



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA, ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE
COMPUESTOS PENTACOORDINADOS DE ESTAÑO (IV)
DERIVADOS DE ALFA-AMINOÁCIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

JOSÉ MIGUEL GALVÁN HIDALGO.



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado.

Presidente.

Prof. Ernestina Cervera Flores.

Vocal.

Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

Secretario.

Prof. Elizabeth Gómez Pérez.

1er. Suplente.

Prof. Georgina Artemisa Duarte Lisci.

2º. Suplente.

Prof. Martín Andrés Iglesias Arteaga.

La presente tesis se desarrolló en el laboratorio 5 del Departamento de Química Inorgánica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con una beca otorgada por el proyecto PAPIIT IN203908.

Dra. Elizabeth Gómez Pérez.

Asesor.

M. en C. María Teresa Ramírez Apan.

Supervisor técnico.

José Miguel Galván Hidalgo.

Sustentante.

“De veras tomo los cielos y la tierra como testigos contra ustedes hoy, de que he puesto delante de ti la vida y la muerte, la bendición y la invocación de mal; y tienes que escoger la vida a fin de que te mantengas vivo, tú y tu prole, amando a Jehová tu Dios escuchando su voz y adhiriéndote a él, porque él es tu vida y la longitud de tus días, para que mores sobre el suelo que Jehová juro a tus antepasados Abrahán, Isaac y Jacob que les daría.”
(Deuteronomio 30:19-20).

Esto es lo que ha dicho el señor Jehová “... Aquí estoy creando nuevos cielos y una nueva tierra; y las cosas anteriores no serán recordadas ni subirán al corazón.” (Isaías 65:13,17).

AGRADECIMIENTOS.

Al Padre eterno por la vida que me ha otorgado.

A Jesús el señor por haberme recomprado, por estarme haciendo resurgir de mis cenizas y por su infinita bondad.

A mi madre, Luz María Hidalgo Pimentel por su apoyo, sus consejos, su tiempo y su ser, a mi hermana; la pequeña Lulú y mi tío Jorge Molina Armas.

A mi abuelos maternos Miguel Hidalgo Cruz (1913-1954) y Victoria Pimentel Silva (1914-1981) por su sabiduría transmitida a través del tiempo y del espacio, por ser fundadores de nuestra Gran Familia.

A mi Patria, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de realizar mis estudios.

A la Dra. Elizabeth Gómez Pérez por abrirme las puertas de su laboratorio, por haberme brindado su amistad, por todo lo que me ha enseñado, por su paciencia, su tiempo, la formación académica sólida que me dio, sus consejos y la confianza que ha puesto en mi durante la realización de todo este tiempo.

A mi supervisor técnico M. en C. María Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por la realización de las pruebas biológicas, sus enseñanzas y su tiempo.

Al Ing. Luis Velasco por la realización de los espectros de masas (FAB⁺) y a la Q.F.B. Rocío Patiño Maya por la realización de los espectros de infrarrojo y las determinaciones de polarimetría.

Al proyecto PAPIIT IN203908 por la beca otorgada.

A las personas con quienes compartí el laboratorio: Dr. Juan Manuel Fernández González, Arturo, Armando, Alejandro, Janet, Cristina, Celia, Obdulia y Nayeli, con quienes pase momentos muy agradables.

A mis amigos de la Facultad de Química: Tania, Rodrigo, Jorge y Ernesto.

A mis amigos del CCH Oriente: Noé, Gaspar, Roberto Carlos, Jeannette y Chucho.

A la M. en C. Martha Yolanda González Quezada, Dr. Francisco Hernández Luis, Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar, M. en F. María del Socorro Alpizar Ramos, Dr. Aníbal Bascuñan Blaset (†), Dra. Rocío Pozas Horcasitas, Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha, Mat. Eulogio Aquino Vázquez, M.I. María Eugenia Jiménez Reyes y a mis demás profesores por la sólida formación académica y su ayuda desinteresada e incondicional.

A los miembros del H. Jurado, por sus comentarios y observaciones valiosas.

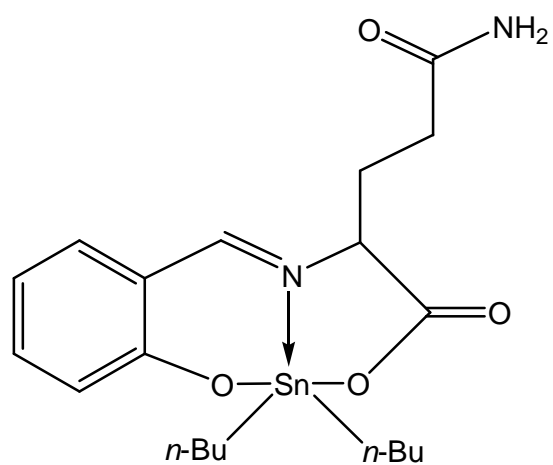
A mi médico: Pedro Espinoza Aguilar del H.G.M. por la atención que ha brindado todo este tiempo.

A las empresas: Autotransportes Unidos México-Cd. Netzahualcóyotl S.A. de C.V. y Chimalhuacán Aviación Civil Caracol y Colonias del vaso de Texcoco S.A. de C.V.

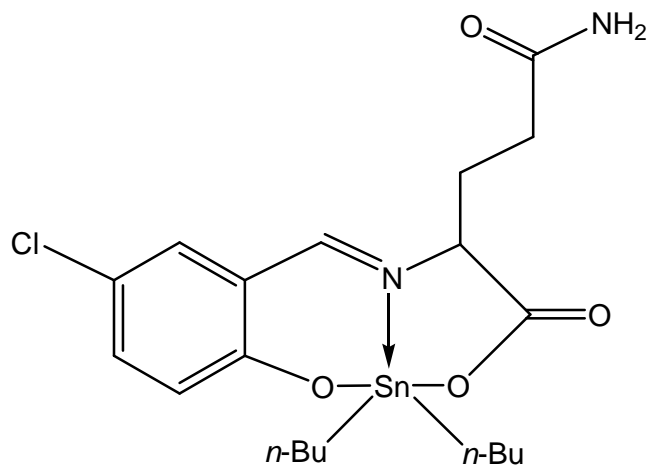
A los que me aprecian y cuyos nombres no aparecen aquí y que por algún motivo ya no están conmigo y que seguramente reencontraré en el día de la eternidad.

ÍNDICE.	Pág.
Índice de compuestos.	
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	
A. Aspectos terapéuticos en compuestos de coordinación.	3
B. Requerimientos estructurales en la búsqueda de compuestos líder en derivados de organoestaño.	13
C. Mecanismo de citotoxicidad de compuestos de organoestaño.	15
D. Proceso inflamatorio.	15
E. Mediadores lipídicos del proceso inflamatorio.	16
F. Búsqueda de compuestos de organoestaño con actividad antiinflamatoria.	19
G. Actividad antioxidante de compuestos de organoestaño.	20
III. Objetivos.	22
IV. Resultados y discusión.	
A. Síntesis.	24
B. Caracterización por RMN ^1H de los complejos 4a-d .	25
C. Caracterización por RMN ^{13}C de los complejos 4a-d .	31
D. Caracterización por RMN ^{119}Sn de los complejos 4a-d .	37
E. Caracterización por espectrometría de masas (FAB $^+$).	38
F. Caracterización por espectroscopía infrarroja.	40
G. Estudio de la actividad citotóxica.	42
H. Estudio de la actividad antiinflamatoria.	44
I. Estudio de la actividad antioxidante.	46
V. Conclusiones.	48
VI. Parte experimental.	50
VII. Referencias.	60

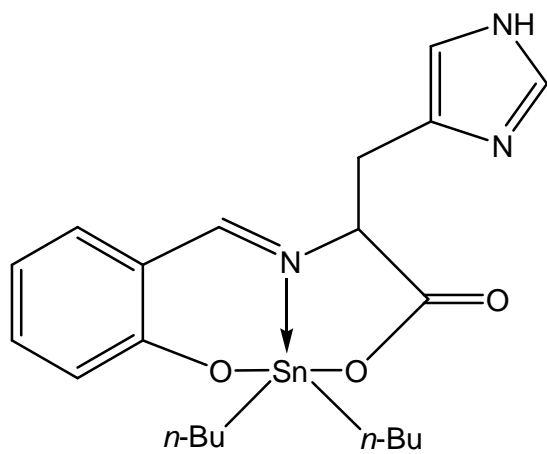
ÍNDICE DE COMPUESTOS.



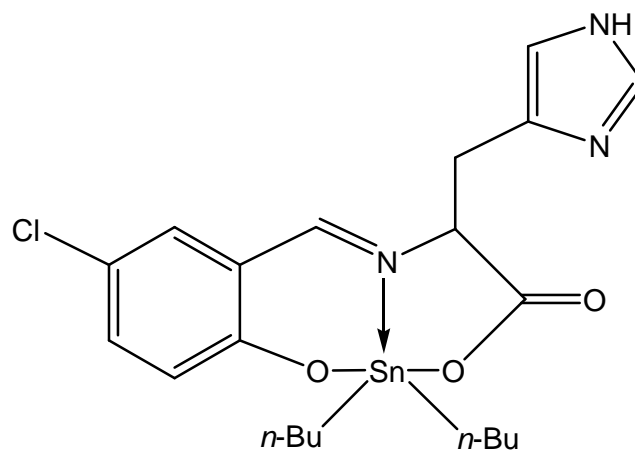
4a



4b



4c



4d

I. INTRODUCCIÓN.

El estaño es un elemento perteneciente al grupo 14 y del bloque P dentro de la tabla periódica de los elementos; su concentración en la corteza terrestre es de 2.2 partes por millón (ppm) y la principal fuente de dicho metal es la casiterita (SnO_2), en su estado nativo es un metal maleable y dúctil, presentando dos formas alotrópicas en función de la temperatura; el estaño α y estaño β , asimismo, presenta dos estados de oxidación: Sn(II) dando lugar a compuestos estannosos y el Sn(IV) a los compuestos estannicos. No obstante, al expandir su capa de valencia se utilizan orbitales d lo que permite coordinar cinco pares de electrones formando especies pentacoordinadas con geometría de bipirámide trigonal con hibridación sp^3d , mientras que al coordinar seis pares de electrones da lugar a especies hexacoordinadas con geometría octaédrica e hibridación sp^3d^2 .¹

La química de los compuestos de organoestaño se inició en 1849 cuando Frankland sintetizó el yoduro de dietilestaño a partir de estaño metálico y yoduro de etilo, dichos compuestos se caracterizan por tener al menos un enlace C-Sn en su estructura y la estandarización de la síntesis de este tipo de compuestos se sistematizó hacia 1937;² debido a que estos compuestos poseen fuerte actividad biológica su uso se generalizó en la década de 1940 como biocidas en conservadores alimenticios, así como aditivos en dentífricos, agroquímicos y principalmente en las pinturas de los cascos de los buques con el propósito de evitar la adherencia de moluscos, pero el efecto destructivo en los ecosistemas marinos motivó su prohibición a partir de 1987.³

En la actualidad los compuestos de organoestaño tienen un amplio intervalo de aplicaciones, entre las cuales, destacan su uso en química orgánica en la polimerización del uretano, la estabilización del policloruro de vinilo (PVC), como catalizadores en reacciones transesterificación, síntesis enantioselectiva, en la formación de nuevos enlaces C-C, así como su participación en reacciones de tipo Reformatsky.^{4,5,6}

Por otro lado, debido a su actividad antimicrobiana, antifúngica y citotóxica, es de particular interés su potencial aplicación en medicina. El constante aumento de cepas resistentes a los fármacos de uso común, así como las desventajas que representan los efectos adversos de los mismos a motivado la búsqueda de nuevas alternativas, por lo que se han sintetizado gran número de compuestos de organoestaño con una amplia variedad estructural y diferentes tipos de ligantes tales como aminas, carboxilatos, salicilatos, bases de Schiff, así como con ligantes biológicamente activos como penicilinas, cefalosporinas, flumenamatos, esteroides, porfirinas, carbohidratos, ácidos nucleicos, péptidos y aminoácidos;⁷ los cuales presentan importante actividad biológica, que depende, del número de grupos orgánicos unidos al metal como de su naturaleza química. El orden de toxicidad se muestra en forma descendente y es: $R_3SnX > R_2SnX_2 > RSnX_3 > R_4Sn$ (X= Cl, Br, I, N, S, O), siendo proporcional a la longitud de la cadena alquílica, los tetraorganoestanos generalmente son inactivos. De acuerdo a los estudios de citotoxicidad realizados frente a diversas líneas celulares procedentes de diferentes tipos de tumores humanos y murinos se observa que la mayor selectividad y potencia corresponden a los *n*-butilderivados.⁸⁻⁹

El presente trabajo comprende la síntesis de compuestos de coordinación derivados de diorganoestaño con ligantes tridentados de tipo bases de Schiff derivados de α -aminoácidos y salicilaldehídos sustituidos en la posición cinco. Todos los compuestos sintetizados se caracterizaron por RMN de 1H , ^{13}C , ^{119}Sn y espectrometría de masas realizando una evaluación preliminar de la actividad citotóxica hacia diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos, así como de su actividad antiinflamatoria y antioxidante.

II. ANTECEDENTES.

A. ASPECTOS TERAPÉUTICOS EN COMPUESTOS DE COORDINACIÓN.

La investigación en compuestos de coordinación con aplicaciones terapéuticas ha revolucionado la práctica médica en las últimas décadas, por ejemplo, la conjunta aplicación de agentes terapéuticos que contienen isótopos radiactivos como ^{153}Sm empleados en el tratamiento del osteosarcoma, dieron lugar al nacimiento de la medicina nuclear.¹⁰

Las técnicas de diagnóstico como la RMN al utilizar medios de contraste basados en compuestos de coordinación de Gd^{3+} , permite la detección temprana de cánceres y otros padecimientos, que antes de su aplicación era imposible. No obstante, antes del descubrimiento de las propiedades antiproliferativas del *cis*-platino por Barnett Rosenberg en 1965, esta área de la química era muy poco explorada.¹¹⁻¹²

Después de las investigaciones pertinentes el *cis*-platino se aprobó en 1979 para el tratamiento de tumores de cabeza, cuello, aparato reproductor, pulmón y ciertos tipos de cáncer del tracto gastrointestinal; debido sus efectos adversos como nefrotoxicidad y neurotoxicidad, se impulsó la síntesis de análogos como el carboplatino con el objetivo de incrementar la eficacia y disminuir la toxicidad del compuesto líder; el carboplatino está caracterizado por tener en su estructura un anillo de ciclobutanodicarboxilato que es un ligante más estable que los átomos de cloro del *cis*-platino, idea que surgió debido a que si se reducía la reactividad de la molécula también se observaría una disminución proporcional en la nefrotoxicidad, hecho demostrado al realizar los correspondientes estudios clínicos, pero la neurotoxicidad y emésis son efectos adversos importantes; a pesar de ello, el carboplatino fue aprobado en 1985 para el tratamiento de tumores refractarios al *cis*-platino, ocurriendo la misma situación posteriormente con el oxaliplatino y nedaplatino (Figura 2.1), los cuales tienen en general las mismas indicaciones terapéuticas.¹³

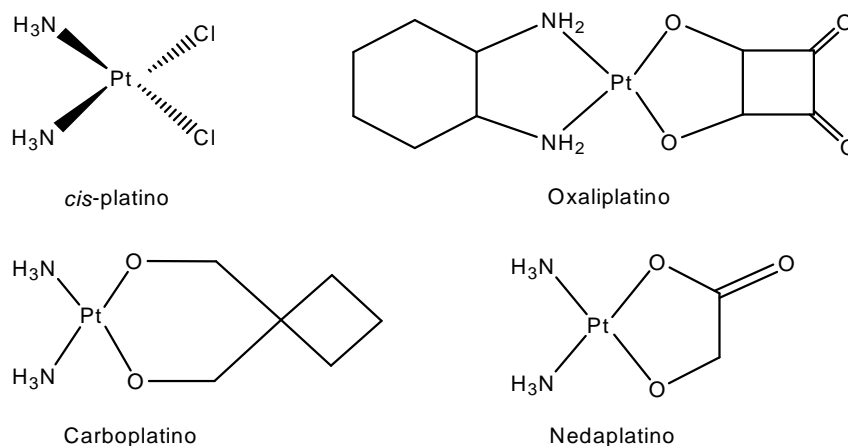


Figura 2.1 Compuestos de coordinación de platino utilizados actualmente en quimioterapia.¹³

El *cis*-platino es un compuesto de geometría plana cuadrada y neutro, su actividad antitumoral se explica por medio de su capacidad de atravesar la membrana plasmática. Cuando esto sucede, la concentración intracelular de iones Cl⁻ disminuye, entonces se produce el desplazamiento de los ligantes cloruro por el agua convirtiendo al *cis*-platino en una especie cargada positivamente y consecuentemente atraída por el DNA que se encuentra cargado negativamente formando finalmente un quelato, donde la formación de los enlaces de coordinación es irreversible, de hecho, la mayor parte de las lesiones al DNA se producen por enlaces dentro de una las cadenas; los complejos más abundantes se forman con el N-7 de la guanina; otro derivado de una guanina y una adenina adyacentes, así como el complejo derivado del N-7 de dos guaninas que tienen otra base entre ellas, como se muestra a continuación en la figura 2.2¹⁴.

