



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Síntesis, Caracterización y Evaluación Citotóxica de Complejos NHC de Ir(I)
Derivados de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[d]imidazol”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. ARTURO TRINIDAD SÁNCHEZ MORA

TUTOR:

Dr. David Morales Morales

Instituto de química, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX. Noviembre de 2019.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**“Síntesis, Caracterización y Evaluación Citotóxica de Complejos NHC de Ir(I)
Derivados de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. ARTURO TRINIDAD SÁNCHEZ MORA



Ciudad de México, Noviembre de 2019.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Norberto Farfán García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Guadalupe López Cortés	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Vojtech Jancik	Instituto de Química, UNAM CCIQS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación 3 del departamento de Química Inorgánica, en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, C.P. 04510, México.

PARTICIPACIONES:

Este trabajo ha sido presentado en dos congresos, y un artículo ha sido publicado. A continuación, se muestran los detalles:

- II Congreso de Química de Caribe (febrero de 2019, comunicación oral).
- IX Encuentro de Química Inorgánica (junio de 2019, póster).
- **Sánchez-Mora, A.**; Valdés, H.; Ramírez-Apan, M. T.; Nieto-Camacho, A.; Hernández-Ortega, S.; Canseco-González, D.; Morales-Morales, D. NHC-Ir(III) Complexes Derived from 5,6-Dinitrobenzimidazole. Synthesis, Characterization and Preliminary Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. *Inorganica Chim. Acta* 2019, 496, 119061. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119061>.

ASESOR DEL TEMA: Dr. David Morales Morales

SUSTENTANTE: Q.F.B. Arturo Trinidad Sánchez Mora

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:



Al equipo técnico académico del instituto de química: Dra. Beatriz Quiroz García, M. en C. Lucía del Carmen Marqués Alonso, M. en C. Lucero Rios Ruiz, Q. María de la Paz Orta Pérez, I.Q. Luis Velasco Ibarra, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, Dra. María del Carmen García González, Dr. Rubén Alfredo Toscano, M. en C. Simón Hernández Ortega, M. en C. Antonio Nieto Camacho y M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan. Por su apoyo en la caracterización y pruebas biológicas de los compuestos.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto (CONACYT A1-S-33933) y la beca de maestría otorgada (No. de becario: **629466**; CVU: **848539**).



A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el financiamiento de proyecto a través del programa PAPIIT IN207317.



A la Coordinación General de Estudios de Posgrado por el apoyo para la asistencia a un congreso a través de programa PAEP-2019.



Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca de titulación otorgada.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

A la mismísima Universidad Nacional Autónoma de México, porque a través de sus académicos, investigadores, trabajadores e instalaciones forma profesionistas de alta calidad.

Al Estimado Dr. David Morales, por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por el apoyo brindado a lo largo del desarrollo de este proyecto de investigación, muchas gracias.

A los apreciables miembros del jurado, Dra. Lena Ruiz, Dra. Noráh Yolanda Barba, Dr. José Norberto Farfán, Dr. José Guadalupe López y Dr. Vojtech Jancik, por el tiempo e interés dedicado a la revisión del manuscrito y por sus acertadas recomendaciones, gracias.

A mi mamá Martha Sánchez, abuelita Elsa Mora y primos: Moisés, Ana, Elsa y Jesús. Sin duda alguna parte de mis logros son fruto del apoyo que incondicionalmente me otorgan con sus consejos, valores, experiencias, y motivación constante, pero más que nada, por su amor, gracias desde lo más profundo de mi corazón.

A mi novia Paola Contreras por toda la confianza que me has brindado, por los momentos que hemos compartido, por tus consejos tan positivos, pero sobre todo por tu amor y cariño, infinitas gracias.

A mis amigas las científicas, Vane Cortés y Ángeles Ramírez. Gracias por su apoyo, amistad, cariño, pláticas tan divertidas, consejos y visitas a lugares, gracias.

A mis amigos Robert, Adán, Alberto, Nelly, Gloria, Miriam, Erick, y demás. Aprecio mucho su valiosa amistad, gracias por todos los buenos momentos que hemos vivido.

A los posdocs Dr. Hugo Valdés y Dr. Ernesto Rufino, por todos sus consejos, asesorías y apoyos. Asimismo, a todo el grupo de trabajo del Laboratorio 3 de Química Inorgánica del Instituto de Química por crear un increíble lugar para trabajar.

En general, a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en mi formación personal y/o profesional, gracias.

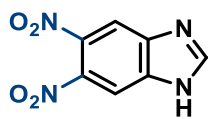
TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	7
LISTA DE COMPUESTOS	8
I. RESUMEN.....	9
II. INTRODUCCIÓN	11
III. ANTECEDENTES.....	12
a) Cáncer	12
b) Ligantes Carbeno <i>N</i> -Heterocíclico (NHC).....	18
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
a) Síntesis y caracterización de los compuestos.....	30
b) Análisis cristalográfico de los complejos	42
c) Análisis de las propiedades electrónicas de los ligantes.	56
d) Actividad citotóxica de los compuestos.	58
e) Actividad Antioxidante <i>in vivo</i> de los complejos mediante TBARS	60
VII. CONCLUSIONES.....	63
VIII. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	64
a) Síntesis y caracterización de los compuestos.....	64
b) Evaluación Citotóxica.....	69
c) Actividad Antioxidante <i>in vivo</i> (TBARS)	70
IX. REFERENCIAS	72
ANEXO I. ESPECTROS DE RMN.....	81
ANEXO II. ESPECTROS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	97
ANEXO III. ESPECTROS DE I.R.....	106
ANEXO IV. CONSTANCIAS DE LAS PARTICIPACIONES.	108
ANEXO V. ARTÍCULO PUBLICADO	109

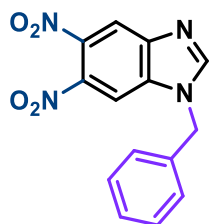
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C	Grado(s) Celsius
μM	Micromolar
1,2-DCE	1,2-dicloroetano
¹³ C{ ¹ H} RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 desacoplado de Hidrógeno 1
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno 1
Å	Angstrom(s)
A.E.	Análisis Elemental
Ar	Arilo
BHT	Butil hidroxitolueno
Blm	Benzimidazol
CCF	Cromatografía en capa fina
COD	1,5-ciclooctadieno
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.M.	Espectrometría de masas
eq.	Equivalente(s) molar(es)
ESI ⁺ -IT	Ionización mediante ElectroSpray, analizador trampa de iones
FAB ⁺	Ionización mediante el Bombardeo con Átomos Rápidos
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos en EUA
FT-IR	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
I.E. ⁺	Ionización mediante Impacto electrónico positivo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz, analizador tiempo de vuelo
mg	Miligramo(s)
MHz	Megahertz
mL	Mililitro(s)
mmol	mmol(es)
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NHC	Carbena(s) <i>N</i> -heterocíclico(s)
nmol	Nanomol(es)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.f.	Punto de fusión
R.f.	Factor de retención
ROS	Especie(s) reactiva(s) de oxígeno
TBARS	Especie(s) reactiva(s) al ácido 2-tiobarbitúrico
TEP	Parámetro electrónico de Tolman
$\bar{\nu}(CO)$	Frecuencia vibracional promedio de las bandas de los carbonilos
ρ _{cal}	Densidad calculada

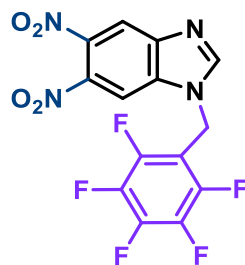
LISTA DE COMPUESTOS



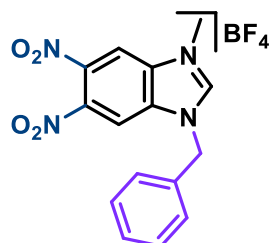
1



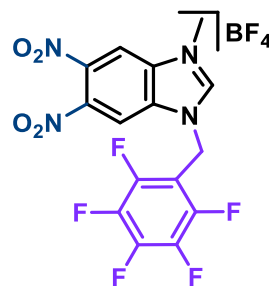
2a



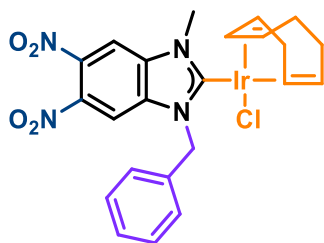
2b



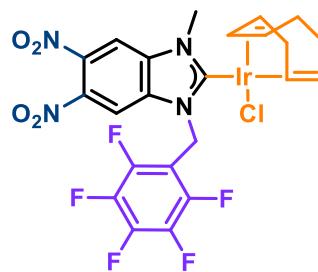
3a



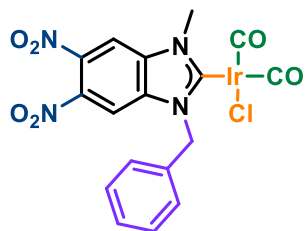
3b



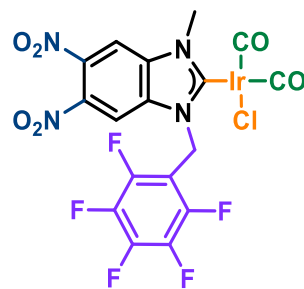
4a



4b



5a



5b

I. RESUMEN

En este trabajo se describe la preparación de una serie de complejos de Ir(I), con ligantes del tipo carbeno *N*-Heterocíclicos (NHC) derivados de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol. La síntesis se realizó mediante una reacción de transmetalación a partir del complejo de Ag(I) correspondiente.

La caracterización de los compuestos preparados se llevó a cabo mediante las siguientes técnicas analíticas: resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H RMN), resonancia magnética nuclear de carbono 13 desacoplada de hidrógeno (^{13}C { ^1H } RMN), espectrometría de masas (E.M.) y análisis elemental (A.E.). En el caso de los complejos **4a**, **4b** y **5b** se determinó de manera inequívoca su estructura molecular mediante difracción de rayos X de monocristal. Además, se analizaron las interacciones no covalentes que presentan los complejos en la red cristalina.

Una vez preparados y caracterizados los compuestos, se precedió a evaluar su actividad citotóxica *in vitro* frente a las líneas celulares cancerosas humanas de mayor incidencia en el mundo, como lo son: glía de sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1). El complejo **4a** mostró la mejor actividad citotóxica, siendo mayor al 70 % en la mayoría de las células evaluadas. Cabe resaltar que el porcentaje de inhibición de crecimiento en las células sanas de riñón de mono (COS-7) fue muy bajo, siendo de 7.9 %. En particular para el compuesto **4a**, se determinó la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) en las líneas celulares: PC-3 ($10.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$), MCF-7 ($15.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$) y SKLU-1 ($10.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$). Debido a la buena selectividad y actividad observada, convierten al complejo **4a** en un excelente candidato para seguir estudiándolo como posible antineoplásico.

También, se demostró que la actividad citotóxica de los compuestos no se encuentra mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS). Debido a que, en el experimento de inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata, se observó que los compuestos

4a-b presentan buenas propiedades antioxidantes (4.99 ± 0.19 y 3.74 ± 0.12 μM , respectivamente), incluso mejores que el α -tocoferol (6.78 ± 2.16 μM).

Finalmente, se estudiaron las propiedades electrónicas de los dos ligantes NHC mediante el parámetro electrónico de Tolman (TEP). Observando que los grupos nitro presentes en las posiciones 5,6 tienen poca influencia en el carácter electrodonador del ligante NHC.

II. INTRODUCCIÓN

La comunidad científica de químicos alrededor del mundo se encuentra trabajando en cuatro áreas críticas: reducción de residuos, energías sostenibles, materiales con valor agregado y mejoramiento de la salud.¹ Dentro de esta última área se encuentra el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de cáncer.

El cáncer es un reto global debido a que es una de las principales causas de muerte en el mundo. En otras palabras, solo en 2018 produjo 9.6 millones de muertes. Además, cada año se diagnostican 18.1 millones de casos nuevos.² De estos, cerca del 50 % de los pacientes que reciben quimioterapia son tratados con derivados de platino (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino).³ Desafortunadamente, estos fármacos traen consigo efectos adversos.^{4,5} Así, con la finalidad de superar estos inconvenientes, grupos de investigación a nivel mundial han enfocado sus estudios en el desarrollo de mejores agentes quimioterapéuticos empleado otros metales de transición (Au, Cu, Ru, Os, etc.).⁶⁻⁸ Por otro lado, los ligantes carbeno *N*-heterocíclicos (NHC) han llamado poderosamente la atención en química organometálica,⁹ catálisis^{10,11} y química medicinal.¹²⁻¹⁶ Debido a que estos ligantes forman enlaces fuertes con prácticamente cualquier metal de transición, por lo cual han sido empleados en la preparación de numerosos complejos, algunos de ellos han demostrado poseer buenas propiedades citotóxicas. Por ejemplo, Metzler-Nolte y colaboradores describieron la actividad citotóxica de una serie de complejos del tipo [(NHC)IrCl(COD)], donde NHC corresponde a derivados imidazolideno y triazolideno. Los compuestos mostraron valores de IC₅₀ de 10.3 ± 2.9 a 46.9 ± 0.1 μM para MCF-7.¹⁷⁻¹⁹

III. ANTECEDENTES

a) Cáncer

- Definición

Es un conjunto de enfermedades caracterizado por la división anormal de las células y por la diseminación de estas hacia otros tejidos. Normalmente, las células crecen, se dividen para formar nuevas células a medida que el organismo lo necesita, programan su muerte (apoptosis) cuando ya no son necesitadas o bien se encuentran dañadas genéticamente, mueren y otras células nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso sistemático se descontrola. Las células dañadas o viejas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Frecuentemente, el exceso de todas estas células conduce a la formación de tumores. Al crecer estos tumores, algunas células cancerosas migran a través del sistema circulatorio y/o linfático hacia otro órgano o tejido circundante (metástasis) agravando la condición de paciente.^{20,21}

- Tipos

Existen más de 100 tipos de cáncer. Los tipos de cáncer reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se formaron. Por ejemplo, el cáncer de pulmón empieza en las células pulmonares. Para el caso de un cáncer metastático se identifican las células cancerosas que migraron, cáncer original o primario. Por ejemplo, el cáncer de mama, que se disemina a los pulmones y forma un tumor metastático se llama cáncer metastático de seno y no cáncer de pulmón.²¹

- Incidencia y mortalidad mundial

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018, los cánceres de pulmón (2.094 millones), mama (2.089 millones) y colorrectal (1.8 millones) fueron los más diagnosticados. Por otra parte, los que causaron más defunciones fueron pulmón (1.8 millones), colorrectal (0.88 millones) y estómago (0.783 millones). En la **tabla 1** se comparan los principales tipos de cáncer que afectaron a la población mundial en 2018.

Tabla 1. Número estimado de casos de incidencia y mortalidad en el mundo, ambos sexos, todas las edades. "Comparación en los tipos de cáncer".²

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Pulmón	2 093 876	1 761 007
Glándulas mamarias	2 088 849	626 679
Colorrectal	1 849 518	880 792
Próstata	1 276 106	358 989
Estómago	1 033 701	782 685
Hígado	841 080	781 631
Esófago	572 034	508 585
Cervicouterino	569 847	311 365
Tiroides	567 233	41 071
Vejiga	549 393	199 922
Total	11 441 637	6 252 726

Origen: Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer. OMS.

Comparando la incidencia y mortalidad en las diferentes regiones del mundo se observa que es una enfermedad que afecta prácticamente a cualquier persona. Es normal ver números altos en la región de Asia debido a que en esta región se encuentran países altamente poblados. Otro hecho digno de mencionar es que en países tercermundistas en ocasiones no se cuenta con estadísticas de la situación.^{2,22}

Tabla 2. Número estimado de casos de incidencia y mortalidad en el mundo, ambos sexos, todas las edades. "Comparación por regiones del mundo".²

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Asia	8 750 932	5 477 064
Europa	4 229 662	1 943 478
Norteamérica	2 378 785	698 266
América Latina y el caribe	1 412 732	672 758
África	1 055 172	693 487
Oceanía	251 674	69 974
Total	18 078 957	9 555 027

Origen: Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer. OMS.

En México el cáncer de mama, próstata y colorrectal presentaron una incidencia y tasa de mortalidad alta.^{23,24}

Tabla 3. Número estimado de casos de incidencia y mortalidad en México, ambos sexos, todas las edades. "Comparación en los tipos de cáncer".^{2,23,24}

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Glándulas mamarias	27 283	6 884
Próstata	25 049	6 915
Colorrectal	14 900	7 084
Tiroides	12 122	881
Cervicouterino	7 869	4 121
Pulmón	7 811	6 733
Estómago	7 546	6 034
Cuerpo uterino	7 266	1 128
Hígado	7 265	6 868
Leucemia	6 406	4 470
Total	123 517	51 118

Origen: Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer. OMS.

- Tratamiento

En términos de la tecnología disponible hoy en comparación con hace 30 años, el tratamiento del cáncer ha progresado notablemente. Existen muchos tipos de tratamiento para el cáncer. El tratamiento que recibirá el paciente dependerá del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté. Los principales tratamientos son:^{21,25}

- Cirugía, procedimiento por el cual el cirujano extirpa el conglomerado de células cancerígenas del cuerpo.
- Radioterapia, tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores.
- Quimioterapia (popularmente llamada quimio), en este tratamiento se emplean fármacos para destruir y/o inhibir la proliferación de células cancerosas.

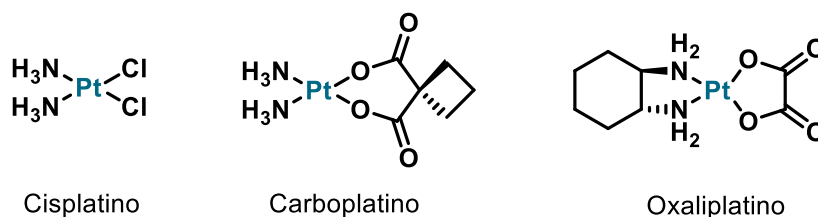
Existen otros tratamientos con menor prevalencia como son: inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, etc. Algunos pacientes solo recibirán un tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría reciben una combinación de tratamientos, comúnmente cirugía con *quimioterapia* o con radioterapia.

- Metalofármacos derivados de platino

Uno de los metalofármacos más antiguos y mejor conocidos es el *cis*-diaminodicloroplatino(II), o cisplatino. Este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1844 por Peyrone,²⁶ no fue hasta 1965 cuando Rosenberg B. y colaboradores demostraron sus propiedades como inhibidor de la división celular en *Escherichia coli*,²⁷ a partir de este experimento el cisplatino presentó gran relevancia. Posteriormente, se evaluó como agente antitumoral en un modelo de ratón presentando resultados buenos.²⁸ Estudios posteriores validaron el cisplatino como un agente anticancerígeno efectivo en humanos. Finalmente, la FDA aprobó su uso en 1978 para el tratamiento de los cánceres metastásicos de ovario y testicular.²⁹

Durante muchos años, se ha descrito que el mecanismo de acción del cisplatino implica la activación del compuesto mediante su hidrólisis dentro de las células, debido a la variación de la concentración del ion cloruro. En los fármacos de platino de segunda generación como carboplatino (comercializado como Paraplatin) y oxaliplatino se sustituyeron los átomos de cloro por enlaces de tipo éster con la finalidad de realizar el proceso de hidrólisis más fácilmente, estos compuestos fueron aprobados por la FDA en 1989 y 2002, respectivamente. Actualmente, se tienen algunos compuestos de platino en fase clínica en los Estados Unidos de América, principalmente destacan nedaplatino, lobaplatino y heptaplatino (**Figura 1**).

Metalofármacos Aprobados



Metalofármacos en Pruebas Clínicas (E.U.A.)

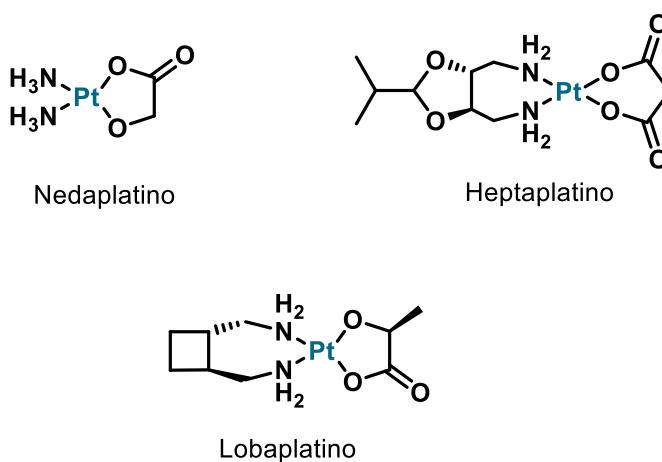


Figura 1. Metalofármacos derivados del Platino

Los medicamentos a base de platino se han convertido en los fármacos de primera elección en la terapia contra el cáncer. En otras palabras, la mitad de todos los pacientes sometidos a quimioterapia reciben un medicamento de platino.³⁰ A pesar de la universalidad de los medicamentos de platino, existen varias desventajas: resistencia por parte de las células tumorales hacia derivados de platino y diversos efectos adversos, como: infertilidad, alopecia, anemia, alteraciones óticas y nefrotoxicidad.^{4,5,31,32}

- Nuevos Metalofármacos

Con la finalidad de ofrecer mejores alternativas terapéuticas, los compuestos organometálicos podrían ser una solución debido a que presentan diversas características. Los compuestos organometálicos tienen una gran variedad de geometrías (desde lineal a octaédrica), tienen una estereoquímica mucho más diversa que los compuestos orgánicos (para un complejo octaédrico con seis ligantes diferentes, existen 30 estereoisómeros), y por un adecuado diseño del ligante, proporcionan control sobre las propiedades cinéticas (como la tasa de hidrólisis del ligante). Además, son cinéticamente estables, y relativamente lipofílicos. Debido a estas diferencias fundamentales en comparación con los "complejos de coordinación clásicos", los organometálicos ofrecen amplias oportunidades en el diseño de nuevos compuestos. Curiosamente, todas las clases de compuestos organometálicos como: metallocenos, medio-sándwich, carbenos, carbonilos, etc., que se han utilizado ampliamente para fines catalíticos o como biosensores, ahora también han encontrado aplicación en química medicinal (**Figura 2**).³³

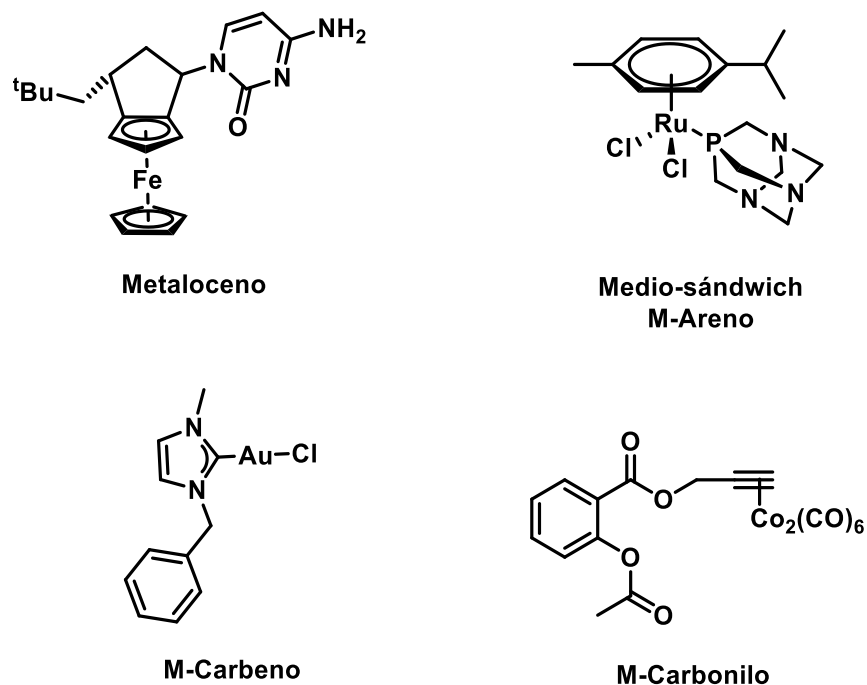


Figura 2. Ejemplos de compuestos organometálicos evaluados como anticancerígenos.

b) Ligantes Carbena N-Heterocíclico (NHC)

- Definición de carbena

Un carbena libre ($:CR_2$) es formalmente un átomo de carbono neutro con seis electrones de valencia (cuatro electrones de enlace y un par electrónico de no enlace). Los carbenos pueden encontrarse en estado fundamental singulete ($\sigma^2p\pi^0$, 1A_1) o triplete ($\sigma^1p\pi^1$, 3B_1), el primer estado electrónico ocurre cuando los dos electrones de no enlace ocupan el orbital σ (orbital híbrido sp^2). En contraste, en el estado triplete, un electrón ocupa el orbital σ y el otro se sitúa en el orbital $p\pi$ (**Figura 3**).³⁴⁻³⁶



Figura 3. Estados electrónicos de un carbeno: Singulete y triplete.

- Carbenos Metálicos

El enlace carbeno-metal ($L_nM=CR_2$) es posible explicarlo mediante dos modelos: carbenos tipo Fischer y Schrock. En los carbenos tipo Fischer, el estado electrónico del carbeno es del tipo singulete ($\sigma^2p_\pi^0$), por lo que la formación del enlace se lleva a cabo mediante la interacción del par electrónico del orbital σ del carbeno con el orbital d_z^2 del metal y por la retrodonación π por parte del orbital lleno d_{xy} del metal hacia el orbital p_π del carbeno. Este tipo de carbenos se caracteriza por coordinar metales (generalmente de los grupos 8 a 12) en bajo estado de oxidación, tiene ligantes (L) π -aceptores y sustituyentes (R) π -donadores (generalmente, MeO- o Me₂N-). Por las características anteriores el carbeno tiene carácter electrofílico.^{34,37-39}

Carbeno Tipo Fischer

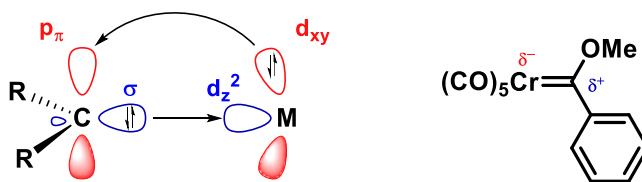


Figura 4. Modelo de enlace y ejemplo de complejo metal-carbeno de Fischer.

Por otra parte, los carbenos tipo Schrock forman dos enlaces covalentes mediante la interacción del carbeno en estado triplete ($\sigma^1p_\pi^1$) con dos electrones desapareados del metal. Este tipo de carbenos se caracteriza por coordinar metales (generalmente de los grupos 3 a 7) en alto estado de oxidación y los sustituyentes (R) se limitan a grupos alquílicos e hidrógeno. Por las características anteriores el carbeno tiene carácter nucleofílico.^{34,37-39}

Carbena Tipo Schrock

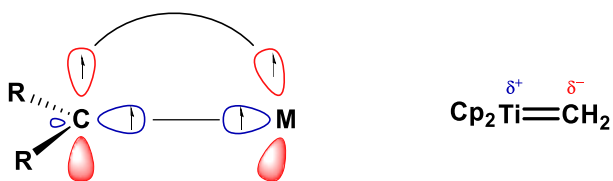


Figura 5. Modelo de enlace y ejemplo de complejo metal-carbena de Schrock.

- Carbenos *N*-Heterocíclicos (NHC)

Los carbenos *N*-heterocíclicos (NHC, por sus siglas en inglés *N*-Heterocyclic Carbene) son, como su nombre indica, compuestos orgánicos cíclicos neutros con al menos un átomo de nitrógeno dentro del anillo y un átomo de carbono divalente con un par solitario de electrones. Estos ligantes son considerados carbenos de Fischer debido a que el átomo de carbono se encuentra en estado singulete. El estado singulete se encuentra favorecido por el denominado efecto Push-Pull. El efecto Push consiste en la retrodonación π por parte de los pares solitarios en los átomos de nitrógeno (N^1 y N^3) hacia el orbital p_π de carbena. De manera paralela se tiene el efecto Pull, el cual consiste en el efecto inductivo que tienen los átomos de nitrógeno (N^1 y N^3) a través de los enlaces σ sobre el C^2 (Figura 6).^{35–38,40–42} En el caso en particular de este ejemplo (imidazolin-2-ido) la extensión de la conjugación del sistema π por parte de la insaturación proporciona una estabilidad adicional de al menos 20 Kcal/mol.⁴³

Estabilización mediante el efecto *Push-Pull*

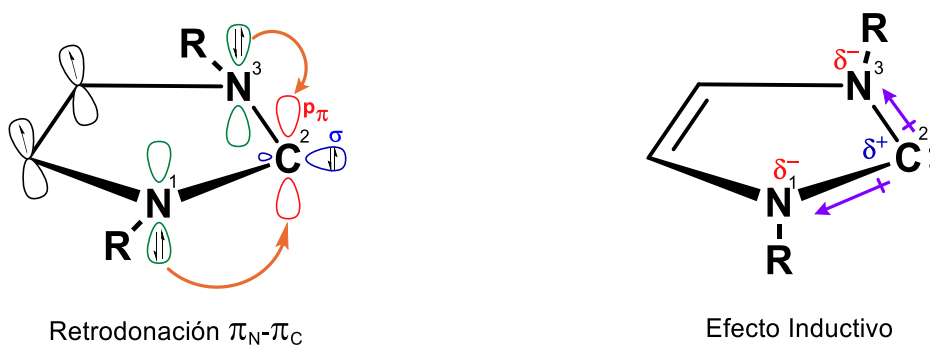
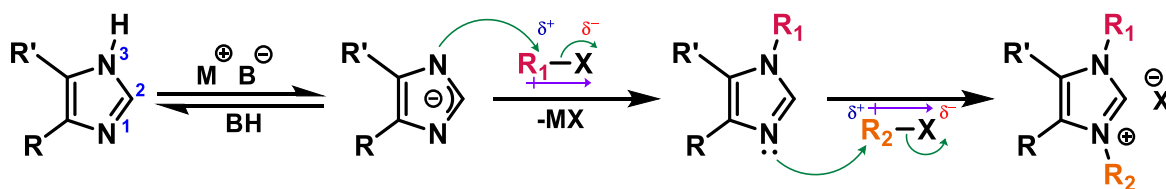


Figura 6. Estabilidad de los NHC

- Aspectos Sintéticos de los complejos NHC

Un inconveniente en el uso de los NHCs libres como herramienta sintética es la baja estabilidad que presentan. Por ello, la mayoría se generan a partir de sales de azolio. Existen numerosas formas de preparar las sales de azolio.⁴⁴ A continuación, se describirá la *N*-alquilación de azoles debido a que las sales empleadas en este trabajo fueron preparadas por este método.

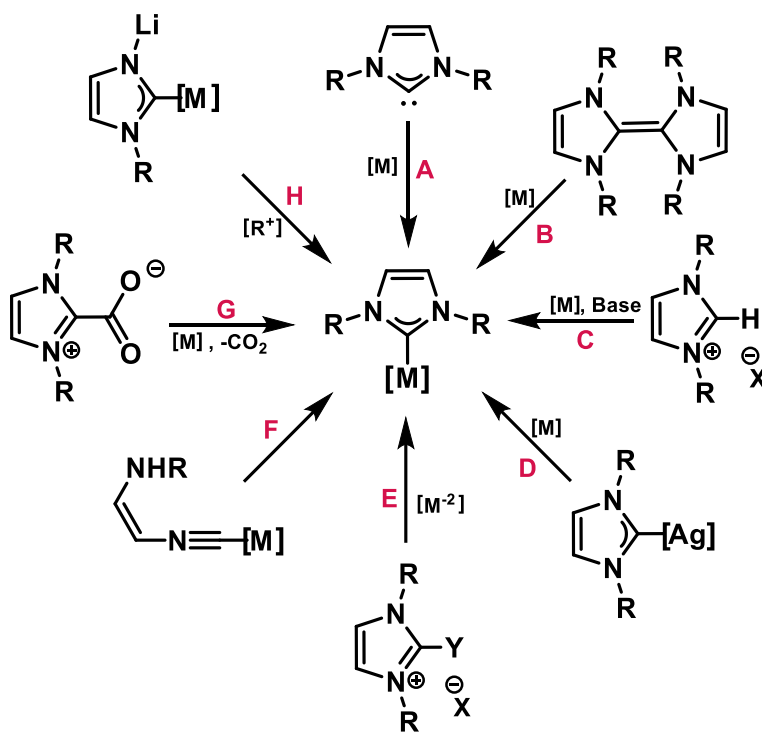
Posiblemente la *N*-alquilación de azoles, es la forma más sencilla y eficiente de preparar sales de azolio. Para obtener las sales de azolio se requiere alquilar ambos átomos de nitrógeno (N^1 y N^3). La primera *N*-alquilación a menudo requiere la adición de una base (usualmente, hidróxidos o carbonato de metales alcalinos), la cual desprotona al hidrógeno del N^3 dando lugar a la formación del nucleófilo azolato. Posteriormente, se lleva a cabo la sustitución nucleofílica con el halogenuro de alquilo (R_1-X) deseado. Finalmente, la segunda *N*-alquilación se realiza con el mismo halogenuro de alquilo o bien se puede emplear otro (R_2-X); también es posible emplear alquil tosilatos, triflatos y sales de trialquiloxonio (reactivo de Meerwein). Cabe mencionar, que si se desea emplear dos diferentes halogenuros de alquilo es necesario realizarlo en dos pasos de síntesis (**Esquema 1**).^{36,44-46}



*Esquema 1. Síntesis de sales de azolio mediante *N*-alquilación de azoles.*

En cuanto a los disolventes, la primera *N*-alquilación se suele realizar en disolventes polares apróticos (MeCN o THF) para ayudar a solubilizar a los reactantes y ayudar a la disolución de la base. Mientras que en la segunda *N*-alquilación se suelen emplear disolventes menos polares (DCM o 1,2-DCE⁴⁶) con la finalidad que la sal de azolio precipite completamente. Si se requiere calentamiento para realizar este paso se emplea tolueno por su alto punto de ebullición.⁴⁴

Los complejos NHC pueden ser preparados mediante múltiples metodologías. Algunas de las rutas más utilizadas son: coordinación del carbeno libre, ruptura del dimero del carbeno por metales de transición, desprotonación *in situ*, transmetalación, adición oxidativa, ciclación de isocianuros metálicos, descarboxilación de 2-carboxi-imidazoles, alquilación de complejos de azolio (**Esquema 2**).^{35,36,38,45,47}



R= Radical; M= Metal; X = Contraión; Y= Me, H, Halógeno

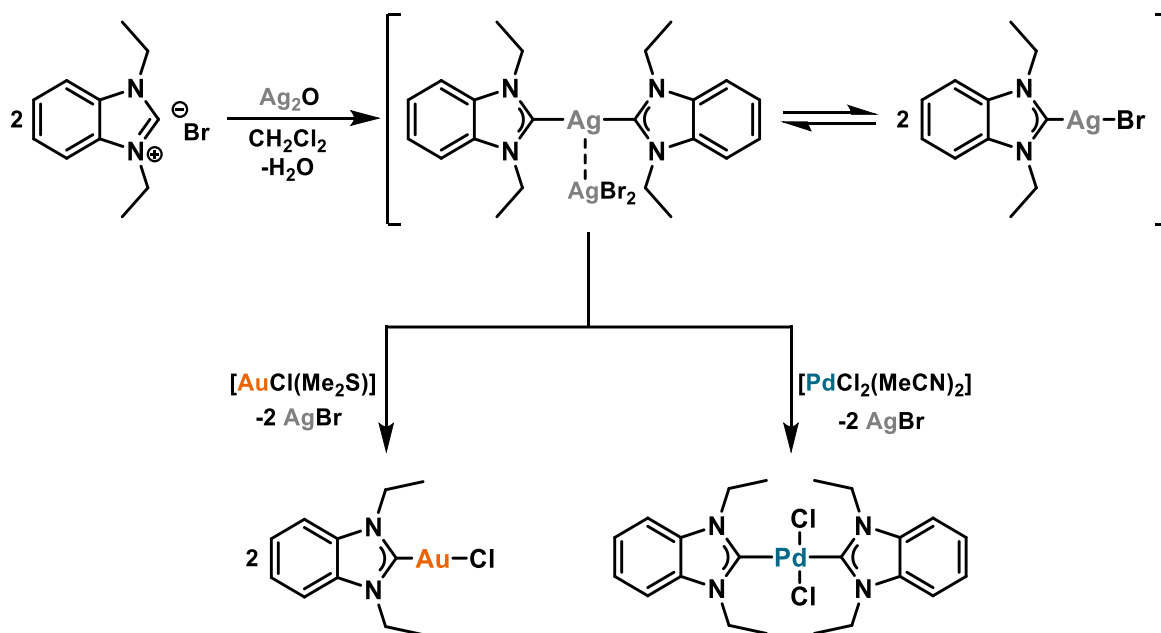
Esquema 2. Principales rutas de síntesis de los complejos NHC. A) Coordinación del carbeno libre, B) Ruptura del dimero del carbeno por metales de transición, C) Desprotonación *in situ*, D) Transmetalación, E) Adición oxidativa, F) Ciclación de isocianuros metálicos, E) Descarboxilación de 2-carboxi-imidazoles, G) Alquilación de complejos de azolio.

A continuación, se describe el método de transmetalación debido a que los complejos de este trabajo fueron preparados mediante esta estrategia.

Los principales agentes de transferencia son los complejos NHC-Ag(I).³⁶ Estos complejos se generan por desprotonación *in situ* de sales de azolio empleando óxido de plata (I) (Ag₂O) como el precursor metálico. Aunque el Ag₂O es el más utilizado, también es posible usar otras sales de plata como carbonato o acetato. Algunos complejos de plata han presentado

propiedades antimicrobianas contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, etc. ⁴⁸⁻⁵⁰ Sin embargo, muchos complejos son fotosensibles por lo cual solo se sintetizan para transferir el ligante a otros metales de transición como Au, Cu, Ni, Pd, Rh, Ir y Ru. ^{51,52}

En 1998, Wang y Lin reportaron la primera transmetalación de un complejo NHC de Ag(I) a Pd(II) y Au(I), con ello demostraron la labilidad que presentaba el enlace Ag-NHC (**Esquema 3**).⁵³ Actualmente, este método se ha convertido en un procedimiento estándar en la síntesis de complejos de NHC, debido a sus condiciones de reacción suaves, aislamientos sencillos y en algunos casos evitar el uso de: bases fuertes, disolventes anhidros y atmósfera inerte. ^{36,42,45}



Esquema 3. Transmetalación de Ag(I) a Au(I) y Pd(II).

- Cuantificación de las propiedades electrónicas de los ligantes NHC

Las propiedades electrónicas de los NHCs se rigen por los efectos inductivos, estéricos y de conjugación.⁵⁴ Actualmente, se han desarrollado varios métodos para cuantificarlas, tanto experimentales como teóricos,^{55,56} pero sin duda el parámetro electrónico de Tolman (TEP) es el método más utilizado. Crabtree y colaboradores establecieron una fórmula de regresión lineal evaluando complejos del tipo de $[\text{IrCl}(\text{CO})_2(\text{NHC})]$, la cual fue mejorada más tarde por Nolan para obtener la ecuación siguiente:

$$TEP = 0.847 \bar{\nu}(\text{CO})[\text{Ir}] + 336 \text{ cm}^{-1}$$

El TEP evalúa el poder electrodonador de los ligantes NHC. Cuando un ligante es muy electrodonador ocasiona que el centro metálico se enriquezca de electrones y aumente su capacidad de retrodonación al orbital de antienlace π^* del ligante carbonilo (CO). Produciendo un alargamiento en la distancia de enlace C-O y una disminución en la frecuencia de estiramiento del CO en el IR.^{55,56}

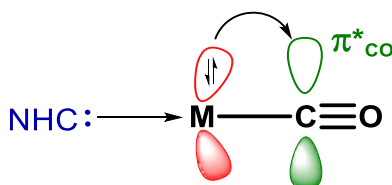


Figura 7. Fundamento del parámetro electrónico de Tolman. Electrodonación por parte del NHC al metal (M) y retrodonación del metal al ligante carbonilo (CO).

En resumen, entre menor sea el valor del TEP el ligante es más electrodonador. Por ejemplo, el 1,3-dimetil-imidazolideno (TEP= 2051 cm^{-1}) es más electrodonador que el 1,3-dimetil-5-nitro-imidazolideno (TEP= 2060 cm^{-1}).⁵⁶

- Aplicación de complejos NHC

Desde que Arduengo en 1991 aisló al primer NHC libre⁵⁷ rompió con ello la idea de que estos compuestos eran demasiado inestables para ser usados como ligantes en la preparación de complejos con metales de transición y fomentó la síntesis de más compuestos. Es cierto también, que la mayoría de NHCs libres son especies sensibles al aire. Sin embargo, también se observó que se estabilizan mediante la formación de complejos, donde el NHC actúa como un donante neutro de dos electrones. Los primeros complejos con ligantes NHCs ya habían sido conocidos desde la preparación por parte de Wanzlick y Öfele en 1968.^{58,59} Sin embargo, hoy en día, los complejos de NHC cubren todos los metales de transición,⁶⁰ así como una gran cantidad de elementos del grupo principal.⁶¹ El descubrimiento de que muchos complejos de NHC son catalizadores⁶² útiles para diversas transformaciones orgánicas contribuyó en gran medida a su popularidad y fue una fuerza impulsora importante para su desarrollo y avance de la química de coordinación.⁶³ Además, algunos complejos NHC poseen propiedades biológicas interesantes, entre ellas destacan: propiedades antimicóticas, antimicrobianas, antitumorales, entre otras.¹²⁻¹⁶ Otras áreas en las cuales también incursionan estos compuestos son: ciencia de los materiales y luminiscencia.^{64,65}

- Complejos NHC con propiedades terapéuticas

Los primeros reportes sobre las propiedades biológicas de los complejos NHC fueron publicados entre 1996 y 1999 por Cetinkaya y colaboradores, ellos describieron las propiedades antibacterianas de complejos de Ru(II) y Rh(I).^{66,67} Posteriormente, el número de publicaciones sobre complejos NHC en ciencias biomédicas siguió aumentando lentamente (aún menos de 10 reportes hasta finales de 2005) pero experimentó un aumento dramático en años posteriores. Hoy en día, la investigación sobre el potencial biológico de los complejos metálicos de NHC es una de las áreas más activas dentro del campo emergente de la química bioorganometálica.^{12-16,33}

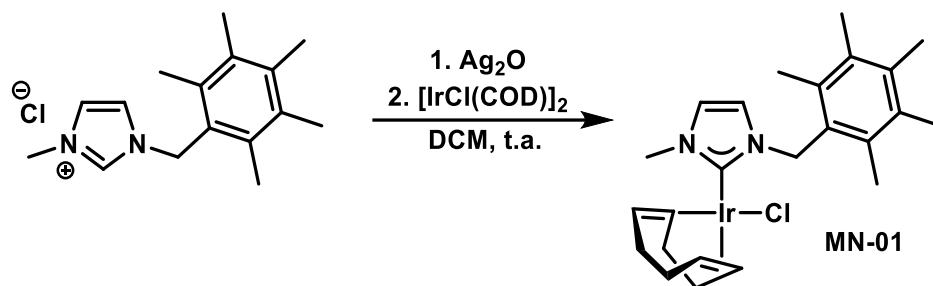
Recientemente, los complejos de Ir han atraído mucho la atención por sus propiedades antiproliferativas y luminiscentes, especialmente cuando su estado de oxidación es + III.^{8,68-}
⁷¹ Sin embargo, solo hay escasos ejemplos de complejos Ir(I) con propiedades terapéuticas.

- Metalofármacos de Ir(I)

Desde 1978, se tenía la idea que los compuestos de Ir(I) podrían exhibir excelentes propiedades antitumorales, debido a que se pensaba que actuarían de manera análoga a los compuestos de Pt(II), ya que estos compuestos comparten: una configuración electrónica d^8 y una geometría cuadrada plana. Giraldi T. y colaboradores reportaron la actividad antitumoral del acetilacetato-1,5-ciclooctadieno iridio (I) [Ir(acac)COD] empleando el modelo carcinoma de ascitis de Ehrlich-Lette (EAC). El compuesto mostró buenos resultados, reportaron que administrando 50 mg/Kg/día en un periodo de cuatro días (comenzando un día después de trasplante del tumor) todos los ratones se aliviaban y ninguno de ellos moría por efectos tóxicos.⁷²

Cerca de 37 años los complejos de Ir(I) con aplicaciones antineoplásicas fueron olvidados por la comunidad científica. Probablemente se deba a que algunos de estos compuestos son inestables al medio ambiente y/o fisiológico. No fue hasta que los ligantes NHC permitieron estabilizar estos complejos y con ello continuar la evaluación de sus propiedades antitumorales.

