



# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

**“Síntesis, caracterización y evaluación de la potencial actividad antiproliferativa de nuevos complejos de Pd (II) y Pt(II) derivados del ligante AcNac<sup>Fluores</sup>”**

**Tesis**

Que para obtener el título de:  
**Maestra en Ciencias Químicas**

**Presenta:**

Q. Varela Espinoza Esperanza Yazmin

**Dirección y asesoría:**

**Dra. Rocío Angeles García Becerra**

**Dra. María del Rosario Galindo  
González**

**Dr. José de Jesús Cázares Marinero**

**Dr. Oracio Serrano Torres**

**Guanajuato, Gto., Diciembre del 2016**

Por medio de la presente, manifiesto que el presente trabajo de investigación es original, titulado "Síntesis, caracterización y evaluación de la potencial actividad antiproliferativa de nuevos complejos de Pd (II) y Pt(II) derivados del ligante AcNac<sup>Fluores</sup>" fue desarrollado para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas en la Universidad de Guanajuato y no ha sido presentado en ningún otro lugar.

---

Fdo. Q. Varela Espinoza Esperanza Yazmin

Directores:

---

Dra. Rocío Angeles García Becerra

---

Dra. María del Rosario Galindo González

---

Dr. José de Jesús Cázares Marinero

---

Dr. Oracio Serrano Torres

**Comité Evaluador**

**Dr. Jorge Albino López Jiménez**

\_\_\_\_\_

**Dr. Euclides Avila Chávez**

\_\_\_\_\_

**Dr. Luis Antonio Ortiz Frade**

\_\_\_\_\_

**Dr. David Cruz Cruz**

\_\_\_\_\_

**Dirección y Asesoría**

\_\_\_\_\_  
**Dra. Rocío Angeles García Becerra**

\_\_\_\_\_  
**Dra. María del Rosario Galindo González**

\_\_\_\_\_  
**Dr. José de Jesús Cázares Marinero**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Oracio Serrano Torres**

**Sustentante:**

\_\_\_\_\_  
**Q. Varela Espinoza Esperanza Yazmin**

**Guanajuato, Gto., Diciembre 2016**



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**



Este trabajo fue realizado en diversas etapas, en las siguientes instituciones: Universidad de Guanajuato, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la dirección de los doctores: María del Rosario Galindo González, José de Jesús Cázares Marinero, Oracio Serrano Torres y Rocío Angeles García Becerra.

Se agradece a la Universidad de Guanajuato (DAIP-UG-090-2013), la SEP-UGTO (NPTC-270) y Excelencia Académica 2015, al Laboratorio Nacional UG-CONACYT.

Al instituto Científico Pfizer, número INCMN/110/08/PI/86/15.

Y a CONACYT, por la beca de maestría recibida para la elaboración de este trabajo, No. CVU:631103, convocatoria:290840, que, sin su apoyo, este y otros trabajos no se realizarían.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y hermanas por el apoyo incondicional y la confianza brindada para poder realizar y culminar mis estudios.

Al Dr. Oracio Serrano Torres, asesor de tesis, por sus conocimientos impartidos, por la confianza, paciencia y supervisión durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. María del Rosario Galindo González, por la asesoría y supervisión de tesis, apoyo, confianza y sobre todo por la amistad que me ha brindado incondicionalmente.

A la Dra. Rocío García Becerra, por darme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo y brindarme las facilidades para realizar este trabajo en su laboratorio, por la asesoría y supervisión de tesis, apoyo y confianza.

Al Dr. José de Jesús Cázares Marinero por la asesoría brindada para realizar este trabajo.

Al Dr. Heriberto Prado García, por permitirme realizar parte de mi trabajo en su laboratorio y por la asesoría brindada.

A David Ordaz, por su asesoría, paciencia y todos los conocimientos impartidos durante la elaboración de este trabajo, y por la amistad brindada.

A Mariana Segovia por lo conocimientos impartidos, paciencia, amistad y por su tiempo brindado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Martín, Toño, Charis.

A mis amigos Karito, Anita, Aly, Susi, Rey, David, Ana Cris, Flor, Kristal, Israel, Dany-boy, los cuales han estado conmigo durante este camino, y he compartido muchos momentos, por todo su apoyo, muchas gracias.

A Lorenita, Isa y Cris por las aventuras vividas.

A mis amigos y compañeros de la CDMX, Mariana, Adriana, David, Nancy, Sr. Luis, Sofí, Isela, Mitzi, que estuvieron conmigo durante mi estancia en INCMNSZ, gracias por su apoyo, por los momentos vividos, muchas gracias.

A mis maestros, por todos los conocimientos impartidos.

A mis sinodales, por las recomendaciones para finalizar este trabajo.

Al maestro Fernando de Jesús Amezcuita por el apoyo brindado para ocupar el equipo de IR.

A la Dra. Leticia López por el apoyo brindado para ocupar el equipo de UV-vis.

A la Universidad de Guanajuato (DAIP-UG-090-2013), la SEP-UGTO (NPTC-270) y Excelencia Académica, así como al Laboratorio Nacional UG-CONACYT.

A CONACYT, que, sin su apoyo, este y otros trabajos no se realizarían.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1.1. <i>Naturaleza química de los ligantes tipo <math>\beta</math>-acetilacetato .</i>	10
1.2. <i>Modos de coordinación de los ligantes tipo Acac.</i>	11
1.3. <i>Complejos soportados por el ligante Acac<sup>BIMs</sup>, estabilización de especies con propiedades inusuales.</i>	12
1.4. <i>El cáncer y su relación con el cisplatino como agente anticancerígeno.</i>	14
1.5. <i>Complejos de coordinación de Pt conteniendo ligantes tipo Acac como potenciales agentes anticancerígenos.</i>	17
1.6. <i>Complejos neutros y zwitteriónicos de Pd como potenciales agentes anticancerígenos.</i>	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>21</b>
4.1. <i>Objetivos específicos.</i>	21
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>22</b>
5.1. <i>Reactivos utilizados.</i>	22
5.2. <i>Síntesis del nuevo ligando AcNac<sup>Fluores</sup> y algunos de sus complejos de Pd(II) y Pt(II).</i>	23
5.2.1. <i>Síntesis del ligando AcNac<sup>Fluores</sup>.</i>	23
5.2.2. <i>Síntesis de los compuestos de Pd(II).</i>	24
5.2.3. <i>Síntesis de los compuestos de Pt(II).</i>	26
5.3. <i>Técnicas de caracterización.</i>	27
5.3.1. <i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.</i>	27
5.3.2. <i>Difracción de rayos X.</i>	27

5.3.3.	<i>Espectroscopía infrarroja.</i>	27
5.3.4.	<i>Espectroscopía UV-Vis.</i>	28
5.3.5.	<i>Voltamperometría cíclica.</i>	28
5.4.	<i>Evaluación biológica.</i>	29
5.4.1.	<i>Microscopía de fluorescencia.</i>	29
5.4.2.	<i>Medición de fluorescencia y proliferación celular.</i>	30
5.4.3.	<i>Análisis estadístico.</i>	30
5.4.4.	<i>Evaluación del ciclo celular.</i>	31
6.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	32
6.1.	<i>Caracterización del ligante AcNac<sup>Fluores</sup> y de algunos de sus compuestos de Pd(II) y Pt(II) mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear.</i>	32
6.2.	<i>Difracción de rayos X del ligando AcNac<sup>Fluores</sup>.</i>	37
6.3.	<i>Caracterización mediante espectroscopía UV-Vis de los compuestos sintetizados.</i>	39
6.4.	<i>Espectroscopía infrarroja.</i>	40
6.5.	<i>Actividad electroquímica de los compuestos AcNac<sup>Fluores</sup>, Pdn, PdZ y Ptn.</i>	42
6.6.	<i>Evaluación biológica de los compuestos AcNac<sup>Fluores</sup>, Pdn, PdZ y Ptn.</i>	46
7.	<b>CONCLUSIONES.</b>	59
8.	<b>REFERENCIAS</b>	61
9.	<b>ANEXOS</b>	66
I.	<i>Espectroscopía de Resonancia Magnética</i>	66
II.	<i>Difracción de Rayos X</i>	75
III.	<i>Espectroscopía UV-Vis</i>	77
IV.	<i>Espectroscopía Infrarroja</i>	79



## Abreviaciones y definiciones:

---

<b>Acac</b>	Ligante acetilacetato
<b>Acac<sup>BIMs</sup></b>	Ligante (Z)-1,3-dimesitil-3-oxoprop-1-en-1-olato
<b>Acac<sup>BIMs</sup>-H</b>	1,3-dimesitilpropano-1,3-diona
<b>COD</b>	1,5-ciclooctadieno
<b>COE-OH</b>	5-hidroxi-ciclooctadieno
<b>Homoléptico</b>	Adjetivo para designar un complejo metálico constituido por ligantes idénticos
<b>L</b>	Ligante
<b>Ligante</b>	Ion o molécula que se une a un átomo metálico para formar complejos
<b>TEA</b>	Trietilamina (Et <sub>3</sub> N)
<b>AcNac</b>	Ligante β-cetoiminato
<b>Cisplatino</b>	Cis-diaminodicloroplatino (II)
<b>Carboplatino</b>	Cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino (II)
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter Etílico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Pdn</b>	Complejo [Pd <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (AcNac <sup>Fluores</sup> ) <sub>2</sub> ]
<b>PdZ</b>	Complejo [Pd <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (AcNac <sup>Fluores</sup> ) <sub>2</sub> ]
<b>Ptn</b>	Complejo [PtCl(DMSO)(AcNac <sup>Fluores</sup> )]

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Naturaleza química de los ligantes tipo $\beta$ -acetilacetato .

La familia de ligandos de tipo  $\beta$ -acetilacetato (**Acac**) y sus compuestos derivados son de las especies más estudiadas en química de coordinación y organometálica.<sup>1</sup> Gracias al gran número de posibilidades estructurales, las cuales derivan de la modificación de los sustituyentes R, R' y R'' en el esqueleto molecular del **Acac**, dichos ligantes generan un gran interés para su aplicación en la síntesis química (Figura 1.1.). Así, los sustituyentes (R) pueden ser, *inter alia*, hidrógeno, alquilo, arilo o sililo, lo que permite modular adecuadamente tanto las propiedades estéricas como las propiedades electrónicas de las moléculas de los ligantes. Aunado a lo anterior, los derivados del **Acac** son especies de naturaleza monoaniónica y de excelentes donadores sigma ( $\sigma$ ).

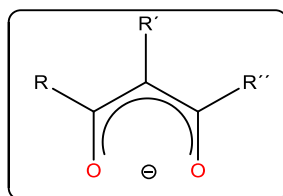
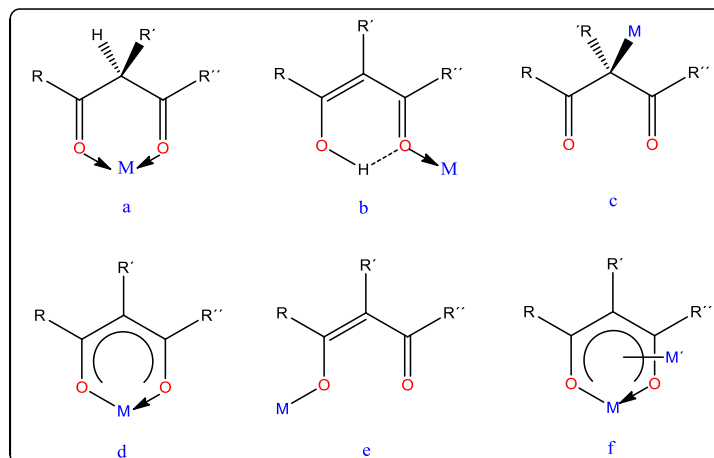


Figura 1.1. Estructura general de los ligantes del tipo  $\beta$ -dicetonato (Acac)

Durante la década de los 60's se llevaron a cabo estudios sobre la química de coordinación de algunos complejos homolépticos de Cobalto (Co), Níquel (Ni) y Cobre (Cu) conteniendo el ligante **Acac** y presentando la fórmula general  $[M (+2) (Acac)_2]$ . Estos estudios han puesto de manifiesto la factibilidad de su síntesis y han enfatizado sus propiedades estructurales, espectrales y magnéticas.<sup>2</sup> Actualmente, la química de los complejos a base de ligantes del tipo **Acac** continúa llamando la atención gracias a la amplia gama de reactividad que confiere este tipo de ligantes. El gran número de investigaciones, sobre estos complejos, realizadas tanto en el laboratorio como a escala industrial justifica lo anterior, además del desarrollo tecnológico concomitante para buscar su aplicación en procesos electroquímicos, de deposición química de vapor y en catálisis, por mencionar algunos ejemplos.<sup>3</sup>

## 1.2. Modos de coordinación de los ligantes tipo *Acac*.

Una de las características más importantes de los ligantes de tipo **Acac** es su versatilidad en los modos de coordinación hacia los centros metálicos, tanto en su forma neutra como en su forma monoaniónica. En la Figura 1.2., se presentan seis modos posibles de coordinación (**a-f**) de un ligante tipo **Acac** con un centro metálico (**M**).



**Figura 1.2.** Modos de coordinación (a-f) que pueden presentar los ligantes *Acac*.

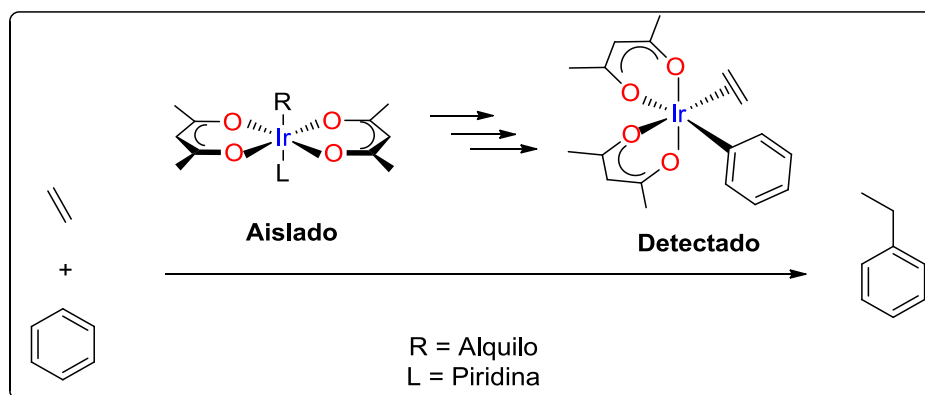
En algunos complejos, el ligante  $\beta$ -dicetona (**H-Acac**) puede actuar de manera bidentada y neutra (**a**), mientras que, en otros, se encuentra coordinando el metal a través de un solo átomo de oxígeno (forma monodentada,  $\kappa^1-O$ ), (**b**). Dentro de las estructuras generadas por la forma aniónica del ligante, podemos encontrar complejos donde el metal se enlaza a través del átomo de carbono (forma monodentada,  $\kappa^1-C$ ), (**c**). Aunque la manera de coordinación más usual es a través de sus dos átomos de oxígeno (**d**). En analogía a la estructura mostrada en (**b**), el ligante aniónico también puede coordinar al metal mediante un solo átomo de oxígeno (forma monodentada,  $\kappa^1-O$ ), (**e**). Finalmente, una de las formas de coordinación menos usuales es aquella donde dos metales pueden estar enlazados al mismo ligante (**f**); el primero, a través de los dos átomos de oxígeno y, el segundo, a través de la densidad electrónica del sistema  $\pi$ .<sup>4</sup>

### 1.3. Complejos soportados por el ligante $\text{Acac}^{\text{BiMs}}$ , estabilización de especies con propiedades inusuales.

En 2008, Wu y colaboradores reportaron la síntesis y la caracterización tanto del ligante 1,3-dimesitilpropano-1,3-diona ( $\text{H-Acac}^{\text{BiMs}}$ ) y su complejo de aluminio (Al) de fórmula  $[\text{Al}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})_3]$ . Los investigadores obtuvieron el complejo en cantidades del orden de diez gramos por medio de la reacción de acilación de Friedel-Crafts del mesitilo ( $\text{C}_9\text{H}_{12}$ ) con el correspondiente cloruro de ácido ( $\text{ClCOCH}_2\text{COCl}$ ).<sup>5</sup> Es importante resaltar que la demanda estérica del ligante  $\text{Acac}^{\text{BiMs}}$  lo convierte en un excelente ligante auxiliar para la síntesis de nuevos complejos organometálicos y de coordinación, así como para su estabilización molecular. Estos productos estarán dotados de propiedades estructurales, fisicoquímicas y reactividades poco convencionales.

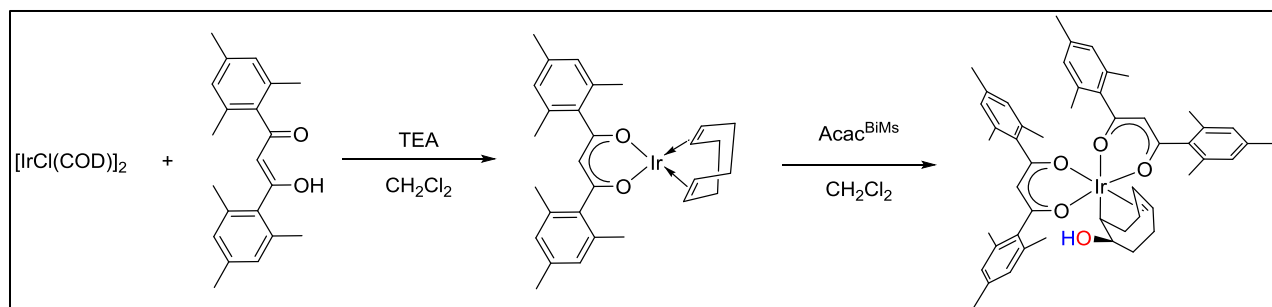
Por su parte, el grupo de Strassner (2014) reportó que el ligante  $\text{H-Acac}^{\text{BiMs}}$  puede ser utilizado como ligante auxiliar igualmente para la síntesis de algunos complejos ciclometalados de platino (Pt). Estas especies presentan excelentes propiedades como diodos fosforescentes en el rango del azul.<sup>6-8</sup>

Por otro lado, dentro de la familia de los complejos de Iridio (Ir) con ligantes  $\text{Acac}$  destaca el sistema descrito por Periana y colaboradores. Las especies de fórmula  $[\text{trans-Ir}(\text{Acac})_2(\text{R})(\text{L})]$ , donde R = alquilo y L = piridina, son capaces de llevar a cabo tanto la activación de enlaces C-H como la formación de enlaces C-C, e.g. la reacción de acoplamiento del etileno con el benceno, (Figura 1.3.).<sup>9-11</sup> Es importante señalar que a través de experimentos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN), a diferentes temperaturas, se observó que el isómero *cis* juega un papel fundamental en el ciclo catalítico. No obstante, dicho intermediario no se ha logrado aislar.



**Figura 1.3.** Formación del etilbenceno mediada por catalizadores conteniendo el fragmento de  $[\text{Ir}(\text{Acac})_2(\text{Ph})(\text{Etileno})]$ .

Una de las líneas de investigación que se lleva a cabo en nuestro grupo de trabajo se dirige a la activación de moléculas pequeñas a partir de complejos de Ir para obtener a especies químicas poco convencionales. Podemos citar, por ejemplo, la formación de carbenos derivados del diclorometano y de la piridina mediante complejos de Ir(III).<sup>12-13</sup> Además, de los estudios sobre la síntesis y caracterización de nuevos complejos organometálicos de fórmula  $[\text{Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})(\text{COD})]$  y  $[\text{Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})(\text{COE-OH})]$ . Estos últimos han sido formados a partir de la reacción del complejo dinuclear de Iridio  $[\text{IrCl}(\text{COD})]_2$  con un equivalente de H- $\text{Acac}^{\text{BiMs}}$  utilizando un exceso de trietilamina (TEA), que permite neutralizar el ácido formado durante el curso de la misma. (Figura 1.4.).



**Figura 1.4.** Formación de los complejos  $[\text{Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})(\text{COD})]$  y  $[\text{Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})(\text{COE-OH})]$  a partir del ligante  $\text{Acac}^{\text{BiMs}}$ .

La reactividad que presenta el complejo de fórmula  $[\text{Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})(\text{COD})]$  frente a la molécula de oxígeno, en presencia de un equivalente del ligante H- $\text{Acac}^{\text{BiMs}}$ , a presión y temperatura atmosférica, conduce a la formación del nuevo complejo de fórmula  $[\text{cis-Ir}(\text{Acac}^{\text{BiMs}})_2(\text{COE-OH})]$  como resultado de la activación selectiva de la molécula de oxígeno.<sup>14</sup>

Los compuestos han sido caracterizados mediante las técnicas espectroscopias convencionales y sus estructuras han sido completamente resueltas gracias a los estudios de difracción de rayos-X de monocristal.

De manera interesante, el ligante H-*Acac*<sup>BIMs</sup> ha demostrado su capacidad de estabilizar algunos complejos organometálicos de Ni(II), Pd(II) y Pt(II). De especial mención son los derivados de Pd, los cuales se sintetizan a partir de la reacción de protonación selectiva del correspondiente dialquil complejo usando fosfinas como coligantes (Figura 1.5.) Además de su efectividad en las reacciones de acoplamiento cruzado, los complejos de Pd han demostrado ser buenos precursores catalíticos en reacciones de ciclotrimerización de alquinos.<sup>15</sup>

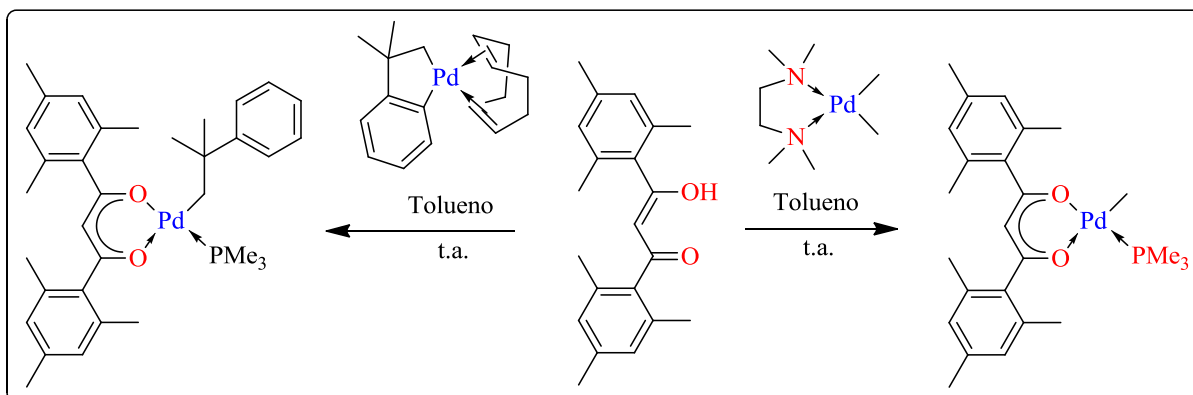


Figura 1.5. Ruta de síntesis de algunos complejos de Pd soportados por el ligando *Acac*<sup>BIMs</sup>.

#### 1.4. El cáncer y su relación con el cisplatino como agente anticancerígeno.

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo, el cual es considerado un problema de salud pública y de vital importancia.

El cáncer (a veces también denominado neoplasia o tumor maligno) provoca cerca de ocho millones de muertes al año, lo que lo convierte en la principal causa de muerte a nivel mundial tomando como referencia las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La misma OMS identifica que, a nivel mundial en 2015, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones,

mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago.<sup>16</sup>

Actualmente, es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Un total de 1 658 370 nuevos casos de cáncer se estimó en el 2015, en este mismo año, en los Estados Unidos ocurrieron 589 430 muertes por dicha afección.<sup>17</sup>

En México en 2013, del total de defunciones de la población de 20 años y más, 13.6% se debieron a algún tumor y de estas, 93.6% a los tumores malignos. Por sexo, del total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2%, en mujeres.

Entre las mujeres, el cáncer de mama aparece como segunda causa de mortalidad con 14 defunciones por cada 100 mil.<sup>16</sup>

El Instituto Nacional de Cáncer define el cáncer como un «término genérico empleado para designar las enfermedades en las cuales existe una división celular incontrolada que puede invadir los tejidos adyacentes». Las células cancerosas pueden llegar a otros órganos por medio de los sistemas sanguíneo y linfático para crear metástasis. El cáncer no debe ser considerado como una sola enfermedad, sino como un conjunto de enfermedades. Actualmente, se conocen alrededor de 100 tipos de cáncer y se clasifican en función al órgano o al tipo de células afectadas.

