



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE RU(II) CON
LIGANTES DERIVADOS DEL 2-(CLOROMETIL)BENCIMIDAZOL Y
MERCAPTANOS ALIFÁTICOS. EVALUACIÓN CATALÍTICA Y CITOTÓXICA.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA
LUIS ENRIQUE LÓPEZ ROBLEDO



CD.MX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: José Manuel Méndez Stivalet

Vocal: David Morales Morales

Secretario: Marcos Flores Álamo

1er. Suplente: Juan Manuel German Acacio

2do. Suplente: Carmela Crisóstomo Lucas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 3, Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DE TEMA:

Dr. David Morales Morales

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Patricia Eugenia Conelly Espinosa

SUSTENTANTE

Luis Enrique López Robledo

Agradecimientos

A mi padre (Luis Enrique) y madre (Ydalia) fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida que sin su ayuda hubiera sido imposible culminar mi preparación académica y ser la persona que ahora soy.

A mi novia (Sara) y amigos (Rubén, Juan, Jorge, Andrés, Jess, Eu, Luis, Erik, Alan, Mench, Julia, Barcelata, Danny, Carlos, Juanito, Pancho, Karla, Fany, Ferr, Andrea, Ale y los que me falten) por su amistad, cariño, comprensión y apoyo durante todo este camino, saben lo que significan para mí. Gracias por los momentos.

Al Dr. David Morales por su asesoría y guía, a Rebeca Osorio y Patricia Conelly que son una parte fundamental en mi formación profesional y en la elaboración de este trabajo; a mis compañeros y amigos del L-IN3 en especial a Jahir, Ángel, Aless, Jorge, Marín, Jaime, Toño, Hugo, Sharemy, Robert y Marco Villafán por las experiencias compartidas, los consejos, la cordialidad y excelente ambiente de trabajo.

A mi apreciable jurado M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, Dr. David Morales Morales y Dr. Marcos Flores Álamo por sus acertadas observaciones que me ayudaron a completar con calidad este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM) por el financiamiento a través del proyecto **IN201711-3 e IN213214-3** y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento a través del proyecto **CB2010/154732**.

Al equipo técnico del Instituto de Química, UNAM; Q. Eréndira García-Ríos, a la M en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz y a la M en C. Lucia del Carmen Márquez Alonso por

los análisis de espectrometría de masas ESI-MS, a la Q. Rocío Patiño-Maya por los análisis de IR, al I. Q. Luis Velasco Ibarra y al Dr. Francisco Javier Pérez Flores por los análisis de espectrometría de masas IE-MS y FAB-MS, y a la Q. María de la Paz Orta Pérez y a la M en C. Alejandra Núñez Pineda (CCIQS) por los análisis elementales.

A la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por su apoyo en la realización de las pruebas de Citotoxicidad y a la Dra. Nuria Sánchez Puig y Abril Gijbers y todo el equipo de trabajo del laboratorio de Bioquímica 7 por su invaluable paciencia y apoyo en la determinación de las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas.

Al Dr. Ruben Alfredo Toscano, al M. en C. Simón Hernández Ortega y al Dr. Marcos Flores Álamo (USAI-FQ) por la determinación de los análisis por difracción de Rayos-X de cristal único.

Índice General

I.	Introducción	17
II.	Antecedentes	20
III.	Objetivos	32
	Objetivo general	33
	Objetivos particulares	33
IV.	Hipótesis	34
V.	Síntesis	36
	Sales de plomo tioladas	37
	Ligantes	37
	Síntesis de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6\text{Cl}_2)_2]$	40
	Síntesis de complejos	40
VI.	Caracterización	43
	Ligantes	44
	Espectrometría de masas (<i>DART</i>)	44
	Espectroscopia infrarroja	49
	Resonancia Magnética Nuclear	53
	^1H -RMN	53
	$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN	58
	Compuestos de Ru(II)	63
	Espectrometría de masas (<i>FAB</i> ⁺)	63
	Espectroscopia de infrarrojo	66
	Resonancia Magnética Nuclear	70
VII.	Evaluación catalítica	74
	Oxidación de alcoholes	75
	Hidrogenación de cetonas	76
	Resultados	77
VIII.	Evaluación biológica y citotóxica	82
	Ensayos para la determinación de actividad antimicrobiana	84

	Medios de cultivo	85
	Resultados	86
	Pruebas citotóxicas	90
	Resultados	91
IX.	Conclusiones	94
X.	Referencias	96
XI.	Anexos	102
	Al. Sección experimental	103
	1.1. Material y reactivos	103
	1.2. Instrumentación	103
	1.3. Procedimiento general de reacción de síntesis de sales de plomo [Pb(SR) ₂]	104
	1.4. Procedimiento general de reacción de síntesis de ligante	104
	1.5. Procedimiento general de reacción de síntesis de complejos	105
	1.6. Procedimiento de síntesis de Ru(η^6 -C ₆ H ₆)Cl ₂] ₂	105
	1.7. Evaluación catalítica	105
	1.8. Evaluación citotóxica	106
	1.8.1 Procedimiento de ensayo sulforodamina B (SRB)	106
	1.8.2 Diagrama de bioensayo para las pruebas de citotoxicidad	108

Índice de Esquemas

Esquema 1 Estados de oxidación del rutenio.	24
Esquema 2. Precursores de rutenio y su obtención.	29
Esquema 3. Hidrogenaciones con complejos de rutenio. (1) Hidrogenación quimioselectiva de poli olefinas. (2) Hidrogenación quimioselectiva de aldehídos. (3) Hidrogenación regioselectiva de hidrocarburos aromáticos. (4) Hidrogenación enantioselectiva.	30
Esquema 4. Oxidación de alcoholes con complejos de rutenio.	30
Esquema 5. Reacción general para la síntesis de sales de Pb(II).	37
Esquema 6. Reacción general para la síntesis de ligantes.	38
Esquema 7. Mecanismo propuesto para la formación de disulfuros. (1) Formación del ligante. (2) Formación del disulfuro.	40
Esquema 8. Síntesis del precursor de rutenio.	40
Esquema 9. Reacción general para la síntesis de complejos de Ru(II).	41
Esquema 10. Reacción general de catálisis para la oxidación de alcoholes α -metilbencílicos (feniletanol).	75
Esquema 11. Reacción de hidrogenación de la benzofenona.	76
Esquema 12. Parámetros evaluados en la reacción catalítica de hidrogenación de la benzofenona.	77
Esquema 13. Condiciones óptimas de reacción para la hidrogenación de la benzofenona.	78
Esquema 14. Reacción general para la hidrogenación de la 2,4-dihidroxiacetofenona.	81

Índice de Figuras

Figura 1. Bencimidazol como ligante dentro de la vitamina B ₁₂ .	21
Figura 2. Estructura de la histidina (izquierda) e histamina (derecha).	22
Figura 3. Fármacos comercialmente disponibles derivados del bencimidazol.	22
Figura 4. Aplicaciones de los derivados del imidazol.	23
Figura 5. Fármacos de platino comúnmente utilizados en la terapia contra el cáncer.	24
Figura 6. Tasa de intercambio de ligantes.	26
Figura 7. Nuevos fármacos de rutenio probados como terapia frente al cáncer.	27
Figura 8. Procesos catalíticos donde intervienen compuestos de rutenio.	29
Figura 9. Compuestos sintetizados en el grupo de investigación del Dr. Morales con actividad citotóxica relevante.	31
Figura 10. Espectro de masas <i>DART</i> del compuesto L1 2-((<i>tert</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	45

Figura 11. Espectro de masas DART del compuesto L2 2-(<i>sec</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	46
Figura 12. Espectro de masas <i>DART</i> del ligante L3 2-((<i>iso</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	47
Figura 13. Espectro de masas <i>DART</i> del ligante L3 2-((<i>iso</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol sin el ion fragmento correspondiente al dímero.	48
Figura 14. Espectro de IR del compuesto L1 2-((<i>tert</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.	50
Figura 15. Espectro de IR del compuesto L2 2-((<i>sec</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.	51
Figura 16. Espectro de IR del compuesto L3 2-((<i>iso</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.	52
Figura 17. Espectro de ¹ H-RMN obtenido del compuesto L1 en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz, t.a.	54
Figura 18. Espectro de ¹ H-RMN obtenido en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz para el compuesto L2 2-((<i>sec</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	56
Figura 19. Espectro de ¹ H-RMN del compuesto L3 2-((<i>iso</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	57
Figura 20. Espectro de ¹³ C{ ¹ H}-RMN del compuesto L1 2-((<i>tert</i> -butitio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	60
Figura 21. Espectro de ¹³ C{ ¹ H}-RMN del compuesto L2 2-((<i>sec</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	61
Figura 22. Espectro de ¹³ C{ ¹ H}-RMN del compuesto L3 2-((<i>iso</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol obtenido en acetona- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	62
Figura 23. Isotopía de rutenio del ion molecular del espectro de masas <i>FAB</i> ⁺ del compuesto L2 .	64
Figura 24. Espectro de masas <i>FAB</i> ⁺ del complejo derivado del 2-((<i>sec</i> -butiltio)metil)-1 <i>H</i> -bencimidazol y Ru(II) (C2).	65
Figura 25. Espectro de IR del compuesto C1 obtenido en pastilla de KBr a t.a.	67
Figura 26. Espectro de IR del complejo C2 obtenido en pastilla de KBr a t.a.	68
Figura 27. Espectro de IR del complejo C3 obtenido en pastilla de KBr a t.a.	69
Figura 28. Espectro de ¹⁹ F{ ¹ H}-RMN corrido en DMSO- <i>d</i> ₆ como disolvente a 300 MHz.	71
Figura 29. Patrón característico del espectro obtenido del experimento ³¹ P{ ¹ H}-RMN para el ⁻ PF ₆ realizado en DMSO- <i>d</i> ₆ a 300MHz.	71
Figura 30. Espectro de resonancia de ¹ H del complejo C1 obtenido en DMSO- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	72
Figura 31. Espectro de resonancia de ¹³ C{ ¹ H}-RMN del compuesto C2 en DMSO- <i>d</i> ₆ a 300 MHz.	73
Figura 32. Diagrama de ensayos de susceptibilidad.	86

Índice de Gráficas

Gráfica 1. %de Conversión al difenilmetanol a diferentes cargas de catalizador para los compuestos C1, C2 y C3 en la reacción de hidrogenación de la benzofenona sin base en <i>i</i> prOH a 60 h.	79
Gráfica 2. Porcentajes de conversión obtenidos para el compuesto C3 en la reacción de hidrogenación de la acetofenona evaluando el desempeño con y sin base en el seno de reacción.	81
Gráfica 3. Diámetro de halo de inhibición de los compuestos que presentaron actividad antibacterial en <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphilococcus aureus</i> .	87
Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de los complejos de Ru(II) para las bacterias <i>E. Coli</i> , <i>B. Subtilis</i> , <i>S. aureus</i> (10 mg/mL).	88
Gráfica 5. Diámetros de inhibición para los compuestos L1 y L2 en una concentración de 10 mg/mL respecto a su antibiótico control.	89
Gráfica 6. Porcentajes de inhibición de los compuestos L1 y L2 (10 mg/mL) frente al fármaco control.	90
Gráfica 7. Porcentajes de inhibición del screening primario en 6 líneas celulares de los ligantes (L1 , L2 y L3) y los complejos de Ru(II) (C1 , C2 y C3).	93

Índice de Tablas

Tabla 1. Estados de oxidación y geometrías del rutenio.	25
Tabla 2. Algunas propiedades físicas de los compuestos sintetizados.	39
Tabla 3. Compuestos de Ru(II) sintetizados y algunas de sus propiedades.	42
Tabla 4. Bandas características observadas en los experimentos de IR para los ligantes L1 , L2 y L3 .	49
Tabla 5. Desplazamientos químicos de los compuestos L1 , L2 y L3 obtenidos de ¹ H-RMN a 300 MHz en acetona- <i>d</i> ₆ .	58
Tabla 6. Desplazamientos químicos y asignación de señales de ¹³ C{ ¹ H}-RMN de la serie de ligantes.	59
Tabla 7. Isotopías y abundancias relativas presentes en los compuestos sintetizados.	64
Tabla 8. Vibraciones importantes de los espectros obtenidos para los complejos de Ru(II).	66
Tabla 9. Variación de parámetros en el estudio para la hidrogenación de cetonas, las reacciones se efectuaron en isopropanol como disolvente.	77
Tabla 10. Resultados de las reacción de hidrogenación de la benzofenona a diferentes cargas de catalizador.	78
Tabla 11. Resultados obtenidos para la hidrogenación de la acetofenona	80

evaluando el desempeño al adicionar o no Na_2CO_3 en la reacción con el compuesto **C3** como catalizador.

Tabla 12. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos.	84
Tabla 13. Microorganismos utilizados en pruebas de susceptibilidad.	85
Tabla 14. Diámetros de inhibición para los ligantes L1 , L2 y L3 y complejos de Ru(II) C1 , C2 y C3 a una concentración de 10 mg/mL.	87
Tabla 15. Porcentaje de inhibición para los compuestos L1 , L2 , L3 , C1 , C2 y C3 a una concentración de 10 mg/mL.	88
Tabla 16. Concentración y diámetro de inhibición de los fármacos control utilizados.	89
Tabla 17. Screening primario de inhibición de los compuestos obtenidos (L1 , L2 , L3 , C1 , C2 y C3) evaluados en distintas líneas celulares.	92
Tabla 18. Tiempos de duplicación, concentración y órganos de origen de las líneas celulares de ensayo.	106

Símbolos y Abreviaturas

Acetato de etilo	AcOEt
Acetato de plomo	[Pb(CH ₃ COO) ₂]
Acetona deuterada	Acetona- <i>d</i> ₆
Ácido peracético	AcOOH
Alfa	α
Bicarbonato de sodio	Na ₂ CO ₃
Bromuro de potasio	KBr
Carga nuclear efectiva	Z _{eff}
Cloruro de plomo	PbCl ₂
Cobalto	Co
Desplazamiento químico	δ
Dimetil sulfóxido deuterado	DMSO- <i>d</i> ₆
Direct Analysis in Real Time (Espectrometría de masas de análisis directo en tiempo real)	<i>DART</i>
Electronvolts	eV
Enlace puente del ion cloruro	μ -Cl
Fast Atom Bombardment (Espectrometría de masas de bombardeo por átomos rápidos)	<i>FAB</i> ⁺
Fórmula general de la sal de plomo tiolada	[Pb(SR) ₂]
Grados Celsius; Unidad de temperatura	°C
Gramo	g
Hexano	Hex
Hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo	<i>tert</i> -BuOOH
Horas	h
Infrarrojo	IR
Iodosilbenceno	PhIO

Ion hexafluorofosfato	PF_6^-
Iridio	Ir
Isopropanol	iso-prOH
Kilo	k
Línea celular de cáncer de colón	HCT-15
Línea celular de cáncer de leucemia	K562
Línea celular de cáncer de mama	MCF-7
Línea celular de cáncer de próstata	PC-3
Línea celular de cáncer de pulmón	SKLU
Línea celular de cáncer del sistema nervioso central	U251
Litro	L
Masa molar (gramo/mol)	g/mol
Materia prima de rutenio (dímero)	$[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6\text{Cl}_2)_2]$
Mega Hertz; Unidad de medida utilizada en RMN	MHz
Metanol	MeOH
microLitro	μL
miligramo	mg
mililitro; Unidad de medida para volumen	mL
milimol: Unidad fundamental para cantidad de sustancia	mmol
milimolar; Unidad de medida para concentración	mM
Minuto(s)	min
Nanómetros	nm
Partes por millón	ppm
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Plomo en estado de oxidación 2+	Pb(II)
Porcentaje de catalizador en mol	%mol
Porcentaje de inhibición	%I
Punto de descomposición en grados Celsius	P.desc. [$^{\circ}\text{C}$]

Punto de fusión en grados Celsius	°C
Relación masa carga; unidad utilizada en espectrometría de masas	<i>m/z</i>
Relación utilizada de un disolvente con otro.	1:1
Resonancia magnética nuclear de carbono 13 desacoplada a protón	¹³ C{ ¹ H}-RMN
Resonancia magnética nuclear de flúor 19 desacoplada a protón	¹⁹ F{ ¹ H}-RMN
Resonancia magnética nuclear de fósforo 31 desacoplada a protón	³¹ P{ ¹ H}-RMN
Resonancia magnética nuclear de protón	¹ H-RMN
Rodio	Rh
Rutenio en estado de oxidación 2+	Ru(II)
Sustitución nucleofílica bimolecular tipo 2	S _N 2
Temperatura ambiente	t.a.
Unidad fundamental para cantidad de sustancia	mol
Volts	V

Resumen

Se realizó la síntesis una serie de ligantes derivados del 2-(clorometil)bencimidazol y mercaptanos alifáticos a través de reacciones de sustitución nucleofílica bimolecular tipo 2 (S_N2). Los ligantes obtenidos se hicieron reaccionar con la materia prima de rutenio $[Ru(\eta^6-C_6H_6Cl_2)_2]$ obteniéndose así los correspondientes compuestos organometálicos.

Para todos los compuestos se determinó el punto de fusión y/o descomposición, además de llevarse a cabo pruebas de solubilidad y se procedió a caracterizarlos mediante técnicas espectroscópicas tales como 1H , $^{13}C\{^1H\}$, $^{19}F\{^1H\}$ y $^{31}P\{^1H\}$ -RMN e infrarrojo, así como también por técnicas de espectrometría de masas *DART* y *FAB*⁺ para los ligantes y complejos respectivamente.

Una vez caracterizados los compuestos sintetizados se evaluó el potencial biológico (antibacteriano, antifúngico y citotóxico) donde los ligantes **L1** y **L2** demostraron tener el mejor potencial antimicrobiano, mientras que los compuestos metalados demostraron tener potencial de acción específico frente a bacterias Gram-positivas e inhibición relevante frente a células cancerígenas de leucemia (K562).

Finalmente se evaluó la actividad catalítica de los complejos en reacciones de hidrogenación de cetonas, teniendo un desempeño bueno bajo las condiciones de reacción estudiadas.

Abstract

A series of ligands derived from 2-(chloromethyl)benzimidazole and aliphatic mercaptans were synthesized via bimolecular nucleophilic substitution reactions (S_N2). With the ligands on hand reactions with $[Ru(\eta^6-C_6H_6Cl_2)_2]$ were performed to produce the corresponding organometallic compounds.

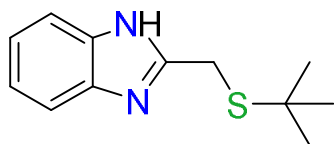
For both ligands and complexes melting or decomposition points were determined and the solubility of these species were also determined. Further characterization by different spectroscopic techniques such as 1H , $^{13}C\{^1H\}$, $^{19}F\{^1H\}$ y $^{31}P\{^1H\}$ -MNR and infrared, *DART* and *FAB*⁺ mass spectrometry was also made for both ligands and complexes.

The biological activity (antibacterial, antifungal and cytotoxic) for the synthesized compounds was evaluated. Thus ligands **L1** and **L2** exhibited the best antimicrobial activity, while Ru(II) compounds showed promising specific action against Gram-positive bacteria and relevant cell inhibition against leukemia cancer cells.

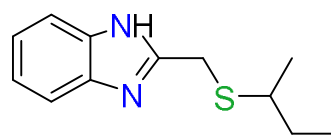
Finally, the series of complexes exhibited good performance in the hydrogenation reaction of ketones under the reaction conditions studied.

Compuestos sintetizados

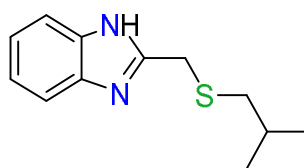
Ligantes



L1

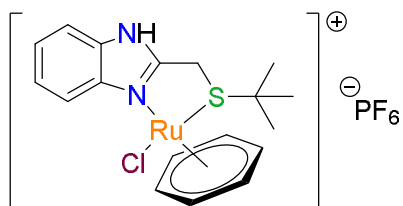


L2

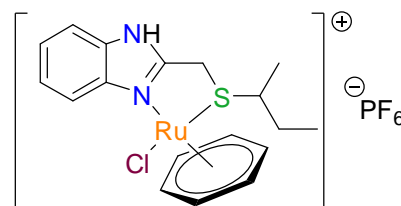


L3

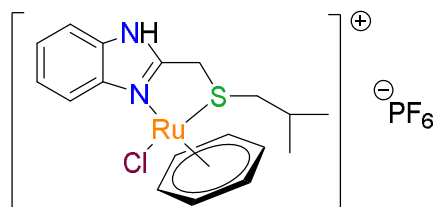
Complejos



C1



C2



C3

I. Introducción

El bencimidazol y sus derivados conforman una importante clase de moléculas bioactivas; que desde su descubrimiento en la naturaleza en 1950 como ligante axial para el cobalto dentro de la vitamina B₁₂ (*N*-ribosil-dimetilbencimidazol) han sido estudiados en diversas áreas de investigación tal como la industria farmacéutica, ya que presenta propiedades antihelmínticas, antifúngicas y antiprotozoarias que lo hacen un compuesto con un gran potencial de acción en esta área. Por este hecho en los últimos años el campo de investigación de este tipo de compuestos ha crecido enormemente ya que se han descubierto propiedades adicionales a las ya conocidas; tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicas, antihipertensivas, contra el virus de la hepatitis B, y la más relevante anticancerígenas.

Así mismo, se ha descubierto que la presencia de uno o más centros metálicos en la estructura de dichos compuestos potencializa su efecto terapéutico, tal es el caso de los fármacos de platino que son comúnmente utilizados en terapia contra el cáncer, como por ejemplo el *cis*-platino y oxalilplatino, que a pesar que han demostrado una gran efectividad como agentes quimioterapéuticos presentan una gran cantidad de efectos biológicos adversos.

Ante este hecho, se han buscado nuevas alternativas dentro de la misma familia de elementos que acompañan al platino dentro de la tabla periódica. Así, el rutenio se ha convertido en una de las opciones de reciente auge presentando amplia versatilidad y diversas ventajas biológicas en comparación con el platino.

Por otro lado, los compuestos de coordinación presentan, en general, multifuncionalidad en las aplicaciones que se les puede dar en diferentes áreas de la química, como en la síntesis de nuevos productos, la química organometálica, bioquímica o la catálisis. En este sentido la catálisis ha representado una aplicación fundamental para este tipo de compuestos; donde, el rutenio ha sido vastamente

utilizado como materia prima en la síntesis de nuevos compuestos con diversas aplicaciones a nivel industrial.

Cabe mencionar que en la rama de la catálisis se ha buscado optimizar las condiciones en los procesos de reacción, reducir tanto la cantidad de los subproductos como el número de intermediarios en una reacción, así como abatir el tiempo de reacción en estos procesos. Actualmente existen cuatro procesos que son relevantes en el campo de la catálisis: reacciones de oxidación, reacciones de hidrogenación, formación de enlaces C-C y activación de enlaces múltiples C-C.

Bajo este contexto se presenta la síntesis y caracterización de una serie de compuestos derivados del 2-(clorometil)bencimidazol y mercaptanos alifáticos así como de sus derivados con Ru (II) con el propósito de observar y comparar su actividad biológica (antimicrobiana, antifúngica y citotóxica) y catalítica en reacciones de oxidación de derivados de alcoholes α -metilbencílicos e hidrogenación de cetonas.

II. Antecedentes

El bencimidazol es una molécula de relevancia científica, que se descubrió como ligante axial dentro de la cobalamina^[33] (vitamina B₁₂) (Figura 1). También el anillo imidazólico se ha encontrado como parte fundamental de la histidina (Figura 2), la cual es un aminoácido esencial que no es sintetizado por los humanos y sólo se obtiene mediante la ingesta de plantas y hongos; esta sustancia participa dentro del sistema inmune, así como en el desarrollo y manutención de los músculos y tejidos. De igual forma la histamina (Figura 2) contiene un anillo de imidazol en su estructura y es un componente activo del sistema inmune, además de actuar como neurotransmisor dentro del sistema nervioso central^{[10][16]}.

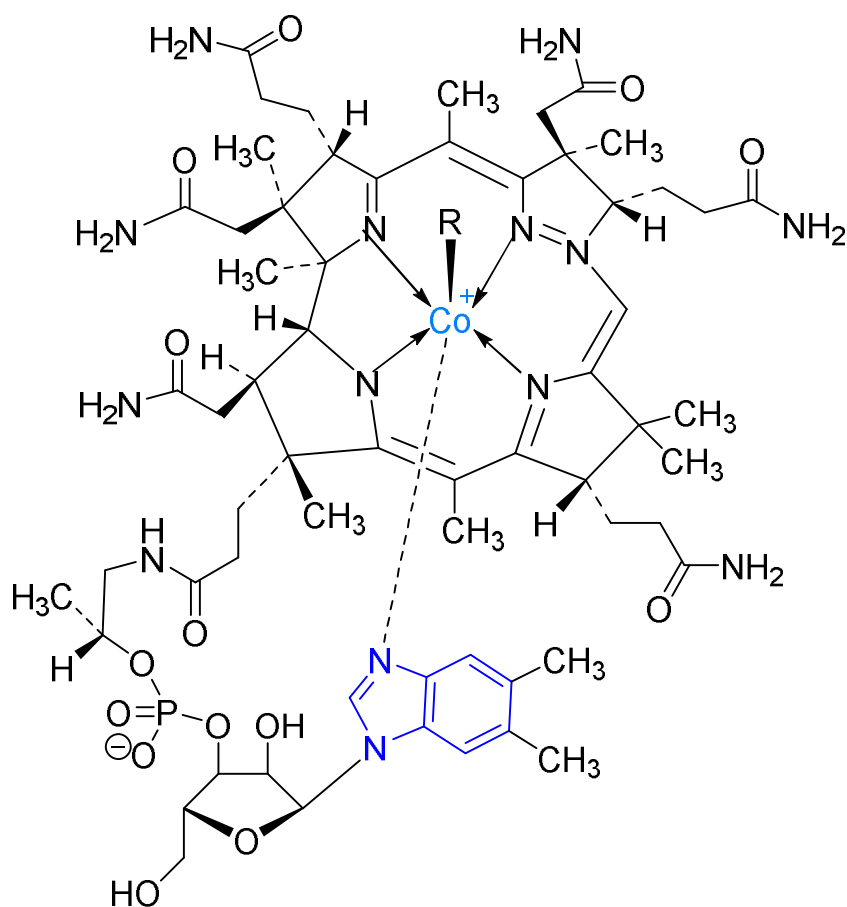


Figura 1. Bencimidazol como ligante dentro de la vitamina B₁₂.



Figura 2. Estructura de la histidina (izquierda) e histamina (derecha).

Ante esto, la investigación sobre el imidazol, el bencimidazol y sus derivados ha presentado numerosos avances y aplicaciones dentro de una gran variedad de áreas de la ciencia. En el área farmacéutica, los derivados más relevantes del bencimidazol han mostrado alta biodisponibilidad y buena eficiencia farmacocinética^{[16][23][24][33]}; por lo anterior han sido utilizados tradicionalmente como agentes antimicrobianos, antifúngicos y antibacteriales. Todos ellos comercialmente disponibles y que incluso han llegado a ser productos de uso cotidiano como el albendazol, utilizado como antihelmíntico de alto espectro de administración oral efectivo para el tratamiento de infestaciones causadas por una diversidad de parásitos; o como el omeprazol que es utilizado en el tratamiento de úlcera gástrica y duodenal asociada con la bacteria *Helicobacter pylori* (Figura 3).

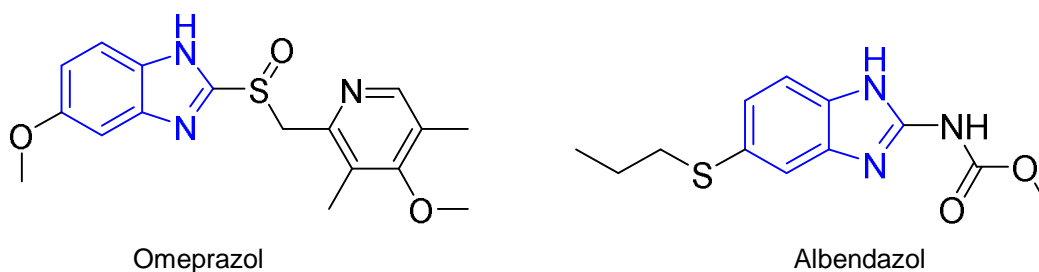


Figura 3. Fármacos comercialmente disponibles derivados del bencimidazol.

Recientemente se han agregado nuevas aplicaciones a las ya antes mencionadas, que van desde agentes quimioterapéuticos, antitubercular, antiprotozoario, anticoagulante, analgésico, anticonceptivo, con actividad frente al VIH, entre otros^{[33][44][55][69]} (Figura 4).

