



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE
FERROCENILTIOSEMICARBAZONAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RAMÍREZ RAMÍREZ ARTURO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: FEDERICO JESÚS JIMÉNEZ CRUZ**

VOCAL: **Profesor: SIMÓN HERNÁNDEZ ORTEGA**

SECRETARIO: **Profesor: MARCOS MARTÍNEZ GARCÍA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**

2° SUPLENTE: **Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. MARCOS MARTÍNEZ GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO

DRA. SANDRA CORTEZ MAYA

SUSTENTANTE:

RAMÍREZ RAMÍREZ ARTURO

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II	
ANTECEDENTES	3
2.1 Ferroceno	4
2.1.1 Historia del ferroceno	4
2.1.2 Síntesis de ferroceno	6
2.1.3 Propiedades físicas y químicas del ferroceno	8
2.1.4 Reactividad	8
2.1.4.1 Reactividad química	8
2.1.4.2 Metalación	9
2.1.5 Aplicaciones	11
2.1.5.1 Aditivos de combustible	11
2.1.5.2 Aplicaciones farmacéuticas	11
2.1.5.3 Biosensores	13
2.1.5.4 Materiales conductores y magnéticos	13
2.1.5.5 Catálisis asimétrica con ligandos ferrocenilo	14
2.2 Tiosemicarbazidas	15
2.2.1 Historia de las tiosemicarbazidas	15
2.2.2 Síntesis de tiosemicarbazidas	16
2.2.3 Propiedades físicas y químicas de la tiosemicarbazida	17
2.2.4 Aplicaciones de las tiosemicarbazonas	18
2.2.4.1 Actividad biológica	18
2.2.4.2 Actividad antituberculosa	19
2.2.4.3 Actividad antiviral	19
2.2.4.4 Actividad antimicrobiana	20
2.2.4.5 Actividad antitumoral	21

CAPÍTULO III	
OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivos Particulares	24
CAPÍTULO IV	
EQUIPO Y REACTIVOS	25
4.1 Equipos	26
4.2. Reactivos y disolventes	26
CAPÍTULO V	
DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
5.1 Metodología	29
5.1.1 Síntesis de cetonas ferrocenílicas	29
5.1.2 Síntesis de tiosemicarbazonas ferrocenílicas	33
CAPÍTULO VI	
ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
6.1 Obtención de ferrocenilcetonas	38
6.1.1 Mecanismo de reacción	39
6.1.2 Análisis de difracción de Rayos-X de ferrocenilcetonas.....	42
6.2 Obtención de ferroceniltiosemicarbazonas	44
6.2.1 Mecanismo de reacción	44
CAPÍTULO VII	
PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	49
7.1 Ensayos de citotoxicidad, sulforodamina B (SRB)	50
7.1.1 Metodología para el ensayo de sulforodamina B (SRB)	50
7.1.2 Ensayo de citotoxicidad (SRB) en derivados celulares	50
CAPÍTULO VIII	
CONCLUSIONES	54
CAPÍTULO IX	
CONCLUSIONES	56

LISTA DE ABREVIATURAS

δ : Desplazamiento químico	MHz : MegaHertz
λ : Longitud de onda en nm	mL : Mililitro
ν : Número de onda en cm^{-1}	mmol : Milimol
Ar : Aromático	<i>m/z</i> : Masa por unidad de carga
°C : Grados Celsius	nm : Nanómetros
CDCl_3 : Cloroformo deuterado	PC-3 : Cáncer de próstata humano
CI_{50} : Concentración Inhibitoria 50	PM : Peso molecular
DCM : Diclorometano	ppm : Partes por millón
EM : Espectrometría de masas	RMN ^{13}C : Resonancia magnética nuclear de carbono 13
EtOH : Etanol	RMN ^1H : Resonancia magnética nuclear de protón
HCT-15 : Adenocarcinoma colorectal humano	s : Singulete
Hertz : Hertz	sa : Señal ancha
IR : Espectroscopía de infrarrojo	SKLU-1 : Adenocarcinoma pulmonar humano
<i>J</i> : Constante de acoplamiento	t : Triplete
K-562 : Leucemia mieloide crónica humana	TMS : Tetrametilsilano
KBr : Bromuro de potasio	U-251 : Glía de sistema nervioso central
m : Multiplete	Uv-vis : Ultravioleta-visible
M^+ : Ion molecular	
MCF-7 : Cáncer de mama	

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La importancia del ferroceno y sus derivados en el campo de la química se debe en gran parte a sus propiedades físicas y químicas. Su estructura tipo sándwich, sus propiedades electroquímicas, además de su estabilidad relativa del par Fe(II)/Fe(III), ha favorecido su aplicación en la fabricación de nanomateriales, en ingeniería molecular, catálisis homogénea, sales de transferencia de carga, en la fabricación de ferro-imanés moleculares, fabricación de biosensores, (valoración de la glucosa en sangre), marcadores, sondas electroquímicas y polímeros. En el área farmacéutica se le han determinado diferentes actividades biológicas, por ejemplo; como antibacterianos, antivirales, antiparasitarios, antitumorales, etc.

Por otra parte, se ha reportado que las tiosemicarbazonas presentan diferentes actividades biológicas, entre ellas, ha sido probada su actividad como agente antitumoral, antiviral, antibacteriano, antiparasitario y antifúngico. De acuerdo a los reportes en la literatura, este tipo de compuestos son de fácil obtención, por lo que resultó de gran interés desarrollar una ruta de síntesis para la obtención de seis Ferroceniltiosemicarbazonas aromáticas en buen rendimiento. Dichos compuestos fueron obtenidos a partir de la condensación de las Ferrocenilcetonas, las cuales fueron sintetizadas mediante una reacción de acilación de Friedel y Crafts entre el cloruro de acilo correspondiente y el ferroceno, utilizando como catalizador tricloruro de aluminio (AlCl_3).

La caracterización de estas moléculas se realizó mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , ^{13}C , IR y UV-vis. Una vez sintetizado y caracterizado cada uno de los compuestos, se realizaron pruebas de actividad citotóxica en seis líneas celulares de cáncer humano, resultando el compuesto sustituido en posición *-orto* por cloro, un excelente prototipo para el tratamiento de cáncer humano.

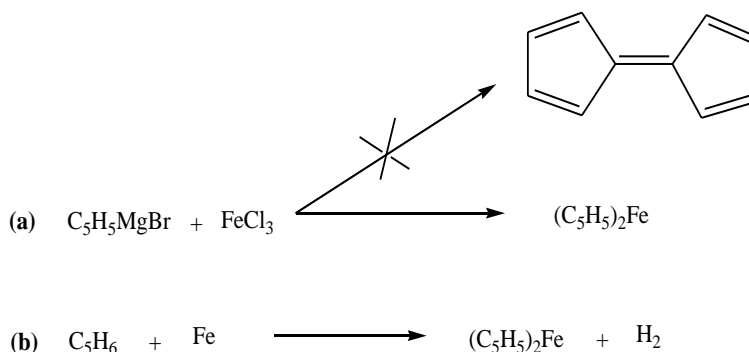
CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 FERROCENO

2.1.1 Historia del Ferroceno

El descubrimiento del compuesto dicitclopentadienilhierro a principios de los años 50's, marcó el inicio de una revolución en el campo de la química organometálica. Dos grupos de investigación sintetizaron el mismo producto por casualidad, mientras se encontraban trabajando en diferentes áreas de la química. El primero de ellos (Kealey y Pauson, Diciembre 1951)¹ tratando de obtener el fulvaleno a partir del bromuro del ciclopentadienilmagnesio y el tricloruro de hierro, obtuvieron cristales de color naranja cuyo análisis elemental consistía en $C_{10}H_{10}Fe$, véase esquema 1. Por otra parte, Miller y colaboradores² (Enero de 1952) trabajando en la síntesis de aminas, obtienen el mismo compuesto por reacción directa del ciclopentadieno con hierro, en presencia de óxidos de aluminio, potasio o molibdeno a $300^{\circ}C$. Ambos grupos coincidían en que el compuesto obtenido era estable al aire, con un punto de fusión de $173^{\circ}C$, muy soluble en disolventes orgánicos e insolubles en agua y además poseía una estabilidad térmica excepcional, que permitía su calentamiento a temperaturas superiores a $400^{\circ}C$ sin descomposición.



Esquema 1. Procedimientos que condujeron a la obtención del ferroceno, (a) Kealey y Pauson¹, (b) Miller y colaboradores².

¹ Kealey, T. J.; Pauson, P. L. *Nature*, **1951**, 168, 1039.

² Miller, S. A.; Tebboth, J. A.; Tremaine, J. F. *J. Chem. Soc.* **1952**, 632.

La primera estructura propuesta para este compuesto consistía en dos anillos de ciclopentadienilos planos unidos a un átomo central de hierro, destacando el carácter covalente, como se representa en la figura 1. Sin embargo, había algunos hechos que no podían ser explicados considerando dos enlaces sigma en el compuesto $C_{10}H_{10}Fe$, por ejemplo; las propiedades térmicas y químicas. Además el enlace sigma entre el fragmento metálico y el orgánico deberían de ser relativamente inestables y la volatilidad observada no podía ser consecuencia de una interacción iónica.

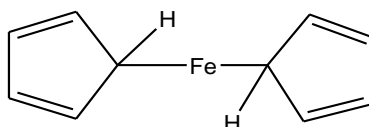


Figura 1. Primera estructura propuesta para el ferroceno.

Wilkinson y colaboradores³ utilizaron métodos físicos, químicos, y espectroscópicos para determinar la estructura correcta del ferroceno [bis (ciclopentadienil) hierro] mientras que independientemente Fischer y Paul⁴ utilizaban cristalografía de rayos X sobre monocristal. Wilkinson advirtió que los diez átomos de carbono deberían de contribuir del mismo modo al enlace con el hierro y en base a ello formuló una estructura con dos anillos ciclopentadienilo paralelos y el átomo de hierro en el centro de ambos, como si fuera un "sándwich", véase figura 2. De este modo, el enlace parecía muy fuerte debido al solapamiento entre los orbitales d del metal y electrones π de los orbitales p del ciclopentadienilo. Para corroborar su hipótesis se determinaron mediciones en infrarrojo, ultravioleta, susceptibilidad magnética, y medidas del momento dipolar, llegando a la conclusión de que existía un único tipo de enlace C-H, que el compuesto era diamagnético, sin electrones desapareados y que el momento

³ Wilkinson, G.; Leonard, N. J.; Kenneth, L.; Rinehart, K. L.; Donald, J. C.; Moon, S. *Org. Synth.* **1956**, 36, 473.

⁴ Bratteman, P. S. *Metal Carbonyl Spectra*, New York: Edit. Academic Press **1975**. 50. 286.

dipolar efectivo era cero. Esta información indicaba que la estructura tipo sándwich, debería ser la correcta. Unos meses más tarde los estudios cristalográficos de Fischer corroboraron inequívocamente la estructura propuesta.

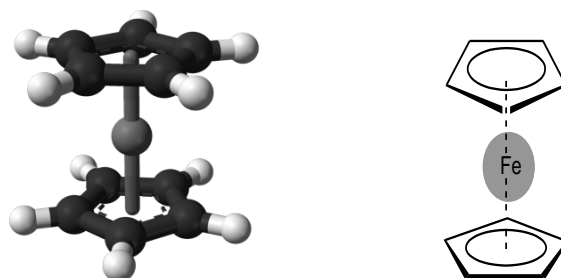


Figura 2. Estructura tipo "sándwich" del ferroceno.

Muy pronto se extendió la química de los compuestos tipo sándwich a otros metales de transición, como por ejemplo cobalto y níquel, poniendo de manifiesto que este tipo de enlace no era único para el hierro.

Este descubrimiento en las diferentes áreas de la química resultó de magnitud inconmensurable y su impacto económico en la industria química alcanzó cifras que resultan difíciles de imaginar. Cabe mencionar que el trabajo realizado por Fischer y Wilkinson respecto a su contribución al desarrollo de la química organometálica, referente a la química de los compuestos tipo sándwich; los hizo merecedores al premio Nobel de Química en 1973⁵.

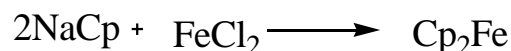
2.1.2 Síntesis de Ferroceno

Existen diferentes vías por las cuales se puede obtener el ferroceno, las más comunes son las que se describen a continuación:

- 1) A partir de una fuente de ciclopentadienilo (Cp^-), véase esquema 2. La obtención del ferroceno por esta vía, se prepara eficientemente por la reacción del

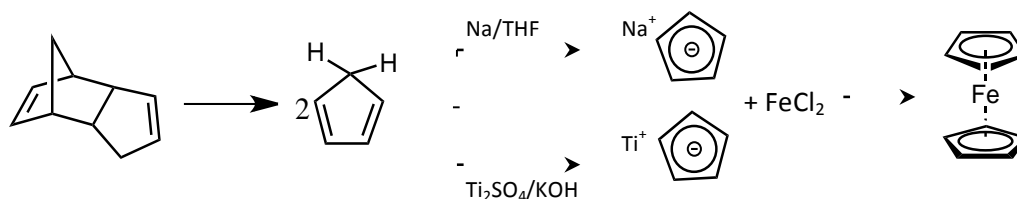
⁵ Carmona, E. *Los metalocenos, arquetipo de familia química*, "El ferroceno y los primeros años del desarrollo de los metalocenos" España: Edit. Real academia de ciencias exactas, físicas y naturales, **2007**, 16, 106.

ciclopentadienuro sódico y cloruro de hierro anhidro, en disolventes etéreos; en donde el ferroceno se obtiene mediante sublimación³.



Esquema 2. Obtención del ferroceno a partir de ciclopentadienilo.

2) A partir de ciclopentadieno, véase esquema 3. La obtención de ferroceno a partir de una fuente de ciclopentadienilo, se inicia con la preparación de la molécula C_5H_6 , el dieno se obtiene por la ruptura térmica del dicitriclopentadieno, posteriormente se separa un protón del dieno para formar el ion C_5H_5^- el cual finalmente se hace reaccionar con una sal anhidra de hierro⁶.



Esquema 3. Obtención del ferroceno a partir del ciclopentadieno.

3) A partir de ciclopentadienuro y una sal de hierro, véase esquema 4. Otra alternativa para la síntesis de ferroceno es usando una sal de hierro hidratada, y así el ciclopentadienuro puede ser generado *in situ*⁶.



Esquema 4. Obtención del ferroceno a partir de ciclopentadienuro y una sal de hierro.

⁶ Reyes, V. M. *Síntesis de Dendrimeros con Sistemas π-Conjugados Ferrocenílicos y Resorcinarenos como Moléculas Centrales*. México: Edit. UNAM, 2007.