Así, es posible reagruparlos en cuatro grandes categorías: (a) carcinoma: es un cáncer que empieza en la piel o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos, (b) sarcoma: es un cáncer que empieza en los huesos, el cartílago, la grasa, el músculo, los vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén, (c) leucemia: cáncer que comienza en un tejido donde se forman las células sanguíneas, como la medula ósea, y hace que se produzcan un gran número de células sanguíneas anormales y que estas entren a la sangre, (d) linfoma o mieloma múltiple: son cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario, y (e) cáncer del sistema nervioso central: empieza en los tejidos del cerebro y la medula espinal.<sup>[18]</sup>

Existen diversos fármacos utilizados como agentes anticancerígenos, entre los medicamentos más estudiados se encuentran los derivados del cisplatino, dicho efecto fue descubierto de manera inesperada por Rosenberg en 1978. Además, existen derivados análogos como el carboplatino, y el oxaliplatino.<sup>19</sup> El mecanismo de acción más aceptado para la actividad que presenta el cisplatino, implica la sustitución de uno o ambos cloruros por moléculas de agua. Los aquo-complejos son potentes electrófilos y reaccionan fácilmente con un gran número de ligandos biológicos tales como el glutatión (GSH), metalotioneína, metionina y proteínas. Las bases purinas (adenina y guanina) de los ácidos nucleicos son fuertemente nucleofílicas, en especial sobre la posición N7. Por lo tanto, el cisplatino tiende a unirse fácilmente al ADN formando aductos bifuncionales (Figura 1.6.), principalmente con la pérdida de ambos ligandos *aquo*.<sup>[20]</sup>

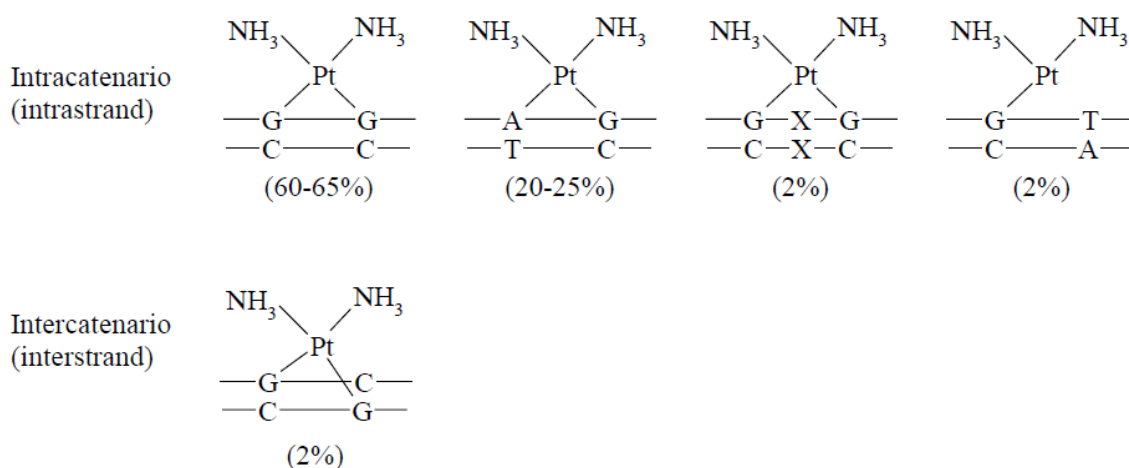


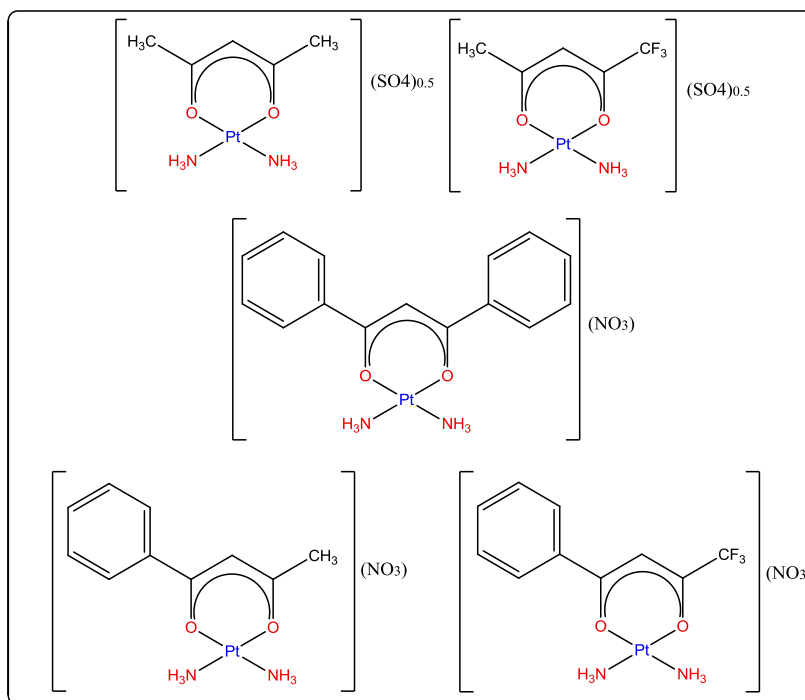
Figura 1.6. Tipos de aductos del cisplatino con el ADN.

Una vez formados los aductos de Pt-ADN, estos se distorsionan y doblan la estructura de ADN, con el concomitante impedimento del proceso de la transcripción. Investigaciones independientes, han demostrado que los complejos de carboplatino y el oxaliplatino operan con mecanismos de acción similares al del cisplatino.<sup>20</sup> Sin embargo, dichos fármacos presentan efectos secundarios por ejemplo la alta nefrotoxicidad y a menudo generan mecanismos de resistencia en las células.<sup>19</sup> Es por ello que en la actualidad se ha seguido investigando y desarrollando nuevos complejos inorgánicos.



### 1.5. Complejos de coordinación de Pt conteniendo ligantes tipo *Acac* como potenciales agentes anticancerígenos.

Recientemente, el grupo de investigación del profesor Lippard reportó la síntesis y la caracterización de una familia de complejos de coordinación de Pt(II) basados en ligantes bidentados de tipo *Acac* (Figura 1.7.). Estos complejos han demostrado tener muy buena actividad anticancerígena *in vitro* en algunas líneas celulares de cáncer (e.g., *HeLa*, *A549*, *U2OS*, *MFC-7*, *inter alia*).<sup>21</sup>

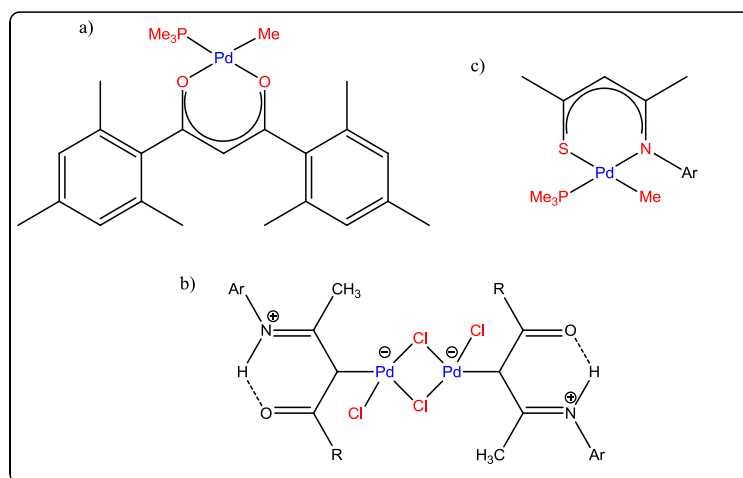


**Figura 1.7.** Estructuras ejemplos de complejos de coordinación de Pt a partir de ligantes *Acac*, con actividad anticancerígena.

### 1.6. Complejos neutros y zwitteriónicos de Pd como potenciales agentes anticancerígenos.

Motivados por los resultados reportados por el grupo del profesor Lippard, aunado al limitado estudio de complejos organometálicos de Pd como posibles agentes anticancerígenos (comparado con Pt), nuestro grupo de investigación decidió realizar un estudio sobre la potencial actividad antiproliferativa en algunas líneas establecidas de cáncer, mediante el empleo de algunos complejos de Pd(II) conteniendo ligantes potencialmente bidentados O,O-donador (**Acac<sup>BiMs</sup>**), así como algunos derivados zwitteriónicos con ligantes análogos como los  $\beta$ -cetoiminatos, de tipo bidentado con átomos O,N-donadores (**AcNac**) y los  $\beta$ -tio-cetoiminato, de tipo S,N-donadores (**SacNac**) (Figura 1.8. a-c).<sup>[22-23]</sup>

Particularmente los ligantes  $\beta$ -cetoiminatos cuentan con propiedades únicas debido a su capacidad de coordinación moderada hacia un centro de metal de transición que se encuentra entre ligantes  $\beta$ -dicetoiminato (más fuerte) y una base de Schiff (más débil) hacia el mismo centro metálico y su efecto trans asimétrico basado en la diferencia de los átomos de coordinación (N y O).<sup>24</sup>



**Figura 1.8.** a-c) Estructura de algunos complejos de Pd(II) con potencial aplicación como anticancerígenos, conteniendo ligantes del tipo a) **Acac<sup>BiMs</sup>**, b) **AcNac** y c) **SacNac**.

Así, de los estudios realizados por Valerio y col. (2015) se ha demostrado que algunos complejos zwitteriónicos de Pd(II) conteniendo ligantes **AcNac** tienen importante actividad antiproliferativa en la línea celular BT-474.<sup>22</sup> La línea celular BT-474 es derivada de células de cáncer de mama del tipo carcinoma ductal invasivo (CDI). Esta línea celular presenta aneuploidía con la mayoría de los recuentos cromosómicos en el rango hipertetraploides, varios cromosomas están ausentes (N1, N13, N22) y otros son menos representados (N9, N14, N 15) con respecto a los cromosomas normales.<sup>25</sup> Sin embargo, los derivados de ligantes **Acac** y **SacNac** mostraron una menor actividad bajo las mismas condiciones de estudio.

Conviene mencionar que la información obtenida sobre el mecanismo de reacción-acción de dichos complejos, aun no se ha podido describir con certeza. Es por ello, que el trabajo previo nos motiva a continuar con la investigación, y nos planteamos las siguientes cuestiones: ¿Cuál será el mecanismo de acción de los complejos zwitteriónicos de Pd? ¿Se podrá introducir la fluoresceína como un cromóforo en el fragmento de ligante **AcNac**? ¿La demanda estérica de la fluoresceína inhibirá su potencial actividad en la proliferación celular de algunas líneas de cáncer? Para encontrar respuesta a estas preguntas, surge el presente proyecto de investigación, teniendo por objetivo llevar a cabo los estudios de proliferación en diferentes tipos de células de cáncer empleando nuevos complejos neutros y zwitteriónicos de Pd(II) y algunos neutros de Pt(II), soportado por un ligante de tipo **AcNac**.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó en los párrafos anteriores, de los trabajos de investigación llevados a cabo por nuestros grupos de investigación, se encontró que algunos complejos neutros y zwitteriónicos de Pd(II), conteniendo ligantes bidentados de tipo **AcNac** y **Acac** poseen actividad antiproliferativa en algunas líneas de cáncer, en especial los derivados del ligante **AcNac**. Dichos resultados son alentadores debido a: *i*) una menor toxicidad del Pd con respecto al Pt, *ii*) la buena solubilidad que presentan los complejos zwitteriónicos en el vehículo empleado y *iii*) no existen ejemplos previos del uso de especies organometálicas zwitteriónicas de Pd como drogas contra el cáncer. Sin embargo, desconocemos el mecanismo de reacción-acción de dichos complejos. Por ello, surge la necesidad de continuar con nuestra investigación, de manera que se pueda obtener mayor información sobre dicho proceso a nivel celular. Así, la presente propuesta de trabajo pretende encontrar mayor evidencia experimental sobre este, a través de la incorporación de un fragmento fluoróforo, *p.e.* la fluoresceína dentro del ligante **AcNac**, y así poder detectar los complejos dentro de las células, y realizar una evaluación en tiempo real a través de diversos estudios.

## 3. HIPÓTESIS

La potencial actividad anticancerígena que han presentado los complejos zwitteriónicos de Pd estudiados en nuestro grupo de investigación, nos sugieren que los nuevos complejos análogos, conteniendo en el ligando **AcNac**, unido a la fluoresceína, poseerán similar actividad. Además, la introducción selectiva de dicho fluoróforo, nos permitirá, en principio, obtener una mayor información sobre su mecanismo de reacción-acción, en algunas líneas celulares de cáncer.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis, purificación y caracterización de nuevos complejos zwitteriónicos de Pd(II) y algunos neutros de Pd(II) y Pt(II) conteniendo el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>**, con el fluoróforo derivado de la fluoresceína. Evaluar *in vitro* su potencial actividad antiproliferativa en algunas líneas celulares de cáncer y elucidar un potencial mecanismo de acción-reacción.

### 4.1. Objetivos específicos.

- Realizar la síntesis, purificación y caracterización del ligante tipo **AcNac<sup>Fluor</sup>**, conteniendo en su estructura el fragmento de la fluoresceína, mediante técnicas espectroscópicas y fisicoquímicas comunes.
- Sintetizar, purificar y caracterizar los nuevos complejos Pd(II) y Pt(II), de naturaleza neutra y zwitteriónica.
- Evaluar *in vitro* el efecto de los nuevos complejos en la proliferación de líneas celulares de diferentes cánceres.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1. Reactivos utilizados.

La lista de reactivos, disolventes o suplementos empleados en la síntesis y la caracterización del nuevo ligante **AcNac<sup>Fluor</sup>** y sus complejos de coordinación y organometálicos; y la de los estudios biológicos.

- Tetracloroplatinato (II) de potasio (98% Aldrich)
- Hidróxido de potasio ( $\geq 90\%$  Sigma Aldrich)
- Acido p-toluensulfónico
- Acetilacetona ( $\geq 99\%$  Sigma Aldrich)
- Carbonato de sodio (Baker Analyzed)
- Fluoresceína (Sigma Aldrich)
- Tolueno (KEM de Leon S.A. de C.V.)
- Cloruro de paladio (II) (Pressure CHEMICAL CO.)
- Dimetil sulfóxido-d6 (Sigma Aldrich)
- Ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (J. T. Baker)
- Alcohol etílico (J. T. Baker)
- Dimetil sulfóxido grado cultivo celular (Appli Chem Panreac)
- DAPI (4', 6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidrocloruro)
- 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (BioLegend)
- RNAsa A (Ribonucleasa bovina nativa A) (Creative Enzymes) (mol wt ~13.7 kDa)
- Suero bovino fetal para ensayos de cultivo celular (ATCC)
- Hybri-Care (ATCC)
- Mezcla de nutrientes F-12 (Ham) (Gibco)
- Medio modificado Dulbecco's Eagle (Gibco)
- RPMI 1640, 1X (CORNING)
- Medio modificado Dulbecco's Eagle's (Caisson Labs)
- Medio RPMI 1640 (Gibco)
- Medio F-12K (ATCC)
- Penicilina/estreptomicina (Gibco)
- Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco)

## 5.2. Síntesis del nuevo ligando $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ y algunos de sus complejos de $\text{Pd(II)}$ y $\text{Pt(II)}$ .

A continuación, se describe de manera general la síntesis del ligando  $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$  y de los complejos de  $\text{Pd(II)}$  y  $\text{Pt(II)}$ .

### 5.2.1. Síntesis del ligando $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ .

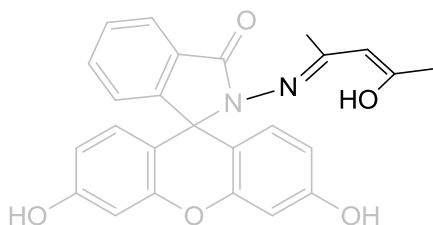


Figura 5.1. Ligando  $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ .

A un vial se adicionó la **Fluores-NH<sub>2</sub>** (2.0 g, 5.78 mmol), sintetizada previamente mediante la metodología descrita por Hambley,<sup>26</sup> la acetilacetona (10 mL) y una pizca de ácido p-toluensulfónico. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C, con agitación vigorosa durante un periodo de 4 h. La mezcla se llevó a temperatura ambiente observando la formación de un precipitado amarillo. El sólido se filtró mediante vacío y se lavó con éter etílico (Et<sub>2</sub>O) frío (10 mL). Con objeto de eliminar toda la acetilacetona, el sólido se suspendió nuevamente en Et<sub>2</sub>O y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El proceso se repitió dos veces. Finalmente, el sólido se lavó con tolueno, bajo agitación vigorosa a una temperatura de 60 °C durante 24 h. El sólido se filtró y se repitió el lavado dos veces. Finalmente, el producto se obtuvo como un sólido color amarillo pálido con un rendimiento del 88 % y un punto de fusión de 267-270 °C (Figura 5.1.).

## 5.2.2. Síntesis de los compuestos de Pd(II).

### 5.2.2.1. Síntesis del compuesto zwitteriónico $[Pd_2Cl_4(AcNac^{Fluores})_2]$ .

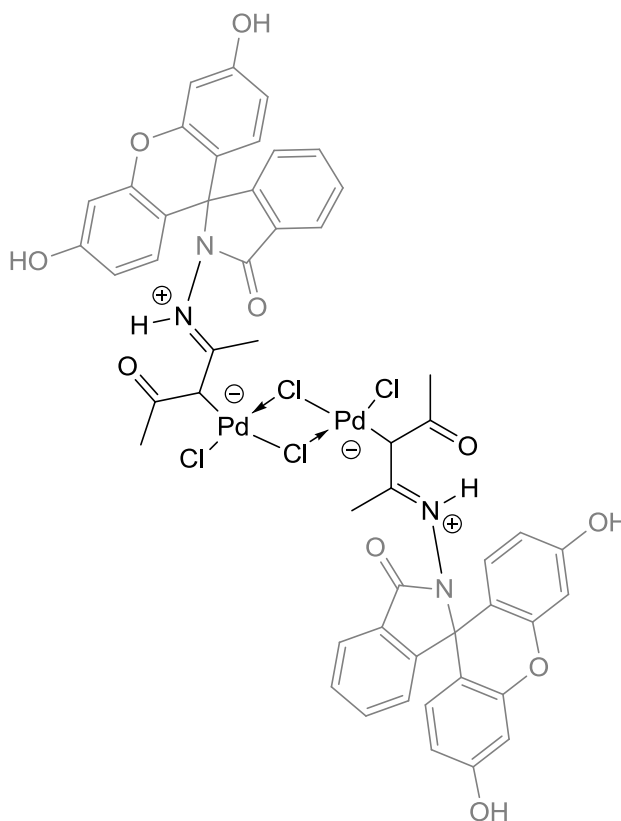


Figura 5.2. Compuesto zwitteriónico  $[Pd_2Cl_4(AcNac^{Fluores})_2] = PdZ^*$

El complejo  $[PdCl_2(CH_3CN)_2]$  (0.30 g, 1.15 mmol)<sup>23</sup>, el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** (0.495 g, 1.15 mmol) y tolueno (18 mL) se añadieron en un matraz bola y se tapó. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C, en agitación constante durante 2 h y se enfrió a temperatura ambiente, observando la formación de un precipitado de color marrón. El sólido se filtró a vacío y se llevó a sequedad. El compuesto se obtuvo como un sólido color marrón con un rendimiento de 94 %. No presentó punto de fusión, descompone a 270 °C (Figura 5.2.).

\* El compuesto zwitteriónico  $[Pd_2Cl_4(AcNac^{Fluores})_2]$  se abreviará en el texto como **PdZ**.



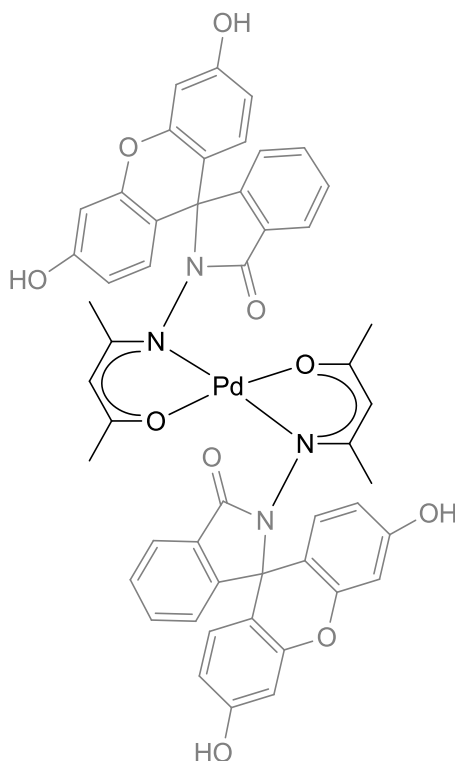
5.2.2.2. Síntesis del compuesto neutro  $[Pd_2Cl_2(AcNac^{Fluores})_2]$ .

Figura 5.3. Compuesto neutro  $[Pd_2Cl_2(AcNac^{Fluores})_2] = Pdn^*$

El ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** (0.33 g, 0.77 mmol) se colocó en un vaso de precipitado y se adiciono etanol (15 mL), la mezcla se agitó hasta disolver el **AcNac<sup>Fluores</sup>** a temperatura ambiente. Sobre la mezcla se adicionó una disolución de KOH (0.043 g, 0.77 mmol) en agua (1 mL) y se agitó durante 30 min. La mezcla se adicionó lentamente, gota a gota, a una disolución del complejo  $[PdCl_2(CH_3CN)_2]$  (0.1 g, 0.38 mmol) en acetonitrilo (15 mL). La mezcla de reacción se agitó por 30 min., a temperatura ambiente, observando la formación de un precipitado de color gris. El sólido obtenido se eliminó mediante filtración. Con objeto de obtener cristales adecuados para difracción de rayos X, las aguas madres se dejaron reposar durante unos días, hasta inducir la formación de un precipitado de color anaranjado con un rendimiento del 44 %. Diversos intentos llevados a cabo para obtener cristales han sido infructuosos a la fecha. No presento punto de fusión, descompone a 270 °C (Figura 5.3.).

\* El compuesto neutro  $[Pd_2Cl_2(AcNac^{Fluores})_2]$  se abreviará en el texto como **Pdn**.

### 5.2.3. Síntesis de los compuestos de Pt(II).

#### 5.2.3.1. Síntesis del compuesto neutro $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]$ .

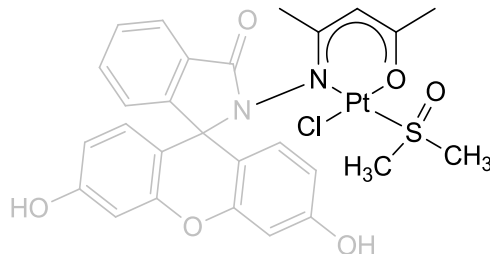


Figura 5.4. Compuesto neutro  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]=Ptn^*$

El ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** (0.206 g, 0.48 mmol) se colocó en un vaso de precipitado y se adicionó el dimetilsulfóxido (DMSO, 15 mL). La mezcla se agitó hasta disolver el **AcNac<sup>Fluores</sup>** a temperatura ambiente. Sobre esta mezcla se adicionó una disolución de KOH (0.027 g, 0.48 mmol) en agua (1 ml) y se agitó durante 30 min.

La mezcla se adicionó lentamente, gota a gota, a una disolución del complejo  $K_2[PtCl_4]$  (0.1 g, 0.29 mmol) en DMSO (15 mL) y se agitó por 30 min., a temperatura ambiente, obteniéndose una disolución anaranjada. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C hasta evaporar el DMSO, observando la formación de un sólido viscoso, a este se adicionó agua (15 ml), se filtró a vacío y se llevó a sequedad. El compuesto se obtuvo como un sólido color rojo. No presentó punto de fusión, descompone a 290 °C (Figura 5.4.).

\* El compuesto neutro  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]$  se abreviará en el texto como **Ptn**.

### 5.3. Técnicas de caracterización.

#### 5.3.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Espectros de RMN multidimensionales:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , DEPT, bidimensionales homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , COSY (Correlation Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) y bidimensionales heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Correlation), y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) se registraron tanto del **Fluor-NH<sub>2</sub>**, el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>**, como de los complejos de Pd(II) y Pt(II) en un equipo Bruker Avance III HD Ultrashield de 500MHz. Los complejos se disolvieron en dimetilsulfóxido deuterado (*dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub>*).

#### 5.3.2. Difracción de rayos X.

Los datos de Rayos X se obtuvieron en un difractómetro Oxford Gemini con un detector de área CCD, los paquetes de software CrysAlisPro y CrysAlis fueron usados para la colección e integración de los datos. Los datos fueron registrados y corregidos por absorbanza usando la corrección numérica de absorción analítica mediante el modelo de cristal multifacético basado en expresiones sobre la simetría de Laue, usando reflexiones equivalentes. Las estructuras fueron resueltas usando SHELXS-9721 y refinadas por la matriz de mínimos cuadrados en F2 con R SHELXL-9722 factor R y con muy buen ajuste de indicadores, S, basados en F2.

#### 5.3.3. Espectroscopía infrarroja.

Los estudios de radiación infrarroja (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Infrarrojo Perkin-Elmer Spectrum 100 en el intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Las muestras fueron preparadas en pastillas de KBr de grado espectroscópico, previamente secado en un horno para minimizar señales relacionadas al agua.

#### 5.3.4. Espectroscopía UV-Vis.

Los estudios UV-Vis se realizaron con un espectrofotómetro UV-visible marca Varian modelo Cary 50 en un intervalo de 190 a 800 nm. Disoluciones en DMSO como disolvente se prepararon para el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** y el complejo **Ptn** a la concentración de  $5 \times 10^{-5}$  M y para los complejos **PdZ y Pdn** a la concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M. Una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico se utilizó.

#### 5.3.5. Voltamperometría cíclica.

Los experimentos se realizaron con un potencióstato-galvanostato Biologic 250, modelo: VSP s/n:1355 acoplado a una PC, usando la técnica de voltamperometría cíclica. Antes de realizar cada experimento la disolución a analizar se burbujeó con nitrógeno durante 20 min. El electrodo de trabajo se pulió con alúmina de  $0.5 \mu\text{m}$ , se enjuagó con agua destilada y se secó antes de realizar el primer voltamperograma. Después, entre cada medición, el electrodo se pulió nuevamente con alúmina de  $0.5 \mu\text{m}$ , se enjuagó con agua destilada y se secó. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de Pt. Todos los voltamperogramas fueron obtenidos a partir del potencial de circuito abierto ( $E_i=0$ ).

Experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron en alícuotas de 5 mL a la concentración de 0.01 M de los complejos **PdZ, Pdn, Ptn** y del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** en presencia de LiCl 0.1 M en DMSO como electrolito soporte, en sentido anódico usando diferentes velocidades (10, 75 y 100 mV/s).

#### 5.4. Evaluación biológica.

Las líneas celulares utilizadas para los experimentos fueron, células HeLa (cáncer cervicouterino), T47-D (cáncer de mama) y PC-3 (cáncer de próstata). Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM, y RPMI-1640 para las células T47-D y PC-3, suplementado con 5% de FBS inactivado por calor, y 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Las líneas celulares son cultivadas en monocapas en una atmosfera humidificada al 95% y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, y cosechadas por tripsinización.

##### 5.4.1. Microscopia de fluorescencia.

Las células se sembraron en placas negras de 96 pozos por quintuplicado con una densidad de 1500 células por pozo. Después de 96 h de incubación, las células se trataron con los distintos compuestos (**AcNac<sup>Fluores</sup>**, **PdZ**, **Pdn** y **Ptn**) y con los compuestos precursores de **Pd** [PdCl<sub>2</sub>(CNCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], y **Pt** K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>] \*, a una concentración de 1x10<sup>-5</sup> M, el vehículo (0.01% v/v DMSO) y un control negativo, por un tiempo de 6 o 24 h dependiendo de la línea celular.

Terminado el tiempo de incubación, el medio de cultivo se aspiró y las células se lavaron con 200  $\mu$ L de solución salina equilibrada de Hank (HBSS). En seguida, las células se fijaron con 100  $\mu$ L de formaldehído al 4%, por 10 min, el cual se aspiró y se realizó nuevamente un lavado con HBSS. Después, se añadieron, 100 $\mu$ L de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en ausencia de luz y se dejó por 5 min. Transcurrido el tiempo, el DAPI se retiró y las células se lavaron nuevamente con HBSS, las placas se dejaron secar y se envolvieron con papel aluminio para aislar de la luz. Por último, se adquirieron fotos con un microscopio Nikon Eclipse TS100 utilizando diferentes filtros (FITC y DAPI).

