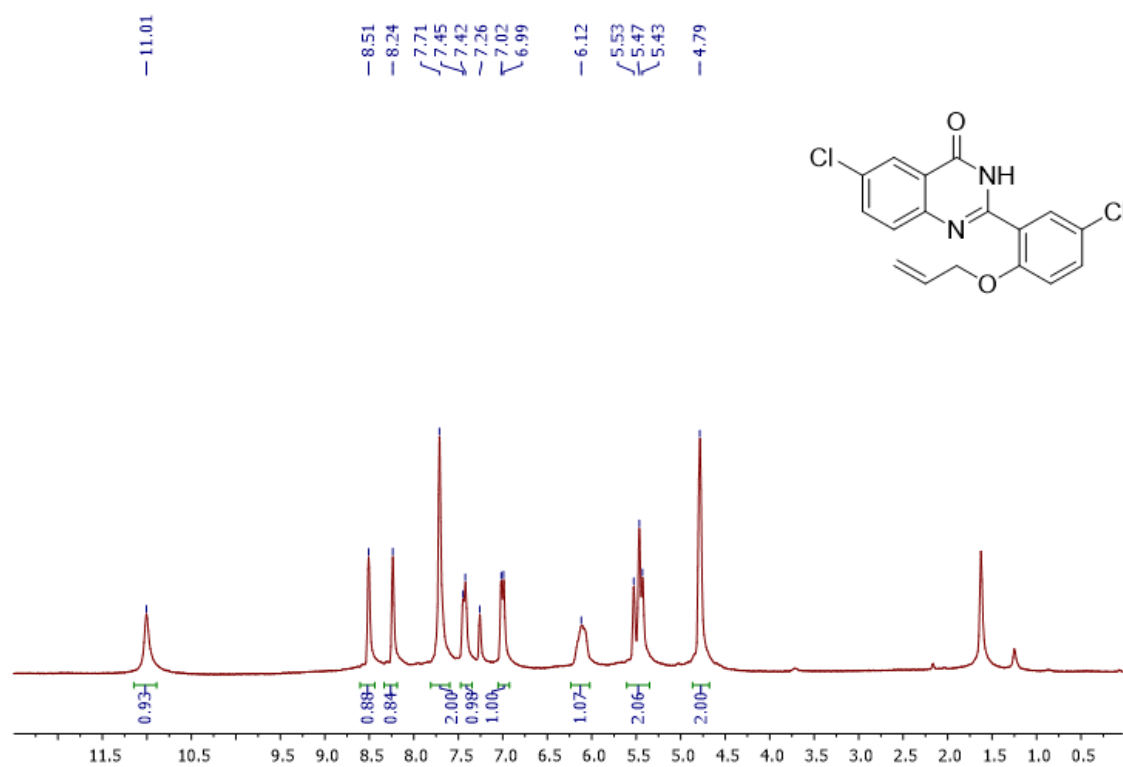
Se incuban las células con catalizador **Ru3** (50 μM) y DMEM (400 μL) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con DMEM (3x400 μL). A continuación, se añade el sustrato (100 μM) y se incuban las células 90 minutos. Antes de su observación in vivo mediante microscopía de fluorescencia de las células, es necesario lavar con DMEM (2x400 μL) y transferir las células a portaobjetos para facilitar su visionado. Se realizan capturas de imagen de las muestras gracias al equipo y diferentes filtros presentes en el instrumento.

Reacciones promovidas por rutenio utilizando la sonda C:

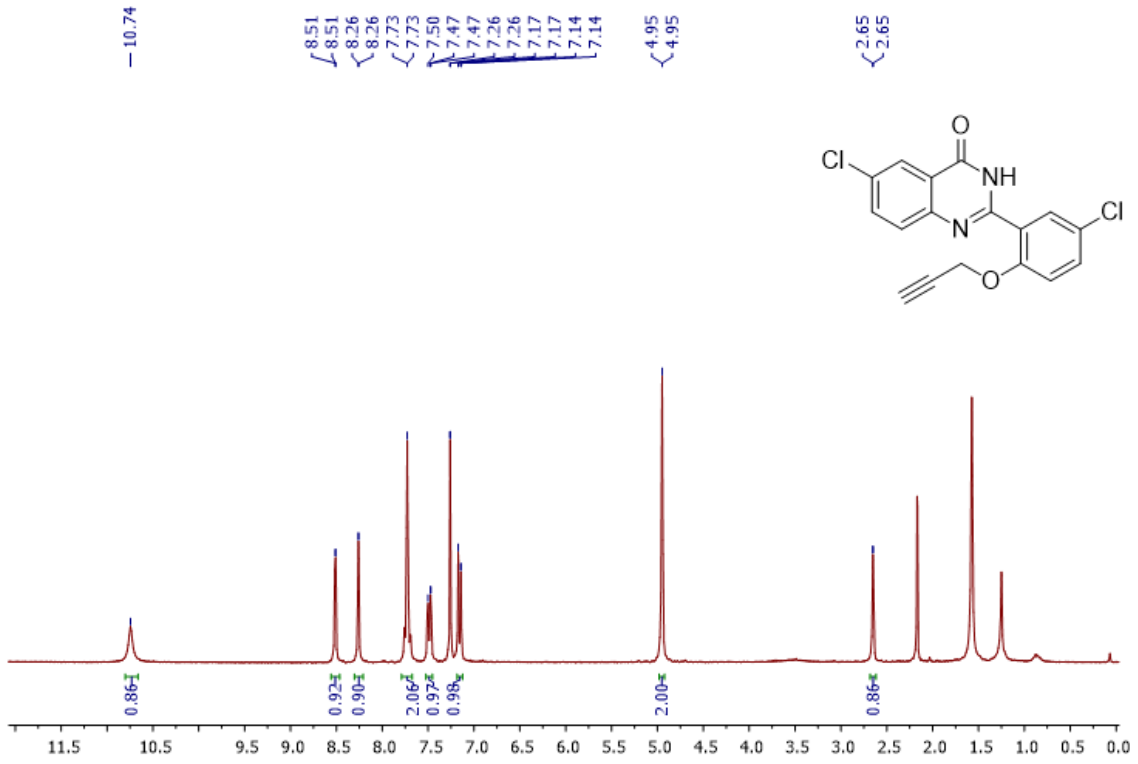
Se incuban las células con catalizador **Ru1** y **Ru2** (50 μM) y DMEM (400 μL) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con DMEM (400 μL). A continuación, se añade el sustrato (100 μM) y se incuban las células 4 h. Antes de su observación in vivo mediante microscopía de fluorescencia de las células, es necesario lavar con DMEM (2x400 μL) y transferir las células a portaobjetos para facilitar su visionado. Se realizan capturas de imagen de las muestras gracias al equipo y diferentes filtros presentes en el instrumento.