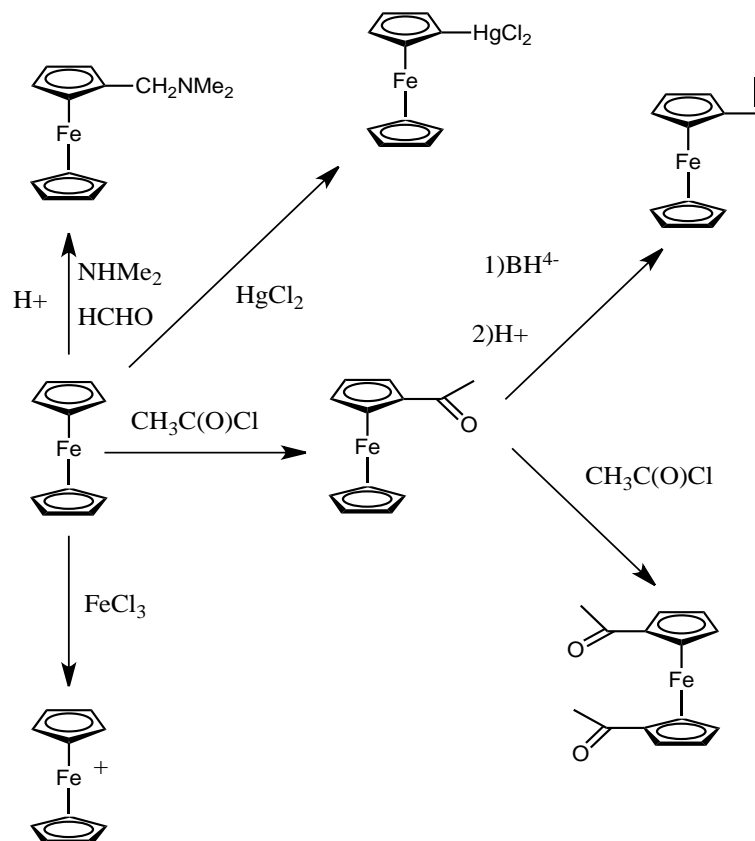
2.1.3 Propiedades físicas y químicas del Ferroceno

El ferroceno es un compuesto diamagnético, sólido de color naranja, es muy estable al aire y a la hidrólisis. Funde a 172.85 °C, es térmicamente estable al menos hasta los 500 °C. Parte de la estabilidad es consecuencia de la aromaticidad de los 5 electrones π de cada anillo, tiene la propiedad de poder sublimarse, lo que permite una buena purificación. Es soluble en disolventes orgánicos como el benceno, alcohol y éter. Es insoluble en agua, pero es soluble en disolución acuosa al 10% de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico.

2.1.4 Reactividad

2.1.4.1 Reactividad Química

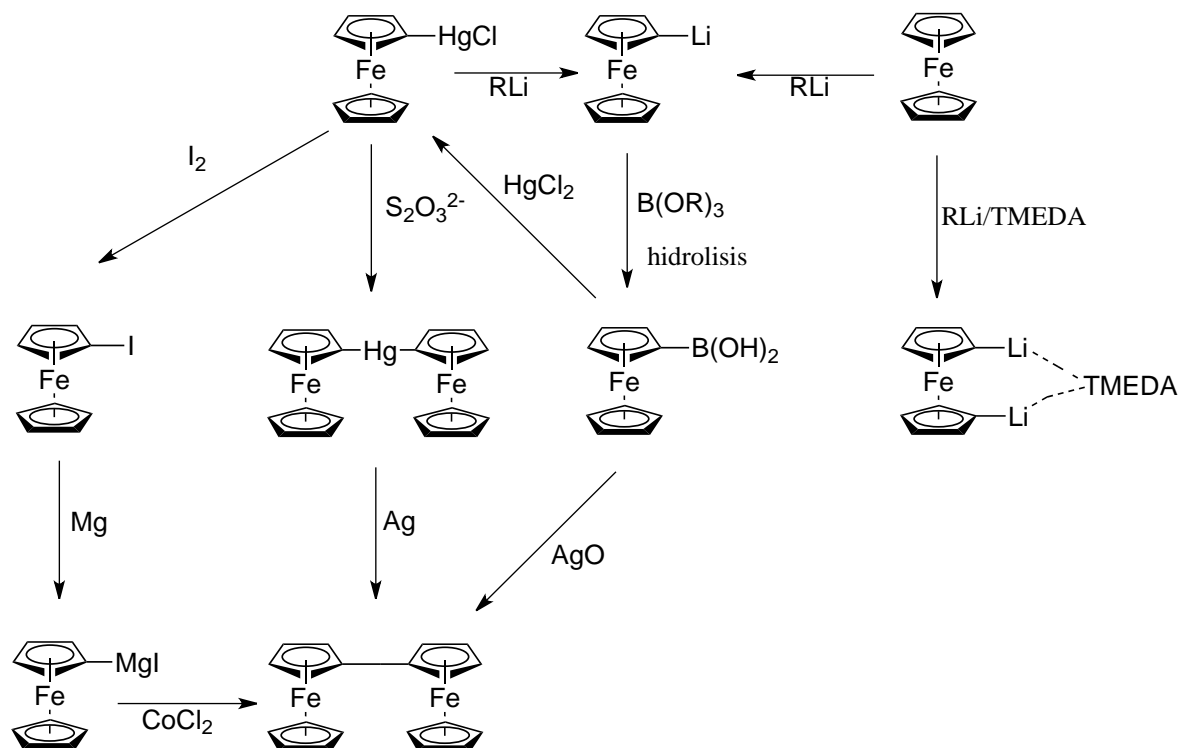
Una de las características fundamentales del ferroceno es que se comporta como un sistema aromático, debido a la aromaticidad proporcionada por los anillos ciclopentadienilo. De este modo la química del ferroceno se basa y se puede predecir en términos de la aromaticidad de los anillos ciclopentadienilos. Es importante resaltar que la estabilidad del ferroceno bajo condiciones de reacción violentas hace muy extensa su utilización. En el esquema 5 se muestran algunas de las reacciones orgánicas más significativas del ferroceno.



Esquema 5. Reacciones orgánicas más significativas del ferroceno.

2.1.4.2 Metalación

Una reacción importante en este tipo de compuestos es la metalación, ya que sirve de intermediario para la obtención de una gran variedad de derivados. Los metales alcalinos en general son buenos candidatos para producir la metalación del ferroceno, entre ellos hay que destacar los derivados alquílicos de litio, por ejemplo la reacción del ferroceno con el butil litio produce el 1,1-dilítioferroceno, que es un nucleófilo muy versátil. Otros metales utilizados son el sodio, mercurio y boro, como se describe en el esquema 6.



Esquema 6. Metalación y derivados del ferroceno (TMEDA = N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina).

Por otra parte, se ha reportado que la reacción del 1,1-dilitioferroceno con dietil ditiocarbamato de selenio forma un ferrocenofano, en donde los dos ligandos ciclopentadienilo están unidos por el átomo de selenio. Este compuesto, se puede convertir en un polímero, a través de una polimerización térmica de apertura del anillo, para así formar ferrocenilseleniuro⁷. Así mismo, mediante la reacción con silicio y fósforo se obtienen los ferrocenilos correspondientes.

⁷ Ron, R.; Derek, P. G.; David, B.; John, K. P.; Douglas, F. M.; Alan, J. L.; Ian, M. J. *Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119,45, 10976.

2.1.5 Aplicaciones

El ferroceno y sus derivados poseen propiedades físicas y químicas que les confieren características que los hacen factibles para su aplicación en muchas áreas de la ciencia, a continuación, se describe brevemente algunos ejemplos de aplicación de este tipo de compuestos.

2.1.5.1 Aditivos de combustible

El ferroceno y sus derivados son agentes antidetonantes utilizados en el combustible para motores de gasolina, que son más seguros que el tetraetilo de plomo, utilizado anteriormente. En los motores alimentados de diesel, el ferroceno reduce la producción de hollín, eliminando así la producción de humo. Permite el ahorro de energía y por lo tanto reduce la contaminación del aire. La adición de 0.1% de ferroceno al diesel puede reducir el consumo de petróleo entre el 10 - 14%, permitiendo la eliminación de humo entre el 30 - 70%. Es utilizado como catalizador de combustible para aviones, y como propulsor; en donde mejora la velocidad de combustión y permite bajar la temperatura de los tubos de escape⁸.

2.1.5.2 Aplicaciones farmacéuticas

Algunos derivados del ferroceno han mostrado poseer propiedades antitumorales muy buenas, como por ejemplo; el ferricinio como agente eficaz en el tratamiento del tumor ascitis Ehrlich, llegando a unos niveles de curación de entre el 70 y el 100%. Otros tumores inhibidos por el ferricinio son el melanoma B16, carcinoma colon 38 y el carcinoma de pulmón de Lewis. La principal ventaja en la utilización de estos derivados es que son mucho menos tóxicos que los derivados de platino.

⁸ Sila chemistry, *Ferrocene chemistry (en línea)*, 2012 disponible en: http://silachem.com/cgi/searchen.cgi?f=product_en3&t=product_en3&w=product_en3&cate2=Ferrocene%20chemistry>

Siden Top y colaboradores⁹, reportaron un fármaco experimental que es una versión del ferrocenil tamoxifeno, véase figura 3. La idea es que el tamoxifeno se una a los sitios de unión de los estrógenos, resultando así un efecto de citotoxicidad⁹.

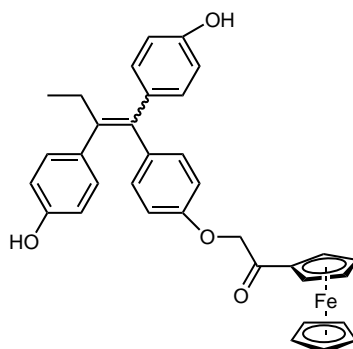
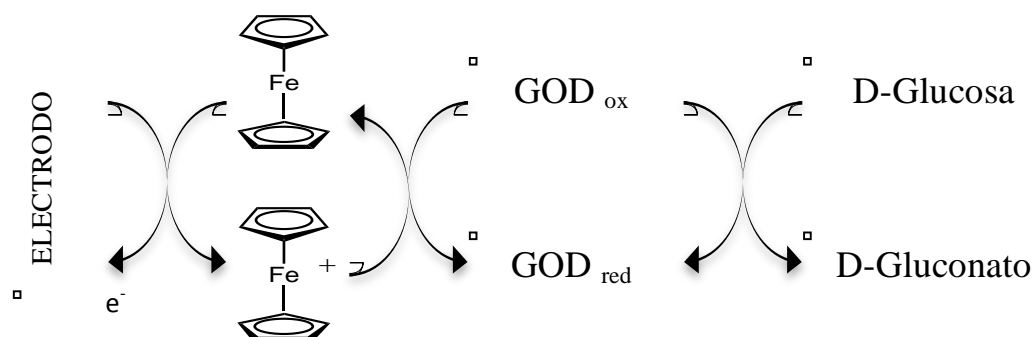


Figura 3. Ferrocenil tamoxifeno.

2.1.5.3 Biosensores

El par ferroceno/ferricinio puede actuar como mediador en la determinación electroquímica de la glucosa a través de ciclos electroquímicos en cadena. La glucosa oxidasa y el ferrocencarboxilato son inmovilizados en una película de polipirrol para formar un biosensor simple usado para determinar los niveles de glucosa en sangre¹⁰, para el diagnóstico del estado de diabetes y de la hiperglucemia. Véase esquema 7.



Esquema 7. Uso del ferroceno como mediador en la determinación de la glucosa.

⁹ Tod, S.; Bénédicte D.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. *J. Org. Chem*, **1997**, 541, 355.

¹⁰ Holme, D. Y.; Peck, H. *Analytical Biochemistry*. "Biosensors", 3ra. EUA: Edit. Prentice Hall **1998**, 192, 481.

La oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa para dar gluconato es sensible y específica y de este modo, apropiada para la determinación de la glucosa con sensores. El resultado de la reacción bioquímica entre la enzima y la glucosa puede ser evaluado a través del oxígeno consumido o del peróxido de hidrógeno formado. Sin embargo, la medida electroquímica directa del producto oxidado esta impedida debido a que la enzima no reacciona con las superficies del electrodo directamente y también allí puede ser disuelto el oxígeno de las muestras. Así pues, se puede utilizar un mediador redox para facilitar la oxidación de la glucosa en condiciones catalíticas. Por oxidación de la forma reducida de la enzima glucosa oxidasa puede saberse la cantidad de glucosa transformada en gluconato. El par ferroceno/ferrocinio puede actuar como mediador permitiendo la determinación electroquímica de la glucosa a través ciclos electroquímicos en cadena.

2.1.5.4 Materiales conductores y magnéticos

La base molecular de un compuesto de transferencia de carga (TC) consiste en un dador y un aceptor de densidad electrónica, capaces de formar cationes, aniones y radicales estables, y en estado sólido estos compuestos deben presentar el apilamiento adecuado para que pueda producirse la conducción eléctrica. El estudio de este campo se transformó en 1973 con el descubrimiento de la elevada conductividad eléctrica y el comportamiento metálico del compuesto monodimensional de TC formado por el tetratiofulvaleno y el aceptor 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano. Los complejos de TC necesitan cumplir ciertos requisitos para presentar un cierto apilamiento en estado sólido: A) Las moléculas tienen que ser planas o estar compuestas de fragmentos que lo sean, B) deben de formar radicales estables en disolución en los que la diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO sea relativamente pequeña y C) las moléculas deben poseer sistemas conjugados, y deben ser capaces de aproximarse unas a otras

más cerca que la suma de la distancia de los radios de Van der Waals, aumentando de este modo el solapamiento intermolecular¹¹.

El ferroceno y sus derivados son buenos candidatos para la formación de sales de TC debido a que el ferroceno es una molécula cilíndrica compacta con dos anillos planos, paralelos, además de ser fácilmente oxidable para dar sales estables de ferrocinio, y su capacidad dadora puede ser modificada con el número y la naturaleza de los sustituyentes. El estudio sistemático de las propiedades magnéticas del decametilferroceno por Miller-Epstein ha desencadenado en el descubrimiento de materiales moleculares ferromagnéticos y ha generado nuevas perspectivas en los mecanismos de acoplamiento magnéticos¹². Tales resultados han demostrado que compuestos monodimensionales pueden comportarse como tridimensionales si los componentes moleculares están dispuestos de forma adecuada. A pesar de esto, el diseño de materiales ferromagnéticos orgánicos/organometálicos, con unas propiedades físicas y estructurales determinadas continúa siendo un reto en investigación y desarrollo, así como la preparación de materiales organometálicos con propiedades superconductoras.

2.1.5.5 Catálisis asimétrica con ligandos ferrocenilo

Existen una gran variedad de catalizadores derivados de metales de transición, que tienen aplicación en química orgánica. Entre ellos cabe destacar la utilización de ligandos de ferroceno quirales. Estos compuestos han demostrado ser muy eficaces en reacciones asimétricas, por ejemplo en la síntesis estereoselectiva de péptidos, transaminaciones y condensaciones asimétricas.

Las ferrocenilfosfinas se emplean como ligandos para las reacciones catalizadas por metales de transición. La versatilidad y coordinación de estas permite controlar la influencia de los factores estéricos y electrónicos del ligando. Algunos de ellos han encontrado aplicaciones industriales en la síntesis de

¹¹ Togni, A.; Hayashi, T. *Ferrocenes*. Alemania: Edit. VCH *Verlagsgesellschaft mbH*, **1995**, 435, 540.

¹² Dixon, D.; Calabrese, J. C.; Miller, J. S. *J. Phys. Chem.*, **1999**, 93, 2284.

productos farmacéuticos y agroquímicos. Por ejemplo; la diofosfina ferroceno, es un ligando para las reacciones de acoplamiento con paladio¹³, véase figura 4. La versatilidad de coordinación de las ferrocenilfosfinas permite controlar la influencia de los factores estéricos y electrónicos del ligando en la estereoselectividad del catalizador.