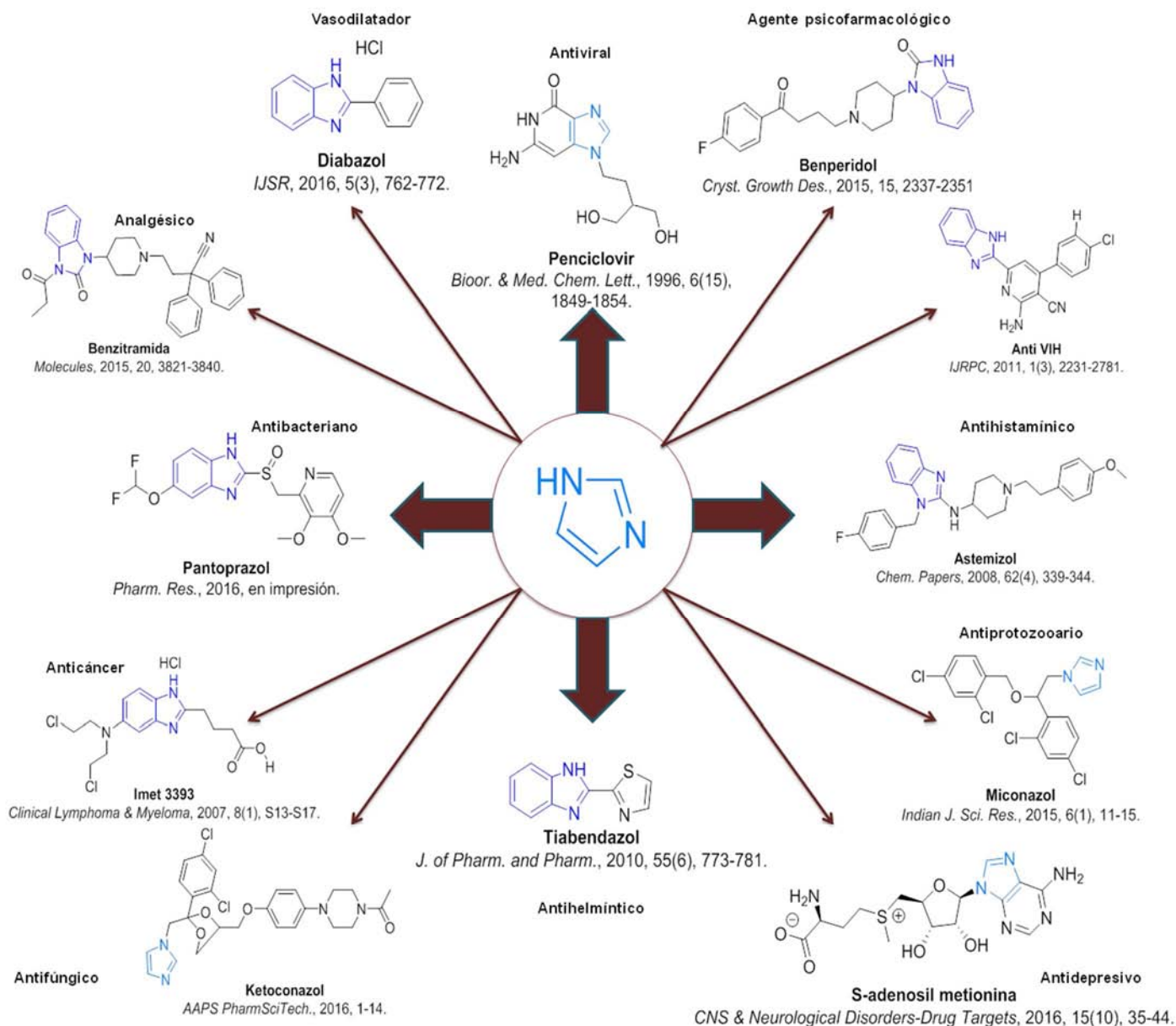


Figura 4. Aplicaciones de los derivados del imidazol.

Dentro de las aplicaciones más importantes se encuentran las relacionadas a las enfermedades del nuevo siglo; como el cáncer, en donde se tienen fármacos altamente efectivos demostrando que la presencia de unos o más centros metálicos en la estructura de los compuestos mejora el desempeño de los derivados orgánicos potencializando su efecto terapéutico, como lo son el *cis*-platino (sarcomas, carcinomas, linfomas y tumor de células germinales) el oxalilplatino (cáncer de colon o rectal diseminado) o el carboplatino (tumores de ovarios, pulmones, cuello y cerebro) (Figura 5). Sin embargo la presencia de efectos negativos significativos

relacionados a los efectos secundarios y/o a la fármaco-resistencia que presenta el portador a los mismos representa una desventaja enorme.^{[70][72]}

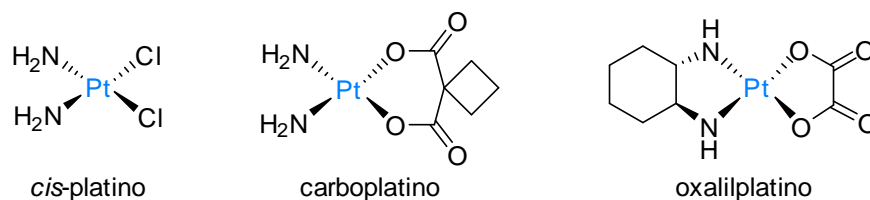
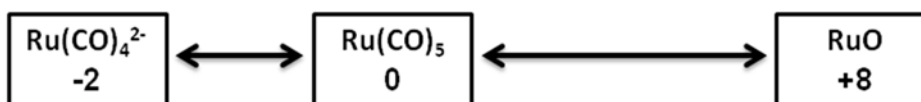


Figura 5. Fármacos de platino comúnmente utilizados en la terapia contra el cáncer.

Ante esta tendencia se han buscado nuevas rutas para la síntesis de nuevos compuestos para mejorar la eficiencia de estas sustancias, y eliminar ciertos efectos secundarios; en este sentido dentro de la diversidad de átomos metálicos presentes en la tabla periódica aquellos del grupo 10 son los que se han utilizado mayoritariamente. Pero en los últimos años han sobresalido aquellos compuestos que contienen rutenio, que presenta propiedades citotóxicas y catalíticas en diferentes reacciones de gran utilidad en síntesis orgánica.^[3]

El rutenio presenta grandes ventajas en comparación de otros elementos del grupo 10 como el platino o el paladio, ya que es el elemento que tiene el más amplio número de estados de oxidación que van desde -2 hasta +8, por este motivo, puede adoptar diferentes geometrías al coordinarse (Esquema 1). En la Tabla 1 se presentan ejemplos representativos de las diferentes formas de coordinación del rutenio.^{[4][6][7]}



Esquema 1. Estados de oxidación del rutenio.

Tabla 1. Estados de oxidación y geometrías del rutenio.

Estados de Oxidación	Número de Coordinación	Geometría	Ejemplo
Ru(0)	5	bipirámide trigonal	$\text{Ru}(\text{CO})_5$
Ru(II)	5	bipirámide trigonal	$\text{RuHCl}(\text{PPh}_3)_3$
	6	octaédrico	$\text{RuCl}_2\text{CO}(\text{PR}_3)_3$
Ru(III)	6	octaédrico	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$
Ru(VI)	4	tetraédrico	RuO_4^{2-}
Ru(VII)	4	tetraédrico	RuO_4^-
Ru(VIII)	4	tetraédrico	RuO_4

Las características de reactividad que presentan los complejos de rutenio son las siguientes:

- Alta capacidad de transferencia de electrones.
- Alta acidez de Lewis.
- Bajos potenciales rédox.
- Formación de diferentes especies metálicas como: oxometales, metalociclos y complejos metal-carbenos.
- Menor toxicidad con respecto a otros metales.
- Semejanza con el hierro.
- Tasas bajas de intercambio de ligantes.

Cabe destacar que dentro de estas propiedades las que demuestran mayor versatilidad y utilidad en el área farmacéutica son el amplio intervalo de estados de oxidación, lo que permite, bajo condiciones fisiológicas fluctuar entre ellos intracelularmente debido a que en el rutenio la barrera energética de interconversión entre dichos estados es relativamente baja (Figura 6).^[50]

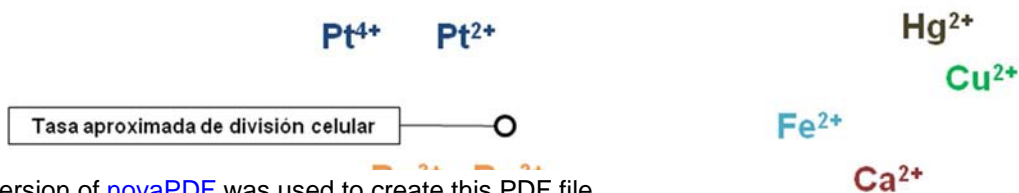


Figura 6. Tasa de intercambio de ligantes.

Adicionalmente el rutenio tiende a formar complejos octaédricos, lo cual brinda la posibilidad de explotar dos sitios adicionales de coordinación comparado con los complejos de Pt(II), que adoptan una geometría cuadrada plana generalmente.

Además el rutenio puede formar enlaces químicos fuertes con una amplia gama de átomos, de acuerdo a la “dureza” química y la electronegatividad que presenten estas entidades, significando así que no sólo se podría enlazar con moléculas como el ADN, sino con una cantidad mayor de biomoléculas como las proteínas.^{[50][26][28][30]}

Finalmente, en la literatura se ha postulado que los compuestos de rutenio podrían ser menos tóxicos que los fármacos del platino debido a la “activación por reducción”. Esto se basa en que los complejos de Ru(III) son más inertes que los de Ru(II), este efecto puede ser atribuido a la carga nuclear efectiva (Z_{eff}) ya que es mayor en el Ru(III) que en el Ru(II). Paralelamente las células cancerosas tienden a tener un ambiente químico más reductor que las células sanas donde consecuentemente la concentración de oxígeno molecular disminuye (debido a su mayor tasa metabólica); teniendo esto en cuenta se podrían suministrar compuestos de rutenio en estado de oxidación III (más inerte) reduciendo (activando) las células cancerosas y causando la menor cantidad de daño a las células sanas.

Aunado a esta hipótesis, el hecho de que el rutenio se encuentre ubicado en la misma familia que el hierro nos permite postular que el rutenio puede potencialmente suplantar al hierro en diferentes bioestructuras, como las proteínas; *i.e.* la transferrina.^{[26][50][72]}

Debido a las características mencionadas, algunos compuestos de rutenio que se han probado frente a diversas líneas celulares de cáncer han demostrado causar menos daños colaterales y efectos adversos sobre la salud como el daño en el sistema nervioso, pérdida de cabello y náuseas que los fármacos de platino provocan.

Tal es el caso de los fármacos NAMI-A y KP1019 (Figura 7), ambos compuestos fusionan el potencial farmacológico del imidazol con el rutenio y que actualmente se encuentran bajo evaluación en pruebas clínicas como fármacos anticancerígenos.^{[3][6][7][8][9]}

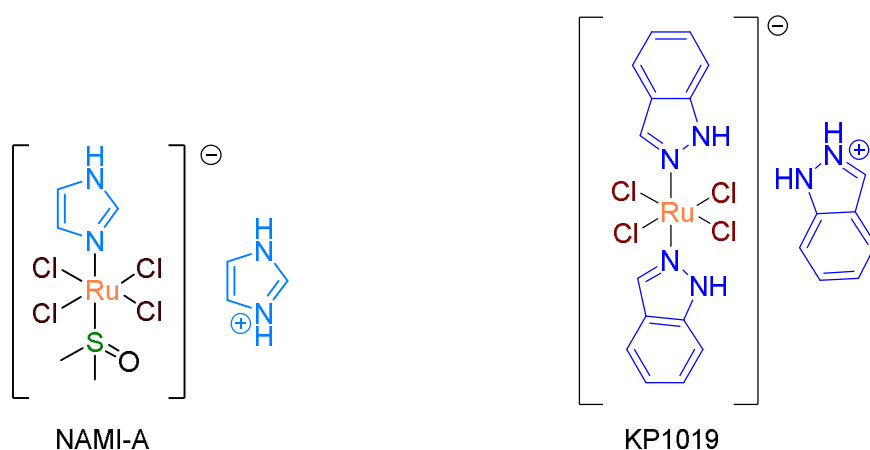


Figura 7. Nuevos fármacos de rutenio probados como terapia frente al cáncer.

Ambos fármacos (NAMI-A y KP1019) son compuestos de coordinación, que se propone son fácilmente hidrolizables y podrían “activar” moléculas reduciéndolas atacando así al cáncer en la célula. Estructuralmente ambos complejos contienen como centro metálico al Ru³⁺, cloruros y ligantes imidazol o bencimidazol dentro de su estructura así como un derivado del imidazol como contra ion.

A pesar de éstas semejanzas estructurales, la actividad anticancerígena que presentan cada uno es significativamente diferente; ya que, el KP1019 actúa frente

a cáncer primario (la primera masa tumoral formada en los pacientes) mientras que el NAMI-A es activo frente a células tumorales secundarias (*i.e.* la metástasis que se forma del tumor primario y que se puede mover a diferentes órganos por diversas vías).

Por otro lado, los compuestos de coordinación han demostrado una gran versatilidad en los usos y aplicaciones que se les ha dado, como en el caso de la catálisis, cuyo principal objetivo es el de hacer más eficientes los procesos de síntesis a nivel industrial así como la eliminación o reducción de subproductos, aumentando la velocidad de reacción y/o generando mayores porcentajes de conversión en menor tiempo.

Debido a su gran versatilidad, el rutenio se ha utilizado ampliamente en la industria para diferentes procesos catalíticos, en la generación de productos de alto valor agregado. Estos procesos van desde formación de metalociclos, activación del enlace C-H, formación de vinildenos hasta la activación de enlaces C-C; como se muestra en la Figura 8.

Los estados de oxidación +2 o +4 son los más versátiles para los procesos catalíticos debido a la química redox que presentan entre estos estados y las diversas geometrías de coordinación que brindan grandes posibilidades de reacción en ciclos catalíticos. En el Esquema 2 se muestran diferentes métodos de obtención de precursores de rutenio frecuentemente utilizados en la síntesis de nuevos catalizadores.

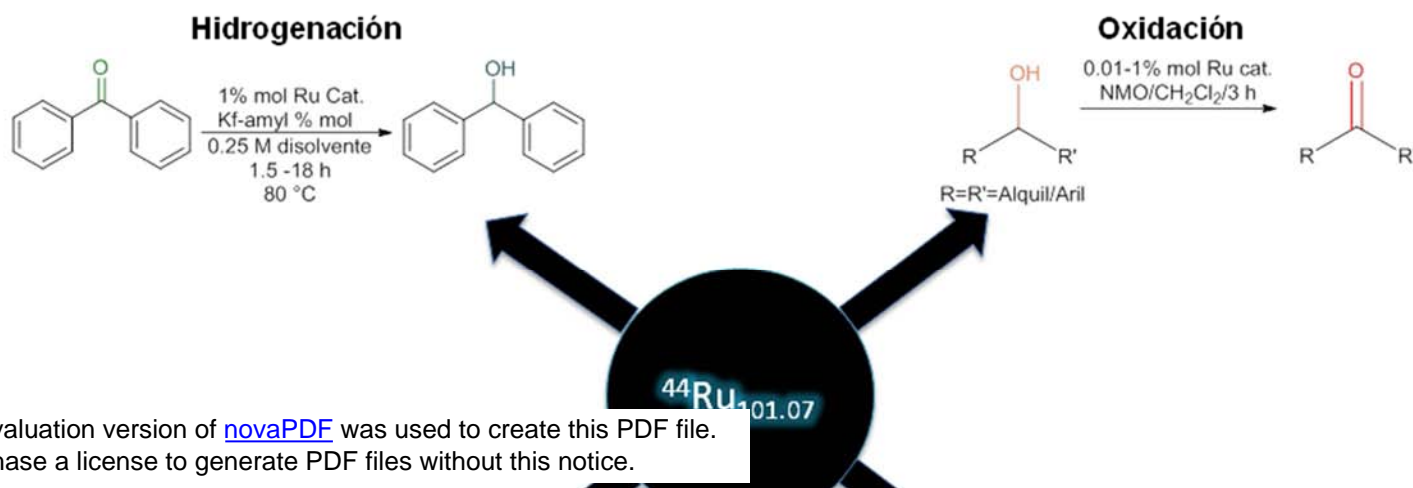
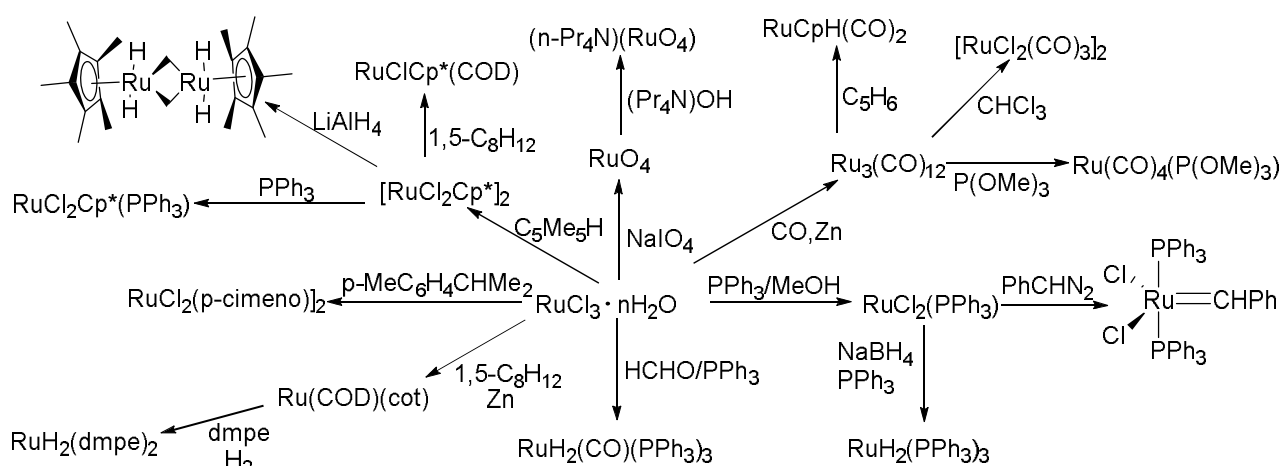
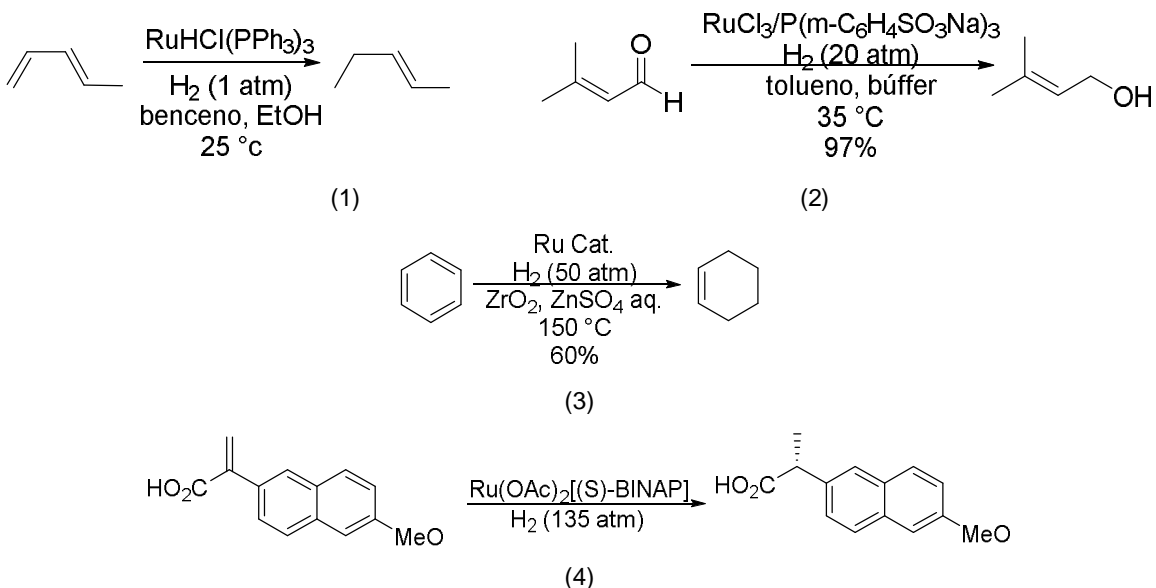


Figura 8. Procesos catalíticos donde intervienen compuestos de rutenio.



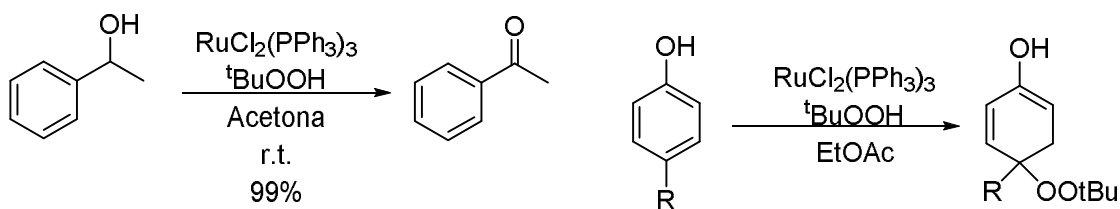
Esquema 2. Precursores de rutenio y su obtención.

Comparado con otros complejos metálicos tales como el Rh, Ir y Co los complejos de rutenio generalmente tienen menor actividad catalítica en hidrogenaciones simples o de alquenos funcionalizados. Usualmente los complejos de rutenio son usados en hidrogenaciones quimioselectivas debido a su reactividad; caso contrario se observa en las hidrogenaciones asimétricas efectuadas con complejos de rutenio y ligandos fosfino quirales en catálisis homogénea como se muestra en el Esquema 3.



Esquema 3. Hidrogenaciones con complejos de rutenio. (1) Hidrogenación quimioselectiva de poli olefinas. (2) Hidrogenación quimioselectiva de aldehídos. (3) Hidrogenación regioselectiva de hidrocarburos aromáticos. (4) Hidrogenación enantioselectiva.

Los complejos de rutenio de baja valencia catalizan la oxidación de alcoholes y a compuestos *hidroxi-* relacionados en combinación con diferentes oxidantes; tales como el *tert*-BuOOH, AcOOH, H₂O₂, PhIO, *N*-óxido de la *N*-metil morfolina y el *N*-óxido de la piridina. Alcoholes secundarios son convertidos en la correspondiente cetona y los alcoholes primarios son normalmente oxidados en ácidos carboxílicos (Esquema 4).



Esquema 4. Oxidación de alcoholes con complejos de rutenio.

En el grupo de investigación del Dr. Morales se han investigado este tipo de ligantes y complejos derivados del Ru(II) (Figura 9), demostrando su potencial catalítico en reacciones de oxidación de alcoholes; así como también su acción citotóxica contra

células de cáncer de próstata y mama y actividad antimicrobiana con resultados prometedores frente a bacterias Gram-positivas como *E. coli* y *S. epidermidis*.

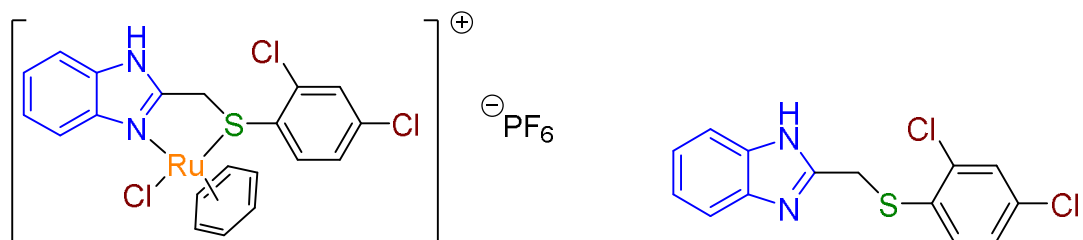


Figura 9. Compuestos sintetizados en el grupo de investigación del Dr. Morales con actividad citotóxica relevante.

III. Objetivos

Objetivo general

Sintetizar una serie homóloga de compuestos derivados del 2-(clorometil)bencimidazol y mercaptanos alifáticos con Ru(II), evaluar su actividad catalítica en reacciones de oxidación de alcoholes α -metilbencílicos y en la hidrogenación de benzofenona; así como también evaluar su actividad citotóxica y antimicrobiana.

Objetivos particulares

- Sintetizar una serie de ligantes derivados de 2-(clorometil)bencimidazol y mercaptanos alifáticos.
- Sintetizar los correspondientes compuestos organometálicos de Ru(II) con los ligantes previamente obtenidos.
- Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas convencionales (IR, RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) y espectrometría de masas todos los compuestos obtenidos.
- Evaluar la actividad catalítica de los compuestos de rutenio obtenidos en la reacción de oxidación de alcoholes α -metilbencílicos.
- Evaluar la actividad catalítica de los compuestos de Ru(II) sintetizados en la reacción de transferencia de hidrógeno en la benzofenona.
- Evaluar la actividad biológica (antimicrobiana, antifúngica y citotóxica) de los compuestos obtenidos frente a diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como para dos cepas diferentes de hongos y seis líneas celulares de cáncer humano (glía del sistema nervioso-U251, próstata-PC-, leucemia-K562, colon-HCT-15, mama-MCF-7 y pulmón-SKLU-1).

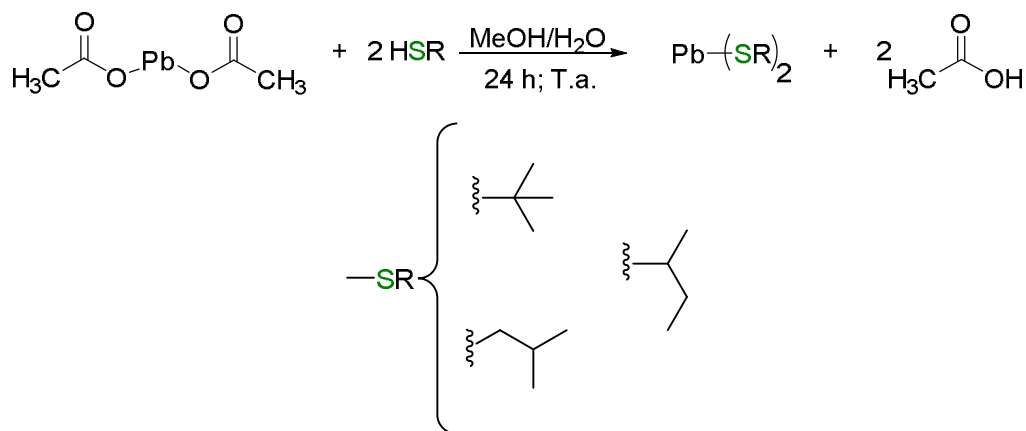
IV. Hipótesis

Será posible la síntesis de los ligantes y complejos de Ru(II) derivados del 2-(clorometil)bencimidazol y tioles alifáticos. Dichos compuestos presentarán actividad catalítica relevante en reacciones de oxidación de alcoholes y de hidrogenación de cetonas. Además se esperará que estos ligantes y complejos exhiban buena actividad biológica (citotóxica, microbiana y antifúngica).

V. Síntesis

Sales de plomo tioladas.

Se llevó a cabo la síntesis de los precursores $[\text{Pb}(\text{SR})_2]$ de los ligantes a través de una reacción de metátesis entre el $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ el tiol correspondiente ($\text{SR} = \textit{iso}$ -, \textit{sec} - y \textit{tert} - butanotiol) en una mezcla metanol:agua (1:10) a temperatura ambiente; al finalizar la reacción se observa un precipitado de color amarillo el cual corresponde a la sal de plomo deseada. En el Esquema 5 se muestran las condiciones de reacción utilizadas.

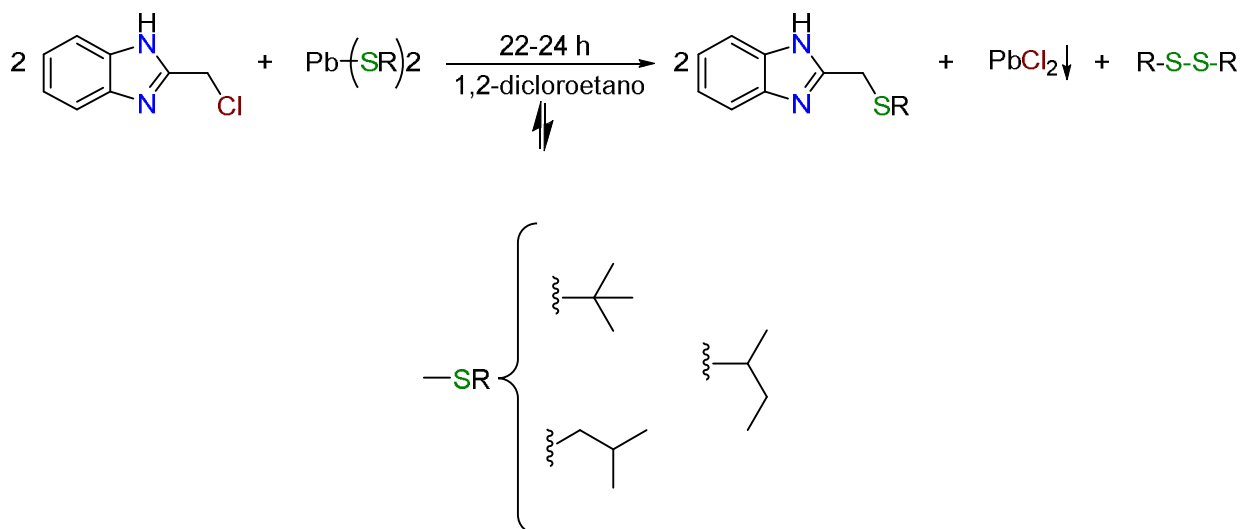


Esquema 5. Reacción general para la síntesis de sales de Pb(II).

Ligantes

Los ligantes se sintetizaron a través de reacciones de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) entre el 2-(clorometil)bencimidazol (nucleófilo) y la sal $[\text{Pb}(\text{SR})_2]$ correspondiente (nucleófilo). El disolvente utilizado (1,2-dicloroetano) fue secado con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y reservado bajo atmósfera inerte¹. La reacción se muestra en el Esquema 6.

¹ El disolvente es secado y desgasificado debido a que la presencia de oxidantes; tales como el agua o el oxígeno del aire disueltos en él favorecen la formación de los disulfuros correspondientes mediante un acoplamiento oxidativo en similitud a lo propuesto por Sasson, et. al.[5] en 2005 (Esquema 7)



Esquema 6. Reacción general para la síntesis de ligantes.

La reacción se ve favorecida de acuerdo al principio de *Le Châtelier* debido a la formación del precipitado de cloruro de plomo, además de que la energía de red cristalina de la sal formada es mayor a la de los reactivos, favoreciendo aún más la formación de los ligantes deseados.

Se verificó el avance de reacción mediante cromatografía en capa fina, además se puede comprobar visualmente dicho avance con el cambio de color de amarillo a incoloro de la mezcla de reacción. También se observó la aparición de un precipitado blanco en la mezcla de reacción que se debe a la presencia de cloruro de plomo, que nos indica el término de la reacción.

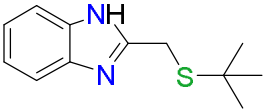
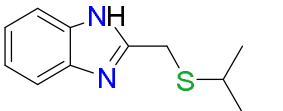
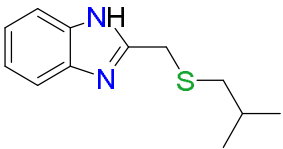
Al finalizar el tiempo de reacción (22-24 h) la disolución obtenida se filtró al vacío a través de celita para retirar el cloruro de plomo. Se verificaron los productos formados mediante cromatografía en capa fina, en un sistema 1:1 hexano:acetato de etilo donde se observó el ligante deseado, como subproductos el disulfuro correspondiente y 2-(clorometil)benzimidazol remanente².