En 2015, el Dr. Nils Metzler-Nolte y colaboradores reportaron la síntesis (**Esquema 4**) y las propiedades antiproliferativas del complejo (**MN-01**), $14.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ en MCF-7 (mama), $19.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$ en HT-29 (colon) y $16.1 \pm 6.4 \mu\text{M}$ en HEK-293T (riñón). Además, incluyeron un estudio de interacción con proteínas, en el cual el complejo formó un aducto con el citocromo c, esta unión resulta de la interacción del citocromo con el fragmento iridio-carbeno, durante este proceso el complejo pierde los ligantes (Cl y COD) y se oxida a Ir(III).¹⁹



Esquema 4. Síntesis del complejo MN-01.

En 2016, Maftai E. y colaboradores realizaron una serie de complejos NHC de Au(I), Rh(I) e Ir(I), los cuales fueron evaluados en 12 líneas celulares (CXF-HT-29, GXF-251, LXFA-629, LXFL-529, MAXF-401, MEXF-462, OVXF-899, PAXF-1657, PRXF-22Rv1, PXF-1752, RPXF-486 y UXF-1138). Desafortunadamente, los complejos de Ir(I) no mostraron buenas propiedades como anticancerígenos (**Figura 8**).⁷³

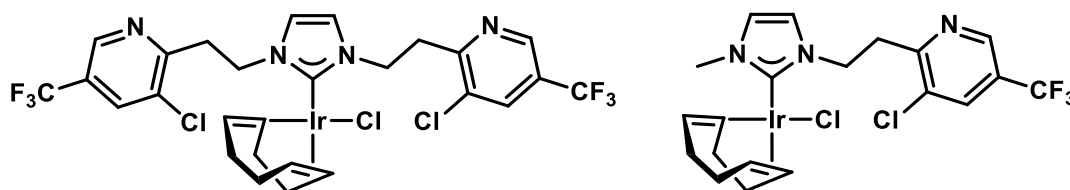


Figura 8. Complejos de Maftai con deficiente actividad anticancerígena.

Posteriormente, Metzler-Nolte N. y colaboradores tomaron como base el complejo (**MN-01**) para continuar preparando análogos de este. En 2016, describieron dos series de complejos NHC de Ir(I) derivados de imidazolideno, la primera mono carbenos y la segunda bis-carbenos catiónicos. Los mono carbenos (M_{1-3}) mostraron ser buenos antiproliferativos en MCF-7 obteniendo valores de IC_{50} que van desde $14.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ hasta $46.920 \pm 0.085 \mu\text{M}$ y el mismo tipo de interacción que el complejo anterior. Con respecto a los bis carbenos catiónicos (B_{1-3}) se observa que son más potentes al compararlos con los mono carbenos y en estos compuestos no se observó la interacción con el citocromo c, lo que sugiere que su mecanismo de acción es mediante otra vía. También se incluyó un compuesto de carbonilos, el cual presentó una actividad citotóxica inferior al compararlo con su análogo con ligante COD (**Figura 9**).¹⁷

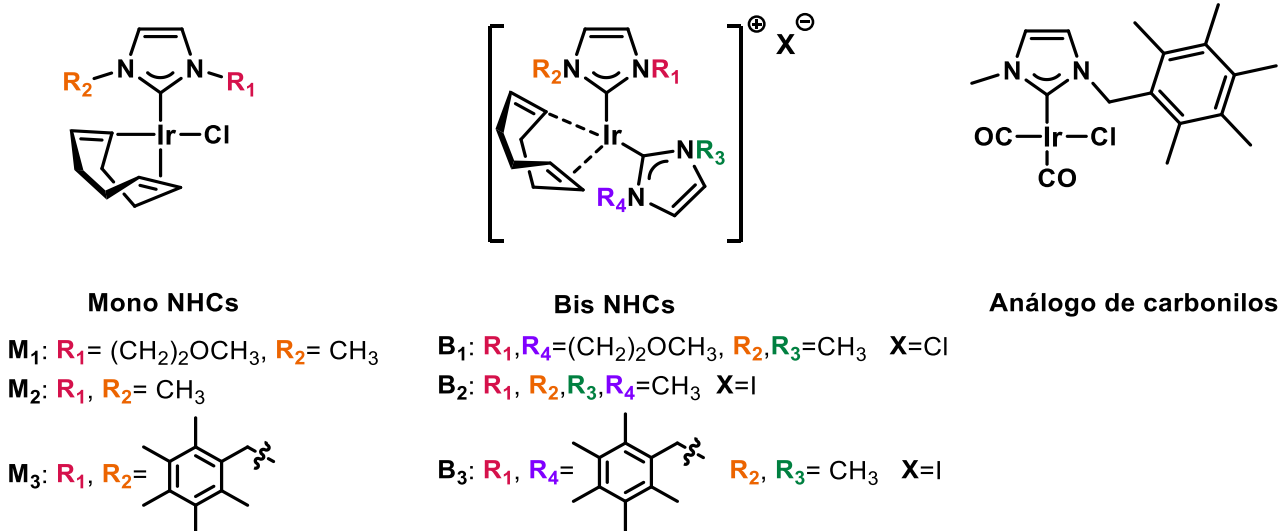


Figura 9. Complejos reportados por Metzler-Nolte N. y colaboradores en 2016.

Finalmente, el año pasado Metzler-Nolte N. y colaboradores prepararon dos series de complejos NHC de Ir(I) derivados de triazolideno y tiazolideno, los complejos fueron activos frente a MCF-7 y HT-29, con valores de IC₅₀ en el intervalo de 1 a 60 μM. En cuanto al estudio del mecanismo de acción de estos complejos, realizaron el bioensayo de ROS en MCF-7 y observaron que todos los compuestos elevaban los niveles, sugiriendo que los compuestos presentan la actividad terapéutica por realizar daño celular a través de estrés oxidativo.¹⁸

IV. HIPÓTESIS

En el bioensayo de citotoxicidad, los complejos mostrarán una potencia y especificidad alta hacia células tumorales, con respecto al cisplatino. Lo anterior podría ser posible debido a que, en los compuestos se incorporaron diversos grupos farmacóforos: los ligantes NHC brindarán estabilidad,¹²⁻¹⁶ el Ir(I) podría ser capaz de unirse al ADN y/o modificar el metabolismo celular.^{17-19,46} Además, los grupos nitro posiblemente logran interactuar con nucleófilos biológicos (proteínas, aminoácidos, nucleótidos, etc.) a través de interacciones no covalentes y/o podrían causar daño celular a través de estrés oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno.⁷⁴⁻⁷⁶ Finalmente, el carácter lipofílico necesario para permear las membranas celulares será modulado mediante la sustitución del anillo bencílico.⁷⁷ Con todo lo anterior en mente, nos planteamos los siguientes objetivos.

V. OBJETIVOS

- Objetivo General

Sintetizar y caracterizar una serie de complejos de Ir(I) **4a-b** y **5a-b**, con ligantes del tipo carbeno *N*-Heterocíclicos (NHC) derivados de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol. Así como, evaluar *in vitro* su actividad citotóxica.

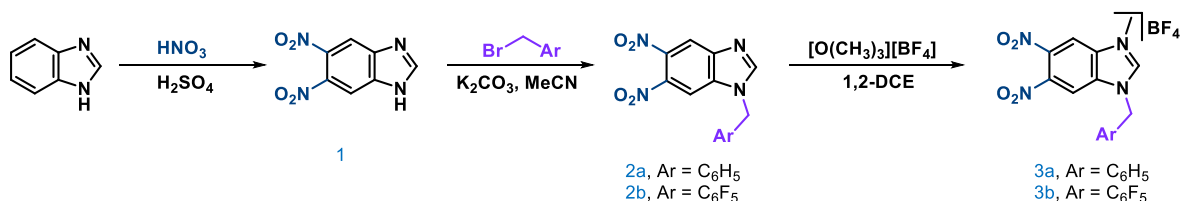
- Objetivos Particulares
 - i. Establecer las condiciones de reacción para cada uno de los pasos de reacción
 - ii. Obtener las sales de 5,6-dinitrobenzimidazol **3a-b**
 - iii. Analizar las interacciones no covalentes presentes en las redes cristalinas.
 - iv. Determinar *in vitro* la IC₅₀ (actividad citotóxica) del compuesto más potente y/o selectivo identificado durante el screening
 - v. Estudiar *in vivo* la producción de especies reactivas de oxígeno de los compuestos que resulten con buenas propiedades citotóxicas
 - vi. Estudiar las propiedades electrónicas de los ligantes NHC mediante el parámetro electrónico de Tolman (TEP).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Síntesis y caracterización de los compuestos

- Sales de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazolio 3a-b

Las sales de azolio necesarias para el desarrollo de esta tesis fueron sintetizadas en tres pasos de reacción a partir de benzimidazol (**Esquema 5**). En primer lugar, con la finalidad de incorporar los grupos nitro al ligante, se sintetizó el 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol **1**, el cual fue obtenido mediante la nitración del benzimidazol empleando una mezcla de ácido nítrico fumante con ácido sulfúrico (**Esquema 5**). La reacción se calentó a 130 °C por 12 h. El producto se obtuvo con un rendimiento de 52 %. Los datos espectroscopicos de **1** concuerdan con los descritos en la literatura.⁷⁸



Esquema 5. Síntesis de las sales de 5,6-dinitrobenzimidazolio 3a-b.

Posteriormente, el compuesto **1** reaccionó con el bromuro de bencilo correspondiente, en presencia de carbonato de potasio y acetonitrilo como disolvente. En nuestro estudio escogimos dos grupos bencilo, bromuro de bencilo (serie a) y su análogo pentafluorado (serie b), ya que el carácter lipofílico que necesitan los compuestos es brindado esencialmente por este fragmento. Los compuestos **2a** y **2b** se obtuvieron con un rendimiento de 87 y 86 %, respectivamente. Finalmente, las sales de azolio fueron preparadas haciendo reaccionar **2a** o **2b** con tetrafluoroborato de trimetiloxonio en 1,2-dicloroetano. Las sales fueron aisladas con un rendimiento de 81 y 87 %, respectivamente.

Todos los compuestos fueron caracterizados mediante RMN de ¹H y ¹³C{¹H}, espectrometría de masas y análisis elemental. A continuación, se detalla la caracterización de **3a**. Todos los detalles concernientes al resto de los compuestos se encuentran en la sección experimental.

- Espectro de RMN de ^1H de **3a**.

En el espectro de RMN de ^1H de **3a** (**Figura 10**) la señal más característica corresponde al protón ácido del fragmento NCHN , la cual aparece en 10.06 ppm, siendo un valor típico para este tipo de compuestos. Además, se observa una señal simple en 4.46 ppm, la cual es asignada al fragmento $-\text{CH}_3$. El resto de las señales se encuentran convenientemente asignadas en el espectro de la **Figura 10**.

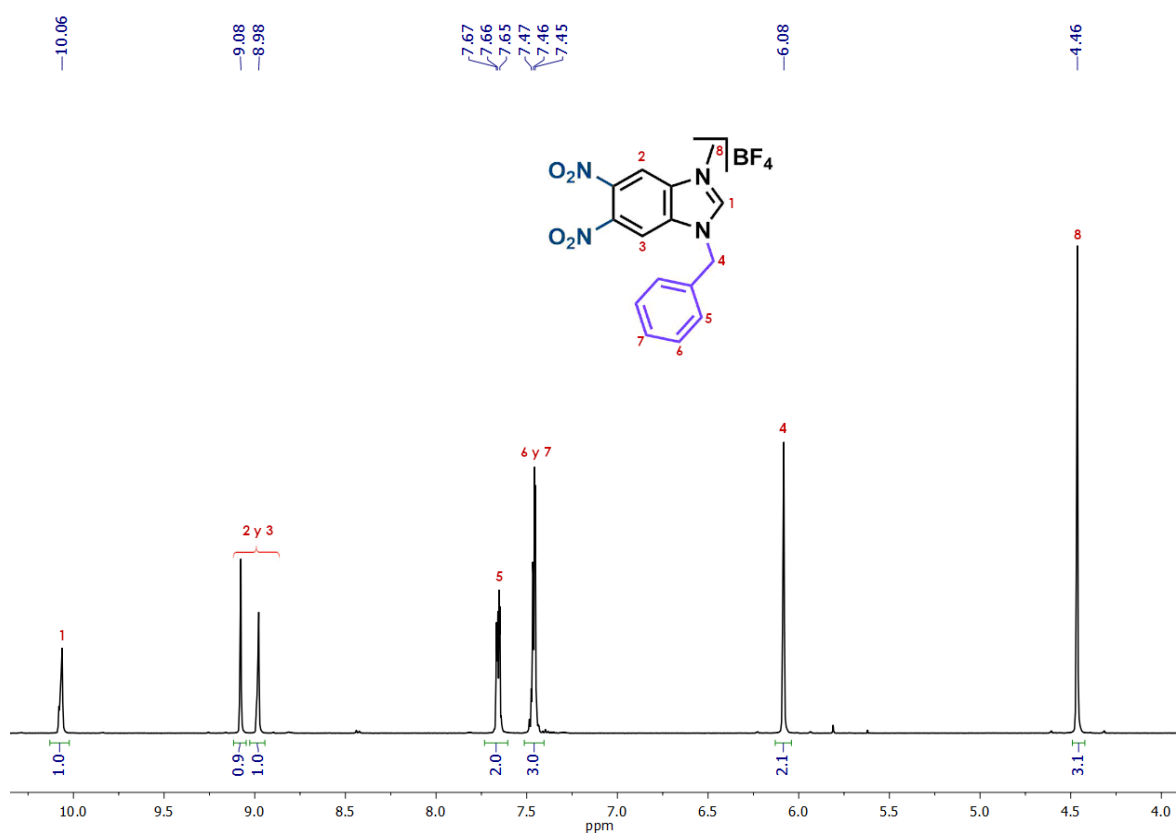


Figura 10. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, $\text{Acetona-}d_6$) del compuesto **3a**.

- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **3a**.

En la **Figura 11** se muestra el espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **3a**. La señal del carbono procarbenico (NCHN) se encuentra en 150.2 ppm. Como era de esperarse en la región de carbonos aromáticos se muestran 10 señales debido a los fragmentos aromáticos (benzimidazol y bencilo) del compuesto. La señal en 35.5 ppm corresponde al fragmento $-\text{CH}_3$.

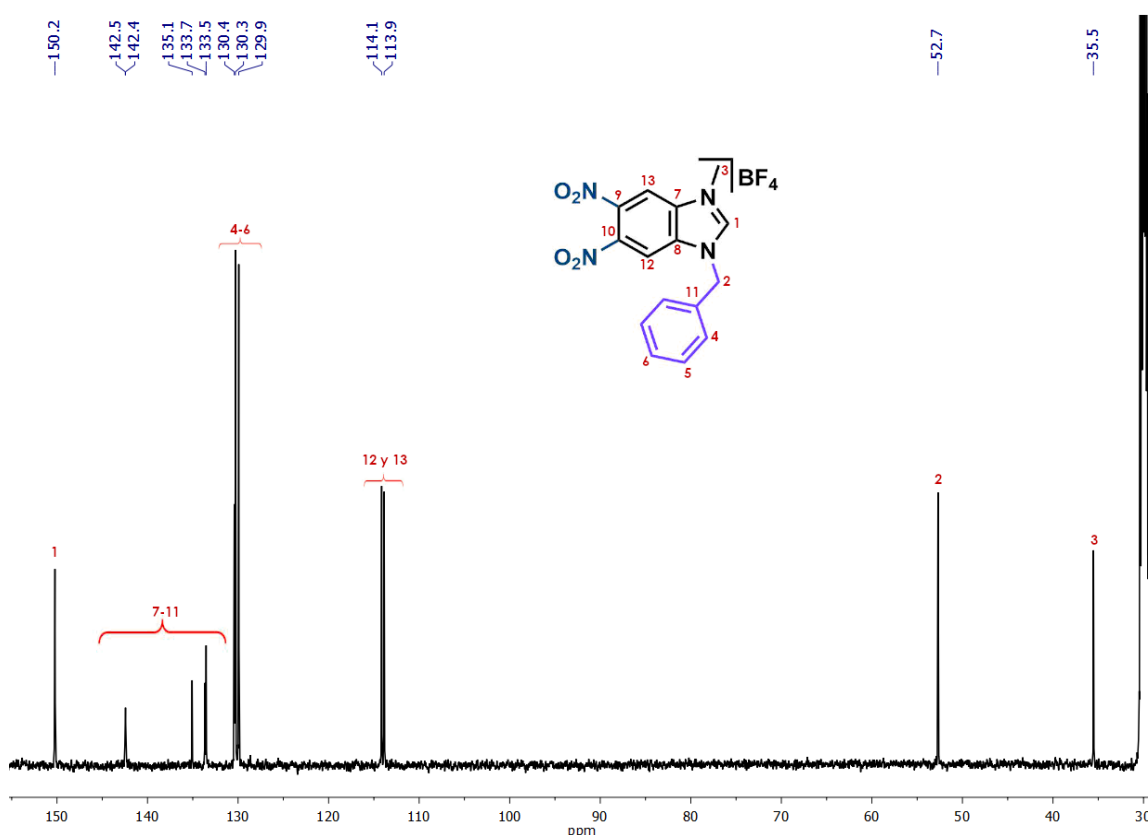


Figura 11. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, Acetona- d_6) del compuesto **3a**.

- Espectro de masas de **3a**.

El espectro de masas de **3a** fue determinado mediante ESI⁺, en el se muestra el ion molecular $[\text{M}-\text{BF}_4]^+$ en 313.10 m/z (**Figura 12**).

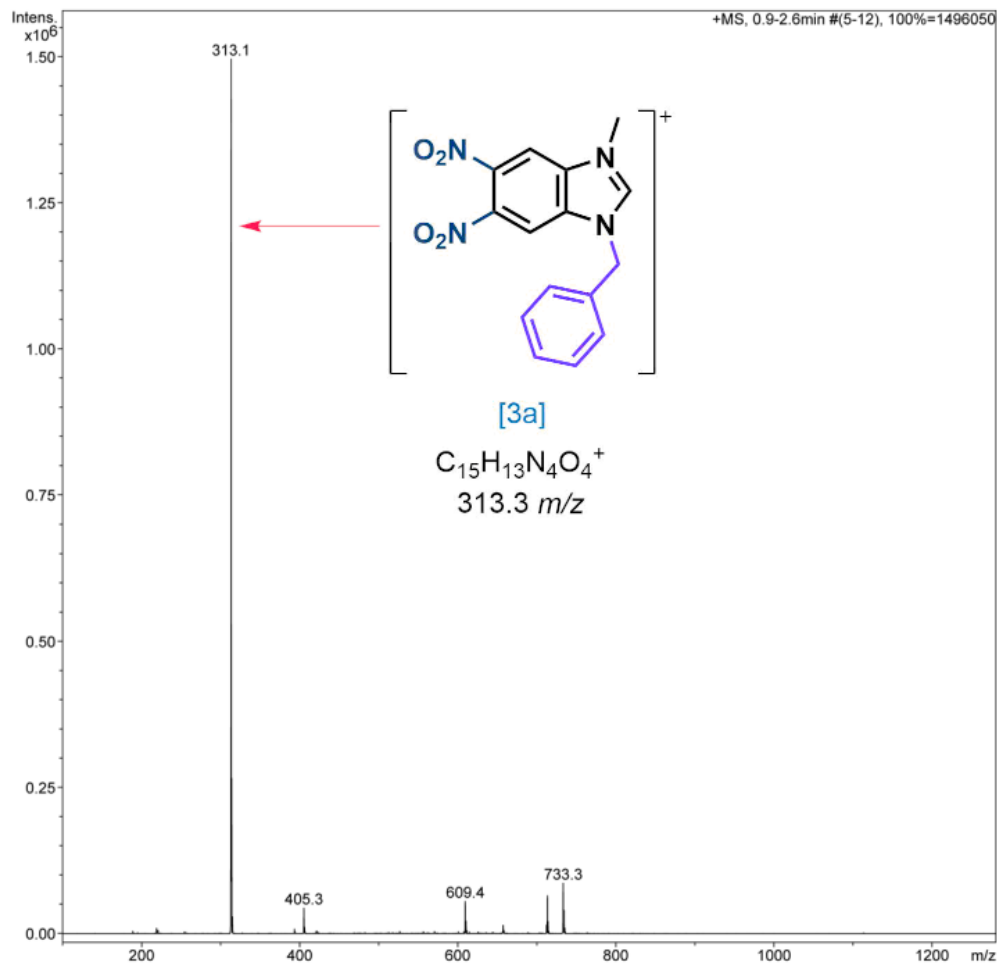


Figura 12. Espectro de masa (ESI⁺) del compuesto 3a.

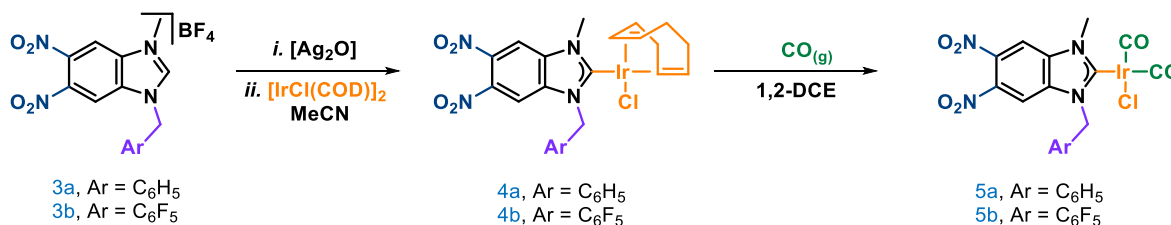
- Análisis elemental de 3a.

Los resultados del análisis elemental del compuesto 3a están en concordancia con los porcentajes teóricos calculados para la fórmula: $C_{15}H_{13}BF_4N_4O_4$, [C] 45.03 %, [H] 3.28 %, [N] 14.00 %, encontrándose experimentalmente [C] 44.94 %, [H] 3.25 %, [N] 13.94 %.

Los análisis anteriores confirmaron la identidad y pureza del compuesto 3a.

- Complejos NHC-Ir(I) 4a-b y 5a-b

La preparación de los complejos NHC de Ir(I) **4a** y **4b** se realizó mediante una reacción de transmetalación (**Esquema 6**). La reacción de Ag_2O con la sal de azolio correspondiente **3a** o **3b** en acetonitrilo, produjo los respectivos complejos NHC de Ag(I), los cuales no fueron aislados ni purificados. Posteriormente, se añadió $[\text{IrCl}(\text{COD})]_2$ al medio de reacción, produciendo la precipitación inmediata de AgBF_4 y la formación de los productos deseados. Los complejos **4a** y **4b** se obtuvieron con un rendimiento de 20 y 24 %, respectivamente. Además, con el objetivo de estudiar las propiedades electrónicas de los ligantes NHC, se sintetizaron los derivados carbonílicos **5a** y **5b**. Para tal objetivo se hizo burbujear CO (monóxido de carbono) a través de una disolución del complejo **4a** o **4b**, lo que genera el intercambio del ligante COD (1,5-ciclooctadieno) por dos moléculas de CO (carbonilo). Los complejos **5a** y **5b** fueron obtenidos con un rendimiento del 71 y 76 %, respectivamente.



Esquema 6. Síntesis de los complejos NHC de Ir (I) 4a-b y 5a-b.

Debido a la similitud de los compuestos, a continuación, sólo se describe la caracterización de los complejos **4a** y **5a**. Todos los detalles referentes a los complejos **4b** y **5b** se encuentran en la sección experimental.

- Espectro de RMN de ^1H de **4a**.

El primer indicio de que el complejo **4a** se ha formado se muestra en el espectro de RMN de ^1H (**Figura 13**), ya que la señal del fragmento NCHN no se observa. Además, aparecen las señales típicas del ligante COD. Debido a la influencia *trans* del NHC, la señal del fragmento *trans*- $\text{HC}=\text{CH}$ del ligante COD aparece en 4.96 ppm, mientras que el fragmento *cis*- $\text{HC}=\text{CH}$ se muestra como un par de señales múltiples en 3.03 y 2.88 ppm. Otra señal característica es la producida por el grupo $-\text{CH}_2-$, la cual aparece como un par diasterotópico en 6.36 y 5.91 ppm. El resto de las señales se encuentran asignadas en el espectro de la **Figura 13**.

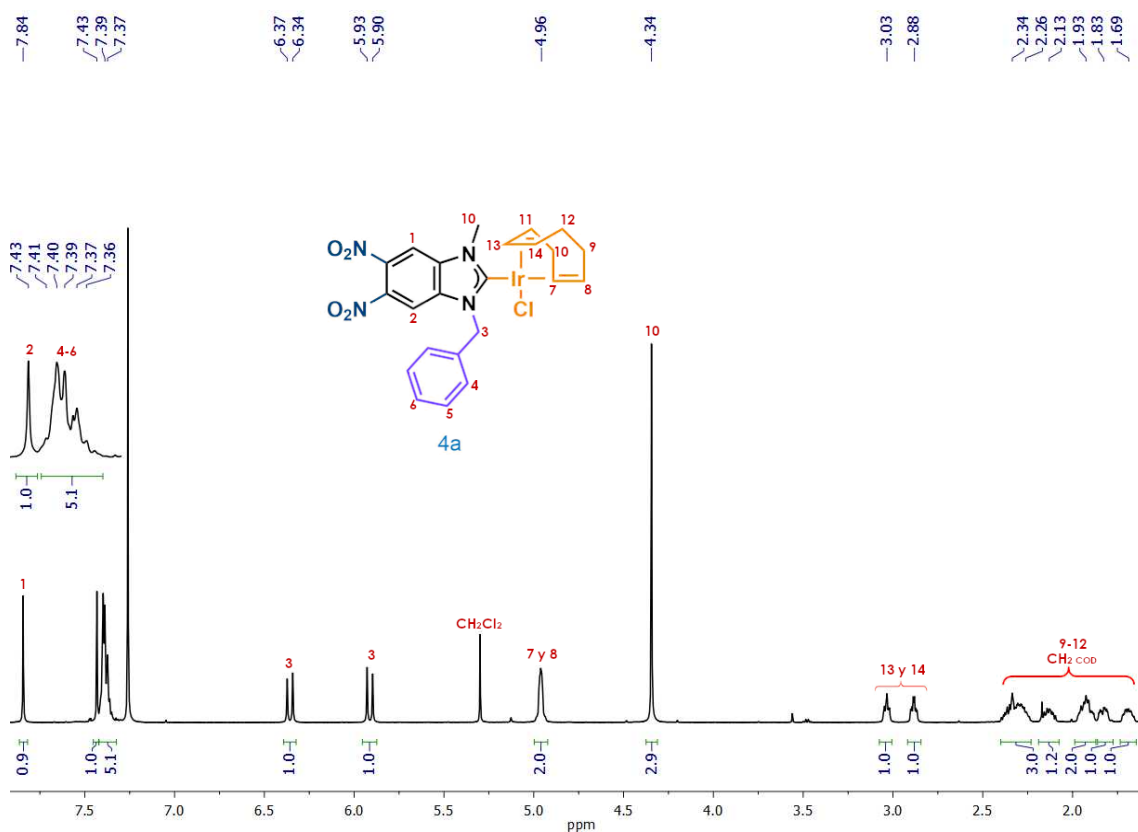


Figura 13. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **4a**.

- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **4a**.

En el espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **4a** el número de señales concuerda con la estructura del compuesto (**Figura 14**). La señal más característica corresponde al carbono carbénico ($\text{Ir}-\text{C}_{\text{Carbénico}}$) que aparece en 202.9 ppm, lo cual confirma que la coordinación a Ir(I) se ha realizado. En la región de 106 a 140 ppm aparecen 10 señales asignadas a los carbonos aromáticos. Debido a la falta de simetría del complejo el ligante COD muestra 8 señales, siendo las más significativas las asignadas al fragmento *trans*-HC=CH al NCH que se observan en 91.4 y 91.2 ppm. El resto de las señales se encuentran asignadas en la **Figura 14**.

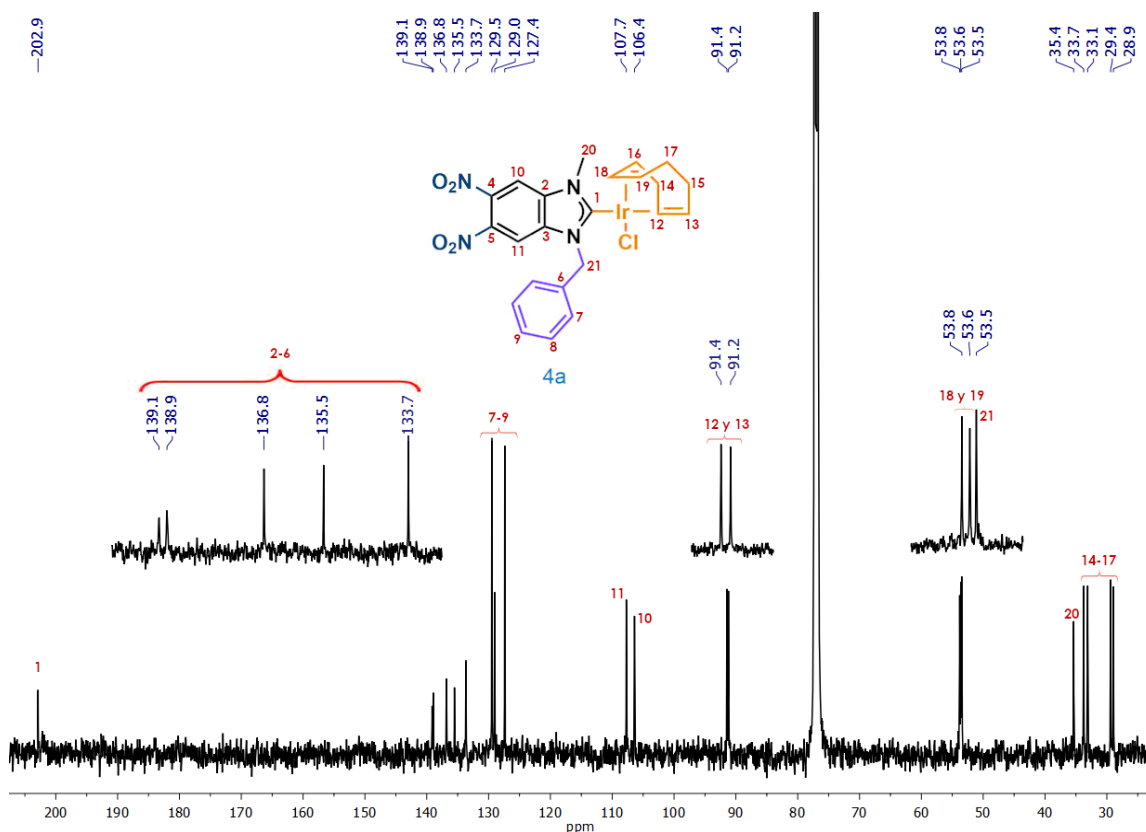


Figura 14. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **4a**.

- Espectro de masas de **4a**.

En el espectro de masas se observa el ion molecular $[\text{M}]^+$ en 648 m/z , el cual corresponde con la masa del compuesto (**Figura 15**).

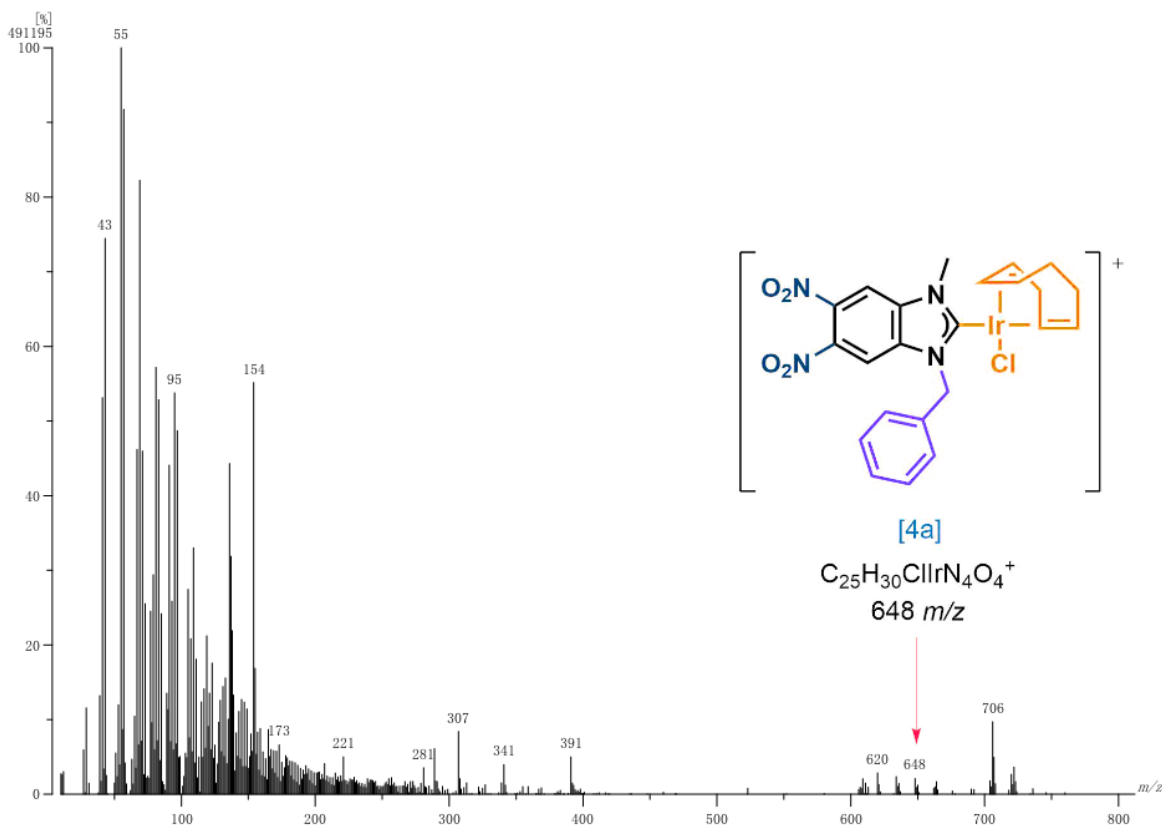


Figura 15. Espectro de masa (FAB⁺) del compuesto 4a.

- Análisis elemental de 4a.

Los resultados del análisis elemental corresponden de manera satisfactoria con los porcentajes teóricos calculados para la fórmula: $C_{23}H_{24}ClIrN_4O_4$, [C] 42.62 %, [H] 3.73 %, [N] 8.64 %, encontrándose experimentalmente [C] 42.80 %, [H] 3.68 %, [N] 8.63 %.

Todas las espectroscopías y el análisis elemental fueron congruentes con la estructura propuesta, lo que confirma su identidad y pureza.

- Espectro de RMN de ^1H de **5a**.

El primer indicio para afirmar que el intercambio de ligante (COD por 2 CO) se realizó satisfactoriamente se muestra en el espectro de RMN de ^1H (**Figura 16**), ya que las señales típicas del ligante COD no se observan. En el espectro sólo se observan las señales del núcleo de benzimidazol, los hidrógenos aromáticos provenientes del bencilo, el metileno ($-\text{CH}_2-$) y el fragmento $-\text{CH}_3$.

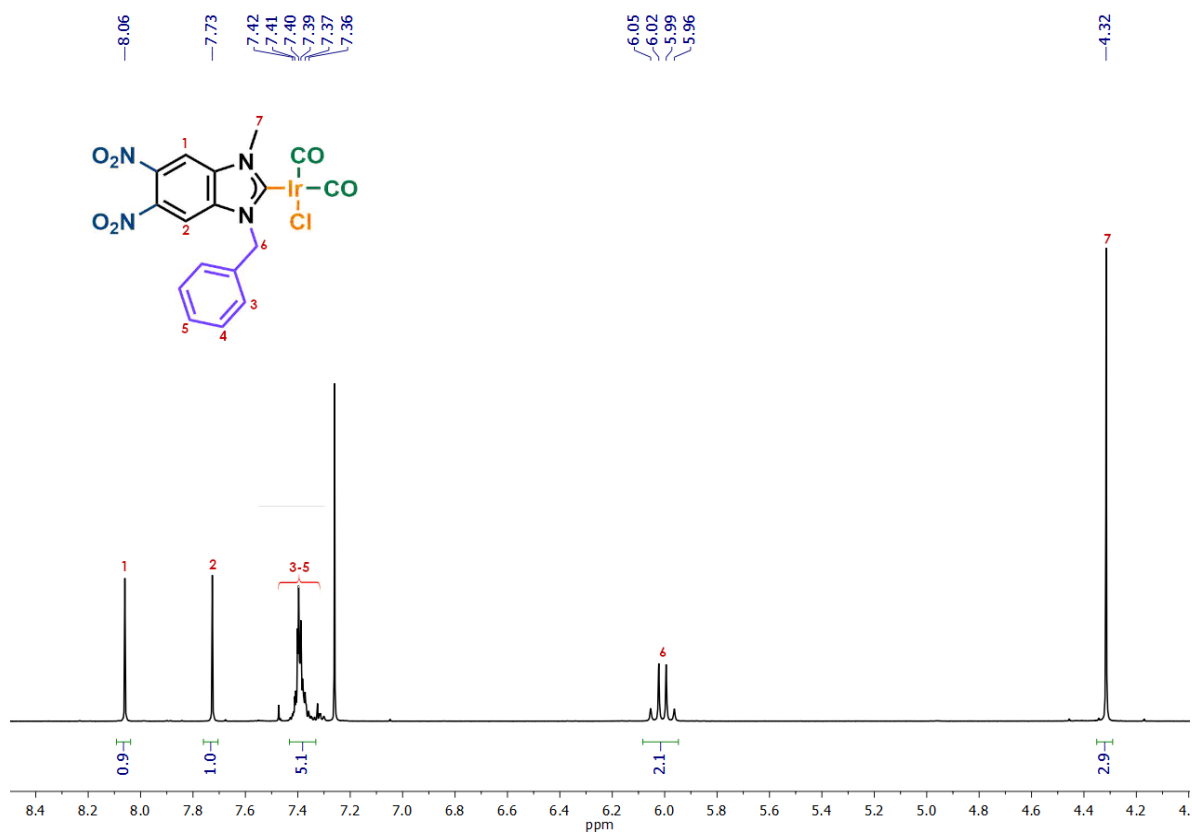


Figura 16. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **5a**.

- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **5a**.

En el espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **5a** el número de señales concuerda con la estructura del compuesto (**Figura 17**). Las señales más características corresponden a los dos ligantes carbonilo (2 CO) que aparecen en 180.2 y 167.3 ppm, lo cual confirma que el intercambio de ligante se ha realizado. Otra señal importante corresponde al carbono carbénico metalado (Ir-C_{Carbénico}) que aparece en 193.9 ppm. El resto de las señales corresponden al ligante NHC.

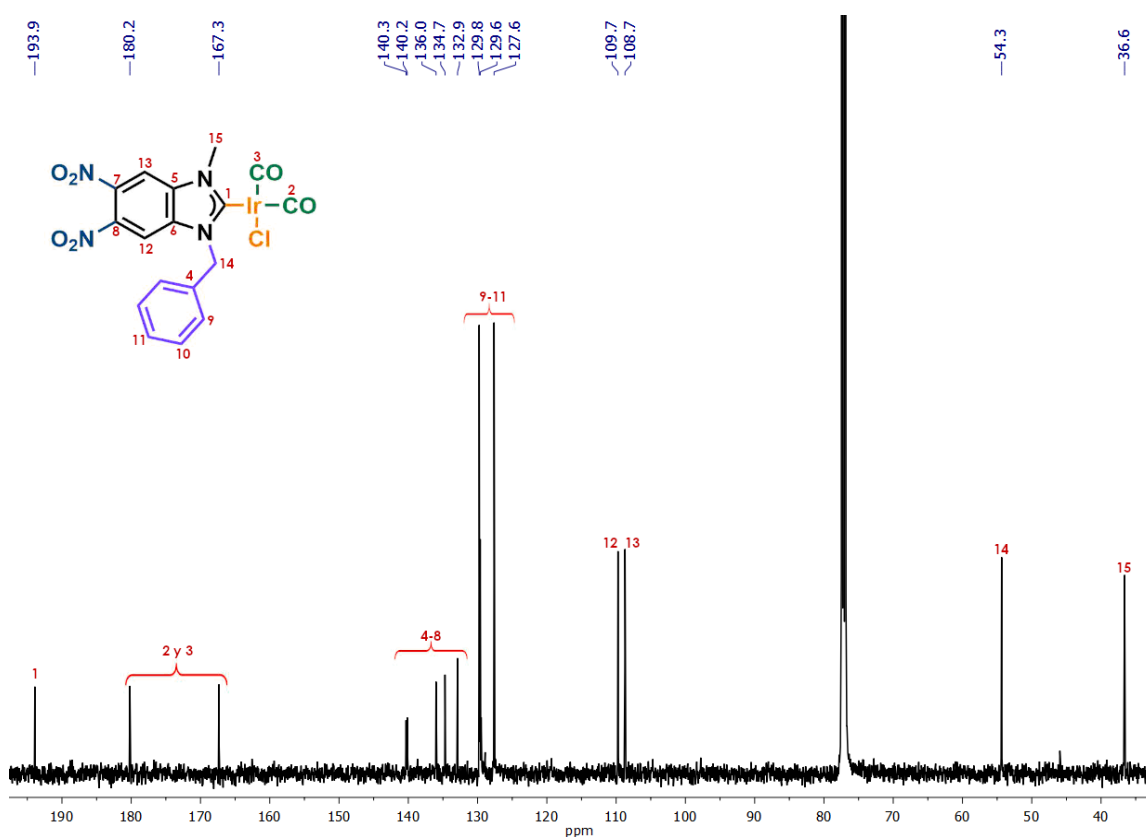


Figura 17. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **5a**.

- Espectro de masas de **5a**.

En el espectro de masas (**Figura 18**) se observa el ion molecular $[\text{M}]^+$ en 596 m/z , el cual corresponde a la masa del compuesto y el pico $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ en 560 m/z .

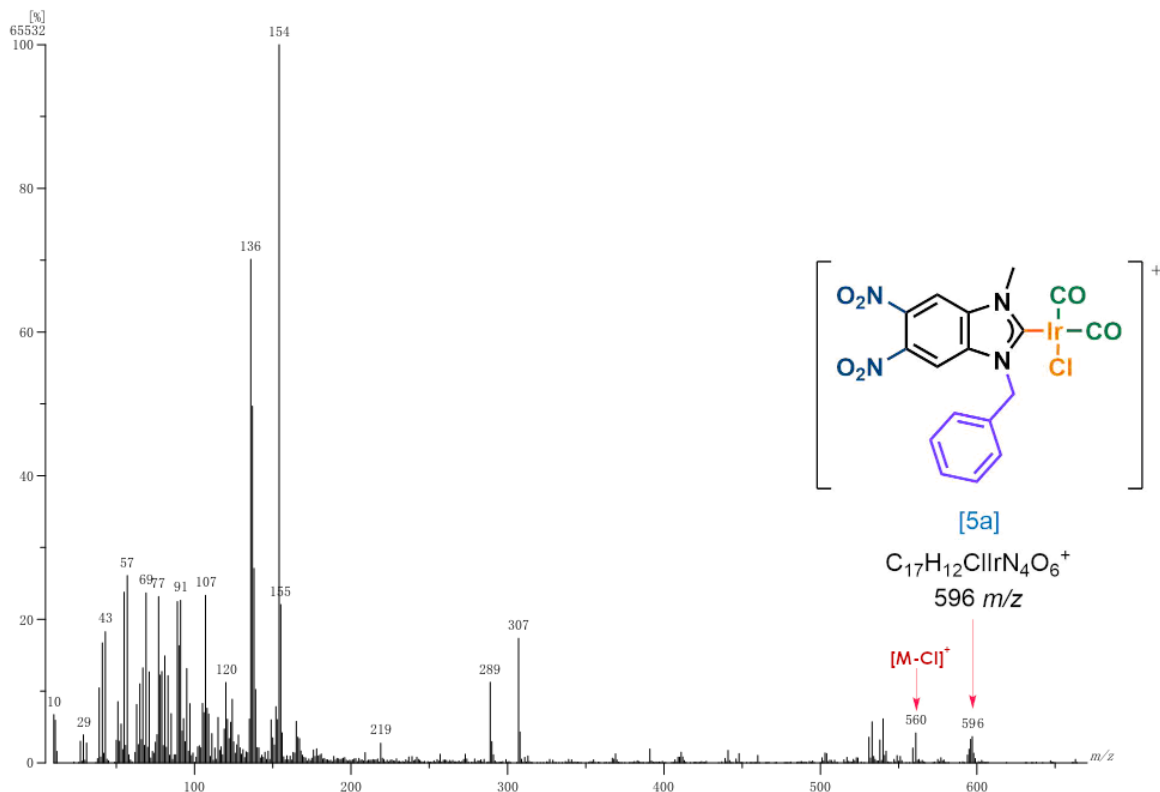


Figura 18. Espectro de masas (FAB⁺) del compuesto 5a.

- Espectro FT-IR de 5a.