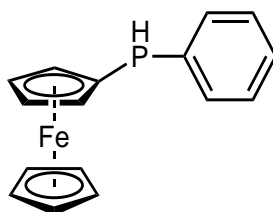


Figura 4. Estructura química de la diofosfina ferroceno.

Existen otras familias de ligandos quirales derivados de ferroceno, tales como alcoholes, aminoalcoholes y calcogenuros (son una serie de compuestos químicos que contienen un anión formado por un elemento anfígeno y un elemento metal de carácter electropositivo). Estos ligandos conducen a la obtención de catalizadores similares a los de ferrocenilfosfinas, pero su estudio está menos desarrollado.

2.2 TIOSEMICARBAZIDAS

2.2.1 Historia de las tiosemicarbazidas

Casi de forma contemporánea a la investigación en sulfonas, Domagk¹⁴, encuentra actividad tuberculoestática en sulfamidas derivadas del tiazol. Ciertas sulfamidas derivadas del tiazol y tiadiazol son la cura para el ratón de investigación, que presentaba la infección por bacilos de Koch. Con sus colaboradores Mietzsch, Behnisch, realizan estudios de sulfamidas con restos tiadiazólicos y de sus intermediarios de síntesis, que le llevan sorprendentemente a encontrar actividad tuberculostática en las tiosemicarbazonas precursoras.

¹³ Wan-yi; Qi-hai; Yong-xiang; Yong-min; Ning-li; De-peng. *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 128, 625.

¹⁴ Dogmak, G.; Behnisch, R.; Mietzsch, F.; Schmidt, H. *Naturwissenschaften*, **1946**, 33, 315.

La importancia del descubrimiento de las tiosemicarbazonas más que un significado directo, ha tenido una repercusión indirecta, pero decisiva en el descubrimiento de la isoniazida medicamento histórico y valioso, frente al *Mycobacterium tuberculosis*. El descubrimiento de la potente actividad de la isoniazida (hidrazida del ácido isonicotínico), fue anunciado casi simultáneamente en 1952 por Domagk y dos grupos americanos, uno del Instituto Squibb y otro perteneciente a Hoffmann-la Roche¹⁵. Se ha demostrado que determinadas tiosemicarbazonas tienen la propiedad de frenar el crecimiento de las bacterias de la tuberculosis. Entre los preparados que se utilizaban para la cura de la tuberculosis se encuentra la tiosemicarbazona del *p*-acetilaminobenzaldehído, que ya no se encuentra en el mercado, véase figura 5.

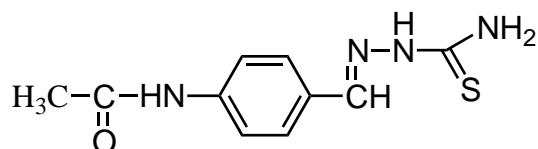
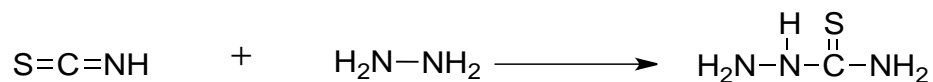


Figura 5. Estructura química del *p*-acetilaminobenzaldehído.

2.2.2 Síntesis de tiosemicarbazidas

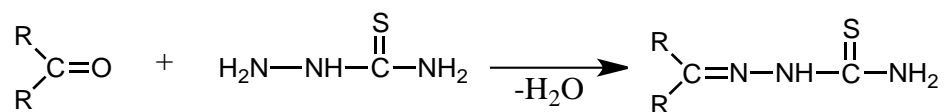
La tiosemicarbazida se puede considerar como la hidracina del ácido tio-carbámico, se obtiene por calentamiento del hidrato de hidracina al 85% con un exceso de tiocianato amónico en atmósfera de nitrógeno, con un rendimiento del 60% (Audrieth, 1954)¹⁵, véase esquema 8.



Esquema 8. Síntesis de tiosemicarbazida.

¹⁵ Raviña, E. *Medicamentos, Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. Quimioterapia antituberculosa. Quimioterapia antileprosa España: Edit. U. de Santiago de Compostela; **2008**, 141, 507.

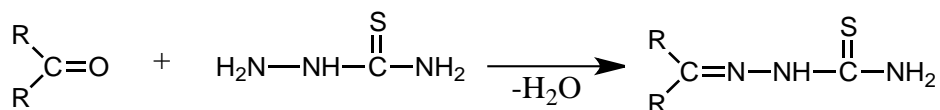
Junto a ella se forma la ditioamina del ácido hidracina-1,2-dicarboxílico-ditiourea, véase esquema 9. Por calentamiento del sulfato de hidracina con tiocianato potásico en disolución acuosa a 90° C (365 K) y adición de acetona, se separa con muy buen rendimiento la tiosemicarbazona de la acetona, cuya hidrólisis permite liberar fácilmente la tiosemicarbazida.



Esquema 9. Adición aldólica o cetónica de la tiosemicarbazida para dar la tiosemicarbazona correspondiente.

2.2.3 Propiedades físicas y químicas de la tiosemicarbazidas

La tiosemicarbazida es una base cristalina, que funde a 181-183 °C. La reacción más importante de la tiosemicarbazida es su adición en disolución acuosa o alcohólica con aldehídos o cetonas, con formación de las correspondientes tiosemicarbazonas, véase esquema 10.



Esquema 10. Formación de una tiosemicarbazona.

Las moléculas de tiosemicarbazona existen en la configuración *trans*, comportándose como ligandos monodentados a través del átomo de azufre, pero se ha comprobado que la metilación del átomo de azufre no implica la imposibilidad de coordinación, sino que entonces ésta puede producirse mediante la unión al centro metálico a través del átomo de nitrógeno hidrazinico y del átomo de nitrógeno amida. Las tiosemicarbazonas que actúan como quelato, tienen los átomos N1 y S en *cis* y explican que el hecho de que la configuración de la tiosemicarbazona sea *cis* o *trans* respecto al enlace C(3)-S se debe a efectos

estéricos y a las formas protonada o desprotonada de las tiosemicarbazonas¹⁶. Las tres formas de coordinación se pueden observar en la figura 6.

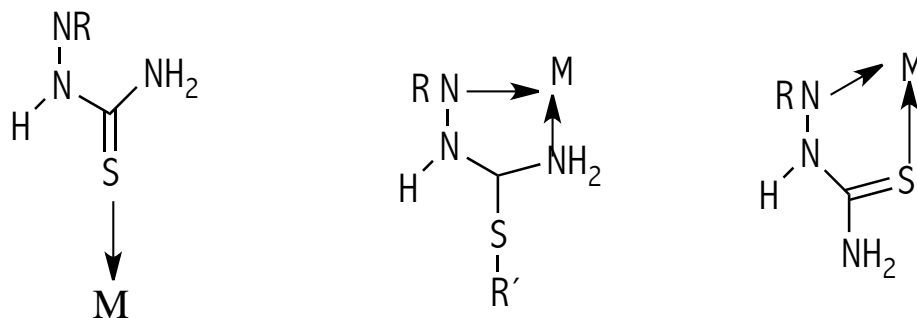


Figura 6. Posibilidades de coordinación de las tiosemicarbazona.

Por calentamiento de la tiosemicarbazida con ácido acético resulta la 1-acetiltiosemicarbazida, $\text{H}_2\text{N-CS-NH-NH-COCH}_3$, la cual se utiliza ampliamente como producto de partida en la síntesis de heterociclos.

2.2.4 Aplicaciones de las tiosemicarbazonas

2.2.4.1 Actividad biológica

Los primeros datos sobre el uso potencial de tiosemicarbazonas como agentes terapéuticos provienen de los estudios de Dogmak¹⁴, que descubrió la existencia de tiosemicarbazonas activas *in vitro* frente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Los estudios sobre su actividad biológica han demostrado un amplio rango de aplicaciones para estos compuestos; ya que presentan actividad antitumoral, antiviral, antibacteriana, antimalarica, y antifúngica, estando normalmente esta actividad relacionada con la presencia de anillos heterocíclicos²⁰. Las tiosemicarbazonas heterocíclicas ejercen su acción biológica en células de mamíferos inhibiendo la ribonucleótido reductasa, una enzima clave en la síntesis de precursores de ADN, siendo en muchos casos la

¹⁶ Rodríguez; R. *Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de la 2-pirazinaformamid*. "Actividad biológica" España: Edit. Universidad de Santiago de Compostela, **2007**, 28, 423

actividad biológica de sus complejos metálicos mayor que las de las tiosemicarbazonas sin coordinar.

2.2.4.2 Actividad antituberculosa

La tiosemicarbazona más utilizada para tratar la tuberculosis es la *p*-acetamidobenzaldehído tiosemicarbazona (tioacetazona), que ha sido empleada en África y Sudamérica como agente antimicrobial para el tratamiento de la tuberculosis, véase figura 7. Sin embargo, este antibiótico presenta efectos tóxicos como son: anemia hemolítica, edema cerebral, erupciones cutáneas y disfunción hepática, además los microorganismos desarrollan resistencia a este fármaco.

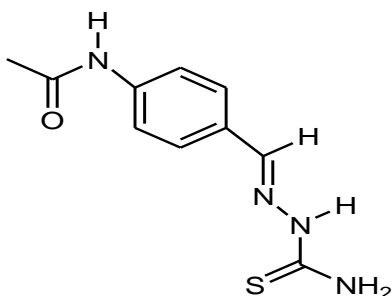


Figura 7. Estructura química de la Tioacetazona.

2.2.4.3 Actividad antiviral

En estudios realizados por Hamre¹⁷, se descubrió que derivados de benzaldehído tiosemicarbazonas son activos contra la infección del virus *Neurovaccinia* en ratones. Numerosos estudios con tiosemicarbazonas heterocíclicas, demostraron que los derivados de isatin-3-tiosemicarbazona son especialmente activos contra los virus *vaccinia* y *Rous sarcoma virus* (RSV), aunque la aplicación más importante para estas tiosemicarbazonas ha sido el uso de la 1-metilisatin-3-tiosemicarbazona, conocido como metisazona contra el adenovirus de la viruela, véase figura 8. Estas propiedades antivirales suelen estar

¹⁷ Hamre, S; Shipman, C.; Drach, J. C.; Klayman, D. L. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1981**, 19, 682.

asociadas a la habilidad de las tiosemicarbazonas para inhibir la ribonucleósido difosfato reductasa (RDR), pero también puede deberse a la inhibición de otras enzimas, tal como sucede en el *Rous sarcoma virus* (RSV), donde se inhibe la ADN polimerasa dependiente de ARN.

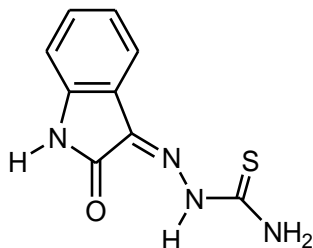


Figura 8. Estructura química del Isatin-3-tiosemicarbazona(metisazona).

2.2.4.4 Actividad antimicrobiana

La *p*-acetamidobenzaldehído tiosemicarbazona (tioacetazona) compuesto previamente mencionado por sus propiedades antituberculosas, también ha sido usado contra *Mycobacterium leprae*, el microorganismo responsable de la lepra, con una actividad muy similar a la observada en el tratamiento contra la tuberculosis¹⁸.

Se ha reportado la actividad antibacteriana de diversas tiosemicarbazonas α (N)-heterocíclicas y sus complejos metálicos para inhibir el crecimiento de un gran número de bacterias dañinas para el ser humano y resistentes a la penicilina, como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter*¹⁹.

En muchas de estas tiosemicarbazonas con actividad antibacteriana el anillo heterocíclico presente es de piridina, y parece que la disustitución sobre el nitrógeno tioamida y la formación de complejos plano cuadrados diamagnéticos

¹⁸ West, D.X.; Padhye, S.B.; Sonawane, P. B. *Structure and Bonding*, "Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes". Berlil. Edit, Springer **1991**, 76.

¹⁹ Dobek, A. S.; Klayman, D. L.; Dickson, E. T.; Scovill, J. P.; Tramont, E. C. *Antimicrob. agents chemother*, **1980**, 18,1, 27.

con un ligando lábil pueden favorecer la actividad antibacteriana de estos compuestos.

Por otra parte, cabe destacar las propiedades antifúngicas de diversas tiosemicarbazonas heterocíclicas y sus complejos metálicos contra una gran variedad de hongos patógenos: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* entre otros.

La actividad antifúngica de las tiosemicarbazonas parece estar considerablemente afectada por los sustituyentes unidos a la molécula de tiosemicarbazona. Así la mayor actividad se da en los derivados de la piridina 2-sustituidos, como 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina o benzoilpiridina. El tamaño de los sustituyentes sobre el nitrógeno tioamida y el metal involucrado en la formación de los complejos también influyen en la capacidad inhibidora contra los hongos²⁰.

2.2.4.5 Actividad antitumoral

La bis(tiosemicarbazonas) y N-heterociclo tiosemicarbazonas comprenden dos interesantes series experimentales de agentes quimioterapéuticos, sobre todo aquellos derivados de 1-formilisoquinolina y 2-formilpiridina, presentando los derivados de la 2-formilpiridina una mayor solubilidad en agua. Diversos derivados de la 2-formilpiridina presentan actividad frente al sarcoma 180 de células ascíticas en ratones, aunque resultan tóxicas a niveles terapéuticos²¹.

Las tiosemicarbazonas heterocíclicas presentan un gran potencial antineoplásico, comprobándose que su actividad se basa en bloquear la síntesis de ADN en las células de mamíferos inhibiendo la enzima ribonucleósido difosfato reductasa (RDR), presumiblemente quelatando a un ión de hierro necesario para la actividad enzimática o por formación de un complejo enzima-hierro-tiosemicarbazona que inhiba la actividad de la RDR²².

²⁰ Liberta, A. E.; West, D. X. *BioMetals*, **1992**, 5, 2, 121.

²¹ Lin, L. F.; Lee, S. J.; Chen, C. T. *Heterocycles*, **1977**, 7, 1, 347.

²² French, F. A.; Blanz, Jr.; E. J.; Amaral, J. R.; French, D. A. *J. Med. Chem*, **1970**, 13, 1117.

No obstante no se puede afirmar que la inhibición del RDR es el único mecanismo de la actividad antitumoral, ya que diversas tiosemicarbonas heterocíclicas han demostrado alterar la actividad de otras enzimas como losina monofosfato (IMP) deshidrogenasa, dihidrofolato reductasa, nucleosido quinasa o DNA polimerasa en células leucémicas murinas y humanas.

Entre los derivados de la 2-formilpiridina, la introducción de un grupo 3-hidroxi en el anillo heterocíclico para dar lugar al compuesto denominado 3-HP que provoca una disminución de la toxicidad y un aumento de la actividad antitumoral, mientras que la 5-hidroxi-2-formilpiridina tiosemicarbona (5-HP) es altamente efectiva frente a la leucemia, al carcinoma ascítico de Ehrlich y al linfoma L-5178Y, y presenta actividad moderada frente al carcinoma pulmonar de Lewis y al adenocarcinoma 755, véase figura 9.