² En el espectro de masas *DART* de los compuestos **L1** y **L3** se evidencia la formación de un polímero de los ligantes (Figuras 10,12 y 13) presumiblemente sea debido a la alta concentración presente del benzimidazol en el seno de reacción. Debido a este hecho la cantidad de benzimidazol disponible para las reacciones se ve limitado a no más de 100 mg por reacción.

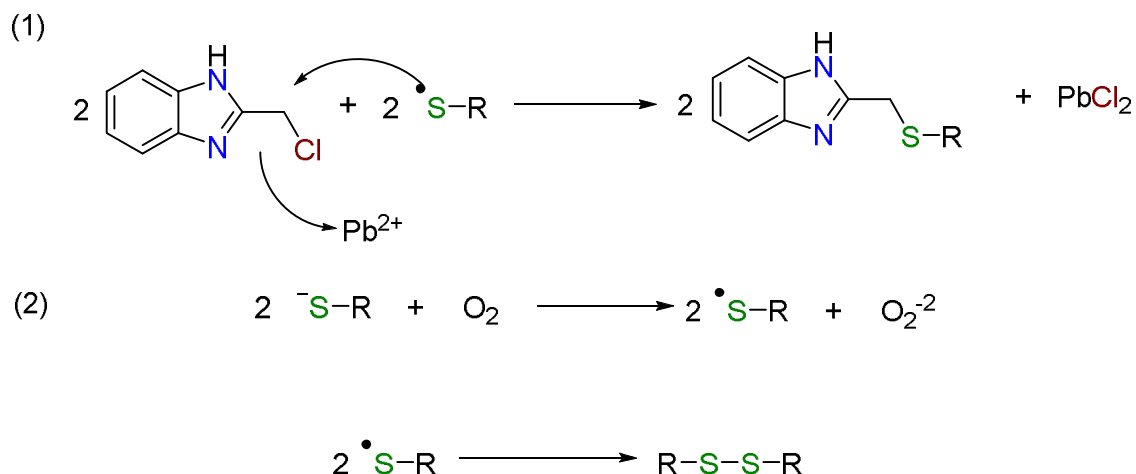
El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna con el sistema (Hex:AcOEt; 1:1) obteniéndose un porcentaje de rendimiento de entre 75-85% (Tabla 2).

Los ligantes obtenidos son solubles en disolventes polares, tales como acetona, acetato de etilo, metanol, etanol, entre otros.

Tabla 2. Algunas propiedades físicas de los compuestos sintetizados.

Compuesto	%Rend	P.f.[°C]	Color	
			Sólido	Disolución
 <p>L1</p>	85	115.0-115.6	Blanco	Incoloro
 <p>L2</p>	83	117.6-118.6	Blanco	Incoloro
 <p>L3</p>	75	125.5-126.1	Blanco	Incoloro
2-(clorometil)benzimidazol		146.0-148.0	Naranja	Amarilla

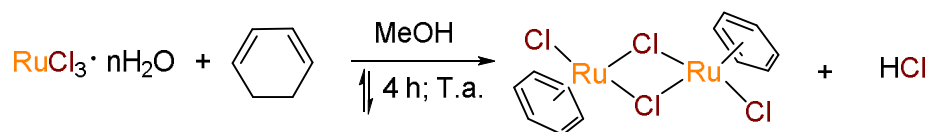
La formación del disulfuro se puede explicar con un mecanismo que propone que posterior a la formación del ligante deseado, la formación del tiolato entra en competencia para así formar el disulfuro correspondiente en presencia de oxígeno molecular y en presencia de una base reacciona con el oxígeno generando así un radical y el ión peróxido. Dicho radical posteriormente dimeriza formando así el disulfuro como subproducto de la reacción como se aprecia en el Esquema 7.



Esquema 7. Mecanismo propuesto para la formación de disulfuros. (1) Formación del ligante. (2) Formación del disulfuro.

Síntesis de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6\text{Cl}_2)_2]$

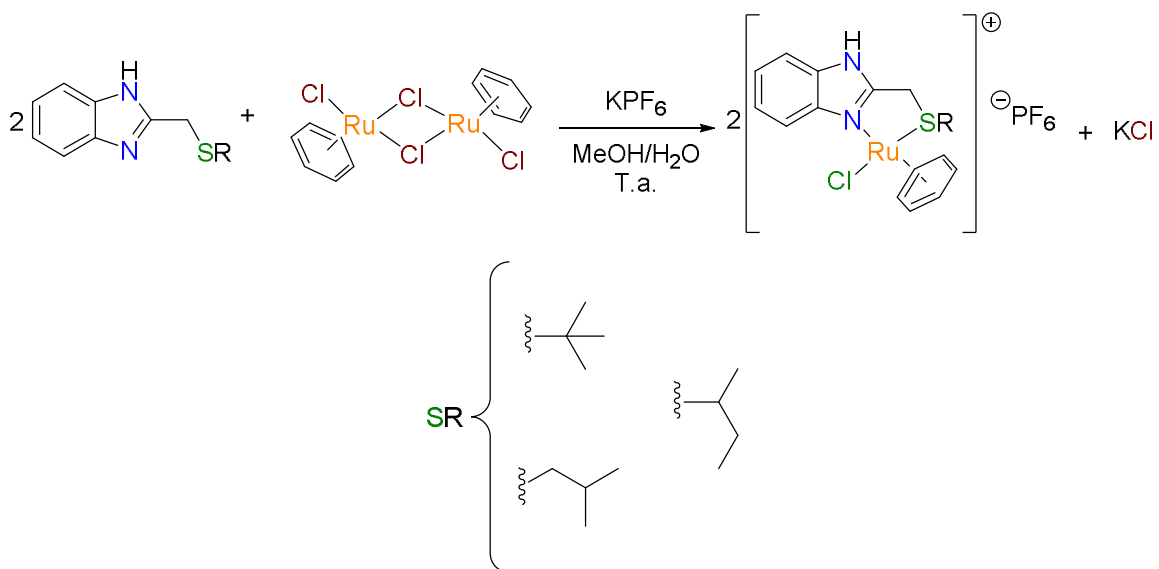
Este compuesto se sintetizó de acuerdo al procedimiento descrito por *Benneth et al.* ^[5] como se muestra a continuación (Esquema 8):



Esquema 8. Síntesis del precursor de rutenio.

Síntesis de complejos

Los complejos de Ru(II) se sintetizaron de acuerdo al Esquema 9 siguiendo una reacción de intercambio de ligante entre el dímero de rutenio y los diferentes compuestos orgánicos obtenidos.



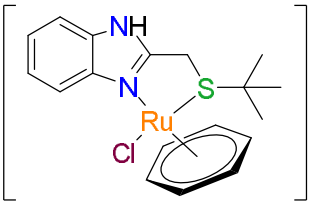
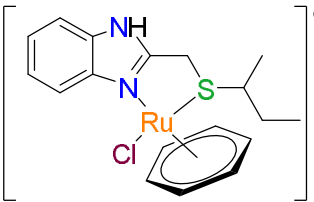
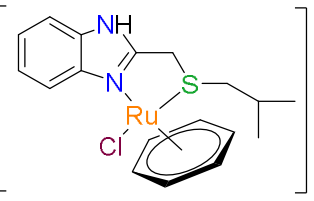
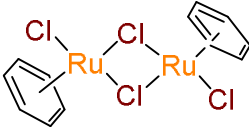
Esquema 9. Reacción general para la síntesis de complejos de Ru(II).

Ésta reacción se ve favorecida debido a la labilidad del enlace $\mu\text{-Cl}$ del dímero de rutenio, cabe mencionar que la reacción de formación del cloruro de potasio constituye la fuerza directriz de la reacción desplazando el equilibrio hacia la formación de productos.

El término de la reacción se verificó mediante cromatografía en capa fina, en donde se observó el remanente de materia prima que no reaccionó y el complejo formado. Visualmente se puede verificar este avance mediante el cambio de color de la mezcla de reacción, el cambio de color dependerá del ligante utilizado y se resume en la Tabla 3.

Los complejos se purificaron pasándolos por una columna de celita para eliminar la materia prima residual, posteriormente la disolución restante se evaporó hasta obtener un sólido colorido (Tabla 3), dichos sólidos se reservaron para su posterior análisis. El porcentaje de rendimiento de los complejos es entre 90-95%, lo que nos indica que la reacción es cuantitativa.

Tabla 3. Compuestos de Ru(II) sintetizados y algunas de sus propiedades.

Compuesto	%Rend	P.f.[°C]	Color	
			Sólido	Disolución
 <p>C1</p>	95	189.5-191.2	Rojizo	Amarillo-naranja
 <p>C2</p>	94	158.0-158.8	Rojizo	Amarillo-naranja
 <p>C3</p>	90	176.7-177.6	Rojizo	Amarillo-naranja
	>95	242	Rojiza	Naranja
RuCl ₃ .nH ₂ O		>500	Negro	

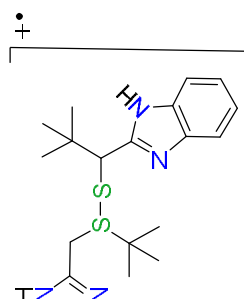
VI. Caracterización

Ligantes

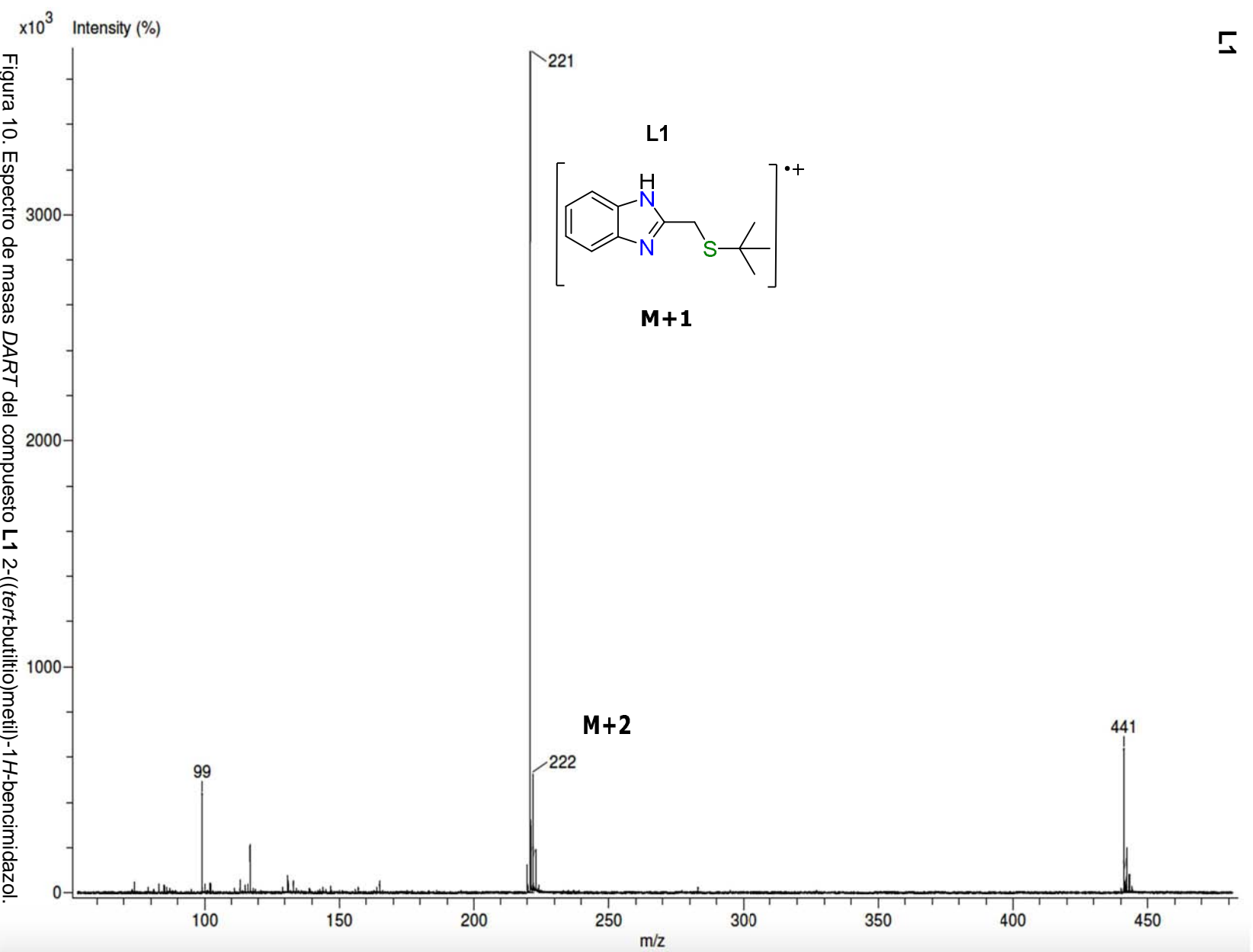
Los ligantes derivados del 2-(clorometil)bencimidazol y tiolatos alifáticos **L1**, **L2** y **L3** se caracterizaron por técnicas convencionales de análisis; tales como espectrometría de masas (*DART*), espectroscopia infrarroja, análisis elemental, resonancia magnética nuclear (^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN). Debido a la semejanza estructural de los ligantes obtenidos se discutirán comparativamente las diferencias significativas de la serie de compuestos sintetizados.

Espectrometría de masas

Se efectuaron experimentos utilizando la técnica de ionización de masas *DART* (*Direct Analysis in Real Time*, por sus siglas en inglés) para el análisis, donde se observan diversas señales correspondientes a pérdidas debidas a la fragmentación de la molécula. De dichas señales el ión molecular de cada uno de los compuestos sintetizados, al ser isómeros estructurales es el mismo ubicándose en $221\ m/z$ ($M+1$); la señal ubicada en $222\ m/z$ corresponde al fragmento $M+2$ del ion molecular debido a la isotopía del nitrógeno (^{15}N) (Figura 10). En el caso de los ligantes **L1** y **L3** se logra observar una señal en $441\ m/z$ la cual corresponde al disulfuro del ligante (Figuras 10 y 12); para el caso del ligante **L3** se efectuó el análisis de masas *DART* del compuesto impuro (con el ión fragmento del disulfuro) (Figura 12) y con un grado de pureza mayor; es decir, únicamente con el ión fragmento correspondiente al ion molecular $M+1$ en $221\ m/z$ (Figura 13).



L1



L2

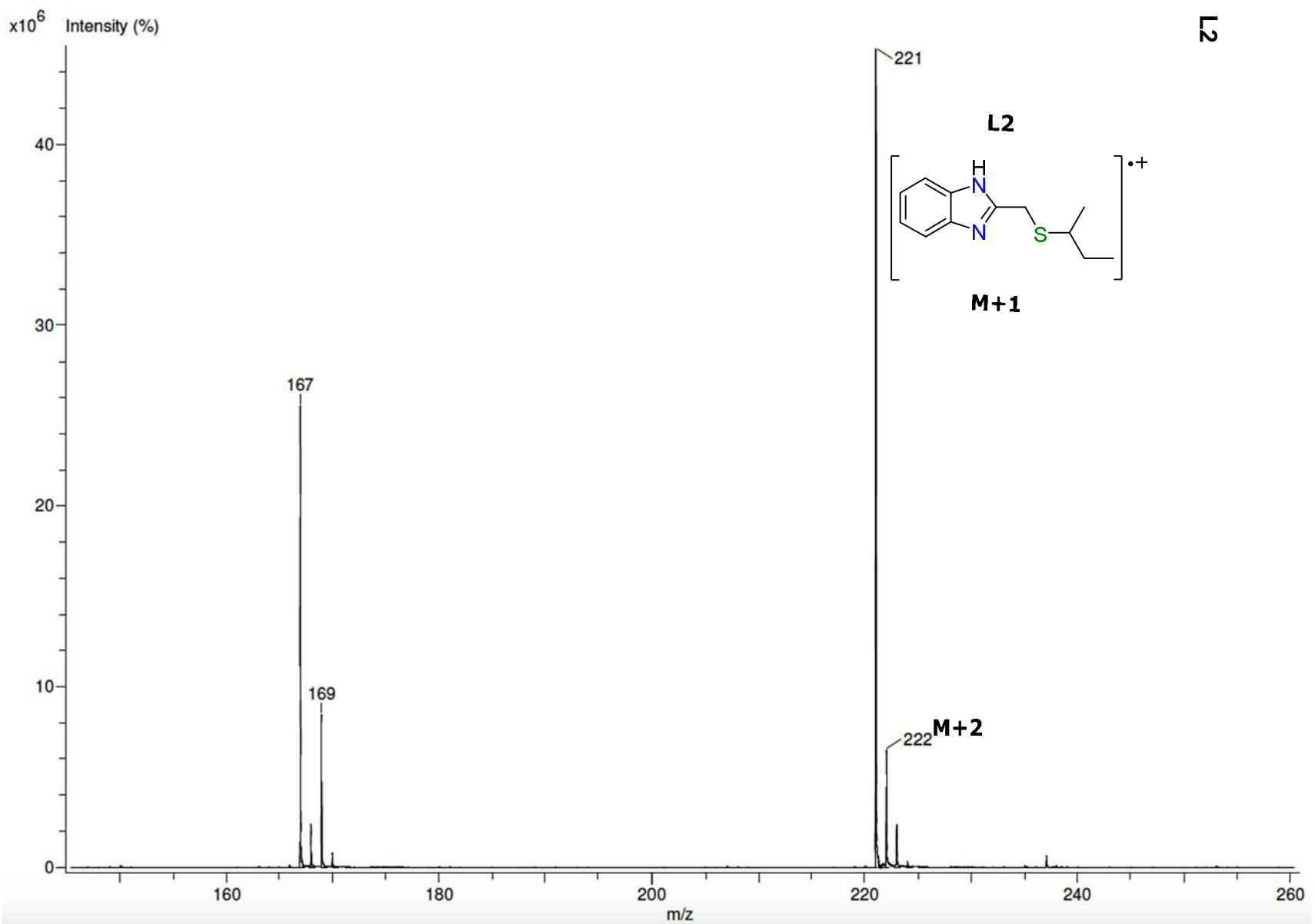


Figura 11. Espectro de masas DART del compuesto **L2** 2-(sec-butil(tio)metil)-1H-benzimidazol.

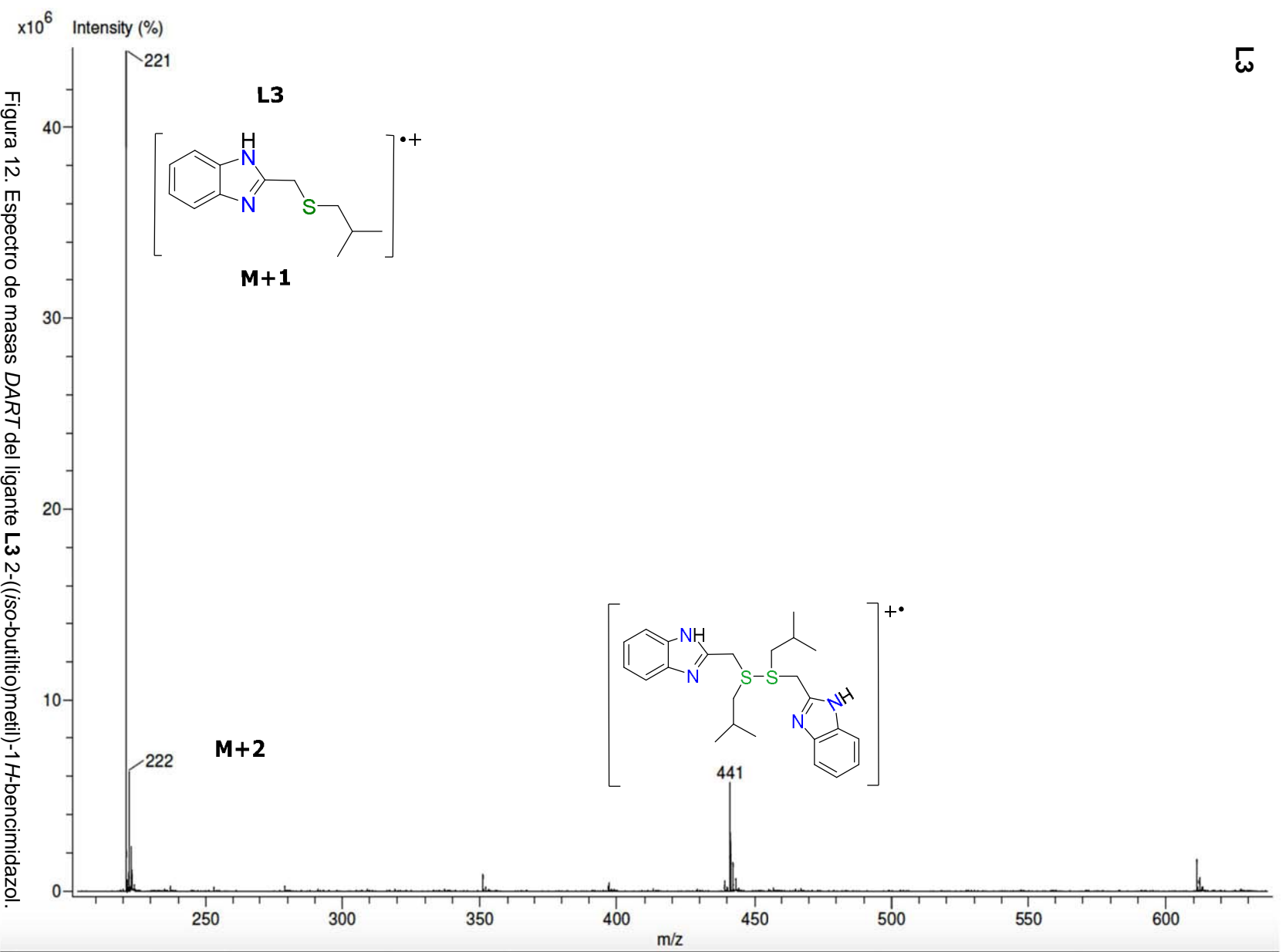


Figura 12. Espectro de masas DART del ligante L3 2-((iso-butilo)metil)-1H-benzimidazol.

L3

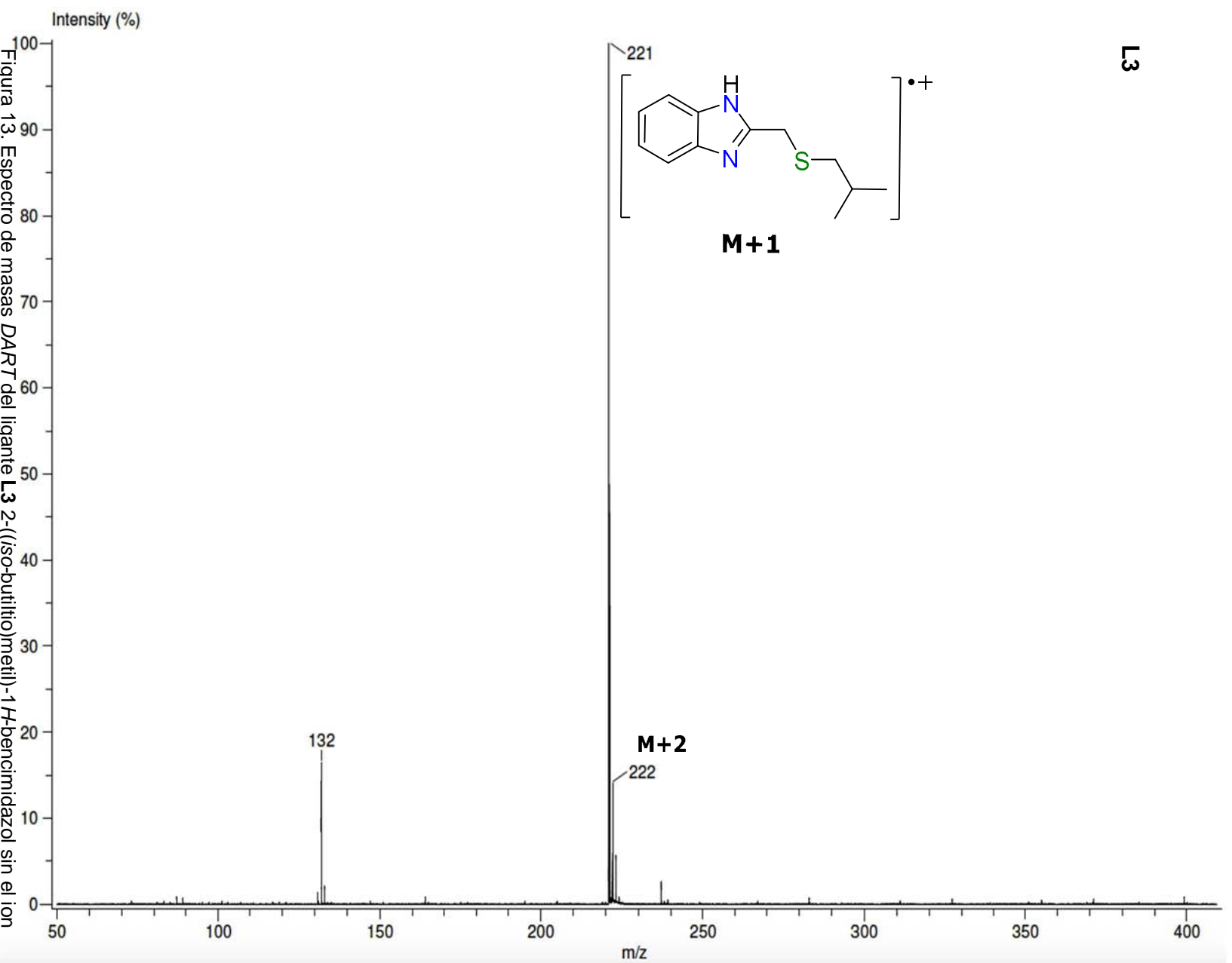


Figura 13. Espectro de masas DART del ligante L3 2-((iso-butilio)metil)-1H-benzimidazol sin el ion fragmento correspondiente al dimer.

Espectroscopia infrarroja

En ésta técnica de caracterización espectroscópica fue posible identificar diferentes bandas características de los grupos funcionales presentes en los compuestos obtenidos, tales como las correspondientes al anillo aromático, al enlace N-H del anillo imidazólico ($3000-3060\text{ cm}^{-1}$), el enlace C-S ($570-640\text{ cm}^{-1}$) y las correspondientes al metileno presentándose a continuación para cada uno de los ligantes (Tabla 4).

Tabla 4. Bandas características observadas en los experimentos de IR para los ligantes **L1**, **L2** y **L3**.

Grupo	Compuesto		
	L1 $\nu[\text{cm}^{-1}]$	L2 $\nu[\text{cm}^{-1}]$	L3 $\nu[\text{cm}^{-1}]$
N-H	(d) 802	(d) 798	(d) 802
	(d) 836		(d) 843
	(d) 861	(d) 841	(d) 865
	(d) 1589	(d) 1515	(d) 1587
	(d) 1621	(d) 1620	(d) 1621
C-S (st)	(d) 578	(d) 513	---
	(m) 1395	(m) 1382	(m) 1382
CH ₂	(m) 1425	(m) 1437	(m) 1430
	(m) 736	(m) 738	(m) 737
Sust. Aromática	(m) 2921	(f) 2918	(f) 2930

d: débil, m: media, f: fuerte

Para los experimentos de IR obtenidos de los ligantes (**L1**, **L2** y **L3**) no se observan cambios significativos debido al cambio en la posición de átomos por la isomería presente en los compuestos sintetizados.

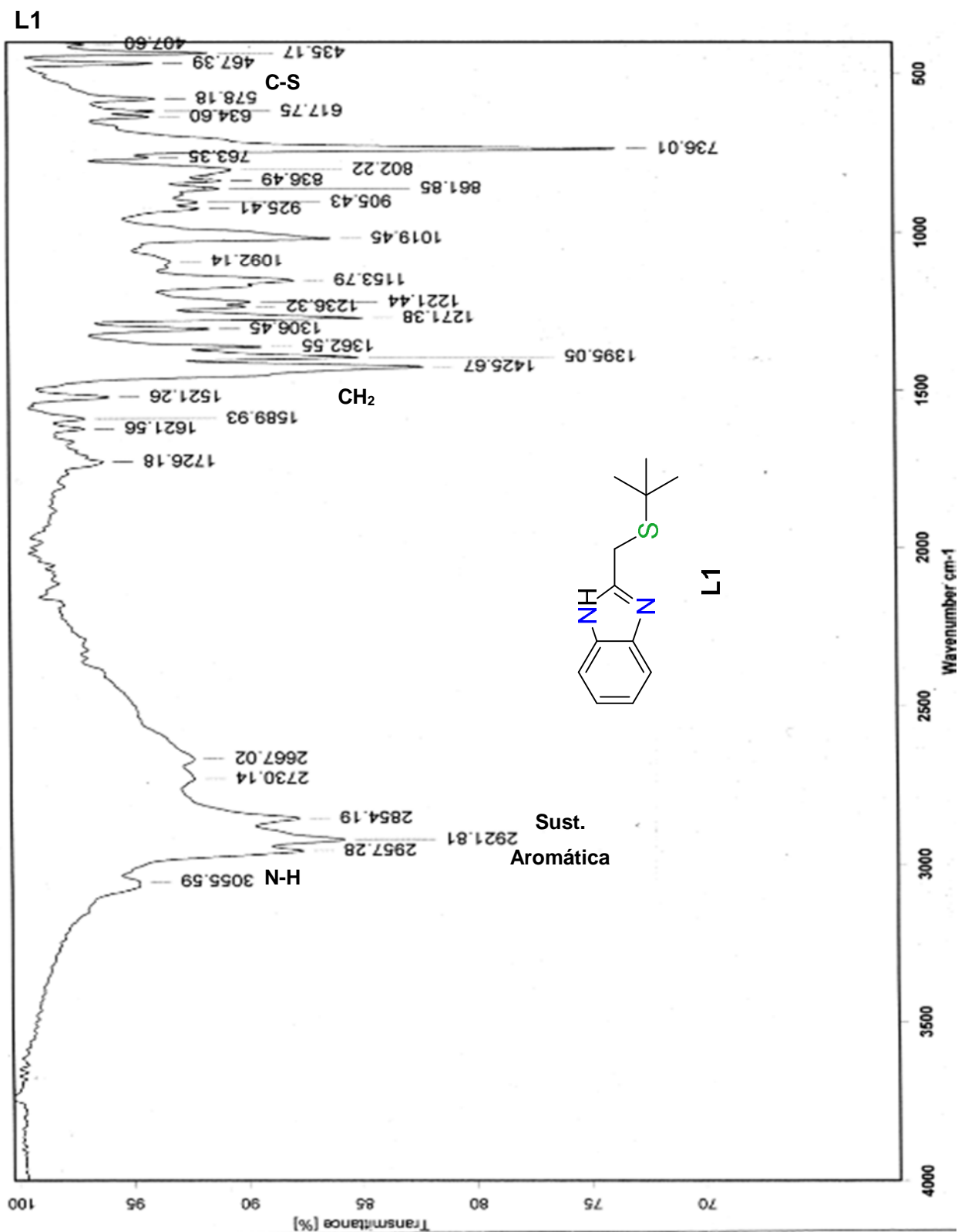


Figura 14. Espectro de IR del compuesto L1 2-((*tert*-butiltio)metil)-1*H*-bencimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.