7.1 Anexo I: Espectros

Sonda A1 4

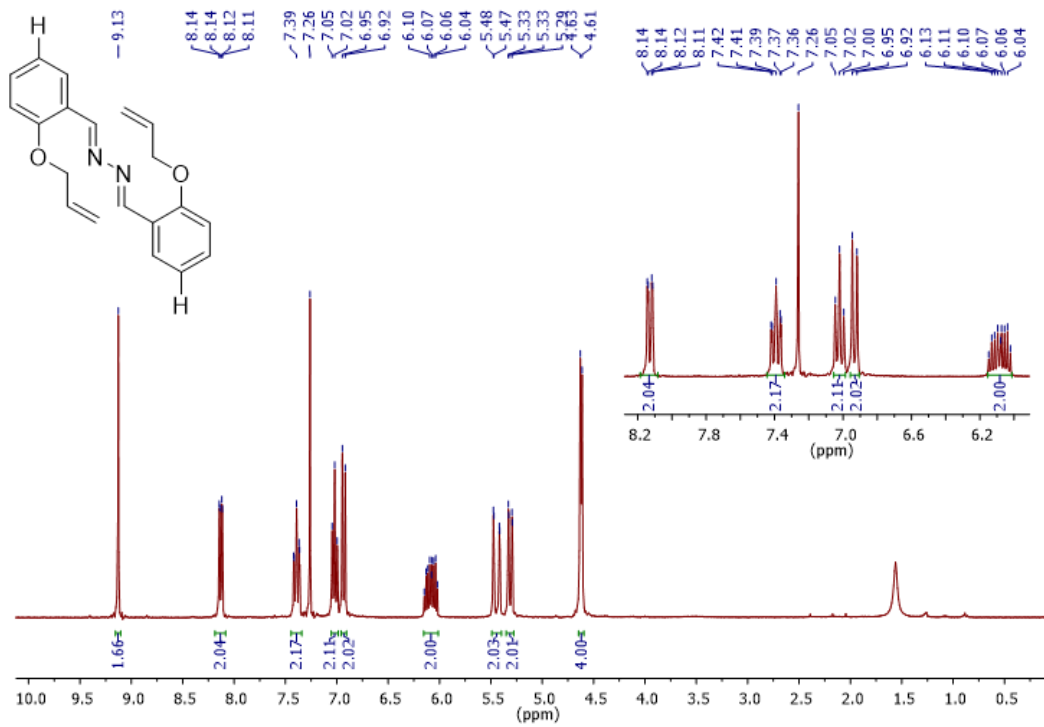


Sonda A2 6

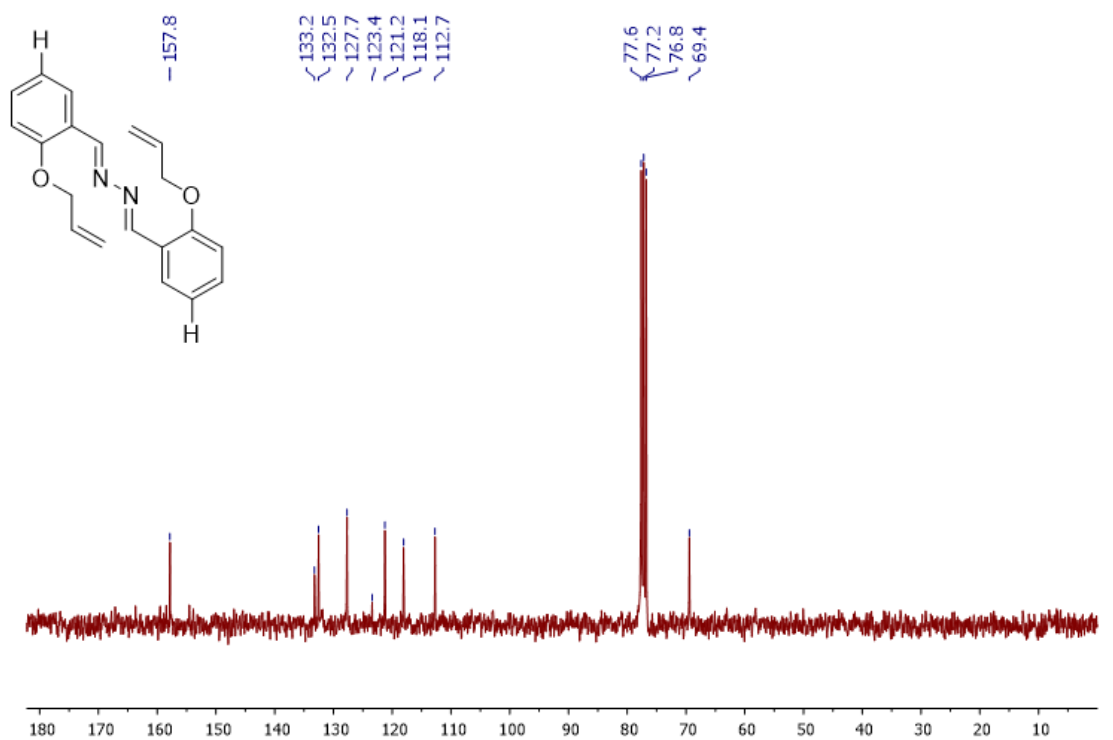