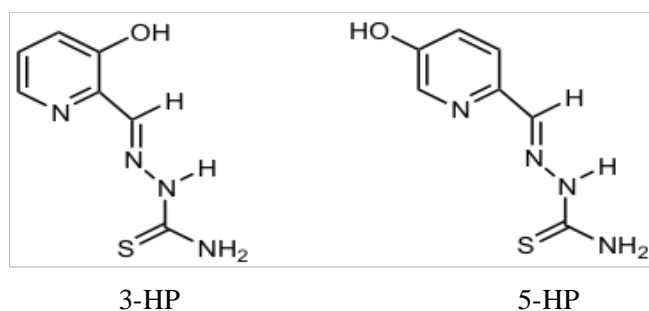


Figura 9. Estructuras químicas de la 3-hidroxi-formilpiridina de la tiosemicarbona (3H) y 5 hidroxiformilpiridina de la tiosemicarbona.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis y caracterización de Ferroceniltiosemicarbazonas con actividad anticancerígena.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de Ferrocenilcetonas mediante la reacción de acilación de Friedel Crafts con el cloruro de acilo correspondiente y el ferroceno.
- Obtención de las Ferroceniltiosemicarbazonas a través de la adición de tiosemicarbazida con la Ferrocenilcetona correspondiente.
- Realizar la elucidación y caracterización de cada uno de los compuestos obtenidos mediante las diferentes técnicas espectroscópicas (IR, UV-Vis, RMN ^1H , ^{13}C), espectrometría de masas y análisis elemental.
- Realizar pruebas de actividad anticancerígena de las Ferroceniltiosemicarbazonas en seis líneas celulares de cáncer humano.

CAPÍTULO IV

EQUIPO Y REACTIVOS

4.1. EQUIPOS

Resonancia Magnética Nuclear

BRUCKER ADVANCE	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C.
VARIAN UNITY	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C.
Referencia	¹ H Tetrametilsilano (Me ₄ Si, 0.00 ppm).
Disolventes	Cloroformo deuterado (CDCl ₃) Metanol deuterado (D ₃ HCOD)

Espectrofotometría de UV-Vis

Espectrofotómetro SHIMADZU UV 160 U.

Espectrofotometría de FT-IR

Espectrofotómetro FT-IR MAGNA.700

Espectrometría de Masas

Espectrómetro de masas JEOL JMS AX505 HA.

Análisis Elemental

GALBRAITH LABORATORIES, INC.

4.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Reactivos.

Alúmina Merk 70-230

<i>orto</i> -flúor cloruro de benzoílo	Aldrich
<i>meta</i> -flúor cloruro de benzoílo	Aldrich
<i>para</i> -flúor cloruro de benzoílo	Aldrich
<i>orto</i> -cloro cloruro de benzoílo	Aldrich
<i>meta</i> -cloro cloruro de benzoílo	Aldrich

<i>para</i> -cloro cloruro de benzoílo	Aldrich
Ferroceno	Aldrich
Terbutoxido de potasio	Aldrich
Cloruro de aluminio	Aldrich

Disolventes

Agua

Hexano

Acetona

Diclorometano

Metanol

Acetato de etilo

Benceno

2-propanol

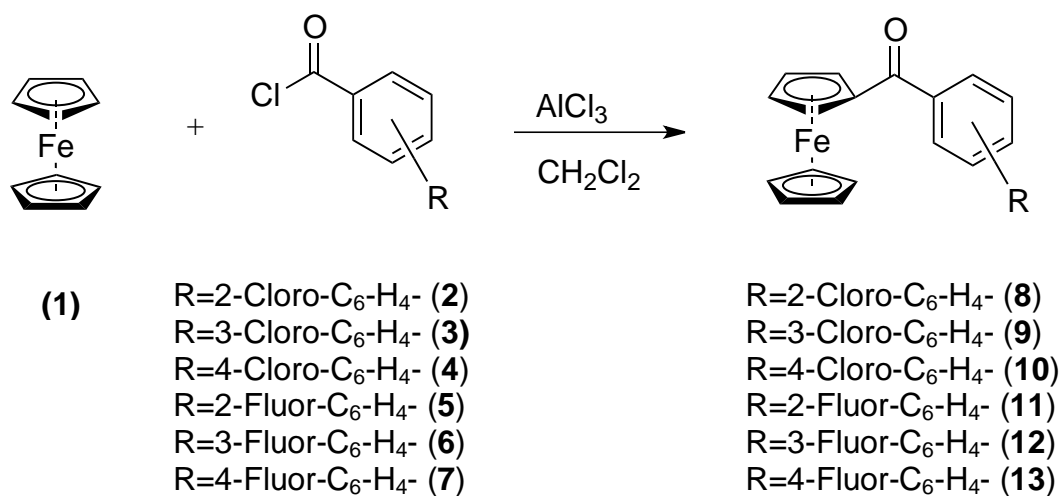
CAPÍTULO V

DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1 Síntesis de Ferrocenilcetonas

En un matraz bola de 250 mL se colocó a reflujo: 1mmol (0.18 g) de ferroceno (1), 1.2 mmol del cloruro de acilo correspondiente (2-7) y 1.5 mmol (0.20 g) cloruro de aluminio (AlCl_3) en 90 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se monitoreo por cromatografía en capa fina y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se detuvo la reacción, agregando 50 mL de agua. La fase orgánica fue separada de la fase acuosa, y llevada a sequedad. El sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna de alúmina neutra, usando como eluyente hexano: acetato de etilo (9:1). Con esta metodología se obtuvieron 6 Ferrocenilcetonas (8-13) sustituidas en las posiciones *-orto*, *-meta* y *-para* ($\text{R} = -o, -m, -p$) por cloro ó flúor, véase esquema 11. Los compuestos fueron obtenidos con rendimientos que van del 56-91%.

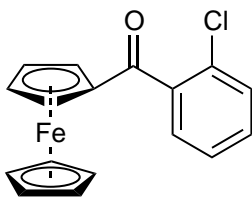


Esquema 11. Síntesis de Ferrocenilcetonas (8-13).

A continuación se presentan las características espectroscópicas de los compuestos 8-13.

Compuesto 8:

(*o*-Clorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 59%.

Aspecto físico: Sólido rojo

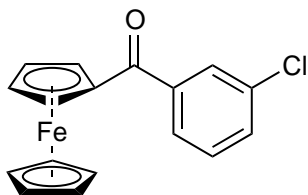
Punto de fusión: 101.2 °C.

EM *m/z*: 324 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 234, 267, 277. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3084, 2644, 2549, 1683, 1626, 1439, 1408, 1287, 1236, 734, 477. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.25 (s, 5H, C₅H₅), 4.6 (s, 2H, C₅H₄), 4.75 (s, 2H, C₅H₄), 7.36-7.38 (m, 2H, Ar-4,5), 7.51 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, Ar-3), 8.02 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz, Ar-6). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 69.9 (C₅H₅), 71.1 (C₅H₄), 72.7 (C₅H₄), 79.9 (Fc ipso), 126.0 (Ar-5), 128.4 (Ar-6), 129.9 (Ar-3), 130.4 (Ar-4), 134.6 (Ar-2), 139.0 (Ar-1), 198 (C=O). **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 62.91, H, 4.04 %. Encontrado: C,62.90, H, 4.03 %.

Compuesto 9:

(*m*-Clorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 91%.

Aspecto físico: Sólido rojo

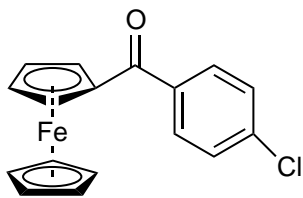
Punto de fusión: 91.1-92.0 °C

EM *m/z*: 324 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 367,239. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3089, 2918, 1692, 1625, 1412, 1286, 1053, 720, 475. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.25 (s, 5H, C₅H₅), 4.6 (s, 2H, C₅H₄), 4.91 (s, 2H, C₅H₄), 7.4 (dd, 1H, *J* = 2.4, 8.1 Hz, Ar-5), 7.4-7.53 (m, 1H, Ar-4), 7.74-7.77 (m, 1H, Ar-2), 7.90-7.92 (m, 1H, Ar-6). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.5 (C₅H₅), 71.6 (C₅H₄), 73.0 (C₅H₄), 78.3 (Fc ipso), 126.3 (Ar-6), 128.4 (Ar-5), 129.7 (Ar-2), 131.6 (Ar-4), 134.5 (Ar-3), 144.5 (Ar-1), 197.8 (C=O). **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 62.91, H, 4.04 %. Encontrado: C,62.92, H, 4.05 %.

Compuesto 10:

(*p*-Clorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 82%.

Aspecto físico: Polvo naranja

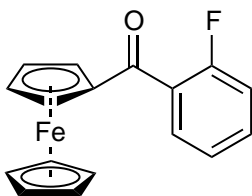
Punto de fusión: 122.5 °C.

EM *m/z*: 324 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 253. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3095, 1626, 1442, 1285, 1085, 820, 481. ¹H **RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.18 (s, 5H, C₅H₅), 4.58 (t, 2H, *J*=1.8 Hz, C₅H₄), 4.86 (t, 2H *J*= 1.8 Hz, C₅H₄), 7.42 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz, Ar-3,5), 7.84 (d, 2H, *J*=8.7 Hz, Ar-2,6). ¹³C **RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.1 (C₅H₅), 71.3 (C₅H₄), 72.6 (C₅H₄), 77.7 (Fc ipso), 128.4 (Ar-3,5), 129.4 (Ar-2,6), 137.6 (Ar-1), 137.9 (Ar-4), 197.5 (C=O). **EM** *m/z*: 324 [M]⁺, **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 62.91, H, 4.04 %. Encontrado: C,62.90, H, 4.05 %

Compuesto 11:

(*o*-fluorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 56%.

Aspecto físico: Polvo rojo

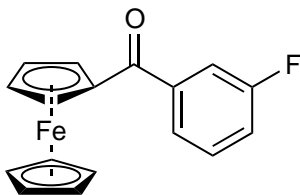
Punto de fusión: 101.6 °C

EM *m/z*: 308 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 235, 265, 276. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3085, 1689, 1638, 1447, 1294, 1219, 836, 754, 485. ¹H **RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.23 (s, 5H, C₅H₅), 4.60 (t, 2H, *J*=2.1 Hz, C₅H₄), 4.82 (t, 2H, *J*=2.1 Hz, C₅H₄), 7.24 (dd, 1H, *J*=1.2, 7.5 Hz, Ar-3), 7.44-7.51 (m, 1H, Ar-5), 7.56 (dd, 1H, *J*= 1.8, 7.2 Hz, Ar-4), 8.02-8.07 (m, 1H, Ar-6). ¹³C **RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.3 (C₅H₅), 71.2 (C₅H₄), 73.1 (C₅H₄), 78.7 (Fc ipso), 116.4 (Ar-3), 124.0 (Ar-5), 129.2 (Ar-6), 132.1 (Ar-4), 133.1 (Ar-1), 159.4 (Ar-2), 196.3 (C=O). **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 66.27, H, 4.25 %. Encontrado: C,66.26, H, 4.23 %

Compuesto 12:

(*m*-fluorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 68%.

Aspecto físico: Solido rojo

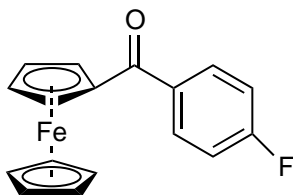
Punto de fusión: 117.1 °C

EM *m/z*: 308 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 278, 238. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3069, 2826, 1686, 1624, 1583, 1448, 1289, 754. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.21 (s, 5H, C₅H₅), 4.64 (s, 2H, C₅H₄), 4.93 (s, 2H, C₅H₄), 7.27 (dd, 1H, *J*=2.1, 8.1Hz, Ar-4), 7.45 (dd, 1H, *J*=2.1, 9.0 Hz Ar-5), 7.63 (dd, 1H, *J*= 2.4, 9.3 Hz, Ar-2), 7.93 (d, 1H, *J*= 8.1 Hz, Ar-6). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.4 (C₅H₅), 71.6 (C₅H₄), 73.1 (C₅H₄), 77.8 (Fc ipso), 115.5 (Ar-2), 118.7 (Ar-4), 123.9 (Ar-6), 130.0 (Ar-5), 141.9 (Ar-1), 164.0 (Ar-3), 197.9 (C=O). **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 66.27, H, 4.25 %. Encontrado: C,66.25, H, 4.27 %

Compuesto 13:

(*p*-fluorofenil) Ferrocenilcetona



Rendimiento 89%,

Aspecto físico: Solido rojo

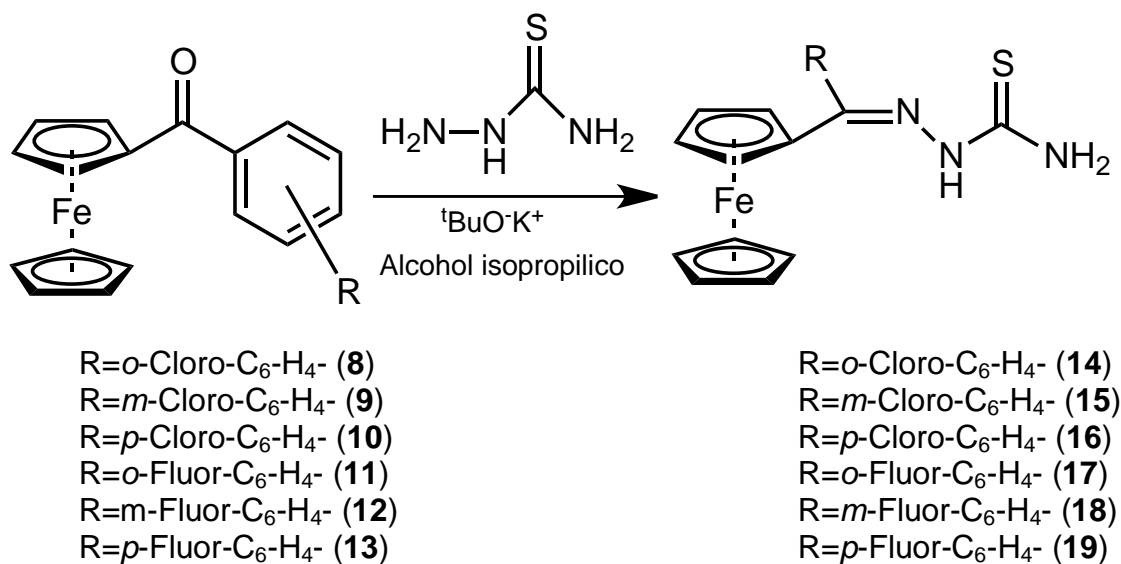
Punto de fusión: 114.2°C

EM *m/z*: 308 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 238. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3083, 1677, 1627, 15,94, 1289, 1215, 823, 480. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.20 (s, 5H, C₅H₅), 4.59 (t, 2H, *J*=1.8 Hz, C₅H₄), 4.88 (t, 2H, *J*=1.8 Hz, C₅H₄), 7.11-7.17 (m, 2H, Ar-2,5), 7.92-7.97 (m, 2H, Ar-2,6). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.2 (C₅H₅), 71.5 (C₅H₄), 72.6 (C₅H₄), 78.0 (Fc ipso), 115.2 (Ar-3,5), 130.5 (Ar-2,6), 135.9 (Ar-1), 164.7 (Ar-4), 197.6 (C=O). **AE:** calculado para C₁₇H₁₃ClFeO: C, 66.27, H, 4.25 %. Encontrado: C,66.25, H, 4.24 %

5.1.2 Síntesis de Ferroceniltiosemicarbazonas

En un matraz bola de 250 mL se disolvieron: 3.3 mmol de Ferrocenilcetona (**8-13**) en 80 mL de 2- propanol, posteriormente se agregaron 6 mmol (0.5 g) de tiosemicarbazida y 4 mmol (0.5 g) de terbutóxido de potasio, la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se realizaron extracciones con una mezcla de agua: benceno (1:4), 4 veces. La fase orgánica fue separada de la fase acuosa y llevada a sequedad. El sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna, usando sílica 35-70 y como medio de elución hexano: acetato de etilo (6:4). Mediante esta metodología se obtuvieron 6 Ferroceniltiosemicarbazonas (**14-19**) sustituidas en las posiciones *-orto*, *-meta* y *-para* ($R = -o, -m, -p$) por cloro ó flúor, véase esquema 12. Los compuestos fueron obtenidos en rendimientos del 15-60%.