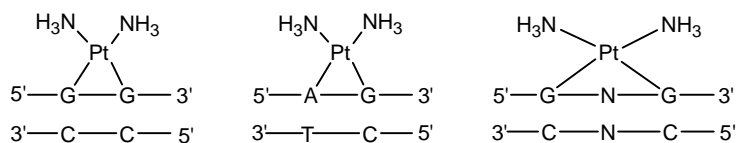


Figura 2.2 Complejos formados a partir de la interacción del DNA con *cis*-platino.¹⁴

Las sales inorgánicas de estaño se han utilizado desde tiempos remotos para combatir infecciones en la piel causadas por *Stafilococcus aureus*. Los compuestos de organoestaño constituyen una familia de compuestos con elevada actividad biocida de amplio espectro principalmente antimicrobiana y antifúngica, de modo, que estas propiedades se han aprovechado para la eliminación de gérmenes, ejemplo de ello es el benzoato de tributilestaño utilizado en combinación con formaldehído para la limpieza de pabellones deportivos y hospitalarios desde 1954. Desde la introducción del *cis*-platino en clínica como fármaco antineoplásico, se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de desarrollar nuevos principios activos debido principalmente a sus efectos adversos.¹⁵

La búsqueda de nuevos antineoplásicos derivados de platino esta siendo abandonada debido a problemas como dificultad de síntesis, inestabilidad química, insolubilidad, toxicidad pronunciada, entre otras; por lo que se han realizado investigaciones para desarrollar fármacos antineoplásicos de base metálica diferente al platino.¹³

En 1972 Crowe observó que el acetato de trifenilestaño inhibía el crecimiento de tumores malignos en modelos murinos, iniciando así una área de investigación con el propósito de desarrollar agentes antineoplásicos derivados de compuestos organometálicos de estaño (IV).¹⁶

Pero hasta el momento, no se ha encontrado un compuesto líder como en el caso del *cis*-platino a partir del cual realizar modificaciones estructurales de manera racional, en otras palabras, no se conoce un grupo farmacóforo, responsable de su actividad farmacológica. A la fecha se han probado miles de compuestos con ésta finalidad emulando en principio al *cis*-platino, sin embargo, los compuestos organometálicos de estaño son una clase diferente de compuestos. En la siguiente tabla se muestran las principales similitudes y diferencias entre compuestos de platino y organoestaño.^{15,17}

Elemento	Naturaleza
Platino	Elemento metálico del séptimo período y de la primera serie de transición, cuyo estado de oxidación más estable pertenece a la especie Pt(II). Asimismo, los compuestos de coordinación son monoméricos en estado sólido.
Estaño	Elemento metálico del quinto período y elemento representativo, el estado de oxidación corresponde a la especie Sn(IV). Además, los compuestos de coordinación son poliméricos en estado sólido en la mayoría de los casos.

Tabla 2.1 Similitudes y diferencias entre compuestos de coordinación de estaño y platino.¹

En este contexto, los compuestos de platino con número de coordinación de cuatro presentan una geometría plana cuadrada, mientras que los respectivos compuestos de estaño muestran una geometría tetraédrica; los compuestos pentacoordinados de estaño presentan geometría de bipirámide trigonal distorsionada, de manera, que una emulación del *cis*-platino no es posible.

En cambio, los compuestos hexacoordinados de estaño (IV) presentan una geometría octaédrica, en donde es posible la existencia de isomería *cis-trans* con átomos de halógeno y de nitrógeno como en el caso de los pseudohalogenuros de estaño (IV) del tipo $R_2SnX_2L_2$ o R_2SnX_2LM , en donde X es un átomo de halógeno, R es el fragmento orgánico unido covalentemente al centro metálico y puede ser una cadena alquílica o un grupo arilo, mientras que L y M corresponden átomos en el ligante (generalmente bidentado) capaces de donar pares de electrones al metal tales como nitrógeno, oxígeno o azufre (Figura 2.3).

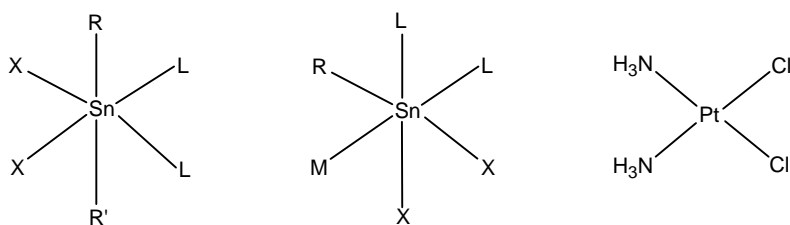


Figura 2.3 Geometría de compuestos hexacoordinados de estaño y *cis*-platino.¹⁵

Los ensayos de actividad biológica *in vitro* (principalmente antimicrobiana y citotóxica) de éstos compuestos muestran ésta en función tanto del número de grupos orgánicos unidos al metal como por su naturaleza en el siguiente orden: $R_3SnX > R_2SnX_2 > RSnX_3 > R_4Sn$; los tetraorganoestannanos y monorganoestannanos en general son inactivos en diversas líneas celulares procedentes de diferentes tipos de tumores humanos y murinos; la mayor selectividad, potencia y menor toxicidad corresponden a los *n*-butilderivados; la presencia de átomos donadores de pares de electrones como azufre, nitrógeno y oxígeno es fundamental. Asimismo, los triorganoestannanos presentan una elevada toxicidad al grado de cuestionar la viabilidad en su desarrollo.¹⁶

Hasta la fecha se han sintetizado diversos compuestos con ligantes como alcoholes, tioles, aminas, ácidos carboxílicos, bases de Schiff, compuestos orgánicos heterocíclicos, así como derivados de ligantes biológicamente activos como antibióticos β -lactámicos, aminoácidos, péptidos, carbohidratos, entre otros; observando en todos los casos elevada actividad biológica, principalmente antimicrobiana y citotóxica.⁶⁻⁹ Por ejemplo M. Gielen (Figura 2.4) informó en 1996 que los compuestos de coordinación derivados de 2,6-Piridindicarboxilatos con óxidos de di-*n*-butilestaño (compuesto **2.1**) y difenilestaño (compuesto **2.2**) presentan una mayor actividad citotóxica que el *cis*-platino en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y WiDr (cáncer de colón).¹⁸

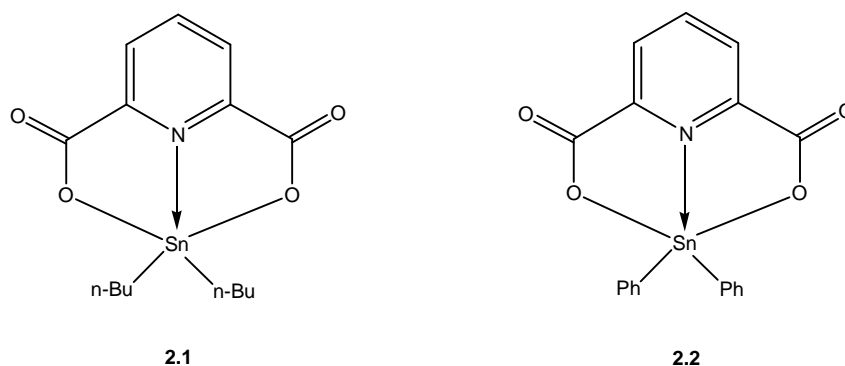


Figura 2.4 Compuestos de coordinación sintetizados por M. Gielen.¹⁸

En un trabajo posterior M. Gielen (Figura 2.5) apreció la misma tendencia al emplear derivados del ácido salicílico utilizando ambas líneas celulares comparando los resultados con el *cis*-platino, encontrando que el compuesto más activo corresponde al derivado proveniente del ácido 5-Metoxisalicílico, aislando el compuesto **2.3** como dímero.¹⁹

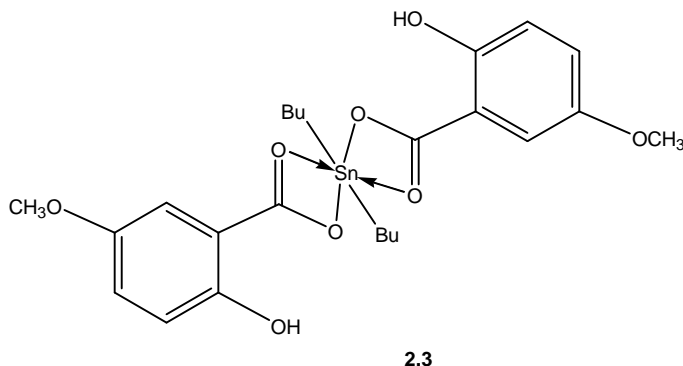


Figura 2.5 Compuesto dimérico obtenido por M. Gielen a partir del ácido 5-Metoxisalicílico.¹⁹

Asimismo, Xanthopoulou y sus colaboradores describieron (2003) compuestos derivados de mercaptobenzotiazol con óxidos di-*n*-butilestaño y di-*n*-metilestaño formando los compuestos de coordinación correspondientes; mediante estudios de difracción de rayos X demostraron que poseían geometría octaédrica distorsionada, donde los fragmentos organometálicos ocupan las posiciones axiales, en tanto que las posiciones ecuatoriales se encuentran los dos átomos de azufre y el átomo de nitrógeno del ligante. Al someterlos a ensayos de citotoxicidad se observó dichos compuestos son marcadamente activos en líneas celulares de sarcoma de rata.²⁰

En 2006 E. Gómez (Figura 2.6) describió la síntesis de compuestos de coordinación con ligantes tridentados de tipo **2.4-2.5** que fueron evaluados frente a líneas celulares PC-3 (próstata), MCF-7(mama), HCT-15(colon) U-251(sistema nervioso central), donde los mejores resultados se observaron en contra de la línea celular K-562 (leucemia mielógena crónica). Los valores de desplazamiento químico en ^{119}Sn RMN corresponden a compuestos con geometría pentacoordinada.²¹

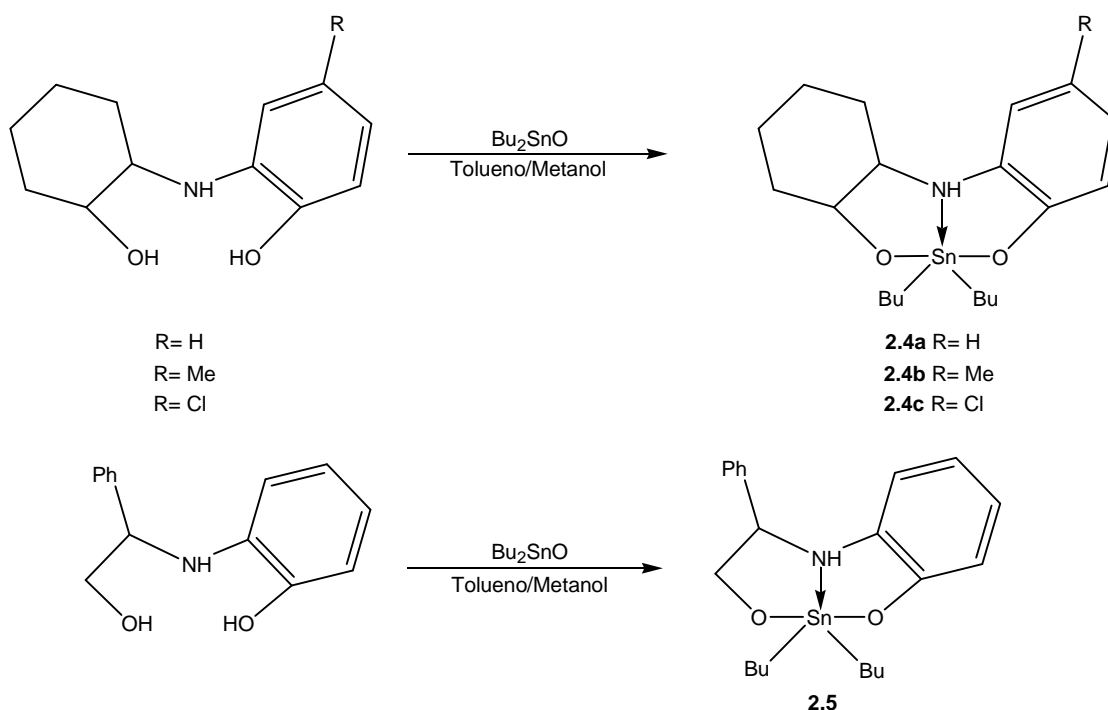


Figura 2.6 Compuestos de coordinación descritos por E. Gómez.²¹

Por otro lado, los di-*n*-butilderivados con bases de Schiff pueden ser usados como modelos de investigación de reacciones de transaminación que efectúan enzimas dependientes de piridoxal. Debido a éstas observaciones, se han sintetizado numerosos compuestos de tipo base de Schiff derivados de α -aminoácidos con el propósito de mimetizar los sitios activos de muchas enzimas. Además, los derivados que involucran piridoxal, histidina y salicilaldehído son de particular interés debido a la importancia biológica de los residuos de histidina en los sitios activos de enzimas, de hecho, las bases de Schiff derivadas de salicilaldehído y L-aminoácidos se consideran análogos del piridoxal, pero las bases de Schiff derivadas de histidina no se han aislado, por la

presencia de impurezas formadas en reacciones de competencia durante su formación y por tanto imposibles de separar.²²

En este contexto, L. Casella y M. Gulloti (Figura 2.7) informaron que la reacción entre L-Histidina y piridoxal en medio básico acuoso produce tetrahidropirido[3,4-*d*]-imidazol derivados cíclicos (Compuestos **2.7** y **2.8**); posiblemente la reacción procede a través de la formación de un intermediario de tipo base de Schiff (Compuesto **2.6**), resultados similares se obtuvieron con salicilaldehído al aislar el respectivo derivado cíclico (Compuesto **2.8**), lo cual puede ocurrir a través de una sustitución electrofílica aromática intramolecular entre el anillo heterocíclico de imidazol y la aldimina. Asimismo, la presencia de iones metálicos no conducía a productos de ciclización al coordinarse éstos a las bases de Schiff formadas como intermediarios en la reacción.²³

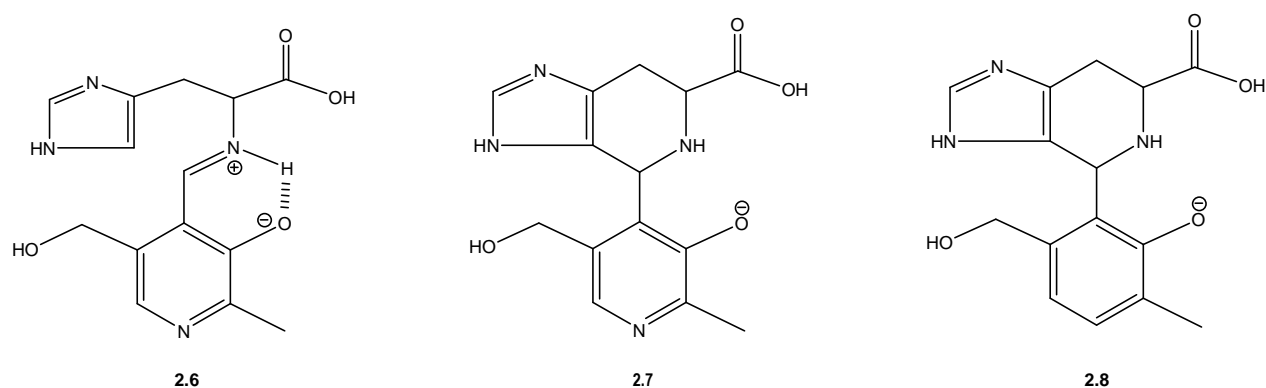


Figura 2.7 Estructuras propuestas por L. Casella y M. Gulloti para los productos obtenidos de la reacción entre L-Histidina con salicilaldehído y piridoxal.²³

Este hecho sugiere que estos compuestos y sus análogos actúen como antimetabolitos del piridoxal y de este modo impulsando la síntesis de compuestos de coordinación de diorganoestaño derivados de bases de Schiff de α -aminoácidos del tipo N-[(2-Hidroxiaril)alquiliden]- α -aminoácidos, en 1997 M. Gielen y colaboradores sintetizaron complejos derivados de glicina, alanina, valina, leucina, metionina y fenilglicina, 2-hidroxi-1-naftaldehído y óxido de di-*n*-butilestaño, los complejos obtenidos mostraron elevada actividad citotóxica, en particular hacia la línea celular M19 MEL (melanoma). Basándose en la información obtenida mediante estudios de Mössbauer se estableció

que los complejos exhiben una geometría de bipirámide trigonal alrededor del centro metálico.²⁴

Por otra parte, Han-Dong Yin (Figura 2.8) en 2004 sintetizó complejos con ligantes derivados de salicilaldehído, triptófano y valina formando las respectivas bases de Schiff en reflujo de etanol y una vez obtenida la imina, ésta se hizo reaccionar con óxido de *n*-butilestaño. Los valores obtenidos en ¹¹⁹Sn RMN sugieren la presencia de compuestos pentacoordinados, mientras que el análisis de difracción de rayos X muestra que tanto dos grupos butilo como el átomo de nitrógeno de la imina se localizan en las posiciones ecuatoriales, mientras que el oxígeno fenólico y el grupo carboxilo ocupan las posiciones axiales.²⁵

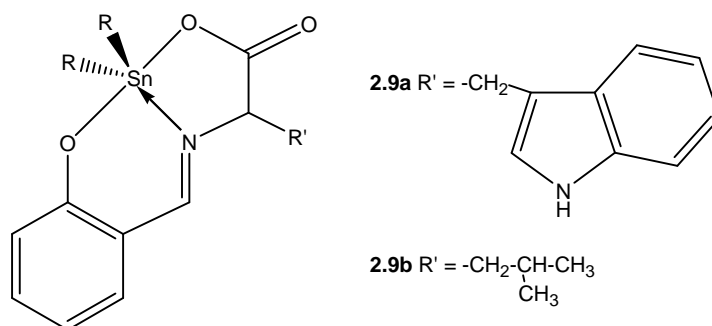


Figura 2.8 Compuestos obtenidos utilizando α -aminoácidos por Han-Dong Yin.²⁵

Otro ejemplo citado en la literatura son los compuestos del tipo N-(3,5-Dibromosaliciliden)- α -aminoácidos reportados en el 2005 por L. Tian (Figura 2.9) empleando glicina, alanina, valina y fenilalanina, en su trabajo L. Tian encontró que los compuestos tienen geometría pentacoordinada en solución, los estudios de difracción de rayos X sugieren que los complejos de la serie **2.10** presentan una tendencia similar al caso anterior. Posteriormente, los complejos se hicieron reaccionar con un equivalente de cloruro de difenilestaño (IV) aislando aductos del tipo **2.11**, lo cual se comprobó al observar dos señales en ^{119}Sn RMN.