Sonda B1 9a

¹H

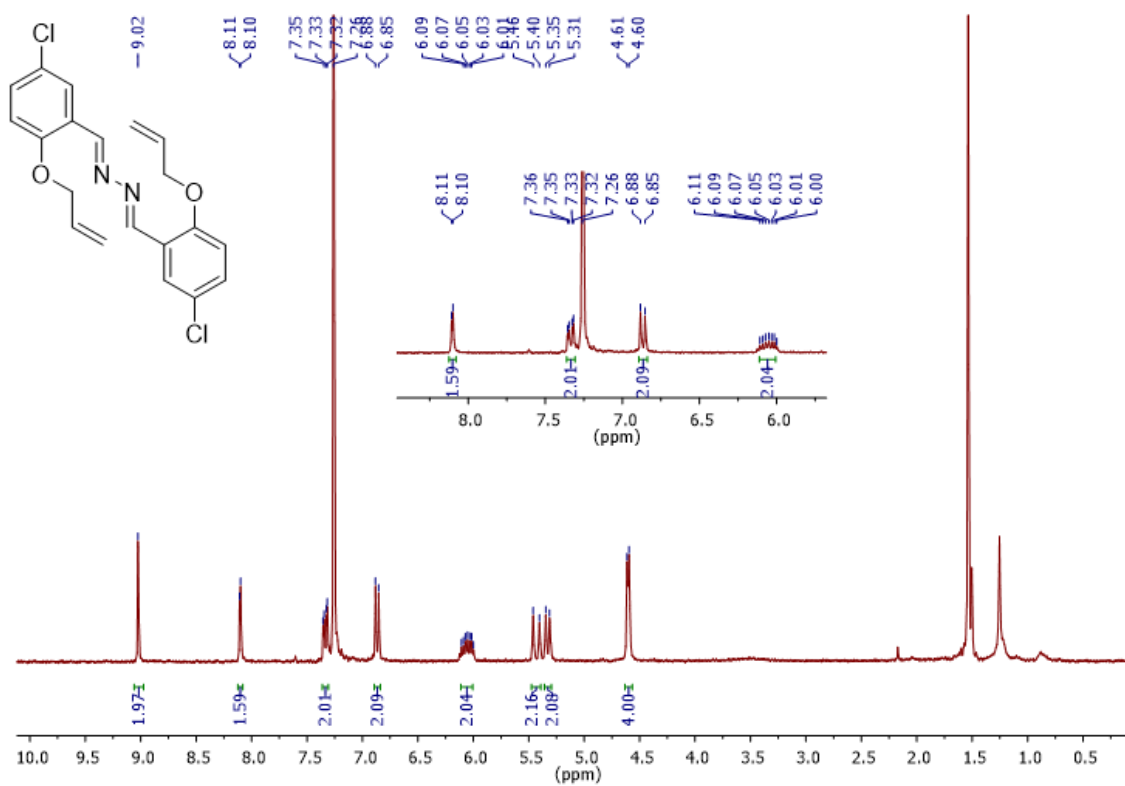


¹³C

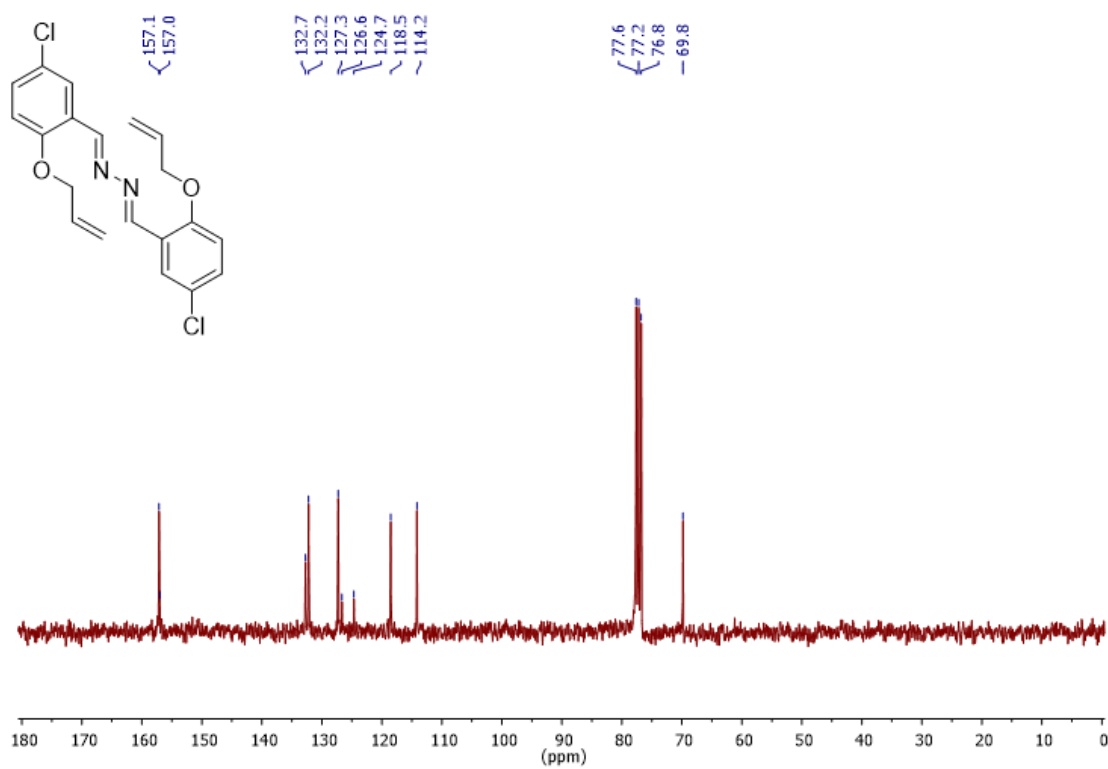


