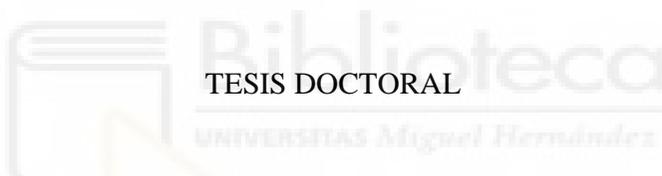




UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA  
Área de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**Síntesis de derivados de perilenodiimida, su  
estudio como agentes terapéuticos y su  
funcionalización en materiales 2D**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA  
POR:

**José Garcés Garcés**

Bajo la dirección de:  
Prof. Dr. Fernando Fernández Lázaro  
y la codirección de:  
Prof. Dra. Ángela Sastre Santos

Programa de Doctorado en Bioingeniería

Elche, 2023





## Indicios de calidad

---

La tesis doctoral titulada “Síntesis de derivados de perilenediimida, su estudio como agentes terapéuticos y su funcionalización en materiales 2D”, realizada por D. José Garcés Garcés, con DNI: 54137875S, bajo la dirección de la Prof. Dra. Ángela Sastre Santos y el Prof. Dr. Fernando Fernández Lázaro, se presenta bajo la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones con los siguientes índices de calidad según el área de la ANEP de Química y subárea Química Orgánica.

### Publicaciones Científicas:

- Garcés-Garcés, J.; Redrado, M.; Sastre-Santos, Á.; Gimeno, M. C.; Fernández-Lázaro, F. **Synthesis of Dipyridylaminoperylene diimide-Metal Complexes and Their Cytotoxicity Studies.** *Pharmaceutics*. **2022**, *14*, 2616. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122616. FI: 6,25. Área de conocimiento: Pharmacology and Pharmacy. Puesto que ocupa/total de revistas en el área: 39/279.
- Sideri, I. K.; Jang, Y.; Garcés-Garcés, J.; Sastre-Santos, Á.; Cantón-Vitoria, R.; Kitaura, R.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F.; Tagmatarchis, N. **Unveiling the photoinduced electro-donating carácter of MoS<sub>2</sub> in covalently linked hybrids featuring perylene diimide.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9120. DOI: 10.1002/anie.202016249. FI: 16,82. Área de conocimiento: Chemistry, multidisciplinary. Puesto que ocupa/total de revistas en el área: 15/179.





## **Programa de Doctorado en Bioingeniería**

---

La Dra. Dña. Piedad Nieves de Aza Moya, Catedrática del área de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Coordinadora de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 3120/19, de 09 de diciembre de 2019,

### **INFORMA**

Que la tesis doctoral titulada “Síntesis de derivados de perilendiimida, su estudio como agentes terapéuticos y su funcionalización en materiales 2D”, ha sido realizada por D. José Garcés Garcés, bajo la dirección del Prof. Dr. Fernando Fernández Lázaro y la codirección de la Prof. Dra. Ángela Sastre Santos, da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Henández.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente documento en Elche, a 9 de enero de 2023.

Fdo.: Prof. Dra. Piedad Nieves de Aza Moya  
Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería





## **Programa de Doctorado en Bioingeniería**

---

La Dra. Dña. Ángela Sastre Santos, codirectora, y el Dr. D. Fernando Fernández Lázaro, director, ambos Catedráticos del área de Química Orgánica, pertenecientes al Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

### **CERTIFICAN**

Que el presente trabajo titulado “**Síntesis de derivados de perilendiimida, su estudio como agentes terapéuticos y su funcionalización en materiales 2D**”, el cual constituye la memoria que presenta el graduado JOSÉ GARCÉS GARCÉS para optar al Grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios y dan su conformidad a la lectura de la tesis doctoral. conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste, expiden y firman el presente certificado en Elche, a 27 de enero de 2023

Fdo.: Prof. Dra. Ángela Sastre Santos

Fdo. Prof. Dr. Fernando Fernández Lázaro





---

## Financiación

---

La realización de la tesis que aquí se presenta ha sido posible gracias a la financiación obtenida que se indica a continuación:

1. Proyecto de investigación “Hacia la síntesis de nuevas moléculas para la generación de energía” (referencia: CTQ2017-87102-R AEI/FEDER financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y por la Unión Europea a través del Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional- FEDER- “Una manera de hacer Europa”. Responsable: Prof. Dra. Ángela Sastre Santos.
2. Proyecto de investigación “Perilenoimidias: transferencia electrónica fotoinducida en sistemas multicromofóricos, fisión singlete y láseres. Preparación de SURMOF basados en PDI. (referencia: PID2019-109200GB-I00) financiado por el Ministerio de Ciencia e innovación y por la Unión Europea a través del Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional-FEDER- “Una manera de hacer Europa”. Responsable: Prof. Dr. Fernando Fernández Lázaro.
3. Red de investigación “Multifunctional Metallodrugs in Diagnosis and Therapy” (referencia: RED2018-102471-T), financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Coordinadora: Prof. Dra. M. Concepción Gimeno Floria. Responsable UMH: Prof. Dra. Ángela Sastre Santos.



## Agradecimientos

Parece que nunca llegaría el final, pero esta etapa ya se acaba y sin duda, han sido unos años de aprendizaje científico y humano.

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directores de tesis, **Ángela Sastre** y **Fernando Fernández**, por darme la oportunidad de realizar la tesis en su grupo de investigación, DYSMOL. Gracias Ángela por la entrevista y por confiar en mí para empezar la tesis. Después de dos años y el COVID de por medio, Fernando puso los medios para que pudiese acabar tranquilamente la tesis. Muchísimas gracias a los dos, espero que me tengáis siempre en el recuerdo como vuestro hijo científico.

Agradecer también a todos mis compañeros de DYSMOL, en especial a aquellos que han batallado día a día junto a mí. Empiezo por **David Gutierrez**, gracias por ayudarme a desenvolverme mis primeros meses en este mundo de colores. **Nathalie Zink**, posiblemente tú has sido mi salvavidas en el laboratorio. Gracias infinitas por ayudarme cada vez que te lo pedía, por todos tus consejos, paciencia a la hora de enseñarme y calmarme cuando (la mayoría de las veces) me ponía nervioso. **Ana María Gutierrez**, pocas palabras tengo que decirte, empezaste siendo mi compañera, pero ahora eres mi amiga, gracias por ayudarme siempre que te lo he pedido, y no me refiero al trabajo de laboratorio, gracias. **Javier Ortiz**, gran parte de lo que explico en esta tesis me lo has enseñado tú. Gracias por ayudarme con todo el tema de RMN cada vez que te lo he pedido. **Jorge Follana** y **María Joao**, mis primeros compañeros de doctorado, aunque ya reconocidos doctores, muchas gracias por ayudarme siempre que os lo he pedido, que no han sido pocas veces. **Desiré Molina**, gracias por tu apoyo y consejos y sin duda por ser una de las mejores catadoras de mis postres. **Adrián Hernández**, **Victor Sobrino** y **Lydia Ferrer**, mis actuales compañeros de tesis. Adrián, podrías ser el que más me entiende en este momento, contigo junto a María habéis sido mis compañeros de batalla. Gracias por comprenderme y servirme también para llorar un poco cuando lo hemos necesitado, realmente siento que me llevo un amigo. Víctor, tendremos siempre un tema pendiente, lo sabes. Lydia, la nueva incorporación, mucho ánimo en este camino y espero poder ver como lo acabas brillando. Por su puesto, millones de gracias **Belen Rufete**, que sería el laboratorio sin ti. Gracias por todos los favores, tus consejos, tus charlas (buenas y malas), el intercambio de recetas, truquillos y sobre todo gracias por darme siempre ánimos. Gracias a todo el equipo de DYSMOL.

**Gema Martínez**, aunque no formes parte del equipo de DYSMOL, hemos trabajado mano a mano prácticamente desde el inicio de mi tesis. Gracias por toda tu ayuda científica y sobre todo, gracias por tu ayuda humana.

Gracias a la red MultiMetDrugs pude realizar una estancia en el grupo de la profesora **Concepción Gimeno** en el ISQCH (CSIC)-Universidad de Zaragoza. Muchas gracias Conchita y a todo su grupo por acogerme y sentirme uno más desde el primer día. Todo lo que cuento en el capítulo tres ha sido fruto de esta maravillosa colaboración.

Un hueco especial también lo tienen mis compis de Villapharma. **Bea**, **Jose**, **Paula**, vosotras me enseñasteis a trabajar en un laboratorio de síntesis orgánica,

recordaré siempre aquellos meses con mucho cariño, vosotras fuisteis el preludio de esta tesis doctoral, gracias.

Gracias también a toda la gente que he conocido a lo largo de estos años. **Valeria**, comenzaste conmigo en el laboratorio, al principio eras una desconocida, pero hoy formas parte de mi día a día, gracias por aguantarme todas las tardes eternas en el laboratorio (alguna que otra madrugada también) y por ayudarme con todo el tema informático (je je je), has formado parte también de esta tesis. Gracias también por toda tu ayuda fuera del laboratorio, nunca estarás lejos. **Cristina**, realmente a ti te conocí hace unos años, pero fue gracias a Elche lo que afianzó nuestra amistad, te tengo un cariño infinito, gracias por todos los ánimos que siempre me has dado. **Paco**, te mereces unas palabras, gracias por tu ayuda siempre que te la he pedido, y más el último favor (je je je) que ha sido la guinda del pastel. El plato fuerte, **Javier Marco**, se quedan pequeñas solo unas líneas para agradecerte todo. Hubo un punto de inflexión después de conocerte, sin duda, no hubiese podido acabar esto sin ti. **Jero, Ramon, Rober**, junto a Javi habéis formado mi pequeña familia aquí en Elche. Ya se acabó el escribir y el drama. Gracias chicos porque sin vosotros esta última etapa hubiese sido imposible.

Y bueno, como no, mi AMIGA **Laura**, que te voy a decir a ti, eres mi persona. Has vivido cada momento de esta tesis conmigo, te has alegrado incluso más que yo de cada buena noticia que te daba. Ahora empiezas tu camino y más que nunca, recuerda que juntas todo es posible. En mayo siempre florecerán las flores.

Por supuesto, todo esto no hubiese sido posible sin mi familia. Mamá, hemos llegado al final. Gracias por ayudarme a llegar hasta aquí, en los momentos difíciles has sido mi motivo para seguir. Papá, realmente creo que mi curiosidad por la ciencia, y la cocina, viene de tu parte, se que te sientes orgulloso de mí. Mi abuela, o mi segunda madre, todo lo que soy hoy te lo debo a ti, eres mi luz. Gracias a mi hermana, has sido siempre mi mano derecha y a lo largo de todos estos años de mi formación académica has sido una pieza fundamental.

Gracias infinitas a todos

Gracias, gracias, gracias

## Resumen

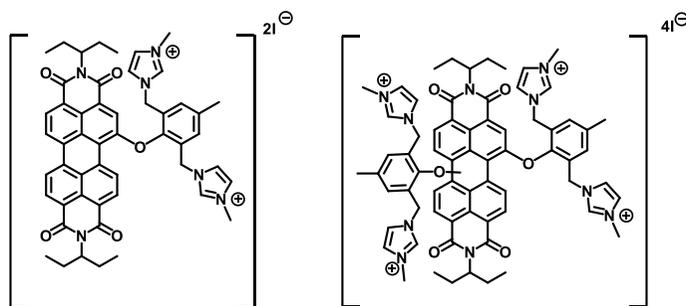
Las perilendiimidias (PDI) son moléculas orgánicas cromóforas con propiedades físicas interesantes y gran versatilidad sintética. Debido a esta característica, estas moléculas, se puede modificar estratégicamente en las posiciones *imida*, *orto* y *bahía* mediante rutas sintéticas racionales para dotarlas con propiedades totalmente nuevas y poder aplicarlas en diferentes campos de estudio, desde fotovoltaica orgánica, sensores químicos, catálisis, materiales 2D o química médica.

La presente tesis, dividida en cuatro capítulos, abarca el estudio de estas moléculas desarrollado durante el periodo de investigación.

En el capítulo uno, se presenta una pequeña revisión bibliográfica de la química de las PDI, haciendo especial hincapié en la química sintética de estas moléculas, desde sus inicios hasta las reacciones desarrolladas en los últimos años. También se recoge información sobre sus propiedades optoelectrónicas.

En los capítulos dos y tres, se han desarrollado distintas PDI para aplicarlas en el campo de la química médica.

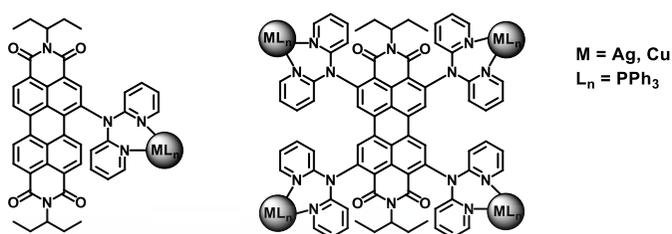
Siendo el cáncer una de las enfermedades actuales más emergentes, uno de los objetivos primordiales en el tratamiento de esta enfermedad es el uso de terapias no invasivas, un ejemplo de estas, la terapia fotodinámica (PDT, del inglés *photodynamic therapy*), basada en el empleo de moléculas que, tras fotoexcitarse son capaces de generar especies reactivas de oxígeno y oxígeno singlete para causar muerte celular. Dado que las PDI son capaces de generar estas especies reactivas de oxígeno, en el capítulo dos de la tesis, se han sintetizado y caracterizado dos nuevas PDI solubles en agua. Para conseguir la solubilidad en medio acuoso, se funcionalizaron las posiciones *bahía* de las PDI con grupos [2,6-(3'-metilimidazolio-1'-ilmetil)]-4-metilfenoxilo, obteniendo derivamos mono y disustituídos. Tras la metilación de los grupos imidazol, se formarán sales de imidazolio (**Figura 1**), lo que aportará solubilidad en medio acuoso y los ensayos biológicos se podrán realizar de forma más efectiva. Estas PDI han mostraron actividad antiproliferativa contra células de cáncer de cervix humano al ser fotoexcitadas.



**Figura 1:** Moléculas objetivo del capítulo 2.

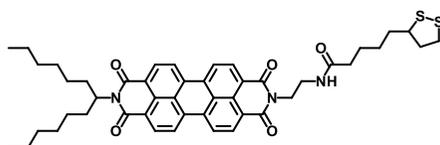
Desde la antigüedad, los metales como el oro, el platino, la plata y el cobre han sido utilizados como agentes terapéuticos debido a que estos son

biológicamente activos. Por ejemplo, la plata posee propiedades antibacterianas, siendo las sulfodiazinas de plata potentes fármacos antibacterianos, o el platino, que presenta propiedades anticancerígenas, siendo el *cis*-platino el fármaco anticancerígeno más usado en la historia de la medicina. Teniendo en cuenta las propiedades biológicas que presentan los metales, en el capítulo tres, se han sintetizado y caracterizado dos familias diferentes, mono sustituidas en la posición *bahía* y tetrasustituidas en la posición *orto* con el grupo 2,2'-dipiridilamina. Este grupo funcional es capaz de formar complejos metálicos a través de la coordinación de los átomos de nitrógeno de las piridinas con diferentes metales. De esta forma, a través de estos precursores, se sintetizaron complejos metálicos de cobre y plata (**Figura 2**), obteniéndose también en forma de sal, que ayudará su solubilidad en medio acuoso para realizar los ensayos biológicos. Estas metalo-PDI han demostrado tener también gran capacidad antiproliferativa frente a células de cáncer de cérvix humano.



**Figura 2:** Moléculas objetivo del capítulo 3.

El capítulo cuatro de la tesis se muestra otro gran campo de aplicación de las PDI: la funcionalización de los materiales 2D. Debido a la necesidad actual de generar energía mediante fuentes artificiales, una estrategia comúnmente empleada, es diseñar sistemas dador-aceptor de electrones. Las PDI sin funcionalización en el núcleo aromático, son excelentes aceptoras de electrones, y el MoS<sub>2</sub>, un material 2D emergente, es un sistema dador excepcional, por lo tanto, la funcionalización de este material con una PDI se convierte en un sistema dador-aceptor de electrones idóneo. En el capítulo tres, se ha sintetizado una PDI asimétrica funcionalizada con ácido lipoico (**Figura 3**), el cual, a través de los átomos de azufre presente en su estructura, permitirá unirse covalentemente a MoS<sub>2</sub> para formar un nuevo material híbrido 2D PDI-MoS<sub>2</sub>. Los estudios fotofísicos de este nuevo material híbrido, han demostrado que es capaz de producir estados de separación de carga y transferencia de energía, pudiendo aplicar este tipo de material híbrido en dispositivos optoelectrónicos para la generación o almacenaje de energía.



**Figura 3:** Molécula objetivo del capítulo 4.

## Abstract

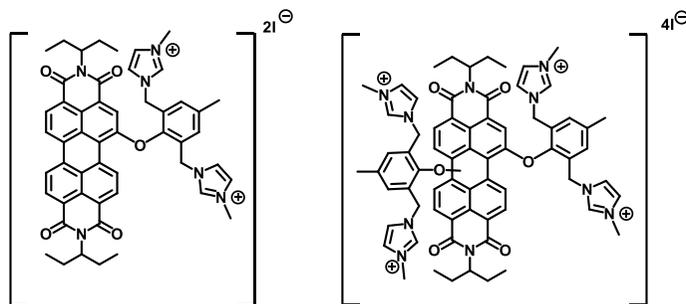
Perylenediimides (PDIs) are organic chromophores molecules with interesting physical properties and huge synthetic versatility. Due these characteristics these molecules can be strategically modified at *imide*, *ortho* and *bay* area by a rational synthetic route to provide them with new properties and be able to apply them in different research field such as chemical sensors catalysis, 2D material or medicinal chemistry.

This doctal thesis consists of an introduction and three chapters and covers the study of these molecules developed for the research period.

The introduction consists in a small bibliographic review of the chemistry of PDIs, with special emphasis on the synthetic chemistry of these molecules from its beginnings to the reactions developed in recent years. Information about its optoelectronic properties is also collected.

In chapter two and three different families of PDIs have been developed to apply then in medicinal chemistry.

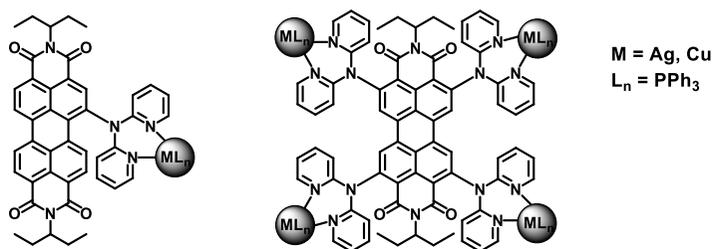
Due cancer is one of the most emerging diseases today, one of the main objectives in the treatment of this disease is the use of noninvasive therapies, been photodynamic therapy (PDT) an example of this. PDT is based on the use of molecules that after being photoexcited, can generate reactive oxygen species (ROS) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) to produce cell death. Due that PDIs are able to generate these reactive oxygen species, in chapter two, two new water soluble PDIs have been synthesized and characterized. To achieve solubility in aqueous medium, the bay area of the PDI have been functionalized with [2,6-(3'-methylimidazolium-1'-ylmethyl)]-4-methylphenoxy group, obtaining mono- and di- substituted PDIs derivates. Methylation of the imidazole groups allows obtaining imidazolium salts (Figure 1), which will provide solubility in aqueous medium and biological assays can be carried out more effectively. These PDI have shown antiproliferative activity against human cervical cancer cells after photoexcitation.



**Figure 1:** Target molecules of chapter 2.

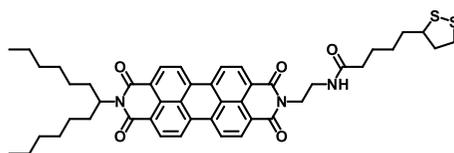
Metals such as gold, platinum, silver, and copper have been used as therapeutic agents due to their intrinsic biological properties. For example, silver have antibacterial properties, being sulfodiazines powerful antibacterial drugs, or platinum, which have anticancer properties, an example of this drug are cisplatin that are the most used

anticancer drug in the history of medicine. In chapter three, due to the metal properties, two different families of PDIs, mono substituted in *bay* area and tetrasubstituted in *ortho* with 2,2'-dipyridylamine group have been synthesized and characterized. This functional group is able to create metal complexes through the coordination of the nitrogen atoms of pyridines with different metals. In this way, silver and copper metal PDI-metal complexes were synthesized (**Figure 2**), also obtained in form of salt, which will help its solubility in aqueous medium to carry out biological assays. These metallo-PDIs show great antiproliferative capacity against human cervical cancer cells.



**Figure 2:** Target molecules of chapter 3.

Chapter four shows another field of application of PDIs: functionalization of 2D materials. The current need to generate energy by artificial sources, an usual strategy is to design donor-acceptor systems. PDIs without functionalization in aromatic core are excellent electron acceptor and MoS<sub>2</sub>, an emerging 2D material, is an exceptional donor system. Therefore, functionalization of this material with a PDI unit, it became in a donor-acceptor system. In chapter three, an asymmetric PDI functionalized with liponic acid have been synthesized (**Figure 3**), which, through the sulfur atoms present in its structure, will allow covalent binding to MoS<sub>2</sub> to obtain a new 2D PDI-MoS<sub>2</sub> hybrid material. Photophysical studies of this new hybrid material have shown that its able to produce energy transfer a charge separation processes, being able to apply them in optoelectronic devices for energy generation or storage.



**Figure 3:** Target molecule of chapter 4.

## Contenido

1. Introducción: Química de las perilenodiimidias.....	3
1.1. Las perilenodiimidias: reactividad y química.....	3
1.1.1 Funcionalización en bahía: PDI de segunda generación .....	7
1.1.2 Funcionalización en orto: PDI de tercera generación.....	11
1.1.3 Funcionalización total del núcleo aromático de las PDI .....	12
1.1.4 Reacciones de sustitución en las PDI.....	13
1.1.5 Reacciones de acoplamiento C-C en PDI.....	14
1.2 Funcionalización directa de las PDI.....	15
1.3 Expansión del núcleo central de las PDI.....	17
1.4 Propiedades físicas de las PDI .....	19
1.4.1 Propiedades ópticas: absorción y fluorescencia .....	19
1.4.2 Propiedades redox de las PDI.....	21
1.4.3 Ordenamiento y solubilidad .....	22
2.- PDI sustituidas en las posiciones bahía con sales de imidazolio y su aplicación en terapia fotodinámica.....	27
2.1 ¿Qué es la terapia fotodinámica? .....	27
2.2 Componentes de la terapia fotodinámica .....	28
2.2.1 Fotosensibilizadores .....	29
2.2.2 Luz.....	32
2.2.3 Oxígeno .....	34
2.3 ¿Cómo funciona la Terapia Fotodinámica?.....	35
2.4 Antecedentes. Aplicación de las PDI en Terapia Fotodinámica .....	36
2.5 Objetivos .....	40
2.6 Discusión de resultados.....	42
2.6.1 Síntesis y caracterización .....	42
2.6.2 Ensayos biológicos.....	55
2.6.2.1 Estudios previos de biocompatibilidad para las PDI-1 y PDI-2. 55	
2.7 Conclusiones .....	59
2.8 Experimental .....	60

2.8.1 Materiales y métodos .....	60
2.8.2 Síntesis de nuevos productos.....	61
ANEXO I .....	64
3. Síntesis, caracterización y estudios de citotoxicidad de complejos metálicos basados en dipiridilaminoperilenodiimidias.....	79
3.1. Metales en quimioterapia .....	79
3.1.1. Un poco de historia .....	79
3.1.2. Propiedades de los complejos metálicos o compuestos de coordinación.....	80
3.1.3. Metales con propiedades anticancerígenas.....	81
3.2. Antecedentes: PDI funcionalizadas con metales.....	90
3.3. Objetivos .....	94
3.4. Discusión de resultados .....	95
3.5. Resumen.....	131
3.6. Conclusiones .....	135
4. Síntesis y caracterización de una PDI asimétrica para la funcionalización de materiales 2D .....	139
4.1 Materiales 2D.....	139
4.1.1 Sulfuro de Molibdeno (MoS <sub>2</sub> ).....	140
4.1.2 Obtención de materiales 2D .....	141
4.1.3 Funcionalización no covalente de MoS <sub>2</sub> con agentes dopantes ..	142
4.1.4 Funcionalización covalente de MoS <sub>2</sub> .....	143
4.2 Antecedentes. Utilización de PDI y otras moléculas orgánicas en funcionalización de materiales 2D .....	144
4.3 Objetivos .....	149
4.4 Discusión de resultados.....	149
4.5 Resumen.....	173
4.6 Conclusiones .....	180
Listado de abreviaturas y acrónimos .....	181

## Capítulo 1

### Introducción: Química de las perilenodiimidias





## 1. Introducción: Química de las perilenodiimidias

La síntesis orgánica es una herramienta que nos ofrece la química orgánica, mediante la cual podemos romper y formar enlaces químicos de forma racional y controlada, de tal forma que se puedan construir nuevas arquitecturas moleculares complejas y diversamente funcionalizadas. Esta versatilidad permite modular las características físico-químicas de las moléculas o, incluso, dotarlas de nuevas propiedades.

El desarrollo en los países industrializados requiere del avance de esta disciplina, ya que tanto la industria farmacéutica, como la de materiales o la agroquímica, necesitan del descubrimiento de nuevas moléculas que satisfagan las necesidades de los ciudadanos. Cabe destacar aquí el uso de estas nuevas moléculas en el campo del almacenamiento y transferencia de energía, como pueden ser los sistemas fotosintéticos artificiales<sup>1</sup> y los materiales 2D,<sup>2</sup> y también el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas a terapias anticancerígenas menos invasivas como puede ser la terapia fotodinámica.<sup>3</sup>

En este contexto, y centrándonos en sistemas fotosintéticos artificiales, materiales 2D o en terapia fotodinámica, es necesario disponer de moléculas que cumplan ciertos requisitos para poder aplicarlas en esos campos de estudio. Idealmente necesitaríamos moléculas con una alta conjugación  $\pi$ , relativamente fáciles de funcionalizar, capaces de actuar como dadores o aceptores de carga y, en el caso de la terapia fotodinámica, tener la capacidad de formar especies reactivas de oxígeno. Estas características las cumplen algunas familias de cromóforos orgánicos, como pueden ser las ftalocianinas<sup>4</sup> (Pcs), los BODIPYS<sup>5</sup> o las perilenodiimidias<sup>6</sup> (PDI), que serán las protagonistas de la presente tesis, al ser utilizadas como *building blocks* en las aplicaciones anteriormente mencionadas.

### 1.1. Las perilenodiimidias: reactividad y química

Las PDI son uno de los grupos de hidrocarburos aromáticos policíclicos más importantes que se han desarrollado en las últimas décadas, atrayendo la atención de

---

<sup>1</sup> a) Follana-Berná, J.; Farran, R.; Leibl, W.; Quaranta, A.; Sastre-Santos, Á.; Aukauloo, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12284-12288. b) Martín-Gomis, L.; Peralta-Ruiz, F.; Thomas, M. B.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F.; Sastre-Santos, Á. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3863-3874. c) Taniguchi, M.; Lindsey, J. S. *Chem. Rev.* **2017**, *2*, 344-535. d) Rybtchinski, B.; Sinks, L. E.; Wasielewski, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12268-12269.

<sup>2</sup> a) Cantón-Vitoria, R.; Gobeze, H. B.; Blas-Ferrando, V. M.; Ortiz, J.; Jang, Y.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á.; Nakanishi, Y.; Shinohara, H.; D'Souza, F.; Tagmatarchis, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 5712-5717. b) Miltrović, A.; Wild, S.; Lloret, V.; Fickert, M.; Assebban, M.; Markus, B. G.; Simon, F.; Hauke, F.; Abellán, G.; Hirsch, A. *Eur. J. Chem.* **2021**, *27*, 3361-3366.

<sup>3</sup> a) Liu, Z.; Gao, Y.; Jin, X.; Den, Q.; Yin, Z.; Tong, S.; Qing, W.; Huang, Y. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 5535-5544. b) Zhonghua, L.; Xuejuan, W.; Qing, C.; Feiyan, M.; Yongwe, H.; Yijian, G.; Qingyuan, D.; Zeng-Ying, Q.; Xiaoyi, X.; Jianling, Z.; Feng, L.; Hao, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 16215-16223.

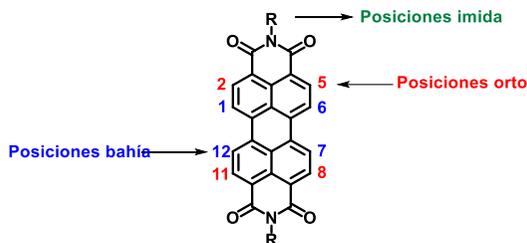
<sup>4</sup> a) Lo, P. C.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Pandey, R. K.; Ng, D. K. P.; Torres, T.; Dumoulin, F. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1041-1056. b) de la Torre, G.; Bottari, G.; Torres, T. *Adv. Energy Mater.* **2017**, *7*, 1601700es

<sup>5</sup> Lu, H.; Shen, Z. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 290-295.

<sup>6</sup> a) Zink-Lorre, N.; Font-Sanchis, E.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 3824-3838. b) Nowak-Król, A.; Würthner, F. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 1272-1318.

químicos, físicos e ingenieros de materiales.<sup>7</sup> Las PDI son derivados sintéticos del perileno, sintetizadas por primera vez por Kardos<sup>8</sup> en 1913, quien las catalogó como pigmentos de batería en su patente.<sup>9</sup>

Formalmente, las PDI están compuestas por dos unidades de naftaleno unidas por sus posiciones 1,8, dando lugar a un núcleo pentacíclico aromático (**Figura 1.1**); además, presentan dos grupos imida en las posiciones peri (3, 4 y 9, 10). Las PDI se pueden funcionalizar en diez posiciones diferentes: *bahía* (1, 6, 7 y 12), *orto* (2, 5, 8 y 11) e imida (*N, N'*).



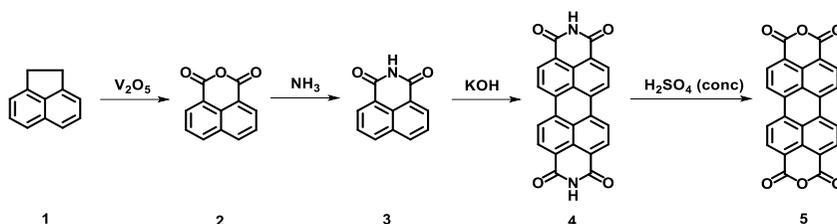
**Figura 1.1:** Estructura y numeración de la PDI.

Debido a su baja solubilidad, originada por la tendencia a la agregación propiciada por las interacciones pi-pi de sus estructuras aromáticas planas, hasta el año 1959 no se descubrió todo su potencial asociado a su intensa fluorescencia y no fue posible aplicarlas fuera de la industria de los pigmentos. La primera estrategia para solubilizar las PDI consistió en introducir sustituyentes adecuados en las posiciones imida, lo que requirió sintetizar previamente el dianhídrido del ácido 3,4,9,10-perileno-tetracarboxílico (perileno-dianhídrido, PDA). El proceso sintético desarrollado fue el siguiente (**Esquema 1.1**): al acenafteno (**1**) se oxida usando  $V_2O_5$  para obtener el naftaleno-1,8-dicarboxianhídrido (**2**), que no puede ser dimerizado directamente al correspondiente PDA; por lo tanto, se forma la monoimida de **2** haciendo una reacción de condensación con amoníaco, para obtener la naftaleno-1,8-dicarboxiimida (**3**), la cual, mediante el tratamiento con un medio altamente básico, origina la PDI simétrica (**4**). Finalmente, la saponificación con ácido sulfúrico concentrado permite obtener el PDA (**5**) deseado.

<sup>7</sup> Würthner, F.; Saha-Möller, C. R.; Fimmel, B.; Ogi, S.; Leowanawat, P.; Schmidt, D. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 962-1052.

<sup>8</sup> Kardos, M. *D. R. P.* 276357, June 14, 1913.

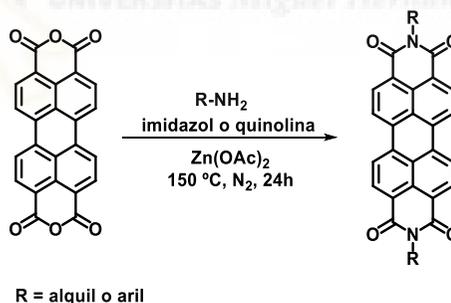
<sup>9</sup> Liebermann, C.; Kardos, M. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1914**, *47*, 1203.



**Esquema 1.1:** Ruta sintética para obtener el PDA.

No todos los sustituyentes tienen el mismo efecto a la hora de incrementar la solubilidad. Los anillos aromáticos con sustituyentes voluminosos en posiciones 2,6 o 2,5 y las cadenas alifáticas ramificadas con más de cinco átomos de carbono (especialmente las denominadas de cola de golondrina como etilpropilo o hexilheptilo) aumentan considerablemente la solubilidad en disolventes orgánicos. Esto es consecuencia de la disminución que producen en el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de los núcleos aromáticos del perileno.<sup>10</sup>

La reacción del PDA con aminas primarias alifáticas o aromáticas para obtener las correspondientes PDI simétricas suele ser relativamente sencilla, usando normalmente tolueno o imidazol fundido como disolvente en condiciones de atmósfera inerte para evitar la oxidación de dichas aminas; sin embargo, en el caso de usar aminas aromáticas menos reactivas es necesario usar quinolina como disolvente y adicionar sales de metales, como hierro, cobre o zinc, para que actúen como catalizadores en la reacción de condensación (**Esquema 1.2**).



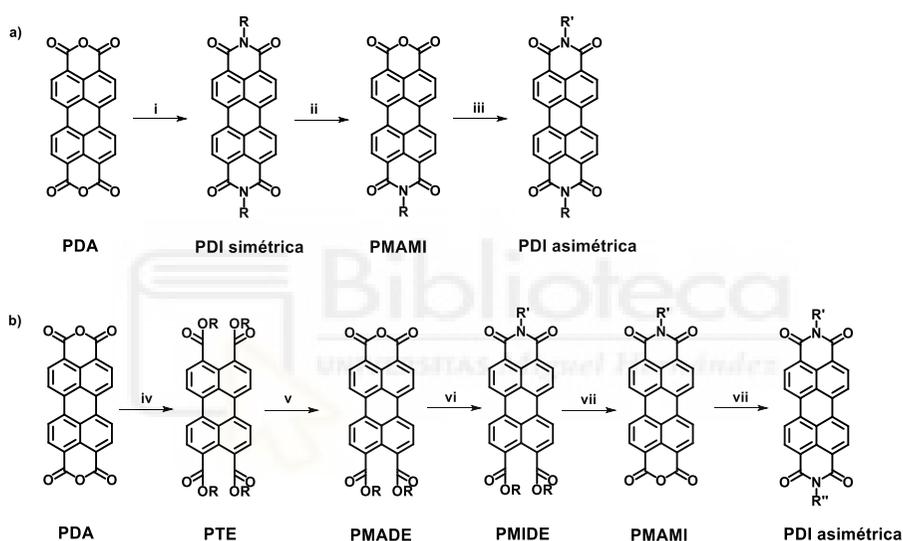
**Esquema 1.2:** Condiciones de reacción estándar para obtener PDI simétricas.

Alternativamente se pueden sintetizar PDI asimétricas, es decir, PDI con dos sustituyentes diferentes en las posiciones imida; para ello existen dos métodos principalmente. El primero de ellos consiste en una reacción de hidrólisis en medio básico de una PDI simétrica para obtener el derivado perileno monoanhídrido monoimida (PMAMI), el cual reaccionará con otra amina diferente para dar lugar a la PDI asimétrica.<sup>11</sup>

<sup>10</sup> Langhals, H. *Heterocycles* **1995**, *40*, 477.

<sup>11</sup> a) Nagao, Y. *Prog. Org. Chem.* **1997**, *31*, 43-49; b) Wicklein, A.; Kohn, P.; Ghazaryan, L.; Thurn-Albrecht, T.; Thelakkat, M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2328-2330.

El segundo método consiste en la hidrólisis total del PDA en medio básico y en presencia de un alcohol y un haluro de alquilo, para formar el derivado perileno tetraéster (PTE). La presencia de los cuatro grupos éster aumenta considerablemente la solubilidad en medio orgánico, favoreciendo así tanto la reactividad como la caracterización. El siguiente paso consiste en la hidrólisis en medio ácido de dos de los grupos éster, seguido de la deshidratación espontánea de los grupos carboxilo formados para generar el derivado perileno monoanhidridodiesté (PMADE), el cual podrá reaccionar con una amina bajo las condiciones normales de condensación dando lugar al perileno monoimidadiesté (PMIDE). Con este derivado se repite el ciclo hidrólisis de los ésteres – deshidratación para obtener el PMAMI, el cual podrá reaccionar con otra amina diferente para así obtener una PDI asimétrica.<sup>12</sup> Esta ruta conlleva más reacciones, sin embargo, los rendimientos obtenidos son mayores que en la primera ruta (**Esquema 1.3**).



**Esquema 1.3:** Rutas para obtener PDI asimétricas. Reactivos y condiciones: i)  $R-NH_2$ , imidazol, 150 °C, 24 h,  $N_2$ ; ii) KOH, tBuOH, 30 min, reflujo; iii)  $R'-NH_2$ , imidazol, 150 °C, 24 h,  $N_2$ ; iv) Bu4NOH, hexanol, bromohexano,  $K_2CO_3$ , 3h, 120 °C; v) pTsOH- $H_2O$ , dodecano/tolueno (5:1), 5h, 95 °C; vi)  $R'-NH_2$ , imidazol, DMAP, 150 °C, 5 h,  $N_2$ ; vii)  $R''-NH_2$ , imidazol, DMAP, 150 °C, 5 h,  $N_2$ .

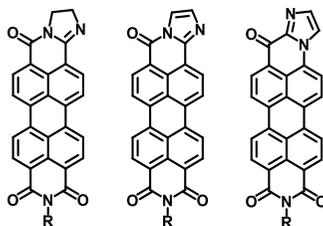
Se han descrito otras reacciones de condensación en la posición imida entre un grupo amino primario y el grupo carbonilo de la propia imina, para dar lugar a los derivados perilenoimidazoloimida (**Figura 1.2**)<sup>13,14</sup>, los cuales, dependiendo de las condiciones de reacción, se pueden obtener en diversas proporciones o diferentes isómeros, en el caso de que la reacción transcurra a través del mecanismo de Regel<sup>15</sup>.

<sup>12</sup> Xue, C.; Sun, R.; Annab, R.; Abadi, D.; Jin, S. *Tetrahedron* **2009**, 50, 853-856.

<sup>13</sup> Langhals, H.; Jaschke, H.; Ring, U.; von Unold, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 201-203.

<sup>14</sup> Perrin, L.; Hudhome, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 28, 5427-5440.

<sup>15</sup> Regel, H.; Büchel, K. H. *Liebigs Ann. Chem.* **1977**, 145-158.



**Figura 1.2:** Estructura de diferentes perilenoimidazoloimidas.

La funcionalización de las posiciones *bahía* y *orto* se ha ido desarrollando a lo largo del tiempo, denominando PDI de segunda generación a aquellas funcionalizadas en *bahía* y de tercera generación a las funcionalizadas en *orto*, siendo las PDI de primera generación aquellas que no están sustituidas en ninguna de sus posiciones *bahía* u *orto*.

### 1.1.1 Funcionalización en bahía: PDI de segunda generación

La halogenación<sup>16,17</sup> y nitración<sup>18</sup> de las posiciones bahía se ha ido desarrollando a lo largo de los años, convirtiendo a las PDI en moléculas muy versátiles. Los nuevos sustituyentes provocan dos efectos principales en la naturaleza de las PDI aumentan la solubilidad, ya que la introducción tanto de átomos de halógeno, como de grupos oxigenados, nitrogenados o borilados en las posiciones bahía, produce una distorsión de la estructura de la PDI, que pierde su planaridad, lo que incrementa el impedimento estérico y, consecuentemente, disminuye el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de los núcleos aromáticos de la PDI<sup>19</sup> pueden dotar a la PDI con nuevas propiedades optoelectrónicas, convirtiéndolas en moléculas dadoras oceptoras de electrones dependiendo del sustituyente introducido. De este tema se hablará con más detalle en el siguiente apartado.

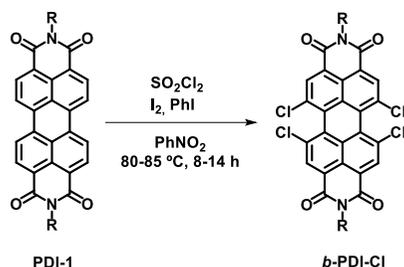
La halogenación en las posiciones bahía puede realizarse mediante la introducción de átomos de cloro, bromo o flúor. En el caso de la cloración, se puede optar por clorar una PDI o un PDA. El tratamiento de la **PDI 1** con cloruro de sulfuro en presencia de yodo y yodobenceno, usando nitrobenzoceno como disolvente, da lugar a la **PDI 2** con buen rendimiento (**Esquema 1.4**).<sup>14</sup>

<sup>16</sup> Böhm, A.; Arms, H.; Henning, G.; Blashka, P. Patente alemana, DE 19547209 A1, **1997**, (*Chem. Abstr.* **1997**, 127, 96569g)

<sup>17</sup> Rogovik, V.; Gutnik, L. *Zh. Org. Khim.* **1988**, 24, 635.

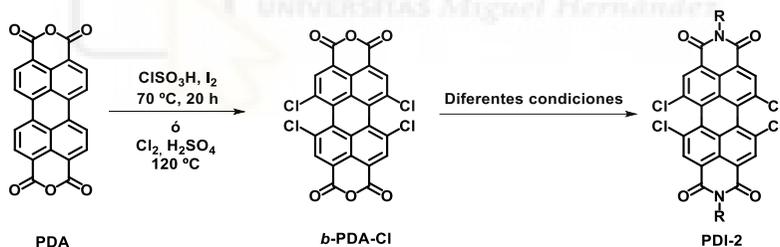
<sup>18</sup> Chen, K. Y.; Chow, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5959-5963.

<sup>19</sup> Osswald, P.; Würthner, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14319-14326.



*Esquema 1.4: Síntesis de tetra cloro-PDI sustituidas en bahía.*

Otro método para obtener tetra cloro-PDI sustituidas en bahía consiste en tratar el PDA con ácido clorosulfónico usando yodo como catalizador durante 20 horas a una temperatura de 70 °C.<sup>20</sup> Sin embargo, el método más utilizado para obtener tetracloroPDI sustituidas en bahía consiste en la cloración del PDA, lo que se consigue mediante el tratamiento con cloro gas en presencia de ácido sulfúrico, obteniendo el derivado tetraclorado **b-PDA-Cl**. También están descritas condiciones más suaves para obtener este derivado tetraclorado, las cuales implican el tratamiento del PDA con ácido sulfúrico y cantidades catalíticas de yodo durante 20 horas a una temperatura de 70 °C. Una vez sintetizado el **b-PDA-Cl** se puede funcionalizar con diferentes aminas primarias para obtener los derivados PDI tetraclorados en bahía. Dependiendo de la naturaleza de la amina, si es alifática o aromática, se usarán diferentes condiciones de reacción.<sup>21,22</sup> Normalmente, las aminas aromáticas requieren condiciones de reacción más drásticas, necesitando tiempos de reacción más largos y temperaturas más elevadas, y usando como disolventes NMP o ácido propiónico (*Esquema 1.5*).<sup>23</sup>



*Esquema 1.5: Síntesis de tetracloroPDI sustituidas en bahía.*

Al igual que la cloración, la reacción de bromación se puede llevar a cabo sobre el PDA o sobre una PDI. Bromar el PDA requiere de condiciones de reacción más agresivas, usando bromo junto con ácido sulfúrico fumante a altas temperaturas.<sup>24</sup> Bajo estas condiciones se logra obtener una mezcla isomérica del producto dibromado en las posiciones 1,7 (**1,7-Br<sub>2</sub>PDA**) y 1,6 (**1,6-Br<sub>2</sub>PDA**), junto con el producto

<sup>20</sup> Sadari, M.; Hadel, L.; Sauer, R. R.; Husain, S.; Krogh-Jespersen, K.; Westbrook, J. D.; Bird, G. R. *Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7988-7996.

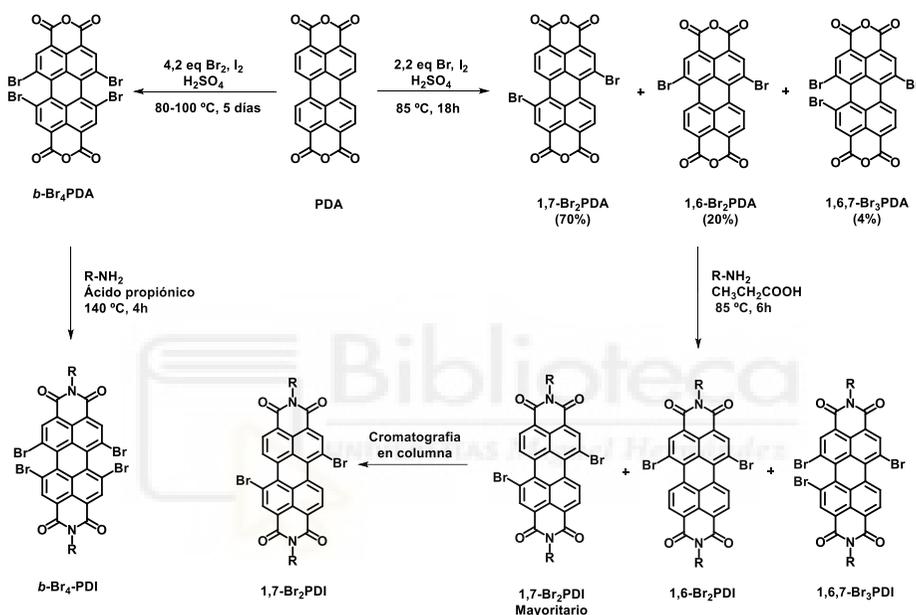
<sup>21</sup> Wang, W.; Shaller, A. D.; Li, A. D. Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8271-8279.

<sup>22</sup> Queste, M.; Cadiou, C.; Pagoaga, L.; Giraudet, L.; Hoffman, N. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2537-2545.

<sup>23</sup> Dubey, R. K.; Westerveld, N.; Grozema, F. C.; Sudhölter, E. J. R.; Jager, W. F. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1882-1885.

<sup>24</sup> Böhm, A.; Arms, H.; Henning, G.; Blaschka, P. Patente alemana, DE 19547209 A1, **1997**, (*Chem. Abstr.* **1997**, 127, 96569G)

tribromado (**b-Br<sub>4</sub>PDA**) en proporción 70:20:4 respectivamente.<sup>25</sup> Dado que estas PDA son altamente insolubles, no es posible llevar a cabo una etapa de purificación para separar los isómeros; por lo tanto, la opción que suele utilizarse es realizar una reacción de imidación sobre los PDA para formar las correspondientes PDI, que se separan mediante cromatografía en columna, obteniendo el isómero 1,7 como producto mayoritario. El grupo de los profesores Liu y Zhu describió un método por el que es posible obtener PDI bromadas en las cuatro posiciones bahía.<sup>26</sup> Para ello se hace reaccionar PDA con bromo, una cantidad estequiométrica de yodo y ácido sulfúrico durante cinco días. El PDA tetrabromado resultante se somete a una reacción de imidación en ácido propiónico para obtener finalmente la PDI tetrabromada en las posiciones bahía (**Esquema 1.6**).



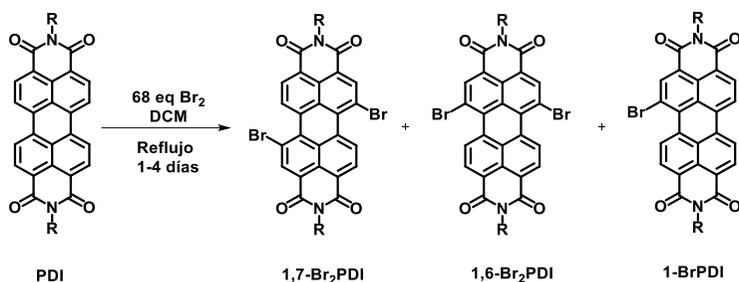
**Esquema 1.6:** Síntesis de PDI bromadas a partir de PDA.

Las reacciones anteriormente descritas para obtener PDI bromadas utilizan condiciones de reacción agresivas, por lo que se ha investigado la forma de obtener estos compuestos con métodos más suaves. El grupo del profesor Rytchinski ha desarrollado un método mediante el cual se puede obtener el derivado dibromado 1,7 frente al 1,6 en una ratio 3:1 con rendimientos mayores del 90%.<sup>27</sup> Para poder aislar solo el isómero 1,7 se somete al crudo de reacción a sucesivas recristalizaciones. Mediante este método también es posible obtener la PDI monobromada, aunque el rendimiento de este producto es mucho menor que el de la PDI dibromada (**Esquema 7**).

<sup>25</sup> Würthner, F.; Stepanenko, V.; Chen, Z.; Saha-Möller, C. R.; Kocher, N.; Stalke, D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7933-7939.

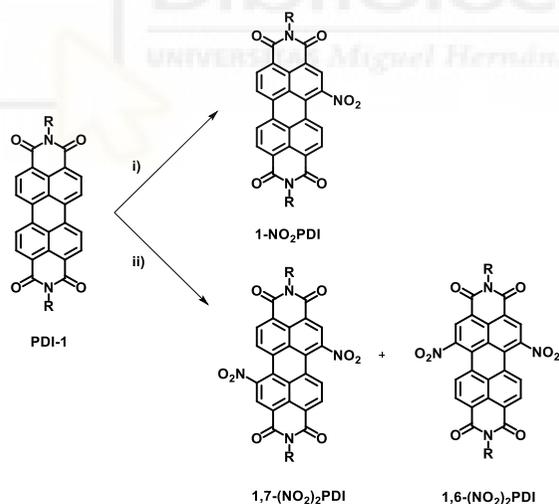
<sup>26</sup> Qui, W.; Chen, S.; Sun, X.; Liu, Y.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 867-870.

<sup>27</sup> Rajasingh, P.; Cohen, R.; Shirman, E.; Shimon, L. J. W.; Rytchinski, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973-5979.



*Esquema 1.7: Síntesis de PDI bromadas.*

A priori, las PDI nitradas en bahía son moléculas que no tienen interés a la hora de ser aplicadas en diferentes campos de estudio, sin embargo, la especie reducida, las amino PDI sustituidas en bahía, son intermedios sintéticos útiles para poder llevar a cabo diversas rutas sintéticas. Debido al carácter electrón-atractor del grupo nitró, la funcionalización de una sola de las posiciones bahía se consigue muy fácilmente, ya que la segunda reacción de sustitución electrófila aromática queda bloqueada en cuanto se ha introducido el primer grupo nitró. En este caso, las condiciones de reacción también son suaves, empleando normalmente como agente nitrante el nitrato de amonio y cerio (IV) (CAN) en presencia de ácido nítrico y diclorometano a temperatura ambiente. En el caso de querer introducir dos grupos nitró se puede incrementar la cantidad de agente nitrante y también el tiempo de reacción, en este caso se obtendrían la mezcla isomérica de 1,7-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PDI y 1,6-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PDI (**Esquema 1.8**).<sup>28</sup>



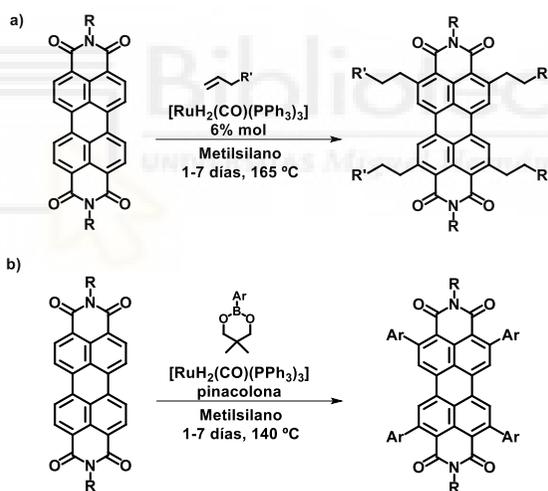
*Esquema 1.8: Síntesis de PDI nitradas. Reactivos y condiciones: i) HNO<sub>3</sub>, CAN, DCM, rt, 2 h; ii) HNO<sub>3</sub>, CAN, DCM, rt, 48 h.*

<sup>28</sup> Chen, K. Y.; Chow, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5959-5963.

### 1.1.2 Funcionalización en orto: PDI de tercera generación

Las PDI sustituidas en las posiciones *orto* (2, 5, 8 y 11) se desarrollaron en el año 2009 en el grupo de investigación del profesor Osuka.<sup>29</sup> Basándose en el método de Murai-Chatani-Kakiuchi<sup>30</sup> usaron la catálisis con rutenio para activar enlaces C-H y poder así introducir grupos alquílicos y arílicos de forma directa en las cuatro posiciones orto (**Esquema 1.9**).

Este método tenía sus limitaciones debido al número restringido de sustituyentes que se podían introducir, por ello, tanto Shinokubo,<sup>31</sup> como Li y Müllen<sup>32</sup> siguieron investigando sobre la catálisis con rutenio para la activación de enlaces C-H para poder formar enlaces C-C, y en el año 2011 publicaron paralelamente un método que permitía obtener PDI mono-, di- o tetraboriladas en las posiciones *orto*, con la ventaja de que, al introducir ésteres borónicos, se los podía sustituir por una gran variedad de sustituyentes. Para poder funcionalizar estas posiciones se requiere de catalizadores de rutenio o iridio. Li y Müllen optimizaron un método que usaba bispinacolato de boro ( $B_2Pin_2$ ) junto con  $[RuH_2(CO)(PPh_3)_3]$  como catalizador, obteniendo PDI tetraboriladas en *orto* con buenos rendimientos (60-80%). Sin embargo, el uso de catalizadores de rutenio no da buenos resultados con grupos diisopropilfenilo en las posiciones imida.



**Esquema 1.9:** Condiciones de alquilación y arilación directa de las posiciones *orto* de las PDI.

Por otro lado, el grupo del profesor Shinokubo usa como catalizador  $[Ir(OMe)cod]_2$  junto a  $B_2Pin_2$  y tris(pentafluorofenil)fosfina  $[P(C_6F_5)_3]$  para conseguir la tetraborilación con rendimientos altos. Existe la posibilidad de obtener sólo las PDI

<sup>29</sup> a) Nakazono, S.; Imazaki, Y.; Yoo, H.; Yang, J.; Sasamori, T.; Tokitoh, N.; Cedric, T.; Kageyama, H.; Kim, D.; Shinokubo, H.; Osuka, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7530-7533. b) Nakazono, S.; Easwaramoorthi, S.; Kim, D.; Shinokubo, H.; Osuka, A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5426-5429.

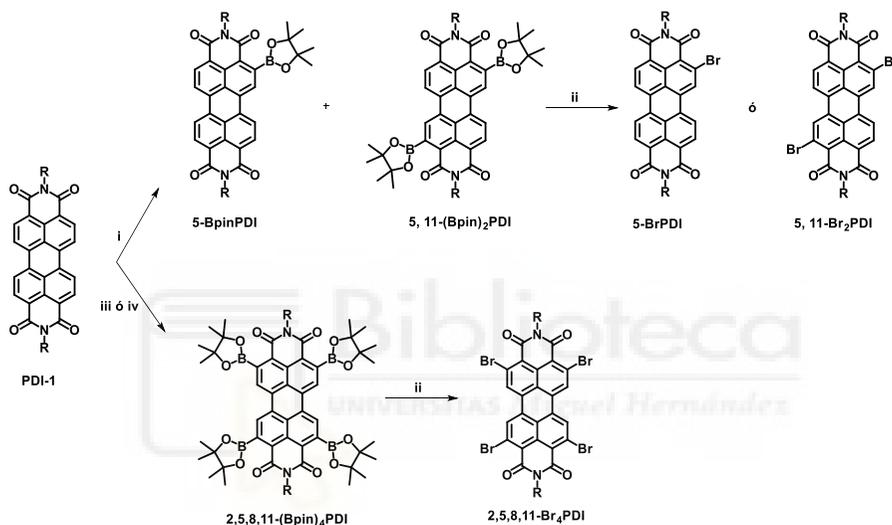
<sup>30</sup> Murai, S.; Kakiuchi, S.; Sekine, S.; Tanaka, Y.; Kamatani, A.; Sonoda, M.; Chatani, N. *Nature* **1993**, *366*, 529-531.

<sup>31</sup> Teraoka, T.; Hiroto, S.; Shinokubo, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2532-2535.

<sup>32</sup> Battagliarin, G.; Li, C.; Enkelmann, V.; Müllen, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3012-3015

mono- o diboriladas usando 4,4'-di-*tert*-butil-2,2'-bipiridina o tris[3,5-bis(trifluorometil)fenil]fosfina en lugar de  $P(C_6F_5)_3$ : sin embargo, en este caso el rendimiento de la reacción baja considerablemente hasta un 12% (**Esquema 1.10**).

Estos derivados de PDI son interesantes a nivel sintético, ya que el grupo éster borónico puede emplearse en reacciones de Suzuki, o ser reemplazado por halógenos, que pueden sufrir reacciones de sustitución nucleófila o reacciones de formación de enlaces C-C catalizadas por paladio (Stille, Suzuki, Sonogashira, etc.) como se verá en la presente tesis. Sin embargo, aun hoy en día, la funcionalización en *orto* de las PDI es un campo poco explotado, debido principalmente al uso de los catalizadores de rutenio o iridio que tienen precios elevados. Por ello, se sigue investigando en rutas sintéticas alternativas para poder funcionalizar las posiciones *orto* de las PDI.



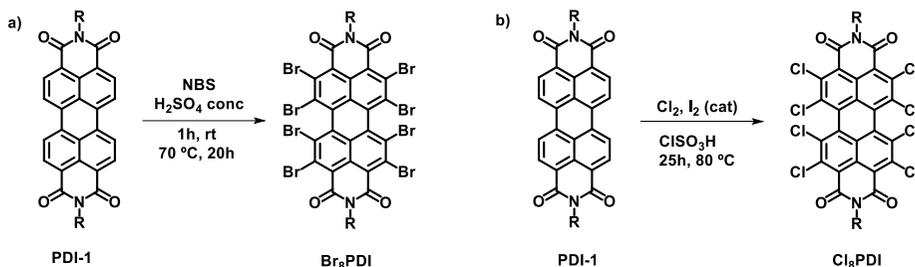
**Esquema 1.10:** Rutas sintéticas para obtener los derivados de PDI borilados y halogenados en las posiciones *orto*, reactivos y condiciones: i)  $B_2pin_2$ ,  $[Ir(OMe)cod]_2$ , tris[3,5-bis(trifluorometil)fenil]fosfina, dioxano, reflujo; ii)  $CuBr_2$ , dioxano/MeOH/agua, 120 °C, 12 h; iii)  $B_2pin_2$ , 3-4 mol%  $[Ir(OMe)cod]_2$ ,  $P(C_6F_5)_3$ , dioxano, reflujo, 2-4 días; iv)  $B_2pin_2$ , 50 mol%  $[RuH_2(CO)(PPh_3)_3]$ , metilsilano/pinacolona, 140 °C, 24-30h.

### 1.1.3 Funcionalización total del núcleo aromático de las PDI

Son pocos los ejemplos descritos en la literatura de PDI con todas las posiciones del núcleo aromático sustituidas. El grupo del profesor Orentas ha descrito un método que permite la perbromación de la PDI.<sup>33</sup> Para ello se usa como agente bromante *N*-bromosuccinimida (NBS) junto con ácido sulfúrico concentrado, de este modo se obtiene la PDI perbromada en un solo paso y con un rendimiento del 95% (**Esquema 1.11a**). La percloración del núcleo aromático del perileno se desarrolló en el grupo del profesor Würthner, usando ácido clorosulfónico junto con un exceso de

<sup>33</sup> Jozeliunaite, A.; Striela, R.; Labanauskas, L.; Orentas, E. *Synthesis* **2017**, 49, 5176-5182.

cloro y empleando iodo como catalizador, durante veinticinco horas a 80 °C (**Esquema 1.11b**).



**Esquema 1.11:** Síntesis de PDI perbromadas a) y percloradas b).

#### 1.1.4 Reacciones de sustitución en las PDI

En el apartado anterior se ha visto cómo se pueden bromar, clorar, nitrar o borilar las PDI. Todas las moléculas así obtenidas, algunas con más interés que otras, se consideran material de partida para poder realizar síntesis de PDI más complejas. Las reacciones más comunes son las de sustitución nucleófila y los acoplamiento C-C catalizados por metales, destacando las de sustitución de las PDI bromadas con aminas,<sup>34</sup> alcoholes,<sup>35</sup> fenoles<sup>36</sup> o tioles,<sup>37</sup> siendo menos común usar la **b-PDI-Cl** para reacciones de sustitución nucleófila.

La reacción de sustitución sobre la mezcla de **1,7-Br<sub>2</sub>PDI** y **1,6-Br<sub>2</sub>PDI** con aminas cíclicas, como piperidina, pirrolidina o morfolina, da lugar a la mezcla de regioisómeros que fácilmente se pueden separar por columna cromatográfica, obteniendo rendimientos altos en este tipo de reacciones. En el caso de la reacción de sustitución con aminas de cadena abierta los rendimientos son aún mayores, obteniendo en algunos casos valores del 93%.<sup>38</sup> Del mismo modo, los fenoles también pueden ser introducidos en el núcleo aromático del perileno mediante reacciones de sustitución sobre las PDI bromadas, usando un medio básico, éter corona y como disolvente NMP o tolueno a 80 °C durante 24 o 48 horas; de esta forma se obtienen rendimientos en torno al 88%.<sup>36</sup> La síntesis de PDI alcoxiladas es más compleja; solamente el grupo del profesor Würthner consiguió sintetizar una PDI tetraalcoxilada utilizando como producto de partida **b-Br<sub>4</sub>PDI** y catalizando la reacción con iones cobre.<sup>39</sup> El grupo del profesor Würthner desarrolló un método por el cual se puede obtener PDI monohidroxiladas a partir del derivado monobromado.<sup>35</sup>

<sup>34</sup> a) Fan, L.; Xu, Y.; Tian, H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 443-446. b) Dubey, R. K.; Efimov, A.; Lemmetyinen, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 778-788. c) Wang, H.; Kaiser, T. E.; Uemura, S.; Würthner, F. *Chem. Commun.* **2008**, 1181-1183.

<sup>35</sup> Li, Y.; Qing, Z.; Yu, Y.; Liu, T.; Jiang, R.; Li, Y. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1934-1939

<sup>36</sup> a) Jiménez, Á. J.; Lin, M. J.; Burschka, C.; Becker, J.; Settels, V.; Engels, B.; Würthner, F. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 608-619. b) Lin, M. J.; Jiménez, Á. J.; Burschka, C.; Würthner, F. *Chem. Commun.* **2011**, *48*, 12050-12052.

<sup>37</sup> a) Zhao, C.; Zhang, Y.; Li, R.; Li, X.; Jiang, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2402-2410. b) Lin, M. J.; Schulze, M.; Radacki, K.; Würthner, F. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9107-9109.

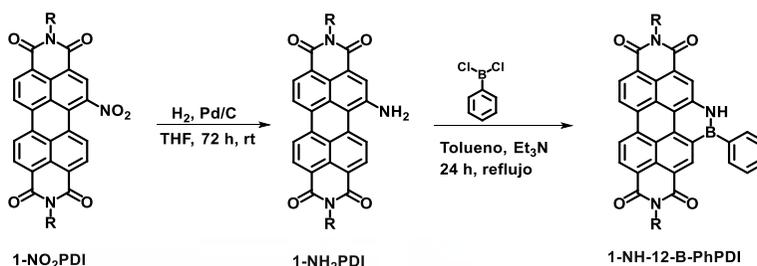
<sup>38</sup> Zhao, C.; Zhang, Y.; Li, R.; Li, X.; Jiang, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2402-2410.

<sup>39</sup> Leowanawat, P.; Nowak-Król, A.; Würthner, F. *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 537-544.

Para las **b-PDI-Cl**, la reacción de sustitución solo transcurre con fenoles, aunque no siempre es posible la tetrasustitución.<sup>40</sup> Los mejores rendimientos se consiguen cuando la sustitución va mediada con iones fluoruro.<sup>41</sup>

La mayor nucleofilia de los iones alquiltiolato hace que la reacción de sustitución con los derivados bromados de PDI sea bajo condiciones más suaves y con buenos rendimientos,<sup>37</sup> y que incluso tenga lugar con derivados clorados también.

Como se comentó en el apartado anterior, las PDI nitradas no han sido muy utilizadas en el diseño de PDI para aplicaciones posteriores. Existen ejemplos en la bibliografía de reacciones de sustitución de PDI nitradas por aminas cíclicas o fenoles;<sup>42</sup> sin embargo, a nivel sintético, las PDI nitradas se han empleado como precursores de PDI *N*-anuladas en bahía tras su reducción a aminas (**Esquema 1.12**).<sup>43</sup>



**Esquema 1.12:** Síntesis de PDI *N*-anuladas en bahía.

En el caso de las posiciones orto también se pueden llevar a cabo reacciones de sustitución. Se puede obtener el derivado tetrahidroxilado con buenos rendimientos a partir del tetraéster borónico. En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un método para poder alquiltio-funcionalizar y ariloxilar las cuatro posiciones orto de PDI con buenos rendimientos usando iones fluoruro.<sup>44</sup> Estas condiciones de reacción no son efectivas para poder realizar la sustitución con alcoholes alifáticos, dando lugar a mezcla de productos tetraalcoxilados y trialcoxilados.

### 1.1.5 Reacciones de acoplamiento C-C en PDI

Las reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio hacen posible la construcción de nuevas estructuras de PDI con propiedades interesantes, siendo las más usadas los acoplamientos de Stille, Suzuki y Sonogashira (**Esquema 1.13**).

Entre los años 2006 y 2010 los grupos de investigación de los profesores Liu, Zhu y Hoffmann desarrollaron la arilación de las posiciones *bahía* mediante la reacción de Suzuki, empleando tanto el derivado **b-Cl-PDI**, como los derivados bromados. De sus estudios se puede concluir dos aspectos fundamentales:

<sup>40</sup> Xie, Z.; Stepanenko, V.; Radacki, K.; Würthner, F. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7060-7070

<sup>41</sup> Zink-Lorre, N.; Font-Sanchis, E.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 2016-2021.

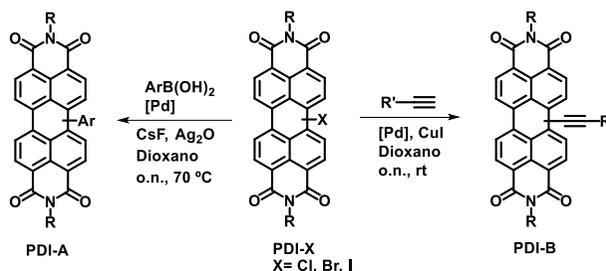
<sup>42</sup> Kong, X.; Gao, J.; Ma, T.; Wang, M.; Zhang, A.; Shi, Z.; Wei, Y. *Dyes Pigm.* **2012**, *95*, 450-454.

<sup>43</sup> Li, G.; Zhao, Y.; Li, J.; Cao, J.; Zhu, J.; Sun, X. W.; Zhang, Q. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 196-203.

<sup>44</sup> Zink-Lorre, N.; Font-Sanchis, E.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 2016-2021.

- el empleo de bases débiles, como KF o CsF, hace que aumente considerablemente el rendimiento de la reacción
- la adición de Ag<sub>2</sub>O a la reacción provoca el mismo efecto.<sup>45,46</sup>

También se ha descrito la arilación de las posiciones *orto* con buenos rendimientos mediante reacción de Suzuki, siendo habitual emplear la PDI tetraborilada como producto de partida.<sup>47</sup>



**Esquema 1.13:** Síntesis mediante reacción de Suzuki (PDI-A) y de Sonogashira (PDI-B).

Los acoplamientos de Sonogashira y Stille son menos usados que el de Suzuki, siendo empleados, principalmente, en el campo de los semiconductores orgánicos.<sup>48</sup> Esto se debe a que mediante este tipo de reacciones es posible sintetizar sistemas poliméricos con puentes lineales de tipo etinilo, o con puentes aromáticos como el tiofeno.<sup>49,50</sup> Los derivados de PDI que se usan para conseguir estos sistemas suelen estar mono- o disustituídos en bahía, siendo la sustitución en *orto* menos común en este tipo de reacciones. Las PDI en estas reacciones pueden actuar bien como el reactivo halogenado, o bien como el portador del alquino o del vinilestanano. El rendimiento de las reacciones suele depender mucho del tipo de cadena sobre la posición imida, siendo por lo general alto.<sup>51</sup>

## 1.2 Funcionalización directa de las PDI

Como se ha visto hasta ahora, para poder funcionalizar el núcleo de las PDI con fenoles o aminas, o para poder realizar un acoplamiento C-C, es necesaria una etapa previa de halogenación. Sin embargo, recientemente se han descrito distintos métodos para poder realizar una funcionalización directa de las PDI sin pasar por la etapa previa de halogenación. Uno de estos métodos consiste en la aminación directa utilizando CuBr<sub>2</sub> como catalizador; aunque se han descrito varios ejemplos,<sup>52</sup> el rendimiento de

<sup>45</sup> Qui, W.; Chen, S.; Sun, X.; Liu, Y.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 867-870.

<sup>46</sup> Queste, M.; Cadiou, C.; Pagoaga, B.; Giraudet, L.; Hoffmann, N. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2537-2545.

<sup>47</sup> Wu, J.; He, D.; Zhang, L.; Liu, Y.; Mo, X.; Lin, J.; Zhang, H. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5438-5441.