En el espectro de FT-IR (**Figura 19**) se observan dos bandas intensas situadas en $\tilde{\nu}$ 2067 y 1981 cm^{-1} , las cuales pertenecen a las frecuencias de estiramiento de los ligantes carbonilos (CO) localizados en conformación *cis*.

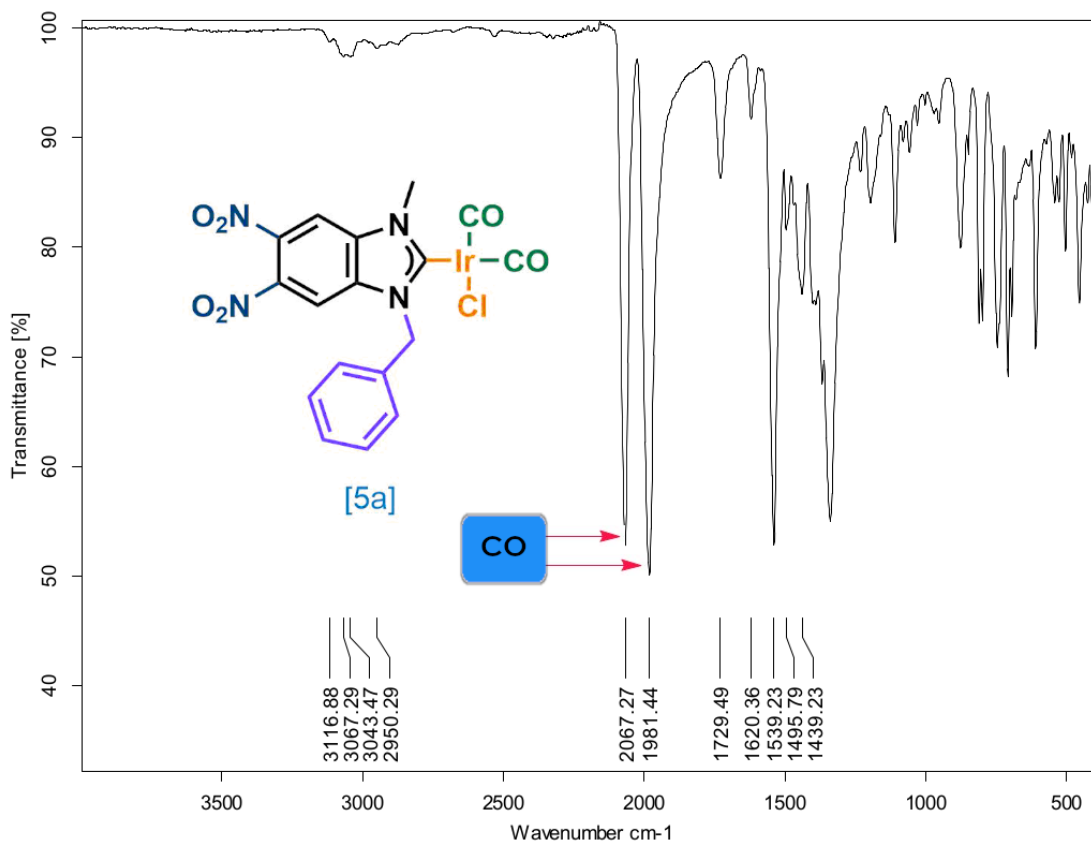


Figura 19. Espectro de FT-IR del compuesto 5a.

- Análisis elemental de 5a.

Los resultados del análisis elemental corresponden de manera satisfactoria con los porcentajes teóricos calculados para la fórmula: $C_{17}H_{12}ClIrN_4O_6$, [C] 34.26 %, [H] 2.03 %, [N] 9.40 %, encontrándose experimentalmente [C] 34.29 %, [H] 2.12 %, [N] 9.61 %.

Todas las espectroscopías y el análisis elemental fueron congruentes con la estructura propuesta, lo que confirma su identidad y pureza.

b) Análisis cristalográfico de los complejos

Las estructuras moleculares de los complejos **4a**, **4b** y **5b** fueron determinadas de manera inequívoca mediante difracción de rayos X de monocristal. Los datos cristalográficos de colección y refinamiento están compilados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Datos cristalográficos y de refinamiento estructural de los complejos **4a**, **4b** y **5b**.

Compuestos	4a	4b	5b
Fórmula	C ₂₃ H ₂₄ ClIrN ₄ O ₄	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₅ IrN ₄ O ₄	C ₁₇ H ₇ ClF ₅ IrN ₄ O ₆ · 5/2 C ₆ H ₆
P.M.	648.11	738.07	881.18
T (K)	298(2)	298(2)	150(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	C ₂ /c	C ₂ /c
a(Å)	13.3172(5)	19.3562(18)	50.406(4)
b(Å)	14.3965(5)	9.9886(10)	9.8489(8)
c(Å)	12.0061(4)	26.188(3)	13.3841(11)
β(°)	96.7621(11)	106.918(2)	98.146(2)
V(Å ³)	2285.81(14)	4844.2(9)	6577.4(9)
Z	4	8	8
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.883	2.024	1.780
μ (mm ⁻¹)	5.996	5.701	4.219
F(000)	1264.0	2848.0	3432.0
Tamaño del cristal (mm ³)	0.290 × 0.087 × 0.065	0.408 × 0.279 × 0.196	0.401 × 0.240 × 0.086
Radiación	λ = 0.71073	λ = 0.71073	λ = 0.71073
Intervalo θ (°)	4.436 a 50.784	4.4 a 59.148	4.792 a 60.212
Reflexiones colectadas	17,262	35,627	110,879
Reflexiones Independiente, R _{int}	4201, 0.0227	6783, 0.0952	9669, 0.0502
Datos/restricciones /parámetros	4201/0/299	6783/0/344	9669/642/500
Bondad del ajuste en F ²	1.123	1.072	1.252
R ₁ , ^a wR ₂ ^b (I ≥ 2σ(I))	0.0233, 0.0449	0.0517, 0.0872	0.0508, 0.1187
R ₁ , ^a wR ₂ ^b (todos los datos)	0.0280, 0.0471	0.1105, 0.1014	0.0612, 0.1232
Δρ _{min,max} [e Å ⁻³]	-0.45, 0.67	-1.37, 2.24	-4.26, 4.16

Los monocristales de los complejos **4a** y **4b** fueron obtenidos mediante difusión lenta de hexano en disoluciones concentradas de los complejos (1,2-DCE para **4a** y MeCN para **4b**). Mientras que los cristales de **5b** se obtuvieron por evaporación lenta de una disolución concentrada del complejo en benceno.

El sistema cristalino para el complejo **4a** es monoclinico con grupo espacial $P2_1/c$ y presenta cuatro moléculas en la celda unitaria ($Z=4$). Por otra parte, los complejos **4b** y **5b**, presentan un sistema monoclinico con grupo espacial C_2/c y ocho moléculas en la celda unitaria ($Z=8$).

A continuación, se analiza de manera conjunta las estructuras cristalinas de los complejos **4a** y **4b** (**Figura 20 y 21**) debido a la similitud estructurales que guardan los compuestos.

Las estructuras revelan una geometría cuadrada plana ligeramente distorsionada alrededor del centro metálico. El ligante NHC respectivo se encuentra coordinado al Ir(I), un ligante cloro y un ligante COD completan la esfera de coordinación. Las longitudes del enlace Ir(I)–NHC son 2.004 (4) Å en **4a** y 1.979 (5) Å en **4b**, las cuales son típicas para este tipo de compuestos. En ambos complejos se observa el fuerte efecto *trans* que ejerce el ligante NHC, en otras palabras, la distancia promedio de los carbonos *trans* al carbeno (2.19 Å en **4a** y **4b**) es ligeramente mayor que la distancia de los carbonos *trans* al ligante cloro (2.11 y 2.10 Å en **4a** y **4b**, respectivamente). Las principales distancias de enlace y los ángulos más representativos se muestran en la (**Tabla 5**).

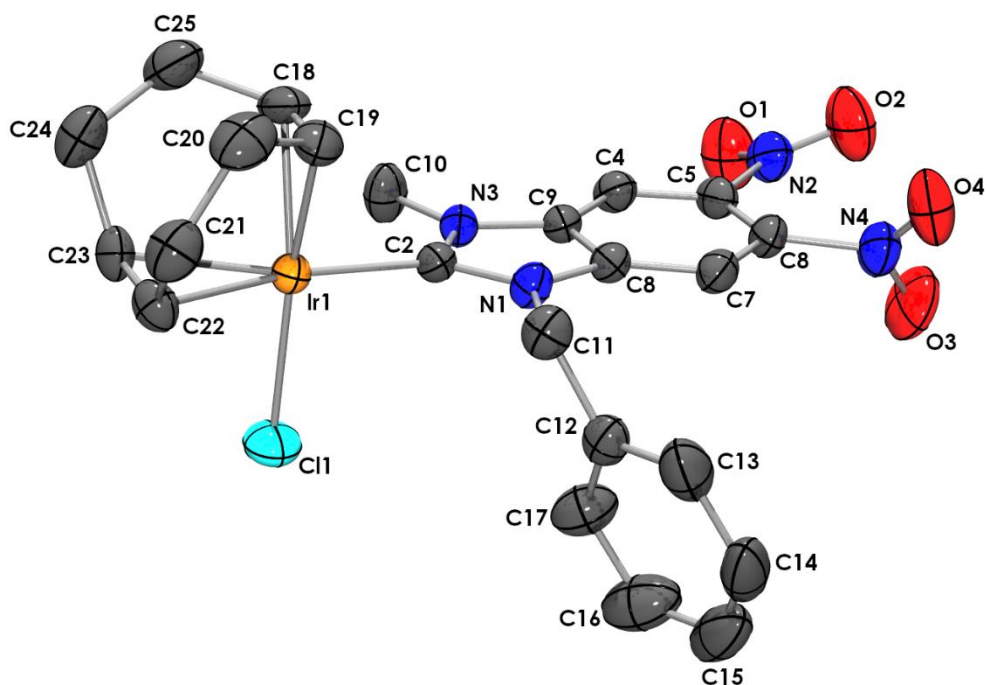


Figura 20. Estructura molecular del complejo 4a. Los elipsoides están representados a 50 % de probabilidad y los átomos de hidrógeno fueron omitidos por claridad

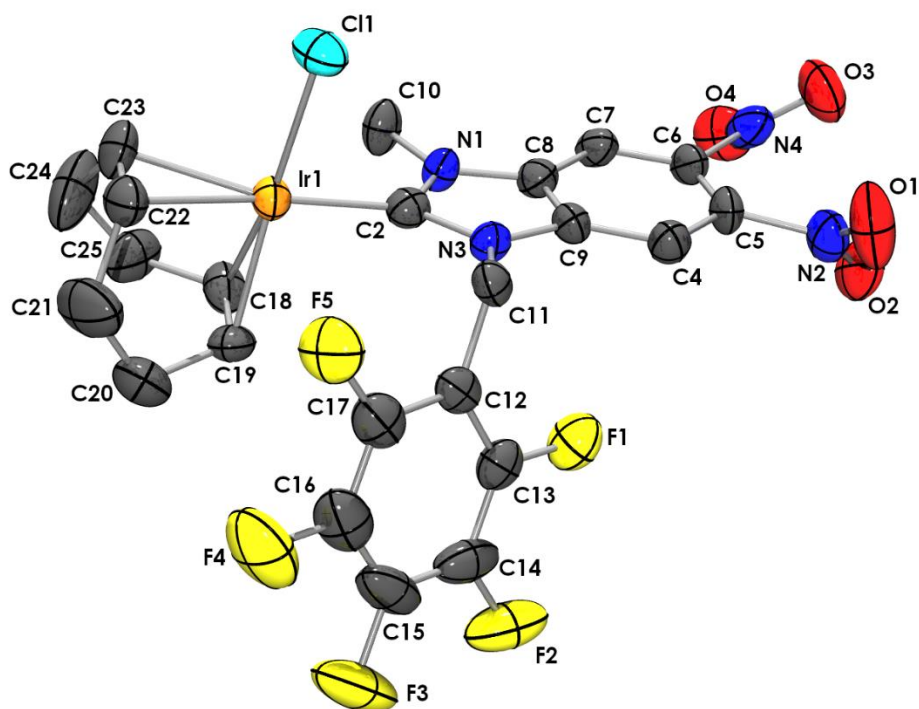


Figura 21. Estructura molecular del complejo 4b. Los elipsoides están representados a 50 % de probabilidad y los átomos de hidrógeno fueron omitidos por claridad.

Tabla 5. Distancias de enlace y ángulos selectos para los complejos 4a y 4b.

Compuesto	4a	4b
Enlace	Distancia de enlace [Å]	
Ir(1)-C(2)	2.004(4)	1.979(5)
Ir(1)-Cl(1)	2.364(1)	2.374(2)
Ir(1)-C(18)	2.107(3)	2.102(9)
Ir(1)-C(19)	2.111(5)	2.099(8)
Ir(1)-C(22)	2.184(4)	2.198(7)
Ir(1)-C(23)	2.204(4)	2.188(6)
Enlace	Ángulos de enlace [°]	
C(2)-Ir(1)-C(18)	89.1(1)	92.3(3)
C(2)-Ir(1)-C(19)	92.4(2)	97.6(3)
C(2)-Ir(1)-Cl(1)	91.0(1)	86.7(2)
C(18)-Ir(1)-C(23)	80.9(1)	81.2(3)
C(18)-Ir(1)-C(22)	96.7(1)	93.8(3)
C(19)-Ir(1)-C(23)	89.1(2)	91.9(3)
C(19)-Ir(1)-C(22)	80.8(2)	80.9(3)
C(2)-Ir(1)-C(22)	160.6(1)	167.9(3)
C(2)-Ir(1)-C(23)	162.2(1)	155.7(3)
C(22)-Ir(1)-Cl(1)	90.2(1)	90.8(2)
C(23)-Ir(1)-Cl(1)	93.0(1)	92.2(2)

En un análisis más detallado del empaquetamiento molecular, se encontró que los cristales se encuentran estabilizados con enlaces de hidrógeno (A-H...B) e interacciones de apilamiento tipo π - π .

Los puentes de hidrógeno de la estructura 4a (**Figuras 22-23**) presentan una geometría angular y son considerados de fuerza baja debido a que las distancias del enlace H...B se encuentran entre 2.6 y 2.9 Å.⁷⁹ En la **tabla 6**, están enlistadas estas distancias y sus ángulos.

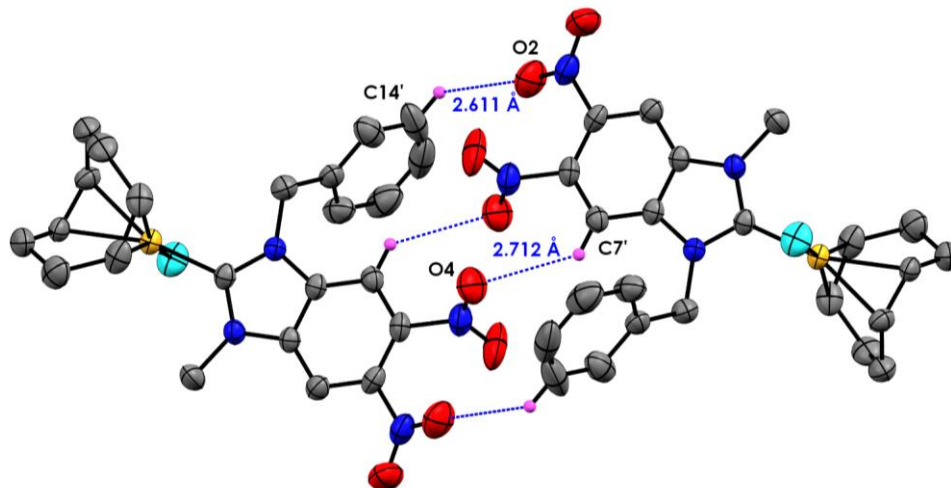


Figura 22. Interacciones: $C(14')-H(14')\cdots O(2)$ y $C(7')-H(7')\cdots O(4)$, en el complejo 4a.

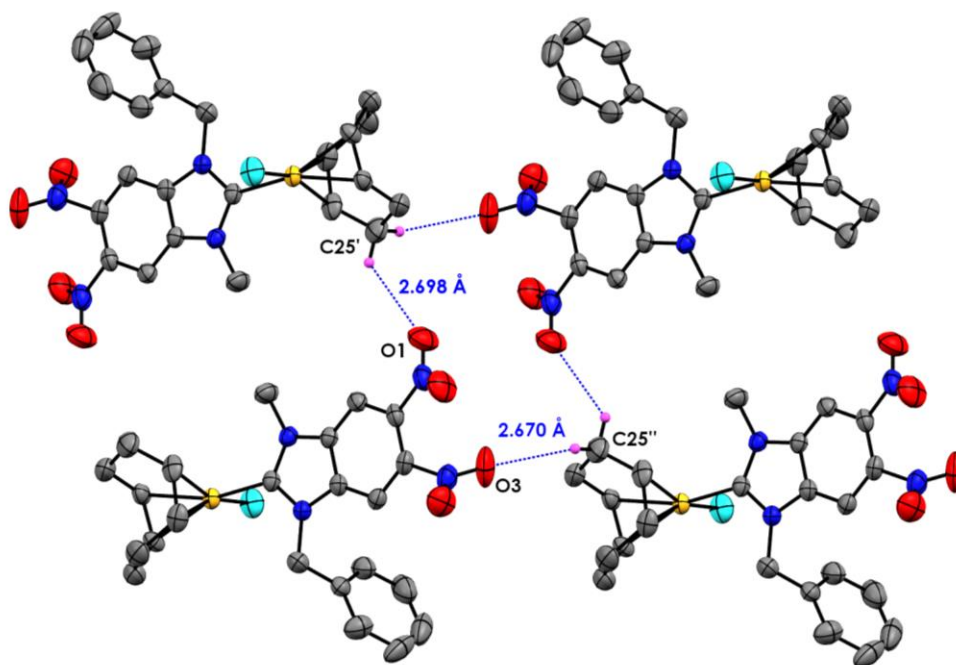


Figura 23. Interacciones: $C(25')-H(25A')\cdots O(1)$ y $C(25')-H(25B')\cdots O(3)$, en el complejo 4a.

Tabla 6. Enlaces de hidrógeno del complejo 4a.

Enlace	Distancia [Å]			Ángulo [°]
	A-H	H...B	A...B	
A-H...B	A-H	H...B	A...B	<(AHB)
C(14')-H(14')...O(2)	0.930	2.611	3.327(7)	139.2
C(25')-H(25B')...O(3)	0.970	2.670	3.503(6)	144.2
C(25')-H(25A')...O(1)	0.970	2.698	3.434(6)	133.1
C(7')-H(7')...O(4)	0.930	2.712	3.411(5)	132.7

Por otra parte, en los enlaces de hidrógeno de la estructura 4b (Figuras 24-27) se observan varios tipos de geometrías: donador bifurcado, aceptor bifurcado y angular. Las distancias de enlace y sus ángulos (Tabla 7), se encuentran dentro de los límites establecidos para enlaces de hidrógeno de fuerza baja.⁷⁹

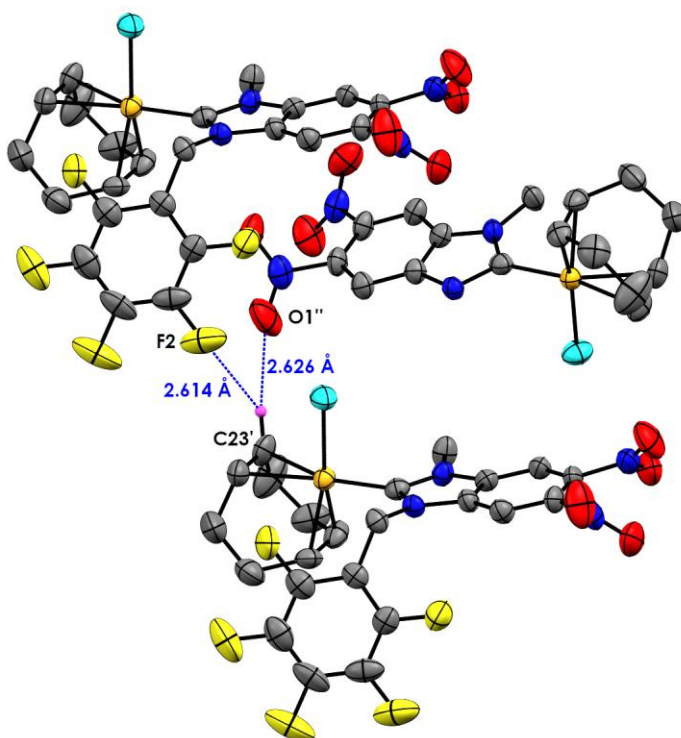


Figura 24. Interacciones del tipo donador bifurcado, presente en el complejo 4b: C(23')-H(23')...F(2) y C(23')-H(23')...O(1''); el ángulo (F2-H23'-O1'') es 67.5°. Un bencilo fluorado fue omitido por claridad.

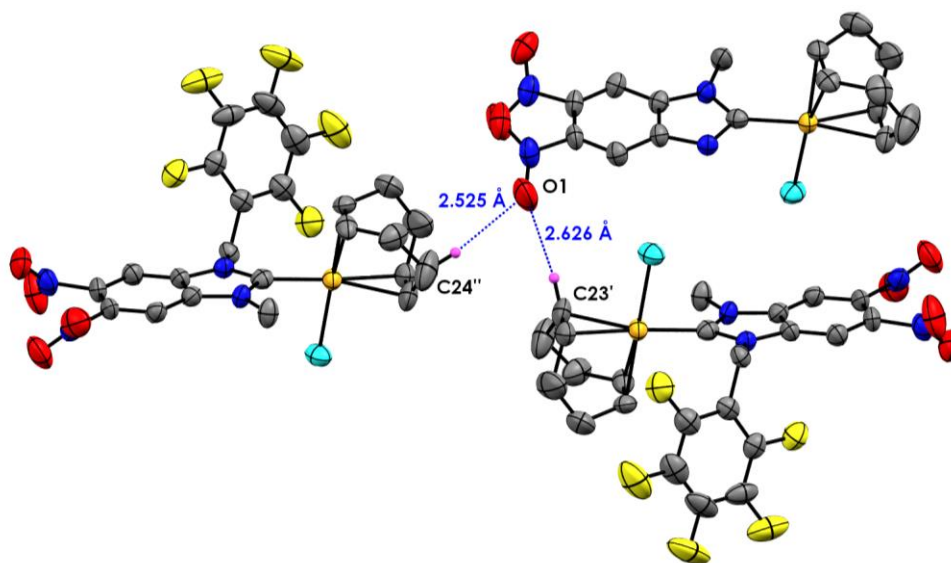


Figura 25. Interacciones del tipo aceptor bifurcado, presente en el complejo 4b: C(24'')-H(24A'') \cdots O(1) y C(23')-H(23') \cdots O(1); el ángulo (H24A''-O1-H23') es 69.3°. Un bencilo fluorado fue omitido por claridad.

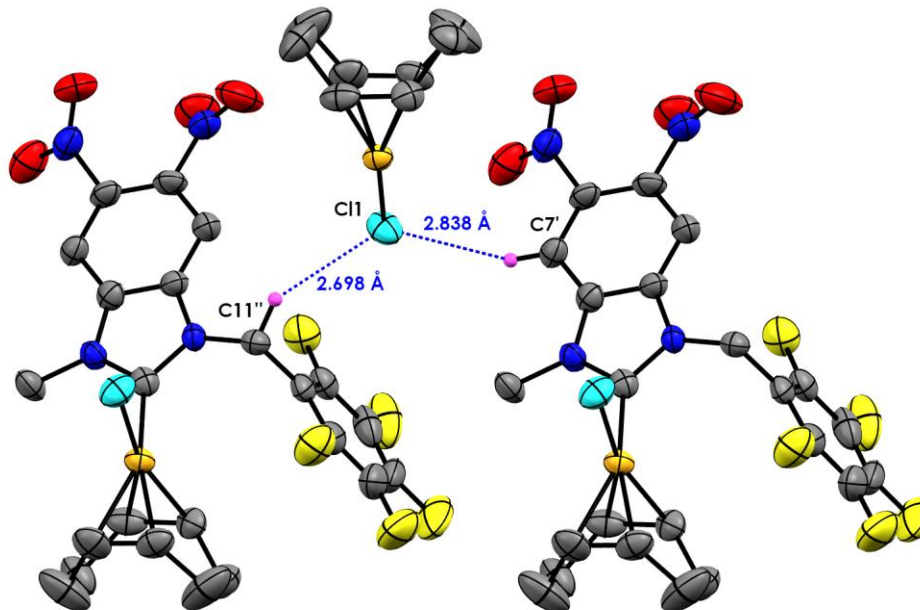


Figura 26. Interacciones del tipo aceptor bifurcado, presente en el complejo 4b: C(7')-H(7') \cdots Cl(1) y C(11'')-H(11B'') \cdots Cl(1); el ángulo (H11''-Cl1-H7') es 132.0°. Un ligante NHC fue omitido por claridad.

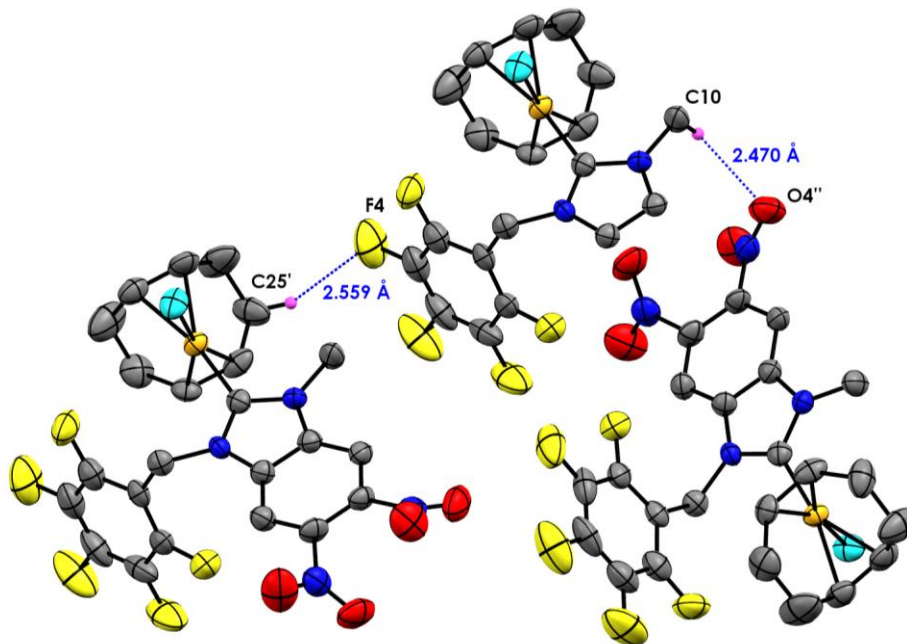


Figura 27. Interacciones del tipo angular, presentes en el complejo 4b: C(7')-H(7')...Cl(1) y C(11'')-H(11B'')...Cl(1). Un anillo de benceno fue omitido por claridad.

Tabla 7. Enlaces de hidrógeno del complejo 4b.

Enlace	Distancia [Å]			Ángulo [°]
	A-H	H...B	A...B	
C(10')-H(10C')...O(4)	0.962	2.470	3.192(9)	131.8
C(24')-H(24A')...O(1)	0.970	2.525	3.48(1)	167.0
C(25')-H(25A')...F(4)	0.970	2.559	3.443(9)	151.5
C(23')-H(23')...F(2)	0.981	2.614	3.38(1)	135.0
C(23')-H(23')...O(1)	0.981	2.626	3.54(1)	155.7
C(11')-H(11B')...Cl(1)	0.970	2.698	3.547(6)	146.3
C(7')-H(7')...Cl(1)	0.930	2.838	3.586(7)	138.2

Por otro lado, en las redes cristalinas de los complejos se presentaron interacciones de apilamiento π - π del tipo paralelo desplazado entre los anillos aromáticos (benzimidazol-bencilo en **4a** y benzimidazol-benzimidazol en **4b**), las distancias entre los centroides de los anillos son 3.862 y 3.931 Å, respectivamente (**Figuras 28-29**). Estas distancias son habituales

para este tipo de interacciones.⁷⁹ También se observó en el complejo **4b** la sinergia de interacciones, el enlace de hidrógeno C(10')-H(10C')...O(4) es más fuerte que los demás debido a que ocurre con el mismo par de moléculas que la interacción π - π (**Figura 29**).

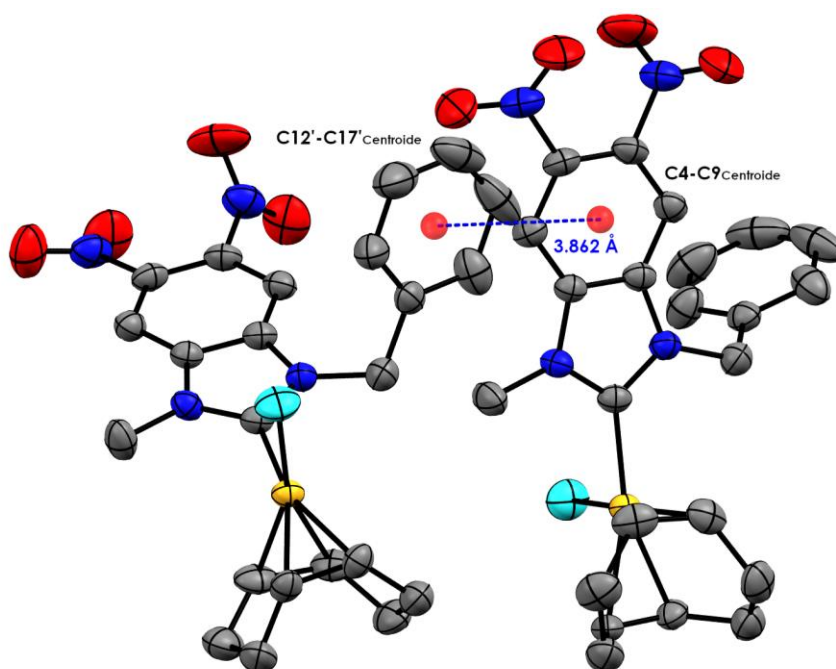


Figura 28. Interacción de apilamiento π - π entre los anillos de benzimidazol y bencilo en el complejo **4a**.

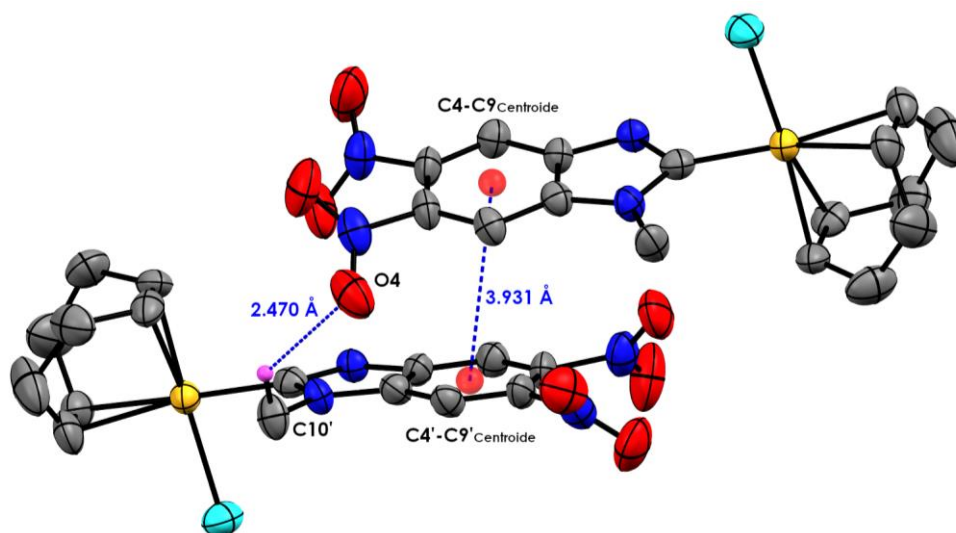


Figura 29. Sinergia de interacciones en el complejo **4b**: interacción de apilamiento π - π entre los anillos de benzimidazol y enlace de hidrógeno C(10')-H(10C')...O(4). Dos bencilos fluorado fueron omitido por claridad.

Para concluir el análisis cristalográfico analizaremos al complejo **5b**, el cual cristalizó en forma de solvato de benceno. Las moléculas de benceno cocrystalizaron con el complejo por la presencia de interacciones de apilamiento π - π del tipo paralelo desplazado. (**Figura 30-31**).⁸⁰ Adicionalmente, entre estas moléculas se forman los siguientes enlaces de hidrógeno (**Figura 31-32**): C(30')-H(30') \cdots F(1) y C(28')-H(28') \cdots O(4). Las distancias observadas son habituales para cada tipo de interacción.

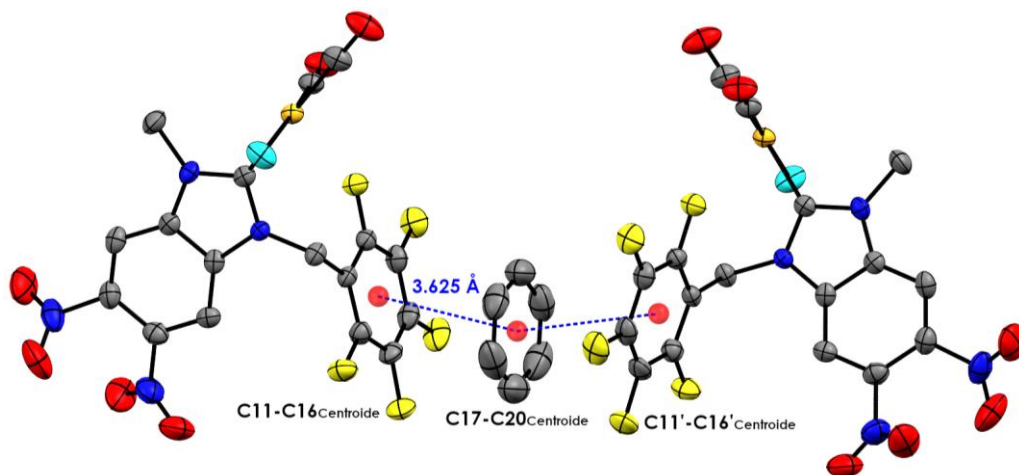


Figura 30. Interacciones de apilamiento π - π stacking en el complejo **5b**: paralelo desplazado entre los centroides C11-C16 y C17-C20.

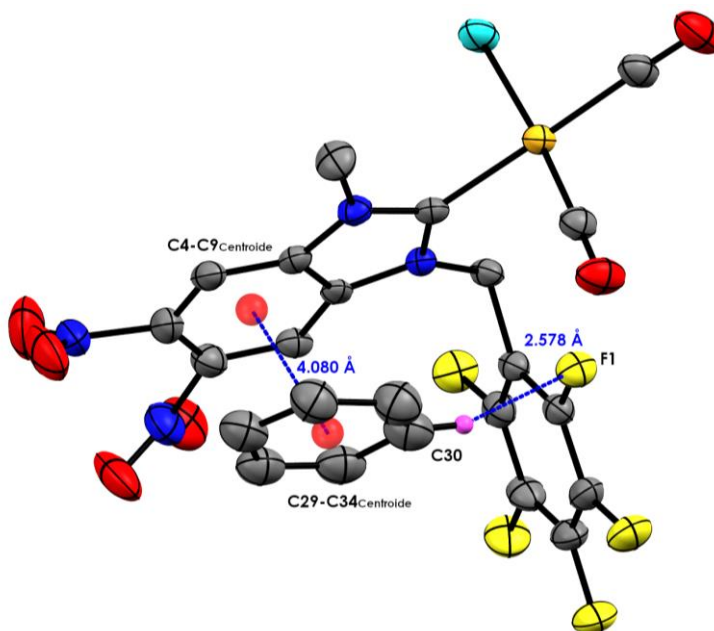


Figura 31. Interacciones en el complejo **5b**: apilamiento π - π entre los anillos de bencimidazol y enlace de hidrógeno C(30)-H(30) \cdots F(1).

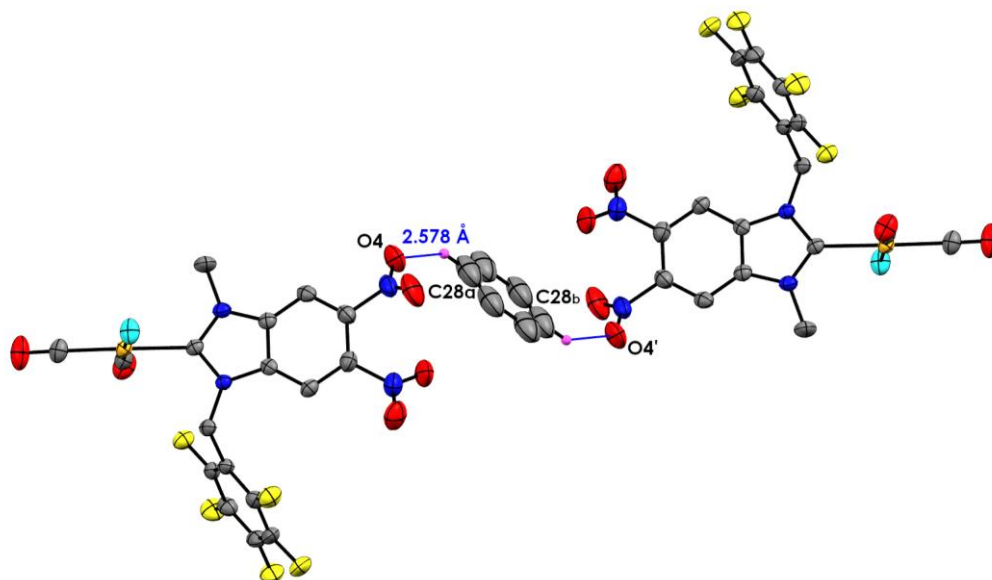


Figura 32. Enlace de hidrógeno C(28')-H(28')...O(4), presente en el complejo 5b.

Adicionalmente, el cristal está estabilizado con otros enlaces de hidrógeno intermoleculares (Figuras 33-35) de fuerza baja, estos enlaces presentan diversos tipos de geometrías: aceptor bifurcado y angular. Las distancias de enlace y sus ángulos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Enlaces de hidrógeno del complejo 5b.

Enlace	Distancia [Å]			Ángulo [°]
	A-H	H...B	A...B	
C(1')-H(1B')...O(1)	0.98	2.563	3.108(9)	<(AHB)
C(30)-H(30)...F(1)	0.95	2.578	3.470(2)	115.1
C(28)-H(28)...O(4)	0.95	2.592	3.320(1)	157.0
C(10')-H(10B')...F(2)	0.99	2.664	3.286(7)	133.3
C(31')-H(31')...Cl(1)	0.95	2.811	3.750(1)	121.0
C(4')-H(4')...Cl(1)	0.95	2.923	3.282(5)	168.2
				103.8

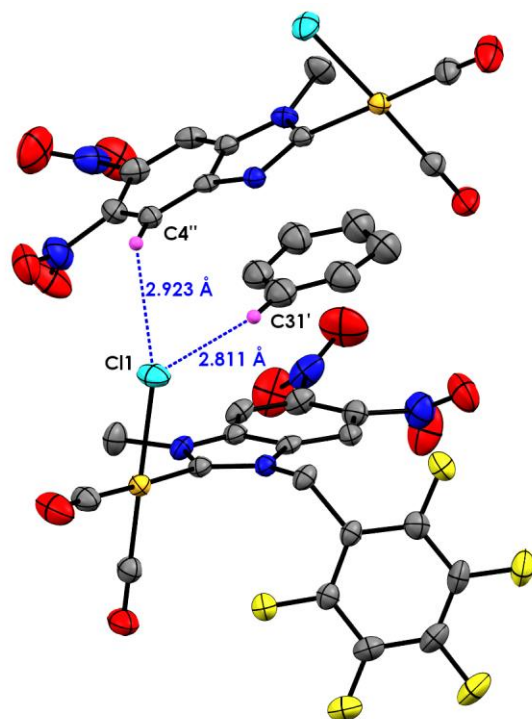


Figura 33. Interacciones del tipo aceptor bifurcado, presente en el complejo 5b: $C(31')-H(31')\cdots Cl(1)$ y $C(4'')-H(4'')\cdots Cl(1)$; el ángulo $(H4''-Cl1-H31')$ es 82.0° . Un bencilo fluorado fueron omitido por claridad.

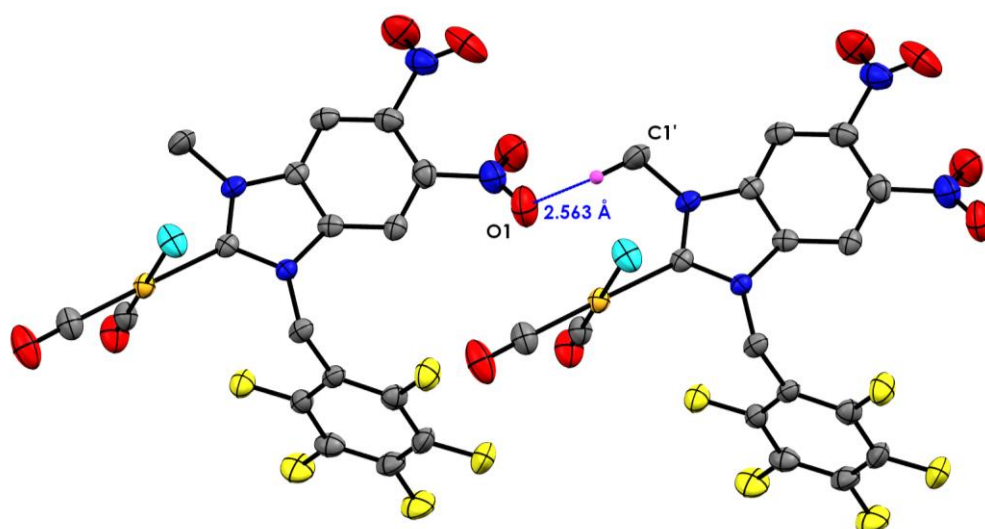


Figura 34. Enlace de hidrógeno $C(1')-H(1')\cdots O(1)$, presente en el complejo 5b.

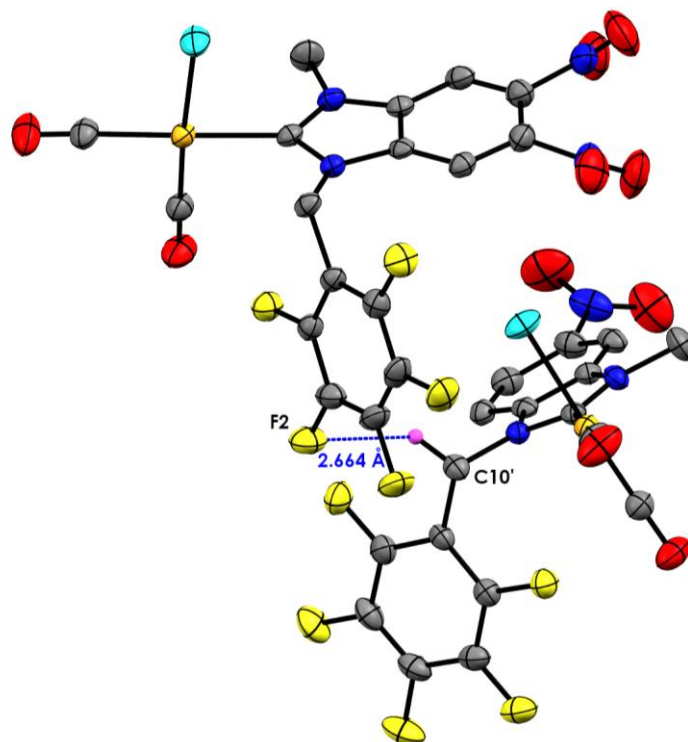


Figura 35. Enlace de hidrógeno C(10')-H(10')...F(2), presente en el complejo 4b. Un grupo nitro fue omitido por claridad.

Además, en la estructura se puede observar al ligante NHC coordinado al Ir (I), dos ligantes carbonilos (CO) y un átomo de cloro completando la esfera de coordinación alrededor del centro metálico (**Figura 36**). El complejo presenta una geometría cuadrada plana ligeramente distorsionada. La longitud de enlace Ir (I)-NHC es 2.055(6) Å. De manera similar observamos el efecto *trans* que ejerce el ligante NHC, en este caso ocasiona que la distancia Ir(I)-CO *trans* al carbeno (1.905(7) Å) sea ligeramente mayor que la distancia Ir(I)-CO *trans* al ligante cloro (1.832(7) Å). Las distancias principales de enlace y los ángulos más representativos se muestran en la (**Tabla 9**).