Sonda B2 **9b**

¹H

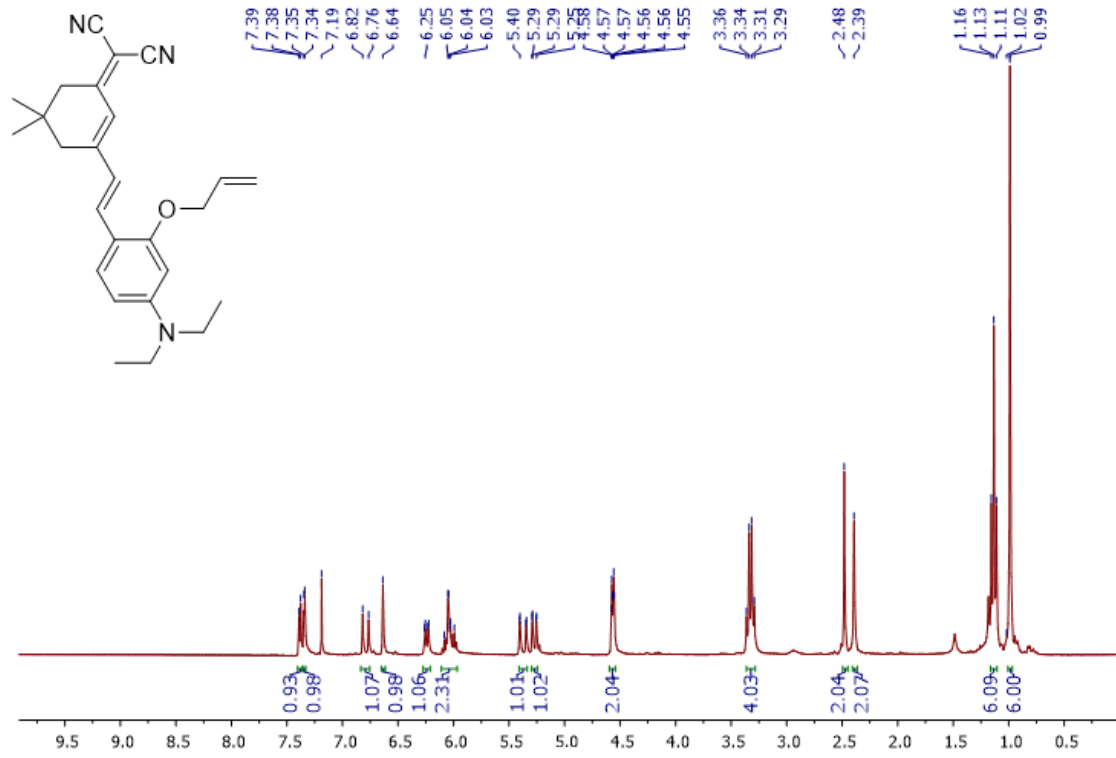


¹³C



Sonda C 14

¹H



¹³C