<sup>48</sup> Guide, M.; Pla, S.; Sharenko, A.; Zalar, P.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á.; Nguyen, T. Q. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 18894-18899.

<sup>49</sup> Yan, Q.; Zhou, Y.; Zheng, Y. Q.; Pei, J.; Zhao, D. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4389-4394.

<sup>50</sup> Li, S.; Liu, W.; Li, C. W.; Lau, T. K.; Lu, X.; Shi, M.; Chen, H. *J. Mater. Chem. A* **2016**, *4*, 14983-14987.

<sup>51</sup> a) Zeng, C.; Xiao, C.; Feng, X.; Zhang, L.; Jiang, W.; Wang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10933-10937. b) Shahar, C.; Baram, J.; Tidhar, Y.; Weissman, H.; Cohen, S. R.; Pinkas, I.; Rybtchinski, B. *ACS Nano* **2013**, *7*, 3547-3556.

<sup>52</sup> Kremer, M.; Kresten, M.; Höger, S. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 1825-1829

estas reacciones es bajo, en torno al 30%, incluso utilizando un gran exceso de la amina a reaccionar.

Nuestro grupo de investigación, siguiendo esta misma línea de trabajo, desarrolló entre 2018 y 2019 un método que permite la funcionalización directa en las posiciones bahía con diferentes aminas cíclicas.<sup>53</sup> En este caso las reacciones van mediadas por iones fluoruro, permitiendo la mono- di- o triaminación directa, siendo más común la disustitución; sin embargo, una vez obtenido el derivado disustituido, empleando las mismas condiciones de reacción se puede obtener la PDI trisustituida con buenos rendimientos (**Esquema 1.14**). La ventaja de este método de trisustitución radica en tres aspectos

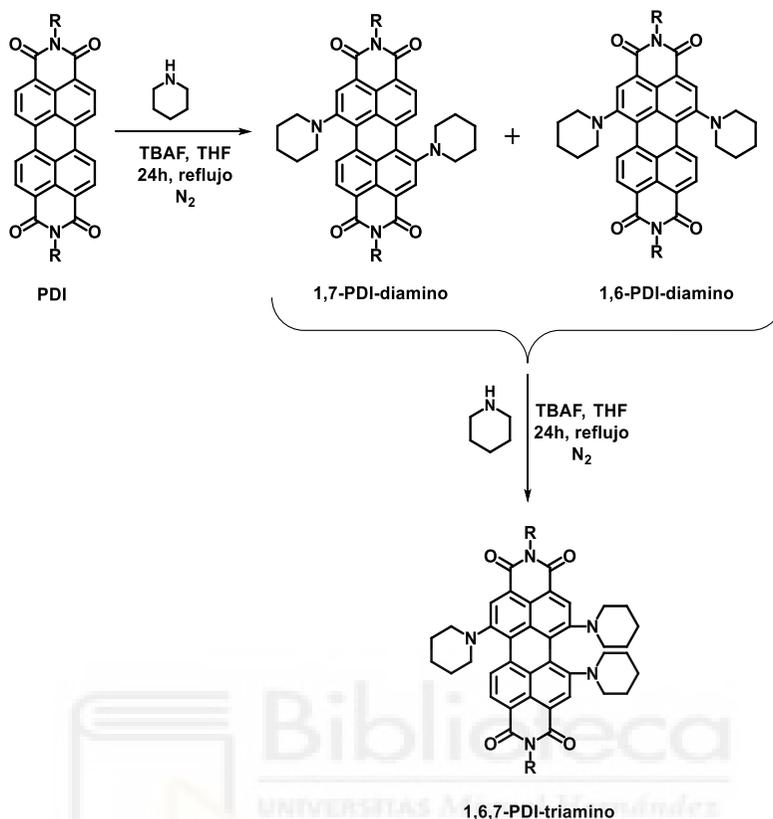
- como ya se ha dicho, no se necesita una etapa previa de bromación.
- la formación de mezclas 1,6- y 1,7- en la disustitución no es problema, ya que el tercer grupo amino entra en la posición restante generando el mismo compuesto final independientemente del regioisómero de partida.
- se pueden introducir dos aminas diferentes.

En cuanto a la tetrasustitución directa, ésta es más difícil de conseguir, habiéndose logrado solamente la PDI tetrasustituida con muy bajo rendimiento cuando se usó pirazol como amina reactiva.



---

<sup>53</sup> a) Gutiérrez-Moreno, D.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 1830-1834.  
b) Gutierrez-Moreno, D.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2488-2499.



**Esquema 1.14:** Ejemplo de síntesis directa de aminoperilenoimidas sustituidas en bahía.

Del mismo modo, nuestro grupo de investigación exploró anteriormente tanto las hidroxilaciones, como las tiolaciones directas en bahía de la PDI.<sup>54</sup> Igual que en el caso de las aminaciones, las reacciones son mediadas por aniones fluoruro, pero a diferencia de ellas tienen algunas limitaciones<sup>55</sup>. En primer lugar, la hidroxilación o tiolación sólo se produce con éxito en el caso de alcoholes y tioles alquílicos, no produciéndose en ningún caso la reacción con fenoles o tiofenoles. Como segunda objeción, en este caso la reacción no es regioselectiva, obteniéndose siempre el producto como mezcla isomérica 1,6- y 1,7-disustituido.

### 1.3 Expansión del núcleo central de las PDI

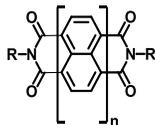
Las PDI pueden sufrir otro tipo de reacciones que originan la expansión del núcleo aromático central, produciendo así un cambio significativo en sus propiedades optoelectrónicas<sup>56</sup>. Esta expansión se puede producir de dos modos, longitudinal o transversalmente. La expansión longitudinal se produce cuando se adiciona una o varias nuevas unidades de naftaleno, dando lugar a lo que se conocen como rilenodiimidas:

<sup>54</sup> Zink-Lorre, N.; Font-Sanchis, E.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Dyes Pigm.* **2016**, *127*, 9-17.

<sup>55</sup> Zink-Lorre, N.; Font-Sanchis, E.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9375-9383.

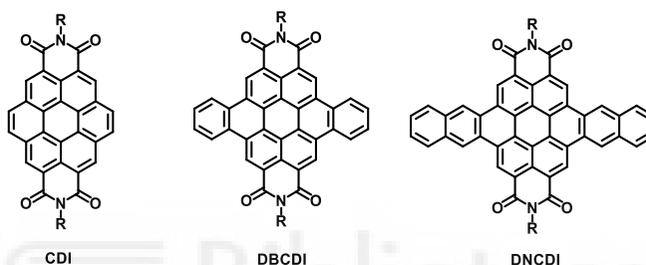
<sup>56</sup> Chen, L.; Li, C.; Müllen, K. *J. Mater. Chem. C.* **2014**, *2*, 1938-1956.

naftalenodiimidias (una unidad de naftaleno), perilenodiimidias (dos unidades de naftaleno), terrilenodiimidias (tres unidades de naftaleno), etc (**Figura 1.3**).<sup>57</sup>



**Figura 1.3:** Estructura general de las terrilenodiimidias: naftalenodiimida ( $n = 1$ ), perilenodiimida ( $n = 2$ ), terrilenodiimida ( $n = 3$ ), quaterrilenodiimida ( $n = 4$ ), etc.

Para producir una expansión transversal es necesario adicionar unidades extra de benceno, dando lugar a coronendiimidias (CDI), dibenzocoronendiimidias (DBCIDI) o dinaftocoronendiimidias (DNCDI) (**Figura 1.4**).<sup>58</sup>



**Figura 1.4:** Estructura de PDI extendidas transversalmente.

Como se ha comentado anteriormente, al modificar el núcleo aromático de las PDI se van a producir cambios en cuanto a sus propiedades ópticas. En la familia de las rilenodiimidias el aumento en el número de unidades de naftaleno origina un desplazamiento batocrómico y un aumento de la intensidad de la absorción;<sup>59</sup> por el contrario, al pasar de la PDI a la CDI se produce un desplazamiento hipsocrómico y una disminución de la intensidad de absorción.<sup>60</sup>

En 2019, nuestro grupo de investigación desarrolló una metodología que permite obtener CDI y sus derivados en un solo paso de reacción.<sup>61</sup> Hasta la fecha, para poder sintetizar estos derivados de PDI se empleaban tres pasos de reacción:

<sup>57</sup> a) Nolde, F.; Qu, J.; Kohl, C.; Pschirer, N. G.; Reuther, E.; Müllen, K. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3959-3967. b) Pschirer, N. G.; Kohl, C.; Nolde, F.; Qu, J.; Müllen, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1401-1404. c) Yuan, Z.; Lee, S. L.; Chen, L.; Li, C.; Mali, K. S.; De Feyter, S.; Müllen, K. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 11842-11846.

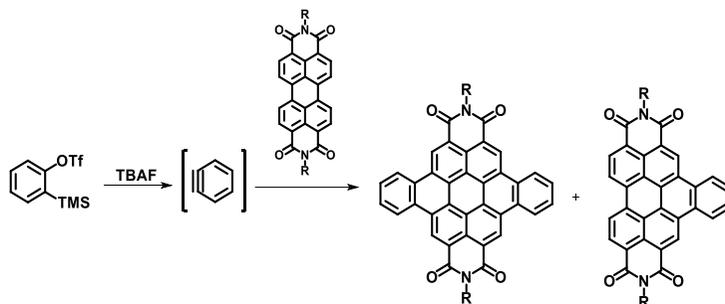
<sup>58</sup> a) Müller, S.; Müllen, K. *Chem. Commun.* **2005**, 4045-4046. b) Avlasevich, Y.; Müller, S.; Erk, P.; Müllen, K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6555-6561. c) Eversloh, C. L.; Li, C.; Müllne, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4148-4150. d) Zhen, Y.; Yue, W.; Li, Y.; Jiang, W.; Di Motta, S.; Di Donato, E.; Negri, F.; Ye, S.; Wang, Z. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6078-6080.

<sup>59</sup> Nagao, Y.; Iwano, T.; Hirano, M.; Arimitsu, K.; Kozawa, K. *Heterocycles* **2012**, *84*, 815-828.

<sup>60</sup> Rohr, U.; Schlichting, P.; Böhm, A.; Gross, M.; Meerholz, K.; Bräuchle, C.; Müllen, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1434-1437.

<sup>61</sup> Zink-Lorre, N.; Doncel-Giménez, A.; Font-Sanchis, E.; Calbo, J.; Sastre-Santos, Á.; Ortí, E.; Fernández-Lázaro, F. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2860-2871.

bromación, acoplamiento C-C y ciclación.<sup>62</sup> se usó la reacción de Diels-Alder para fusionar anillos aromáticos en las posiciones bahía de las PDI. El dienófilo utilizado en este proceso fue el bencino, realizando un estudio metodológico que empleaba diferentes fuentes de bencino y PDI sin funcionalizar para realizar las cicloadiciones y poder sintetizar distintas familias de NPDI y DBCDI, con rendimientos mayores del 60% en algunos casos (**Esquema 1.15**).



**Esquema 1.15:** Síntesis de DBCDI y NPDI.

## 1.4 Propiedades físicas de las PDI

Como se ha comentado al principio de esta introducción, las PDI fueron aplicadas inicialmente como pigmentos, sin embargo, conforme se ha ido conociendo más sobre su química, y por tanto sobre sus propiedades físicas, han ido adquiriendo notoriedad en un mayor número de campos de investigación. Modificando su núcleo central aromático con diferentes sustituyentes, las PDI pueden cambiar sus propiedades ópticas, redox o de ordenación supramolecular.

### 1.4.1 Propiedades ópticas: absorción y fluorescencia

Las propiedades ópticas de las PDI dependen de los sustituyentes que tengan sobre su esqueleto aromático. Los sustituyentes sobre las posiciones imida están desacoplados electrónicamente del núcleo aromático debido a la existencia de nodos sobre los átomos de nitrógeno en los orbitales HOMO y LUMO, por lo que no afectan a las propiedades ópticas.<sup>63</sup> Sin embargo, estos sustituyentes son muy importantes, ya que su adecuada elección mejora la solubilidad de las PDI y dificulta su apilamiento, factores que sí afectan directamente tanto a la absorción como a la fluorescencia. Los sustituyentes que aportan mayor solubilidad son los denominados “cola de golondrina”,<sup>64</sup> como la (hexilheptil)amina, o aminas aromáticas con grupos voluminosos en las posiciones 2,6 o 2,5, como la 2,6-diisopropilanilina.<sup>65</sup> En ausencia de sustituyentes sobre el anillo aromático, tanto los máximos de absorción como los rendimientos cuánticos de fluorescencia de todas las PDI solubles tienen los mismos valores. En estos casos, el perfil del espectro de absorción en disolución muestra tres

<sup>62</sup> a) Jiang, W.; Li, Y.; Yue, W.; Zhen, Y.; Qu, J.; Wang, Z. *Org. Lett.* **2010**, *12*(2), 228-231. b) Xu, L.; Liu, C.; Qin, Z.; Jiang, R.; Li, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 300-306. c) Zhang, X.; Zhang, J.; Tagn, S.; Lin, Y.; Zhao, M.; Yang, J.; Zhang, H. L.; Peng, Q.; Yu, G.; Li, Z. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7156-7159.

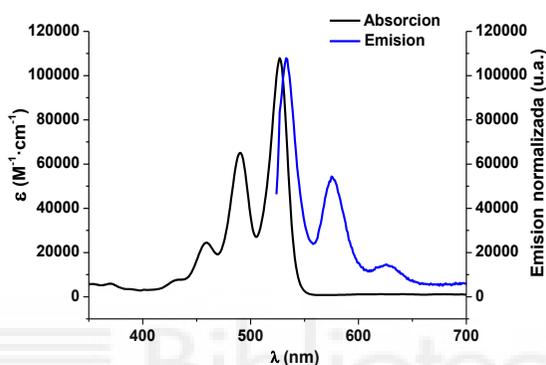
<sup>63</sup> Langhals, H.; Demming, S.; Huber, H. *Spectrochim. Acta* **1988**, *44A*, 1189-1193.

<sup>64</sup> Langhals, H.; Demming, S.; Potrawa, T. *J. Prakt. Chem.* **1991**, *333*, 733-748.

<sup>65</sup> Seybold, G.; Wagenblast, G. *Dyes Pigm.* **1989**, *11*, 303-317.

bandas de origen vibrónico con un máximo situado en torno a 526 nm (**Figura 1.5**), que son el resultado de la transición electrónica del estado fundamental de la PDI a su estado excitado ( $\pi-\pi^*$ ).<sup>66</sup> Este perfil de absorción puede cambiar dependiendo del disolvente que se utilice.

En cuanto a los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_f$ ), estas PDI sin sustituir poseen valores cercanos a la unidad, no viéndose afectados por la presencia de oxígeno, lo que permite usarlas como referencia.<sup>67</sup> Sin embargo, en el caso de sustituyentes en la posición imida que no estén en el mismo plano que el núcleo central aromático de la PDI, como pueden ser las anilinas, el  $\Phi_f$  decae hasta un 70%.<sup>68</sup>



**Figura 1.5:** Espectros de absorción y emisión de perilenodiimiditas sin sustituyentes en el anillo aromático.

Los cambios significativos, tanto en la absorción como en la fluorescencia, se producen al introducir grupos dadores de electrones en las posiciones bahía. Se puede observar un desplazamiento de hasta 50 nm en el caso de tener PDI sustituidas con cuatro grupos fenoles en comparación con una PDI sin sustituir ( $\lambda_{\text{abs máx}} = 526$  nm). En el caso de tener grupos amino, estos cambios se acentúan aún más, pudiendo producirse un desplazamiento batocrómico de hasta 160 nm en el caso de tener una PDI disustituida en bahía con grupos pirrolidinilo, apareciendo además una banda de transferencia electrónica en el espectro de ultravioleta, debido a la cesión de carga de los grupos dadores de electrones al núcleo aromático de la PDI.<sup>69</sup> Tanto la aparición de la banda de transferencia, como el desplazamiento batocrómico que presentan estas PDI, hacen que su color cambie del rojo al verde, por ejemplo en el caso de la PDI disustituida con piperidinas, o incluso al azul en el caso de tener una triple sustitución con grupos piperidinilo ( $\lambda_{\text{abs máx}} = 711$  nm) (**Figura 1.6**). En estos casos, debido a la transferencia electrónica, los  $\Phi_f$  decaen bruscamente en las PDI sustituidas con fenoles,

<sup>66</sup> Oltean, M.; Calborean, A.; Mile, G.; Vidrighin, M.; Iosin, M.; Leopold, L.; Maniu, D.; Leopold, N.; Chis, V. *Spectrochim. Acta A* **2012**, *97*, 703-710.

<sup>67</sup> Langhals, H.; Karolin, J.; Johansson, B. A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1988**, *84*, 2919-2922.

<sup>68</sup> Sandrai, M.; Hadel, L.; Sauer, R. R.; Husain, S.; Krogh-Jespersen, K.; Westbrook, J. D.; Bird, G. R. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7988-7996

<sup>69</sup> Zhao, C.; Zhang, Y.; Li, R.; Li, X.; Jiang, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2402-2410.

Llegando a estar totalmente anulada (*quenching*) en el caso de funcionalizar la PDI con aminas.<sup>70</sup>

Por otro lado, la funcionalización de las PDI en bahía con grupos aceptores de electrones no produce cambios significativos en sus propiedades ópticas, el perfil de absorción o en su  $\Phi_f$ , ya que en este caso no existe transferencia de carga al núcleo; por ejemplo, el perfil de absorción de las PDI funcionalizadas con bromo es idéntico al de la PDI sin sustituir.<sup>71</sup> Solamente en el caso de los nitroderivados se produce un leve desplazamiento hipsocrómico.<sup>72</sup>

La funcionalización en las posiciones orto no afecta a las propiedades ópticas de las PDI de manera tan acusada como la funcionalización en bahía. En este caso, los máximos de absorción se sitúan en torno a los 518 nm, produciéndose un desplazamiento hipsocrómico respecto a una PDI sin funcionalizar, observándose el mayor efecto cuando se funcionalizan estas posiciones con átomos de cloro. En cuanto a  $\Phi_f$ , éste se ve bruscamente afectado, llegando a producirse una desactivación (*quenching*) total de la fluorescencia en esta familia de PDI.<sup>73</sup>

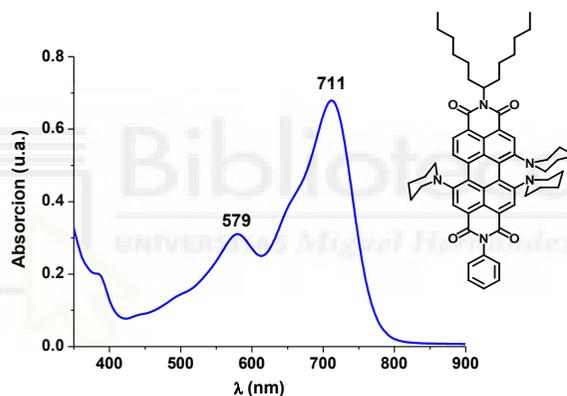


Figura 1.6: Espectro de absorción de una PDI trisustituida en bahía con piperidinas.

#### 1.4.2 Propiedades redox de las PDI

Las PDI son consideradas como moléculasceptoras de electrones, por lo tanto, esto las convierte en especies fáciles de reducir y difíciles de oxidar. La voltametría cíclica de una PDI sin sustituir muestra dos potenciales de reducción a -1,0 V y a -1,2 V y un potencial de oxidación a +1,2 V, todas ellas reversibles. Igual que ocurre con las propiedades ópticas, las propiedades redox de las PDI no varían en función del grupo situado en la posición imida.<sup>74</sup> Se pueden observar cambios en estos potenciales cuando se funcionaliza en las posiciones bahía (**Tabla 1.1**). La presencia de grupos que retiren carga, como halógenos o grupos ciano, hace que las PDI se puedan

<sup>70</sup> Zhao, Y.; Wasielewski, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7047-7050.

<sup>71</sup> Rajasingh, P.; Cohen, R.; Shirman, E.; Shimin, L. J. W.; Rybtchinski, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973-5979.

<sup>72</sup> Chen, K. Y.; Chow, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5959-5963.

<sup>73</sup> Battagliarin, G.; Zhao, Y. F.; Li, C.; Müllen, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3399-3401.

<sup>74</sup> Viehbeck, A.; Goldberg, M. J.; Kovac, C. A. *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137*, 1460-1466

reducir más fácilmente, haciendo disminuir el primer potencial de reducción, por el contrario, si existen grupos dadores de electrones se dificultará la reducción y se favorecerá la oxidación.<sup>75</sup> Para las PDI sustituidas en orto se observa la misma tendencia.<sup>73</sup>

PDI	E <sub>red 2</sub> (V)	E <sub>red 1</sub> (V)	E <sub>ox 1</sub> (V)	E <sub>ox 2</sub> (V)
Sin sustituir <sup>76</sup>	-1,21	-0,98	+0,21	-
<i>b</i> -4Cl-PDI <sup>76</sup>	-1,07	-0,87	-	-
1,7-diciano-PDI <sup>77</sup>	-0,92	-0,59	-	-
1,7-dipirrolidin- <i>N</i> -il-PDI <sup>77</sup>	-1.46	-1.28	+0,16	+0,23
2,5,8,11-tetracloro-PDI <sup>78</sup>	-1,06	-0,83	-	-
<i>b</i> -tetrafenoxi-PDI <sup>79</sup>	-1,25	-1,09	+0,8	-

Tabla 1.1: Propiedades redox de las PDI según su funcionalización.

### 1.4.3 Ordenamiento y solubilidad

Se ha podido determinar de forma exacta la estructura de las PDI mediante difracción de rayos X.<sup>80</sup> Esto permite conocer como son tridimensionalmente estas moléculas y su forma de comportarse en estado sólido y disolución. La principal interacción que sufren las PDI y el PDA es de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre sus núcleos de naftaleno. Como se ha comentado al principio de este epígrafe, el tipo de sustituyente en la posición imida influye en la solubilidad de las PDI modificando las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , de tal forma que en disolución no se produzcan agregados entre las moléculas presentes. Debido a que la unión de los dos anillos de naftaleno es mediante enlaces C-C, éstos pueden girar generando un ángulo de torsión ( $\theta$ ), lo que ocurre cuando se introducen sustituyentes en las posiciones bahía. En el caso de la *b*-PDI-Cl el ángulo de torsión es de 37°, y cuando ésta se funcionaliza con grupos fenol, por ejemplo, el ángulo cambia a 25°,<sup>81</sup> lo que hace que las interacciones  $\pi$ - $\pi$  sean apenas apreciables, disminuyendo así la agregación y aumentando la solubilidad de estas PDI.<sup>82</sup> En la **Tabla 1.2** se recogen algunos ángulos de torsión, determinados experimentalmente mediante rayos X, de estructuras cristalinas de PDI. En los derivados sin sustituir el ángulo de torsión es inexistente, pero dependiendo del número de sustituyentes este valor cambia su magnitud.

En disolución, las PDI pueden agregarse en función de su estructura y de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  que puedan desarrollar. Estos agregados supramoleculares pueden ser de

<sup>75</sup> Lukas, A. S.; Zaho, Y.; Miler, S. E.; Wasielewski, M. R. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1299-1306.

<sup>76</sup> Würthner, F. *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.

<sup>77</sup> Huang, C.; Barlow, S.; Marder, S. R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2386-2407.

<sup>78</sup> Battagliarin, G.; Zhao, Y.; Li, C.; Müllen, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3399-3401.

<sup>79</sup> Würthner, F.; Thalacker, C.; Diele, S.; Tschierske, C. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2245-2243.

<sup>80</sup> Gaser, F.; Hädicke, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1994-2011.

<sup>81</sup> a) Chen, Z.; Debije, M. G.; Debaerdemaeker, P.; Osswald, P.; Würthner, F. *ChemPhysChem.* **2004**, *5*, 137-140. b) Würthner, F.; Sautter, A.; Schilling, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3037-3044.

<sup>82</sup> Schneider, M.; Hagen, J.; Haarer, D.; Müllen, K. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 351-354.

- tipo J<sup>83</sup> (PDI deslizadas o rotadas unas sobre otras), lo que producirá un desplazamiento hipsocrómico en la absorción
- tipo H<sup>84</sup> (PDI agrupadas de forma paralela unas sobre otras), los cuales producirán un desplazamiento batocrómico

En ambos casos la fluorescencia se ve afectada, llegando incluso a anularse. Cuando se tiene una PDI sin funcionalizar en bahía se pueden formar los dos tipos de agregados, siendo más común el tipo H; sin embargo, cuando el grupo de la posición imida es una cadena ramificada se dan agregados tipo J. Como ya se ha comentado, las PDI sustituidas en bahía generan un ángulo de torsión en el núcleo de la PDI, por lo tanto, este tipo de moléculas en disolución tiende a formar agregados tipo J.

Sustituyentes	Ángulo experimental $\theta$ (°)
Sin sustituyentes	0
1,7-difenoxi-PDI	15
1,7-di(pentafluoro)fenoxi-PDI	18
1,7-dibromo-PDI	24
1,7-dipirrolidin-N-il-PDI	25
b-tetracloro-PDI	36
b-tetrafenoxi-PDI	27
1,7-diciano-PDI	5

Tabla 1.2: Ángulos de torsión experimentales de diferentes PDI.

<sup>83</sup> Kaiser, T. E.; Stepanenko, V.; Würthner, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6719-6732.

<sup>84</sup> Zhao, H. M.; Pfister, J.; Settels, V.; Renz, M.; Kaupp, M.; Dehm, V. C.; Würthner, F.; Fink, R. F.; Engels, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15660-15668.



## Capítulo 2

### **PDI sustituidas en las posiciones bahía con sales de imidazolio y su aplicación en terapia fotodinámica**





## 2. PDI sustituidas en las posiciones bahía con sales de imidazolio y su aplicación en terapia fotodinámica

### 2.1 ¿Qué es la terapia fotodinámica?

La terapia fotodinámica (PDT, del inglés *photodynamic therapy*) es una técnica clínicamente aprobada en diferentes países, que permite el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre otras enfermedades, mediante técnicas no invasivas, de tal forma que se minimicen los posibles efectos secundarios de un tratamiento convencional contra este tipo de enfermedades.<sup>85</sup>

Para producir este efecto terapéutico, la PDT se basa principalmente en tres elementos (**Figura 2.1**): luz de una determinada longitud de onda, una especie química que pueda pasar a un estado excitado por la acción de esa luz (fotosensibilizador o PS, del inglés *photosensitizer*), y por último oxígeno molecular que formará diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) por interacción con el PS. El proceso se basa en la acumulación selectiva/específica de PS en la zona tumoral junto con la acción de la luz, para producir ROS y oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$  que inducen la muerte celular (**Figura 2.1**)



**Figura 2.1:** Proceso general de la terapia fotodinámica.

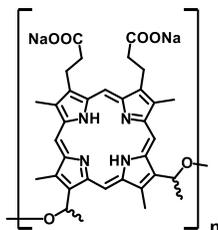
El uso terapéutico de la luz junto con especies químicas se remonta al siglo XIII a.C., cuando en Egipto y en la India se usaban plantas que contenían psoralenos para activarlos mediante luz solar y tratar enfermedades como el vitíligo.<sup>86</sup> La PDT tal como la conocemos hoy en día comenzó con los estudios realizados por Lipson y Schwartz en la Clínica Mayo en 1960. Usando como marcador tumoral hematoporfirina (HD) durante unas de sus cirugías, se dieron cuenta de que esta molécula era capaz de producir muerte celular, con lo que comenzaron sus investigaciones en torno a este suceso. Tras el tratamiento de la HD con ácido acético y sulfúrico se obtiene una mezcla denominada “derivados de hematoporfirinas” (HPD) compuesta por monómeros y oligómeros de porfirinas que se usaron como detectores de tumores.<sup>87</sup> Esta mezcla de HPD era activa biológicamente cuando se irradiaba con luz roja produciendo muerte celular; sin embargo, debido a la gran variedad de especies presentes, se decidió aislar y analizar la actividad biológica de cada molécula por separado, obteniendo como

<sup>85</sup> a) Benov, L. *Med. Princ. Pract.* **2015**, *24*, 14-28; b) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90*, 889-905.

<sup>86</sup> Fitzpatrick, T. B.; Pathak, M. A. *J. Invest. Dermatol.* **1959**, *32*, 229-231.

<sup>87</sup> a) Lipson, R. L.; Baldes, E. J.; Olsen, A. M. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1961**, *26*, 1-11; b) Moan, J. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *43*, 681-690.

resultado la porfirina que más se ha usado como fotosensibilizador en la historia de la PDT, Photofrin® (**Figura 2.2**).<sup>88</sup> Este fármaco fue aprobado por primera vez en 1993 en Canadá para el tratamiento de cáncer de vejiga,<sup>89</sup> y desde entonces ha sido aprobado para el tratamiento de otros tipos de cáncer como el de pulmón o el gástrico, e incluso para tratar otras enfermedades como puede ser el esófago de Barret.<sup>85,90</sup> A pesar de los buenos resultados que tiene Photofrin®, se detectaron efectos dermatológicos adversos, con lo que se empezó a desarrollar nuevos PS basando en porfirinas como pueden ser Photogem® y Photosan-3®. Evidentemente, paralelamente a este tipo de PS se han ido desarrollando otros sin la estructura tetrapirrólica de las porfirinas.



**Figura 2.2:** Estructura de Photofrin®,  $n = 1-9$ .

Actualmente la PDT no solo se centra en el tratamiento de tumores, si no que abarca otras áreas. Dado que los PS que se usan son fluorescentes, se aprovechan para emplearlos en fotodiagnosís, lo que representa una ventaja adicional, ya que mediante la imagen fluorescente de la zona tumoral se pueden definir mejor los límites del tumor, evitando así la eliminación de tejido sano en cirugías de cánceres en zonas complicadas, como por ejemplo, el cerebro.<sup>91</sup> Otras áreas que emplean la PDT son, por ejemplo, la dermatología para el tratamiento del acné<sup>92</sup> o la odontología para tratar periodontitis.<sup>93</sup>

## 2.2 Componentes de la terapia fotodinámica

Tal como se ha comentado en el apartado anterior, la PDT se basa en tres componentes: luz, un fotosensibilizador y oxígeno. Ninguno de estos tres elementos por separado es capaz de producir un beneficio terapéutico,<sup>94</sup> sino que es la combinación de los tres lo que produce ROS, siendo esto una ventaja, ya que la zona afectada queda restringida al lugar donde esté acumulado el PS y donde, además, se irradie con luz (**Figura 2.3**).<sup>95</sup> A continuación, se detallan los tres elementos citados.

<sup>88</sup> Dougherty, T. J. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, *14*, 219-221.

<sup>89</sup> Jian, Z.; Shao, J.; Yang, T.; Wang, J.; Jia, L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 98-104.

<sup>90</sup> a) Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915; b) Ormond, A. B.; Freeman, H. S. *Materials* **2013**, *6*, 817-840.

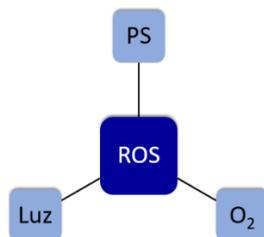
<sup>91</sup> a) Celli, J.; Spring, B.; Rizvi, I.; Evans, C.; Samkoe, K.; Verma, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795-2838; b) Yuan, A.; Wu, J.; Tang, X.; Zhao, L. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 6-28.

<sup>92</sup> Choudhary, S.; Nouri, K.; Elsaie, M. L. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *11*, 971-980.

<sup>93</sup> Gursoy, H.; OzcaKir-Tomruk, C.; Tanalp, J.; Yilmaz, S. *Clin. Oral Invest.* **2013**, *17*, 1113-1125.

<sup>94</sup> Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O. *et al. CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281.

<sup>95</sup> O'Conner, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053-1074



**Figura 2.3:** Componentes de la PDT.

### 2.2.1 Fotosensibilizadores

Uno de los elementos clave en PDT es el fotosensibilizador por lo que hay una gran cantidad de trabajo desarrollado sobre estos materiales. Además, es el único elemento que podemos modificar a nuestro antojo mediante síntesis química, proporcionándole unas propiedades óptimas para poder ser aplicado en PDT. Las principales características de un buen fotosensibilizador son:<sup>96</sup>

- ✓ debe ser una molécula pura, con bajo coste de fabricación o síntesis, y estable en condiciones aeróbicas.
- ✓ su(s) máximo(s) de absorción debe(n) estar comprendido(s) entre los 600 y 800 nm, longitudes de onda que están dentro de la conocida como ventana terapéutica. Este rango es el idóneo para poder formar ROS, además estas longitudes de onda son las que tienen mayor capacidad de penetración en los tejidos.
- ✓ debe carecer de actividad biológica en ausencia de fotoexcitación.
- ✓ debe ser soluble en el medio biológico.
- ✓ debe tener un coeficiente de extinción molar alto, para evitar la necesidad de una que haya que tener una concentración alta de PS en el organismo para generar ROS.
- ✓ debe ser fácilmente metabolizable y no generar especies que sean tóxicas para el organismo.

Principalmente los PS se pueden clasificar en dos grupos, los porfirinoides y los no porfirinoides.<sup>97</sup>

#### 2.2.1.1 Fotosensibilizadores porfirinoides

Esta es la familia de PS más empleada, ya que el sistema  $\pi$ -conjugado de su estructura basada en porfirinas o derivados de estas, le confiere propiedades fotoquímicas muy interesantes. Este tipo de PS se suele dividir, a su vez, en dos grupos: porfirinoides de primera y segunda generación:

Porfirinoides de primera generación:

<sup>96</sup> Allison, R. R.; Sibata, C. H. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, 7, 61-75.

<sup>97</sup> Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, 473, 347-364.

En este grupo se engloba, principalmente, a los primeros fotosensibilizadores usados en PDT, donde se encuentra por excelencia Photofrin® y sus derivados. Evidentemente, al ser el primer PS descubierto, no tiene las propiedades óptimas y es poco selectivo para diferentes tipos de cáncer.

Porfirinoides de segunda generación:

La investigación en torno a los PS se ha ido desarrollando teniendo en cuenta los requerimientos que deben cumplir (*vide supra*). Uno de los primeros PS en ser desarrollado en este grupo fue el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA o  $\delta$ -ALA, Levulan®). Como tal, 5-ALA no es un PS, sin embargo es un precursor biosintético de la protoporfirina IX.<sup>98</sup> A partir de éste se han desarrollado derivados con mejor actividad que 5-ALA, como por ejemplo Hexvix® o Benzvix®.

Evidentemente, en este grupo también se incluyen PS que son propiamente porfirinas, presentando estas moléculas máximos de absorbancia en torno a los 630 nm. Un inconveniente de usar porfirinas como PS es su bajo coeficiente de extinción molar. Un ejemplo de PS basado en porfirinas es la *m*-tetra(hidroxifenil)porfirina (*m*-THPP). Las clorinas, otro importante grupo de PS, son derivados de porfirina que presentan un anillo de pirrol parcialmente reducido. La ventaja que tienen las clorinas frente a una porfirina convencional es que absorben a longitudes de onda más altas, y su coeficiente de extinción molar es mayor.<sup>99</sup> Un ejemplo es la *m*-tetra(3'-hidroxifenil)clorina, conocida como Temoporfin® o Foscan®.<sup>100</sup> Existen también derivados de clorofila que actúan como fotosensibilizadores, como la clorina E6, cuya sal sódica es un potente PS conocido como fotoditazina.<sup>101</sup> Las bacterioclorinas son otro tipo de porfirinoides que presentan dos anillos pirrólicos reducidos y que, aparte de acción anticancerígena, también tienen acción antimicrobiana; algunos ejemplos son las bacterioclorinas BC37, BC38 y BC39.<sup>102</sup> En este grupo también hay derivados de benzoporfirina, como la Verteporfina<sup>103</sup>.

Otro ejemplo de PS de segunda generación son las texafirinas, análogas de las porfirinas, como Lutrin® o Antrin®. Ocupan un lugar importante en este grupo de PS de segunda generación las ftalocianinas, análogos sintéticos de las porfirinas, formadas por cuatro anillos de isoindol unidos por puentes nitrogenados, con capacidad de coordinar distintos metales. Este tipo de PS posee una conjugación  $\pi$  mayor que las porfirinas, presentando máximos de absorción en torno a 670 nm. Existen ftalocianinas aprobadas como fármacos para PDT, un ejemplo es Photosense®,<sup>104</sup> una ftalocianina

---

<sup>98</sup> De Rosa, F. S.; Bentley, M. V. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1447-1455.

<sup>99</sup> Castano, A. P.; Demidiva, T. N.; Hamblin, M. R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279-293.

<sup>100</sup> Wagner, A.; Denzer, U. W.; Neureiter, D.; Kiesslich, T.; Puespoechk, A.; Rauws, E. A.; Emmanuel, K.; Degenhardt, N.; Frick, U.; Beuers, U. et al. *Hepatology*, **2015**, *62*, 1456-1465.

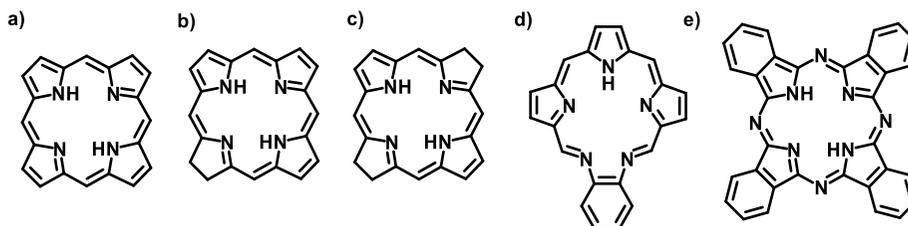
<sup>101</sup> Romanko, Y. S.; Tysb, A. F.; Kaplan, M. A.; Popuchiev, V. V. *Exp. Biol. Med.* **2004**, *138*, 584-589.

<sup>102</sup> Huang, Y. Y.; Mroz, P.; Zhiyentayev, T.; Sharma, S. K.; Balasubramanian, T.; Ruzie, C.; Krayner, M.; Fan, D.; Bordas, K. E.; Yang, E. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4018-4027.

<sup>103</sup> Chan, W. M.; Lim, T. H.; Pece, A.; Silva, R.; Yoshimura, N. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2010**, *248*, 613-626.

<sup>104</sup> Master, A.; Livingston, M.; Sen Gupta, A. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 88-102.

de aluminio, y algunas otras como *Photocyanine*, que se trata de una ftalocianina de zinc funcionalizada con una ftalimida que está en fase II de ensayos clínicos.<sup>105</sup>



**Figura 2.4:** Estructura básica de familias porfirinoides empleadas como PS de segunda generación: a) porfiringa, b) clorina, c) bacterioclorina, d) texafiringa, e) ftalocianina.

### 2.2.1.2 Fotosensibilizadores no porfirinoides

En este grupo, se engloban los PS que no tienen la unidad de pirrol en su estructura. Podemos encontrar moléculas con estructura de fenotiazina, las cuales alcanzan máximos de absorción de hasta 660 nm; el azul de metileno<sup>106</sup> o la toluidina azul<sup>107</sup> son ejemplos de este tipo de estructuras, sin embargo, no han mostrado gran potencial anticancerígeno. Los xantenos son otro tipo de PS incluidos en este grupo, el más destacado y sobre el que hay más estudios es el rosa de Bengala, al que se le atribuyen tanto propiedades antimicrobianas como anticancerígenas.<sup>108</sup> Las cianinas<sup>109</sup> y los BODIPYS<sup>110</sup> son otro tipo de moléculas pertenecientes a este grupo, ambas familias tienen un rango de absorción entre 500 y 700 nm. Los compuestos de coordinación formados por metales de transición ocupan un lugar importante en este tipo de PS, donde los complejos de Ru (II)<sup>111</sup> y los complejos ciclotmetalados de Ir (III)<sup>112</sup> han sido los más estudiados en PDT. En la mayoría de los casos, la introducción de metales pesados en la estructura de estas moléculas provoca un aumento considerable del rendimiento cuántico triplete, incrementando así la formación de ROS y mejorando la eficacia en tratamiento con PDT. Las PDI, que también se incluyen en este grupo de PS, se tratarán con más detalle en los siguientes apartados.

<sup>105</sup> Huang, J.; Naisheng, C.; Jiandong, H.; Ersheng, L.; Jinping, X.; Suling, Y.; Ziqiang, H.; Jiancheng, S. *Sci. China Ser. B, Chem.* **2001**, *44*, 113-122.

<sup>106</sup> Wainwright, M.; Crossley, K. B. *J. Chemother.* **2002**, *14*, 431-443.

<sup>107</sup> Tseng, S. P.; Hung, W. C.; Chen, H. J.; Lin, Y. T.; Jiang, H. S.; Chiu, H. C.; Hsueh, P. R.; Teng, L. J.; Tsai, J. C. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2017**, *50*, 46-54.

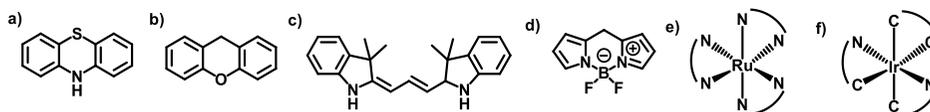
<sup>108</sup> a) Costa, A. C.; Rasteiro, V. M.; Pereira, C. A.; Rossoni, R. D.; Junqueira, J. C.; Jorge, A. O. *Mycoses* **2012**, *55* 56-63; b) Panzarini, E.; Inguscio, V.; Fimia, G. M.; Dini, L. *PLoS One* **2014**, *9*, e105778.

<sup>109</sup> Usama, S. M.; Thavornpradit, S.; Burgess, K. *Appl. Bio. Mater.* **2018**, *4*, 1195-1205.

<sup>110</sup> Kamkaew, A.; Lim, S.; Lee, H. B.; Kiew, L. K.; Chung, L. Y.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77-88.

<sup>111</sup> Gill, M. R.; Thomas, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3179-3192.

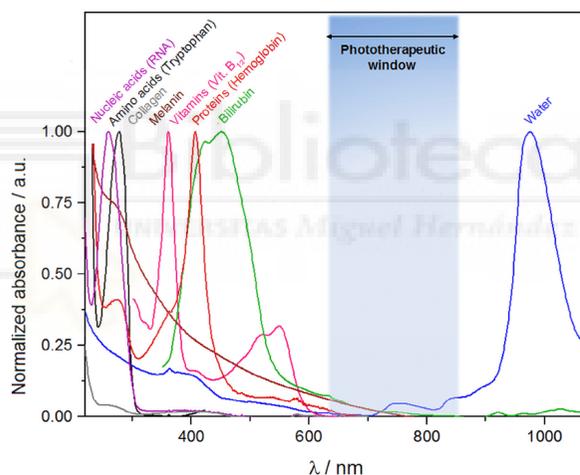
<sup>112</sup> Li, Y.; Tan, C. P.; Zhang, W.; He, L.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *Biomaterials* **2015**, *39*, 95-104.



**Figura 2.5:** Estructura básica de las familias más habituales de PS no porfirinoides: a) fenotiazina, b) xanteno, c) cianina, d) BODIPY, e) complejo de Ru (II), f) complejo de Ir (III).

### 2.2.2 Luz

Otro de los elementos fundamentales en PDT es la luz. La función principal de la luz es transferir la energía necesaria al PS para que alcance su estado excitado singlete, por lo tanto, la longitud de onda de excitación vendrá dada por el máximo de absorbancia del PS. Sin embargo, no todas las longitudes de onda tienen la misma eficacia terapéutica, por ejemplo la luz azul tiene menos capacidad de penetración en los tejidos que la luz roja, por lo tanto el intervalo de longitudes de onda recomendables para usar en PDT está comprendido entre 600 y 800 nm, región que típicamente se denomina “ventana terapéutica” (**Figura 2.6**), ya que longitudes de onda de hasta 800 nm pueden generar  $^1\text{O}_2$ , mientras que longitudes de onda mayores no pueden producir la reacción fotodinámica.<sup>113</sup>



**Figura 2.6:** Longitudes de onda de absorción de los diferentes componentes de los tejidos y de la ventana terapéutica.<sup>114</sup>

La interacción de la luz con los tejidos y la capacidad de penetración de ésta a través de ellos dependen de las características del propio PS (concentración, coeficiente de extinción molar, rendimiento cuántico de fluorescencia) y también de las características intrínsecas de la luz: dispersión, absorción, reflexión y refracción,<sup>115</sup> siendo la dispersión la que más importancia tiene, ya que esta característica es la responsable de la pérdida de direccionalidad e intensidad del haz de luz. Por lo tanto, un factor a tener en cuenta son los propios componentes químicos de los tejidos que

<sup>113</sup>Juzeniene, A.; Nielsen, K. P.; Moan, J. J. *Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2006**, *25*, 7-28.

<sup>114</sup>Dabrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyr, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyziot, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67-101.

<sup>115</sup>Mang, T. S. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 43-48

tengan capacidad de absorber luz. De esta forma, a longitudes de onda menores de 1000 nm, absorben moléculas como la hemoglobina o la melanina, y a longitudes de onda mayores de 1000 nm el principal componente con capacidad para absorber luz es el agua, pudiendo absorber también en esta región el colágeno, la elastina o la grasa. Por lo tanto, como se expuso anteriormente, la región de la ventana terapéutica es la ideal para que este tipo de moléculas no intervenga con la absorción de la luz a través de los tejidos; sin embargo, es difícil definir una única ventana terapéutica,<sup>116</sup> logrando efectos terapéuticos mediante la PDT en rangos que van desde el UV-Vis al infrarrojo cercano para el tratamiento de tumores superficiales o más profundos.

Existen diversas fuentes de luz que se pueden utilizar en PDT, ya sea usando luz coherente o incoherente,<sup>117</sup> siendo la luz coherente aquella en la que todos los fotones tienen la misma frecuencia y sus ondas están en fase entre sí; por el lado contrario, la luz incoherente es aquella en la que los fotones no tienen la misma frecuencia y las ondas no tienen la misma fase.<sup>118</sup> La principal ventaja de usar una fuente de luz coherente frente a una no coherente es la monocromaticidad de la luz coherente, ya que de esta forma se puede ajustar mejor a una determinada longitud de onda específica para excitar al PS. Las fuentes de luz no coherentes destacan principalmente por su bajo coste y su gran rango de iluminación, que en el caso de tratar áreas corporales grandes es más efectiva. En cuanto a la potencia de irradiación, los valores usados para PDT oscilan entre 100-300 mW/cm<sup>2</sup>.<sup>119</sup> Las principales fuentes de irradiación que se utilizan en PDT son láseres (luz coherente), LED (luz no coherente) y lámparas (luz no coherente).

Los láseres han sido usados para tratar distintos tipos de cáncer bien localizados, como pueden ser los de páncreas,<sup>120</sup> próstata,<sup>121</sup> o cerebro.<sup>122</sup> Su principal inconveniente es la poca selectividad de longitud de onda que ofrecen; sin embargo, ofrecen una gran potencia y uniformidad en la irradiación. La eficacia de los LED como fuente de luz en PDT se demostró en la mitad de la década de los 90 por el trabajo realizado por Schmidt y colaboradores, donde trataron tumores cerebrales en perros con porfirinas.<sup>123</sup> Sin embargo, hoy en día el uso de los LED ha decaído, ya que tienen menos potencia que los láseres y debido a su amplio espectro de longitudes de onda, que requiere emplear mayor potencia para tener la misma eficacia. Aun así, actualmente

---

<sup>116</sup> a) Allison, R. R. *Future Oncol.* **2014**, *10*, 123-142. b) Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8934-8948. c) Starkey, J. R.; Rebane, A. K.; Drobizhev, M. A.; Meng, F.; Gong, A.; Elliott, A.; McInerney, K.; Spangler, C. W. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6564-6573.

<sup>117</sup> Katarina, S.; Bendsoe, N.; Axelsson, J.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, S. *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 041502.

<sup>118</sup> Frank, T.; Buchnev, O.; Cookson, T.; Kaczmarek, M.; Lagoudakis, P.; Fedotov, V. A. *Nano Lett.* **2019**, *10*, 6869-6875.

<sup>119</sup> Kim, M. M.; Darafsheh, A. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 280-294.

<sup>120</sup> Bown, S. G. *Photonics Laser Med.* **2016**, *5*, 91-100.

<sup>121</sup> Wang, L.; Yang, H.; Li, B. *Prostate Int.* **2019**, *7*, 83-90.

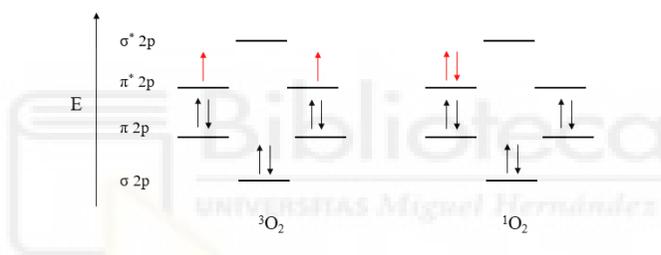
<sup>122</sup> Quirk, B. J.; Brandal, G.; Donlon, S.; Vera, J. C.; Mang, T. S.; Foy, A. B.; Lew, S. M.; Girotti, A. W.; Jogonal, S.; La Violette, P. S.; Connelly, J. M.; Whelan, H. T. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 530-544.

<sup>123</sup> Schmidt, M. H.; Bajic, D. M.; Reichert, K. W.; Martin, T. S.; Meyer, G. A.; Whelan, H. T. *Neurosurgery* **1996**, *38*, 552-557.

se usan este tipo de fuentes de luz para tratar, por ejemplo, el cáncer de mama.<sup>124</sup> Con todos los datos anteriormente expuestos, escoger una fuente de luz u otra para el tratamiento con PDT depende de varios factores, como coste de fabricación, potencia, localización del tejido tumoral y, lo más importante, activación eficiente del PS.

### 2.2.3 Oxígeno

El oxígeno molecular en su estado fundamental posee un estado de espín triplete ( $^3\text{O}_2$ ), donde dos electrones desapareados ocupan un orbital  $\pi$ -antienlazante ( $\pi^*$ ) con spines paralelos (**Figura 2.7**). El primer estado excitado del oxígeno molecular es el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), en el cual los electrones que ocupaban los dos orbitales  $\pi^*$  de forma desapareada en el estado triplete, ahora se encuentran apareados en el mismo orbital.<sup>125</sup> Este estado singlete está directamente relacionado con mecanismos de señalización y muerte celular<sup>126</sup> y es, por tanto, un elemento principal en PDT. La transición del estado  $^3\text{O}_2$  al  $^1\text{O}_2$  está cuánticamente prohibida, por lo que el método más convencional utilizado para generar  $^1\text{O}_2$  es la fotoestimulación de PS para que este alcance su estado triplete y poder transferir esta energía absorbida al oxígeno molecular y formar  $^1\text{O}_2$ .



**Figura 2.7:** Configuraciones electrónicas del oxígeno en su estado triplete ( $^3\text{O}_2$ ) y singlete ( $^1\text{O}_2$ ).

Una vez formado el  $^1\text{O}_2$ , éste puede difundir a través del citoplasma y membranas biológicas, teniendo un tiempo de vida media ( $\tau$ ) de  $3 \cdot 10^{-6}$  segundos en agua.<sup>127</sup> En el citoplasma este tiempo se reduce, ya que este puede reaccionar con moléculas presentes, reduciendo su tiempo de vida a  $1 \cdot 10^{-7}$  s.<sup>128</sup> Otro dato a tener en cuenta es la constante de difusión (D) del  $^1\text{O}_2$  en las células, siendo ésta de  $1,4 \cdot 10^{-5}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,<sup>129</sup> teniendo un radio de acción efectivo de 30 nm.

Debido al corto tiempo de vida media y a la alta reactividad del  $^1\text{O}_2$  y otras ROS que puedan formarse, la toxicidad celular producida por estas especies se limitará

<sup>124</sup> Kamanli, A. F.; Yildiz, M. Z.; Özyol, E.; Ozkan, A. D.; Kucukkara, E. S.; Eskiler, G. G. *Lasers Med. Sci.* **2021**, 36, 563-569.

<sup>125</sup> Paterson, M. J.; Christiansen, O.; Jensen, F.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 1136-1160.

<sup>126</sup> Bapat, P.; Singh, G.; Nobile, C. J. *Microorganisms* **2021**, 9, 500.

<sup>127</sup> Juzeniene, A.; Nielsen, K. P.; Moan J. *Environ. Pathol. Toxicol.* **2006**, 25, 7-28.

<sup>128</sup> Niedre, M.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 382-391.

<sup>129</sup> Moan, J.; Boye, E. *Photobiochem. Photobiophys.* **1982**, 2, 301-307.

solo a las áreas irradiadas, reduciendo de esta forma los efectos secundarios, al contrario que otras terapias antitumorales convencionales.<sup>130</sup>

### 2.3 ¿Cómo funciona la Terapia Fotodinámica?

El estado fundamental del PS es singlete ( $S_0$ ). Tras la fotoexcitación, dependiendo de la energía absorbida, puede pasar a diferentes estados excitados, todos ellos de multiplicidad singlete,  $S_x^*$  ( $x = 1, 2, 3, \dots$ ). Una vez en el estado excitado, el PS tiene dos vías para regresar directamente al estado fundamental: la primera opción es mediante un proceso no radiativo, en el que el exceso de energía se disipa en forma de calor, y la segunda es mediante emisión de luz, la fluorescencia. Una alternativa para llegar al estado fundamental de forma indirecta es pasar previamente por un estado triplete, al que se llega mediante un proceso denominado cruce intersistémico (ISC, del inglés *intersystem crossing*), seguido de emisión de luz, fosforescencia, para llegar al estado  $S_0$ . Mientras se encuentra en el estado triplete, el PS puede inducir cambios químicos en moléculas que tenga a su alrededor mediante reacciones fotoquímicas de Tipo-I o Tipo-II, en las cuales se producen las especies reactivas de oxígeno.

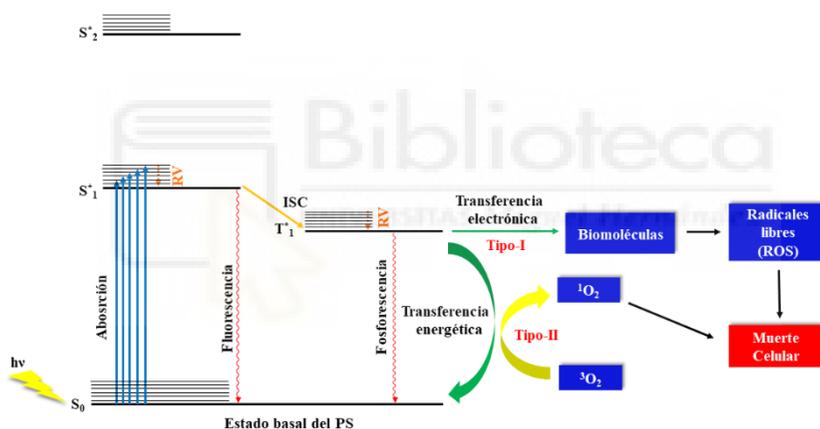


Figura 2.8: Mecanismo de acción en PDT.

Mediante el mecanismo Tipo-I se produce una transferencia electrónica desde el estado triplete del PS al oxígeno molecular, generando de esta forma radicales de oxígeno, como por ejemplo el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) y el radical hidroperóxilo ( $HOO^{\cdot}$ ). Estas especies no presentan mucha reactividad en sistemas

<sup>130</sup> a) Li, X.; Lee, S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1174-1188. b) Mitton, D.; Ackroyd, R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2008**, *5*, 103-111. c) Mari, C.; Pierroz, V.; Ferrari, S.; Gasser, G. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2660-2686.

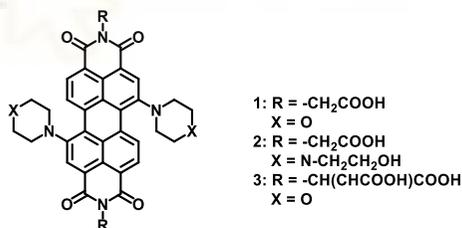
biológicos, sin embargo pueden reaccionar entre ellas formando peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual es realmente citotóxico.<sup>131</sup>

En el mecanismo Tipo-II se produce una transferencia de energía del PS hacia el oxígeno molecular, formándose de esta forma  $^1\text{O}_2$ , que es altamente reactivo y ataca a lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, produciendo muerte celular, bien por necrosis o por apoptosis<sup>132</sup> (**Figura 2.8**). Estos dos mecanismos ocurren de forma paralela, siendo la ratio entre ambos dependiente de varios factores, como el tipo de PS utilizado o la concentración de oxígeno, aunque para la mayoría de los PS el mecanismo Tipo-II es el dominante.

## 2.4 Antecedentes. Aplicación de las PDI en Terapia Fotodinámica

Tradicionalmente, las PDI han sido utilizadas principalmente en el campo de la optoelectrónica, debido a su gran fluorescencia y a sus estabilidades térmica y fotoquímica en disolventes orgánicos,<sup>133</sup> sin embargo actualmente se están aplicando las PDI con fines biológicos, siendo el mayor hándicap conseguir sintetizar PDI solubles en medio acuoso.

Existen descritas en la literatura varias PDI que se han aplicado como fotosensibilizadores en PDT. Uno de los primeros ejemplos se debe al profesor Akkaya y colaboradores,<sup>134</sup> que sintetizaron tres PDI funcionalizadas en las posiciones imida con aminoácidos (glicina y ácido L-aspártico) y en las posiciones bahía con morfolina o *N*-(2-hidroxietil)piperazina (**Figura 2.9**). La presencia de aminoácidos en la PDI hace que la penetración a través de la membrana celular se produzca de una forma más efectiva, y tanto la morfolina, como la *N*-(2-hidroxietil)piperazina y los aminoácidos de las posiciones imida, hacen que estas PDI sean solubles en medio acuoso.



**Figura 2.9:** Estructura de las PDI sintetizadas por Akkaya y colaboradores.

<sup>131</sup> a) Montaseri, H.; Kruger, C. A.; Abrahamse, H. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 296. b) Cárdenas, G.; Nogueira, J. J. *Molecules* **2020**, *25*, 5927. c) Karges, J.; Basu, U.; Blacque, O.; Chao, H.; Gasser, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1434-14340.

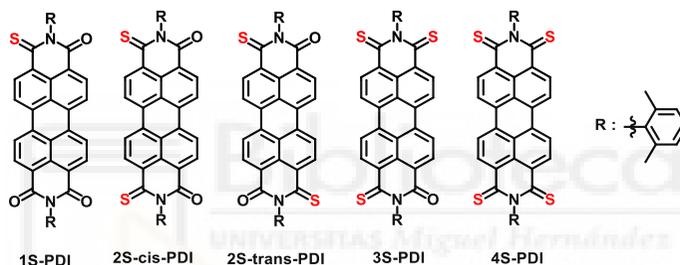
<sup>132</sup> a) Sun, J.; Kormakov, S.; Liu, Y.; Huang, Y.; Wu, D.; Yang, Z. *Molecules* **2018**, *23*, 1704. b) Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.; Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A. H.; Vignoni, M.; Yoshimura, T. M. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (4), 912-919.

<sup>133</sup> a) Matussek, M.; Filapek, M.; Gancarz, P.; Krompiec, S.; Malecki, J. G.; Kotowicz, S.; Siwy, M.; Mackoski, S.; Chrobok, A.; Schab-Balcezark, E.; Slodek, A. *Dyes. Pigm.* **2018**, *159*, 590-599. b) Giri, D.; Raut, S. K.; Patra, S. K. *Dyes. Pigm.* **2020**, *174*, 10832. c) Tilley, A. J.; Guo, C.; Miltenburg, M. B.; Schon, T. B.; Yan, H.; Li, Y.; Seferos, D. S. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 3321-3329.

<sup>134</sup> Yukruk, F.; Dogan, A. L.; Canpinar, H.; Guc, D.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2885-2887.

Para evaluar la capacidad que tenían estas PDI como fotosensibilizadores, se las sometió a ensayos para cuantificar la cantidad de oxígeno singlete que eran capaces de producir. Los resultados se compararon frente a un PS convencional, la hematoporfirina IX, que tiene un rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de 0,65 en metanol. Se obtuvieron valores de 0,04, 0,22 y 1,2 para las PDI-1, -2 y -3 respectivamente. La citotoxicidad de estas PDI se evaluó usando como línea celular la eritroleucemia. Después de la irradiación de las células a una longitud de onda mayor de 600 nm, con las PDI a diferentes concentraciones, se determinó que la más citotóxica fue la PDI-3, la que había presentado mayor rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete.

Las PDI ofrecen una gran versatilidad química, ya que pueden incorporar a su estructura tanto elementos que la hagan soluble en medio acuoso, como también estructuras que permitan reconocimiento celular. Este es el caso de las PDI sintetizadas por los grupos de los profesores Ho y Chou,<sup>135</sup> que presentan grupos dimetilfenilo en las posiciones tioimida (**Figura 2.10**); estos grupo tioimida se habían obtenido por reacción de tiónación con el reactivo de Lawesson.



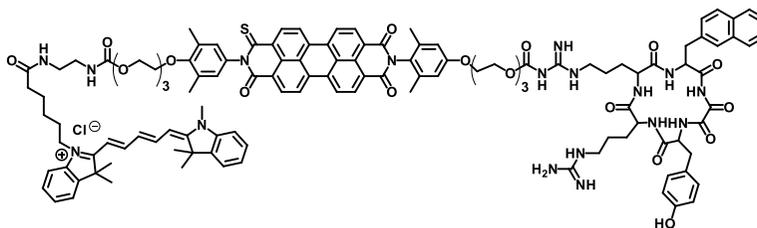
**Figura 2.10:** Estructura de las PDI tionadas.

Tras calcular la energía necesaria para poblar el estado triplete de todas las nS-PDI, se encontró que la PDI con la energía óptima para poblar este estado y conseguir producir más oxígeno singlete era la 1S-PDI, por lo que fue esta PDI a la que se incorporaron las modificaciones necesarias para que fuese soluble en agua y biorreconocible. De esta forma, en una de las posiciones imida se le incorporó el péptido FC<sub>131</sub> (ciclo-[2-Nal-Gly-d-Try-Arg-Arg]), el cual permite el reconocimiento de células cancerígenas.<sup>136</sup> La posición imida restante se funcionalizó con cianina5, un fluoróforo biocompatible que permitía la visualización de la PDI. La necesidad de la incorporación de un fluoróforo reside en el quencheo de la fluorescencia del núcleo de PDI debido a la reacción de tiónación. De esta forma se sintetizó la FC<sub>131</sub>-1SPDI-Cy5. Dado que en ambas posiciones imida tiene cadenas pegiladas a modo de espaciador, esta PDI consigue autoensamblarse creando nanopartículas solubles en agua (**Figura 2.11**). El estudio de viabilidad celular *in vitro* se llevó a cabo utilizando una línea celular de cáncer de pulmón. Se concluyó que la mayor muerte celular se producía tras un

<sup>135</sup> Yao-Lin, L.; Yi-Te, C.; Bo-Kang, S.; Chi-Chi, W.; Chih-Hsing, W.; Kai-Hsin, C.; Ja-an, A.; Pi-Tai, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 17249-17260.

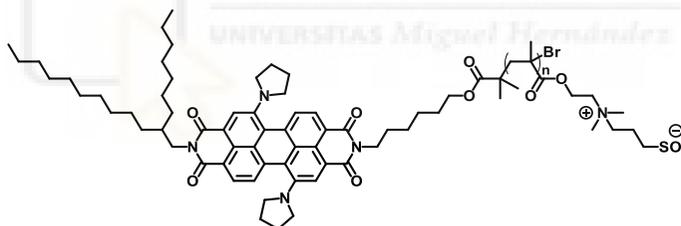
<sup>136</sup> Thiele, S.; Mungalpara, J.; Steen, A.; Rosenkilde, M. M.; Vabeno, J. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 5313-5329.

tiempo de incubación de 24 horas con una concentración 8  $\mu\text{M}$  de FC<sub>131</sub>-1SPDI-Cy5 con un tiempo de irradiación de ocho minutos con una longitud de onda de 590 nm usando como fuente un LED de 200 mW/cm<sup>2</sup> de potencia. Finalmente, testaron *in vivo* la efectividad de esta PDI para funcionar como PS utilizando ratones que tenían cáncer de pulmón, concluyendo que a los catorce días de tratamiento con la FC<sub>131</sub>-1SPDI-Cy5 se reducía tanto el tamaño como el volumen del tumor, poniendo en evidencia la eficacia de FC<sub>131</sub>-1SPDI-Cy5 en PDT.



**Figura 2.11:** Estructura de la FC<sub>131</sub>-1SPDI-Cy5.

Existen ejemplos en la bibliografía en los que se combina la PDT con la terapia fototérmica (PTT, del inglés *photothermal therapy*) utilizando PDI. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por el grupo del profesor Fan.<sup>137</sup> En este caso se sintetizó una PDI polimérica con carácter zwitteriónico funcionalizada con un grupo dimetilaminosulfonato, PDS-PDI (**Figura 2.12**). El carácter polimérico y zwitteriónico hacen que la PDS-PDI tenga buena solubilidad en agua y también sea biocompatible.

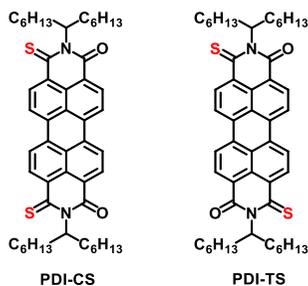


**Figura 2.12:** Estructura de la PDS-PDI.

Esta PDI presenta un rendimiento cuántico de oxígeno singlete de 16,7 % bajo irradiación láser con una longitud de onda de 660 nm. El estudio de citotoxicidad se llevó a cabo mediante ensayos *in vitro* utilizando células de cáncer de mama. Después de 4 horas de incubación, las células se irradiaron a una longitud de onda de 660 nm con un láser de 0,5 W·cm<sup>2</sup> de potencia durante diez minutos, con una dosis de PDS-PDI entre 0 y 0,08 mg·mL<sup>-1</sup>. Igualmente se realizaron ensayos *in vivo*, utilizando ratones con la misma afección tumoral. Tras la administración de la PDS-PDI e irradiando con un láser de la misma potencia a la misma longitud de onda, se concluyó que a los catorce días el volumen y tamaño del tumor se reducía de forma considerable.

<sup>137</sup> Sun, P.; Wang, X.; Wang, G.; Deng, W.; Shen, Q.; Jiang, R.; Wang, W.; Fan, Q.; Huang, W. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6, 3395-3403.

Otro ejemplo de PDI con carácter dual, fototérmico y fotodinámico, en el tratamiento del cáncer es la que sintetizó el grupo del profesor Qing.<sup>138</sup> Se trata de nuevo de PDI tionadas (PDI-CS y PDI-TS), que muestran solubilidad acuosa y biocompatibilidad al formarse nanopartículas empleando derivados de polietilenglicol (**Figura 2.13**).



**Figura 2.13:** Estructura de las PDI-tionadas sintetizadas.

Como se ha comentado anteriormente, las PDI tionadas tienen la capacidad de poblar efectivamente su estado triplete, favoreciendo la formación de ROS para poder aplicarlas como PS en PDT y PTT. Ambas PDI mostraron rendimientos cuánticos de oxígeno singlete similares, 20% para PDI-TS y 19% para PDI-CS. Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo empleando células cancerígenas de pulmón, las cuales se irradiaron con un láser de  $0,75 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$  de potencia durante cinco minutos a una longitud de onda de 660 nm, con una dosis de PDI-TS-CS NPs variable de entre 12,5 y  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Para evaluar la capacidad fototérmica se monitorizó la temperatura al incrementar tanto el tiempo de irradiación, como la concentración de PDI-NPs, obteniendo los mejores resultados para la PDI-TS-NPs, que alcanzó  $71 \text{ }^\circ\text{C}$  tras cinco minutos de irradiación frente los  $57\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$  para la PDI-CS-NPs con una concentración de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . En ambos casos la viabilidad celular descendía hasta un 20%, demostrando de esta forma la efectividad de las PDI tionadas como agentes termo- y fotoanticancerígenos. Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones con la misma afección cancerígena y tras la administración e irradiación de ambas PDI-NPs al cabo de catorce días, el tejido tumoral disminuyó de tamaño y volumen, y en algunos casos, incluso, llegó a desaparecer.

Recientemente los grupos de los profesores Fang, Gou y Zhao sintetizaron y realizaron estudios fotofísicos de una nueva PDI soluble en agua basada en sales de amonio cuaternario con capacidad de autoensamblarse para dar lugar a fotosensibilizadores de PDI-NPs.<sup>139</sup> En este caso se llevó a cabo la síntesis de una PDI sustituida en las posiciones imida con aminas terciarias y en las posiciones bahía con grupos difenilamino (**Figura 2.14**). Las aminas terciarias, tras su metilación, le

<sup>138</sup> Zhonghua, L.; Yijian, G.; Xin, J.; Qingyuan, D.; Zengle, Y.; Shuaihang, T.; Weisia, Q.; Yongwei, H. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 5535-5544.

<sup>139</sup> Chengwei, L.; Ya, G.; Rong, H.; Lei, F.; Yanyan, S.; Yuliang, Y.; Shaohua, G.; Jian, Z. *ACS Materials Lett.* **2022**, *4*, 657-664.

proporcionan solubilidad en medio acuoso a la PDI, y la presencia de los grupos difenil amino en las posiciones bahía hace que esta PDI absorba a longitudes de onda de 702 nm, valores más cercanos a la ventana terapéutica que todos los casos anteriormente descritos. La capacidad de autoensamblarse proporciona también a estas PDI la posibilidad de formar nanopartículas, lo que también permite una mejor internalización celular. Las medidas de rendimiento cuántico de oxígeno singlete de esta PDI-NPs dieron como resultado el valor de 0,81, dato sorprendente, ya que supera a otros fotosensibilizadores clínicamente aprobados, como es Laserphyrin® he contestado al comentario con un rendimiento cuántico de oxígeno singlete de 0,48 o Photofrin® con un 0,28.<sup>140</sup>

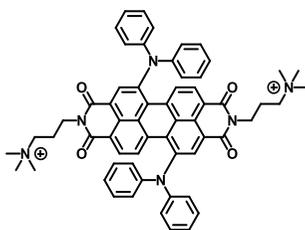


Figura 2.14: Estructura de la PDI sintetizada.