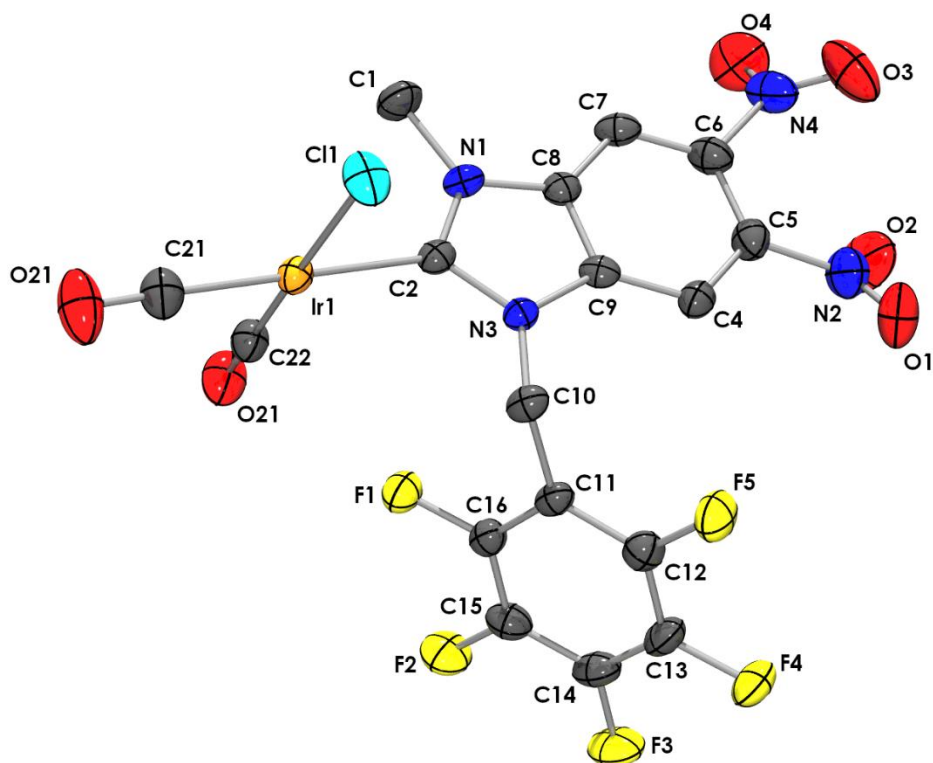


Figura 36. Estructura molecular del complejo 5b. Los elipsoides están representados a 50 % de probabilidad. Los átomos de hidrógeno y las moléculas de benceno fueron omitidos por claridad.

Tabla 9. Distancias de enlace y ángulos selectos para el complejo 5b.

Enlace	Distancia de enlace [Å]	Enlace	Ángulo [°]
Ir(1)-C(2)	2.055(6)	C(2)-Ir(1)-C(21)	177.0(3)
Ir(1)-Cl(1)	2.339(2)	C(2)-Ir(1)-C(22)	92.2(3)
Ir(1)-C(21)	1.905(7)	C(2)-Ir(1)-Cl(1)	84.1(2)
Ir(1)-C(22)	1.832(7)	C(21)-Ir(1)-C(22)	90.4(3)
C(21)-O(21)	1.120(1)	C(2)-Ir(1)-Cl(1)	84.1(2)
C(22)-O(22)	1.140(8)	C(21)-Ir(1)-Cl(1)	93.3(2)
		C(22)-Ir(1)-Cl(1)	175.7(2)
		O(21)-C(21)-Ir(1)	178.1(7)
		O(22)-C(22)-Ir(1)	178.5(6)

c) Análisis de las propiedades electrónicas de los ligantes.

Mediante la ecuación (1) descrita por Nolan⁵⁶ se obtuvieron los valores de TEP para los complejos **5a** y **5b** (2050.3 y 2052.9 cm⁻¹, respectivamente). En la **Figura 37** se muestran estos resultados y valores de compuestos relacionados.

$$TEP = 0.847 \bar{\nu}(CO)[Ir] + 336 \text{ cm}^{-1} \quad (1)$$

Comparando los ligantes **NHC-04**^{56,81} y **NHC-09**⁵⁶ podemos observar que la presencia de un grupo nitro en la posición C⁴ del imidazol influye mucho en las propiedades electrónicas. Sin embargo, en los complejos **5a** y **5b** los grupos nitros en las posiciones 5,6 del benzimidazol no retiran mucha densidad electrónica del anillo, debido a que los valores de TEP se asemejan a imidazoles relacionados. Por ejemplo, al comparar **5b** con **NHC-06**^{56,82} se observa que el carácter electrodonador de estos ligantes es semejante (TEP= 2052.9 y 2053.3 cm⁻¹, respectivamente) y de manera similar ocurre con **5a** (TEP= 2050.3 cm⁻¹), el cual presenta un carácter electrodonador igual a los ligantes **NHC-02**⁸³ y **NHC-03**^{56,84}. Sugiriendo que los efectos de los grupos nitro y el anillo benzofusionado se compensan entre si.

Al comparar los complejos **5a** y **5b** (TEP= 2050.3 y 2052.9 cm⁻¹, respectivamente) se observa que los átomos de fluor invierten la polaridad del anillo bencílico ocasionado que el derivado pentafluorado presente menor capacidad electrodonadora. Lo anterior concuerda con la tendencia observada en los ligantes **NHC-01**¹⁷ y **NHC-06**^{56,82} (TEP= 2041.9 y 2053.3 cm⁻¹, respectivamente).

Comparando los ligantes **5a**, **NHC-05**⁸⁵, **5b**, **NHC-07**⁸⁵ y **NHC-08**⁸⁶ (TEP= 2050.3, 2052.0, 2052.9, 2053.3 y 2055.4 cm⁻¹, respectivamente), se observa que **5a** presenta la mayor capacidad electrodonadora de todos estos derivados de benzimidazolideno. En cuanto al ligante **5b** presenta una capacidad electrodonadora regular.

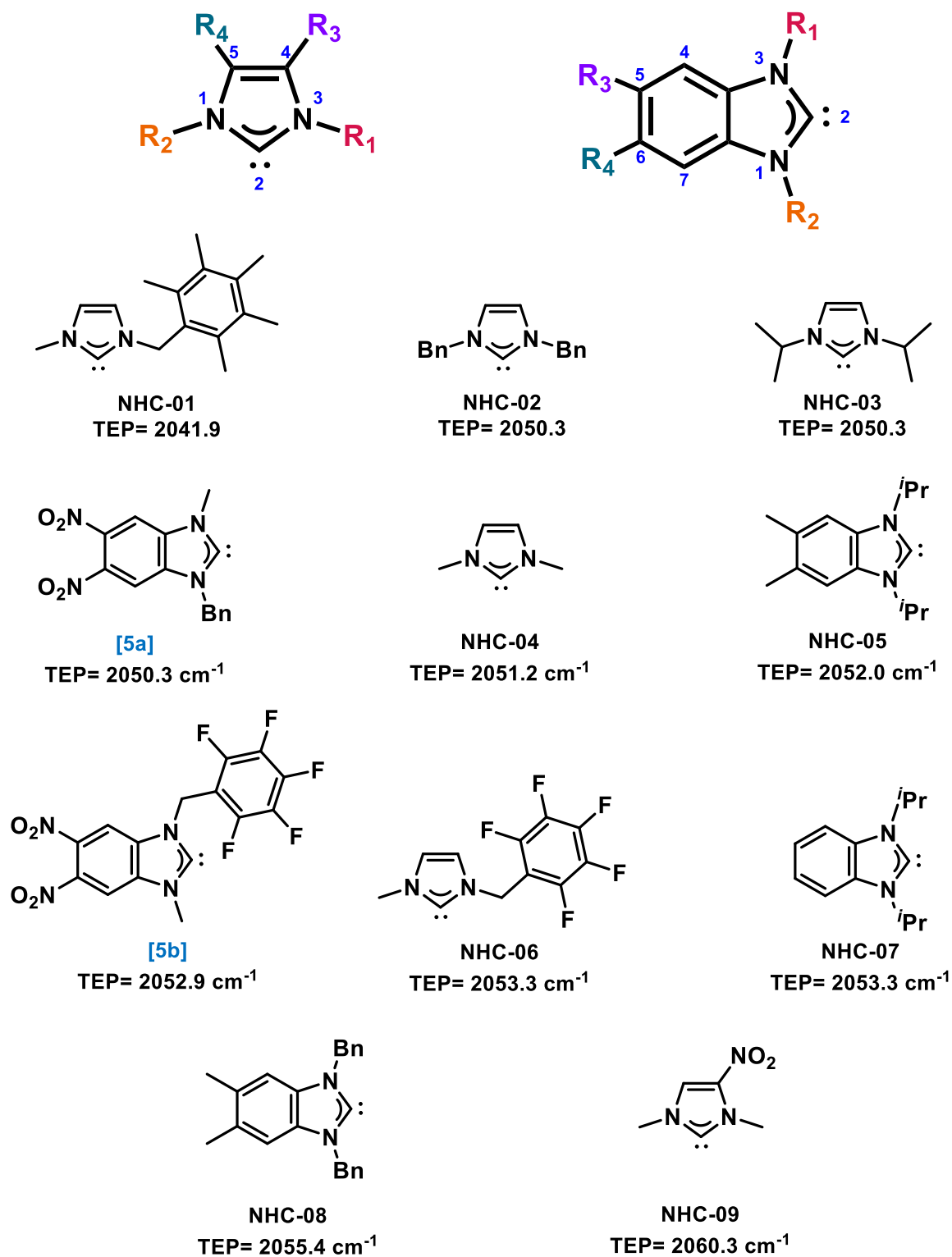


Figura 37. Valores de TEP de los ligandos 5a, 5b y relacionados.

d) Actividad citotóxica de los compuestos.

La evaluación citotóxica preliminar de todos los compuestos se llevó a cabo en cinco líneas celulares de cáncer humano; glioblastoma (U-251) y adenocarcinomas de: próstata (PC-3), colorrectal (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1). Además, se incluyeron células sanas de riñón de mono verde africano (COS-7) con fines comparativos. Se empleó una concentración de 25 μ M de cada uno de los compuestos y DMSO como vehículo. Con la finalidad de comparar los compuestos con un metalofármaco aprobado por la FDA, se evaluó el cisplatino en las mismas condiciones que los compuestos. En la (tabla 10) se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10. Inhibición del crecimiento (%) de las líneas celulares por acción de los compuestos derivados del 5,6-dinitro- benzimidazol empleado una dosis de 25 μ M.

Compuesto	U-251	PC-3	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
2a	6.8	10.5	---	6.4	0.2	2.1
2b	---	30.5	6.6	---	52.7	1.1
3a	100	85.3	100	100	100	86.3
3b	100	100	100	92.7	100	98.3
4a	25.3	99.0	11.2	100	68.7	7.9
4b	75.0	100	100	100	99.0	93.2
5a	---	24.3	13.2	2.0	19.1	3.7
5b	---	13.8	14.7	11.8	32.4	---
Cisplatino	48.4	45.9	36.7	20.3	77.5	42.8

Como se observa en la **Tabla 10**. El compuesto **2a** fue poco activo contra todas las líneas celulares, mientras que el compuesto **2b** inhibió el crecimiento en PC-3 (30.5 %) y SKLU-1 (52.7 %). La única diferencia estructural entre estos compuestos es la presencia del anillo aromático fluorado en **2b**. Por lo tanto, está claro que los átomos de flúor juegan un papel importante en el comportamiento del compuesto.

En cuanto a las sales de azolio **3a** y **3b**, su actividad citotóxica varía de 85.3 a 100 %, siendo ambas más activas que el cisplatino. Desafortunadamente, ambos compuestos **3a** (86.3%) y **3b** (98.3%) fueron muy activos también para COS-7. Curiosamente, la coordinación de Ir(I) a estos compuestos ocasiona una disminución de la inhibición del crecimiento de algunas líneas celulares tumorales.

El compuesto **4a** exhibió inhibición baja en U-251 (25.3%) y HCT-15 (11.2%), mientras que para PC-3, MCF-7 y SKLU-1 exhibió muy buenos resultados, alcanzando un porcentaje de inhibición de hasta 100 %. Afortunadamente, el porcentaje de crecimiento de inhibición para la línea celular sana COS-7 fue bajo (7.9%). En contraste, el complejo fluorado **4b** fue muy activo en todas las líneas celulares evaluadas, incluyendo COS-7.

El complejo **4a** presenta mayor actividad antiproliferativa en las líneas PC-3 (99 %) y MCF-7 (100 %), mientras que el cisplatino solamente inhibe el 45.9 % y 20.3 %, respectivamente. En SKLU-1 ambos compuestos presentan actividades similares (68.7 %, **4a** y 77.5 %, cisplatino). La principal ventaja **4a** es la inactividad hacia células sanas (7.9 %) a diferencia del cisplatino (42.8 %).

Tomando en cuenta todo lo anterior, se decidió determinar la IC_{50} del compuesto **4a** en tres líneas celulares tumorales humanas. Así, el compuesto **4a** exhibió una buena citotoxicidad contra PC-3 ($10.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$), MCF-7 ($15.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$) y SKLU-1 ($10.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$), proporcionando valores en la escala micromolar. Estos valores son similares a los encontrados para el cisplatino, (8.4 ± 0.8 , 5.5 ± 0.5 y $4.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ para PC-3, MCF-7 y SKLU-1), pero con menor toxicidad contra las células sanas.

Es interesante mencionar que al intercambiar el ligante COD por CO se produce una disminución de la actividad citotóxica en todas las líneas celulares, como lo muestran los resultados obtenidos para los complejos **5a** y **5b**. Esto puede deberse a que el ligante CO forma enlaces muy fuertes con Ir(I), evitando la creación de sitios de coordinación que son esenciales para la actividad citotóxica de los complejos.

e) Actividad Antioxidante *in vivo* de los complejos mediante TBARS

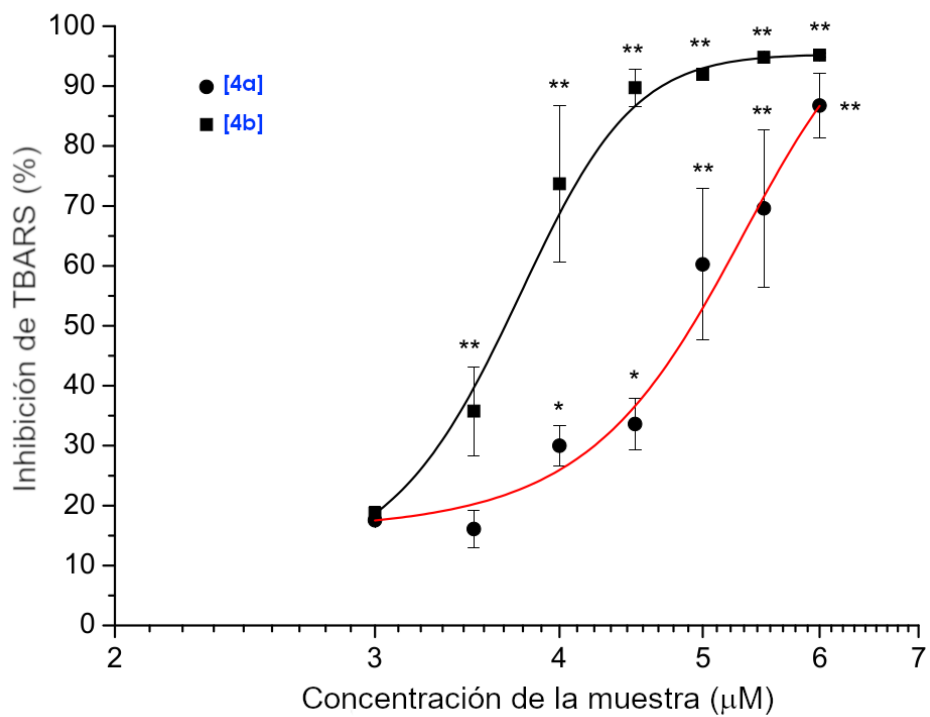
La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un proceso carcinogénico importante a través de la activación de la proliferación celular y vías de señalización relacionadas con el crecimiento.⁸⁷ Por lo tanto, debido a la relevancia de este proceso y al hecho de que es posible que los complejos participen en procesos redox relevantes, se evaluó las propiedades antioxidantes de los complejos **4a** y **4b**, empleando la técnica de especies reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), la cual implica la producción de ROS con FeSO₄ en presencia de lípidos obtenidos del cerebro de rata.⁸⁸ Se encontró que ninguno de los complejos (**4a** y **4b**) produce ROS. Todo lo contrario, los compuestos presentaron buenas propiedades antioxidantes (**Tabla 11**). Para completar el bioensayo y poder comparar la actividad antioxidante de los compuestos, se determinaron los valores de IC₅₀, los cuales resultaron semejantes 4.99 ± 0.19 μM para **4a** y 3.74 ± 0.12 μM para **4b**. Como se puede observar el compuesto **4b** presenta una mejor actividad antioxidante y se puede afirmar que los átomos de flúor juegan un papel importante en el comportamiento del compuesto. Ambos compuestos presentaron una actividad antioxidante alta, inclusive mayor que α-tocoferol (**6.78 ± 2.16**).

Correlacionando los bioensayos, se propone que el mecanismo de acción de los complejos **4a** y **4b** no se encuentra mediado por especies reactivas de oxígenos. Lo que probablemente ocurra es una interacción con el citocromo c, esta interacción ocasiona alteraciones metabólicas y se encuentra asociada con la actividad antiproliferativa. Esta unión produce que los complejos se oxiden de Ir(I) a Ir(III) con la pérdida de sus respectivos ligantes (Cl y COD), mediante este mecanismo se explicarían las buenas propiedades citotóxicas y antioxidantes de los compuestos, todo lo anterior concuerda con lo reportado por el Dr. Nils Metzler-Nolte para este tipo de compuestos.

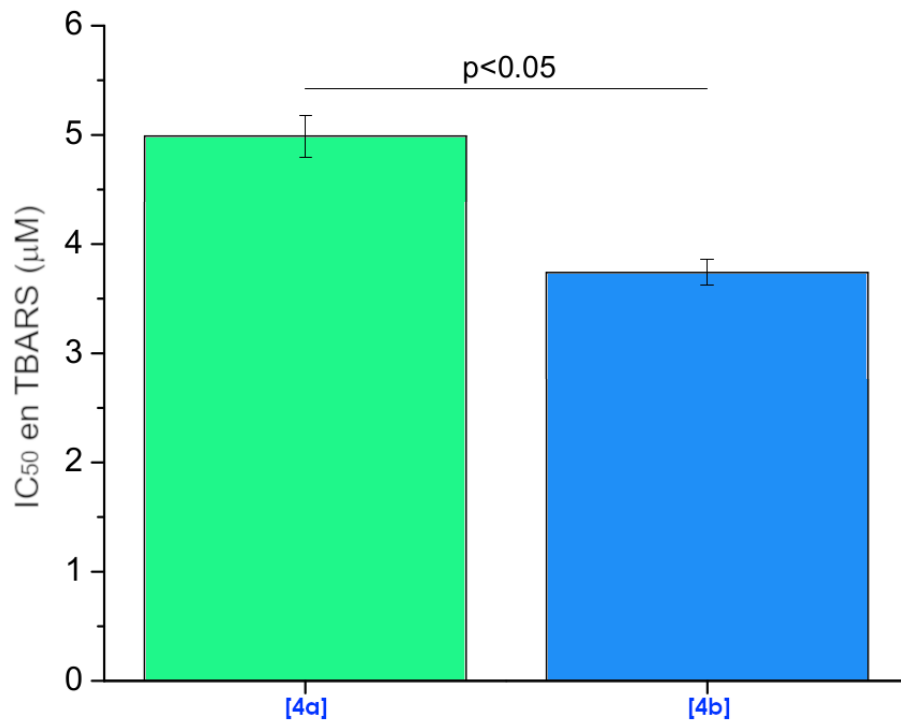
Tabla 11. Determinación de Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.

Compuesto	Concentración (μM)	TBARS (nmol/mg prot.)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)
4a (n=3)	Basal	0.273±0.005		
	Control	8.305±0.055		
	3	6.848±0.068	17.54±0.35	
	3.5	6.966±0.233	16.09±3.08	
	4	5.812±0.238*	29.98±3.31	4.99±0.19
	4.5	5.511±0.330*	33.59±4.31	
	5	3.289±1.034**	60.24±12.63	
	5.5	2.512±1.082**	69.58±13.2	
	6	1.094±0.435**	86.76±5.35	
4b (n=3)	Basal	0.273±0.005		
	Control	8.305±0.055		
	3	6.751±0.099	18.7±1.14	
	3.5	5.328±0.592**	35.77±7.39	3.74±0.12
	4	2.171±1.062**	73.7±13.01	
	4.5	0.852±0.251**	89.71±3.1	
	5	0.665±0.078**	91.98±0.99	
	5.5	0.430±0.028**	94.81±0.37	
	6	0.402±0.025**	95.16±0.31	
BHT (n=3)	Basal	0.268±0.053		
	Control	7.384±0.630		
	0.56	6.098±0.353	16.64±2.86	
	0.75	5.559±0.294*	23.92±2.69*	1.22±0.44
	1	4.457±0.283**	37.14±7.44**	
	1.33	3.228±0.572**	53.59±8.93**	
	1.78	1.315±0.489**	81.59±6.89**	
	2.37	0.487±0.075**	93.16±1.16**	
α-Tocoferol (n= 4)	Basal	0.200±0.011		
	Control	6.589±0.213		
	0.32	6.048±0.242	8.26±1.31	
	1	5.211±0.332*	21.13±2.56*	6.78±2.16
	3.16	3.676±0.569**	44.84±6.74**	
	10	2.725±0.335**	59.00±3.71**	
	31.62	1.849±0.319**	72.30±3.87**	
100	1.408±0.364**	79.09±4.79**		

Los valores representan el promedio de tres o cuatro experimentos independientes ± error estándar de la media ($\bar{x} \pm ES$). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de un apueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control. Los valores de IC₅₀ se analizaron con una prueba de t de Student, el valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo.



Gráfica 1. Curva dosis-respuesta (TBARS) de los complejos 4a y 4b.



Gráfica 2. Prueba t de Student de los valores de IC₅₀ de los complejos 4a y 4b.

VII. CONCLUSIONES

En resumen, se han sintetizado y caracterizado una serie novedosa de complejos NHC de Ir (I) derivados del 5,6-dinitrobenzimidazol. Las estructuras moleculares de los compuestos **4a**, **4b** y **5b** se determinaron inequívocamente mediante difracción de rayos X de monocristal; en ellas se observan los correspondiente ligantes NHC coordinados al Ir (I) y la geometría típica de un metal con configuración d^8 . Además, se estudiaron las interacciones no covalentes a lo largo de la red cristalina de los compuestos, en donde se encontró la existencia de varios puentes de hidrógeno formados por los átomos de: cloro, oxígeno y flúor; también se observaron las diversas interacciones de apilamiento del tipo π - π entre los anillos aromáticos. Por otro lado, se estudió las propiedades electrodonadoras de los ligantes mediante el parámetro TEP; observando que los grupos nitro en las posiciones 5,6 no disminuyen el carácter electrodonador de los ligantes, inclusive el ligante **5a** es más electrodonador que varios benzimidazolidenos.

En cuanto al bioensayo de citotoxicidad *in vitro*, se demostró que la presencia de átomos de flúor en el *N*-sustituyente aumenta la inhibición del crecimiento de las líneas celulares tumorales humanas. Sin embargo, disminuye la selectividad, inhibiendo el crecimiento de células sanas (COS-7). Se observó que la coordinación del NHC a IrCl(COD) favorece la selectividad hacia las líneas celulares cancerosas en comparación con el precursor del ligante NHC. Interesantemente, el intercambio del ligante COD por CO produce una disminución en la actividad citotóxica. El complejo **4a** inhibió el crecimiento en PC-3, MCF-7 y SKLU-7 en 99.0%, 100% y 68.7%, respectivamente, y fue inactivo para células sanas (COS-7). Además, los valores de IC_{50} de **4a** para PC-3 ($10.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$), MCF-7 ($15.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$) y SKLU-7 ($10.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$) se encuentran en la escala micromolar. Finalmente, se probó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los complejos **4a** y **4b**, demostrando que (en el modelo TBARS) ambas especies no producen ROS, sino que tienen propiedades antioxidantes, incluso mejores que el α -tocoferol, siendo **4a** el mejor en estos ensayos, este compuesto representa un buen candidato para realizar más estudios, algunos de los cuales actualmente están en desarrollo en nuestro laboratorio.

VIII. SECCIÓN EXPERIMENTAL

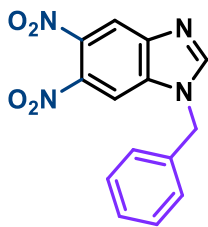
Los reactivos empleados fueron adquiridos de Merck-Sigma-Aldrich®, y fueron utilizados sin ninguna purificación adicional. El curso de las reacciones se monitoreo mediante cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatofolios de gel de sílice Alugram® SIL G/UV254 como fase estacionaria, las placas fueron reveladas empleando radiación ultravioleta 254/366 nm. En la técnica de cromatografía en columna se empleó sílica gel (malla 70-230) como fase estacionaria. Los espectros de RMN de ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ fueron adquiridos en un equipo Bruker 500 Avance III HD., empleando (Tetrametilsilano) TMS como referencia interna y como disolventes se empleó CDCl_3 , DMSO-d_6 y Acetona- d_6 . Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) a partir del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz. Para indicar la multiplicidad de las señales de ^1H RMN se utilizó la siguiente nomenclatura: (s) señal simple, (d) señal doble, (brs) señal simple ancha y (m) señal múltiple. Los espectros de masas fueron adquiridos en los siguientes equipos: JEOL, JMS-700 (FAB-MS), Bruker Microflex (MALDI-TOF) y LC-Mass Agilent 1200-Bruker Esquire 6000 (ESI-IT) y las señales se encuentran reportadas en m/z . Los análisis elementales se realizaron en un aparato Thermo Scientific/Flash 2000, usando una microbalanza Mettler Toledo XP6 y sulfanilamida como estándar. Los puntos de fusión se determinaron en un Mel-Temp Digital Melting Point apparatus usando tubos capilares abiertos con una resolución de ± 1 °C.

a) Síntesis y caracterización de los compuestos

- Procedimiento general de síntesis de los compuestos 2a-b

A una disolución de 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol (1 eq.) en acetonitrilo (100 mL) se añadió carbonato de potasio (1.5 eq.) y el correspondiente bromuro de bencilo (1.2 eq.). La mezcla de reacción fue calentada a 80 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, la reacción fue enfriada a temperatura ambiente y posteriormente filtrada a través de celita®. Finalmente, el filtrado fue concentrado en el rotavapor y el producto crudo fue lavado varias veces con éter dietílico para obtener los compuestos [2a](#) y [2b](#).

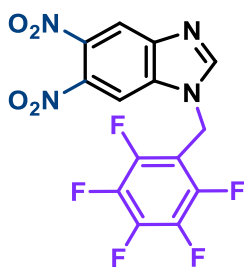
- 1-bencil-5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol **2a**



2a

Para la síntesis de **2a** se emplearon los siguientes reactivos: Bromuro de bencilo (1.3 mL, 10.6 mmol), 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2.0 g, 9.6 mmol) y K₂CO₃ (1.9 g, 14.4 mmol). Obteniendo 2.5 g (87 % Rendimiento) de 1-bencil-5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol como un sólido beige, p.f. 173-174 °C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (s, 1H, CH_{BIm}), 8.28 (s, 1H, CH_{BIm}), 7.86 (s, 1H, CH_{BIm}), 7.41 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.21 (m, 2H, CH_{Ar}), 5.46 (s, 2H, -CH₂-); ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 149.4 (NCHN), 145.1 (C_{BIm}), 139.8 (C_{BIm}), 139.7 (C_{BIm}), 134.8 (C_{BIm}), 133.3 (C_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 118.3 (CH_{BIm}), 108.4 (CH_{BIm}), 50.1 (-CH₂-). E.M. (I.E.+): *m/z* 298 [M]⁺. A.E. Calculado para C₁₄H₁₀N₄O₄: C, 56.38; H, 3.38; N, 18.78. Encontrado: C, 56.10; H, 3.35; N, 18.70.

- 5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol **2b**



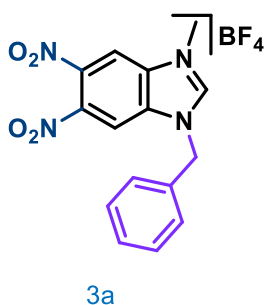
2b

Para la síntesis de **2b** se emplearon los siguientes reactivos: bromuro de 2,3,4,5,6-pentafluorobencilo (1.3 mL, 8.4 mmol), 5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol (1.5 g, 7.2 mmol) y K₂CO₃ (1.49 g, 10.8 mmol). Obteniendo 2.4 g (86 % Rendimiento) de 5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol como un sólido blanco, p.f. 212-213 °C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.83 (s, 1H, CH_{BIm}), 8.60 (s, 1H, CH_{BIm}), 8.59 (s, 1H, CH_{BIm}), 5.89 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.2 (NCHN), 146.3 – 145.8 (m, CF_{Ar}), 144.2 – 144.1 (m, CF_{Ar}), 144.0 (C_{BIm}), 142.5 – 141.5 (m, CF_{Ar}), 140.3 – 139.6 (m, CF_{Ar}), 138.7 (C_{BIm}), 138.3 (C_{BIm}), 138.2 – 138.0 (m, CF_{Ar}), 136.7 – 135.7 (m, CF_{Ar}), 134.5 (C_{BIm}), 117.5 (CH_{BIm}), 109.7 (CH_{BIm}), 109.1 (t, ³J_{C-F} = 17.4 Hz, C_{Ar}), 36.5 (-CH₂-). E.M. (I.E.+): *m/z* 388 [M]⁺. A.E. Calculado para C₁₄H₅F₅N₄O₄: C, 43.31; H, 1.30; N, 14.43. Encontrado: C, 43.69; H, 1.21; N, 14.44.

- Procedimiento general de síntesis de los compuestos 3a-b.

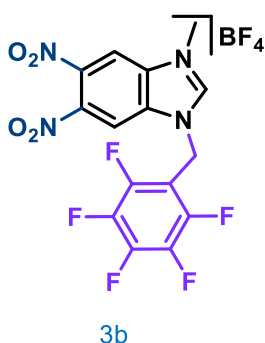
A una disolución de **2a** o **2b** (1 eq.) en 1,2-dicloroetano (50 mL) se adicionó tetrafluoroborato de trimetiloxonio (1.6 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 48 h. a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción fue enfriada a 0 °C y el producto fue colectado mediante filtración.

- Tetrafluoroborato de 1-bencil-3-metil-5,6-dinitro-1*H*-benzo[*d*]imidazolio **3a**



Para la síntesis de **3a** se emplearon los siguientes reactivos: **2a** (1.2 g, 4.0 mmol) y tetrafluoroborato de trimetiloxonio (1.0 g, 6.4 mmol). Obteniendo 1.3 g (81 % Rendimiento) de **3a** como un sólido blanco, p.f. 200-201 °C. ¹H RMN (500 MHz, Acetona-*d*₆) δ 10.06 (s, 1H, NCHN), 9.08 (s, 1H, CH_{BIm}), 8.98 (s, 1H, CH_{BIm}), 7.65 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.46 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.08 (s, 2H, -CH₂-), 4.46 (s, 3H, -CH₃). ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, Acetona-*d*₆) δ 150.2 (NCHN), 142.5 (C_{BIm}), 142.4 (C_{BIm}), 135.1 (C_{BIm}), 133.7 (C_{BIm}), 133.5 (C_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 114.1 (CH_{BIm}), 113.9 (CH_{BIm}), 52.7 (-CH₂-), 35.5 (-CH₃). E.M. (ESI⁺-IT): *m/z* 313.1 [M-BF₄]⁺. A.E. Calculado para C₁₅H₁₃BF₄N₄O₄: C, 45.03; H, 3.28; N, 14.00. Encontrado: C, 44.94; H, 3.25; N, 13.94.

- Tetrafluoroborato de 3-metil-5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1*H*-benzo[*d*]imidazolio **3b**

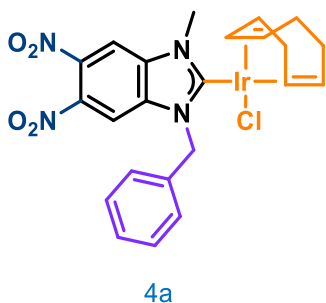


Para la síntesis de **3b** se emplearon los siguientes reactivos: **2b** (1.0 g, 2.6 mmol) y tetrafluoroborato de trimetiloxonio (0.6 g, 4.1 mmol). Obteniendo 1.1 g (87 % Rendimiento) de **3b** como un sólido blanco, p.f. 248-250 °C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.14 (s, 1H, NCHN), 9.19 (m, 2H, CH_{BIm}), 6.08 (s, 2H, -CH₂-), 4.15 (s, 3H, -CH₃). ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.4 (NCHN), 146.8 – 147.1 (m, CF_{Ar}), 144.9 – 145.1 (m, CF_{Ar}), 142.8 – 143.1 (m, CF_{Ar}), 141.1 (C_{BIm}), 140.9 (C_{BIm}), 138.3 – 138.7 (m, CF_{Ar}), 136.4 – 136.7 (m, CF_{Ar}), 133.6 (C_{BIm}), 132.3 (C_{BIm}), 113.8 (CH_{BIm}), 113.5 (CH_{BIm}), 107.71 – 107.26 (m, C_{Ar}), 39.1 (-CH₂-), 35.1 (-CH₃). E.M. (MALDI-TOF): *m/z* 403.22 [M-BF₄]⁺. A.E. Calculado para C₁₅H₈BF₉N₄O₄: C, 36.76; H, 1.65; N, 11.43. C, 36.86; H, 1.55; N, 11.41.

- Procedimiento general de síntesis de los complejos NHC-Ir(I) 4a-b

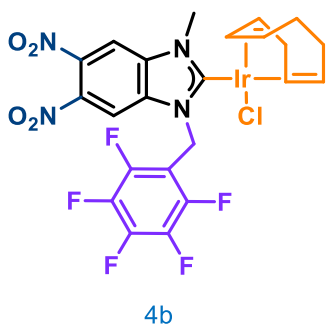
A una solución de Ag₂O (0.5 eq.) y la correspondiente sal de azolio **3a** o **3b** (1 eq.) en acetonitrilo (50 mL) fue agitada protegida de la luz durante 12 h. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionó [IrCl(COD)]₂ (0.5 eq.). La mezcla de reacción continuó con agitación durante 2h. más. Posteriormente, fue filtrada a través de celita® y el filtrado fue concentrado. El producto crudo fue purificado mediante la técnica de cromatografía en columna empleado silica gel y 1,2-dicloroetano como eluyente.

- Complejo 4a



Para la síntesis de 4a se emplearon los siguientes reactivos: Ag₂O (29 mg, 0.13 mmol), 3a (100 mg, 0.25 mmol) y [IrCl(COD)]₂ (49 mg, 0.13 mmol). Obteniendo 32.4 mg (20 % Rendimiento) de 4a como un sólido amarillo brillante, p.f. 201-206 °C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.43 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.40–7.37 (m, 5H, CH_{Ar}), 6.36 (d, ²J_{H-H}= 15.6 Hz, 1H, CH₂), 5.91 (d, ²J_{H-H}= 15.6Hz, 1H, -CH₂-), 4.96 (br s, 2H, CH_{COD}), 4.35 (s, 3H, -CH₃), 3.08–3.00 (m, 1H, CH_{COD}), 2.91–2–86 (m, 1H, CH_{COD}), 2.41–2.23 (m, 3H, CH₂ COD), 2.19–2.09 (m, 1H, CH₂ COD), 1.99–1.87 (m, 2H, CH₂ COD), 1.87–1.78 (m, 1H, CH₂ COD), 1.73–1.65 (m, 1H, CH₂ COD). ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 202.9 (Ir-C_{carbeno}), 139.1 (C_{Bim}), 138.9 (C_{Bim}), 136.8 (C_{Bim}), 135.5 (C_{Bim}), 133.7 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 107.7 (CH_{Bim}), 106.4 (CH_{Bim}), 91.4 (CH_{COD}), 91.2 (CH_{COD}), 53.8 (CH_{COD}), 53.6 (CH_{COD}), 53.5 (-CH₂-), 35.4 (-CH₃), 33.7 (CH₂ COD), 33.1 (CH₂ COD), 29.4 (CH₂ COD), 28.9 (CH₂ COD). E.M. (FAB⁺): *m/z* 648.0 [M]⁺. A.E. Calculado para C₂₃H₂₄ClIrN₄O₄: C, 42.62; H, 3.73; N, 8.64. Encontrado: C, 42.80; H, 3.68; N, 8.63. Valor de R.f. en CCF (SiO₂; 1,2-dicloroetano): 0.15.

- Complejo 4b

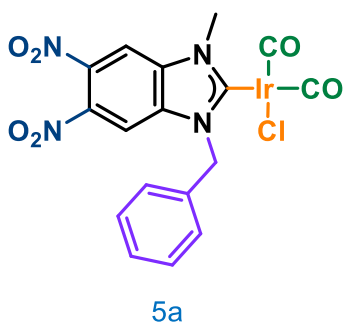


Para la síntesis de 4b se emplearon los siguientes reactivos: Ag₂O (24 mg, 0.10 mmol), 3b (100 mg, 0.20 mmol) y [IrCl(COD)]₂ (40 mg, 0.10 mmol). Obteniendo 36.8 mg (24 % Rendimiento) de 4b como un sólido amarillo brillante, p.f. 223–227 °C. ¹H RMN (500 MHz, Acetona-d₆) δ 8.68 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.46 (s, 1H, CH_{Bim}), 6.17 (d, ²J_{H-H}= 16.0 Hz, 1H, -CH₂-), 5.99 (d, ²J_{H-H}= 16.0Hz, 1H, -CH₂-), 4.60–4.42 (m, 2H, CH_{COD}), 4.41 (s, 3H, -CH₃), 3.26–3.19 (m, 1H, CH_{COD}), 3.05–3.01 (m, 1H, CH_{COD}), 2.45–2.31 (m, 2H, CH₂ COD), 2.30–2.21 (m, 1H, CH₂ COD), 2.19–2.08 (m, 1H, CH₂ COD), 2.01–1.92 (m, 1H, CH₂ COD), 1.88–1.82 (m, 1H, CH₂ COD), 1.73–1.65 (m, 1H, CH₂ COD), 1.65–1.55 (m, 1H, CH₂ COD). ¹³C{¹H} RMN (125 MHz, Acetona-d₆) δ 202.9 (Ir-C_{carbeno}), 147.0–146.8 (m, CF_{Ar}), 145.1–149.8 (m, CF_{Ar}), 142.5–142.1 (m, CF_{Ar}), 140.5–139.9 (m, CF_{Ar}), 139.1 (C_{Bim}), 138.9 (C_{Bim}), 138.9–138.5 (m, CF_{Ar}), 136.9 (C_{Bim}), 136.9–136.6 (m, CF_{Ar}), 136.1 (C_{Bim}), 111.–110.6 (m, C_{Ar}), 108.1 (CH_{Bim}), 107.9 (CH_{Bim}), 89.6 (CH_{COD}), 89.3 (CH_{COD}), 54.6 (CH_{COD}), 51.2 (CH_{COD}), 40.0 (-CH₂-), 35.6 (-CH₃), 34.3 (CH₂ COD), 32.0 (CH₂ COD), 29.3 (CH₂ COD), 27.6 (CH₂ COD). E.M. (FAB⁺): *m/z* 738.0 [M]⁺. A.E. Calculado para C₂₃H₁₉ClF₅IrN₄O₄: C, 37.43; H, 2.59; N, 7.59. Encontrado: C, 37.55; H, 2.57; N, 7.60. Valor de R.f. en CCF (SiO₂; 1,2-dicloroetano): 0.15.

- Procedimiento general de síntesis de los complejos NHC-Ir(I) 5a-b

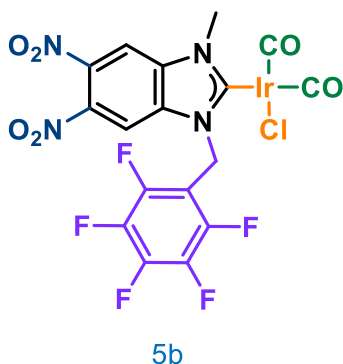
Una disolución del correspondiente complejo NHC-Ir (I) 4a o 4b (100 mg) en 1,2-dicloroetano (20 mL) fue enfriada a 0 °C mediante un baño de hielo. Posteriormente, con agitación magnética se burbujeó monóxido de carbono durante 50 minutos. Trascorrido este tiempo, la mezcla de reacción fue concentrada en el rotavapor hasta sequedad. Finalmente, el compuesto deseado fue precipitado (diclorometano-hexano) y colectado mediante filtración a vacío.

- Complejo 5a



Para la síntesis de 5a se partió de 100 mg (0.15 mmol) de 4a. Obteniendo 65.6 mg (71 % Rendimiento) del compuesto deseado como un sólido amarillo pálido, p.f. 123–124 °C (descomposición). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.06 (s, 1H, CH_{BIm}), 7.73 (s, 1H, CH_{BIm}), 7.42–7.36 (m, 5H, CH_{Ar}), 6.05–5.96 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.32 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 193.9 (Ir- $\text{C}_{\text{carbena}}$), 180.2 (CO), 167.3 (CO), 140.3 (C_{BIm}), 140.2 (C_{BIm}), 136.0 (C_{BIm}), 134.7 (C_{BIm}), 132.9 (C_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 109.7 (CH_{BIm}), 108.7 (CH_{BIm}), 54.3 ($-\text{CH}_2-$), 36.6 ($-\text{CH}_3$). E.M. (FAB⁺): m/z 596 [M]⁺. A.E. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClIrN}_4\text{O}_6$: C, 34.26; H, 2.03; N, 9.40. Encontrado: C, 34.29; H, 2.12; N, 9.61.

- Complejo 5b



Para la síntesis de 5b se partió de 100 mg (0.14 mmol) de 4b. Obteniendo 70.9 mg (76 % Rendimiento) del compuesto deseado como un sólido amarillo pálido, p.f. 130–132 °C (descomposición). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (s, 1H, CH_{BIm}), 8.03 (s, 1H, CH_{BIm}), 6.24 (d, $^2J_{\text{H-H}} = 15.8$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$), 5.63 (d, $^2J_{\text{H-H}} = 15.8$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$), 4.30 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 195.3 (Ir- $\text{C}_{\text{carbena}}$), 179.9 (CO), 167.0 (CO), 146.7–146.6 (m, CF_{Ar}), 144.8–144.5 (m, CF_{Ar}), 140.6 (C_{BIm}), 140.5 (C_{BIm}), 139.5–138.9 (m, CF_{Ar}), 137.4–137.0 (m, C_{Ar}), 135.4 (C_{BIm}), 134.8 (C_{BIm}), 109.1 (CH_{BIm}), 108.6 (CH_{BIm}), 42.1 ($-\text{CH}_2-$), 37.0 ($-\text{CH}_3$). E.M. (FAB⁺): m/z 686 [M]⁺. A.E. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_7\text{ClF}_5\text{IrN}_4\text{O}_6$: C, 29.77; H, 1.03; N, 8.17. Encontrado: C, 29.76; H, 1.10; N, 8.52.

b) Evaluación Citotóxica.

Las líneas celulares que se utilizan en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química (I.Q.), pertenecen al panel del NCI (Instituto Nacional del Cáncer, de los EUA), 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 el tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 12. Líneas celulares cancerosas empleadas en el I.Q.

Línea celular	Órgano de origen	Tiempo de duplicación (h.)	Células/pozo
U-251	S.N.C.	25.4	7 500
PC-3	Próstata	28.7	7 500
HCT-15	Colon	18.1	10 000
MCF-7	Mama	25.6	5 000
SKLU-1	Pulmón	25.4	7 500

TCA: ácido tricloroacético, S.N.C.: sistema nervioso central)

Las líneas celulares 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 adicionan 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 colectarlas. De la suspensión se toman 50 µl del inóculo y se resuspenden en 50 µl de azul de tripano (colorante vital) y la cuenta de viabilidad se realiza en un contador automatizado Bio-Rad. Una vez determinado el número de células por mL, se deposita el inóculo en un volumen de 100 µl/pozo a la densidad celular. 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. Para un cernimiento primario (screening) de un compuesto se prueba la concentración de 25 µM. Todas las muestras son solubilizadas en dimetil sulfoxido (DMSO) 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%, incubadas a 4 °C por 1 h. 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 se realiza con 100 µl de una solución al 0.4% de SRB e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida con 3 lavados con ácido acético al 1% y se dejan secar al ambiente. Las placas teñidas se les agrega 100 µl de un buffer de tris y se agitan por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación, se mide la DO en un lector de microplacas 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 % de inhibición del crecimiento (% IC) se calcula con la siguiente expresión:⁸⁹

$$\% IC = 100 - \frac{100 (DO_t - DO_b)}{DO_c - DO_b}$$

c) Actividad Antioxidante *in vivo* (TBARS)

- Animales.