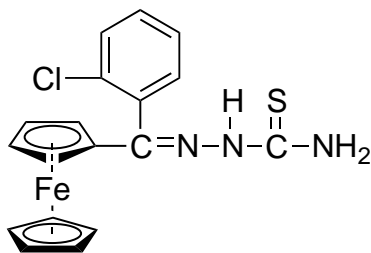


Esquema 12. Síntesis de Ferroceniltiosemicarbazonas (**14-19**).

A continuación se presentan las características espectroscópicas de los compuestos **14-19**.

Compuesto 14 :

1-(2-clorofenil)(ferrocenil)
tiosemicarbazona

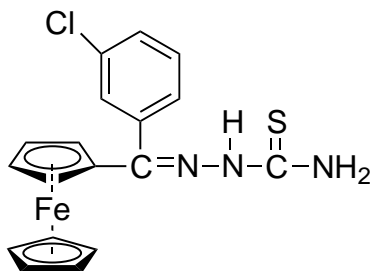


Rendimiento 38%,
Aspecto físico: Solido naranja
Punto de fusión: 98.1°C.
EM m/z : 397 $[M]^+$.

UV-Vis: CH_2Cl_2 , λ (nm): 319, 287, 231. **IR** (KBr, cm^{-1}): 3345, 3263, 3142, 1730, 1581, 1488, 1240 743, 478. 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ_H (ppm): 4.12 (t, 2H, $J=1.8$ Hz, C_5H_4), 4.19 (s, 5H, C_5H_5), 4.36 (t, 2H, $J=1.8$ Hz, C_5H_4), 6.55 (Sa, 2H, NH_2), 7.32-7.34 (m, 1H, Ar-5), 7.45 (dd, 1H, $J=2.4, 8.4$ Hz, Ar-3), 7.53-7.55 (m, 1H, Ar-4), 8.29 (s, 1H, Ar-6), 10.68 (Sa, 1H, NH). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz), δ_C (ppm): 69.7 (C_5H_5), 70.4 (C_5H_4), 70.6 (C_5H_4), 80.8 (Fc ipso), 127.7 (Ar-5), 129.9 (Ar-3), 130.6 (Ar-2), 130.8 (Ar-6), 131.7 (Ar-4), 132.5 (Ar-1), 150.8 (C=N) 178.0 (C=S). **EM** m/z : 397 $[M]^+$, **AE:** calculado para $C_{18}H_{16}ClFeN_3S$: C, 54.36, H, 4.06 %, N, 10.57 %. Encontrado: C, 54.34, H, 4.08, N, 10.59 %.

Compuesto 15:

1-(3-clorofenil) (ferrocenil)
tiosemicarbazona

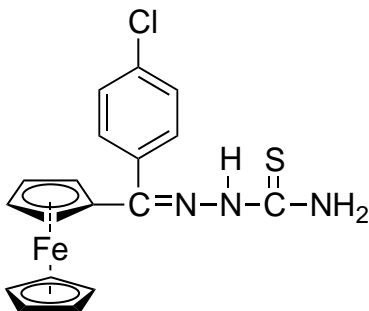


Rendimiento 47%,
Aspecto físico: Solido amarillo
Punto de fusión: 92.6°C.
EM m/z : 397 $[M]^+$.

UV-Vis: CH_2Cl_2 , λ (nm): 339, 295, 234. **IR** (KBr, cm^{-1}): 3403, 3225, 3143, 1598, 1486, 1466, 1286, 1078, 732, 479. 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ_H (ppm): 4.47 (s, 5H, C_5H_5), 4.49 (s, 2H, C_5H_4), 4.59 (s, 2H, C_5H_4), 6.35 (Sa, 2H, NH_2), 7.25 (t, 1H, $J=8.1$ Hz, Ar-5), 7.35-7.37 (m, 1H, Ar-4), 7.38-7.39 (m, 1H, Ar-6), 7.45 (d, 1H, $J=2.1$ Hz, Ar-2), 11.04 (Sa, 1H, NH). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz), δ_C (ppm): 79.7 (C_5H_5), 71.5 (C_5H_4), 73 (C_5H_4), 81. (Fc ipso), 127.4 (Ar-6), 128.8 (Ar-2), 129.7 (Ar-5), 130.1 (Ar-4), 134.6 (Ar-3), 140.5 (Ar-1), 148.5 (C=N) 178.7 (C=S). **AE:** calculado para $C_{18}H_{16}ClFeN_3S$: C, 54.36, H, 4.06 %, N, 10.57 %. Encontrado: C, 54.34, H, 4.04, N, 10.59 %.

Compuesto16:

1-(4-clorofenil) (ferrocenil)
tiosemicarbazona

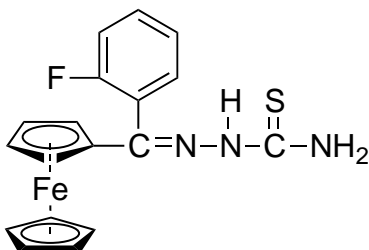


Rendimiento 54%,
Aspecto físico: Solido naranja
Punto de fusión: 219°C.
EM *m/z*: 397 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 331, 222. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3405, 3231, 3151, 1596, 1472, 1284, 1085, 819, 470. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.48 (s, 5H, C₅H₅), 4.49 (t, 2H, *J*= 4.1 Hz, C₅H₄), 4.58 (t, 2H, *J*= 2.1 Hz, C₅H₄), 6.26 (Sa, 2H, NH₂), 7.04 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, Ar-3,5), 7.52 (d, 2H, *J*=9.0 Hz, Ar-2,6), 11.04 (Sa, 2H, NH). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 70.1 (C₅H₅), 70.2 (C₅H₄), 70.9 (C₅H₄), 72.8. (Fc ipso), 130.0 (Ar-3,5), 130.3 (Ar-2,6), 134.4 (Ar-1), 148.4 (Ar-4), 165.1 (C=N), 178.3 (C=S). **AE:** calculado para C₁₈H₁₆ClFeN₃S: C, 54.36, H, 4.06 %, N, 10.57 %. Encontrado: C, 54.34, H, 4.04, N, 10.55 %.

Compuesto 17:

1-(2-fluorofenil) (ferrocenil)
tiosemicarbazona

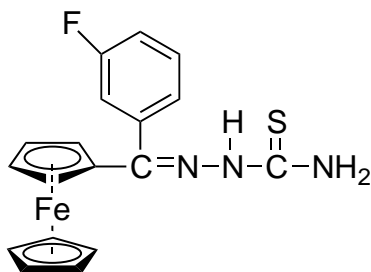


Rendimiento 15%,
Aspecto físico: Solido naranja
Punto de fusión: 101.6°C.
EM *m/z*: 381 [M]⁺.

UV-Vis: CH₂Cl₂, λ(nm): 317, 288, 230. **IR** (KBr, cm⁻¹): 3417, 3252, 3154, 1605, 1489, 1459, 1102, 1027, 769, 478. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃), δ_H (ppm): 4.10 (s, 2H, C₅H₄), 4.18 (s, 5H, C₅H₅), 4.40 (s, 2H, C₅H₄), 6.27 (Sa, 2H, NH₂), 7.29-7.34 (m, 1H, Ar-3), 7.37-7.47 (m, 1H, Ar-5), 7.49-7.59 (m, 1H, Ar-4), 8.07 (d, 1H, *J*=8.1 Hz, Ar-6), 10.98 (br, 2H, NH). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75 MHz), δ_C (ppm): 68.0 (C₅H₅), 69.5 (C₅H₄), 69.8 (C₅H₅), 80.8. (Fc ipso), 117.3(Ar-3), 119.4 (Ar-1), 121.4 (Ar-5), 125.3 (Ar-6), 130.0 (Ar-4), 148.0, (Ar-2), 160.4, (C=N), 178.3 (C=S) **AE:** calculado para C₁₈H₁₆ClFeN₃S: C, 56.71, H, 4.23 %, N, 11.02 %. Encontrado: C, 56.7, H, 4.22, N, 11.04 %.

Compuesto 18:

1-(3-fluorofenil) (ferrocenil)
tiosemicarbazona

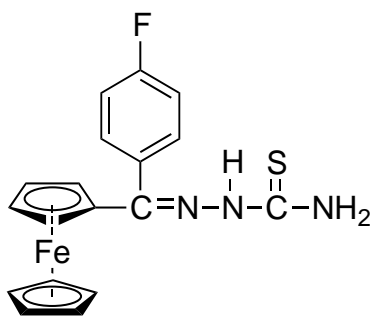


Rendimiento 49%,
Aspecto físico: Solido amarillo-naranja
Punto de fusión: 161.0°C.
EM m/z : 381 $[M]^+$.

UV-Vis: CH_2Cl_2 , $\lambda(\text{nm})$: 329, 296, 234.
IR (KBr, cm^{-1}): 3408, 3243, 3144, 1593, 1475, 1294, 1219, 793, 477. **$^1\text{H RMN}$** (300 MHz, CDCl_3), δ_{H} (ppm): 4.48 (s, 5H, C_5H_5), 4.51 (t, 2H, $J=2.4$ Hz, C_5H_4), 4.59 (t, 2H, $J=2.4$ Hz, C_5H_4), 6.33 (s, 1H, NH_2), 7.08 (dd, 1H, $J=2.4, 8.7$ Hz Ar-4), 7.24-7.28 (m, 1H, Ar-5), 7.31 (d, 1H, $J=2.7$ Hz, Ar-2), 7.50-7.6 (m, 1H, Ar-6), 11.05 (s, 2H, NH). **$^{13}\text{C RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz), δ_{C} (ppm): 70.37 (C_5H_5), 71.1 (C_5H_4), 72.5 (C_5H_4), 80.8 (Fc ipso), 115.6 (Ar-2), 116.7 (Ar-4), 124.5 (Ar-6), 129.6 (Ar-5), 131.7 (Ar-1), 148.1, (Ar-3), 164.4, (C=N), 178.6 (C=S). **AE:** calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClFeN}_3\text{S}$: C, 56.71, H, 4.23 %, N, 11.02 %. Encontrado: C, 56.70, H, 4.22, N, 11.05 %.

Compuesto 19:

1-(4-fluorofenil) (ferrocenil)
tiosemicarbazona



Rendimiento 60%,
Aspecto físico: Solido naranja
Punto de fusión: 214°C.
EM m/z : 381 $[M]^+$.

UV-Vis: CH_2Cl_2 , $\lambda(\text{nm})$: 328, 233. **IR** (KBr, cm^{-1}): 3424, 3228, 1588, 1476, 1286, 1091, 824, 474. **$^1\text{H RMN}$** (300 MHz, CDCl_3), δ_{H} (ppm): 4.48 (s, 5H, C_5H_5), 4.49 (t, 2H, $J=1.9$ Hz, C_5H_4), 4.58 (t, 2H, $J=1.9$ Hz, C_5H_4), 6.27 (s, 2H, NH_2), 7.04 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, Ar-3,5), 7.53 (d, 2H, $J=9.0$ Hz Ar-2,6), 11.04 (s, 1H, NH). **$^{13}\text{C RMN}$** (CDCl_3 , 75 MHz), δ_{C} (ppm): 70.37 (C_5H_5), 70.1 (C_5H_5), 70.2 (C_5H_4), 78. (Fc ipso), 115.0 (Ar-3,5), 130.4 (Ar-2,6), 134.4 (Ar-1), 148.6 (C=N), 165.3 (Ar-4), 178.4 (C=S). **EM m/z :** 381 $[M]^+$, **AE:** calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClFeN}_3\text{S}$: C, 56.71, H, 4.23, N, 11.02 %. Encontrado: C, 56.73, H, 4.20, N, 11.01 %.

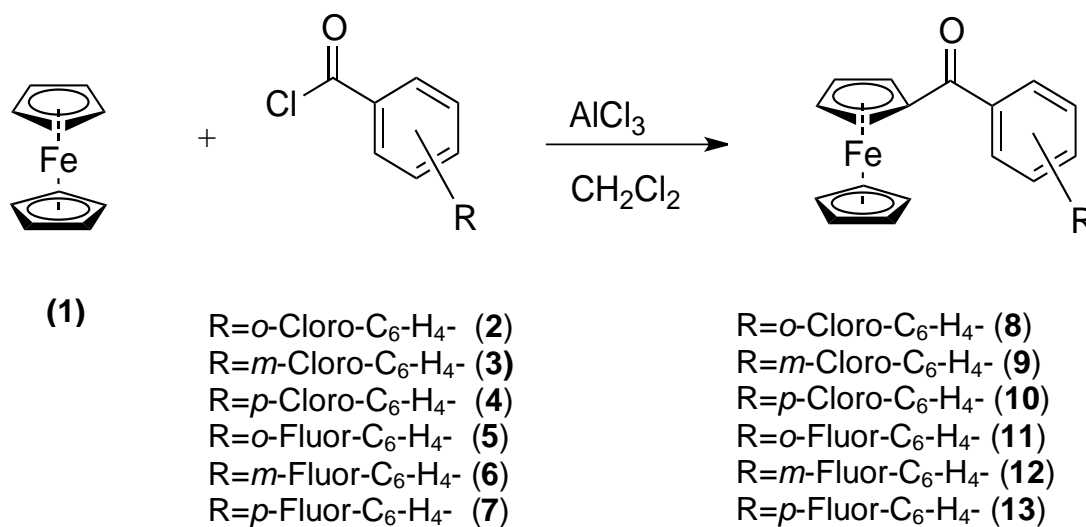
CAPÍTULO VI

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cada uno de los compuestos obtenidos en las diferentes etapas de síntesis fueron caracterizados y elucidados por las técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , IR, UV-vis, así como por espectrometría de masas y análisis elemental. Los datos espectroscópicos se encuentran reportados en el capítulo V. A continuación se describe el análisis de resultados de cada una de las etapas de síntesis, con un ejemplo detallado de alguno de los compuestos sintetizados.