Tanto los ensayos *in vitro* como los *in vivo*, usando células cancerígenas de pulmón, concluyeron que, tras irradiación a 730 nm, esta PDI-NPs era capaz de reducir las células cancerígenas entre un 69 y un 92 % dependiendo del tiempo de exposición y de la dosis de PDI-NPs.

## 2.5 Objetivos

Con base en los antecedentes anteriormente expuestos, para este capítulo se proponen dos objetivos. El primero de ellos consiste en la síntesis y caracterización estructural de dos nuevos derivados de PDI solubles en agua, **PDI-1** y **PDI-2**, y sus precursores hidrofóbicos, **PDI-3** y **PDI-4** (Figura 2.15). Para ello se funcionalizaran las posiciones bahía de la PDI con grupos [2,6-(3'-metilimidazolío-1'-ilmetil)]-4-metilfenoxilo, siendo este el primer ejemplo de PDI solubles en agua basadas en sales de imidazolío (Esquema 2.1).

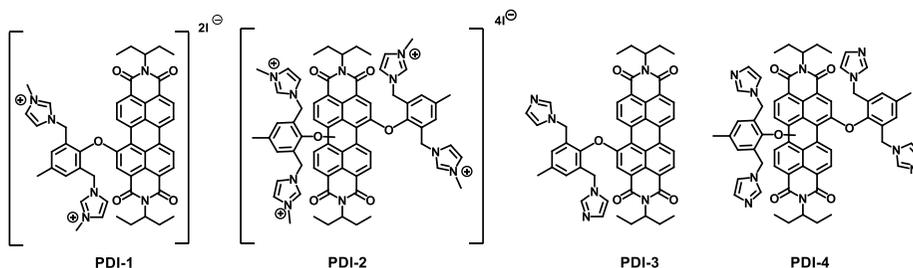
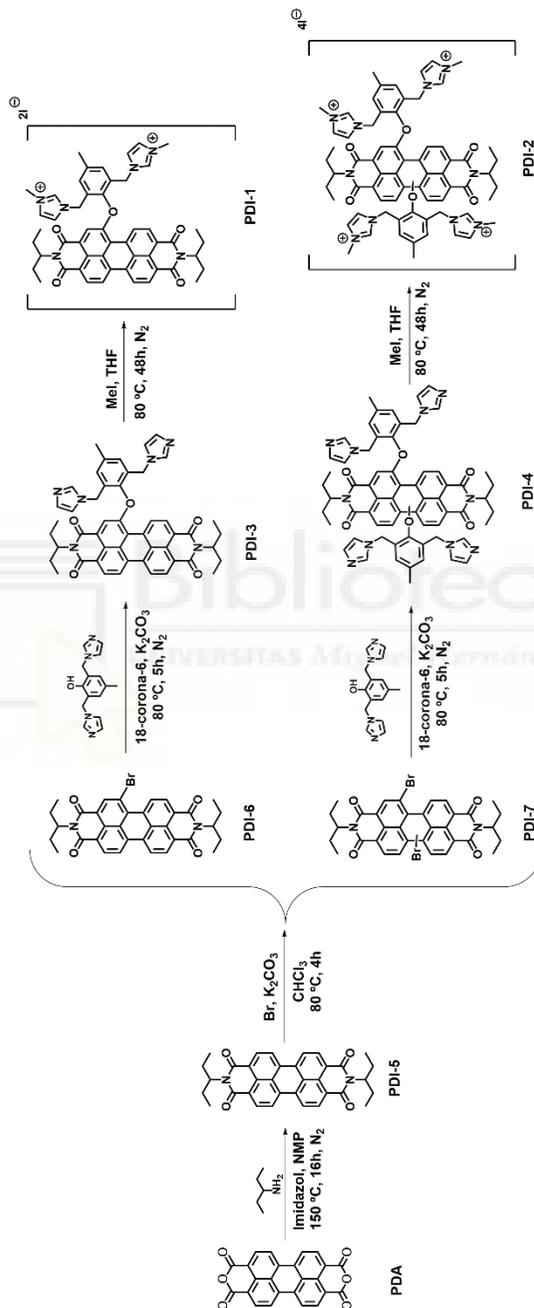


Figura 2.15: Estructura de las PDI objetivo.

<sup>140</sup> Yuan, Y. Y.; Xu, S. D.; Zhang, C. J.; Zhang, R. Y.; Liu, B. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 169-176.

El segundo objetivo de este capítulo consiste en el estudio de fototoxicidad de los dos PDI objetivo, **PDI-1** y **PDI-2**, así como estudios de internalización celular. Estos ensayos se han llevado a cabo en colaboración con el grupo del profesor Eduardo Fenández Jover del Instituto de Bioingeniería en la Universidad Miguel Hernández.



*Esquema 2.1: Ruta sintética propuesta para la obtención de PDI-1 y PDI-2.*

## 2.6 Discusión de resultados

En este apartado se abordarán tanto la síntesis de las **PDI-1 – PDI-4**, como los resultados obtenidos en los ensayos biológicos.

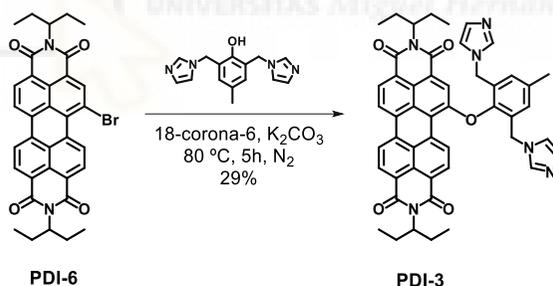
### 2.6.1 Síntesis y caracterización

#### 2.6.1.1 Síntesis de las PDI precursoras PDI-5 – PDI-7

La síntesis comenzó con la obtención de la **PDI-5** mediante una reacción de condensación entre el **PDA** y la pentan-3-amina bajo las condiciones de imidación habituales en esta química,<sup>141</sup> obteniendo la **PDI-5** con un 85% de rendimiento sin necesidad de purificación. A continuación, con el fin de poder funcionalizar las posiciones bahía del núcleo de perileno en las siguientes etapas de reacción, la **PDI-5** se sometió a una reacción de bromación modificando las condiciones descritas previamente por Rybtchinski y cols.,<sup>142</sup> para obtener los derivados mono- y dibromado, **PDI-6** y **PDI-7**, con 30% y 70% de rendimiento respectivamente. Cabe destacar que, tras la purificación en columna cromatográfica, la **PDI-7** se aisló como una mezcla de regioisómeros bromados en las posiciones 1,6 y 1,7 del núcleo de perileno, siendo mayoritario el compuesto 1,7-dibromado. Los datos espectroscópicos obtenidos para las **PDI-5** a **PDI-7** están en plena concordancia con los descritos en la bibliografía.

#### 2.6.1.2 Síntesis y caracterización de la PDI-1

La obtención de la **PDI-1** se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar se preparó la **PDI-3** con un 29% de rendimiento mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática ( $S_NAr$ ) entre la **PDI-6** y el 2,6-di(imidazolil)metil-4-metilfenol<sup>143</sup> en medio básico y en presencia de éter 18-corona-6 (**Esquema 2.2**).



*Esquema 2.2: Reacción de obtención de la PDI-3.*

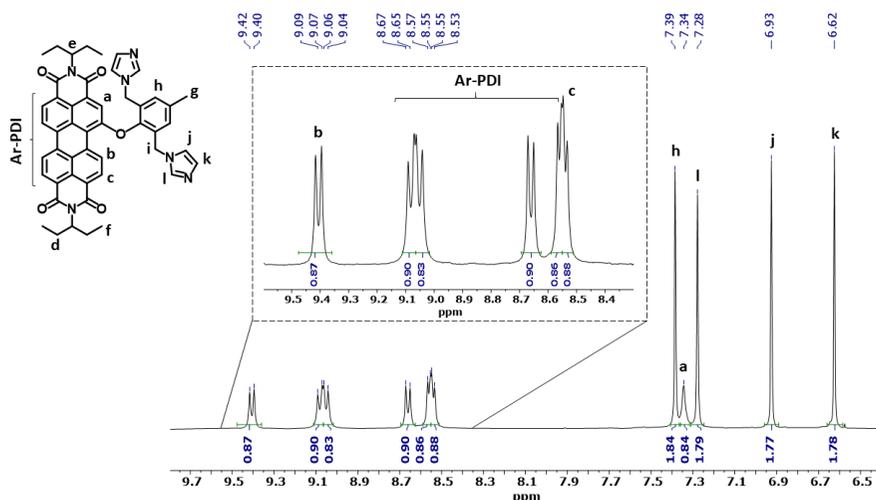
La formación de la **PDI-3** se puso de manifiesto mediante experimentos monodimensionales de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ , apoyados con experimentos bidimensionales COSY y HMBC realizados en  $\text{DMSO-d}_6$  a temperatura ambiente. En la región aromática (**Figura 2.16**) se aprecian dos grupos de señales claramente diferenciadas. En el primero, situado entre 9,42 y 8,53 ppm, se encuentran una serie de dobletes, en algunos casos superpuestos, que integran para un protón cada uno y que

<sup>141</sup> Holman, M. W.; Liu, R.; Adams, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12649-12654.

<sup>142</sup> Rajasingh, P.; Cohen, R.; Shirman, E.; Shimon, L. J. W.; Rybtchinski, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973.

<sup>143</sup> Yang, L.; Luo, L.; Zhang, S.; Su, X.; Lan, J.; Chen, C. T.; You, J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3938-3940.

pertenecen al anillo de perileno; de ellos, solo dos se pudieron asignar de forma inequívoca ( $H_b$  y  $H_c$ ).



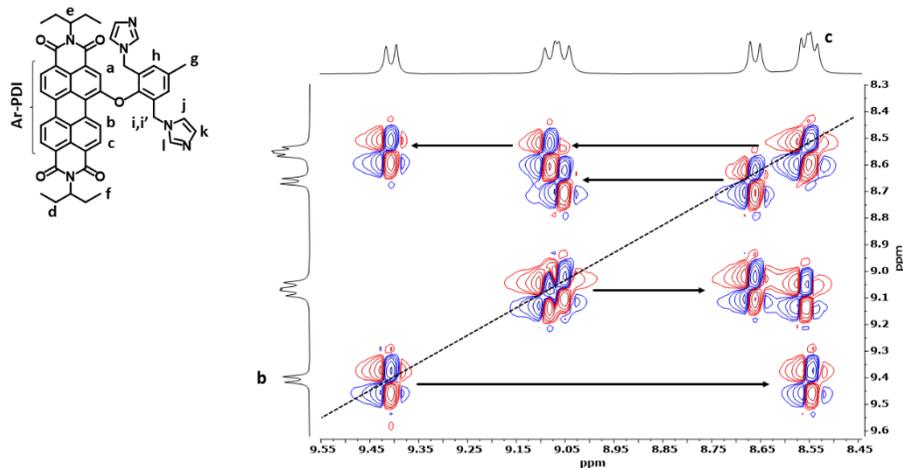
**Figura 2.16:** Región aromática del espectro  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , 25 °C) de la **PDI-3**.

En el caso de las PDI monosustituidas en la posición 1, al protón designado como  $H_b$  se le asigna en la bibliografía un doblete alrededor de 9,5 ppm.<sup>144</sup> En el caso de la **PDI-3**, ese doblete aparece a 9,41 ppm con una constante de acoplamiento  $J = 8,4$  Hz. Como es de esperar, el protón  $H_b$  está acoplado con su protón vecino  $H_c$ , que puede ser cualquiera de los dobletes restantes que aparecen entre 9,07 y 8,53 ppm. Gracias a los valores de las constantes de acoplamiento (**Tabla 2.1**) de los demás dobletes y al experimento COSY, se pudo asignar  $H_c$  al doblete que aparece a 8,56 ppm, ya que tiene una  $J = 8,4$  Hz, y existe una correlación directa del protón  $H_b$  y el doblete que aparece a 8,56 ppm ( $H_c$ ) (**Figura 17**)

$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
9,41	8,4
9,08	8,1
9,05	8,2
8,66	8,0
8,56	8,0
8,01	8,4

**Tabla 2.1:** Datos parciales de  $^1H$ -RMN para la **PDI-3**.

<sup>144</sup>a) Gutierrez-Moreno, D. Perilenodiimidas: Funcionalización directa de las posiciones bahía con compuestos nitrogenados. Doctorado en Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Julio 2017. b) Zink-Lorre, N. Perilenodiimidas: Reactividad y aplicaciones como sensores de explosivos y en dispositivos láser. Doctorado en Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Mayo 2017.

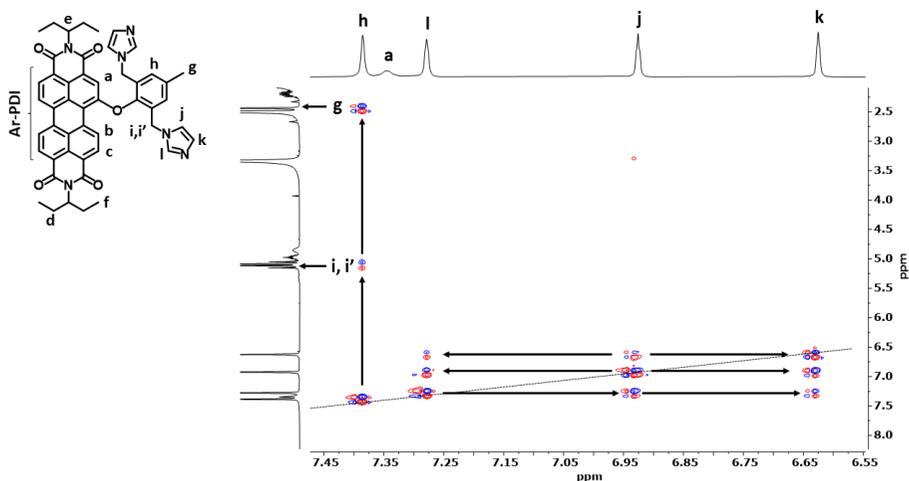


**Figura 2.17:** Región aromática del espectro COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la **PDI-3**.

Como se puede observar en la **Figura 2.17**, los protones aromáticos restantes del anillo de PDI no se pueden asignar con precisión, ya que existen correlaciones entre todos ellos presentando valores de  $J$  que corresponden con acoplamientos en orto, excepto para  $H_a$  que aparece como un singlete ancho a 7.34 ppm (**Figura 2.16**).

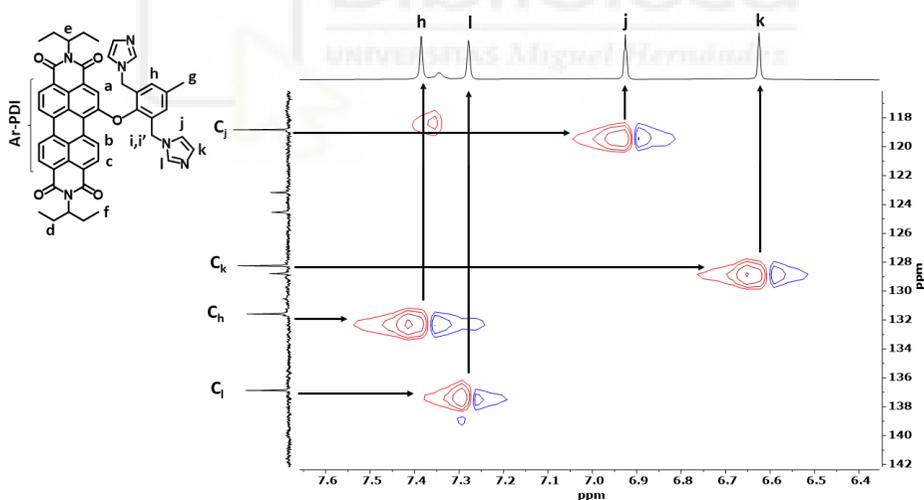
Entre 7,39 y 6,62 ppm aparecen cuatro singletes, integrando todas ellas para dos protones, pertenecientes a los protones del grupo fenoxi ( $H_h$ ) y al grupo imidazol ( $H_i$ ,  $H_j$  y  $H_k$ ). La señal que aparece a 7.39 corresponde con  $H_h$ , debido a que presenta dos puntos de cruce en el espectro COSY con  $H_g$  y  $H_i$  (**Figura 2.18**). También podemos observar como el espectro COSY de la **PDI-3** muestra que todos los protones del grupo imidazol están acoplados entre ellos.  $H_i$ ,  $H_j$  y  $H_k$  se pudieron asignar gracias al espectro HSQC tomando como referencia espectros de carbono asignados en una base de datos y en publicaciones recientes.<sup>145</sup>

<sup>145</sup> Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfady, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11149-11151.



**Figura 2.18:** Región aromática del espectro COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la PDI-3.

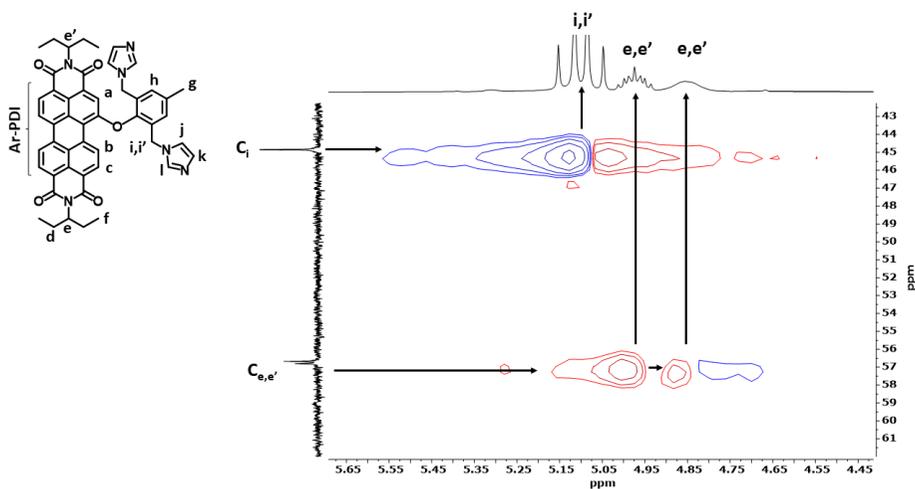
De esta forma, los desplazamientos químicos de  $C_i$ ,  $C_k$  y  $C_j$  fueron asignados a las señales que aparecen a 136,9, 128,3 y 118,8 ppm respectivamente. Estas señales presentan puntos de cruce con las señales que aparecen a 7.28 ppm ( $H_i$ ), 6.93 ( $H_k$ ) y 6.63 ( $H_j$ ) ppm (**Figura 2.19**).



**Figura 2.19:** Región aromática del espectro HSQC (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la PDI-3.

Alrededor de cinco ppm aparecen cuatro señales (**Figura 2.20**), dos de estas son comunes en PDI asimétricamente sustituidas en bahía, correspondientes a los protones  $H_e$  y  $H_c'$  que aparecen como un singlete ancho a 4,85 ppm y un multiplete a 4,98 ppm respectivamente. Las otras dos señales restantes aparecen como dos dobletes a 5,07 ppm y 5,14 ppm, los cuales están acoplados con un  $J = 15,1$  Hz e integrando para cuatro protones. De acuerdo con el espectro HSQC, ambos están enlazados al

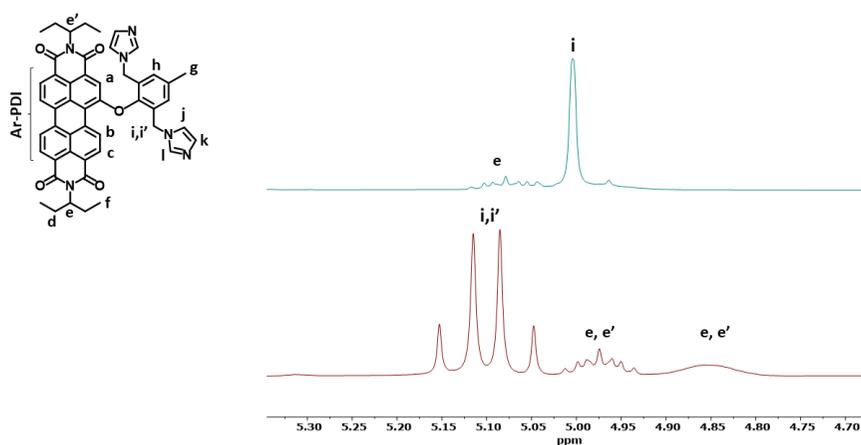
carbono  $C_i$ , de tal forma que esos dos hidrógenos geminales tienen carácter diastereotópico debido a la interacción con el anillo de PDI. Este suceso ocurre también con otros ejemplos con esta misma unidad de ,6-di(imidazolil)metil-4-metilfenol descritos en bibliografía.<sup>146</sup>



**Figura 2.20:** Sección del espectro HSQC (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la PDI-3.

Cabe destacar, que este suceso está influenciado directamente con el disolvente, ya que en  $CDCl_3$ , los protones  $H_i$ , aparecen como un solo singlete, como cabría de esperar (**Figura 2.21**).

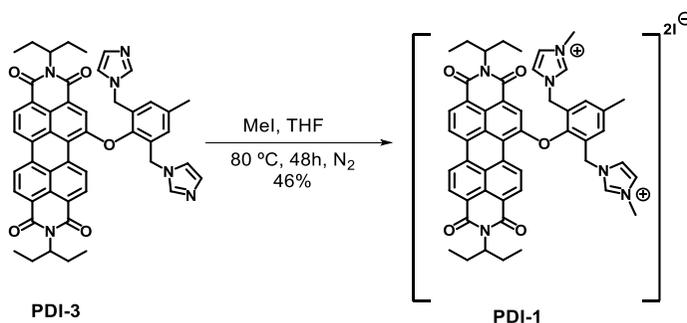
<sup>146</sup> a) Machacek, M.; Demuth, J.; Cermak, P.; Vavreckova, M.; Hruby, L.; Jedlickova, A.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9443-9456. b) Macháček, M.; Carter, K. A.; Kostelanský, F.; Miranda, D.; Seffouh, A.; Ortega, J.; Šimunek, T.; Zimčík, P.; Lovell, J. F. *J. Mater. Chem. B.* **2018**, *6*, 7298-7305.



**Figura 2.21:** Comparación de las secciones del espectro  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 25 °C) de la **PDI-3** en  $\text{CDCl}_3$  (en azul) y en  $\text{DMSO}-d_6$  (en rojo).

Finalmente, la caracterización de la **PDI-3** se completó con espectroscopía de IR (Figura AI-6) y espectrometría de masas de alta resolución (MALDI-TOF). Esta última muestra en el espectro una señal de  $m/z$  795,332, correspondiente al ión  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (Figura AI-7).

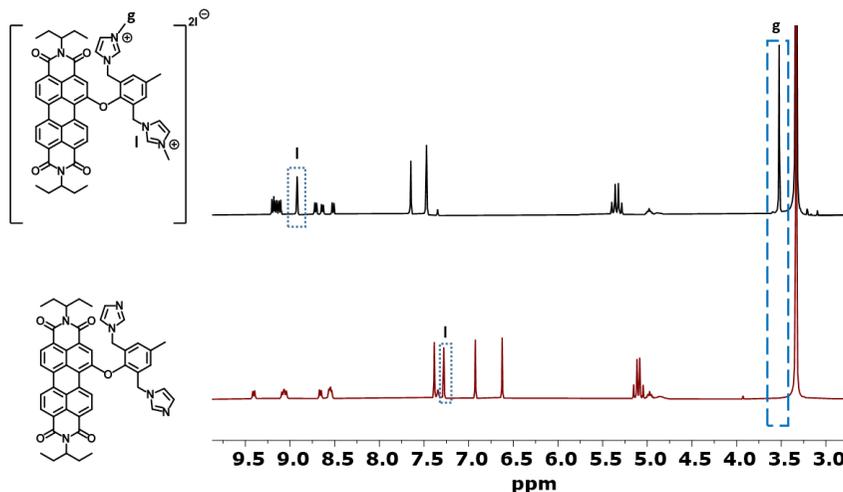
Una vez obtenida la **PDI-3**, esta se sometió a una reacción de metilación con un exceso de yoduro de metilo en un tubo de presión para obtener la **PDI-1** (**Esquema 2.3**). Tras 48 horas de reacción, el exceso de yoduro de metilo se eliminó mediante vacío y finalmente el sólido obtenido se lavó sucesivas veces con cloroformo, con el fin de eliminar los posibles restos de producto de partida, ya que debido a la alta polaridad de la **PDI-1** no fue posible realizar cromatografía en columna; aun así, el compuesto se obtuvo con un alto grado de pureza con un 46% de rendimiento.



**Esquema 2.3:** Síntesis de la **PDI-1**.

Se puede corroborar el éxito de la reacción por la aparición de dos señales principalmente, tanto en  $^1\text{H}$ -RMN como en  $^{13}\text{C}$ -RMN. Se puede observar como en el

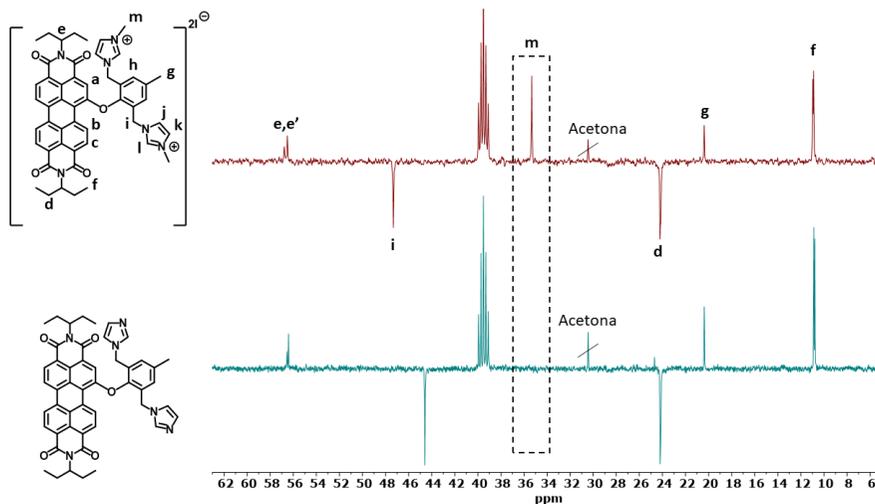
espectro de  $^1\text{H}$ -RMN aparece una nueva señal a 3,52 ppm que integra por 6 protones y que corresponde a los grupos *N*-metilo de la sal de imidazolio formada (**Figura 2.21**).



**Figura 2.21:** Comparación de la región aromática de  $^1\text{H}$ -RMN para la **PDI-1** (negro) y la **PDI-3** (rojo) (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C). (Caracterización completa en AI-1 y AI-14).

Debido a la formación de la sal de imidazolio, la señal correspondiente a  $\text{H}_i$  se desapantalla, pasando de 7,28 ppm en la **PDI-3** a 8,92 en la **PDI-1**.

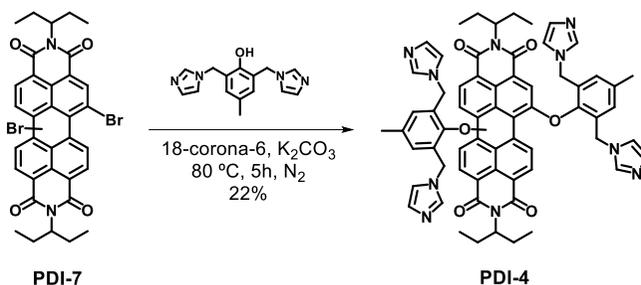
En el espectro de DEPT-135 de la **PDI-1** se puede observar como aparece una nueva señal a 35,28 ppm correspondiente al nuevo grupo grupo *N*-metilo, que no está presente en la PDI precursora (**Figura 2.22**).



**Figura 2.22:** Comparación de la región alifática de  $^{13}\text{C}$ -RMN para la **PDI-1** (rojo) y la **PDI-3** (azul) (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C).

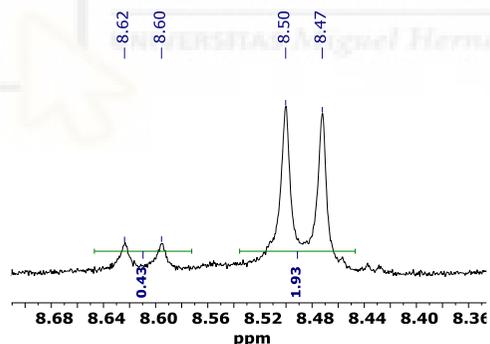
### 2.6.1.3 Síntesis y caracterización de la PDI-2

La síntesis de la **PDI-2** se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia sintética que con la **PDI-1**. En primer lugar, se realizó la reacción de  $S_NAr$  entre la **PDI-7** y el 2,6-di(imidazolil)metil-4-metilfenol en medio básico y contando con la presencia del éter 18-corona-6 (**Esquema 2.4**).



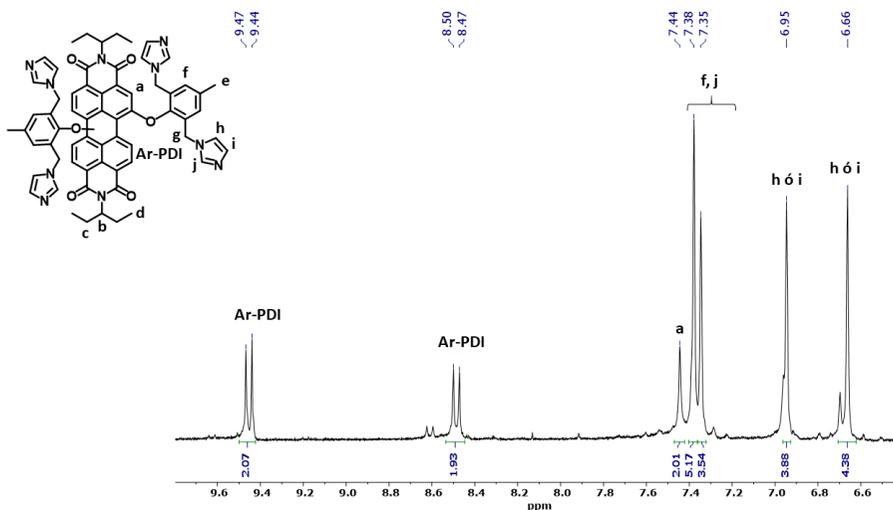
*Esquema 2.4: Obtención de la PDI-4.*

Finalmente, tras la purificación mediante columna cromatográfica en columna, se obtuvo la **PDI-4** con un rendimiento del 22%. Hay que mencionar que esta PDI es una mezcla de los regioisómeros 1,6 y 1,7 (**Figura 2.23**), siendo este último el mayoritario con una proporción 1/4,5 calculada a partir de la relación entre las dos integrales. La separación de estos dos isómeros en columna cromatográfica resulta imposible debido a la similitud del  $R_f$  de ambos compuestos.



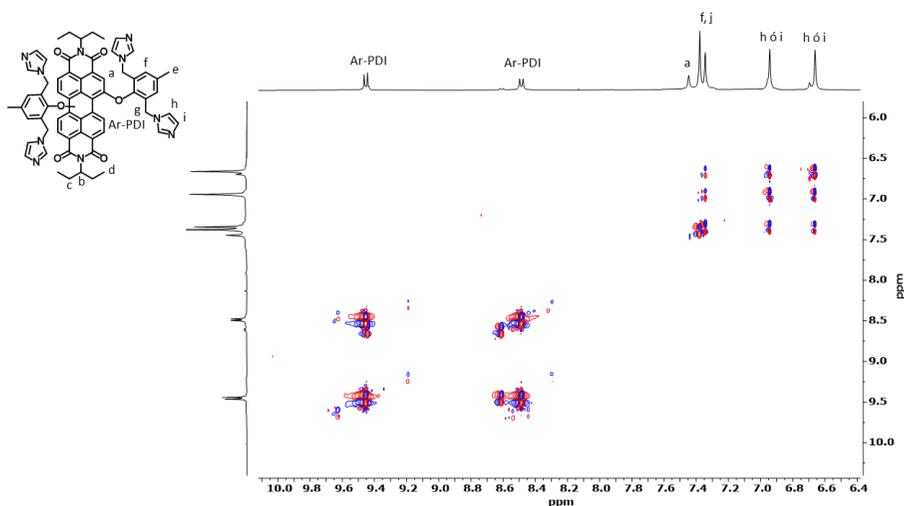
*Figura 2.23: Región aromática del espectro de  $^1H$ -RMN de la PDI-4 correspondiente a las señales de parte de los hidrógenos del anillo de perileno.*

Los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN confirman la conversión de la **PDI-7** en la **PDI-4**. Tal como ocurría en la **PDI-3**, aparecen señales que corresponden al grupo fenoxilo introducido (**Figura 2.24**).



**Figura 2.24:** Región aromática de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 25 °C) de la **PDI-4**.

En este caso, debido a la doble sustitución y a la presencia de isómeros, las señales pertenecientes al anillo de PDI no se pueden asignar con certeza, apareciendo como dos dobletes a 9,45 y 8,48 ppm. La señal singlete que integra para 2 protones que aparece a 7,44 ppm pertenece al protón del anillo de perileno contiguo a la posición sustituida. Por otro lado, igual que ocurría con el derivado monosustituido, las señales aromáticas correspondientes al grupo fenoxilo aparecen siguiendo el mismo patrón: todas son singletes que integran para cuatro protones. Con la intención de poder asignar este grupo de señales de forma correcta, se realizó el espectro de COSY de la **PDI-4** (**Figura 25**), sin embargo, no se obtuvo ningún dato aclarador. Se observa que los protones del anillo de perileno presentan acoplamiento entre sí, excepto  $\text{H}_a$ . Respecto a los protones aromáticos del grupo fenoxilo, nos encontramos ante la misma situación que en la **PDI-3**, todos los protones del anillo de imidazol presentan correlación directa entre sí y los protones del anillo bencénico no presentan ningún tipo de correlación.

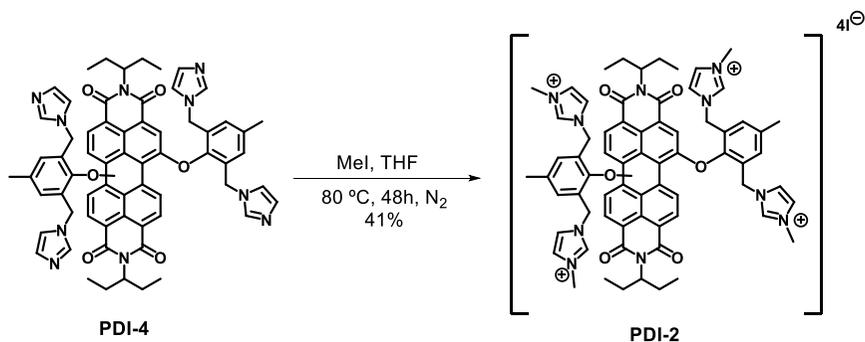


**Figura 2.25:** Región aromática del espectro COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la **PDI-4**.

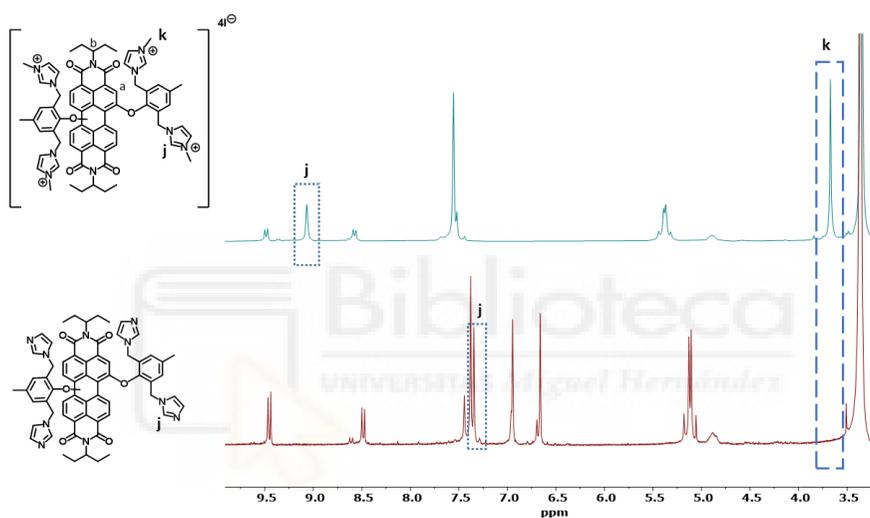
Las señales correspondientes a los grupos metileno y metilo del fenol, aparecen a 5,12 y 2,44 ppm, integrando para ocho y seis protones respectivamente (Figura AI-8). Estos datos, junto con el valor de  $m/z$  de 1061,452 del ión molecular  $[M-H]^-$  (Figura AI-13), confirman la estructura propuesta para la **PDI-4**.

Una vez obtenida la **PDI-4** se procedió a metilarla para obtener finalmente la **PDI-2** (Esquema 2.5). Se usaron las mismas condiciones que para la **PDI-1**, empleando un exceso de yoduro de metilo como agente alquilante en un tubo de presión. Tras 48 horas de reacción, se eliminó mediante vacío el exceso de yoduro de metilo y se lavó el sólido obtenido con cloroformo para eliminar los posibles restos de **PDI-4**. Debido a la gran polaridad de la **PDI-2**, no se llevó a cabo ningún proceso adicional de purificación, obteniéndola con un 41% de rendimiento.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la **PDI-2** se puede ver como aparece una señal a 3,67 ppm que integra por 12 protones (Figura 2.26), la cual pertenece a los grupos *N*-metilo formados tras la reacción de metilación. Si lo comparamos con el espectro de la **PDI-4** precursora, esta señal no está presente. Por otro lado, los protones  $H_j$ , al formarse la sal de imidazolio, sufren un fuerte desapantallamiento, pasando de 7,35 a 9,35 ppm.

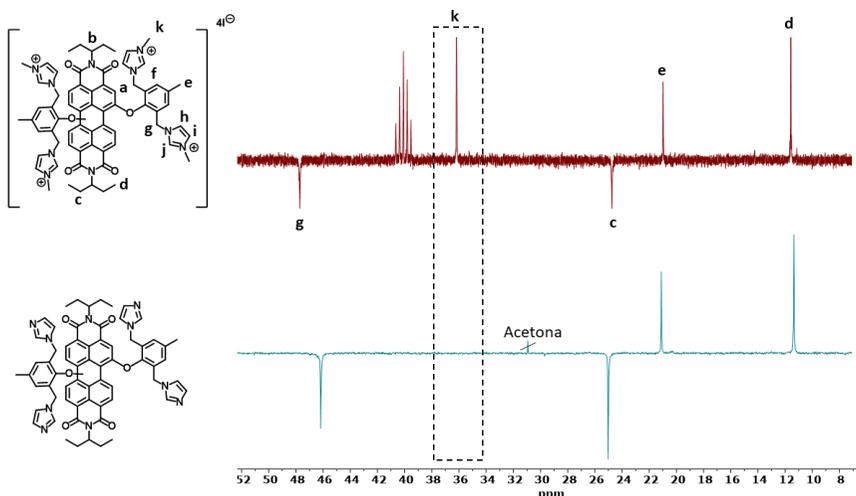


**Esquema 2.5:** Síntesis de la **PDI-2**.



**Figura 2.26:** Comparación de la región aromática de  $^1\text{H}$ -RMN para la **PDI-4** (rojo) y la **PDI-1** (azul) (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25  $^\circ\text{C}$ ). (Caracterización completa en AI-8 y AI-19).

El espectro DEPT-135 de la **PDI-1** corrobora el éxito de la metilación (**Figura 27**). A 36,18 ppm aparece una nueva señal que corresponde con un grupo metilo; esta señal no está presente en el espectro DEPT-135 de la **PDI-4**, lo que confirma la formación de la sal de imidazolio.

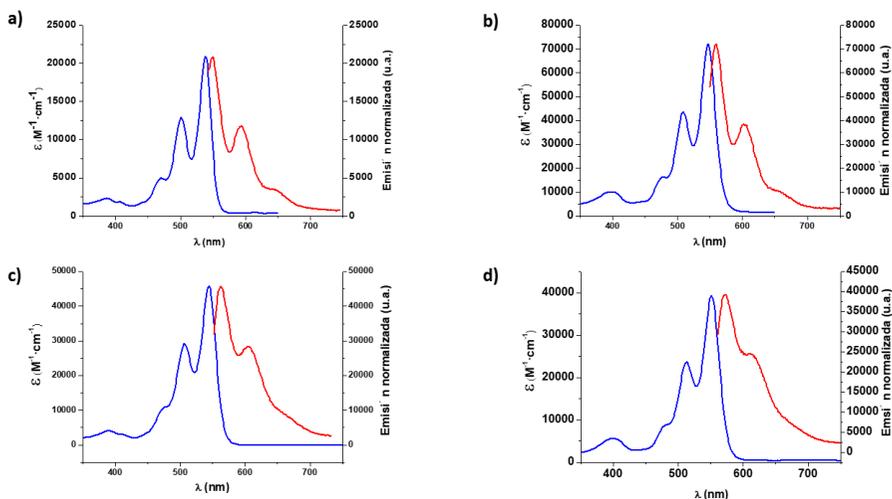


**Figura 2.27:** Comparación de la región alifática de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los experimentos DEPT-135 para la **PDI-2** (rojo) (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 25 °C). y la **PDI-4** (azul) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C).

Finalmente, tanto la PDI-1 como la PDI-2 fueron caracterizadas mediante IR (Figuras AI-17 y AI-22) y espectrometría de masas (Figuras AI-18 y AI-23). Al tratarse de moléculas cargadas, se empleó la técnica de electrospray para realizar el experimento, obteniendo en ambos casos el valor del ion molecular con la pérdida de un átomo de yodo dando valores de  $m/z = 953,3$  para la **PDI-1** y  $1503,2$  para la **PDI-2**. (Figuras AI-18 y AI-23)

#### 2.6.1.4 Propiedades ópticas de las PDI-1 – PDI-4

El perfil de absorción y fluorescencia de las nuevas PDI sintetizadas muestra el patrón correspondiente a PDI sustituidas con grupos fenoxilo en bahía. Dada la alta polaridad de las **PDI-1** y **PDI-2**, estas se midieron usando como disolvente una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}/0,05\%$  DMSO, mientras que las **PDI-3** y **PDI-4** fueron medidas en cloroformo (Figura 2.28).



**Figura 2.28:** Espectros de absorción (azules) y emisión normalizada (rojos) de: a) **PDI-3**, b) **PDI-4**, c) **PDI-1**, d) **PDI-2**. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

Las **PDI-3** y **PDI-4**, muestran las tres bandas características de las PDI correspondientes a las transacciones energéticas de su estado fundamental al estado excitado  $\pi-\pi^*$ , mostrando sus máximos a 538 y 544 nm respectivamente. Sin embargo, en las **PDI-1** y **PDI-2** la tercera banda aparece como un hombro, posiblemente debido a la influencia del disolvente utilizado para realizar la medida. Ambas PDI muestran un desplazamiento batocrómico respecto a sus precursoras, presentando sus máximos de absorción a 544 y 551 nm respectivamente.

En cuanto a la fluorescencia, las **PDI-3** y **PDI-4** muestran altos valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_f$ ), siendo mayor en el caso de la **PDI-3**. Es destacable el fuerte descenso que sufre el  $\Phi_f$  de la **PDI-1** respecto del de su precursora, pasando de 75% a 31%, valor que es aceptable teniendo en cuenta la alta polaridad del disolvente utilizado para realizar la medida en la **PDI-1**. Sin embargo, este efecto no se observa en la **PDI-2**, ya que, respecto a su precursora, mantiene prácticamente el mismo valor de  $\Phi_f$ , siendo del 53% (**Tabla 2.2**).

Los valores de absorción obtenidos son importantes, ya que son los que se utilizaran para fotoexcitar a las **PDI-1** y **PDI-2** y ver su efecto fototóxico, aunque estos se alejen de los valores estandarizados en la ventana terapéutica. Dado que las **PDI-1** y **PDI-2** tienen propiedades de emisión intrínseca, esto será interesante a la hora de realizar los ensayos de microscopía confocal para comprobar la internalización de dichas PDI en el entorno celular.

	Absorbancia ( $\lambda_{\text{máx}}$ , nm)	Emisión ( $\lambda_{\text{máx}}$ , nm)	$\Phi_f$ (%)
<b>PDI-1</b>	506, 544	561, 604	31
<b>PDI-2</b>	512, 551	571, 603	53
<b>PDI-3</b>	470, 501, 538	550, 594	75
<b>PDI-4</b>	477, 508, 547	560, 602	54

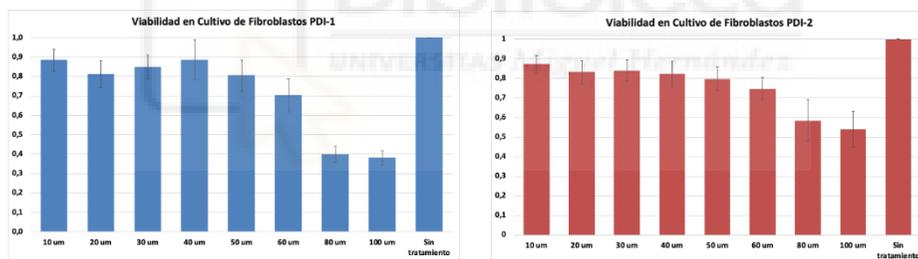
Tabla 2.2: Datos ópticos de las PDI-1 – PDI-4.

## 2.6.2 Ensayos biológicos

### 2.6.2.1 Estudios previos de biocompatibilidad para las PDI-1 y PDI-2

En primer lugar, antes de realizar ensayos de fototoxicidad en una línea celular cancerígena, se evaluó la biocompatibilidad de las PDI-1 y PDI-2 en una línea celular sana, para descartar la probabilidad de que puedan ser citotóxicas sin irradiación. Para ello, se realizó un estudio de viabilidad celular mediante ensayos de MTT.<sup>147</sup>

Las PDI-1 y PDI-2 se disolvieron en medio biológico conteniendo un 0,5% de DMSO, obteniendo concentraciones crecientes de 30, 40, 50, 60 y 80  $\mu\text{M}$ , que se probaron *in vitro* sobre un cultivo celular de fibroblastos durante 48 horas. Pasado el tiempo, se realizó un ensayo MTT para obtener los datos de viabilidad. El grado de citotoxicidad se determinó en función de la concentración de las PDI en comparación con células sin tratar (Gráfica 2.1).



Gráfica 2.1: Datos de viabilidad de la PDI-1 y PDI-2 en línea celular de fibroblastos.

Como se puede observar en la Gráfica 1, ambas PDI presentan datos de viabilidad aceptables para concentraciones de hasta 50  $\mu\text{M}$ , donde la viabilidad es mayor del 80% en ambas PDI.

A la vista de estos resultados preliminares, se decidió continuar con ensayos *in vitro* utilizando una línea celular anticancerígena.

### 2.6.2.2 Internalización celular y citotoxicidad *in vitro* de las PDI-1 y PDI-2

La línea celular cancerígena que se eligió para realizar los ensayos fue ATTC, células de cáncer de cuello de útero, comúnmente conocidas como HeLa.

De nuevo, se realizaron ensayos MTT para evaluar la citotoxicidad de las PDI-1 y PDI-2. Se usaron concentraciones crecientes de PDI, determinando el grado de

<sup>147</sup> Van Meerloo, J.; Kaspers, G. J.; Cloos, J. *Method. Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237-245.

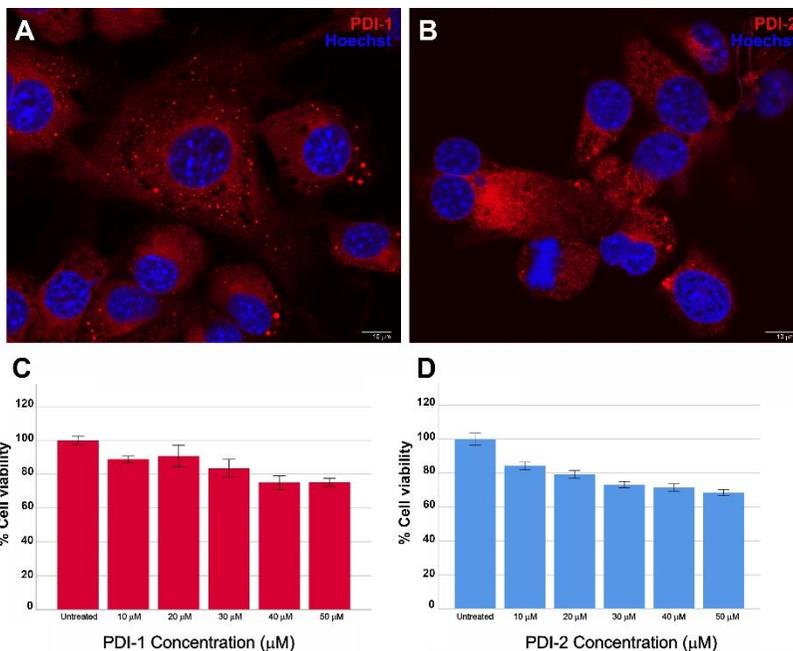
citotoxicidad teniendo en cuenta la concentración de la PDI en comparación con células sin tratar tras doce horas de incubación (**Figura 2.29**). En el caso de la **PDI-1**, los mejores datos de viabilidad se obtuvieron a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  con un 80% de viabilidad (**Figura 2.29C**). En cuanto a la **PDI-2**, se obtuvieron valores muy parecidos, siendo el mejor dato de viabilidad para esta PDI a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , con un 70% de viabilidad (**Figura 2.27D**). A la vista de estos resultados, se decidió realizar los ensayos de fototoxicidad a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

Debido al hecho de que las PDI poseen fluorescencia intrínseca, se evaluó la internalización de las **PDI-1** y **PDI-2** en las células HeLa mediante microscopía confocal. Tras 24 horas de incubación de ambas PDI a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , las células mostraron fluorescencia roja en todo el citoplasma (**Figuras 2.27 A y B**), el marcador nuclear utilizado fue Hoechst 33342, permitiendo ver el núcleo de color azul.

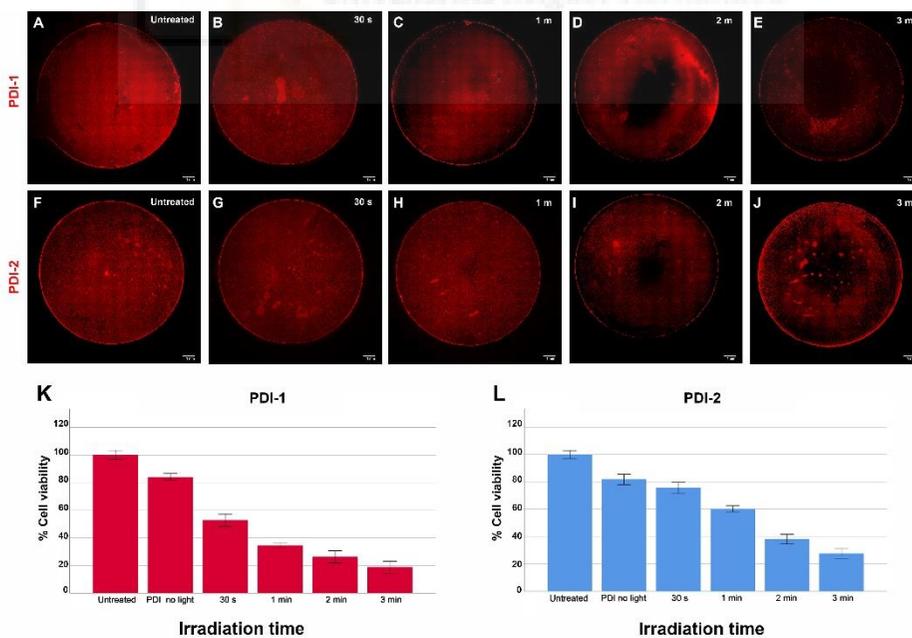
### **2.6.2.3 Estudios de fototoxicidad inducida por las PDI-1 y PDI-2**

Los estudios de fototoxicidad se realizaron a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  para ambas PDI. Tras 24 horas de incubación con las diferentes PDI, las células se irradiaron en intervalos de tiempo creciente, desde 30 segundos a tres minutos, con un láser de una potencia de 35  $\text{mW}/\text{cm}^2$  a una longitud de onda de 547 nm. Una vez irradiadas, se siguieron incubando las células durante 24 horas más y se realizaron ensayos de MTT para calcular la viabilidad celular.

Se observó como el tiempo es crucial para producir muerte celular, no observándose un daño apreciable a los 30 segundos; sin embargo, al incrementar el tiempo de irradiación el número de células muertas aumenta de forma considerable, lo que sugiere un mejor efecto antitumoral al aumentar el tiempo de irradiación (**Figuras 2.30 A-J**). De la misma forma, se observó que las células sin tratar no mostraron ningún tipo de daño.



**Figura 2.29:** Internalización celular y citotoxicidad de las **PDI-1** y **PDI-2** en células *HeLa*. Imágenes de microscopía confocal de células *HeLa* tratadas con A) **PDI-1** 10 μM y B) **PDI-2** 10 μM. Viabilidad celular en células *HeLa* tratadas con diferentes concentraciones de C) **PDI-1** y D) **PDI-2**.

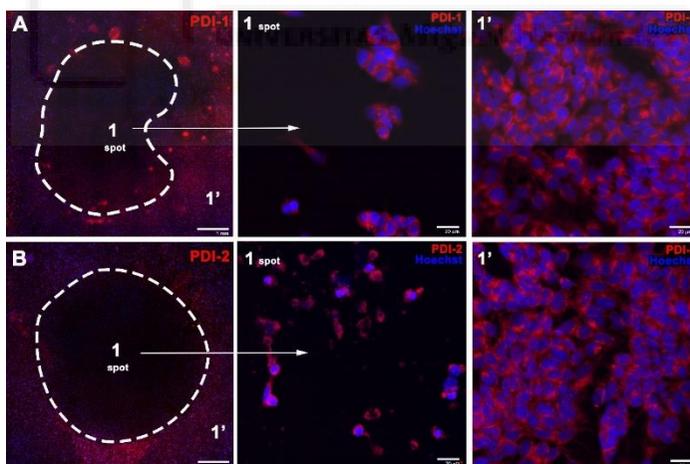


**Figura 2.30:** Fototoxicidad inducida por las **PDI-1** y **PDI-2** en células *HeLa*. A-E) Efecto del tiempo de exposición para la **PDI-1**. F-J) Efecto del tiempo de exposición para la **PDI-2**. K-L)

Porcentajes de viabilidad para la **PDI-1** y **PDI-2** tras 24 h de incubación y diferentes tiempos de irradiación. Los datos están representados como media  $\pm$ SD de experimentos independientes ( $n=4$ ). Barra de escala: 1 mm.

Los datos de MTT muestran como, en el caso de la **PDI-1**, con un tiempo de irradiación corto de 30 segundos se produce una muerte celular del  $52,73 \pm 5,37\%$  debido a la fototoxicidad; conforme el tiempo de irradiación aumenta, el valor de viabilidad decae bruscamente llegando a ser del 20% con un tiempo de irradiación de tres minutos ( $18,77 \pm 5,14\%$ ) (**Figura 2.30K**). Las células incubadas con la **PDI-2** mostraron un comportamiento similar: después de 30 segundos de irradiación el porcentaje de células sanas fue del  $75,66 \pm 4,99\%$ ; sin embargo, tras tres minutos de irradiación el porcentaje de viabilidad descendió a un 30% ( $27,62 \pm 4,23\%$ ) (**Figura 2.30L**).

Para estudiar con más detalle el efecto fototóxico de las **PDI-1** y **PDI-2**, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal tras tratar células HeLa con ambos compuestos a una concentración  $10 \mu\text{M}$  durante un tiempo de exposición de dos minutos con el mismo láser y a la misma longitud de onda. Como se muestra en la **Figura 2.31**, ambas PDI inducen fototoxicidad en el área irradiada generando un *spot* 1 (**Figuras 2.31A-B**); las células que sobreviven en esta zona presentan una morfología celular anómala, por lo que se considera una afección debida a PDT en estas células tumorales. La morfología de las células que no fueron expuestas a irradiación dentro del mismo portaobjetos no mostraron ningún tipo de cambio en cuanto a densidad celular o morfología (**Figura 2.31-1'**).



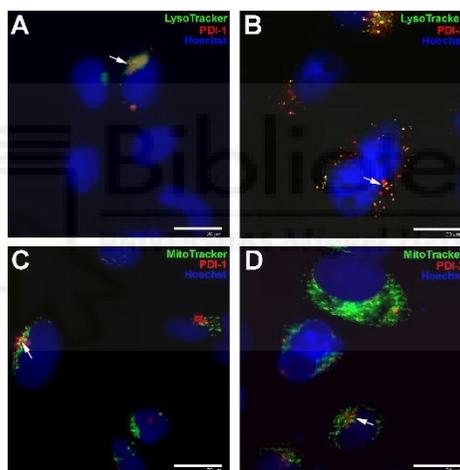
**Figura 2.31:** Imágenes de microscopía confocal de la fototoxicidad inducida por las **PDI-1** A) y **PDI-2** B). Barra de escala: 1 mm y 20 micras. El área dañada corresponde al *spot* 1 (línea discontinua).

Ante los resultados de fototoxicidad expuestos, se puede confirmar que las PDI objetivo producen muerte celular al ser irradiadas con una fuente de luz láser, no habiendo una diferencia considerable entre ambas PDI.

#### 2.6.2.4 Estudios de localización subcelular

Como ya se ha comentado, las **PDI-1** y **PDI-2** presentan fluorescencia intrínseca, lo que es interesante para poder llevar a cabo estudios de localización celular. Para elucidar la distribución de ambas PDI dentro de las células, se llevaron a cabo ensayos de colocalización con diferentes marcadores (MitoTracker Green y LysoTracker), y para la visualización del núcleo celular se utilizó el marcador Hoechst 33342. Tras la incubación de las células con los diferentes marcadores durante 30 minutos, se añadió las **PDI-1** y **PDI-2** con una concentración de 10  $\mu$ M (**Figura 2.32**):

Para ambas PDI se encontró una dinámica similar, observándose una colocalización parcial con LysoTracker (**Figuras 2.32 A-B**), lo que sugiere la posibilidad de que ambas PDI estén afectando a la función o estructura de los lisosomas en las células tumorales. Del mismo modo, se observó colocalización parcial con MitoTracker Green (**Figuras 2.32C-D**), dato que ofrece una información muy importante, ya que la apoptosis celular puede estar inducida a través del daño mitocondrial por la acumulación de  $^1\text{O}_2$  y/o ROS y posterior liberación del citocromo C.



**Figura 2.32:** Localización subcelular de las **PDI-1** y **PDI-2** *in vitro*. A-B) Imágenes de fluorescencia en células HeLa tratadas con LysoTracker y las **PDI-1** y **PDI-2**. Las flechas indican la colocalización parcial en lisosomas. C-D) Imágenes de fluorescencia en células HeLa tratadas con MitoTracker Green y las **PDI-1** y **PDI-2**. Las flechas indican la colocalización parcial en mitocondrias. Barra de escala: 20 micras.

#### 2.7 Conclusiones

En este capítulo, se han sintetizado y caracterizado cuatro nuevas PDI no descritas hasta el momento, las **PDI-1** – **PDI-4**, siendo las **PDI-1** y **PDI-2** los primeros ejemplos de PDI solubles en agua basadas en sales de imidazolio.

Tras la realización de los ensayos biológicos, en ausencia de luz, las **PDI-1** y **PDI-2** no muestran citotoxicidad; sin embargo, una vez irradiadas con una fuente láser a 447 nm, las células incubadas con ambas PDI muestran un descenso abrupto de la viabilidad, descendiendo hasta un 30% para ambas PDI, dejando constancia del efecto citotóxico de **PDI-1** y **PDI-2**.

Los estudios de localización celular muestran una buena internalización celular, colocalizando ambas PDI tanto en lisosomas como en mitocondria, siendo este último caso interesante, ya que la muerte celular puede estar ocasionada por una acumulación de  $^1\text{O}_2$  y/o ROS en la mitocondria, afectando directamente al ciclo de respiración celular.

## 2.8 Experimental

### 2.8.1 Materiales y métodos

Los reactivos utilizados, tanto orgánicos como inorgánicos, se obtuvieron a través de casas comerciales especializadas (Sigma-Aldrich, Fluka, Merck o TCI) y se utilizaron sin ningún tipo de purificación adicional, a menos que se indique lo contrario.

Los disolventes empleados (SDS) se utilizaron en todos los casos en grado de síntesis, y cuando se estimó necesario, se purificaron y secaron mediante los métodos habituales en cada caso.

El seguimiento de las reacciones se efectuó por cromatografía en capa fina analítica, utilizando cromatofolios de gel de sílice de tipo 60F254, con un espesor de capa de 0,2 mm (SDS). La purificación y separación de los productos se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria  $\text{SiO}_2$  de tipo 60, con tamaño de partícula de 40-63  $\mu\text{m}$  (SDS).

Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker Advance 400 a 25 °C, a no ser que se indique lo contrario, utilizando disolvente deuterado y se referenciaron frente a tetrametilsilano. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hercios. Las señales se designaron como: s (singlete), sa (señal ancha), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), dt (doble triplete), c (cuadruplete), m (multiplete). Los desplazamientos químicos de estas se dan en partes por millón (ppm).

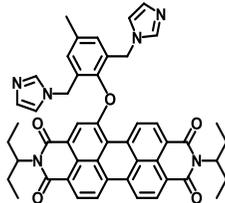
Los experimentos de espectrometría de masas (EM) se realizaron con un equipo Microflex LRF20 de Bruker, utilizando la técnica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) y usando como matriz ditranol, tanto en modo positivo como en modo negativo.

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) se obtuvieron siempre en disolución, utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 365 y empleando en todos los casos disolventes de grado espectroscópico. Los espectros de emisión fluorescente se registraron en un espectrofotómetro HORIBA scientific SAS.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en pastilla de bromuro de potasio utilizando un espectrofotómetro Nicolet Impact 400D.

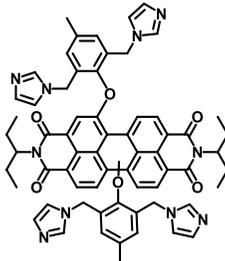
## 2.8.2 Síntesis de nuevos productos

### 2.8.2.1 Síntesis de *N,N'*-di(etilpropil)-1-[2',6'-(imidazol-1''-ilmetil)-4'-metilfenoxi]perileno-3,4:9,10-tetracarboxidiimida (PDI-3)



Una mezcla de **PDI-6** (142 mg, 0,233 mmol), carbonato de potasio (257 mg, 1,6 mmol), 2,6-di(imidazol-1'-ilmetil)-4-metilfenol (270 mg, 1 mmol), éter 18-corona-6 (986 mg, 3,73 mmol) y tolueno seco (40 mL) se calentó 5 horas a 80 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez pasado el tiempo, se diluyó la mezcla con diclorometano, se extrajo con el mismo disolvente y se lavó la fase orgánica con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Finalmente se llevó a cabo la purificación empleando cromatografía en columna con gel de sílice usando como fase móvil una mezcla cloroformo/metanol (20:1), obteniendo 53 mg (23%) de la **PDI-3** como un sólido rosa oscuro.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,41 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 9,08 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, H<sub>Ar-PDI</sub>), 9,05 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, H<sub>Ar-PDI</sub>), 8,66 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, H<sub>Ar-PDI</sub>), 8,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, H<sub>Ar-PDI</sub>), 8,54 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, H<sub>c</sub>), 7,39 (s, 2H, H<sub>h</sub>), 7,34 (bs, 1H, H<sub>a</sub>), 7,28 (bs, 2H, H<sub>i</sub>), 6,93 (bs, 2H, H<sub>j</sub>), 6,62 (bs, 2H, H<sub>k</sub>), 5,13 (d,  $J = 15,1$  Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 5,05 (d,  $J = 15,1$  Hz, 2H, H<sub>i'</sub>), 5,03 – 4,76 (2m, 2H, H<sub>e</sub>, H<sub>c'</sub>), 2,44 (s, 3H, H<sub>g</sub>), 2,26-2,14 (m, 4H, H<sub>d</sub>), 1,96 – 1,72 (m, 4H, H<sub>d</sub>), 0,83 (2t,  $J = 7,4$ , 7,4 Hz, 12H, H<sub>f</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,5, 146,0, 136,7, 133,9, 133,4, 133,0, 131,4, 130,2, 128,6, 128,3, 128,0, 127,6, 126,1, 124,4, 124,3, 123,0, 119,5, 118,7, 56,4, 56,3, 44,4, 30,3, 24,1, 24,0, 20,2, 10,7, 10,6. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> calcd C<sub>49</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 795,331, found 795,332. IR (KBr): 2962, 2931, 2874, 1694, 1655, 1592, 1507, 1459, 1425, 1406, 1332, 1199, 1163, 1139, 810, 788, 849, 733, 660 cm<sup>-1</sup> UV-Vis (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\text{max/nm}}$  (log  $\epsilon$ ). 470 (4, 28), 501 (4, 7), 538 (4, 92).

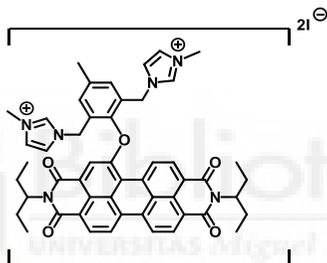
### 2.8.2.2 Síntesis de *N,N'*-di(etilpropil)-1,7(6)-di-[2',6'-(imidazol-1''-ilmetil)-4'-metilfenoxi]perileno-3,4:9,10-tetracarboxidiimida (PDI-4)



Una mezcla de **PDI-7** (500 mg, 0,726 mmol), carbonato de potasio (800 mg, 5,82 mmol), 2,6-di(imidazol-1'-ilmetil)-4-metilfenol (270 mg, 1 mmol), éter 18-corona-6 (284 mg, 11,63 mmol) y tolueno seco (50 mL) se calentó 5 horas a 80 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez pasado el tiempo, se diluyó la mezcla con

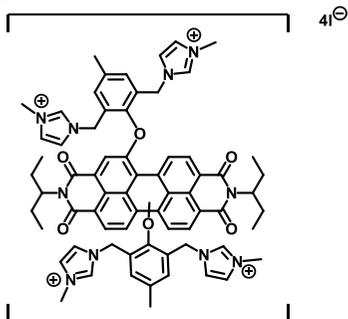
diclorometano, se extrajo con el mismo disolvente y se lavó la fase orgánica con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Finalmente se llevó a cabo la purificación empleando cromatografía en columna con gel de sílice usando como fase móvil una mezcla de cloroformo/acetona (20:1), obteniendo 172 mg (22%) de la **PDI-4** como un sólido rosa.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,45 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 8,49 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 7,44 (s, 2H,  $H_a$ ), 7,38 (s, 5H,  $H_f, H_j$ ), 7,35 (s, 3H,  $H_j$ ), 6,95 (s, 4H,  $H_h$ ), 6,66 (s, 4H,  $H_i$ ), 5,16 (d,  $J = 15,1$  Hz, 4H,  $H_g$ ), 5,08 (d,  $J = 15,1$  Hz, 4H,  $H_g'$ ), 4,88 (bs, 2H,  $H_b$ ), 2,44 (s, 6H,  $H_e$ ), 2,16-2,08 (m, 4H,  $H_c$ ), 1,91-1,77 (m, 4H,  $H_c$ ), 0,81 (t,  $J = 7,4$  Hz, 12H,  $H_d$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154,0, 145,9, 137,6, 136,4, 132,2, 131,2, 129,2, 129,0, 128,6, 128,4, 124,4, 120,0, 117,9, 57,0, 45,4, 30,2, 28,9, 24,2, 20,3, 10,58. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$   $[\text{M-H}]^-$  calcd  $\text{C}_{64}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_6$ : 1061,452, found 1061,451. IR (KBr): 3109, 2963, 2875, 1694, 1654, 1593, 1510, 1459, 1407, 1330, 1262, 810, 752, 661  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max/nm}}$  ( $\log \epsilon$ ): 477 (4,21), 508 (4,63), 547 (4,85).

### 2.8.2.3 Síntesis de *N,N'*-di(etilpropil)-1-[2',6'-(3''-metilimidazol-1''-ilmetil)-4'-metilfenoxi]perileno-3,4:9,10-tetracarboxidiimida (**PDI-1**)



Una mezcla de **PDI-3** (53 mg, 0,06 mmol), y THF seco (6 mL) se añadieron a un tubo de presión y se le pasó una corriente de nitrógeno durante cinco minutos. A continuación, se le añadió yoduro de metilo (5 mL, 8,03 mmol) y se calentó la mezcla a 85 °C durante dos días. Pasado el tiempo de reacción, la temperatura se bajó a 50 °C y se mantuvo a vacío toda la noche. Después de enfriar, el sólido obtenido se filtró y se lavó varias veces con cloroformo, obteniendo 25 mg de la **PDI-1** como un sólido rosa (46%) sin necesitar etapas posteriores de purificación.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,19 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H,  $H_b$ ), 9,16 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 9,11 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 8,92 (bs, 2H,  $H_i$ ), 8,71 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 8,64 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_{\text{Ar-PDI}}$ ), 8,52 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H,  $H_c$ ), 7,65 (s, 2H,  $H_h$ ), 7,47 (bs, 4H,  $H_j, H_k$ ), 7,35 (s, 1H,  $H_a$ ), 5,38 (d,  $J = 15,2$  Hz, 2H,  $H_i$ ), 5,31 (d,  $J = 15,2$  Hz, 2H,  $H_i'$ ), 5,07 – 4,78 (2m, 2H,  $H_e, H_e'$ ), 3,52 (s, 6H,  $H_m$ ), 2,24-2,14 (m, 4H,  $H_d$ ), 1,96 – 1,82 (m, 4H,  $H_d$ ), 0,84 (2t,  $J = 7,5, 7,4$  Hz, 12H,  $H_f$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,0, 147,0, 138,0, 136,6, 134,1, 133,6, 133,2, 128,8, 128,6, 128,2, 128,1, 126,5, 125,2, 124,9, 123,7, 122,4, 120,8, 57,04, 56,77, 35,6, 30,7, 24,5, 24,415, 20,6, 11,2, 11,16. ESI-MS  $m/z$  calcd  $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{IN}_6\text{O}_5^+$ : 953,3, found 953,3. IR (KBr): 3110, 2963, 2847, 2346, 1693, 1651, 1593, 1576, 1503, 1343, 1293, 1256, 1193, 1088, 940, 809, 748  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max/nm}}$  ( $\log \epsilon$ ): 506 (4,49), 544 (4,65).