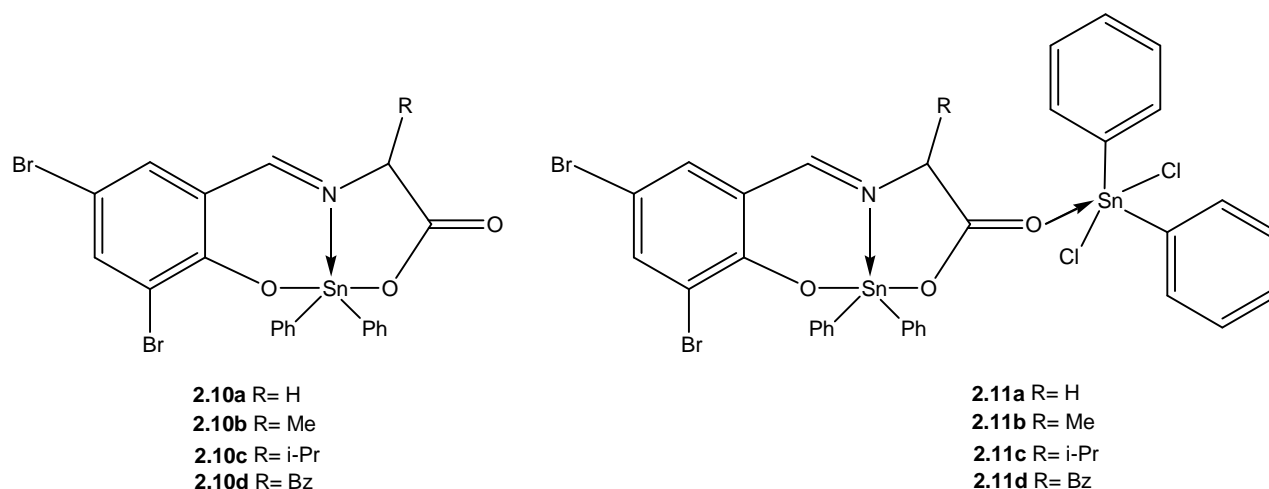


Figura 2.9 Aductos obtenidos por L. Tian a partir de α -aminoácidos.²⁶

Los complejos de glicina y valina, así como el aducto derivado de fenilalanina presentaron mayor actividad citotóxica con relación al *cis*-platino en ensayos *in vitro* frente a las líneas celulares HeLa (cáncer cérvico-uterino), CoLo 205 (cáncer de colon) y MCF-7.²⁶

B. REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES EN LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS LÍDER EN DERIVADOS DE ORGANOESTAÑO.

La actividad antineoplásica del *cis*-platino y sus análogos se ha relacionado con el ángulo de enlace entre los átomos de cloro (el cual es menor a 95°) y a la distancia entre los átomos de cloro y platino (menor a 3.6 \AA), ya que se ha observado en el DNA que tanto la distancia como el ángulo de enlace entre los tres centros (dos corresponden al N-7 de cada guanina y el centro metálico) no se modifica.

Con relación a los derivados de estaño en 1984 se consideró con base en estudios de citotoxicidad de pseudohalogenuros de diorganoestaño activos *in vitro*, que la actividad citotóxica estaba relacionada con el ángulo de enlace; encontrándose que las moléculas con dicha actividad debían tener un ángulo de enlace entre los átomos de halógeno en el intervalo de 103° a 105° , por lo que los compuestos con un valor distinto podían considerarse inactivos. Esta tendencia se observó también para átomos donadores de pares de electrones, particularmente en el caso del nitrógeno en donde la distancia entre este átomo y el centro metálico debe ser mayor a 2.39 \AA para que los compuestos presenten actividad biológica, ya que los compuestos con valores distintos se consideraban inactivos. Sin embargo, en la actualidad se conocen compuestos que no cumplen con éstas estimaciones.⁶

La posible explicación del comportamiento en los derivados antes mencionados se basa en el estudio de compuestos que contienen al menos un enlace Sn-O obtenido a partir de ligantes que originen dicho enlace o por la hidrólisis de los pseudohalogenuros de diorganoestaño del tipo R_2SnX_2 , los valores de ángulo y distancia de enlace entre ambos átomos donadores de pares electrónicos (generalmente N, S, O), no muestran variación en relación a los mostrados por los pseudohalogenuros de diorganoestaño que presentan actividad citotóxica.²⁷

Por otro lado, la formación de compuestos de coordinación de estaño con las bases púricas y pirimídicas del DNA no depende del ángulo ni la distancia de enlace de acuerdo a las diferencias observadas entre dichos parámetros en comparación con los compuestos de platino. Además, aquellos compuestos que tienen estabilidad hidrolítica moderada son activos, indicando una posible predisociación, la cual puede ser una función de la acidez de los mismos.¹⁷

Según la teoría de Lewis los halogenuros de estaño muestran la siguiente tendencia: $\text{SnCl}_4 > \text{SnBr}_4 > \text{SnI}_4$. En el cloruro de estaño (IV) y sus congéneres de diorganoestaño, el orden de acidez esperado basándose en ésta teoría es el siguiente: $\text{SnCl}_4 > \text{Ph}_2\text{SnCl}_2 > \text{Me}_2\text{SnCl}_2 > \text{Et}_2\text{SnCl}_2 > \text{Bu}_2\text{SnCl}_2$; sin embargo los ensayos de citotoxicidad presentan una tendencia no esperada, ya que los resultados muestran un orden decreciente en la actividad biológica: $\text{Br} > \text{Cl} > \text{I}$, de modo, que las tendencias de acidez y la citotoxicidad no manifiestan correlación alguna y la presencia de átomos donadores de pares de electrones no modifica dicha tendencia; por lo que tales parámetros tienen escaso potencial predictivo.¹⁶

Lo anterior demuestra que en los derivados de diorganoestaño de la forma $\text{R}_2\text{SnX}_2\text{L}_2$; R determina la potencia y la toxicidad del compuesto, mientras que X determina el grado de liberación de la especie R_2Sn^{2+} , de acuerdo a su estabilidad hidrolítica, donde uno de los principales inconvenientes es la formación de los correspondientes hidroxocompuestos altamente insolubles o bien la formación de aductos derivados de proteínas que sean muy estables, es decir, no presenten disociación posteriormente y por tanto impidiendo su liberación en el sitio deseado.

Finalmente, se han sintetizado compuestos de coordinación con ligantes derivados del diaminociclohexano emulando al oxaliplatino, pero los resultados de actividad antitumoral muestran que éstos compuestos son inactivos.²⁸

C. MECANISMO DE CITOTOXICIDAD DE COMPUESTOS DE ORGANOESTAÑO.

El mecanismo de acción responsable es bastante complejo, las investigaciones realizadas plantean que este tipo de compuestos ejerce su acción al interactuar en primer lugar con la membrana plasmática al intercalarse entre los fosfolípidos de membrana interfiriendo con la síntesis y el transporte de los mismos afectando su empaquetamiento y promoviendo la peroxidación de lípidos.²⁹

En segundo lugar, los organoestannanos inhiben la fosforilación oxidativa en las mitocondrias por la alteración en el equilibrio de intercambio iónico de Cl^- y OH^- en la membrana mitocondrial.³⁰

Más recientemente, se han llevado a cabo estudios para elucidar el mecanismo de acción de los compuestos de diorganoestaño utilizando compuestos del tipo $\text{R}_2\text{SnX}_2\text{L}_2$, donde L es el compuesto orgánico fenantrolina, el complejo se adicionó a una solución de nucleótidos y de DNA extraído de timo de becerro, demostrándose que la predisociación y la liberación de especies de la forma R_2Sn^{2+} es fundamental, asimismo, se encontró que el ligante se intercala en el DNA, pero el fragmento R_2Sn^{2+} forma enlaces de coordinación con los grupos fosfato del DNA, una explicación plausible se obtiene en la teoría de ácidos y bases de Pearson, debido a que los iones fosfato son bases duras, mientras que los compuestos del tipo R_2Sn^{2+} son ácidos duros.³¹

D. PROCESO INFLAMATORIO.

El proceso inflamatorio incluye una serie de fenómenos desencadenados por diversos estímulos provocados por infecciones bacterianas, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, así como lesiones térmicas o físicas, donde cada tipo de estímulo produce un patrón característico de reacción ó respuesta. A escala macroscópica el cuadro clínico muestra eritema, edema y dolor. Las respuestas inflamatorias surgen en tres fases diferentes, donde al parecer cada una es regulada por mecanismos distintos: Una fase transitoria aguda caracterizada por vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar; una fase subaguda tardía que se identifica por la infiltración de polimorfonucleares, y una fase proliferativa crónica en la que se manifiesta degeneración y fibrosis tisular.

E. MEDIADORES LIPÍDICOS DEL PROCESO INFLAMATORIO.

Los compuestos químicos derivados de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos se denominan eicosanoides y son derivados del ácido araquidónico, principal precursor de la biosíntesis de eicosanoides en mamíferos que proviene del metabolismo del ácido linoleico procedente de los alimentos; como respuesta a estímulos hormonales a través de receptores de membrana acoplados a la enzima *fosfolipasa C*, ésta ataca los fosfolípidos de membrana liberando ácido araquidónico y catalizando la hidrólisis de fosfatidilinositol a diacilglicerol e inositol-1-4-5-trifosfato (IP₃), que es responsable de la liberación de Ca²⁺ intracelular que funciona como segundo mensajero; una vez liberado, el ácido araquidónico es metabolizado en productos oxigenados por medio de diferentes sistemas enzimáticos como son las *ciclooxigenasas* y *lipooxigenasas*.³²

Por otro lado, la enzima sintetasa de endoperóxido de prostaglandina conocida como *ciclooxigenasa*, presente en la mayoría de los tejidos y teniendo dos isoformas denominadas COX-1 y COX-2 (donde la primera isoforma es constitutiva) son las responsables de la biosíntesis de prostaglandinas. Estas enzimas presentan dos sitios activos diferentes; el primero de ellos es *sintetasa de endoperóxido* que oxigena al ácido araquidónico formando un endoperóxido cíclico de PGG a través de un grupo hemo que es activado por un peróxido (iniciando el ciclo catalítico) oxidándose a una especie oxorradicalaria de Fe^{IV} que abstrae un átomo de hidrógeno de la enzima; a continuación, el radical formado abstrae un átomo de hidrógeno del C-13 *pro-S*, posteriormente la adición de oxígeno triplete seguida de ciclización y adición de otra molécula de oxígeno origina la prostaglandina PGG (Figura 2.10).³³

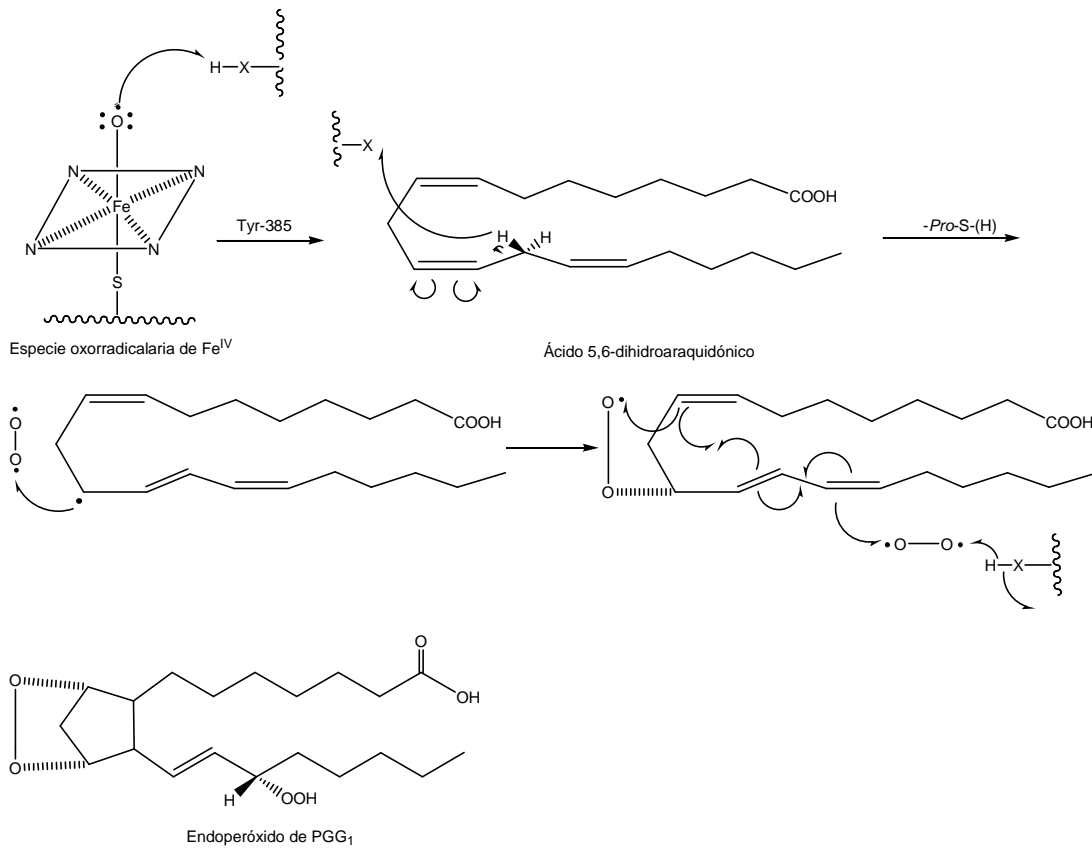


Figura 2.10 Mecanismo de síntesis de endoperoxidos de PGG.³³

A continuación, mostrando su actividad de *peroxidasa* la prostaglandina PGG transforma PGG en PGH₂, químicamente inestable y precursor de otras prostaglandinas y por acción enzimática se convierten en productos como PGD₂, PGF_{2α}, PGE₂ y PGI₂ (prostaciclina), en tanto la *tromboxano sintasa* presente en las plaquetas transforma PGH₂ en tromboxano A₂, el cual es precursor de otros tromboxanos, los cuales son responsables de la constricción de vasos sanguíneos y de la agregación plaquetaria como se muestra a en la figura 2.11.³³

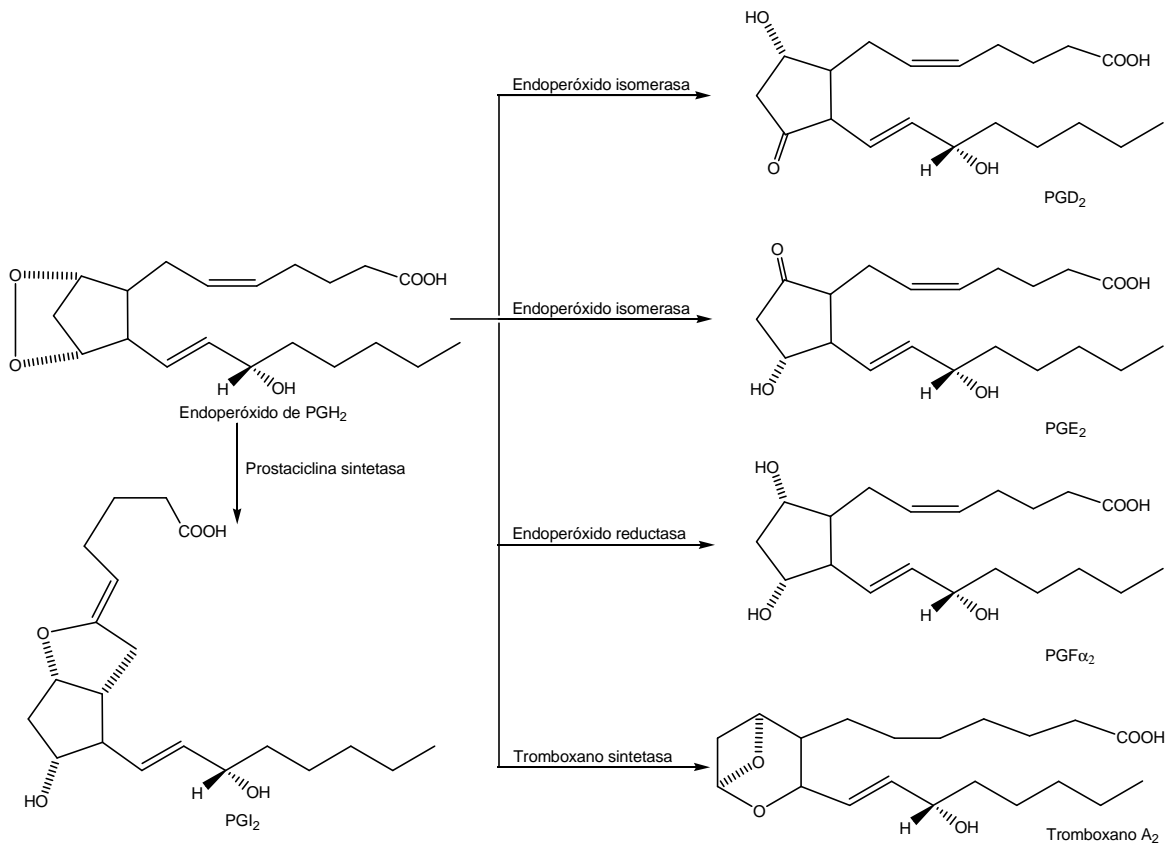


Figura 2.11 Mecanismo de la conversión de endoperoxidos a prostaglandinas y tromboxanos.³³

La otra ruta metabólica del ácido araquidónico es la catalizada por las *lipooxigenasas*, enzimas citosólicas presentes en tejidos como corazón, cerebro y pulmón, así como en los leucocitos actuando como factores quimiotácticos de los polimorfonucleares, por lo que están involucrados en la inmunorregulación.³⁴ Dicha ruta consiste en la formación de ácidos hidropoxieicosatetraónicos (HPETE); los cuales son precursores de leucotrienos, sustancias involucradas en padecimientos como el asma y la psoriasis.

F. BÚSQUEDA DE COMPUESTOS DE ORGANOESTAÑO CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

Desde la década de 1970 se sabe que los fármacos antiinflamatorios no esteroidales (AINES, por sus siglas en inglés) son inhibidores no selectivos de las *ciclooxigenasas*, no obstante tienen efectos adversos importantes como la irritación de la mucosa gastrointestinal en el tratamiento a largo plazo de enfermedades crónicas como la artritis reumatoide, por lo que el interés en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos se ha incrementado notablemente.