6.1 Obtención de Ferrocenilcetonas

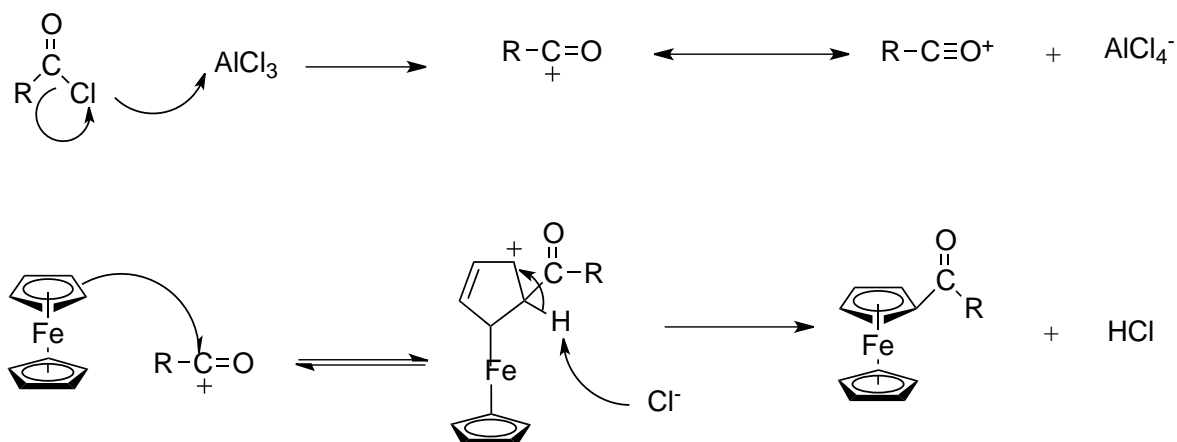
La síntesis de las ferrocenilcetonas se realizó mediante una reacción de acilación de Friedel y Crafts, entre el ferroceno **1** y el cloruro de benzoilo correspondiente (**2-7**), en presencia de un ácido de Lewis como catalizador (AlCl_3), esquema 13. Mediante esta metodología se obtuvieron 6 Ferrocenilcetonas (**8-13**) de tipo aromático sustituidas en las posiciones *-orto*, *-meta* y *-para* por cloro ó flúor. Los compuestos fueron obtenidos en rendimientos que van del 56-91%, siendo los compuestos sustituidos en *-orto* los menos favorecidos con rendimientos del 59% (**8**) y 56% (**11**), mientras que los compuestos sustituidos en posición *-meta* fueron obtenidos en rendimientos más altos, del 82% (**10**) y 89% (**13**).



Esquema 13, Síntesis de Ferrocenilcetonas

6.1.1 Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de la acilación de Friedel y Crafts se inicia con la formación de un complejo entre el cloruro de acilo (**2-7**) y el tricloruro de aluminio (AlCl_3), la formación del ión tetracloruro de aluminio origina la formación del ión acilo, este ión acilo actúa como electrófilo rápidamente con el ferroceno, originando el producto de acilación, que corresponde a una ferrocenilcetona, véase esquema 14.



Esquema 14. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de acilación de Friedel and Crafts.

Los compuestos (**8-13**) son similares por tal motivo se analiza sólo uno de ellos.

Inicialmente se caracterizo por resonancia magnética nuclear, en la figura 10 se muestra el espectro de RMN ^1H del compuesto **8**, en el cual se observa a 4.25 ppm la señal asignada al C_5H_5 del ferroceno, en 4.6 y 4.75 ppm las señales asignadas al C_5H_4 del ferroceno, en la región de 7.36-7.38 ppm se observa un multiplete asignado a los protones aromáticos 4 y 5, en 7.51 ppm un doblete asignado al protón aromático 3 con una $J= 3.0 \text{ Hz}$ y finalmente en 8.02 ppm un doblete asignado al protón aromático 6 con una $J= 3.0 \text{ Hz}$.

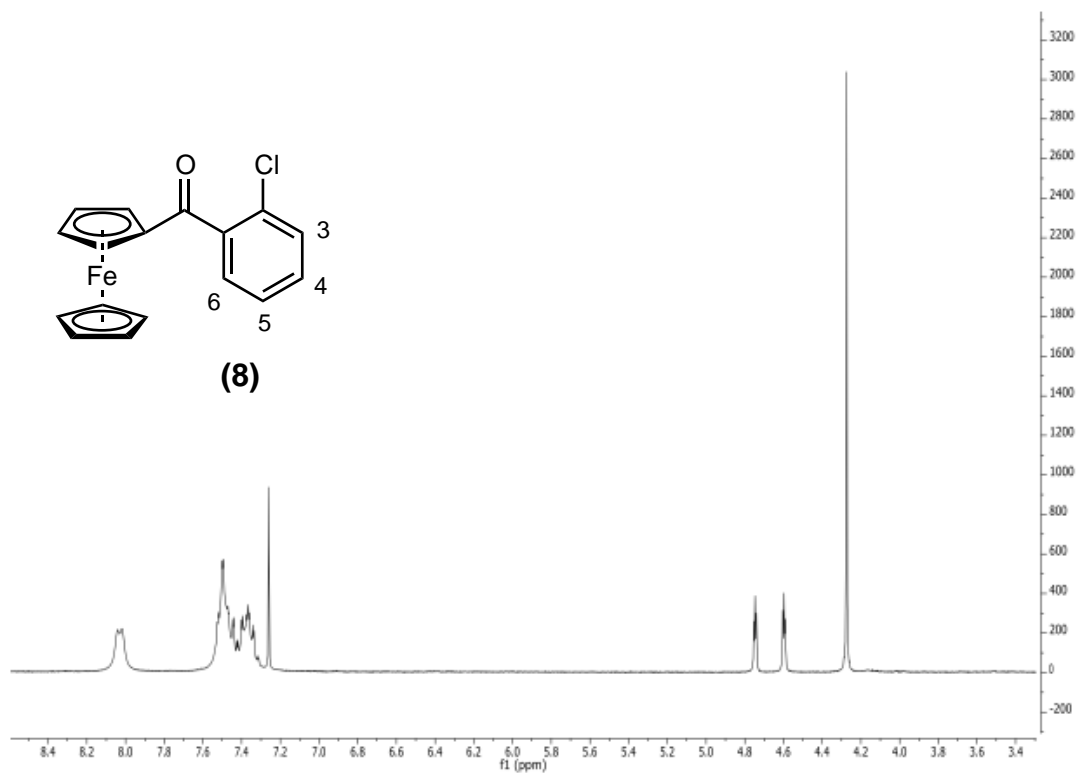


Figura 10. Espectro de RMN ^1H del compuesto **8**, (2-Clorofenil)Ferrocenilcetona

En la figura 11 que corresponde al espectro de RMN ^{13}C del compuesto **8**, se observa en 69.9 ppm la señal asignada al C_5H_5 del ferroceno, en 71.1 y 72.7 ppm las señales asignadas al C_5H_4 del ferroceno, en 79.9 ppm la señal asignada al carbono *ipso* del ferroceno, de la región de 126.0–139.0 ppm las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático, y finalmente en 198 ppm la señal asignada al grupo carbonilo.

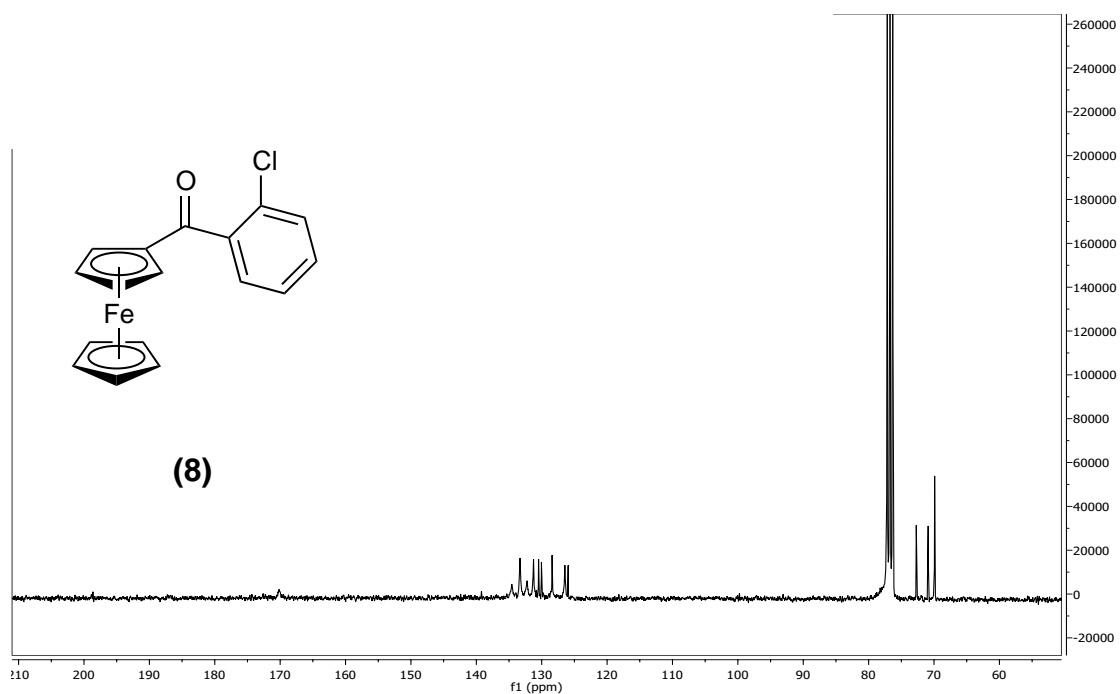


Figura 11. Espectro RMN ^{13}C del compuesto **8**, (2-Clorofenil) Ferrocenilcetona

La obtención del compuesto **8** fue confirmada por espectrometría de masas mediante ionización electrónica. En la figura 12 que corresponde al espectro de masas del compuesto **8** se observa el pico con m/z 324 que corresponde al ión molecular $[\text{M}]^+$ del compuesto.

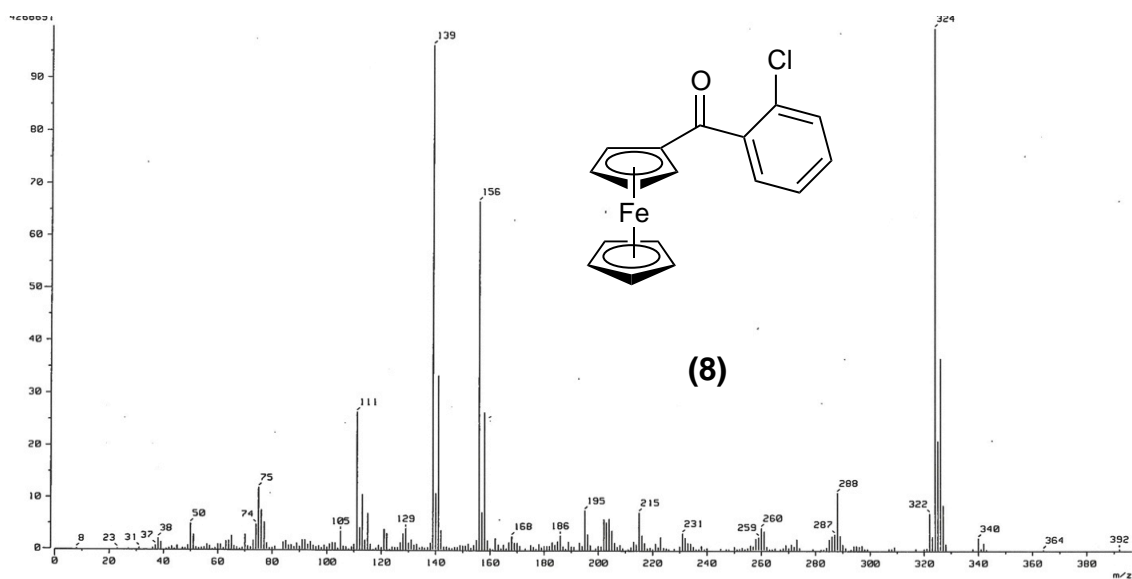


Figura 12. Espectro de masas del compuesto **8** (2-Clorofenil) Ferrocenilcetona.

La figura 13 que corresponde al espectro de infrarrojo del compuesto **8**, se observa una banda a 3084cm^{-1} perteneciente a C-H del anillo aromático, en 1626cm^{-1} una banda que corresponde C=O de la cetona.

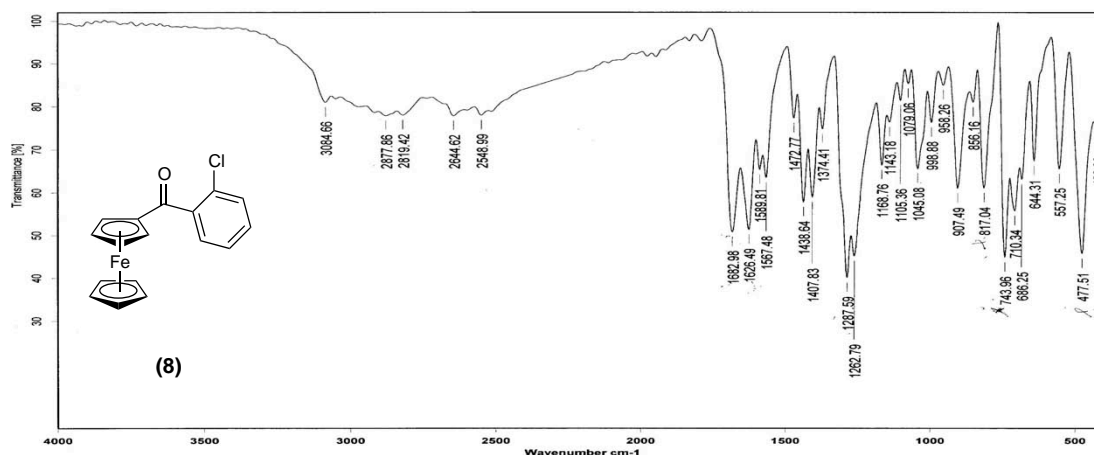


Figura 13. Espectro de IR del compuesto **8** (2-Clorofenil) Ferrocenilcetona.

6.1.2 Análisis de difracción de Rayos-X de Ferrocenilcetonas

En el caso del compuesto **10**, se lograron crecer cristales en diclorometano (CH_2Cl_2) de la calidad necesaria para realizar estudios de difracción de Rayos-X.

En la figura 13 se observa el arreglo molecular, empaque cristalino y celda unitaria del compuesto **10**. En la tabla 1 se describen los datos estructurales y las constantes de celda obtenidos.

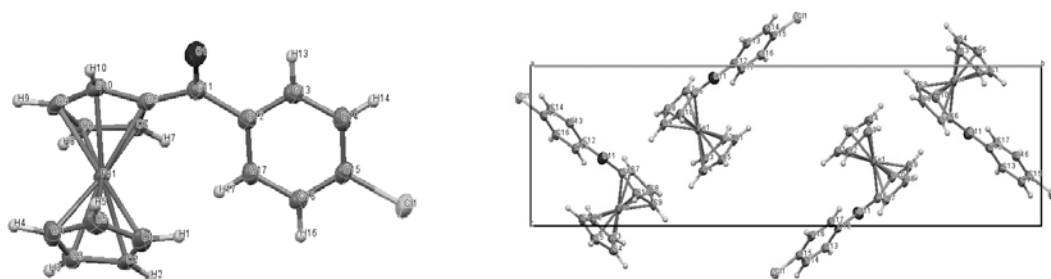


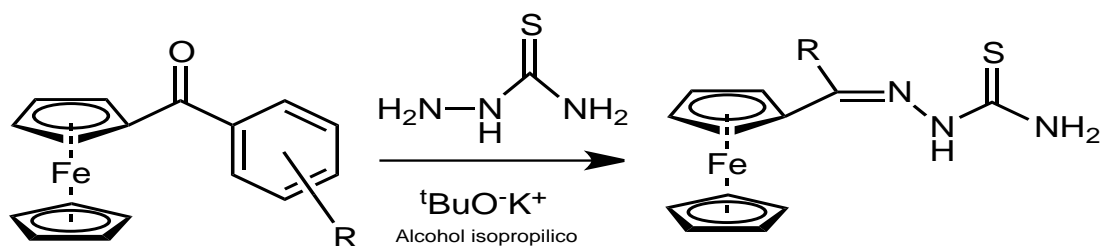
Figura. 14. La estructura cristalina y compacta del compuesto **10**. Angulo de enlace seleccionados (Å): C(6)-C(7)=1.440(5), C(6)-C(11)=1.490(5), C(11)-C(12) = 1.497(5), C(11)-O(1) = 1.222(5), C(12)-C(13) = 1.392(5), C(15)-Cl(1) = 1.744(4). Angulo de enlace (°): C(10)-C(6)-C(11)=121.9(3), C(7)-C(6)-C(11)=130.7(3), O(1)-C(11)-C(6)=118.2(3), O(1)-C(11)-C(12)=119.3(3), C(6)-C(11)-C(12)=122.6(3), C(13)-C(12)-C(11)=117.1(3), C(14)-C(15)-Cl(1)=119.9(3).