### 2.8.2.4 Síntesis de *N,N'*-di(etilpropil)-1-7(6)-di[2',6'-(3''-metilimidazol-1'')-ilmetil]-4'-metilfenoxi]perileno-3,4:9,10-tetracarboxidiimida (**PDI-2**)



Una melca de **PDI-4** (60 mg, 0,08 mmol), y THF seco (6 mL) se añadieron a un tubo de presión y se le pasó una corriente de nitrógeno durante cinco minutos. A continuación, se le añadió yoduro de metilo (5 mL, 8,03 mmol) y se calentó la mezcla a 85 °C durante dos días. Pasado el tiempo de reacción, la temperatura se bajo a 50 °C y se mantuvo a vacío toda la noche. Después de enfriar, el sólido obtenido se filtró y se lavó varias veces con cloroformo, obteniendo 40 mg de la **PDI-2** como un sólido rosa oscuro (41%) sin necesitar etapas posteriores de purificación. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,49 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, HAr-PDI), 9,07 (s, 4H, H<sub>j</sub>), 8,60 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 7,56-7,52 (m, 14H, HAr-PDI, H<sub>f</sub>, H<sub>h</sub>, H<sub>i</sub>), 5,42 (d, *J* = 15,3 Hz, 4H, H<sub>g</sub>), 5,35 (d, *J* = 15,3 Hz, 4H, H<sub>g'</sub>), 4,89 (s, 2H, H<sub>c</sub>), 3,67 (s, 12H, H<sub>k</sub>), 2,12 (bs, 4H, H<sub>b</sub>), 1,91-1,84 (m, 4H, H<sub>b</sub>), 0,83 (t, *J* = 7.4 Hz, 16H, H<sub>d</sub>). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 154,5, 146,7, 137,8, 136,8, 132,8, 132,7, 129,7, 129,1, 128,1, 124,4, 123,7, 122,5, 121,1, 57,0, 47,4, 35,3, 24,4, 20,6, 11,2. ESI-MS *m/z* calcd C<sub>68</sub>H<sub>69</sub>I<sub>3</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>: 1503,3, emcontrado 1503,3. IR (KBr): 3109, 2963, 2975, 1694, 1654, 1693, 1510, 1549, 1407, 1330, 1262, 1076, 810, 752, 661 cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max/nm</sub> (log ε):512 (4,40), 551 (4,61).

ANEXO I

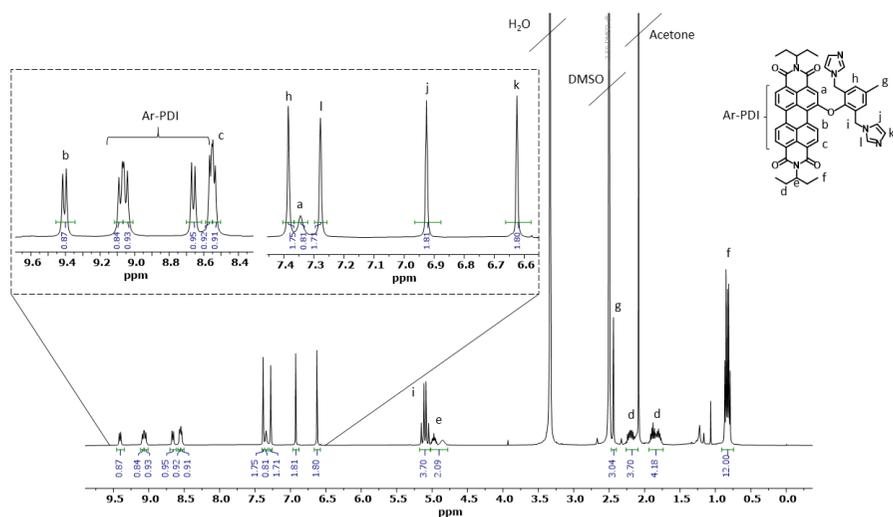


Figura AI.1: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la PDI-3.

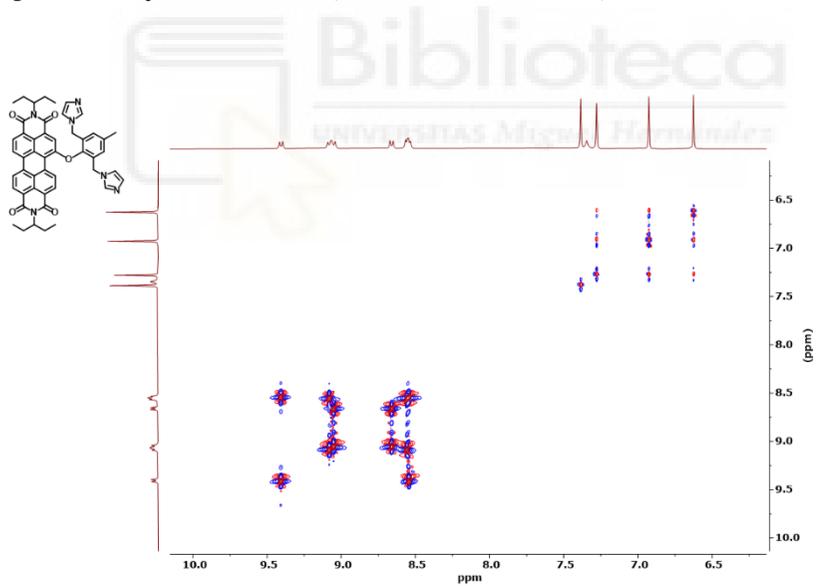
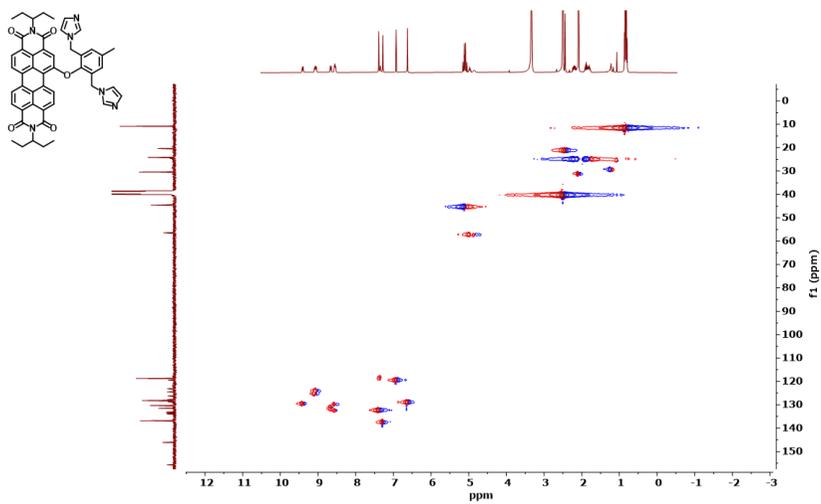
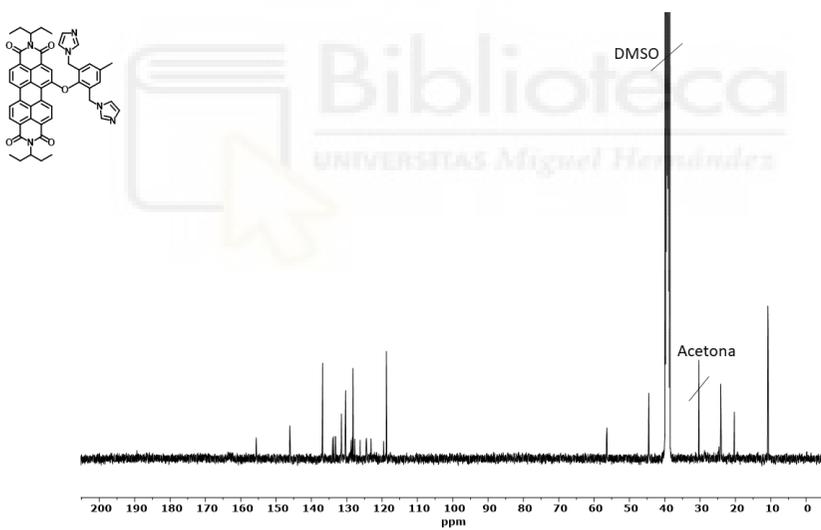


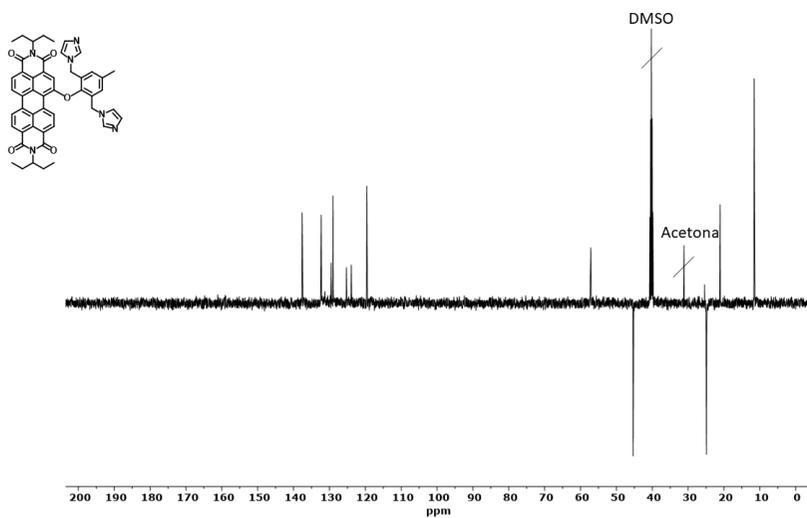
Figura AI.2: Espectro COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la PDI-3.



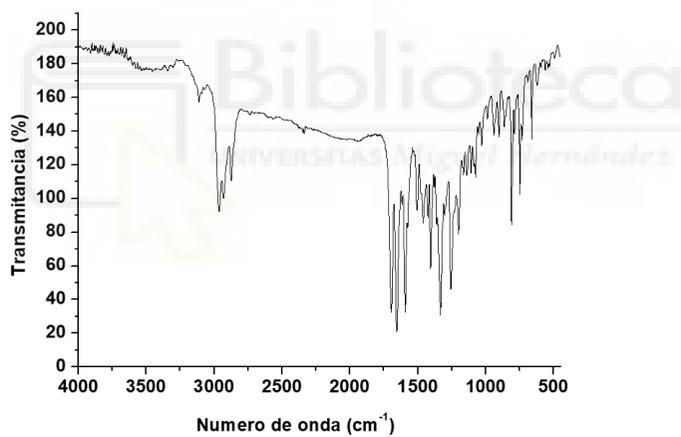
**Figura AI.3:** Espectro HSQC (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de la **PDI-3**.



**Figura AI.4:** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de la **PDI-3**.



**Figura AI.5:** Espectro DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de la **PDI-3**.



**Figura AI.6:** Espectro FT-IR (KBr) de la **PDI-3**.

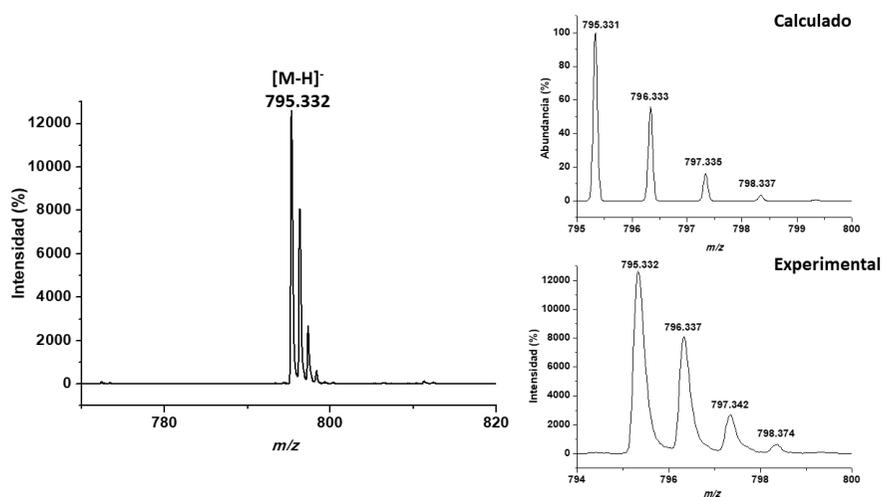


Figura A1.7: Espectro MALDI-TOF de la PDI-3.

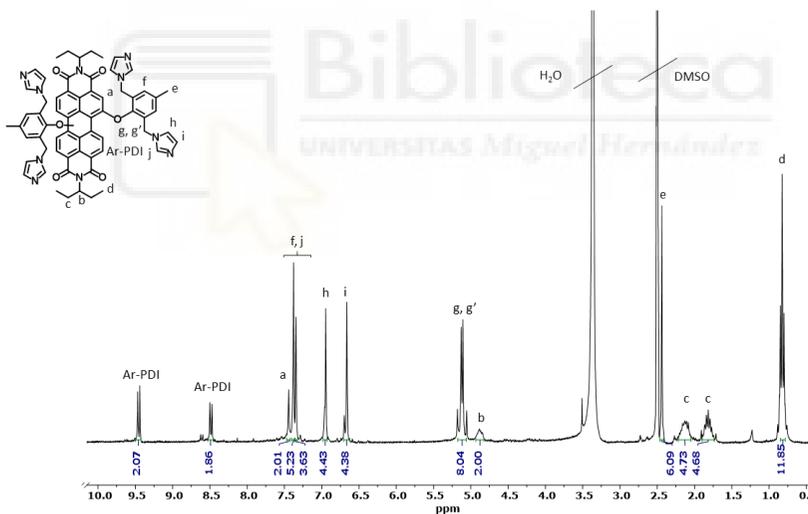
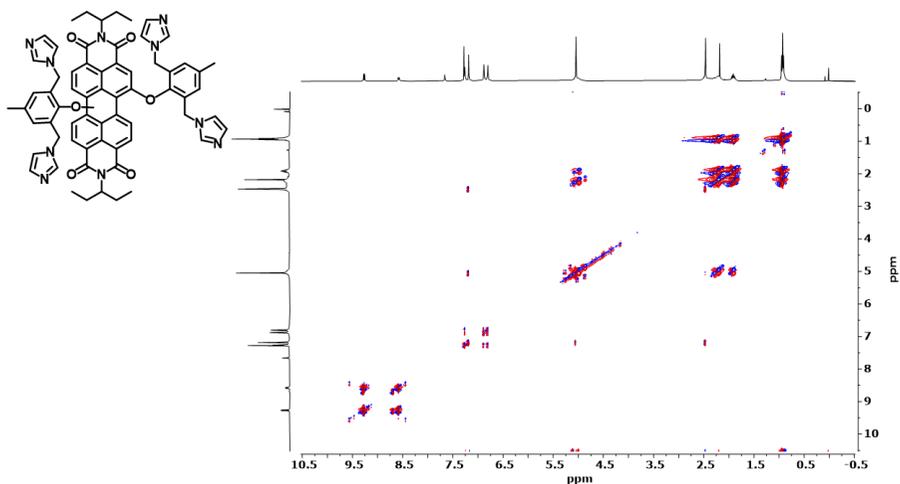
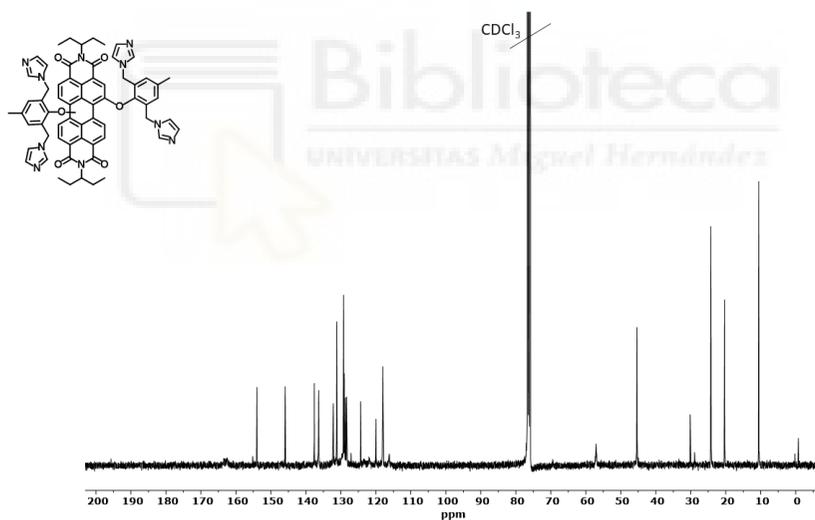


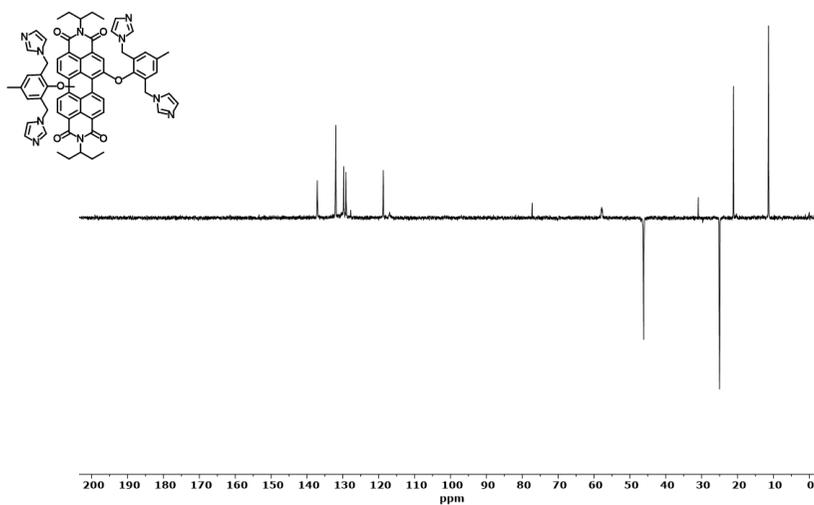
Figura A1.8: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C) de la PDI-4.



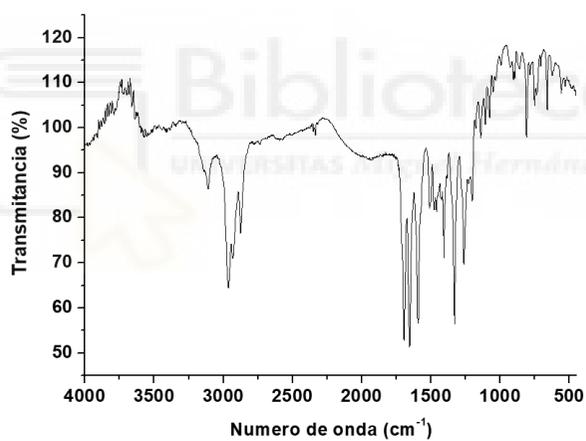
**Figura AI.9:** Espectro COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la **PDI-4**.



**Figura AI.10:** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la **PDI-4**.



**Figura AI.11:** Espectro DEPT-135 (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) de la PDI-4.



**Figura AI.12:** Espectro FT-IR (KBr) de la PDI-4.

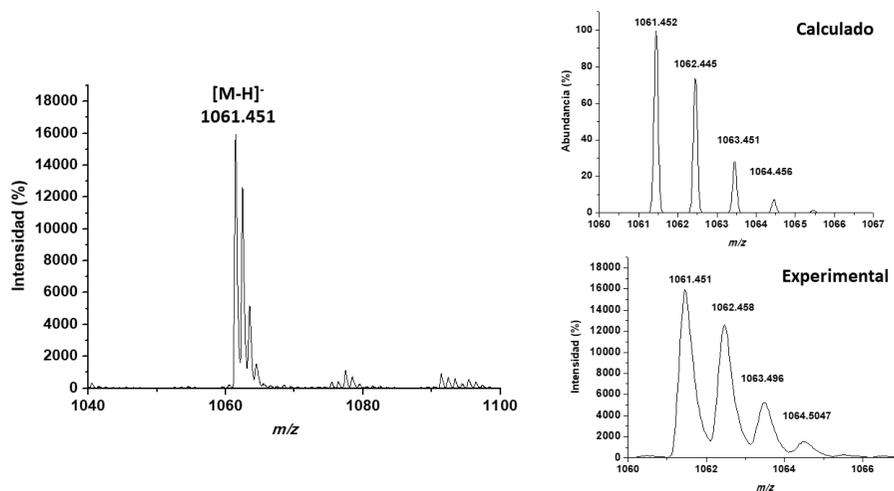


Figura AI.13: Espectro MALDI-TOF de la PDI-4.

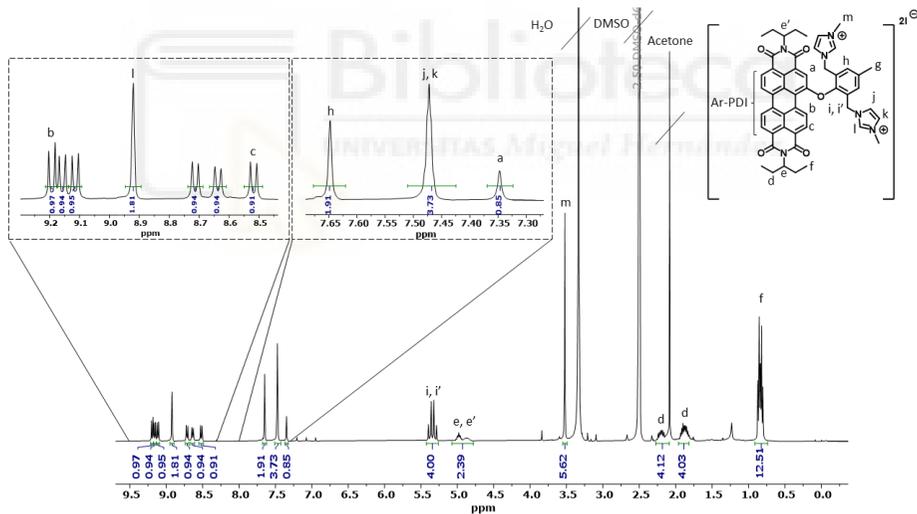


Figura AI.14: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 25  $^\circ\text{C}$ ) de la PDI-1.

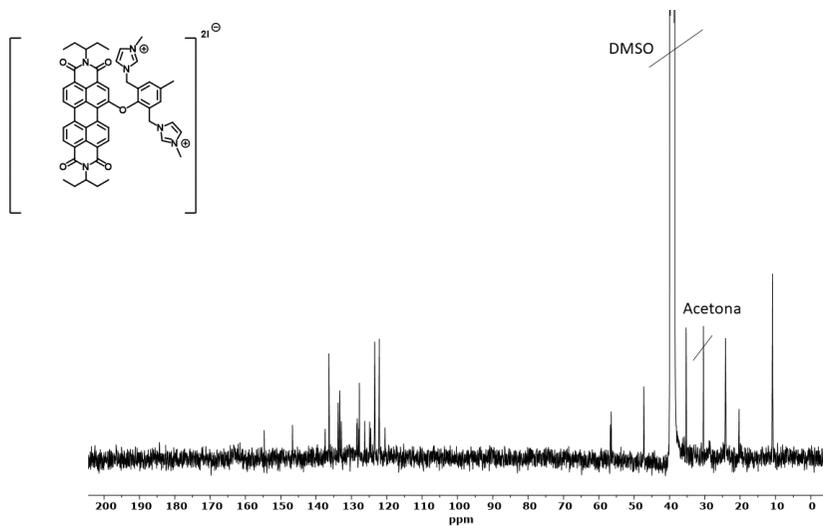


Figura AI.15: Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C) de la PDI-1.

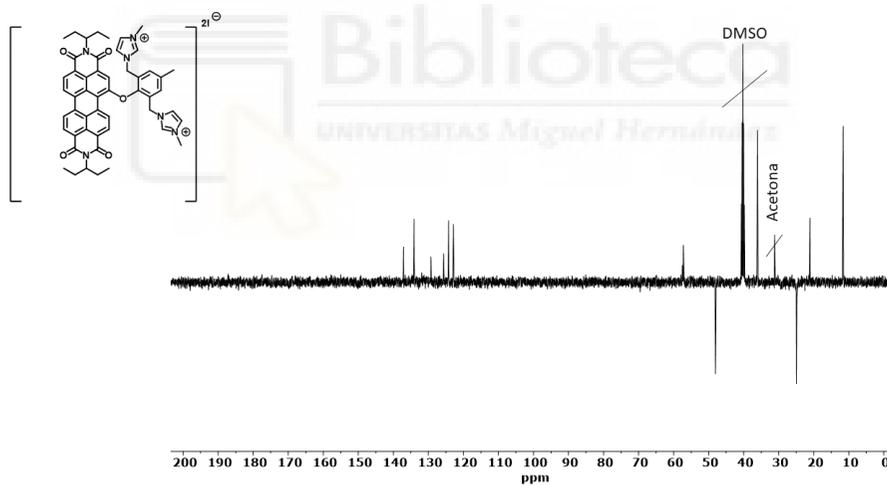
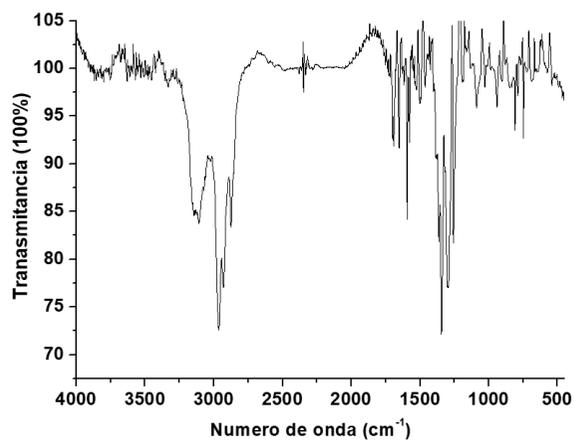
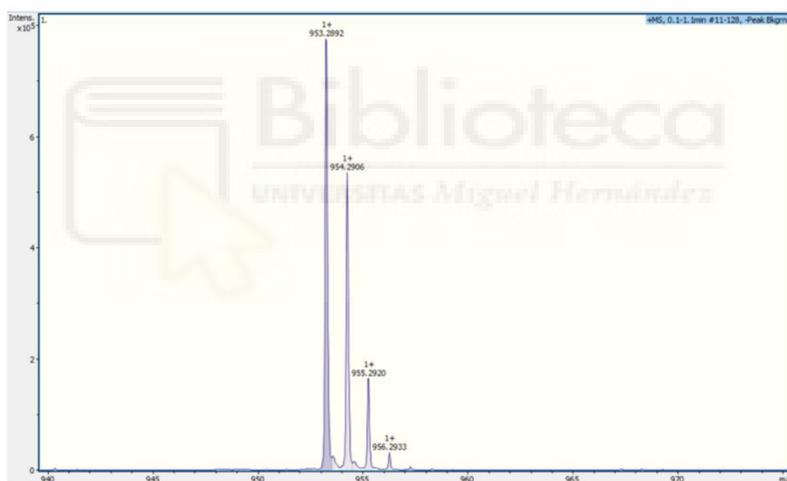


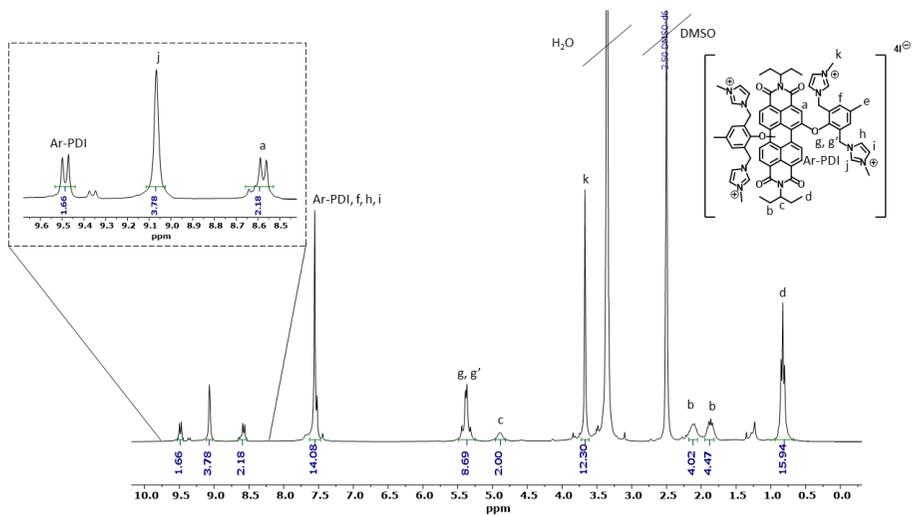
Figura AI.16: Espectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 °C) de la PDI-1.



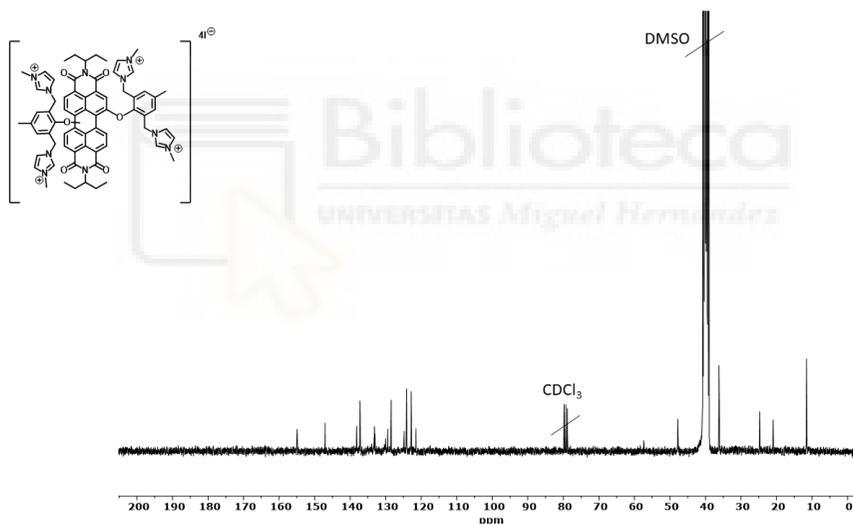
**Figura AI.17:** Espectro FT-IR (KBr) de la **PDI-1**.



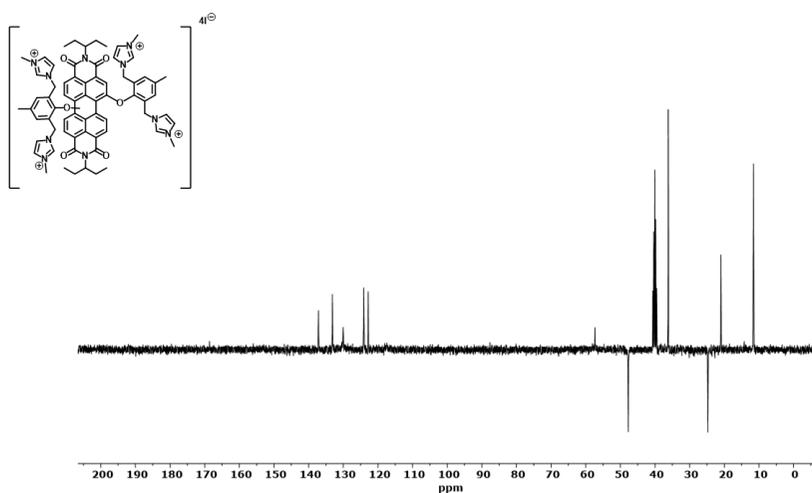
**Figura AI.18:** Espectro ESI de la **PDI-1**.



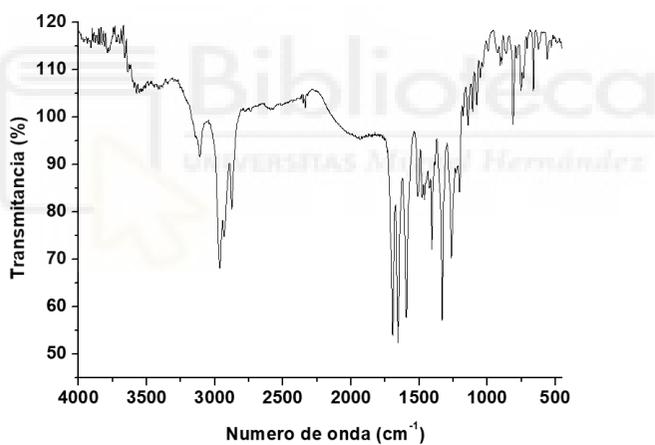
**Figura AI.19:** Espectro  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25  $^\circ\text{C}$ ) de la **PDI-2**.



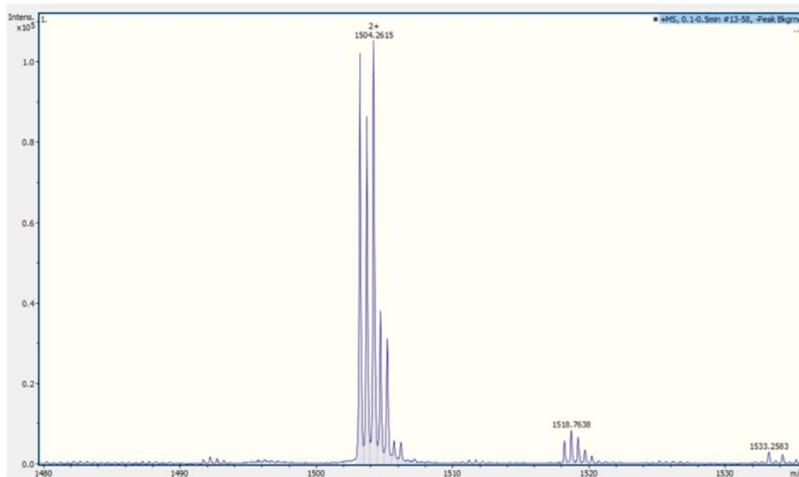
**Figura AI.20:** Espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25  $^\circ\text{C}$ ) de la **PDI-2**.



**Figura AI.21:** Espectro DEPT-135 (100 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) de la **PDI-2**.



**Figura AI.22:** Espectro FT-IR (KBr) de la **PDI-2**.



**Figura A1.23:** Espectro ESI de la **PDI-2**.





## Capítulo 3

### **Síntesis, caracterización y estudios de citotoxicidad de complejos metálicos basados en dipiridilaminoperilenodiimidias**





### 3. Síntesis, caracterización y estudios de citotoxicidad de complejos metálicos basados en dipiridilaminoperilenodiimidias

#### 3.1. Metales en quimioterapia

##### 3.1.1. Un poco de historia

El uso de metales en medicina tiene su origen en las civilizaciones antiguas. Tanto la cultura egipcia y china conocían de forma indirecta la importancia que tenían los metales en el tratamiento de algunas dolencias; así, por ejemplo, usaban el mineral cinabrio (sulfuro de mercurio), debido a que se le atribuían propiedades medicinales. Con la llegada de “la teoría de las ciencias” entre los siglos IV y V a. de C. de la mano de los filósofos griegos Empédocles y Aristóteles, el conocimiento acerca del uso terapéutico de los metales se catapultó, siendo esta teoría apoyada por autores romanos como Plinio el Viejo y Aulo Cornelio Celso, que conocían los beneficios del cinabrio para el tratamiento de las enfermedades venéreas. Más tarde, entre los siglos IX y XI de nuestra era, los médicos Ibn Sina y Al-Razi, fueron reconocidos por el descubrimiento de los efectos toxicológicos del mercurio y su uso en el tratamiento de enfermedades de la piel.<sup>148</sup>

La medicina tradicional china utilizó ampliamente el trióxido de arsénico para tratar enfermedades como el reumatismo, la sífilis o la psoriasis, y también se le atribuían propiedades antisépticas.<sup>149</sup> Más tarde, durante en los siglos XVIII y XIX, el trióxido de arsénico fue el primer compuesto químico autorizado para el tratamiento de la leucemia, hasta que en el siglo XX fue reemplazado por los tratamientos anticancerígenos actuales.

Sin lugar a dudas, el metal al que más propiedades medicinales se le atribuyen es al oro.<sup>150</sup> La cultura china fue pionera en el uso medicinal de este metal 2.500 años antes de nuestra era, y en la Europa medieval muchos alquimistas prepararon elixires conocidos como *aurum potabile*. En las farmacopeas del siglo XVII, Nicholas Culpepper defendía el uso del oro para tratar enfermedades degenerativas, fiebre, fatiga o incluso la melancolía. Fue en el siglo XIX cuando se usó un complejo de oro,  $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$ , para tratar la sífilis; a este compuesto lo llamaron “muriato de oro y soda” ya que lo obtenían mezclando tricloruro de oro y cloruro de sodio. El conocimiento de del uso del oro, tal y como la conocemos hoy en día, llegó a principios del siglo XX, cuando el alemán Robert Koch descubrió las propiedades bactericidas del  $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$  contra el bacilo que producía la tuberculosis, causante también de dolencias como la artritis; por ello, en la década de 1920 se comenzó a utilizar compuestos de oro contra la artritis. La gran revolución en el uso médico de los metales surgió en 1969, cuando Barnett Rosenberg y Lorreta Van Camp descubrieron las propiedades anticancerígenas de los compuestos de platino, en concreto del cis-platino<sup>151</sup>, esto junto al descubrimiento del auranofin, una tioglucosa de oro comercializada para el tratamiento de la artritis, en 1985 dio pie a las posteriores investigaciones en torno a este metal para

---

<sup>148</sup> Norn, S.; Permin, H.; Kruse, E.; Kruse, P. R. *Dan. Medicinhist. Arbog.* **2008**, *36*, 21-40.

<sup>149</sup> Agnew, J. *Medicine in the Old West: a history*; McFarland & CO: Jefferson, N. C., 2010

<sup>150</sup> Fricker, S. P. *Gold Bull.* **1996**, *29*, 53-60.

<sup>151</sup> Rosenberg. B.; Van Camp. L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature*, **1969**, *222*, 385-386.

utilizarlo por ejemplo como un agente anticancerígeno. De estos descubrimientos emergió la investigación y el uso de metales en medicina tal y como los conocemos hoy en día.

### **3.1.2. Propiedades de los complejos metálicos o compuestos de coordinación**

Los metales desempeñan un rol fundamental en el cuerpo humano, ya que forman parte de los componentes celulares,<sup>152</sup> normalmente se encuentran localizados en el centro activo de enzimas y están involucrados en numerosos procesos biológicos, como por ejemplo el intercambio de electrones, catálisis o funciones estructurales.<sup>153</sup> Algunos de estos metales son el zinc, cobre, hierro, cobalto, sodio, magnesio entre otros.<sup>154</sup> Por lo tanto, es necesario un balance entre las necesidades celulares y la cantidad de metal que poseemos en el organismo ya que una desregulación de estos niveles hace que el desarrollo bioquímico en el cual están implicados estos metales no funcione correctamente y de lugar a diversos tipos de enfermedades, como por ejemplo, cáncer.<sup>155</sup>

Como se ha comentado anteriormente, el cisplatino y sus derivados como el oxaliplatino y el carboplatino (Figura 1), fueron los primeros compuestos de coordinación descubiertos a los que se atribuyen propiedades anticancerígenas. Por ello, los estudios siguientes se centraron en la búsqueda de otros complejos formados por metales de transición, para mejorar las propiedades de los complejos de platino. Los metales de transición poseen diferentes estados de oxidación que les permiten reaccionar con diversas moléculas cargadas negativamente, dando lugar a una amplia variedad de complejos metálicos con potencial uso en medicina, exhibiendo diferentes propiedades biológicas como, por ejemplo, antiinflamatorias, antidiabéticas y por supuesto anticancerígenas. De forma paralela, el avance en la química de coordinación ha hecho mejorar las posibles propiedades biológicas de los compuestos de coordinación debido al mayor conocimiento a la hora de sintetizar estos compuestos, controlando, por ejemplo, el intercambio de ligandos, de tal forma que no se den reacciones paralelas y existan menos efectos secundarios atribuidos al compuesto de coordinación. A continuación, se detallan las características que hacen que los complejos metálicos sean interesantes:

- Carga:<sup>156</sup> dependiendo del entorno químico y del tipo de ligando, el estado de oxidación del metal puede variar, dando lugar así a una gran variedad de especies cargadas. Una ventaja adicional de obtener el complejo en forma cargada es que en disolución acuosa puede interactuar con las cargas negativas que se encuentra en las membranas biológicas, por lo que tendrá mayor capacidad de penetración a través de ellas. Además, este tipo de moléculas podrá interactuar con biomoléculas que estén cargadas negativamente.

---

<sup>152</sup> Buccella, D.; Lim, M. H.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*(20), 13505-13508.

<sup>153</sup> Bruijninx, P.; Sadler, P. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 197-206.

<sup>154</sup> Mourriño, V.; Cattalini, J. P.; Boccaccini, A. R. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9*, 401-419.

<sup>155</sup> Yaman, M.; Kaya, G.; Yekeler, H. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 612-618.

<sup>156</sup> Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1813-1825.

- Estructura: una de las principales características de los complejos metálicos es la gran variedad de geometrías que presentan. El estado de oxidación del metal determinará tanto la longitud como el ángulo de enlace.<sup>157</sup> Está demostrado que la unión a biomoléculas se correlaciona con la complejidad estereoquímica de estructuras rígidas, pero bien definidas, requisito que los compuestos de coordinación cumplen. Esto supone una ventaja frente a las moléculas orgánicas, ya que, debido a la configuración electrónica del átomo de carbono, éste solo puede adquirir tres tipos de geometría.
- Interacción metal-ligando: existen diferentes tipos de interacciones entre el metal y el ligando. Las propiedades termodinámicas y cinéticas de esas interacciones determinarán, en algunos casos, que se produzcan reacciones de intercambio de ligando que permitan reaccionar al metal con biomoléculas.
- Propiedades ácido-base de Lewis: los metales se caracterizan por tener gran afinidad electrónica, actuando por lo tanto como ácidos de Lewis y polarizando los grupos que se coordinan al metal, lo que los convierte en catalizadores para la reacción de hidrólisis.
- Actividad redox: como se ha comentado con anterioridad, muchos de los metales de transición presentan numerosos estados de oxidación, lo que es importante a la hora de diseñar el futuro compuesto de coordinación. Es común que, en reacciones bioquímicas, el metal con un determinado número de oxidación sea el que catalice la reacción. También los diferentes estados de oxidación permiten selectividad, ya que, por ejemplo, un mismo metal puede ser activo biológicamente solo en uno de sus diversos estados de oxidación.

### 3.1.3. Metales con propiedades anticancerígenas

Como se ha comentado en el punto anterior, los compuestos de coordinación presentan características únicas que los hacen atractivos a la hora de funcionar como fármacos. Su correcto diseño permitirá unirse a biomoléculas o penetrar dentro de las células con el objetivo final de producir citotoxicidad. Muchos compuestos de coordinación han demostrado tener propiedades anticancerígenas, y algunos de ellos actualmente son fármacos autorizados para el tratamiento de esta enfermedad. A continuación, se hará una pequeña revisión de los metales más usados en quimioterapia contra el cáncer.

#### 3.1.3.1. Platino

El compuesto de coordinación pionero en el tratamiento del cáncer fue el cisplatino, *cis*-diaminodicloroplatino (II). Se trata de un complejo plano cuadrado de Pt<sup>2+</sup>, aprobado por la FDA en diciembre de 1978 bajo el nombre de PlatinoI® para el tratamiento de cáncer de vejiga, ovarios y testículos.<sup>158</sup> A día de hoy se sigue utilizando como agente antitumoral en otros tipos de cáncer. Una vez dentro del medio celular, el cisplatino sufre una reacción de intercambio de ligando, intercambiando uno de los ligandos cloro por una molécula de agua, debido a la baja concentración de iones cloruro en el medio celular.<sup>159</sup> De esta forma, el nuevo complejo de Pt<sup>2+</sup> es

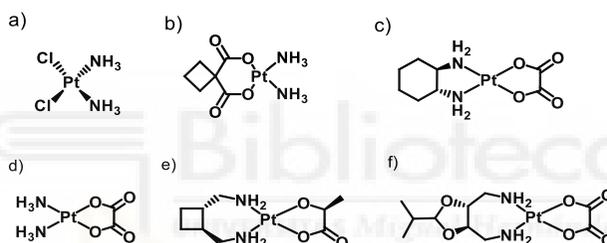
---

<sup>157</sup> Haas, K. L.; Franz, K. J. *Chem. Rev.* **2010**, *109*, 4921-4960.

<sup>158</sup> Monneret, C. *Ann. Pharm. Fr.* **2011**, *69*, 286-295.

<sup>159</sup> Berners-Price, S. J.; Ronconi, L.; Sadler, P. J. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros.* **2006**, *49*, 65-98.

biológicamente activo, coordinándose al N7 de las bases púricas del ADN, de tal forma que el cloro restante puede ser reemplazado por estas bases nitrogenadas, generalmente en la secuencia de nucleótidos guanina-guanina o adenina-guanina formando sistemas intercalados.<sup>160</sup> La generación de estos aductos de platino con bases nitrogenadas hace que el proceso de replicación del ADN no se pueda llevar a cabo, así como la transcripción y el ciclo celular, de tal forma que se produce la apoptosis celular. Con el objetivo de reducir los efectos secundarios que produce el cisplatino, se desarrollaron otros complejos de  $Pt^{2+}$ . El primero de ellos fue el carboplatino, ciclobutano-1,1-dicarboxilato de *cis*-diaminoplatino (II), comercializado y aprobado por la FDA como Paraplatin® (**Figura 3.1**) en 1979. En este caso, al tener seis puntos posibles de coordinación, el efecto quelante que puede producir es menor, de tal forma que se reducen los efectos secundarios.<sup>161</sup> El oxaliplatino, etanodioato de (1*R*,2*R*)-(N,N'-1,2-diaminociclohexano)platino (II), se aprobó en Europa en 1999 y por la FDA en 2002 bajo el nombre de Eloxatin®, y junto con el carboplatino, son los dos fármacos de platino de segunda generación.<sup>162</sup> A partir de estos surgieron otros, como por ejemplo el nedaplatino, el lobaplatino o el heptaplatino, los cuales están clínicamente aprobados en Japón, China y Corea del Sur (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1:** Estructura de a) cisplatino, b) carboplatino, c) oxaliplatino, d) nedaplatino, e) lobaplatino, f) heptaplatino.

El desarrollo de nuevas estructuras en relación a los fármacos ya existentes de platino, puede ser la solución para paliar del todo los efectos secundarios que presentan estos fármacos. Un ejemplo de este tipo de estructuras es el satraplatino, un complejo hexacoordinado de  $Pt^{+4}$ ,<sup>163</sup> que, aunque sigue presentando efectos secundarios, puede ser el cabeza de serie para el desarrollo de nuevas estructuras de platino con potentes propiedades biológicas.

### 3.1.3.2. Oro

Aunque se conocen desde la antigüedad las propiedades bioactivas de los compuestos de oro, en los últimos años han visto aumentado el foco de atención sobre ellos debido a sus propiedades anticancerígenas. Así, se han desarrollado moléculas en

<sup>160</sup> Reedijk, J. *PNAS* **2003**, *100*, 3611-3616.

<sup>161</sup> a) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Bioinorg. Chem.* **1973**, *2*, 187-210. b) Clere, M. J.; Hoeschele, J. D. *Platinum Met. Rev.* **1973**, *17*, 2. c) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D.; Rosenberg, B.; VanCamp, L. *Malonato platinum anti-tumor compounds*. U. S. 4657927, 1987.

<sup>162</sup> a) Kidani, Y.; Noji, M.; Tashiro, T.; Tashiro-Gann, T. *Jpn. J. Cancer Res.* **1980**, *71*, 637-643. b) Kidani, Y.; Masahide, N. *Cytostatic platinum organic complexes*. US. 4710577-A, 1987.

<sup>163</sup> Hensing, T. A.; Hann, N. H.; Gillenwater, H. H.; Camboni, M. G.; Allievi, C.; Socinski, M. A. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, *17*, 697-704.

las que el oro, en sus dos estados de oxidación, tiene actividad biológica. Normalmente, este tipo de moléculas están estabilizadas por ligandos fosfina o con átomos que le cedan carga, como nitrógenos. Los estudios realizados indican que la interacción con el ADN, y por lo tanto la muerte celular, no se produce de la misma forma que con los compuestos de platino.<sup>164</sup> Muchos estudios sugieren que las principales dianas terapéuticas de los compuestos de oro son las vías de fosforilación oxidativa y las mitocondrias.<sup>165</sup> La inhibición de la seleno-enzima tioredoxina reductasa (TrxR) mediante los compuestos de oro parece ser otro mecanismo capaz de producir citotoxicidad, ya que la inhibición de esta enzima conduce a la apoptosis celular a través de la mitocondria.<sup>166</sup> A parte de esta enzima, existen otras como la proteasa de cisteína cathepsina, que es una potente diana terapéutica para complejos de oro (III).<sup>167</sup> Esta enzima está relacionada con diversas afecciones, como procesos cancerígenos o inflamatorios. Estudios realizados por Che y colaboradores, demostraron que complejos ciclometalados de oro (III) son capaces de inhibir deubiquitininas, hidrolizando enlaces peptídicos o isopeptídicos, siendo las cisteínas proteasas las encargadas de regular el sistema de ubiquitinas.<sup>168</sup> Los carbenos *N*-heterocíclicos de oro (I) han mostrado también ser inhibidores de la tirosina fosfatasa (PTPs) dependiente de cisteína, esta enzima está involucrada en varios procesos del ciclo celular, y por lo tanto se la considera diana de procesos antitumorales.<sup>169</sup>

A pesar de la evidente citotoxicidad de los complejos de oro, uno de los factores que se debe controlar es el tipo de ligando, ya que en el medio celular, existe la probabilidad de que los complejos de oro (III) se puedan reducir a oro (I).<sup>170</sup> Una opción para evitar esa reducción consiste en sintetizar complejos en los que haya un ligando con un átomo de carbono directamente enlazado al oro, de esa forma se estabilizará el oro (III); sin embargo, hay que tener en cuenta que este proceso redox puede ser interesante, ya que se pueden diseñar complejos de oro (III) que actúen como profármacos y que en medio biológico se reduzcan a oro (I). A continuación, se detallan los diferentes compuestos de oro con potencial biológico.

### 3.1.3.2.1. Oro (I)

Durante mucho tiempo este tipo de compuestos se han usado para el tratamiento de la tuberculosis o de la endocarditis, aunque donde más se han explotado ha sido como fármacos contra la artritis reumatoide.<sup>171</sup> Esta familia de compuestos está

---

<sup>164</sup> a) Casini, A.; Messori, L. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2647-2660. b) Nagy, E. M.; Ronconi, L.; Nardon, C.; Fregona, D. *Mini Rev Med. Chem.* **2012**, *12*, 1216-1229.

<sup>165</sup> a) Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. *Metallomics* **2011**, *3*, 863-873. b) Rackham, O.; Shearwood, A. M. J.; Thyer, R.; McNamara, E.; Davies, S. M. K.; Callus, B. A.; Miranda-Vizuete, A.; Berners-Price, S. J.; Cheng, Q.; Arnér, E. S. J.; Filipovska, A. *Free Radicals Biol. Med.* **2011**, *50*, 689-699.

<sup>166</sup> Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692-1707.

<sup>167</sup> Fricker, S. P. *Metallomics* **2010**, *2*, 366-377.

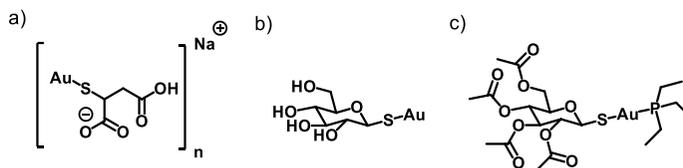
<sup>168</sup> a) Zhang, J. J.; Ng, K. M.; Lok, C. N.; Sun, R. W.; Che, C. M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5153-5155. b) Fraile, J. M.; Quesada, V.; Rodríguez, D.; Freije, J. M. P.; López-Otín, C. *Oncogene* **2012**, *31*, 2373-2388.

<sup>169</sup> Krishnamurthy, D.; Karver, M. R.; Fiorillo, E.; Orru, V.; Stanford, S. M.; Bottini, N.; Barrios, A. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4790-4795.

<sup>170</sup> Casini, A.; Cinelli, M. A.; Minghetti, G.; Gabbiani, C.; Coronello, M.; Mini, E.; Messori, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5524-5531.

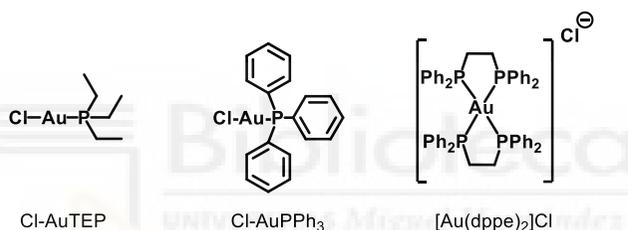
<sup>171</sup> a) Sadler, P. J. *Gold Bull.* **1976**, *9*, 110-118. b) Brown, D. H.; Smith, W. E. *Chem. Soc. Rev.* **1980**, *9*, 217-240. c) Leibfarth, J. H.; Persellin, R. H. *Agents Actions* **1981**, *11*, 458-472.

basada en tiolatos de oro (I), como por ejemplo el aurotiomalato de sodio o la tioglucosa de oro, pero el que más repercusión ha tenido ha sido la fosfina de oro (I) auranofin (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2:** Estructura de a) aurotiomalato de sodio, b) tioglucosa, c) auranofin.

Tras conocer los buenos resultados que ofrecía coordinar un grupo fosfina al oro, se desarrollaron otros complejos siguiendo la estructura (fosfina)oro (I). Existen varios ejemplos con esta estructura, desde la más básica donde el oro está coordinado a una sola fosfina aromática, como el cloruro de trifenilfosfinaoro (I) ([AuPPh<sub>3</sub>]Cl), a quelatos con un átomo de oro coordinado a cuatro grupos fosfina, como es el caso del cloruro de bis(etilendifenilfosfina)oro (I) ([Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl) (**Figura 3.3**).<sup>172</sup>



**Figura 3.3:** Estructura de complejos antitumorales de oro (I) con fosfinas.

Este tipo de complejos ha demostrado tener actividad inhibitoria frente a la inhibición de las enzimas glutatión reductasa y tioredoxina reductasa,<sup>173</sup> y en el caso de las especies quelantes, son capaces también de coordinarse al ADN y producir intercalaciones. En el caso de los complejos con mayor carácter lipófilo, como el [Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl, son capaces de atravesar y acumularse en la membrana mitocondrial produciendo finalmente su despolarización e induciendo de esta forma la muerte celular.<sup>174</sup> Por otro lado, los complejos de oro (I) con carbenos *N*-heterociclos (NHC) también presentan propiedades biológicas (**Figura 3.4**). En este caso, el enlace directo C-metal estabiliza al átomo de oro. Asimismo, la presencia de heterociclos origina más versatilidad sintética, pudiendo modificar las propiedades lipófilas con el fin de poder penetrar en el medio celular.<sup>175</sup> El modo de acción de estos compuestos es similar al de los anteriormente descritos, principalmente producen toxicidad por acumulación en las

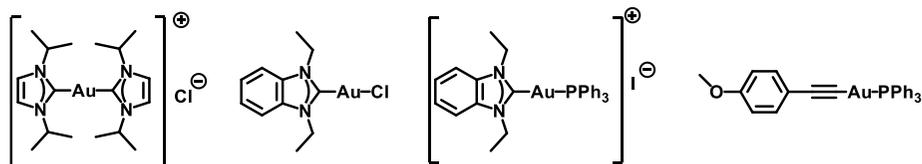
<sup>172</sup> Scheffler, H.; You Y.; Ott, I. *Polyhedron* **2010**, *29*, 66-69.

<sup>173</sup> Urig, S.; Fritz-Wolf, K.; Reau, R.; Herold-Mende, C.; Toth, K.; Davioud-Charvet, E.; Becker, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1881-1886.

<sup>174</sup> Humphreys, A. S.; Filipovska, A.; Berners-Prince, S. J.; Koutsantonis, G. A.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Dalton Trans.* **2007**, *43*, 4943-4950.

<sup>175</sup> Hopkinson, M. N.; Richter, C.; Schedler, M.; Glorius, F. *Nature* **2014**, *510*, 485-496.

mitocondrias e inhibiendo a la tioredoxina reductasa.<sup>176</sup> No solo los carbenos N-heterocíclicos pueden estabilizar a los complejos de oro (I), los grupos alquino también pueden, siendo este tipo de compuestos biológicamente activos también.<sup>177</sup>



**Figura 3.4:** Estructura de algunos complejos biológicamente activos de oro (I) con carbenos N-heterocíclicos y con ligandos alquino.

### 3.1.3.2.2. Oro (III)

El oro (III) presenta una configuración electrónica  $d^8$ , por lo tanto es isoeléctrico con el Pt (II), por lo que va a formar complejos con la misma geometría plano cuadrada que este último y presentará una actividad biológica similar. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, el oro (III) en medio fisiológico se reduce fácilmente a oro (I) o incluso a oro (0), por lo que uno de los mayores retos consiste en formar complejos estables. Para ello se han desarrollado una serie de complejos de oro (III) con ligandos quelantes bi-, tri- y tetradentados como la etilendiamina, la fenantrolina, la dietilentriammina o la terpiridina que le aportan estabilidad frente a la reducción.<sup>178</sup> Los ligandos ciclometalados también se utilizan para estabilizar este tipo de complejos de oro (III) en medio biológico<sup>179</sup> (Figura 3.5). El modo de acción de estos complejos depende plenamente de la naturaleza de los ligandos. En algunos casos, al igual que ocurre con los complejos de Pt (II), estos complejos de oro (III) se pueden coordinar con el ADN produciendo intercalaciones.<sup>180</sup> También estos compuestos con capaces de inhibir enzimas, como las acuaporinas o las deubiquitinasas, ya que como en el caso de la tioredoxina reductasa, posee grupos tioles que puede producir reacciones de intercambio de ligando con los complejos de oro (III) originando apoptosis celular.<sup>181</sup>

<sup>176</sup> a) Baker, M. V.; Barnard, P. J.; Berners-Price, S. J.; Brayshaw, S. K.; Hichery, J. L.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Dalton Trans.* **2004**, 3708-3715. b) Hickey, J. L.; Ruhayel, R. A.; Barnard, P. J.; Baker, M. V.; Bernes-Price-S. J.; Filipovska, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12570-12571.

<sup>177</sup> Andermark, V.; Göke, K.; Kokoschka, M.; Abu el Maaty, M. A.; Lum, C. T.; Zou, T.; Sun, R. W.-Y.; Aguilo, E.; Oehninger, L.; Rodriguez, L.; Bunjes, H.; Wölfl, S.; Che, C. M.; Ott, I. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *160*, 140-148.

<sup>178</sup> a) Messori, L.; Abbate, F.; Marcon, G.; Orioli, P.; Fontani, M.; Mini, E.; Mazzei, T.; Carotti, S.; O'Connell, T.; Zanello, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3541-3548. b) Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Gold Bull.* **2007**, *40*, 73-81. c) Yang, T.; Tu, C.; Zhang, J. Y.; Lin, L. P.; Zhang, X. M.; Liu, Q.; Ding, J.; Xu, Q.; Guo, Z. *Dalton Trans.* **2003**, 3419-3424.

<sup>179</sup> Kumar, R.; Nevado, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1994-2015.

<sup>180</sup> Yang, T.; Tu, C.; Zhang, J. Y.; Lin, P.; Zhang, X. M.; Liu, Q.; Ding, J.; Xu, Q.; Guo, Z. *Dalton Trans.* **2003**, 3419-3424.

<sup>181</sup> Martins, A. P.; Maronne, A.; Ciancetta, A.; Cobo, A. G.; Echevarría, M.; Moura, T. F.; Re, N.; Casini, A.; Soveral, G. *PlosOne* **2012**, *7*, e37435. b) Zhang, J. J.; Ng, K. M.; Lok, C. N.; Sun, R. W. Y.; Che, C. M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5153-5155. c) Altaf, M.; Monim-ul-Mehboob, M.; Kawde, A. N.; Corona, G.; Larcher, R.; Ogasawara, M.; Casagrande, N.; Celegato, M.; Borghese, C.; Siddik, Z. H.; Aldinucci, D.; Isab, A. A. *Oncotarget* **2017**, *8*, 490-505.

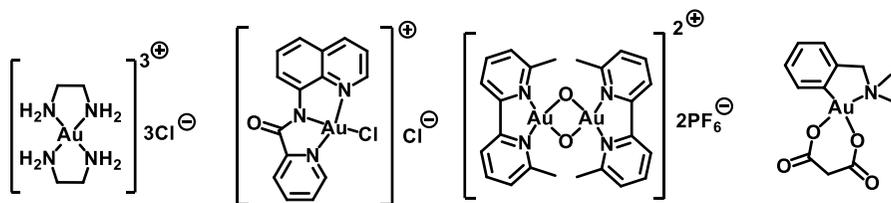


Figura 3.5: Estructura de compuestos de coordinación de oro (III) biológicamente activos.

### 3.1.3.2. Plata

Los primeros usos de la plata en medicina se remontan a la época romana, donde la usaban en forma de nitrato para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas en neonatales.<sup>182</sup> Con el descubrimiento de los antibióticos en el año 1940, el uso de la plata en medicina cobró importancia, ya que a este metal se le atribuyen propiedades antibacterianas,<sup>183</sup> por lo que se ha explotado esta aplicación, sobre todo en quemaduras, durante muchos años, e incluso hoy en día. Las sales inorgánicas de plata o sus complejos han sido la forma más usada de este metal, como por ejemplo el nitrato de plata, las sulfonamidas de plata o las sulfodiazinas de plata. La desventaja de utilizar nitratos de plata radica en la alta solubilidad de éstos en medio fisiológico, que viene acompañada de una disociación total seguida de inactivación de su efecto terapéutico.<sup>184</sup> Las sulfodiazinas de plata, por otro lado, han mostrado tener un grado elevado de citotoxicidad, sobre todo cuando se aplican en forma de cremas sobre piel sana, ya que la Ag (I) se absorbe tan rápido que finalmente acaba inactivándose debido a que forma complejos con otros iones que encuentre disponibles, presentando por lo tanto poca estabilidad.<sup>185</sup> Sin embargo, una de las ventajas que ofrece la plata frente a otros metales es que los derivados de esta se pueden tolerar en bajas dosis sin peligro,<sup>186</sup> de ahí que la plata se convierta en un metal interesante para utilizarlo como metalofármaco.

El mecanismo de acción anticancerígena de los complejos de plata no está bien establecido, sin embargo, se conocen posibles dianas terapéuticas de este metal. Se le atribuyen propiedades antiproliferativas debido a que es capaz de inhibir diferentes tipos de enzimas, como la tiorredoxina reductasa,<sup>187</sup> la topoisomerasa I<sup>188</sup> o la

<sup>182</sup> Hill, W. R.; Pillsbury, D. M. *Argyria: the pharmacology of silver*; Williams & Wilkins Baltimore, 1939.

<sup>183</sup> a) Lansdown, A. B G. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2010**, *2010*, 910686. b) Patra, M.; Gasser, G.; Metzler-Nolte, N. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6350–6358.

<sup>184</sup> Atiyeh, B. S.; Costagliola, M.; Hayek, S. N.; Dibo, S. A. *Burns* **2007**, *33*, 139-148.

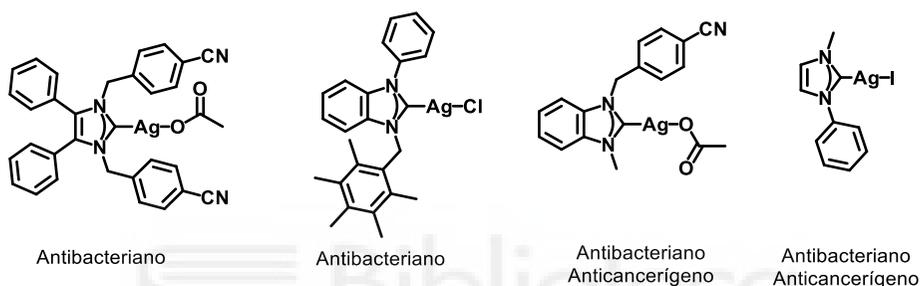
<sup>185</sup> a) Brandt, O.; Mildner, M.; Egger, A. E.; Groessl, M.; Rix, U.; Posch, M.; Keppler, B. K.; Strupp, C.; Mueller, B.; Stingl, G. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 478-488. b) Gurunathan, S.; Han, J. W.; Kwon, D. N.; Kim, J. H. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 373.

<sup>186</sup> Zhang, S.; Du, C.; Wang, Z.; Han, X.; Zhang, K.; Liu, L. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 739-744.

<sup>187</sup> Pelli, M.; Gandin, V.; Marinelli, M.; Orsetti, A.; Del Bello, F.; Santini, C.; Marzano, C. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 21041.

<sup>188</sup> Allison, S. J.; Sadiq, M.; Baronou, E.; Cooper, P. A.; Dunnill, C.; Georgopoulos, N. T.; Latif, A.; Shepherd, S.; Shnyder, S. D.; Stratford, I. J.; Wheelhouse, R. T.; Willans, C. E.; Phillips, R. M. *Cancer Lett.* **2017**, *403*, 98-107.

lipooxigenasa.<sup>189</sup> También estos compuestos pueden producir intercalaciones con el ADN. Por lo general, los complejos de plata producen la muerte celular mediante apoptosis debido a la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial.<sup>189</sup> Aunque no se conozca bien el mecanismo de acción, es evidente que la presencia de plata (I) dentro del medio celular altera su función, por lo tanto, es fundamental un buen diseño para formar el complejo. De esta forma, se han ido desarrollando diversos tipos de complejos de plata (I) con actividad biológica. Los ligandos carbeno *N*-heterocíclicos de plata (I) han demostrado ser potentes agentes antibacterianos<sup>190</sup> y anticancerígenos,<sup>191</sup> teniendo eficacia frente a bacterias Gram-positivas y negativas y también frente a diferentes tipos de cáncer, como el de ovario o el renal. Debido a versatilidad sintética y a la gran estabilidad del enlace que ofrece este tipo de ligandos, se han desarrollado diversos tipos de complejos metálicos con esta estructura (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6:** Estructura de carbenos *N*-heterocíclicos de plata (I) biológicamente activos.

A parte de los ligando del tipo NHC, existe una variedad de ligandos que pueden coordinarse a la plata (I), siendo algunos ejemplos los ácidos carboxílicos,<sup>192</sup> las fosfinas,<sup>193</sup> o ligandos dadores de electrones, como los N- o S- dadores,<sup>194</sup> presentando todos ellos actividad biológica (**Figura 7**).

<sup>189</sup> Banti, C. N.; Giannoulis, A. D.; Kourkoumelis, N.; Owczarzak, A. M.; Poyraz, M.; Kubicki, M.; Charalabopoulos, K.; Hadjikakou, S. K. *Metallomics* **2012**, *4*, 545–560.

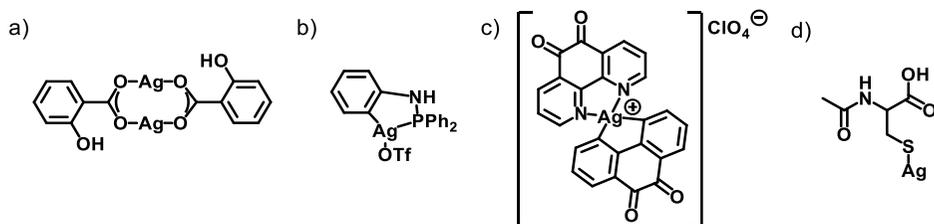
<sup>190</sup> a) Patil, S.; Deally, A.; Gleeson, B.; Muller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M. *Metallomics* **2011**, *3*, 74–88. b) Tacke, M. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *782*, 17–21

<sup>191</sup> a) Medvetz, D. A.; Hindi, K. M.; Panzner, M. J.; Ditto, A. J.; Yun, Y. H.; Youngs, W. J. *Met. Based Drugs* **2008**, *2008*, 1–7. b) Hackenberg, F.; Tacke, M. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 8144–8153.

<sup>192</sup> Fourie, E.; Erasmus, E.; Swarts, J. C.; Tuchscherer, A.; Jakob, A.; Lang, H.; Joone, G. K.; Van Rensburg, C. E. *J. Anticancer Res.* **2012**, *32*, 519–522.

<sup>193</sup> Santini, C.; Pellei, M.; Papini, G.; Morresi, B.; Galassi, R.; Ricci, S.; Tisato, F.; Porchia, M.; Rigobello, M. P.; Gandin, V.; Marzano, C. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 232.

<sup>194</sup> Mármol, I.; Montanel-Pérez, S.; Royo, J. C.; Gimeno, M. C.; Villacampa, M. D.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 17732–17745.



**Figura 3.7:** Estructura de complejos de plata (I) biológicamente activos, a) ligando carboxilato, b) ligando fosfina, c) ligando N-dador, d) ligando S-dador.