En la búsqueda de nuevos antiinflamatorios se han implementado diversos modelos de inflamación aguda principalmente en la piel (dermatitis) cuya manifestación es edema y eritema en el sitio de la lesión; uno de éstos modelos se fundamenta en la aplicación tópica de agentes químicos irritantes como el 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA, Figura 2.12) el cual induce la biosíntesis de prostaglandinas, por lo que se sugiere que este fenómeno sea el responsable de la hiperplasia producida por el TPA.³⁵

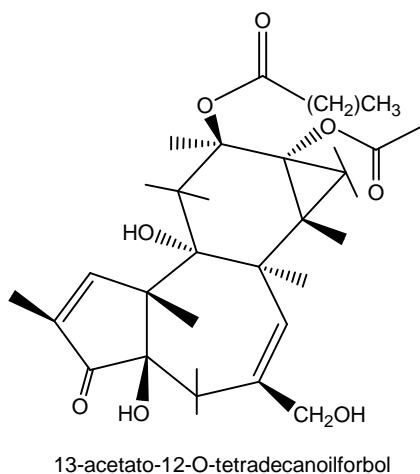
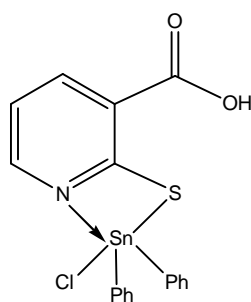


Figura 2.12 Estructura del 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA).³⁵

El mecanismo de acción del TPA es aún desconocido, aunque se sabe que actúa como un segundo mensajero activando la proteína cinasa C y generación de radicales libres, siendo un promotor de tumores en modelos *in vivo* de carcinogénesis en epidermis, ya que se sabe que inhibe la enzima *superóxido dismutasa*.³⁵ Se sabe que los compuestos derivados de diorganoestaño poseen actividad antiinflamatoria, un ejemplo es el complejo 2.12 (Figura 2.13) descrito en 2006 por Xanthopoulou, el cual es inhibidor competitivo de las *lipooxigenasas*, el complejo fue sintetizado a partir de ácido 2-mercaptonicotínico y cloruro de difenilestaño (IV) utilizando metanol como disolvente; el estudio de difracción de rayos X mostró que es un complejo pentacoordinado de naturaleza monomérica.³⁶



2.12

Figura 2.13 Complejo inhibidor competitivo de las *lipooxigenasas* sintetizado por Xanthopoulou.³⁶

G. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS DE ORGANOESTAÑO.

En el 2006, A. Ali informó de la existencia de compuestos de coordinación de estaño (IV) derivados de calix[4]arenos que inhiben la formación radicales libres (especies reactivas de oxígeno, ROS) en eritrocitos de rata.³⁷

La relevancia patológica de las ROS radica en que son factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como aterosclerosis, artritis reumatoide, la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson e incluso el cáncer, ya que se ha observado una correlación positiva entre su formación y la ocurrencia de éstos padecimientos, aunque no se ha demostrado hasta el momento que sean la causa directa de los mismos.

Basándose en estas observaciones; una forma de prevenir su aparición es la interferencia en la generación de radicales libres a través del uso de antioxidantes, que son compuestos químicos que a bajas concentraciones con respecto a la de un sustrato dado, retarda o previene su oxidación.³⁸

Existen numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto, uno de ellos que involucra un sistema biológico, es la medición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata utilizando como inductor el 2,2'-Azobis-(2-amidinopropano) compuesto conocido como AAPH, (Figura 2.14) cuya descomposición produce nitrógeno molecular y dos radicales amidinoprapano que se combinan químicamente con oxígeno molecular generando radicales peroxilo dando lugar a la fase de iniciación en el proceso de peroxidación en fosfolípidos de membrana produciendo radicales hidroperoxilo que conducen a la fase de propagación.

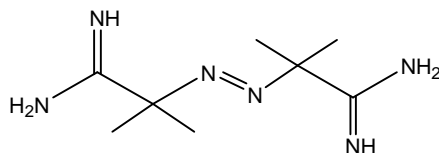


Figura 2.14 AAPH compuesto iniciador de radicales libres.

Finalmente, el proceso concluye con la formación de productos múltiples como el malondialdehído (MDA), el cual reacciona a pH ácido con ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un aducto cuya absorbancia es medida a 532 nm (Figura 2.14) observando una relación directamente proporcional entre la concentración de MDA y la respuesta medida como absorbancia, lo que indica que a medida que se incrementa la absorbancia, es mayor la concentración de MDA generado a partir de la peroxidación de lípidos.³⁹

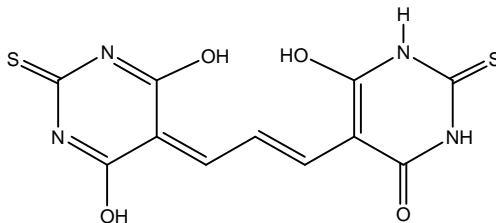


Figura 2.14 Aducto formado entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA).³⁹

III. OBJETIVOS GENERALES Y JUSTIFICACIÓN.

Desde el descubrimiento de las propiedades antiproliferativas del *cis*-platino se han buscado nuevos antineoplásicos basándose en otros metales, en este contexto, los derivados de diorganoestaño presentan elevada actividad biológica *in vitro*, en particular citotóxica y desde 1972 se ha buscado un compuesto líder, sin éxito hasta el presente. Por otro lado, las bases de Schiff derivadas de α -aminoácidos se consideran análogos del piridoxal, por lo que se han estudiado desde hace tiempo como posibles antimetabolitos. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se presenta la síntesis de compuestos pentacoordinados de estaño (IV) con sustituyentes *n*-butilo en el fragmento organometálico, ya que son desde el punto de vista biológico los más activos, adicionalmente se utilizaron los aminoácidos L-Histidina y L-Glutamina como precursores en la síntesis de los organoestannanos. La L-Histidina se encuentra presente en la saliva y además, es el principal medio de transporte en el organismo al unirse a los residuos de L-Histidina presentes en la hemoglobina.⁴⁰ Mientras que la L-Glutamina es de particular interés para el desarrollo de antimetabolitos como potenciales inhibidores de la biosíntesis de purinas; puesto que a la fecha no existe ningún antineoplásico disponible en la clínica de este tipo.⁴¹

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Sintetizar compuestos pentacoordinados de estaño (IV) derivados de L-Histidina.
2. Realizar la síntesis de complejos de estaño (IV) derivados de L-Glutamina.
3. Caracterizar los compuestos obtenidos por medio de espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn e IR, así como por espectrometría de masas.
4. Llevar a cabo la evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos frente a las líneas celulares HCT-15 (cáncer de colon), PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), SKLU-1 (cáncer de pulmón) y K562 (Leucemia mielógena crónica).

-
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido por TPA por medio de su aplicación tópica en oreja de ratón.

 6. Determinar la actividad antioxidante de los complejos mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Síntesis y caracterización de complejos pentacoordinados de estaño(IV) derivados de L-Glutamina y L-Histidina.

Síntesis.

Se realizó la síntesis de cuatro derivados del tipo 2,2-di-*n*-butil-6-aza-1,3-dioxa-6-en-2-estannabenzociclononen-4-onas unidos por enlaces de coordinación transanulares N→Sn haciendo reaccionar *in situ* óxido de di-*n*-butilestaño, 5-X-salicilaldehído (X= H, Cl) y L-Glutamina ó L-Histidina en relación estequiométrica 1:1:1 utilizando metanol anhidro como disolvente (Figura 4.1), las correspondientes bases de Schiff no se aislaron debido a la escasa solubilidad de los aminoácidos en disolventes orgánicos y reacciones de competencia que conducen a impurezas que son imposibles de separar.²³

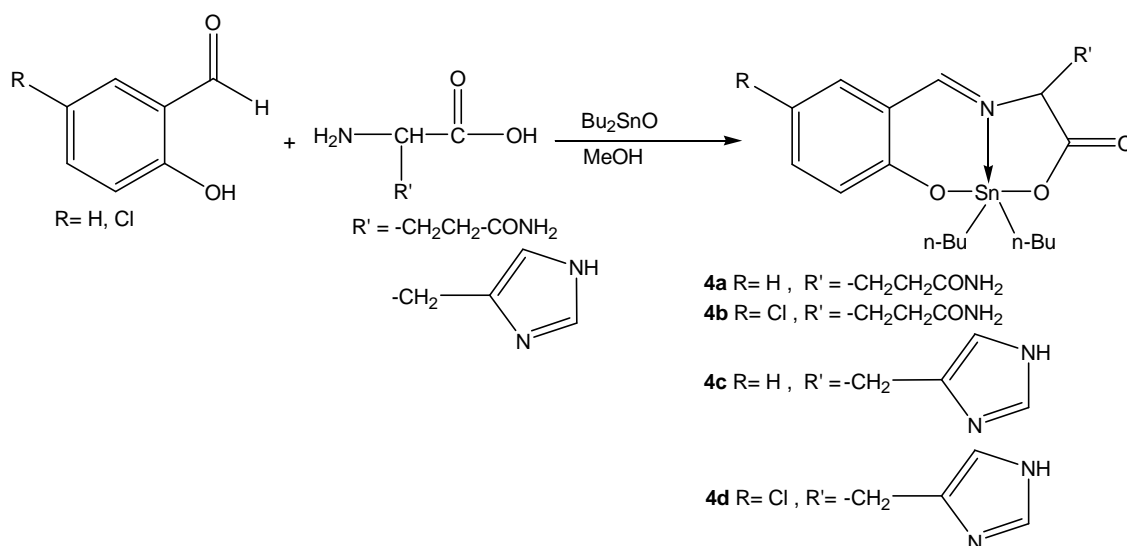


Figura 4.1 Síntesis de los compuestos de coordinación de diorganoestaño (IV) derivados de α -aminoácidos.

En todos los casos se obtuvieron sólidos amorfos de color amarillo claro después de la eliminación del disolvente con rendimientos entre el 75-96%. Para cada grupo de compuestos se observaron señales similares en espectroscopía de RMN de ¹H, ¹³C, ¹¹⁹Sn e IR, y el patrón de fragmentación en espectrometría de masas (FAB⁺) es similar.

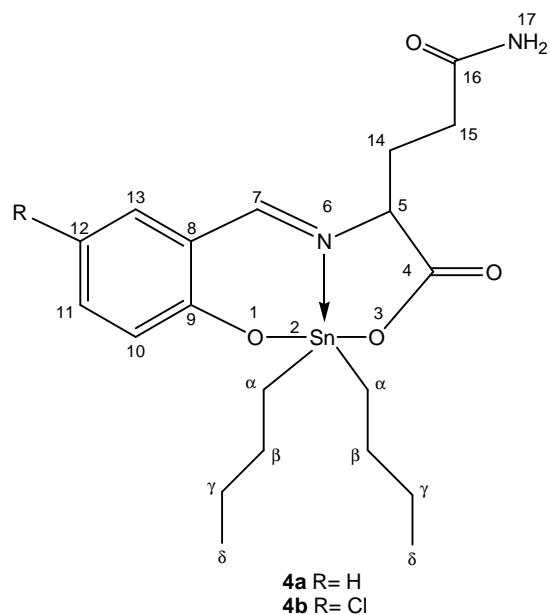


Tabla 4.1 Datos de ^1H RMN para los compuestos **4a- b**.

Compuesto	H-5	H-7	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-15	H-17	H- α , H- β , H- γ	H- δ
4a	4.12(dd) J=5.79Hz J=9.87Hz	8.48 (s)	6.70(d) J=9.06Hz	7.33(dd) J=2.76Hz J=9.09Hz	6.75(t) J=8.52 Hz	7.19(dd) J=1.95Hz J=7.98Hz	2.42(ddd) J=5.49Hz J=5.65Hz J=15.12Hz 2.74(ddd) J=6.06Hz J=12.36Hz	2.03-2.23(m)	6.52 (s)	1.22- 1.75(m)	0.81(t) J=7.14Hz 0.91(t) J=7.14Hz
4b	4.15(dd) J=5.79Hz J=9.09Hz	8.48 (s)	6.72(d) J=9.06Hz	7.33(dd) J=2.76Hz J=9.09Hz	-----	7.19(d) J=2.76Hz	2.42(ddd) J=5.49Hz J=5.76Hz J=15.39Hz	2.13 (ddd) J=7.9 Hz J=12.39 Hz J=21.09 Hz	6.49 (s)	1.22- 1.75(m)	0.81(t) J=7.14Hz 0.91(t) J=7.14Hz

Caracterización por ^1H RMN para los complejos **4c-d** derivados de L-Histidina.

En el espectro de ^1H RMN del complejo **4c** se presentan dos tripletes en 0.66 y en 0.78 ppm que corresponden a los metilos de los butilos unidos al estaño indicando que la molécula es asimétrica, mientras que los metilenos del resto del fragmento organometálico presentan una señal múltiple entre 1.08-1.66 (12H, m).

En la región alifática se observan dos señales dobles de dobles (dd) correspondientes a los H-14 diastereotópicos. El centro quiral donde se encuentra H-5 presenta una señal doble de dobles en δ : 4.27 debido al acoplamiento con los hidrógenos diastereotópicos H-14. En la región aromática se presentan dos señales dobles en 6.61 y 6.81 ppm; mientras que en δ : 6.52 y δ : 7.23 se observan dos tripletes que corresponden a H-13, H-10, H-12 y H-11, respectivamente. Para el anillo de imidazol se presentan dos señales simples en 6.59 y 7.48 ppm para H-19 y H-17, dichas asignaciones se realizaron basándose en lo reportado por M.A. Girasolo para compuestos de coordinación de di-*n*-butilestaño sintetizados a partir de péptidos derivados de L-Histidina, ya que las señales antes mencionadas se encontraron en 6.75 y 7.56 ppm, respectivamente.⁴² En tanto, el protón imínico cuya señal se espera entre 8.19-8.35 ppm se desplaza a hacia zona de protección por la posición superposición entre ambos sistemas aromáticos favoreciendo la protección del carbono imínico de la base de Schiff formada en el seno de la reacción. Por otra parte, no se observa ninguna señal originada por grupos metilenos vecinos a sistemas aromáticos, lo que indica que no se presentó la ciclización de la Histidina reportada por L. Casella,²³(Figura 4.5) debido a las condiciones de reacción anhídras que se emplearon.

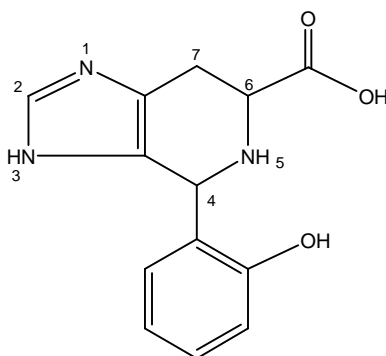


Figura 4.4. Compuesto producto de la ciclización de la L-Histidina propuesto por L. Casella.²³

En la región aromática el compuesto **4d** que tiene un átomo de cloro en la posición 12 se observa un comportamiento similar, la asignación de los protones aromáticos se muestra en la tabla 4.2 y como en el caso del compuesto **4c** (Figura 4.5) no se observaron indicios de condensación del anillo de imidazol de la L-Histidina con la base de Schiff.

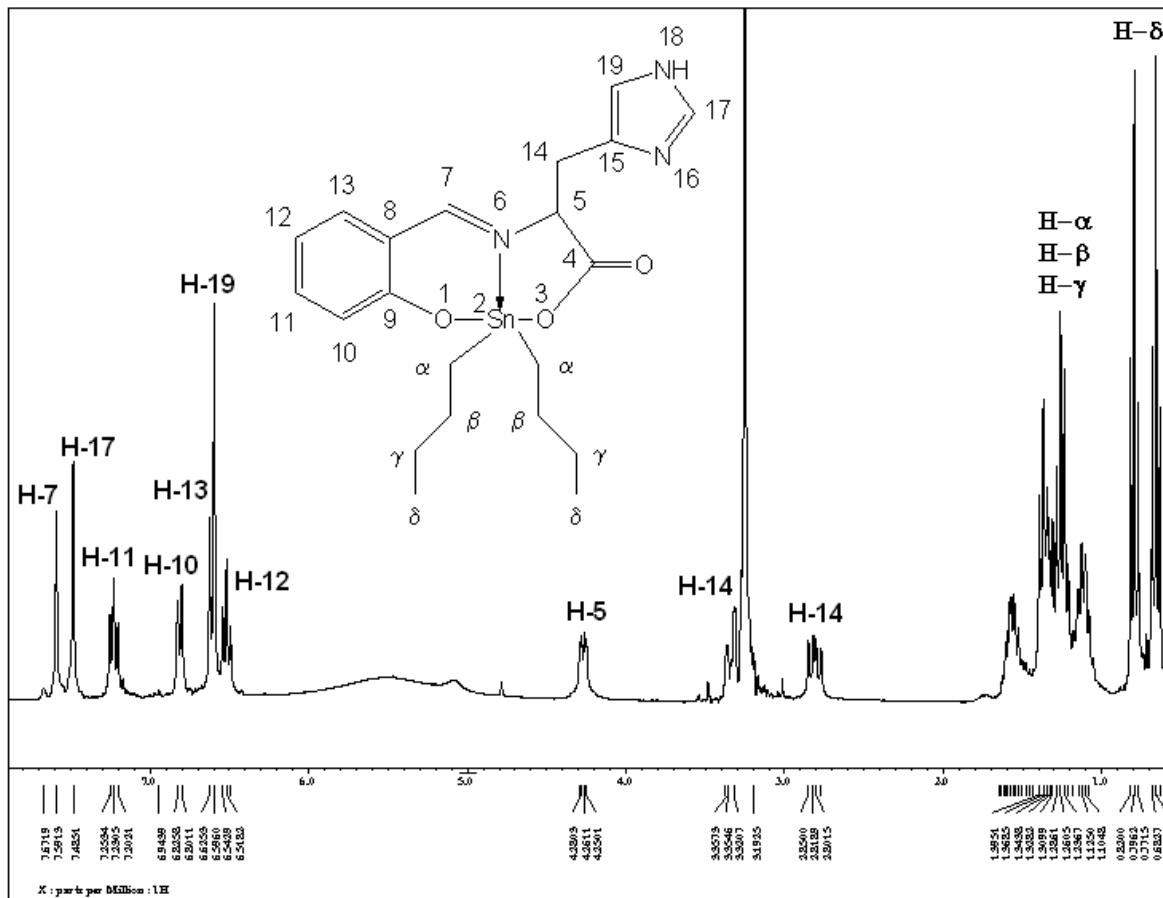


Figura 4.5 Espectro de ¹H RMN (300.5 MHz, CDCl₃) del compuesto **4c**.