\* Los compuestos precursores [PdCl<sub>2</sub>(CNCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] y K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>] se abreviarán como **Pd** y **Pt** respectivamente.

#### **5.4.2. Medición de fluorescencia y proliferación celular.**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos por sextuplicado con una densidad de 250-1500 células por pozo, dependiendo de la línea celular. Después de 24 h de incubación, las células se trataron en presencia de concentraciones crecientes ( $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M) de los compuestos (*AcNac<sup>Fluores</sup>*, *Pd*, *Pdn*, *PdZ*, *Pt*, *Ptn*), o el vehículo (0.01% v/v DMSO) por 3 a 6 días, este tiempo dependió de la línea celular. Posteriormente, el medio de cultivo se cambió por medio sin rojo fenol, y se midió la fluorescencia a 528 nm en un lector de microplacas (BioTeK, Winooski, VT, E.U.)

En seguida las células se fijaron con 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (m/v), y se incubaron por una hora a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron con agua del grifo tres veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después, 100  $\mu$ L de sulforodamina B (SRB) al 0.057% (m/v) se adicionaron en cada pozo y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, tres lavados se realizaron con 150  $\mu$ L de ácido acético al 1% (v/v) para remover la SRB que no se unió a los aminoácidos básicos de las proteínas de las células y se dejó secar a temperatura ambiente. Para que la SRB unida se solubilice, 200  $\mu$ L de Tris base 10 mM (pH 10.5) se adicionaron en cada pozo y se dejó en agitación por 30 min. Por último, la densidad óptica se midió a 492 nm en un lector de microplacas (BioTeK, Winooski, VT, E.U.). Los valores de la IC<sub>50</sub> se obtuvieron por medio del análisis de la regresión no lineal de la curva concentración-respuesta utilizando el software especializado (OriginLab Corporation, Northampton MA) versión 6.1. Los experimentos se realizaron por sextuplicado en 3 experimentos independientes.

#### **5.4.3. Análisis estadístico.**

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DS) de dos o tres experimentos individuales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Holm-Sidak utilizando el software SigmaPlot 12.0.

#### 5.4.4. Evaluación del ciclo celular.

Las células se sembraron en placas de 6 pozos por duplicado, con una densidad de 60000 células por pozo y se incubaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de 48 h, las células se trataron con los distintos compuestos (**AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, Pdn, PdZ, Pt, Ptn**) a una concentración de 1x10<sup>-5</sup> M, el vehículo (0.01% v/v DMSO) y un control negativo por 48 h.

Terminado el tiempo de incubación, el medio de cultivo de los pozos de cada uno de los estímulos se recolectó en tubos falcón de 15 mL. En seguida 500 µL de EDTA se adicionaron en cada pozo de las placas y las cajas se dejaron en la incubadora por 10 min. Posteriormente, las células se despegaron y se recolectaron en el mismo tubo donde se recolectó anteriormente su medio.

Luego, cada pozo se lavó adicionando 1 mL de PBS (pH 7.2) y este se recolectó nuevamente en cada tubo falcón, correspondiente a cada estímulo, en seguida los tubos se centrifugaron a 1600 rpm a 4 °C por 6 min. El sobrenadante se retiró y a cada tubo se agregaron 2 mL de PBS (pH7.2) y los tubos se centrifugaron nuevamente. Posteriormente, el sobrenadante se retiró y las células se fijaron con 1 mL de etanol al 70 % (v/v), en agitación por vórtex. Las células se mantuvieron a una temperatura de -20 °C.

Para el análisis del ciclo celular, las muestras se lavaron, adicionando 2 mL de PBS en cada tubo. En seguida, se centrifugó a velocidad constante de 1600 rpm durante 7 min y el sobrenadante se retiró. Un segundo lavado se realizó de la misma forma. Posteriormente, 230 µL de una mezcla conteniendo PBS (pH7.2), Tritón X-100 0.1 % (v/v), 7-amino-actinomicina (7-ADD) 50 µg/mL y RNAsa 4 mg/mL se adicionaron y las cajas se incubaron en agitación y ausencia de luz, a temperatura ambiente por 20 min. Por último, el contenido de ADN y la fluorescencia de las células se determinaron en un citómetro de flujo FACsCanto II.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Caracterización del ligante *AcNac*<sup>Fluores</sup> y de algunos de sus compuestos de Pd(II) y Pt(II) mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Para la caracterización de los compuestos, se llevaron a cabo estudios de RMN de protón <sup>1</sup>H, de carbono <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}, Dept, COSY, NOESY, HMQC, HSQC y HMBC, con el fin de poder elucidar la estructura de los compuestos sintetizados mediante el análisis de sus espectros. Estos estudios se llevaron a cabo en solución, en DMSO-*d*<sub>6</sub> a una temperatura de 25 °C.

En la figura 6.1 se presenta el espectro de RMN de protón del ligante *AcNac*<sup>Fluores</sup> en el cual se observan las siguientes señales: dos singuletes a 1.41 y 1.85 partes por millón (ppm) los cuales son asignados a los protones de los metilos del fragmento *AcNac*, un singulete a 5.00 ppm asignado al metino de este mismo fragmento. En tanto, las señales observadas en el rango de 6.5 a 8.0 ppm son asignadas a los protones aromáticos del fragmento fluoresceína. Los singuletes observados a un desplazamiento químico ( $\delta$ ) de 10.02 y 11.07 ppm son asignados a los protones de los hidroxilos (OH) de los fragmentos fluoresceína y *AcNac*, respectivamente.



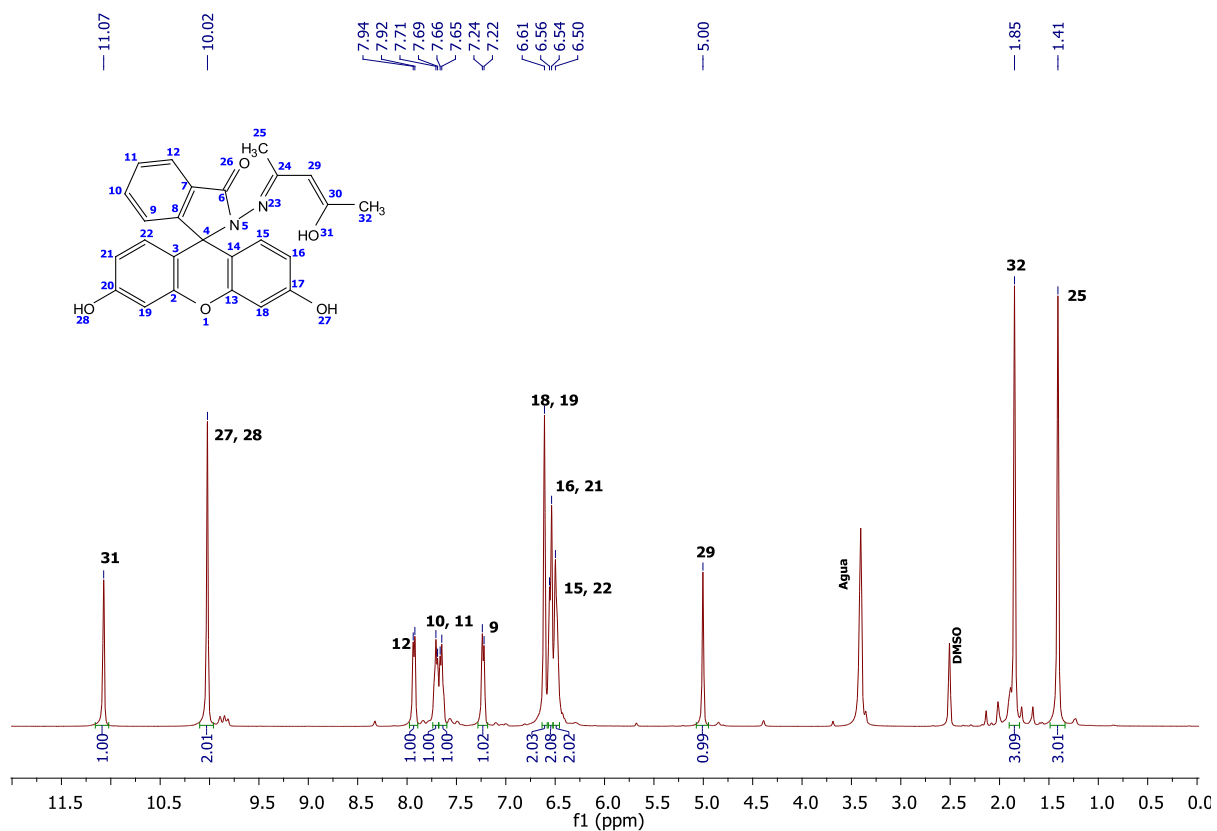


Figura 6.1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del ligando **AcNac<sup>Fluores</sup>**

En tanto, el análisis del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (Figura 6.2.) muestra señales para los carbonos de metilos del fragmento **AcNac** en un desplazamiento químico de 17.46 y 28.81 ppm, el carbono de metino en 96.81 ppm y el desplazamiento de los carbonos cuaternarios contiguo a OH y el carbono adyacente a nitrógeno, en este fragmento **AcNac**, se encuentran en 195.94 y 163.41 ppm respectivamente. El carbono espiro del fragmento fluoresceína se encuentra en 65.75 ppm, así, los carbonos aromáticos se encuentran en un rango de 100-160 ppm, y para el carbono de carbonilo en 165.52 ppm.

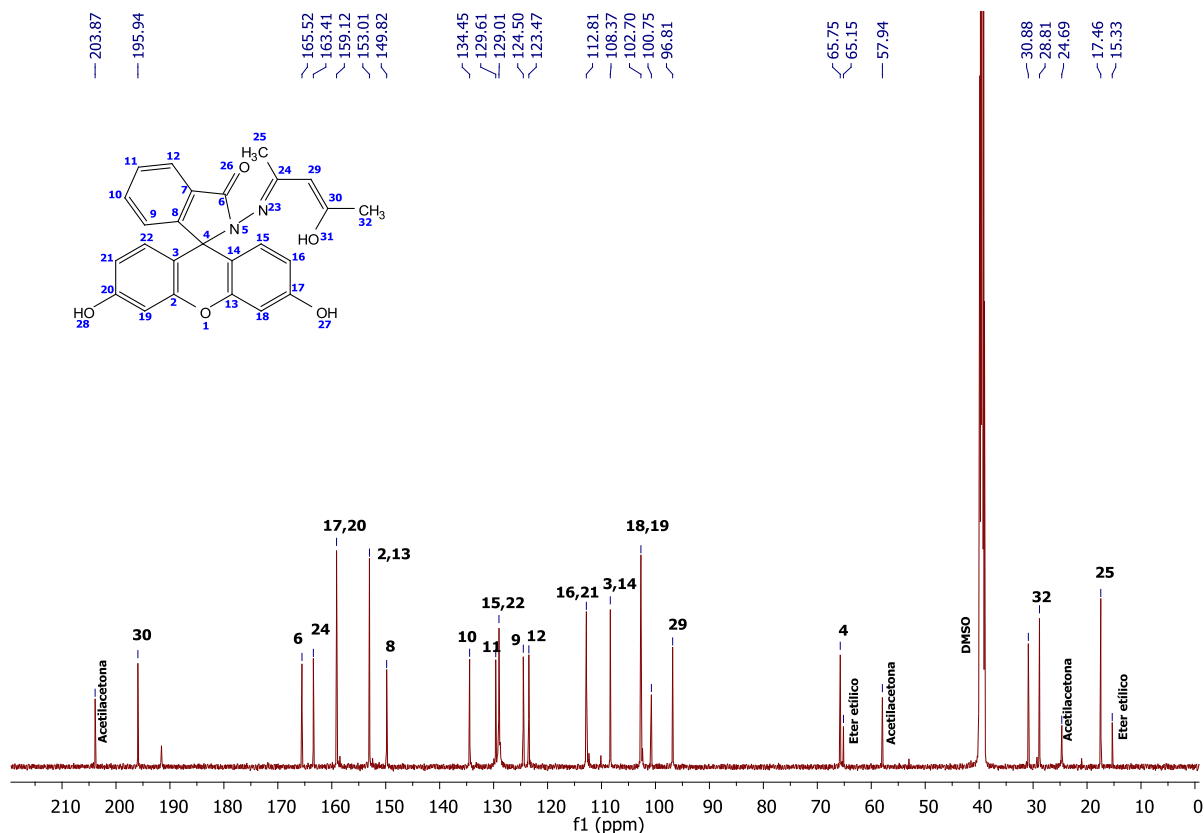


Figura 6.2. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del ligando **AcNac<sup>Fluores</sup>**

La espectroscopía de RMN también se realizó para el compuesto zwitteriónico de Pd (**PdZ**) y los compuestos neutros de Pd (**Pdn**) y Pt (**Ptn**) para su posible elucidación estructural. Lo anterior se muestra en la figura 6.3, que resume un estudio comparativo entre los compuestos de interés para este trabajo y el **AcNac<sup>Fluores</sup>**.

Para el compuesto **PdZ**, en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 6.3. b) se observan las mismas señales de los protones que en el ligante, pero con una doble intensidad para cada una de ellas, debido a los 2 equivalentes de ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** unido al Pd. Cabe resaltar que la señal que se encuentra a un desplazamiento químico de 10.01 ppm, asignado a los protones del grupo hidroxilo del fragmento fluoresceína del ligante, y la señal del agua debida a la hidratación del  $\text{DMSO}-d_6$ , se observa un singulete ancho con muy poca intensidad esto en comparación al ligante libre. Digno de mencionarse es la inusual correlación

observada en el espectro homonuclear NOESY, entre estas dos señales ya mencionadas, esta posible interacción se atribuye a la formación del complejo.

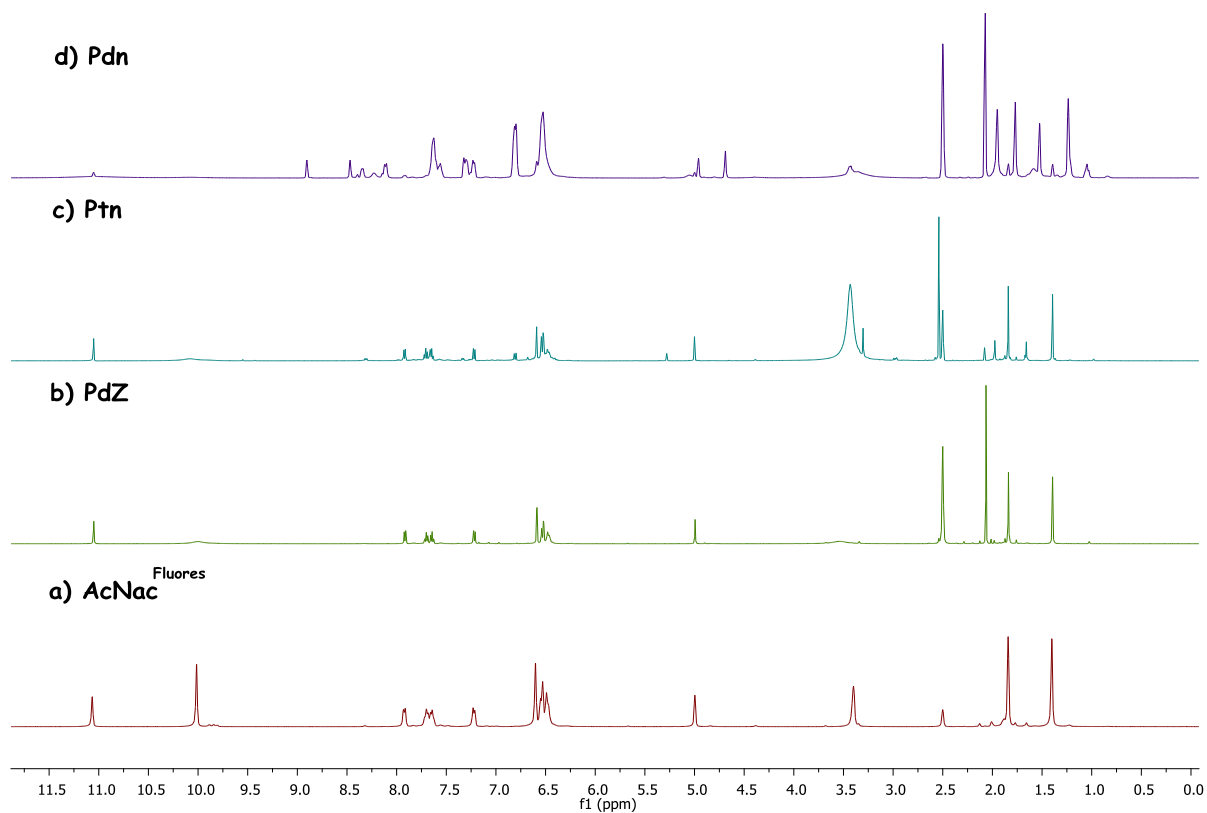
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , se observan las señales de los carbonos debidas a los ligantes **AcNac<sup>Fluores</sup>** enlazados al Pd, todas las señales se desplazan a campo alto en un rango de 0.2 a 0.4 ppm en comparación a los desplazamientos del ligante libre. Esto evidencia la formación del compuesto.

Mientras tanto en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **Ptn** (Figura 6.3. c), se observa una señal a un desplazamiento de 2.54 ppm atribuida al DMSO que se encuentra coordinado al Pt, la señal de los OH del fragmento fluoresceína del ligante que está a 10.09 ppm da un singulete ancho con una intensidad muy pequeña casi nula, al igual, para la señal del agua se observa un singulete ancho. Además, en el espectro NOESY se logra ver la interacción de estas dos señales. En este sentido, las señales atribuidas a los protones que fueron asignadas al compuesto **Ptn**, también se observan señales similares pero desplazadas a campo más bajo a 1.65, 1.98, 3.30, 5.28, 6.80, 7.32, 8.30 ppm, en una relación 0.25:1 con respecto a las señales asignadas a **Ptn**, esto se atribuye a un posible isómero, el cual puede estar en muy poca proporción debido a la baja intensidad de las señales.

Por otro lado, en el espectro de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , se observa la señal del DMSO coordinado en un desplazamiento de 40.43 ppm, y también se logran observar señales de carbono diferentes a las asignadas al compuesto **Ptn**, desplazadas a campo más bajo y con intensidad baja.

En tanto para el compuesto **Pdn**, del análisis de su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 6.3. d) se puede observar que se presentan cambios evidentes en las señales, con respecto al ligante libre. Esto es, desaparecen las señales de los OH del fragmento **AcNac** y fluoresceína del ligante, esto se atribuye a la formación del compuesto. Por otro lado, la señal **DMSO- $d_6$**  se ensancha. Además, se observan dos señales para protones de metinos en una relación 1:1.5, lo anterior nos sugiere la existencia de dos isómeros en solución. En el espectro de RMN de

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  también son evidentes cambios en las señales, además de un aumento de señales respecto a las esperadas debido al compuesto. Lamentablemente la caracterización mediante estudios de temperatura variable de RMN protón no se ha logrado llevar a cabo debido a causas ajenas a esta investigación.



**Figura 6.3.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) de: a)  $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ , b) PdZ, c) Ptn y d) Pdn.

## 6.2. Difracción de rayos X del ligando *AcNac<sup>Fluores</sup>*.

Mediante estudios de difracción de rayos X de monocristal se corroboró la estructura del compuesto sintetizado *AcNac<sup>Fluores</sup>*, este cristalizó en un medio de acetilacetona, los cristales obtenidos se analizaron con el software CrysAlisPro y CrysAlis. En la figura 6.4 se muestra una representación del compuesto con perspectiva *ORTEP*, en ella se pudo observar que los anillos aromáticos del fragmento fluoresceína están perpendicularmente unidos mediante un espiro átomo de carbono al resto de la molécula, lo cual permite que los átomos de los anillos aromáticos sean equivalentes a través del giro del enlace sencillo N-N.

De acuerdo a los valores obtenidos de las longitudes de los ejes y de los ángulos que se forman en la celda unitaria, se deduce que este compuesto tiene un sistema cristalino monoclinico. El resto de los compuestos se intentaron cristalizar, pero no se obtuvo éxito.

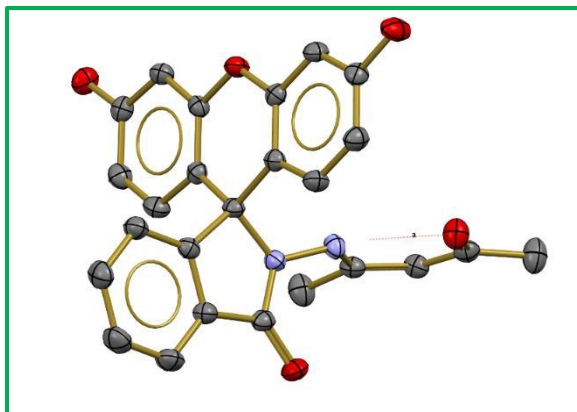
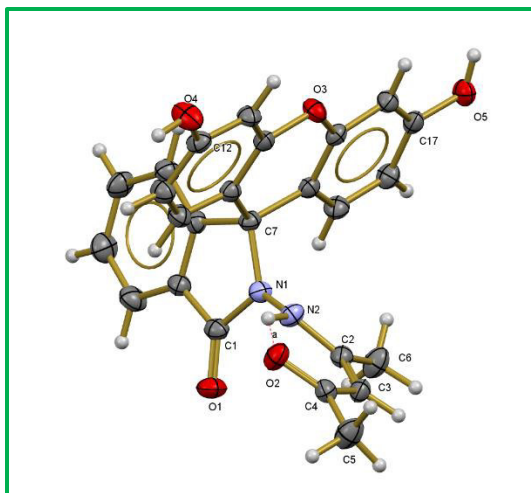


Figura 6.4. Estructura de rayos X del ligante *AcNac<sup>Fluores</sup>*.

En la figura 6.5 se muestran enumerados algunos de los átomos más representativos del compuesto **AcNac<sup>Fluores</sup>**, y en la tabla 6.1 se presentan los valores de la longitud de enlace y su ángulo.



**Figura 6.5.** Estructura de rayos X del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** enumerando los átomos más representativos.

**Tabla 6.1.** Longitud de enlace [Å] y ángulos [°] para **AcNac<sup>Fluores</sup>**

<b>N(1)-N(2)</b>	1.382(2)
<b>C(1)-O(1)</b>	1.227(3)
<b>C(1)-N(1)</b>	1.371(3)
<b>C(2)-N(2)</b>	1.351(3)
<b>C(3)-H(3)</b>	0.9500
<b>C(4)-O(2)</b>	1.264(3)
<b>C(12)-O(4)</b>	1.359(3)
<b>C(17)-O(5)</b>	1.357(3)
<b>O(4)-H(4D)</b>	0.881(19)
<b>O(5)-H(5D)</b>	0.878(19)

Los valores de longitud de enlace y ángulo para el resto de los átomos, se presentan en el anexo II.

### 6.3. Caracterización mediante espectroscopía UV-Vis de los compuestos sintetizados.

En la tabla 6.2 se presentan las absorbancias, la longitud de onda y el coeficiente de absorptividad molar de los compuestos previamente sintetizados, en presencia de DMSO como disolvente.

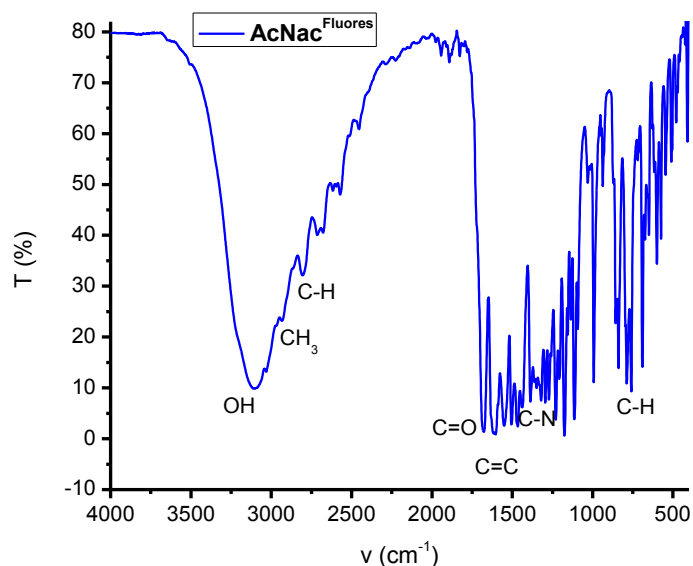
Para el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** y el compuesto **PdZ** solo se observa una banda de absorción en la región del ultravioleta cercano a 285 nm y 281 nm respectivamente, esto se atribuye a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  debido a los átomos con pares de electrones libres de los grupos OH y C=O. Para los compuestos **Pdn** y **Ptn**, estos además de presentar la banda en el ultravioleta cercano (277 y 281 nm), presentan bandas de absorción para la fracción aromática de la fluoresceína teniendo un máximo de absorción en 459 nm, con una absorptividad molar de 41000 y 6000  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Estas bandas de absorción se deben a las transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>27,28</sup>

Los espectros electrónicos de los compuestos se presentan en el anexo III.

Tabla 6.2. Concentración, absorbancias, longitud de onda y coeficiente de absorptividad molar en presencia de DMSO como disolvente.				
Compuesto	Concentración (mol/L)	A	$\lambda$ (nm)	$\xi$ ( $L\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
AcNac <sup>Fluores</sup>	$5 \times 10^{-5}$	0.78	285	15600
Pdn	$2 \times 10^{-5}$	0.65	277	32500
		0.56	379	28000
		0.66	433	33000
		0.82	459	41000
		0.59	490	29500
PdZ	$2 \times 10^{-5}$	0.91	281	45500
Ptn	$5 \times 10^{-5}$	0.78	281	15600
		0.27	379	5400
		0.24	433	4800
		0.30	459	6000
		0.22	490	4400

#### 6.4. Espectroscopía infrarroja.

En la figura 6.6 se muestra el espectro de infrarrojo del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>**, en el cual se pueden apreciar las vibraciones de tensión  $\nu(\text{O-H})$  en  $3098\text{ cm}^{-1}$ , así como  $\nu(\text{CH}_3)$  en  $2939\text{ cm}^{-1}$  característica de los metilos, y la señal  $\nu(\text{CH})$  en  $2803\text{ cm}^{-1}$ . En  $1676\text{ cm}^{-1}$  se puede apreciar la vibración de tensión para el carbonilo  $\nu(\text{C=O})$  y en  $1612, 1551\text{ cm}^{-1}$  la vibración de tensión  $\nu(\text{C=C})$ , de los carbonos aromáticos. Por otro lado, en  $1463, 1437\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las vibraciones de flexión  $\delta(\text{C-H})$  de los aromáticos, mientras que la vibración de tensión  $\nu(\text{C-N})$  se detecta en  $1384, 1322\text{ cm}^{-1}$ . Por último, se observan otras bandas características de vibraciones de flexión de  $\delta(\text{C-H})$  fuera y dentro del plano del anillo aromático en  $1270$  y  $1177\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.