### 3.1.3.3. Cobre

El cobre es un elemento fundamental que, debido a sus propiedades redox, está implicado en la funcionalidad de diversas enzimas y proteínas involucradas en rutas metabólicas, respiración celular o síntesis de ADN. Algunas de estas enzimas son la citocromo C oxidasa, la superóxido dismutasa o la ascorbato oxidasa.<sup>195</sup> El papel fundamental del cobre en el medio biológico consiste en llevar a cabo reacciones redox en las que directamente reacciona con el oxígeno molecular, dando lugar a radicales libres, por lo que es necesario que haya una buena regulación homeostática del cobre en el organismo, ya que un exceso de este puede producir efectos tóxicos.<sup>196</sup> Estas propiedades redox hacen que el cobre no sólo esté limitado a propiedades terapéuticas antiproliferativas, sino que también puede actuar como agente bactericida,<sup>197</sup> en procesos inflamatorios<sup>198</sup> o frente a virus.<sup>199</sup> Debido a estas características, el desarrollo de complejos basados en cobre con actividad antitumoral es un área interesante en química médica.<sup>200</sup>

Igual que en el caso de la plata o el oro, el cobre puede formar complejos con diferentes tipos de ligandos; sin embargo, hay un grupo importante de complejos de cobre (II), formados por ligandos N- y O-dadores, que se conocen como casiopeínas. Dentro de esta familia existen variedad de estructuras con actividad frente a diversos tipos de cáncer, en concreto, la casiopeína III-ia (Cas-III-ia) y la casiopeína Gly II (Cas-II-gly) se encuentran en ensayos clínicos para el tratamiento de la leucemia<sup>201</sup> (**Figura 3.8**).

<sup>195</sup> Fengyi, Z.; Weifan, W.; Wen, L.; Li, X.; Shilong, Y.; Xu-Min, C.; Mengyi, Z.; Meng, L.; Mengtao, M.; Hai-Jun, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 451–459.

<sup>196</sup> Chudal, L.; Pandey, N. K.; Phan, J.; Johnson, O.; Lin, L.; Yu, H.; Shu, Y.; Huang, Z.; Xing, M.; Liu, J. *P. ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 1804–1814.

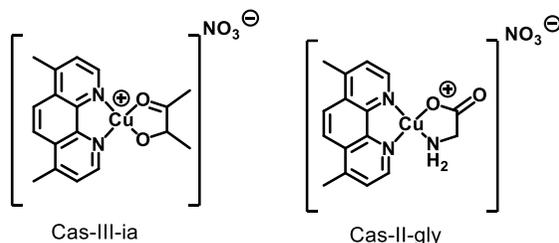
<sup>197</sup> Stanila, A.; Braicu, C.; Stanila, S.; Pop, R.M. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj-Na* **2011**, *39*, 124–129.

<sup>198</sup> Roch-Arveiller, M.; Huy, D. P.; Maman, L.; Giroud, J.-P.; Sorenson, J. R. *J. Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 569–574.

<sup>199</sup> Lebon, F.; Boggetto, N.; Ledecq, M.; Durant, F.; Benatallah, Z.; Sicsic, S.; Lapouyade, R.; Kahn, O.; Mouthys-Mickalad, A.; Deby-Dupont, G. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1863–1873

<sup>200</sup> a) Pellei, M.; Bagnarelli, L.; Luciani, L.; Del Bello, F.; Giorgioni, G.; Piergentili, A.; Quaglia, W.; De Franco, M.; Gandin, V.; Marzano, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2616. b) Takjoo, R.; Centore, R.; Hayatolghaibi, S. *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *471*, 587–594.

<sup>201</sup> Correia, I.; Borovic, S.; Cavaco, I.; Matos, C. P.; Roy, S.; Santos, H. M.; Fernandes, L.; Capelo, J. L.; Ruiz-Azuara, L.; Pessoa, J. C. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *175*, 284–297.



**Figura 3.8:** Estructura de Cas-III-ia y Cas-II-gly.

Las casiopeínas pueden producir muerte celular por varias vías, incluyendo la formación de especies reactivas de oxígeno que inhiben la respiración celular y la síntesis de ATP, o el daño celular por intercalación con el ADN.<sup>202</sup>

### 3.1.3.4. Otros metales

Aunque el oro, la plata y el cobre han sido los metales más usados en terapia, actualmente se está investigando el uso de metales como el galio, el rutenio o el iridio para el tratamiento contra el cáncer (**Figura 3.9**).

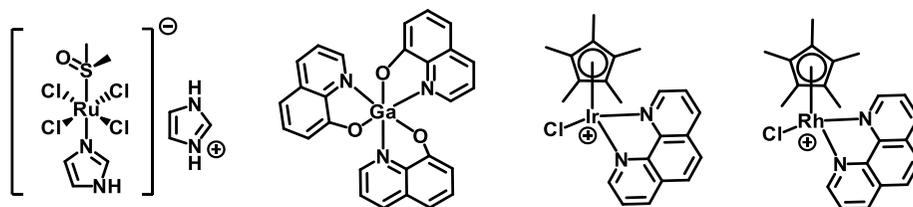
Tanto el rutenio (III) como el galio (III), son capaces de mimetizar el efecto del hierro y pueden coordinarse a la transferrina.<sup>203</sup> Esta proteína se encarga de transportar el hierro en sangre y se encuentra sobreexpresada en células cancerígenas, por lo tanto, estos complejos se dirigirán a este tipo de células, produciendo toxicidad. En el caso del rutenio (III), debido a los bajos niveles de oxígeno en las células cancerígenas, se reducirá a rutenio (II), el cual resulta sumamente citotóxico. También el complejo galio (III)-transferrina, inhibe la liberación de hierro hacia la célula, hecho que afecta a la función mitocondrial y, por lo tanto, a la proliferación celular. Por otro lado, el galio (III) también es capaz de coordinarse a enzimas como la ribonucleótido reductasa, la cual es responsable de la síntesis de ADN, produciendo de esta forma muerte celular.<sup>204</sup>

El iridio (III) y el rodio (III) también son capaces de provocar muerte celular. Estos metales también producen reacciones redox en el medio celular, creando daño celular mediante estrés oxidativo en el caso del iridio, y estrés reductivo en el caso del rodio. Los complejos de iridio (III) ciclotometalados también son utilizados en terapia fotodinámica, al ser capaces de producir especies reactivas de oxígeno.

<sup>202</sup> a) Galindo-Murillo, R.; García-Ramos, J. C.; Ruiz-Azuara, L.; Cheatham, T. E.; Cortés-Guzman, F. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5364–5376. b) Rodríguez-Enriquez, S.; Vital-González, P. A.; Flores-Rodríguez, F. L.; Marín-Hernández, A.; Ruiz-Azuara, L.; Moreno-Sánchez, R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *215*, 208–217.

<sup>203</sup> a) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 3201–3209. b) Vacca, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 993–998.

<sup>204</sup> a) Chitambar, C. R. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1257–1272. b) Collery, P.; Keppler, B.; Madoylet, C.; Deseize, B. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 283–296.

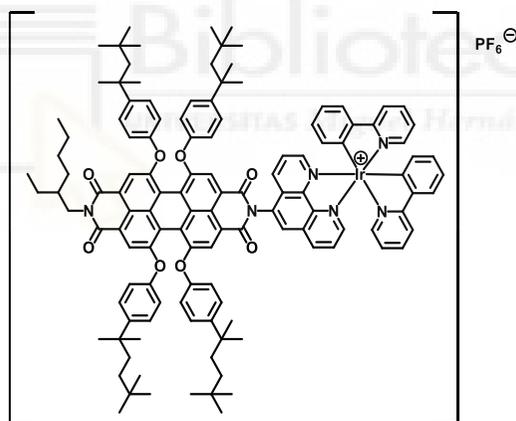


**Figura 3.9:** Estructura de complejos de rutenio, galio, iridio y rodio biológicamente activos.

### 3.2. Antecedentes: PDI funcionalizadas con metales

Debido a la versatilidad sintética que presentan las PDI, éstas se pueden funcionalizar fácilmente con grupos quelantes, lo que da acceso a la formación de compuestos de coordinación. Este tipo de PDI metaladas han sido aplicadas en diversas disciplinas como son la fotovoltaica orgánica, química médica o el campo de los sensores biológicos.

Nuestro grupo de investigación fue uno de los pioneros en la síntesis de este tipo de complejos PDI-metal. En 2009, se sintetizó una PDI asimétrica funcionalizada en una de las posiciones imida con un grupo fenantrolina como unidad quelante. Finalmente, esta PDI se hizo reaccionar con un complejo de iridio (III) con ligandos fenilpiridina para formar la PDI-Ir (**Figura 3.10**).<sup>205</sup>



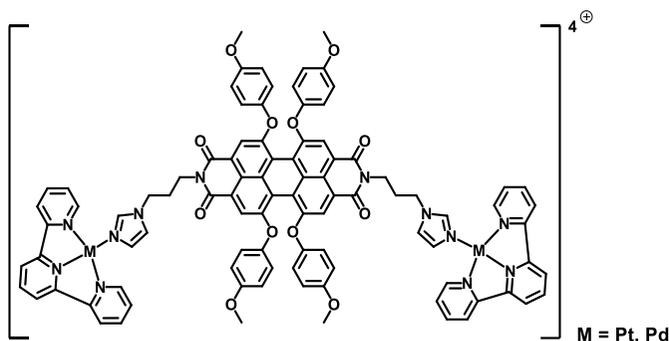
**Figura 3.10:** estructura del complejo PDI-Ir funcionalizado en la posición imida.

Esta PDI se empleó para preparar celdas electroquímicas emisoras de luz (LEEC) gracias a la sinergia creada entre la unidad de PDI y el ion metálico. Aunque las PDI poseen grandes rendimientos cuánticos de fluorescencia, debido a su carácter oxidante no son capaces de actuar como transportadores de huecos en este tipo de dispositivos, haciéndolos inestables; sin embargo, la unidad de iridio introducida es capaz de actuar como transportador de huecos, y el núcleo de PDI sigue siendo el emisor de fotones, de tal forma que la actividad óptica conjunta de la PDI-Ir mejora las propiedades de la LEEC. Así, se observó un incremento en la luminiscencia y en la

<sup>205</sup> Costa, R. D.; Céspedes-Guirao, F. J.; Ortí, E.; Bolink, H. J.; Gierschner, J.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á. *Chem. Commun.* **2009**, 26, 3886–3888.

densidad de corriente al aplicar un voltaje de 3V, lo que indica que esta PDI-Ir se puede utilizar como transportador de huecos en dispositivos LEC.

En el campo de la fotovoltaica orgánica, el grupo del profesor Şengül estudió las propiedades foto- y electroquímicas de derivados de PDI funcionalizados en la posición imida con grupos imidazol, lo que permitió coordinar unidades de terpiridilplatino (II)/paladio (II), para formar las correspondientes PDI-Pt o PDI-Pd solubles en agua (**Figura 3.11**).<sup>206</sup>



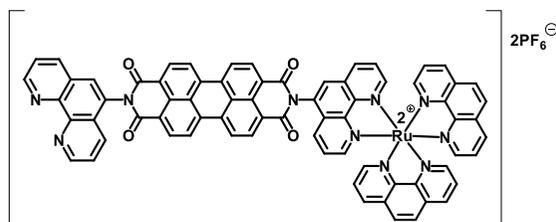
**Figura 3.11:** Estructura de las PDI metaladas sintetizadas por el grupo del profesor Şengül.

Las medidas electroquímicas de ambas PDI mostraron potenciales redox que sugerían que podrían ser utilizadas como sistemas aceptores de electrones en células solares de heterounión masiva. La mejor eficiencia fotovoltaica se obtuvo para la PDI-Pd, con un valor del 7%.

Los complejos PDI-metal han sido ampliamente utilizados en terapia fotodinámica, ya que este tipo de sistemas, debido al diferente carácter electrónico entre el núcleo de PDI y el metal, pueden provocar procesos de separación de carga y, como consecuencia, formar estados triplete que puedan generar especies reactivas de oxígeno y oxígeno singlete. Este es el caso de la PDI que sintetizaron los grupos de los profesores Carlos y Martinho en 2016. Se trata de una PDI funcionalizada en las posiciones imida con grupos fenantrolina, pero solo una de ellas está coordinada con rutenio (II) (**Figura 3.12**).<sup>207</sup>

<sup>206</sup> Büyükekeşi, S. I.; Orman, E. B.; Şengül, A.; Altındal, A.; Özkaya, A. R. *Dyes Pigm.* **2017**, *144*, 190-202.

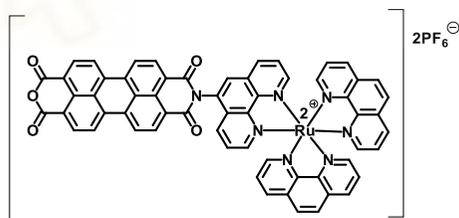
<sup>207</sup> Santos, E. R. D.; Pina, J.; Venâncio, T.; Serpa, C.; Martinho, J. M. G.; Carlos, R. M. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 22831–22843.



**Figura 3.12:** Estructura de la PDI-Ru sintetizada por grupo de los profesores Carlos y Martinho.

El espectro de UV-Vis de la PDI-Ru muestra tres bandas intensas asociadas a la absorción de la unidad de PDI entre 450-550 nm y una banda ancha en 450 nm asociada al complejo de rutenio. Al realizar los experimentos de espectroscopía de absorción transitoria excitando a una longitud de onda de 525 nm observaron fotoblanqueo (*bleaching*) a 530 nm y una banda ancha con máximo a 700 nm, lo que se asocia con un estado de separación de cargas a través de la transferencia un electrón desde el Ru (II) hacia la PDI. Este estado de separación de cargas conducirá a un estado triplete con una banda de absorción transitoria a 515 nm. Independientemente de la unidad que se excite, este estado triplete se alcanzará, siendo capaz de generar oxígeno singlete o especies reactivas de oxígeno. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete medido fue del 57 %, demostrando la viabilidad de esta PDI-Ru en terapia fotodinámica contra el cáncer.

A raíz de esta PDI-Ru, en 2018 los grupos de los profesores Maia y Selke sintetizaron un derivado de PDI, una perilonomonoanhídridomonoimida (PMAMI) funcionalizada en la posición imida con el mismo complejo de rutenio (II) (**Figura 3.13**).<sup>208</sup>

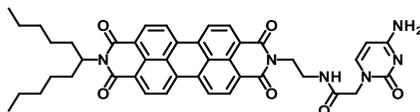


**Figura 3.13:** Estructura de la PMAMI sintetizada por de los profesores Maia, Selke y colaboradores.

Las propiedades ópticas de esta PMAMI-Ru son muy similares a las descritas para la PDI-Ru, siendo el rendimiento cuántico de oxígeno singlete del 23%, más bajo que en el caso anterior. La actividad fototóxica de esta PMAMI-Ru se evaluó en macrófagos de ratón para lograr la inactivación del hongo *Candida albicans*. Tras incubar las células con la PMAMI-Ru se observó una reducción de la concentración de *C. albicans*, y esa reducción se vio incrementada al irradiar las células con luz de 532 nm.

<sup>208</sup> Maia, P. J. S.; de Aguiar, I.; dos Santos Velloso, M.; Zhang, D.; dos Santos, E. R.; de Oliveira, J. R.; Junqueira, J. C.; Selke, M.; Carlos, R. M. J. *Photochem. Photobiol. A* **2018**, 353, 536–545.

Las nanopartículas metálicas son un recurso ampliamente utilizado en química médica.<sup>209</sup> Aprovechando las ventajas que ofrecen este tipo de formulaciones, los grupos de los profesores Yin y Su sintetizaron una PDI asimétrica funcionalizada en una de las posiciones imida con una unidad de citosina (**Figura 3.14**).<sup>210</sup>



**Figura 3.14:** Estructura de la PDI asimétrica funcionalizada con citosina.

La unidad de citosina cumple un papel dual, ya que permite la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, produciendo de esta forma un autoensamblaje de las moléculas de PDI y, además, facilita que se puedan dar reacciones de metalación con  $\text{Ag}^+$ . Una vez autoensambladas las unidades de PDI, la adición de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$ , como agente reductor, da origen a las nanopartículas  $\text{PDI@AgNP}$ , que, tras la exposición a luz visible, son capaces de producir diferentes especies reactivas de oxígeno. Para evaluar la acción antibacteriana, se incubaron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con las  $\text{PDI@AgNP}$ , comprobando que, tras una hora de irradiación, la supervivencia bacteriana se redujo un 95% para ambas bacterias.

Los complejos metálicos de PDI también han sido utilizados como biosensores; así, el grupo del profesor Singh llevó a cabo un estudio donde una PDI sustituida en bahía con un grupo etanolamina (PDI-EA) permitía reconocer moléculas de espermina.<sup>211</sup> La espermina pertenece al grupo de las poliaminas biogénicas, como la putrescina o la espermidina, que desarrollan un papel crucial en el crecimiento celular, proliferación, transcripción y traducción de la información genética,<sup>212</sup> de ahí que la detección temprana de niveles anormales de estas poliaminas pueda prevenir el desarrollo de enfermedades tumorales. La PDI-EA sintetizada funcionó como un interruptor molecular:

- debido a la presencia del grupo amino en la posición bahía, el espectro de absorción de UV-Vis presenta una banda de transferencia de carga a 620 nm; al adicionar una disolución con  $\text{Cu}^{2+}$  el grupo etanolamina es capaz de complejarlo, de tal forma que el grupo amino deja de transferirle carga al núcleo de PDI haciendo que en su espectro de absorción aparezcan las bandas típicas de PDI sin sustituir a 523 nm.
- igualmente la fluorescencia de la PDI-EA aumentó al formar el complejo con el  $\text{Cu}^{2+}$ .
- dado que la espermina es un mejor agente quelante que la PDI-EA, tras la adición de espermina a una disolución de PDI-EA-Cu, aquella es capaz de complejar al  $\text{Cu}^{2+}$  de tal forma que de nuevo el grupo etanolamina cede carga

<sup>209</sup> Kłębowski, B.; Depciuch, J.; Parlinska-Wojtan, M.; Baran, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4031.

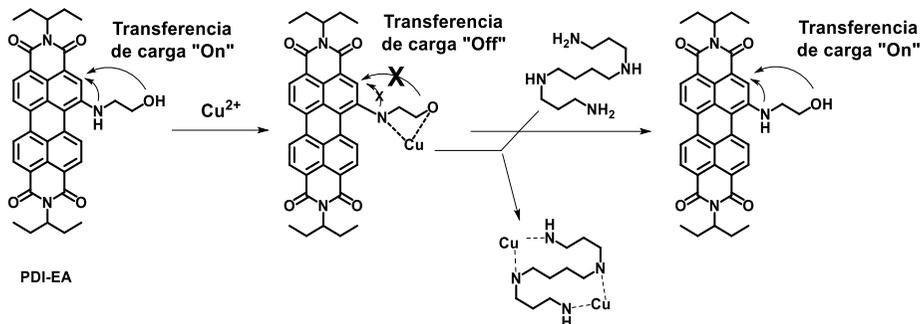
<sup>210</sup> Cai, Y.; Cheng, W.; Ji, C.; Su, Z.; Yin, M. *Dyes Pigm.* **2021**, *195*, 109698.

<sup>211</sup> Kumar, K.; Kaur, S.; Kaur, S.; Bhargava, G.; Kumar, S.; Sing, P. *J. Mater. Chem. B.* **2019**, *7*, 7218-7227.

<sup>212</sup> a) Igarashi, K.; Kashiwagi, K. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2010**, *42*, 39-51. b) Tse, R. T. H.; Wong, C. Y. P.; Chiu, P. K. F.; Ng, C. F. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1258.

al núcleo de PDI y se observa la banda correspondiente a 523 nm y la fluorescencia disminuye (**Esquema 3.1**).

El límite de cuantificación calculado para la determinación de espermina usando la PDI-EA-Cu fue de 86,3 nM.

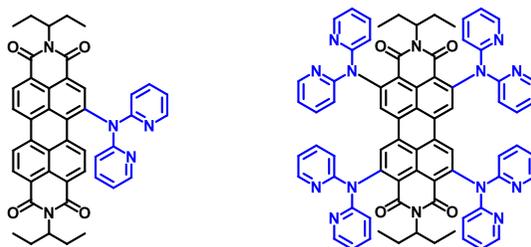


**Esquema 3.1:** Estructura y modo de acción de la PDI-EA-Cu para la determinación de espermina.

### 3.3. Objetivos

Como se ha visto en los antecedentes, existen en la bibliografía diferentes tipos de PDI metaladas que se pueden aplicar a diversas disciplinas. Siguiendo la misma línea de investigación descrita en el capítulo 2 de la presente tesis, los objetivos de este capítulo son la síntesis y caracterización estructural de complejos metálicos de PDI, y su evaluación citotóxica, así como estudios de internalización y muerte celular. Al contrario que sucedía en el capítulo 2, en este caso, pretendemos conseguir la citotoxicidad solamente debido a la presencia del metal en el núcleo de la PDI, sin necesidad de fotoexcitación, y evaluar la capacidad de las PDI metaladas como posibles metalofármacos.

Por lo tanto, el primer objetivo es diseñar una PDI con un grupo con capacidad quelante. Para ello se eligió la unidad de 2,2'-dipiridilamina, proponiéndose dos PDI, una de ellas monosustituida en bahía y otra tetrasustituida en orto, con el objetivo de poder formar mono- y tetra-complejos metálicos de PDI (**Figura 3.15**).



**Figura 3.15:** Estructura de las PDI objetivo funcionalizadas con el grupo 2,2'-dipiridilamino.

Una vez elegidas estas PDI, la complejación con metales y los estudios biológicos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación de la profesora M<sup>a</sup> Concepción Gimeno Floria, en el centro de investigación mixto Instituto

de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (CSIC-ISQCH) y la Universidad de Zaragoza. Tanto las reacciones de complejación, como los ensayos de citotoxicidad fueron realizados gracias a una estancia predoctoral de un mes en dicho grupo de investigación.

Debido a las propiedades biomédicas que presentan la plata y el cobre, se decidió realizar la complejación de las PDI con estos metales (**Figura 3.16**). Hay que resaltar que las PDI metaladas objetivo se obtendrán en forma de sales, lo que facilitará su solubilidad en medio biológico para realizar los estudios de citotoxicidad e internalización celular.



**Figura 3.16:** Estructura de las PDI metaladas objetivo.

### 3.4. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en la siguiente publicación:

- Garcés-Garcés, J.; Redrado, M.; Sastre-Santos, Á.; Gimeno, M. C.; Fernández-Lázaro, F. Synthesis of Dipyrindilaminoperylene diimide-Metal Complexes and Their Cytotoxicity Studies. *Pharmaceutics* **2022**, *14*(12), 2616.

Article

## Synthesis of Dipyridylaminoperylene diimide–Metal Complexes and Their Cytotoxicity Studies

José Garcés-Garcés <sup>1</sup>, Marta Redrado <sup>2</sup>, Ángela Sastre-Santos <sup>1</sup>, María Concepción Gimeno <sup>2,\*</sup> and Fernando Fernández-Lázaro <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Área de Química Orgánica, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche (Alicante), Spain; jgarces@umh.es (J.G.G.), asastre@umh.es (A.S.S.)

<sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), CSIC-Universidad de Zaragoza, C/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain; marta@unizar.es

\* Correspondence: gimeno@unizar.es (M.C.G.); fdofdez@umh.es (F.F.L.); Tel.: +34-(97)-6762291 (M.C.G.); +34-(96)-6658405 (F.F.L.)

**Citation:** Garcés-Garcés, J.; Redrado, M.; Sastre-Santos, Á.; Gimeno, M.C.; Fernández-Lázaro, F. Synthesis of Dipyridylaminoperylene diimide–Metal Complexes and Their Cytotoxicity Studies. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editors: Ana Isabel Fraguas-Sánchez, Raquel Fernández García and Francisco Bolás-Fernández

Received: 3 November 2022

Accepted: 23 November 2022

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** A new family of perylene diimide (PDI) silver and copper complexes has been successfully synthesized by reacting *ortho*- and *bay*-substituted (dipyrid-2',2''-ylamino)perylene diimide ligands with metal phosphine fragments. The coordination of the metal center did not reveal a significant effect on the photophysical properties, which are mainly due to the PDI ligands, and in some cases quenching of the luminescence was observed. The antiproliferative effect of the free perylene diimide ligands and the metalloPDI complexes against the cervix cancer cell line HeLa was determined by MTT assay. The free perylene diimide ligands exhibited a moderate cytotoxic activity, but the coordination of silver or copper to the dipyridylamino fragment greatly enhanced the activity, suggesting a synergistic effect between the two fragments. In attempts to elucidate the cellular biodistribution of the PDIs and the



complexes, a colocalization experiment using specific dyes for the lysosomes or mitochondria as internal standards revealed a major internalization inside the cell for the metal complexes, as well as a partial mitochondrial localization.

**Keywords:** perylenediimide; biological properties; cancer; cytotoxicity; metal complexes; silver; copper

## 1. Introduction

Perylenediimides (PDIs) are one of the most important dyes known today due to their outstanding electrooptical properties, high fluorescence quantum yields, strong absorption of visible light and huge versatility in their chemistry [1]. The properties of PDIs can be modified by the functionalization of the aromatic core in their different positions, namely *bay* positions (1, 6, 7 and 12) and *ortho* positions (2, 5, 8, and 11). Depending on the nature of the substituents on the aromatic core, their absorption profile, as well as the electron accepting/donating character of PDIs, can be drastically modified [2]. For these reasons, the appropriate design of the PDIs plays a key role in modulating their properties and molecular organization, which will lead to the optimal performance of the material.

Although PDIs are mainly used in optoelectronic applications [3] and material science [4], the number of biological studies using PDIs has been growing in the last few years [5–7], becoming promising molecules for biological investigation. Water-soluble PDIs have been used in biological applications due to their biocompatibility, photostability and optical absorption and emission properties. Synthetic strategies to gain water solubility consist either of the functionalization of PDIs with carbohydrate or PEG moieties, or the formation of charged PDI salts. The latter allows the interaction with other charged molecules present in the organism, such as DNA or proteins contained in the cell membrane [6]. On the other hand, PDI–carbohydrate conjugates are excellent candidates to label protein–carbohydrate interactions as glycodendrimers, presenting the potential to recognize carbohydrate–protein (lectin) interactions involved in key biological processes [8]. There are some examples on the use of PDIs as biological labels, such as the PDI–estradiol conjugate used to monitor the estrogen receptor by confocal microscopy [9]. PDIs bearing biotin and maleimide moieties have been used to target specific receptors, such as maltoporin [10]. PDIs substituted with galactose, mannose and fucose [11] have been used as chemosensors. PDIs are also involved in nanomedicine [12]; an example of this is a glycosaccharide–PDI attached to maghemite nanoparticles tested as a dual imaging agent in magnetic resonance imaging. PDIs are also used in photodynamic therapy [13].

A simple strategy to modulate the properties of PDI systems using metallic fragments is the functionalization of the perylene core with coordinating donor groups that can act as ligands for metal complex formation. Thus, PDI derivatives containing palladium [14] and gold [15] complexes have been

synthesized for electrooptical applications and to prepare Langmuir films, respectively. A PDI self-assembly to construct silver nanohybrids with enhanced visible-light photocatalytic antibacterial effects has also been described [16]. Additionally, iridium-containing PDI complexes [17] have been used as organic light-emitting devices (OLEDs). Moreover, functionalization of PDIs with electron-donating groups to coordinate  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  allowed the development of photo-induced electron transfer systems with the aim to emulate the photosynthetic process [18]. On the other hand, the supramolecular chemistry of metallo-PDIs is an emerging research area; thus, metallo-cages based on PDIs [19] show high fluorescence quantum yields and the ability to host polycyclic aromatic hydrocarbon, such as pyrene or triphenylene. Biological properties of metal complex derivatives of PDIs have been investigated too, as in the case of a PDI functionalized with phenanthroline moieties to coordinate ruthenium (II) [20], which was studied for photodynamic therapy. However, almost no studies have been published on PDI metallocomplexes as anticancer or theranostic agents. One of the most promising metals that presents several biological properties is silver. For many years, silver complexes have been used for antiseptic, antibacterial or anti-inflammatory applications [21], taking advantage of their low cytotoxicity [22]. Silver organometallic complexes have also been studied as anticancer agents, as many silver (I) complexes have been found to exhibit a greater cytotoxic activity than cisplatin, with relatively low toxicity and greater selectivity toward cancer cells [23,24]. Cell death via apoptosis and depolarization of the mitochondrial membrane potential are the most accepted mechanisms of this anticancer activity [24–28]. On the other hand, copper salts have been less studied as drugs. Copper is an essential metal for organisms, playing a key role in numerous cellular processes. In particular, copper is the cofactor in important metalloenzymes for the mitochondrial metabolism and in detoxification of radical oxygen species (ROS). Copper complexes are potent topoisomerase inhibitors, the redox activity of [Cu(I)/Cu(II)] being one of the principal causes of cytotoxicity [29].

In this context, in order to study the synergistic influence of PDI ligands and their metal complexes as anticancer agents, we present here the synthesis and *in vitro* studies of a new family of silver and copper complexes derived from *ortho*- and *bay*-substituted (dipyrid-2',2''-ylamino)perylene-diimides, testing the free perylene-diimide ligand and the metalloPDI complexes against HeLa cell line.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Synthetic Procedure

All chemicals were reagent grade, purchased from commercial sources, and were used as received unless otherwise specified. Column chromatography was performed on  $\text{SiO}_2$  (40–63  $\mu\text{m}$ ) (Carlo Erba, Barcelona, Spain). TLC plates coated with  $\text{SiO}_2$  60F254 were visualized under UV light (Marcherei Nagel, Düren, Germany).



$^1\text{H}$  NMR and  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra were recorded at room temperature on a BRUKER AVANCE 400 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz) or on a BRUKER AVANCE II 300 spectrometer ( $^1\text{H}$ , 300 MHz), with chemical shifts (ppm) reported relative to the solvent peaks in the  $^1\text{H}$  spectra or external 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  of the deuterated solvent.  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{CDCl}_3$  were used as the deuterated solvents (Euroisotop, Saint-Aubin, France). Chemical shifts were reported in the  $\delta$  scale relative to residual  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.32 ppm) and TMS (0 ppm). NMR were recorded at ambient probe temperature. UV-vis spectra were recorded with a Perkin Elmer Lambda 365 spectrophotometer (Tres Cantos, Madrid, Spain) in  $\text{CHCl}_3$  solutions in the range 250 to 800 nm. Fluorescence spectra were recorded with a HORIBA scientific SAS spectrophotometer (Palaiseau, France) in  $\text{CHCl}_3$  solutions in the range 250 to 800 nm. High-resolution mass spectra were obtained from a Bruker Microflex LRF20 (Bruker, Boston, MA, USA) matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF), using dithranol as a matrix. IR spectra were recorded with a Nicolet Impact 400D spectrophotometer (ThermoFisher, Scientific) in KBr in the range 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ .

The starting material  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{PPh}_3)]$  [30] was prepared according to published procedures. All other reagents and solvents were commercially available (Merk Life Science, Madrid, Spain).

#### 2.1.1. Synthesis of *N,N'*-Diethylpropyl-1-(dipyrid-2',2''-ylamine)perylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide (**PDI-2**)

*N,N'*-Diethylpropyl-1-bromoperylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide **PDI-1** (50 mg, 0.06 mmol), 2,2'-dipyridylamine (31 mg, 0.181 mmol), cesium carbonate (70 mg, 0.21 mmol) and 1,1'-bis[(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (4.4 mg, 0.0054 mmol) were added to a two-neck round-bottom flask and flushed with nitrogen for 30 min. Then, dry toluene (8 mL) was injected and stirred at 80 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. The cooled mixture was extracted with dichloromethane and washed with water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated. Purification was carried out by silica gel column chromatography (toluene:acetone, 20:1), yielding 30 mg (70%) of **PD-2** as a purple solid.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  9.24 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_g$ ), 8.67–8.62 (m, 4H,  $\text{H}_{b-e}$ ), 8.38 (bs, 1H,  $\text{H}_a$ ), 8.34 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_f$ ) 8.22 (ddd,  $J = 4, 9, 3$ , 1.08, 0.89 Hz, 2H,  $\text{H}_k$ ), 7.58 (dddd,  $J = 6.44, 5.32, 1.98, 1-95$  Hz, 2H,  $\text{H}_m$ ), 7.20 (d,  $J = 7.36$ , 2H,  $\text{H}_n$ ), 6.97 (ddd,  $J = 7.26, 4.91, 0.95$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 5.04–4.92 (m, 2H,  $\text{H}_h$ ), 2.28–2.10 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 1.96–1.80 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), and 0.87 ppm (dt,  $J = 13.8, 7.5$  Hz, 12 H,  $\text{H}_j$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.9, 149.1, 143.1, 138.1, 134.8, 134.4, 132.9, 129.3, 129.1, 129.0, 128.3, 128.2, 126.7, 126.5, 125.4, 123.6, 122.7, 119.5, 115.8, 57.8, 57.6, 25.1, 25.1, 11.4 and 11.41 ppm. FT-IR (KBr): 3457, 2962, 2872, 1704, 1650, 1593, 1458, 1426, 1401, 1332, 1242, 1193, 1144, 1086, 854, 813, 776, 743, and 694  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\log \epsilon$ ): 561 (4.48), 480 (4.55). HR-MALDI-TOF  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ] calc. for  $\text{C}_{44}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_4$ : 699.285, found: 699.280.

### 2.1.2. Synthesis of *N,N'*-Diethylpropyl-2,5,8,11-tetra(dipyrid-2',2''-ylamine)perylene-3,4:9,10 tetracarboxydiimide (**PDI-6**)

*N,N'*-Diethylpropyl-2,5,8,11-tetrabromoperylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide **PDI-5** (50 mg, 0.06 mmol), 2,2'-dipyridylamine (123 mg, 0.72 mmol), cesium carbonate (273 mg, 0.84 mmol) and 1,1'-bis[(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium (II) (21 mg, 0.021 mmol) were added to a two-neck round-bottom flask and flushed with nitrogen for 30 min. Then, dry toluene (30 mL) was injected and stirred at 80 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. The cooled mixture was extracted with dichloromethane and washed with water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. Purification was carried out by silica gel column chromatography (toluene:acetone, 20:1) yielding 30 mg (69%) of **PDI-6** as a purple solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 8.15 (d, J = 3.7 Hz, 8H, H<sub>e</sub>), 7.98 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 7.61–7.55 (m, 8H, H<sub>g</sub>), 7.16 (d, J = 8.3 Hz, 8H, H<sub>h</sub>), 6.93 (dd, J = 6.9, 5.2 Hz, 8H, H<sub>i</sub>), 4.41–4.31 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 1.58–1.43 (m, 4 H, H<sub>c</sub>), 1.36–1.22 (m, 4H, H<sub>c</sub>) and 0.33 ppm (t, J = 7.4 Hz, 12H, H<sub>d</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.3, 157.3, 148.5, 148.2, 138.0, 134.9, 133.3, 126.7, 123.6, 119.3, 119.1, 117.7, 57.7, 24.9 and 11.6 ppm. FT-IR (KBr): 3457, 2962, 2929, 2872, 1704, 1650, 1593, 1458, 1426, 1401, 1332, 1242, 1193, 1144, 1086, 854, 813, 776, 743, and 694 cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub>/nm (log ε): 536 (4.81), 496 (4.78). HR-MALDI-TOF *m/z* [M<sup>+</sup>] calc. for C<sub>74</sub>H<sub>58</sub>N<sub>14</sub>O<sub>4</sub>: 1206.477, found: 1206.475.

### 2.1.3. Synthesis of Complex **PDI-3**

**PDI-2** (10 mg, 0.014 mmol) was dissolved in DCM (2.5 mL) and then [Ag(OTf)PPh<sub>3</sub>] (7.41 mg, 0.014 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then the solvent was evaporated until dryness, yielding 14.97 mg (100%) of **PDI-3** as a purple solid. No purification step was needed. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 9.20 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, H<sub>g</sub>), 8.74–8.61 (m, 4H<sub>b-c</sub>), 8.39 (s, 1H, H<sub>a</sub>), 8.29 (d, J = 4.07 Hz, 2H, H<sub>k</sub>), 8.24 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H<sub>i</sub>), 7.67 (dddd, J = 8.38, 7.33, 1.89, 1.89 Hz, 2 H, H<sub>m</sub>), 7.46–7.29 (m, 15 H, Ar-Ph), 7.24 (d, J = 8.36 Hz, 2H, H<sub>n</sub>), 6.97 (dd, J = 6.69, 5.37 Hz, 2H, H<sub>l</sub>), 5.07–4.91 (m, 2H, H<sub>h</sub>), 2.26–2.10 (m, 4 H, H<sub>j</sub>), 1.98–1.81 (m, 4 H, H<sub>i</sub>), and 0.88 ppm (dt, J = 14.9, 7.5 Hz, 12 H, H<sub>j</sub>). <sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 16.7 and 12.2 ppm. FT-IR (KBr): 3473, 2962, 2365, 1699, 1654, 1593, 1434, 1328, 1242, 1021, 821, 756, 702, and 629 cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub>/nm (log ε): 561 (4.91), 481 (4.75) and 274 (4.29). HR-MALDI-TOF *m/z* [M<sup>+</sup>] calc. for C<sub>62</sub>H<sub>52</sub>AgN<sub>5</sub>O<sub>4</sub>P: 1069.288, found: 1069.282.



#### 2.1.4. Synthesis of Complex **PDI-4**

**PDI-2** (20 mg, 0.029 mmol) was dissolved in DCM (2.5 mL) and then  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{PPh}_3)_2]$  (18.85 mg, 0.029 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then the solvent was evaporated until dryness, yielding 37 mg (100%) of **PDI-4** as a purple solid. No purification step was needed.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  9.28 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_g$ ), 8.70–8.64 (m, 4H,  $\text{H}_{b-e}$ ), 8.48 (s, 1H,  $\text{H}_a$ ), 8.42 (d,  $J = 8.30$  Hz, 1H,  $\text{H}_i$ ) 8.31–(dd,  $J = 4.66, 1.1$  Hz, 2  $\text{HH}_k$ ), 7.62–7.57 (m, 2H,  $\text{H}_m$ ), 7.44–7.2 (m, 30 H, Ar-Ph), 7.19 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $\text{H}_n$ ), 6.99 (dd,  $J = 6.8, 5.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_i$ ), 5.12–5.0 (m, 2H,  $\text{H}_h$ ), 2.38–2.16 (m, 4H,  $\text{H}_i$ ), 2.03–1.86 (m, 4H,  $\text{H}_i$ ), and 0.93 ppm (dt,  $J = 10.1, 7.5$  Hz, 12 H,  $\text{H}_j$ ).  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  -0.47 ppm. FT-IR (KBr): 3052, 2958, 2925, 2872, 1691, 1654, 1597, 1458, 1433, 1405, 0380, 1331, 1249, 1192, 1090, 812, 738, 698, and 500  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (log  $\epsilon$ ): 561 (4.91), 481 (4.75) and 274 (4.29). MALDI-TOF  $m/z$   $[\text{M}-\text{PPh}_3]^+$  calc. for  $\text{C}_{80}\text{H}_{67}\text{CuN}_5\text{O}_4\text{P}_2-\text{PPh}_3$ : 1024.305, found for  $\text{C}_{80}\text{H}_{67}\text{CuN}_5\text{O}_4\text{P}_2-\text{PPh}_3$ : 1024.340.

#### 2.1.5. Synthesis of Complex **PDI-7**

**PDI-6** (10 mg,  $8.28 \cdot 10^{-3}$  mmol) was dissolved in DCM (2.5 mL) and then  $[\text{Ag}(\text{OTf})\text{PPh}_3]$  (17.20 mg, 0.033 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then the solvent was evaporated until dryness, yielding 22 mg (99%) of **PDI-7** as a purple solid. No purification step was needed.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  8.16 (bs, 12H,  $\text{H}_a, \text{H}_e$ ), 7.58 (t,  $J = 7.1$  Hz, 8H,  $\text{H}_g$ ), 7.49–7.34 (m, 60H, Ar-Ph) 7.10 (d,  $J = 8.2$  Hz, 8H,  $\text{H}_h$ ), 6.93–6.89 (m, 8 H,  $\text{H}_i$ ), 4.25–4.20 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1.40–1.27 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), 1.15–1.06 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), and 0.16–0.09 ppm (m, 12H,  $\text{H}_a$ ).  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  18.38 and 12.29 ppm. FT-IR (KBr): 3052, 2966, 2921, 2860, 1699, 1663, 1589, 1462, 1430, 1377, 1332, 1274, 1254, 1180, 1091, 1050, 776, 474, 694, 657, and 523  $\text{cm}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (log  $\epsilon$ ): 536 (4.62), 271 (4.70).

#### 2.1.6. Synthesis of Complex **PDI-8**

**PDI-6** (10 mg,  $8.28 \cdot 10^{-3}$  mmol) was dissolved in DCM (2.5 mL) and then  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{PPh}_3)_2]$  (21.54 mg, 0.033 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then the solvent was evaporated until dryness, yielding 29 mg (99%) of **PDI-8** as a purple solid. No purification step was needed.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  8.13 (bs, 8H,  $\text{H}_e$ ), 7.99 (bs, 4H,  $\text{H}_a$ ), 7.60–7.55 (m, 8 H,  $\text{H}_g$ ), 7.42–7.28 (m, 120H, Ar-Ph), 7.56 (bs, 8H,  $\text{H}_h$ ), 6.91 (bs, 8H,  $\text{H}_i$ ), 4.42–4.37 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1.61–1.46 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), 1.36–1.29 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), and 0.35 ppm (t,  $J = 7.3$  Hz, 12 H,  $\text{H}_a$ ).  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  -0.48 ppm. FT-IR (KBr): 3436, 3052, 3003, 2958, 2921, 2361, 1691, 1654, 1585, 1467, 1434, 1385, 1344, 1274, 1209, 1091, 1025, 988, 735, 694, 523, and 506  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (log  $\epsilon$ ): 536 (4.66), 274 (4.66).

## 2.2. Cell Culture

HeLa (cervical cancer) cell line (from ATCC, USA) was routinely cultured in high-glucose DMEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and penicillin/streptomycin (hereafter, complete medium) at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub>.

## 2.3. Cell Viability Assays

The MTT-reduction assay was used to analyse cell metabolic activity as an indicator of cell sensitivity to compounds **PDI-2** to **PDI-4**, and **PDI-6** to **PDI-8** in the HeLa cell line. A total of 6000 cells/well were seeded in 96-well plates (100 µL/well) and allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. The complexes were dissolved in DMSO and added to cells in concentrations ranging from 0.2 to 50 µM in quadruplicate. Cells were incubated with our compounds for 24 h, then 10 µL of MTT (5 mg/mL in PBS) were added to each well and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Finally, the culture medium was removed and DMSO (100 µL/well) was added to dissolve the formazan crystals. The optical density was measured at 550 nm using a 96-well multiscanner autoreader (ELISA) and IC<sub>50</sub> was calculated. Each compound was analyzed at least in three independent experiments.

## 2.4. Cytotoxicity Assays

Apoptotic cell death was determined by measuring phosphatidyl-serine exposure on cell surface in HeLa cells. A total of 60,000 cells/well were seeded in 12-well plates (1 mL/well) and left overnight to be attached to the bottom. Cells were treated for 24 h with complexes **PDI-3** and **PDI-4** at IC<sub>50</sub> and 2·IC<sub>50</sub> concentrations, respectively, in duplicate. After treatment, cells were trypsinised and resuspended in 50 µL of a mixture of Annexin-binding buffer (ABB; 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4), FITC-conjugated Annexin V and incubated at room temperature in the dark for 15 min. Finally, cells were diluted to 250 µL with ABB and a total of 10,000 cells were acquired on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cell death was analyzed using CellQuest Pro (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), FlowJo 7.6.1 (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software.

## 2.5. Fluorescence Confocal Microscopy

A total of 10<sup>4</sup> HeLa cells/well were seeded in complete medium in µ-slide 8 well (ibiTreat) (300 µL/well) and left 24 h to be attached to the bottom. Then, 200 µL of culture medium were removed and 100 µL of a solution of species **PDI-2**, **-3**, **-4** and **-8** were added to a final concentration of 2 µM. The compounds were incubated with the cells for 2 h. Thereafter, MitoTracker Green (MTG) or



LysoTracker Green (LTG) was added to a final concentration of 75 nM and 500 nM, respectively, and it was incubated with the cells for 30–45 min at room temperature. Eventually the medium was replaced with fresh medium without phenol red. Images were collected in a sequential mode in a FluoView FV10i (Olympus, Shinjuku, Japan) confocal microscope with a 40 oil immersion lens, a line average of 4, and a format of 1024 × 1024 pixels using excitation wavelength of either 488 or 561 nm. The confocal pinhole was 1 Airy unit. Images were analysed with FV10-ASW 3.1. Viewer software.

### 2.6. Cell Morphology Analysis

Alterations in cell morphology and behavior as a consequence of the exposure to complexes **PDI-3** and **PDI-4** were analyzed using an inverted microscope Olympus IX71 Inverted. A total of 10,000 cells/well were seeded in 12-well plates (1 mL/well) and left overnight to be attached to the bottom. Thereafter, cells were treated for 24 h with complexes at IC<sub>50</sub> and 2·IC<sub>50</sub> concentrations, respectively, in duplicate.

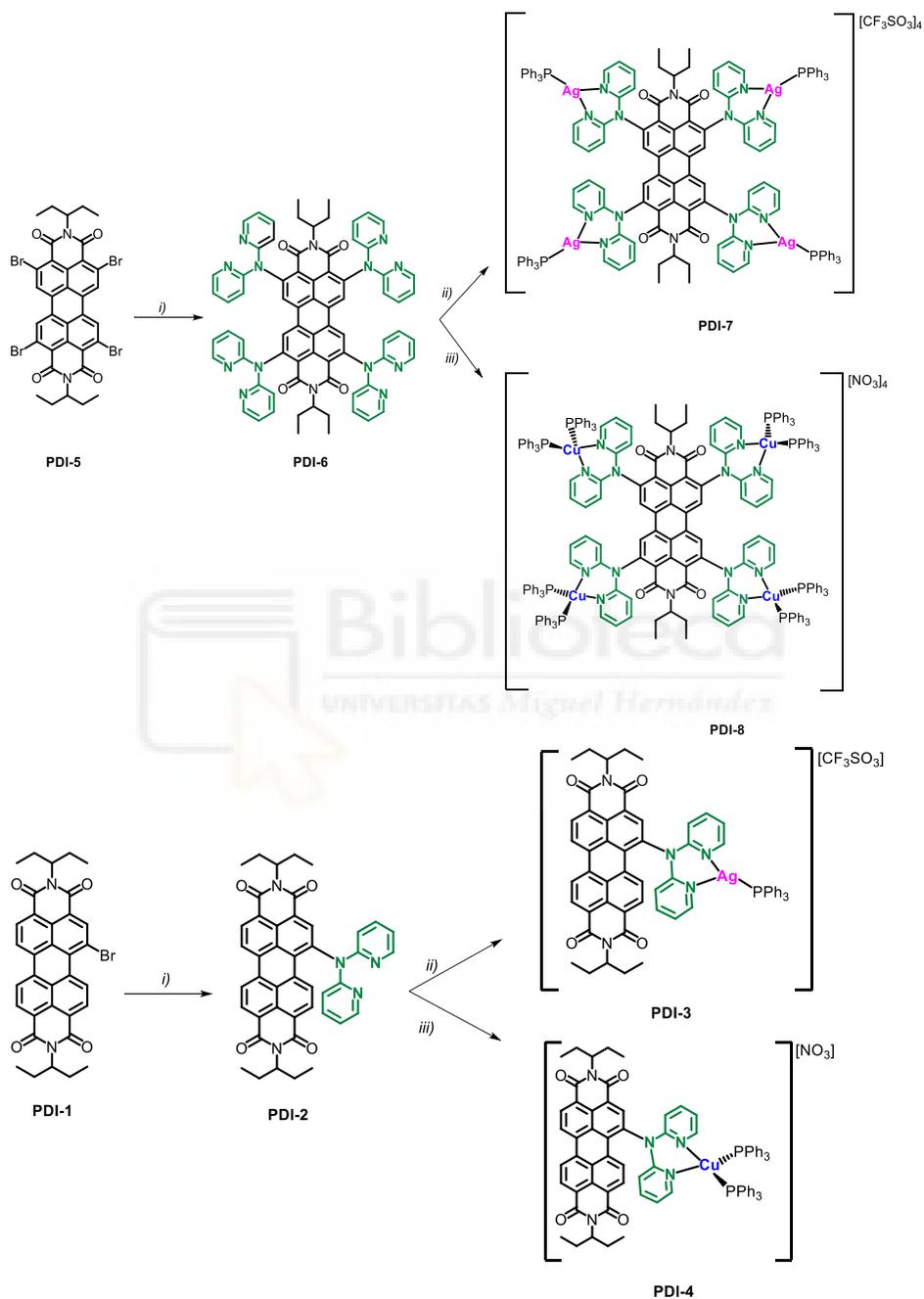
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Synthesis of PDIs and Metal Complexes

**PDI-1** and **PDI-5** were synthesized as described in the literature [31–33]. **PDI-2** and **PDI-6** were synthesized for the first time using a Buchwald–Hartwig cross-coupling reaction [34,35]. Thus, bromo **PDI-1** and tetrabromo **PDI-5** were reacted with 2,2'-dipyridylamine in the presence of bis[(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) in a basic media to obtain **PDI-2** and **PDI-6** with 70% and 69% yield, respectively (Scheme 1). Both PDIs were fully characterized by spectroscopic and spectrometric methods (see the Supporting Information).

The addition of either [Ag(OTf)(PPh<sub>3</sub>)] or [CuNO<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] to a solution of **PDI-2** or **PDI-6** in a 1:1 or 4:1 molar ratio, respectively, led to the formation of the phosphine silver (I) complexes **PDI-3** and **PDI-7**, and the phosphine copper(I) complexes **PDI-4** and **PDI-8** (Scheme 1). In all cases, complexation reactions were quantitative, and no purification steps were required.

Figure 1 shows the comparison between **PDI-2** and the mono-copper complex **PDI-4**. We can observe that all aromatic protons of the pyridyl group were weakly deshielded in **PDI-4** in comparison with **PDI-2** due to copper complexation, H<sub>k</sub> being the most affected. At 7.44–7.26 ppm we found the signal attributed to the phosphine groups integrating for 30 H corresponding to two phosphine groups. The mono-silver complex **PDI-3** followed the same pattern (see Supporting Information Figure S11).

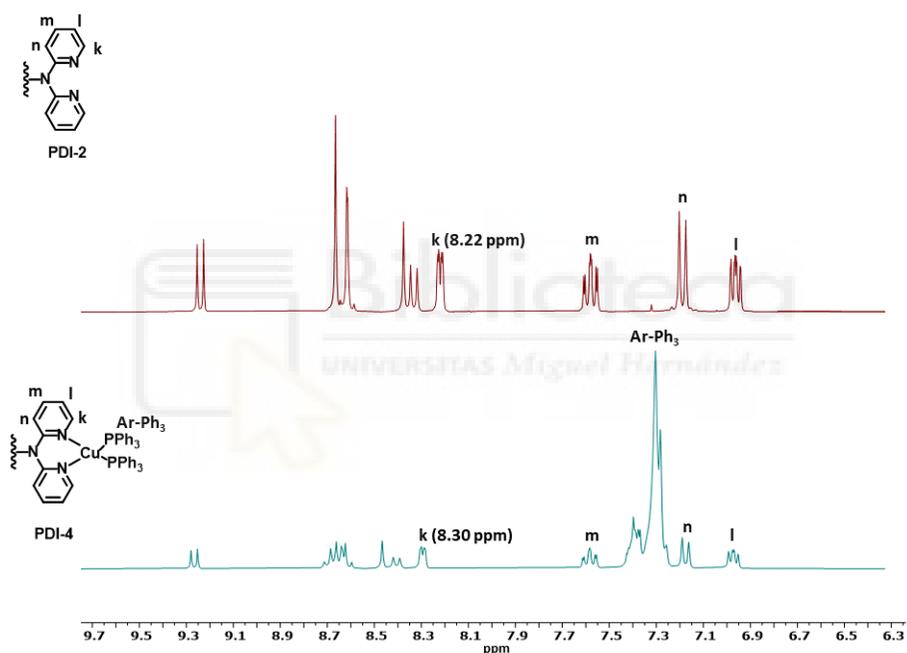


**Scheme 1.** Reagents and conditions: (i) 2,2'-dipyridylamine,  $[Pd(dppf)_2Cl_2]$ , DCM,  $Cs_2CO_3$ , toluene, 24 h, 80 °C, nitrogen; (ii)  $[Ag(OTf)(PPh_3)]$ , DCM, 1 h, rt; (iii)  $[CuNO_3(PPh_3)_2]$ , DCM, 1 h, rt.



The addition of either  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{PPh}_3)]$  or  $[\text{CuNO}_3(\text{PPh}_3)_2]$  to a solution of **PDI-2** or **PDI-6** in a 1:1 or 4:1 molar ratio, respectively, led to the formation of the phosphine silver (I) complexes **PDI-3** and **PDI-7**, and the phosphine copper(I) complexes **PDI-4** and **PDI-8** (Scheme 1). In all cases, complexation reactions were quantitative, and no purification steps were required.

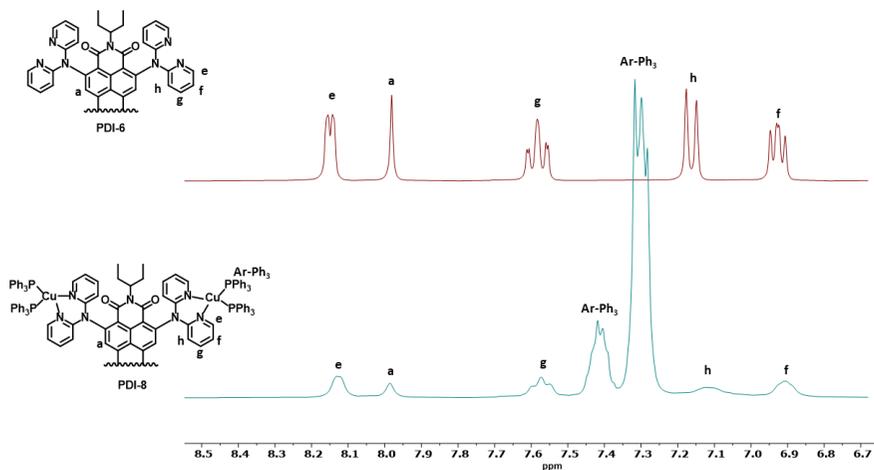
Figure 1 shows the comparison between **PDI-2** and the mono-copper complex **PDI-4**. We can observe that all aromatic protons of the pyridyl group were weakly deshielded in **PDI-4** in comparison with **PDI-2** due to copper complexation, Hk being the most affected. At 7.44–7.26 ppm we found the signal attributed to the phosphine groups integrating for 30 H corresponding to two phosphine groups. The mono-silver complex **PDI-3** followed the same pattern (see Supporting Information Figure S11).



**Figure 1.** Part of  $^1\text{H}$  NMR of **PDI-2** (red) and **PDI-4** (blue) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  at 25 °C. Letters over the NMR signals refer to the different hydrogen atoms of the ligands (see figures in the inset).

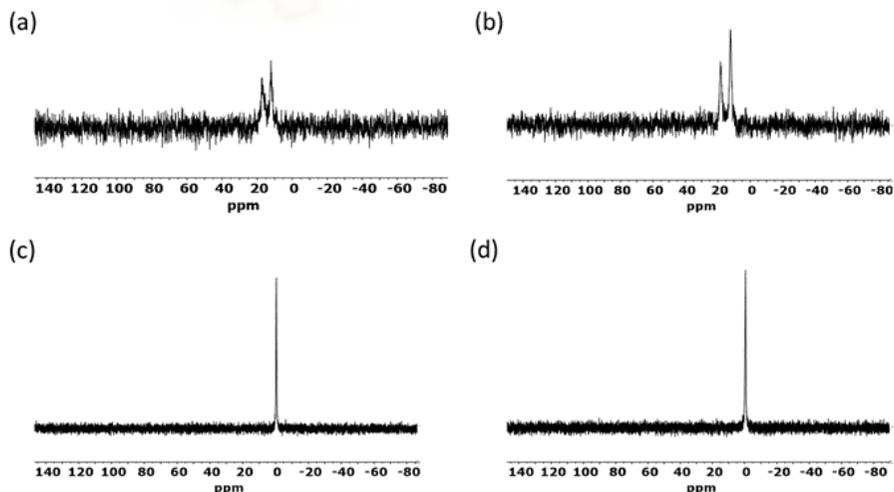
Figure 2 shows the comparison between **PDI-6** and the tetra-copper complex **PDI-8**. In this case, all signals were broadened, possibly because of the rotation of the four substituted dipyridylamino metallo units in **PDI-6–8**. Additionally, we can observe the resonance corresponding to the aromatic protons of the phosphine groups between 7.28 and 7.45 ppm integrating for 120 H, indicating the presence of two phosphine groups for each copper unit. The same broadening effect was observed in the tetra-silver complex **PDI-7**. In this case,

an integration of 60 H of the phosphine signals agrees with the existence of four triphenylphosphine units (see Supporting Information Figure S17).



**Figure 2.** Part of  $^1\text{H}$  NMR of **PDI-6** (red) and **PDI-8** (blue) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  at 25  $^\circ\text{C}$ .

In the case of silver complexes, **PDI-3** and **PDI-7**, the  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectrum showed a broad doublet at 12.02 and 17.12 ppm, respectively, due to the coupling of the phosphorus atom with the two silver isotopes  $^{109}\text{Ag}$  and  $^{107}\text{Ag}$ , corresponding to the average coupling. The copper complexes **PDI-4** and **PDI-8** showed a signal at  $-0.5$  ppm in the  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectrum in agreement with the presence of equivalent phosphorus atoms (Figure 3).



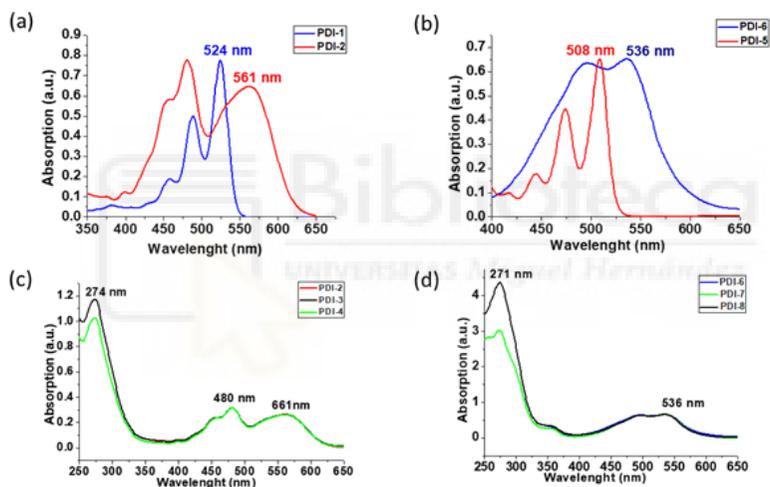
**Figure 3.**  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra of PDI metal complexes (a) **PDI-3**, (b) **PDI-7**, (c) **PDI-4**, (d) **PDI-8** in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  at 25  $^\circ\text{C}$ .



### 3.2. Absorption and Fluorescence Studies

The presence of N atoms in **PDI-2** and **PDI-6** quenches the fluorescence in these PDIs. Thus, while **PDI-1** has a fluorescence quantum yield of 91%, it drops to 35% in **PDI-2**. For **PDI-6**, fluorescence is completely quenched (see Supporting Information, Figure S9). In the case of the mono-substituted complexes **PDI-3** and **PDI-4**, the fluorescence quantum yield were 49 and 57%, respectively, being higher than in the precursor **PDI-2**.

The absorption spectrum of **PDI-2** in chloroform solution changed totally in respect to the precursor **PDI-1**, which located its maximum at 524 nm, typical for a *bay*-substituted PDI with electron withdrawing groups. **PDI-2** showed a broad band at 561 nm, which corresponds to the charge transfer from the dipyrrolylamine moieties to the perylene core (Figure 4a). On the other hand, functionalization of **PDI-5** in the *ortho* positions with dipyrrolylamine induced a dramatic bathochromic shift, changing the maximum of **PDI-5** located at 508 nm to 536 nm in **PDI-6** (Figure 4b).



**Figure 4.** Normalized absorption in  $\text{CHCl}_3$  as solvent at 25 °C of (a) **PDI-1** and **PDI-2**, (b) **PDI-5** and **PDI-6**, (c) **PDI-2**, **PDI-3** and **PDI-4**, and (d) **PDI-6**, **PDI-7** and **PDI-8**.

The UV-vis spectra in chloroform of the four metal complexes, **PDIs-3–4** and **PDIs-7–8**, show new absorption bands at 274 and 271 nm, attributed to the phenyl groups of the phosphine moieties, while the absorption band attributed to the perylene core remains unaffected after complexation reaction (Figure 4c,d).

### 3.3. Antiproliferative Studies

Antiproliferative studies were carried out for all compounds against human cervical carcinoma (HeLa) cancer cell line using the MTT assay [36], and the results are shown in Table 1. We tested the stability of all compounds in DMSO, the medium used in the *in vitro* assays,  $^1\text{H}$  NMR, corroborating that they

remained stable after a few days. In addition, the stability of the complexes in the biological media (Phosphate Buffer Solution PBS with 5% of DMSO) was measured using Uv-Vis spectra. The spectra measured at 0 and 24 h showed that the PDI and the corresponding silver complexes remained stable in solution (see Figure S23). However, some differences in the high energy absorptions appeared for the copper complex **PDI-8** and, consequently, we can not discard that this complex could dissociate some PPh<sub>3</sub> ligands in DMSO or biological solutions. The effect of this dissociation in the cytotoxic properties will be studied in due course.

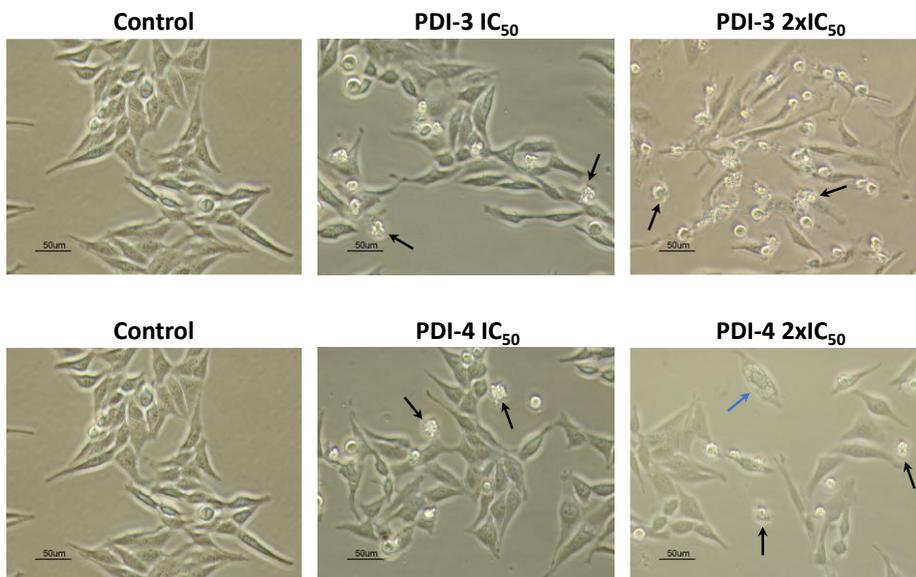
**Table 1.** IC<sub>50</sub> values of **PDI-2–PDI-4** and **PDI-6–PDI-8** incubated for 24 h in HeLa cells.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>PDI-2</b>	11.51 ± 0.9
<b>PDI-3</b>	2.46 ± 0.1
<b>PDI-4</b>	3.08 ± 0.6
<b>PDI-6</b>	10.54 ± 0.8
<b>PDI-7</b>	2.05 ± 0.9
<b>PDI-8</b>	1.90 ± 0.1

The data show that the starting **PDI-2** and **PDI-6** ligands were moderately active, with half minimum inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of 11.51 ± 0.86 and 10.54 ± 0.82 μM, respectively. Coordination of the silver or copper fragments greatly enhanced the cytotoxic activity, and the final complexes exhibited IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range. Analyzing the results as a function of the metal, a clear tendency was not observed because for **PDI-3** and **PDI-4**, the silver complex presented a slightly higher activity than the copper one, but the opposite result was obtained for **PDI-7** and **PDI-8**. However, these differences may not be significant, as the complexes in general exhibited excellent activity.

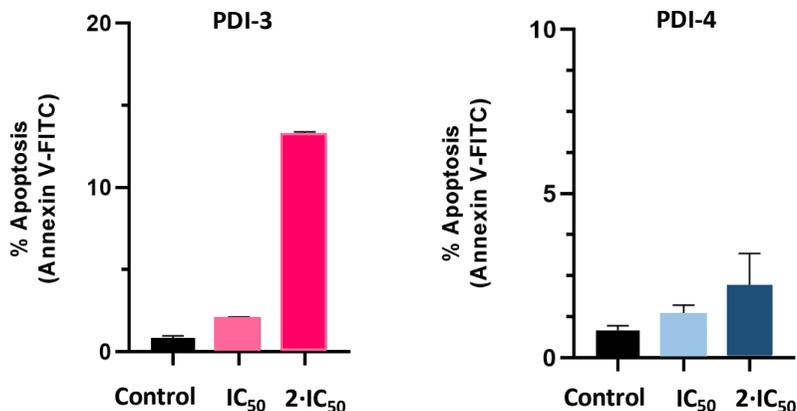
### 3.4. Morphological Appearance and Cell Death Mechanism

Cellular behavior and morphological alterations of HeLa cells after exposure to the complexes were analyzed under an inverted microscope. Untreated cells were healthy, grew exponentially and exhibited their characteristic morphology, whereas the cells treated with the silver and copper compounds at concentrations about and double the IC<sub>50</sub> showed alterations in the morphology (Figure 5). It is noticeable that for copper compound **PDI-4**, the formation of apoptotic death cells was observed, whereas at higher concentration some of the cells were greatly disturbed and presented a necrotic morphology. For the silver compound **PDI-3**, an apoptotic cell death envisaged an even higher concentration.



**Figure 5.** Phase contrast microscopy images of HeLa cells untreated (control) and treated with **PDI-3** and **PDI-4** at concentrations equal to the  $IC_{50}$  and  $2 \times IC_{50}$   $\mu M$  for 24 h. Black arrows point to apoptotic cells and blue arrow to necrotic cells.

With the purpose of corroborating the mechanism of cellular death, flow cytometry studies were performed. Evaluation of their ability to promote cell death based on specific cell death markers, in particular, phosphatidylserine (PS) exposure on the outer face of the plasma membrane to detect apoptosis using Annexin V-DY634 as a marker, were conducted. As can be observed in Figure 6, both complexes induced apoptosis as cell death, and a more potent cytotoxic effect at higher concentrations was observed, especially for the compound silver species **PDI-3**.

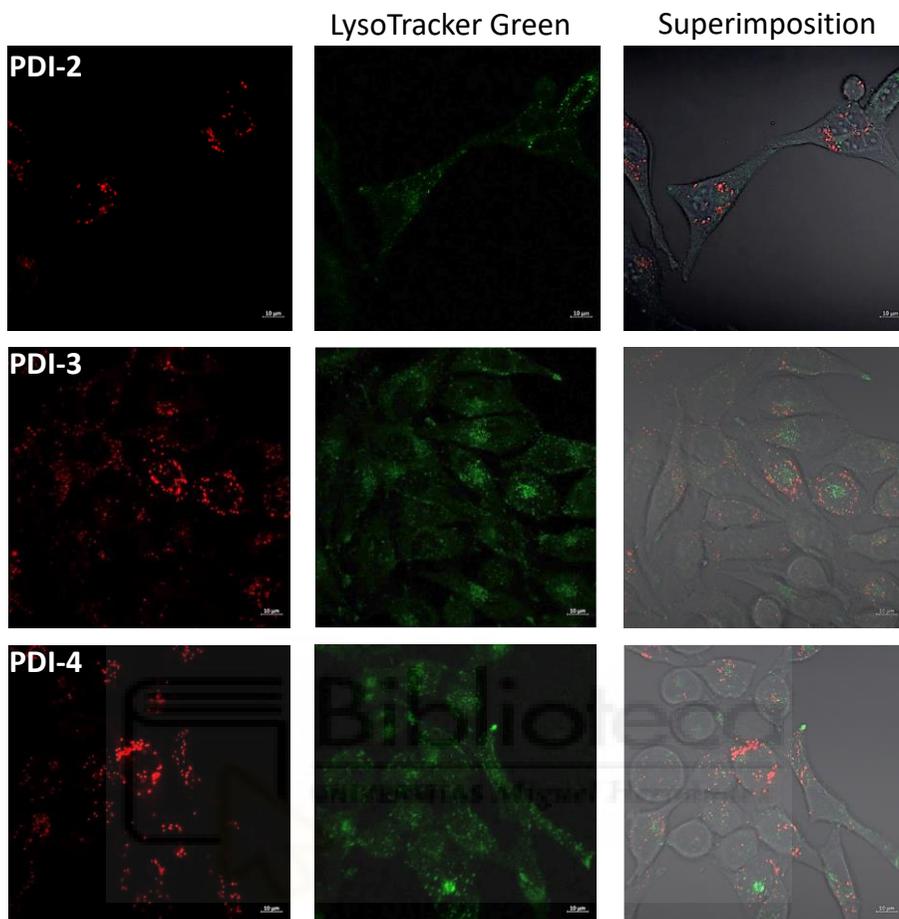


**Figure 6.** Cytotoxicity assays of compounds **PDI-3** and **PDI-4** incubated in HeLa cells for 24 h, in concentrations of IC<sub>50</sub> and 2 IC<sub>50</sub> values.