Se emplearon ratas Wistar macho (200-250 g) provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El cuidado y manejo se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los animales se mantuvieron a 23 ± 2 °C con un fotoperiodo 12/12 horas luz/oscuridad y con acceso libre al alimento y agua.

- Preparación del homogeneizado de rata.

El sacrificio se realizó evitando dolor innecesario. Las ratas se sacrificaron con CO₂. Rápidamente el cerebro completo se disectó y se homogeneizó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (0.2 g de KCl, 0.2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl, and 2.16 g de NaHPO₄·7H₂O /L, pH 7.4) como se reporta previamente^{90,91} para obtener un homogeneizado 1/10 peso/volumen. Después, el homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 800 fcr (fuerza centrífuga relativa), se recuperó el sobrenadante y se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry (21) para finalmente ajustarlo a 2.666 mg/ml con PBS.

- Inducción de la peroxidación de lípidos y cuantificación de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

Como índice de peroxidación de lípidos, fueron medidos los niveles de TBARS usando homogeneizado de cerebro de rata de acuerdo con el método descrito por Ng et al.⁹², con algunas adaptaciones. A 375 µl de sobrenadante se le adicionaron 50 µl de EDTA 20 mM, 25 µl de la muestra disuelta en DMSO (grupo control 25 µl de DMSO) y se incubaron 30 min a 37 °C. Para inducir la peroxidación de lípidos se agregaron 50 µl de una solución fresca de FeSO₄ 100 µM (concentración final 10 µM), la mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. El contenido de TBARS se determinó de acuerdo con lo descrito por Ohkawa et al.⁹³, con algunas modificaciones. Se agregaron a cada tubo 500 µl de reactivo TBA (mezcla 1:1 de ácido 2-tiobarbitúrico al 0.5% disuelto en NaOH 0.05 N y ácido tricloroacético al 30%), la mezcla se incubó en baño de hielo por 10 min. Después, se centrifugó 5 min a 13400 fcr y finalmente se calentó a 80 °C durante 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a 540 nm de 200 µl del sobrenadante, en un lector de placas Bio-Tek modelo ELx808. La concentración de TBARS se calculó por interpolación en una curva estándar de tetrametoxipropano (TMP) como precursor de malondialdehído (MDA)⁹⁴. Los resultados se expresaron como nmol de TBARS por mg de proteína. La relación de inhibición (R_i [%]) se calculó con la siguiente fórmula $R_i = (C-E) * 100 / C$, en donde C es la densidad óptica del grupo control y E la densidad óptica de la muestra probada. Como estándar positivo se emplearon hidroxitolueno butilado (BHT por sus siglas en inglés) y alfa tocoferol.

Los resultados se reportan como la media ± error estándar de la media (ESM). Los datos se analizaron mediante una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa.

IX. REFERENCIAS

- (1) Springer. Chemistry for a better future | Grand Challenges at Springer Nature <https://grandchallenges.springernature.com/users/70417-springer/posts/39522-chemistry-for-a-better-future> (accessed Jul 17, 2019).
- (2) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (3) Johnstone, T. C.; Park, G. Y.; Lippard, S. J. Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs--Phenanthriplatin. *Anticancer Res.* **2014**, *34* (1), 471–476.
- (4) Shen, D.-W.; Pouliot, L. M.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64* (3), 706–721. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005637>.
- (5) Breglio, A. M.; Rusheen, A. E.; Shide, E. D.; Fernandez, K. A.; Spielbauer, K. K.; McLachlin, K. M.; Hall, M. D.; Amable, L.; Cunningham, L. L. Cisplatin Is Retained in the Cochlea Indefinitely Following Chemotherapy. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01837-1>.
- (6) Meier-Menches, S. M.; Gerner, C.; Berger, W.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. Structure-Activity Relationships for Ruthenium and Osmium Anticancer Agents-towards Clinical Development. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (3), 909–928. <https://doi.org/10.1039/c7cs00332c>.
- (7) Zeng, L.; Gupta, P.; Chen, Y.; Wang, E.; Ji, L.; Chao, H.; Chen, Z.-S. The Development of Anticancer Ruthenium(II) Complexes: From Single Molecule Compounds to Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (19), 5771–5804. <https://doi.org/10.1039/c7cs00195a>.
- (8) Konkankit, C. C.; Marker, S. C.; Knopf, K. M.; Wilson, J. J. Anticancer Activity of Complexes of the Third Row Transition Metals, Rhenium, Osmium, and Iridium. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (30), 9934–9974. <https://doi.org/10.1039/c8dt01858h>.
- (9) Lappert, M. F. Contributions to the Chemistry of Carbenometal Chemistry. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690* (24–25), 5467–5473. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.07.066>.
- (10) Wang, W.; Cui, L.; Sun, P.; Shi, L.; Yue, C.; Li, F. Reusable N-Heterocyclic Carbene Complex Catalysts and Beyond: A Perspective on Recycling Strategies. *Chem. Rev.*

2018, *118* (19), 9843–9929. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00057>.

- (11) Kumar, S. Recent Advances in the Schiff Bases and N-Heterocyclic Carbenes as Ligands in the Cross-Coupling Reactions: A Comprehensive Review. *J. Heterocycl. Chem.* **2019**, *56* (4), 1168–1230. <https://doi.org/10.1002/jhet.3504>.
- (12) Ray, S.; Mohan, R.; Singh, J. K.; Samantaray, M. K.; Shaikh, M. M.; Panda, D.; Ghosh, P. Anticancer and Antimicrobial Metallopharmaceutical Agents Based on Palladium, Gold, and Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (48), 15042–15053. <https://doi.org/10.1021/ja075889z>.
- (13) Hindi, K.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J. ChemInform Abstract: The Medicinal Applications of Imidazolium Carbene-Metal Complexes. *ChemInform* **2009**, *40* (48), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.200948269>.
- (14) Oehninger, L.; Rubbiani, R.; Ott, I. N-Heterocyclic Carbene Metal Complexes in Medicinal Chemistry. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (10), 3269–3284. <https://doi.org/10.1039/c2dt32617e>.
- (15) Liu, W.; Gust, R. Metal N-Heterocyclic Carbene Complexes as Potential Antitumor Metallodrugs. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (2), 755–773. <https://doi.org/10.1039/c2cs35314h>.
- (16) Gautier, A.; Cisnetti, F. Advances in Metal-Carbene Complexes as Potent Anti-Cancer Agents. *Metallomics* **2012**, *4* (1), 23–32. <https://doi.org/10.1039/c1mt00123j>.
- (17) Gothe, Y.; Marzo, T.; Messori, L.; Metzler-Nolte, N. Iridium(I) Compounds as Prospective Anticancer Agents: Solution Chemistry, Antiproliferative Profiles and Protein Interactions for a Series of Iridium(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (35), 12487–12494. <https://doi.org/10.1002/chem.201601542>.
- (18) Gothe, Y.; Romero-Canelón, I.; Marzo, T.; Sadler, P. J.; Messori, L.; Metzler-Nolte, N. Synthesis and Mode of Action Studies on Iridium(I)–NHC Anticancer Drug Candidates. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, *2018* (20), 2461–2470. <https://doi.org/10.1002/ejic.201800225>.
- (19) Gothe, Y.; Marzo, T.; Messori, L.; Metzler-Nolte, N. Cytotoxic Activity and Protein Binding through an Unusual Oxidative Mechanism by an Iridium(I)-NHC Complex. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (15), 3151–3153. <https://doi.org/10.1039/c4cc10014j>.
- (20) Cancer Basics | American Cancer Society <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics.html> (accessed Jul 29, 2019).

- (21) What Is Cancer? - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed Jul 29, 2019).
- (22) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, *69* (1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- (23) Peacock, A. F. A.; Habtemariam, A.; Fernández, R.; Walland, V.; Fabbiani, F. P. A.; Parsons, S.; Aird, R. E.; Jodrell, D. I.; Sadler, P. J. Tuning the Reactivity of Osmium(II) and Ruthenium(II) Arene Complexes under Physiological Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (5), 1739–1748. <https://doi.org/10.1021/ja055886r>.
- (24) Antoni, S.; Soerjomataram, I.; Møller, B.; Bray, F.; Ferlay, J. An Assessment of GLOBOCAN Methods for Deriving National Estimates of Cancer Incidence. *Bull. World Health Organ.* **2016**, *94* (3), 174–184. <https://doi.org/10.2471/BLT.15.164384>.
- (25) Fink, D. J. Cancer Overview1. **1979**, No. July, 2819–2821.
- (26) Kauffman, G. B.; Pentimalli, R.; Doldi, S.; Hall, M. D. Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platin. Met. Rev.* **2010**, *54* (4), 250–256. <https://doi.org/10.1595/147106710X534326>.
- (27) Division, C.; Products, E.; Electrode, P. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *20*, 698–699.
- (28) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- (29) Wilson, J. J.; Lippard, S. J. Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer Complexes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4470–4495. <https://doi.org/10.1021/cr4004314>.
- (30) Galanski, M.; Jakupec, M.; Keppler, B. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (18), 2075–2094. <https://doi.org/10.2174/0929867054637626>.
- (31) Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>.
- (32) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (33) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med.*

Chem. **2011**, *54* (1), 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>.

- (34) *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*; Crabtree, R. H., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118788301>.
- (35) Hahn, F. E.; Jahnke, M. C. Heterocyclic Carbenes: Synthesis and Coordination Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (17), 3122–3172. <https://doi.org/10.1002/anie.200703883>.
- (36) Huynh, H. V. *The Organometallic Chemistry of N-Heterocyclic Carbenes*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2017. <https://doi.org/10.1002/9781118698785>.
- (37) Hegedus, L. S.; Soderberg, B. *Transition Metals in the Synthesis of Complex Organic Molecules*, 3rd ed.; University Science Books, Ed.; University Science Books, 2009.
- (38) Kühn, O. The Chemistry of Functionalised N-Heterocyclic Carbenes. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (4), 592–607. <https://doi.org/10.1039/b603765h>.
- (39) Boehme, C.; Frenking, G. N-Heterocyclic Carbene, Silylene, and Germylene Complexes of MCl (M = Cu, Ag, Au). A Theoretical Study. *Organometallics* **1998**, *17* (26), 5801–5809. <https://doi.org/10.1021/om980394r>.
- (40) Herrmann, W. A.; Elison, M.; Fischer, J.; Köcher, C.; Artus, G. R. J. N-Heterocyclic Carbenes[+]: Generation under Mild Conditions and Formation of Group 8-10 Transition Metal Complexes Relevant to Catalysis. *Chem. - A Eur. J.* **1996**, *2* (7), 772–780. <https://doi.org/10.1002/chem.19960020708>.
- (41) Moerdyk, J. P.; Bielawski, C. W. Stable Carbenes. *Contemp. Carbene Chem.* **2013**, 40–74. <https://doi.org/10.1002/9781118730379.ch2>.
- (42) Dörwald, F. Z. *Metal Carbenes in Organic Synthesis*; Wiley, 1998. <https://doi.org/10.1002/9783527614066>.
- (43) Heinemann, C.; Müller, T.; Apeloig, Y.; Schwarz, H. On the Question of Stability, Conjugation, and “Aromaticity” in Imidazol-2-Ylidenes and Their Silicon Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (8), 2023–2038. <https://doi.org/10.1021/ja9523294>.
- (44) Benhamou, L.; Chardon, E.; Lavigne, G.; Bellemin-Laponnaz, S.; César, V. Synthetic Routes to N-Heterocyclic Carbene Precursors. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (4), 2705–2733. <https://doi.org/10.1021/cr100328e>.
- (45) De Frémont, P.; Marion, N.; Nolan, S. P. Carbenes: Synthesis, Properties, and Organometallic Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (7–8), 862–892.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.018>.

- (46) Sánchez-Mora, A.; Valdés, H.; Ramírez-Apan, M. T.; Nieto-Camacho, A.; Hernández-Ortega, S.; Canseco-González, D.; Morales-Morales, D. NHC-Ir(I) Complexes Derived from 5,6-Dinitrobenzimidazole. Synthesis, Characterization and Preliminary Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *496* (August), 119061. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119061>.
- (47) Herrmann, W. A.; Köcher, C. N-Heterocyclic Carbenes. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36* (20), 2162–2187. <https://doi.org/10.1002/anie.199721621>.
- (48) Johnson, N. A.; Southerland, M. R.; Youngs, W. J. Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-Nhc Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules22081263>.
- (49) Sakamoto, R.; Morozumi, S.; Yanagawa, Y.; Toyama, M.; Takayama, A.; Kasuga, N. C.; Nomiya, K. Synthesis, Characterization, and Structure–Activity Relationship of the Antimicrobial Activities of Dinuclear N-Heterocyclic Carbene (NHC)-Silver(I) Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.031>.
- (50) Kascatan-Nebioglu, A.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J. N-Heterocyclic Carbene-Silver Complexes: A New Class of Antibiotics. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (5–6), 884–895. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.019>.
- (51) Lin, I. J. B.; Vasam, C. S. Preparation and Application of N-Heterocyclic Carbene Complexes of Ag(I). *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (5–6), 642–670. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.09.004>.
- (52) Garrison, J. C.; Youngs, W. J. Ag(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes: Synthesis, Structure, and Application. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (11), 3978–4008. <https://doi.org/10.1021/cr050004s>.
- (53) Wang, H. M. J.; Lin, I. J. B. Facile Synthesis of Silver(I)-Carbene Complexes. Useful Carbene Transfer Agents. *Organometallics* **1998**, *17* (5), 972–975. <https://doi.org/10.1021/om9709704>.
- (54) Dröge, T.; Glorius, F. The Measure of All Rings - N-Heterocyclic Carbenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (39), 6940–6952. <https://doi.org/10.1002/anie.201001865>.
- (55) Albrecht, M. N-Heterocyclic Carbenes . Effective Tools for Organometallic Synthesis. Edited by Steven P. Nolan. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (20), 5822–5822. <https://doi.org/10.1002/anie.201502195>.

- (56) Nelson, D. J.; Nolan, S. P. Quantifying and Understanding the Electronic Properties of N-Heterocyclic Carbenes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6723–6753. <https://doi.org/10.1039/c3cs60146c>.
- (57) Arduengo, A. J.; Harlow, R. L.; Kline, M. A Stable Crystalline Carbene. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (1), 361–363. <https://doi.org/10.1021/ja00001a054>.
- (58) Wanzlick, H.-W.; Schönherr, H.-J. Direct Synthesis of a Mercury Salt-Carbene Complex. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1968**, *7* (2), 141–142. <https://doi.org/10.1002/anie.196801412>.
- (59) Öfele, K. 1,3-Dimethyl-4-Imidazolinylden-(2)-Pentacarbonylchrom Ein Neuer Übergangsmetall-Carben-Komplex. *J. Organomet. Chem.* **1968**, *12* (3), P42–P43. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)88691-X](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)88691-X).
- (60) Feroci, M.; Chiarotto, I.; Inesi, A. Advances in the Knowledge of N-Heterocyclic Carbenes Properties. The Backing of the Electrochemical Investigation. *Catalysts* **2016**, *6* (11), 178. <https://doi.org/10.3390/catal6110178>.
- (61) Nesterov, V.; Reiter, D.; Bag, P.; Frisch, P.; Holzner, R.; Porzelt, A.; Inoue, S. NHCs in Main Group Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (19), 9678–9842. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00079>.
- (62) Cazin, C. S. J. Recent Advances in the Design and Use of Immobilised N-Heterocyclic Carbene Ligands for Transition-Metal Catalysis. *Comptes Rendus Chim.* **2009**, *12* (10–11), 1173–1180. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2008.10.016>.
- (63) Herrmann, W. A. ChemInform Abstract: N-Heterocyclic Carbenes. Part 31. N-Heterocyclic Carbenes: A New Concept in Organometallic Catalysis. *ChemInform* **2010**, *33* (32), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.200232255>.
- (64) Mercks, L.; Albrecht, M. Beyond Catalysis: N-Heterocyclic Carbene Complexes as Components for Medicinal, Luminescent, and Functional Materials Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 1903. <https://doi.org/10.1039/b902238b>.
- (65) Visbal, R.; Gimeno, M. C. N-Heterocyclic Carbene Metal Complexes: Photoluminescence and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3551–3574. <https://doi.org/10.1039/C3CS60466G>.
- (66) Durmaz, R.; Kucukbay, H.; Cetinkaya, E.; Çetinkaya, B. Antimicrobial Activity of Rhodium (I) and Ruthenium (II) Carbene Complexes Derived from Benzimidazole against *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Turkish J. Med. Sci.* **1997**, *27*, 59–61.
- (67) Çetinkaya, B.; Cetinkaya, E.; Kucukbay, H.; Durmaz, R. Antimicrobial Activity of

Carbene Complexes of Rhodium(I) and Ruthenium(II). *Arzneimittelforschung*. **1996**, *46*, 821–823.

- (68) Gonell, S.; Poyatos, M.; Peris, E. Pyrene-Based Bisazolium Salts: From Luminescence Properties to Janus-Type Bis-N-Heterocyclic Carbenes. *Chem. A Eur. J.* **2014**, *20* (31), 9716–9724. <https://doi.org/10.1002/chem.201304952>.
- (69) Petrini, A.; Pettinari, R.; Marchetti, F.; Pettinari, C.; Therrien, B.; Galindo, A.; Scopelliti, R.; Riedel, T.; Dyson, P. J. Cytotoxic Half-Sandwich Rh(III) and Ir(III) β -Diketonates. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (21), 13600–13612. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02356>.
- (70) Du, Q.; Guo, L.; Tian, M.; Ge, X.; Yang, Y.; Jian, X.; Xu, Z.; Tian, Z.; Liu, Z. Potent Half-Sandwich Iridium(III) and Ruthenium(II) Anticancer Complexes Containing a P[^]O-Chelated Ligand. *Organometallics* **2018**, *37* (17), 2880–2889. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.8b00402>.
- (71) Štarha, P.; Trávníček, Z.; Crlíková, H.; Vančo, J.; Kašpárková, J.; Dvořák, Z. Half-Sandwich Ir(III) Complex of N1-Pyridyl-7-Azaindole Exceeds Cytotoxicity of Cisplatin at Various Human Cancer Cells and 3D Multicellular Tumor Spheroids. *Organometallics* **2018**, *37* (16), 2749–2759. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.8b00415>.
- (72) Giraldi, T.; Sava, G.; Mestroni, G.; Zassinovich, G.; Stolfa, D. Antitumour Action of Rhodium (I) and Iridium (I) Complexes. *Chem. Biol. Interact.* **1978**, *22* (2–3), 231–238. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(78\)90128-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(78)90128-X).
- (73) Maftai, E.; Maftai, C. V.; Jones, P. G.; Freytag, M.; Franz, M. H.; Kelter, G.; Fiebig, H. H.; Tamm, M.; Neda, I. Trifluoromethylpyridine-Substituted N-Heterocyclic Carbenes Related to Natural Products: Synthesis, Structure, and Potential Antitumor Activity of Some Corresponding Gold(I), Rhodium(I), and Iridium(I) Complexes. *Helv. Chim. Acta* **2016**, *99* (6), 469–481. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500529>.
- (74) Lopes, M.; de Andrade Sena, C.; Silva, B.; de Souza, C.; Ramos, J.; Cassali, G.; de Souza-Fagundes, E.; Alves, R.; de Oliveira, M.; de Oliveira, R. Synthesis of Nitroaromatic Compounds as Potential Anticancer Agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2015**, *15* (2), 206–216. <https://doi.org/10.2174/1871520614666141114201749>.
- (75) Nepali, K.; Lee, H. Y.; Liou, J. P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (6), 2851–2893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>.
- (76) Cenas, N.; Prast, S.; Nivinskas, H.; Sarlauskas, J.; Arnér, E. S. J. Interactions of Nitroaromatic Compounds with the Mammalian Selenoprotein Thioredoxin Reductase and the Relation to Induction of Apoptosis in Human Cancer Cells. *J. Biol.*

Chem. **2006**, *281* (9), 5593–5603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511972200>.

- (77) Wright, B. D.; Deblock, M. C.; Wagers, P. O.; Duah, E.; Robishaw, N. K.; Shelton, K. L.; Southerland, M. R.; Debord, M. A.; Kersten, K. M.; McDonald, L. J.; et al. Anti-Tumor Activity of Lipophilic Imidazolium Salts on Select NSCLC Cell Lines. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24* (7), 2838–2861. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1330-z>.
- (78) Kincaid, K.; Beckman, J.; Zivkovic, A.; Halcomb, R. L.; Engels, J. W.; Kuchta, R. D. Exploration of Factors Driving Incorporation of Unnatural DNTPS into DNA by Klenow Fragment (DNA Polymerase I) and DNA Polymerase α . *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (8), 2620–2628. <https://doi.org/10.1093/nar/gki563>.
- (79) Jonathan W. Steed, J. L. A. *Supramolecular Chemistry*, Wiley.; 2013.
- (80) Salonen, L. M.; Ellermann, M.; Diederich, F. Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition: Energetics and Structures. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (21), 4808–4842. <https://doi.org/10.1002/anie.201007560>.
- (81) Khramov, D. M.; Rosen, E. L.; Er, J. A. V.; Vu, P. D.; Lynch, V. M.; Bielawski, C. W. N-Heterocyclic Carbenes: Deducing σ - and π -Contributions in Rh-Catalyzed Hydroboration and Pd-Catalyzed Coupling Reactions. *Tetrahedron* **2008**, *64* (29), 6853–6862. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.04.030>.
- (82) Burling, S.; Mahon, M. F.; Reade, S. P.; Whittlesey, M. K. Neutral and Cationic Fluorinated N-Heterocyclic Carbene Complexes of Rhodium and Iridium. *Organometallics* **2006**, *25* (15), 3761–3767. <https://doi.org/10.1021/om060324h>.
- (83) Chang, Y. H.; Fu, C. F.; Liu, Y. H.; Peng, S. M.; Chen, J. T.; Liu, S. T. Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Saturated and Unsaturated N-Heterocyclic Carbene Iridium(I) Complexes. *Dalt. Trans.* **2009**, No. 5, 861–867. <https://doi.org/10.1039/b814234c>.
- (84) Frey, G. D.; Rentzsch, C. F.; von Preysing, D.; Scherg, T.; Mühlhofer, M.; Herdtweck, E.; Herrmann, W. A. Rhodium and Iridium Complexes of N-Heterocyclic Carbenes: Structural Investigations and Their Catalytic Properties in the Borylation Reaction. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691* (26), 5725–5738. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.08.099>.
- (85) Gülcemal, S.; Gökçe, A. G.; Çetinkaya, B. Iridium(i) N-Heterocyclic Carbene Complexes of Benzimidazol-2-Ylidene: Effect of Electron Donating Groups on the Catalytic Transfer Hydrogenation Reaction. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (20), 7305–7311. <https://doi.org/10.1039/c2dt32482b>.
- (86) Gülcemal, S.; Gökçe, A. G.; Çetinkaya, B. N-Benzyl Substituted N-Heterocyclic

Carbene Complexes of Iridium(I): Assessment in Transfer Hydrogenation Catalyst. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (18), 10601–10609. <https://doi.org/10.1021/ic401626e>.

- (87) Dixon, S. J.; Stockwell, B. R. The Role of Iron and Reactive Oxygen Species in Cell Death. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>.
- (88) Łukaszewicz-Hussain, A.; Moniuszko-Jakoniuk, J.; Rogalska, J. Assessment of Lipid Peroxidation in Rat Tissues in Subacute Chlorfenvinphos Administration. *Polish J. Environ. Stud.* **2007**, *16* (2), 233–236.
- (89) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- (90) Domínguez, M.; Nieto, A.; Marin, J. C.; Keck, A. S.; Jeffery, E.; Céspedes, C. L. Antioxidant Activities of Extracts from *Barkleyanthus Salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon Gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (15), 5889–5895. <https://doi.org/10.1021/jf0504972>.
- (91) Rossato, J. I.; Ketzer, L. A.; Centurião, F. B.; Silva, S. J. N.; Lüdtke, D. S.; Zeni, G.; Braga, A. L.; Rubin, M. A.; Da Rocha, J. B. T. Antioxidant Properties of New Chalcogenides against Lipid Peroxidation in Rat Brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27* (4), 297–303. <https://doi.org/10.1023/A:1014907228580>.
- (92) Ng, T. B.; Liu, F.; Wang, Z. T. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. *Life Sci.* **2000**, *66* (8), 709–723. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00642-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00642-6).
- (93) Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95* (2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- (94) Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. In *Methods in enzymology*; 1990; Vol. 186, pp 407–421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H).

ANEXO I. ESPECTROS DE RMN

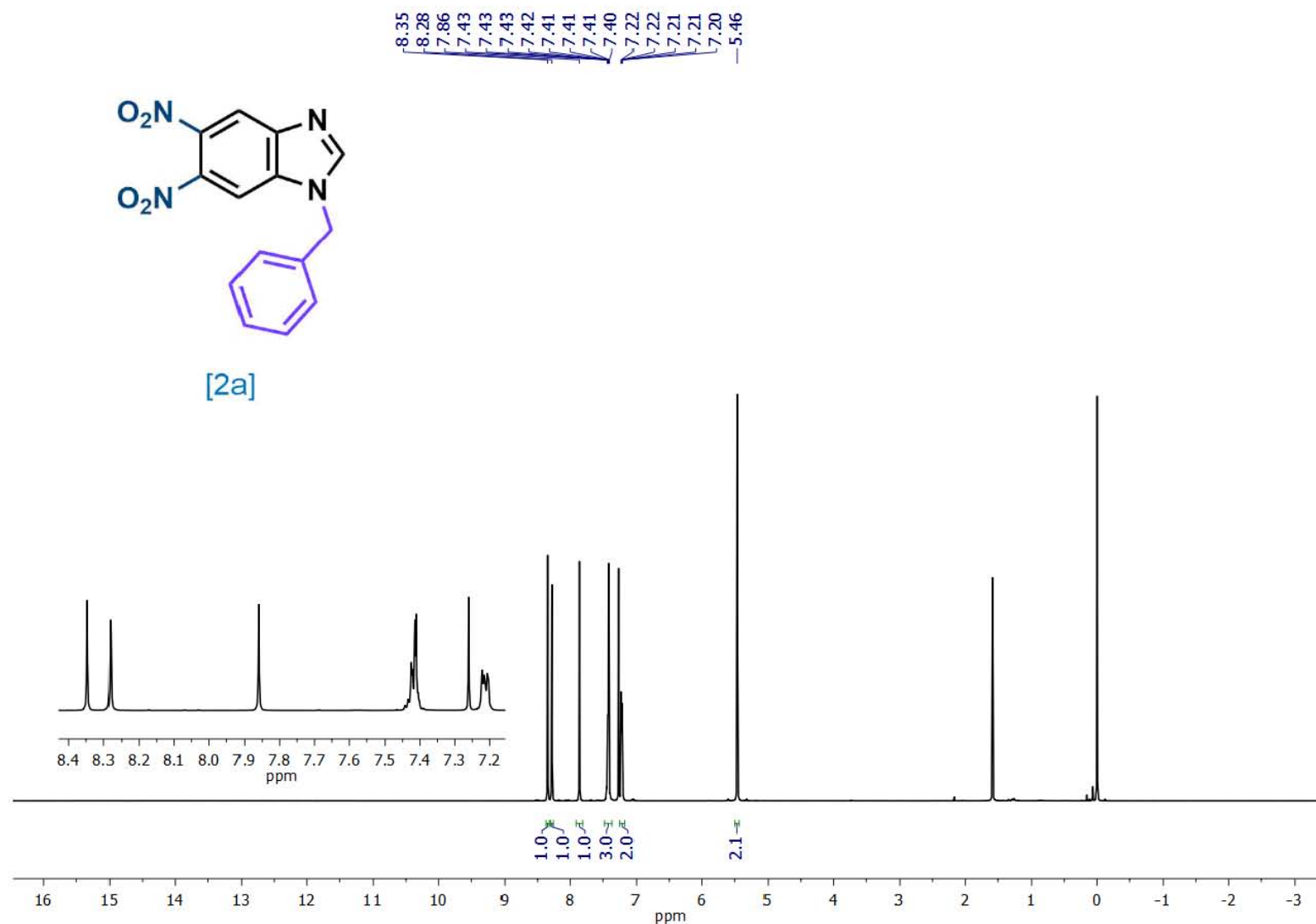


Figura 38. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del 1-bencil-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazol **2a**.

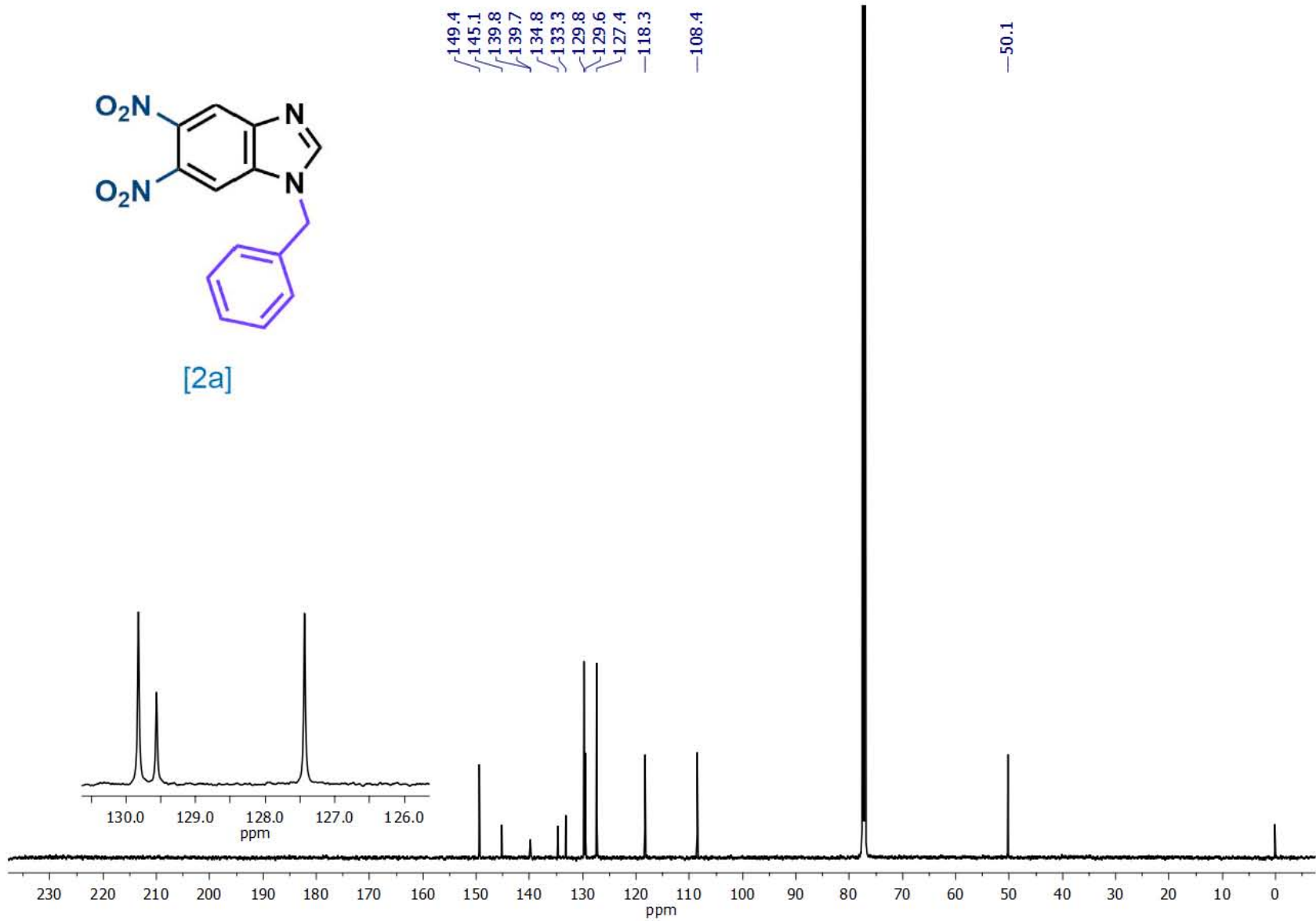


Figura 39. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del 1-bencil-5,6-dinitro-1H-benzodimidazol **2a**.

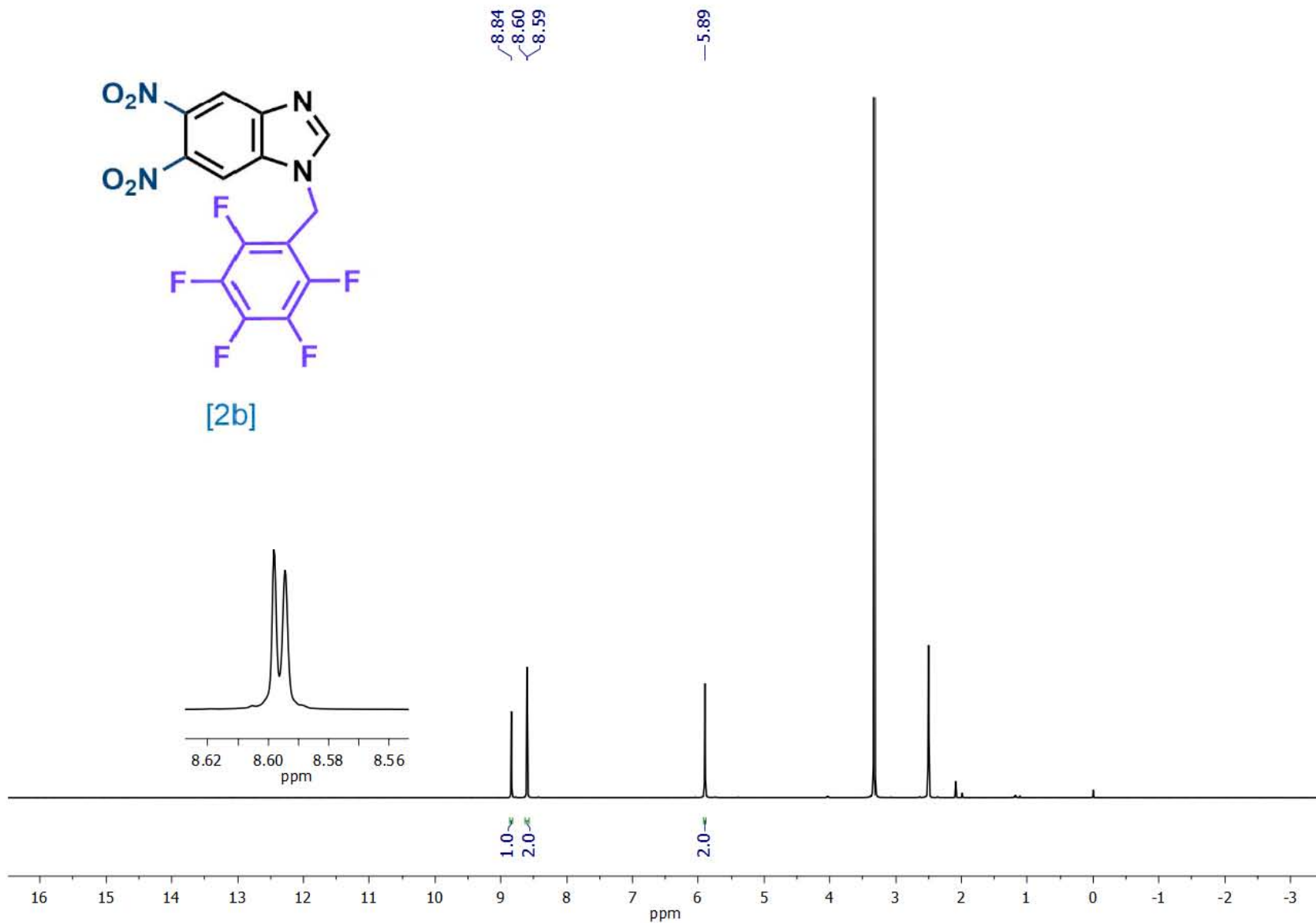


Figura 40. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) del 5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1H-benzo[d]imidazol **2b**.

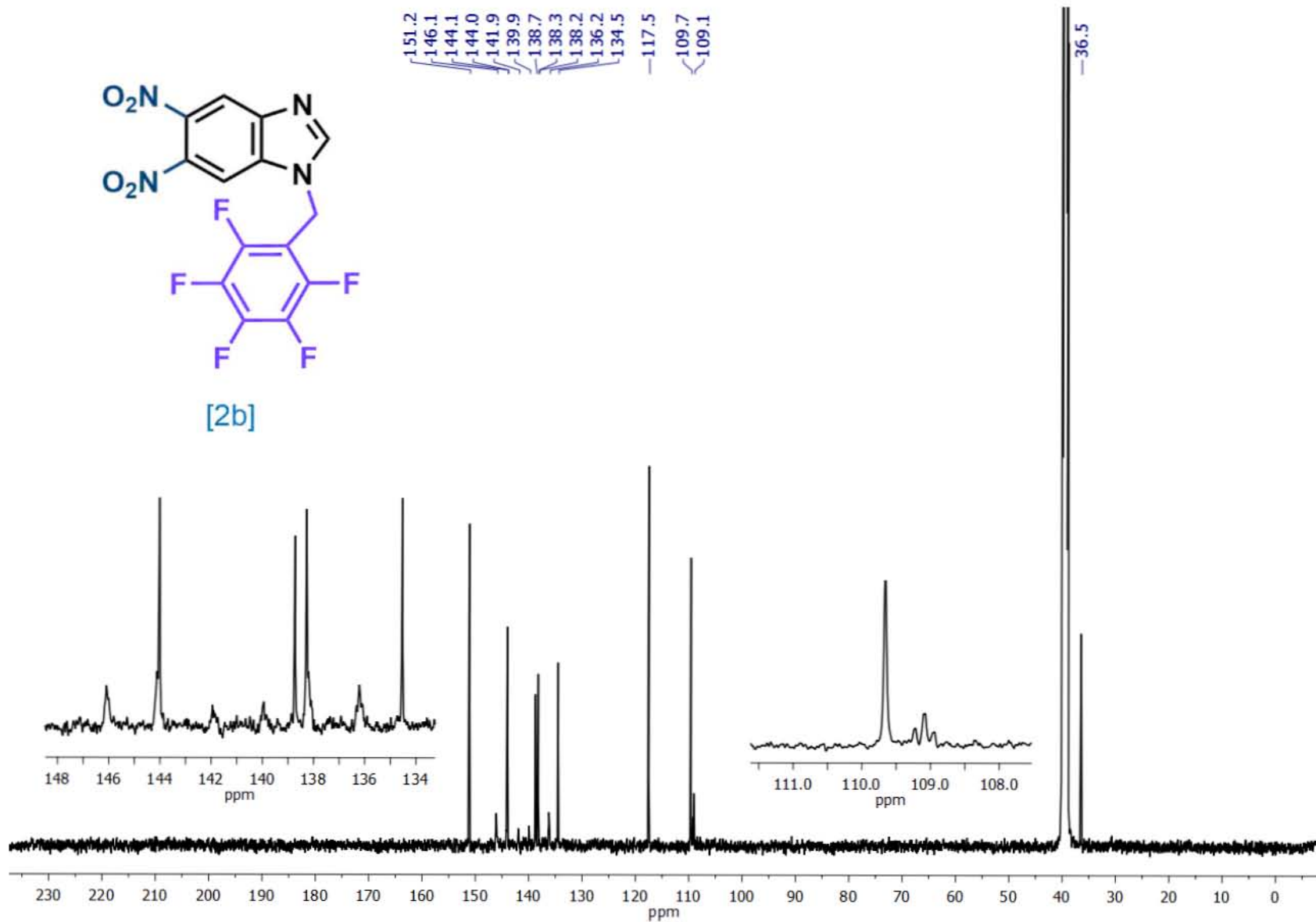


Figura 41. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del 5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1H-benzo[d]imidazol **2b**.

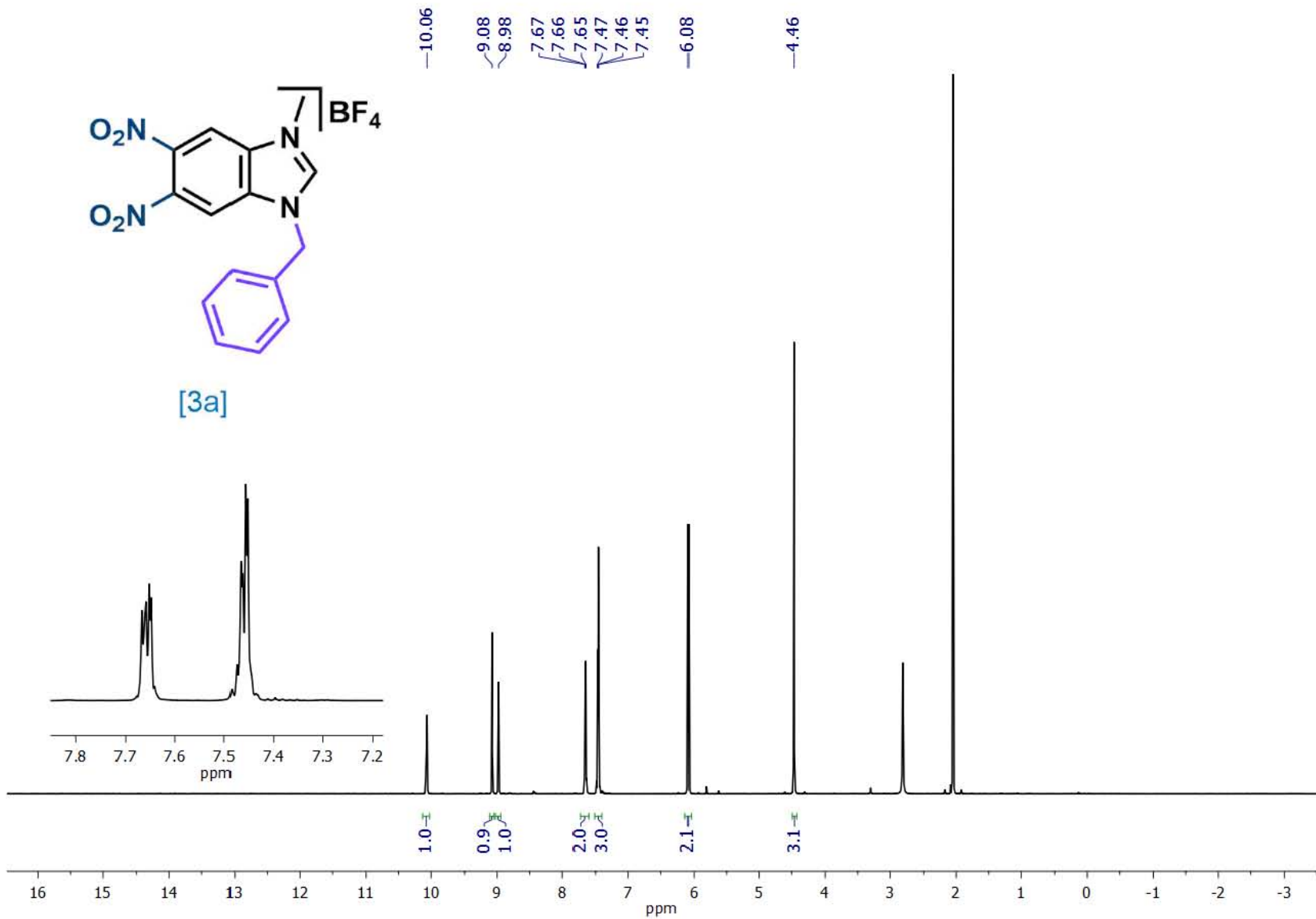


Figura 42. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, Acetona-d₆) del Tetrafluoroborato de 1-bencil-3-metil-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazolio **3a**.