**Figura 6.6.** Espectroscopía IR de AcNac<sup>Fluores</sup> pastilla de KBr.



En la tabla 6.3 se presentan las bandas de absorción en el IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de los compuestos sintetizados. Se identificaron las frecuencias de las vibraciones características de los complejos.

Asignación/Compuesto	AcNac <sup>Fluores</sup> $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pdn $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	PdZ $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Ptn $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\nu(\text{O-H})$	3098	3059	3205	3181
$\nu(\text{CH}_3)$	2939	2917	2925	2925
$\nu(\text{CH})$	2803	-----	2811	2811
$\nu(\text{C=O})$	1676	1641	1684	1698
$\nu(\text{C=C})$	1612, 1551	1609, 1570	1609	1609
$\delta(\text{C-H})$ aromático	1463,1437	1465	1465	1465
$\nu(\text{C-N})$	1384,1322	-----	-----	1381, 1324
$\delta(\text{C-H})$ 1:2 di sustituido o.o.p.	1270,1229	-----	1276, 1231	-----
(C-H) 1:2:4 tri sustituido i.p.	1177	-----	1185	1178
$\delta(\text{C-H})$ i.p.	1112	1110	-----	1110
(C-H) 1:2 di sustituido o.o.p.	837	846	-----	846
(C-H) 4H adyacentes	759	756	763	763

De acuerdo al análisis de las bandas de absorción de los compuestos **Pdn PdZ y Ptn** podemos observar una disminución en la frecuencia de vibración asignada a los metilos ( $\nu$   $\text{CH}_3$ ) en comparación al ligante libre, en tanto para la banda de absorción debida al metino ( $\nu$   $\text{C-H}$ ), la frecuencia aumenta para **PdZ y Ptn**, sin embargo, para el compuesto **Pdn** esta vibración no se observa. Estos cambios en las frecuencias de vibración evidencian la formación de los compuestos.

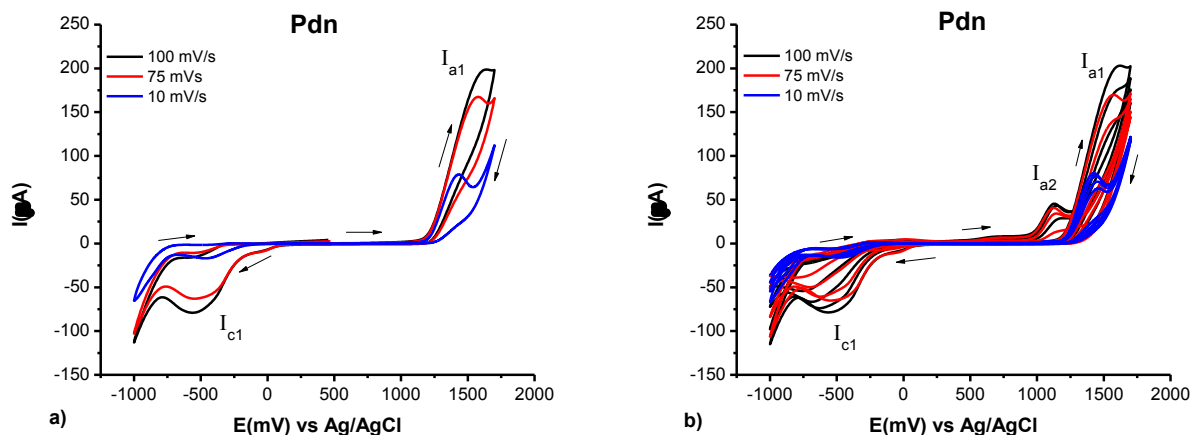
Los espectros de los compuestos restantes se presentan en el anexo IV.

### 6.5. Actividad electroquímica de los compuestos $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ , $\text{Pdn}$ , $\text{PdZ}$ y $\text{Ptn}$ .

El siguiente paso en la caracterización del ligante y sus complejos, consistió en estudiar su posible respuesta electroquímica, algunos autores refieren una correlación directa entre la respuesta electroquímica de este tipo de complejos y su actividad en la disminución de actividad cancerígena.<sup>29</sup>

Se aplicó la técnica de voltamperometría cíclica con el fin de evaluar la respuesta de los compuestos al aplicar un potencial obteniendo una respuesta de oxidación-reducción. Los experimentos se realizaron en una celda electroquímica convencional de tres electrodos (ET: carbón vítreo, ER: Ag/AgCl, y CE: Pt), registrados a una concentración de 0.01 M, LiCl (0.1 M) en DMSO como electrolito soporte, en sentido anódico, en tres diferentes velocidades.

El primer compuesto estudiado fue el ligante  $\text{AcNac}^{\text{Fluores}}$ , el cual, no fue activo, ya que no presentó respuesta a el potencial aplicado (ver anexo V, figura 5.2.). Posteriormente se probaron los compuestos sintetizados:  $\text{PdZ}$ ,  $\text{Pdn}$  y  $\text{Ptn}$ . Los resultados para el compuesto  $\text{Pdn}$  se muestran en la figura 6.7. El análisis de los voltamogramas nos permite proponer que dicho compuesto, después de un ciclo, presenta un pico de oxidación  $I_{a1}$  y una señal de reducción  $I_{c1}$  los cuales aumentan de intensidad conforme aumenta la velocidad, y que su potencial de pico  $E_{pa1}$  y  $E_{pc1}$  depende de la velocidad (figura 6.7. a). Además, se puede apreciar que en cuanto aumentamos el número de ciclos, aparece una segunda señal de oxidación  $I_{a2}$  y el valor de intensidad para las señales  $I_{a1}$  e  $I_{c1}$  disminuyen, este comportamiento se presenta para la velocidad de 75 y 100 mV/s (figura 6.7. b). Así, podemos sugerir que al inicio se presenta una reacción electroquímica casi reversible seguida de una reacción electroquímica irreversible, generando un mecanismo ErEi. Los picos de oxidación y de reducción se pueden atribuir al centro metálico de  $\text{Pd}^{2+} + 2e \leftrightarrow \text{Pd}^{4+}$  seguido de la reacción irreversible  $\text{Pd}^{2+} \leftrightarrow \text{Producto}$ .



**Figura 6.7.** Voltamperogramas del compuesto *Pdn* en concentración 0.01 M en presencia de LiCl (0.1 M) en DMSO como electrolito soporte. El barrido se realizó en sentido anódico, en velocidades de 10, 75 y 100 mV/s. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de platino. a) 1 ciclo, b) 3 ciclos.

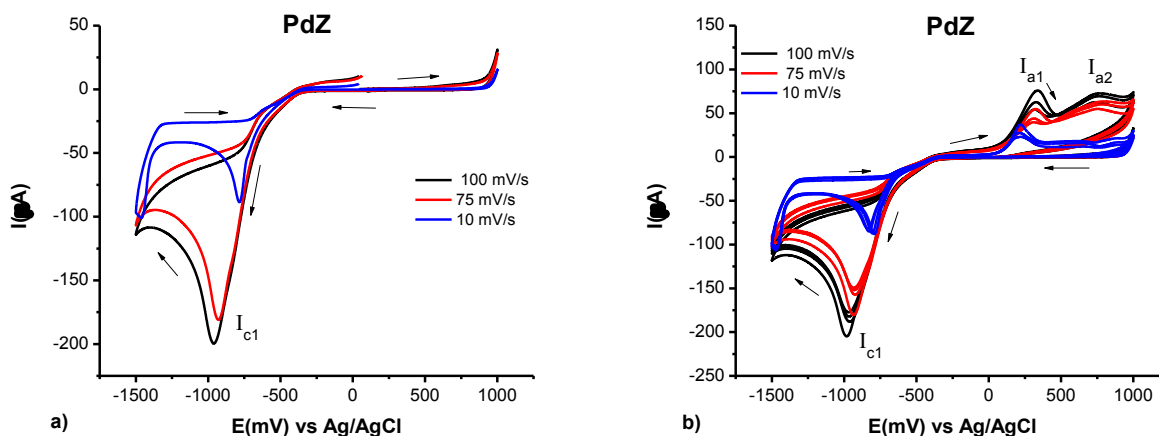
En tanto, cuando los experimentos se llevan a cabo a una velocidad de 10 mV/s solo se observa una reacción electroquímica cuasi reversible, la cual es independiente del número de ciclos. (Figura 6.7. b). Esto sugiere que, el proceso presenta una transferencia de electrones lenta, el cual favorece solo a un proceso. En la tabla 6.4 se presentan los valores de potenciales e intensidades de pico para estos procesos.

**Tabla 6.4.** Potenciales ( $E_p$ ) e intensidades de pico ( $I$ ) de *Pdn* en concentración 0.01 M, a diferentes velocidades (Vel.)

Vel. (mV/s)	$E_{p_{a1}}$ (mV)	$I_{a1}$ ( $\mu$ A)	$E_{p_{c1}}$ (mV)	$I_{c1}$ ( $\mu$ A)	$E_{p_{a2}}$ (mV)	$I_{a2}$ ( $\mu$ A)
10	1430	78	-460	17	---	---
75	1580	160	-540	63	1120	40
100	1620	200	-560	78	1120	45

En este sentido, el análisis de los resultados obtenidos para el estudio electroquímico del compuesto **PdZ** podemos observar que su voltamograma con un ciclo genera solo una señal de reducción  $I_{c1}$ , la cual aumenta de intensidad conforme aumenta la velocidad de barrido, y su potencial de pico  $Ep_{c1}$  es dependiente de la misma (Figura 6.8. a). Sin embargo, después de generarse el primer pico de reducción, se generan dos picos de oxidación  $I_{a1}$  e  $I_{a2}$ , los cuales disminuyen de intensidad mientras que  $I_{c1}$  disminuye (Figura 6.8 b). Así, teniendo en cuenta el conocimiento previo de la nula reactividad electroquímica presentada por el ligante libre, estos procesos podrían atribuirse a la reducción del átomo metálico, de  $Pd^{2+} + 2e \leftrightarrow Pd^0$  ( $I_{c1}$ ) con la transferencia de 2 electrones, y para la oxidación, la transferencia de electrones ocurra en dos etapas de 1 electrón, **I)**  $Pd^0 \leftrightarrow Pd^{1+} + 1e$  y **II)**  $Pd^{1+} \leftrightarrow Pd^{2+} + 1e$ , lo cual permite explicar la generación de los dos picos de oxidación  $I_{a1}$  e  $I_{a2}$ .

En la tabla 6.5 se presentan los valores de potenciales e intensidades de pico para estos procesos.



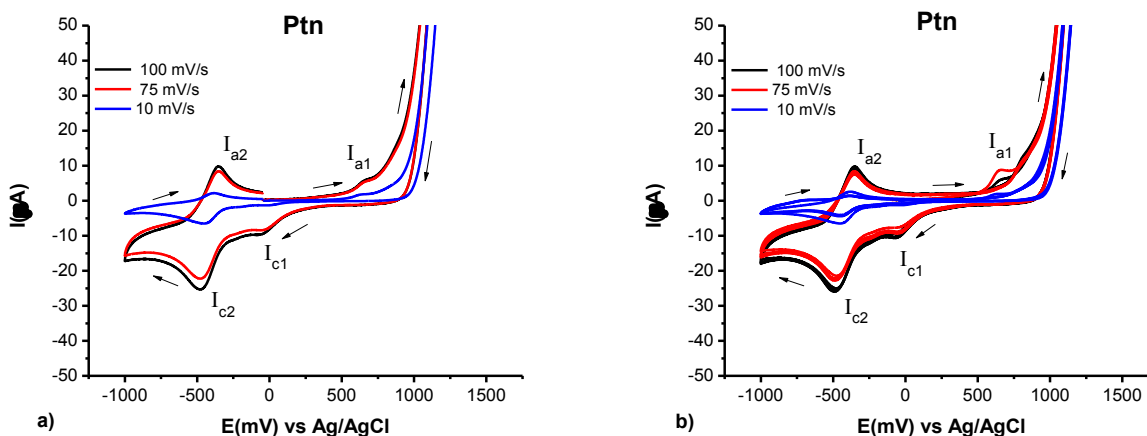
**Figura 6.8.** Voltamperogramas del compuesto **PdZ** en concentración 0.01 M en presencia de LiCl (0.1 M) en DMSO como el electrolito soporte. El barrido se realizó en sentido anódico, en velocidades de 10, 75 y 100 mV/s. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de platino. a) 1 ciclo, b) 3 ciclos.

**Tabla 6.5.** Potenciales ( $E_p$ ) e intensidades de pico ( $I$ ) de PdZ en concentración 0.01 M, a diferentes velocidades (Vel.)

Vel. (mV/s)	$E_{p_{c1}}$ (mV)	$I_{c1}$ ( $\mu A$ )	$E_{p_{a1}}$ (mV)	$I_{a1}$ ( $\mu A$ )	$E_{p_{a2}}$ (mV)	$I_{a2}$ ( $\mu A$ )
10	-780	88	220	36	620	18
75	-920	180	320	55	750	55
100	-960	190	330	75	750	62

Aunque el proceso es atribuible al elemento metálico central no podemos dejar de lado la interacción con la estructura circundante, es por eso que en el caso del compuesto PdZ observamos la presencia inicial de una marcada señal de reducción solamente, en comparación con las señales que se observan en el compuesto Pdn, al incrementar la cantidad de ciclos y a velocidades de barrido mayores, comienzan a aparecer las señales de oxidación, lo que puede atribuirse a que hay un mayor impedimento circundando el metal.

Por otro lado, en la figura 6.9 se muestra los voltamogramas del complejo **Ptn**, en ellos se puede observar que este compuesto presenta dos procesos redox, generándose dos picos de oxidación  $I_{a1}$  e  $I_{a2}$  y dos picos de reducción  $I_{c1}$  e  $I_{c2}$  que son independientes del número de ciclos. Además, para las velocidades de 75 y 100 mV/s, los potenciales de picos son independientes de la velocidad de barrido. Para la velocidad de 10 mV/s los potenciales de pico variaron un poco con respecto a las velocidades de 75 y 100 mV/s (ver tabla 6.6). Los picos  $I_{c2}$  e  $I_{a2}$  se pueden atribuir a la reducción-oxidación del centro metálico  $Pt^{2+} + 2e \leftrightarrow Pt^0$ . Los picos  $I_{c1}$  e  $I_{a1}$  podrían atribuirse a la segunda especie que se observa en RMN y que se encuentra en una menor proporción, y es por ello que la intensidad de las señales es muy pequeña.



**Figura 6.9.** Voltamperogramas del compuesto **Ptn** en concentración 0.01 M en presencia de LiCl (0.1 M) en DMSO como el electrolito soporte. El barrido se realizó en sentido anódico, en velocidades de 10, 75 y 100 mV/s. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de platino. a) 1 ciclo, b) 3 ciclos.

En la tabla 6.6 se presentan los valores de potenciales e intensidades de pico para estos procesos.

**Tabla 6.6.** Potenciales (Ep) e intensidades (I) de pico de Ptn en concentración 0.01 M, a diferentes velocidades (Vel.)

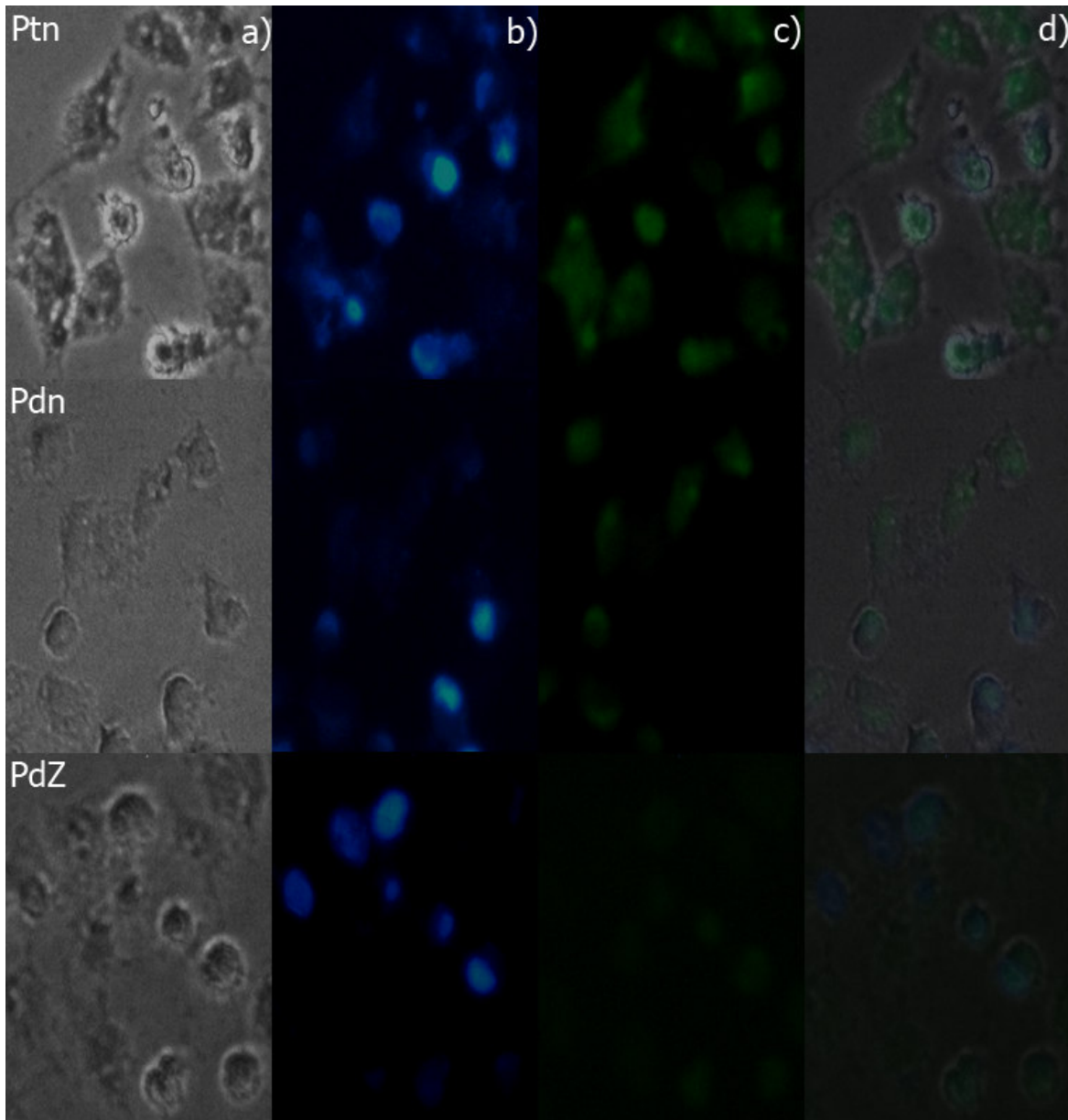
Vel. (mV/s)	Ep <sub>a1</sub> (mV)	I <sub>a</sub> (μA)	Ep <sub>c1</sub> (mV)	I <sub>c1</sub> (μA)	Ep <sub>a2</sub> (mV)	I <sub>a2</sub> (μA)	Ep <sub>c2</sub> (mV)	I <sub>c2</sub> (μA)
10	630	1	-53	1.4	-380	2.4	-440	6
75	660	5	-58	8.6	-350	8.3	-470	22
100	660	6	-58	9.3	-350	9.9	-470	25

El potencial de reducción es un parámetro farmacológico importante para estimar la reactividad-actividad de los fármacos. Cuando el potencial de reducción es alto, la reducción se produce muy rápido en la sangre, dando como resultado una serie de efectos secundarios, como reaccionar con proteínas o tioles intracelulares, (tetraplatino Ep -90 mV vs Ag/AgCl). Por otro lado, si el potencial de reducción es demasiado bajo, el fármaco no se reduce lo suficientemente rápido en el cuerpo y se excreta intacto o una cantidad significativa (iproplatino -730 mV vs Ag/AgCl). Es por ello que se debe de buscar compuestos con un potencial de reducción intermedio. Estas diferencias de potenciales hacen la diferencia en la actividad biológica.<sup>29</sup> De acuerdo a esta información, se puede sugerir que los compuestos **Pdn** y **Ptn**, tomando como base el valor de sus potenciales de reducción discutidos previamente, podrían tener una aceptable actividad biológica.

### 6.6. Evaluación biológica de los compuestos AcNac<sup>Fluores</sup>, Pdn, PdZ y Ptn.

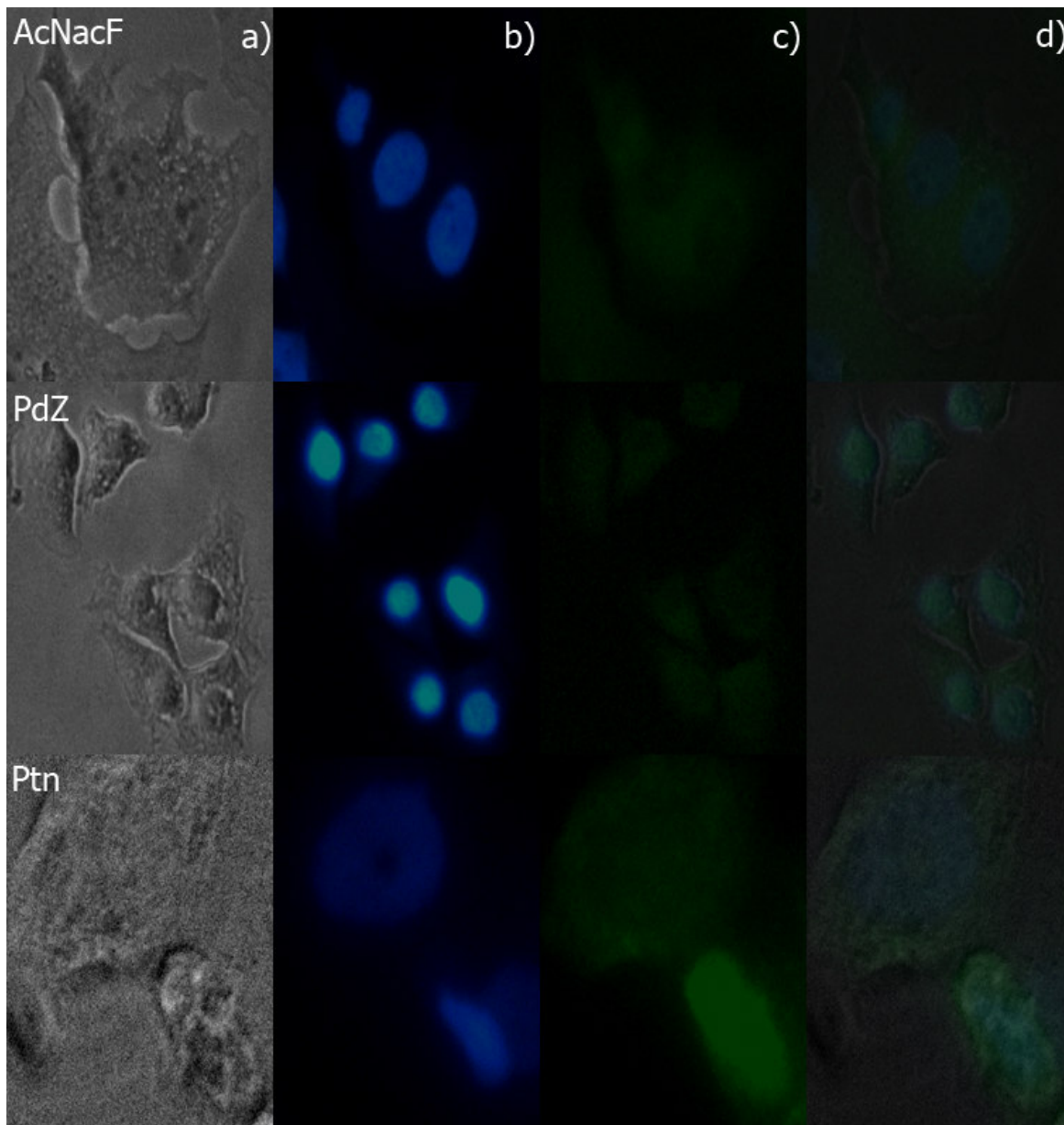
El primer objetivo fue realizar estudios para determinar la incorporación y localización de los compuestos en las líneas de cáncer HeLa (cáncer cervicouterino), T-47D (cáncer de mama) y PC-3 (cáncer de próstata). Por ello, el primer paso consistió en tratar dichas células con los complejos **Pdn**, **PdZ** y **Ptn** derivados del ligando **AcNac<sup>Fluores</sup>** y los precursores **Pd** y **Pt** (controles) por un tiempo de 6 y 24 h para la línea celular HeLa y T-47D, PC-3, respectivamente. Posteriormente, con la finalidad de localizar el núcleo, las células fueron fijadas y teñidas con **DAPI** (4',6-diamino-2-fenilindol).

En la figura 6.10 se muestra las imágenes de las células *HeLa* tratadas con los compuestos **Ptn**, **Pdn** y **PdZ**. Cabe resaltar, la incorporación de dichos complejos se lleva a cabo tanto en el núcleo como el citoplasma de las células estudiadas. En tanto, para el ligando libre **AcNac<sup>Fluores</sup>** no se observa fluorescencia en las células. Además, como es de esperar, las sales metálicas libres, no presentan el fenómeno de fluorescencia.



**Figura 6.10.** Imagen de células *HeLa* (20X) incubadas con el complejo Ptn, Ptn y PdZ a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M por un tiempo de 6h. a) Campo claro, b) Filtro DAPI ( $\lambda_{em} 461$  nm), c) Filtro Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{em} 520$  nm) d) Merge.