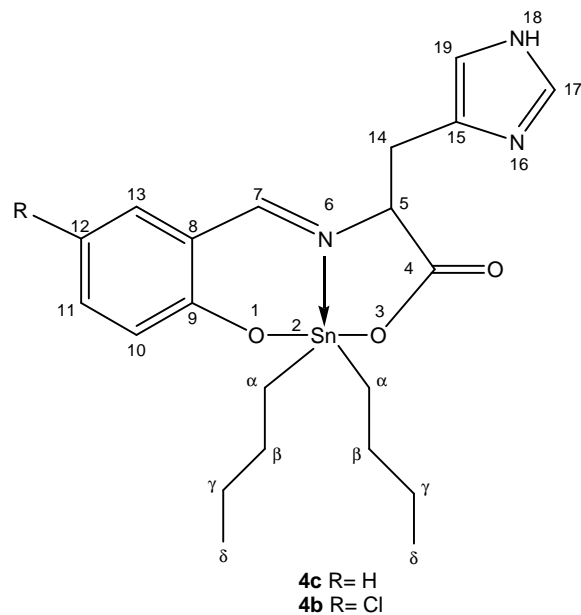


Tabla 4.2. Datos de ^1H RMN para los compuestos **4c-d**.

Compuesto	H-5	H-7	H-10	H-11	H-12	H-13	H-14	H-17	H-18	H-19	H- α , H- β , H- γ	H- δ
4c	4.27(dd) J=3.30Hz J=9.06Hz	7.59 (s)	6.81(d) J=7.41Hz	7.23(t) J=6.87Hz	6.52(t) J=7.41Hz	6.61(d) J=8.79Hz	2.81(dd) J=9.33Hz J=14.59Hz	7.48 (s)	-----	6.59 (s)	1.08- 1.66(m)	0.66(t) J=7.14Hz 0.78(t) J=7.41Hz
4d	4.32(dd) J=2.73Hz J=7.95Hz	7.57 (s)	6.56(d) J=9.06Hz	7.13(dd) J=2.49Hz J=9.06Hz	-----	6.79(d) J=2.46Hz	2.86(dd) J=9.06Hz J=14.01Hz 3.40(d) J=12.36Hz	7.55 (s)	3.27 (s)	6.65 (s)	1.08- 1.66(m)	0.66(t) J=7.14Hz 0.78(t) J=7.41Hz

Caracterización por RMN ^{13}C de los complejos 4a-b derivados de L-Glutamina.

El espectro de RMN ^{13}C mostró para el compuesto **4a** once señales en la región alifática, entre 13 y 27 ppm se aprecian 8 señales correspondientes a los carbonos de los grupos butilo unidos al átomo de estaño, indicando que dichos grupos no son equivalentes, los desplazamientos químicos son similares a los reportados por Holecek y Lycka para compuestos de coordinación derivados de di-*n*-butilestaño.⁴⁴ En 31.6 ppm aparece la señal asignada al carbono adyacente al centro quiral (C-14), mientras que la señal de δ : 33.0 corresponde al carbono C-15 del grupo amida; y la señal de 66.8 ppm se asignó al carbono quiral de la molécula (C-5).

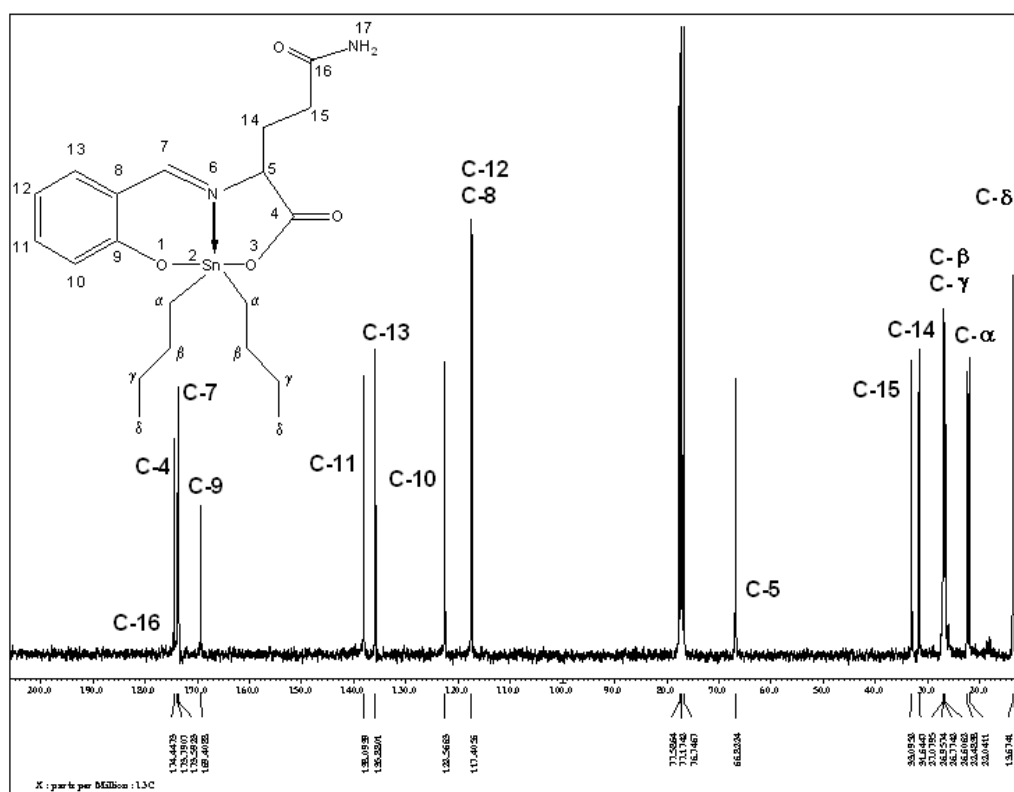


Figura 4.6 Espectro de ^{13}C RMN del (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **4a**.

En la región aromática se observan 5 señales en lugar de 6, este comportamiento se debe al traslape de señales en 117.4 ppm de los C-12 y C-8; las señales de los carbonos C-10, C-13, C-11 y C-9 aparecen en 122.5, 135.8, 138.1 y 169.5 ppm, respectivamente (Figura 4.6).

La señal del carbono imínico se ubica en δ : 173.6, en tanto las señales de 173.8 y 174.4 ppm se asignaron al carbono carbonílico de la amida (C-16) y al carboxilato coordinado al metal (C-4), respectivamente.

En el espectro del compuesto **4b** (Figura 4.7) se observa un comportamiento similar, excepto en la región aromática en donde si se aprecian las 6 señales esperadas para el anillo aromático, dicho comportamiento se debe a la presencia del átomo de cloro en la posición 12, al ser más electronegativo desprotege a éste átomo de carbono el cual aparece a campo más bajo en δ : 121.4 con respecto a C-8 cuya señal aparece en 117.4, es decir, no se observa traslape de señales como en el caso anterior. En general, las señales del compuesto **4b** se desplazaron en promedio 2 ppm hacia zona de desprotección, en comparación con compuesto **4a** donde no se encuentra en átomo de cloro; los datos espectroscópicos del compuesto **4b** se resumen en la tabla 4.3.⁴⁵⁻⁴⁶

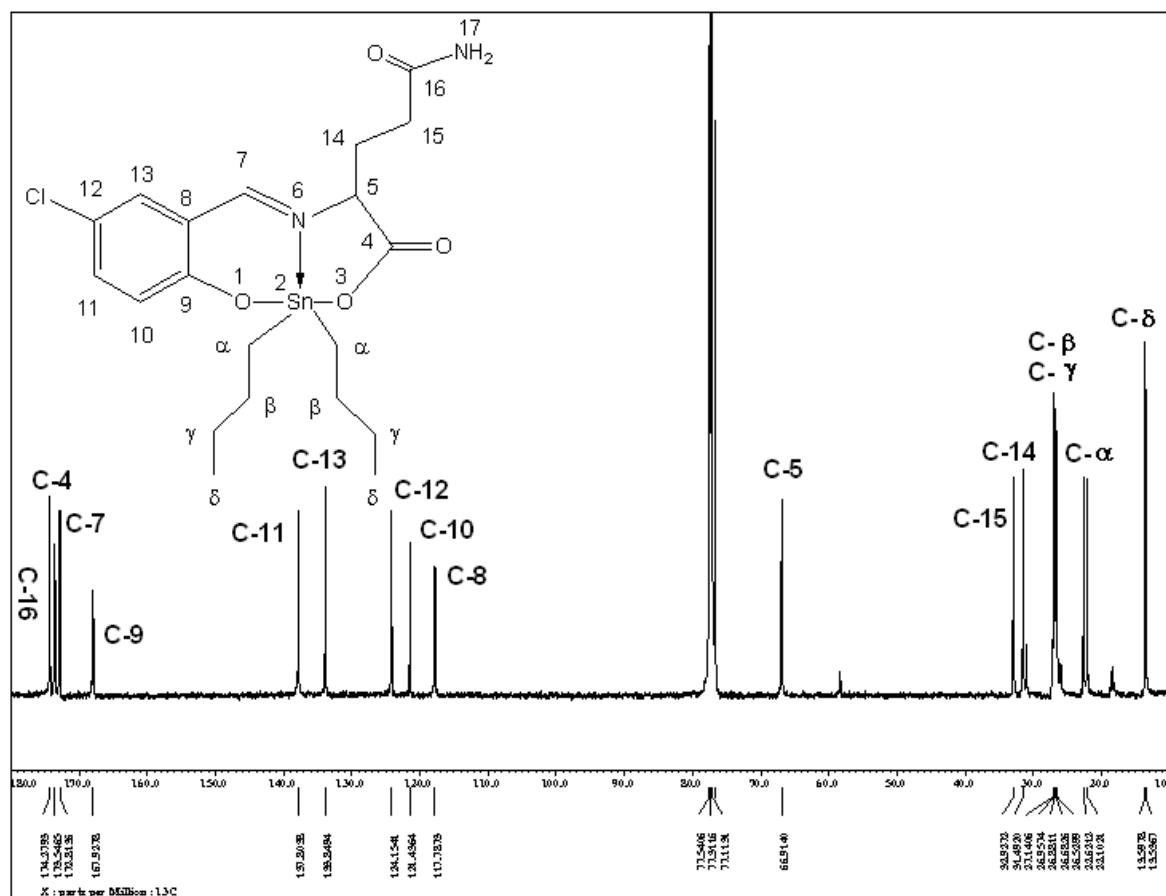
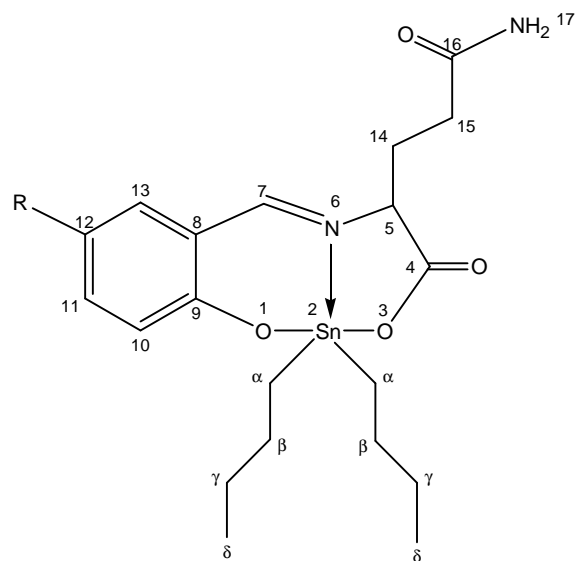


Figura 4.7 Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **4b**.



4a R= H
4b R= Cl

Tabla 4.3. Datos de RMN ^{13}C para los complejos **4a-b**.

Compuesto	C-4	C-5	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	C $_{\gamma}$	C $_{\delta}$
4a	174.4	66.8	173.6	117.4	169.4	122.6	138.1	117.4	135.9	31.6	33.1	174.0	22.0- 22.5	26.9- 27.0	26.6- 27.0	13.6- 13.7
4b	173.5	66.9	172.8	117.8	167.9	121.1	137.8	124.4	133.8	31.5	32.9	174.3	22.1- 22.6	26.9- 27.1	26.7- 26.8	135.- 13.6

Caracterización por RMN ^{13}C de los complejos **4c-d** derivados de L-Histidina.

Para éstos compuestos en la región alifática se tienen diez señales, ocho de las cuales corresponden a los dos grupos butilos enlazados al centro metálico en el intervalo comprendido entre 13 y 27 ppm observándose el mismo comportamiento que en los derivados de L-Glutamina. En δ : 33.6 aparece la señal del carbono proquiral de la posición catorce de la cadena lateral y la señal de 67.8 ppm se asignó al carbono quiral de la molécula C-5 (Figura 4.8). Asimismo, en el resto de la región alifática no se presentan señales adicionales que sugieran la ciclización de la L-Histidina como lo reportó L.Casella.²³

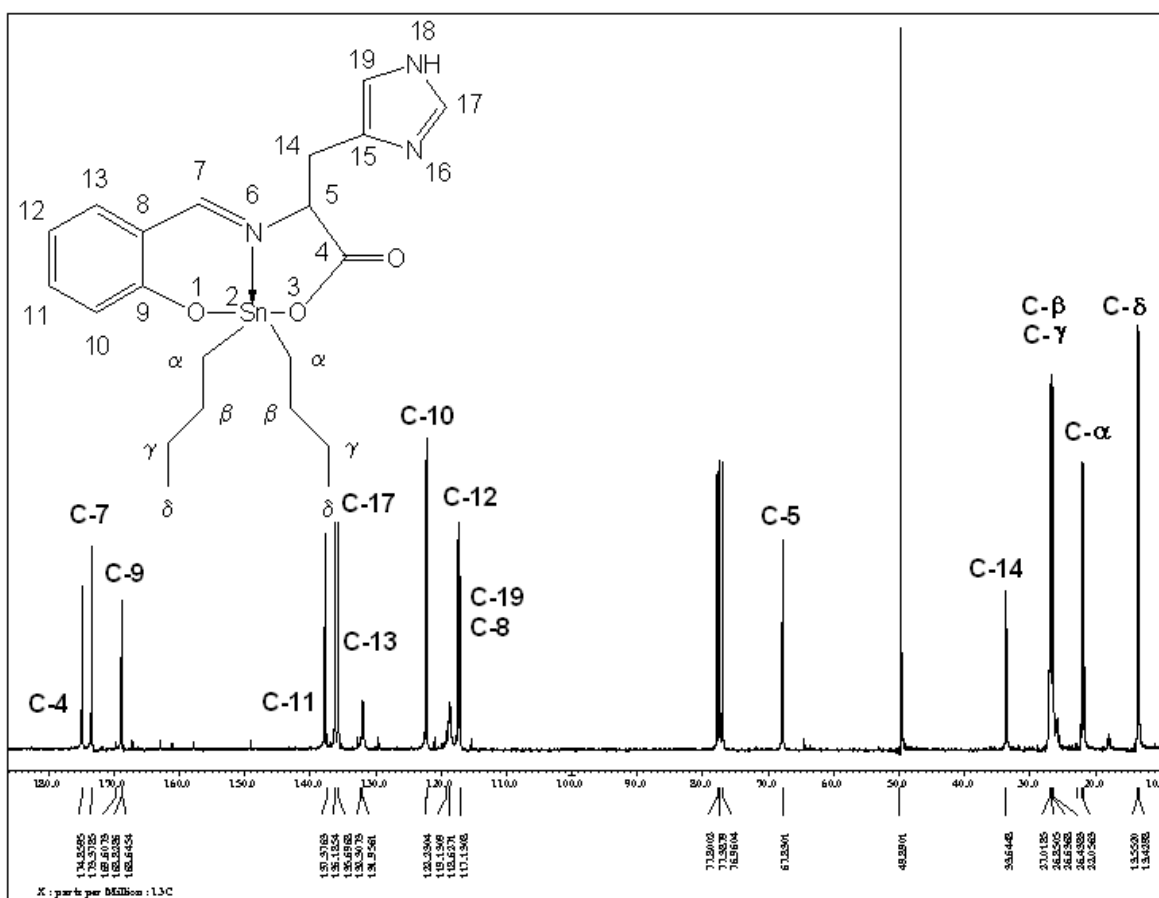


Figura 4.8 Espectro de ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) para el compuesto **4c**.

En la región aromática del espectro se observan 7 señales en lugar de las 9 esperadas para éste sistema debido a la existencia en solución de formas tautoméricas del imidazol de la L-Histidina.

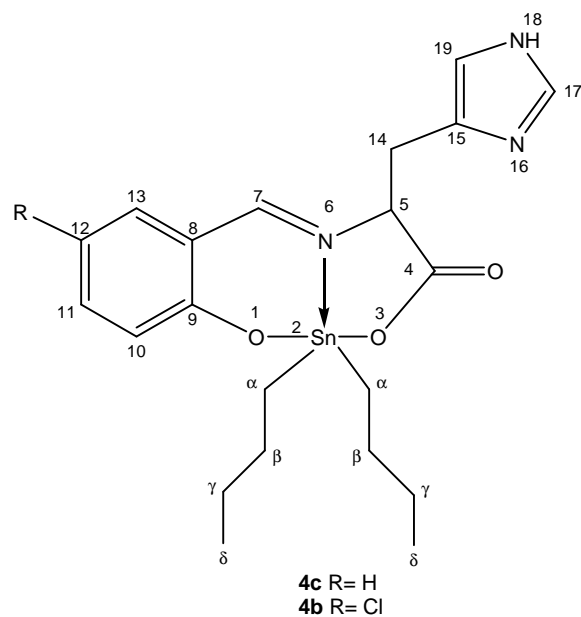


Tabla 4.4. Datos de RMN ^{13}C para los complejos **4c-d**.

Compuesto	C-4	C-5	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-17	C-19	C $_{\alpha}$	C $_{\beta}$	C $_{\gamma}$	C $_{\delta}$
4c	174.8	67.8	173.4	117.1	168.8	122.2	137.7	117.4	135.7	33.6	---	136.2	117.1	21.7- 22.0	26.8- 27.0	26.5- 26.6	13.4- 13.5
4d	174.2	68.1	172.1	117.5	167.5	124.1	137.3	121.1	133.5	33.7	---	136.2	117.5	22.0- 22.4	26.9- 27.0	26.5- 26.6	13.5- 13.6

Caracterización por RMN ^{119}Sn para los complejos **4a-d**.

Los desplazamientos químicos para los cuatro complejos son muy similares, lo quiere decir que en todos los casos se tiene la misma geometría en disolución. Los valores de desplazamiento químico obtenidos en CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$ sugieren que los compuestos son pentacoordinados de acuerdo a lo reportado en la literatura, intervalo que comprende los desplazamientos químicos ubicados entre -90 y -190 ppm. Asimismo, la coordinación por parte del disolvente ($\text{DMSO-}d_6$) esperada para este tipo de compuestos se presenta en los cuatro complejos, ya que todos muestran valores desplazamiento químico situados entre -210 y -400 ppm, por lo que dichas especies son de geometría hexacoordinada (Figura 4.11).⁴⁴

Tabla 4.5. Desplazamientos químicos en RMN ^{119}Sn para compuestos de coordinación de diorganoestaño derivados de α -aminoácidos en distintos disolventes.