### 3.5. Confocal Fluorescence Microscopy

Cell biodistribution of the ligand **PDI-2** and the metal complexes **PDI-3** and **PDI-4** was studied in HeLa cells. Quenching of the luminescent properties in the tetra-metallic complexes precluded the analysis of the biodistribution in cancer cells. A colocalization assay was performed where the ligand **PDI-2** and the copper complex **PDI-4** were incubated with HeLa cells together with a commercially available selective dye for a specific organelle as internal standard. The superimposition of the images obtained from the internal standard with those of the study compounds provides the cellular internalization of the compounds.

As many of these small molecules enter the cell with a passive transport and localize in the lysosomes, the colocalization experiment was performed using the LysoTracker Green with a different emission energy from the compounds. Figure 7 shows the emission inside the cells of the ligand and copper complexes in red, and in green the emission of the LysoTracker and the superimposition images, observing a slightly different emission pattern for each compound

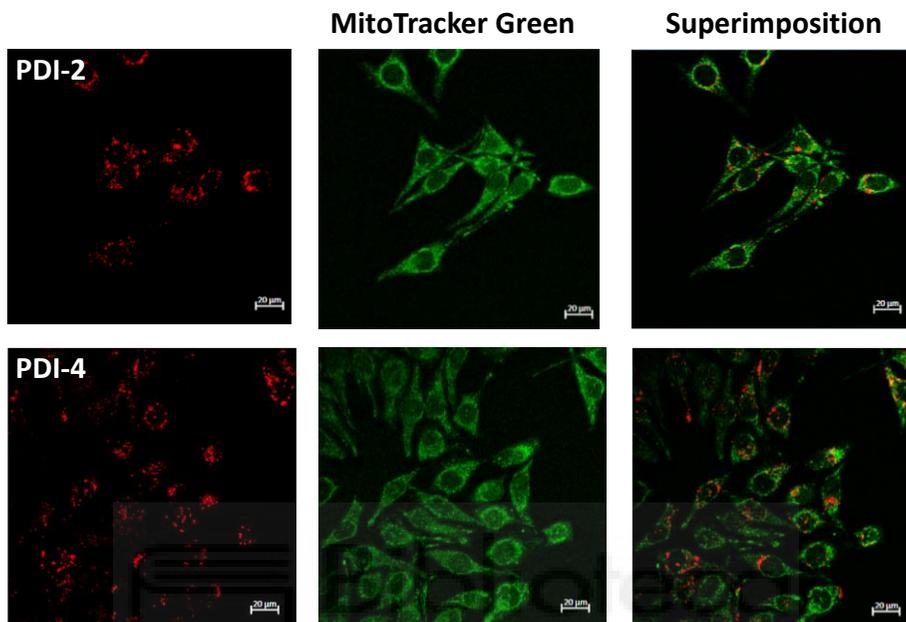


**Figure 3.7.** Fluorescence confocal microscopy images in HeLa cells incubated with the ligand **PDI-2** and the **PDI-3** and **PDI-4** complexes at 2 h (red, irradiated at 561 nm) and stained with LysoTracker Green (green, irradiation at 488 nm).

The **PDI-2** ligand presents a lower internalization inside the cells than the corresponding metal complexes, and all of them spread through the cytoplasm of the cell, non-entering in the nucleus. It can be observed in the superimposition images that neither the ligand or the complexes colocalized with the signal emitted by LysoTracker, indicating the absence of a lysosomal localization.

In an attempt to elucidate the biodistribution and considering the previous experiment, compounds were incubated in HeLa cells for 2 h and MitoTracker Green, a mitochondrial selective dye, was added as internal standard. Mitochondria is an important biological target and several metal complexes targeting mitochondria have been encountered. Superimposition of the images reveals a partial mitochondrial localization for the ligand **PDI-2** and the copper complex **PDI-4** (Figure 8). Additionally, small spots near the nuclear region

that do not match with the mitochondrial biodistribution can be observed. This accumulation may point to a localization in the Golgi apparatus, although further experiments with this specific dye as internal standard should be performed.



**Figure 8.** Fluorescence confocal microscopy images in HeLa cells incubated with the ligand **PDI-2** and the copper complex **PDI-4** at 2 h (red, irradiated at 561 nm) and stained with MitoTracker Green (green, irradiation at 488 nm).

#### 4. Conclusions

We report the synthesis of perylenediimide (PDI) derivatives bearing one or four dipyrindylamino fragments with the purpose of studying the coordination properties to silver and copper phosphine complexes. These ligands coordinate to the metal fragments in a chelate fashion and mononuclear or tetranuclear complexes have been achieved. As perylenediimides are very interesting chromophore groups, the photophysical properties of the ligands and complexes have been studied. The coordination of the metal center did not reveal a significant effect on the emission energy in the complexes, which are mainly based on the PDI ligands, although a higher quantum yield was observed upon coordination of the metal complexes. For the tetranuclear silver or copper derivatives, quenching of the luminescence was observed.

The antiproliferative effect of the free perylenediimide ligand and the metal complexes against the cervix cancer cell line HeLa was determined by the MTT assay. The free perylenediimide ligands exhibit a moderate cytotoxic activity, but the coordination of silver or copper to the dipyrindylamino fragment greatly enhanced the activity, suggesting a synergistic effect between the two fragments. Flow cytometry experiments showed that the metal complexes



induce an apoptotic cell death. To assert the cellular biodistribution of the PDIs and the complexes, a colocalization experiment using specific dyes for the lysosomes or mitochondria as internal standards revealed a major internalization inside the cell for the metal complexes as well as a partial mitochondrial localization.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1). Figure S1:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-2. Figure S2:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of PDI-2. Figure S3: MALDI-TOF spectrum of PDI-2. Figure S4: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-2. Figure S5: IR spectrum (KBr) of PDI-2. Figure S6:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-6. Figure S7:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of PDI-6. Figure S8: MALDI-TOF spectrum of PDI-6. Figure S9: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-6. Figure S10: IR spectrum (KBr) of PDI-6. Figure S11:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-3. Figure S12: MALDI-TOF spectrum of PDI-3. Figure S13: IR spectrum (KBr) of PDI-3. Figure S14:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-4. Figure S15: MALDI-TOF spectrum of PDI-4. Figure S16: IR spectrum (KBr) of PDI-4. Figure S17:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-7. Figure S18: IR spectrum (KBr) of PDI-7. Figure S19:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-8. Figure S20: IR spectrum (KBr) of PDI-8. Figure S21: UV-Vis spectra of PDI-complexes. Figure S22: Fluorescence spectra of PDI-3 and PDI-4. Figure S23: UV-Vis spectra of PDI-2, -3, -7, -8 in PBS solution + 5% DMSO at 37.5 °C, at 0 and 24 h. Figure S24: Dose–response curves of HeLa cells after incubation with cationic PDI-2, -3, -4, and PDI-6, -7, -8 for 24 h.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.C.G. and F.F.-L.; methodology, J.G.-G. and M.R.; formal analysis, M.C.G., A.S.-S. and F.F.-L.; writing—original draft preparation, M.C.G., A.S.-S. and F.F.-L.; writing—review and editing, M.C.G., A.S.-S., F.F.-L., J.G.-G. and M.R.; funding acquisition, M.C.G., A.S.-S. and F.F.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Agencia Estatal de Investigación (AEI), projects PID2019-109200GB-I00, PID2019-104379RB-C21/AEI/10.13039/501100011033, RED2018-102471-T (MCIN/AEI /10.13039/501100011033) and Gobierno de Aragón-Fondo Social Europeo (Research Group E07\_20R).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Nowak-Król, A.; Würthner, F. Progress in the synthesis of perylene bisimide dyes. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 1272–1318.
2. Gutiérrez-Moreno, D.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F. Direct amination and N-heteroarylation of perylenediimides. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2488–2499.
3. Seetharaman, S.; Zink-Lorre, N.; Gutierrez-Moreno, D.; Karr, P.A.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F. Quadrupolar Ultrafast Charge Transfer in Diaminoazobenzene-Bridged Perylenediimide Triads. *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202104574.
4. Sideri, I.K.; Jang, J.; Garcés-Garcés, J.; Sastre-Santos, Á.; Canton-Vitoria, R.; Kitaura, R.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F.; Tagmatarchis, N. Unveiling the

- Photoinduced Electron-Donating Character of MoS<sub>2</sub> in Covalently Linked Hybrids Featuring Perylenediimide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 9120–9126.
- Singh, P.; Hirsch, A.; Kumar, S. Perylene diimide-based chemosensors emerging in recent years: From design to sensing. *Trends Anal. Chem.* **2021**, *138*, 116–327.
  - Sun, M.; Müllen, K.; Yin, M. Water-soluble perylenediimides: Design concepts and biological applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1513–1528.
  - Lu, L.; Sun, H.-J.; Zeng, Y.-T.; Shao, Y.; Bermeshev, M.V.; Zhao, Y.; Sun, B.; Chen, Z.-J.; Ren, X.-K.; Zhu, M. Perylene diimide derivative *via* ionic self-assembly: Helical supramolecular structure and selective detection of ATP. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8*, 10422–10430.
  - Wang, K.; An, H.; Qian, F.; Wang, Y.; Zhang, J.; Li, X. Synthesis, optical properties and binding interactions of a multivalent glycocluster based on a fluorescent perylene bisimide derivative. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 23190–23196.
  - Céspedes-Guirao, F.J.; Roperio, A.B.; Font-Sanchis, E.; Nadal, Á.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á. A water-soluble perylenedye functionalised with a 17 $\beta$ -estradiol: A new fluorescent tool for steroid hormones. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8307–8309.
  - Yang, S.K.; Shi, X.; Park, S.; Doganay, S.; Ha, T.; Zimmerman, S.C. Monovalent, Clickable, Uncharged, Water-Soluble Perylenediimide-Cored Dendrimers for Target-Specific Fluorescent Biolabeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9964–9967.
  - Donnier-Marechal, M.; Galanos, N.; Grandjean, T.; Pascal, Y.; Ji, D.K.; Dong, L.; Gillon, E.; He, X.P.; Imberty, A.; Kipnis, E.; Dessein, R.; Vidal, S. Perylenediimide-based glycoclusters as high affinity ligands of bacterial lectins: Synthesis, binding studies and anti-adhesive properties. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 10037–10043.
  - Gálvez, N.; Kedracka, E.J.; Carmona, F.; Céspedes-Guirano, F.J.; Font-Sanchis, E.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á.; Domínguez-Vera, J.M. Water soluble fluorescent-magnetic perylenediimide-containing maghemite-nanoparticles for bimodal MRI/OI imaging. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 205–211.
  - Li, H.; Yue, L.; Li, L.; Liu, G.; Zhang, J.; Luo, X.; Wu, F. Triphenylamine-perylenediimide conjugate-based organic nanoparticles for photoacoustic imaging and cancer phototherapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *205*, 111841.
  - Büyükekçi, S.I.; Orman, E.B.; Sangül, A.; Altındal, A.; Özkaya, A.R. Electrochemical and photovoltaic studies on water soluble triads: Metallosupramolecular self-assembly of ditopic bis(imidazole)perylenediimide with platinum(II)-, and palladium(II)-2,2':6',2''-terpyridyl complex ions. *Dyes Pigm.* **2017**, *144*, 190–202.
  - Dominguez, C.; Baena, M.J.; Coco, S.; Espinet, P. Perylenecarboxydiimide-gold(I) organometallic dyes. Optical properties and Langmuir films. *Dyes Pigm.* **2017**, *140*, 375–383.
  - Cai, Y.; Cheng, W.; Ji, C.; Su, Z.; Yin, M. Cai, Y.; Cheng, W.; Ji, C.; Su, Z.; Yin, M. Perylenediimide/silver nanohybrids with visible-light photocatalysis enhanced antibacterial effect. *Dyes Pigm.* **2021**, *195*, 109698.
  - Costa, R.D.; Céspedes-Guirao, F.J.; Ortí, E.; Bolink, H.J.; Gierschner, J.; Fernández-Lázaro, F. Sastre-Santos, Á. Efficient deep-red light-emitting electrochemical cells based on a perylenediimide-iridium-complex dyad. *Chem. Commun.* **2009**, *26*, 3886–3888.
  - Qvortrup, K.; Bond, A.D.; Nielsen, A.; McKenize, C.J.; Kilså, K.; Nielsen, M.B. Perylenediimide–Metal ion dyads for photo-induced electron transfer. *Chem. Commun.* **2008**, 1986–1988.



19. Hou, Y.; Zhang, Z.; Lu, S.; Yuan, J.; Zhu, Q.; Chen, W.P.; Ling, S.; Li, X.; Zheng, Y.Z.; Zhu, K.; et al. Highly Emissive Perylene Diimide-Based Metallacages and Their Host–Guest Chemistry for Information Encryption. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 18763–18768.
20. Aksakal, N.E.; Kazan, H.H.; Ecik, E.T.; Yuksel, F. Novel photosensitizer based on a ruthenium(ii) phenanthroline bis(perylene diimide) dyad: Synthesis, generation of singlet oxygen and *in vitro* photodynamic therapy. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 17538–17545.
21. Zhang, S.; Du, C.; Wang, Z.; Han, X.; Zhang, K.; Liu, L. Carboplatin resistant human laryngeal carcinoma cells are cross resistant to curcumin due to reduced curcumin accumulation. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 739–744.
22. Eloy, L.; Jarrousse, A.S.; Teyssot, M.L.; Gautier, A.; Morel, L.; Jolival, C.; Cresteil, T.; Roland, S. Anticancer Activity of Silver–N-Heterocyclic Carbene Complexes: Caspase-Independent Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF). *ChemMedChem* **2012**, *7*, 805–814.
23. Kumar Raju, S.; Karunakaran, A.; Kumar, S.; Sekar, P.; Murugesan, M.; Karthikeyan, M. Silver Complexes as Anticancer Agents: A Perspective Review. *German J. Pharm. Biomater.* **2022**, *1*, 6–28.
24. Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
25. Canudo-Barreras, G.; Ortego, L.; Izaga, A.; Marzo, I.; Herrera, R.P.; Gimeno, M.C. Synthesis of New Thiourea-Metal Complexes with Promising Anticancer Properties. *Molecules* **2021**, *26*, 6891.
26. Mármol, I.; Montanel-Perez, S.; Royo, J.C.; Gimeno, M.C.; Villacampa, M.D.; Rodríguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Gold(I) and Silver(I) Complexes with 2-Anilinopyridine-Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 17732–17745.
27. Johnson, A.; Marzo, I.; Gimeno, M.C. Heterobimetallic propargyl gold complexes with  $\pi$ -bound copper or silver with enhanced anticancer activity. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 11736–11742.
28. Salvador-Gil, D.; Ortego, L.; Herrera, R.P.; Marzo, I.; Gimeno, M.C. Highly active group 11 metal complexes with  $\alpha$ -hydrazidophosphonate ligands. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 13745–13755.
29. Molinaro, C.; Martoriati, A.; Pelinski, L.; Cailliau, K. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. *Cancers* **2020**, *12*, 2863. <https://doi.org/10.3390/cancers12102863>.
30. Bardají, M.; Crespo, O.; Laguna, A.; Fischer, A.K. Structural characterization of silver(I) complexes  $[\text{Ag}(\text{O}_3\text{SCF}_3)(\text{L})]$  ( $\text{L}=\text{PPh}_3$ ,  $\text{PPh}_2\text{Me}$ ,  $\text{SC}_4\text{H}_8$ ) and  $[\text{AgL}_n](\text{CF}_3\text{SO}_3)$  ( $n=2-4$ ), ( $\text{L}=\text{PPh}_3$ ,  $\text{PPh}_2\text{Me}$ ). *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *304*, 7–16.
31. Rajasingh, P.; Cohen, R.; Shirman, E.; Shimon, L.J.W.; Rybtchiski, B. Selective Bromination of Perylene Diimides under Mild Conditions. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973–5979.
32. Battagliarin, G.; Li, C.; Enkelmann, V.; Müllen, K. 2,5,8,11-Tetraboronic Ester Perylene diimides: A Next Generation Building Block for Dye-Stuff Synthesis. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3012–3015.
33. Teraoka, T.; Hiroto, S.; Shinokubo, H. Iridium-Catalyzed Direct Tetraborylation of Perylene Bisimides. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2532–2535.
34. Guram, A.S.; Rennels, R.A.; Buchwald, S.L. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348–1350.

35. Louie, L.; Hartwig, J.F. Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609–3612.
36. Van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245.



## Supplementary Data

### Synthesis of bipyridylaminoperylene diimide-metal complexes and their cytotoxicity studies

#### Table of Contents

• Figure S1: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-2	118
• Figure S2: <sup>13</sup> C NMR spectrum of PDI-2	118
• Figure S3: MALDI-TOF spectrum of PDI-2	119
• Figure S4: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-2	119
• Figure S5: IR spectrum (KBr) of PDI-2	120
• Figure S6: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-6	120
• Figure S7: <sup>13</sup> C NMR spectrum of PDI-6	121
• Figure S8: MALDI-TOF spectrum of PDI-6	121
• Figure S9: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-6	122
• Figure S10: IR spectrum (KBr) of PDI-6	122
• Figure S11: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-3	123
• Figure S12: MALDI-TOF spectrum of PDI-3	123
• Figure S13: IR spectrum (KBr) of PDI-3	124
• Figure S14: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-4	124
• Figure S15: MALDI-TOF spectrum of PDI-4	125
• Figure S16: IR spectrum (KBr) of PDI-4	125
• Figure S17: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-7	126
• Figure S18: IR spectrum (KBr) of PDI-7	126
• Figure S19: <sup>1</sup> H NMR spectrum of PDI-8	127
• Figure S20: IR spectrum (KBr) of PDI-8	127
• Figure S21: UV-Vis spectra of PDI-complexes	128
• Figure S22: Fluorescence spectra of PDI-3 and PDI-4	128
• Figure S23: UV-Vis spectra of PDI-2, -3, -7, -8 in PBS solution + 5% DMSO at 37.5 °C, at 0 and 24 h.	129
• Figure S24: Dose-response curves of HeLa cells after incubation with cationic PDI-2, -3, -4, and PDI-6, -7, -8 for 24 hours.	130

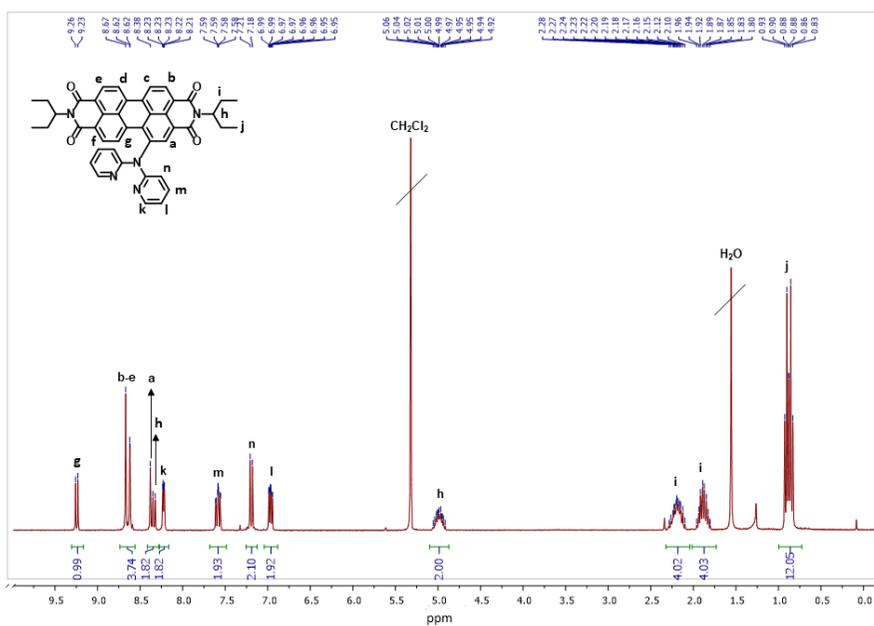


Figure S1: <sup>1</sup>H NMR spectrum of PDI-2 in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 MHz, 25 °C)

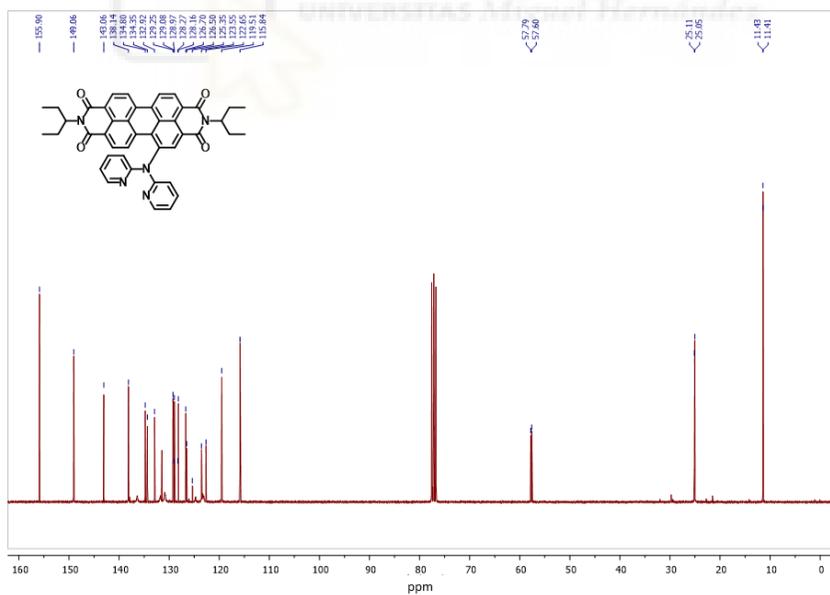


Figure S2: <sup>13</sup>C NMR spectrum of PDI-2 in CDCl<sub>3</sub> (75 MHz, 25 °C)

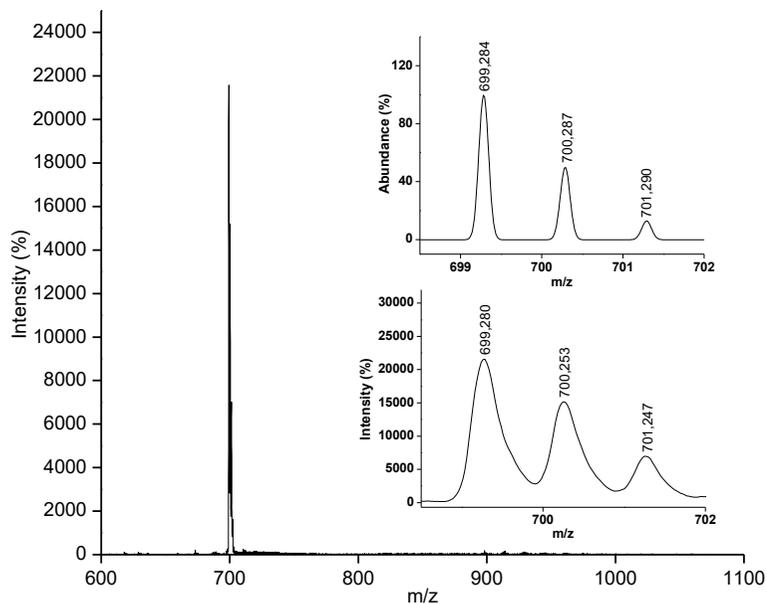


Figure S3: MALDI-TOF spectrum of PDI-2

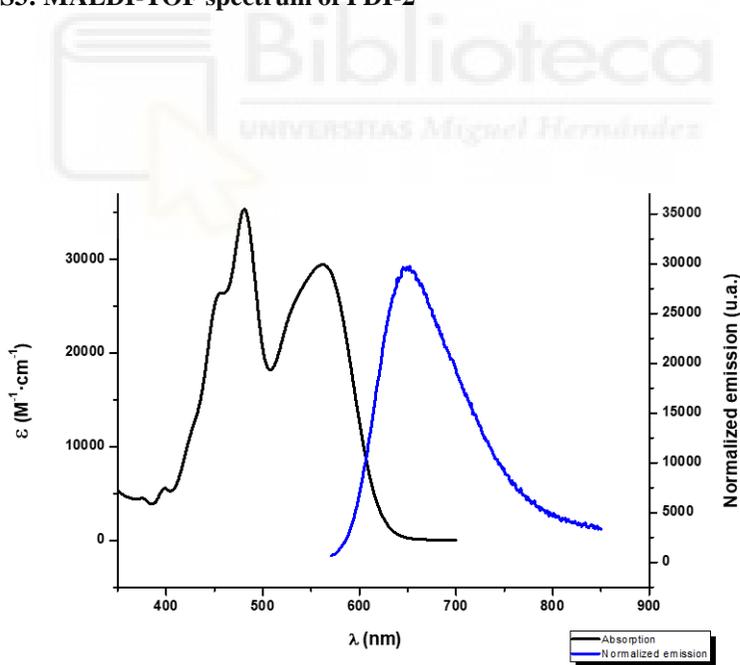


Figure S4: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-2

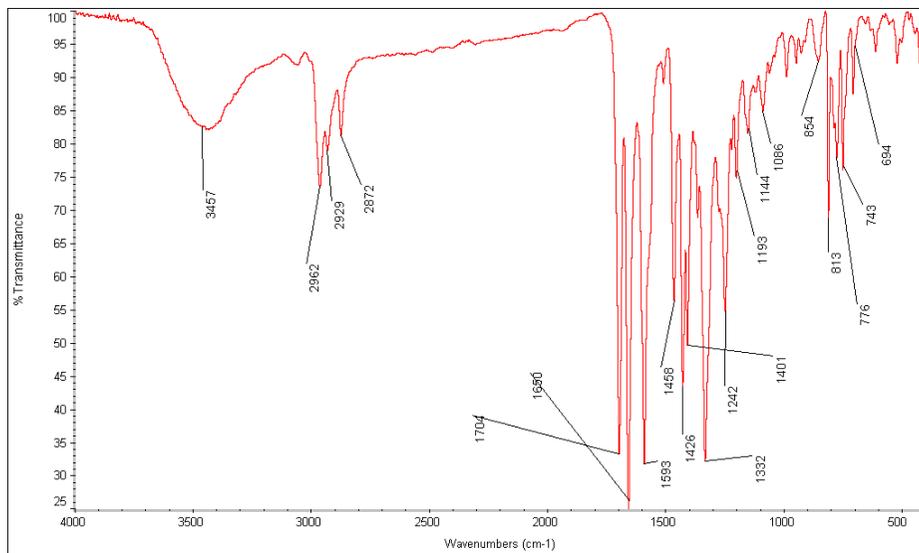


Figure S5: IR spectrum (KBr) of PDI-2

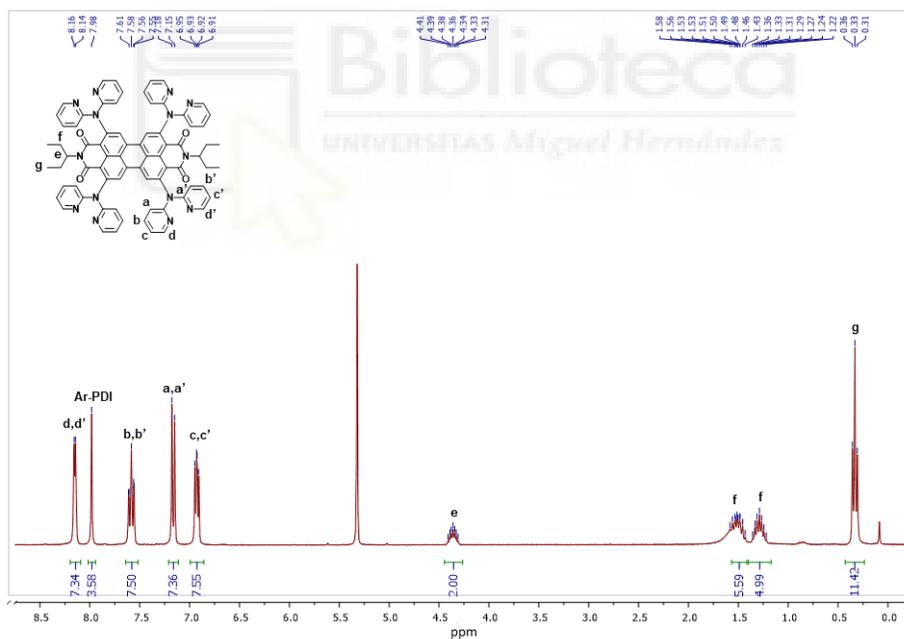


Figure S6: <sup>1</sup>H NMR spectrum of PDI-6 in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 MHz, 25 °C)

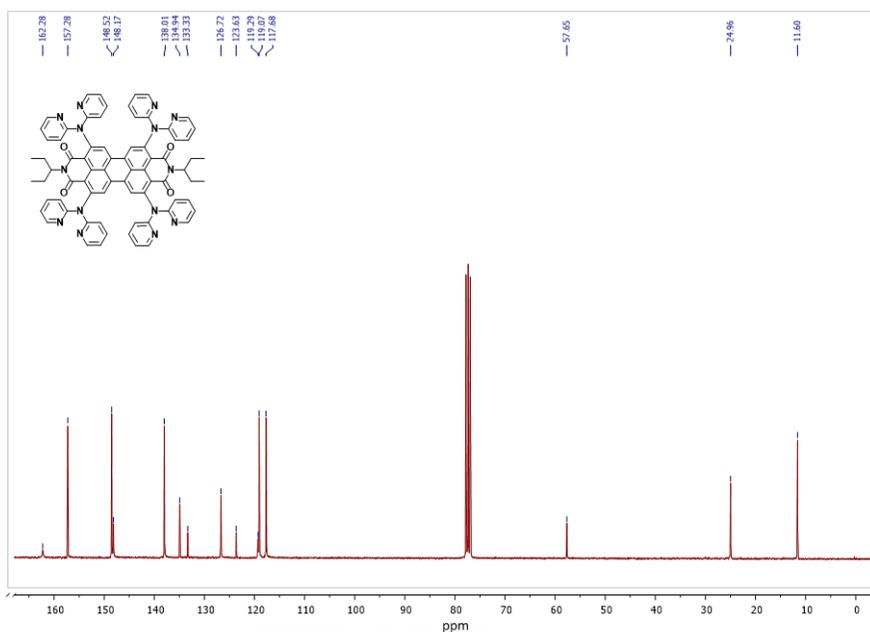


Figure S7:  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of PDI-6 in  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz, 25 °C)

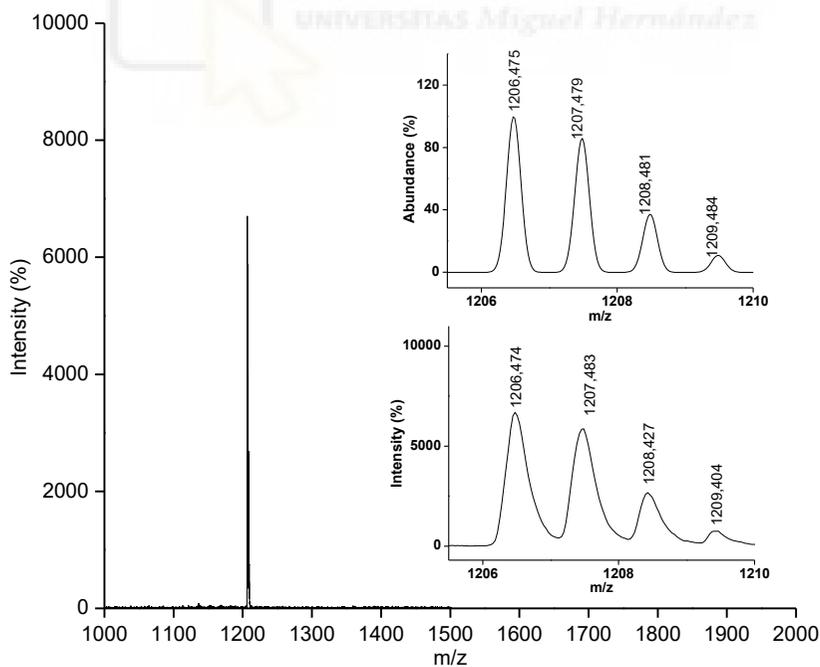


Figure S8: MALDI-TOF spectrum of PDI-6

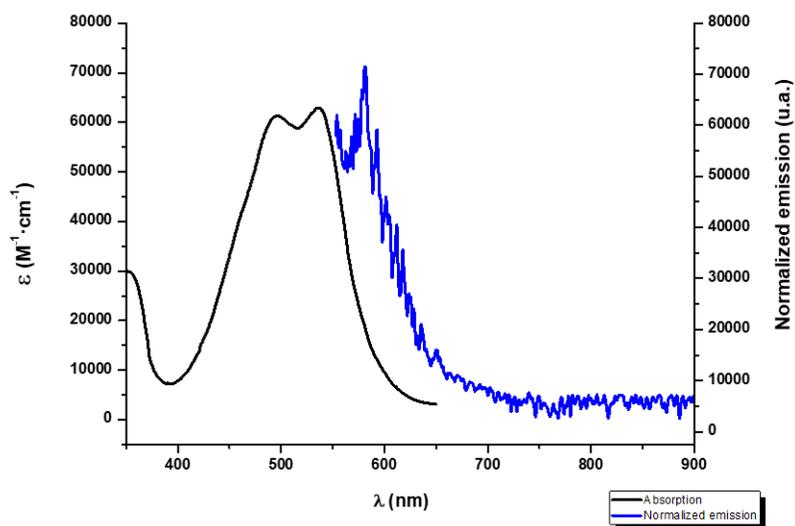


Figure S9: UV-Vis and fluorescence spectra of PDI-6

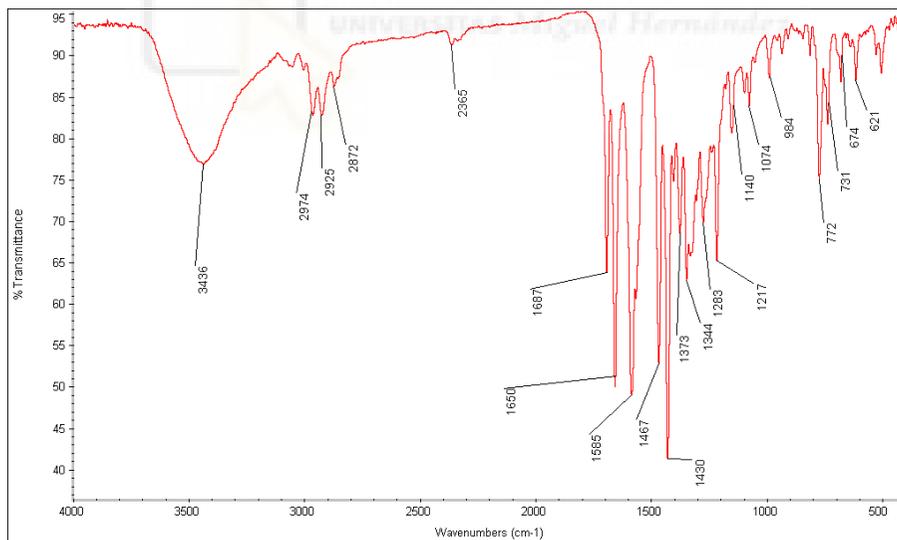


Figure S10: IR spectrum (KBr) of PDI-6



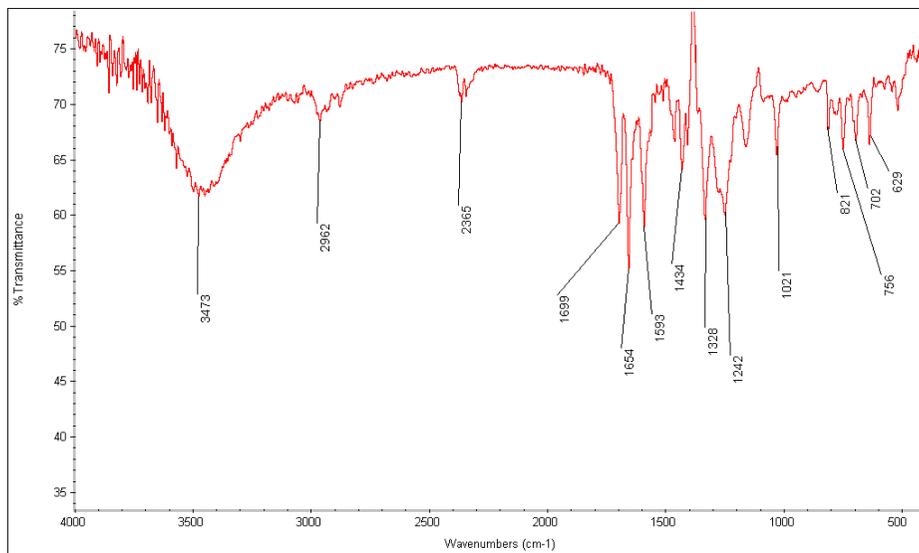


Figure S13: IR spectrum (KBr) of PDI-3

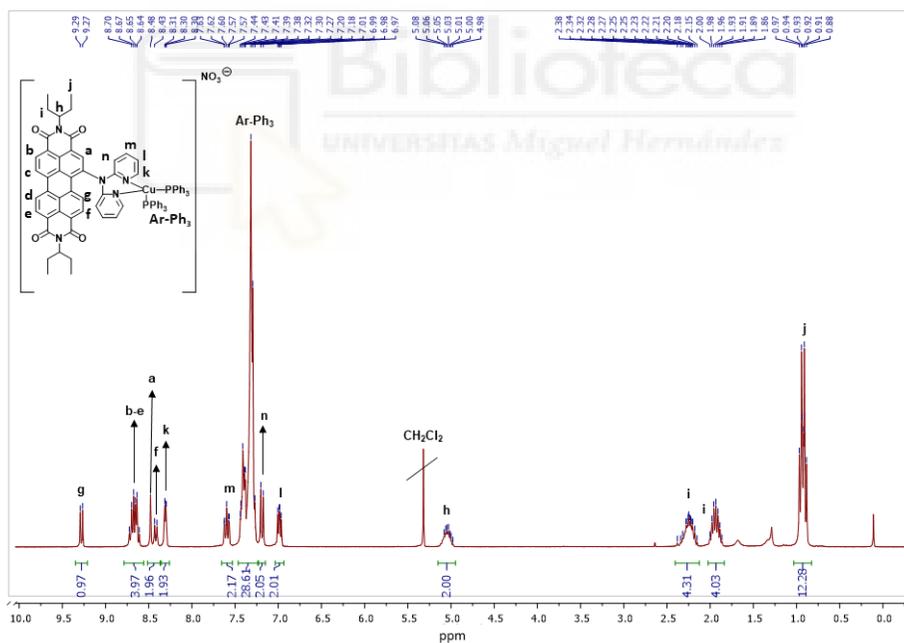
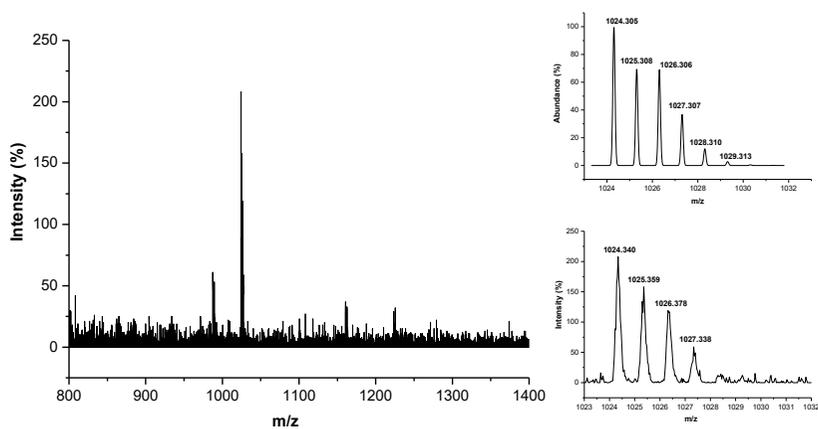
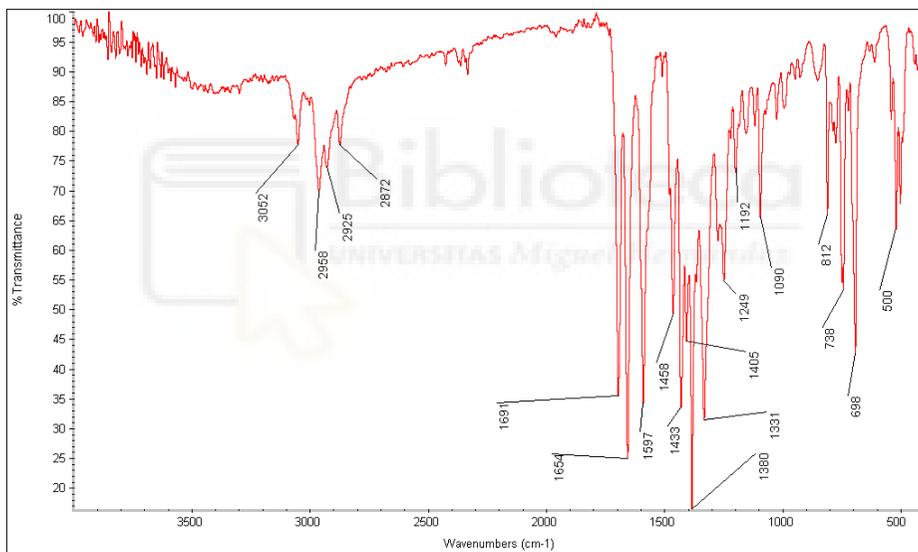


Figure S14: <sup>1</sup>H NMR spectrum of PDI-4 in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 MHz, 25 °C)



**Figure S15: MALDI-TOF spectrum of PDI-4**



**Figure S16: IR spectrum (KBr) of PDI-4**

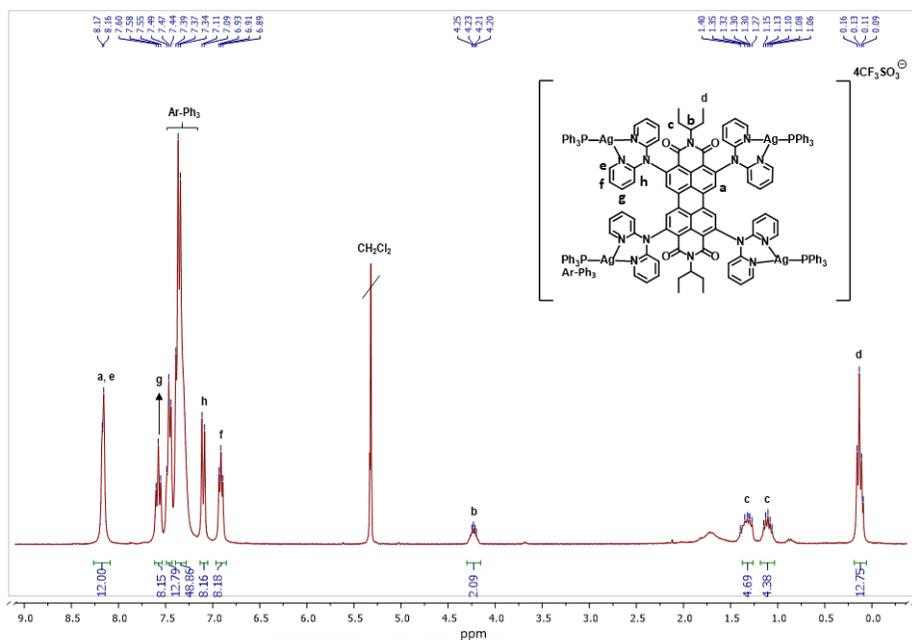


Figure S17:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PDI-7 in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (300 MHz, 25 °C)

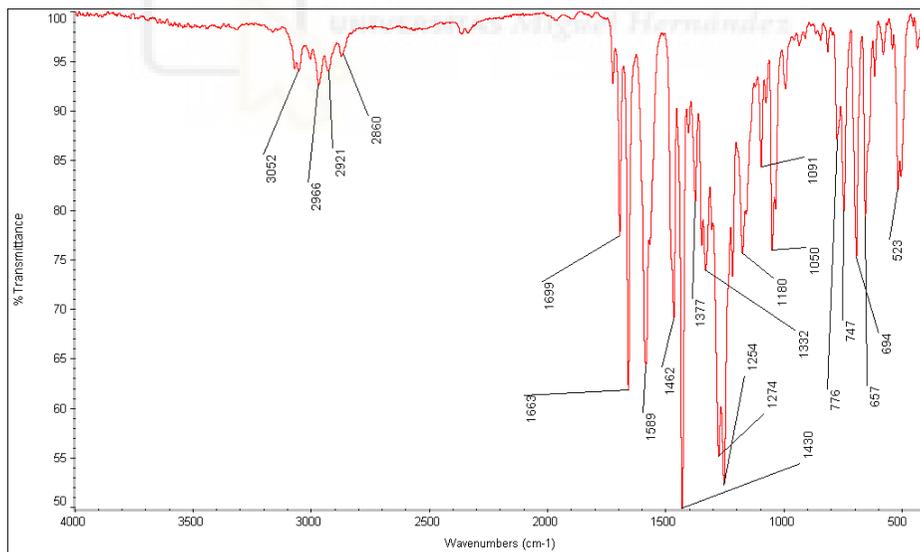
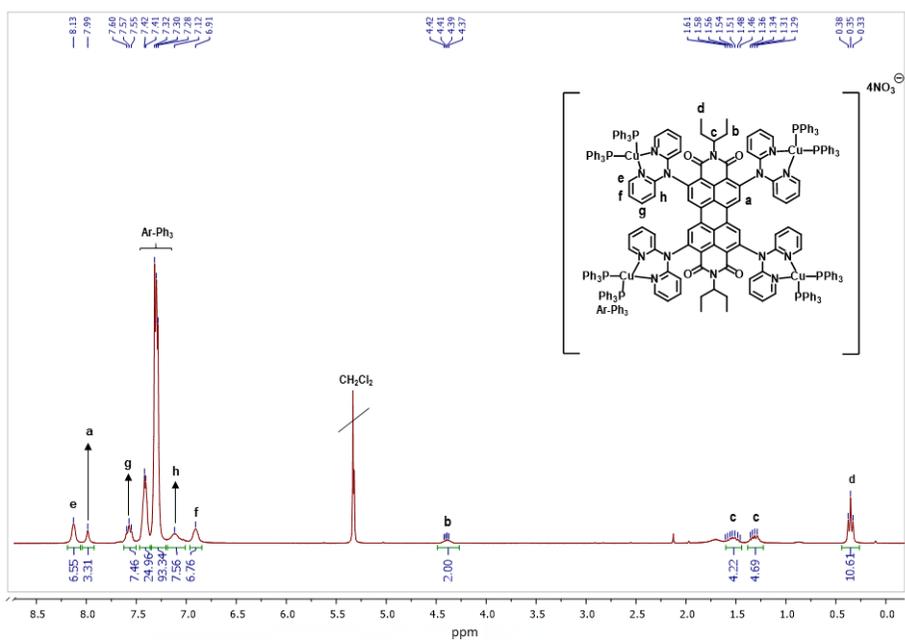
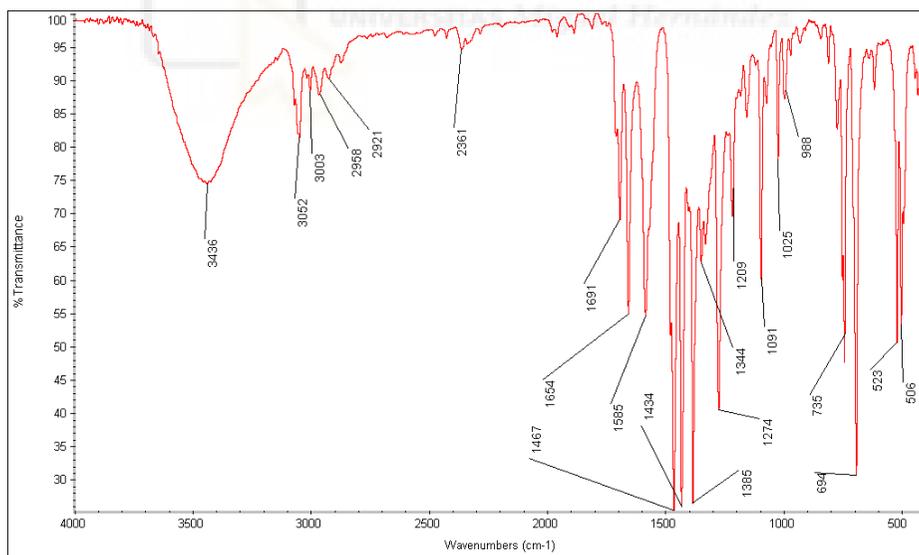


Figure S18: IR spectrum (KBr) of PDI-7



**Figure S19: <sup>1</sup>H NMR spectrum of PDI-8 in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 MHz, 25 °C)**



**Figure S20: IR spectrum (KBr) of PDI-8**

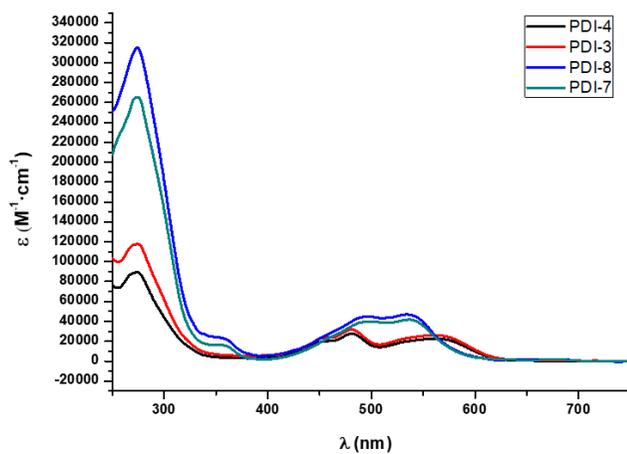


Figure S21: UV-Vis spectra of PDI-complexes ( $\text{CHCl}_3$ )

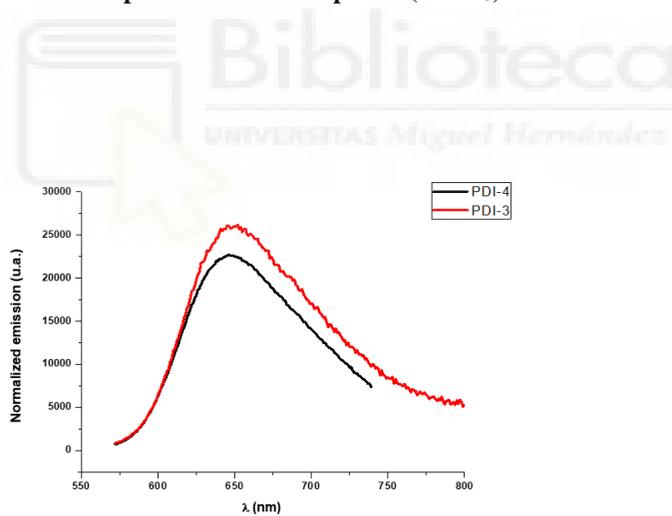
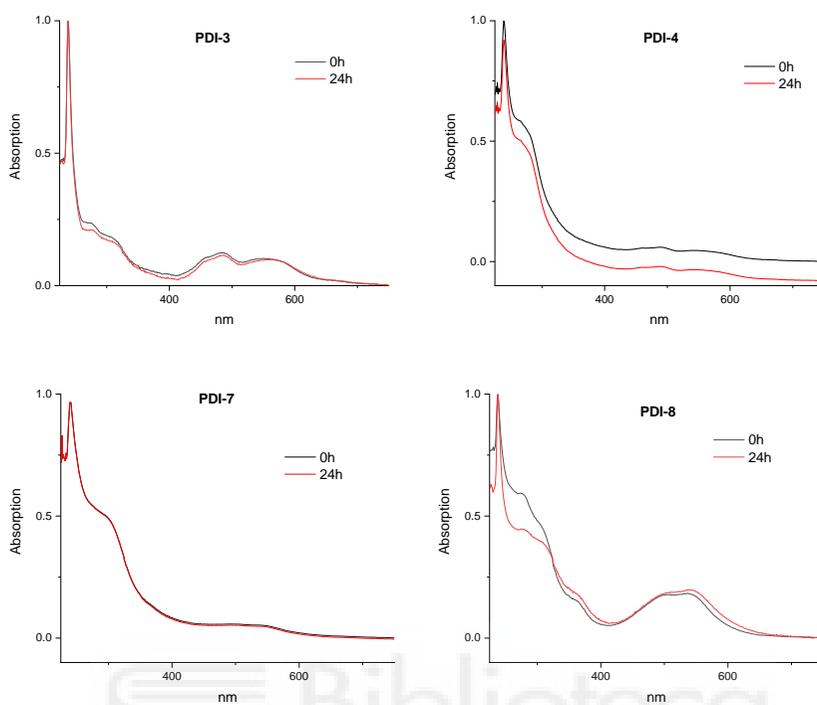


Figure S22: Fluorescence spectra of PDI-3 and PDI-4 ( $\text{CHCl}_3$ )



**Figure S23: UV-Vis spectra of PDI-2, -3, -7, -8 in PBS solution + 5% DMSO at 37.5 °C, at 0 and 24 h (concentration  $5 \cdot 10^{-4}$ ).**

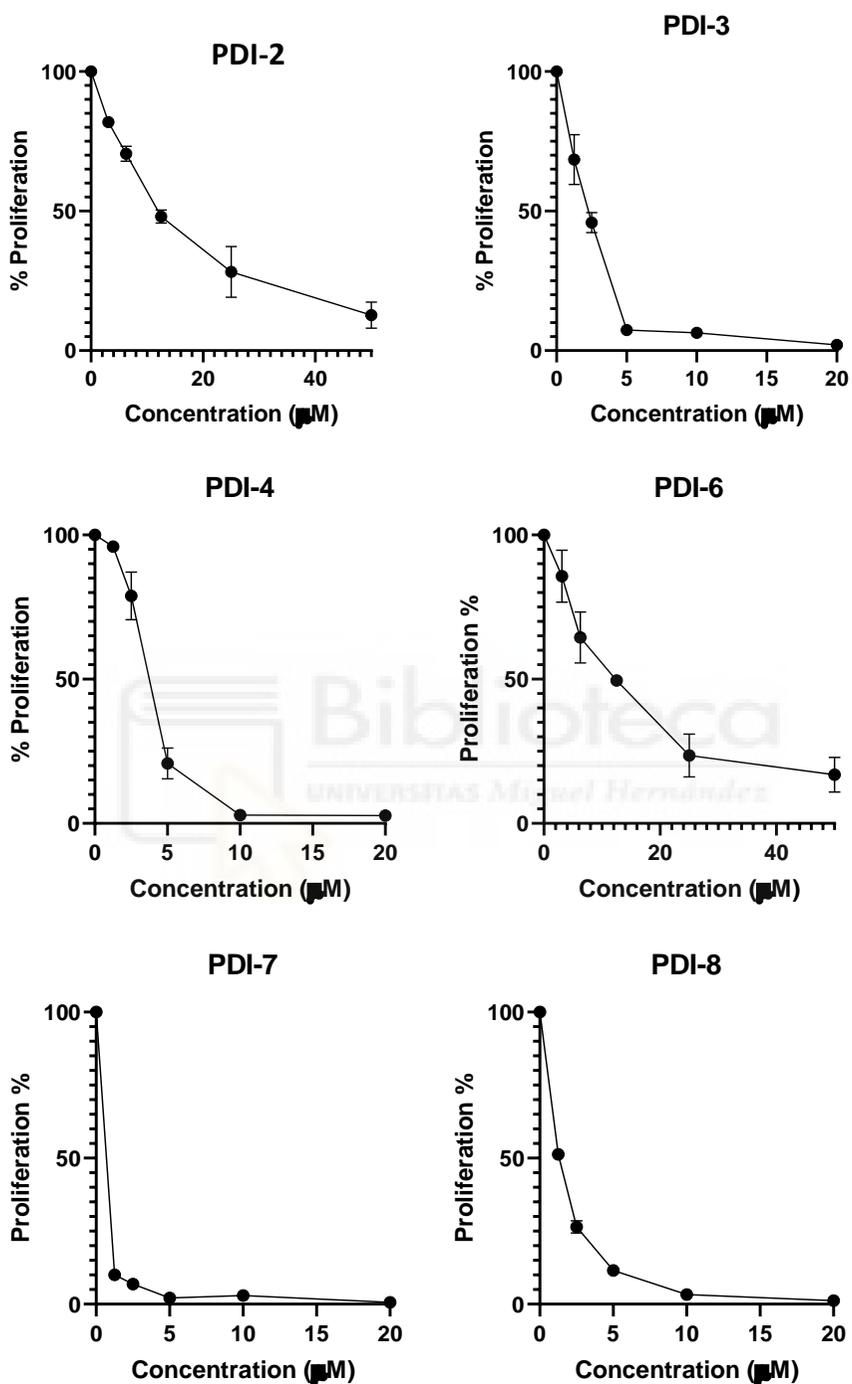


Figure S24: Dose-response curves of HeLa cells after incubation with cationic PDI-2, -3, -4, and PDI-6, -7, -8 for 24 hours.

### 3.5. Resumen

Para la síntesis de las PDI metaladas objetivo se siguió la ruta sintética descrita en los esquemas 3.2-3.3.

En primer lugar, la preparación de los derivados monosustituídos, **PDI-3** y **PDI-4**, comenzó con una reacción de imidación del **PDA** bajo condiciones clásicas utilizando imidazol fundido en presencia de la amina y *N*-metilpirrolidona,<sup>213</sup> que tras la precipitación en medio ácido condujo a la **PDI-EtPr** con 85% de rendimiento sin necesidad de purificación. A continuación, se llevó a cabo una reacción de bromación en presencia de carbonato de potasio,<sup>214</sup> obteniendo finalmente el derivado monobromado **PDI-Br** con un 30% de rendimiento. Los datos espectroscópicos de la **PDI-EtPr** y **PDI-Br** coinciden con los descritos en bibliografía. Para la síntesis de la **PDI-2** se llevó a cabo una reacción de acoplamiento cruzado de Buchwald-Hartwig entre el derivado monobromado y la 2,2'-dipiridilamina catalizada por bis[(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) en medio básico, siguiendo las condiciones descritas por Sonar y colaboradores para otro tipo de sistemas aromáticos.<sup>215</sup> Finalmente se obtuvo la **PDI-2** con un 70% tras su purificación mediante cromatografía en columna. La adición de [Ag(OTf)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] o [CuNO<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] a una disolución de **PDI-2** en un ratio molar 1:1 dio lugar a la formación de los complejos de plata **PDI-3** y de cobre **PDI-4**, ambos con un rendimiento cuantitativo sin necesidad de etapa de purificación.

Para poder obtener los derivados tetrasustituídos en orto, una vez sintetizada la **PDI-EtPr**, se siguió el procedimiento descrito por Shinokubo y colaboradores,<sup>216</sup> llevando a cabo una reacción de activación de enlaces C-H catalizada por iridio y tris-pentafluorofenilfosfina en presencia de bispinacolato de boro para dar lugar a la **PDI-4Bpin** con un 40% rendimiento tras su purificación cromatográfica. Una vez obtenida esta PDI, mediante una reacción de sustitución de los grupos boronato con CuBr y posterior purificación, se obtuvo la **PDI-4Br** con 52% rendimiento. Los datos espectroscópicos de la **PDI-4Bpin** y de la **PDI-4Br** coinciden con los descritos en la bibliografía. Tras la obtención de la **PDI-4Br**, igual que en el caso de la **PDI-2** y bajo las mismas condiciones, se realizó la reacción de acoplamiento de Buchwald-Hartwig para obtener la **PDI-6** con un 69% de rendimiento tras su purificación. En este caso, para la formación de los complejos se adicionó [Ag(OTf)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] o [CuNO<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] en un ratio molar 4:1 debido a la presencia de cuatro grupos quelantes en la **PDI-6**. Finalmente se obtuvieron los complejos de plata **PDI-7** y de cobre **PDI-8** con rendimientos cuantitativos y sin necesidad de etapa de purificación.

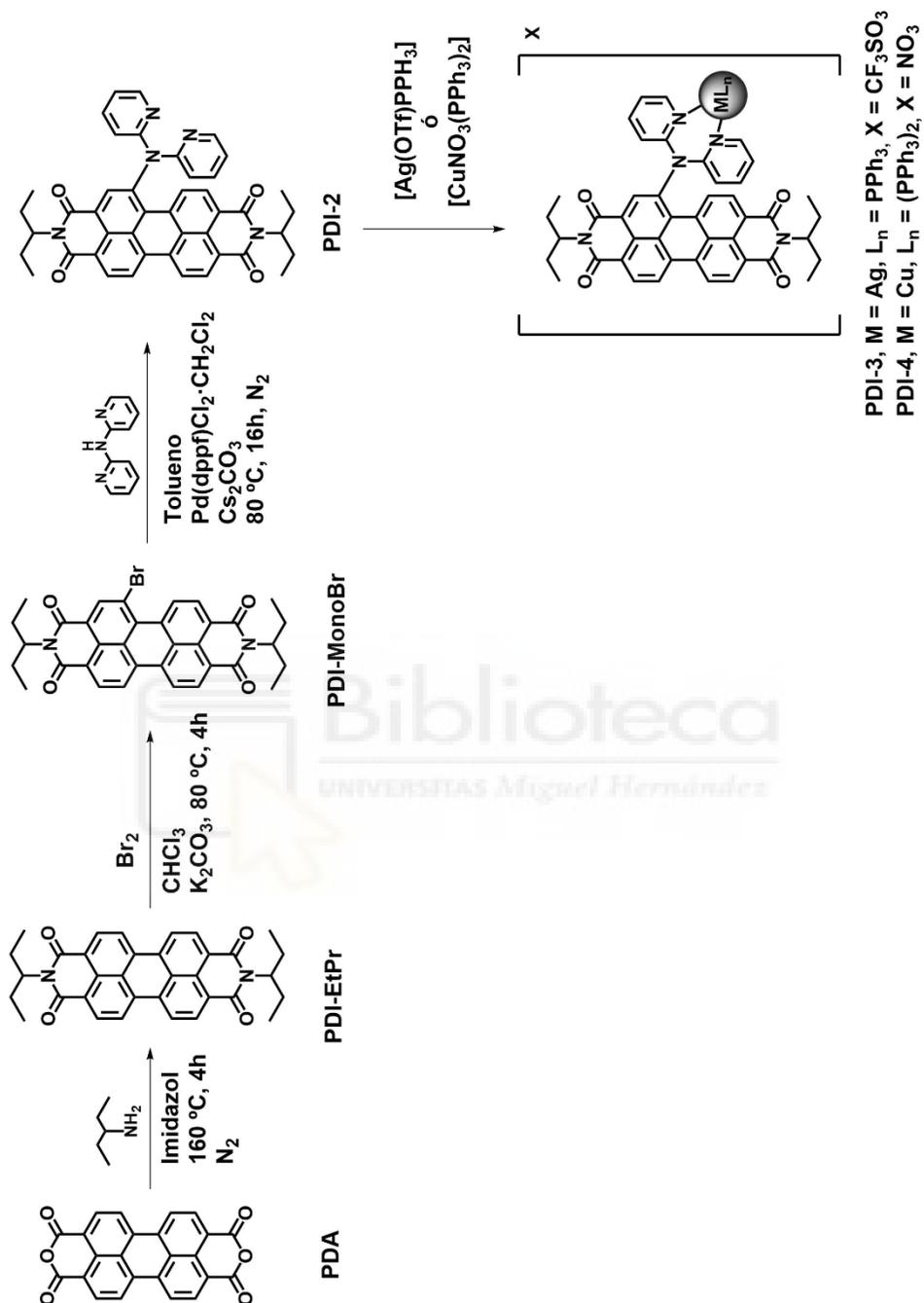
Tanto los complejos metálicos **PDI-3 – 4**, como los **PDI-7 – 8**, así como sus precursores **PDI-2** y **PDI-6** se caracterizaron completamente mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos (ver *Supporting Information*).

<sup>213</sup> Holman, M. W.; Liu, R.; Adams, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12649-12654.

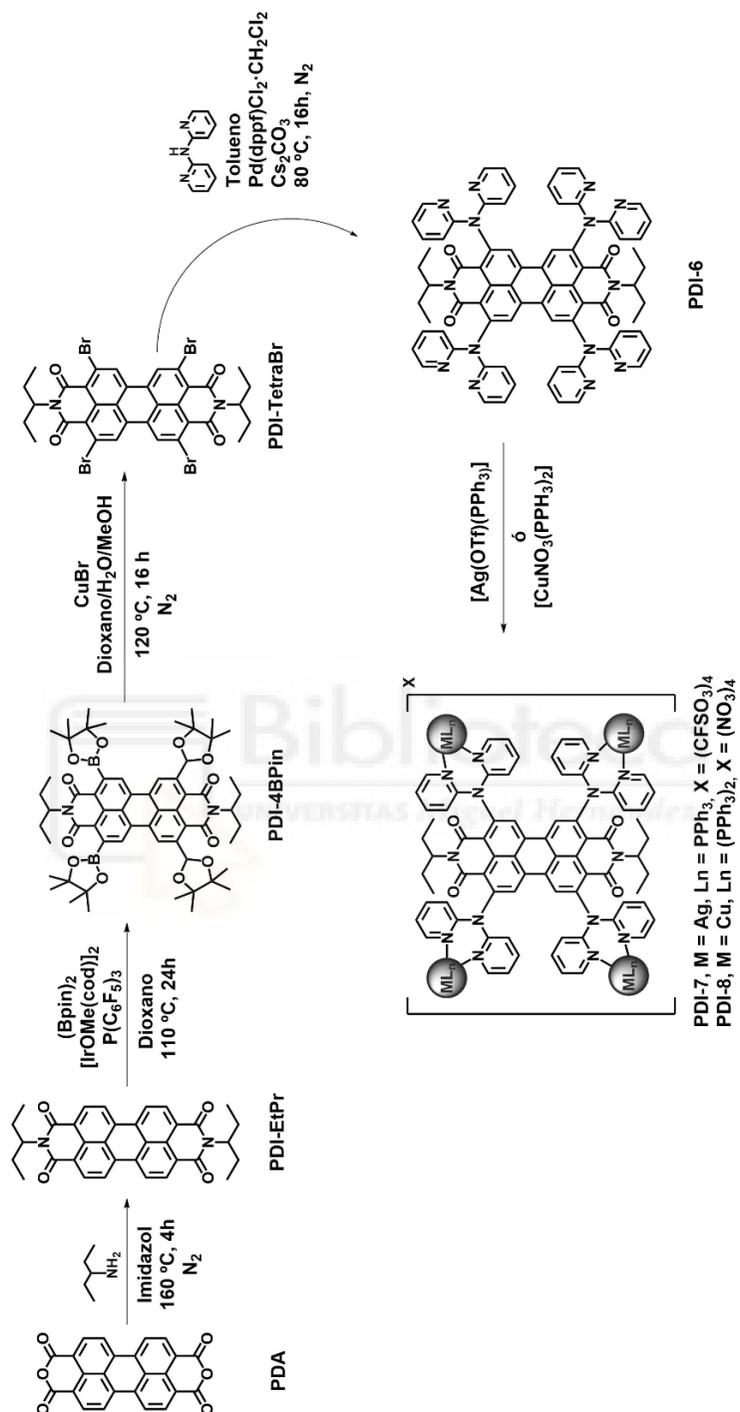
<sup>214</sup> Rajasingh, P.; Cohen, R.; Shirman, E.; Shimon, L. J. W.; Rytchinski, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5973.

<sup>215</sup> Pham, H. D.; Hayasake, K.; Kim, J.; Do, T. T.; Matsui, H.; Manzhos, S.; Feron, K.; Tokito, S.; Watson, T.; Tsoi, W. C.; Motta, N.; Durrant, J. R.; Jain, S. M.; Sonar, P. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6*, 3699-3708.

<sup>216</sup> Teraoka, T.; Hiroto, S.; Shinokubo, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2532-2535.



Esquema 3.2: Ruta sintética para la obtención de los complejos monosustituidos **PDI-3** y **PDI-4**.



Esquema 3.3: Ruta sintética para la obtención de los complejos tetrasustituidos **PDI-7** y **PDI-8**.

En las **Figuras 1 y 2** del artículo se comprueba mediante  $^1\text{H}$ -RMN el éxito de las reacciones de acoplamiento y metalación, viendo como aparecen señales correspondientes al grupo 2,2'-dipiridilaminay como estas señales, al realizar la reacción de complejación, cambian su desplazamiento químico. En la **Figura 3**, también se puede observar mediante  $^{31}\text{P}$ -RMN la formación de los complejos.

En cuanto a las propiedades ópticas de las **PDI-2 y PDI-6**, en la **Figura 4** del artículo se puede ver cómo cambia su perfil de absorción respecto a las PDI precursoras, apareciendo en ambos casos la correspondiente banda de transferencia de carga, a 561 nm para la **PDI-2** y 536 para la **PDI-6**, debido a la incorporación del grupo 2,2'-dipiridilamina. Cabe destacar que en el caso de la **PDI-6** la fluorescencia queda totalmente suprimida (*quenched*, ver Figura S9 *Supporting Information*). Al realizar la reacción de complejación el perfil de absorción de las **PDI-3 – 4 y PDI-7 – 8** no cambia respecto a sus precursoras, debido a que el metal no ejerce ninguna influencia electrónica directamente sobre el anillo de PDI; sin embargo, se observa cómo a 274 y 271 nm aparecen las bandas de absorción pertenecientes a los grupos fosfina introducidos.

Antes de llevar a cabo los estudios biológicos, se midió la estabilidad de las **PDI-3 – 4 y PDI-7 – 8** en medio biológico mediante espectroscopía UV-Vis, dando un resultado positivo y sin observar degradación de estas PDI (ver Figura S23 *Supporting Information*). Para los ensayos biológicos se eligió como línea celular cancerígena el carcinoma cervical humano (HeLa). Tras analizar los ensayos MTT, se vio como las **PDI-2 y PDI-6** muestran cierta citotoxicidad, con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $11,51 \pm 0,86$  y  $10,54 \pm 0,82$  respectivamente; sin embargo, estos valores sufren una gran disminución en el caso de los complejos **PDI-3 – 4 y PDI-7 – 8** (**Tabla 1**).