De manera análoga, el análisis de las imágenes de los estudios sobre la incorporación y posterior localización de los complejos en las células T-47D, pone en evidencia que el complejo **AcNac<sup>Fluores</sup>** se localizó principalmente en el citoplasma, PdZ en el núcleo y el Ptn tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 6.11.). En tanto, el análisis de las imágenes de las células tratadas con el complejo **Pdn**, no se pudo observar fluorescencia del mismo, dentro de la célula.

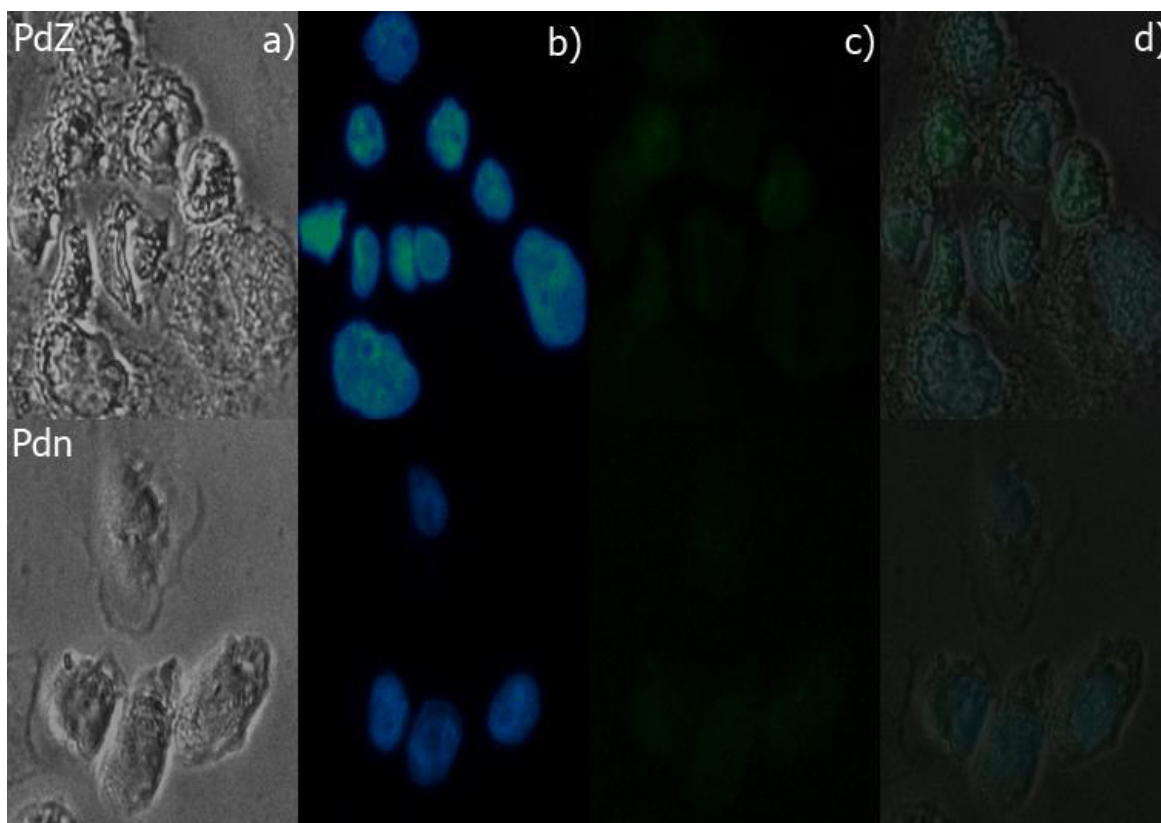


**Figura 6.11.** Imagen de células T-47D incubadas con el precursor AcNac<sup>Fluores</sup>, PdZ (20X) y Ptn (40X) en concentración  $1 \times 10^{-5}$  M por un tiempo de 24h. a) Campo claro, b) Filtro DAPI ( $\lambda_{em} 461$  nm), c) Filtro Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{em} 520$  nm) d) Merge.



Finalmente, el análisis de las imágenes obtenidas para las células PC-3, sugiere que los complejos **PdZ** y **Pdn** se encuentra inmersos en toda la célula (Figura 6.12.). Por otro lado, en el análisis de las imágenes de los estudios con el compuesto **Ptn** y el ligante libre **AcNac<sup>Fluores</sup>**, no permite observar fluorescencia dentro de las células.

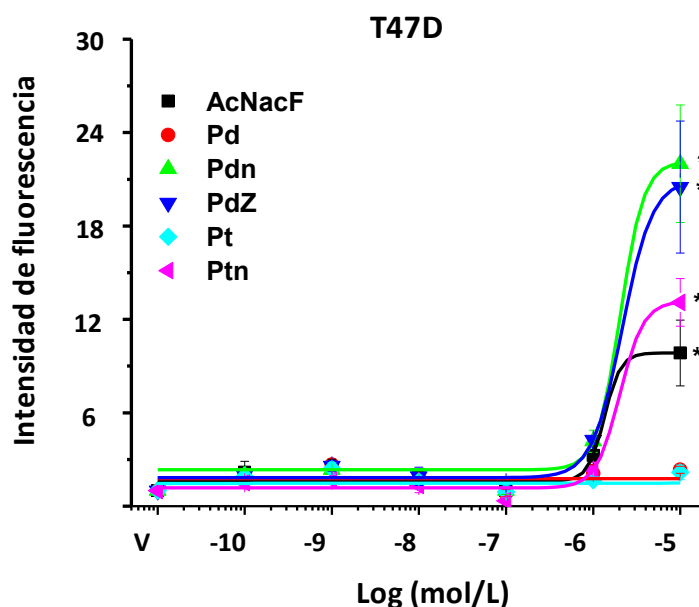
Las razones por las cuales se pueda deber esta nula incorporación de los compuestos en las células se pueden atribuir: i) al periodo corto en el tiempo de incubación de éstos con las células o ii) al mecanismo de entrada y posteriores interacciones, las cuales están en función de las diferentes propiedades que proporciona cada uno de los compuestos en las líneas celulares y iii) a las mismas diferencias entre las líneas celulares. Lo anterior se encuentra en relación a los efectos observados después de tratar algunas células de cáncer frente al complejo de fórmula  $[Pd(Acac)_2]$ .<sup>30</sup>



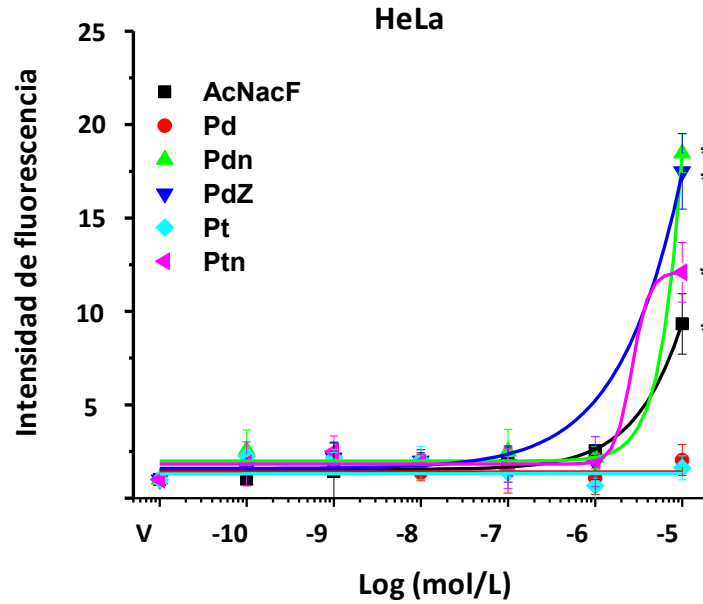
**Figura 6.12.** Imagen de células PC-3 (20X) incubadas con el complejo PdZ y Pdn en concentración  $1 \times 10^{-5}$  M por un tiempo de 24h. a) Campo claro, b) Filtro DAPI ( $\lambda_{em} 461$  nm), c) Filtro Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{em} 520$  nm) d) Merge

Teniendo los resultados anteriores, nuestro siguiente paso consistió en llevar a cabo la evaluación de la intensidad de fluorescencia que presentan los compuestos **Pdn**, **PdZ**, **Ptn**, así como de los precursores **AcNac<sup>Fluores</sup>**, **Pd**, **Pt**, variando las concentraciones desde  $1 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M, en las células HeLa, PC-3 y T-47D.

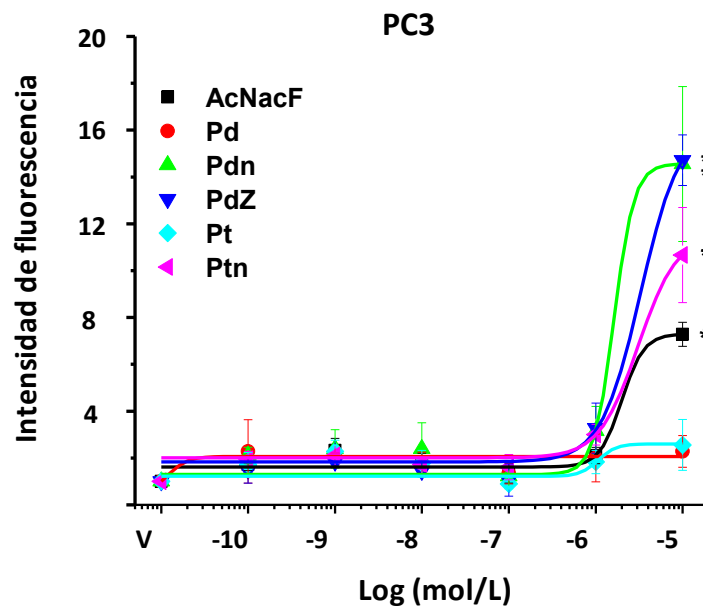
Del análisis de los resultados obtenidos se puede deducir que a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M hay mayor incorporación de los compuestos en las células, debido a que en esta concentración se observó un incremento de la intensidad de fluorescencia, de manera significativa comparado con el vehículo. Además, los precursores de **Pd** y **Pt** no presentaron fluorescencia, lo anterior encuentra fundamento a la falta de un fluoróforo en su estructura, como era de esperarse. En este sentido, después del análisis, resulta evidente que el compuesto **Pdn** presentó mayor intensidad de fluorescencia en las células T-47D (Figura 6.13.) y HeLa (Figura 6.14.); en tanto para la línea celular PC-3 los compuestos **Pdn** y **PdZ** obtuvieron la mejor intensidad de fluorescencia (Figura 6.15.).



**Figura 6.13.** Intensidad de fluorescencia en células T-47D incubadas en presencia de los distintos compuestos (**AcNac<sup>Fluores</sup>**, **Pd**, **Pdn**, **PdZ**, **Pt**, **Ptn**), en concentraciones  $1 \times 10^{-10}$ -  $1 \times 10^{-5}$  M, así como el vehículo (V), por 4 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de dos experimentos independientes por sextuplicado. \* $p < 0.05$  vs V.



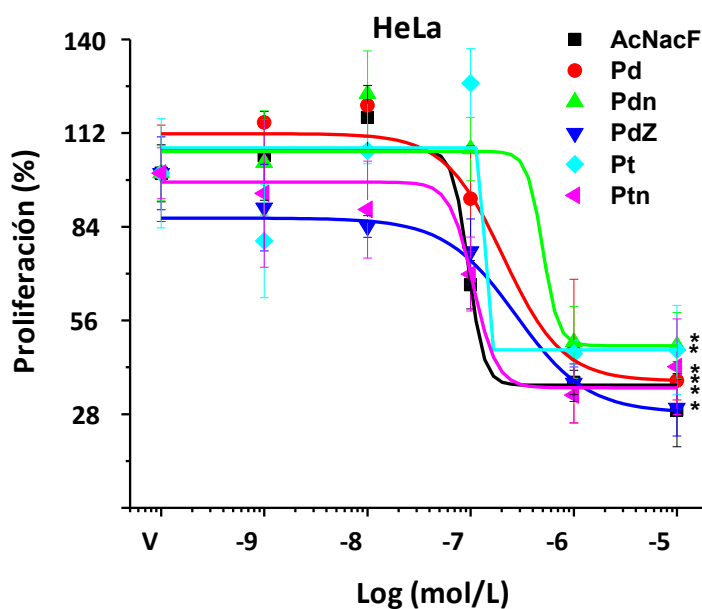
**Figura 6.14.** Intensidad de fluorescencia en células HeLa incubadas en presencia de los distintos compuestos (AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, Pdn, PdZ, Pt, Ptn), en concentraciones  $1 \times 10^{-10}$ -  $1 \times 10^{-5}$  M, así como el vehículo (V), por 3 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por sextuplicado. \* $p < 0.05$  vs V.



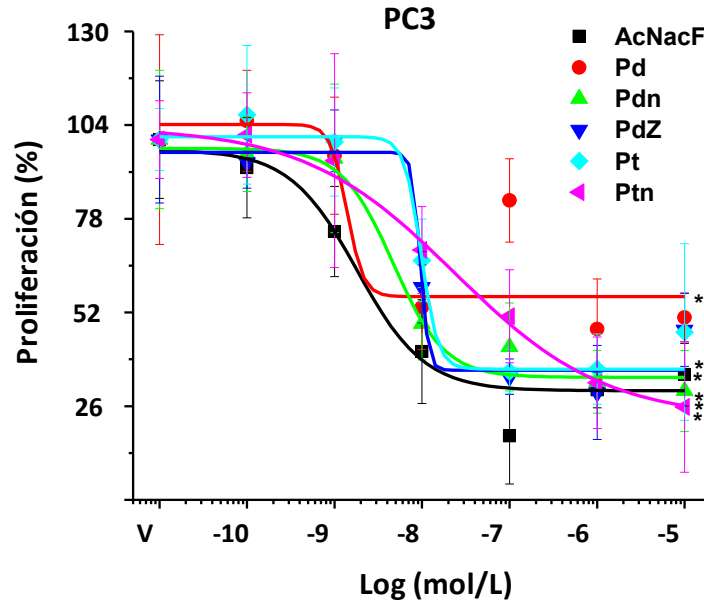
**Figura 6.15.** Intensidad de fluorescencia en células PC-3 incubadas en presencia de los distintos compuestos (AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, Pdn, PdZ, Pt, Ptn), en concentraciones  $1 \times 10^{-10}$ -  $1 \times 10^{-5}$  M, así como el vehículo (V), por 4 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por sextuplicado. \* $p < 0.05$  vs V.

Una vez obtenidos los resultados de la incorporación y localización de los compuestos dentro de las células, el siguiente paso consistió en llevar a cabo estudios de proliferación celular en las líneas mencionadas anteriormente. Estas células fueron estimuladas con los complejos sintetizados **PdZ**, **Pdn** y **Ptn** así como de los precursores **Pd**, **Pt** y el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** en diferentes concentraciones que van de valores de  $1 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M, durante un tiempo de 3-7 días en función del tipo de la línea celular.

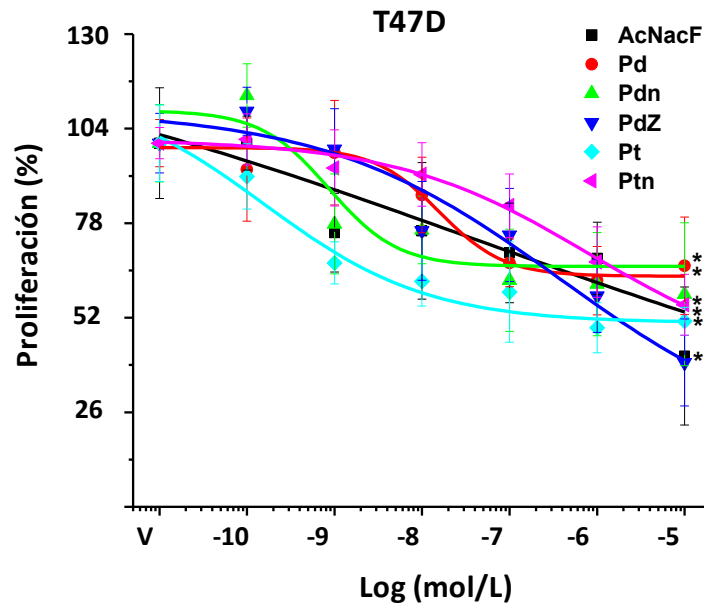
El análisis de los datos obtenidos demostró que a concentraciones altas de los compuestos el porcentaje de inhibición de la proliferación en las células fue mayor. Con los resultados se obtuvieron las curvas sigmoideas de dosis respuesta (Figura 6.16. - 6.18.), se calculó la concentración inhibitoria al 50% ( $CI_{50}$ ) (tabla 6.7) y se determinó el % de inhibición para cada uno de los compuestos en la concentración  $1 \times 10^{-5}$  M (tabla 6.8).



**Figura 6.16.** Células HeLa incubadas en presencia de los distintos compuestos (**AcNac<sup>Fluores</sup>**, **Pd**, **Pdn**, **PdZ**, **Pt**, **Ptn**), en concentraciones  $1 \times 10^{-9}$ - $1 \times 10^{-5}$  M, y DMSO (**V**) por 3 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de determinaciones por sextuplicado y representan al menos tres experimentos independientes. Los datos de las células tratadas con el vehículo se normalizaron al 100%. \* $p < 0.05$  vs V



**Figura 6.17.** Células PC3 incubadas en presencia de los distintos compuestos (AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, Pdn, PdZ, Pt, Ptn), en concentraciones  $1 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-5}$  M, y DMSO (V), por 4 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de determinaciones por sextuplicado y representan al menos tres experimentos independientes. Los datos de las células tratadas con el vehículo se normalizaron al 100%. \* $p < 0.05$  vs V



**Figura 6.18.** Células T-47D incubadas en presencia de los distintos compuestos (AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, Pdn, PdZ, Pt, Ptn), en concentraciones  $1 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-5}$  M, y DMSO (V), por 4 días. Los resultados son el promedio  $\pm$  DS de determinaciones por sextuplicado y representan al menos dos experimentos independientes. Los datos de las células tratadas con el vehículo se normalizaron al 100%. \* $p < 0.05$  vs V

Considerando los valores de las  $CI_{50}$  de cada compuesto, las células de cáncer cervicouterino (HeLa) mostraron la siguiente sensibilidad:  $AcNac^{Fluores} < Ptn < Pd < PdZ < Pdn < Pt$ . En tanto, para las células de cáncer de próstata (PC-3) la actividad observada fue:  $Pd < AcNac^{Fluores} < Pdn < PdZ < Pt < Ptn$ . Finalmente, en las células de cáncer de mama (T-47D) la respuesta fue:  $Pt < Pdn < Pd < AcNac^{Fluores} < PdZ < Ptn$ .

Cabe resaltar, que los valores de  $CI_{50}$  presentados por los compuestos son del orden de nano-molar para lastres líneas celulares (tabla 6.7). En tanto, los valores reportados para el cisplatino, son los siguientes:  $3.82 \pm 0.52 \mu M$  para células HeLa y un  $30 \pm 2 \mu M$  para células T-47D. <sup>21,31,32</sup> Así, tomando como base los resultados obtenidos a la fecha, nos permite sugerir que las modificaciones químicas generadas por el ligante  $AcNac^{Fluores}$  sobre el centro metálico (Pd o Pt) propician una mejora en sus propiedades anticancerígenas.

**Tabla 6.7. Concentraciones inhibitorias al 50% ( $CI_{50}$  en M), de los compuestos en células de cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer de mama (T-47D) Y cáncer de próstata (PC-3).**

Compuesto	HeLa	PC-3	T-47D
$AcNac^{Fluores}$	9.50E-8	1.80E-9	4.65E-8
<i>Pd</i>	2.07E-7	1.38E-9	1.57E-8
<i>Pdn</i>	4.99E-7	4.64E-9	8.65E-10
<i>PdZ</i>	2.75E-7	9.04E-9	3.81E-7
<i>Pt</i>	1.00E-6	9.71E-9	1.59E-10
<i>Ptn</i>	1.05E-7	2.36E-8	8.08E-7

De manera complementaria, en la tabla 6.8 se recogen los porcentajes de inhibición de la proliferación celular (I%) ejercido por los compuestos a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M. Del análisis de los mismos podemos deducir que las especies ***Pdz*, *Ptn*, *Pdz*** fueron los complejos más potentes para inhibir la proliferación en las células HeLa, PC-3, y T-47D, respectivamente.

Tabla 6.8. % de inhibición a la concentración de $1 \times 10^{-5}$ M en células de cáncer			
Compuesto	HeLa	PC-3	T-47D
<i>AcNac<sup>Fluores</sup></i>	71	65	58
<i>Pd</i>	62	49	34
<i>Pdn</i>	52	70	41
<i>PdZ</i>	70	53	60
<i>Pt</i>	53	53	49
<i>Ptn</i>	58	74	44

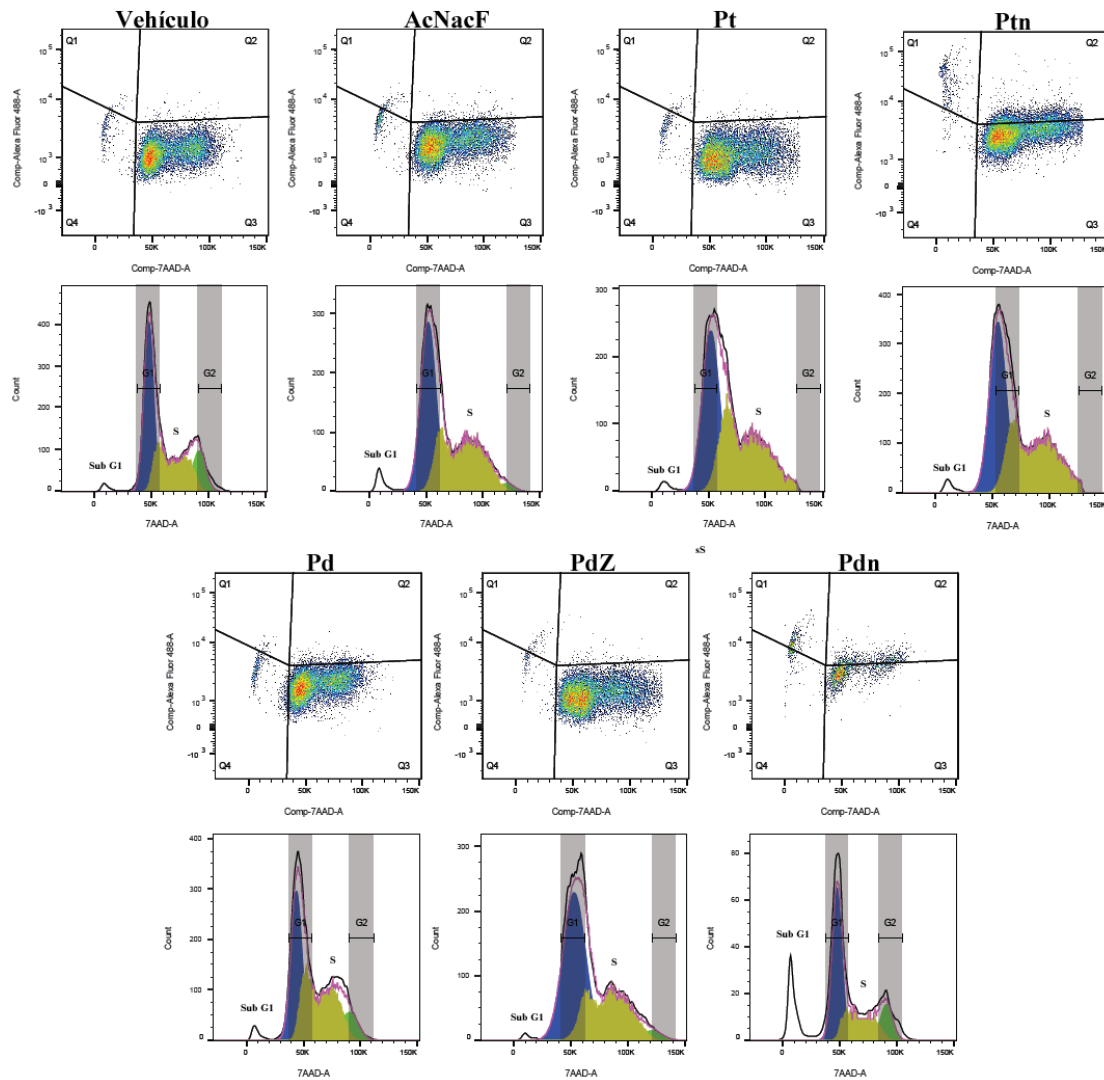
De acuerdo a los resultados obtenidos, descritos previamente, se decidió evaluar el efecto de los complejos en el ciclo celular, teniendo por objetivo indagar de manera más precisa la acción de los compuestos dentro de las células. El último paso de esta investigación consistió en determinar el contenido del ADN de las células mediante la incorporación de 7-amino-actinomicina (7ADD) y calcular el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases de dicho ciclo (subG1, G0/G1, S y G2/M). Además, la naturaleza fluorescente del ligante *AcNac<sup>Fluores</sup>* en la estructura de los complejos, nos permitió medir de manera directa la fluorescencia en las mismas células.

En la figura 6.19 se muestran los histogramas del perfil del DNA de las células *HeLa*, en presencia del vehículo, el ligante *AcNac<sup>Fluores</sup>*, los precursores (*Pd* y *Pt*) y los complejos sintetizados (*Pdn*, *PdZ* y *Ptn*).

En los histogramas (AlexaFluor 488 vs 7ADD) en los que se evaluó la fluorescencia, en el cuadrante Q1 podemos encontrar a las células muertas con fluorescencia (**CMF**), en Q2 células viables con fluorescencia (**CVF**), en Q3 las células viables sin fluorescencia (**CVSF**) y en Q4 las células muertas sin fluorescencia (**CMSF**). Con esta distribución de las células en los distintos cuadrantes, podemos fácilmente identificar que las células muertas encontradas en Q1 se debió, en principio, al efecto de los compuestos *Pdn*, *Pdz* y *Ptn*, pues todos estos presentan fluorescencia. Dicha muerte celular se atribuye al mecanismo de reacción-acción de los complejos en las células. Estos resultados corroboran las imágenes de la incorporación y localización de los compuestos discutidas en párrafos anteriores.

En tanto, en Q3 las **CVSF** indica que no todas las células incorporan el respectivo compuesto, confirmando los resultados de la figura 6.10. Finalmente, en Q4 (**CMSF**), la muerte celular es debido a otras causas y no por el compuesto fluorescente en cuestión.