Compuesto	4a	4b	4c	4d
CDCl_3	-197.4	-196.9	-198.1	-200.5
$\text{DMSO-}d_6$	-230.4	-241.1	-231.1	-233.7

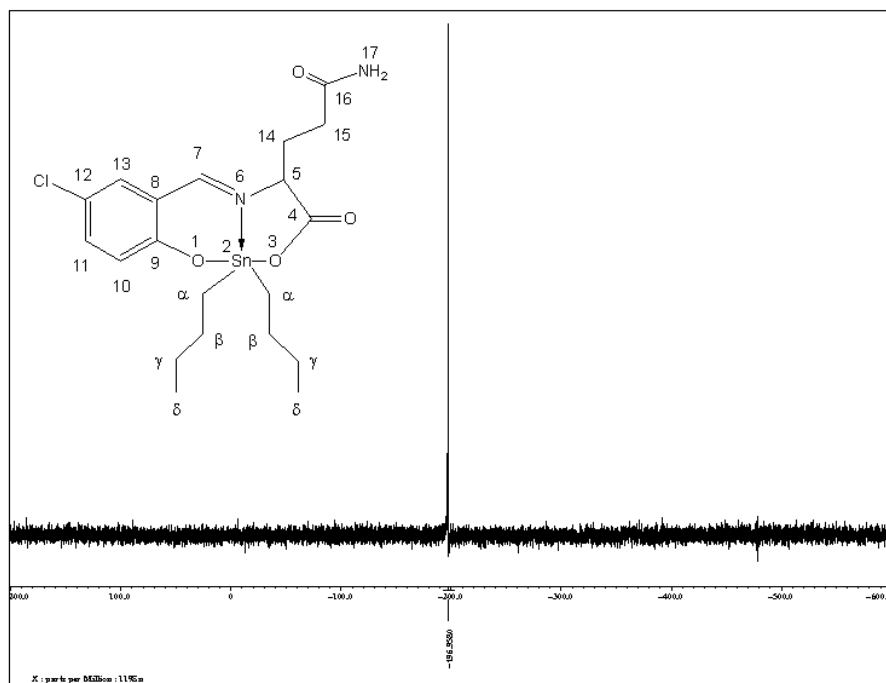


Figura 4.10 Espectro de ^{119}Sn RMN (112.8 MHz, CDCl_3) del compuesto **4b**.

Espectrometría de masas (FAB⁺).

En general, los compuestos exhiben el ión molecular con abundancia relativa del 100%, excepto para el compuesto **4d** con 85%. En éstos sistemas es común la pérdida de ambos grupos butilo [M⁺-Bu] y [M⁺-2Bu], los cuales se encuentran unidos al átomo metálico seguido por descarboxilación [M⁺-CO₂], apreciándose un patrón de fragmentación similar en todos los casos (Figura 4.11).

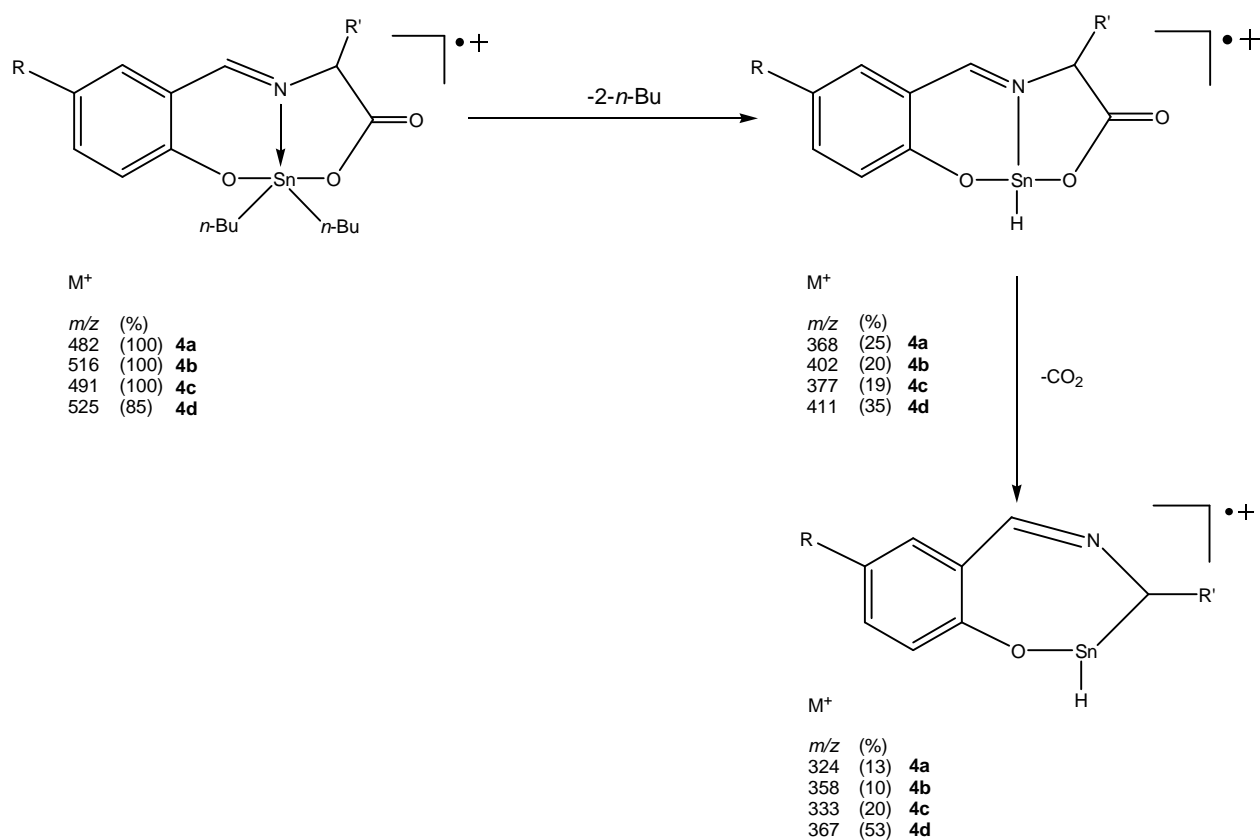


Figura 4.11 Patrón de fragmentación propuesto para los compuestos **4a-d**.

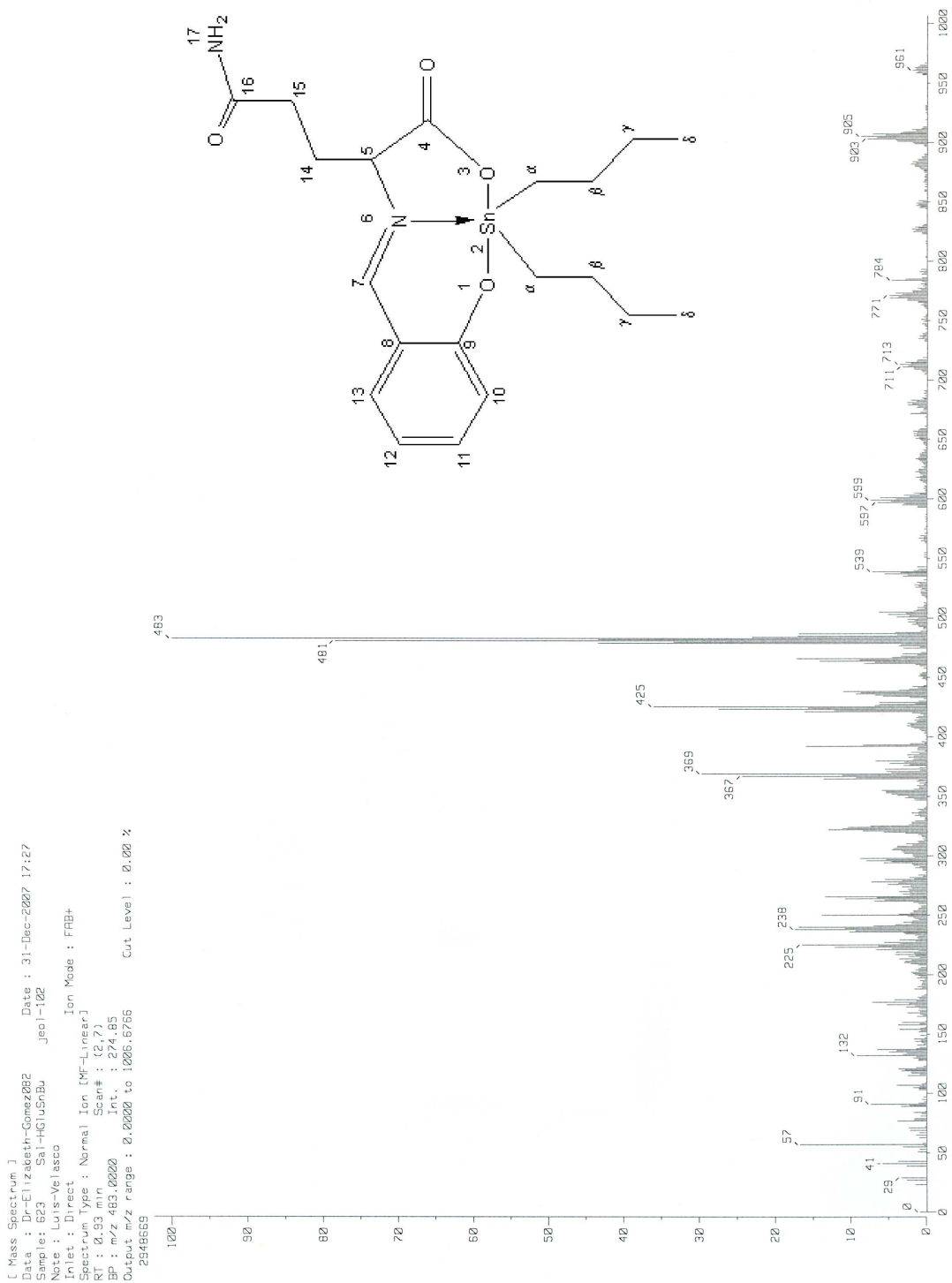


Figura 4.12 Espectro de masas del compuesto 4a

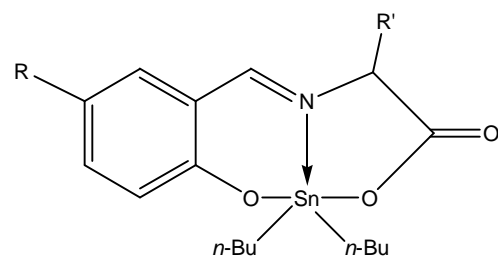
Espectroscopía infrarroja.

En todos los casos se observa la ausencia de la banda de 3200 cm^{-1} correspondiente a la $\nu(\text{OH})$ lo que indica la desprotonación del átomo de oxígeno fenólico del ligante y su coordinación con el átomo de estaño, este hecho se confirma con la presencia de la vibración Sn-O en aproximadamente 550 cm^{-1} en el infrarrojo lejano.

Asimismo, en todos los casos se observa una señal intensa en el intervalo comprendido entre $1614\text{-}1629\text{ cm}^{-1}$ indicando la presencia de imina coordinada al estaño en estado sólido y para los complejos **4a-b** se confirma con la presencia de una señal situada entre $420\text{-}430\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración $\text{N}\rightarrow\text{Sn}$. Esta información indica que la ciclización de la L-Histidina entre el anillo de imidazol y el grupo azometino de la molécula reportada por L. Casella no se presenta en este caso.

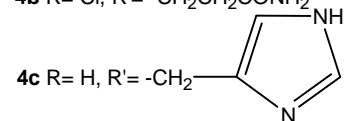
Por otra parte, la $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ en los compuestos derivados de L-Glutamina se sitúa cerca de 1686 cm^{-1} , mientras que en los provenientes de L-Histidina dicha vibración se presenta en el intervalo entre 1650 cm^{-1} y 1660 cm^{-1} . En cuanto a la $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ se tiene que para complejos **4a-b** con L-Glutamina la señal correspondiente aparece cerca de 1330 cm^{-1} , mientras que los complejos sintetizados a partir de L-Histidina ésta vibración aparece en el intervalo de 1339 cm^{-1} a 1443 cm^{-1} . De éstos datos se tiene que la diferencia entre $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ es mayor a 200 cm^{-1} indicando que la forma de coordinarse del grupo carboxilato del residuo de aminoácido es de tipo monodentado, es decir, no se presenta efecto quelato. Las vibraciones del enlace Sn-C se encuentran entre 423 cm^{-1} y 454 cm^{-1} , cuyos valores están de acuerdo a los descritos con anterioridad para compuestos de organoestaño.⁴⁹

Adicionalmente, para los complejos **4a-b** las $\nu(\text{N-H}_{\text{Amida}})$ características se presentan entre $3186\text{-}3362\text{ cm}^{-1}$. Mientras que en los compuestos **4c-d** derivados de L-Histidina la $\nu(\text{N-H}_{\text{Arom}})$ se encuentra en 2957 cm^{-1} en ambos casos. Asimismo, los datos espectroscópicos se resumen en la tabla 4.6.



4a R= H, R'= -CH₂CH₂CONH₂

4b R= Cl, R'= -CH₂CH₂CONH₂



4d R= Cl, R'= -CH₂-

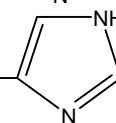


Tabla 4.6. Datos de IR para los compuestos **4a-d**.

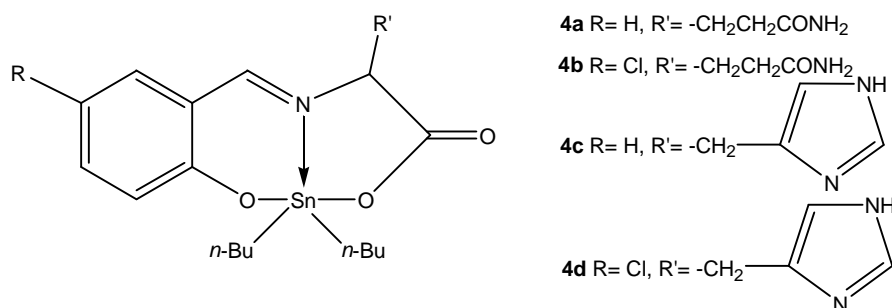
Compuesto	$\nu_{as}(\text{COO})$	$\nu_s(\text{COO})$	$\Delta\nu$	$\nu(\text{Sn-C})$	$\nu(\text{Sn-O})$	$\nu(\text{Sn}\rightarrow\text{N})$	$\nu(\text{N-H}_{\text{Amida}})$	$\nu(\text{N-H}_{\text{Arom}})$	$\nu(\text{C=N})$
4a	1686	1330	356	423	541	427	3359 3186	-	1618
4b	1687	1329	358	458	548	430	3362 3195	-	1622
4c	1650	1343	307	450	548	-	-	2957	1614
4d	1659	1339	320	454	547	-	-	2957	1629

Estudio de la actividad citotóxica de los complejos **4a-d**.

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se tomaron en cuenta los compuestos **4a-d**, todos ellos presentaron elevada solubilidad en disolventes polares como el metanol. Las líneas celulares utilizadas son U251 (Sistema nervioso central), PC-3 (cáncer de próstata), K-562 (Leucemia mielógena crónica), HCT-15(cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y SKLU-1 (cáncer de pulmón); las características de cada línea celular se describen en la parte experimental.

Tabla 4.7 Estudio preliminar de la actividad citotóxica de los compuestos **4a-d**.

Compuesto (1 μ M)	Línea celular (% de inhibición).					
	U251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
4a	78.07	7.13	81.57	64.55	19.32	100
4b	77.38	14.51	68.13	60.66	36.79	100
4c	80.9	66.28	66.28	67.75	30.77	100
4d	93.28	29.78	61.21	92.15	49.09	100
cis-platino (25 μ M)	85.71	42.18	59.17	65.98	92.2	94.01



El estudio preliminar de la actividad citotóxica mostró que todos los compuestos tienen marcada actividad citotóxica con relación al *cis*-platino.

En la línea celular U251, los compuestos derivados de Glutamina **4a-b** presentan actividad citotóxica similar entre sí. No obstante, los compuestos **4c-d** derivados de L-Histidina producen valores mayores de inhibición de crecimiento celular en comparación a los primeros. La mayor actividad citotóxica corresponde al compuesto **4d** con un átomo de cloro en la posición doce.

En cuanto a la línea celular PC-3 el compuesto **4c** derivado de L-Histidina resultó ser el más activo, en tanto los compuestos **4a**, **4b** y **4d** son mucho menos activos en comparación al primero; al parecer la sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de cloro en la posición doce en derivados de L-Histidina, es responsable de la disminución de la actividad citotóxica.

Para la línea celular K-562 la actividad citotóxica de los compuestos **4b**, **4c** y **4d** es muy similar, siendo el compuesto **4a** el de mayor actividad siendo en promedio 1.2 veces más activo en comparación al resto del grupo; estos resultados muestran que la introducción de un grupo electroatractor en la posición doce reduce la actividad citotóxica en esta línea celular. Sin embargo, en los derivados de L-Histidina no se produce un cambio importante.

Por su parte, la actividad citotóxica de los compuestos **4a**, **4b** y **4c** frente a la línea celular HCT-15 mostró valores de % de inhibición muy cercanos entre ellos, no obstante, el compuesto **4d** resultó ser el más activo. En los derivados de L-Glutamina la presencia del átomo de cloro no tiene efecto significativo en la actividad citotóxica pero en los derivados de L-Histidina, su presencia aumenta en 1.4 veces su actividad biológica.

En el caso de la línea celular MCF-7 se presentan los valores más bajos de % de inhibición para todos los compuestos a la concentración de prueba (1 μ M), aunque el reemplazo del átomo de hidrógeno por cloro en la estructura tanto en los derivados de L-Glutamina como de L-Histidina se traduce en un incremento de la actividad citotóxica de 1.9 y 1.6 veces, respectivamente.

Finalmente, en la línea celular SKLU-1 todos los compuestos son igualmente activos al inhibir totalmente el crecimiento celular.