L2

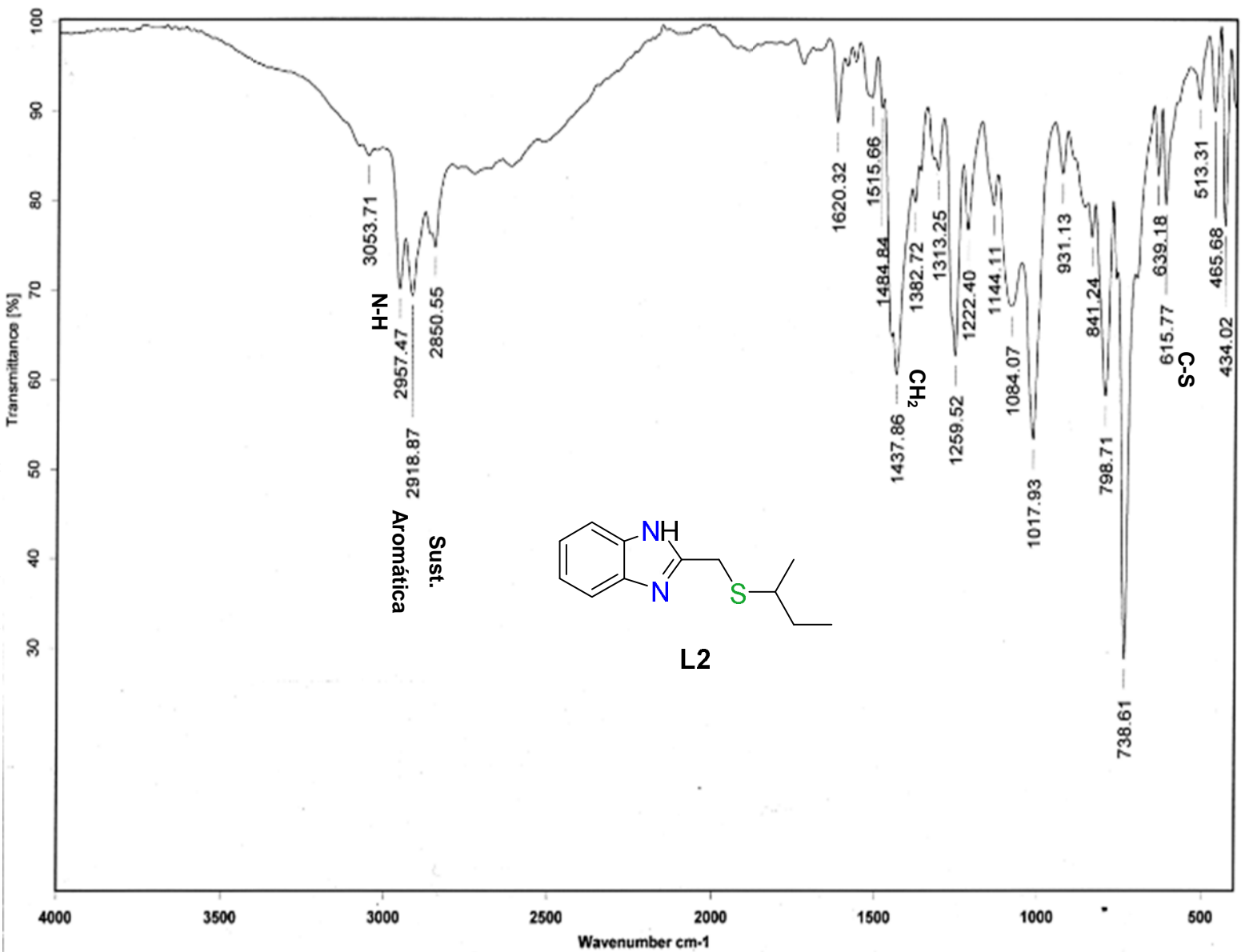


Figura 15. Espectro de IR del compuesto L2 2-((sec-butilio)metil)-1H-benzimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.

L3

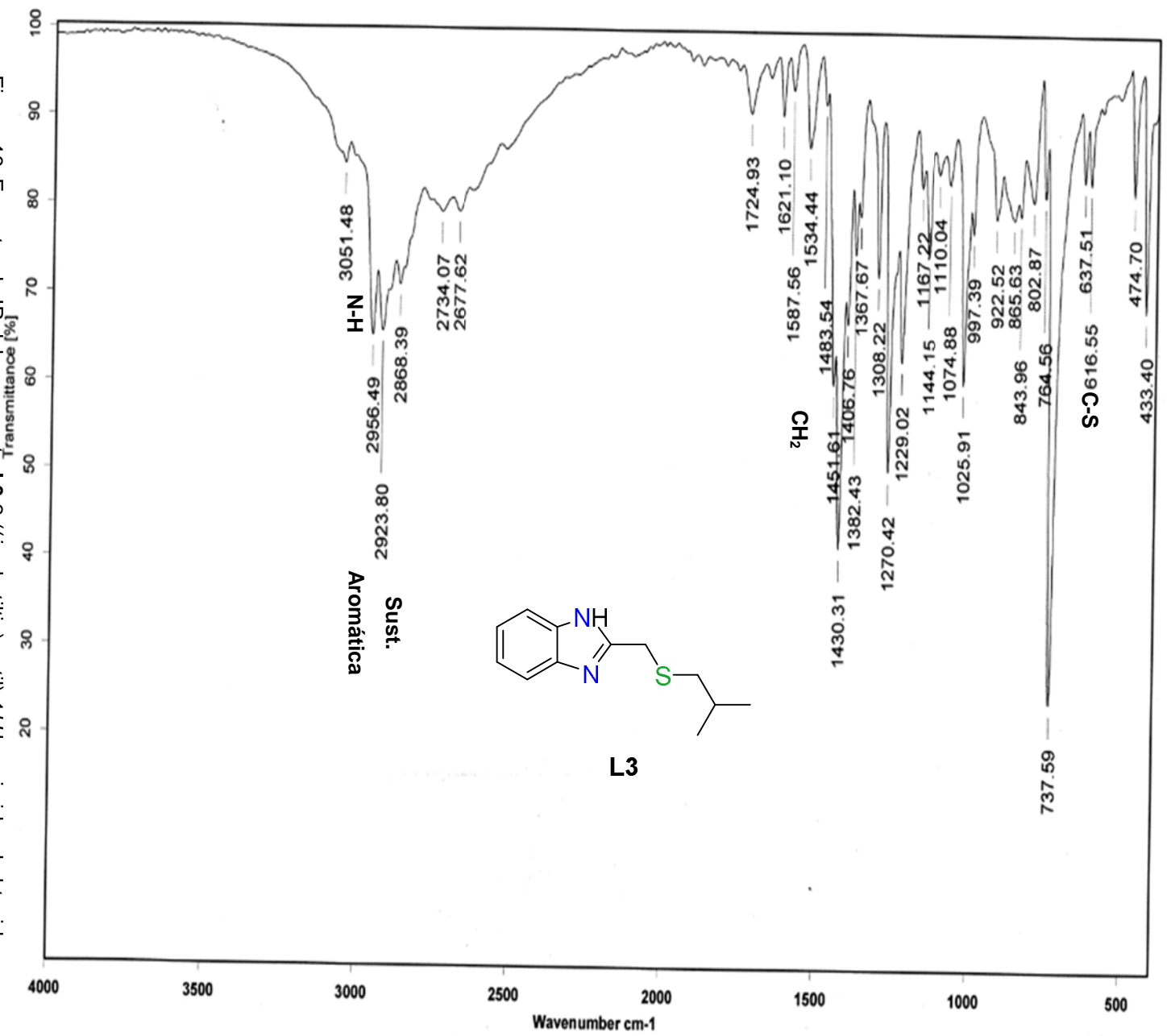


Figura 16. Espectro de IR del compuesto L3 2-((iso-butilitio)metil)-1H-bencimidazol obtenido en pastilla de KBr a T. ambiente.

Resonancia Magnética Nuclear (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN)

Se efectuaron los experimento de resonancia magnética nuclear para la serie de ligantes **L1**, **L2** y **L3** para corroborar la obtención de estos, así como también observar la influencia de la isomería estructural presente en los mismos, además se resalta la simetría de las moléculas ya que gracias a esta se observa el protón del imidazol entre el intervalo de δ 4.5-5.5 ppm y se esperará una señal de intensidad media-baja, ancha y que integrará para 0.5 protones, ya que en disolución este tipo de protones se intercambian entre los nitrógenos del anillo imidazol que lo conforman. De ésta manera se lograron obtener los espectros que se presentan a continuación.

^1H -RMN

Se presenta el espectro obtenido para el compuesto **L1**, el cual tiene como sustituyente al *tert*-butilo, se observan 4 señales: una señal en δ 7.40 ppm y otra en δ 7.05 ppm atribuibles a los protones unidos al anillo aromático del bencimidazol, subiendo hacia campo alto en δ 3.95 ppm se encuentra una señal simple que corresponde al metileno y finalmente desplazado hacia campo más alto sobre δ 1.15 ppm se encuentra una señal simple asignable a los 9 protones de los metilos correspondientes al *tert*-butilo, en este caso sólo se observa una única señal debido a que dichos protones son químicamente equivalentes.

Adicionalmente se observan dos señales no muy intensas en el intervalo de δ 0.5 a 2.0 ppm que corresponden a los disolventes utilizados ya sea durante la síntesis de los compuestos o bien de los experimentos de resonancia. La señal sencilla (a) en δ 1.92 ppm corresponde al acetato de etilo utilizado durante la purificación del compuesto, la señal a campo más alto sobre δ 0.75 ppm (b) es asignable al hexano acarreado de la cromatografía en columna para purificación.

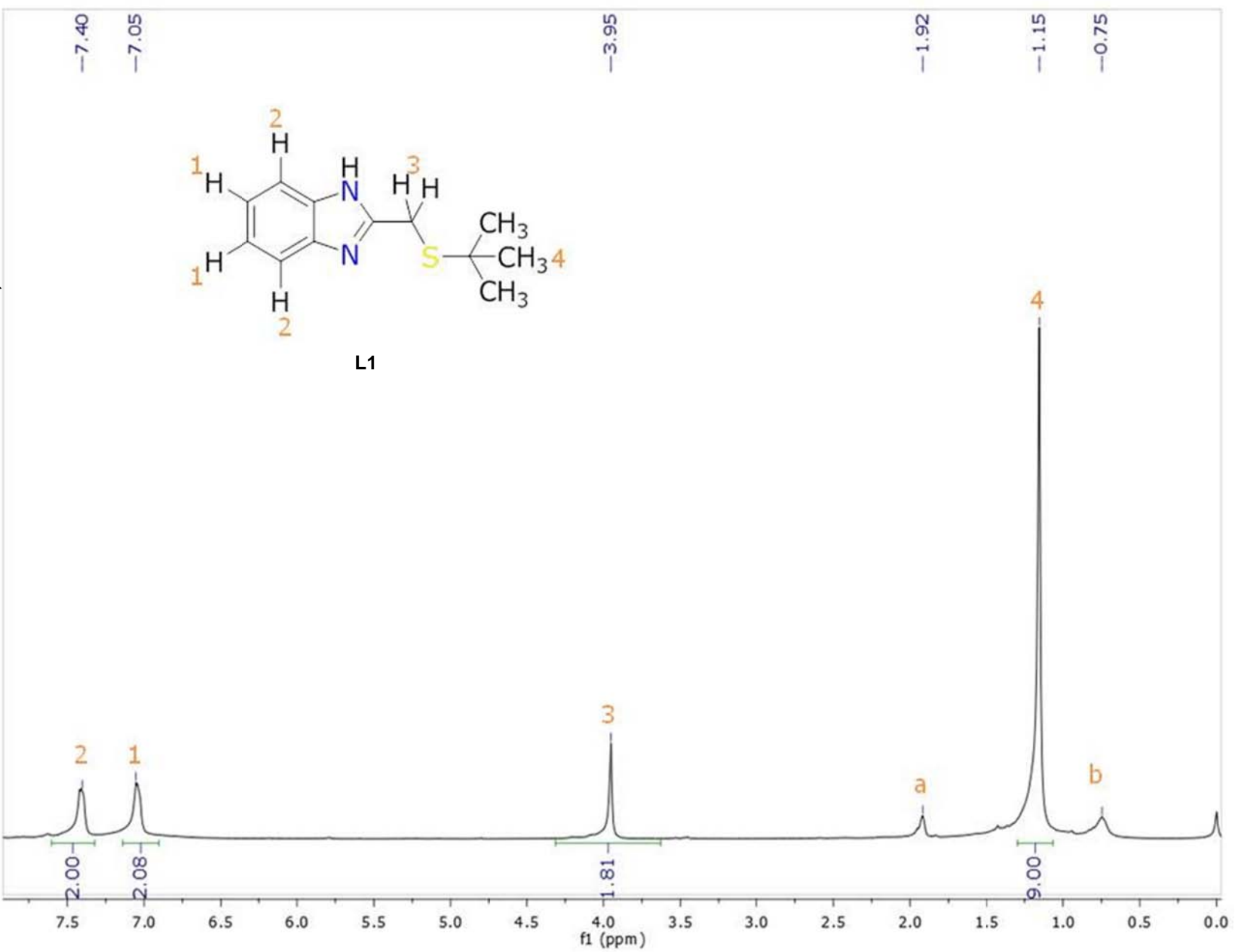


Figura 17. Espectro de ^1H -RMN obtenido del compuesto L1 en acetona- d_6 a 300 MHz, 1a.

Para el espectro del compuesto **L2** se observan 10 señales dentro de las cuales las correspondientes a los protones del compuesto son las ubicadas en δ 7.41 ppm (2) y δ 7.05 (1) correspondientes a los protones aromáticos del bencimidazol, hacia campo bajo se encuentra una señal sencilla en δ 3.86 ppm (3) asignada a los dos protones del metileno, más adelante se observa una señal que se atribuye al protón del carbono terciario, además de que la multiplicidad corresponde a la esperada, desplazado hacia campo más bajo se encuentra una señal en δ 1.4 ppm (6) que se asigna a los dos protones del metileno vecino al metilo terminal que se ubica en δ 0.76 ppm (5) con una señal triplete con multiplicidad de 3 y finalmente se encuentra el otro metilo terminal, que debido al tipo de sustitución del *sec*-butilo se encuentra en δ 1.10 ppm (4) con un doblete que integra para 3 protones químicamente equivalentes.

Así mismo se notan tres señales correspondientes al acetato de etilo que se utilizó para la purificación por cromatografía en columna ubicados en δ 4.09 ppm (A), δ 1.92 ppm (B) y δ 1.15 ppm (C).

Finalmente para el compuesto **L3** 2-((*iso*-butilitio)metil)-1-*H*-bencimidazol se observan 6 señales que corresponden a las señales esperadas de acuerdo con la isomería del *iso*-butilo, éstas señales se ubican de campo alto a campo bajo en el siguiente orden: en δ 7.38 ppm (2) y δ 7.05 ppm (1) con el patrón y multiplicidad característica para un anillo aromático disustituido (del bencimidazol), más adelante se encuentra una señal sencilla en δ 3.82 ppm (3) asociada a los protones del metileno vecino al bencimidazol, también se nota el patrón característico para el *iso*-butilo correspondiente a una señal doble en δ 2.32 ppm (4), un quintuplete en δ 1.65 ppm (5) y una señal sencilla intensa en δ 0.80 ppm (6) asignadas a los protones del metileno, el carbono terciario y metilos terminales del *iso*-butilo respectivamente. Al igual que en los espectros anteriores se observan las señales del acetato de etilo residual (a,b) proveniente de la purificación.

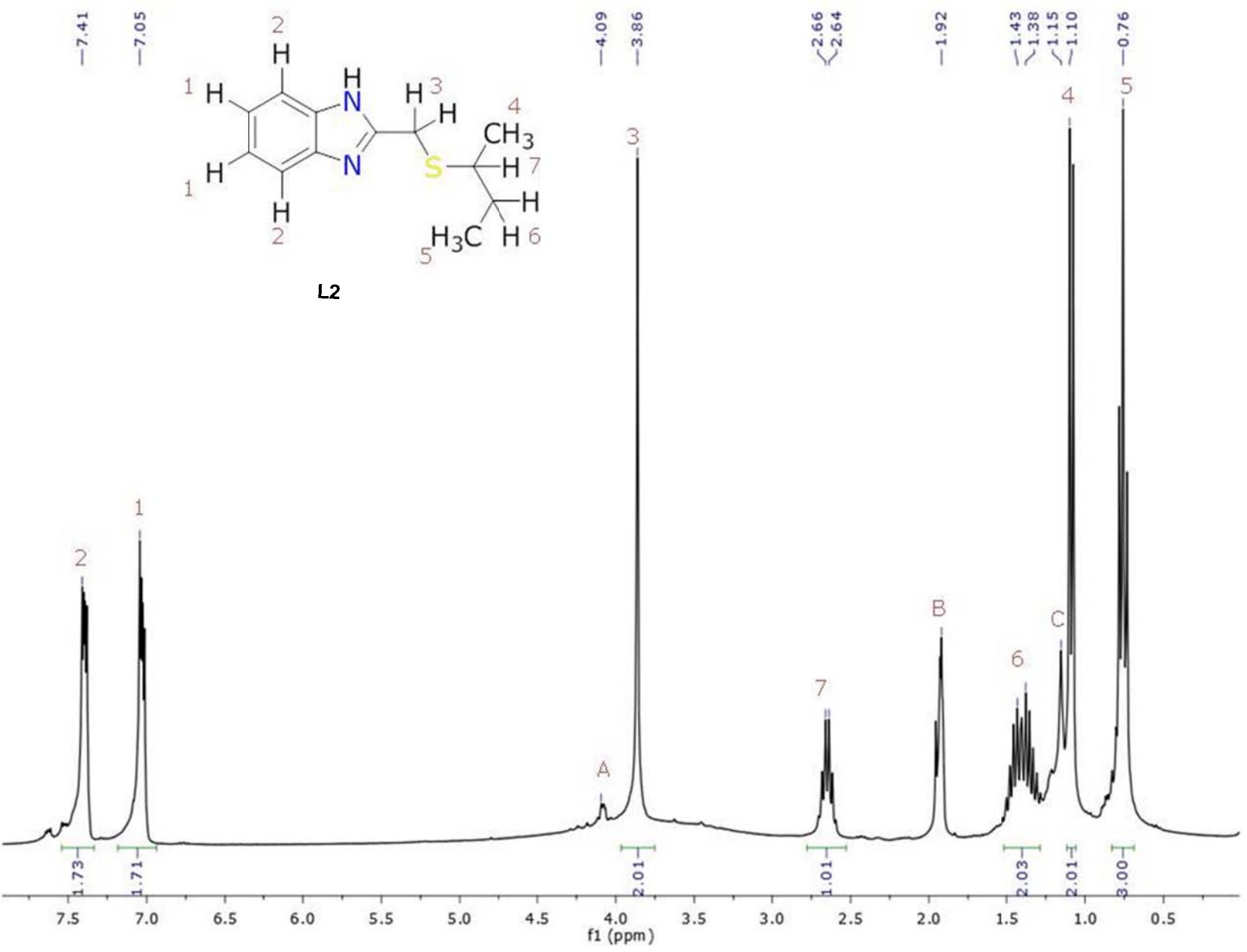


Figura 18. Espectro de ¹H-RMN obtenido en acetona-d₆ a 300 MHz para el compuesto **L2** 2-((sec-butilto)metil)-1H-bencimidazol.

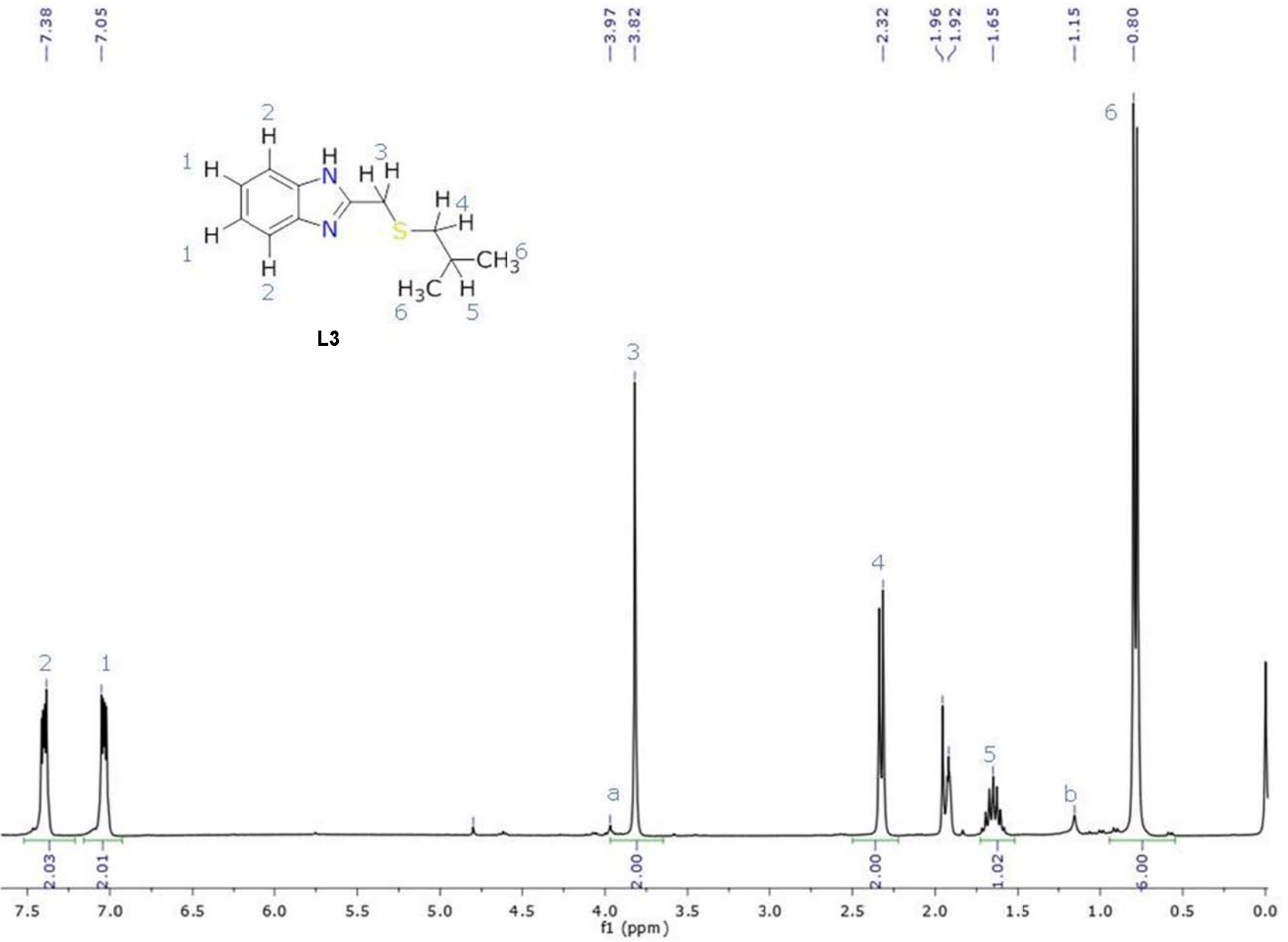
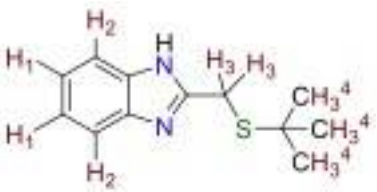
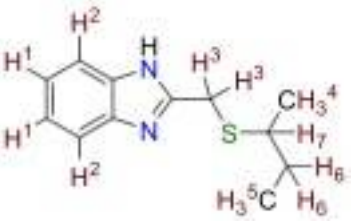
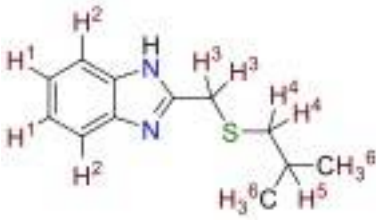


Figura 19. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **L3** 2-((iso-butilitio)metil)-1*H*-bencimidazol obtenido en acetona-*d*₆ a 300 MHz.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de los compuestos **L1**, **L2** y **L3** obtenidos de ^1H -RMN a 300 MHz en acetona- d_6 .

Ligante	Asignación de núcleos de hidrógeno en la molécula						
	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇
	7.05	7.4	3.95	1.15	-	-	-
	7.05	7.41	3.86	1.1	0.76	1.4	2.66
	7.05	7.38	3.82	2.32	1.65	0.8	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN

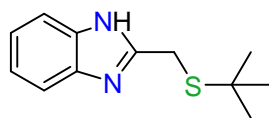
Se presentan a continuación los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 obtenidos en acetona- d_6 en un equipo de 300 MHz. Al igual que los espectros de ^1H -RMN obtenidos previamente se esperarán identificar señales para los átomos de carbono presentes en las moléculas sintetizadas, ya que por la simetría de las moléculas sintetizadas se esperan detectar 7, 9 y 8 señales para los sustituyentes *tert*-, *sec*- e *isobut*ilo respectivamente.

Siendo así se enlistan a continuación (Tabla 6) los desplazamientos químicos obtenidos y la asignación de cada una de las señales obtenidas de los espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de los compuestos **L1**, **L2** y **L3** sintetizados. Cabe mencionar que en todos los experimentos efectuados se utilizó como disolvente acetona- d_6 .

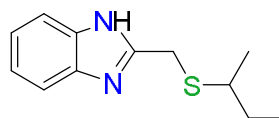
Tabla 6. Desplazamientos químicos y asignación de señales de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN de la serie de ligantes.

Señal #C	Compuesto		
	L1 [ppm]	L2 [ppm]	L3 [ppm]
1	122.45	122.43	121.76
2	115.4	115.8	114.87
3	149.63	139.95	139.21
4	114.75	153.27	152.21
5	26.26	29.87	29.12
6	42.76	42.15	40.81
7	38.21	20.69	28
8	-	28.32	21.23
9	-	11.33	-

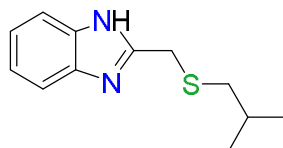
Ligantes



L1



L2



L3

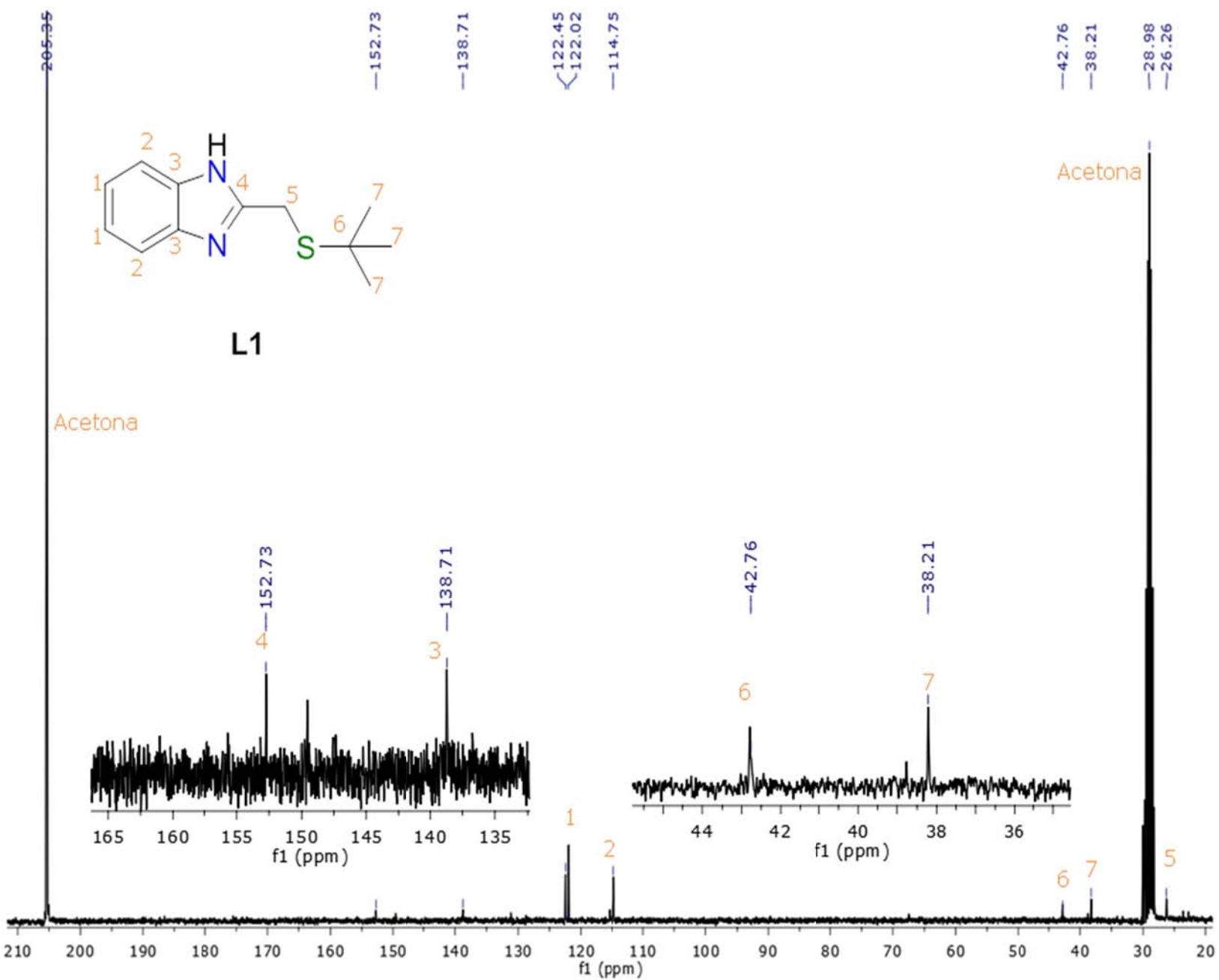


Figura 20. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto **L1** 2-((*tert*-butil(metil)-1*H*-bencimidazol) obtenido en acetona-*d*₆ a 300 MHz.