Además, podemos sugerir que las **CVF** (Q2) podrían llegar a la muerte celular (**Q1**) durante tiempos de exposición prolongados.



**Figura 6.19.** Se muestran los histogramas de distribución de células HeLa en cada fase del ciclo celular obtenida mediante la determinación de ADN por incorporación de 7-amino-actinomicina (7-ADD). Las células se encuentran en presencia del vehículo y los compuestos AcNac<sup>Fluores</sup>, Pd, PdZ, Pt, Ptn, en concentración  $1 \times 10^{-6}$  M. Estos resultados se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos representan uno de dos experimentos individuales.



A partir de estos resultados se generó la tabla 6.9, que muestra los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	SubG1 (muertas)	G0/G1	S	G2/M
<i>Vehículo</i>	1.84	45.9	34.6	14.6
<i>AcNac<sup>Fluores</sup></i>	2.25	49.1	46.1	2.18
<i>Pd</i>	2.66	39.9	46.0	11.6
<i>Pdn</i>	16.4	44.8	23.6	13.0
<i>PdZ</i>	4.70	56.4	35.4	3.50
<i>Pt</i>	0.00	47.0	52.3	0.31
<i>Ptn</i>	0.54	49.4	48.6	0.19

Las células tratadas con el ligante *AcNac<sup>Fluores</sup>* presentaron incremento significativo en la fase S (49%), en comparación con las células tratadas con el vehículo (35%). En tanto, para las fases G0/G1 y Sub G1 se observó un pequeño aumento, y por consecuente en la fase G2/M hubo una disminución del porcentaje celular. Así, se puede deducir de manera particular, que este compuesto indujo un arresto celular provocado en las fases S.

Para el precursor de *Pd*, también se observó arresto celular en la fase S (46%), las fases G0/G1 y G2/M presentaron disminución del porcentaje celular, y sub G1 aumentó un poco, comparado con las células sin tratamiento.

El compuesto *Pdn*, no presentó diferencia significativa de las fases G0/G1 y G2/M en comparación con el vehículo. Sin embargo, se puede observar una disminución celular en la fase S (24%). Además, la fase Sub G1 (16%) aumentó significativamente en comparación con las células tratadas con el vehículo, lo cual indica que para este compuesto las células se someten a la muerte celular (a través de la apoptosis) antes de que sean arrestadas en la fase S.

Mientras tanto, el análisis de los resultados obtenidos para el compuesto **PdZ**, permite sugerir el arresto celular en las fases G0/G1 (56%), un pequeño aumento en la fase Sub G1 (5%), y por consecuente una disminución en la fase G2/M (3%). La fase S no presentó diferencias significativas. Se ha reportado que el arresto del ciclo celular en la fase G1, es debido a la activación de la proteína supresora p53 por daño en el ADN, por fármacos citotóxicos, hipoxia, o señalización oncogénica, entre otras, por consecuente inhibe la proliferación celular o activa apoptosis.<sup>33</sup>

Por otro lado, el porcentaje de células en la fase S para los tratamientos **Pt** y **Ptn** se incrementó, en comparación con el vehículo, dando como resultado un 52% y 48% respectivamente. Estos resultados indican un arresto de células en la fase S del ciclo celular. Aunado a lo anterior, en la fase G0/G1 se puede observar un pequeño incremento y como consecuencia hay una disminución casi total en la proporción de células en la fase G2/M dando un 0.31% para **Pt** y un 0.19% para **Ptn**. En la fase SubG1 la proporción de células fue prácticamente nula. El arresto celular en la fase S, concuerdan con datos previamente reportados para compuestos análogos derivados del Pt.<sup>33,34</sup> Agentes que dañan el ADN como el Pt pueden inducir expresión de p21 dependiente o independiente de p53. Se ha observado que p21 puede retardar la progresión de la fase S a través de su capacidad de unirse e inhibir la función del complejo ciclina A-CDK2. Ciclina A-CDK2 es un regulador pivote de la progresión de la fase S.<sup>34</sup>

Cabe mencionar que, dado a los tiempos requeridos para la elaboración del presente proyecto, no se llevó a cabo los estudios pertinentes para las otras líneas celulares.

## 7. CONCLUSIONES.

- Se encontraron las condiciones de reacción óptimas para poder llevar a cabo la síntesis del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** en cantidades de gramos, con la concomitante caracterización mediante técnicas espectroscópicas comunes.
- El complejo zwitteriónico de paladio (**PdZ**) soportado con el ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** se sintetizó siguiendo la metodología depurada en nuestro grupo de investigación. El complejo fue caracterizado empleando técnicas espectroscópicas comunes. Sin embargo, nuestros intentos dirigidos a obtener cristales adecuados para estudios de difracción de rayos X de monocristal han sido infructuosos a la fecha.
- Los complejos neutros de paladio (**Pdn**) y platino (**Ptn**), se sintetizaron con buenos rendimientos en cantidades de 0.5 g. Además, se caracterizaron mediante las técnicas de espectroscopía comunes, el análisis de estas pone de manifiesto la formación de una segunda especie en solución. De igual manera que para el **PdZ**, los intentos para obtener cristales y poder elucidar su estructura por medio de rayos X fueron infructuosos a la fecha.
- Los complejos neutros de paladio (**Pdn**) y platino (**Ptn**) presentaron un potencial reductor de -560 mV y -470 mV respectivamente, el cual los hace más sensibles a tener una mejor actividad biológica.
- La evaluación biológica del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** y de sus complejos de paladio como el de platino demostraron mediante su fluorescencia que pueden entrar a las células de cáncer de mama (T-47D), próstata (PC-3) y cervicouterino (HeLa) y localizarse tanto el núcleo como en el citoplasma.

- Los complejos (***PdZ***, ***Pdn***, y ***Ptn***) así como el ligante (***AcNac<sup>Fluores</sup>***) inhibieron la proliferación de las líneas de cáncer de mama (T-47D), próstata (PC-3) y cervicouterino (HeLa).
- Los valores de concentraciones, para inhibir al 50 por ciento el crecimiento de las células (CI 50%), para los complejos (***PdZ***, ***Pdn***, y ***Ptn***) y el ligante (***AcNac<sup>Fluores</sup>***) fueron mejores ( $10^{-9}$  M) en comparación a los reportados ( $10^{-6}$  M).
- La evaluación del ciclo celular demostró que los complejos son capaces de detener el ciclo celular en células HeLa y en su defecto mandar a la célula a la muerte celular mediante apoptosis.

## 8. REFERENCIAS

- [1] (a) Dose, E. V.; Murphy, K. M. M.; Wilson, L. J., *Inorg. Chem.*, **1976**, *15*, 2622. (b) Neumayer, D. A.; Belot, J. A.; Feezel, R. L.; Reedy, C.; Stern, C. L.; Marks, T. J.; Liable-Sands, L. M.; Rheingold, A. L., *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 5625.
- [2] (a) Ikeno, T.; Sato, M.; Yamada, T., *Chem. Lett.*, **1999**, *12*, 1345. (b) Doherty, S.; Errington, R. J.; Housley, N.; Ridland, J.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J., *Organometallics*, **1999**, *18*, 1018. (c) Kim, J.; Hwang, J.-W.; Kim, Y.; Lee, H. M.; Han, Y.; Do, Y., *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *620*, 1.
- [3] (a) Lee, D.-H.; Jung, J.-Y.; Jin, M.-J., *Green Chem.*, **2010**, *12*, 2024. (b) Studebaker, D. B.; Neumayer, D. A.; Hinds, B. J.; Stern, C. L.; Marks, T. J., *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 3148. (c) Xiang-Yong Gu, Xiang-Zong Han, Ying-Ming Yao, Yong Zhang, Qi Shen, J. *Organomet. Chem.*, **2010**, *695*, 2726. (d) Macedo, F. P.; Gwengo, C.; Lindeman, S. V.; Smith, M. D.; Gardinier, J. R.; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 3200. (e) Liu, Z.; Chen, H.-X.; Huang, D.; Zhang, Y.; Yao, Y.-M.; *J. Organomet. Chem.*, **2014**, *749*, 7.
- [4] (a) Kim, J.; Hwang, J.-W.; Kim, Y.; Lee, M. H.; Han, Y.; Do, Y.; *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *620*, 1. (b) Xie, G.; Li, Y.; Sun, J.; Qian, C., *Inorg. Chem. Commun.*, **2009**, *12*, 796. (c) Bryliakov, K. P.; Talsi, E. P.; Moller, H. M.; Baier, M. C.; Mecking, S., *Organometallics*, **2010**, *29*, 4428. (d) Huang, Y.-B.; Jin, G.-X.; *Dalton Trans.*, **2009**, 767.
- [5] Zhang, C.; Yang, P.; Yang, Y.; Huang, X.; Yang, X.-J.; Wu, B., *Syn. Comm.*, **2008**, *38*, 2349.
- [6] Tronnier, A.; Metz, S.; Wagenblast, G.; Muenster, I.; Strassner, T., *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 3297.
- [7] Micksch, M.; Tenne, M.; Strassner, T., *Organometallics*, **2014**, *33*, 3464.

- [8] Tronnier, A.; Nischan, N.; Metz, S.; Wagenblast, G.; Muenster, I.; Strassner, T., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2014**, (1), 256.
- [9] (a) Matsumoto, T.; Taube, D. J.; Periana, R. A.; Taube, H.; Yoshida, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7414. (b) Wong-Foy, A. G.; Bhalla, G.; Liu, X.-Y.; Periana, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 14292.
- [10] (a) Tenn, III, W. J.; Young, K. J. H.; Oxgaard, J.; Nielsen, R. J.; Goddard, III, W. A.; Periana, R. A.; *Organometallics*, **2006**, *25*, 5173. (b) Oxgaard, J.; Muller, R. P.; Goddard, III, W. A.; Periana, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 352. (c) Bischof, S. M.; Ess, D. H.; Meier, S. K.; Oxgaard, J.; Nielsen, R. J.; Bhalla, G.; Goddard, III, W. A.; Periana, R. A.; *Organometallics*, **2010**, *29*, 742.
- [11] (a) Bhalla, G.; Liu, X.-Y.; Oxgaard, J.; Goddard, III, W. A.; Periana, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11372. (b) Tenn, III, W. J.; Young, K. J. H.; Bhalla, G.; Oxgaard, J.; Goddard, III, W. A.; Periana, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 14172.
- [12] Lopez, J. A.; Mereiter, K.; Paneque, M.; Poveda, M. L.; Serrano, O.; Trofimenko, S.; Carmona, E.; *Chem. Commun.*, **2006**, 3921.
- [13] (a) Alvarez, E.; Conejero, S.; Lara, P.; Lopez, J. A.; Conejero, S.; Paneque, M.; Petronilho, A.; Poveda, M. L.; del Río, D.; Serrano, O.; Carmona, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14130. (b) Conejero, S.; Lara, P.; Paneque, M.; Petronilho, A.; Poveda, M. L.; Serrano, O.; Batire, F.; Alvarez, E.; Maya, C.; Salazar, V.; Carmona, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4380.
- [14] Serrano, O.; Nicasio-Collazo, J.; Morales, G.; Alvarado-Monzon, J. C.; Torres-Huerta, A.; Hopfl, H.; Lopez, J. A.; Esqueda, A. C., *Organometallics* **2014**, *33*, 2561.

- [15] (a) Mayra Evangelina Valerio Martínez, Oracio Serrano. *Verano de la Investigación Científica UG*. **2012**. (b) Mayra Valerio, Jorge A. López, Oracio Serrano. *245th American Chemical Society National Meeting*, New Orleans, USA. **2013**.
- [16] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). “Estadísticas a propósito del día Mundial contra el Cáncer (4 de febrero)”, Febrero 2016, disponible en [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf) (consultado el día 11 de octubre del 2016)
- [17] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., *Cancer statistics, 2015, CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65, (1), 5–29.
- [18] NCI Dictionary of cancer terms, disponible en <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=45333> (consultado el día 11 de octubre del 2016)
- [19] Cutillas N., Martínez A., Yellol G. S., Rodríguez V., Zamora A., Pedreño M., Donaire A., Janiak C., Ruiz J., *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 13529.
- [20] Wilson, J. J.; Lippard S. J., *Chemical Reviews* 114, (8), 4470-4495.
- [21] Wilson, J. J.; Lippard S. J., *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 5326.
- [22] Mayra Evangelina Valerio Martínez, *Tesis Licenciatura*, **UG-2015**.
- [23] Daniel Antonio Ruiz Plaza, *Tesis Doctoral*, **UG en proceso**.

- [24] Sasamori, T.; Matsumoto, T.; Takeda, N.; Tokitoh, N., *Organometallics*, **2007**, (26) 15, 3621-3623.
- [25] <https://www.atcc.org/products/all/HTB-20.aspx#characteristics>
- [26] Shen C., Harris B. D. W., Dawson L. J., Charles K. A., Hambley T. W., New E. J., *Chem. Comm.*, **2015**, 51, 6312-6314.
- [27] Margulies, D.; Melman, G.; Shanzer, A.; *Nat. Mater.* **2005**, 4 (10), 768-771.
- [28] Icart L. P.; Fernandes E.; Agüero L.; Ramón J.; Zaldivar D.; Dias M. I.; *J. Appl. Polym. Sci.*; **2016**, 42994.
- [29] Reithofer, M. R.; Bytzek, A. K.; Valiahdi, S. M.; Kowol, C. R.; Groessl, M.; Hartinger, C. G.; Jakupcek, M. A.; Galanski M.; Keppler, B. K., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, **2011**, 46-51.
- [30] a) B. Therrien, G. Suss-Fink, P. Govindaswamy, A. K. Renfrew, P. J. Dyson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 3773-3776. b) Y. Wang, J. Hu, Y. Cai, S. Xu, B. Weng, K. Peng, X. Wei, T. Wei, H. Zhou, X. Li, G. Liang, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 9601-9611.
- [31] Enders, M.; Gorling, B.; Braun, A. B.; Seltenreich, J. E.; Reichenbach, L. F.; Rissanen, K.; Nieger, M.; Luy, B.; Schepers, U.; Brase, S., *Organometallics* 33, (15), **2014**, 4027-4034.
- [32] Huang, K.-B.; Chen, Z.-F.; Liu, Y.-C.; Li, Z.-Q.; Wei, J.-H.; Wang, M.; Zhang, G.-H.; Liang, H., *European journal of Medicinal Chemistry* 63, **2013**, 76-84.
- [33] Romero-Canelón, I.; Salassa, L.; Sadler, P. J. J. *Med. Chem.* **2013**, 56, 1291-1300.



- [34] Zheng, H.; Hu, W.; Yu, D.; Shen, D. Y.; Fu, S.; Kavanagh, J. J.; Wei, C.; Yang, D. J. *Pharm. Res.* **2008**, 25, 2272–2282.

## 9. ANEXOS

### I. Espectroscopía de Resonancia Magnética

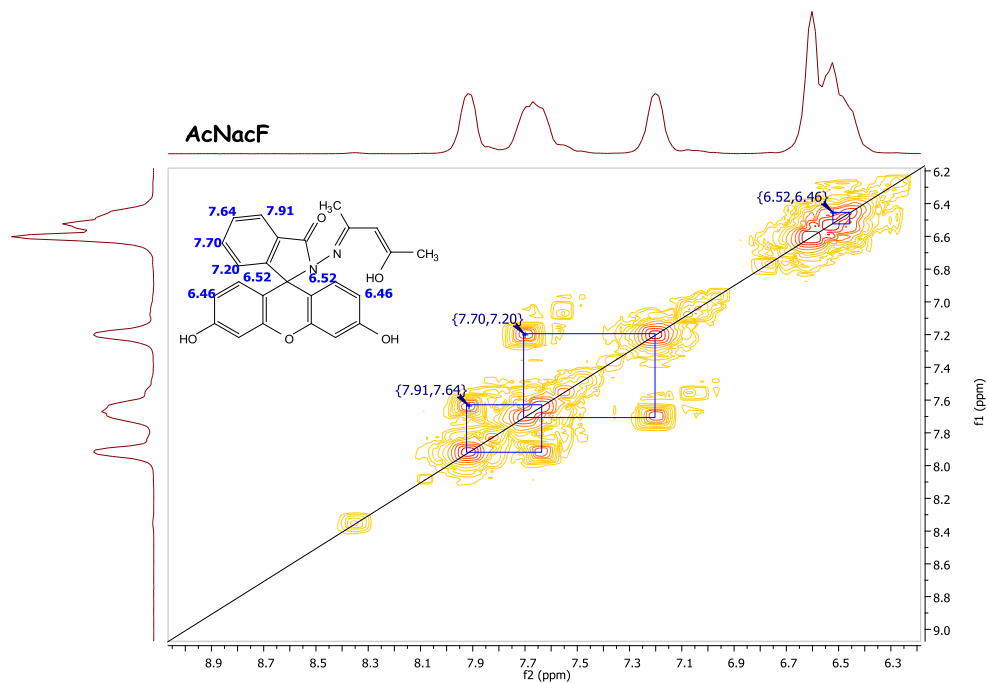


Figura 1.1. Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del ligante AcNacFluores

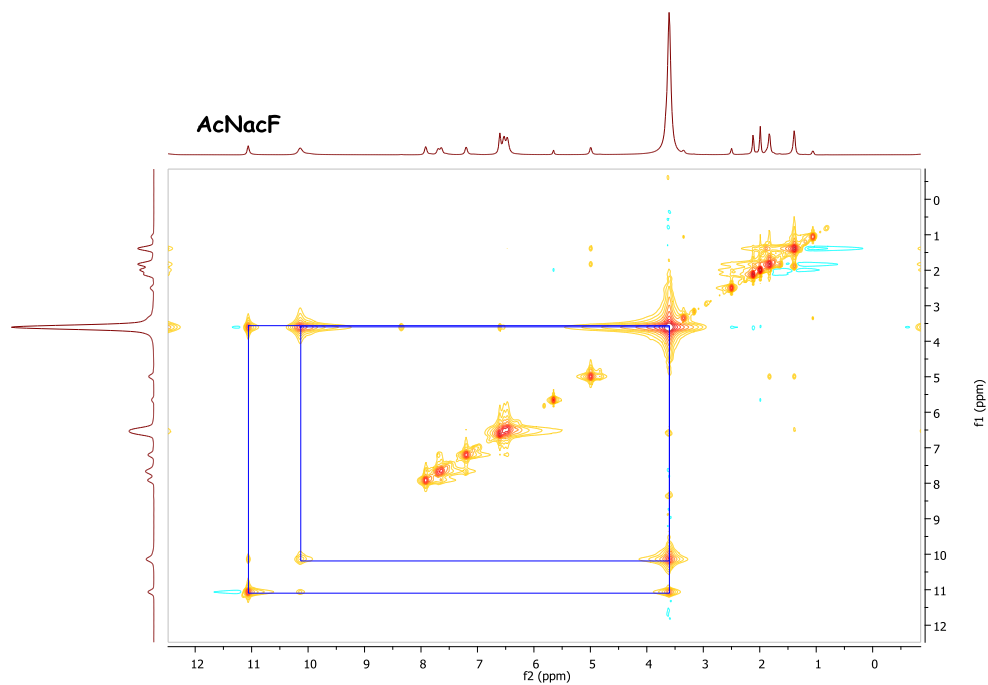


Figura 1.2. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del ligante AcNacFluores

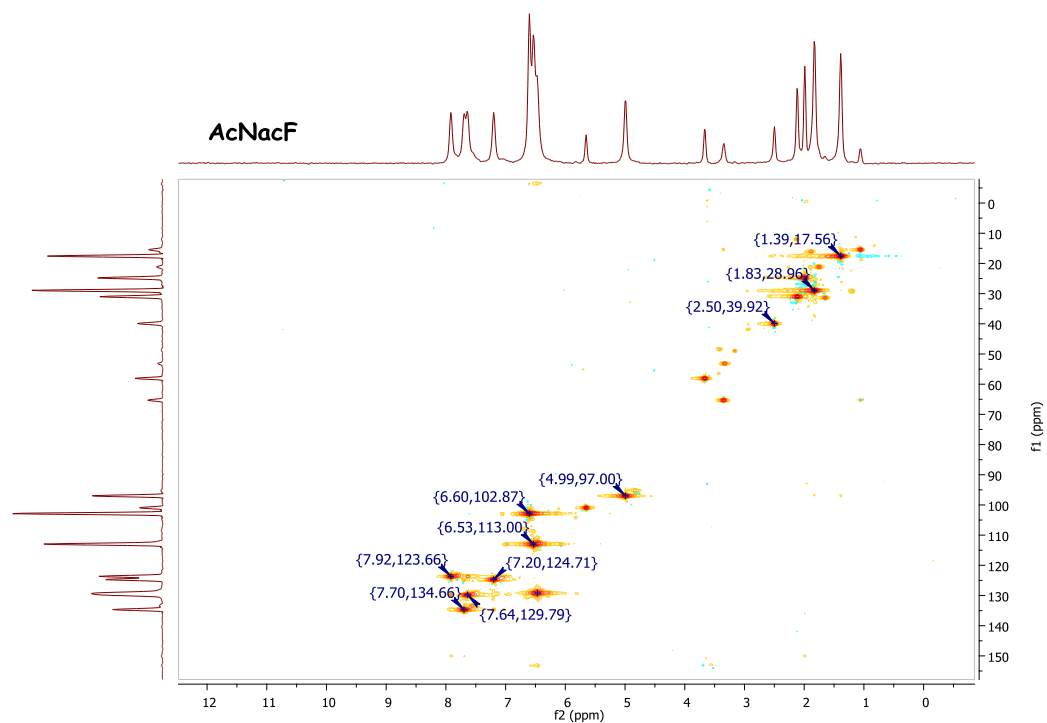


Figura 1.3. Espectro de RMN HSQC (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del ligante AcNacFluores

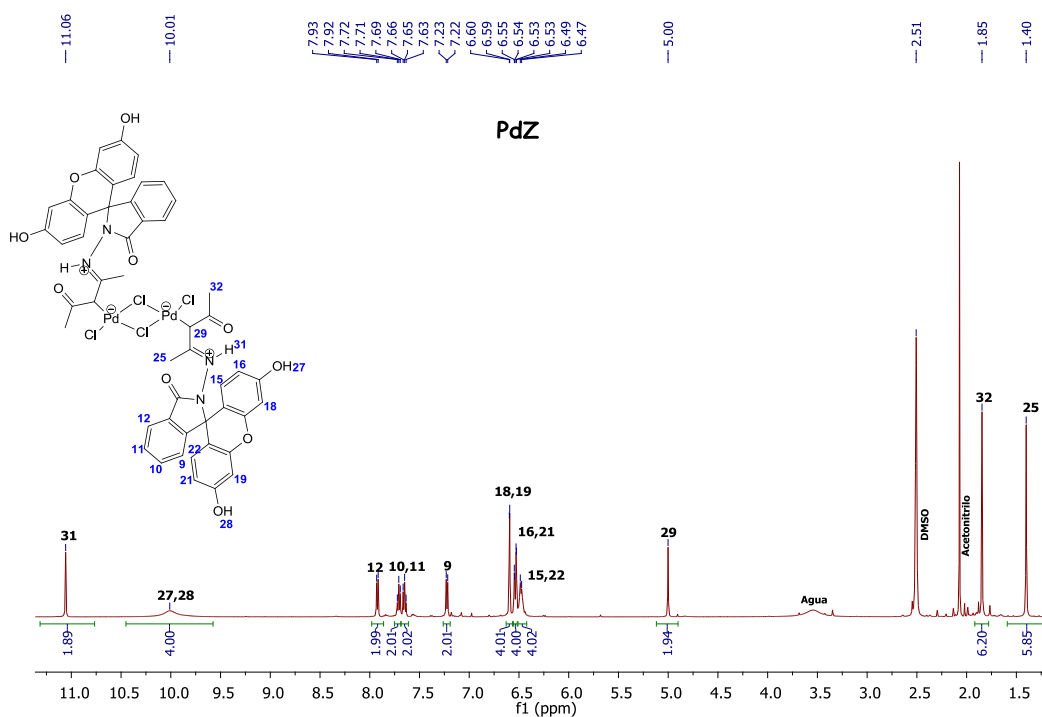


Figura 1.4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del complejo  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4 \text{AcNacFluores}]_2$

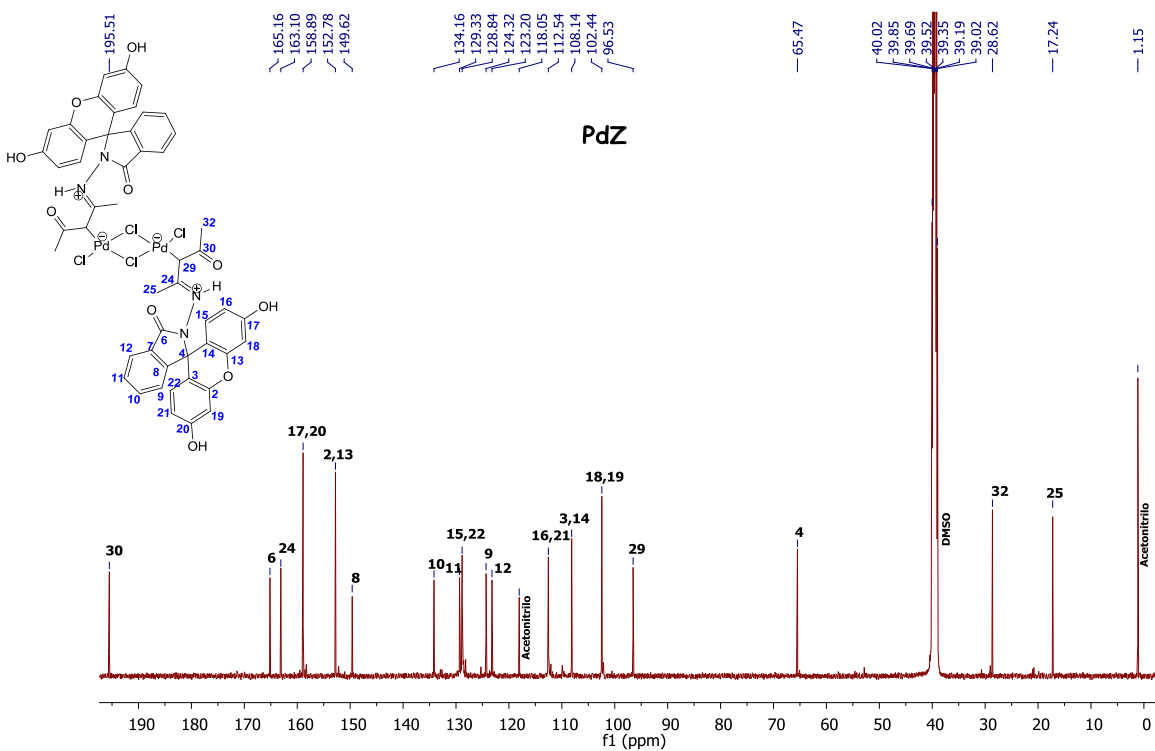


Figura 1.5. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> AcNac<sup>Fluores</sup>]<sub>2</sub>