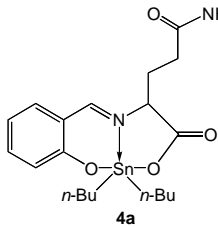
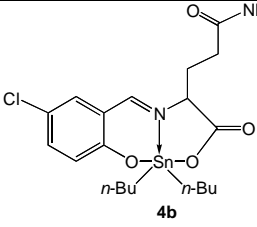
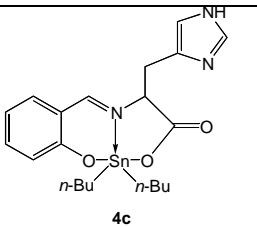
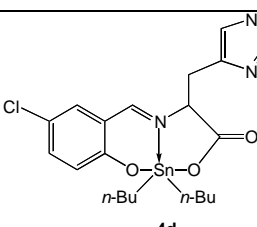
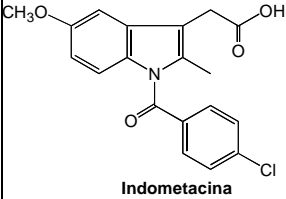
*Estudio de la actividad antiinflamatoria de los complejos **4a-d**.*

El estudio de la actividad antiinflamatoria se llevó a cabo utilizando el modelo de edema inducido por aplicación tópica de 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón usando como vehículo metanol determinándose las IC₅₀ para los cuatro complejos y los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 4.8.

De acuerdo con la tabla 4.8 el compuesto **4a** presenta una actividad 1.2 veces menor con respecto a la Indometacina, en tanto que para el compuesto **4b** resultó ser aún menos activo que el primero, en este caso la introducción de un grupo electroattractor en la posición doce se traduce en la disminución de la actividad antiinflamatoria con respecto a la molécula donde dicho grupo se encuentra ausente.

En este contexto el compuesto **4c** derivado de L-Histidina presenta actividad antiinflamatoria 2.3 veces menor en comparación al estándar -Indometacina- sin embargo, en el compuesto **4d** la presencia de un grupo de mayor electronegatividad en posición *para* al oxígeno fenólico coordinado al metal pudiera ser responsable de un notorio incremento en la actividad antiinflamatoria del compuesto, ya que ésta molécula muestra una actividad antiinflamatoria de 0.6 veces mayor que la producida la Indometacina.

Tabla 4.8 Estudio de la actividad antiinflamatoria de los complejos **4a-d**. % Inhibición de edema+esm (error estándar de la media) los valores *P≤0.05 se consideraron como diferencia significativa con respecto al grupo control.

Compuesto.	Concentración (μmol/oreja)	Edema+esm (mg)	% Inhibición	IC ₅₀ (μmol/oreja)
 4a	-----	16.27±0.76	-----	0.32
	0.10	13.61±0.61	19.20	
	0.17	13.14±0.91	49.30	
	0.31	8.24±1.20	67.50	
	1.00	5.28±1.01	73.90	
	1.78	4.24±1.10		
 4b	-----	16.20	-----	0.57
	0.10	13.27±0.76	13.93	
	0.17	10.84±1.02	33.06	
	1.00	7.41±1.52	54.23	
	3.10	3.18±0.64	80.33	
 4c	-----	15.92±0.57	-----	0.62
	0.10	13.48±0.45	15.30	
	0.31	9.04±1.14	43.20	
	1.00	7.81±1.77	50.90	
	3.10	3.75±0.64	76.40	
 4d	-----	15.62±0.71	-----	0.15
	0.03	13.92±1.14	10.91	
	0.10	9.45±1.57	39.54	
	0.31	5.32±1.26	65.93	
	1.00	1.77±0.68	88.64	
 Indometacina	-----	15.36±0.03	-----	0.27
	0.10	11.83±0.07	21.11	
	0.31	6.82±1.27	54.53	
	1.00	2.36±1.34	86.73	

*Estudio de la actividad antioxidante de los complejos **4a-d**.*

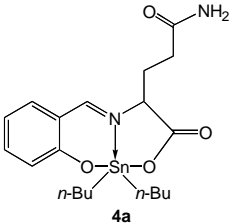
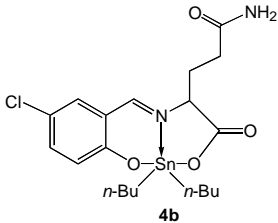
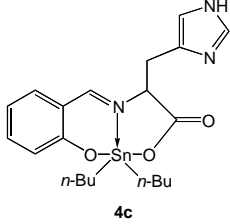
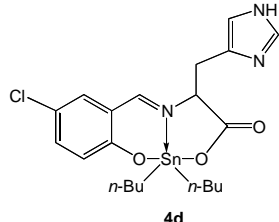
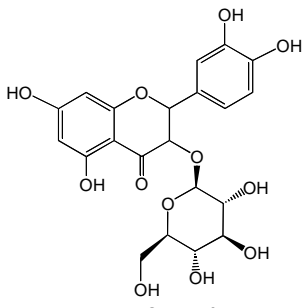
Mediante el modelo de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata se determinó la actividad antioxidante de los complejos en una escala de concentraciones logarítmica para determinar el cromóforo formado entre el ácido tiobarbitúrico y sustancias reactivas al mismo. Los resultados obtenidos se expresan en % de inhibición y se encuentran resumidos en la tabla 4.9.

De acuerdo a los resultados del cernimiento primario utilizando este modelo, el compuesto **4a** no presenta efecto sobre la peroxidación de lípidos a ninguna de las concentraciones de prueba. Por su parte el compuesto **4b** tiene una actividad *pro-oxidante* proporcional a la concentración.

Los compuestos **4c-d** mostraron actividad *pro-oxidante* a la concentración de 1 μM , sin embargo, a las concentraciones de 10 μM y 100 μM presentaron ligera actividad antioxidante siendo mayor en el compuesto **4d** a la concentración de 100 μM .

Estos resultados sugieren que la introducción del átomo de cloro en la posición doce en los compuestos **4a-b** derivados de L-Glutamina aumenta su actividad *pro-oxidante*; en los derivados de L-Histidina al sustituir un átomo de hidrógeno por uno de cloro, la actividad antioxidante disminuye. Además, la introducción de un anillo de imidazol en la posición cinco del núcleo de estannabenzociclononen-4-ona al parecer es responsable de la actividad antioxidante de los derivados de L-Histidina comparados con los derivados de L-Glutamina, de hecho los compuestos de organoestaño se utilizan en reacciones de ciclización de olefinas por medio de radicales libres, lo cual podría explicar el comportamiento *pro-oxidante* de los compuestos **4a-b**, pero habría que llevar a cabo otros estudios para probar esta hipótesis.³

Tabla 4.9 Porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata de los complejos.

Compuesto.	Concentración(μM).	TBARS (nmol/mgproteína)	% inhibición.
Basal	-----	0.298	-----
Control	-----	3.867	-----
 4a	1 10 100	3.807 3.900 3.860	1.54 -0.86 0.17
 4b	1 10 100	4.029 4.059 4.754	-4.19 -4.96 -22.96
 4c	1 10 100	3.999 3.629 2.587	-3.42 6.16 33.10
 4d	1 10 100	4.072 3.751 3.586	-5.30 2.99 7.27
 Quercetina	1 10 100	3.13 1.74 0.80	5.99 50.47 78.10

V. CONCLUSIONES.

1. Se estableció una metodología fácil y eficiente para la preparación de compuestos de coordinación de diorganoestaño derivados de α -aminoácidos en un solo paso, sin necesidad de aislar las bases de Schiff.
2. Todos los compuestos se caracterizaron por medio de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{119}Sn , espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas.
3. Los desplazamientos de RMN de ^1H , ^{13}C e IR indican que los derivados de L-Histidina no experimentan ciclización como se ha descrito, la cual ocurre entre el grupo azometino de la base de Schiff y el anillo de imidazol del aminoácido.
4. Los desplazamientos químicos de RMN de ^{119}Sn sugieren la presencia de compuestos pentacoordinados en solución con la existencia de enlaces de coordinación $\text{N}\rightarrow\text{Sn}$ en todos los casos.
5. La espectrometría de masas demostró que todos los compuestos son de naturaleza monomérica observado los picos correspondientes a los iones moleculares con contribución isotópica.
6. El estudio preliminar de citotoxicidad muestra que todos los compuestos son marcadamente activos en relación al *cis*-platino. La introducción de un grupo de mayor electronegatividad en la posición cinco en los derivados de L-Histidina les confiere otorga mayor actividad. Mientras que en los derivados de L-Glutamina se observa el efecto contrario.

-
7. En el estudio de la actividad antiinflamatoria los derivados de L-Histidina, el átomo de cloro confiere mayor potencia a la molécula. En contraste, en los derivados de L-Glutamina se presenta el efecto contrario.

 8. El estudio de la actividad antioxidante mostró que los compuestos derivados de L-Glutamina son inactivos. Mientras que en los derivados de L-Histidina el átomo de cloro reduce la actividad antioxidante en dichos compuestos.

VI. PARTE EXPERIMENTAL.

Todos los reactivos utilizados son productos comerciales de Aldrich Chemical Company®, y los disolventes empleados fueron destilados previamente. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fischer-Johns MEL-TEMP II y no están corregidos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear(RMN) de ^1H , ^{13}C y ^{119}Sn se obtuvieron en un espectrómetro JEOL ECLIPSE de 300 MHz utilizando CDCl_3 ó $\text{DMSO}-d_6$ como disolventes empleando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS), los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Para los datos de RMN de ^1H las señales se indican como singulete (s), doblete (d), triplete (t) doble de dobles (dd), doble de dobles de dobles (ddd), triple de dobles (td) y multiplete (m).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato JEOL-JMS-X103 doble sector de geometría inversa usando la técnica de bombardeo de átomos acelerados (FAB^+) utilizando como matriz alcohol *p*-nitrobencílico y los valores entre paréntesis indican la intensidad relativa al 100% del pico base donde los datos están expresados en unidades de masa-carga $[\text{m}/\text{z}]^+$.

Los espectros de IR se determinaron en un aparato BRUCKER TENSOR 27 empleando la técnica de pastilla (KBr) y las absorciones están expresadas en cm^{-1} .

Las determinaciones de polarimetría se efectuaron en un aparato PERKIN ELMER 343 usando cloroformo como disolvente.

A. Procedimiento general para la obtención de los complejos.

El correspondiente compuesto carbonílico, el respectivo L-aminoácido y óxido de di-*n*-butilestaño, se hicieron reaccionar *in situ* en cantidades equimolares durante 96 horas a temperatura ambiente utilizando metanol anhidro como disolvente, una vez concluida la reacción se procedió a filtrar la solución, posteriormente el disolvente se eliminó por destilación en un rotavapor para finalmente obtener un residuo sólido.

(5S)-2,2-Di-*n*-butil-6-aza-1,3-dioxa-6-en-5-(propilcarbamoil)-2-estannabenzociclononen-4-ona (**4a**).

El compuesto **4a** se preparó al hacer reaccionar de 0.1g de L-Glutamina (6.8 mmol), 0.07ml de salicilaldehído (6.8 mmol) y 0.17g de óxido de di-*n*-butilestaño (6.8 mmol), se obtuvieron 0.3297g (88.8%) de un sólido amarillo claro con punto de fusión de 194-197°C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃)δ: 0.81(3H, t, J=7.14Hz, H-δ), 0.91(3H, t, J=7.14Hz, H-δ), 1.22-1.75(12H, m, H-α, H-β, H-γ), 2.03-2.23(1H, m, H-15), 2.42(1H, ddd, J=5.49 Hz, J=5.65 Hz, J=15.12 Hz, H-14), 2.74(1H, ddd, J=6.06 Hz, J=12.36 Hz, J=12.36 Hz, H-14), 4.12(1H, dd, J=5.49Hz, 9.87 Hz, H-5), 5.55(1H, s, H-17), 6.52(1H, s, H-17), 6.70(1H, d, J=1.11 Hz, H-10), 6.75(1H, t, J=8.52 Hz, H-12), 7.19(1H, dd, J=1.95 Hz, J=7.98 Hz, H-13), 7.41(1H, td, J=1.92 Hz, J=7.83 Hz, J=9.84 Hz, H-11), 8.48(1H, s, H-7); ¹³C RMN (75.5 MHz, CDCl₃)δ: 174.4(C-16), 174.0 (C-4), 173.6(C-7), 169.4(C-9), 138.1(C-11), 135.9(C-13), 122.6(C-10), 117.4(C-12), 117.4(C-8), 66.8(C-5), 33.1(C-15), 31.6(C-14), 27.0, 26.9(C_β), 26.7, 26.6(C_γ), 22.5, 22.0(C_α), 13.7, 13.6(C_δ); ¹¹⁹Sn RMN (112.8 MHz, CDCl₃)δ: -197.4; ¹¹⁹Sn RMN(112.8 MHz, DMSO-*D*₆)δ: -230.4; IR (KBr)cm⁻¹: 3359.5, 3186.0 (N-H_{Amida}), 1330.6 ν_s(COO), 1686.1 ν_{as}(COO⁻), 1618.9 (C=N), 541.7 (Sn-O), 458.4 (Sn-C), 423.7 (Sn-N). EM: (FAB⁺) [*m/z*] (%): [M⁺(¹²⁰Sn)-1, 482] (100), [M⁺(¹²⁰Sn)-*n*-Bu, 425] (36), [M⁺(¹¹⁹Sn)-*n*-Bu, 367] (25), [M⁺(¹²⁰Sn)-CO₂, 325] (15), [M⁺(¹²⁰Sn)-C₄H₆NO₂] (15), [132] (10), [91] (7). [α]_D²⁰ = -60.0 (c=0.0002, CHCl₃).

(5S)-2,2-Di-*n*-butil-6-aza-12-cloro-1,3-dioxa-6-en-5-(propilcarbamoil)-2-estannabenzociclononen-4-ona (**4b**).

Para la obtención del compuesto **4b** se utilizaron 0.1g de L-Glutamina (6.8 mmol), 0.1071g de 5-clorosalicilaldehído (6.8 mmol) y 0.17g de óxido de di-*n*-butilestaño (6.8 mmol) obteniendo 0.3530g (96.0%) de un sólido amarillo-limón pálido con punto de fusión de 185-187°C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃)δ: 0.81(3H, t, J=7.14Hz, H-δ), 0.91(3H, t, J=7.14Hz, H-δ), 1.22-1.74(12H, m, H-α, H-β, H-γ), 2.13(1H, ddd, J=7.95 Hz, J=12.39 Hz, J=21.09 Hz, H-15), 2.42(1H, ddd, J=5.49 Hz, J=5.76 Hz, J=15.39 Hz, H-14), 2.73(1H, ddd, J=6.60 Hz, J=10.59 Hz, J=11.34 Hz, H-14), 4.15(1H, dd, J=5.79Hz, J=9.09 Hz, H-5), 5.66(1H, s, H-17), 6.49(1H, s, H-17), 6.72(1H, d, J=9.06 Hz, H-10), 7.19(1H, d, J=2.76 Hz, H-13), 7.33(1H, dd, J=2.76 Hz, J=9.09 Hz, H-11), 8.48(1H, s, H-7); ¹³C RMN (75.5 MHz, CDCl₃)δ: 174.3(C-16), 173.5(C-4), 172.8(C-7), 167.9(C-9), 137.8(C-11), 133.8(C-13), 124.4(C-12), 121.1(C-10), 117.8(C-8), 66.9(C-5), 32.9(C-15), 31.5(C-14), 27.1, 26.9(C_β), 26.8, 26.7(C_γ), 22.6, 22.1(C_α), 13.6, 13.5(C_δ); ¹¹⁹Sn (112.8 MHz, CDCl₃)δ: -196.9; ¹¹⁹Sn (112.8 MHz, DMSO-*D*₆)δ: -241.1; IR (KBr)cm⁻¹: 3362.7, 3195.5(N-H_{Amida}), 1329.8 ν_s(COO), 1687.6 ν_{as}(COO⁻), 1622(C=N), 548.6(Sn-O), 458.5(Sn-C), 430.2(Sn-N). EM: (FAB⁺) [*m/z*] (%): [M⁺(¹²⁰Sn)-1, 516] (100), [M⁺(¹²⁰Sn)-*n*-Bu, 459] (40), [M⁺(¹¹⁹Sn)-*n*-Bu, 401] (18), [M⁺(¹²⁰Sn)-CO₂, 358] (10), [M⁺(¹²⁰Sn)-C₄H₆NO₂] (7). [α]_D²⁰ = -155.0 (c= 0.0002, CHCl₃).

(5S)-2,2-Di-*n*-butil-6-aza-6-en-5-(imidazol-2-il)-2-estannabenzociclononen-4-ona (**4c**).

El compuesto **4c** se hicieron reaccionar 0.1240g (7.68 mmol) de L-histidina, 0.1ml (7.68 mmol) de salicilaldehído y 0.1983g (7.68 mmol) de óxido de di-*n*-butilestaño obteniendo 0.4578g (75.4%) de un sólido amarillo ámbar claro con punto de fusión de 91-94°C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃)δ: 0.66(3H, t, J=7.41 Hz, H-δ), 0.78(3H, t, J=7.41Hz, H-δ), 1.08-1.66(12H, m, H-α, H-β, H-γ), 2.81(1H, dd, J=9.33Hz, J=14.59 Hz, H-14), 3.26(1H, dd, J=3.57Hz, J=14.82Hz, H-14), 4.27(1H, dd, J=3.3Hz, J=9.06Hz, H-5), 6.52(1H, t, J=7.41Hz, H-12), 6.59(1H, s, H-19), 6.61(1H, d, J=8.79Hz, H-13), 6.81(1H, d, J=7.41 Hz, H-10), 7.23(1H, t, J=6.87 Hz, H-11), 7.48(1H, s, H-17), 7.59(1H, s, H-7);

^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 174.8(C-4), 173.4(C-7), 168.8(C-9), 137.7(C-11), 136.2(C-17), 135.7(C-13), 122.2(C-10), 117.4(C-12), 117.1(C-19), 117.1(C-8), 67.8(C-5), 33.6(C-14), 27.0, 26.8(C_β), 26.6, 26.5(C_γ), 22.0, 21.7(C_α), 13.5, 13.4(C_δ); ^{119}Sn (112.8 MHz, CDCl_3) δ : -198.1; ^{119}Sn (112.8 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ : -231.5; IR (KBr) cm^{-1} : 2957.8(N-H_{Arom}), 1650.2 $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$, 1343.5 $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$, 1614.7(C=N), 548.7(Sn-O), 450.1(Sn-C); EM: (FAB⁺) [m/z] (%): [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-1$, 491] (85), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-n\text{-Bu}$, 434] (22), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-n\text{-Bu}$, 377] (17), [$\text{M}^+(\text{}^{119}\text{Sn})-\text{CO}_2$, 333] (18), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_2\text{O}$, 225] (12).