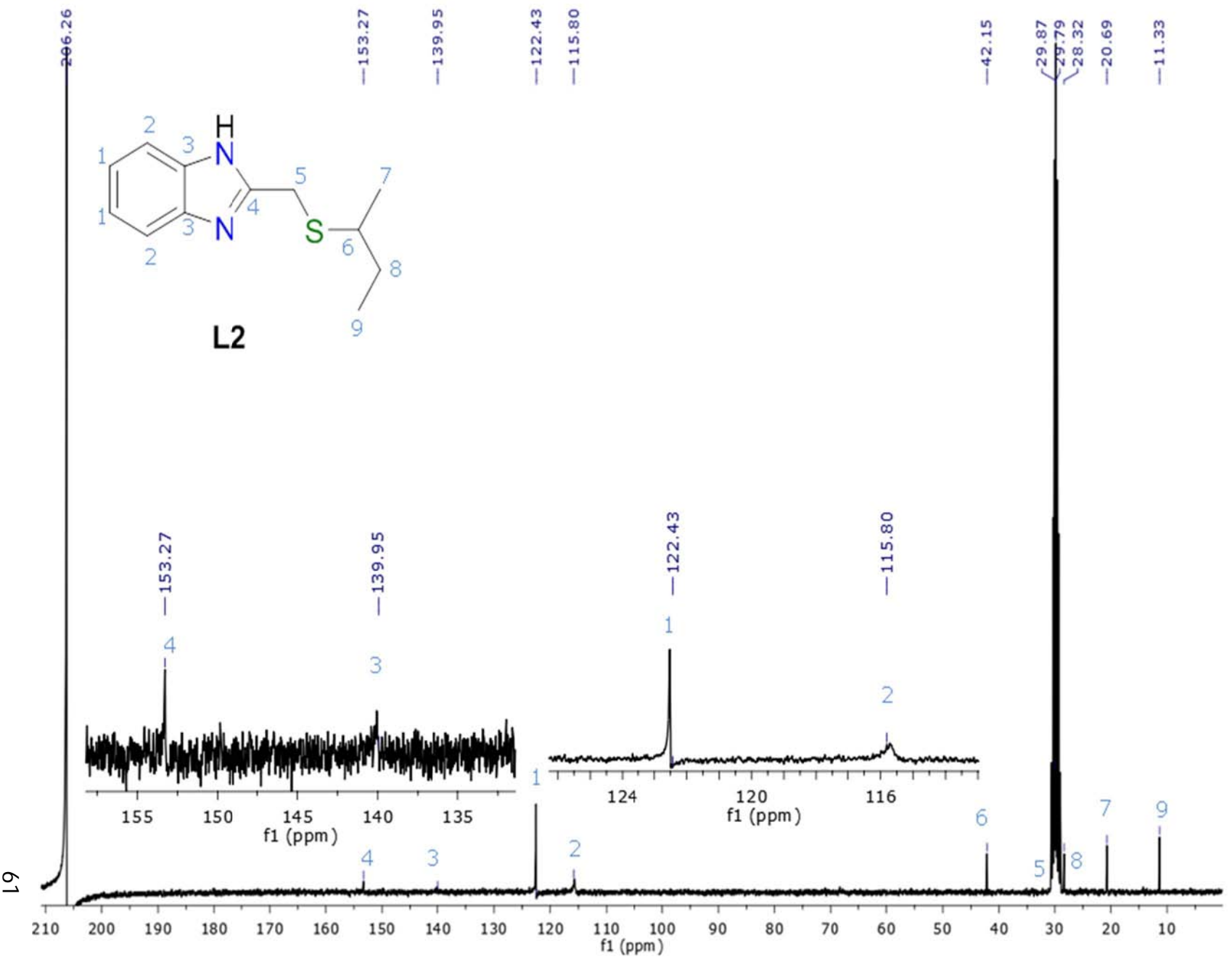


Figura 21. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto **L2** 2-((sec-butil(o)metil)-1*H*-bencimidazol obtenido en acetona- d_6 a 300 MHz.

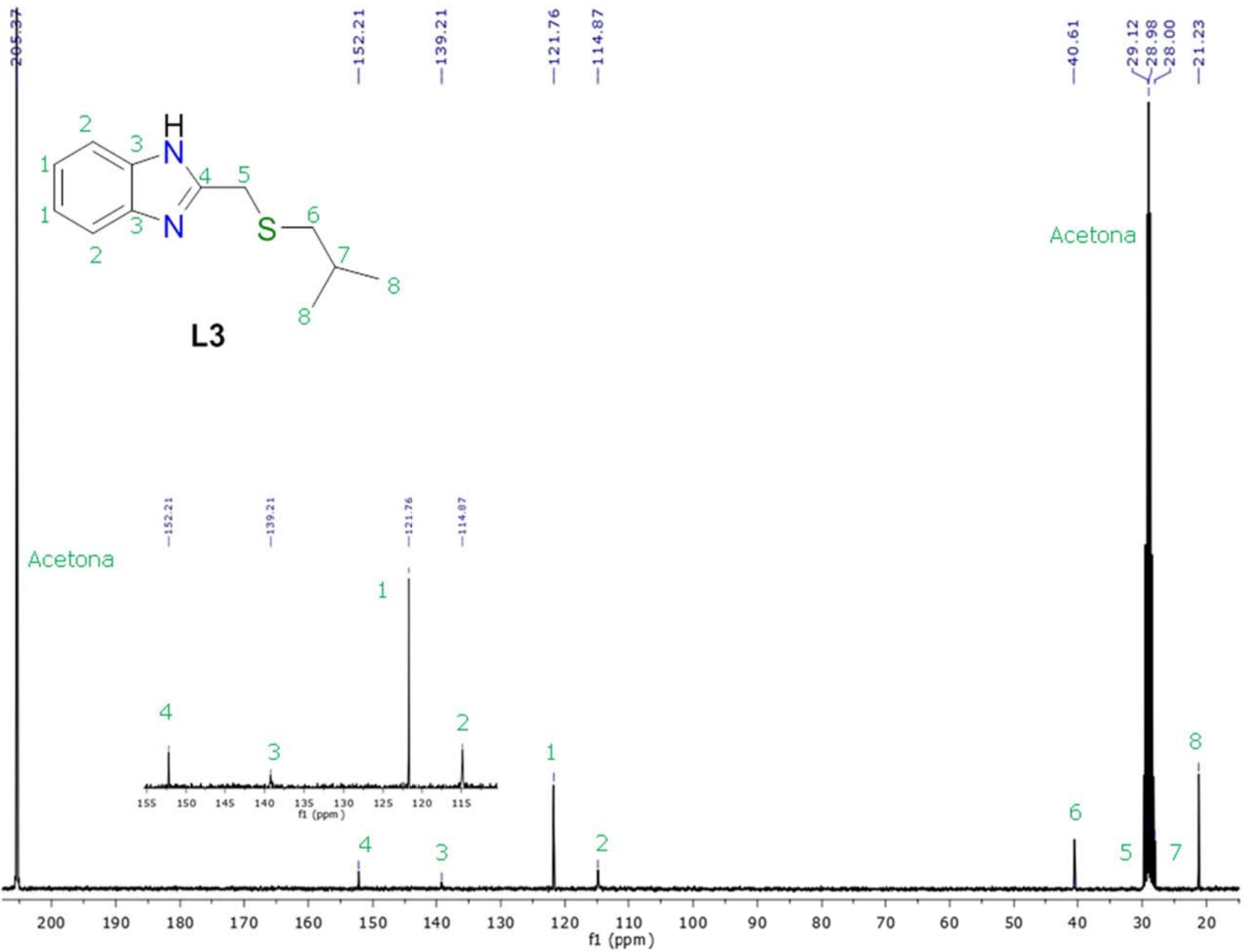


Figura 22. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto **L3** 2-((iso-butiltio)metil)-1*H*-bencimidazol obtenido en acetona- d_6 a 300 MHz.

Compuestos de Ru(II)

Los complejos de Ru(II) **C1**, **C2** y **C3** sintetizados a partir de los ligantes **L1**, **L2** y **L3** se caracterizaron por espectrometría de masas FAB^+ (*Fast Atom Bombardment*, por sus siglas en inglés), espectroscopia infrarroja, análisis elemental, resonancia magnética nuclear (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN). Se ejemplificaran de manera representativa un ejemplo de cada uno de los análisis para cada uno de los complejos, mostrando la parte más relevante de los análisis efectuados.

Espectrometría de masas

El peso molecular de los complejos de Ru(II) obtenidos es de 579.33 m/z , pero en este tipo de experimentos únicamente se espera observar una señal debida al ion molecular correspondiente al ion fragmento catiónico; es decir, solamente se detectarán aquellos iones con carga positiva que para estos compuestos el ión molecular correspondería a 434.97 m/z .

De acuerdo a lo esperado, se observa el ión molecular del compuesto **C2** en 435 m/z , además se sabe que existen varios isótopos del rutenio, en donde los más abundantes se enlistan en la Tabla 7 y que haciendo una ampliación al ión molecular obtenido en el análisis FAB^+ se logran distinguir varias de las isotopías enlistadas (Figura 23)

Es posible identificar en el espectro de masas al ion fragmento correspondiente a la parte catiónica del compuesto sin el ion fragmento $[\text{M}-\text{Cl}]$ en 400 m/z (figura 24), se distingue al ion fragmento correspondiente al ligante libre **L2** en 221 m/z .

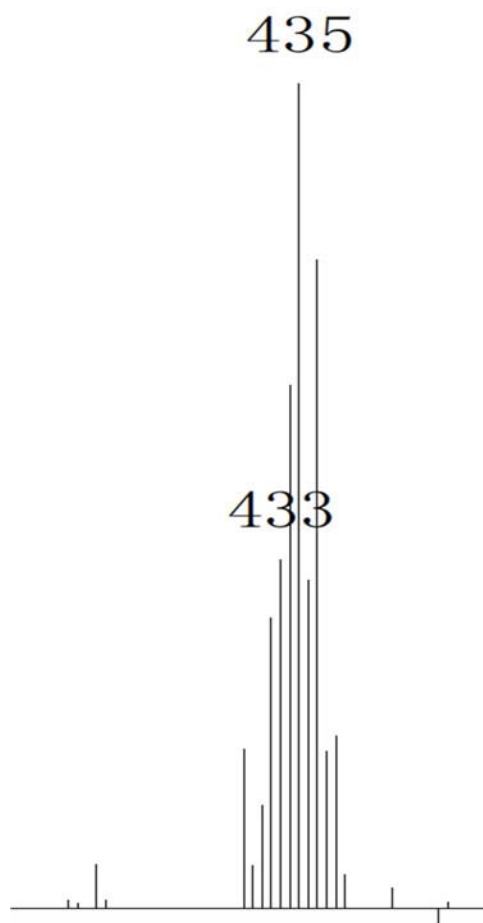


Figura 23. Isotopía de rutenio del ion molecular del espectro de masas FAB^+ del compuesto **L2**.

Tabla 7. Isotopías y abundancias relativas presentes en los compuestos sintetizados.

Isótopo	% Abundancia Relativa
^1H	100
^2H	0.015
^{12}C	100
^{13}C	1.12
^{14}N	100
^{15}N	0.366
^{32}S	100
^{33}S	0.789
^{34}S	4.433
^{36}S	0.018
^{96}Ru	5.5
^{98}Ru	1.9
^{99}Ru	12.8
^{100}Ru	12.6
^{101}Ru	17

C2

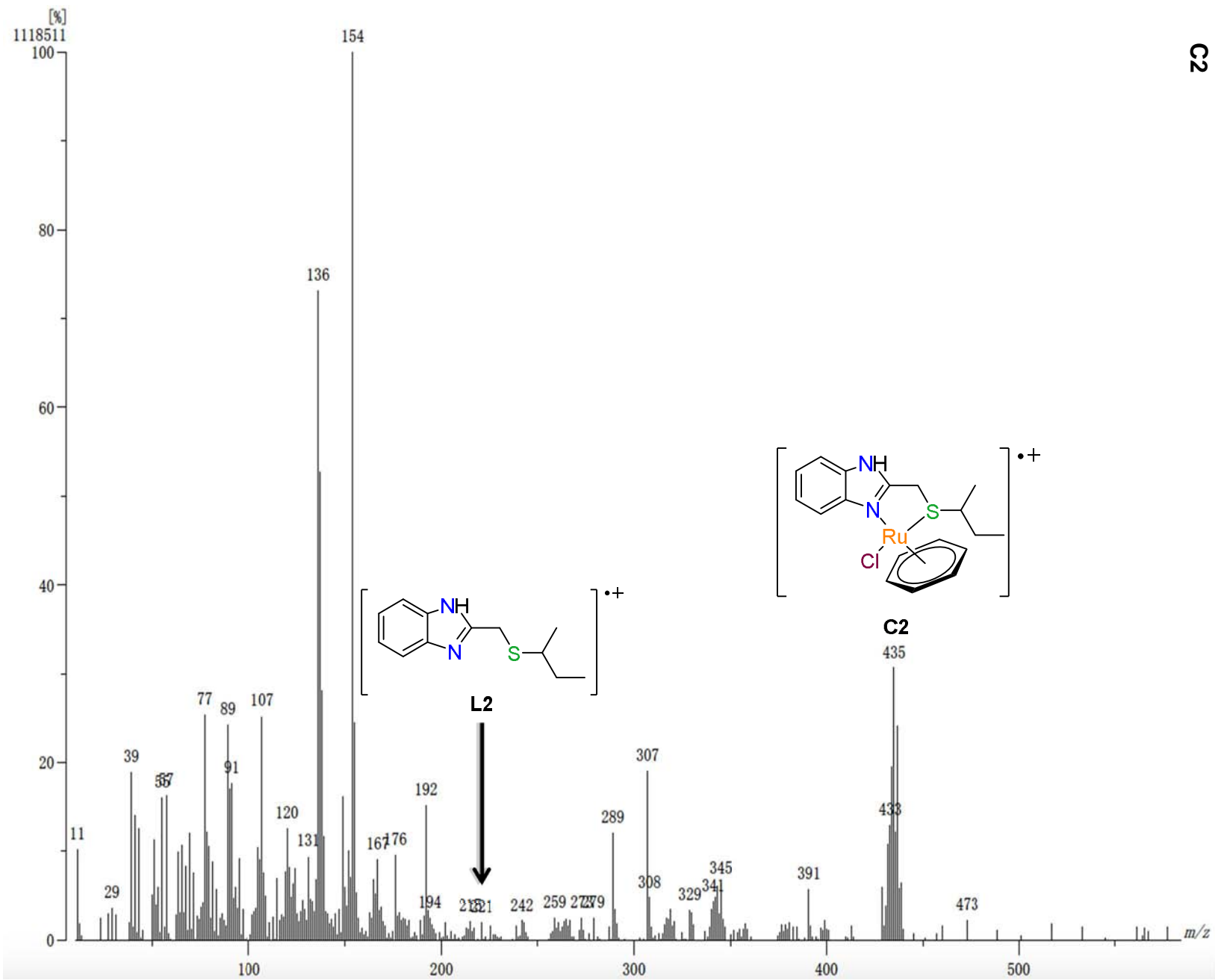


Figura 24. Espectro de masas FAB^+ del complejo derivado del 2-((sec-butiltio)metil)-1*H*-bencimidazol y Ru(II) (**C2**).

Espectroscopia de infrarrojo

En comparación con los espectros de IR obtenidos para los compuestos **L1**, **L2** y **L3**, para los complejos de dichos ligantes se observa la disminución en la intensidad y el desplazamiento ligero de algunas señales como en el caso de la sustitución aromática que va de un intervalo de 2800-3000 cm^{-1} , así mismo en las señales correspondientes a la vibración del enlace C-S (600-650 cm^{-1}) se observa desplazamiento a mayores ppm y mayor definición de las señales que identifican a este enlace. También se observa la aparición de las señales correspondientes al areno sobre 820-840 cm^{-1} y al ion PF_6^- en 555 cm^{-1} lo cual es indicativo de la formación del complejo.

A continuación se presentan más a detalle los espectros obtenidos y la asignación de las señales para cada uno de los compuestos **C1**, **C2** y **C3** (Tabla 8 y Figuras 25-28).

Tabla 8. Vibraciones importantes de los espectros obtenidos para los complejos de Ru(II).

Grupo	Compuesto		
	C1 $\nu[\text{cm}^{-1}]$	C2 $\nu[\text{cm}^{-1}]$	C3 $\nu[\text{cm}^{-1}]$
C-S	(d) 617	(d) 617	(d) 627
Sust. Aromática	(d) 2923	(d) 2922	(d) 2924
CH₂	(m) 743	(m) 743	(m) 744
	(m) 1435	(m) 1434	(m) 1437
N-H	(d) 3064	(d) 3068	(d) 3065
Areno	(f) 831	(f) 829	(f) 829
PF_6^-	(f) 555	(f) 555	(f) 554

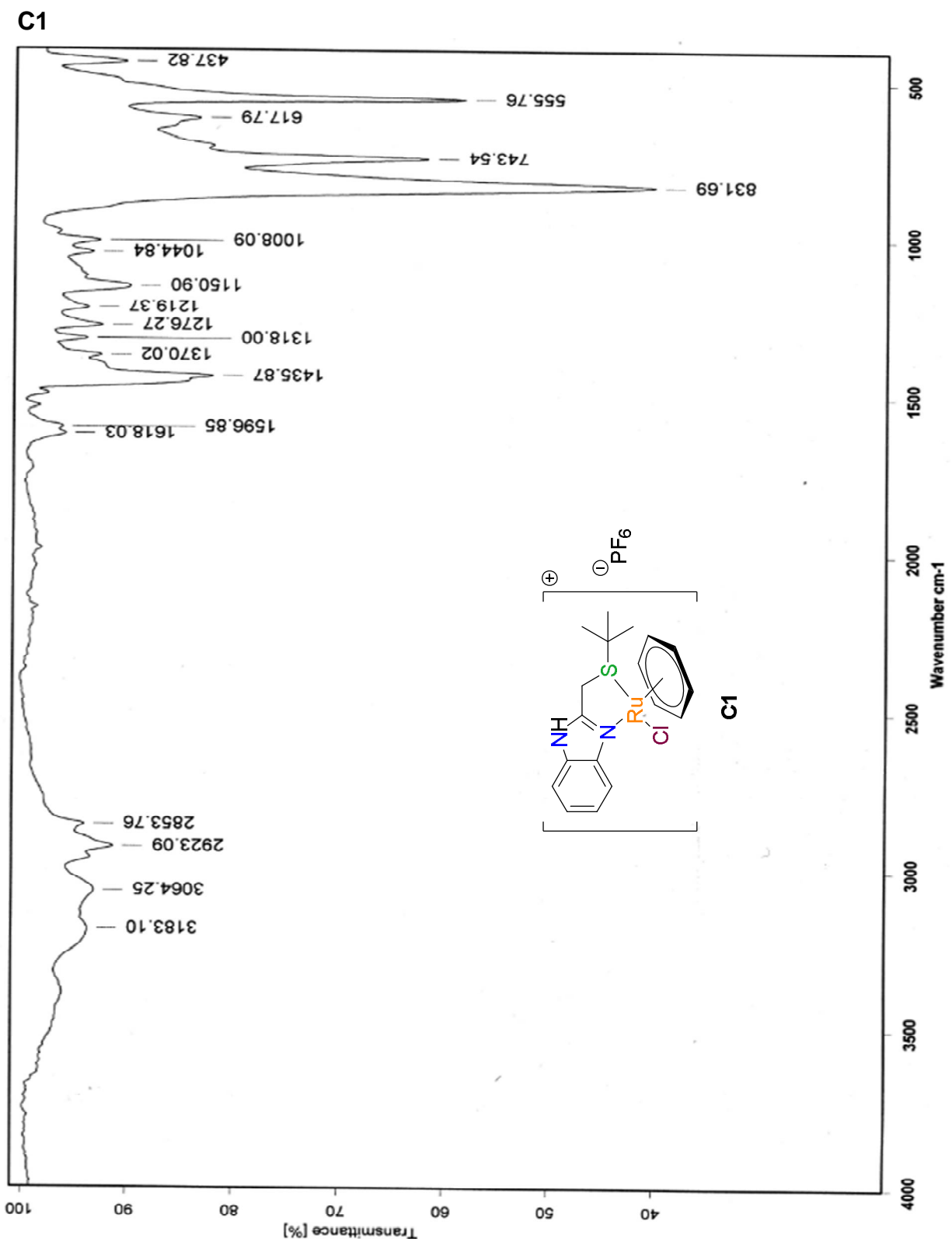


Figura 25. Espectro de IR del compuesto **C1** obtenido en pastilla de KBr a t.a.

C2

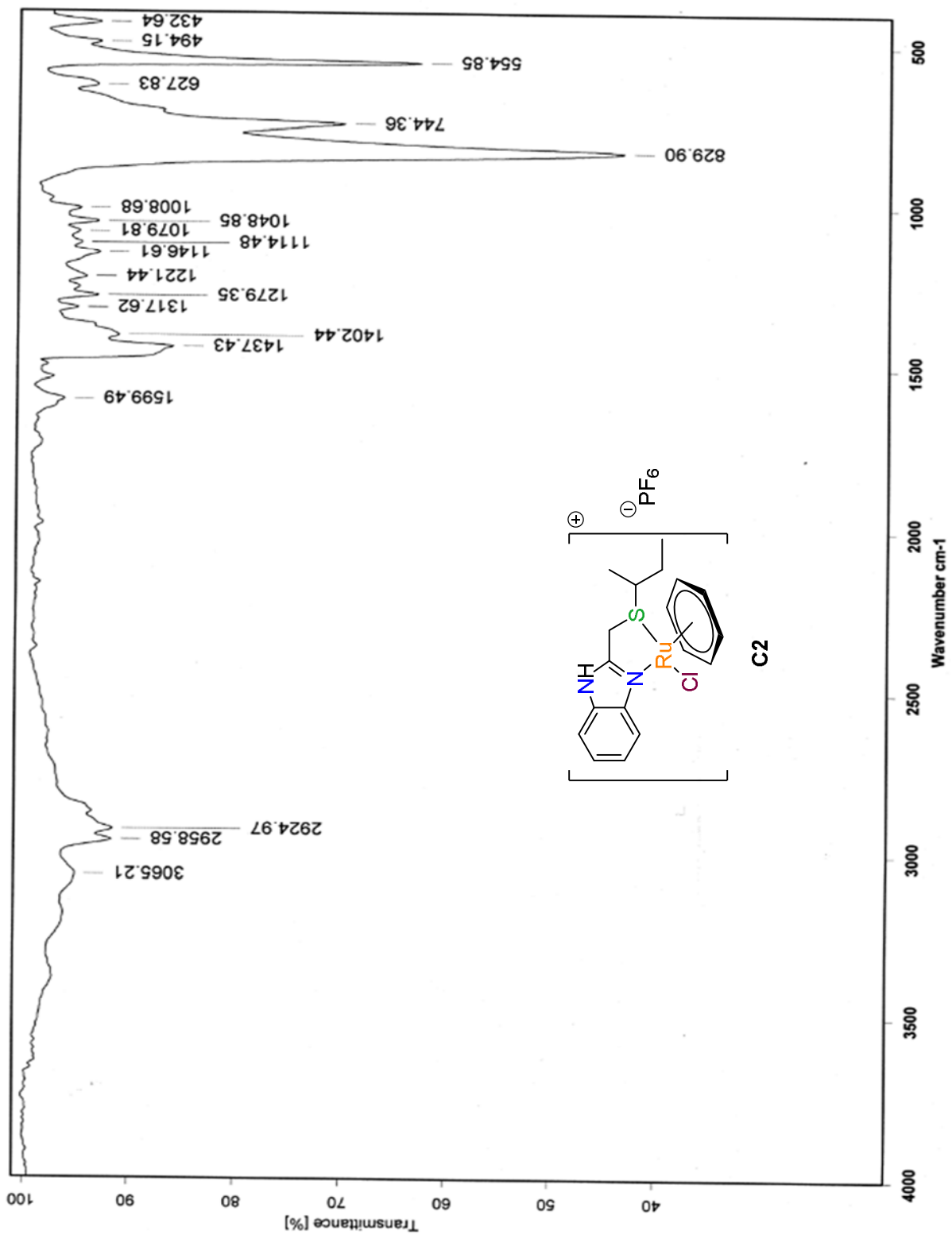


Figura 26. Espectro de IR del complejo **C2** obtenido en pastilla de KBr a t.a.

C3

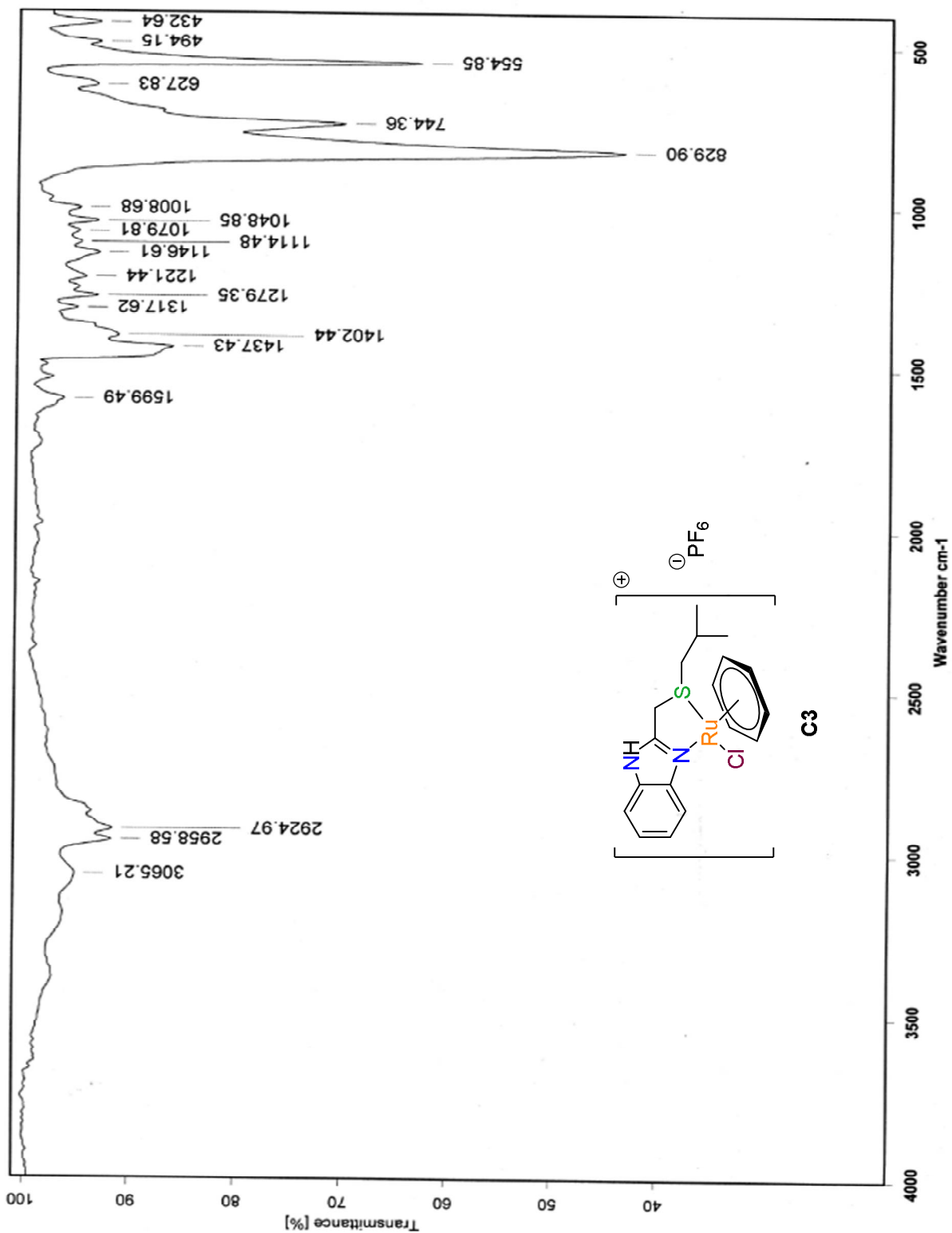


Figura 27. Espectro de IR del complejo **C3** obtenido en pastilla de KBr a t.a.

Resonancia Magnética Nuclear (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN)

Se efectuaron los experimentos de RMN para los compuestos derivados con Ru(II) (**C1-C3**) de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ los cuales nos brindarán información estructural sobre los compuestos obtenidos, así como para verificar la formación del compuesto de coordinación como es el caso del ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, los experimentos de $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nos brindarán información complementaria sobre la presencia del contraion PF_6 .

Siendo así se presentan como ejemplo los experimentos de ^1H -RMN obtenidos para el compuesto **C1**, en donde se identifican 8 señales esperadas y 6 señales adicionales asignables al DMSO- d_6 , agua propia del disolvente y metanol.

Para la serie de compuestos organometálicos se observa el protón del imidazol en el intervalo de δ 12.5-13.0 ppm, la formación del complejo disminuye la simetría del compuesto obtenido, por lo tanto las señales de los protones del anillo aromático se desplazan y se separan ligeramente en comparación de lo observado con los homólogos orgánicos, tal y como se observa en la Figura 30. Como dato relevante, se observa la señal de los protones del areno, lo cual nos brinda información sobre la formación del complejo, esta señal se ubica en el intervalo de δ 6.5-7.0 ppm.