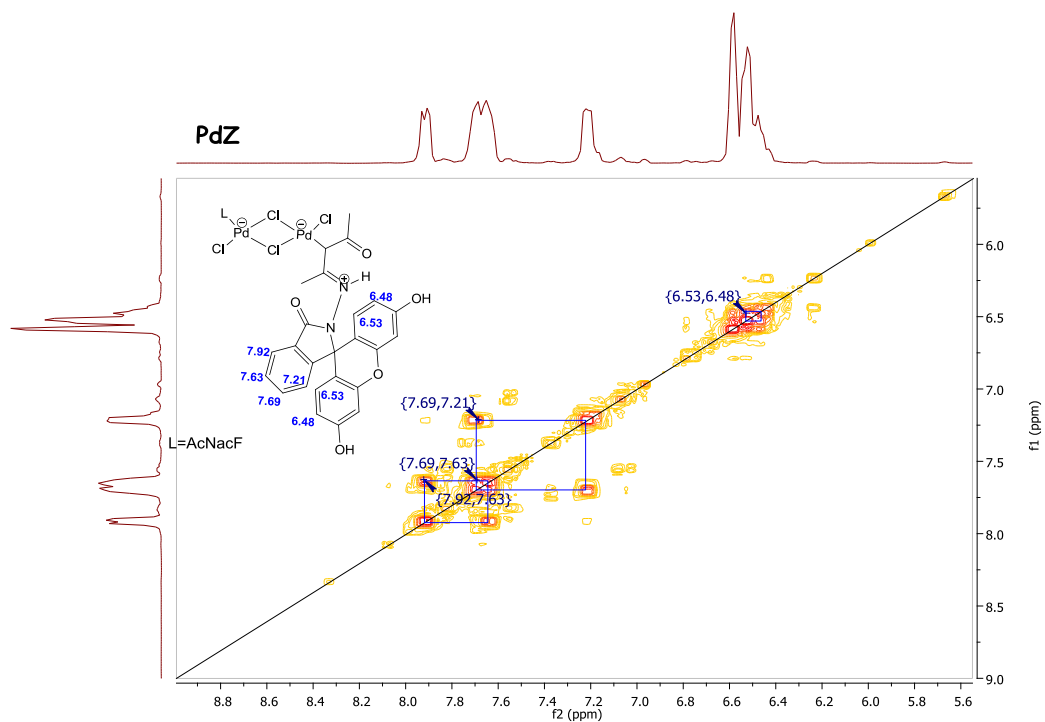


Figura 1.6. Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> AcNac<sup>Fluores</sup>]<sub>2</sub>

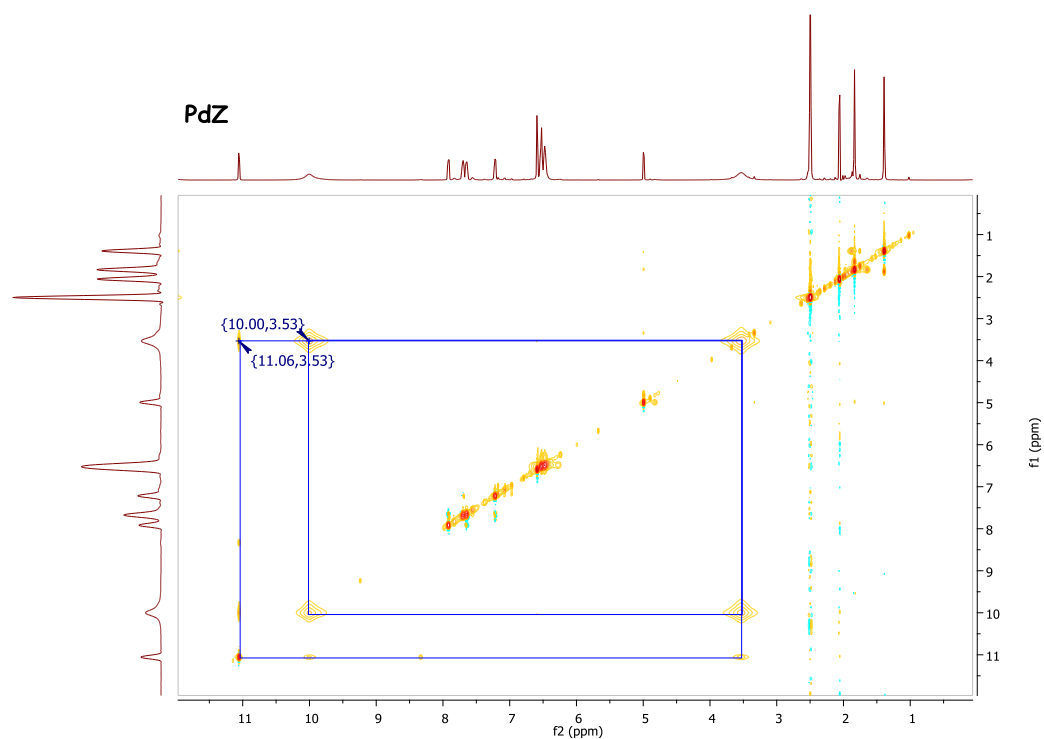


Figura 1.7. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> AcNac<sup>Fluores</sup>]<sub>2</sub>

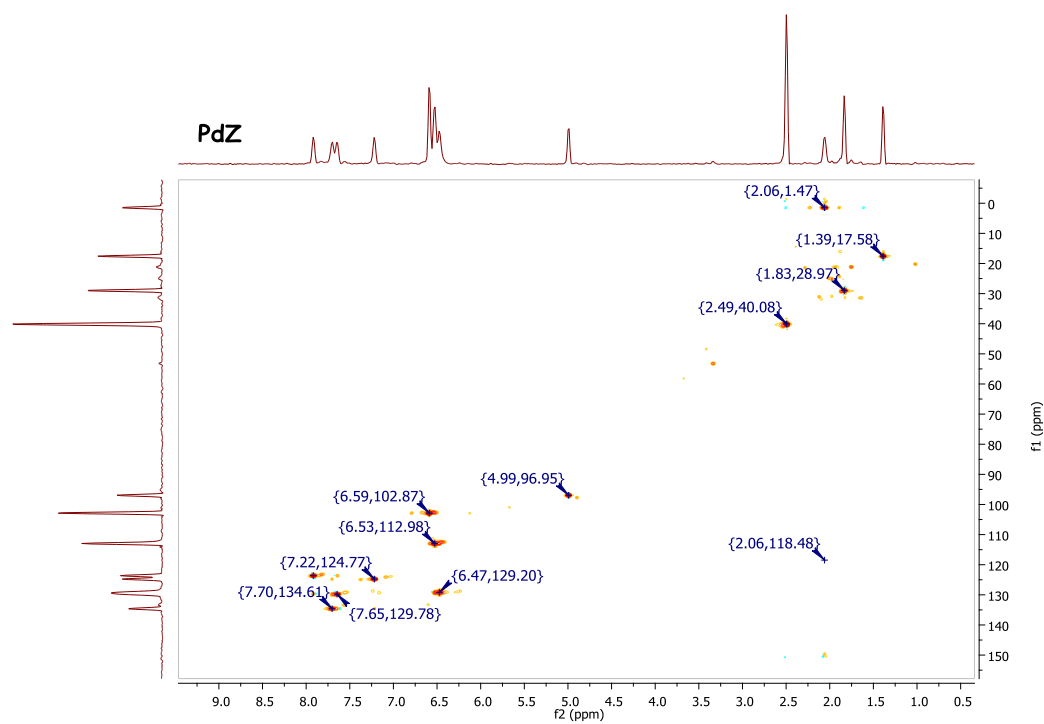
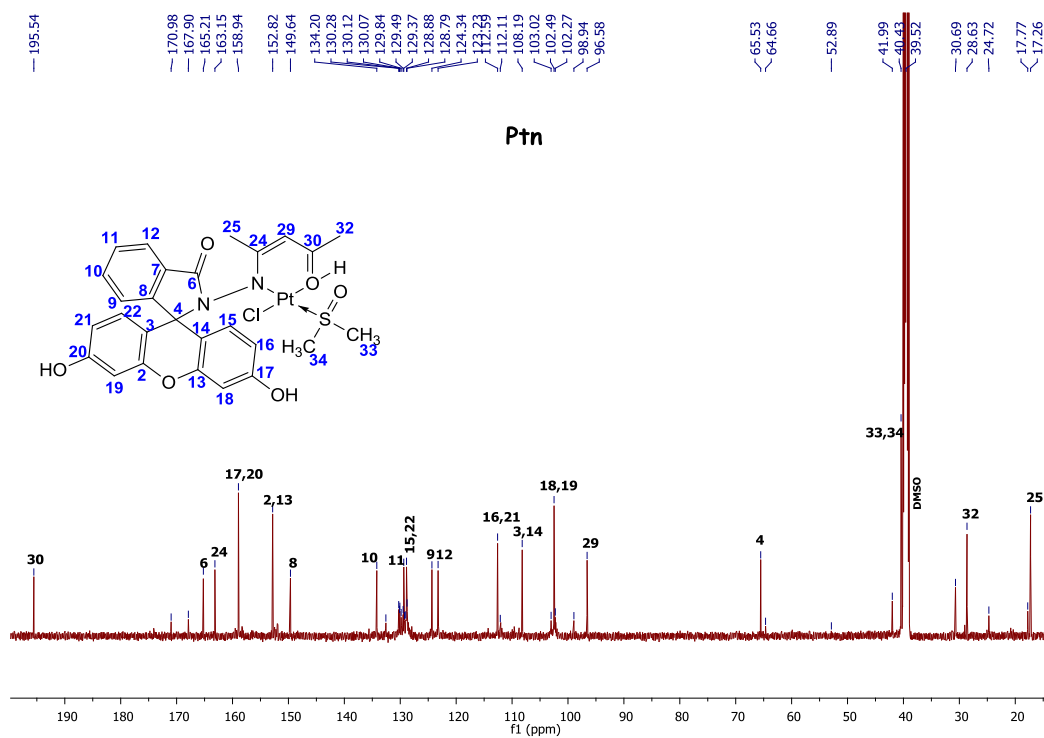
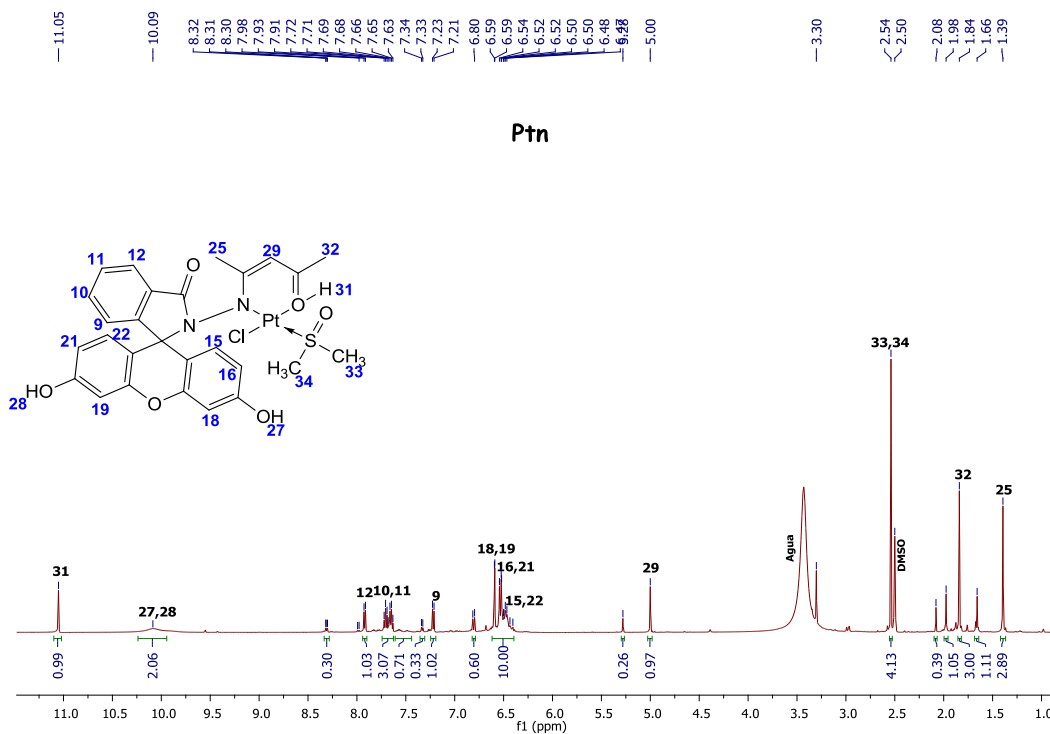


Figura 1.8. Espectro de RMN HSQC (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> AcNac<sup>Fluores</sup>]<sub>2</sub>



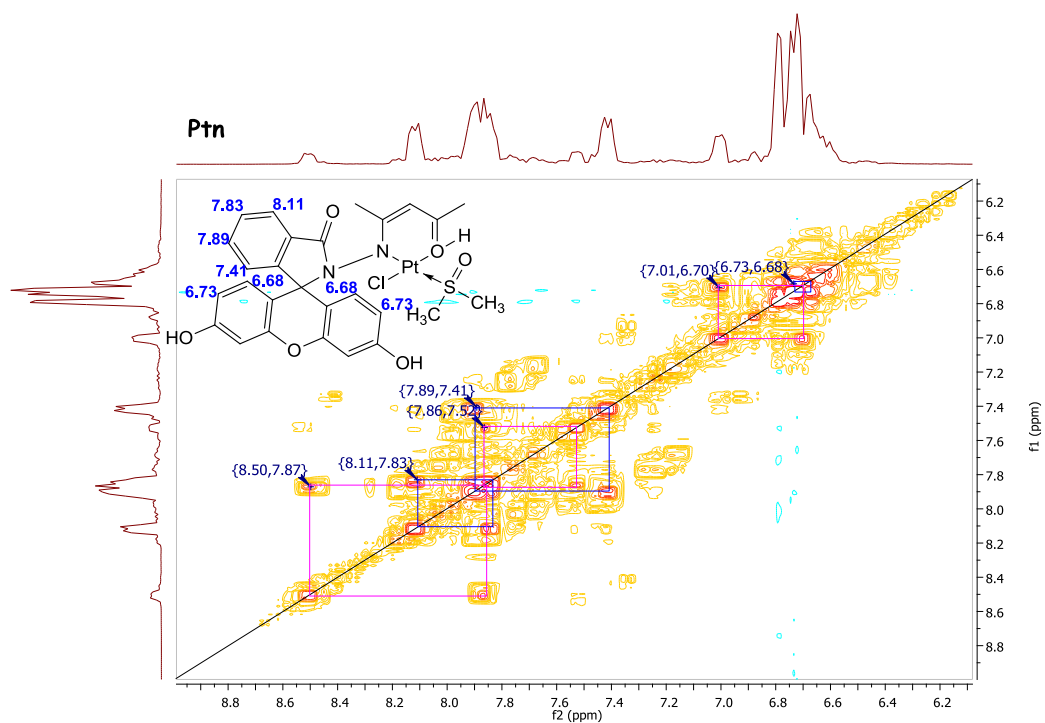


Figura 1.11. Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del complejo  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]$

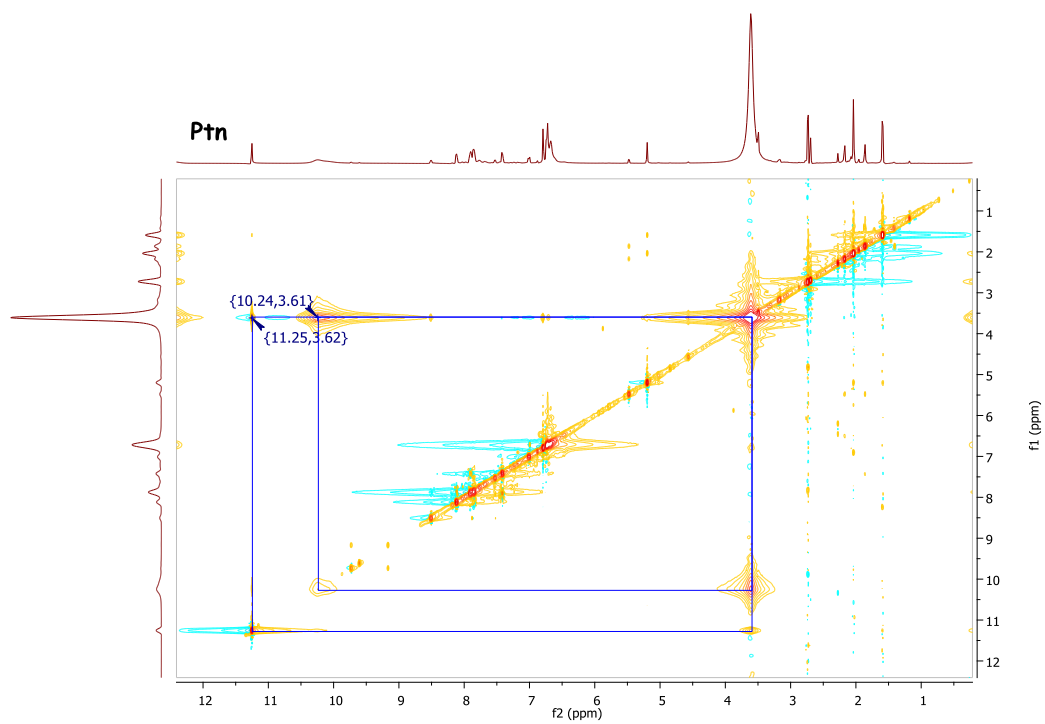


Figura 1.12. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) del complejo  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]$

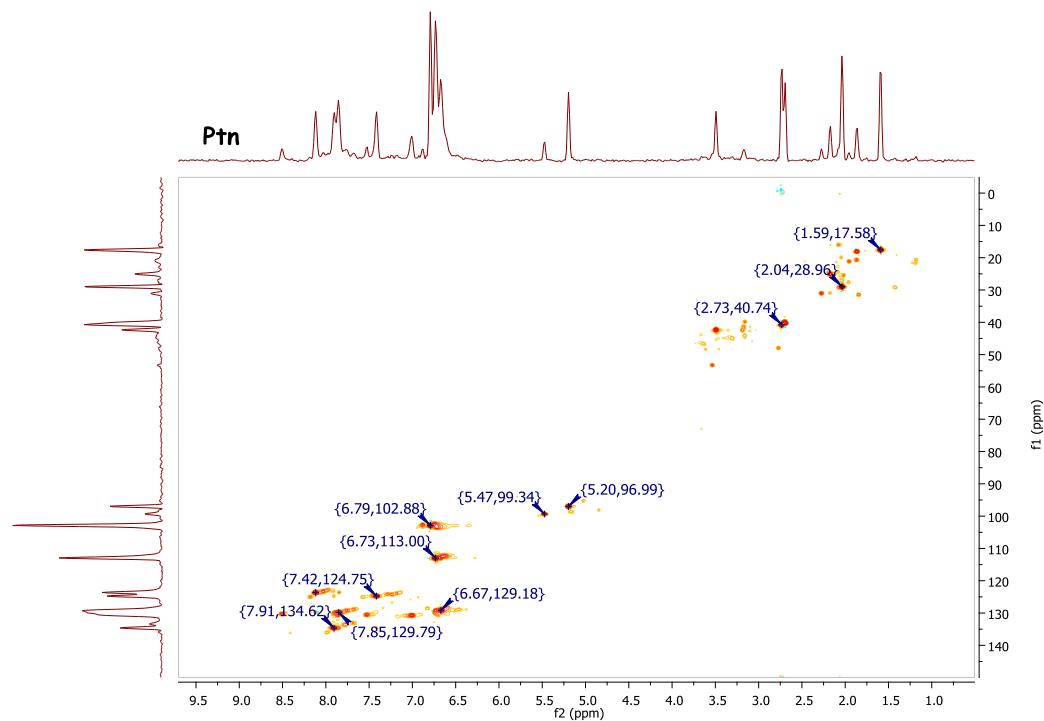


Figura 1.13. Espectro de RMN HSQC (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [PtCl(DMSO)(AcNac<sup>Fluores</sup>)]

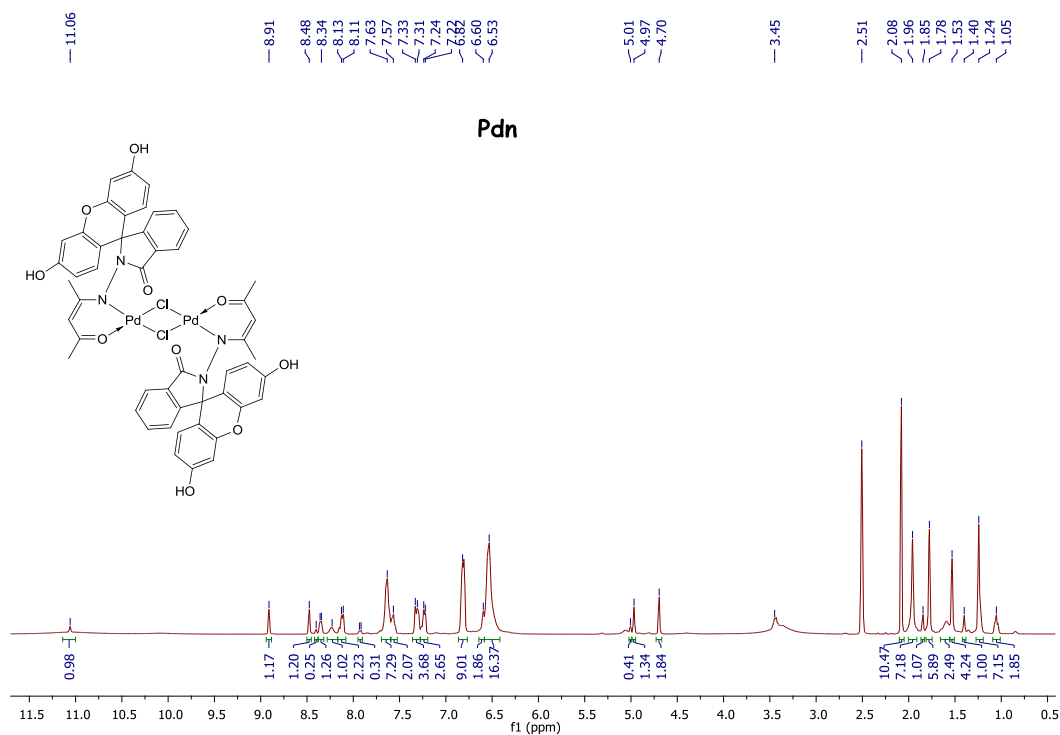


Figura 1.14. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del complejo [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(AcNac<sup>Fluores</sup>)<sub>2</sub>]



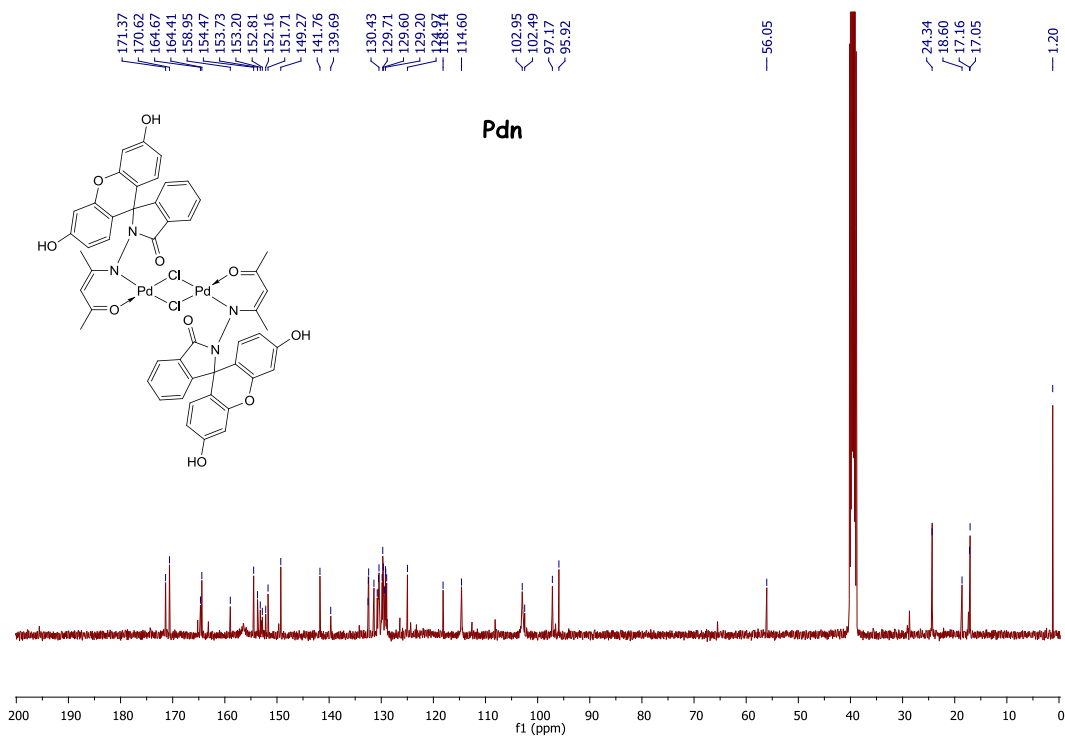


Figura 1.15. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del complejo  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_2(\text{AcNac}^{\text{Fluores}})_2]$