(5S)-2,2-Di-*n*-butil-6-aza-12-cloro-6-1,3-dioxa-6-en-5-(imidazol-2-il)-2-estannabenzociclononen-4-ona (**4d**).

Para la preparación del compuesto **4d** se utilizaron 0.1240g (7.68 mmol) de L-histidina, 0.1254g (7.68 mmol) de 5-clorosalicilaldehído y 0.1983g (7.68 mmol) de óxido de di-*n*-butilestaño obteniéndose 0.4578g (95.3%) de un sólido amarillo ámbar claro con punto de fusión de 121-125°C. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.66(3H, t, $J=7.14\text{Hz}$, H- δ), 0.78(3H, t, $J=7.41\text{Hz}$, H- δ), 1.08-1.66(12H, m, H- α , H- β , H- γ), 2.86(1H, dd, $J=9.06\text{Hz}$, $J=14.01\text{Hz}$, H-14), 3.27(1H, s, H-18), 3.40(1H, d, $J=12.36\text{Hz}$, H-14), 4.32(1H, dd, $J=2.73\text{Hz}$, $J=7.95\text{Hz}$, H-5), 6.56(1H, d, $J=9.06\text{Hz}$, H-10), 6.65(1H, s, H-19), 6.79(1H, d, $J=2.46\text{Hz}$, H-13), 7.13(1H, dd, $J=2.49\text{Hz}$, H-11), 7.57(1H, s, H-17), 7.57(1H, s, H-7); ^{13}C RMN (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 174.2 (C-4), 172.1(C-7), 167.5(C-9), 137.3(C-11), 136.2(C-17), 133.5(C-13), 124.1(C-10), 121.1(C-12), 117.5(C-8), 117.5(C-19), 68.1(C-5), 33.7(C-14), 27.0, 26.9(C_β), 26.6, 26.5(C_γ), 22.4, 22.0(C_α), 13.6, 13.5(C_δ); ^{119}Sn (112.8 MHz, CDCl_3) δ : -200.56; ^{119}Sn (112.8 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ : -233.7; IR (KBr) cm^{-1} : 2957.9(N-H_{Arom}), 1659.6 $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$, 1339.5 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, 1629.7(C=N), 547.8(Sn-O), 454.7(Sn-C); EM: (FAB⁺) [m/z] (%): [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-1$, 525] (85), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-n\text{-Bu}$, 468] (46), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-n\text{-Bu}$, 411] (33), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-\text{CO}_2$, 367] (54), [$\text{M}^+(\text{}^{120}\text{Sn})-\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$, 258] (22).

B. Procedimiento de ensayo de citotoxicidad.

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos de citotoxicidad son las siguientes:

- K562: Leucemia mielógena crónica.
- HCT-15: Adenocarcinoma de colon.
- PC-3: Adenocarcinoma de próstata.
- U251: Sistema nervioso central.
- MCF-7: Adenocarcinoma de glándula mamaria.
- SKLU-1: Adenocarcinoma de pulmón.

Todas las líneas celulares pertenecen al panel del NCI (National Cancer Institute, USA), las cuales se adaptaron al medio de cultivo RPM1-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute) adicionado con suero fetal bovino al 5%, una mezcla de antibióticos al 10% y 2mM de glutamina. Con excepción de la línea celular K562, las restantes se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1 ml de tripsina-EDTA al 0.05%. Una vez que se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo, se les adicionó 5-10 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos de centrifuga y se sometieron a dicho proceso durante 3 minutos, una vez formado el paquete celular se le adicionó medio de cultivo para la resuspensión del mismo, a partir de éste se tomaron 0.05 ml de inóculo y se adicionaron 0.45 ml de azul de tripano, un colorante orgánico que permite distinguir las células viables y las no viables. El recuento de células viables se llevó a cabo en una cámara de Neubauer, tomando una alícuota de 10 μ L de la suspensión celular y con la ayuda de un microscopio se contaron las células viables, localizadas en los cuatro cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos. El número de células por mililitro de suspensión se obtuvieron por medio de la siguiente ecuación:

$$C = (RC)(10^{-4})$$

Donde:

C= Número de células por mililitro de suspensión.

RC= Promedio de células obtenidas de la cuenta de los cuatro cuadrantes de la cámara.

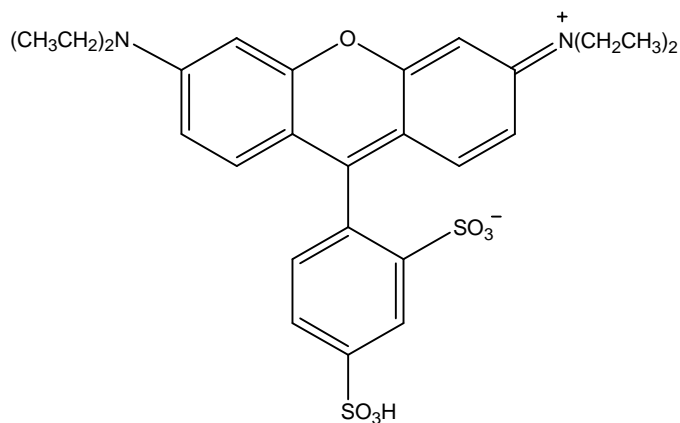
Una vez determinado el número de células por mililitro se realizaron los ajustes necesarios para depositar un inóculo de 100 μL /pozo a la densidad indicada. Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron microplacas de plástico de 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se incubó por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa para permitir que las células alcanzaran la fase exponencial de crecimiento antes de adicionar los compuestos. Para realizar un cernimiento primario de los compuestos se utilizó la concentración más alta permitida de 100 μM disolviendo todas las muestras en metanol añadiendo 100 μL para un volumen final de 200 μL e incubando la microplaca bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad.

LÍNEA CELULAR	PROCEDENCIA	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (H)	CÉLULAS / POZO
K-562	LMC*	19.0	5 000
HCT-15	Colon	18.1	10 000
PC-3	Próstata	28.7	7 500
U-251	SNC	25.4	7 500
MCF-7	Mama	25.6	5 000
SKLU-1	Pulmón	24.5	10 000

Tabla 6.1. Tiempo de duplicación de las líneas celulares utilizadas. * Leucemia mielógena crónica

Al finalizar el período de incubación de las células con los respectivos compuestos, se procedió a la fijación de las mismas *in situ* añadiendo 50 μL ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% para las células adheridas o al 80% para células en suspensión y se incubaron a 4°C durante una hora. Posteriormente se procedió a desechar el sobrenadante lavando las placas cinco veces desionizada y dejando secar las mismas a la intemperie. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se realizó con 100 μL de una solución al 0.4% de sulforodamina B (SRB) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente; la SRB no unida se removió con tres lavados con ácido acético al 1% y la placa se dejó secar al ambiente.

La sulfurodamina B es un colorante aniónico que reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas formando un complejo que se solubiliza en soluciones básicas débiles.



Sulfurodamina B

Una vez realizada la tinción, a las placas se les agregó 100 de un buffer de tris y se agitaron durante 10 minutos para favorecer la solubilización del complejo, a continuación se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesan obteniéndose el promedio de la DO de los tres pozos por línea tratados con el compuesto (DOt) y dos pozos control, que corresponden a aquellos que no contienen células, es decir, sólo el compuesto (DOb). Adicionalmente se manejan tres pozos tratados con metanol (DOc), que corresponden a aquellos que no contienen células pero sí el compuesto (DOb). El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - (DOt - DOb / DOc - DOb) * 100$$

C. Ensayo de actividad antiinflamatoria; edema inducido con TPA.

Se pesaron ratones macho cepa taconi y posteriormente fueron separados en grupos de cuatro ratones, donde uno de los grupos se tomó como grupo control y los tres restantes como grupos tratados. Una vez marcados y separados los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico con una dosis de 30 mg/Kg, la cual fue administrada por vía intraperitoneal.

A cada uno de los grupos se les administraron tópicamente 10 µL de una solución etanólica de TPA distribuidos en ambas caras de la oreja derecha y 10 µL de etanol en la oreja izquierda del mismo modo. Los compuestos se disolvieron en metanol un intervalo de concentración entre 0.1-3.1 µM y se aplicaron 20 µL de la solución en forma tópica distribuidos en ambas caras de la oreja derecha, mientras que en la oreja izquierda sólo se aplicó metanol. Después, se administraron las dosis correspondientes a los grupos tratados, mientras que al grupo control sólo se le administró metanol. Después de la post-administración de 4 horas, se procedió a sacrificar a los animales por dislocación cervical y se tomó una biopsia de ambas orejas con un sacabocados de 7 mm, dicho procedimiento se llevó a cabo tanto para los grupos tratados como para el grupo control, cada biopsia se colocó en tubos Eppendorf pesados previamente y se obtuvo por diferencia de pesos el grado de edema. El % de inhibición del edema se determinó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(X_{\text{tratado}}/X_{\text{control}})100]$$

La Indometacina se utilizó como estándar a las concentraciones de 0.10, 0.31 y 1.00 µmol/oreja. Los resultados de la actividad antiinflamatoria se representaron como el porcentaje de inhibición promedio ± desviación estándar de la media. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnet y los valores de *P≤0.05 se consideraron como diferencia significativa frente al control. Finalmente, la IC₅₀ se calculó al graficar el Log de la concentración contra el % de inhibición del edema aplicando una regresión lineal para obtener el valor de IC₅₀ expresando el resultado en µmol/oreja.

D. Inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS).

Primera parte: Homogenado de cerebro y cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Se anestesió una rata cepa Wistar con éter y se sacrificó por dislocación cervical, después se extrajo el cerebro completo y se colocó en una solución de PBS fría, posteriormente se lavó con agua destilada para quitar los restos de sangre, se pesó y se agregaron 10 ml de solución de PBS por cada gramo de cerebro (10ml/g). El cerebro se homogeneizó el tejido durante 60 segundos e inmediatamente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos recuperando el sobrenadante.

A continuación se tomaron por duplicado 5 μ L del sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pozos agregando 20 μ L de agua desionizada, hecho esto se agregaron 150 μ L de una solución de CuSO_4 , tartrato sódico y carbonato de sodio para incubar por 10 minutos a temperatura ambiente seguida de la adición de 25 μ L del reactivo de Folín disuelto en agua e incubando la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 540 nm y se sustituyeron los valores obtenidos en la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = A_{540nm} / [(A_{540nm} - 0.05012) / 0.028] \times 40$$

Finalmente, se ajusta la concentración de proteína del sobrenadante a la concentración de 2.666 mg/ml con solución de PBS aplicando la fórmula:

$$V_2 = C_1 V_1 / C_2$$

En donde:

C_1 = Concentración de proteína en el homogenado crudo.

V_1 = Volumen del homogenado crudo.

C_2 = Concentración deseada.

V_2 = Volumen al que se debe llevar el homogenado para obtenerla concentración deseada (C_2).

Segunda Parte: Inducción de estrés oxidativo con AAPH 20 mM.

Se colocaron por duplicado 375µL del sobrenadante (2.666 mg/ml) en tubos Eppendorf de 1.5 ml agregando a todos los tubos 50 µL de EDTA 100 µM (concentración final de 10 µM) para la posterior adición del compuesto de prueba e incubando 30 minutos a 37°C. Una vez terminado dicho período se agregaron 50 µL de AAPH 200 µM (concentración final de 20 µM) y a continuación se incubaron las muestras durante 3 horas a 37°C con agitación.

Posteriormente, se adicionan 500 µL de reactivo de TBA y se incubaron en baño de agua ebullición durante 30 minutos, para después centrifugar 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a enfriar en baño de hielo y se depositaron por duplicado 200 µL de cada tubo en una placa de 96 pozos, para medir la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas EL808 BIO-TEK™ e interpolando los resultados en una curva patrón para obtener la concentración de TBARS en solución, utilizando la siguiente ecuación.

$$TBARS(\mu M) = \frac{A_{540nm} + 0.00877}{0.07558}$$

El *screening* primario, se realizó a las concentraciones de 1µL, 10 µL y 100 µL para todos los compuestos y se utilizó la quercetina como referencia.

VII. REFERENCIAS.

1. Huheey, E. J.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. Química inorgánica, Principios de estructura y reactividad. Cuarta edición. Oxford University Press. México. 2005.pp. 508-532.
2. Pettinari, C. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1435-1436.
3. Rudel, H. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, 56, 180-189.
4. Shen, Y. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1452-1461.
5. Kanti, Roy U.; Roy, S. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1525-1530.
6. Pellerito, L.; Nagy, Lázló. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 224, 111-150.
7. Nath, M.; Pokharia, S.; Eng, G.; Song, X.; Kumar, A. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 669, 109-123.
8. Tabassum, S.; Pettinari, C. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1761-1766.
9. Pellerito, C.; Nagy, Lázló.; Pellerito, L.; Szorcscick, A. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1733-1747.
10. Guo, Z.; Sadler, P. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1512-1531.
11. Cohen, S. M. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, 11, 115-120.
12. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature.* **1965**, 205, 698-699.
13. Ledwohl, D.; Canetta, R. *Eur. J. Cancer.* **1998**, 10, 1522-1534.
14. Ronconi, L.; Sadler, P. *J. Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 1633-1648.
15. Omae, I. Applications of Organometallics compounds. Ed. John Wiley & Sons. Chinchester, United Kingdom. Chapter 10. 199-211.
16. Ionel, H.; Silvestru, C. Organometallics in cancer chemotherapy. Vol I. Main Group Metal Compounds. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida. United States. 2000. Chapter 5. 129-165.
17. Gielen, M. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 481-494.
18. Gielen, M. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 151, 41-51.
19. Gielen, M.; Acheddad, M.; Tiekink, E.R.T. *Main Group Met. Chem.* **1993**, 16, 367.
20. Xanthopoulou, M.N.; Hadjikakou, S.K.; Hadjiliadis, N.; Jurkschat, K.; Michaelides, A.; Skoulika, S.; Bakas, T.; Binolis, J.; Karkabounas, S.; Charalabopoulos. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 96, 425-434.

-
21. E. Gómez.; Contreras-Ordóñez, G.; Ramírez-Apan, Teresa. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 54-57.
 22. MacDonald, L.G.; Brown, D.H.; Morris, J.H.; Smith, W.E. *Inorg. Chim. Acta.* **1982**, 67, 7-12.
 23. Casella, L.; Gulloti, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6338-6347.
 24. Nath, M.; Yadav, R.; Gielen, M.; Dalil, H.; Eng, G. *Appl. Organomet. Chem.* **1997**, 11, 727-736.
 25. Yin, H.D.; Wang, Q.; Xue, S. *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 2480-2485.
 26. Tian, L.; Qian, B.; Sun, Y.; Zheng, X.; Yang, M.; Li, H.; Liu, X. *Appl Organomet. Chem.* **2006**, 20, 74-80.
 27. Saxena, A.K.; Huber, F. *Coord. Chem. Rev.* **1989**, 12, 349.
 28. Bonire, J. J.; Fricker, S. P. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 83, 217-221.
 29. Teruel, J. A.; Ortiz, F.; Aranda, F. J. *Appl. Organomet. Chem.* **2004**, 18, 111-116.
 30. Billingsley, M. L.; Yun, J.; Reese, B.E.; Davidson, C.E.; Buck-Koehntop, B. A.; Veglia. *J. Cell. Biochem.* **2006**, 98, 243-250.
 31. Li, Q.; Yang, P.; Wang, H.; Guo, M. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, 64, 181-195.
 32. Goodman, A.; Gilman. A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill interamericana. Novena edición. México. 1996. Capítulo 26. 643-657.
 33. Avendaño, López, C. Introducción a la química farmacéutica. Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 2002. Capítulo 11. 313-318, 575-595.
 34. Lenhinger, A.; Nelson, D.; Cox, Michael. M. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. España. Capítulo 17. 656-658.
 35. Stanley, P.L.; Steiner, S.; Havens, M.; Tramposch, K.M. *Skin Pharmacol.* **1991**, 4, 262-271.
 36. Xanthopolou, M.N.; Hadjikakou, S.K.; Hadjiliadis, N.; Kubicki, M.; Karkabounas, S.; Charalabopoulos, K.; Kourkoumelis, N.; Bakas, T. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 691, 1780-1789.
 37. Amjad, A.; Flora, S.J.S; Saxena, G.; Kolehmainen, E.; Mahieu, B.; Rao, C.P. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 206-213.
 38. Pokorný, J. *Eur. J. Sci. Technol.* **2007**, 109, 629-642.

-
39. Fernández, J.; Pérez-Álvarez, J.A.; Fernández-López, J.A. *Fd. Chem.* **1997**, 3, 345-353.
40. Blunden, S.; Wallace, T. *Fd. Chem. Toxicol.* **2003**, 41, 1651-1662.
41. Elliot, B. M.; Aldridge, N.; Bridges, J. W. *Biochem. J.* **1979**, 177, 461-470.
42. Lyons, S.D.; Sant, M.E.; Christopherson, R.I. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 11377-11381.
43. Girasolo, M.; Pizzino, T.; Mansueto, C.; Valle, G.; Stocco, G.C. *Appl. Organomet. Chem.* **2000**, 14, 197-211.
44. Holecek, J.; Nádvorník, M.; Handlir, Lycka, A. *J. Organomet. Chem.* **1986**, 315, 299-308.
45. Tian, L.; Qian, B.; Sun, Y.; Zheng, X.; Yang, M.; Li, H.; Liu, X. *Appl Organomet. Chem.* **2006**, 20, 74-80.
46. García-Raso, A.; Fiol, J.J.; López-Zafra, A.; Mata, I.; Espinosa, E.; Molins, E. *Polyedron.* **2000**, 19, 673-680.
47. Frey, M.H.; Opella, S.J. *J. Magn. Reson.* **1986**, 66, 144-147.
48. Munowitz, M.; Bachovchin, W.W.; Herzfeld, J.; Dobson, C.M.; Griffin, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1192-1196.
49. Nath, M.; Yadav, R.; Eng, G.; Musingarimi, P. *Appl. Organomet. Chem.* **1999**, 13, 29-37.