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>PDI-2</b>	$11.51 \pm 0.9$
<b>PDI-3</b>	$2.46 \pm 0.1$
<b>PDI-4</b>	$3.08 \pm 0.6$
<b>PDI-6</b>	$10.54 \pm 0.8$
<b>PDI-7</b>	$2.05 \pm 0.9$
<b>PDI-8</b>	$1.90 \pm 0.1$

**Tabla 3.1:** Valores de  $\text{IC}_{50}$  para las **PDI-2–PDI-4** y las **PDI-6–PDI-8** incubadas durante 24 h en células HeLa.

Analizando los resultados no se puede establecer una relación concreta entre el tipo de metal y la citotoxicidad producida, ya que en el caso de los derivados monosustituídos la citotoxicidad es mayor en el caso de la plata (**PDI-3**), mientras que en los derivados tetrasustituídos es el cobre (**PDI-8**) el que produce mayor muerte celular. Sin embargo, se puede comprobar como la presencia del metal induce una mayor citotoxicidad en todos los casos.

Los siguientes estudios que se llevaron a cabo fueron sobre los mecanismos de muerte celular y colocalización. Debido a que los derivados tetrasustituídos no presentan fluorescencia, estos estudios solo se realizaron con los derivados monosustituídos. Mediante microscopía confocal se pudo observar como, tras el

tratamiento de las células con la **PDI-3** y la **PDI-4**, las células mostraron alteraciones morfológicas que sugería un mecanismo de muerte celular mediante vía apoptótica (Ver Figura 5 del artículo), esto se confirmó mediante experimentos de citometría de flujo, indicando que la **PDI-3** producía mayor apoptosis que la **PDI-4** (Ver Figura 6 del artículo), ambas tratadas con la dosis correspondiente al IC<sub>50</sub> y el doble de ésta para cada PDI.

Los estudios de colocalización celular mostraron que la **PDI-2** tenía poca capacidad de internalización en comparación con los correspondientes derivados metalados **PDI-3** y **PDI-4**, estando todos ellos dispersos en el citoplasma. En primer lugar se llevaron a cabo los estudios de colocalización utilizando el marcador LysoTracker Green, para comprobar si las PDI se localizaban en los lisosomas, sin embargo, no se observó ninguna colocalización en este orgánulo (ver Figura 7 del artículo). Con base en los resultados obtenidos, se estudió la colocalización con el marcador MitroTracker Green y, en este caso, se pudo comprobar como la **PDI-2** y la **PDI-4** colocalizaban parcialmente en la mitocondria. También se observaron pequeños puntos cerca del núcleo que no colocalizaban en la mitocondria, lo que podría sugerir una colocalización en el aparato de Golgi (Ver Figura 8 del artículo).

### 3.6. Conclusiones

En este capítulo se han sintetizado y caracterizado seis nuevas PDI no descritas hasta el momento, **PDI-2**, **PDI-3**, **PDI-4**, **PDI-6**, **PDI-7** y **PDI-8**. En el caso de la síntesis de las **PDI-2** y **PDI-6**, se ha empleado la reacción de Buchwald-Hartwig para *N*-aminación en las posiciones bahía y orto con altos rendimientos.

Los estudios biológicos han demostrado que la reacción de complejación aumenta el carácter antiproliferativo de las PDI. Para las **PDI-3 – 4** y **PDI-7 – 8**, los valores del IC<sub>50</sub>, en escala micromolar, se reducen de manera abrupta respecto a los de las PDI precursoras **PDI-2** y **PDI-3**. En el caso de los derivados monosustituidos la que produce mayor efecto citotóxico es la **PDI-3** (complejo de plata), mientras que para los derivados tetrasustituidos es la **PDI-8** (complejo de cobre) la que produce mayor citotoxicidad. En general, los derivados tetrasustituidos, poseen mayor efecto antiproliferativo.

Los ensayos de citometría de flujo indican que la muerte celular se lleva a cabo mediante apoptosis, mostrando que la **PDI-3** induce mayor apoptosis en concentraciones altas. Mediante microscopía confocal de fluorescencia se ha comprobado que las **PDI-2 – 4** tienen capacidad de internalización celular, siendo esta mayor en el caso de los derivados metalados. Finalmente, los ensayos de colocalización muestran que la **PDI-2** y la **PDI-4** colocalizan de manera parcial en la mitocondria, existiendo la posibilidad también de que exista colocalización en el aparato de Golgi.



## Capítulo 4

### **Síntesis y caracterización de una PDI sustituida con ácido lipoico para la funcionalización de materiales 2D**





## 4. Síntesis y caracterización de una PDI asimétrica para la funcionalización de materiales 2D

### 4.1 Materiales 2D

Los materiales 2D son aquellos materiales en los cuales las cargas libres no se pueden mover en una dimensión del espacio, pero sí que pueden hacerlo en las dos restantes. Esta peculiaridad hace que los materiales 2D hayan cobrado una importancia relevante.<sup>217</sup> A finales de los años setenta y principios de los ochenta aparecieron los que fueron los primeros materiales 2D basados en gases electrónicos (2D-EG).<sup>218</sup> Sin embargo, la complejidad del proceso de obtención los encarecía en demasía, y este campo de investigación no se volvió a retomar hasta que, en 2004, los científicos Geim y Novoselov descubrieron, ganando el premio Nobel por ello en 2010, el que a día de hoy sigue siendo el material 2D mejor conocido: el grafeno. Este material está constituido por una capa simple de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  formando una red hexagonal 2D. La aparición de este material hizo que los otros alótropos del carbono con estructura monodimensional, como por ejemplo los nanotubos de carbono,<sup>219</sup> dejasen de tener el gran interés que habían suscitado al ser descubiertos, ya que, por ejemplo, estos materiales son incapaces de diferenciar entre la fase metálica y la semiconductor. En cuanto al grafeno, destacó tanto por sus propiedades químicas y por su gran flexibilidad, resistencia mecánica, alta movilidad electrónica y transmitancia óptica.<sup>220</sup> A pesar de todas estas ventajas, el grafeno tiene alguna limitación en cuanto a aplicaciones electrónicas, principalmente debido al valor cero en su energía interbandas (*band gap*). Aun así, el estudio del grafeno permitió desarrollar el campo de los materiales 2D y el descubrimiento de otros materiales bidimensionales, como pueden ser el nitruro de boro<sup>221</sup> o el fósforo negro.<sup>222</sup>

Otro grupo importante de materiales 2D que carecen del problema del *band gap* del grafeno son los dicalcogenuros de metales de transición (TMD, del inglés *Transition Metal Dichalcogenides*). En este caso su *band gap* es similar al del Si o al del GaAs, por lo que son muy interesantes para usarlos en sustitución del grafeno. Estos materiales presentan una estructura hexagonal unida mediante fuerzas de Van de Waals con la fórmula  $MX_2$ , donde M es el metal de transición (que normalmente suele ser Mo, W o Nb) y X es el calcogenuero (que puede ser S, Se o Te). El átomo metálico, se dispone en un plano que a su vez se rodea de otros dos planos del correspondiente calcogenuero. Estos átomos están unidos covalentemente al metal, presentando de esta forma las correspondientes dos dimensiones. Las interacciones entre las capas de los TMD son débiles debido a los enlaces de Van der Waals que existen entre ellas, lo que permite a estos materiales una exfoliación laminar con espesores de tamaño atómico. Una de las peculiaridades de estos materiales es que las consecuencias de sus propiedades dependen más de las dimensiones que del tamaño en sí del material. Este

<sup>217</sup> Das, S.; Kim, M.; Lee, J. W.; Choi, W. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2014**, *39*, 231-152.

<sup>218</sup> Thornton, T. J.; Pepper, M.; Ahmed, H.; Andrews, D.; Davies, J. G. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 1198-1201

<sup>219</sup> De Volder, M. F. L.; Tawfick, S. H.; Baughman, R. H.; Hart, A. J. *Science* **2013**, *339*, 535-539.

<sup>220</sup> Geim, A. K.; Novoselov, K. S. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183-191.

<sup>221</sup> Song, L.; Ci, L.; Lu, H.; Sorokin, P. B.; Jin, C.; Ni, J.; Kvashnin, A. G.; Kvashnin, J.; Lou, J.; Yakobson, B. I.; Ajayan, P. M. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3209-3215.

<sup>222</sup> Li, L.; Yu, Y.; Ye, G. J.; Ge, Q.; Ou, X.; Wu, H.; Feng, D.; Chen, X. H.; Zhang, Y. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 372-377.

tipo de materiales pueden ser metálicos ( $\text{NbS}_2$  o  $\text{VSe}_2$ ), semimetálicos ( $\text{WTe}_2$  o  $\text{TiSe}_2$ ), semiconductores ( $\text{MoS}_2$  o  $\text{WS}_2$ ), magnéticos ( $\text{CrSe}_2$ ) o superconductores ( $\text{PdTe}_2$ ), dependiendo de la composición química y su configuración estructural, confiriéndole unas propiedades físicas, químicas y mecánicas que los hacen válidos para aplicaciones electrónicas, fotónicas o de almacenamiento de energía. Durante los últimos diez años la investigación en torno a este tipo de materiales está en crecimiento, y el número de publicaciones aumenta considerablemente.<sup>223</sup> De todos los TMD, el que más ha atraído la atención de los investigadores, siendo por lo tanto el más estudiado actualmente, es el  $\text{MoS}_2$ .

#### 4.1.1 Sulfuro de Molibdeno ( $\text{MoS}_2$ )

El  $\text{MoS}_2$  es el material 2D que se ha convertido en el candidato más apto para aplicaciones nanoelectrónicas y optoelectrónicas.<sup>224</sup>

El  $\text{MoS}_2$  en masa (*bulk*) posee varias estructuras polimorfas: 1T,<sup>225</sup> 2H<sup>226</sup> o 3R,<sup>227</sup> cada una de ellas perteneciente a un grupo de simetría distinto, donde cada dígito indica el número de capas que lo componen y la letra la estructura cristalográfica, T (trigonal), H (hexagonal) y R (romboédrica). La estructura polimorfa más estudiada es la 2H, que consiste en una fase triangular prismática, donde cada átomo de molibdeno está enlazado a seis átomos de azufre, de tal forma que cada plano de átomos de molibdeno queda atrapado entre dos planos de átomos de azufre con una estructura tipo sándwich, formando capas con un espesor de tres átomos. Estas capas están enlazadas entre sí mediante enlaces de Van der Waals, lo que permite que se puedan deslizar unas respecto a otras.<sup>228</sup> De esta forma, la estructura del  $\text{MoS}_2$  tiene una organización de panel de abeja, semejante a la del grafeno (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1:** Estructura prismática trigonal del  $\text{MoS}_2$ .

Al igual que el resto de los materiales 2D, el  $\text{MoS}_2$  cambia sus propiedades al pasar del estado en masas al estado laminar. El *band gap* cambian de un estado a otro, teniendo un valor 1,29 eV en su estado en masa, mientras que al ser exfoliado el *band*

<sup>223</sup> Courland, R. Graphene gets some competition. (June 24, 2014)

<sup>224</sup> a) Radisavljevic, B.; Radenovic, A.; Brivio, J.; Giacometti, V.; Kis, A. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 147-150. b) Radisavljevic, B.; Whitwick, M. B.; Kis, A. *ACS Nano* **2011**, *5* (12), 9934-9938.

<sup>225</sup> Wypych, F.; Weber, T.; Prins, R. *Surf. Sci.* **1997**, *380*, 723-7267.

<sup>226</sup> El-Mahalawy, S. H.; Evans, B. L.; Thomson, J. J. *J. Appl. Cryst.* **1976**, *9*, 403-406.

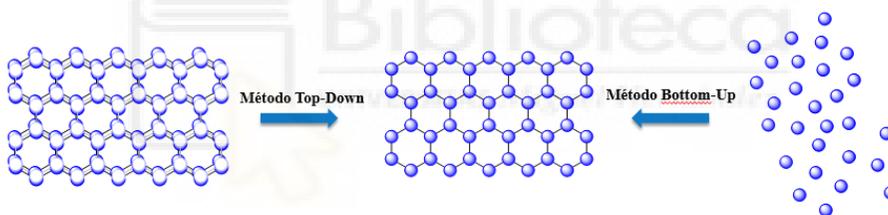
<sup>227</sup> Khalil, R. M. A.; Hussain, F.; Rana, A. M.; Imran, M.; Murtaza, G. *Phys. E: Low-dimensional Syst. Nanostruc.* **2019**, *106*, 338-345.

<sup>228</sup> Splendiani, A.; Sun, L.; Singh, G. *Phys. Chem Lett.* **2012**, *3*, 1523-1530.

*gap* tiene valores comprendidos entre 1,3 y 1,9 eV,<sup>229</sup> dependiendo del grosor de las láminas. Estos valores hacen al MoS<sub>2</sub> apto para los transistores de efecto campo (FET, del inglés *Field-Effect Transistor*), incluso a temperatura ambiente. El MoS<sub>2</sub> también posee una ratio *on-off* alta para el efecto de transición de campo. Estas cualidades hacen al MoS<sub>2</sub> un material óptimo para poder aplicarlo en dispositivos optoelectrónicos.<sup>230</sup> En cuanto a sus propiedades mecánicas, el MoS<sub>2</sub> exfoliado tiene un valor de módulo de Young de  $E = 0,33 \pm 0,07$  TPa,<sup>231</sup> valor que es comparable al del óxido de grafeno. De igual forma, las láminas de MoS<sub>2</sub> son elásticas, con deformaciones de 10 mm para espesores de 5 a 25 láminas.<sup>232</sup> Teniendo en cuenta estos valores de elasticidad, se puede concluir que este material es apto para dispositivos optoelectrónicos flexibles y también como película en materiales semiconductores compuestos.<sup>233</sup>

#### 4.1.2 Obtención de materiales 2D

Como ya se ha comentado anteriormente, las propiedades de los TMD varían dependiendo tanto de su estado (en masa o exfoliado), como del número de capas del material exfoliado y su espesor. Por lo tanto, es fundamental controlar el proceso de exfoliación si se quiere conseguir unas propiedades óptimas. No existe un solo método para obtener materiales 2D, de ahí que es necesario conocer qué requisitos debe cumplir el material para poder ser usado en una determinada aplicación. Los métodos de obtención se pueden dividir en dos categorías: métodos de “abajo a arriba” (*bottom-up*) o métodos de “arriba abajo” (*top-down*) (Esquema 4.1).<sup>234</sup>



**Esquema 4.1:** Métodos para la síntesis de materiales 2D.

En la síntesis de materiales 2D mediante la estrategia *bottom-up* los átomos se depositan formando láminas mediante procesos térmicos y/o reacciones químicas a partir de precursores atómicos o moleculares. Existen varios métodos dentro de esta categoría, siendo los más destacados la formación de TMD a partir de precursores moleculares en fase líquida por vía solvotérmica, o mediante depósito químico en fase

<sup>229</sup> a) Frey, G. L.; Elani, S.; Homyonfer, M.; Feldman, Y.; Tenne, R. *Phys. Rev. B* **1988**, *57*, 6666-6671. b) Mak, K. F.; Lee, C.; Hone, F.; Shan, J.; Heinz, T. F. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *10*, 136805-1 – 136805-4. c) Han, S. W.; Kwon, H.; Kim, S. K.; Ryu, S.; Yun, W. S.; Kim, D. H.; Hwang, J. H.; Kang, J. S.; Baik, J.; Shin, H. J.; Hong, S. C. *Phys. Rev. B* **2011**, *84*, 045409-1 - 045409-6.

<sup>230</sup> Bernardi, M.; Palummo, M.; Grossman, J. C. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 3664-3670.

<sup>231</sup> Wang, Z. M.; Salamo, G.; Bellucci, S. *Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology 21 Materials, Physics, and Device*, ISSN: 2195-2159.

<sup>232</sup> Castellanos-Gómez, A.; Poot, M.; Steele, G. A.; Van der Zant, H. S. J.; Agraït, N.; Rubio-Bollinger, G. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 772-775.

<sup>233</sup> a) Lembke, D.; Bertolazzi, S.; Kis, A. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 100-110. b) Wang, X.; Kalali, E. N.; Wang, D.-Y. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 24112-24120.

<sup>234</sup> Das, S.; Choi, W. *Graphene: Synthesis and Applications*; Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2011.

vapor.<sup>235</sup> Por el contrario, mediante el método *top-down*, las láminas 2D se sintetizan aplicando una fuente externa de energía, que puede ser mecánica o ultrasonidos, a la estructura laminar *bulk* de dicho TMD. Los métodos más usados en este caso son la exfoliación por ultrasonidos<sup>236</sup> o por fuerzas de cizalla,<sup>237</sup> la exfoliación química<sup>238</sup> o la electroquímica.<sup>239</sup>

### 4.1.3 Funcionalización no covalente de MoS<sub>2</sub> con agentes dopantes

A pesar de las buenas propiedades optoelectrónicas del MoS<sub>2</sub>, y al igual que ocurre con otros TMD, éste se puede funcionalizar con el objetivo de mejorar aún más sus propiedades. Los métodos más habituales consisten en la modificación de la superficie de las láminas de MoS<sub>2</sub> con dopantes<sup>240</sup> o mediante heterouniones.<sup>241</sup> Sin embargo, los métodos dopantes más comunes para materiales semiconductores, como por ejemplo la implantación de iones,<sup>242</sup> no son aplicables en el caso de láminas de MoS<sub>2</sub> con un grosor pequeño. La alternativa que se suele utilizar para obtener láminas de MoS<sub>2</sub> con propiedades optoelectrónicas mejoradas es funcionalizar su superficie con moléculas pequeñas de carácter dador o aceptor de electrones a través de enlaces covalentes o de interacciones no covalentes,<sup>243</sup> o también mediante la unión de nanopartículas metálicas.<sup>244</sup>

Se han utilizado diferentes moléculas orgánicas para dopar láminas de MoS<sub>2</sub> y poder así modificar sus propiedades optoelectrónicas. Atendiendo a su carácter electrónico, podemos encontrar, por ejemplo, moléculas con carácter dador de electrones, como el tetratiofualeno (TTF) o ftalocianinas y también moléculas con carácter aceptor de electrones como puede ser el tetracianoquinodimetano (TCNQ) o el tetracianoetileno (TCNE) (**Figura 4.2**).

En el caso de usar dopantes dadores de electrones el material híbrido obtenido se convertirá en un semiconductor tipo n, mientras que al emplear dopantes aceptores de electrones el material será un semiconductor tipo p.<sup>245</sup> También hay descritos ejemplos en la literatura usando alótopos del carbono como agentes dopantes. La funcionalización no covalente de láminas de MoS<sub>2</sub> con C<sub>60</sub> produce efectos fotofísicos interesantes en el material híbrido resultante, como es la separación de carga entre ambas especies.<sup>246</sup>

<sup>235</sup> Chua, C. K.; Loo, A. H.; Pumera, M. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14336-14341.

<sup>236</sup> Guarida, L.; Paredes, J. I.; Rozada, R.; Villar-Rodil, S.; Martínez-Alonso, A.; Tascón, J. M. D. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 14115-14127.

<sup>237</sup> Hernández, Y.; Nicolosi, V.; Lotya, M.; Blighe, F. M.; Sun, Z.; De, S.; McGovern, I. T.; Holland, B.; Bryne, M.; Gun'ko, Y. K.; Boland, J. J.; Niraj, P.; Duesberg, G.; Krishnamurthy, S.; Goodhue, R.; Hutchison, J.; Scardavici, V.; Ferrari, A. C.; Coleman, J. N. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 563-568.

<sup>238</sup> Acerce, M.; Voiry, D.; Chhowalla, M. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 313-318.

<sup>239</sup> Yang, S.; Lohe, M. R.; Müllen, K.; Feng, X. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 6213-6221.

<sup>240</sup> Zhang, X.; Shao, Z.; Zhang, X.; He, Y.; Jie, J. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 10409-10442.

<sup>241</sup> Xia, W.; Dia, L.; Yu, P.; Tong, X.; Song, W.; Zhang, G.; Wang, Z. *Nanoscale* **2017**, *9*, 4324-4365.

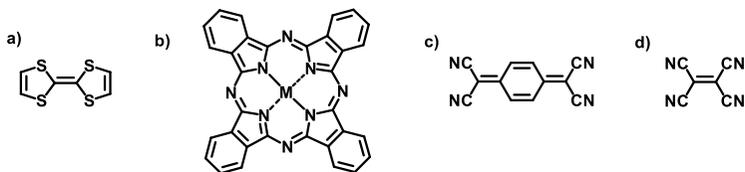
<sup>242</sup> Meldrum, A.; Haglund Jr., R. F.; Boatner, L. A.; White, C. W. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1431-1444.

<sup>243</sup> a) Dolui, K.; Rungger, I.; Pemmaraju, C. D.; Sanvito, S. *Phys. Rev. B* **2013**, *88*, 075420-1 – 075420-9. b) Chen, X.; McDonald, A. R. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 5738-5746. c) Cai, B.; Zhang, S.; Yan, Z.; Zeng, H. *ChemNanoMat.* **2015**, *1*, 542-557.

<sup>244</sup> Zheng, Z.; He, B.; Zhou, L. *J. Mater. Chem. A.* **2014**, *3*, 1042-1048.

<sup>245</sup> Jing, Y.; Tan, X.; Zhou, Z.; Shen, P. *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 16892-16897.

<sup>246</sup> Baek, J.; Umeyama, T.; Choi, W.; Tsutsui, Y.; Yamada, H.; Seki, S.; Imahori, H. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1561-1572.



**Figura 4.2:** Estructura de diferentes dopantes para MoS<sub>2</sub>: a) TTF, b) Ftalociana, c) TCNQ, d) TCNE.

#### 4.1.4 Funcionalización covalente de MoS<sub>2</sub>

En general, la formación de uniones estables tipo p-n en la superficie de las láminas de MoS<sub>2</sub> es complicada ya que este se comporta como un semiconductor tipo n debido a las vacantes de azufre con carácter donador de electrones. Los métodos más habituales para funcionalizar de forma covalente las láminas de MoS<sub>2</sub> en sus diferentes posiciones son los siguientes: coordinación de tioles, aminas o alcóxidos en las vacantes de azufre, formación de enlace C-S y coordinación de átomos de azufre a centros metálicos.

##### 4.1.4.1 Coordinación en las vacantes de azufre

La funcionalización de láminas de MoS<sub>2</sub> sobre los huecos de azufre es la estrategia que más se suele emplear. Existen diversos grupos funcionales que, mediante fisiorción, puede depositarse sobre los átomos de azufre. Algunos de estos grupos funcionales son el -OCH<sub>3</sub>, el -SCH<sub>3</sub> o el -NH<sub>2</sub>. Cabe destacar que, tras su funcionalización, el polimorfo 1T del MoS<sub>2</sub> resulta ser más estable que el 2H.<sup>247</sup> Una familia importante de compuestos que pueden anclarse a las vacantes de azufre son los tioles, los cuales aportan propiedades optoelectrónicas interesantes al nuevo material híbrido. Algunos ejemplos descritos en literatura son el 1-tioglicerol o la L-cisteína.<sup>248</sup> Dependiendo de los grupos funcionales adicionales que tenga el tiol, el material resultante contará con diferentes propiedades, así por ejemplo la presencia de aminas terminales, como en la 2-mercaptoetilamina, origina un dopante tipo n debido al carácter dador del grupo amino que aumenta la densidad electrónica del material final; sin embargo, si hay grupos aceptores, como puede ser en los tioles fluorados, éstos actuarán como dopantes tipo p originando el efecto contrario en el material híbrido. De esta forma, se pueden manipular y controlar los efectos de transferencia de carga en el material híbrido sintetizado.<sup>249</sup>

Otro grupo importante que puede coordinarse a las vacantes del azufre son los 1,2-ditiolanos terminales, siendo el ácido lipoico, el ejemplo más representativo de esta familia.<sup>250</sup> Una de las ventajas de usar ácidos carboxílicos es su posible funcionalización con multitud de moléculas orgánicas, de tal forma que se pueden obtener materiales híbridos con propiedades optoelectrónicas muy diversas.<sup>251</sup>

<sup>247</sup> Tang, Q.; Jiang, D. *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 3743-3748.

<sup>248</sup> Zhou, L.; He, B.; Yang, Y.; He, Y. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 32570-32578.

<sup>249</sup> Sim, D. M.; Kim, M.; Yim, S.; Choi, M. J.; Choi, J.; Yoo, S.; Jung, S. Y. *ACS Nano* **2015**, *9*, 12115-12123.

<sup>250</sup> Cantón-Vitoria, R.; Sayed-Ahmad-Baraza, Y.; Peláez-Fernández, M.; Arenal, R.; Bittencourt, C.; Ewels, C. P.; Tagmatarchis, N. *2D Mater. Appl.* **2017**, *13*.

<sup>251</sup> Liu, T.; Wang, C.; Gu, X.; Gong, H.; Cheng, L.; Shi, X.; Feng, L.; Sun, B.; Liun, Z. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3433-3440.

#### 4.1.4.2 Formación de enlaces C-S

Los propios átomos de las láminas de MoS<sub>2</sub> pueden actuar como centros reactivos para formar enlaces con moléculas dopantes. Una de las estrategias más empleadas es la formación de enlaces C-S a través de reacciones tipo clic (*click chemistry*). Para ello se emplean disoluciones de láminas de MoS<sub>2</sub> con morfología 2H y polibutadieno, que originan de forma espontánea una reacción clic de tipo tioleno, dando como resultado enlaces C-S entre las láminas y el polibutadieno.<sup>252</sup> Otro tipo de reacción es la formación de enlaces C-S utilizando sales de diazonio con láminas de MoS<sub>2</sub> de morfología 1T.<sup>253</sup> También hay ejemplos en la bibliografía que emplean ioduros terminales para la formación de enlaces C-S, siendo los más comunes el iodometano y la 2-iodoacetamida.<sup>254</sup>

#### 4.1.4.3 Coordinación de metales a los átomos de S del MoS<sub>2</sub>

Se pueden obtener láminas del polimorfo 2H-MoS<sub>2</sub> óptimas para su futura funcionalización tratando MoS<sub>2</sub> en masa con isopropanol. Estas láminas pueden coordinarse con sales de diferentes metales, como pueden ser Ni (II), Cu (II) o Zn (II). La coordinación se produce a través del propio átomo de azufre de las láminas de MoS<sub>2</sub>. De todos estos metales, el que presenta mayor afinidad por los átomos de azufre es el Cu (II), mientras que el Zn (II) es el de menor afinidad.<sup>255</sup>

### 4.2 Antecedentes. Utilización de PDI y otras moléculas orgánicas en funcionalización de materiales 2D

Las moléculas orgánicas son una herramienta clave para la funcionalización de los materiales 2D. El diseño racional previo de la molécula orgánica podrá dotar al futuro material híbrido 2D con propiedades optoelectrónicas que permitan procesos fotofísicos interesantes a la hora de aplicarlo bien en dispositivos electrónicos, o bien en sistemas fotosintéticos artificiales.

Existen diversos ejemplos en la bibliografía en los que se utilizan PDI como moléculas para mejorar las propiedades de materiales 2D. Nuestro grupo de investigación publicó en 2019 un trabajo en el que se sintetizó un nuevo material híbrido 2D basado en PDI anclado a grafeno *N*-dopado. La unión entre la PDI y el *N*-grafeno se produjo de forma covalente, mediante una reacción de tipo clic (**Figura 4.3**).<sup>256</sup> El grafeno dopado con heteroátomos es un material 2D con propiedades fotofísicas interesantes, presentando un *band gap* con un valor de 0,16 eV, lo que le permite realizar procesos de transferencia de carga mediante mecanismos redox, siempre y cuando esté unido covalentemente a una molécula dadora o aceptora de electrones. En este caso, la PDI actuó como aceptora, formando un nuevo material

---

<sup>252</sup> Gonçalves, R. H.; Fiel, R.; Soares, M. R. S.; Schreiner, W. H.; Silva, C. M. P.; Leite, E. R. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 15583-15588.

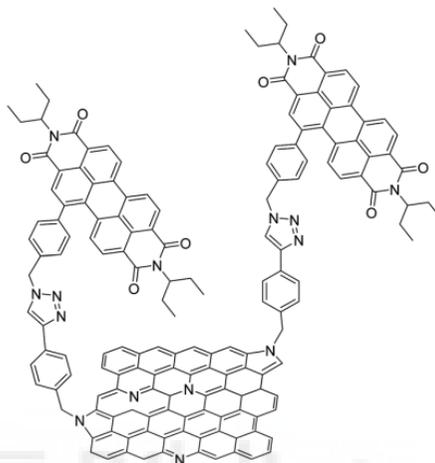
<sup>253</sup> Knirsch, K. C.; Berner, N. C.; Nerl, H. C.; Cucinota, C. S.; Gholamvand, Z.; McEvoy, N.; Wang, Z.; Abramovic, I.; Vecera, P.; Halik, M.; Sanvito, S.; Duesberg, G. S.; Nicolosi, V.; Hauke, F.; Hirsch, A.; Coleman, J. N.; Backes, C. *ACS Nano* **2015**, *9*, 6018-6030.

<sup>254</sup> Voiry, D.; Goswami, A.; Kappera, R.; de Carvalho Castro e Silva, C.; Kaplan, D.; Fujita, T.; Chen, M.; Asefa, T.; Chhowalla, M. *Nat. Chem.* **2014**, *7*, 45-59.

<sup>255</sup> Backes, C.; Berner, N. C.; Chen, X.; Lafargue, P.; LaPlace, P.; Freeley, M.; Duesberg, G. S.; Coleman, J. N.; McDonald, A. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6.

<sup>256</sup> Gobeze, H. B.; Arellano, L. M.; Gutiérrez-Vílchez, A. M.; Gómez-Escalonilla, M. J.; Sastre-Santos, Á.; Fernández-Lázaro, F.; Langa, F.; D'Souza, F. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 4009-4015.

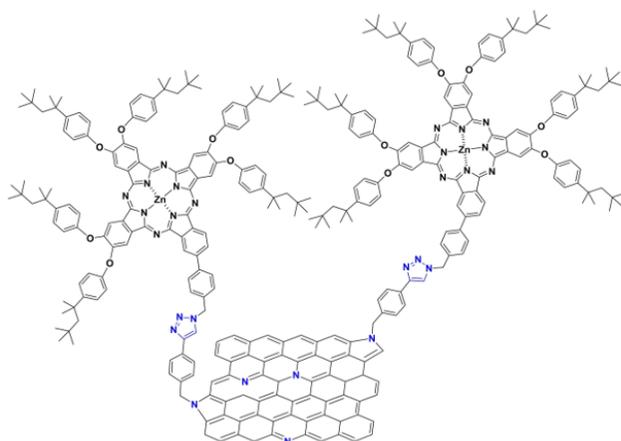
híbrido 2D con carácter dador-aceptor de electrones. Tanto los estados excitados, como el basal, fueron estudiados mediante técnicas espectroelectroquímicas. Empleando fotólisis por destello láser pudo demostrarse la habilidad del nuevo material híbrido 2D para producir separación de cargas fotoinducida. Estos resultados evidencian la capacidad de las PDI para originar materiales 2D híbridos con propiedades fotofísicas interesantes para poder aplicarlos en dispositivos optoelectrónicos.



**Figura 4.3:** Estructura del híbrido grafeno N-dopado - perilenodiimida.

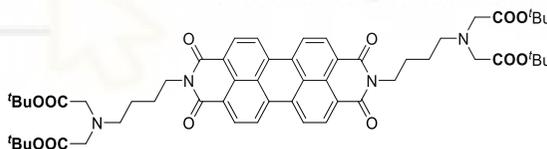
Recientemente, nuestro grupo de investigación también ha publicado un trabajo con este mismo material 2D,<sup>257</sup> siguiendo la misma estrategia de funcionalización. Sin embargo, en este caso se utilizó una molécula orgánica con carácter dador de electrones, una ftalocianina de zinc (ZnPc) funcionalizada con una azida y con grupos tert-octilfenoxilo, que refuerzan aún más carácter dador (**Figura 4.4**). Bajo estas condiciones, utilizando ensayos de espectroelectroquímica y fotólisis por destello láser, quedó demostrado que se producía igualmente separación de cargas, aunque en este caso la especie que actúa de aceptor de electrones es el grafeno dopado, poniendo en evidencia la versatilidad de este tipo de materiales 2D cuando se funcionaliza de forma racional con moléculas orgánicas con carácter fotoactivo.

<sup>257</sup> Arellano, L. M.; Gobeze, H.; Jang, Y.; Barrejón, M.; Parejo, C.; Álvarez, J. C.; Gómez-Escalonilla, M. J.; Sastre-Santos, Á.; D'Souza, F.; Langa, F. *Chem. Eur. J.* **2022**, 28, e2022002.



**Figura 4.4:** Estructura del híbrido grafeno N-dopado - ZnPc.

En otro estudio, llevado a cabo por el grupo de los profesores Abellán y Hirsch,<sup>258</sup> se utiliza una PDI para funcionalizar un tipo diferente de material 2D, el fósforo negro.<sup>259</sup> En este caso la PDI está funcionalizada con ésteres derivados del ácido butilendiamino diacético (**Figura 4.5**) y la unión al material 2D se realiza de forma no covalente. Tras funcionalizar el fósforo negro con la PDI se vio como ésta mejoraba considerablemente la resistencia frente a la oxidación de las capas de aquel. Esto supone una gran ventaja a la hora de utilizar este material 2D en optoelectrónica, almacenamiento de energía o incluso para mejorar algunos composites.



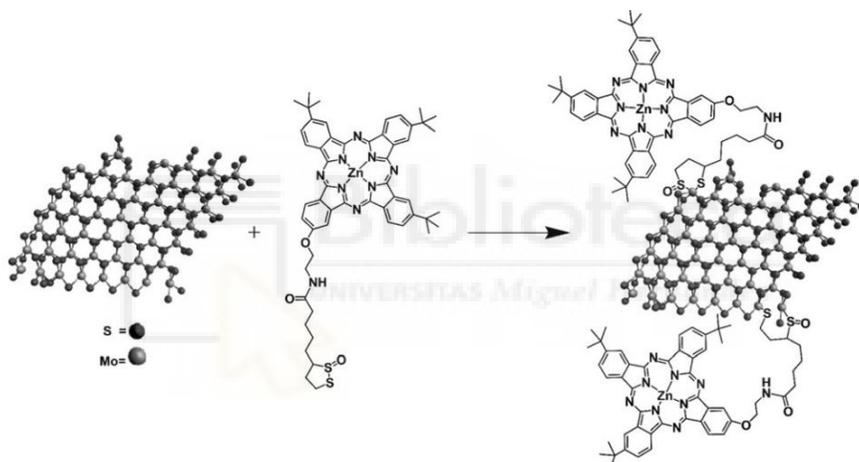
**Figura 4.5:** Estructura de la PDI empleada para funcionalizar fósforo negro.

Volviendo a los TMD, existen varios ejemplos en la bibliografía en los que usan moléculas orgánicas para mejorar las propiedades fotofísicas de estos materiales 2D. A continuación, se citarán tres ejemplos en los cuales se funcionaliza MoS<sub>2</sub> y WS<sub>2</sub> con diferentes tipos de moléculas orgánicas.

<sup>258</sup> Abellán, G.; Lloret, V.; Mundlock, U.; Marcia, M.; Neiss, C.; Görling, A.; Varela, M.; Hauke, F.; Hirsch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1-7.

<sup>259</sup> Ferrari, A. C.; Bonaccorso, F.; Fal'ko, V.; Novoselov, K. S.; Roche, S.; Bøggild, P.; Borini, S.; Koppens, F. H. L.; Palermo, V.; Pugno, N.; Garrido, J. A.; Sordan, R.; Bianco, A.; Ballerini, L.; Prato, M.; Lidorikis, E.; Kivioja, J.; Marinelli, C.; Ryhänen, T.; Morpurgo, A.; Coleman, J. N.; Nicolosi, V.; Colombo, L.; Fert, A.; García-Hernández, M.; Bachtold, A.; Schneider, F.; Guinea, F.; Dekker, C.; Barbone, M.; Sun, Z.; Galiot, C.; Grigorenko, A. N.; Konstantatos, G.; Kis, A.; Katsneson, M.; Vadersypen, L.; Loiseau, A.; Morandi, V.; Neumaier, D.; Treossi, E.; Pellegrini, V.; Polini, M.; Tredicucci, A.; Williams, G. M.; Hong, B. H.; Ahn, J. H.; Kim, J. M.; Zirath, H.; van Wees, B. J.; van der Zant, H.; Occhipinti, L.; Matteo, A. D.; Kinloch, I. A.; Seyller, T.; Quesnel, E.; Feng, X.; Teo, K.; Rupasinghe, N.; Hakonen, P.; Neil, S. R. T.; Tannock, Q.; Löfwander, T.; Kinaret. *J. Nanoscale* **2015**, *7*, 4598-4810.

El primer ejemplo consiste en la funcionalización covalente de MoS<sub>2</sub> con una ftalocianina de zinc, trabajo publicado en 2019 por nuestro grupo de investigación en colaboración con los grupos de los profesores Nikos Tagmatarchis y Francis D'Souza.<sup>260</sup> En este caso la unión covalente entre la ftalocianina y el MoS<sub>2</sub> se produjo siguiendo la estrategia mencionada en el apartado 1.4.1. Así, se funcionalizó la lámina de MoS<sub>2</sub> mediante unión covalente con una ftalocianina portadora de un ácido lipoico, dando lugar al material híbrido 2D ZnPc-MoS<sub>2</sub> (**Figura 4.6**). Los estudios de UV-Vis, fluorescencia y electroquímica demuestran la capacidad que tiene el material híbrido ZnPc-MoS<sub>2</sub> de comportarse como un sistema dador-aceptor de electrones. En este caso existen varios procesos fotofísicos que podrían preverse entre el MoS<sub>2</sub> y la ZnPc, siendo la transferencia electrónica bidireccional, para llegar a un estado de separación de cargas ZnPc<sup>+</sup>-MoS<sub>2</sub><sup>-</sup>, el proceso más plausible. Mediante experimentos de fluorescencia electroquímica se comprobó que pueden ocurrir procesos de transferencia de carga, generando diferentes excitones cuando la transferencia se produce desde el <sup>1</sup>MoS<sup>\*</sup> a la ZnPc.

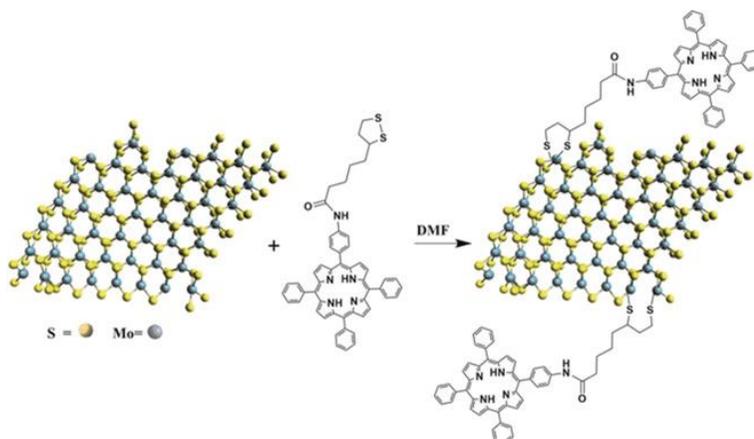


**Figura 4.6:** Funcionalización de MoS<sub>2</sub> con ZnPc, resultando el material híbrido ZnPc-MoS<sub>2</sub>.

El siguiente ejemplo es similar al caso anterior, siendo en esta ocasión una porfirina (H<sub>2</sub>P) la molécula orgánica usada. Para la unión covalente al MoS<sub>2</sub> se siguió la misma estrategia, la funcionalización con ácido lipoico. De esta forma se sintetiza el material híbrido H<sub>2</sub>P-MoS<sub>2</sub> (**Figura 4.7**).<sup>261</sup> Los estudios de espectroscopía de absorción transitoria indicaron que en este caso se produce un mecanismo de transferencia de energía tipo “ping-pong”, preferentemente desde la porfirina hacia el MoS<sub>2</sub>.

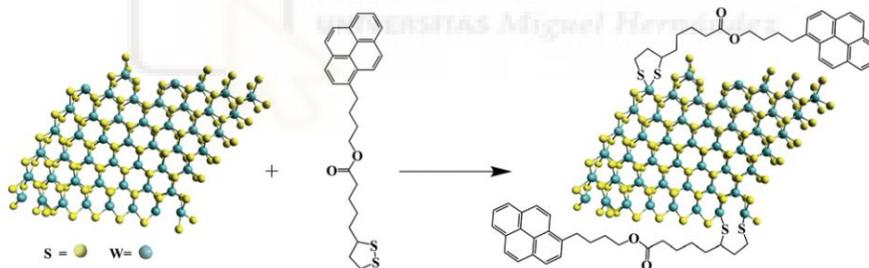
<sup>260</sup> Cantón-Vitoria, R.; Gobeze, H. B.; Blas-Ferrando, V. M.; Ortiz, J.; Jang, Y.; Fernández-Lázaro, F.; Sastre-Santos, Á.; Nakanishi, Y.; Shinohara, H.; D' Souza, F.; Tagmatarchis, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 5712-5717.

<sup>261</sup> Cantón-Vitoria, R.; Scharl, T.; Stergiou, A.; Cadranel, A.; Arenal, R.; Guldi, D. M.; Tagmatarchis, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3976-3981.



**Figura 4.7:** Funcionalización de  $\text{MoS}_2$  con  $\text{H}_2\text{Pc}$ , resultando el material híbrido  $\text{H}_2\text{Pc-MoS}_2$ .

Aunque el  $\text{MoS}_2$  es el material 2D que más se ha estudiado, existen otras posibles opciones, como puede ser el sulfuro de wolframio,  $\text{WS}_2$ .<sup>262</sup> En el tercer ejemplo se funcionalizó  $\text{WS}_2$  con pireno. Igual que en los casos anteriores, la estrategia para la unión covalente entre las láminas de  $\text{WS}_2$  y el pireno consistió en la funcionalización previa del pireno con ácido lipoico, de tal forma que se obtuvo el material híbrido 2D pireno- $\text{WS}_2$  (Figura 4.8).<sup>263</sup>



**Figura 4.8:** Funcionalización de  $\text{WS}_2$  con pireno, resultando el material híbrido Pireno- $\text{WS}_2$ .

En este caso, la incorporación del pireno a las láminas de  $\text{WS}_2$ , hizo mejorar aún más las propiedades del propio  $\text{WS}_2$ , por ejemplo, protegiendo frente a posibles procesos de oxidación. El material híbrido pireno- $\text{WS}_2$  presenta también una alta solubilidad, lo que permite que sea más fácil su manipulación y su posible aplicarlo en dispositivos electrónicos. En cuanto a propiedades físicas, dado que el pireno actúa donando carga hacia el  $\text{WS}_2$  esto aumenta de forma considerable su fotosensibilidad.

<sup>262</sup> Matte, H. S. R.; Gomathi, A.; Manna, A. K.; Late, D. J.; Datta, R.; Pati, S. K.; Rao, C. A. N. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4059-4062.

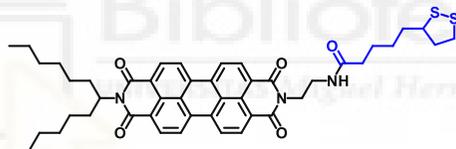
<sup>263</sup> Cantón-Vitoria, R.; Nufer, S.; Che, X.; Sayed-Ahmad-Baraza, Y.; Arenal, R.; Bittencourt, C.; Brunton, A.; Dalton, A. B.; Ewels, C. P.; Tagmatarchis, N. *Mater. Adv.* **2020**, *1*, 2459-2466.

Los casos anteriores demuestran que la funcionalización de materiales 2D exfoliados del tipo TMD mediante enlaces covalentes con moléculas orgánicas fotoactivas mejora considerablemente sus propiedades, dando lugar a procesos fotofísicos como la transferencia electrónica o de carga. Por lo tanto, este tipo de materiales híbridos 2D son candidatos potentes para aplicarlos en dispositivos optoelectrónicos para la generación o almacenamiento de energía.

### 4.3 Objetivos

Con base en los antecedentes anteriormente descritos, el objetivo del presente capítulo consiste en sintetizar una PDI asimétrica funcionalizada con ácido lipoico en una de las posiciones imida, para unirla covalentemente a láminas de MoS<sub>2</sub>. Tanto las posiciones bahía, como como orto, se dejarán sin funcionalizar, de tal forma que la PDI conserve su carácter aceptor de electrones. Posteriormente, en colaboración con el grupo del profesor Nikos Tagmatarchis del *National Hellenic Research Foundation* (NHRF), se funcionalizará láminas de MoS<sub>2</sub> con dicha PDI para obtener el nuevo material híbrido 2D PDI-MoS<sub>2</sub> que, con la ayuda del grupo del profesor Francis D'Souza de la *University of North Texas*, será estudiado para describir los procesos fotofísicos que tienen lugar entre ambos componentes.

La estrategia para funcionalizar la PDI con ácido lipoico será sintetizar previamente una aminoperilenodiimida para, posteriormente, mediante una reacción de amidación, conseguir el conjugado PDI-ácido lipoico (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9:** Estructura de la PDI-ácido lipoico objetivo.

### 4.4 Discusión de resultados

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en la siguiente publicación:

- Sideri, I. K.; Jang, Y.; Garcés-Garcés, J.; Sastre-Santos, Á.; Cantón-Vitoria, R.; Kitaura, R.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F.; Tagmatarchis, N. Unveiling the Photoinduced Electron-Donating Character of MoS<sub>2</sub> in Covalently Linked Hybrids Featuring Perylenediimide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (16), 9120-9126

## Unveiling the photoinduced electron-donating character of MoS<sub>2</sub> in covalently linked hybrids featuring perylenediimide

Ioanna K. Sideri,<sup>[a]</sup> Youngwoo Jang,<sup>[b]</sup> Jose Garcés-Garcés,<sup>[c]</sup> Ángela Sastre-Santos,<sup>[c]</sup> Ruben Canton-Vitoria,<sup>[d]</sup> Ryo Kitaura,<sup>[d]</sup> Fernando Fernández-Lázaro,<sup>\*[c]</sup> Francis D'Souza,<sup>\*[b]</sup> and Nikos Tagmatarchis<sup>\*[a]</sup>

---

[a] I. K. Sideri, Prof. Dr. N. Tagmatarchis  
Theoretical and Physical Chemistry Institute  
National Hellenic Research Foundation  
48 Vassileos Constantinou Avenue, 11635 Athens (Greece)  
E-mail: tagmatar@eie.gr

[b] Y. Jang, Prof. Dr. F. D'Souza  
Department of Chemistry  
University of North Texas  
1155 Union Circle, 305070 Denton, TX 76203-5017 (USA)  
E-mail: Francis.DSouza@unt.edu

[c] J. Garcés-Garcés, Prof. Dr. Á. Sastre-Santos, Prof. Dr. F. Fernández-Lázaro  
Área de Química Orgánica, Instituto de Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández  
03202, Elche (Spain)

[d] Dr. R. Canton-Vitoria, Prof. Dr. R. Kitaura  
Department of Chemistry  
Nagoya University  
464-8602, Nagoya (Japan)

Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

**Abstract:** The covalent functionalization of MoS<sub>2</sub> with a perylenediimide (PDI) is reported and the study is accompanied by detailed characterization of the newly prepared MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material. Covalently functionalized MoS<sub>2</sub> interfacing organic photoactive species have shown electron and/or energy accepting, energy reflecting or bi-directional electron accepting features. Herein, a rationally designed PDI, unsubstituted at the perylene core to act as electron acceptor, forces MoS<sub>2</sub> to fully demonstrate for the first time its electron donor capabilities. The photophysical response of MoS<sub>2</sub>-PDI is visualized in an energy-level diagram, while femtosecond transient absorption studies disclose the formation of MoS<sub>2</sub><sup>+</sup>-PDI<sup>-</sup> charge separated state. The tunable electronic properties of MoS<sub>2</sub>, as a result of covalently linking photoactive organic species with precise characteristics, unlock their potentiality and enable their application in light-harvesting and optoelectronic devices-

## Introduction

Targeting molybdenum disulfide (MoS<sub>2</sub>) implementation in practical electronic devices and energy harvesting and storage area, tailoring of its properties is of paramount importance. Towards this goal, chemical functionalization of MoS<sub>2</sub> constitutes an emerging area of interest that achieves the manipulation of MoS<sub>2</sub> existing properties and the acquisition of novel qualities.<sup>[1]</sup> Two main pillars have been recently established for the covalent functionalization of 2H-MoS<sub>2</sub>, which are the S-defects' healing with sulfur compounds (thiol,<sup>[2]</sup> dithiolane<sup>[3]</sup> and dithiolene<sup>[4]</sup> moieties) and the organic/organometallic reaction pathways, involving S<sub>N</sub>2 substitution<sup>[5]</sup> and metal coordination.<sup>[6]</sup>

Perylenediimides (PDIs) are extremely versatile organic molecules that are characterized by light-absorbing properties, near-unity fluorescence quantum yields and exciton mobility.<sup>[7]</sup> Apart from these qualities, their spatial distribution is interesting, since they are prone to aggregated architectures<sup>[8]</sup> and hydrogen-bond directed self-assemblies,<sup>[9]</sup> that enable also charge-separation and charge-carrier properties.<sup>[10]</sup> Interestingly, these unique characteristics vary, depending on perylenes' type and location of substituents.<sup>[11]</sup> Imide-substituted PDIs without substituents on the perylene core are n-type semiconductors and are widely used as electron acceptors in organic photovoltaics. Conversely, bay-substituted perylenes demonstrate from π-acceptor to strong π-donor character based on the nature of their substituents. Therefore, custom-synthesis enables PDIs to excel in plethora of cutting-edge technological applications, such as organic transistors,<sup>[12]</sup> photovoltaics<sup>[13]</sup> and photonics.<sup>[14]</sup>

Based on our previously reported series of covalently functionalized MoS<sub>2</sub> with organic photoactive species, different photophysical response has been registered for the various MoS<sub>2</sub> based materials. Namely, the MoS<sub>2</sub> entity may act as electron and/or energy acceptor,<sup>[15]</sup> energy reflector<sup>[16]</sup> or bi-directional electron acceptor,<sup>[17]</sup> based on the nature of its photoactive counterpart. Furthermore, there is a scarce literature report on a MoS<sub>2</sub>/PDI interfacial dipole heterosystem, formed by non-covalent interactions between the two entities lacking significant insight into MoS<sub>2</sub> charge transfer properties.<sup>[18]</sup> Therefore, it is timely and imperative to go beyond the existing knowledge of covalent hybrids of MoS<sub>2</sub> as electron acceptors. Herein, aiming in unveiling MoS<sub>2</sub> electron donor capabilities, we envisioned a novel MoS<sub>2</sub>-perylenediimide conjugate,

where its photoinduced processes are examined. Bringing our plan into existence, a core unsubstituted PDI derivative, with proven electron-accepting character, carrying a thiosulfonate moiety, was rationally designed, synthesized and covalently attached to MoS<sub>2</sub> S-defected edges. Next, we employed a series of techniques for characterizing the MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material, followed by redox, spectroelectrochemical and photophysical assessment. Femtosecond transient absorption spectroscopy (fs-TA) revealed the formation of the MoS<sub>2</sub><sup>2+</sup>-PDI<sup>-</sup> charge separated state by reductive electron transfer to <sup>1</sup>PDI\* from MoS<sub>2</sub>. Our results expand the portfolio of species with which MoS<sub>2</sub> can interface towards the realization of functional nanohybrids for managing charge-transfer phenomena

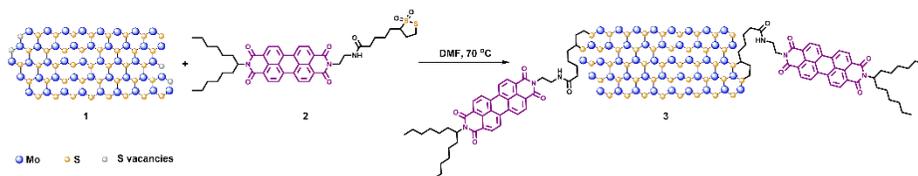
## Results and Discussion

Exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** was prepared by liquid chemical exfoliation,<sup>[19]</sup> while the PDI derivative **2**, featuring a thiosulfonate ring, was synthesized via a condensation reaction of the amino-substituted PDI with lipoic acid and fully characterized by NMR, MALDI-TOF-MS and IR (**Figures S1-S4**). The thiosulfonate structure of the ring is confirmed by IR, since the two characteristic bands at 1340 cm<sup>-1</sup> and 1127 cm<sup>-1</sup> attributed to the sulfone moiety are present (**Figure S4**). Compound **2** is actually a 60:40 mixture of the two possible isomers formed by oxidation of each sulfur atom (see SI for details). Next, reaction between the two species in *N,N*-dimethylformamide (DMF) furnished MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** (**Scheme 1**), in which S-vacancies at the periphery of MoS<sub>2</sub> are occupied by the S atoms of **2** as part of PDI derivative.<sup>[3,15-17]</sup> After completion of the reaction, total removal of excess **2**, from the powder residue obtained,

was secured by filtration over PTFE membrane filter (0.2 μm pore size) and extensive washing with dichloromethane, as evidenced upon blank absorbance of the filtrate (**Figure S5**).

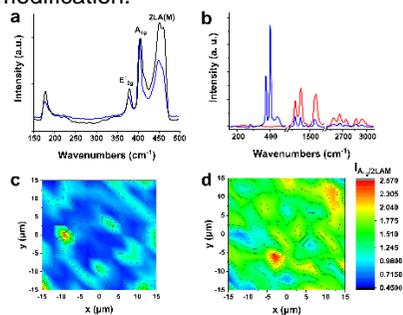
Raman spectroscopy assays (λ<sub>exc</sub> 633 nm) on **1** and **3** revealed all characteristic bands of MoS<sub>2</sub>. The fingerprint of MoS<sub>2</sub> includes three modes in the range of 300-500 cm<sup>-1</sup>, which are E<sup>1</sup><sub>2g</sub> at 375 cm<sup>-1</sup>, A<sub>1g</sub> at 405 cm<sup>-1</sup> and 2LA(M) at 450 cm<sup>-1</sup>. While the former two modes (E<sup>1</sup><sub>2g</sub> and A<sub>1g</sub>) are associated with in- and out-of-plane vibrations, the latter 2LA(M) is defect-induced and specifically, S-vacancy-related.<sup>[20]</sup> In **Figure 1a**, the Raman spectrum of MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** is compared with that of exfoliated MoS<sub>2</sub>, where a clear decrease in the 2LA(M) mode intensity is observed after the functionalization reaction. Please note that while MoS<sub>2</sub> nanosheets with different size and thickness exist, every different MoS<sub>2</sub> flake is functionalized in an uncontrollable fashion depending also on defect availability and accessibility in this particular manifold. Therefore, in order to have a generic image of the 2LA(M) mode intensity decrease upon functionalization, we visually represent in a form of 2D mapping assays, the intensity ratio I<sub>A1g</sub> / I<sub>2LA(M)</sub> variation in a 30 μm x 30 μm area for both materials (**Figures 1c** and **1d**). The fluctuation of the intensity ratio I<sub>A1g</sub> / I<sub>2LA(M)</sub> is averaged at 0.99 for exfoliated MoS<sub>2</sub> (**Figure 1c**) and 1.34 for MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** (**Figure 1d**). This increase by around 35% upon functionalization, is attributed to the defect healing of MoS<sub>2</sub> layer due to the incorporation of the sulfur-containing chain featured in **2**. In addition, information regarding the conductivity characteristics of the material is obtained, since the metallic polytype-related J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> and J<sub>3</sub> bands at 150, 225 and 325 cm<sup>-1</sup><sup>[21]</sup> respectively, are

absent in both Raman spectra of **1** and **3**



**Scheme 1.** Illustration of the chemical reaction of exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** with PDI derivative **2**, furnishing MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3**.

Therefore, the semiconducting characteristics of the 2H-MoS<sub>2</sub> polytype obtained with the exfoliation conditions are retained in the MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3**. Complementary, Raman spectrum of PDI derivative **2**, under on-resonance conditions ( $\lambda_{\text{exc}}$  514 nm), is characterized by eight well-resolved bands at 1292, 1376, 1595, 2589, 2668, 2750, 2868 and 2941 cm<sup>-1</sup>, assigned to in-plane C-C stretch and in-plane C-C-H bend vibrations (**Figure 1b**).<sup>[22]</sup> Accordingly, these bands are present in the Raman spectrum ( $\lambda_{\text{exc}}$  514 nm) of **3**, along with those of the MoS<sub>2</sub> fingerprint at 300-500 cm<sup>-1</sup>, confirming the successful chemical modification.



**Figure 1.** Raman spectra of a) exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (black) and MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** (blue) upon excitation at 633 nm (spectra normalized at the A<sub>1g</sub> mode), and b) PDI derivative **2** (red) and MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** (blue), upon excitation at 514 nm. Raman mapping, upon excitation at 633 nm, of the I<sub>A<sub>1g</sub></sub>/I<sub>L<sub>2LA(M)</sub></sub> intensity ratio of a 30  $\mu\text{m}$  x 30  $\mu\text{m}$  area for c) exfoliated MoS<sub>2</sub> **1**, and d) MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3**.

ATR-IR spectroscopy studies on **3** further validated the above syllogism, since characteristic IR bands of PDI derivative **2** (**Figure S4**) are distinct on the ATR-IR spectrum of the hybrid material **3** (**Figure 2a**). Namely, the bands at 2800-2900 cm<sup>-1</sup> are assigned to the C-H stretching vibrations of the aliphatic chains of PDI, the bands at 1690 cm<sup>-1</sup> and 1655 cm<sup>-1</sup> are attributed to the symmetric and asymmetric carbonyl stretch modes of the imide groups, the 1595 cm<sup>-1</sup> band is attributed to the conjugated C-C stretch modes of the aromatic system and the band at 746 cm<sup>-1</sup> is due to the C-S stretching vibration of the dithiolane moiety. Considering the strong evidence of the PDI presence in **3**, along with the S-vacancies-related decreased 2LA(M) mode in the functionalized material and the respective work-up to remove any physisorbed species, we deduce that the PDI moieties are covalently attached to MoS<sub>2</sub> lattice

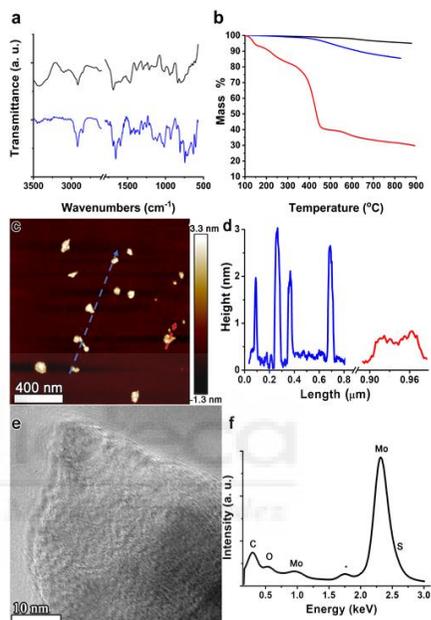
Quantitative information for the degree of functionalization for **3** is obtained by thermogravimetric analysis (TGA). In **Figure 2b**, the TGA graphs under N<sub>2</sub> of the exfoliated MoS<sub>2</sub> **1**, the PDI ligand **2** and the MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** are compared. Whereas exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** is rather thermally stable, losing only 1.4% of weight up to 500 °C, due to lattice decomposition initiated by the S-defected areas, the organic addend **2** decomposes by 60% in the same temperature range. At the end of the

analysis, **2** leaves behind a 20% residue due to the perylene aromatic core. On the other hand, hybrid material **3** exhibits a 4.9% mass loss up to 500 °C owing to the grafted perylene chains on the MoS<sub>2</sub> periphery. Considering this mass loss and the molar masses of MoS<sub>2</sub> unit and PDI, the degree of functionalization is estimated as 1 PDI moiety per every 97 MoS<sub>2</sub> units, which is a relatively high loading considering the available S-vacancies located at the edges of the MoS<sub>2</sub> nanosheet.

Regarding the morphology of MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3**, AFM analysis shows an average height of 2-3 nm, corresponding to an average of ~4 layers. Nevertheless, single layered MoS<sub>2</sub> was also found (**Figures 2c-d**) and the average length is 80x80 nm<sup>2</sup> with amorphous shapes. The absence of perylene-perylene agglomerations within hybrid material **3**, evidenced by the uniform height observation, is highlighted by a 3D-AFM image (**Figure S6**). In addition, MoS<sub>2</sub> layers do not show holes or presence of impurities, making an ideal system for further optoelectronic studies. Analyzing the height profile of a MoS<sub>2</sub> single layer in **3**, a reduction in height from the edge to the center of the layer is apparent, i.e. from 0.9 to 0.6 nm, suggesting that the chemical incorporation of PDI exclusively takes place at the edges of MoS<sub>2</sub>.

High-resolution TEM imaging was further employed to understand the morphology of the hybrid material **3** at higher magnification. Although we focus on a single layer suspended on a TEM grid, the chemically modified MoS<sub>2</sub> layer is rough, producing valleys (**Figure 2e**). However, atoms can be easily distinguishable in several regions of the picture, without observing defects on the lattice. The absence of black areas on the imaged sample ensures lack of PDI and/or other organic species physisorbed onto

the basal plane of MoS<sub>2</sub>. In addition, we want to remark that the high perimeter-to-area ratio, observed by TEM and AFM, is in line with the relatively high level of functionalization estimated by TGA. Finally, EDX reveals the presence of appreciable amount of C as well as O due to PDI, on top of Mo and S in **3** (**Figure 2f**).



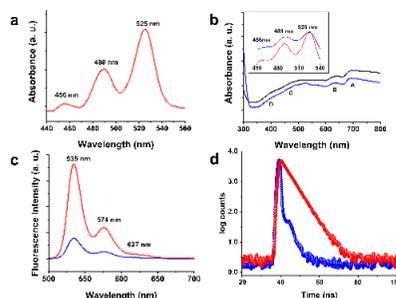
**Figure 2.** (a) ATR-IR spectra of exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (black) and hybrid material **3** (blue). (b) TGA graphs for exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (black), hybrid material **3** (blue) and PDI derivative **2** (red), obtained under N<sub>2</sub> atmosphere. (c) AFM image of hybrid material **3**, and (d) the corresponding line height profile. (e) HR-TEM and (f) EDX of hybrid material **3**. Impurity denoted with \* is due to Si.

Electronic absorption spectroscopy constitutes an effective means of characterizing chemical states in PDI chemistry. PDI's vibronic progression, that is the typical electronic S<sub>0</sub>-S<sub>1</sub> transition, results in three well-defined bands in its absorption spectra at 456, 489 and 525 nm.<sup>[23, 24]</sup> These characteristic bands are attributed to the 0-2, 0-1 and 0-0 transitions,

respectively (**Figure 3a**). Conversely, the exfoliated 2H-MoS<sub>2</sub> absorption spectrum is dominated by four broad bands centered at 690, 630, 470, and 400 nm, which reveal the prominent semiconducting character of the material. The former two bands at 690 and 630 nm are the A and B excitonic transitions, while the direct transitions from the valence to the conduction band are represented by the C and D bands at 470 and 400 nm, respectively<sup>[25]</sup> (**Figure 3b**). The UV-Vis spectrum of hybrid material **3**, highly resembles that of exfoliated MoS<sub>2</sub> since the aforementioned A, B, C and D bands exist, corroborating the maintenance of the MoS<sub>2</sub> 2H phase upon covalent modification (**Figure 3b**). On the contrary, the signature bands of PDI are overshadowed by the C and D bands of MoS<sub>2</sub> and therefore are revealed only upon subtraction of the absorbance spectrum of **1**. At the inset of **Figure 3b**, the UV-Vis spectrum of **3** after subtraction of exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** absorbance, in comparison with the same optical concentration (e.g. same intensity of 525 nm absorbance band) UV-Vis spectrum of **2**, is depicted. The absence of significant alterations in the UV-Vis spectrum of MoS<sub>2</sub>-PDI **3**, as compared to that of **1** and **2**, manifests that negligible, if any at all, electronic interactions between the two species within the hybrid material at the ground state, exist.

The emission spectra of **2** and **3** upon excitation at 480 nm, for samples possessing same optical concentration, are shown in **Figure 3c**. The fluorescent profile of both materials mirrors the absorbance profile of **2**, while considerable fluorescence quenching of PDI's emission at 535 nm is observed for MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** (**Figure 3c**). Furthermore, fluorescence lifetime assays upon excitation at 561 nm reveal a monoexponential decay profile of 4.58

ns for free PDI derivative **2**, while in reverse, a 45 times faster lifetime decay was registered (i.e. 102 ps) for MoS<sub>2</sub>- PDI hybrid material **3** (**Figure 3d**). Collectively, the data acquired from both steady-state and time-resolved fluorescence emission spectroscopic assays validate the presence of a new deactivation pathway involving MoS<sub>2</sub> at the excited state.

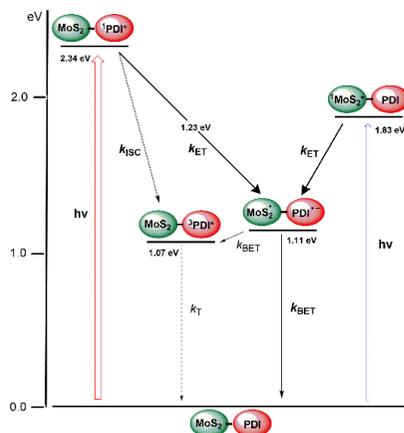


**Figure 3.** UV-Vis spectra of a) PDI derivative **2**, b) exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (black) and hybrid material **3** (blue). Inset: UV-Vis spectrum of **3** (blue) after subtraction of exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** absorbance in comparison with same optical concentration UV-Vis spectrum of **2** (red). c) Emission spectra of samples with same optical concentration of **2** (red) and **3** (blue), obtained upon excitation at 480 nm. d) Emission decay profiles of **2** (red) and **3** (blue), monitored at 574 nm, upon excitation at 561 nm. All spectra are recorded in DMF.

Next, the redox properties of MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** were assessed in benzonitrile vs Fc/Fc<sup>+</sup> with the aid of cyclic voltammetry. The corresponding voltammogram is compared with those acquired from PDI derivative **2** and exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (**Figure S7**). Briefly, **2** exhibits two reversible reductions at -1.28 and -1.67 V, since perylenediimide is characterized by high electron affinity, allowing its facile reduction while rather hindering its oxidization.<sup>[26]</sup> For exfoliated MoS<sub>2</sub>, two irreversible reductions at -1.25 and -1.60 V and an irreversible oxidation at -0.18 V are registered.<sup>[25]</sup> Regarding **3**, overlapped

reduction signals that appear broadened, sum up to two irreversible reductions at -1.29 and -1.53 V. This small negative shift, by 10 mV, in the first reduction potential of PDI, calls for its harder reduction in hybrid material **3**.

From the earlier discussed optical and electrochemical results, an energy level diagram is established (**Figure 4**) to weigh in the possibility of reductive electron transfer to  $^1\text{PDI}^*$  from  $\text{MoS}_2$  to yield  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$ . The electrochemical gap in **3**, viz., potential difference between the first oxidation of  $\text{MoS}_2$  and first reduction of PDI ca. 1.11 eV, is smaller than the pumping energy of  $^1\text{PDI}^*$ , (i.e. 2.34 eV, calculated from the midpoint energy of absorption and fluorescence bands in **2**). Upon excitation,  $\text{MoS}_2\text{-}^1\text{PDI}^*$  formed could undergo either intersystem crossing to populate the  $^3\text{PDI}^*$  or be involved in electron or energy transfer events. From the thermodynamic point of view, reductive electron transfer to yield  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$  is plausible. Interestingly, the energy level of  $^3\text{PDI}^*$ , i.e. 1.07 eV<sup>[27]</sup> is slightly lower by that of  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$ , ca. 1.11 eV. Therefore, under such circumstances,  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$  could directly undergo back electron transfer to the ground state, or populate the  $^3\text{PDI}^*$ . Considering that at the pumping energy of 2.34 eV, direct band gap excitation of  $\text{MoS}_2$  at ca. 1.83 eV is also possible (please note that the direct band gap of  $\text{MoS}_2$  cannot be observed by electronic absorption and/or fluorescence spectroscopy)<sup>[15b,17,25]</sup>. This is particularly true considering the broad absorption of  $\text{MoS}_2$ , covering the 350-800 nm range, providing slender chances of selective excitation of PDI in the hybrid material **3**. Fortunately, as shown in **Figure 4**, both  $^1\text{PDI}^*$  and  $^1\text{MoS}_2^*$  are capable of promoting electron transfer to yield the charge-separated state  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$ .



**Figure 4.** Energy level diagram depicting reductive electron transfer of  $^1\text{PDI}^*$  and oxidative electron transfer from  $^1\text{MoS}_2^*$  in the  $\text{MoS}_2\text{-PDI}$  hybrid material **3**. (thick arrows – most likely process; dotted arrow – less likely process, ET=electron transfer, BET=back electron transfer, T=triplet emission, ISC=intersystem crossing).