Para el caso de los experimentos de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN se presenta el espectro del compuesto **C3** como ejemplo (Figura 31), se observan las señales del disolvente DMSO- d_6 y MeOH. Al igual que en el caso de los experimentos de protón se observa una señal para cada carbono de la parte aromática del bencimidazol debido a la disminución de la simetría debido a la formación del compuesto de organometálico.

Los experimentos de $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nos brindan información complementaria sobre la presencia del contraion $^-\text{PF}_6$, observándose en ambos un patrón característico para cada experimento. Para el caso del flúor se distinguen dos singuletes debido a la diferencia entre los átomos de flúor axiales y ecuatoriales; mientras que para el fósforo se evidencia un quintuplete debido al acoplamiento del fósforo con el flúor tal y como se observa en la Figura 28 y en la Figura 29.

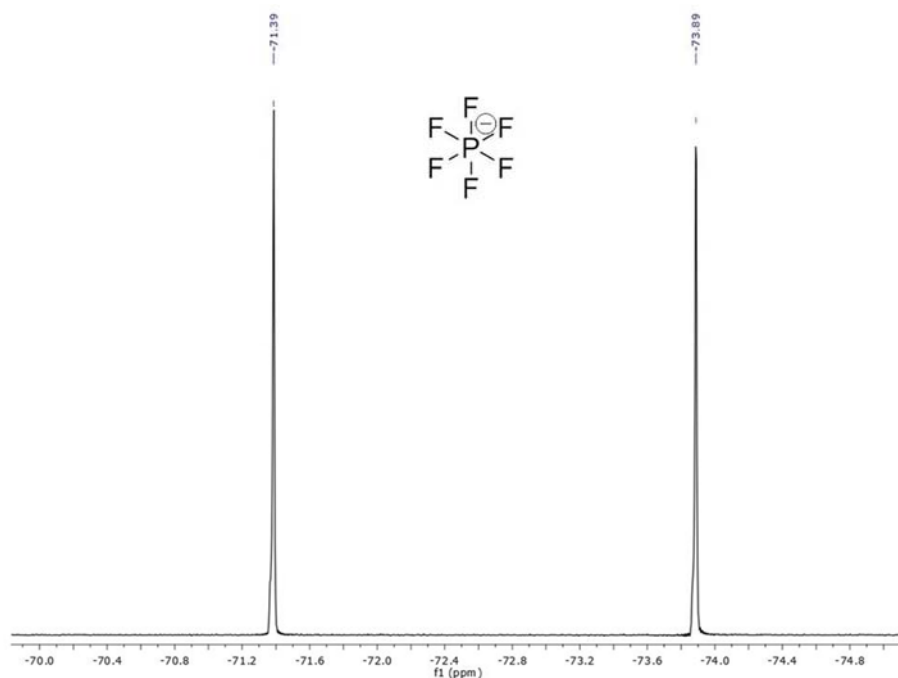


Figura 28. Espectro de $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -RMN corrido en $\text{DMSO-}d_6$ como disolvente a 300 MHz.

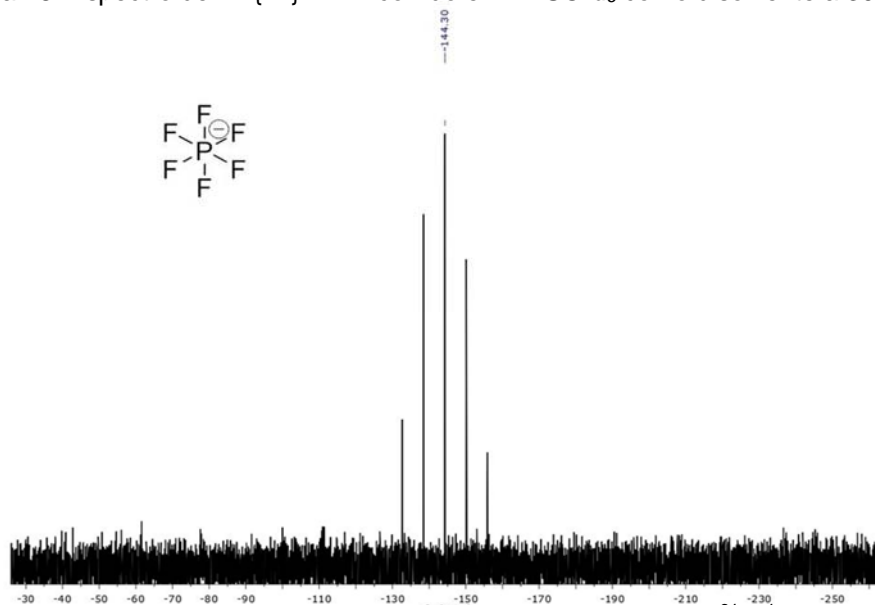


Figura 29. Patrón característico del espectro obtenido del experimento $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN para el $^-\text{PF}_6$ realizado en $\text{DMSO-}d_6$ a 300MHz.

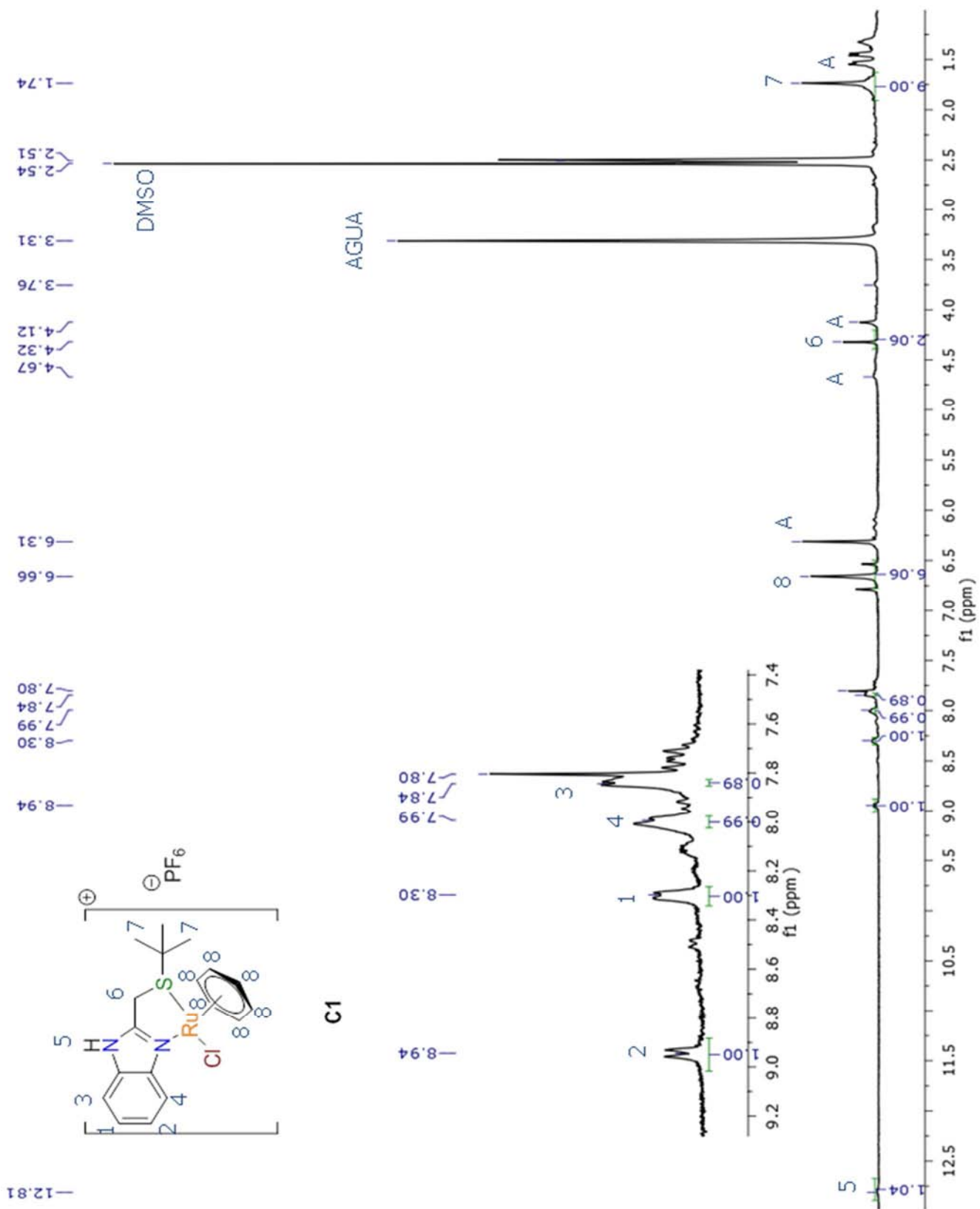


Figura 30. Espectro de resonancia de ¹H del complejo **C1** obtenido en DMSO-*d*₆ a 300 MHz.

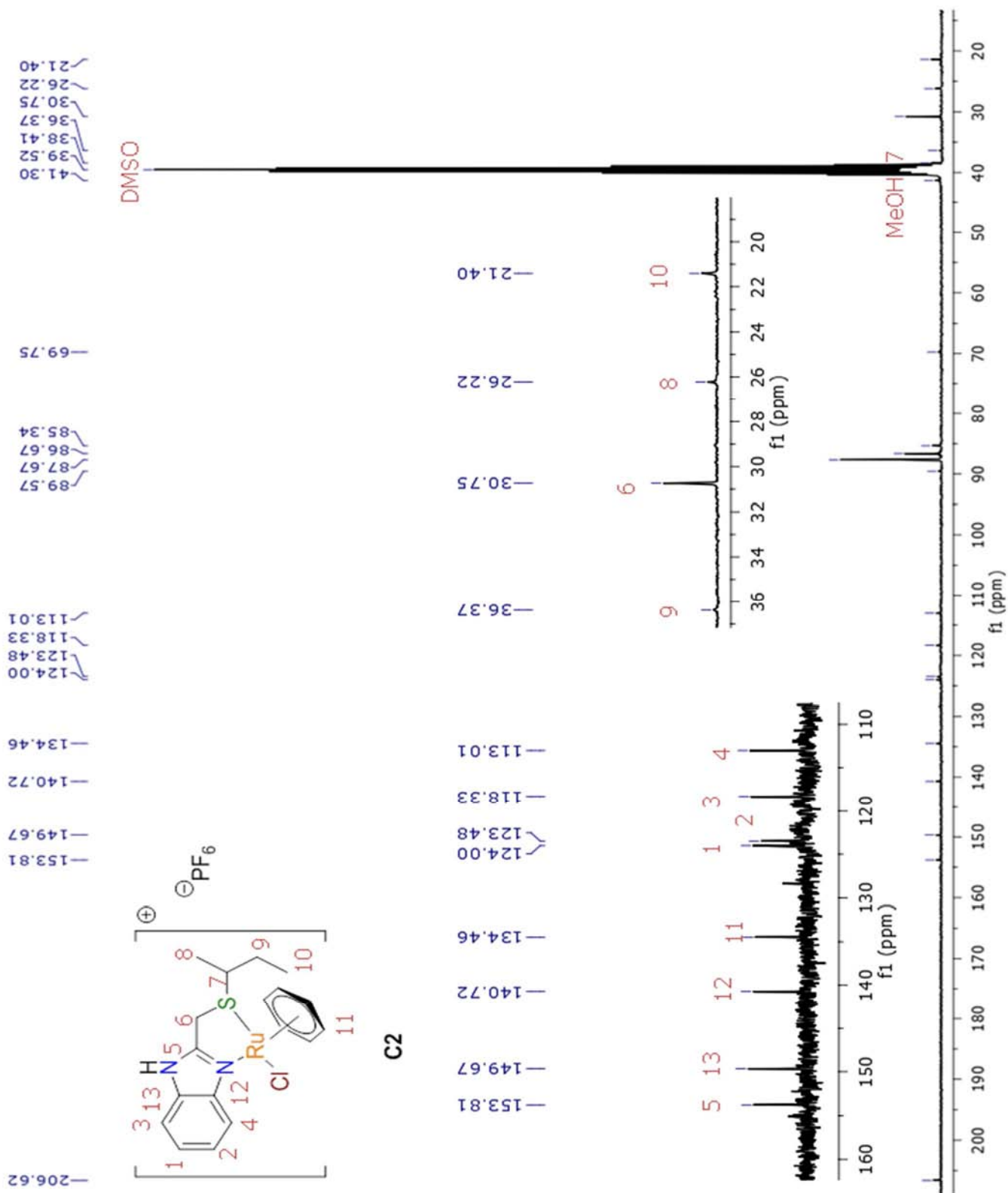


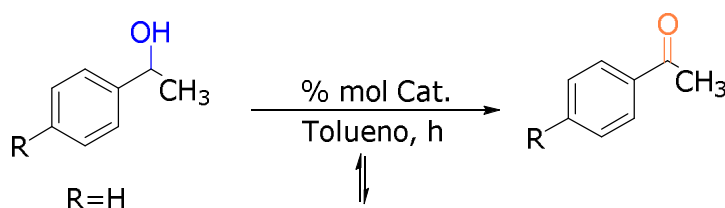
Figura 31. Espectro de resonancia de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto **C2** en DMSO- d_6 a 300 MHz.

VII. Evaluación catalítica

La evaluación de la actividad catalítica de los complejos se realizó estudiando dos reacciones; primero la oxidación de alcoholes α -metilbencílicos^{[20][21][25]}; y la segunda, hidrogenación de cetonas por transferencia de hidrógeno. Se evaluaron diferentes condiciones de reacción, tales como el tiempo, la carga de catalizador y el disolvente hasta encontrar las condiciones óptimas de reacción para dichas transformaciones.

Oxidación de alcoholes

Una vez sintetizados y caracterizados los compuestos obtenidos se procedió a evaluar la reacción de oxidación de alcoholes efectuando la reacción con el feniletanol (Esquema 10) el cual nos dará un panorama general del comportamiento de la reacción de catálisis. Se exploraron diferentes condiciones de reacción variando el porcentaje en mol del catalizador (1% o 1.25%) y el tiempo (24, 48 o 60 h) desafortunadamente bajo estas condiciones la reacción no procedió.

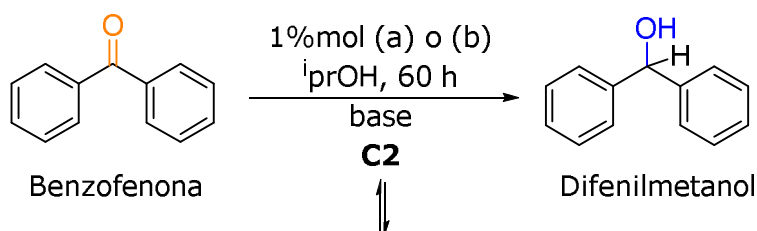


Esquema 10. Reacción general de catálisis para la oxidación de alcoholes α -metilbencílicos (feniletanol).

Para ésta reacción de catálisis se ensayó con todos los compuestos obtenidos (**-L1, L2, L3-blancos; C1, C2 y C3**) a diferentes tiempos 24, 48 y 60 h variando las cargas de catalizador en cada uno de los casos, sin haber reacción alguna. Por este motivo no se continuó evaluando con los diferentes sustratos (alcoholes α -metilbencílicos sustituidos) disponibles y se procedió a evaluar el potencial catalítico de los compuestos en la reacción de hidrogenación de cetonas.

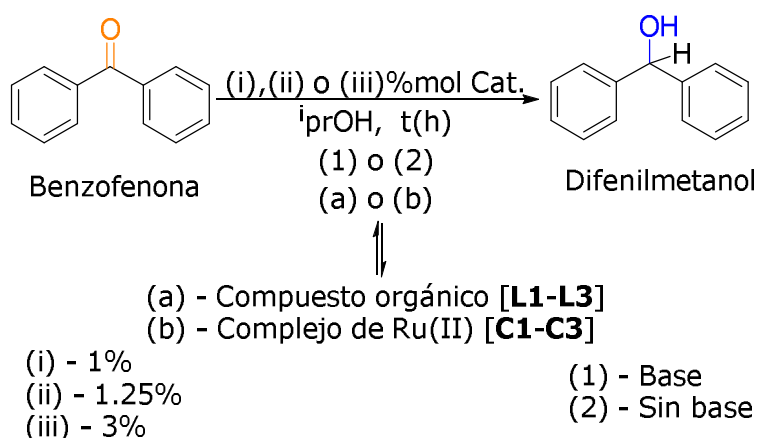
Hidrogenación de cetonas

Para llevar a cabo la reacción de hidrogenación de cetonas se probaron dos de los compuestos sintetizados anteriormente, el compuesto **L2** y el complejo **C2** nos ayudaran a visualizar si dicha reacción podría llevarse a cabo bajo estas condiciones de reacción. La reacción se siguió mediante cromatografía de gases acoplada a masas y también mediante ^1H -RMN esperando observar la formación del alcohol (difenilmetanol) mediante la aparición de la señal correspondiente al protón α al hidroxilo del alcohol de la acetofenona. Estas reacciones se efectuaron de acuerdo al Esquema 11:



Esquema 11. Reacción de hidrogenación de la benzofenona.

La reacción procedió con un porcentaje de conversión de aproximadamente 10% para el compuesto **C2**, con estos resultados se procedió a evaluar diferentes parámetros (Tabla 9) para encontrar las condiciones óptimas de la reacción (Esquema 12).



Esquema 12. Parámetros evaluados en la reacción catalítica de hidrogenación de la benzofenona.

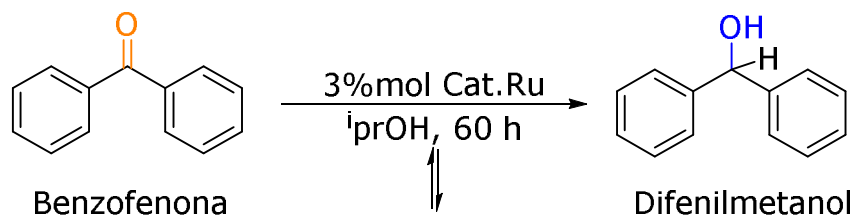
Tabla 9. Variación de parámetros en el estudio para la hidrogenación de cetonas, las reacciones se efectuaron en isopropanol como disolvente.

Compuesto	%mol[Cat]	t [h]	Base	Reacción
C₁₂H₁₂Cl₄Ru₂	1; 1.25; 3	60	Na ₂ CO ₃ /SB	SP
L1	1; 1.25	24/48	Na ₂ CO ₃	NP
L2	1; 1.25	24/48	Na ₂ CO ₃	NP
L3	1; 1.25	24/48	Na ₂ CO ₃	NP
C1	1; 1.25; 3	60	Na ₂ CO ₃ /SB	SP
C2	1; 1.25; 3	60	Na ₂ CO ₃ /SB	SP
C3	1; 1.25; 3	60	Na ₂ CO ₃ /SB	SP

SB: sin base; SP: si procedió; NP: No procedió

Resultados

Mediante los experimentos realizados se lograron encontrar las condiciones óptimas para la reacción de la hidrogenación de la benzofenona, de ésta manera se descartaron los compuestos **L1**, **L2** y **L3** ya que las pruebas catalíticas efectuadas con éstos compuestos evidenciaron un %de conversión de productos muy pobre (<2%) y se establecieron las condiciones de reacción que fueron las siguientes: carga de catalizador al 3%mol, 60 h de tiempo de reacción y utilizando isopropanol como disolvente (Esquema 13).



Esquema 13. Condiciones óptimas de reacción para la hidrogenación de la benzofenona.

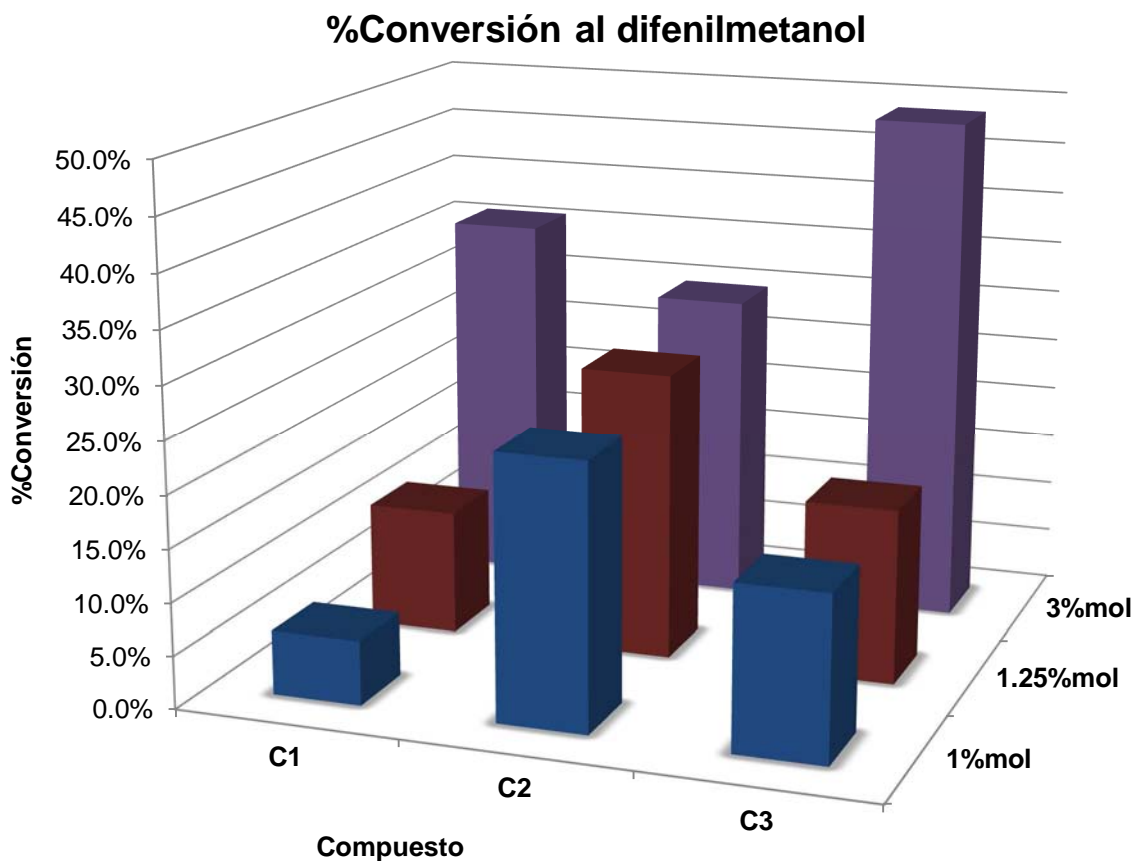
Habiendo efectuado las reacciones de hidrogenación de la benzofenona bajo las condiciones previamente descritas (Esquema 13), se obtuvieron los resultados

mostrados en la Tabla 10. Cabe mencionar que en las reacciones efectuadas se observaron subproductos de reacción los cuales no pudieron ser identificados, pero que dan indicios de que los compuestos evaluados bajo ciertas condiciones lograrían tener alta selectividad en este tipo de reacciones catalíticas.

Tabla 10. Resultados de las reacción de hidrogenación de la benzofenona a diferentes cargas de catalizador.

%Conversion al difenilmetanol			
Compuesto	1%mol	1.25%mol	3%mol
MPRu	15.70%	16.60%	39.50%
C1	6.10%	11.90%	35.80%
C2	25.00%	27.40%	29.70%
C3	15.50%	16.60%	48.70%
RuCl₃·nH₂O	No hubo Rx.		

60 h, sin base, iprOH; MPRu:C₁₂H₁₂Cl₄Ru₂



Gráfica 1. %de Conversión al difenilmetanol a diferentes cargas de catalizador para los compuestos C1, C2 y C3 en la reacción de hidrogenación de la benzofenona sin base en *i*prOH a 60 h.

Como se observa en el gráfico 1 y en la Tabla 10 los mejores porcentajes de conversión al alcohol de la benzofenona fueron desempeñados por los compuestos: **C2** utilizando 1% y 1.25%mol como carga de catalizador bajo las condiciones ya mencionadas y el compuesto **C3** en el caso de la catálisis al 3%mol.

Cabe resaltar que en todos los ensayos evaluados se observa una tendencia creciente en el porcentaje de conversión del producto principal al incrementar la carga del catalizador, obteniéndose el mayor porcentaje de conversión al difenilmetanol utilizando la máxima cantidad de catalizador (3%mol) para los tres compuestos sintetizados (**C1-C3**). Siendo así se puede considerar al complejo **C3**

como el mejor catalizador bajo las condiciones de reacción establecidas demostrando un rendimiento aceptable para la conversión del producto principal.

En la literatura está reportado^{[22][25][32][34][43]} que la reacción de hidrogenación de cetonas se pueden desarrollar adicionando diferentes bases al seno de reacción para favorecer la desprotonación del isopropanol e incrementar el porcentaje de conversión del alcohol deseado. Por esta razón, se realizaron dos ensayos adicionales para analizar la influencia que tiene sobre el porcentaje de conversión al difenilmetanol al adicionar alguna base en la reacción.

El estudio se desarrolló bajo las mismas condiciones de reacción detalladas en el Esquema 13 con el complejo **C3** utilizando al Na₂CO₃ como base al 10%mol, obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 11 y comparativamente en la Gráfica 2.

Tabla 11. Resultados obtenidos para la hidrogenación de la acetofenona evaluando el desempeño al adicionar o no Na₂CO₃ en la reacción con el compuesto **C3** como catalizador.

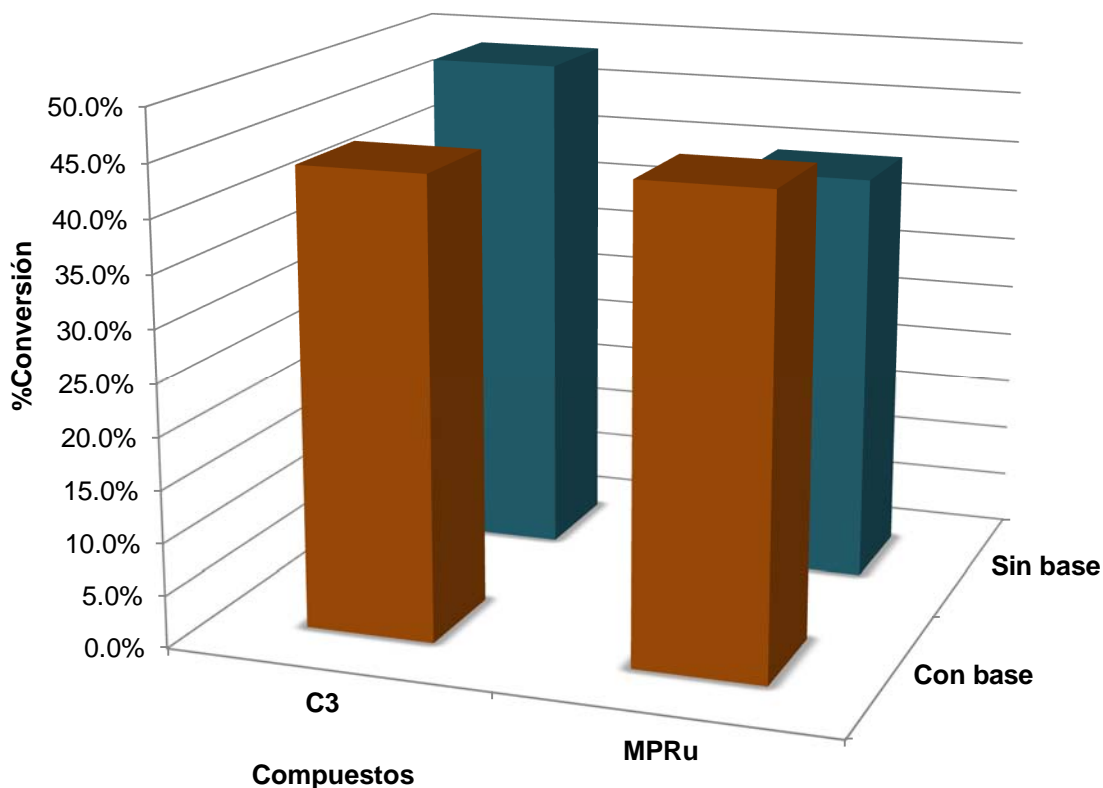
%Conversión 3%mol		
Compuesto	Con base	Sin base
C3	43.80%	48.70%
MPRu	44.60%	39.50%

RuCl₃·nH₂O

No hubo Rx.

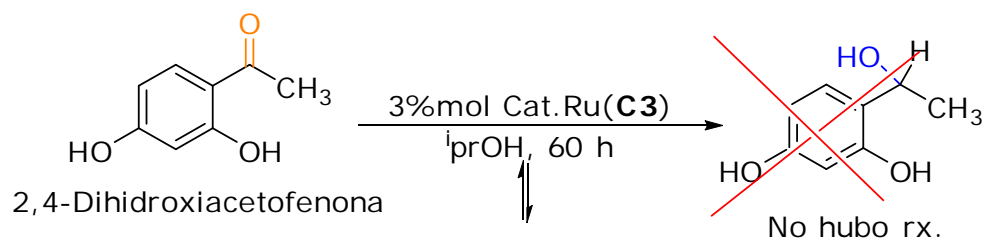
60 h, iprOH, MPRu:C₁₂H₁₂Cl₄Ru₂

Como se muestra en la Tabla 11 no existe una diferencia significativa entre el adicionar o no una base como el Na₂CO₃ como reactivo en la reacción de catálisis para modificar el porcentaje de conversión al alcohol de la acetofenona bajo las condiciones de trabajo utilizadas.



Gráfica 2. Porcentajes de conversión obtenidos para el compuesto **C3** en la reacción de hidrogenación de la acetofenona evaluando el desempeño con y sin base en el seno de reacción.

Considerando este hecho, se extendió la reacción de hidrogenación de cetonas para la 2,4-dihidroxiacetofenona bajo las mismas condiciones de reacción (Esquema 14), pero desafortunadamente la reacción no procedió, se sugiere que este fenómeno se deba a los sustituyentes $-OH$ presentes en el sustrato.



Esquema 14. Reacción general para la hidrogenación de la 2,4-dihidroxiacetofenona.