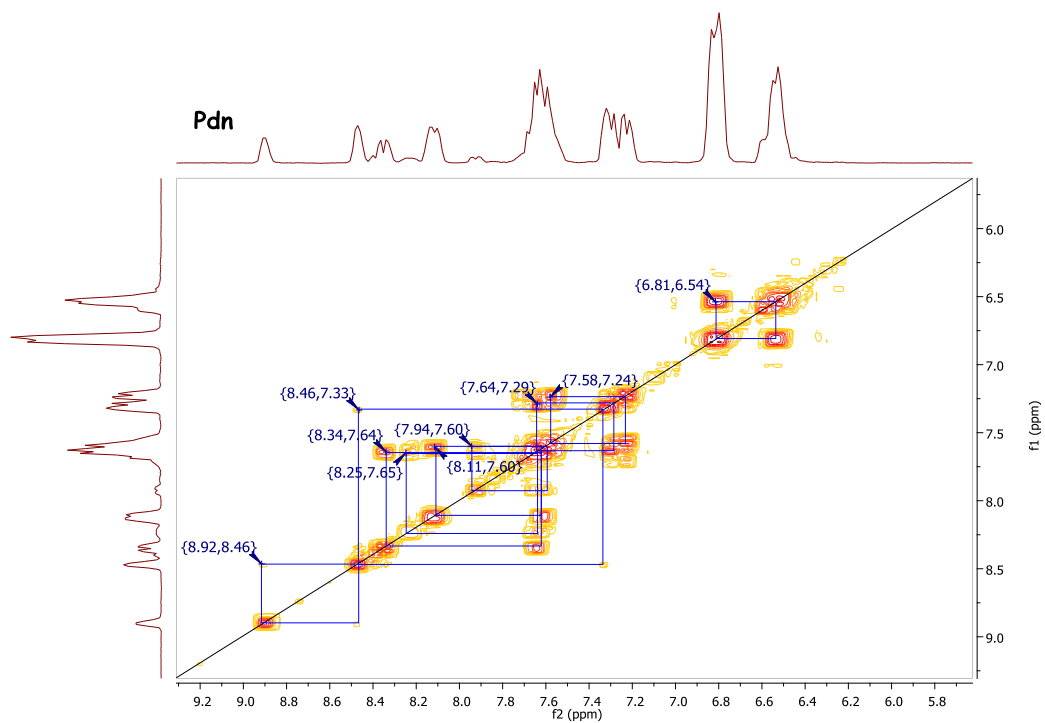


Figura 1.16. Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del complejo  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_2(\text{AcNac}^{\text{Fluores}})_2]$

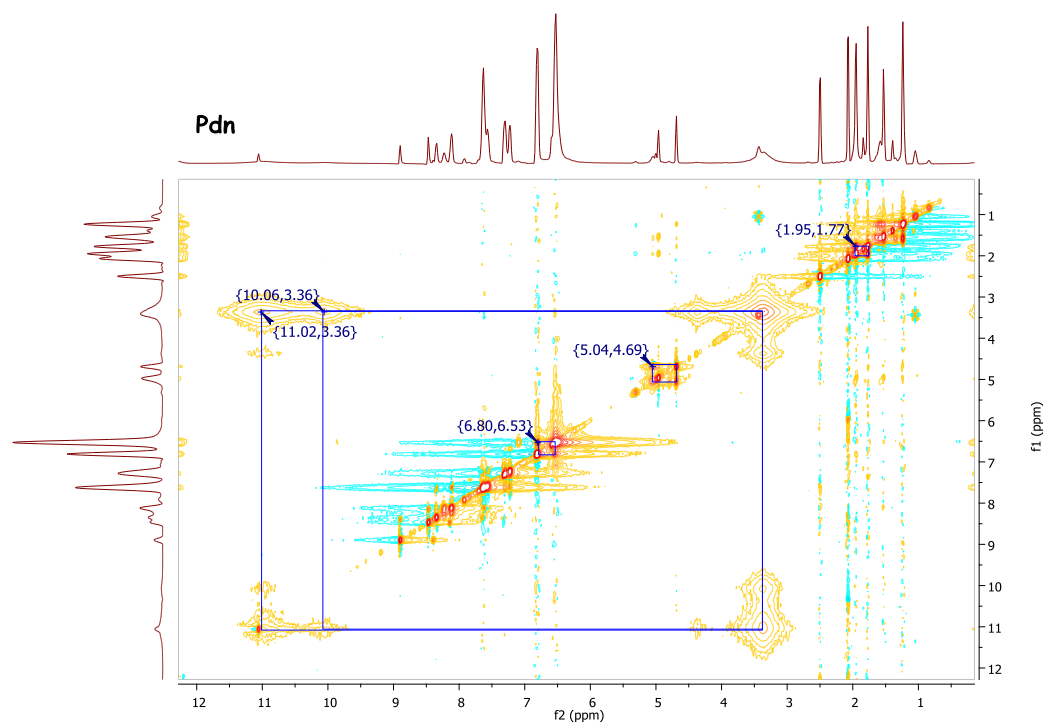


Figura 1.17. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) del complejo  $[Pd_2Cl_2(AcNac^{Fluores})_2]$

## II. Difracción de Rayos X

Tabla 2.1. Longitud de enlace [Å] y ángulos [°] para AcNacF.					
C(1)-O(1)	1.227(3)	C(9)-O(3)	1.375(2)	C(21)-C(22)	1.386(3)
C(1)-N(1)	1.371(3)	C(9)-C(16)	1.386(3)	C(22)-C(23)	1.378(4)
C(1)-C(21)	1.464(3)	C(10)-C(11)	1.376(3)	C(22)-H(22)	0.9500
C(2)-N(2)	1.351(3)	C(10)-O(3)	1.378(2)	C(23)-C(24)	1.389(4)
C(2)-C(3)	1.369(3)	C(10)-C(15)	1.382(3)	C(23)-H(23)	0.9500
C(2)-C(6)	1.492(3)	C(11)-C(12)	1.375(3)	C(24)-C(25)	1.387(3)
C(3)-C(4)	1.412(3)	C(11)-H(11)	0.9500	C(24)-H(24)	0.9500
C(3)-H(3)	0.9500	C(12)-O(4)	1.359(3)	C(25)-H(25)	0.9500
C(4)-O(2)	1.264(3)	C(12)-C(13)	1.385(3)	C(26)-O(6)	1.193(4)
C(4)-C(5)	1.497(3)	C(13)-C(14)	1.382(3)	C(26)-C(28)	1.425(4)
C(5)-H(5A)	0.9800	C(13)-H(13)	0.9500	C(26)-C(27)	1.498(5)
C(5)-H(5B)	0.9800	C(14)-C(15)	1.394(3)	C(27)-C(26)#1	1.498(5)
C(5)-H(5C)	0.9800	C(14)-H(14)	0.9500	C(27)-H(27A)	0.9697
C(6)-H(6A)	0.9800	C(16)-C(17)	1.380(3)	C(27)-H(27B)	0.9697
C(6)-H(6B)	0.9800	C(16)-H(16)	0.9500	C(28)-H(28A)	0.9800
C(6)-H(6C)	0.9800	C(17)-O(5)	1.357(3)	C(28)-H(28B)	0.9800
C(7)-N(1)	1.501(3)	C(17)-C(18)	1.391(3)	C(28)-H(28C)	0.9800
C(7)-C(15)	1.514(3)	C(18)-C(19)	1.373(3)	N(1)-N(2)	1.385(2)
C(7)-C(8)	1.515(3)	C(18)-H(18)	0.9500	N(2)-H(2F)	0.925(19)
C(7)-C(20)	1.521(3)	C(19)-H(19)	0.9500	O(4)-H(4D)	0.881(19)
C(8)-C(9)	1.378(3)	C(20)-C(25)	1.383(3)	O(5)-H(5D)	0.878(19)
C(8)-C(19)	1.401(3)	C(20)-C(21)	1.386(3)		
O(1)-C(1)-N(1)	125.7(2)	C(8)-C(9)-C(16)	122.7(2)	C(22)-C(21)-C(1)	128.9(2)
O(1)-C(1)-C(21)	128.4(2)	C(11)-C(10)-O(3)	114.08(19)	C(20)-C(21)-C(1)	109.21(19)
N(1)-C(1)-C(21)	105.89(18)	C(11)-C(10)-C(15)	122.76(19)	C(23)-C(22)-C(21)	117.7(2)
N(2)-C(2)-C(3)	119.4(2)	O(3)-C(10)-C(15)	123.16(19)	C(23)-C(22)-H(22)	121.2
N(2)-C(2)-C(6)	118.6(2)	C(12)-C(11)-C(10)	119.5(2)	C(21)-C(22)-H(22)	121.2
C(3)-C(2)-C(6)	122.0(2)	C(12)-C(11)-H(11)	120.3	C(22)-C(23)-C(24)	120.7(2)
C(2)-C(3)-C(4)	124.0(2)	C(10)-C(11)-H(11)	120.3	C(22)-C(23)-H(23)	119.7
C(2)-C(3)-H(3)	118.0	O(4)-C(12)-C(11)	116.6(2)	C(24)-C(23)-H(23)	119.7
C(4)-C(3)-H(3)	118.0	O(4)-C(12)-C(13)	123.52(19)	C(25)-C(24)-C(23)	121.5(2)
O(2)-C(4)-C(3)	122.0(2)	C(11)-C(12)-C(13)	119.9(2)	C(25)-C(24)-H(24)	119.2

O(2)-C(4)-C(5)	119.4(2)	C(14)-C(13)-C(12)	119.4(2)	C(23)-C(24)-H(24)	119.2
C(3)-C(4)-C(5)	118.5(2)	C(14)-C(13)-H(13)	120.3	C(20)-C(25)-C(24)	117.8(2)
C(4)-C(5)-H(5A)	109.5	C(12)-C(13)-H(13)	120.3	C(20)-C(25)-H(25)	121.1
C(4)-C(5)-H(5B)	109.5	C(13)-C(14)-C(15)	122.1(2)	C(24)-C(25)-H(25)	121.1
H(5A)-C(5)-H(5B)	109.5	C(13)-C(14)-H(14)	119.0	O(6)-C(26)-C(28)	122.7(4)
C(4)-C(5)-H(5C)	109.5	C(15)-C(14)-H(14)	119.0	O(6)-C(26)-C(27)	119.9(3)
H(5A)-C(5)-H(5C)	109.5	C(10)-C(15)-C(14)	116.4(2)	C(28)-C(26)-C(27)	117.3(3)
H(5B)-C(5)-H(5C)	109.5	C(10)-C(15)-C(7)	122.32(18)	C(26)#1-C(27)-C(26)	110.6(5)
C(2)-C(6)-H(6A)	109.5	C(14)-C(15)-C(7)	121.23(19)	C(26)#1-C(27)-H(27A)	109.3
C(2)-C(6)-H(6B)	109.5	C(17)-C(16)-C(9)	118.7(2)	C(26)-C(27)-H(27A)	109.7
H(6A)-C(6)-H(6B)	109.5	C(17)-C(16)-H(16)	120.7	C(26)#1-C(27)-H(27B)	109.7
C(2)-C(6)-H(6C)	109.5	C(9)-C(16)-H(16)	120.7	C(26)-C(27)-H(27B)	109.3
H(6A)-C(6)-H(6C)	109.5	O(5)-C(17)-C(16)	122.2(2)	H(27A)-C(27)-H(27B)	108.2
H(6B)-C(6)-H(6C)	109.5	O(5)-C(17)-C(18)	117.46(19)	C(26)-C(28)-H(28A)	109.5
N(1)-C(7)-C(15)	110.12(16)	C(16)-C(17)-C(18)	120.3(2)	C(26)-C(28)-H(28B)	109.5
N(1)-C(7)-C(8)	111.45(17)	C(19)-C(18)-C(17)	119.6(2)	H(28A)-C(28)-H(28B)	109.5
C(15)-C(7)-C(8)	110.11(17)	C(19)-C(18)-H(18)	120.2	C(26)-C(28)-H(28C)	109.5
N(1)-C(7)-C(20)	99.16(17)	C(17)-C(18)-H(18)	120.2	H(28A)-C(28)-H(28C)	109.5
C(15)-C(7)-C(20)	114.15(18)	C(18)-C(19)-C(8)	121.5(2)	H(28B)-C(28)-H(28C)	109.5
C(8)-C(7)-C(20)	111.43(17)	C(18)-C(19)-H(19)	119.2	C(1)-N(1)-N(2)	120.69(17)
C(9)-C(8)-C(19)	117.10(19)	C(8)-C(19)-H(19)	119.2	C(1)-N(1)-C(7)	114.16(17)
C(9)-C(8)-C(7)	122.45(19)	C(25)-C(20)-C(21)	120.5(2)	N(2)-N(1)-C(7)	119.92(17)
C(19)-C(8)-C(7)	120.34(19)	C(25)-C(20)-C(7)	128.6(2)	C(2)-N(2)-N(1)	122.42(18)
O(3)-C(9)-C(8)	123.26(18)	C(21)-C(20)-C(7)	110.91(19)	C(2)-N(2)-H(2F)	115(3)
O(3)-C(9)-C(16)	114.04(19)	C(22)-C(21)-C(20)	121.9(2)	N(1)-N(2)-H(2F)	117(3)
C(9)-O(3)-C(10)	118.35(17)				
C(12)-O(4)-H(4D)	117(4)				
C(17)-O(5)-H(5D)	114(4)				
<b>Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:</b>					
#1 -x+1,y,-z+3/2					

## III. Espectroscopía UV-Vis

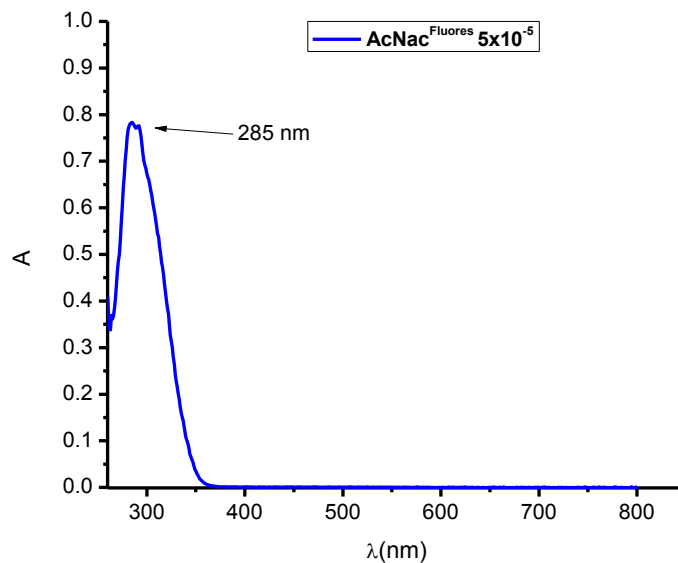


Figura 3.1. Espectroscopía UV-Vis del ligante **AcNac<sup>Fluores</sup>** en concentración  $5 \times 10^{-5}$  M en presencia de DMSO como disolvente.

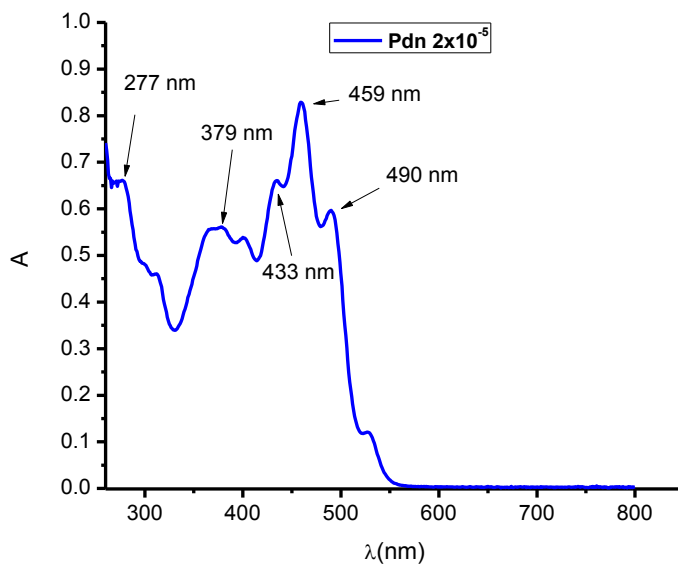
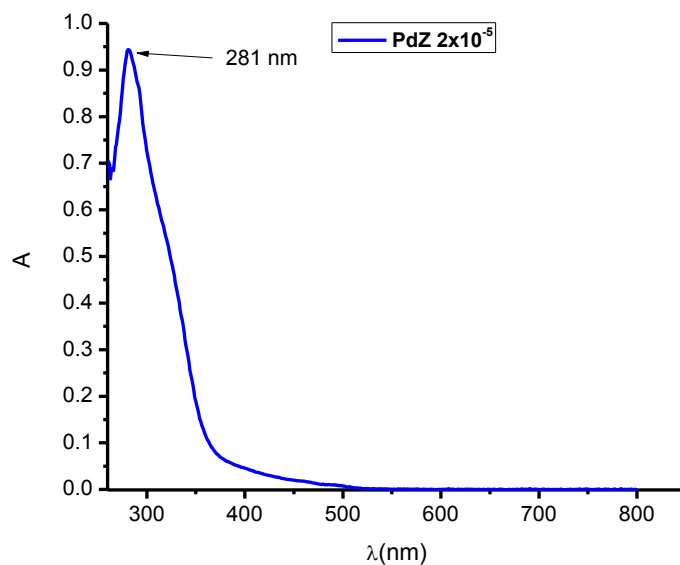
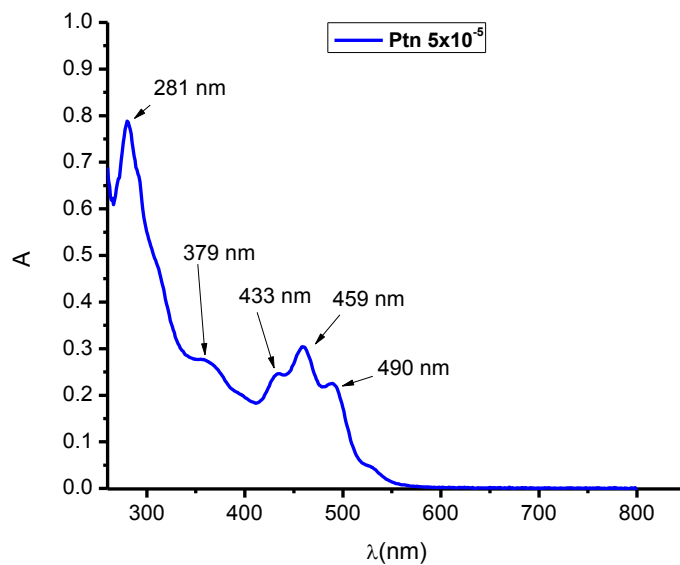


Figura 3.2. Espectroscopía UV-Vis del complejo neutro  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_2(\text{AcNac}^{\text{Fluores}})_2]$  en concentración  $2 \times 10^{-5}$  M en presencia de DMSO como disolvente.



**Figura 3.3.** Espectroscopía UV-Vis del complejo zwitteriónico  $[Pd_2Cl_4(AcNac^{fluores})_2]$  en concentración  $2 \times 10^{-5}$  M en presencia de DMSO como disolvente.



**Figura 3.4.** Espectroscopía UV-Vis del complejo neutro  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{fluores})]$  en concentración  $5 \times 10^{-5}$  M en presencia de DMSO como disolvente.

#### IV. Espectroscopía Infrarroja

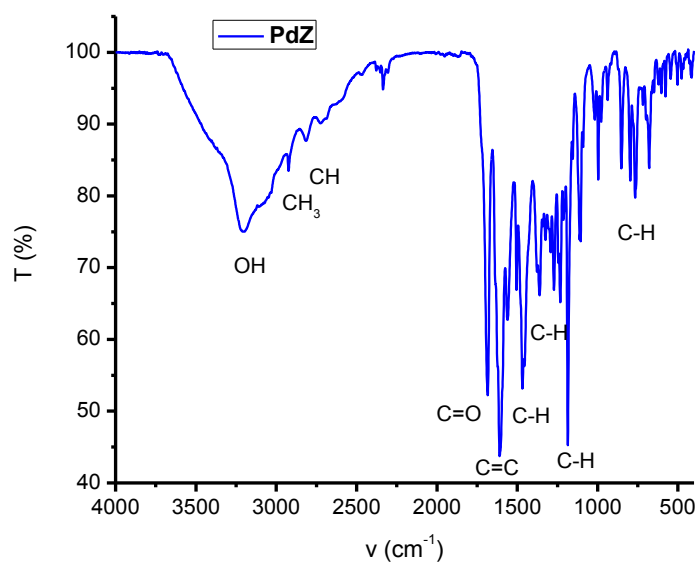


Figura 4.1. Espectroscopía IR del complejo zwitteriónico  $[Pd_2Cl_4(AcNac^{fluores})_2]$  en pastilla de KBr.

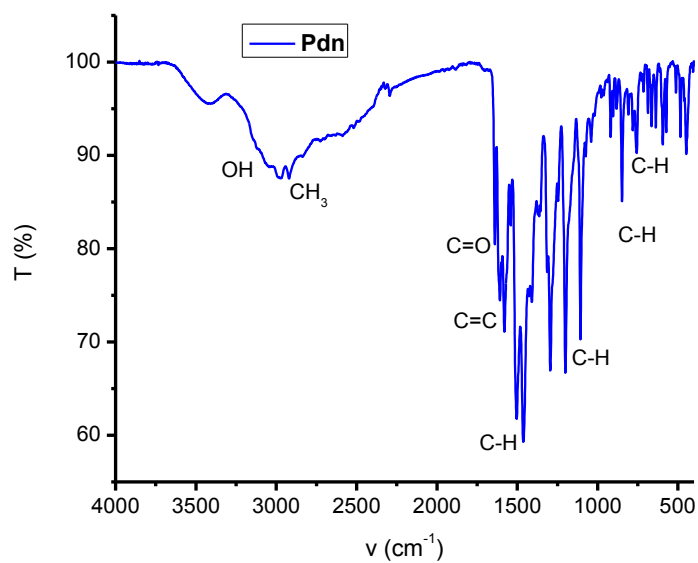


Figura 4.2. Espectroscopía IR del complejo neutro  $[Pd_2Cl_2(AcNac^{fluores})_2]$  en pastilla de KBr.

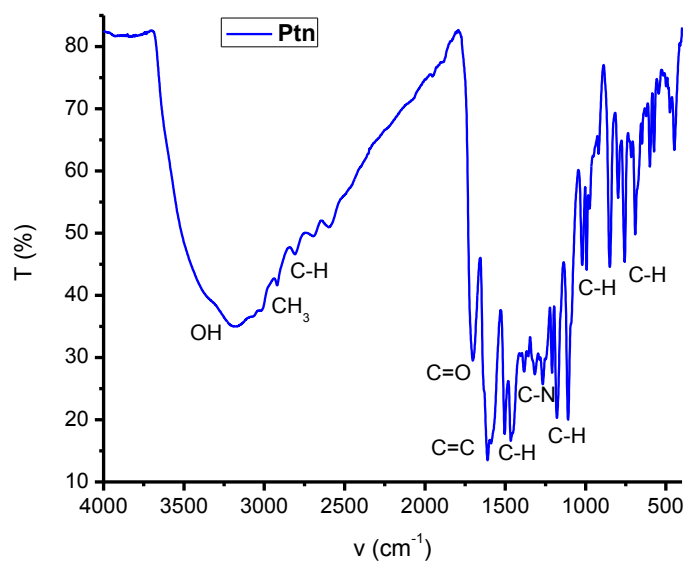
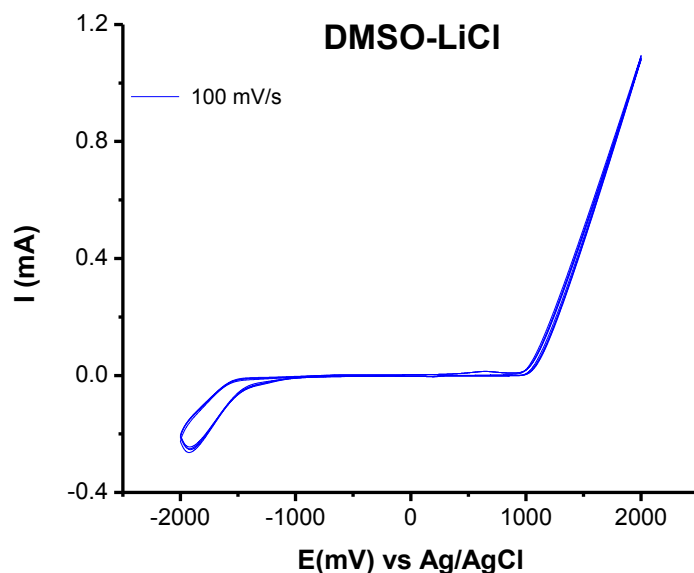


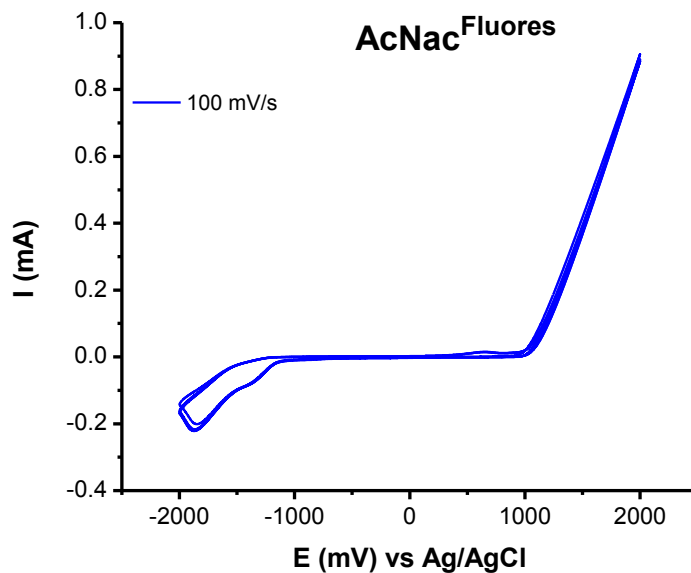
Figura 4.3. Espectroscopía IR del complejo neutro  $[PtCl(DMSO)(AcNac^{Fluores})]$  en pastilla de KBr.



## V. Voltamperometría Cíclica



**Figura 5.1.** Voltamperograma del LiCl (0.1M) en DMSO como electrolito soporte. El barrido se realizó en sentido anódico, a una velocidad de 100 mV/s. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de platino. Se realizaron 3 ciclos.



**Figura 5.2.** Voltamperograma del ligante *AcNac<sup>Fluores</sup>* en concentración 0.01M en presencia de LiCl (0.1M) en DMSO como electrolito soporte. El barrido se realizó en sentido anódico, a una velocidad de 100 mV/s. El electrodo de trabajo empleado fue de carbón vítreo, el de referencia Ag/AgCl y el auxiliar de platino. Se realizaron 3 ciclos.