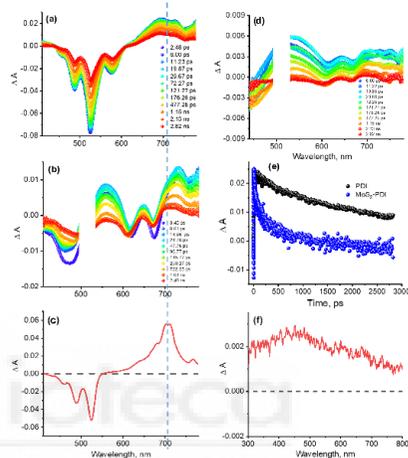
In order to characterize the anticipated electron transfer product,  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^{\cdot-}$ , formed upon photoexcitation during transient absorption spectral studies, spectroelectrochemical studies were performed. The differential absorption spectrum of  $\text{PDI}^{\cdot-}$  obtained upon one-electron reduction of PDI **2** is shown in **Figure 5c**. Negative absorption bands at 460, 490 and 526 nm due to diminished concentration of neutral PDI, and new positive peaks at 680, 703, 711 and 767 nm corresponding to newly formed  $\text{PDI}^{\cdot-}$  are observed. Similar spectroelectrochemical studies, performed upon oxidation of exfoliated  $\text{MoS}_2$  **1**, revealed broad absorption covering the 300-800 nm region with a peak at ~440 nm as shown at the differential absorption spectrum in **Figure 5f**.

Femtosecond transient absorption spectra (fs-TA) of PDI derivative **2**, at the indicated delay times, are presented in **Figure 5a**. The instantaneously formed  $^1\text{PDI}^*$  revealed

excited state absorption bands at 694, 729 and 784 nm, accompanied by negative bands at 456, 488, 526 and 578 nm. Regarding the negative bands, the first two bands have contributions from ground state bleaching (GSB), while the last two bands have contributions from both GSB and stimulated emission. Decay and recovery of the positive and negative peaks is slow, consistent with the long lifetime of  $^1\text{PDI}^*$  (ca. 4.2 ns, also see decay profile of the 784 nm peak in **Figure 3d** (red trace)). Since the spectral features of  $^1\text{PDI}^*$  and  $\text{PDI}^-$  in the 625-750 nm range are close, in order to differentiate those two species, a close examination of spectral results was warranted. As shown with the dashed line in **Figures 5a** and **c**, the main band due to  $^1\text{PDI}^*$  centered at 694 nm is clearly away from the  $\text{PDI}^-$  peak at 711 nm. Efforts were also made to spectrally characterize  $^3\text{PDI}^*$  using nanosecond transient absorption (ns-TA) spectroscopy. Direct excitation of PDI gave no measurable signal, hence,  $^3\text{PDI}^*$  was populated via energy transfer using anthracene,<sup>[28]</sup> as shown in **Figure S8**. Main peaks of  $^3\text{PDI}^*$  spanned the 550-670 nm range.

The fs-TA spectra at the indicated delay times of  $\text{MoS}_2$ -PDI **3** are shown in **Figure 5b**. Due to lack of 100% excitation selectivity, in addition to peaks corresponding to  $^1\text{PDI}^*$ , additional strong peaks corresponding to  $^1\text{MoS}_2^*$  are also identified. Positive bands centered at 560, 648 and 717 nm, and negative peaks at 473, 618 and 675 nm are observed; that is, concurrent formation of  $^1\text{PDI}^*$  and  $^1\text{MoS}_2^*$  (induced absorption of B and A excitons having contributions in the 618 and 675 nm peaks and negative peaks having contributions of GSB;<sup>[15b,25]</sup> see **Figure 5d** for fs-TA of  $\text{MoS}_2$  excited at 514 nm) is witnessed. The decay/recovery of the peaks is associated with the slow development of a broad absorption band in the 710-

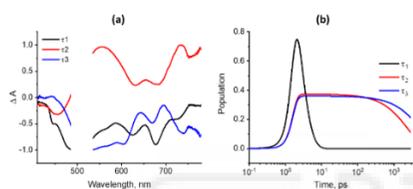
715 nm range, where peaks of  $\text{PDI}^-$  are expected. Additionally, the decay of the 784 nm peak, where contribution from  $^1\text{MoS}_2^*$  is minimal, is rapid, as shown in **Figure 5e** (blue trace), indicating involvement of  $^1\text{PDI}^*$  in the photoinduced reductive electron transfer process. The signature peaks of  $^3\text{PDI}^*$ , developed at a later time were buried within the strong spectral features.



**Figure 5.** Femtosecond transient absorption spectra at the indicated delay times of (a) PDI derivative **2**, (b)  $\text{MoS}_2$ -PDI hybrid material **3**, and (d) exfoliated  $\text{MoS}_2$  **1**, upon excitation at 514 nm in DMF. (c) Differential absorption spectrum of one-electron reduced  $\text{PDI}^-$  in DMF. (e) Decay profile of the 784 nm peak corresponding to  $^1\text{PDI}^*$  of **2** (black) and **3** (blue). (f) Differential absorption spectrum for oxidized  $\text{MoS}_2^{++}$  in DMF. The break in the 500-520 nm range is due to elimination of scattered light from excitation pulses.

Having secured evidence of occurrence of electron transfer in **3** to yield  $\text{MoS}_2^{++}\text{-PDI}^-$ , next, we moved forward to secure time constant of this event. Transient data were subjected to Glotaran analysis<sup>[29]</sup> and species associated spectra (SAS) were generated. For satisfactory data fit, at least three SAS were needed, as shown in **Figure 6a**. The first SAS with a time constant of 1.69 ps (see **Figure**

**6b** for population-time plots) had contributions of the singlet excited states of the entities. The second component, with a time constant of 2.36 ns, had a characteristic peak of PDI<sup>-</sup> in the near-IR region and was attributed to the MoS<sub>2</sub><sup>++</sup>-PDI<sup>-</sup> electron transfer product. The third component, with a time constant of 5.37 ns, had excitonic features of unmodified MoS<sub>2</sub> of similar time constant,<sup>[15b,17,25]</sup> and thus was attributed to free MoS<sub>2</sub>. The average time constant of 2.36 ns for the electron transfer product is reasonable considering the relatively long spacer between MoS<sub>2</sub> and PDI in the hybrid material **3**.



**Figure 6.** (a) Decay associated spectra and (b) population kinetics of MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** from Glotaran analysis of transient data shown in **Figure 5b**. The break in the 500-520 nm range is due to elimination of scattered light from excitation pulses.

## Conclusion

In conclusion, an electron acceptor PDI derivative was covalently incorporated to semiconducting MoS<sub>2</sub> successfully, and a series of complementary characterization techniques were employed to outline the hybrid material's profile. The MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material **3** was custom-designed in order to complete the puzzle of MoS<sub>2</sub> possible photophysical charge-transfer events occurring in MoS<sub>2</sub> interfacing photoactive organic species. Steady-state and time-resolved photophysical assays together with redox and spectroelectrochemical studies acknowledged the formation of MoS<sub>2</sub><sup>++</sup>-

PDI<sup>-</sup> charge-separated state. Overall, the tunable electronic properties of MoS<sub>2</sub>, as a result of covalently linking photoactive organic species with precise characteristics, unlock their potentiality and enable their application in light-harvesting and optoelectronic devices.

## Acknowledgements

Partial support of this work by the project "Advanced Materials and Devices" (MIS 5002409), which is implemented under the "Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sector" funded by the Operational Program "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund) is acknowledged. This material is also based upon work supported by the National Science Foundation under grant numbers 1401188 and 2000988 to FD and by European Regional Development Fund "A way to make Europe" and the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación/Agencia Estatal de Investigación through projects PID2019-109200GB-I00 and CTQ2017-87102-R (MCI/AEI/FEDER, UE). This project was also supported by Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) postdoctoral fellowship grant agreement No P19368. We thank Prof. J. Ortiz for the acquisition of DEPT and HSQC spectra.

**Keywords:** perylenediimide • MoS<sub>2</sub> • covalent functionalization • charge-transfer • transient absorption spectroscopy

## References

- a) C. R. Ryder, J. D. Wood, S. A. Wells, M. C. Hersam, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3900–3917; b) A. Stergiou, N. Tagmatarchis, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 18246.
- [2] a) S. S. Chou, M. De, J. Kim, S. Byun, C. Dykstra, J. Yu, J. Huang, V. P. Dravid, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4584-4587; b) Q. Ding, K. J. Czech, Y. Zhao, J. Zhai, R. J. Hamers, J. C. Wright, S. Jin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 12734-12742.
- [3] a) R. Canton-Vitoria, Y. Sayed-Ahmad-Baraza, M. Pelaez-Fernandez, R. Arenal, C. Bittencourt, C. P. Ewels, N. Tagmatarchis, *NPJ. 2D Mater. Appl.* **2017**, *1*, 13; b) R. Canton-Vitoria, C. Stangel, N. Tagmatarchis, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 23476-23480.
- [4] I. K. Sideri, R. Arenal, N. Tagmatarchis, *ACS Mater. Lett.* **2020**, *2*, 832-837.
- [5] a) S. Karunakaran, S. Pandit, B. Basu, M. De, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12634-12644; b) X. S. Chu, A. Yousaf, D. O. Li, A. A. Tang, A. Debnath, D. Ma, A. A. Green, E. J. G. Santos, Q. H. Wang, *Chem. Mater.* **2018**, *30*, 2112- 2128; c) M. Vera-Hidalgo, E. Giovanelli, C. Navío, E. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3767-3771.
- [6] C. Backes, N. C. Berner, Xi. Chen, P. Lafargue, P. LaPlace, M. Freeley, G. S. Duesberg, J. N. Coleman, A. R. McDonald, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 2638-2642.
- [7] a) F. Würthner, C. R. Saha-Möller, B. Fimmel, S. Ogi, P. Leowanawat, D. Schmidt, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 962-1052.
- [8] A. Oleson, T. Zhu, I. S. Dunn, D. Bialas, Y. Bai, W. Zhang, M. Dai, D. R. Reichman, R. Tempelaar, L. Huang, F. C. Spano, *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 20567-20578.
- [9] P.-O. Schwartz, L. Biniek, E. Zaborova, B. Heinrich, M. Brinkmann, N. Leclerc, S. Méry, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5981-5992.
- [10] K. M. Felter, V. M. Caselli, D. D. Günbaş, T. J. Savenije, F. C. Grozema, *ACS Appl. Energy Mater.* **2019**, *2*, 8010-8021.
- [11] C. Huang, S. Barlow, S. R. Marder, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2386-2407.
- [12] R. Schmidt, J. H. Oh, Y.-S. Sun, M. Deppisch, A.-M. Krause, K. Radacki, H. Braunschweig, M. Könemann, P. Erk, Z. Bao, F. Würthner, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6215-6228.
- [13] G. Zhang, J. Zhao, P. C. Y. Chow, K. Jiang, J. Zhang, Z. Zhu, J. Zhang, F. Huang, H. Yan, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 3447-3507.
- [14] E. Avellanal-Zaballa, G. Durán-Sampedro, A. Prieto-Castañeda, A. R. Agarrabeitia, I. García-Moreno, I. López-Arbeloa, J. Bañuelos, M. J. Ortiz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 13210-13218.
- [15] a) R. Canton-Vitoria, L. Vallan, E. Urriolabeitia, A. M. Benito, W. K. Maser, N. Tagmatarchis, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10468-10474; b) L. Vallan, R. Canton-Vitoria, H. B. Gobeze, Y. Jang, R. Arenal, A. M. Benito, W. K. Maser, F. D' Souza, N. Tagmatarchis, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13488-13496.
- [16] a) R. Canton-Vitoria, T. Scharl, A. Stergiou, A. Cadranel, R. Arenal, D. M. Guldi, N. Tagmatarchis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3976-3981.
- [17] R. Canton-Vitoria, H. B. Gobeze, V. M. Blas-Ferrando, J. Ortiz, Y. Jang, F. Fernández-Lázaro, Á. Sastre-Santos, Y. Nakanishi, H. Shinohara, F. D'Souza, N. Tagmatarchis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 5712-5717.
- [18] X. Yu, A. Rahmanudin, X. A. Jeanbourquin, D. Tsokkou, N. Guijarro, N. Banerji, K. Sivula, *ACS Energy Lett.* **2017**, *2*, 524-531.
- [19] G. Pagona, C. Bittencourt, R. Arenal, N. Tagmatarchis, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12950-12953.
- [20] S. Bae, N. Sugiyama, T. Matsuo, H. Raebiger, K.-i. Shudo, K. Ohno, *Phys. Rev. Appl.* **2017**, *7*, 024001.

- [21] S. Jimenez Sandoval, D. Yang, R. F. Frindt, J. C. Irwin, *J. C. Phys. Rev. B* **1991**, *44*, 3955-3962.
- [22] Z. Luo, A. Peng, H. Fu, Y. Ma, J. Yao, B. H. Loo, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 133-138.
- [23] W. E. Ford, *J. Photochem.* **1987**, *37*, 189-204.
- [24] S. Gan, L. Zhong, C. Engelbrekt, J. Zhang, D. Han, J. Ulstrup, Q. Chi, L. Niu, *Nanoscale* **2014**, *6*, 10516-10523.
- [25] L. Wibmer, S. Lages, T. Unruh, D. M. Guldi, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706702.
- [26] a) A. Wicklein, A. Lang, M. Muth, M. Thelakkat, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14442-14453; b) C. Huang, S. Barlow, S. R. Marder, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2386-2407.
- [27] L. Marin-Gomis, F. Peralta-Ruiz, M. B. Thomas, F. Fernandez-Lazaro, F. D'Souza, Á. Sastre-Santos, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3863-3874.
- [28] W. E. Ford, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6373-6380.
- [29] J. J. Snellenburg, S. P. Laptinok, R. Seger, K. M. Mullen, and I. H. M. van Stokkum, *J. Stat. Softw.* **2012**, *49*, 1-22.

## SUPPORTING INFORMATION

### **Unveiling the photoinduced electron-donating character of MoS<sub>2</sub> in covalently linked hybrids featuring perylenediimide**

Ioanna K. Sideri,<sup>[a]</sup> Youngwoo Jang,<sup>[b]</sup> Jose Garcés-Garcés,<sup>[c]</sup> Ángela Sastre-Santos,<sup>[c]</sup> Ruben Canton-Vitoria,<sup>[d]</sup> Ryo Kitaura,<sup>[d]</sup> Fernando Fernández-Lázaro,<sup>\*[c]</sup> Francis D'Souza,<sup>\*[b]</sup> and Nikos Tagmatarchis<sup>\*[a]</sup>

<sup>a</sup>*Theoretical and Physical Chemistry Institute, National Hellenic Research Foundation, 48*

*Vassileos Constantinou Avenue, 11635 Athens (Greece)*

<sup>b</sup>*Department of Chemistry, University of North Texas, 1155 Union Circle, 305070 Denton, TX 76203-5017 (USA)*

<sup>c</sup>*Área de Química Orgánica, Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, 03202, Elche (Spain)*

<sup>d</sup>*Department of Chemistry, Nagoya University, 64-8602 Nagoya (Japan)*

## Instrumentation

*Tip sonication* was performed with a Bandelin Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD 3200 equipped with a flat head probe (VS70T), running at 35% of the maximum power (250 W).

*Micro-Raman scattering* measurements were performed at room temperature in the backscattering geometry using a RENISHAW inVia Raman spectrometer equipped with a CCD camera and a Leica microscope. A 1200 lines  $\text{mm}^{-1}$  grating was used for all measurements, providing a spectral resolution of  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ . As an excitation source the  $\text{Ar}^+$  laser 514 nm or 633 nm with less than 2.65 mW laser power was used. Measurements were taken with 10 seconds of exposure times at varying numbers of accumulations. A drop of material dispersion was placed on a pre-cleaned microscope glass slide (3x1 inch) and the solvent was evaporated under vacuum. The laser spot was focused on the sample surface using a long working distance 50x objective. Raman spectra were collected after map image acquisition was conducted on various (3-5) areas of the sample and recorded with Peltier cooled CCD camera. The intensity ratio  $I_{A_{1g}}/I_{2LAM}$  was obtained by taking the peak intensities following any baseline corrections. For the mapping recordings, 5-10 areas of 121 acquisition points each were scanned for every sample and we present here a representative one close to the total average with respect to the intensity ratio  $I_{A_{1g}}/I_{2LAM}$ . The data were collected and analyzed with Renishaw Wire and Origin software. Please note that a) the spectra presented correspond to few-layered  $\text{MoS}_2$  nanosheets and not to single-isolated  $\text{MoS}_2$  particles and b) the Raman spectra upon excitation at 633 nm are normalized at the  $A_{1g}$  mode for clarity purposes.

*Mid-infrared spectra* in the region  $500\text{-}4500 \text{ cm}^{-1}$  were acquired on a Fourier transform IR spectrometer (Equinox 55 from Bruker Optics) equipped with a single reflection diamond ATR accessory (DuraSamp1IR II by SensIR Technologies). A drop of the sample dispersion was placed on the diamond surface, followed by evaporation of the solvent, in a stream of nitrogen, before recording the spectrum. Typically, 100 scans were acquired at  $2 \text{ cm}^{-1}$  resolution.

*$^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra* were recorded on a Bruker AVANCE DRX500 (500 MHz and 125 MHz), while DEPT 135 spectra were recorded on a Bruker AC spectrometer

(75 MHz). All NMR spectra are internally referenced to residual solvent signals. Data for  $^1\text{H}$ -NMR are reported as follows: chemical shift ( $\delta$  ppm), multiplicity (s = singlet, t = triplet, sp = septuplet, m = multiplet), coupling constant, integration and assignment. Data for  $^{13}\text{C}$ -NMR are reported in terms of chemical shift ( $\delta$  ppm).

*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectra* were obtained on a Bruker Microflex spectrometer.

*Thermogravimetric analysis* was performed using a TGA Q500 V20.2 Build 27 instrument by TA in an inert atmosphere of nitrogen (purity >99.999%). In a typical experiment 2 mg of the material was placed in the platinum pan and the temperature was equilibrated at 40°C. Subsequently, the temperature was increased to 900°C with a rate of 10°C/min and the mass changes were recorded as a function of temperature.

*Atomic force microscopy (AFM)* imaging was performed by the Veeco AFM system (Dimension 3100SPM, Nanoscope IV) operated at a scanning rate of 1 Hz. For PL imaging, LED light source (Mightex GCS-6500-15) was used to illuminate samples. PL intensity maps (550-800 nm) were imaged with CCD (Princeton Instruments PIXIS-1024BR-eXelion). Sample preparation was performed by dispersing 1 mg of the  $\text{MoS}_2$ -based in 3 mL of isopropanol and bath-sonicating for 20 min. Then,  $\text{MoS}_2$  sheets floating on water were transferred onto h-BN/ $\text{SiO}_2$  substrate and examined.

*High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM)* was performed on an JEOL JEM-2100F equipped with Energy Dispersive X-Ray (EDX) spectroscopy, working at 80 keV equipped with an Orious CCD camera.

*UV-Vis absorption spectra* were recorded on a PerkinElmer (Lambda 19) UV-Vis-NIR spectrophotometer.

*Steady-state emission spectra* were recorded on a Fluorolog-3 JobinYvon-Spex spectrofluorometer (model GL3-21).

*The fluorescence lifetimes* were evaluated by using a Horiba Yvon Nanolog coupled with time-correlated single photon counting with nanoLED excitation sources. A right angle detection method was used.

*Cyclic voltammograms* were recorded on an Autolab PGSTAT128 N potentiostat/galvanostat equipped with a dual mode bipotentiostat (BA module) electrochemical analyzer using a three-electrode system. A platinum button electrode

was used as the working electrode. A platinum cloth served as the counter electrode and a platinum wire was used as the reference electrode. Ferrocene/ferrocenium redox couple was used as an internal standard. All solutions were purged prior to electrochemical and spectral measurements using nitrogen gas.

*Spectroelectrochemical assays* were performed by using a cell assembly (SEC-C) supplied by ALS Co., Ltd. (Tokyo, Japan). This assembly comprised of a Pt counter electrode, a 6 mm Pt Gauze working electrode, and an Ag/AgCl reference electrode in a 1.0 mm path length quartz cell. The optical transmission was limited to 6 mm covering the Pt Gauze working electrode.

*Femtosecond transient absorption spectroscopy* experiments were performed using an ultrafast femtosecond laser source (Libra) by Coherent incorporating a diode-pumped, mode locked Ti:sapphire laser (Vitesse) and a diode-pumped intracavity doubled Nd:YLF laser (Evolution) to generate a compressed laser output of 1.45 W. For optical detection, a Helios transient absorption spectrometer coupled with a femtosecond harmonics generator, both provided by Ultrafast Systems LLC, was used. The sources for the pump and probe pulses were derived from the fundamental output of Libra (Compressed output 1.45 W, pulse width 100 fs) at a repetition rate of 1 kHz; 95% of the fundamental output of the laser was introduced into a TOPAS-Prime-OPA system with a 290–2600 nm tuning range from Altos Photonics Inc., (Bozeman, MT), while the rest of the output was used for generation of a white light continuum. Kinetic traces at appropriate wavelengths were assembled from the time-resolved spectral data. Data analysis was performed initially using Surface Xplorer software supplied by Ultrafast Systems and later by global and target analysis through GloTarAn. All measurements were conducted in degassed solutions at 298 K. The estimated error in the reported rate constants is  $\pm 10\%$ .

## Materials

All solvents and reagents were purchased from Aldrich and used without further purification.

## Experimental

**Exfoliated 2H-MoS<sub>2</sub> 1.** Bulk MoS<sub>2</sub> (150 mg) was dispersed in chlorosulfonic acid (15 mL), sonicated for 2 hours and left stirring at room temperature for 24 hours. Cold water (200 mL) was added dropwise with extreme care (please note that the reaction is

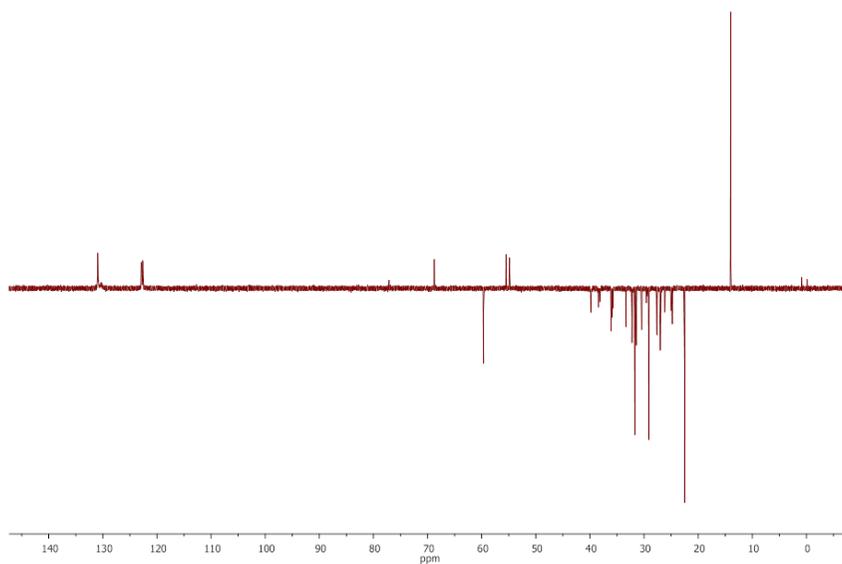
exothermic and releases gaseous hydrochloric acid) and the mixture was filtrated over a PTFE filter (0.2  $\mu\text{m}$  pore size) and washed with an excess of methanol and acetone. The solid material was added to 150 mL of *N*-methyl pyrrolidone and sonicated for 1 hour (tip sonication at 30-35% of amplitude 100% of 200W). The suspension was left to precipitate over a 3 day period and the supernatant was then collected and filtrated on PTFE filter (0.2  $\mu\text{m}$  pore size), washed with a large amount of methanol, acetone and dichloromethane, dried in vacuum and used for further functionalization.

**Synthesis of PDI derivative 2.** Dry  $\text{CHCl}_3$  (10 mL) was added under nitrogen atmosphere to a round-bottom flask containing HOBt (18 mg, 0.147 mmol), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (20  $\mu\text{L}$ , 0.147 mmol) and lipoic acid (28 mg, 0.07 mmol) and the mixture was stirred at rt for 20 min. Then, a solution of PDI (100 mg, 0.162 mmol) and pyridine (20  $\mu\text{L}$ ) in dry *N,N*-dimethylformamide (DMF) (10 mL) was added to the reaction. The mixture was stirred overnight at rt. Then, it was extracted with dichloromethane and washed successively with HCl (2N),  $\text{NaHCO}_3$ , and finally with water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. Purification was carried out by silica gel column chromatography (toluene/acetone, 70:1 to 20:1) yielding 33 mg (25 %) of PDI **2** as a red solid.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.34-8.25 (m, 4H, Ar-PDI), 8.16-8.06 (m, 4H, Ar-PDI), 6.75 (br, 0.06 H, -NHCO- (**2b**)), 6.59 (br, 0.09H, -,NHCO- (**2a**)) 5.10-5.02 (m, -CHN-), 4.44-4.25 (m, 2H, -NCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO-), 4.19 (sp,  $J = 5$  Hz, 1H, -CH-S-SO<sub>2</sub> (**2a**)), 3.76-3.63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NHCO, CH<sub>2</sub>-S-SO<sub>2</sub> (**2b**)), 3.62-3.56 (m, 1H, -CHH-SO<sub>2</sub>-S (**2a**)) 3.49-3.42 (m, 1H, -CHH-SO<sub>2</sub>-S (**2a**), -CH-SO<sub>2</sub>-S (**2b**)), 2.74-2.63 (m, 1H, -CH-CHH-CH<sub>2</sub>-S), 2.31-2.13 (5H, m, -CH<sub>2</sub>-CONH, -N-CH-CH<sub>2</sub>-, -CH-CHH-CH<sub>2</sub>-S), 2.08-2.00 (m, 1H, -CH-CHH-CH<sub>2</sub>-S), 1.98-1.78 (m, 2H, -N-CH-CH<sub>2</sub>-), 1.74-1.56 (m, 4H, -NHCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.41-1.27 (18H, m, -NHCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, 2x[-NCH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>]) and 0.84 ppm (t,  $J = 6.36$  Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.4, 173.3, 163.9, 163.8, 134.7, 134.5, 133.8, 133.7, 131.5, 129.3, 129.2, 129.1, 126.0, 125.9, 125.8, 123.4, 123.3, 123.1, 122.7, 69.3, 60.1, 55.9, 55.4, 40.4, 38.9, 38.7, 36.6, 36.4, 36.3, 33.8, 32.8, 32.2, 31.9, 30.9, 30.1, 29.6, 28.1, 28.1, 27.5, 27.5, 26.7, 25.5, 25.3, 23.0 and 14.5. FT-IR (KBr): 3393, 2932, 2845, 1695, 1643, 1596, 1433, 1404, 1340, 1240, 1127, 820 and 738  $\text{cm}^{-1}$ . UV-Vis ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  (log  $\epsilon$ ): 525 (4.85), 489 (4.83) and 456 (4.41). MALDI-TOF  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ] calc. for  $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ : 835.3325, found: 835.3306.

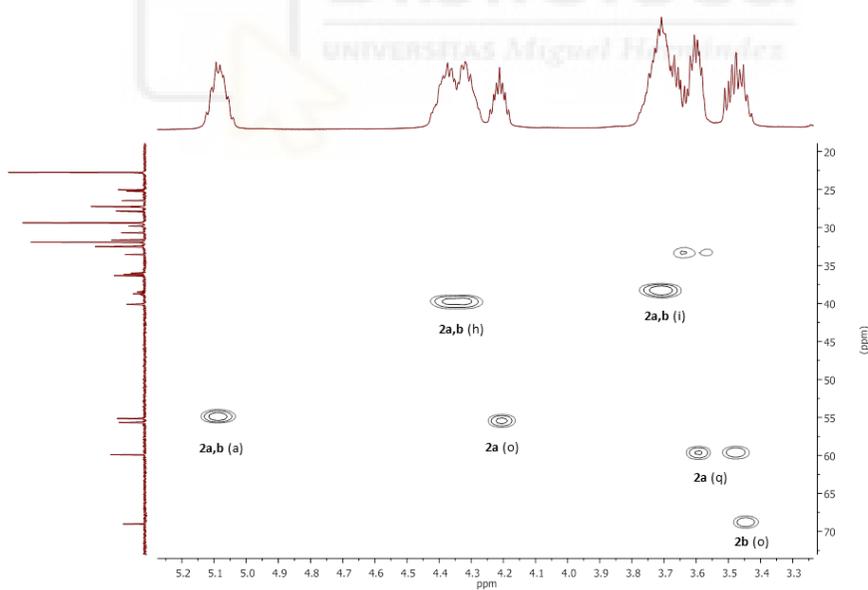
**Determination of 2a:2b structural isomers ratio.** The existence of a mixture of compounds is demonstrated by the presence of 3 CH signals in the 50-70 ppm range of the DEPT 135 spectrum of PDI derivative **2** (Figure S3). The m/z ratio of compound **2** indicates the presence of two oxygen atoms (Figure S5), and the 1340 and 1127 cm<sup>-1</sup> bands in the IR spectrum point out to the presence of a sulfone rather than 2 sulfoxides (Figure S6). With all these data, the structure proposed for compound **2** is that of a thiosulfonate, instead of a *vic*-disulfoxide. Thus, the mixture of compounds should correspond to the oxidation of each sulfur atom in the ring. The heteronuclear HSQC spectrum depicted in Figure S4 allows the unambiguous determination of the abovementioned CH groups (for the NMR characterization of the thiosulfonates derived from lipoic acid see: A. Müller et cols., *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, 111) located at 69.3 (CH adjacent to the sulfone group in **2b**), 60.1 (CH<sub>2</sub> contiguous to the sulfone group in **2a**), 55.9 (CH of the ring in **2a**), and 55.4 ppm (CH of the alkyl chain). Figure S1 shows that the signal at 4.19 ppm (-CH-S-SO<sub>2</sub> in **2a**) integrates for 0.64, while the signal at 3.49-3.42 (-CHH-SO<sub>2</sub>-S in **2a**, and -CH-SO<sub>2</sub>-S in **2b**) integrates for 1.10; this means that 0.64 corresponds to -CHH-SO<sub>2</sub>-S in **2a** and (1.10-0.64=) 0.46 to -CH-SO<sub>2</sub>-S in **2b**. Thus, the **2a/2b** ratio is ca. 60/40. Comparison of the integrals corresponding to the NH groups (located in the 6.50-6.75 ppm region) also leads to the same ratio.

**Functionalized MoS<sub>2</sub>-based material 3.** Exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (20 mg) and PDI derivative **2** (5 mg) in DMF (5 mL) were stirred at 70 °C for 3 days in dark, after adequate bath sonication. The reaction mixture was then filtered through a PTFE membrane (0.2 µm pore size) and the solid residue was successively collected, bath sonicated and extensively washed with methanol, DMF and dichloromethane, dried in vacuum and collected as a dark grey solid.

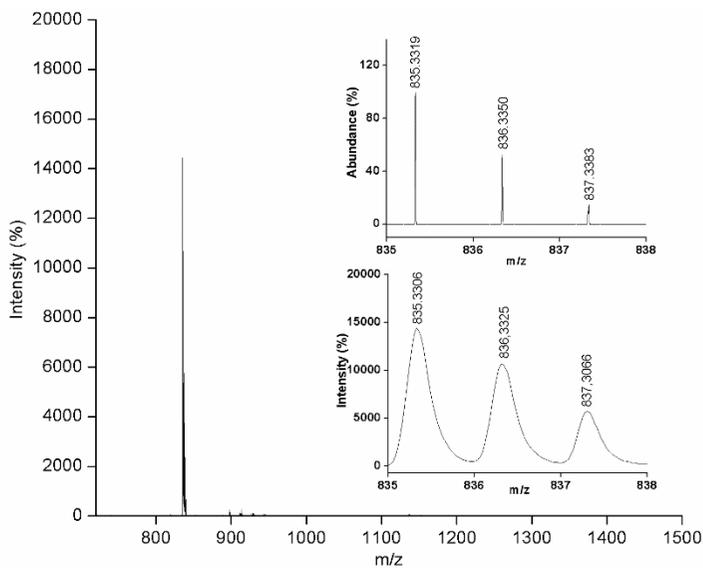




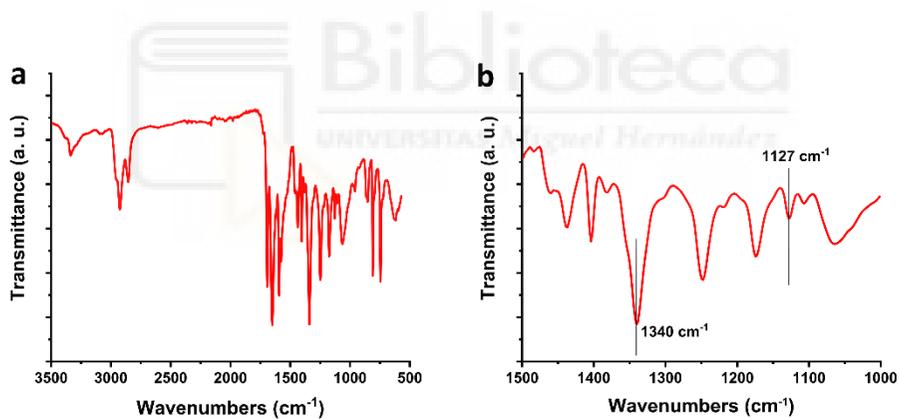
**Figure S3.** DEPT 135 spectrum of PDI derivative **2**



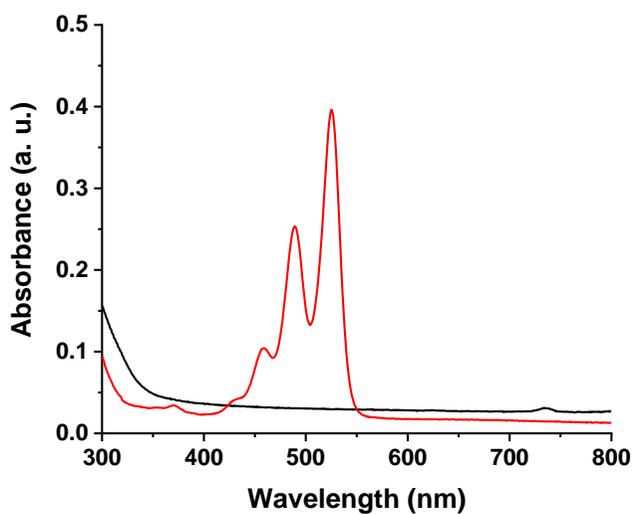
**Figure S4.** Part of heteronuclear HSQC spectrum of PDI derivative **2**.



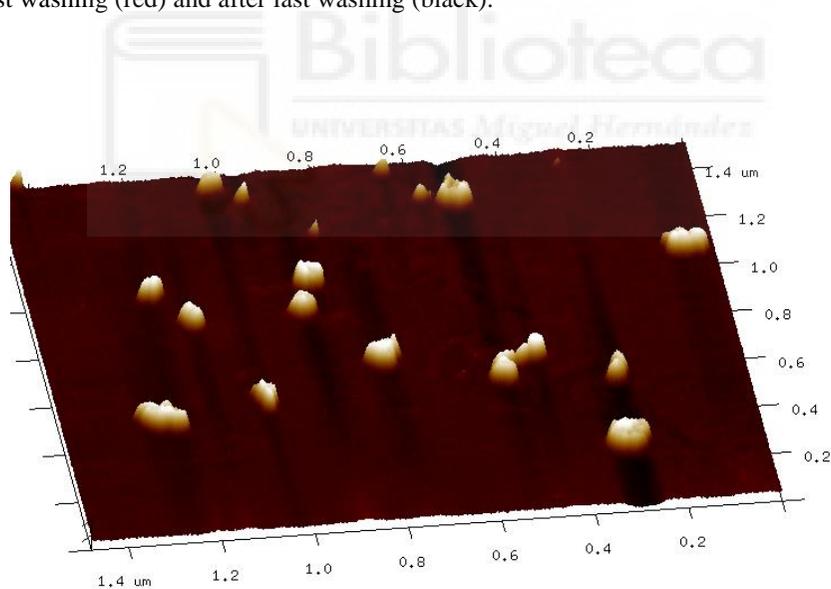
**Figure S5.** MALDI-TOF spectrum of PDI derivative 2.



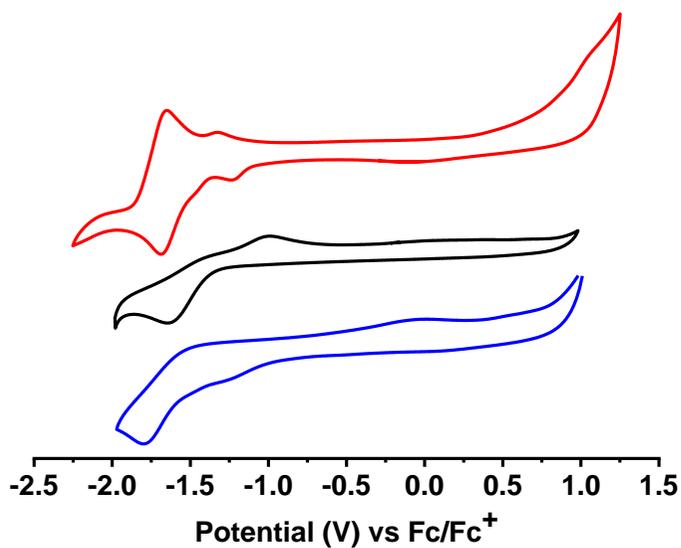
**Figure S6.** a) ATR-IR spectrum of PDI derivative 2, and b) magnified view of 1500-1000 cm<sup>-1</sup> region.



**Figure S7.** UV-Vis spectra of functionalization reaction filtrate in DMF obtained after first washing (red) and after last washing (black).

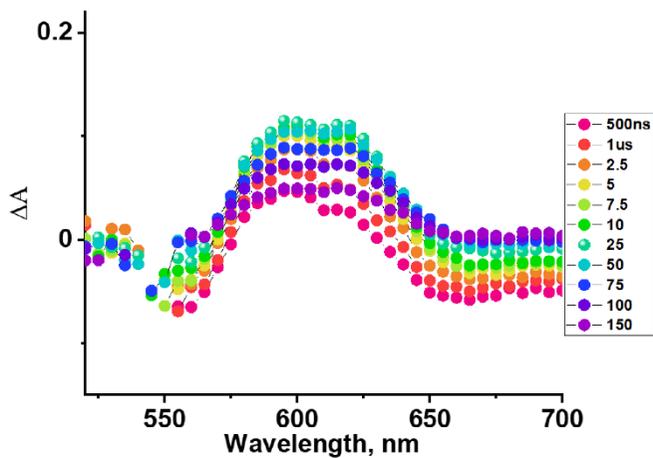


**Figure S8.** 3D-AFM image of MoS<sub>2</sub>-PDI hybrid material 3.

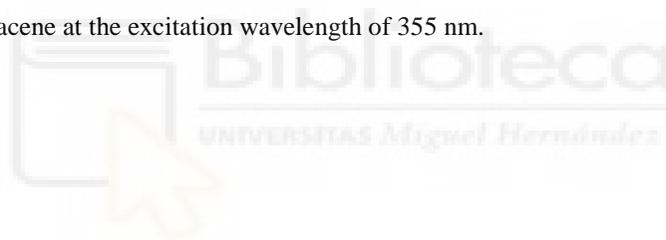


**Figure S9.** Cyclic voltammograms of PDI derivative **2** (red), exfoliated MoS<sub>2</sub> **1** (black) and functionalized MoS<sub>2</sub> material **3** (blue) in benzonitrile with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> as electrolyte. Scan rate 100 mV/s.





**Figure S10.** Nanosecond transient absorption spectra at the indicated delay times of PDI control compound in benzonitrile. The  $^3\text{PDI}^*$  was populated via energy transfer using anthracene at the excitation wavelength of 355 nm.



#### 4.5 Resumen

Debido a que la PDI objetivo es una PDI asimétrica, se siguió una ruta de síntesis que implicaba la formación del perileno tetraéster (**PTE**), ya que mediante este intermedio se puede funcionalizar con dos aminas diferentes el anillo de perileno sin tener que recurrir a condensaciones estadísticas. La formación de los grupos éster también aportará solubilidad, lo que es beneficioso a la hora de llevar a cabo las reacciones. La ruta sintética se detalla en el **Esquema 4.1**. En primer lugar, se sintetizó el perileno tetraéster (**PTE**)<sup>264</sup> mediante una reacción de hidrólisis del **PDA**, seguida de reacción con hexanol y bromuro de hexilo, obteniendo de esta forma el **PTE** con un 87% de rendimiento sin necesidad de etapa de purificación. A continuación, se realizó la hidrólisis de dos de los cuatro grupos éster en medio ácido, usando *p*-TsOH, ya que en este medio, los ésteres sufren un proceso de hidrólisis dando lugar al derivado de ácido correspondiente; debido a la cercanía de los dos grupos ácidos en las posiciones peri del anillo de perileno, estos grupos ciclan espontáneamente formando el grupo anhídrido. Tras la purificación en columna cromatográfica, se obtuvo el **PMADÉ**<sup>264</sup> con un 53% de rendimiento. La siguiente reacción que se llevó a cabo fue la imidación del **PMADÉ** con la hexilheptilamina.<sup>265</sup> Este tipo de aminas con cadenas ramificadas y con más de seis átomos de carbono, proporcionan mucha solubilidad en disolventes orgánicos, y debido a que la PDI objetivo no está funcionalizada en bahía se necesitará una amina que aporte gran solubilidad. Las condiciones para la aminación del **PMADÉ** fueron las estándar, utilizando imidazol fundido como disolvente y DMAP como catalizador; finalmente, tras la purificación en columna cromatográfica, se obtuvo el **PMIDE**<sup>266</sup> con un 90% de rendimiento. Una vez funcionalizada una de las posiciones imida, el siguiente paso consistió en la ciclación de los dos grupos éster restantes, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente para llevar a cabo esta reacción. En este caso no fue necesaria etapa de purificación, y se obtuvo el **PMAMI**<sup>267</sup> con un 90% de rendimiento. La posición imida restante se funcionalizó con la *N*-terc-butoxicarbonileto-1,2-diamina,<sup>268</sup> utilizando imidazol fundido como disolvente y DMAP como catalizador; sin embargo, en esta ocasión la temperatura de reacción fue menor que en los demás casos de reacciones de condensación, ya que el grupo Boc sufre una descarboxilación a altas temperaturas, dejando el grupo amino libre. Este grupo es propenso a reaccionar con los carbonilos del grupo anhídrido, formando como producto mayoritario de reacción una perilenoimidazoloimida,<sup>269</sup> de tal forma que se decidió disminuir la temperatura de 150 a 90 °C, obteniendo tras la purificación mediante columna cromatográfica la **PDI-NHBoc**<sup>270</sup> con un 85% de rendimiento. Para la desprotección del grupo Boc se usó ácido trifluoroacético (TFA), obteniéndose la **PDI-1**<sup>270</sup> con 92% de rendimiento tras purificarla.

<sup>264</sup> Xiangfei, K.; Zhouyang, Z.; Hongkang, G.; Hao, C.; Guixia, W. *Synthesis method of triphenylene benzoyloxy alkynyl biphenyl alkynyl benzene bridged perylene monoimide dihexyl ester*. CN107417618A. 22 de abril, 2017.

<sup>265</sup> Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.

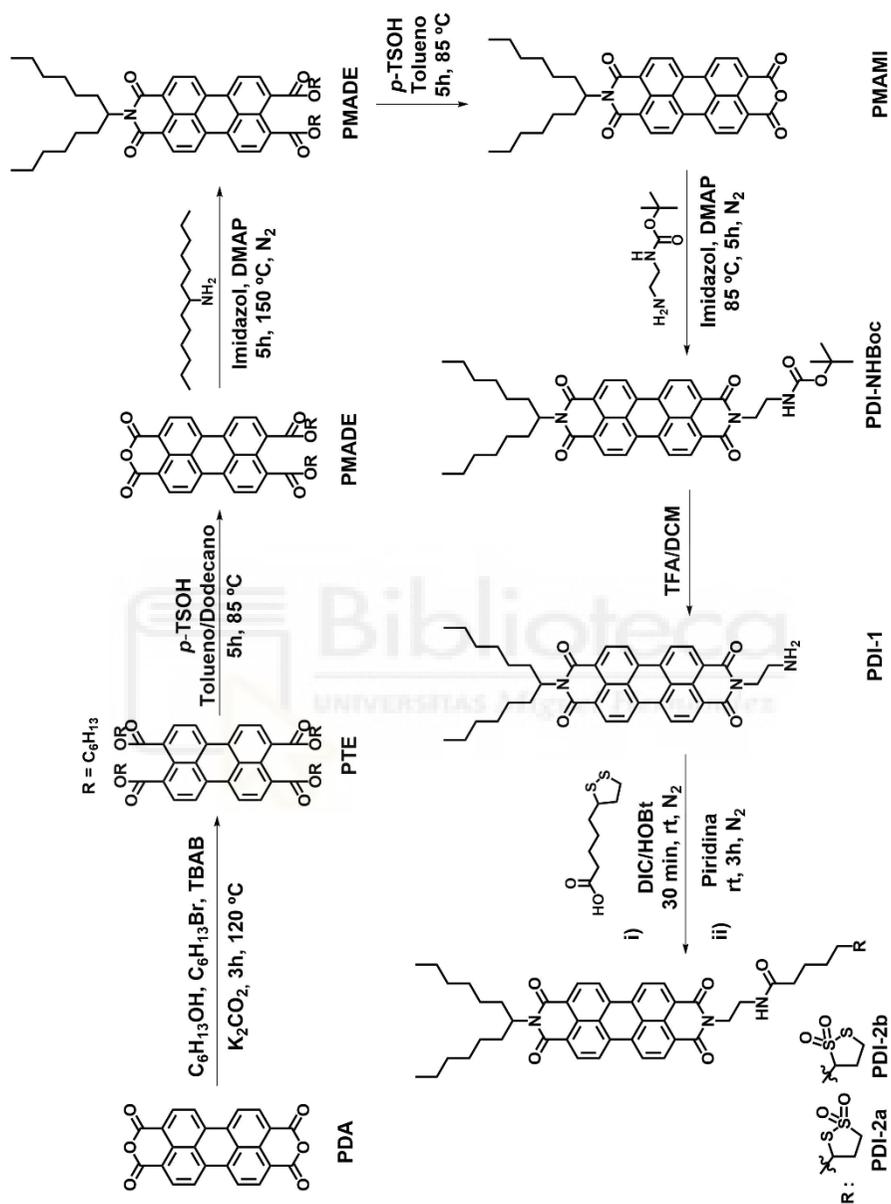
<sup>266</sup> Schulze, M.; Philipp, M.; Waigel, W.; Schmidt, D.; Würthner, F. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8394-8504.

<sup>267</sup> Holman, M. W.; Liu, R.; Adams, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12649-12654.

<sup>268</sup> Muller, D. M.; Zeltser, I.; Bitan, G.; Gilon, C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 411-416.

<sup>269</sup> Langhals, H.; Jaschke, H.; Ring, U.; von Unold, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 201-203.

<sup>270</sup> Zorn, M.; Weber, S. A. L.; Tahir, M. N.; Tremel, W.; Butt, H. J.; Berger, R.; Zentel, R. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2812-2816.

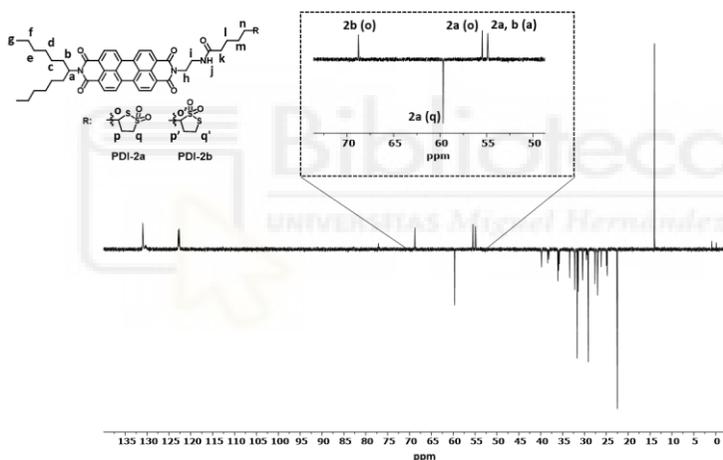


Esquema 4.1: Ruta sintética para la obtención de la **PDI-2a** y **PDI-2b**.

Para la síntesis de la **PDI-2**, se empleó una reacción de amidación con las condiciones estándar.<sup>271</sup> Se usó como agente activante diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) junto con piridina. Tras la purificación mediante columna cromatográfica se obtuvo la **PDI-2** con un 25% de rendimiento.

Tal como se indica en el artículo, la **PDI-2** se obtuvo como mezcla isomérica de dos tiosulfonatos, debido a la oxidación de los átomos de azufre del anillo de ácido lipoico durante la reacción. La presencia del grupo tiosulfonato se determinó en primer lugar mediante espectroscopía de infrarrojo (ver Figura S4 Supporting Information), ya que el espectro mostraba dos bandas vibracionales a 1340 y 1127  $\text{cm}^{-1}$ , características de este grupo funcional.

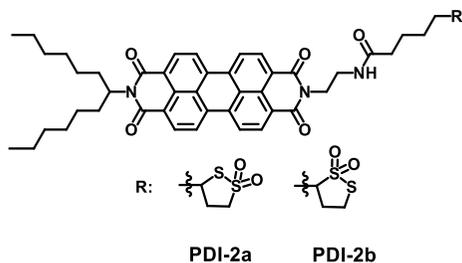
Para corroborar la estructura propuesta para la **PDI-2** y realizar una asignación correcta, se llevaron a cabo experimentos de DEPT-135 y HSQC. En el espectro de DEPT-135 de la **PDI-2** aparecen tres señales de grupos CH a 69,3, 55,9 y 55,4 ppm, respectivamente, en lugar de las dos esperadas, una perteneciente al carbono terciario de la posición imida,  $\text{C}_a$ , más la señal correspondiente al carbono terciario del anillo que contiene al grupo sulfóxido,  $\text{C}_o$  (**Figura 4.11**)



**Figura 4.11:** Espectro de DEPT-135 para la **PDI-2a** y la **PDI-2b**.

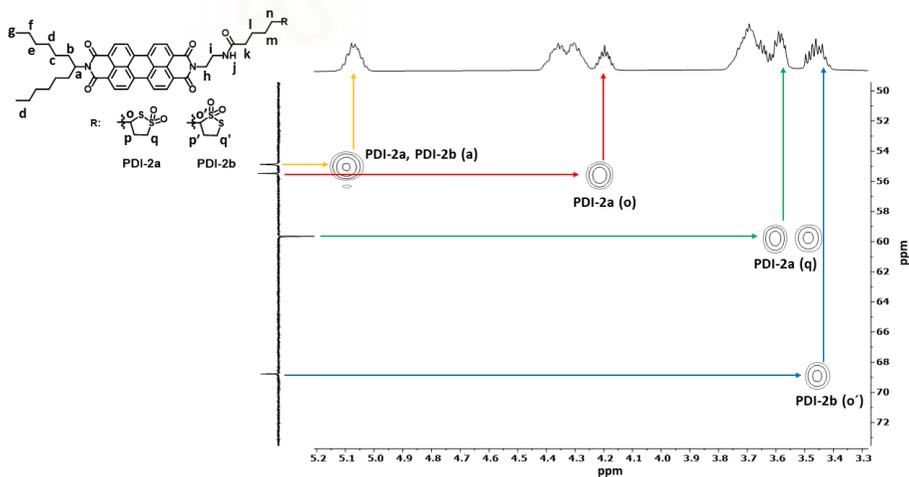
Estas señales nos indican que existen una mezcla de dos especies, siendo éstas las correspondientes a la oxidación de de cada uno de los átomos de azufre del anillo de ácido lipoico, **PDI-2a** y **PDI-2b** (**Figura 4.12**).

<sup>271</sup> El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.



**Figura 4.12:** Estructura de la **PDI-2a** y de la **PDI-2b**.

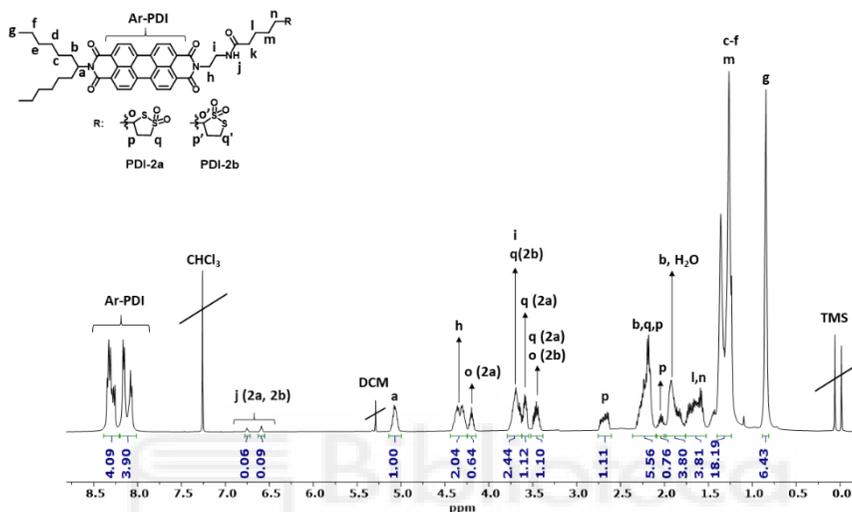
En el espectro de HSQC de la PDI-ác. lipoico se puede ver a un desplazamiento de 69,3 ppm una señal en carbono que da un solo punto de cruce con una señal en protón que aparece como multiplete ente 3,51 y 3,41 ppm, perteneciente al protón  $H_o$  de la **PDI-2b**. Por otro lado, a 55,9 ppm se encuentra otra señal de carbono que también da un solo punto de cruce con un septuplete a 4,20 ppm, perteneciente al protón  $H_o'$  de la **PDI-2a**; sin embargo, la señal de carbono a un desplazamiento de 60,1 ppm, da dos puntos de cruce con la señal de protón que aparece como multiplete a 4,41-4,26 ppm, lo que significa que ese carbono se está acoplando con dos protones, los que corresponden a  $H_q$  de la **PDI-2a**. La señal de carbono que aparece a 55,4 ppm da solo un punto de cruce con una señal de protón multiplete que aparece entre 5,11 y 5,03 ppm, que corresponde con el protón de la posición imida  $H_a$  de las **PDI-2a** y **PDI-2b**; dado que son dos PDI distintas, cabría esperar de este protón que diese dos puntos de cruce, sin embargo, debido a que la posición imida está lejos del anillo del ácido lipoico, no afecta a su entorno químico y aparece como un único punto de cruce en el espectro de HSQC (**Figura 4.13**).



**Figura 4.13:** Sección del espectro HSQC de las **PDI-2a** y **PDI-2b**.

Los desplazamientos químicos en carbono son los esperables teóricamente, es decir, el carbono adyacente al azufre oxidado,  $C_{o'}$ , de la **PDI-2b** aparece a

desplazamientos químicos más altos que el carbono adyacente al azufre sin oxidar, C<sub>o</sub>, de la **PDI-2a**; sin embargo, con sus correspondientes señales en protón (**Figura 4.14**), H<sub>o</sub> y H<sub>o'</sub> de las **PDI-2a** y **PDI-2b**, ocurre lo contrario, el protón adyacente al azufre oxidado aparece a desplazamientos químicos más bajos, multiplete ente 3,50 y 3,41 ppm de la **PDI-2b**, que el protón adyacente al azufre sin oxidar, septuplete a 4,19 ppm de la **PDI-2a**. Este fenómeno lo estudiaron Müller *et al*, que realizaron estudios de RMN para la caracterización de derivados tiosulfonados del ácido lipóico.<sup>272</sup>



**Figura 4.14:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN para las **PDI-2a** y **-2b** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C).

La determinación de la proporción de cada isómero se realizó comparando las señales de <sup>1</sup>H-RMN correspondientes los protones H<sub>o</sub> y H<sub>q</sub>. A 4,19 ppm aparece la señal correspondiente a H<sub>o</sub> (-CH-S-SO<sub>2</sub>) de la **PDI-2a**, que integra para 0,64 protones, mientras que la señal que aparece a 3,50-3,41 ppm, pertenecientes a H<sub>q</sub> (-CHH-SO<sub>2</sub>-S) de la **PDI-2a** y H<sub>o</sub> (-CH-SO<sub>2</sub>-S) de la **PDI-2b** integra para 1,10 protones. Por lo tanto, 0,64 corresponde a un protón de la **PDI-2a** (-CH-S-SO<sub>2</sub>), y (1,10-0,64=) 0,46 corresponde a un protón de la **PDI-2b** (-CH-SO<sub>2</sub>-S). Calculando la relación **PDI-2a/PDI-2b** se obtiene una ratio 60/40; comparando estas integrales con las integrales de los grupos NH de las **PDI-2a** y **PDI-2b** que aparecen a 6,50-6,75 ppm, H<sub>j</sub>, se observa la misma ratio.

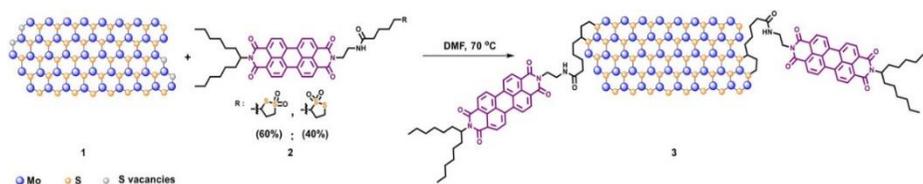
La caracterización de las **PDI-2a** y **PDI-2b** se completó con espectrometría de masas de alta resolución (HR-MALDI-TOF), donde se encontró una señal de m/z 835,330 correspondiente al ion [M-H]<sup>-</sup>, coherente con la estructura propuesta para estas PDI (ver Figura S5 Supporting Information).

La funcionalización de las láminas de MoS<sub>2</sub> con la PDI-ác. lipóico y la caracterización del material híbrido 2D, **PDI-MoS<sub>2</sub>**, se llevó a cabo en el grupo de

<sup>272</sup> Müller, A.; Knaack, M.; Olbrich, A. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35,111-114.

investigación del profesor Nikos Tagmatarchis en el *Theoretical and Physical Chemistry Institute* de la *National Hellenic Research Foundation*, en Atenas.

El MoS<sub>2</sub> utilizado para la unión covalentemente a la **PDI-2** fue preparado mediante exfoliación líquida química, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía<sup>273</sup> (**Figura 4.15**). Una vez obtenido el MoS<sub>2</sub> exfoliado, se puso a reaccionar con la PDI-ác. lipoico durante tres días a 70 °C en oscuridad, usando DMF como disolvente. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se filtró a través de una membrana de PTFE con un tamaño de poro de 0,2 μm. Finalmente, el sólido obtenido se sonicó y se lavó sucesivas veces con DMF y diclorometano, para obtener el material híbrido 2D **PDI-MoS<sub>2</sub>**. La unión entre el MoS<sub>2</sub> y la PDI se produce al ocupar los átomos de azufre de la PDI las vacantes de azufre en la zona periférica de las láminas de MoS<sub>2</sub>.



**Figura 4.15:** Reacción de obtención del material híbrido PDI-MoS<sub>2</sub>.

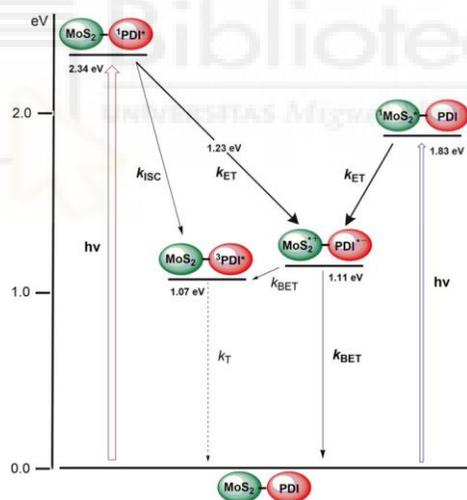
Para la caracterización del material híbrido 2D **PDI-MoS<sub>2</sub>** se usaron diferentes técnicas de análisis estructural: termogravimetría (TGA), espectroscopía de IR y Raman, microscopías de fuerza atómica (AFM) y electrónica de transmisión (TEM), fluorescencia de rayos X (ADX), espectroscopía de UV-Vis y fluorescencia. Todas estas técnicas pusieron de manifiesto la correcta funcionalización del MoS<sub>2</sub> con las **PDI-2a** y **PDI-2b** (Ver Figuras 1-3 del artículo y Figura S7 Supporting Information).

Para poder estudiar los posibles procesos fotofísicos del material híbrido **PDI-MoS<sub>2</sub>**, se midieron las propiedades redox, tanto del propio material híbrido como de sus precursores. Para ello se usó voltametría cíclica, realizando las medidas en benzonitrilo frente al par iónico ferroceno/ferrocinio (Fc/Fc<sup>+</sup>). De esta forma se obtiene que la PDI-ác. lipoico tiene dos potenciales de reducción irreversibles a -1,28 y -1,67 V, que indican el marcado carácter aceptor que tienen las PDI sin sustituir en bahía. Para el MoS<sub>2</sub> se obtienen dos reducciones irreversibles a -1,25 y -1,60 V, y una oxidación irreversible a -0,18 V. En el material híbrido se observan dos reducciones irreversibles a -1,29 y -1,52 V (Ver Figura S9 Supporting Information). Con estos datos es posible calcular el *band gap* electroquímico del híbrido **PDI-MoS<sub>2</sub>**, obteniendo un valor de 1,11 eV, con el que es posible formar la especie anion/catión radical MoS<sup>•+</sup>-PDI<sup>•-</sup>. Por otro lado, para poder alcanzar el estado excitado singlete <sup>1</sup>PDI\*, se necesita una energía de 2,34 eV, calculada ésta a partir del punto de intersección entre la banda de fluorescencia y absorbancia de la **PDI-2**.

<sup>273</sup>Pagona, G.; Bittencourt, C.; Arenal, R.; Tagmatarchis, N. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 12950-12953.

Con estos datos, se evaluó la posibilidad de observar una transferencia de carga desde el  $\text{MoS}_2$  hacia el estado  $^1\text{PDI}^*$ . Excitando a la longitud de onda del máximo de absorción de la PDI-ác. lipoico, se necesita una energía de 2,34 eV para conseguir llegar a su estado excitado singlete  $\text{MoS}_2\text{-}^1\text{PDI}^*$ , el cual puede evolucionar de dos formas distintas. Dado que el *band gap* electroquímico del híbrido **PDI-MoS<sub>2</sub>** es de 1,11 eV, termodinámicamente es posible que se produzca la transferencia electrónica desde el estado  $\text{MoS}_2\text{-}^1\text{PDI}^*$  para producir la reducción de la PDI y la oxidación del  $\text{MoS}_2$  y formar el estado de separación de cargas  $\text{MoS}^{'+}\text{-PDI}^{-}$ , para luego volver al estado basal. Otra posible opción consiste en poblar el estado triplete  $\text{MoS}_2\text{-}^3\text{PDI}^*$ , a través de un cruce intersistémico, y regresar al estado basal en forma de emisión triplete. Dado que el nivel de energía del estado  $^3\text{PDI}^*$  es de 1,07 eV,<sup>274</sup> menor que el estado  $\text{MoS}^{'+}\text{-PDI}^{-}$  (1.11 eV), también cabe la posibilidad de que se produzca una transferencia electrónica de vuelta desde el estado  $\text{MoS}^{'+}\text{-PDI}^{-}$  hacia  $\text{MoS}_2\text{-}^3\text{PDI}^*$ .

También sería posible excitar al material híbrido a la longitud de onda de mayor absorción del  $\text{MoS}_2$ , de tal forma que se llegue al estado singlete  $^1\text{MoS}_2^*\text{-PDI}$ , necesitando en este caso una energía de 1,83 eV. Como esta energía es mayor que la del estado  $\text{MoS}^{'+}\text{-PDI}^{-}$ , en este caso también es factible la transferencia electrónica para evolucionar hacia el estado de separación de cargas  $\text{MoS}^{'+}\text{-PDI}^{-}$ , que puede regresar directamente al estado basal o producir el cruce intersistémico. De esta forma se estableció el diagrama de energía representado en la **Figura 4.16** (Figura 4 del artículo).



**Figura 4.16:** Diagrama de energía para el material híbrido PDI-MoS<sub>2</sub>. Las líneas continuas muestran los procesos más propensos a producirse, las líneas discontinuas muestran los procesos menos probables. ET = transferencia electrónica, BET = transferencia electrónica de vuelta, T = emisión triplete, ISC = cruce intersistémico.

Por último, para poder caracterizar estos estados de separación de cargas, se llevó a cabo estudios de espectroelectroquímica y fotólisis por destello láser de

<sup>274</sup> Martín-Gomis, L.; Peralta-Ruiz, F.; Thomas, M. B.; Fernández-Lázaro, F.; D'Souza, F.; Sastre-Santos, Á. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3863-3874.

femtosegundos y nanosegundos donde se demostró la existencia de todas estas especies (Ver Figura 5 del artículo).

#### 4.6 Conclusiones

En este capítulo se ha sintetizado una nueva PDI (mezcla de isómeros) conjugada con ácido lipoico: **PDI-2a** y **PDI-2b**. Se ha realizado su caracterización estructural inequívocamente mediante RMN, IR y EM, también se han medido sus propiedades ópticas mediante espectroscopía de UV-Vis y fluorescencia.

Posteriormente, se ha funcionalizado láminas de 2H-MoS<sub>2</sub> con las **PDI-2a** y **PDI-2b** con lo que se ha sintetizado un nuevo material híbrido 2D **PDI-MoS<sub>2</sub>**. Este material novedoso, se ha caracterizado mediante espectroscopía de Raman, AFM, TEM, TGA y EDX.

Mediante estudios fotofísicos, empleando técnicas espectroelectroquímicas y de fotólisis por destello laser de femtosegundos y de nanosegundos, se ha demostrado que el material híbrido 2D **PDI-MoS<sub>2</sub>** es capaz de generar un estado de separación de cargas, pudiendo por tanto ser empleado en dispositivos optoelectrónicos para la generación o almacenamiento de energía.



**Listado de abreviaturas y acrónimos**

$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
$^{31}\text{P}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de fósforo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido dexoarribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica (del inglés, <i>atomic force microscopy</i> )
Ar	Aromático
ATR	Reflectancia total atenuada (del inglés, <i>attenuated total reflection</i> )
BET	Transferencia electrónica de vuelta (del inglés, <i>back electron transfer</i> )
BHJ	Heterounión masiva (del inglés, <i>bulk heterojunction</i> )
BODIPY	Borodipirrometano (del inglés, <i>borondipyrrromethane</i> )
BPin	Pinacolato de boro
br	Ancho (del inglés, <i>broad</i> )
c	Cuadruplete
CDI	Coronenodiimida
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (del inglés <i>homonuclear correlation spectroscopy</i> )
CV	Voltametría cíclica (del inglés, <i>cyclic voltammetry</i> )
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doble doblete de dobletes
dt	Doble triplete
DBCDI	Dibenzocoronenodiimida

---

DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSSC	Célula solar sensibilizada por colorante (del inglés, <i>dye-sensitized solar cell</i> )
EDX	Espectroscopía de rayos X (del inglés, <i>energy dispersive X-ray</i> )
Eox	Potencial de oxidación
eq	Equivalenetas
Ered	Potencial de reducción
ET	Transferencia electrónica (del inglés, <i>electron transfer</i> )
eV	Electrónvoltio
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía (del inglés <i>Highest occupied molecular orbital</i> )
HSQC	Coherencia cuántica simple heteronuclear (del inglés, <i>heteronuclear single quantum coherence</i> )
H <sub>2</sub> P	Porfirina de base libre
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés, <i>high resolution mass spectrometry</i> )
IC <sub>50</sub>	Mitad de la concentración inhibitoria máxima
IR	Espectroscopía infrarroja
ISC	Cruce intersistémico (del inglés, <i>intersystem crossing</i> )
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LED	Diodo emisor de luz (del inglés, <i>light emitting diode</i> )
LUMO	Orbital desocupado de menor energía (del inglés, <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> )
m	Multiplete

---

mL	Mililitros
mmol	Milimol
μM	Micromolar
MALDI-TOF	MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ); TOF: detector de tiempo de vuelo (del inglés, <i>time-of-flight</i> )
MeI	Yoduro de metilo
MTT	Ensayo de viabilidad celular
NDI	Naftalenodiimida
NHC	Carbeno- <i>N</i> -heterocíclico
OTf	Triflato
Pc	Ftalocianina
PDT	Terapia fotodinámica
PS	Fotosensibilizador
NPDI	Naftoperilenodiimida
NPs	Nanopartícula
PDA	Perilenodianhídrido
PDI	Perilenodiimida
PMADe	Perilenomonoanhidridodiéster
PMAMI	Perilenomonoahidridomonoimida
PMIDE	Perilenomonoimidadiéster
ppm	Partes por millón
PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
PTE	Perilenotetraéster
PTT	Terapia fototerámica (del inglés, <i>photothermal therapy</i> )
Rf	Factor de retención (del inglés, <i>retention factor</i> )
RMN	Resonancia magnética nuclear

---

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RV	Relajación vibracional
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
s	Singlete
S <sub>N</sub> Ar	Sustitución nucleófila aromática
T	Estado triplete
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio (del inglés, <i>tetrabutylammonium fluoride</i> )
TDM	Dicalcogenuros de metales de transición (del inglés, <i>transition metal dichalcogenides</i> )
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés, <i>transmission electron microscopy</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético (del inglés, <i>trifluoro acetic acid</i> )
TGA	Análisis termogravimétrico (del inglés, <i>thermogravimetric analysis</i> )
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés, <i>thin layer chromatography</i> )
u.a.	Unidades arbitrarias
UV-vis	Ultravioleta visible
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{\text{abs máx}}$	Longitud de onda del máximo de absorción
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar (cm <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )
$\theta$	Ángulo de torsión (°)
$\Phi_f$	Rendimiento cuántico de fluorescencia