VIII. Evaluación biológica y citotóxica

Parte de este estudio se desarrolló hacia la investigación de la actividad biológica de nuevas especies orgánicas derivadas del bencimidazol (por sus propiedades como posibles fármacos) así como de nuevas especies de rutenio que presentan particular interés en la búsqueda de compuestos multifuncionales, útiles y de fácil acceso.

Es importante definir que un agente antimicrobiano es aquella sustancia que actúa en contra de algún microorganismo; dentro de esta extensa clasificación se encuentran los agentes antibióticos, antibacterianos, antifúngicos y antiparasitarios.

Dentro de los agentes antibacterianos, que son aquellas sustancias que matan o inhiben el crecimiento de microbios; *i.e.* bacterias, hongos o parásitos. Este tipo de agentes se pueden clasificar de acuerdo a su espectro de actividad, modo de acción y/o efecto que causa a la bacteria.

Se entiende como agente antifúngico aquella sustancia capaz de evitar o inhibir el crecimiento de algunos tipos de hongos llegando, incluso, a eliminarlos; ya que además de tener diversos beneficios hacia el ser humano también pueden originar una gran gama de efectos adversos hacia él.

Los agentes antifúngicos se clasifican según el sitio donde ataquen a los hongos patógenos; en este sentido, se asocia a las sustancias que contienen derivados imidazólicos debido a que atacan a la molécula de ergosterol el cual es el principal componente de la membrana celular de una gran cantidad de hongos dañinos.

Así mismo, quedó dicho (p. 20; Antecedentes) que una de las tendencias dentro de la investigación que se efectúa en esta época es la búsqueda de curas para las enfermedades del siglo XXI, como el cáncer. En este tenor, la quimioterapia es el uso de fármacos (agentes químicos) que aprovechan su capacidad citotóxica para eliminar, destruir o reducir el crecimiento de células cancerosas.

Por lo tanto, mucha de la investigación de nuevos agentes quimioterapéuticos está enfocada hacia la selectividad citotóxica como inductores de muerte celular.

Teniendo esto como precedente se desarrollaron los ensayos de evaluación de actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica para los ligantes obtenidos **L1**, **L2** y **L3**; así como para los correspondientes complejos **C1**, **C2** y **C3**.

Ensayos para la determinación de actividad antimicrobiana.

Los medios de cultivo sólidos y líquidos utilizados se describen a continuación (Tabla 12), así como la composición de dichos medios. Para el medio de cultivo sólido se adicionó 1.5% de agar a la composición descrita.

Tabla 12. Composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos.

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTES
Müller-Hinton Bacteria	Se disolvió en 1 L de agua destilada 2 g de sólidos de infusión de ternera, 17.5 g de caseína hidrolizada y 1.5 g de almidón.
YEP(D) Hongos	Se disolvió en 1 L de agua destilada 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, y 20 g de glucosa.

Se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad microbiana en cepas bacterianas y levadura, las bacterias se pueden diferenciar estructuralmente si tienen pared celular o no (Gram-positivas o Gram-negativas). Para tener un ensayo representativo se hicieron ensayos en dos cepas de cada grupo, así como en dos cepas de hongos con relevancia biotecnológica y en la salud.

Tabla 13. Microorganismos utilizados en pruebas de susceptibilidad.

Tipo de microorganismo	Nombre	Colección americana de tipos de cultivo
Bacteria Gram-negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cepa aislada en la Facultad de Química
Bacteria Gram-positiva	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
Hongo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028

Medios de cultivo

En 5 mL de medio líquido se inoculó una colonia del microorganismo y se dejó crecer a 37 °C ó 30 °C (37= *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, 30=los hongos y *B. subtilis*) toda la noche con agitación constante. Al día siguiente se midió la densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) y se diluyó el cultivo hasta tener una OD_{600nm} de 0.6. Llevó a cabo una siembra masiva con hisopos estériles en una caja Petri y se colocaron los discos previamente impregnados con las soluciones (15 µL) como se observa en la Figura 32 Cada cultivo sólido se incubó por 18-20 h a la temperatura de crecimiento óptimo de cada microorganismo. La manipulación de reactivos se llevó a cabo en zona estéril en campana de flujo laminar ESCO®.

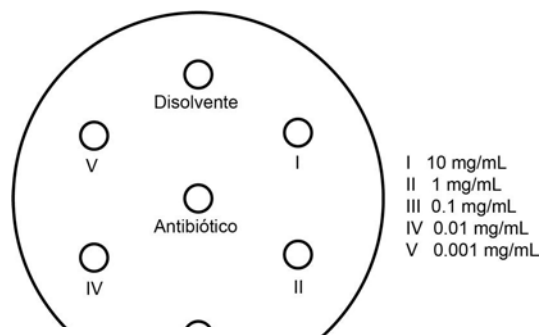


Figura 32. Diagrama de ensayos de susceptibilidad.

Pasado el tiempo se midió el halo de inhibición y se calculó el porcentaje de inhibición a partir de la siguiente ecuación:

$$\%I=A-B/C-D$$

Ecuación 1. Para determinar el porcentaje de inhibición.

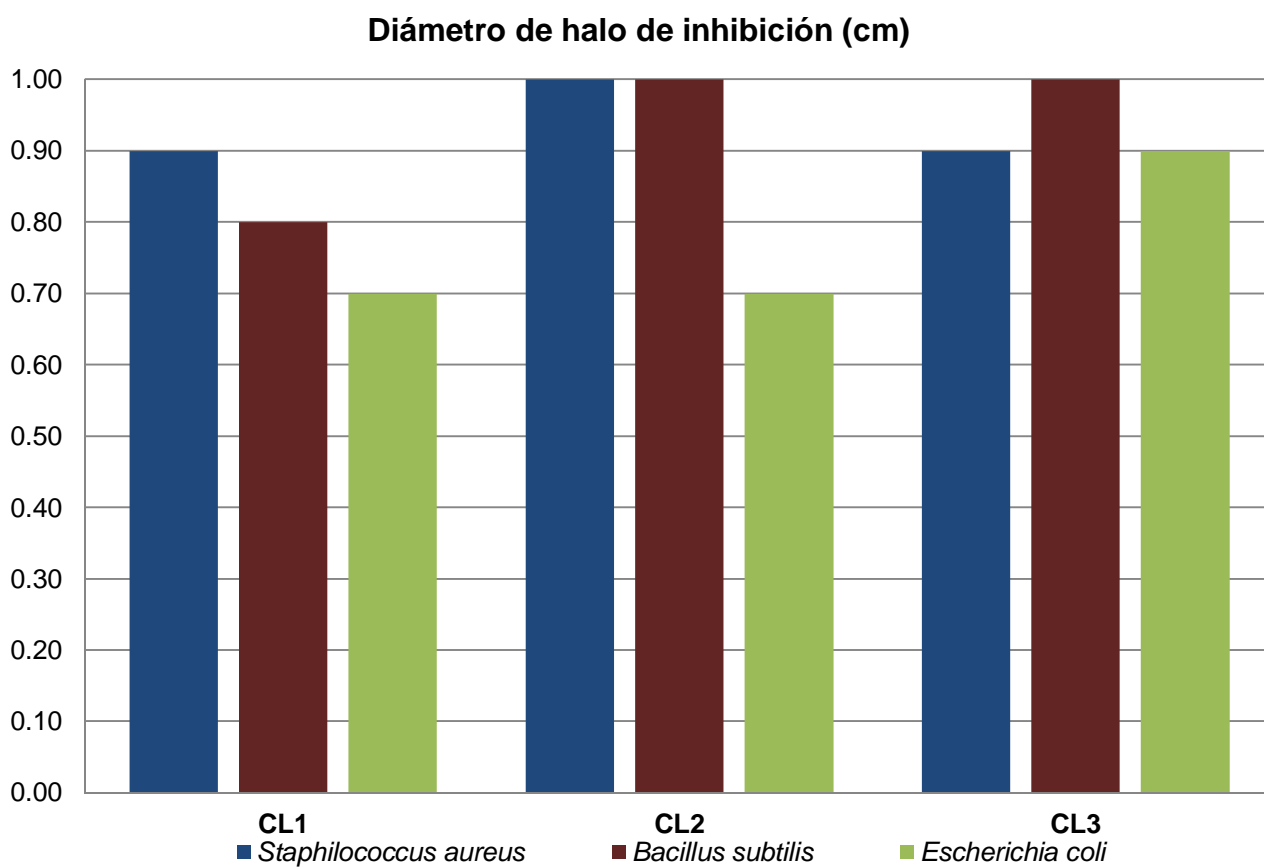
En donde, A y B son la longitud del diámetro del halo de inhibición de la muestra y su disolvente, mientras que C y D son la longitud del diámetro del halo de inhibición del antibiótico control y su disolvente.

Resultados

Todos los compuestos derivados de Ru(II) presentaron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (Gram-positiva) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) siendo posible realizar la comparación cuantitativa del diámetro del halo de inhibición de cada uno de ellos (Tabla 14 y Gráfica 3), así como de su porcentaje de inhibición (Tabla 15 y Gráfica 4) con respecto al antibiótico control utilizado para cada bacteria (Tabla 16). De ésta manera es posible inferir que la presencia del centro metálico coordinado a las especies orgánicas obtenidas potencializa el efecto antibacteriano.

Tabla 14. Diámetros de inhibición para los ligantes **L1**, **L2** y **L3** y complejos de Ru(II) **C1**, **C2** y **C3** a una concentración de 10 mg/mL.

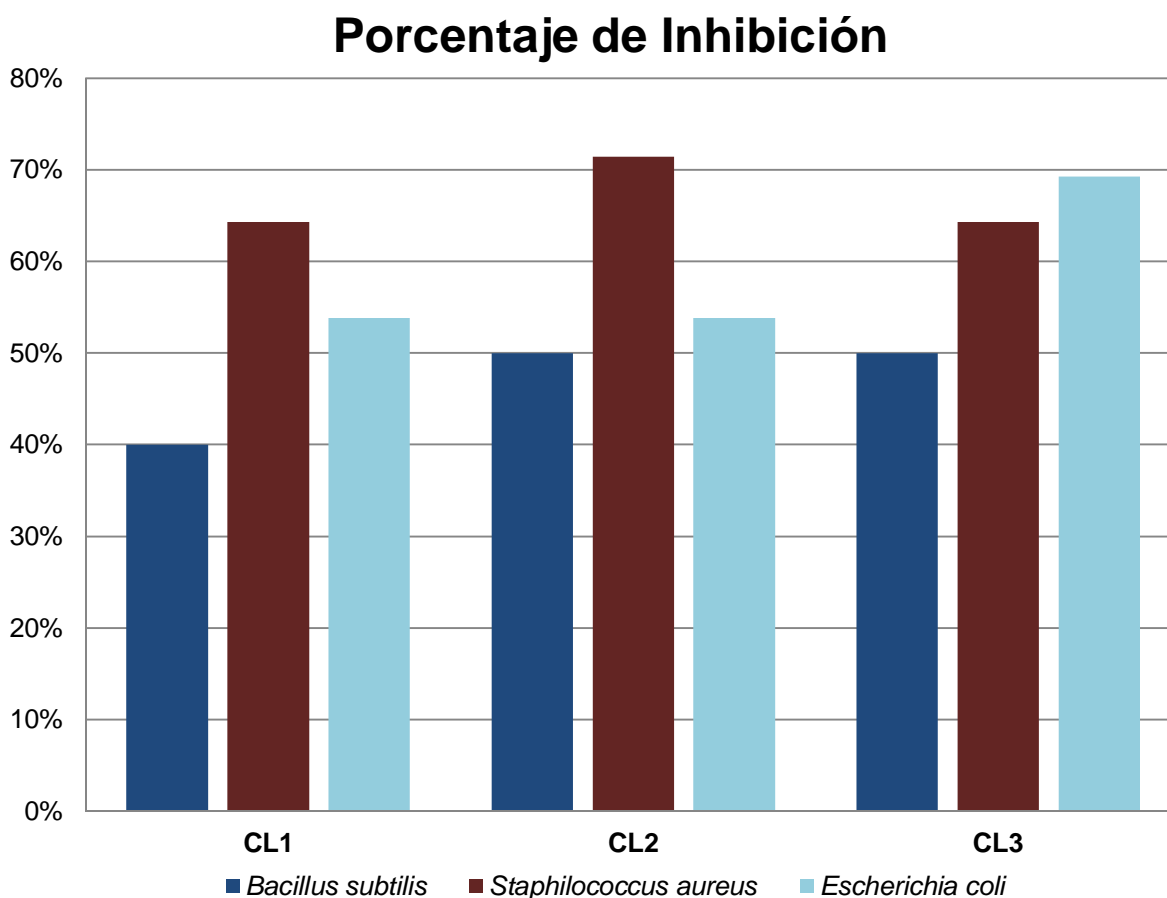
Compuesto	Concentración	DIÁMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN (cm)					
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Cepa aislada	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
				0.00	0.00	0	0
				0.80	0.00	0	0



Gráfica 3. Diámetro de halo de inhibición de los compuestos que presentaron actividad antibacterial en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición para los compuestos L1, L2, L3, C1, C2 y C3 a una concentración de 10 mg/mL.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN							
Compuesto	Concentración	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>
		ATCC 25922	Cepa aislada	ATCC 6633	ATCC 6538	ATCC 9763	ATCC 90028
L1	10 mg/mL	0	44.44%	0.00	0.00	0	0
L2	10 mg/mL	0	0.00	40.00%	0.00	0	0
L3	10 mg/mL	0	0.00	0.00	0.00	0	0
C1	10 mg/mL	53.85%	0.00	40.00%	64.29%	0	0
C2	10 mg/mL	53.85%	0.00	50.00%	71.43%	0	0
C3	10 mg/mL	69.23%	0.00	50.00%	64.29%	0	0

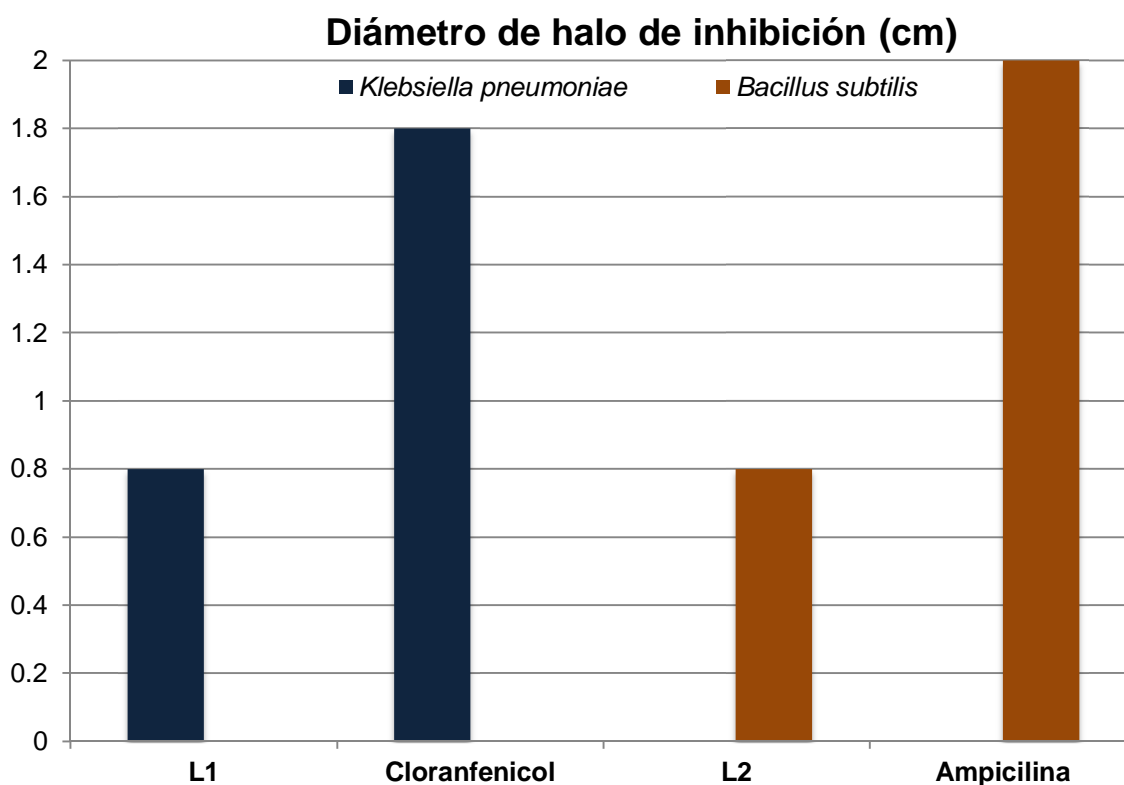


Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de los complejos de Ru(II) para las bacterias *E. Coli*, *B. Subtilis*, *S. aureus* (10 mg/mL).

Tabla 16. Concentración y diámetro de inhibición de los fármacos control utilizados.

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>
Antibióticos control	Ampicilina	Cloranfenicol	Ampicilina	Cloranfenicol	Fluconazol	Fluconazol
				5 mg/mL	10 mg/mL	1.0 mg/mL

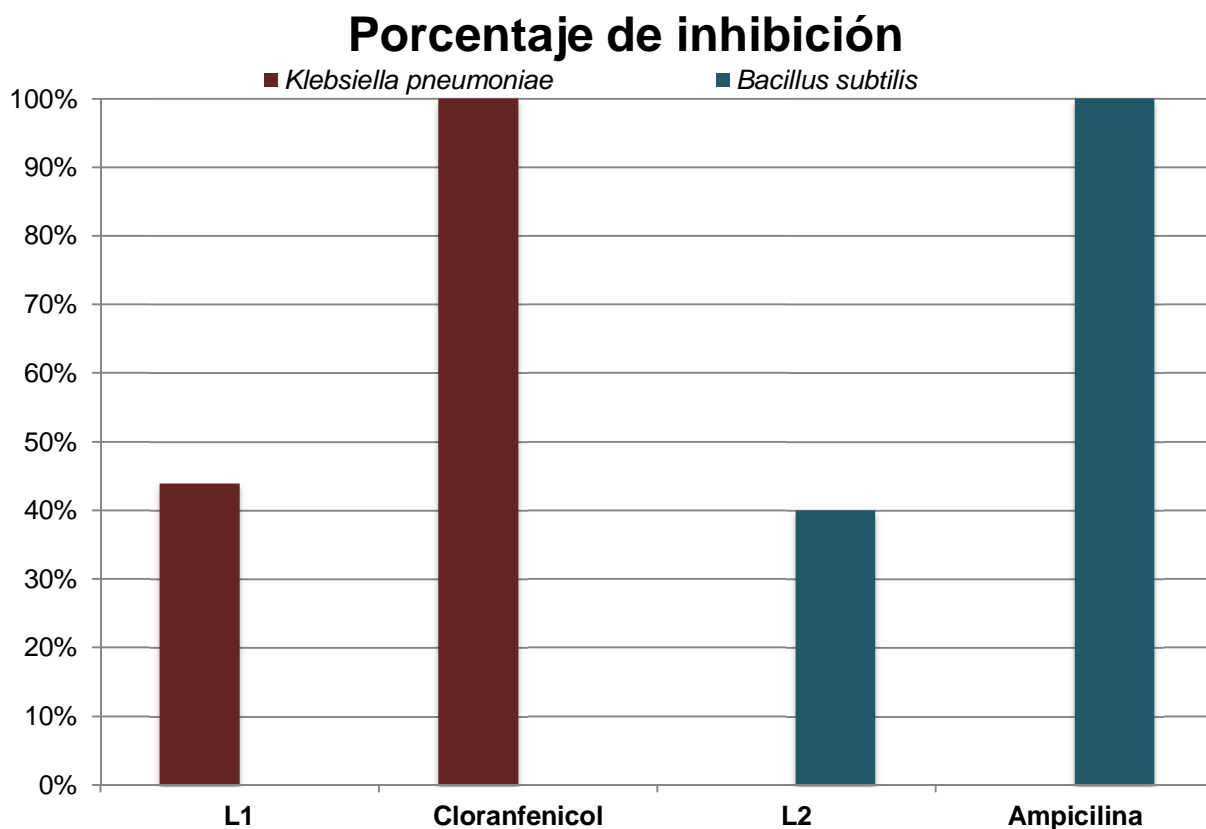
Los compuestos orgánicos **L1** y **L2** presentaron actividad antimicrobiana únicamente para *Klebsiella pneumoniae* (bacteria Gram-negativa) y para *Bacillus subtilis* (bacteria Gram-positiva) a una concentración de 10 mg/mL respectivamente, para hacer un análisis comparativo es necesario contrastar con el antibiótico control (Gráficas 5 y 6).



Gráfica 5. Diámetros de inhibición para los compuestos **L1** y **L2** en una concentración de 10 mg/mL respecto a su antibiótico control.

Los compuestos de Ru(II) presentaron actividad antibacteriana representativa considerada como específica contra bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* y

Staphilococcus aureus); a pesar de este hecho, el estudio se encuentra en etapa inicial ya que se efectuarán más pruebas con ellos para obtener información más específica sobre su potencial inhibitorio. Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos en la literatura^{[26][72][70][68][50]}.



Gráfica 6. Porcentajes de inhibición de los compuestos L1 y L2 (10 mg/mL) frente al fármaco control.

Pruebas citotóxicas

El ensayo que se utilizó para determinar el porcentaje de inhibición de los compuestos obtenidos se utiliza desde 1990 y fue creado por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América (NIC). Consta de hacer un ensayo colorimétrico de sulforodamina B en 60 líneas celulares subdivididas en paneles según los tejidos de donde estas fueron extraídas (leucemia [K562], pulmón [SKLU], colón [HCT-15], sistema nervioso central [U251], melanomas, ovario, riñón, próstata

[PC-3] y mama [MCF-7]) con 7 colorantes y teniendo como control al *cis*-platino se compararon, en dichos colorantes se partió del principio de que se unen electrostáticamente a macromoléculas de células fijadas (precipitadas) al sustrato plástico de micro pozos de placas de 96 pozos y variando el pH se permite la unión y disolución del complejo proteína-colorante. Los colorantes utilizados son aniónicos, la sulforodamina B (SRB), azul de bromofenol (BPB), cromotrope 2R (CTR) y naranja G (ORG), los cuales tiñen proteínas aniónicas con grupos sulfónicos y sulfhídricos bajo condiciones ácidas moderadas siendo que el complejo se solubiliza bajo condiciones básicas.

La evaluación citotóxica se efectuó para todos los compuestos sintetizados (**L1-C3**). Se realizó un screening primario, que consiste de una proyección general del porcentaje de inhibición del crecimiento celular a una concentración de 50 µM contra seis líneas de cáncer humano (S.N.C. [U251], próstata[PC-3], leucemia [K562], colón [HCT-15], mama [MCF-7], pulmón [SKLU-1]).

Resultados

Se presentan los resultados del screening primario obtenido para los compuestos sintetizados (**L1, L2, L3, C1, C2 y C3**) a continuación (Tabla 17) observándose una mayor inhibición en el compuesto **L2**, resaltando la inhibición (65.2%) que presenta para la línea celular de leucemia (K562). Además es importante resaltar que para cada pareja de compuestos (orgánicos y sus homólogos metalados) se nota un aumento o disminución en el porcentaje de inhibición respecto de los compuestos de Ru(II).

Para la glía del sistema nervioso central (U251) en la pareja de compuestos **L1/C1** se observa una disminución del potencial inhibitorio del compuesto orgánico respecto al metalado, así mismo se evidencia una disminución en la inhibición del crecimiento celular para las parejas de compuestos **L2 (24.5%)/C2 (14.5%) y L3 (27.2%)/C3 (no existió inhibición)**.

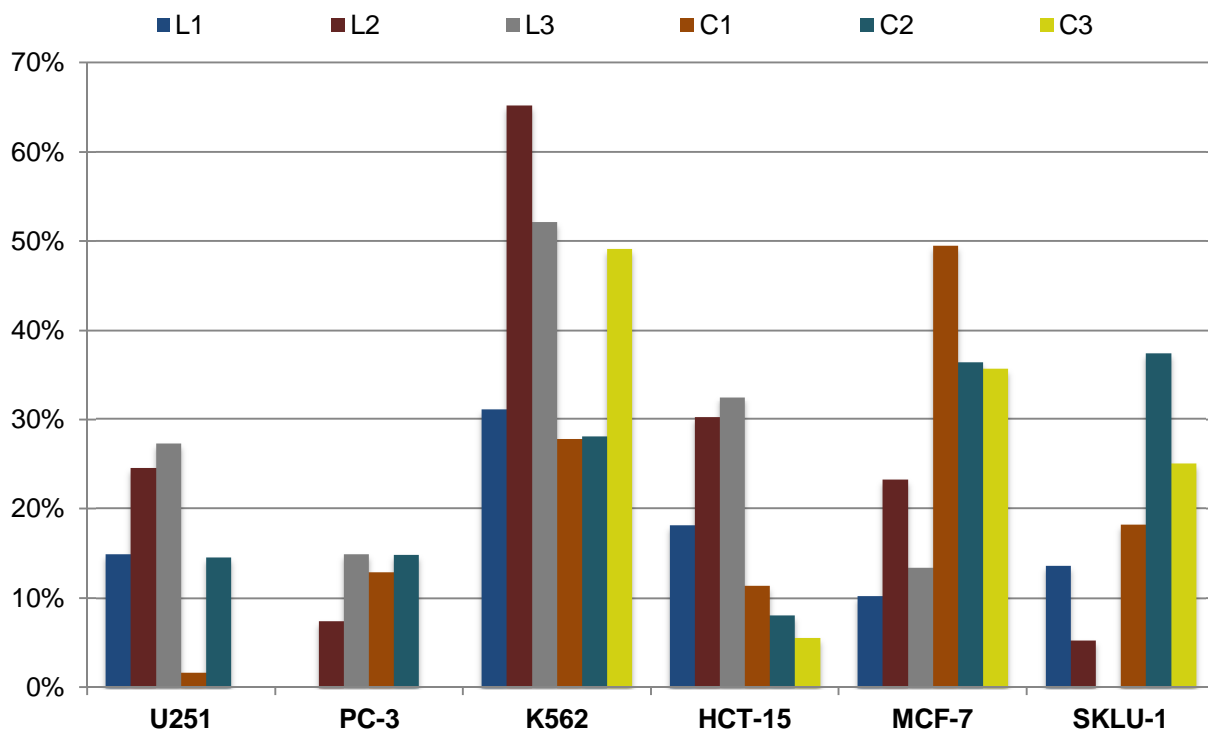
En el mismo caso se encontraron las líneas celulares cancerígenas de leucemia (K562) y colón (HCT-15); la línea K562 fue en donde se presentó la mayor inhibición de todos los compuestos obtenidos (Gráfica 7) en concordancia con lo reportado en la literatura para el fármaco NAMI-A que se encuentra en fase de pruebas clínicas.

Caso contrario se encontró para las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1) donde la coordinación del centro metálico (Ru(II)) potencializó la inhibición de la división celular como se esperaba.

Particularmente dentro de la línea celular de cáncer de próstata la pareja de compuestos **L3/C3** tuvieron un comportamiento contrario a la tendencia mostrada para este, ya que el compuesto orgánico (**L3**) presentó inhibición del crecimiento celular y el compuesto derivado de Ru(II) (**C3**) no presentó actividad inhibitoria.

Tabla 17. Screening primario de inhibición de los compuestos obtenidos (**L1**, **L2**, **L3**, **C1**, **C2** y **C3**) evaluados en distintas líneas celulares.

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
L1	14.9		31	18.1	10.2	13.6
L2	24.5	7.4	65.2	30.2	23.2	5.3
L3	27.2	14.9	52.1	32.5	13.4	
C1	1.7	12.9	27.7	11.4	49.5	18.2
C2	14.5	14.8	28	8.1	36.4	37.4
C3			49.1	5.6	35.7	25



Gráfica 7. Porcentajes de inhibición del screening primario en 6 líneas celulares de los ligantes (L1, L2 y L3) y los complejos de Ru(II) (C1, C2 y C3).

IX. Conclusiones

- ⊗ Se logró sintetizar 3 nuevos ligantes derivados del 2-(clorometil)bencimidazol e isómeros de mercaptanos alifáticos. (**L1-L3**)
- ⊗ Se logró obtener 3 nuevos complejos de Ru(II) con los ligantes previamente sintetizados. (**C1-C3**)
- ⊗ Fue posible la caracterización completa de todos los compuestos sintetizados mediante técnicas analíticas convencionales (IR, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN) y espectrometría de masas (*DART* y *FAB*⁺).
- ⊗ Los complejos de Ru(II) presentaron buena actividad catalítica en la reacción de hidrogenación de acetofenona, siendo el complejo **C3** el mejor catalizador bajo las condiciones de reacción establecidas experimentalmente.
- ⊗ Se evaluó la actividad biológica, antifúngica y antibacteriana; así como la actividad citotóxica para toda la serie de ligantes y complejos.
- ⊗ Los ligantes **L1** y **L2** presentaron la mejor actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram-positivas *K. Pneumoniae* y *B. Subtilis* respectivamente
- ⊗ Los tres complejos **C1**, **C2** y **C3** presentaron actividad antimicrobiana importante frente a bacterias Gram-positivas y *Escherichia coli*, lo cual los hacen buenos candidatos a estudios posteriores.
- ⊗ La actividad citotóxica de los compuestos sintetizados demostró una acción inhibitoria regular, presentando el mejor porcentaje de inhibición para la línea celular K562 (leucemia) en un screening primario para el ligante **L2**.