TABLA 1. DATOS DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA DEL COMPUESTO 10

Formula empírica	C17 H13 Cl Fe O
Peso de la formula	324.57
Temperatura	130(2) K
Longitud de onda	1.54184 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 21/n
Dimensiones celulares de la unida	a=6.1344(3) Å, b=27.9121(14), c=8.0109(4) Å, Alfa=90°, Beta=103.081(5)°, Gama=90°
Volumen	1336.07(11) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.614Mg/m ³
Coeficiente de absorción	10.802 mm ⁻¹
F(000)	664
Tamaño del cristal	0.4075 0.2073 0.0761 mm ³
Rango Theta para colección de datos	5.89 a 68.11°
Rangos de índice	-7<=h<=4, -20<=k<=33, -8<=l<=9
Reflexión de colecciones	4350
Reflexiones independientes	2430 [R(int) = 0.0418]
Cumplimiento de theta 68.11°	99.3%
Método de refinamiento	Matriz-completa cuadrados- mínimos en F ²
Datos	2430
Restricciones	0
Parámetros	181
Bondad de ajuste en F²	1.033
Índices R finales [1>2sigma(1)]	R1 = 0.0495, wR2 = 0.1224
Índices R (toda la información)	R1 = 0.0585, wR2 = 0.1309

6.2 Obtención de Ferroceniltiosemicarbazonas

La síntesis de las ferroceniltiosemicarbazonas se realizó a través de una reacción de adición entre las Ferrocenilcetonas (**8-13**) y la tiosemicarbazida, en 2-propanol, como disolvente. Mediante esta metodología se obtuvieron 6 Ferroceniltiosemicarbazonas (**14-19**) de tipo aromático sustituidas en las posiciones *-orto*, *-meta* y *-para* por cloro ó flúor. Los compuestos fueron obtenidos en rendimientos que van del 15–60%, siendo los compuestos sustituidos en *-orto* los menos favorecidos con rendimientos del 38% (**14**) y 15% (**17**), mientras que los compuestos sustituidos en posición *-para* fueron obtenidos en rendimientos más altos, del 60% (**19**) y 54% (**16**)



R=*o*-Cloro-C₆-H₄- (**8**)
R=*m*-Cloro-C₆-H₄- (**9**)
R=*p*-Cloro-C₆-H₄- (**10**)
R=*o*-Fluor-C₆-H₄- (**11**)
R=*m*-Fluor-C₆-H₄- (**12**)
R=*p*-Fluor-C₆-H₄- (**13**)

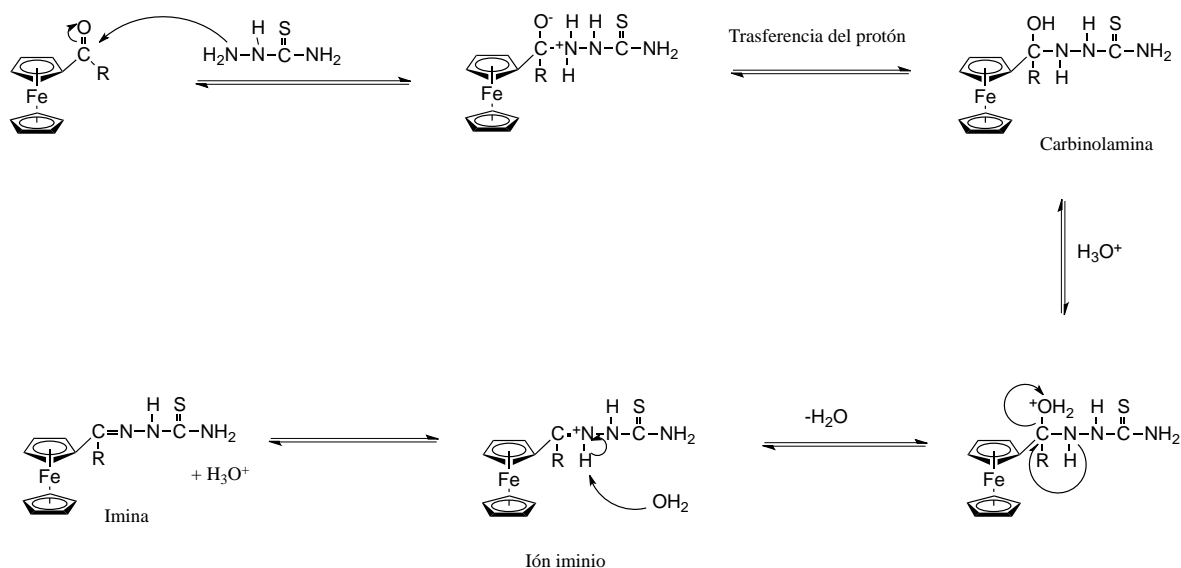
R=*o*-Cloro-C₆-H₄- (**14**)
R=*m*-Cloro-C₆-H₄- (**15**)
R=*p*-Cloro-C₆-H₄- (**16**)
R=*o*-Fluor-C₆-H₄- (**17**)
R=*m*-Fluor-C₆-H₄- (**18**)
R=*p*-Fluor-C₆-H₄- (**19**)

Esquema 14. Síntesis de Ferroceniltiosemicarbazonas (**14-19**).

6.2.1 Mecanismo de reacción:

El mecanismo de reacción propuesto, se inicia con el ataque nucleófilico de la amina primaria terminal de la semicarbazida al carbonilo de la cetona ferrocenilica. El ataque de la amina, seguido de la protonación del átomo de oxígeno (y la desprotonación del átomo de nitrógeno), da lugar al intermediario inestable denominado carbinolamina.

La carbinolamina se transforma en imina mediante la pérdida de agua y la formación de un doble enlace entre el carbono y el nitrógeno, dando lugar a la molécula denominada tiosemicarbazona, véase esquema 15.



Esquema 15. Mecanismo de reacción para la obtención de las Ferroceniltiosemicarbazonas.

Los compuestos (**8-13**) son similares por tal motivo se analiza sólo uno de ellos.

Inicialmente se caracterizaron por resonancia magnética nuclear, en la figura 14 se muestra el espectro de RMN ¹H del compuesto **14**, en 4.12-4.36 ppm se observa un triplete asignado a C₅H₄ del ferroceno con una $J=1.8$ Hz. En 4.19 ppm se observa un singulete que corresponde a la señal asignada al C₅H₅ del ferroceno, en 6.55 ppm la señal asignada al NH₂, en las regiones 7.32-7.34 ppm se observa un multiplete asignado al protón aromático 5, en 7.45 un doblete asignado al protón aromático 3, con una $J=2.4, 8.4$ Hz, en 7.53-7.55 se observa un multiplete del protón aromático 4, en 8.29 un singulete del protón aromático 6, en 10.86 la señal asignada al NH.

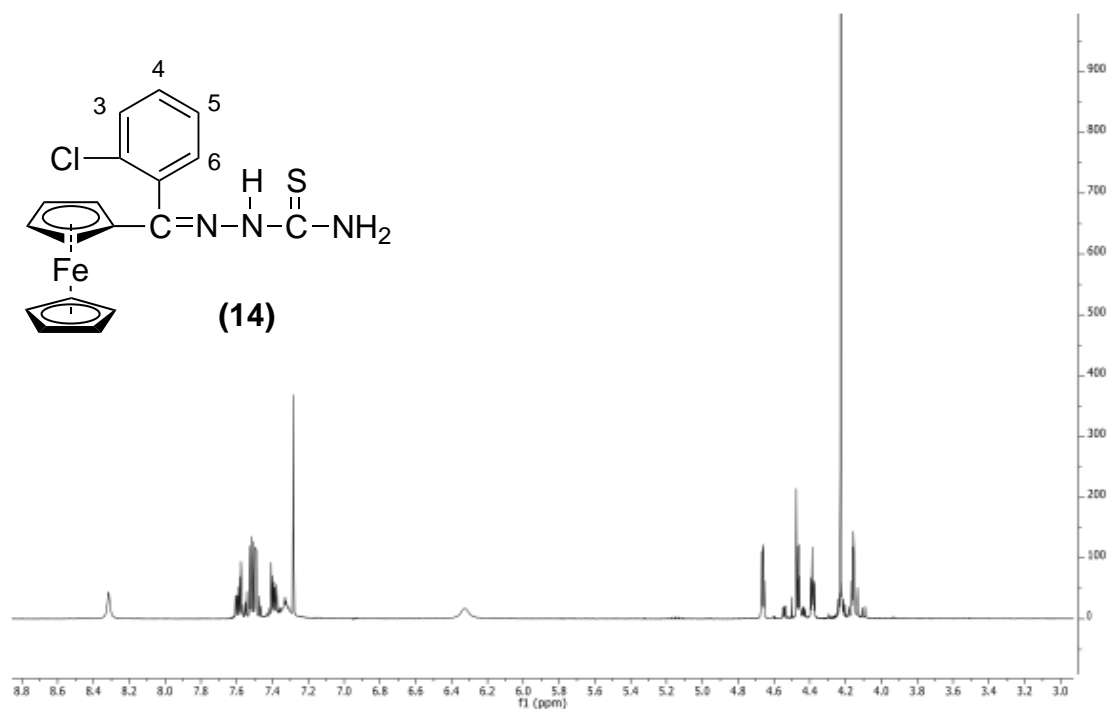


Figura 15. Espectro de RMN ¹H del compuesto **14**, 1-(2-clororfenil) (ferrocenil) tiosemicarbazona

En la figura 15 que corresponde al espectro de RMN ¹³C del compuesto **14**, se observa en 69.7 ppm la señal asignada al C₅H₅ del ferroceno, en 70.4 y 70.6 las señales asignadas al C₅H₄ del ferroceno, en 80.8 ppm la señal asignada al carbono *ipso* del ferroceno, de la región de 127.7–132.5 ppm las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático, en 150.8 ppm la señal asignada al C=N y finalmente en 178.0 para C=S.

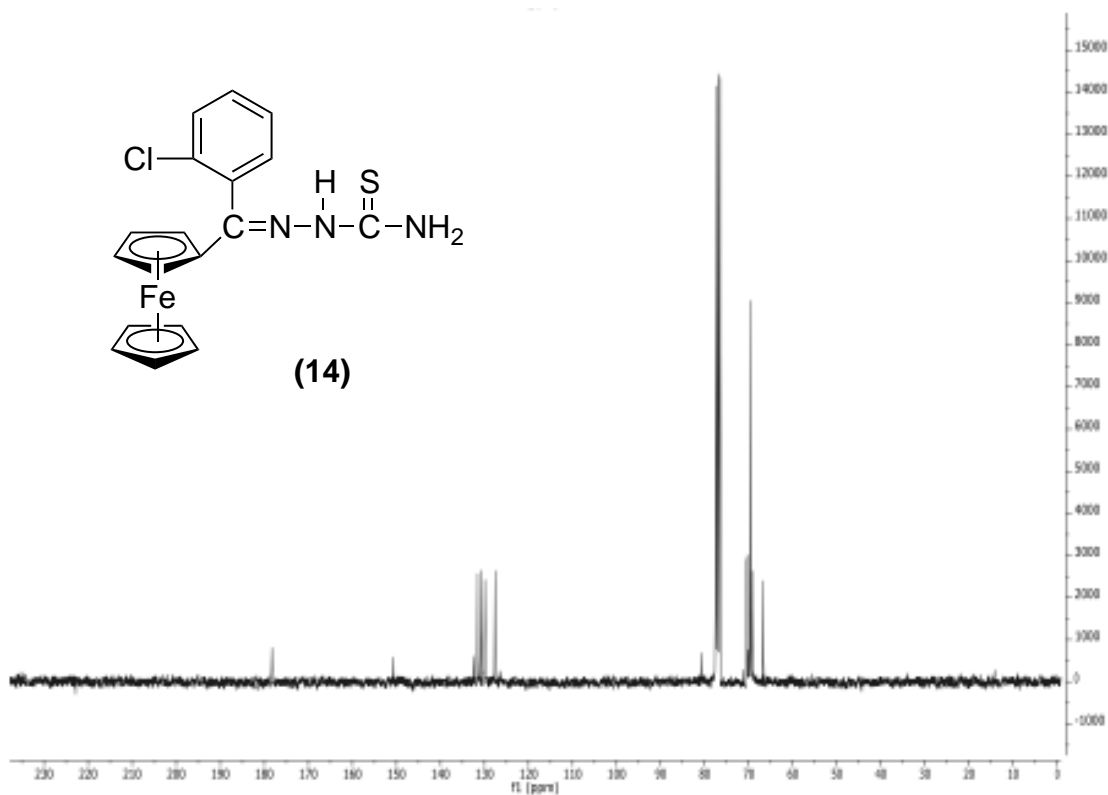


Figura 16. Espectro de ^{13}C del compuesto **14**, 1-(2-clororfenil)(ferrocenil) tiosemicarbazona.

La obtención del compuesto **14** fue confirmada por espectrometría de masas mediante ionización electrónica. En la figura 16 que corresponde al espectro de masas del compuesto **14** se observa el pico con m/z 397 que corresponde al ión molecular $[\text{M}]^+$ del compuesto.

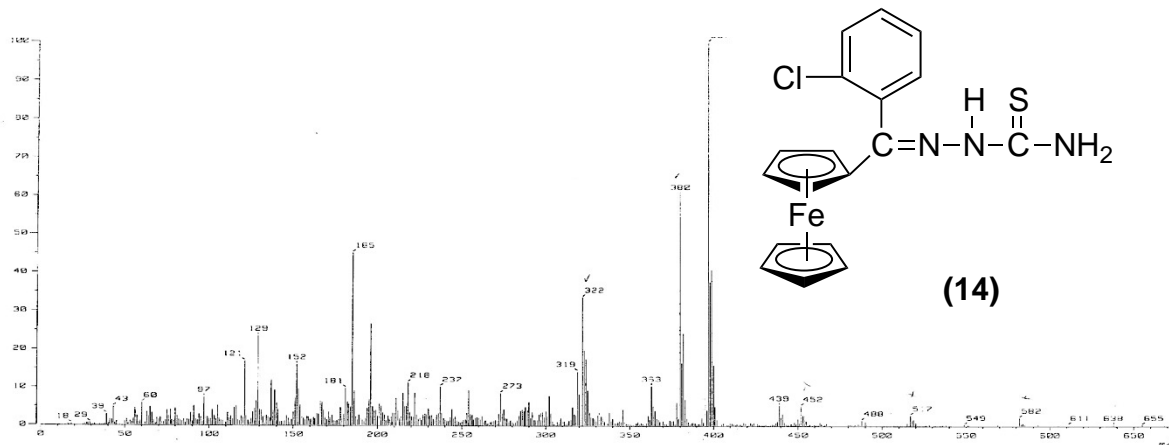


Figura 17. Espectro de masas del compuesto **14**, 1-(2-clororfenil)(ferrocenil) tiosemicarbazona.