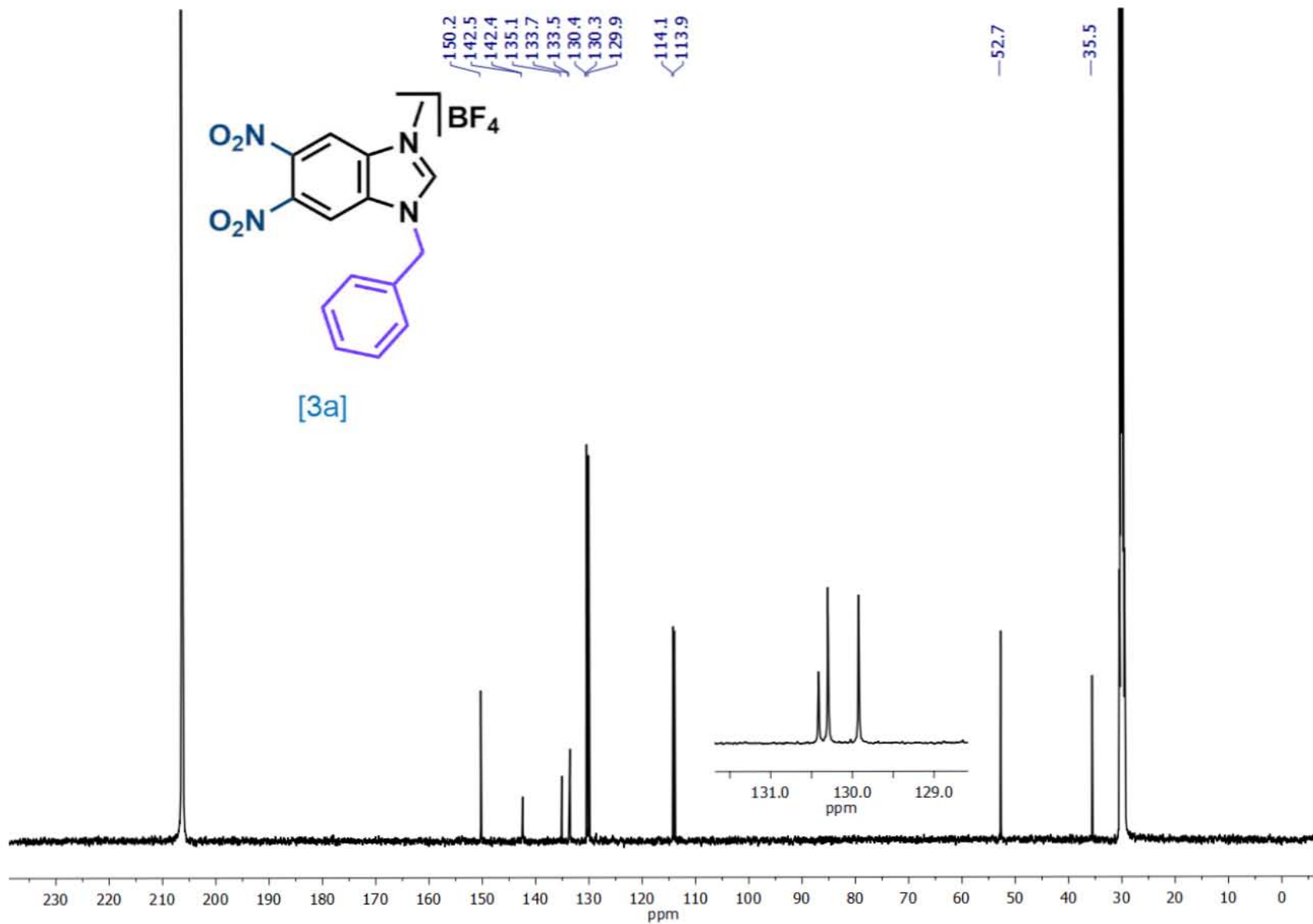


Figura 43. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, Acetona- d_6) del Tetrafluoroborato de 1-benzil-3-metil-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazolio **3a**.

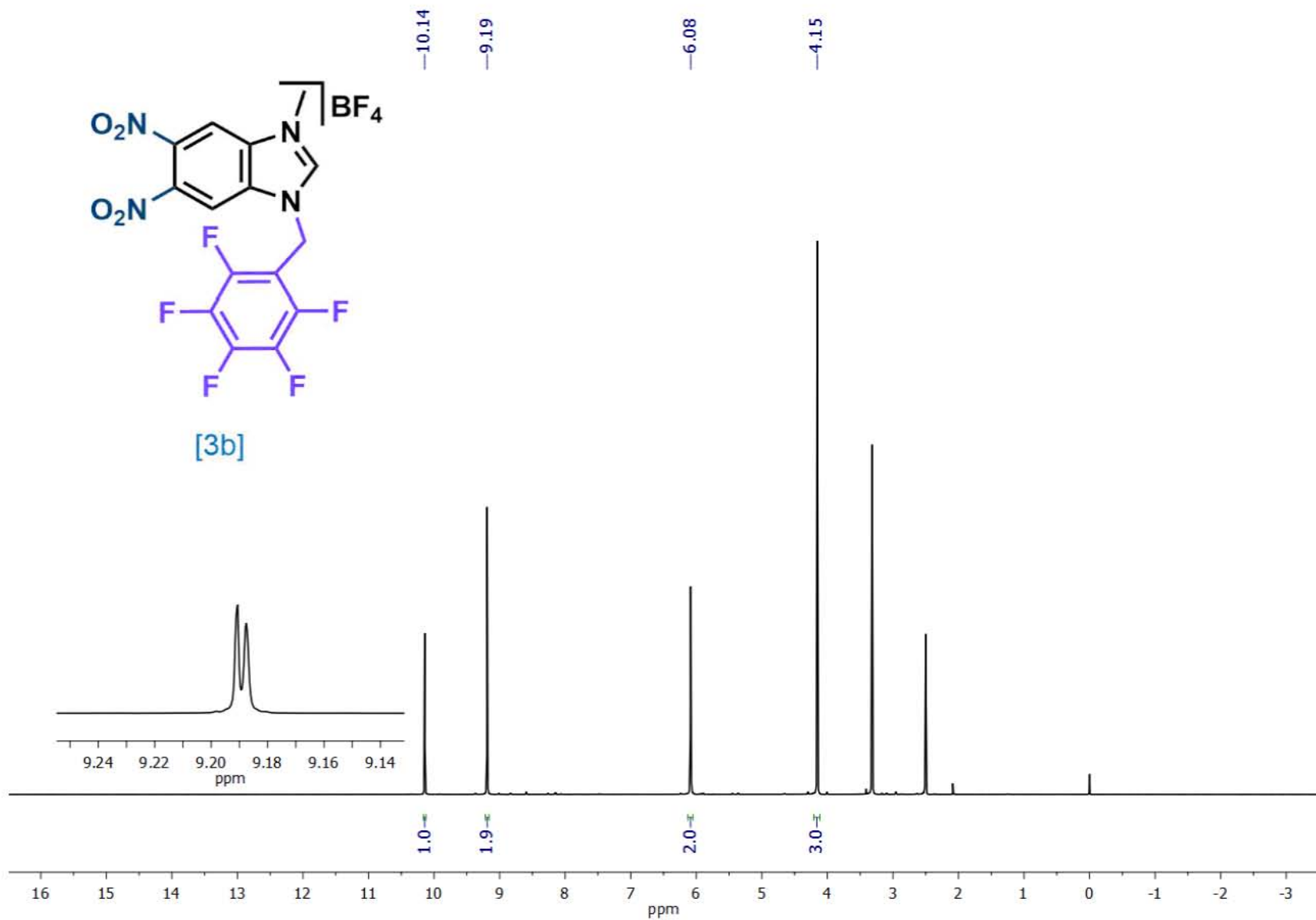


Figura 44. Espectro de ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) del Tetrafluoroborato de 3-metil-5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1H-benzo[d]imidazolio **3b**.

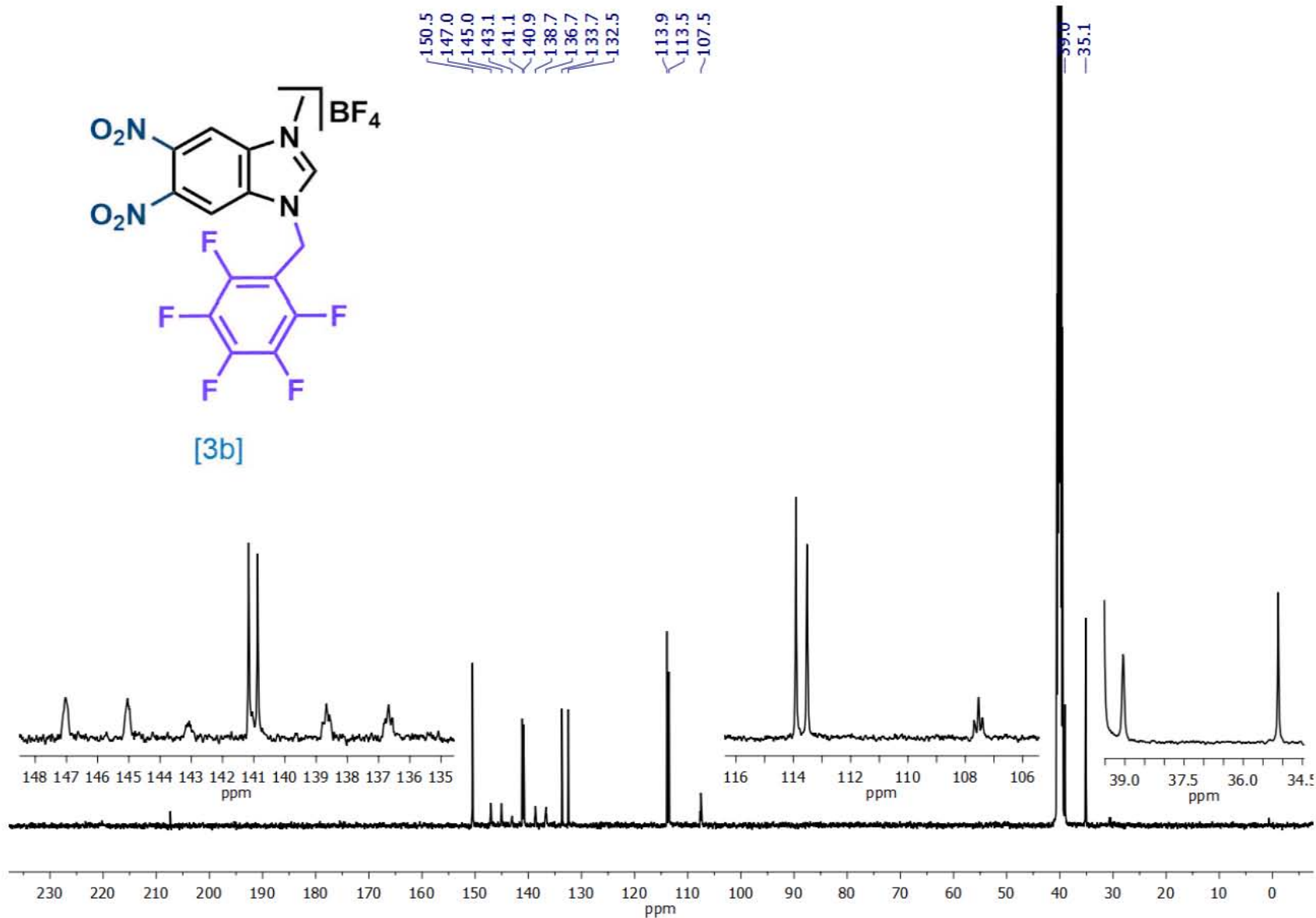


Figura 45. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, DMSO-d_6) del Tetrafluoroborato de 3-methyl-5,6-dinitro-1-((perfluorophenyl)methyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium **3b**.

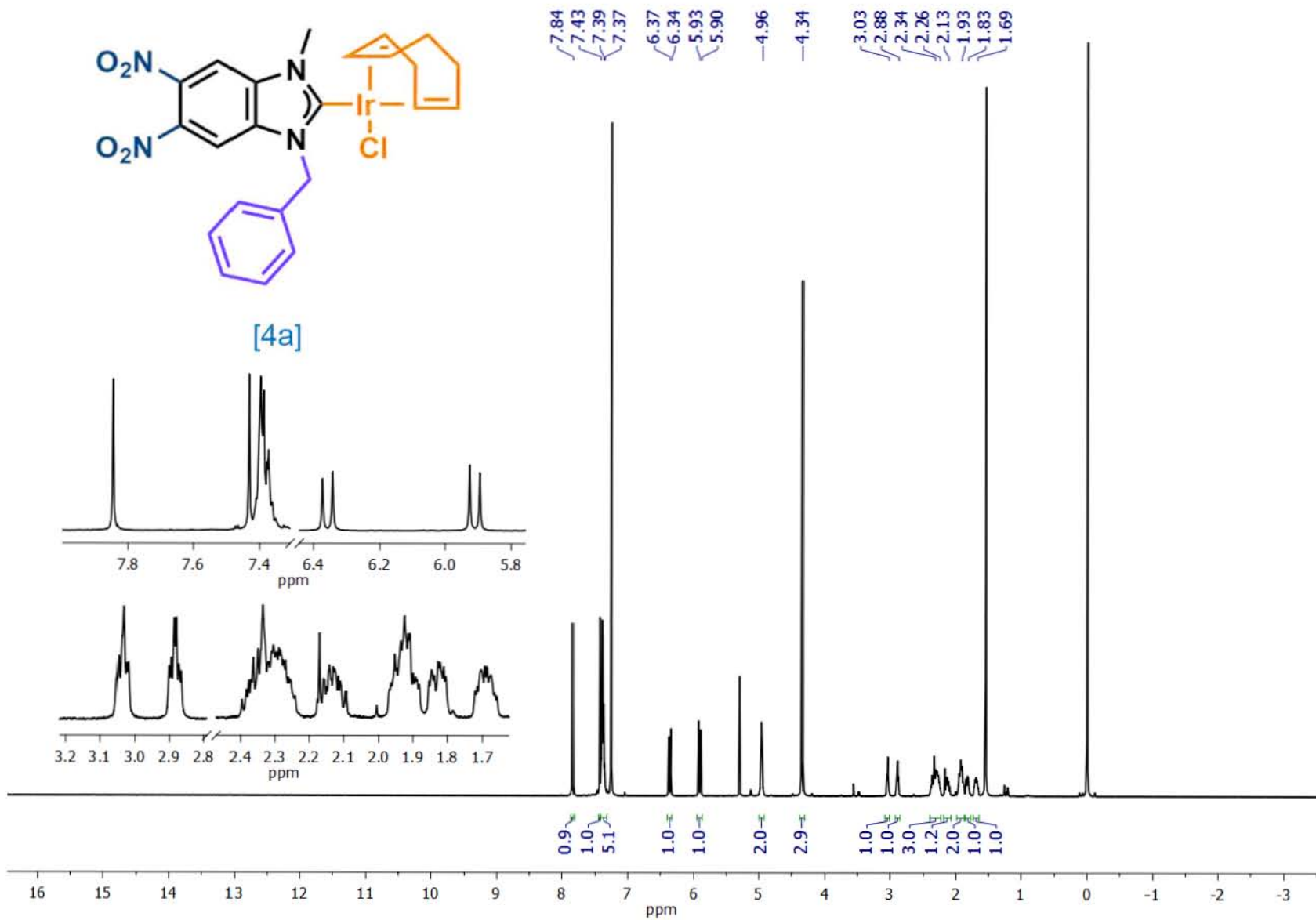


Figura 46. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Complejo **4a**.

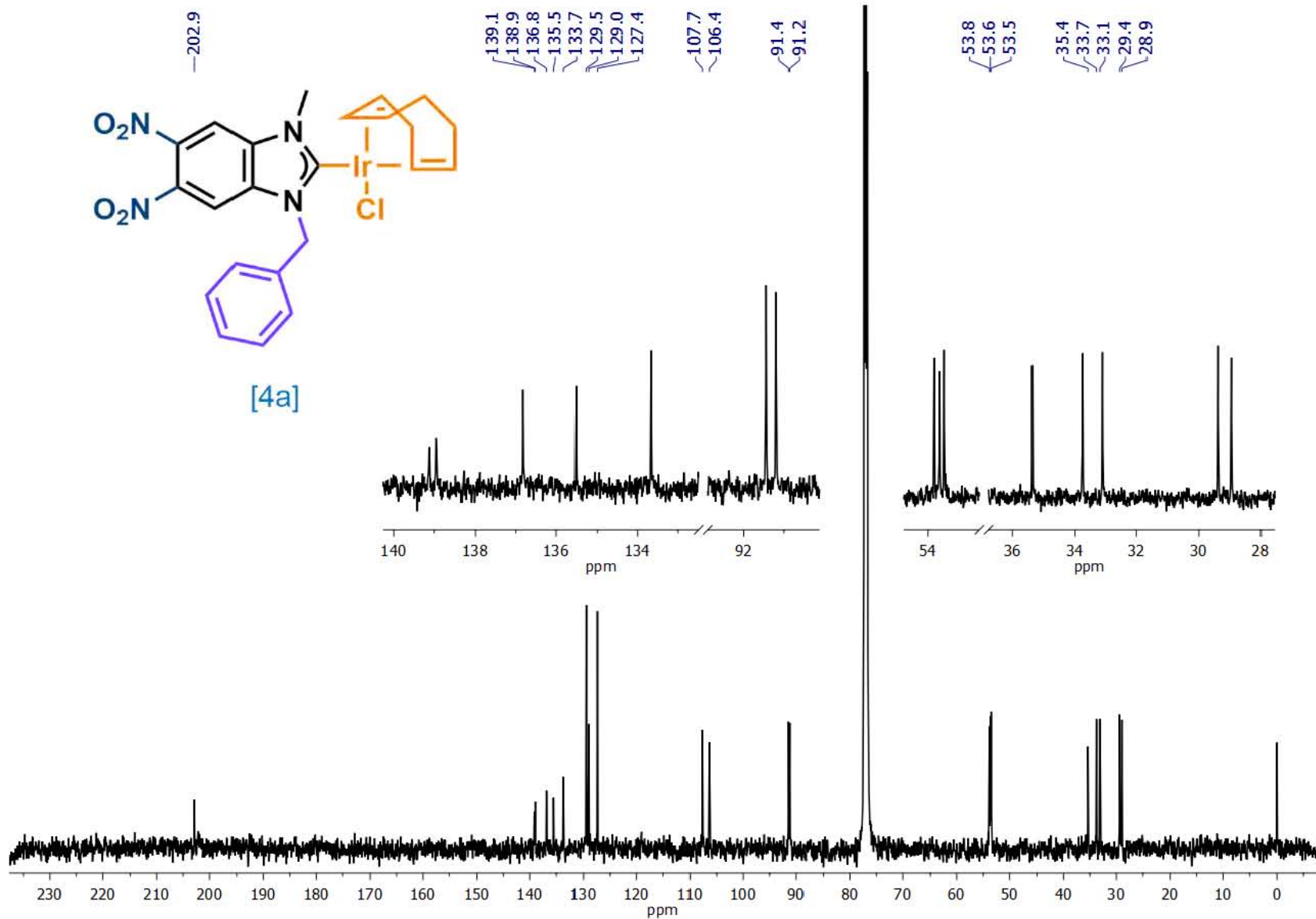


Figura 47. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del Complejo **4a**.

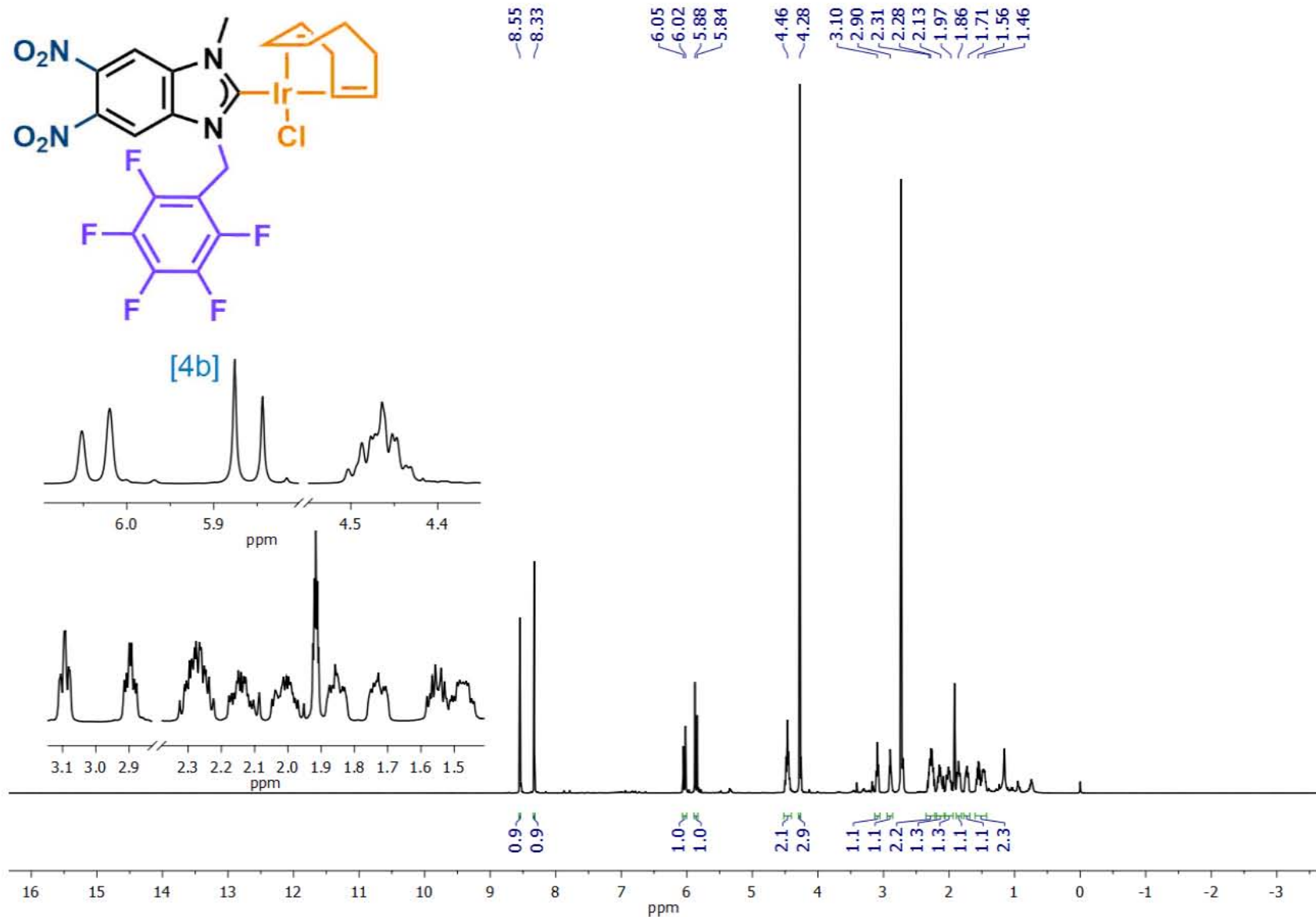


Figura 48. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, Acetona- d_6) del Complejo **4b**.

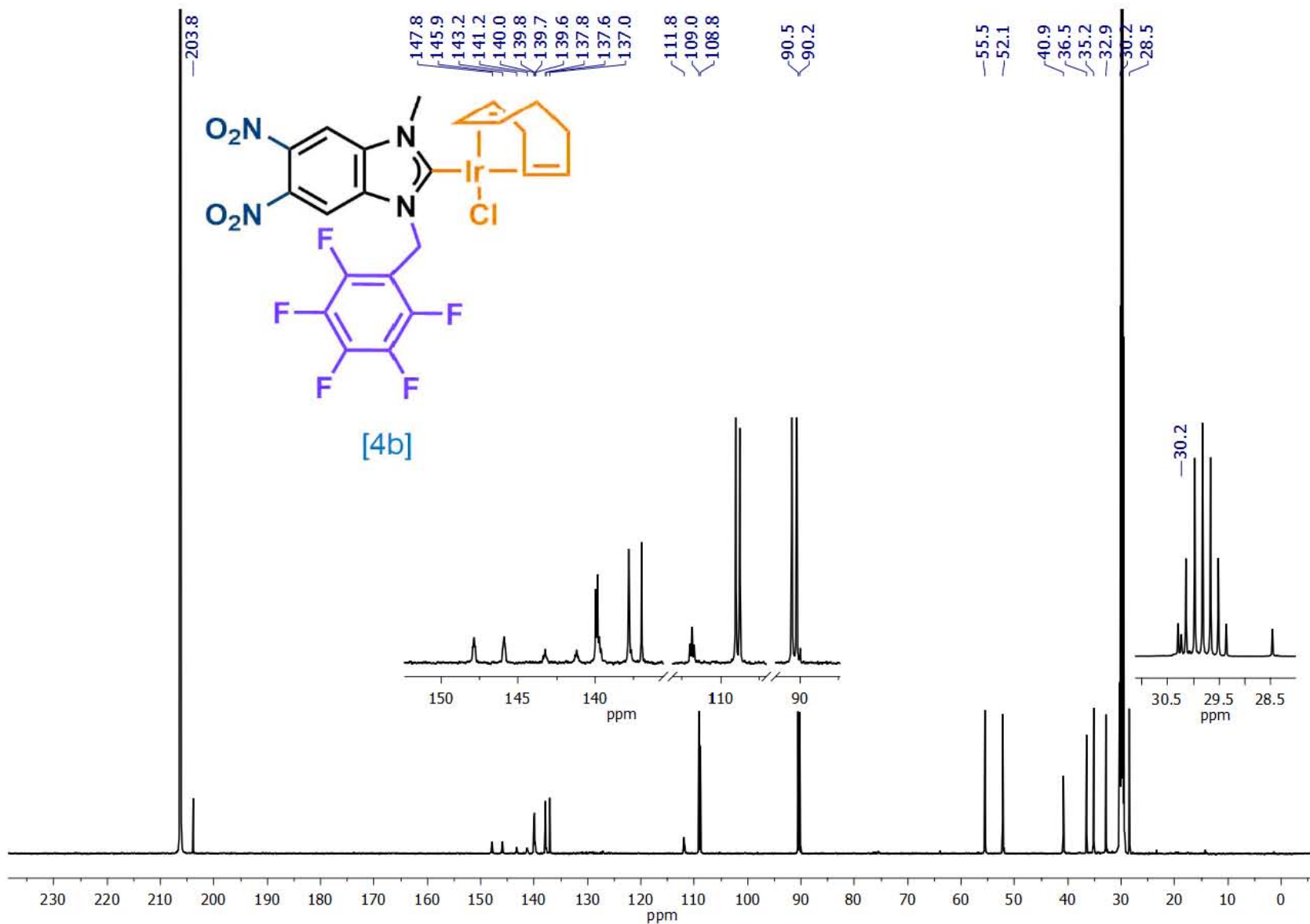


Figura 49. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, Acetona- d_6) del Complejo **4b**.

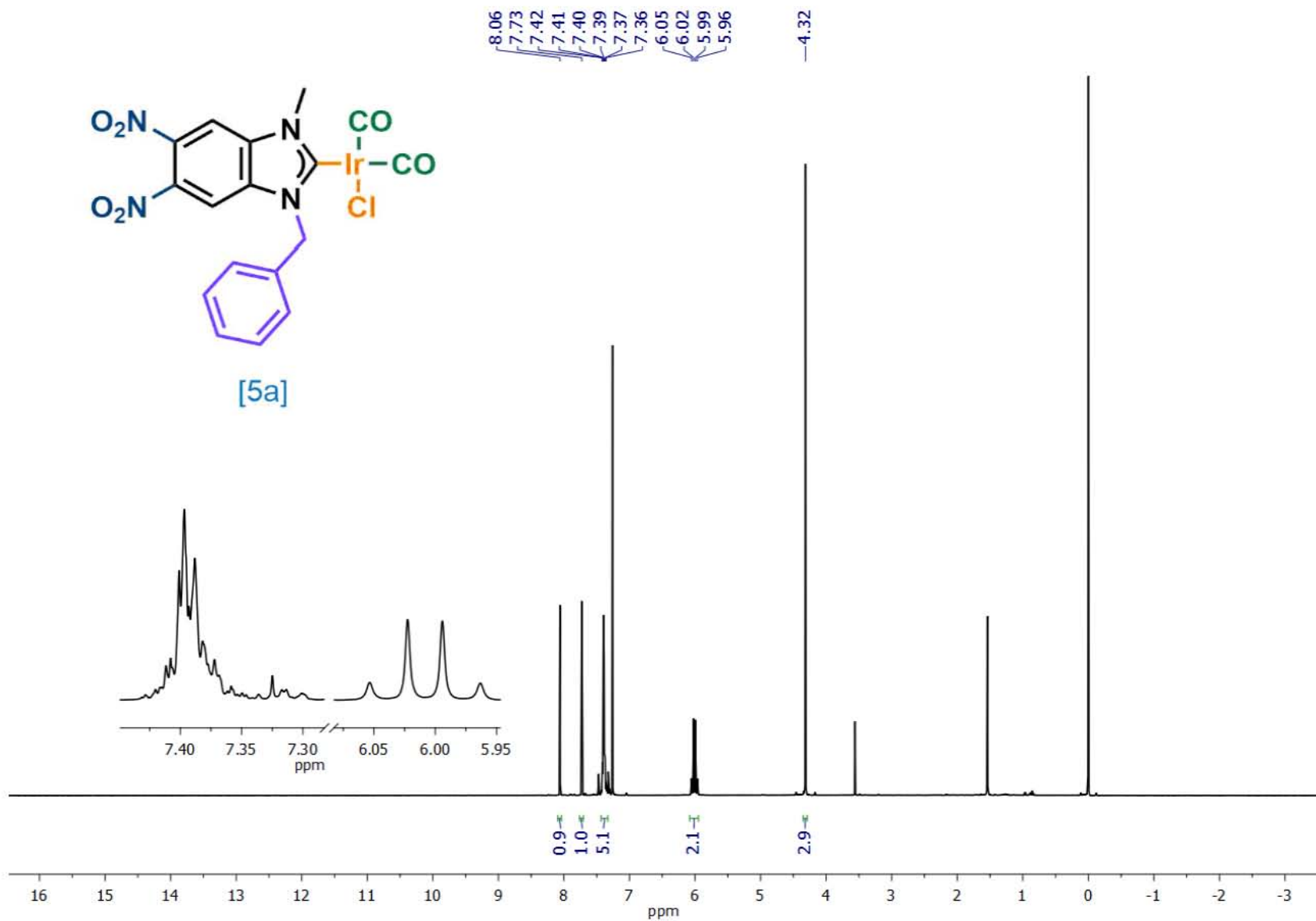


Figura 50. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Complejo **5a**.

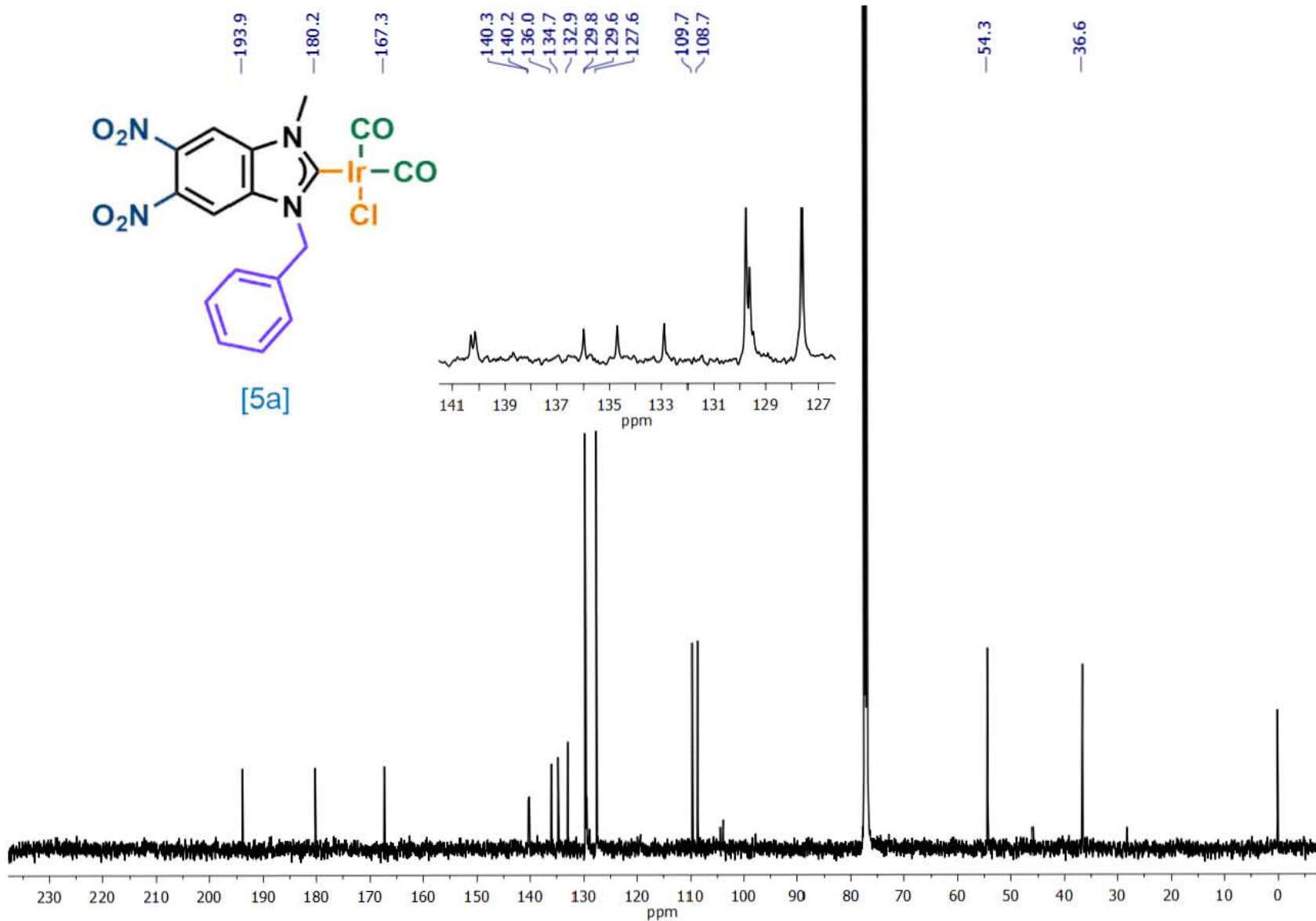


Figura 51. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del Complejo **5a**.

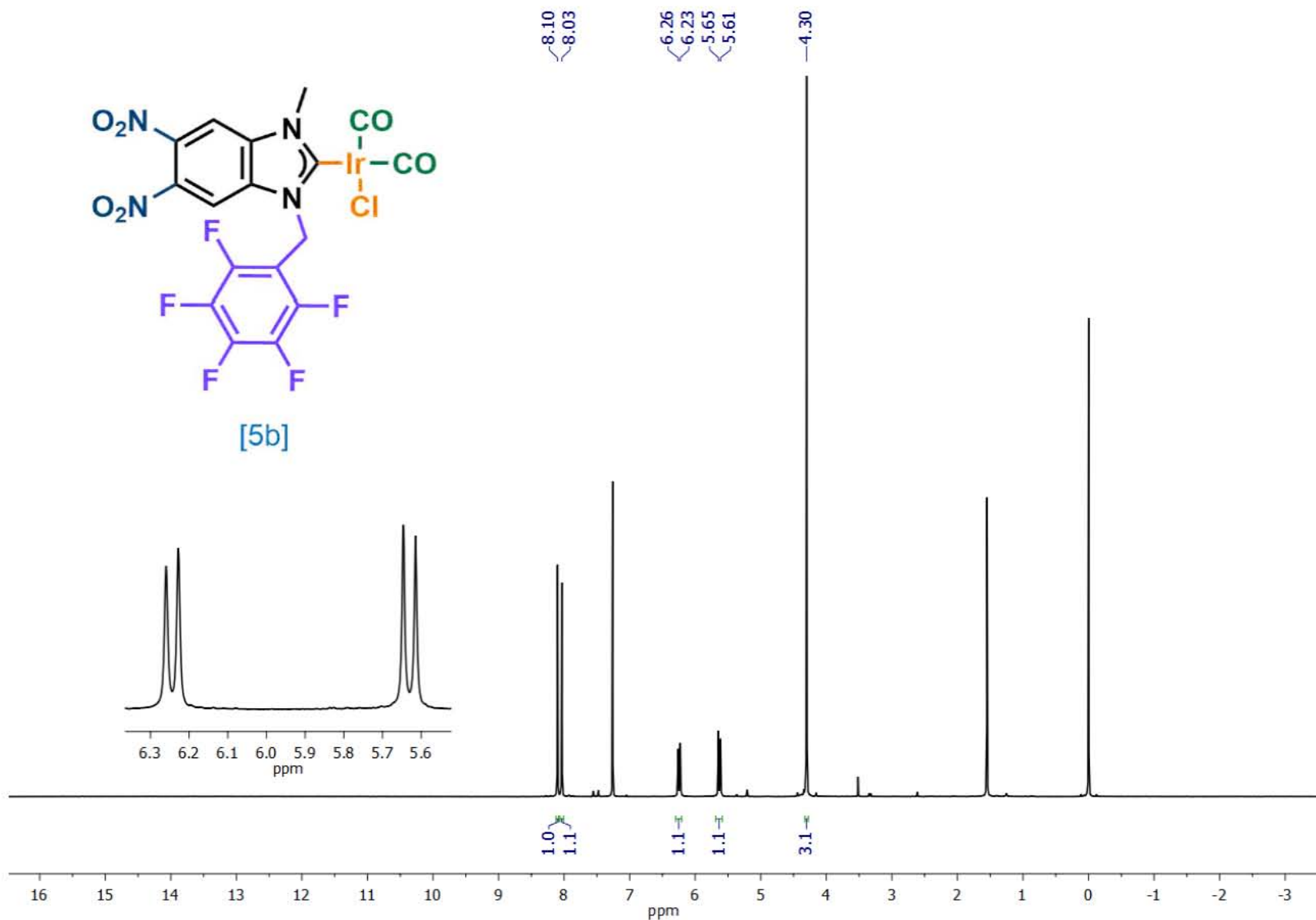


Figura 52. Espectro de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Complejo **5b**.

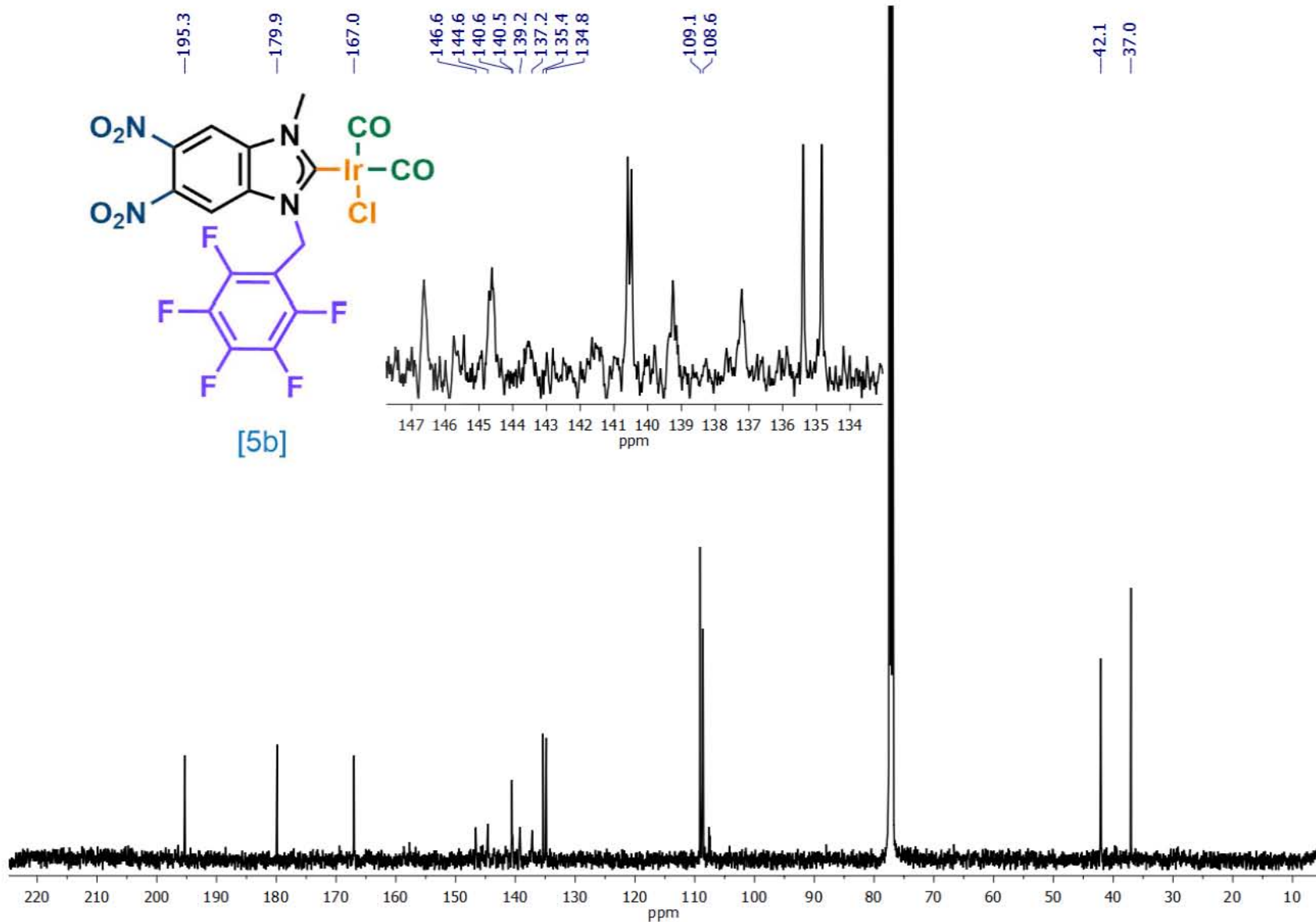


Figura 53. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (125 MHz, CDCl_3) del Complejo **5b**.

ANEXO II. ESPECTROS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

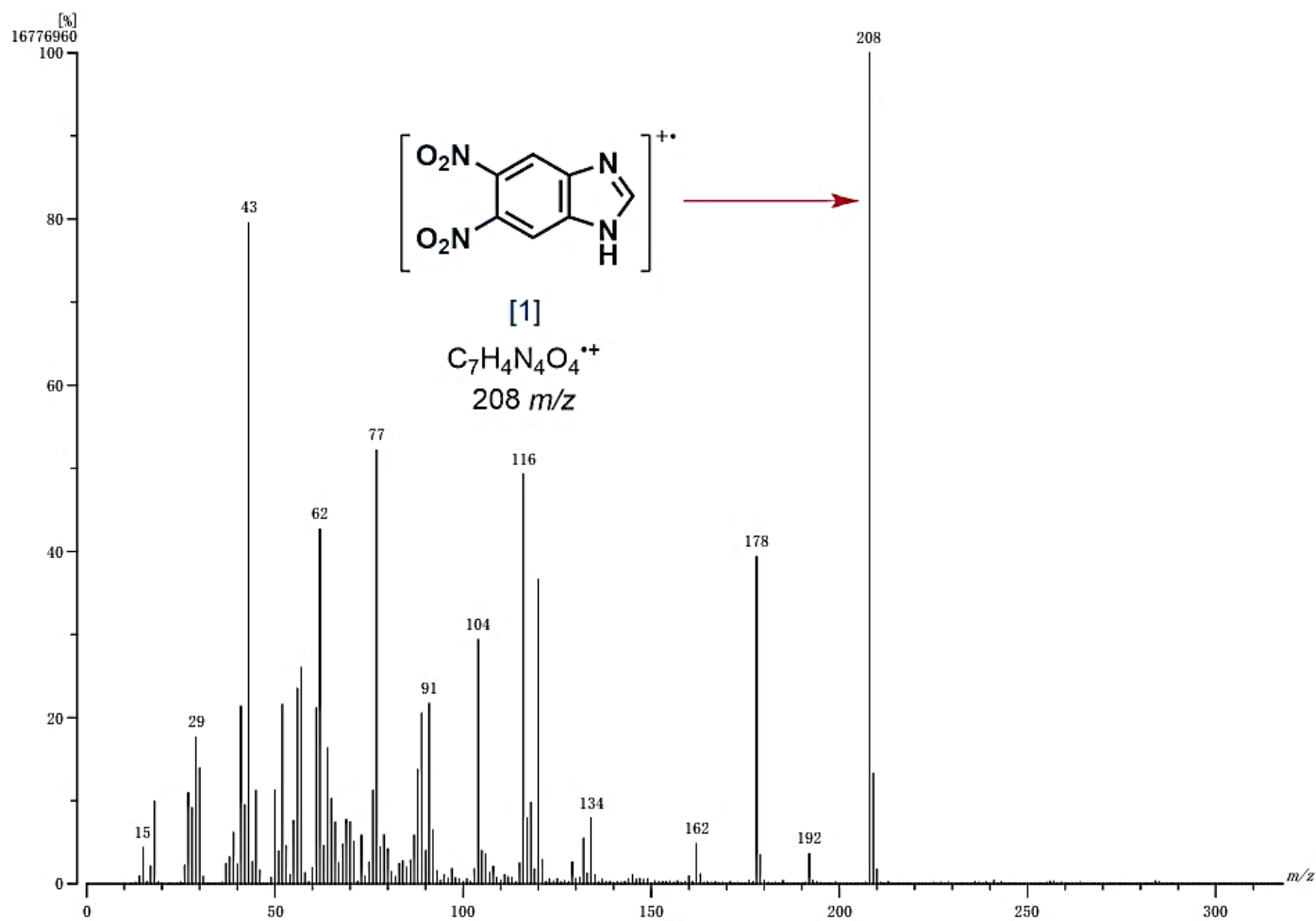


Figura 54. Espectro de masas (I.E.⁺) del 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazol 1.