X. Referencias

- [1] Ahlford, K. (2011). *Asymmetric transfer hydrogenation of ketones*. Stockholm: Department of Organic Chemistry, Stockholm University.
- [2] Alagesan, M., Sathyadevi, P., Krishnamoorthy, P., Bhuvanesh, N., & Dharmaraj, N. (2014). DMSO containing ruthenium(ii) hydrazone complexes: in vitro evaluation of biomolecular interaction and anticancer activity. *Dalton Trans.*, 43(42), 15829-15840. <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt01032a>
- [3] Allardyce, C., & Dyson, P. (2001). Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platinum Metals Revision*, 45(2), 62-69.
- [4] Antonarakis, E., & Emadi, A. (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 66(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1293-1>
- [5] Bennett, M., & Smith, A. (1974). Arene ruthenium(II) complexes formed by dehydrogenation of cyclohexadienes with ruthenium(III) trichloride. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (2), 233. <http://dx.doi.org/10.1039/dt9740000233>
- [6] Bergamo, A., & Sava, G. (2011). Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Transactions*, 40(31), 7817. <http://dx.doi.org/10.1039/c0dt01816c>
- [7] Bergamo, A., Gaiddon, C., Schellens, J., Beijnen, J., & Sava, G. (2012). Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 106(1), 90-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030>
- [8] Bergamo, A., Masi, A., Jakupec, M., Keppler, B., & Sava, G. (2009). Inhibitory Effects of the Ruthenium Complex KP1019 in Models of Mammary Cancer Cell Migration and Invasion. *Metal-Based Drugs*, 2009, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/681270>
- [9] Bergamo, A., Messori, L., Piccioli, F., Cocchiello, M., & Sava, G. (2003). Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. *Invest New Drugs*, 21(4), 401-411.
- [10] Błaszczak-Świątkiewicz, K., Mirowski, M., Kaplińska, K., Kruszyński, R., Trzęsowska-Kruszyńska, A., & Mikiciuk-Olasik, E. (2012). New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity - study of their stability by RP-HPLC. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2), 279-280.
- [11] Borguet, Y., Zaragoza, G., Demonceau, A., & Delaude, L. (2015). Ruthenium catalysts bearing a benzimidazolylidene ligand for the metathetical ring-closure of tetrasubstituted cycloolefins. *Dalton Trans.*, 44(21), 9744-9755. <http://dx.doi.org/10.1039/c5dt00433k>
- [12] Camm, K., El-Sokkary, A., Gott, A., Stockley, P., Belyaeva, T., & McGowan, P. (2009). Synthesis, molecular structure and evaluation of new organometallic ruthenium anticancer agents. *Dalton Transactions*, (48), 10914. <http://dx.doi.org/10.1039/b918902e>
- [13] Carrión, M., Sepúlveda, F., Jalón, F., Manzano, B., & Rodríguez, A. (2009). Base-Free Transfer Hydrogenation of Ketones Using Arene Ruthenium (II) Complexes. *Organometallics*, 28(13), 3822-3833. <http://dx.doi.org/10.1021/om9001268>
- [14] Carrión, M., Sepúlveda, F., Jalón, F., Manzano, B., & Rodríguez, A. (2012). Areneruthenium(II) Complexes Containing Bispyrazolylmethane Ligands: Effect of the Ligand Substituents on the Formation of an Isomer and on the Fluxional Behaviour. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 20(2), 217-227. <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201200884>
- [15] Castigli, E., Sciacaluga, M., Schiavoni, G., Brozzi, F., Fabiani, R., Gorello, P., & Gianfranceschi, G. (2006). GL15 and U251 glioblastoma-derived human cell lines are peculiarly susceptible to induction of mitotic death by very low concentrations of okadaic acid. *Oncology Reports*. <http://dx.doi.org/10.3892/or.15.2.463>

- [16] Chinnappadu, B., Chandra, S., Prasanna, V., Veeranjanyulu, P., & Sumanth, M. (2014). Synthesis and evaluation of 2-substituted benzimidazoles. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 3(10), 1538-1549.
- [17] Clarke, M. (1997). Ruthenium in Biology: DNA Interactions. *Inorganic, Organometallic, And Biological Applications*, 349-365. <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1997-0253.ch021>
- [18] Das Adhikary, S., Samanta, T., Roymahapatra, G., Loiseau, F., Jouvenot, D., & Giri, S. (2010). Synthesis, structure and electrochemical behaviour of Ru(II)- and Pt(II)-carbene complexes of the NCN-pincer 1,3-bis(2-pyridylmethyl)-1H-benzimidazolium chloride. *New J. Chem.*, 34(9), 1974. <http://dx.doi.org/10.1039/b9nj00698b>
- [19] Das, D., & Mondal, P. (2015). Interaction of ruthenium(II) antitumor complexes with d(ATATAT) 2 and d(GCGCGC) 2 : a theoretical study. *New J. Chem.*, 39(4), 2515-2522. <http://dx.doi.org/10.1039/c4nj02118e>
- [20] Delgado-Rebollo, M., Canseco-Gonzalez, D., Hollering, M., Mueller-Bunz, H., & Albrecht, M. (2014). Synthesis and catalytic alcohol oxidation and ketone transfer hydrogenation activity of donor-functionalized mesoionic triazolylidene ruthenium(II) complexes. *Dalton Trans.*, 43(11), 4462-4473. <http://dx.doi.org/10.1039/c3dt53052c>
- [21] Drouin, S., Amoroso, D., Yap, G., & Fogg, D. (2002). Multifunctional Ruthenium Catalysts: A Novel Borohydride-Stabilized Polyhydride Complex Containing the Basic, Chelating Diphosphine 1,4-Bis(dicyclohexylphosphino)butane and Its Application to Hydrogenation and Murai Catalysis. *Organometallics*, 21(6), 1042-1049. <http://dx.doi.org/10.1021/om010745t>
- [22] Du, W., Wang, Q., Wang, L., & Yu, Z. (2014). Ruthenium Complex Catalysts Supported by a Bis(trifluoromethyl)pyrazolyl-Pyridyl-Based NNN Ligand for Transfer Hydrogenation of Ketones. *Organometallics*, 33(4), 974-982. <http://dx.doi.org/10.1021/om401144u>
- [23] Enumula, S., Pangal, A., Gazge, M., Shaikh, J., & Ahmed, K. (2014). Diverse pharmacological aspects of benzimidazole derivatives: A review. *Research Journal Of Chemical Sciences*, 4(4), 78-88.
- [24] Farrington, K. (1964). The syntheses of compounds related to 2-thienylmethyl 2-(2-imidazolyl) sulphide. *Aust. J. Chem.*, 17(2), 230. <http://dx.doi.org/10.1071/ch9640230>
- [25] Fernández, F., Puerta, M., & Valerga, P. (2011). Half-Sandwich Ruthenium(II) Picoyl-NHC Complexes: Synthesis, Characterization, and Catalytic Activity in Transfer Hydrogenation Reactions. *Organometallics*, 30(21), 5793-5802. <http://dx.doi.org/10.1021/om200665f>
- [26] Frasca, D., Ciampa, J., Emerson, J., Umans, R., & Clarke, M. (1996). Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in hela cells. *Metal-Based Drugs*, 3(4), 197-209.
- [27] Fulmer, G., Miller, A., Sherden, N., Gottlieb, H., Nudelman, A., & Stoltz, B. (2010). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*, 29(9), 2176-2179. <http://dx.doi.org/10.1021/om100106e>
- [28] Gorle, A., Ammit, A., Wallace, L., Keene, F., & Collins, J. (2014). Multinuclear ruthenium(II) complexes as anticancer agents. *New J. Chem.*, 38(9), 4049-4059. <http://dx.doi.org/10.1039/c4nj00545g>
- [29] Gürbüz, N., Özcan, E., Özdemir, İ., Çetinkaya, B., Şahin, O., & Büyükgüngör, O. (2012). Preparation of a series of Ru(II) complexes with N-heterocyclic carbeneligands for the catalytic transfer hydrogenation of aromatic ketones. *Dalton Trans.*, 41(8), 2330-2339. <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt11203a>
- [30] Hackenberg, F., & Tacke, M. (2014). Benzyl-substituted metalcarbene antibiotics and anticancer drugs. *Dalton Transactions*, 43(22), 8144. <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt00624k>
- [31] Han, Y., Luo, Q., Hao, X., Li, X., Wang, F., & Hu, W. (2011). Reactions of an organoruthenium anticancer complex with 2-mercaptobenzanilide—a model for the active-site cysteine of protein tyrosine phosphatase 1B. *Dalton Transactions*, 40(43), 11519. <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt11189b>

- [32] Hsu, S., & Plietker, B. (2014). Selective Transfer Hydrogenation and Hydrogenation of Ketones Using a Defined Monofunctional (P^N(Bn)^N(Bn)^P)-Ru II Complex. *Chemistry - A European Journal*, 20(15), 4242-4245. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201304770>
- [33] Khokra, S., & Choudhary, D. (2011). Benzimidazole an important scaffold in drug discovery. *Asian Journal Of Biochemical And Pharmaceutical Research*, 1(3), 476-486.
- [34] Klučiar, M., Grela, K., & Mauduit, M. (2013). Ruthenium-based complexes containing a benzimidazolium tag covalently connected to N-heterocyclic carbene ligands: environmentally friendly catalysts for olefin metathesis transformations. *Dalton Transactions*, 42(20), 7354. <http://dx.doi.org/10.1039/c2dt32856a>
- [35] Komiya, S., & Hirano, M. (2003). Bond activation by low valent ruthenium complexes. *Dalton Transactions*, (8), 1439-1453. <http://dx.doi.org/10.1039/b300601h>
- [36] Kumar, P., Singh, A., Pandey, R., Li, P., Singh, S., Xu, Q., & Pandey, D. (2010). Synthesis, characterization and reactivity of arene ruthenium compounds based on 2,2'-dipyridylamine and di-2-pyridylbenzylamine and their applications in catalytic hydrogen transfer of ketones. *Journal Of Organometallic Chemistry*, 695(19-20), 2205-2212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.06.003>
- [37] Lai, H., Zhao, Z., Li, L., Zheng, W., & Chen, T. (2015). Antiangiogenic ruthenium(II) benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. *Metallomics*, 7(3), 439-447. <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00312h>
- [38] Levina, A., Mitra, A., & Lay, P. (2009). Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*, 1(6), 458. <http://dx.doi.org/10.1039/b904071d>
- [39] Li, F., Collins, J., & Keene, F. (2015). Ruthenium complexes as antimicrobial agents. *Chem. Soc. Rev.*, 44(8), 2529-2542. <http://dx.doi.org/10.1039/c4cs00343h>
- [40] Li, K., Niu, J., Yang, M., Li, Z., Wu, L., Hao, X., & Song, M. (2015). New Type of 2,6-Bis(imidazo[1,2- a]pyridin-2-yl)pyridine-Based Ruthenium Complexes: Active Catalysts for Transfer Hydrogenation of Ketones. *Organometallics*, 34(7), 1170-1176. <http://dx.doi.org/10.1021/om501119x>
- [41] Li, L., Wong, Y., Chen, T., Fan, C., & Zheng, W. (2012). Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. *Dalton Trans.*, 41(4), 1138-1141. <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt11950h>
- [42] Mangiapia, G., Vitiello, G., Irace, C., Santamaria, R., Colonna, A., & Angelico, R. (2013). Anticancer Cationic Ruthenium Nanovectors: From Rational Molecular Design to Cellular Uptake and Bioactivity. *Biomacromolecules*, 14(8), 2549-2560. <http://dx.doi.org/10.1021/bm400104b>
- [43] Manzini, S., Blanco, C., & Nolan, S. (2012). Ruthenium Phenylindenyl Complex as an Efficient Transfer Hydrogenation Catalyst. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 354(16), 3036-3044. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201200411>
- [44] Molina, P., Tárraga, A., & Otón, F. (2012). Imidazole derivatives: A comprehensive survey of their recognition properties. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(9), 1711. <http://dx.doi.org/10.1039/c2ob06808g>
- [45] Mothes, E., Sentets, S., Luquin, M., Mathieu, R., Lugan, N., & Lavigne, G. (2008). New Insight into the Reactivity of Pyridine-Functionalized Phosphine Complexes of Ruthenium(II) with Respect to Olefin Metathesis and Transfer Hydrogenation. *Organometallics*, 27(6), 1193-1206. <http://dx.doi.org/10.1021/om7012106>
- [46] Motswainyana, W., & Ajibade, P. (2015). Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. *Advances In Chemistry*, 2015, 1-21. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/859730>
- [47] Muthukumar, M., Viswanathamurthi, P., & Karvembu, R. (2010). Studies on Ruthenium(III) Chalconate Complexes Containing PPh₃/AsPh₃. *Phosphorus, Sulfur, And Silicon And The Related Elements*, 185(11), 2201-2211. <http://dx.doi.org/10.1080/10426500903486706>

- [48] Ogweno, A., Ojwach, S., & Akerman, M. (2014). (Pyridyl)benzoazole ruthenium(II) and ruthenium(III) complexes: role of heteroatom and ancillary phosphine ligand in the transfer hydrogenation of ketones. *Dalton Trans.*, 43(3), 1228-1237. <http://dx.doi.org/10.1039/c3dt51599k>
- [49] Osorio Yañez, R. (2015). *Síntesis y caracterización de ligantes derivados de 2-(clorometil)benzimidazol y tioles clorados. Estudio de su actividad biológica y de reactividad frente a Ru(II)*. (Maestría en ciencias químicas.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- [50] Page, S. (2012). Ruthenium compounds as anticancer agents. *Education In Chemistry*, 26-29.
- [51] Pillozzi, S., Gasparoli, L., Stefanini, M., Ristori, M., D'Amico, M., & Alessio, E. (2014). NAMI-A is highly cytotoxic toward leukaemia cell lines: evidence of inhibition of KCa 3.1 channels. *Dalton Transactions*, 43(32), 12150. <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt01356e>
- [52] Poyatos, M., McNamara, W., Incarvito, C., Clot, E., Peris, E., & Crabtree, R. (2008). A Weak Donor, Planar Chelating Bitriazole N-Heterocyclic Carbene Ligand for Ruthenium(II), Palladium(II), and Rhodium. *Organometallics*, 27(9), 2128-2136. <http://dx.doi.org/10.1021/om800021c>
- [53] Požgan, F., Toupet, L., & Dixneuf, P. (2011). Preparation of hexacoordinating benzimidazole containing ligand and hexakis(benzimidazole–ruthenium(II)) complex. Molecular structure of $C_6\{CH_2-(N-benzimidazole-RuCl_2(p-cymene))\}_6$. *Dalton Transactions*, 40(25), 6619. <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt10316d>
- [54] Pretsch, E., Bühlmann, P., & Affolter, C. (2000). *Structure determination of organic compounds*. Berlin: Springer.
- [55] Rehman, M., Imran, M., Arif, M., & Farooq, M. (2013). Mannich base derivatives of benzimidazole: synthesis & antimicrobial properties- A short review. *Worlds Applied Programming*, 3(12), 558-564.
- [56] Renfrew, A. (2014). Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics*, 6(8), 1324-1335. <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00069b>
- [57] Saleem, F., Rao, G., Kumar, A., Mukherjee, G., & Singh, A. (2013). Half-Sandwich Ruthenium(II) Complexes of Click Generated 1,2,3-Triazole Based Organosulfur/-selenium Ligands: Structural and Donor Site Dependent Catalytic Oxidation and Transfer Hydrogenation Aspects. *Organometallics*, 32(13), 3595-3603. <http://dx.doi.org/10.1021/om400057e>
- [58] Saleem, F., Rao, G., Kumar, S., Singh, M., & Singh, A. (2015). Complexes of (η^6 -benzene)ruthenium(II) with 1,4-bis(phenylthio/seleno-methyl)-1,2,3-triazoles: synthesis, structure and applications in catalytic activation of oxidation and transfer hydrogenation. *Dalton Trans.*, 44(44), 19141-19152. <http://dx.doi.org/10.1039/c5dt02926k>
- [59] Sandoval, C., Ohkuma, T., Muñoz, K., & Noyori, R. (2003). Mechanism of Asymmetric Hydrogenation of Ketones Catalyzed by BINAP/1,2-Diamine–Ruthenium(II) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(44), 13490-13503. <http://dx.doi.org/10.1021/ja030272c>
- [60] Silverstein, R., & Webster, F. (1998). *Spectrometric identification of organic compounds*. New York: Wiley.
- [61] Singh, P., & Singh, A. (2010). Transfer Hydrogenation of Ketones and Catalytic Oxidation of Alcohols with Half-Sandwich Complexes of Ruthenium(II) Designed Using Benzene and Tridentate (S, N, E) Type Ligands (E = S, Se, Te). *Organometallics*, 29(23), 6433-6442. <http://dx.doi.org/10.1021/om100807b>
- [62] Singh, S., & Pandey, D. (2014). Multifaceted half-sandwich arene–ruthenium complexes: interactions with biomolecules, photoactivation, and multinuclearity approach. *RSC Adv.*, 4(4), 1819-1840. <http://dx.doi.org/10.1039/c3ra44131h>
- [63] Smith, G., & Therrien, B. (2011). Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton Transactions*, 40(41), 10793. <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt11007a>

- [64] Straub, B. (2007). Ligand Influence on Metathesis Activity of Ruthenium Carbene Catalysts: A DFT Study. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(1-2), 204-214. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200600465>
- [65] Süss-Fink, G. (2010). Areneruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.*, 39(7), 1673-1688. <http://dx.doi.org/10.1039/b916860p>
- [66] Tateyama, K., Wada, K., Miura, H., Hosokawa, S., Abe, R., & Inoue, M. (2016). Dehydrogenative synthesis of benzimidazoles under mild conditions with supported iridium catalysts. *Catal. Sci. Technol.*, 6(6), 1677-1684. <http://dx.doi.org/10.1039/c5cy01601k>
- [67] Therrien, B. (2015). Biologically relevant arene ruthenium metalla-assemblies. *Crystengcomm*, 17(3), 484-491. <http://dx.doi.org/10.1039/c4ce02146k>
- [68] Trondl, R., Heffeter, P., Kowol, C., Jakupec, M., Berger, W., & Keppler, B. (2014). NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci.*, 5(8), 2925-2932. <http://dx.doi.org/10.1039/c3sc53243g>
- [69] Walia, R., Hedaitullah, M., Naaz, S., Iqbal, K., & Lamba, H. (2011). Benzimidazole derivatives-an overview. *International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry*, 1(3), 565-574.
- [70] Wang, H., Zhang, S., Wang, S., Lu, J., Wu, W., & Weng, L. (2009). REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: The potential of its RNAi for synergistic therapy. *Neuro-Oncology*, 11(6), 790-802. <http://dx.doi.org/10.1215/15228517-2009-015>
- [71] Xiaoming, X., Haga, M., Matsumura-Inoue, T., Ru, Y., Addison, A., & Kano, K. (1993). Synthesis and proton transfer-linked redox tuning of ruthenium(II) complexes with tridentate 2,6-bis(benzimidazol-2-yl)pyridine ligands. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (16), 2477. <http://dx.doi.org/10.1039/dt9930002477>
- [72] Yellol, G., Donaire, A., Yellol, J., Vasylyeva, V., Janiak, C., & Ruiz, J. (2013). On the antitumor properties of novel cyclometalated benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) complexes. *Chemical Communications*, 49(98), 11533. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cc46239k>

XI. Anexos

AI. Sección Experimental

1.1 Material y Reactivos

El 2-(clorometil)bencimidazol, los tres isómeros del butanotiol (2-metilpropano-2-tiol, butano-2-tiol y 2-metilpropano-1-tiol), el 1,3-ciclohexadieno, el tricloruro de rutenio, la benzofenona, el hexafluoro fosfato de potasio y el bicarbonato de sodio utilizados se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich. Todos los disolventes utilizados fueron de grado reactivo marca J.T. Baker. Los disolventes deuterados utilizados en los experimentos de RMN fueron también obtenidos de Sigma-Aldrich.

Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas empacadas con gel de sílice Merck-60 malla 230-400 nm; mientras que las cromatografías en capa fina se llevaron a cabo con cromatofolios comerciales de gel de sílice 60 Macherey-Nagel con nombre de DC-Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/U utilizando lámpara de luz UV para su revelado.

1.2 Instrumentación

Se utilizó una balanza analítica OHAUS modelo EXPLORER PRO de precisión de 0.0001 g y para evaporar los disolventes se utilizó un rotavapor BÜCHI R-144 con un baño de agua BÜCHI B480.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ y $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ se efectuaron en un equipo BRUKER AVANCE III 300 utilizando disolventes deuterados como referencia interna. Los espectros de masas FAB^+ se realizaron mediante la técnica de ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB^+) (Xenon a 3 keV) en un espectrofotómetro Jeol JMS-SX102A en voltaje de 10 kV. Los espectros de DART (Direct Analysis on Real Time) un Jeol AccuTOF JMS T100LC

con un detector ion sense *DART*. La espectroscopia infrarroja se llevó a cabo en un equipo Brüker Alpha-p ATR.

1.3 Procedimiento general de reacción de síntesis de sales de plomo. [Pb(SR)₂]

Se pesaron 5 g (15.4 mmol) de acetato de plomo, los cuales se disolvieron en 250 mL de agua destilada, a esta disolución se le adicionaron 2.5 g (27.8 mmol) del tiol correspondiente en 5 mL de metanol. Se observa instantáneamente la formación de un precipitado color amarillo que corresponde al producto deseado, se procedió a filtrar el precipitado pasadas 24 h de reacción a temperatura ambiente.

Durante el proceso de filtración se hacen tres lavados con 5 mL de agua destilada cada uno. Se filtró y seco *in vacuo* el producto obtenido durante 24 h.

1.4 Procedimiento general de reacción de síntesis de ligantes

Se disolvieron 100 mg (0.6 mmol) de 2-clorometilbencimidazol en 35 mL de 1,2-dicloroetano previamente secado con Na₂SO₄, desgasificado y reservado bajo atmósfera inerte, se le adicionaron 115.7 mg (0.3 mmol) de la sal de plomo del tiol correspondiente. La disolución resultante se dejó bajo reflujo durante 24 h y atmósfera inerte, se observó la formación de un precipitado blanco correspondiente al PbCl₂ así como también se aclara la disolución de la mezcla de reacción.

La mezcla de reacción se filtró a través de una cama de celita, la disolución resultante se evaporó al alto vacío y se procedió a purificar mediante cromatografía en columna (Hex:AcOEt; 1:1).

1. 5 Procedimiento general de reacción de síntesis de complejos

A una disolución de 35 mg (0.16 mmol) del ligante correspondiente en 35 mL de metanol se le adicionaron 42 mg (0.08 mmol) de la materia prima de rutenio $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ y 29 mg (0.16 mmol) de hexafluorofosfato de potasio dejándose reaccionar bajo agitación magnética durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró bajo celita y se evaporó en rotavapor; el sólido obtenido se reservó.

1.6 Procedimiento de síntesis de $\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$

A una disolución de 2 g (9.7 mmol) de tricloruro de rutenio en 60 mL de MeOH y 5 mL de agua se le adicionaron 5.42 g (0.067 mmol) de 1,3-ciclohexadieno. La mezcla resultante se calentó a reflujo suave por 4 h al cabo de las cuales se observó la precipitación del producto. Se filtró con vacío el precipitado color vino y se efectuaron 3 lavados con 5 mL de metanol cada uno. Se secó *in vacuo* por 12 h.

1.7 Evaluación catalítica

En un matraz Schlenk de 50 mL se adicionaron 52.37 mg (0.29 mmol) de benzofenona en 15 mL de isopropanol y se agregaron 5 mg (0.023 mmol; 3% mol) de catalizador; en el caso de las catálisis básica se utilizó la base Na_2CO_3 adicionando ≈ 10 mg (10%mol), se dejó dicha mezcla de reacción durante 60 h. Al finalizar el tiempo de reacción se tomó una alícuota de 1.5 mL de la disolución, se filtró mediante una cama de celita y se mandó la disolución obtenida directamente a cromatografía de líquidos.

1.8. Evaluación citotóxica

1.8.1 Procedimiento de ensayo sulforodamina B (SRB).

Las líneas celulares que se utilizan en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química, pertenecen al panel del NCI, las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina. A estas líneas se les caracterizó al tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se deposita en cada uno de los micropozos, como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Tiempos de duplicación, concentración y órganos de origen de las líneas celulares de ensayo.

Línea celular	Órgano de origen	Tiempo duplicación (hrs)	Células/pozo	Concentración TCA (%)
K562	CML	19	5,000	50
HCT-15	colón	18.1	10,000	50
MCF-7	mama	25.6	5,000	50
PC-3	próstata	28.7	7,500	50
U251	S N C	25.4	7,500	50
SKLU	pulmon	25.4	7500	50

(TCA: ácido tricloroacético, CML: leucemia mieloblástica crónica, SNC:sistema nervioso central)

Con excepción de la línea K562, las líneas restantes se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adiciona 1 mL de 0.05% de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprenden del sustrato plástico, se les adiciona de 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión son depositadas en tubos cónicos y centrifugadas por 3 min, ya formado el paquete celular se le agrega medio de cultivo para resuspender éstas. De la suspensión se toma una alícuota y se agrega azul de tripano, para contar la población de células viables y ajusta la densidad del inóculo. Determinando el número de células por mililitro, se hacen los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100 μ L/pozo a la densidad ya antes mencionada. Cada placa es inoculada con dos líneas celulares por triplicado y es preincubada por 24 h a 37 °C con una atmósfera

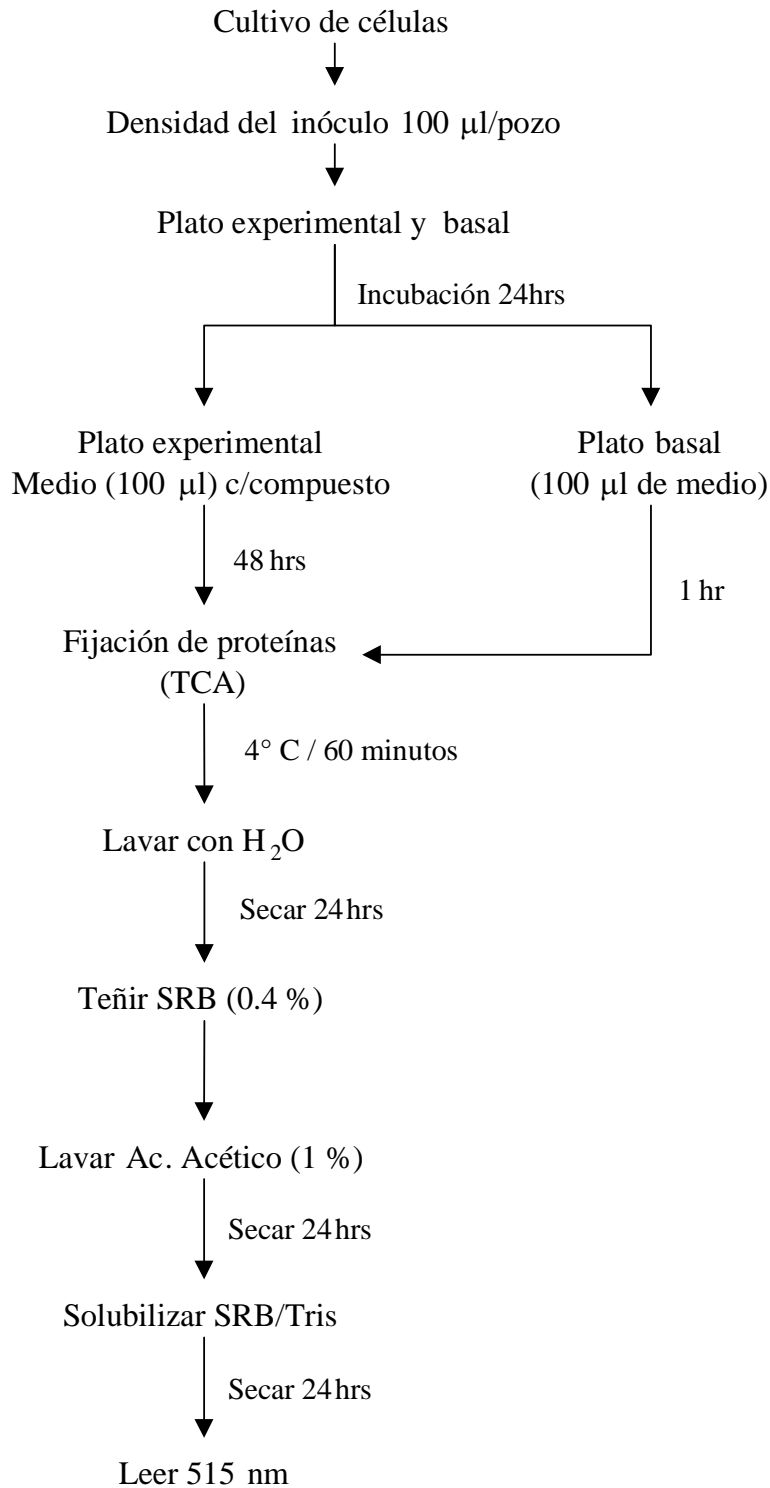
de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de éstos antes de adicionar las sustancias a probar. Para un crecimiento primario (screening) de un compuesto puro se prueba la concentración más alta permitida 50 µM, y para el caso de extractos vegetales se emplea la concentración de 50 µg/mL. Todas las muestras son solubilizadas en dimetil sulfóxido (DMSO) o agua 100 veces más concentradas que la concentración a probar. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución y en el caso de realizar curvas concentración-respuesta (5 diluciones se prueban) se agregan 100 µL, siendo el volumen final del pozo de 200 µL. Nuevamente la microplaca es incubada por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas son precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 µL de una solución de TCA frío al 50% e incubadas a 4 °C por 60 min. Se desecha el sobrenadante y las placas son lavadas 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, es con 100 µL de una solución al 0.4% de SRB e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida por 3 lavados con ácido acético al 1% y se dejan secar al ambiente. Las placas teñidas se les agrega 100 µL de un búffer de tris y se agitan por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación se mide la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas (Synergy/Biotek) a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesan obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO_t), los 3 pozos tratados con DMSO (DO_c) y 2 pozos de testigos, es decir aquellos que no tiene células pero si compuesto (DO_b). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\%IC = (DO_t - DO_b / DO_c - DO_b) 100$$

Ecuación 2. Para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento en las líneas celulares.

1.8.2 Diagrama de bioensayo para las pruebas de citotoxicidad



Los experimentos de evaluación citotóxica se llevaron a cabo en el laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM por técnicos especializados. Las líneas celulares utilizadas fueron:

- U251= Glía de Sistema Nervioso Central
- PC-3= Próstata
- K562= Leucemia
- HCT-15= Colón
- MCF-7= Mama
- SKLU= Pulmón

La evaluación de la inhibición de la división de células –citotoxicidad- de diferentes tipos de cáncer humano se realiza de acuerdo a los protocolos descritos por el Instituto Nacional de Cáncer de E.U.A.

Luis Enrique López Robledo
México, Ciudad Universitaria
Abril, 2016