En la figura 18 que corresponde al espectro de infrarrojo del compuesto **14**, se puede observar a 3263.35 y 1581.39 cm^{-1} las bandas pertenecientes a N-H, y en 3141.67 y 1488.95 cm^{-1} las bandas pertenecientes a C-H del anillo aromático y ferroceno.

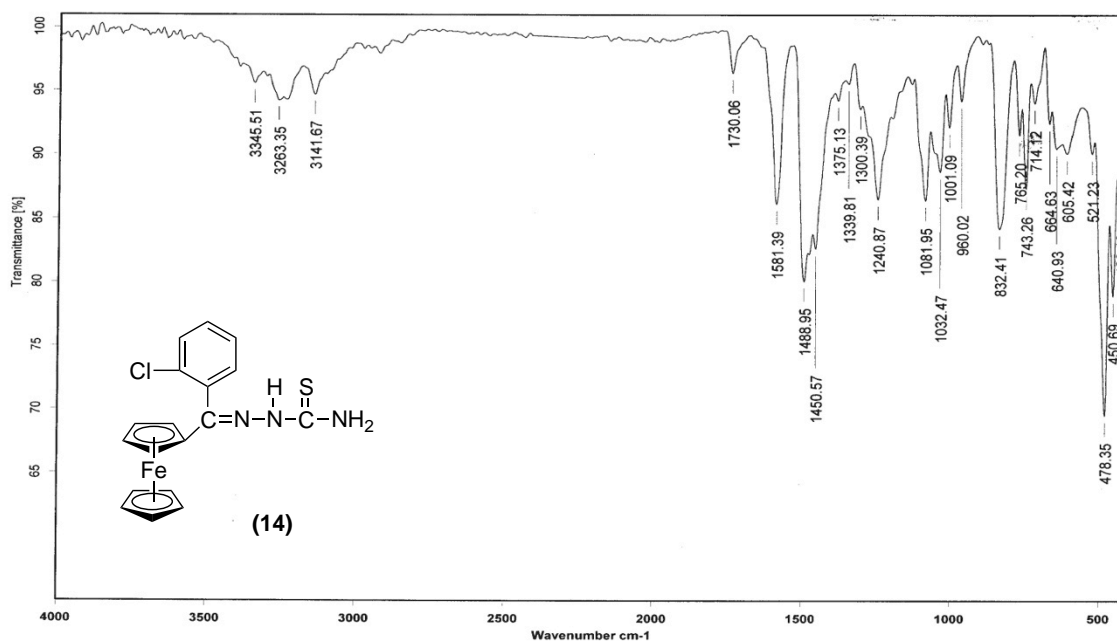


Figura 18. Espectro de IR del compuesto **14**, 1-(2-clororfenil)(ferrocenil) tiosemicarbazona.

CAPÍTULO VII

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.1 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD, SULFORODAMINA B (SRB)

El ensayo o test de la sulforodamina B (SRB) fue desarrollado en 1990, y es uno de los métodos ampliamente usados en la determinación y selección de compuestos con altos niveles de citotoxicidad *in vitro*²³. El ensayo se basa en la habilidad de unión de la SRB a componentes proteínicos de la célula que han sido fijados a las placas de cultivo tisular por ácido tricloroacético. La SRB es un colorante rosa brillante, el cual es un aminoxantano con dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos con carácter básico en condiciones ligeramente ácidas, y que se disocian bajo condiciones básicas. Como la unión de SRB es estequiométrica a la cantidad de colorante extraído de las células teñidas, es directamente proporcional a la masa celular. Este ensayo ha sido ampliamente usado en pruebas de toxicidad de fármacos con líneas celulares cancerosas y no cancerosas²⁴. En el presente trabajo se realizó el estudio *in vitro* con seis líneas celulares de cáncer humano. K-562 (Leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (Adenocarcinoma pulmonar humano), HCT-15 (Adenocarcinoma colorectal humano), PC-3 (Cáncer de próstata humano), MCF-7 (Cáncer de mama), U-251 (Glía de sistema nervioso central, SNC).

7.1.1. Metodología para el ensayo de sulforodamina (SRB)

De un cultivo celular las células fueron tomadas y diluídas en medio fresco. Formando una suspensión en 100 µL que contienen entre 5000 y 10 000 células por pozo, los cuales fueron colocados en los 96 pozos de las microplacas (Costar). El material fue incubado a 37° C por 24 h. en atmósfera de CO₂ al 5%. Subsecuentemente 100 µL de una solución de los compuestos a probar, obtenidos por diluciones Stock fueron adicionados en cada pozo. Los cultivos celulares fueron expuestos por 48 h. a los compuestos, en un intervalo de concentraciones de 10-100 µM.

²³a) Skehan, P.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107; b) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nature protocols*, **2006**, 1, 1112.

²⁴ Monks, A. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757.

Después del período de incubación las células fueron fijadas a un sustrato plástico, mediante la adición de 50 μ L de ácido tricloroacético frío. Las placas fueron incubadas a 4°C por una hora, lavadas con agua, y secadas al aire. Las células fijadas con ácido trifluoroacético fueron teñidas por adición de SRB al 0.4 %. El exceso de SRB fue removido con lavados de una solución acuosa de ácido acético al 5 %. Las placas fueron secadas al aire, y el colorante fijado fue solubilizado por adición de Tris base (100 μ L) 10 Mm. Las placas fueron colocadas en agitación durante 5 minutos y la absorción fue determinada a 515 nm, usando el lector para placas de ELISA (Bio-Tex Instruments).

7.1.2 Ensayo de citotoxicidad (SRB), en derivados

La actividad citotóxica de las ferroceniltiosemicarbazonas se probó inicialmente en macrófagos. Todos los compuestos fueron elegidos para la evaluación de su actividad biológica contra el cáncer utilizando seis diferentes líneas celulares de cáncer humano como son la U251 (células de tumor cerebral), PC-3 (células de cáncer de próstata), K-562 (células de leucemia), HCT-15 (células de cáncer de colon), MCF-7 (células de cáncer de mama) y SKLU-1 (células de cáncer de pulmón).

La citotoxicidad tumoral humana se determinó usando el colorante de unión a proteínas sulforodamina en el ensayo de microcultivos para medir el crecimiento celular. De acuerdo con la citotoxicidad evaluada nos damos cuenta que los compuestos tienen actividad anticancerígena significativa, especialmente los compuestos **14,15,16** y **19** y que su actividad depende de la naturaleza de la línea celular de cáncer humano, véase tabla 1, en esta tabla se determinó que compuestos eran activos y con ellos se realizó la medición de la CI_{50} .

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de las líneas celulares tumorales humanas para (14-19) a 50 μ M en DMSO.

Compuesto	Línea Celular					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
14	96.6 \pm 1.7	88.7 \pm 3.0	99.6 \pm 0.3	67.4 \pm 3.4	86.2 \pm 2.5	100
15	100	92.3 \pm 3.9	100	80.3 \pm 3.0	100	100
16	100	96.1 \pm 1.6	95.0 \pm 2.5	87.8 \pm 4.0	93.5 \pm 2.9	100
18	61.5 \pm 7.6	81.3 \pm 1.7	83.2 \pm 2.0	66.4 \pm 1.2	49.4 \pm 0.6	55.4 \pm 1.1
19	100	91.4 \pm 0.8	100	89.3 \pm 7.4	100	99.9 \pm 0.02

También los experimentos antiproliferativos se llevaron a cabo, con el fin de obtener una idea de las propiedades *in vitro* que presentaban los compuestos al unirse a las diferentes líneas celulares. Dando como resultado que los compuestos **14**, **15**, **16** y **19** son más afines a las líneas celulares U-251, K-562 y SKLU-1 cuando estas están expuestas a diferentes concentraciones de drogas (0.1 a 100nM) por 5 días. Se seleccionaron estas líneas celulares ya que mostraron los mejores resultados. En el experimento se observa que hay una inhibición muy marcada con lo que respecta a la dosis vs el crecimiento celular en estas tres líneas. Los valores de concentración inhibitoria (CI_{50}) solamente se determinaron para estas líneas (U-251, PC-3, K-562, MCF-7 y SKLU-1) para lo cual casi todos los valores de CI_{50} fueron inferiores a 60 nM, comparándose estos con el cis platino como agente citotóxico, véase tabla 2.

Tabla 3. Resultados In Vitro de compuestos seleccionados contra; células de tumor cerebral (U251), cáncer de próstata (PC-3), células de leucemia (K-562), células de cáncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1), fibroblastos normales (NIH3T3), expresada como CI_{50} en mM.

Compuesto	Línea Celular / (mM + D.S.)					
	U251	PC-3	K562	MCF-7	SKLU-1	NIH3T3
14	18.5±1.3	18.0±1.3	10.6±0.3	15.3±1.4	21.5±0.6	10.3 ± 4.3
15	12.3±1.1	4.3±0.3	9.2±0.6	0.34±0.03	12.8±0.6	Sin actividad
16	21.9±2.0	19.4±1.6	8.0±0.6	6.4±0.3	22.3±2.0	23.1 ± 0.1
18	34.0±3.0	18.7±1.7	16.2±0.3	15.4±1.2	40.7±3.8	34.5 ± 0.1
19	17.5±0.5	9.8±0.8	11.3±1.0	11.3±1.1	22.8±0.02	26.1 ± 0.1
Cisplatino	10.8±0.7	17.5±1.4	1.2±0.08	12.3±0.8	17.4±0.8	12.2±0.9

En general los experimentos *in vitro* revelaron una buena actividad de los compuestos ensayados. En particular MCF-7 y PC-3 parecen ser más sensibles a la inhibición del crecimiento por los compuestos ensayados que para K-562, U-252 y SKLU-1. El resultado más interesante se obtuvo con el compuesto **15** que fue el mejor inhibidor para MCF-7 y PC-3 con CI_{50} de 0.34±0.03 y 4.3±0.3 respectivamente.

Por otra parte estos compuestos se ensayaron con NIH3T3 (fibroblastos normales), con el fin de determinar su selectividad para células cancerosas en comparación con células normales. Los compuestos **15** y **16** mostraron una mayor selectividad para las células MCF-7 y PC-3 que para los fibroblastos NIH3T3. Mientras que los compuestos **18** y **19** mostraron una mejor afinidad hacia el ADN dúplex pero son tóxicos para los fibroblastos NIH3T3.

CAPÍTULO VIII
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se obtuvo la síntesis de seis Ferrocenilcetonas aromáticas mediante una reacción de acilación de Friedel y Crafts, utilizando como catalizador el tricloruro de aluminio. Los compuestos fueron obtenidos en buen rendimiento, siendo los sustituidos en la posición *-para*, por cloro o flúor los que se obtuvieron en mejor rendimiento.
- Se llevó a cabo de forma satisfactoria la adición de las Ferrocenilcetonas con la tiosemicarbazida para la obtención de seis Ferroceniltiosemicarbazonas a partir de la formación del enlace imina. Los compuestos fueron obtenidos en rendimientos moderados.
- Todos y cada uno de los compuestos fueron caracterizados mediante las diferentes técnicas espectroscópicas (IR, UV-Vis, RMN ^1H , ^{13}C), y espectrometría de masas, así como por análisis elemental.
- Se realizaron pruebas de actividad citotóxica en seis líneas celulares de cáncer humano, los ensayos de actividad biológica mostraron que los compuestos sintetizados presentan actividad potencial contra el cáncer, obteniendo para la mayoría valores de CI_{50} inferiores a 60 nM, comparados con el cis platino como agente citotóxico.
- De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la inhibición de la proliferación de células de cáncer se ve favorecida en la presencia de cloro en la posición *meta* y *para* en el anillo aromático de las Ferroceniltiosemicarbazonas.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kealy, T. J.; Pauson, P. L. *Nature*, **1951**, 168, 1039.
2. Miller, S. A.; Tebboth, J. A.; Tremaine, J. F. *J. Chem. Soc.* **1952**, 632.
3. Wilkinson, G.; Leonard, N. J.; Kenneth, L.; Rinehart, K. L.; Donald, J. C.; Moon, S. *Org. Synth.* **1956**, 36, 473.
4. Bratterman, P. S. *Metal Carbonyl Spectra*, New York: Edit. Academic Press **1975**. 50. 286.
5. Carmona, E. *Los metallocenos, arquetipo de familia química*, "El ferroceno y los primeros años del desarrollo de los metallocenos" España: Edit. Real academia de ciencias exactas, físicas y naturales, **2007**, 16, 106.
6. Reyes, V. M. *Síntesis de Dendrímeros con Sistemas π -Conjugados Ferrocenílicos y Resorcinarenos como Moléculas Centrales*. México: Edit. UNAM, 2007.
7. Ron, R.; Derek, P. G.; David, B.; John, K. P.; Douglas, F. M.; Alan, J. L.; Ian, M. J. *Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119,45, 10976.
8. Sila chemistry, *Ferrocene chemistry (en línea)*, **2012** disponible en: http://silachem.com/cgi/searchen.cgi?f=product_en3&t=product_en3&w=product_en3&cate2=Ferrocene%20chemistry>
9. Tod, S.; Bénédicte D.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. *J. Org. Chem*, **1997**, 541, 355.
10. Holme, D. Y.; Peck, H. *Analytical Biochemistry*. "Biosensors", 3ra. EUA: Edit. Prentice Hall **1998**, 192, 481.
11. Togni, A.; Hayashi, T. *Ferrocenes*. Alemania: Edit. VCH *Verlagsgesellschaft mbH*, **1995**, 435, 540.
12. Dixon, D.; Calabrese, J. C.; Miller, J. S. *J. Phys. Chem.*, **1999**, 93, 2284.
13. Wan-yi; Qi-hai; Yong-xiang; Yong-min; Ning-li; De-peng. *J. Organomet. Chem.*, **2001**, 128, 625.
14. Dogmak, G.; Behnisch, R.; Mietzsch, F.; Schmidt, H. *Naturwissenschaften*, **1946**, 33, 315.
15. Raviña, E. *Medicamentos, Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. Quimioterapia antituberculosa. Quimioterapia

antileprosa España: Edit. *U. de Santiago de Compostela*; **2008**, 141, 507.

16. Rodríguez; R. *Complejos metálicos con tiosemicarbazonas derivadas de la 2- pirazinaformamid*. "Actividad biológica" España: Edit. Universidad de Santiago de Compostela, **2007**, 28, 423
17. Hamre, S; Shipman, C.; Drach, J. C.; Klayman, D. L. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1981**, 19, 682.
18. West, D.X.; Padhye, S.B.; Sonawane, P. B. *Structure and Bonding*, "Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes". Berlil. Edit, Springer **1991**, 76.
19. Dobek, A. S.; Klayman, D. L.; Dickson, E. T.; Scovill, J. P.; Tramont, E. C. *Antimicrob. agents chemother*, **1980**, 18,1, 27.
20. Liberta, A. E.; West, D. X. *BioMetals*, **1992**, 5, 2, 121.
21. Lin, L. F.; Lee, S. J.; Chen, C. T. *Heterocycles*, **1977**, 7, 1, 347.
22. French, F. A.; Blanz, Jr.; E. J.; Amaral, J. R.; French, D. A. *J. Med. Chem*, **1970**, 13, 1117.
23. a) Skehan, P.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107; b) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nature protocols*, **2006**, 1, 1112.
24. Monks, A. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757.