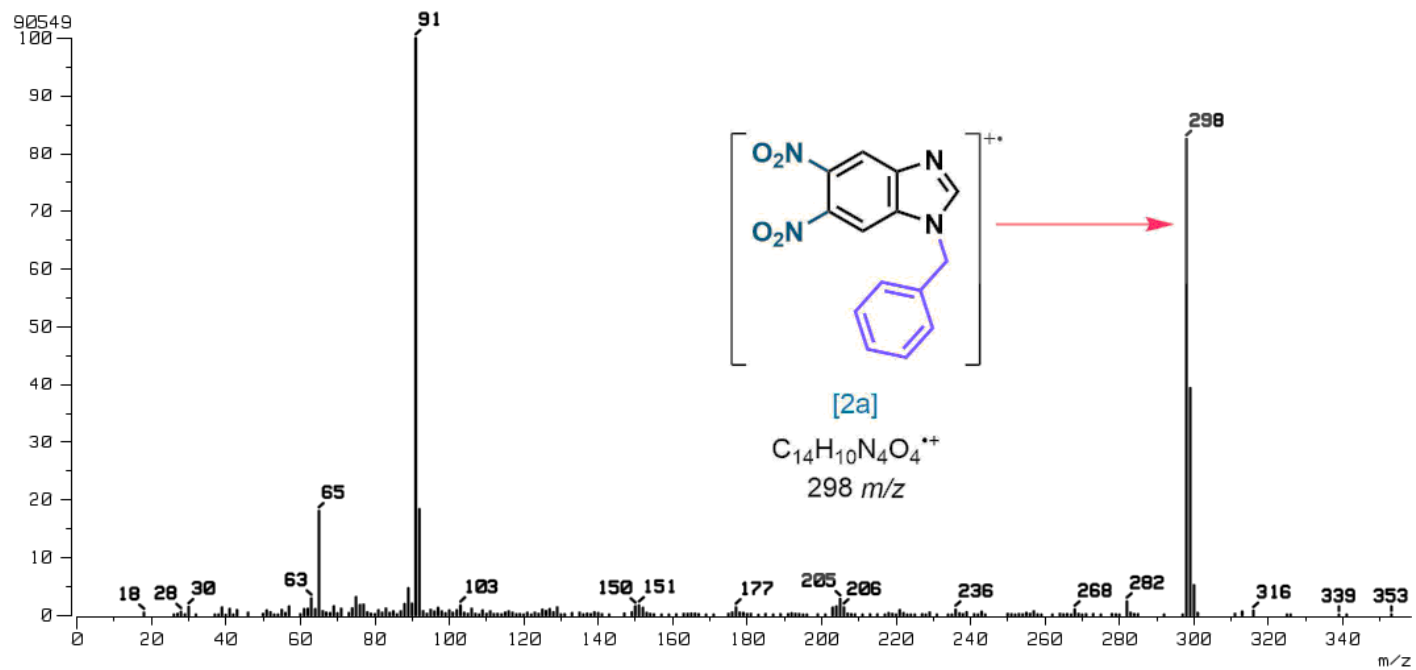


Figura 55. Espectro de masas (I.E.⁺) del 1-bencil-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazol 2a.

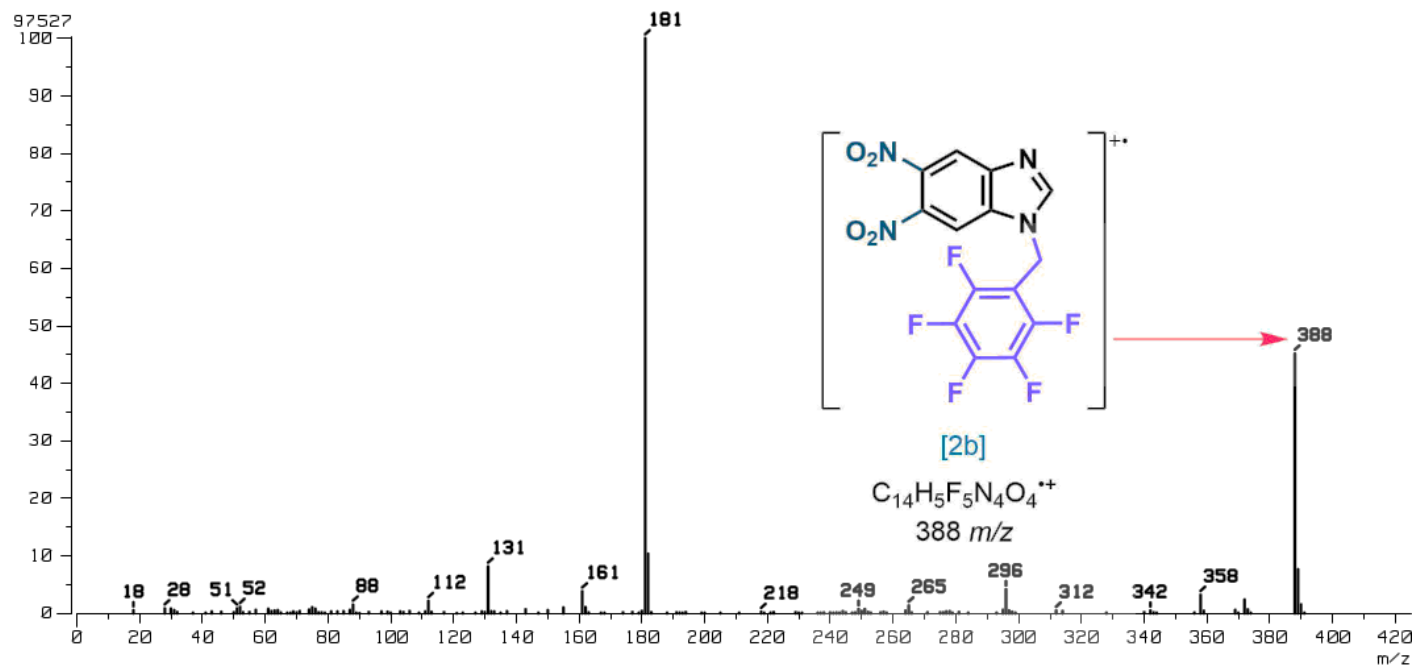


Figura 56. Espectro de masas ($I.E.^+$) del 5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1H-benzo[d]imidazol **2b**.

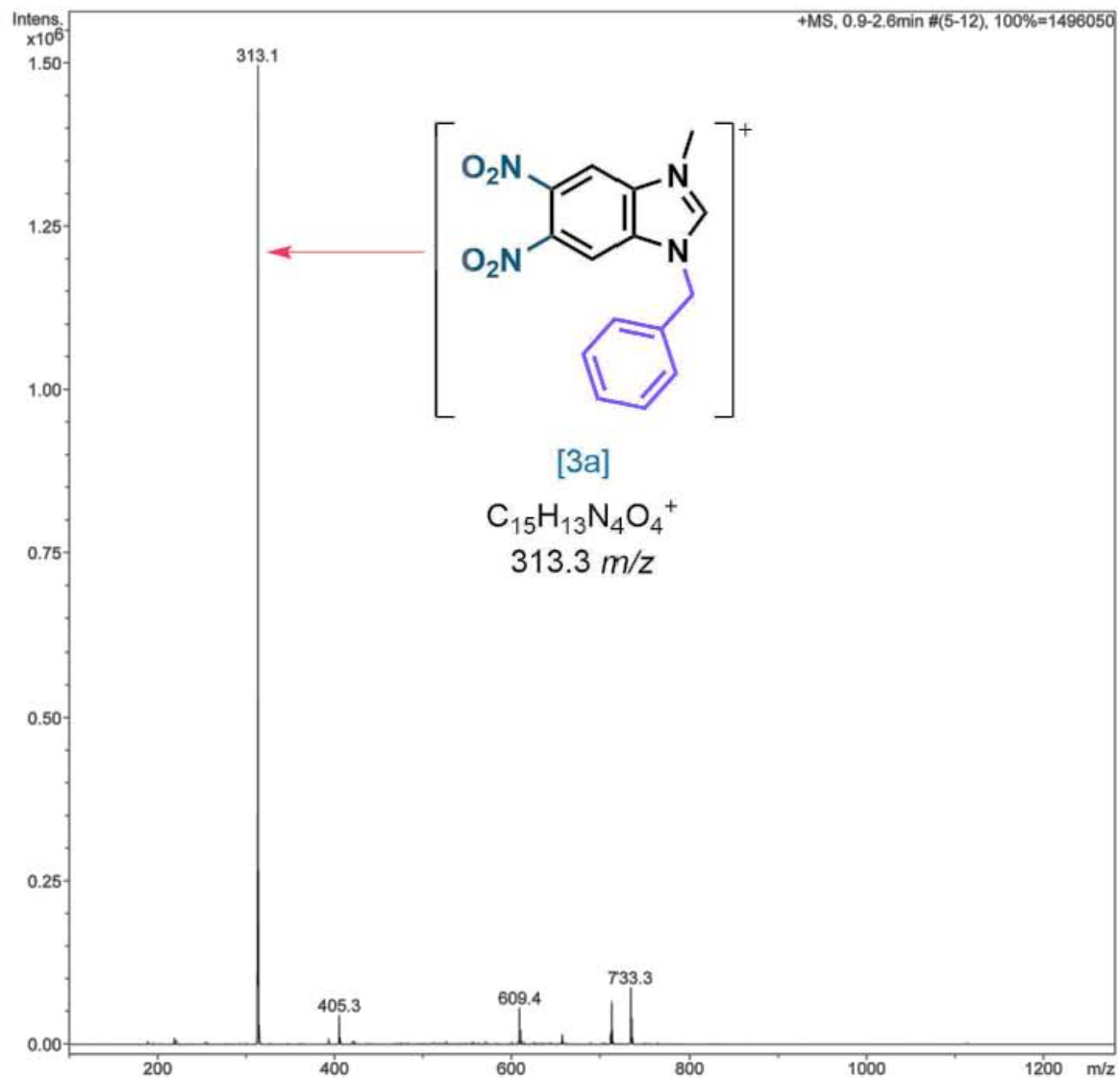


Figura 57. Espectro de masas (ESI-IT) del 1-bencil-3-metil-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazolio 3a.

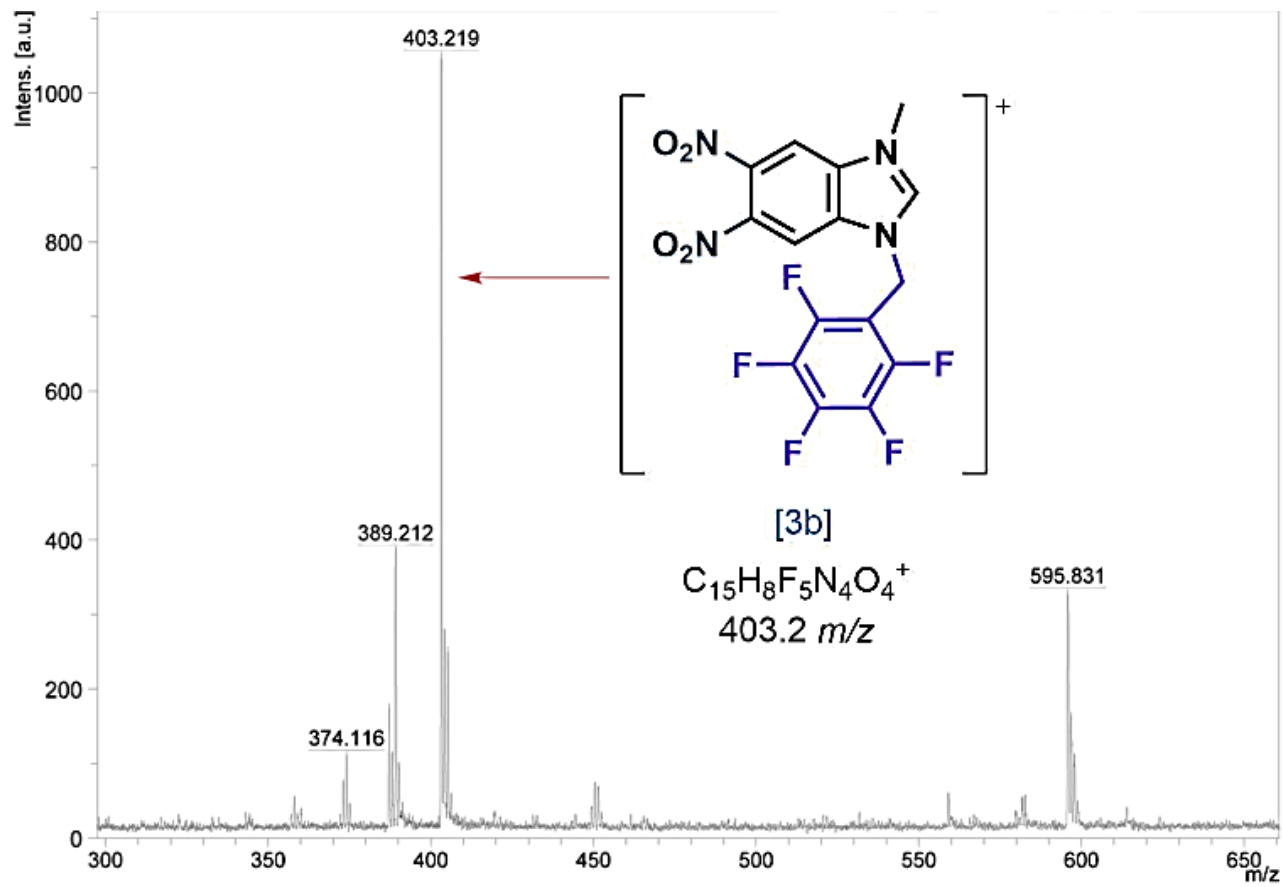


Figura 58. Espectro de masas (MALDI-TOF) del Tetrafluoroborato de 3-metil-5,6-dinitro-1-((perfluorofenil)metil)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium **3b**.

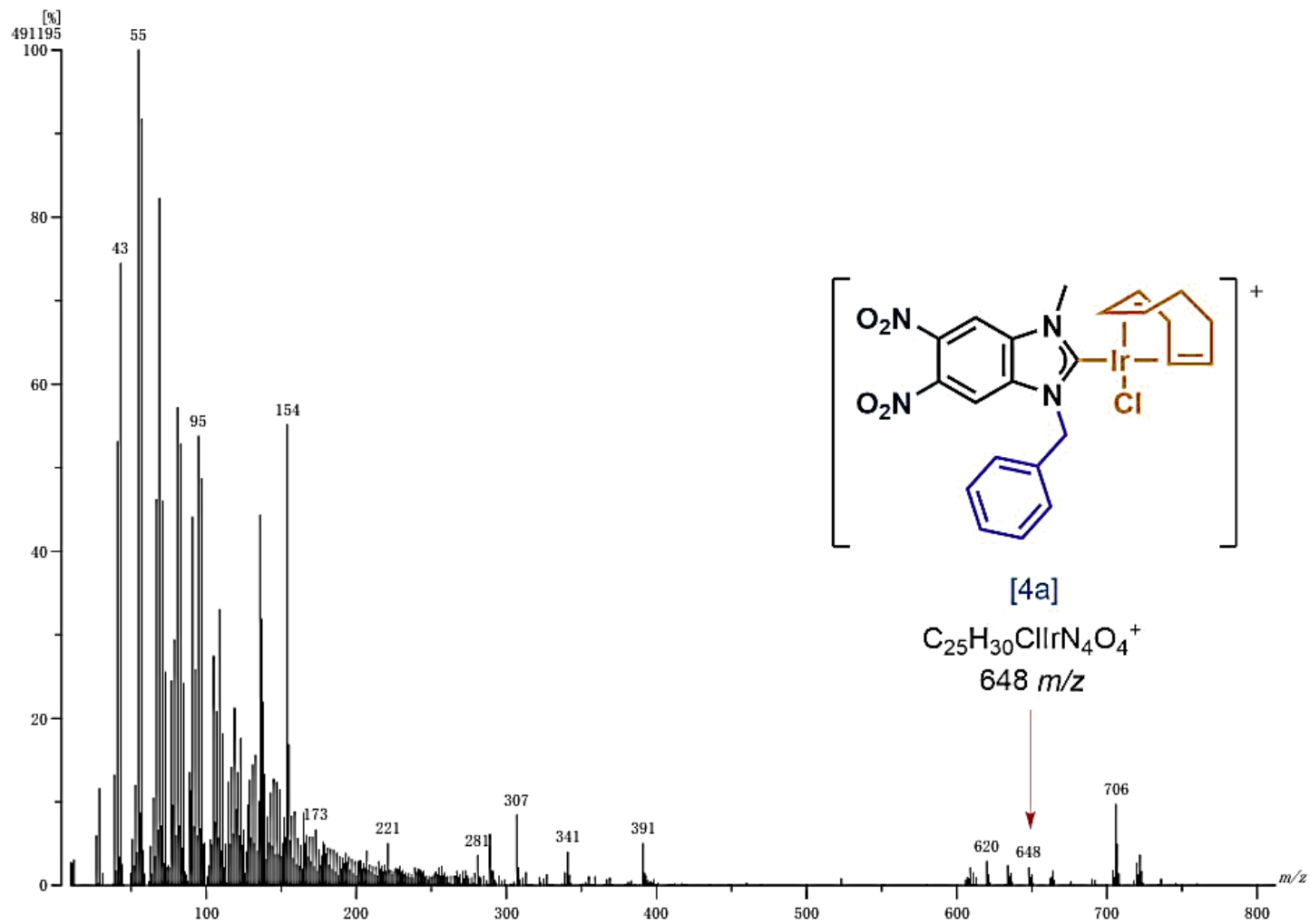


Figura 59. Espectro de masas (FAB⁺) del Complejo 4a.

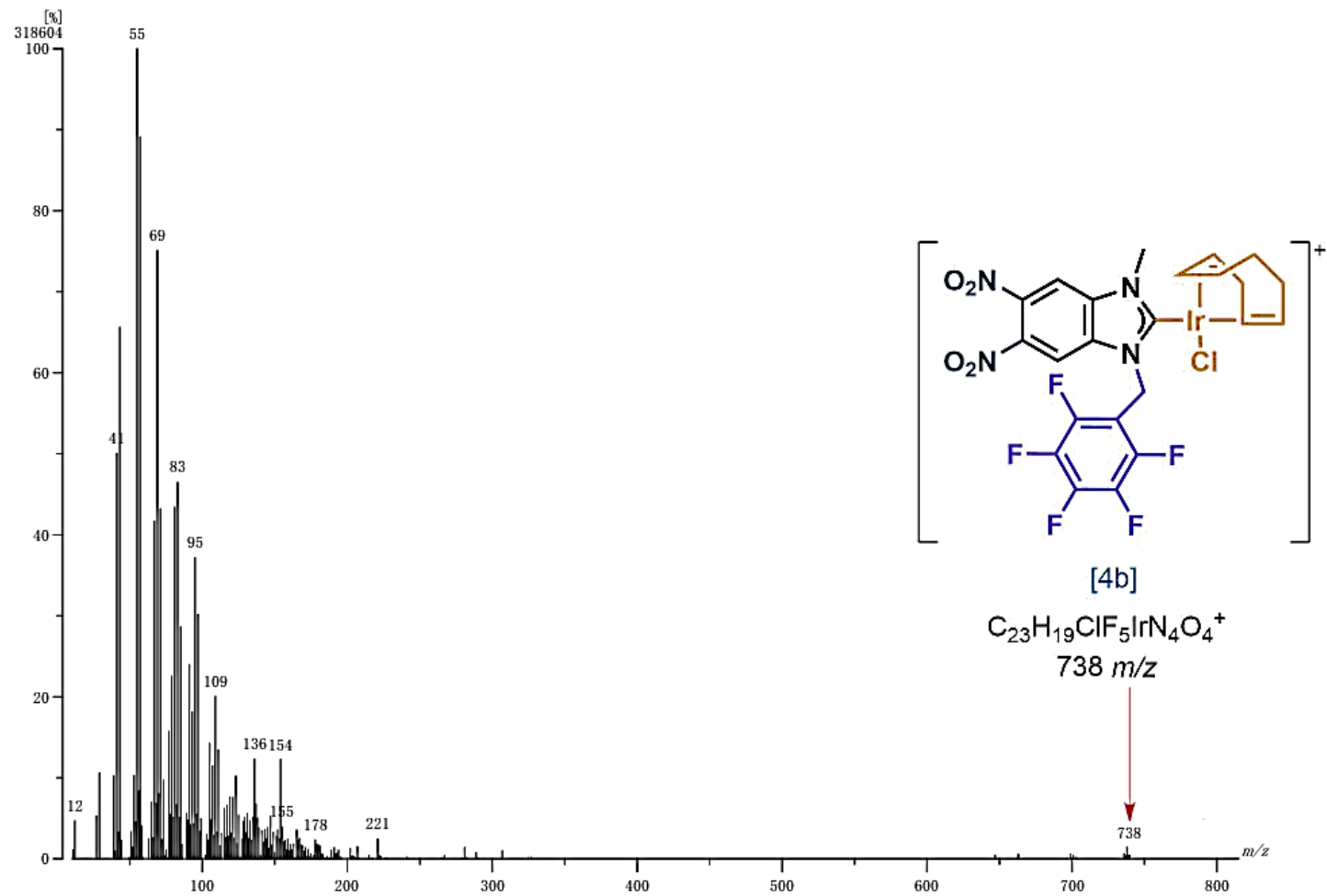


Figura 60. Espectro de masas (FAB⁺) del Complejo 4b.

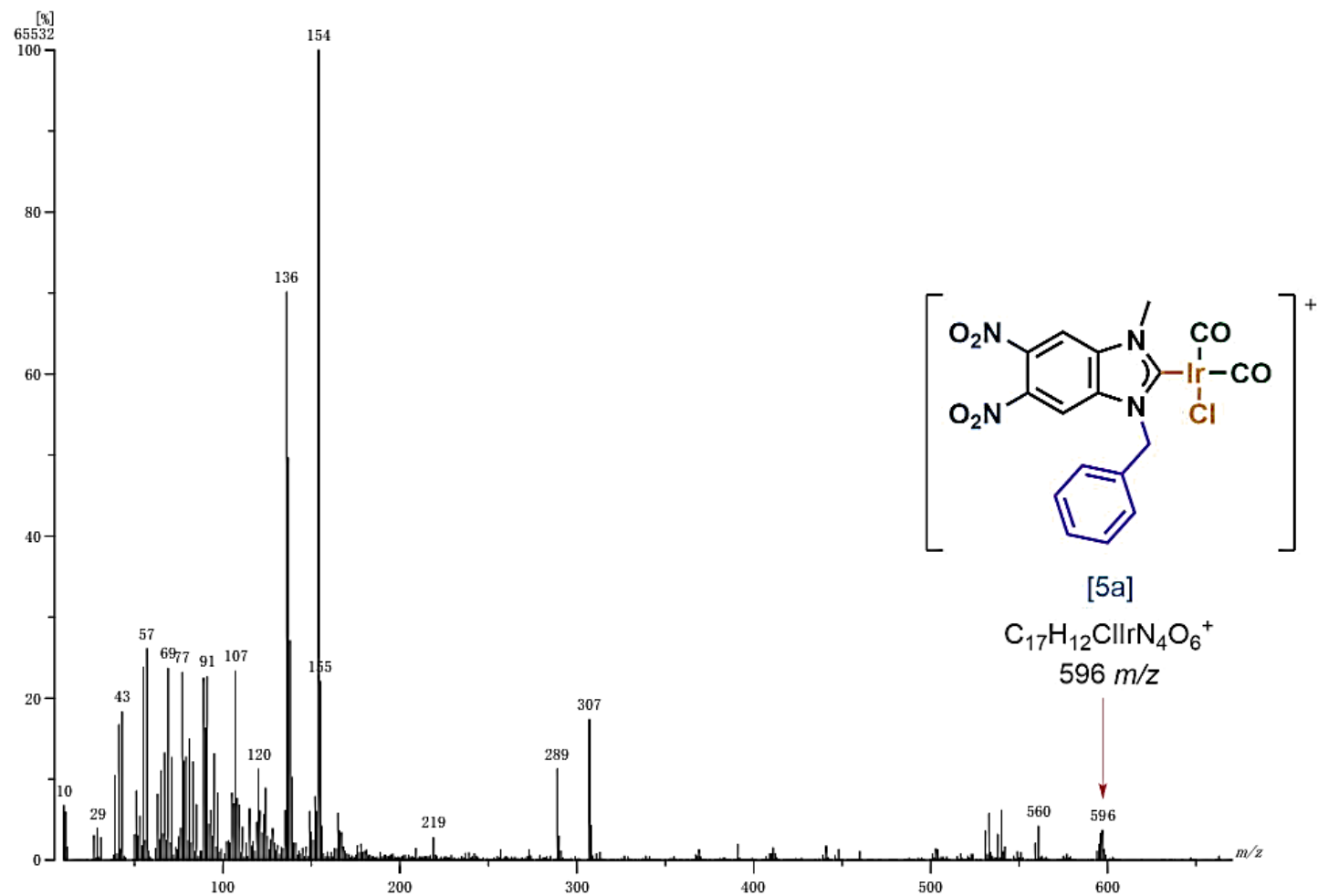


Figura 61. Espectro de masas (FAB⁺) del Complejo 5a.

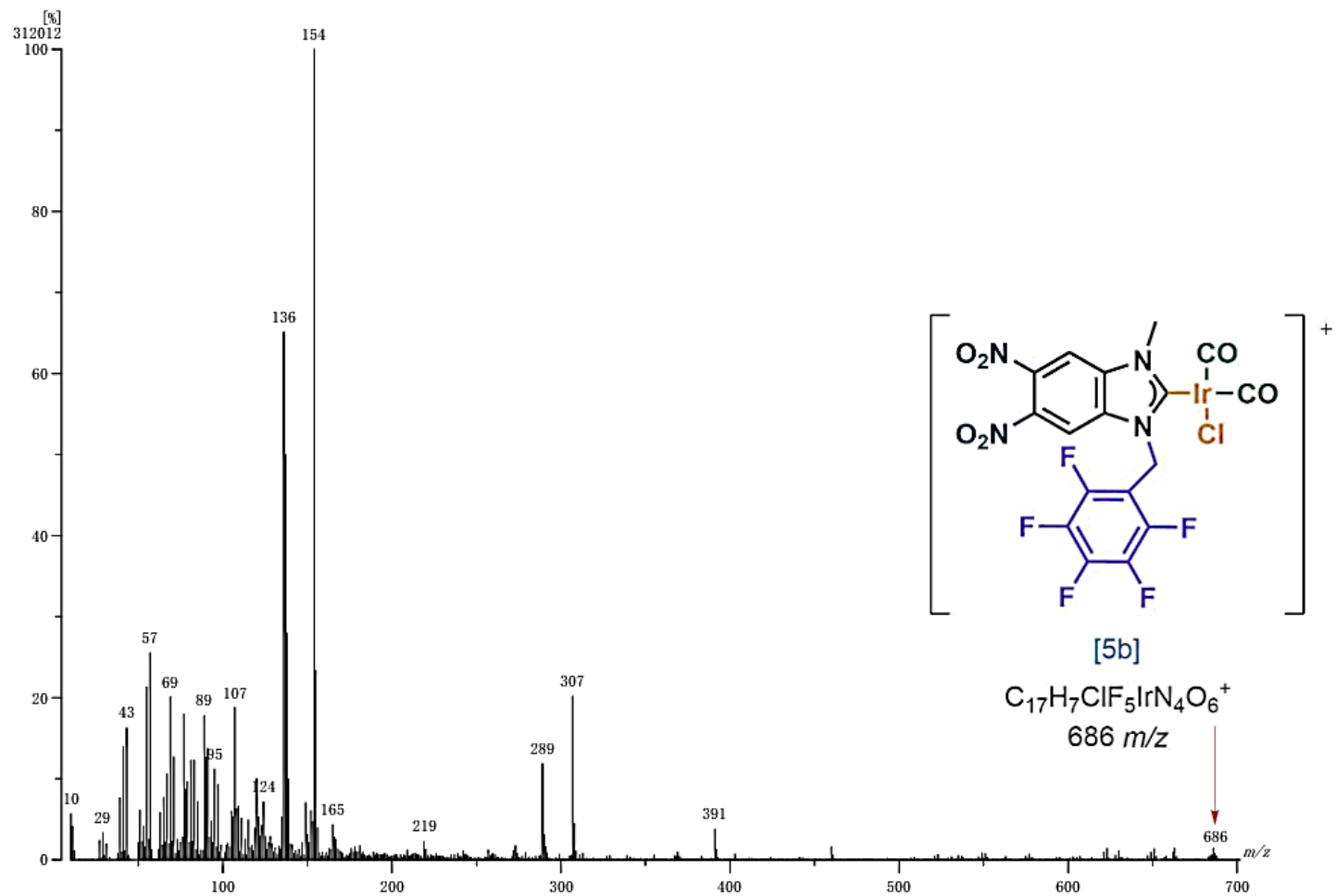


Figura 62. Espectro de masas (FAB⁺) del Complejo 5b.

ANEXO III. ESPECTROS DE I.R.

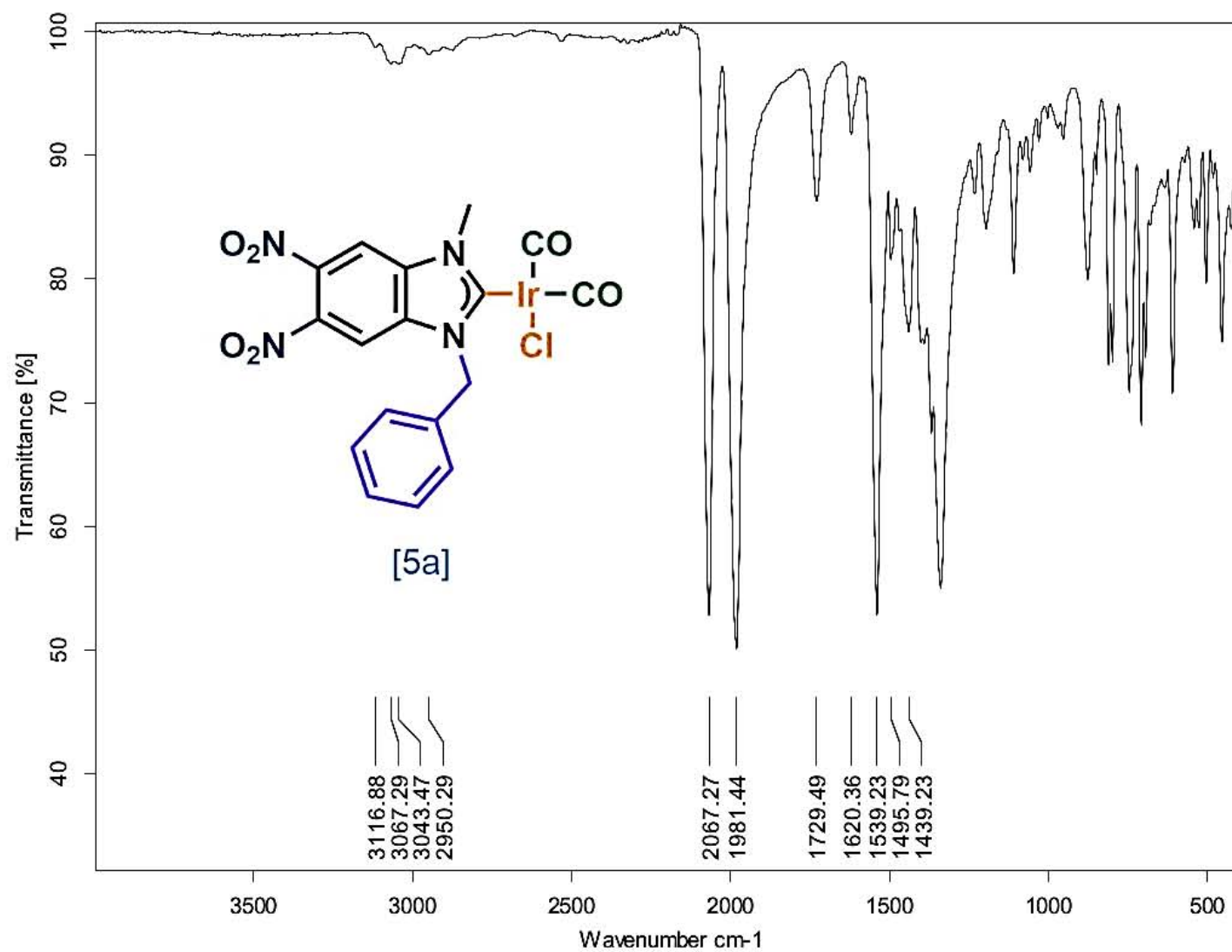


Figura 63. Espectro de FT-IR del complejo 5a.

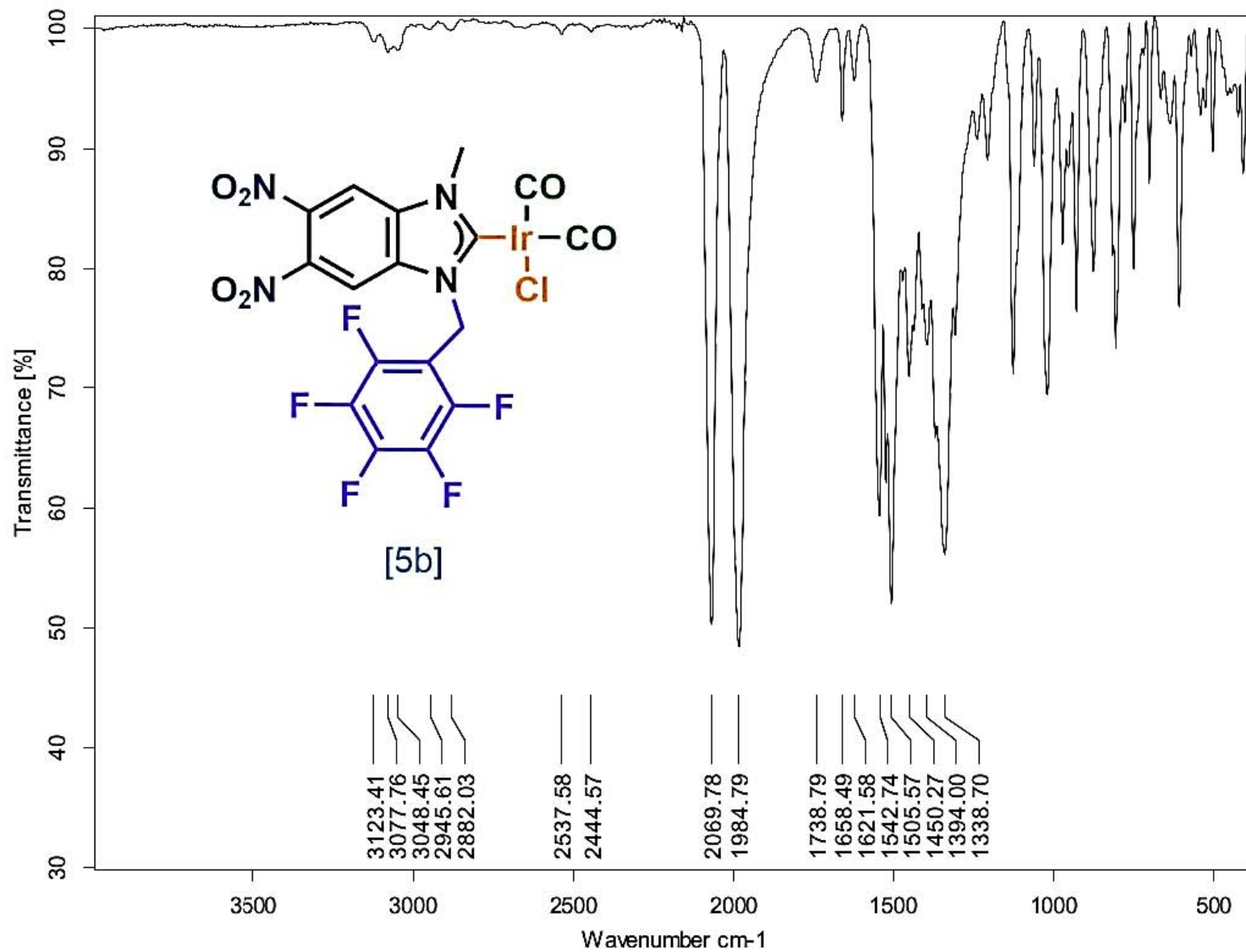


Figura 64. Espectro de FT-IR del complejo **5a**.

ANEXO IV. CONSTANCIAS DE LAS PARTICIPACIONES.



El comité organizador del II Congreso de Química del Caribe, evento internacional realizado en la Universidad del Atlántico, certifica que

ARTURO TRINIDAD SÁNCHEZ MORA

Participó como **Ponente** en la modalidad **Comunicación oral** con el trabajo titulado: "Síntesis y evaluación citotóxica de complejos NHC de Ir(I) derivados de 5,6-dinitro-benzimidazol"
De los autores: Arturo Sánchez-Mora, Hugo Valdés, David Morales-Morales

27 de Febrero al 01 de Marzo del 2019
Universidad del atlántico, Puerto Colombia
Atlántico - Colombia


Farrah Cañavera Buelvas
Directora II Congreso de Química del Caribe


Victoria Andrea Arana Rengifo
Directora Comité Científico

II congreso de QUÍMICA DEL CARIBE
27 Febrero a 01 Marzo | 2019



El Encuentro de Química Inorgánica y la Universidad Veracruzana

Otorgan la presente

Constancia a:

Sánchez-Mora Arturo, Valdés Hugo, Morales-Morales David

Por la presentación del trabajo en modalidad Cartel, titulado:

C-76. Síntesis, Caracterización y evaluación citotóxica de complejos NHC de Ir(I) derivados de 5,6-dinitro-1H-benzimidazol

Durante el 9º Encuentro de Química Inorgánica, celebrado en la Unidad de Servicios Bibliotecarios y de Información (USBI), Ixtaczoquitlán, Veracruz, del 25 al 28 de Junio del 2019.


Dra. Esmeralda Sánchez Pavón


Dr. Raúl Colorado Peralta


M.C. Luis Alberto Sánchez Bazán





Research paper

NHC-Ir(I) complexes derived from 5,6-dinitrobenzimidazole. Synthesis, characterization and preliminary evaluation of their *in vitro* anticancer activity



Arturo Sánchez-Mora^a, Hugo Valdés^a, María Teresa Ramírez-Apan^a, Antonio Nieto-Camacho^a, Simón Hernández-Ortega^a, Daniel Canseco-González^b, David Morales-Morales^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico

^b CONACYT-Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cancer
Cytotoxic activity
N-heterocyclic carbene
Iridium complexes
Fluorinated complexes
Antioxidant properties

ABSTRACT

The design, synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of a series of Ir(I) NHC complexes derived from 5,6-dinitrobenzimidazole is reported. The evaluation was performed in five human cancer cell-lines, namely glioblastoma (U-251), prostatic adenocarcinoma (PC-3), colorectal adenocarcinoma (HCT-15), mammary adenocarcinoma (MCF-7) and lung adenocarcinoma (SKLU-7), including healthy cells of African green monkey kidney (COS-7) for comparative purposes. The complexes exhibited better activity in comparison with the corresponding NHC ligand precursors. In particular, complex (4a) exhibited a good performance against PC-3 and SKLU-1 with IC₅₀ values of 10.6 ± 0.9 μM and 10.4 ± 1.5 μM, respectively.

1. Introduction

Cancer is one of the main causes of death around the world, producing 9.6 million deaths in 2018, only. Furthermore, each year there are 18.1 million new cases of cancer worldwide. Besides the incalculable human cost of cancer, its economical cost was estimated in \$ 1.16 trillion USD. The estimation includes some important issues such as, treatment cost, productivity lost due to premature death and disability among others [1,2].

Patients with cancer are commonly treated with platinum derivatives, such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin [1–4]. In fact, nearly half of patients undergoing chemotherapy are treated with platinum drugs [5]. However, their use has been related to several side effects, such as infertility, alopecia, and anemia. In particular, cisplatin is also nephrotoxic and ototoxic [6,7]. In order to overcome these drawbacks, many research groups have focused their efforts on developing new potential anticancer compounds based on other transition metals, such as Au, Cu, Ru, Os, etcetera [8–26]. Recently, Ir has attracted much attention for the design of metallodrugs because of its antiproliferative and luminescent properties, especially when its oxidation state is + III [27–37]. However, there are only a few examples of Ir(I) complexes for this purpose [3,4,38–40]. Metzler-Nolte and co-workers described the cytotoxic activity of a series of complexes of the type [(NHC)IrCl(COD)]

(Fig. 1), where NHC corresponds to a N-heterocyclic carbene ligand, more specifically they prepared the imidazolylidene and triazolylidene derivatives [41–43]. These compounds showed IC₅₀ values in the micromolar scale, ranging from 10.3 ± 2.9 to 46.920 ± 0.085 μM for MCF-7.

In the past two decades, NHC ligands have become important motifs for the design of catalysts [44–46], as well as biological active compounds [8–26,47]. They form strong bonds with practically any transition metal, and can be easily prepared and functionalized, allowing the fine tuning of their electronic and steric properties. Based on the aforementioned reasons, herein we report the synthesis and cytotoxic activity of a series of Ir(I)–NHC complexes derived from 5,6-dinitrobenzimidazole (Fig. 1). The presence of the nitro groups at the NHC ligand may provide interesting biological properties to their related complexes. The nitro group can interact with biological nucleophiles such as proteins, amino acids, nucleic acids, and enzymes through non-covalent interactions and can be found in some antineoplastic, antibiotic, and antiparasitic agents [48,49]. Furthermore, the –NO₂ groups can be bioactivated by enzymatic reduction, producing reactive species that may serve as prodrugs, ultimately inducing the desired or undesired biological effects [48].

* Corresponding author.

E-mail address: damor@unam.mx (D. Morales-Morales).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119061>

Received 19 May 2019; Received in revised form 22 July 2019; Accepted 8 August 2019

Available online 09 August 2019

0020-1693/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

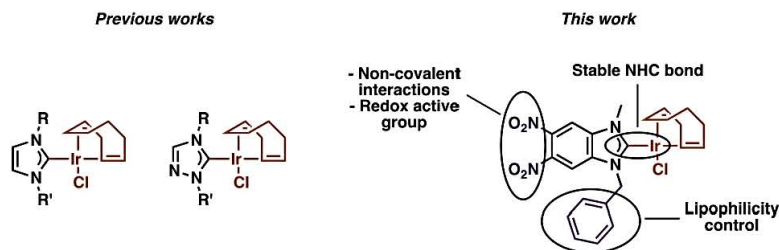
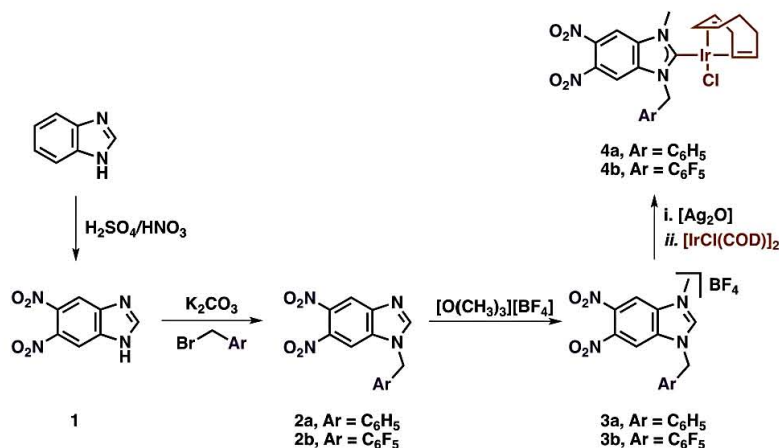


Fig. 1. Cytotoxic NHC-Ir(I) complexes.



Scheme 1. Synthesis of 5,6-dinitrobenzimidazolium salts and Ir(I)-NHC complexes.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis and characterization of NHC-Ir(I) complexes

The preparation of the 5,6-dinitrobenzimidazolium salts was performed in three steps from benzimidazole (Scheme 1). First, the nitration of benzimidazole was carried out using a mixture of $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. The reaction was heated at 130°C for 12 h. After purification 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole was isolated in a 52% yield. Afterwards, 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole was reacted with either benzyl bromide to afford (**2a**) (87%) or 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide to afford (**2b**) (86%). In our study we chose two different *N*-substituent fragments, a benzyl and the fluorinated analog a pentafluorinated benzyl. The presence of fluorine atoms may increase the lipophilicity of the corresponding complex, and thus enhance its cytotoxic activity. Finally, compound (**2a**) or (**2b**) were reacted with trimethyloxonium tetrafluoroborate in 1,2-dichloroethane (Scheme 1). The 5,6-benzimidazolium salts (**3a**) and (**3b**) were obtained in 81% and 87% yield, respectively (Scheme 1).

All compounds were characterized by NMR spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis. The NMR spectra of the azolium salts (**3a**) and (**3b**) reveals a loss of symmetry. The most characteristic signal in the ^1H NMR spectra corresponds to the NCHN fragment at 10.06 and 10.14 ppm, respectively. In the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spectrum, the signals of the procarbenic carbon can be found at 150.2 ppm for (**3a**) and 150.4 ppm for (**3b**). The mass spectra of the azolium salts provide further information about their structures. The molecular ion $[\text{M}-\text{BF}_4]^+$ of (**3a**) and (**3b**) was observed at 313.10 and 403.22 m/z , respectively. All these data are in agreement with the proposed molecular structures.

The preparation of the Ir(I) complexes (**4a**) and (**4b**) was performed

by a transmetalation reaction (Scheme 1). The reaction of Ag_2O with the corresponding azolium salt in acetonitrile, affords the Ag(I)-NHC derivatives (not isolated). Then, the addition of $[\text{IrCl}(\text{COD})]_2$ to the solution produces the immediate precipitation of AgBF_4 and the formation of the desired product. The ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the complexes were in agreement with the symmetry loss of the azolium salts. The most characteristic signal of the complexes corresponds to the metallated carbon that appears at 202.9 ppm. The mass spectra of the complexes were very clean, exhibiting peaks for the molecular ions at 648.0 m/z ($[\text{M}]^+$) for (**4a**) and 738.0 m/z ($[\text{M}]^+$) for (**4b**) respectively.

The molecular structure of complex (**4a**) was unequivocally determined by single crystal X-ray diffraction studies (Table 1, Fig. 2). Suitable crystals for this analysis were obtained by slow diffusion of hexane into a concentrated solution of the compound in 1,2-dichloroethane.

The structure reveals a distorted square planar geometry around the metal center. The NHC ligand is coordinated to Ir(I), one chlorine and one COD ligand complete the coordination sphere. The Ir(I)-NHC length is 2.004 (3) Å, being typical for this kind of compounds. As a consequence of the *trans* influence of the NHC ligand, the average distance of the carbons *trans* to the carbene carbon (2.19 (4) Å) is slightly longer than the distance of the carbons *trans* to the chlorine ligand (2.11 (4) Å). The crystal packing of (**4a**) showed two close contact interactions between pairs of molecules (Fig. 2), in which the nitro moieties are involved. The C(14)⋯O(2') distance is 3.33 Å, while the C(7)⋯O(4') bond distance is slightly longer, 3.41 Å.

2.2. Cytotoxic evaluation of Ir(I)-NHC complexes

Preliminary cytotoxic evaluation of all compounds was performed in five human cancer cell-lines; glioblastoma (U-251), prostatic

Table 1
Crystal data and structure refinement for (4a).

Empirical formula	C ₂₃ H ₂₄ ClIrN ₄ O ₄
Formula weight	648.11
Temperature	298(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
Unit cell dimensions	a = 13.3172(5) Å α = 90° b = 14.3965(5) Å β = 96.7621(11)° c = 12.0061(4) Å γ = 90°
Volume	2285.81(14) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.883 Mg/m ³
Absorption coefficient	5.996 mm ⁻¹
F(0 0 0)	1264
Crystal size	0.290 × 0.087 × 0.065 mm ³
Theta range for data collection	2.218–25.392°
Index ranges	−16 ≤ h ≤ 12, −17 ≤ k ≤ 17, −14 ≤ l ≤ 14
Reflections collected	17,262
Independent reflections	4201 [R(int) = 0.0227]
Completeness to theta = 25.242°	99.9%
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7452 and 0.5065
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	4201/0/299
Goodness-of-fit on F ²	1.123
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0233, wR2 = 0.0449
R indices (all data)	R1 = 0.0280, wR2 = 0.0471
Largest diff. peak and hole	0.671 and −0.447 e.Å ⁻³

adenocarcinoma (PC-3), colorectal adenocarcinoma (HCT-15), mammary adenocarcinoma (MCF-7) and lung adenocarcinoma (SKLU-1), as well as healthy cells of African green monkey kidney (COS-7) for comparative purpose. Tests were carried out using a single-dose of a 25 μM solution of the corresponding 5,6-dinitro compound derivative in DMSO. Table 2 shows the results of the evaluation. The azolium salts precursor (2a) was poorly active against all the cell lines, while compound (2b) inhibited the growth of PC-3 (30.5%) and SKLU-1 (52.7%) (Entry 2, Table 2). The only structural difference between (2a) and (2b) being the presence of the fluorinated aromatic ring in (2b). Thus, it is clear that the fluorine atoms play an important role in the behavior of this compound.

Regarding the azolium salts (3a) and (3b), their cytotoxic activity varies from 85.3% to 100%, being both more active than cisplatin (Entry 7, Table 2). However, both compounds (3a, 86.3%) and (3b, 98.3%) were very active also for COS-7. Interestingly, the coordination of Ir(I) decreased the inhibition of the growth of some tumor cell lines. Compound (4a) exhibited low inhibition for U-251 (25.3%) and HCT-

15 (11.2%), while for PC-3, MCF-7 and SKLU-1 were very good, reaching a percentage of inhibition up to 100%. Fortunately, the percentage of inhibition growth for the healthy cell line COS-7 was low (7.9%). In contrast, the fluorinated complex (4b) was very active in all the evaluated cell lines, including COS-7.

Since compound (4a) exhibited low inhibition in healthy cells, we decided to determine its IC₅₀ in two different human tumor cell lines. Thus, compound (4a) exhibited good cytotoxicity against PC-3 (10.6 ± 0.9 μM) and SKLU-1 (10.4 ± 1.5 μM), affording values in the micromolar scale. These values are similar to those found for cisplatin, 8.4 ± 0.8 μM for PC-3 and 4.3 ± 0.5 μM for SKLU-1, however with lower toxicity against healthy cells.

2.3. Antioxidant properties

The production of reactive Oxygen Species (ROS) is an important carcinogenic process through the promotion of cell proliferation-activating, growth-related signaling pathways [50]. Thus, given the relevance of this process and the fact that it may be possible that the complexes may engage in relevant redox processes we evaluated the antioxidant properties of both complexes (4a) and (4b), using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) technique, which involves the production of ROS with FeSO₄ in the presence of lipids obtained from rat brain [51]. Finding that both species, do not produce ROS but possess antioxidant properties (Table 3).

For completeness the IC₅₀ values for both complexes were also determined and compared with those of butylated hydroxytoluene (BHT) and α-tocopherol (Fig. 3) [52] two reference compounds with antioxidant properties.

3. Conclusions

In summary, we have synthesized and characterized a novel series of Ir(I)-NHC complexes derived from 5,6-dinitrobenzimidazole. The molecular structure of (4a) was unambiguously determined by single crystal X-ray diffraction analysis. The structure shows the NHC coordinated to Ir(I). The nitro groups favored H-bonds between pairs of molecules. On the other hand, the *in vitro* anticancer activity experiments showed that the presence of the fluorine atoms in the *N*-substituent increases the inhibition of the growth of human tumor cell lines, however, in some cases decreases the selectivity, inhibiting the growth of healthy cells (COS-7). The coordination of the NHC to IrCl (COD) favors the selectivity towards cancer cell lines compared with the NHC ligand precursor. Complex (4a) inhibited the growth of PC-3, MCF-7 and SKLU-7 in 99.0%, 100% and 68.7%, respectively, and was inactive for healthy cell (COS-7) representing the best case in this work. Furthermore, the IC₅₀ values of (4a) for PC-3 and SKLU-7 were in the

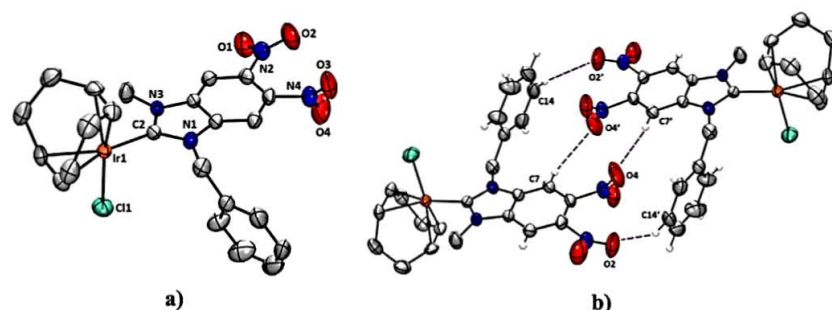
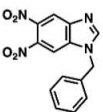
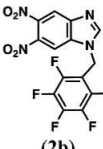
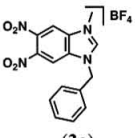

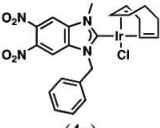
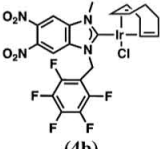


Fig. 2. a) Molecular structure of (4a). b) Close contact interactions between pairs of molecules. The ellipsoids are represented at 50% probability. Selected Bond Lengths (Å): Ir(1)-C(2) 2.004(3); Ir(1)-C(18) 2.107(3), Ir(1)-C(19) 2.111(4), Ir(1)-C(22) 2.184(4), Ir(1)-C(23) 2.204(4), Ir(1)-Cl(1) 2.3641(9), O(1)-N(2) 1.210(4), N(1)-C(2) 1.362(4), N(1)-C(11) 1.468(4), N(3)-C(2) 1.357(4), N(3)-C(10) 1.455(5), N(4)-O(4) 1.202(5), N(4)-O(3) 1.204(5), N(4)-C(6) 1.473(5), O(2)-N(2) 1.213(5), N(2)-C(5) 1.469(5). Selected Bond Angles (°): C(2)-Ir(1)-C(18) 89.12(14), C(2)-Ir(1)-C(19) 92.44(15), C(18)-Ir(1)-C(19) 39.35(15),

C(2)-Ir(1)-C(22) 160.61(14), C(18)-Ir(1)-C(22) 96.70(15), C(19)-Ir(1)-C(22) 80.75(15), C(2)-Ir(1)-C(23) 162.20(14), C(18)-Ir(1)-C(23) 80.89(15), C(19)-Ir(1)-C(23) 89.13(15), C(22)-Ir(1)-C(23) 36.79(13), C(2)-Ir(1)-Cl(1) 90.98(10), C(18)-Ir(1)-Cl(1) 158.61(12), C(19)-Ir(1)-Cl(1) 161.85(12), C(22)-Ir(1)-Cl(1) 90.22(10), C(23)-Ir(1)-Cl(1) 93.03(11), O(4)-N(4)-O(3) 124.8(4), N(3)-C(2)-N(1) 105.7(3), N(3)-C(2)-Ir(1) 126.7(3), N(1)-C(2)-Ir(1) 127.5(3), O(1)-N(2)-O(2) 124.3(4), C(19)-C(18)-Ir(1) 70.5(2), C(23)-C(22)-Ir(1) 72.4(2).

Table 2
Inhibition growth (%) of tumor cell lines at 25 μ M by 5,6-dinitro compounds derivatives.

Entry		U-251	PC-3	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
1	 (2a)	6.8	10.5	–	6.4	0.2	2.1
2	 (2b)	–	30.5	6.6	–	52.7	1.1
3	 (3a)	100	85.3	100	100	100	86.3
4	 (3b)	100	100	100	92.7	100	98.3
5	 (4a)	25.3	99.0	11.2	100.0	68.7	7.9
6	 (4b)	75.0	100	100	100	99.0	93.2
7	Cisplatin	48.4	45.9	36.7	20.3	77.5	42.8

micromolar scale. Finally, the production of Reactive Oxygen Species (ROS) by complexes (4a) and (4b) was tested showing that both species do not produce ROS but instead have antioxidant properties even better than α -tocopherol, being (4a) the best in these assays. Consequently, this compound represents a good candidate to perform further studies, some of which are currently under developing in our laboratory.

4. Experimental

All chemical compounds were commercially obtained from Aldrich Chemical Co. and used as received without further purification. The ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra were recorded on a Bruker Ascend 500 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm down field of TMS using the residual signals in the solvent as internal standard. Elemental analyses were performed on a Perkin Elmer 240. CHNS analyses were performed in Thermo Scientific Flash 2000 elemental analyzer, using a Mettler Toledo XP6 Automated-S Microbalance and sulfanilamide as standard (Thermo Scientific BN 217826, attained values N = 16.40%, C = 41.91%, H = 4.65% and S = 18.63%; certified values

N = 16.26%, C = 41.81%, H = 4.71% and S = 18.62%). MS-Electrospray determinations were recorded on a Bruker Daltonics-Esquire 3000 plus Electrospray Mass Spectrometer. Melting points were carried out on Mel-Temp[®] Digital Melting Point Apparatus using open capillary tubes with a resolution of $\pm 1^\circ\text{C}$.

4.1. Synthesis of 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole (1)

A solution of benzimidazole (12 g, 101.6 mmol) in H_2SO_4 (40 mL) was cooled at 0°C in an ice bath. Then, fuming HNO_3 (80 mL) was added dropwise to the solution. The reaction was kept at 0°C for 20 min more. After this time, it was slowly heated until a temperature of 130°C was reached and was kept at this temperature for 12 h. After this time, the resulting reaction mixture was cooled at 0°C and 200 g of ice were added. This solution was neutralized with NH_4OH , and the yellow solid obtained, filtered. This solid was purified by column chromatography using ethyl acetate as eluent, a pale-yellow band was separated. The resulting organic solution was concentrated until the precipitation of the desired product, which was then filtered. Yield: (52%). The

Table 3
Determination of Lipid peroxidation inhibition (rat brain).

Sample	Code	Concentration (μM)	TBARS (nmol/mg prot.)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μM)
4b (n = 3)	MMD5	Basal	0.273 \pm 0.005		
		Control	8.305 \pm 0.055		
		3	6.751 \pm 0.099	18.7 \pm 1.14	3.74 \pm 0.12
		3.5	5.328 \pm 0.592**	35.77 \pm 7.39	
		4	2.171 \pm 1.062**	73.7 \pm 13.01	
		4.5	0.852 \pm 0.251**	89.71 \pm 3.1	
		5	0.665 \pm 0.078**	91.98 \pm 0.99	
5.5	0.430 \pm 0.028**	94.81 \pm 0.37			
6	0.402 \pm 0.025**	95.16 \pm 0.31			
4a (n = 3)	MMD6	Basal	0.273 \pm 0.005		
		Control	8.305 \pm 0.055		
		3	6.848 \pm 0.068	17.54 \pm 0.35	4.99 \pm 0.19
		3.5	6.966 \pm 0.233	16.09 \pm 3.08	
		4	5.812 \pm 0.238*	29.98 \pm 3.31	
		4.5	5.511 \pm 0.330*	33.59 \pm 4.31	
		5	3.289 \pm 1.034**	60.24 \pm 12.63	
5.5	2.512 \pm 1.082**	69.58 \pm 13.2			
6	1.094 \pm 0.435**	86.76 \pm 5.35			
BHT (n = 3)		Basal	0.268 \pm 0.053		
		Control	7.384 \pm 0.630		
		0.56	6.098 \pm 0.353	16.64 \pm 2.86	1.22 \pm 0.44
		0.75	5.559 \pm 0.294*	23.92 \pm 2.69*	
		1	4.457 \pm 0.283**	37.14 \pm 7.44**	
		1.33	3.228 \pm 0.572**	53.59 \pm 8.93**	
		1.78	1.315 \pm 0.489**	81.59 \pm 6.89**	
2.37	0.487 \pm 0.075**	93.16 \pm 1.16**			
α -Tocopherol (n = 4)		Basal	0.200 \pm 0.011		
		Control	6.589 \pm 0.213		
		0.32	6.048 \pm 0.242	8.26 \pm 1.31	6.78 \pm 2.16
		1	5.211 \pm 0.332*	21.13 \pm 2.56*	
		3.16	3.676 \pm 0.569**	44.84 \pm 6.74**	
		10	2.725 \pm 0.335**	59.00 \pm 3.71**	
		31.62	1.849 \pm 0.319**	72.30 \pm 3.87**	
100	1.408 \pm 0.364**	79.09 \pm 4.79**			

Homogenized in: PBS; Vehicle: DMSO; Peroxidation: induce with FeSO₄ 10 μM , 1 h incubation; EDTA: 2 μM . The values are the average of three or four independent experiments \pm standard error of the mean ($\bar{x} \pm ES$). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparison against control. Values of $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (**) were considered statistically significant. The inhibitory concentration 50 (IC₅₀), was estimated by means of a linear regression.

spectroscopic data were similar to those reported in the literature [53].

4.2. General procedure for the synthesis of 1-substituted-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole

To a solution of 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole (1 eq.) and K₂CO₃ (1.5 eq.) in acetonitrile (100 mL) was added the corresponding benzyl bromide (1.2 eq.). The reaction was stirred and heated at 80 °C for 48 h. After this time, the resulting solution was cooled to room

temperature and filtered through celite®. All the volatiles were removed under high vacuum and the crude product was washed several times with diethyl ether.

4.3. 1-benzyl-5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole (2a)

For the synthesis of (2a), benzyl bromide (1.3 mL, 10.6 mmol), 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole (2.0 g, 9.6 mmol) and K₂CO₃ (1.9 g, 14.4 mmol) were used. Yield: 2.5 g (87%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ

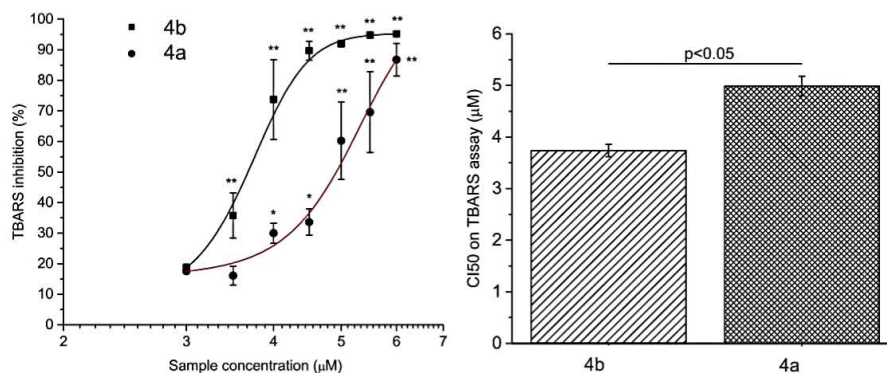


Fig. 3. IC₅₀ values for complexes (4a) and (4b).

8.35 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.28 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.86 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.43–7.40 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.22–7.20 (m, 2H, CH_{Ar}), 5.46 (s, 2H, $-CH_2-$); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 149.4 (NCHN), 145.1 (C_{Bim}), 139.8 (C_{Bim}), 139.7 (C_{Bim}), 134.8 (C_{Bim}), 133.3 (C_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 118.3 (CH_{Bim}), 108.4 (CH_{Bim}), 50.2 ($-CH_2-$). MS (EI⁺): m/z 298 [M]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{14}H_{10}N_4O_4$: C, 56.38; H, 3.38; N, 18.78. Found: C, 56.10; H, 3.35; N, 18.70. Melting Point: 173–174 °C.

4.4. 5,6-dinitro-1-((perfluorophenyl)methyl)-1H-benzo[d]imidazole (2b)

For the synthesis of (2b), 2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl bromide (1.3 mL, 8.4 mmol), 5,6-dinitro-1H-benzo[d]imidazole (1.5 g, 7.2 mmol) and K_2CO_3 (1.49 g, 10.8 mmol) were used. Yield: 2.4 g (86%). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.83 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.60 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.59 (s, 1H, CH_{Bim}), 5.89 (s, 2H, $-CH_2-$). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ 151.2 (NCHN), 146.3–145.8 (m, CF_{Ar}), 144.2–144.1 (m, CF_{Ar}), 144.0 (C_{Bim}), 142.5–141.5 (m, CF_{Ar}), 140.3–139.6 (m, CF_{Ar}), 138.7 (C_{Bim}), 138.3 (C_{Bim}), 138.2–138.0 (m, CF_{Ar}), 136.7–135.7 (m, CF_{Ar}), 134.5 (C_{Bim}), 117.5 (CH_{Bim}), 109.7 (CH_{Bim}), 109.1 (t, $^3J_{C-F}$ = 17.4 Hz, C_{Ar}), 36.5 ($-CH_2-$). MS (EI⁺): m/z 388 [M]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{14}H_5F_5N_4O_4$: C, 43.31; H, 1.30; N, 14.43. Found: C, 43.69; H, 1.21; N, 14.44. Melting Point: 212–213 °C.

4.5. General procedure for the synthesis of azolium salts.

To a solution of (2a) or (2b) (1 eq.) in 1,2-dichloromethane (50 mL), trimethyloxonium tetrafluoroborate (1.6 eq) was added. The resulting solution was stirred at room temperature for 48 h and then cooled at 0 °C, to produce a solid that was filtered.

4.6. Azolium salt (3a)

For the synthesis of (3a), (2a) (1.2 g, 4.0 mmol) and trimethyloxonium tetrafluoroborate (1.0 g, 6.4 mmol) were used. Yield: 1.3 g (81%). 1H NMR (500 MHz, $Acetone-d_6$) δ 10.06 (s, 1H, NCHN), 9.08 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.98 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.65 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.48–7.46 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.08 (s, 2H, $-CH_2-$), 4.46 (s, 3H, $-CH_3$). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $Acetone-d_6$) δ 150.2 (NCHN), 142.5 (C_{Bim}), 142.4 (C_{Bim}), 135.1 (C_{Bim}), 133.7 (C_{Bim}), 133.5 (C_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 114.1 (CH_{Bim}), 113.9 (CH_{Bim}), 52.7 ($-CH_2-$), 35.5 ($-CH_3$). MS (ESI⁺): m/z 313.1 [M–BF₄]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{15}H_{13}BF_4N_4O_4$: C, 45.03; H, 3.28; N, 14.00. Found: C, 44.94; H, 3.25; N, 13.94. Melting Point: 200–201 °C.

4.7. Azolium salt (3b)

For the synthesis of (3b), (2b) (1.0 g, 2.6 mmol) and trimethyloxonium tetrafluoroborate (0.6 g, 4.1 mmol) were used. Yield: 1.1 (87%). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.14 (s, 1H, NCHN), 9.20–9.18 (m, 2H, CH_{Bim}), 6.08 (s, 2H, $-CH_2-$), 4.15 (s, 3H, $-CH_3$). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 150.5 (NCHN), 146.8–147.1 (m, CF_{Ar}), 144.9–145.1 (m, CF_{Ar}), 142.8–143.1 (m, CF_{Ar}), 141.1 (C_{Bim}), 140.9 (C_{Bim}), 138.3–138.7 (m, CF_{Ar}), 136.4–136.7 (m, CF_{Ar}), 133.7 (C_{Bim}), 132.5 (C_{Bim}), 113.9 (CH_{Bim}), 113.5 (CH_{Bim}), 107.7–107.3 (m, C_{Ar}), 39.0 ($-CH_2-$), 35.1 ($-CH_3$). MS (MALDI-TOF): m/z 403.22 [M–BF₄]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{15}H_8BF_9N_4O_4$: C, 36.76; H, 1.65; N, 11.43. C, 36.86; H, 1.55; N, 11.41. Melting Point: 248–250 °C.

4.8. General procedure for the synthesis of the Ir(I)–NHC complexes

A solution of Ag_2O (0.5 eq) and the corresponding azolium salt (1 eq.) in acetonitrile (50 mL) was stirred under the exclusion of light at room temperature for 12 h. After this time $[IrCl(COD)]_2$ (0.5 eq) was added in one portion to the solution. The reaction was further stirred for 2 h. After this time, the solution was filtered through celite®. All the volatiles were removed under high vacuum and the crude product was

purified by column chromatography. Elution with 1,2-dichloroethane affords a yellow band, which contains the desired product.

4.9. Complex (4a)

For the synthesis of (4a), Ag_2O (29 mg, 0.13 mmol), (3a) (100 mg, 0.25 mmol) and $[IrCl(COD)]_2$ (49 mg, 0.13 mmol) were used. Yield: 32.4 mg (20%). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.43 (s, 1H, CH_{Bim}), 7.40–7.37 (m, 5H, CH_{Ar}), 6.36 (d, $^2J_{H-H}$ = 15.6 Hz, 1H, $-CH_2-$), 5.91 (d, $^2J_{H-H}$ = 15.6 Hz, 1H, $-CH_2-$), 4.96 (br s, 2H, CH_{COD}), 4.35 (s, 3H, $-CH_3$), 3.08–3.00 (m, 1H, CH_{COD}), 2.91–2.86 (m, 1H, CH_{COD}), 2.41–2.23 (m, 3H, CH_2 COD), 2.19–2.09 (m, 1H, CH_2 COD), 1.99–1.87 (m, 2H, CH_2 COD), 1.87–1.78 (m, 1H, CH_2 COD), 1.73–1.65 (m, 1H, CH_2 COD). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 202.9 (Ir–Carbene), 139.1 (C_{Bim}), 138.9 (C_{Bim}), 136.8 (C_{Bim}), 135.5 (C_{Bim}), 133.7 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Bim}), 129.0 (CH_{Bim}), 127.4 (CH_{Bim}), 107.7 (CH_{Bim}), 106.4 (CH_{Bim}), 91.4 (CH_{COD}), 91.2 (CH_{COD}), 53.8 (CH_{COD}), 53.6 (CH_{COD}), 53.5 ($-CH_2-$), 35.4 ($-CH_3$), 33.7 (CH_2 COD), 33.1 (CH_2 COD), 29.4 (CH_2 COD), 28.9 (CH_2 COD). MS (FAB⁺): m/z 648.0 [M]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{23}H_{24}ClIrN_4O_4$: C, 42.62; H, 3.73; N, 8.64. Found: C, 42.80; H, 3.68; N, 8.63. Melting Point: 201–206 °C. SiO_2 TLC R_f (1,2-dichloroethane): 0.15

4.10. Complex (4b)

For the synthesis of (4b), Ag_2O (24 mg, 0.10 mmol), (3b) (100 mg, 0.20 mmol) and $[IrCl(COD)]_2$ (40 mg, 0.10 mmol) were used. Yield: 36.8 (24%). 1H NMR (500 MHz, $Acetone-d_6$) δ 8.68 (s, 1H, CH_{Bim}), 8.46 (s, 1H, CH_{Bim}), 6.17 (d, $^2J_{H-H}$ = 16.0 Hz, 1H, $-CH_2-$), 5.99 (d, $^2J_{H-H}$ = 16.0 Hz, 1H, $-CH_2-$), 4.60–4.42 (m, 2H, CH_{COD}), 4.41 (s, 3H, $-CH_3$), 3.26–3.19 (m, 1H, CH_{COD}), 3.05–3.01 (m, 1H, CH_{COD}), 2.45–2.31 (m, 2H, CH_2 COD), 2.30–2.21 (m, 1H, CH_2 COD), 2.19–2.08 (m, 1H, CH_2 COD), 2.01–1.92 (m, 1H, CH_2 COD), 1.88–1.82 (m, 1H, CH_2 COD), 1.73–1.65 (m, 1H, CH_2 COD), 1.65–1.55 (m, 1H, CH_2 COD). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $Acetone-d_6$) δ 202.9 (Ir–Carbene), 147.0–146.8 (m, CF_{Ar}), 145.1–149.8 (m, CF_{Ar}), 142.5–142.1 (m, CF_{Ar}), 140.5–139.9 (m, CF_{Ar}), 139.1 (C_{Bim}), 138.9 (C_{Bim}), 138.9–138.5 (m, CF_{Ar}), 136.9 (C_{Bim}), 136.9–136.6 (m, CF_{Ar}), 136.1 (C_{Bim}), 111.0–110.6 (m, C_{Ar}), 108.1 (CH_{Bim}), 107.9 (CH_{Bim}), 89.6 (CH_{COD}), 89.3 (CH_{COD}), 54.6 (CH_{COD}), 51.2 (CH_{COD}), 40.0 ($-CH_2-$), 35.6 ($-CH_3$), 34.3 (CH_2 COD), 32.0 (CH_2 COD), 29.3 (CH_2 COD), 27.6 (CH_2 COD). MS (FAB⁺): m/z 738.0 [M]⁺. Elem. Anal. Calcd. for $C_{23}H_{19}ClF_5IrN_4O_4$: C, 37.43; H, 2.59; N, 7.59. Found: C, 37.55; H, 2.57; N, 7.60. Melting Point: 223–227 °C. SiO_2 TLC R_f (1,2-dichloroethane): 0.15.

4.11. Cytotoxic evaluation

4.11.1. Cell lines culture and culture medium

The compounds were screened *in vitro* against human cancer cell lines: HCT-15 (human colorectal adenocarcinoma), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma), U-251 (human glioblastoma), PC-3 (human prostatic adenocarcinoma), SKLU-1 (human lung adenocarcinoma), as well as COS-7 (healthy cells of African green monkey kidney). Cell lines were supplied by National Cancer Institute (USA). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI.⁵⁴ The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 I/g/ml streptomycin sulfate and 25 µg/mL amphotericin B (Gibco) and 1% non-essential amino acids (Gibco). They were maintained at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO_2 . The viability of the cells used in the experiments exceeds 95% as determined with trypan blue.

4.11.2. Cytotoxic assay

Cytotoxicity after treatment of the tumors cells and normal cell with

the test compounds was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth [54]. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin, and diluted with fresh media. Of this cell suspension, 100 μL containing 5000–10,000 cell per well, were pipetted into 96 well microtiter plates (Costar) and the material was incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, 100 μL of a solution of the compound obtained by diluting the stocks were added to each well. The cultures were exposed for 48 h to the compound at concentrations 25 μM . After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum by addition of 50 μL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H_2O , and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were then air-dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM unbuffered tris base (100 μL). The plates were placed on and shaken for 10 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plates reader (Bio-Tex Instruments).

4.12. Lipid peroxidation inhibition

4.12.1. Animals

Adult male Wistar rat (200–250 g) was provided by the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Procedures and care of animals were conducted in conformity with Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). They were maintained at 23 ± 2 °C on a 12/12 h light–dark cycle with free access to food and water.

4.12.2. Rat brain homogenate preparation

Animal sacrifice was carried out avoiding unnecessary pain. Ten rats were sacrificed with CO_2 to carry out all experiments. The cerebral tissue (whole brain), was rapidly dissected and homogenized in phosphate buffered saline (PBS) solution (0.2 g of KCl, 0.2 g of KH_2PO_4 , 8 g of NaCl, and 2.16 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /l, pH adjusted to 7.4) as reported elsewhere [55,56] to produce a 1/10 (w/v) homogenate. Then, the homogenate was centrifuged for 10 min at 800 rcf (relative centrifugal field) to yield a pellet that was discarded. The supernatant protein content was measured using the Folin and Ciocalteu's phenol reagent [57] and adjusted with PBS at 2.666 mg of protein/ml.

4.12.3. Induction of lipid peroxidation and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) quantification

As an index of lipid peroxidation, TBARS levels were measured using rat brain homogenates according to the method described by Ng et al. [58] with some modifications. Supernatant (375 μL) was added with 50 μL of 20 μM EDTA and 50 μL of each sample concentration solved in DMSO (50 μL of DMSO for control group) and incubated at 37 °C for 30 min. Lipid peroxidation was started adding 50 μL of freshly prepared 100 μM FeSO_4 solution (final concentration 10 μM) and incubated at 37 °C for 1 h. The TBARS content was determined as described by Ohkawa et al. [59] with some modifications. 500 μL of TBA reagent (1% 2-thiobarbituric acid in 0.05 N NaOH and 30% trichloroacetic acid, in 1:1 proportion) was added at each tube and the final suspension was cooled on ice for 10 min, centrifugated at 13,400 rcf for 5 min and heated at 80 °C in a water bath for 30 min. After cooling at room temperature, the absorbance of 200 μL of supernatant was measured at $\lambda = 540$ nm in a Bio-Tek Microplate Reader Synergy HT. Concentration of TBARS was calculated by interpolation in a standard curve of tetra-methoxypropane (TMP) as a precursor of MDA. Results were expressed as nmoles of TBARS per mg of protein. The inhibition ratio (I_R [%]) was calculated using following formula $I_R = (\text{C}-\text{E})^*100/\text{C}$, where C is the absorbance of control and E is the absorbance of the test sample. Butylated hydroxytoluene (BHT) and atocopherol were used as positive standards.

All data were represented as mean \pm standard error (SEM). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparison against control. Values of $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (**) were considered statistically significant. The inhibitory concentration 50 (IC_{50}), was estimated by means of a linear regression.

4.13. Data collection and refinement for compounds 4a

A yellow and prism crystal of (4a), was grown from CH_2Cl_2 /diethyl ether and mounted on glass fibers, then placed on a Bruker Smart Apex II diffractometer with a Mo-target X-ray source ($\lambda = 0.71073$ Å). The detector was placed at a distance of 5.0 cm from the crystal frames were collected with a scan width of 0.5 in ω and exposure time of 5 s/frame. 17,262 reflections were collected and integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame integration algorithm. Systematic absences and intensity statistics were used in monoclinic system and $P2_1/c$ space group. The structure was solved using Patterson methods using SHELXS-2014/7 program [60]. The remaining atoms were located via a few cycles of least squares refinements and difference Fourier maps. Hydrogen atoms were input at calculated positions and allowed to ride on the atoms to which they are attached. Thermal parameters were refined for all hydrogen atoms using a $U_{eq} = 1.2$ Å. The final cycle of refinement was carried out on all non-zero data using SHELXL-2014/7 [60]. Absorption correction was applied using SADABS program.

The crystallographic analysis was performed using PLATON [61] program, the figures of the molecular structures are represented using ellipsoids model while the supramolecular arrays were done using the ball and stick model, both representations were elaborate using the DIAMOND [62] program.

Acknowledgments

We would like to thank Chem. Eng. Luis Velasco Ibarra, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, Q. Eréndira García Ríos, M.Sc. Lucía del Carmen Márquez Alonso, M.Sc. Lucero Ríos Ruiz, M.Sc. Alejandra Núñez Pineda (CCIQS), Q. María de la Paz Orta Pérez, Q. Rocío Patiño-Maya and Ph.D. Nuria Esturau Escofet for technical assistance. H. V. would like to thank Programa de Becas Posdoctorales-DGAPA-UNAM for postdoctoral scholarships (Oficio: CJIC/CTIC/4751/2018). A. S.-M. would like to thank CONACYT (No. de becario: 629466) for M.Sc. scholarship. J.D.C-G would like to thank Programa de Cátedras CONACYT-PRY for generous support. The financial support of this research by PAPIIT-DGAPA-UNAM (PAPIIT IN207317) and CONACYT A1-S-33933 is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data for compound 4a were deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of this information are available free of charge on request from The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK (Fax: +44-1223-336033; e-mail deposit@ccdc.cam.ac.uk or www: http://www.ccdc.cam.ac.uk) quoting the deposition numbers CCDC 1913480. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119061>.

References

- [1] a) B. W. Stewart and C. P. Wild, Eds., World Cancer Report 2014, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2014.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, CA Cancer J. Clin. 68 (2018) 394–424.
- [3] R.G. Kenny, C.J. Marmion, Chem. Rev. 119 (2018) 1058–1137.
- [4] J.J. Wilson, S.J. Lippard, Chem. Rev. 114 (2014) 4470–4495.
- [5] a) T.C. Johnstone, G.Y. Park, S.J. Lippard, Anticancer Res. 34 (2014) 471–476; b) A. Ramos-Espinosa, H. Valdés, M.T. Ramírez-Apan, S. Hernández-Ortega, B.A. Aguilar-Castillo, R. Reyes-Martínez, J.M. Germán-Acacio, D. Morales-Morales,

- Inorg. Chim. Acta. 466 (2017) 584–590;
 c) S. Ramírez-Rave, M.T. Ramírez-Apan, H. Tlahuext, D. Morales-Morales, R.A. Toscano, J.-M. Grévy, J. Organomet. Chem. 814 (2016) 16–24.
- [6] A.M. Breglio, A.E. Rusheen, E.D. Shide, K.A. Fernandez, K.K. Spielbauer, K.M. McLachlin, M.D. Hall, L. Amable, L.L. Cunningham, Nat. Commun. 8 (2017) 1654.
- [7] D.W. Shen, L.M. Pouliot, M.D. Hall, M.M. Gottesman, Pharmacol. Rev. 64 (2012) 706–721.
- [8] S.M. Meier-Menchés, C. Gerner, W. Berger, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Chem. Soc. Rev. 47 (2018) 909–928.
- [9] L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao, Z.-S. Chen, Chem. Soc. Rev. 46 (2017) 5771–5804.
- [10] C.G. Hartinger, P.J. Dyson, Chem. Soc. Rev. 38 (2009) 391–401.
- [11] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Chem. Rev. 114 (2014) 815–862.
- [12] B. Englinger, C. Pirker, P. Heffeter, A. Terenzi, C.R. Kowol, B.K. Keppler, W. Berger, Chem. Rev. 119 (2019) 1519–1624.
- [13] K.D. Mjos, C. Orvig, Chem. Rev. 114 (2014) 4540–4563.
- [14] A. John, P. Ghosh, Dalton Trans. 39 (2010) 7183–7206.
- [15] W. Liu, R. Gust, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 755–773.
- [16] F. Hackenberg, M. Tacke, Dalton Trans. 43 (2014) 8144–8153.
- [17] L. Oehninger, R. Rubbiani, I. Ott, Dalton Trans. 42 (2013) 3269–3284.
- [18] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, J. Med. Chem. 54 (2011) 3–25.
- [19] G. Gasser, N. Metzler-Nolte, Curr. Opin. Chem. Biol. 16 (2012) 84–91.
- [20] T. Zou, C.T. Lum, C.-N. Lok, W.-P. To, K.-H. Low, C.M. Che, Angew. Chem. Int. Ed. 53 (2014) 5810–5814.
- [21] J. Lemke, A. Pinto, P. Niehoff, V. Vasylyeva, N. Metzler-Nolte, Dalton Trans. 107 (2009) 7063–7070.
- [22] A. Gutiérrez, M.C. Gimeno, I. Marzo, N. Metzler Nolte, Eur. J. Inorg. Chem. 2014 (2014) 2512–2519.
- [23] R. Rubbiani, E. Schuh, A. Meyer, J. Lemke, J. Wimberg, N. Metzler-Nolte, F. Meyer, F. Mohr, I. Ott, Med. Chem. Commun. 4 (2013) 942–948.
- [24] R. Rubbiani, I. Kitanovic, E. Alborzina, S. Can, A. Kitanovic, L.A. Onambe, M. Stefanopoulou, Y. Geldmacher, W.S. Sheldrick, G. Wolber, A. Prokop, S. Wöfl, I. Ott, J. Med. Chem. 53 (2010) 8608–8618.
- [25] W. Liu, R. Gust, Coord. Chem. Rev. 329 (2016) 191–213.
- [26] P.O. Wagers, M.J. Panzner, M.R. Southerland, M.A. DeBord, M.C. Deblock, C.A. Tessier, C.L. Cannon, W.J. Youngs, Biologically Active N-Heterocyclic Carbene-Metal Complexes in *From Laboratory Curiosities to Efficient Synthetic Tools*, 2nd edn., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016, pp. 567–595.
- [27] K.K.-W. Lo, K.Y. Zhang, RSC Adv. 2 (2012) 12069–12083.
- [28] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W.S. Sheldrick, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 84–102.
- [29] M. Graf, Y. Gothe, N. Metzler-Nolte, R. Czerwieńiec, K. Sünkel, J. Organomet. Chem. 765 (2014) 46–52.
- [30] C.-H. Leung, H.-J. Zhong, D.S.-H. Chan, D.-L. Ma, Coord. Chem. Rev. 257 (2013) 1764–1776.
- [31] Z. Liu, P.J. Sadler, Acc. Chem. Res. 47 (2014) 1174–1185.
- [32] Q. Du, L. Guo, M. Tian, X. Ge, Y. Yang, X. Jian, Z. Xu, Z. Tian, Z. Liu, Organometallics 37 (2018) 2880–2889.
- [33] P. Štarha, Z. Trávníček, H. Črlíková, J. Vančo, J. Kasparkova, Z. Dvořák, Organometallics 37 (2018) 2749–2759.
- [34] J. Li, M. Tian, Z. Tian, S. Zhang, C. Yan, C. Shao, Z. Liu, Inorg. Chem. 57 (2018) 1705–1716.
- [35] A. Petrini, R. Pettinari, F. Marchetti, C. Pettinari, B. Therrien, A.N. Galindo, R. Scopelliti, T. Riedel, P.J. Dyson, Inorg. Chem. 56 (2017) 13600–13612.
- [36] R.P. Paitandi, S. Mukhopadhyay, R.S. Singh, V. Sharma, S.M. Mobin, D.S. Pandey, Inorg. Chem. 56 (2017) 12232–12247.
- [37] C.C. Konkankit, S.C. Marker, K.M. Knopf, J.J. Wilson, Dalton Trans. 47 (2018) 9934–9974.
- [38] T. Giraldi, G. Sava, G. Mestroni, G. Zassinovich, D. Stolfa, Chem.-Biol. Interact. 22 (1978) 231–238.
- [39] G. Sava, S. Zorzet, L. Paressin, Inorg. Chim. Acta 137 (1987) 69–71.
- [40] E. Maftei, C.V. Maftei, P.G. Jones, M. Freytag, M.H. Franz, G. Kelter, H.-H. Fiebig, M. Tamm, I. Neda, Helv. Chim. Acta 99 (2016) 469–481.
- [41] Y. Gothe, T. Marzo, L. Messori, N. Metzler-Nolte, Chem. Commun. 51 (2015) 3151–3153.
- [42] Y. Gothe, T. Marzo, L. Messori, N. Metzler-Nolte, Chem. Eur. J. 22 (2016) 12487–12494.
- [43] Y. Gothe, I. Romero-Canelón, T. Marzo, P.J. Sadler, L. Messori, N. Metzler-Nolte, Eur. J. Inorg. Chem. 2018 (2018) 2461–2470.
- [44] E. Peris, Chem. Rev. 118 (2018) 9988–10031.
- [45] M. Poyatos, J. Mata, E. Peris, Chem. Rev. 109 (2009) 3677–3707.
- [46] J. Mata, M. Poyatos, E. Peris, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 841–859.
- [47] a) J.M. Alfaro, A. Prades, M. del Carmen Ramos, E. Peris, J. Ripoll-Gómez, M. Poyatos, J.S. Burgos, Zebrafish 7 (2010) 13–21;
 b) H. Valdes, D. Canseco-Gonzalez, J.M. German-Acacio, D. Morales-Morales, J. Organomet. Chem. 867 (2018) 51–54;
 c) S. Ray, R. Mohan, J.K. Singh, M.K. Samantaray, M.M. Shaikh, D. Panda, P. Ghosh, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 15042–15053;
 d) L. Oehninger, R. Rubbiani, I. Ott, Dalton Trans. 42 (2013) 3269–3284;
 e) J.L. Hickey, R.A. Ruhayel, P.J. Barnard, M.V. Baker, S.J. Berners-Price, A. Filipovska, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 12570–12571;
 f) A. Gautier, F. Cisnetti, Metallomics 4 (2012) 23–32.
- [48] K. Nepali, H.-Y. Lee, J.-P. Liou, J. Med. Chem. (2018), <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>.
- [49] M. Silva Lopes, C. Filizzola de Andrade Sena, B. Leonardo Silva, C. Maria de Souza, J. Pereira Ramos, G. Dantas Cassali, E. Maria de Souza-Fagundes, R. Jose Alves, M. Cristina de Oliveira, R. Barbosa de Oliveira, Anticancer Agents Med. Chem. 15 (2015) 206–216.
- [50] S.J. Dixon, B.R. Stockwell, Nat. Chem. Biol. 10 (2014) 9–17.
- [51] A. Lukaszewicz-Hussain, J. Moniuszko-Jakoniuk, J. Rogalska, Pol. J. Environ. Stud. 16 (2007) 233–236.
- [52] T. Ohsima, V.V. Yankah, H. Ushio, C. Kiozumi, Adv. Exp. Med. Biol. 434 (1998) 181–188.
- [53] K. Kincaid, J. Beckman, A. Zivkovic, R.L. Halcomb, J.W. Engels, R.D. Kuchta, Nucleic Acids Res. 33 (2005) 2620–2628.
- [54] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, J. Natl. Cancer Ins. 83 (1991) 757–766.
- [55] M. Dominguez, A. Nieto, J.C. Marin, A.S. Keck, E. Jeffery, C.L. Cespedes, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5889–5895.
- [56] J.I. Rossato, L.A. Ketzner, F.B. Centurio, S.J. Silva, G. Lueni, A.L. Braga, M.A. Rubin, B.T. Rocha, Neurochem. Res. 27 (2002) 297–303.
- [57] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265–275.
- [58] T.B. Ng, F. Liu, Z.T. Wang, Antioxidative activity of natural products from plants, Life Sci. 66 (2000) 709–723.
- [59] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Anal. Biochem. 95 (1979) 351–358.
- [60] G.M. Sheldrick, Acta Cryst. C71 (2015) 3–8.
- [61] A.L. Spek, Acta. Crystallogr. D65 (2009) 148–155.
- [62] K. Brandenburg, M. Berndt, J. Appl. Cryst. 32 (1999) 1028–1029.