



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO DE METAOCEÑO SELENOAMIDAS
CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

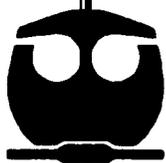
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

P R E S E N T A :

AGUEDA JIMÉNZ GARCÉS



CDMX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

H. Jurado

Presidente Ana Adela Sánchez Mendoza
Vocal Jacinto Eduardo Mendoza Pérez
Secretario José Guadalupe López Cortés
1° Suplente María del Carmen Virginia Ortega Alfaro
2° Suplente Martha Verónica Escárcega Bobadilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE QUÍMICA INORGÁNICA 4 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ GUADALUPE LÓPEZ CORTÉS

ASESOR TÉCNICO

M. en C. JOSÉ ANTONIO RAMÍREZ GÓMEZ

SUSTENTANTE:

AGUEDA JIMÉNEZ GARCÉS

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Química

Al Instituto de Química UNAM

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN204817 y CONACYT 285722

A los técnicos de pruebas bilógicas, IR, EM, RMN, y rayos X

Abreviaturas y símbolos

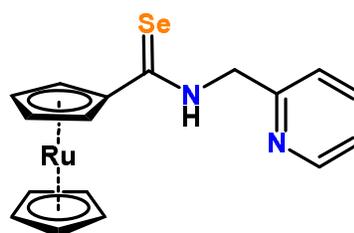
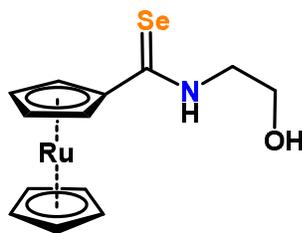
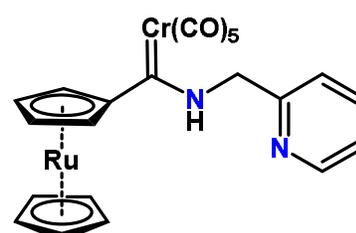
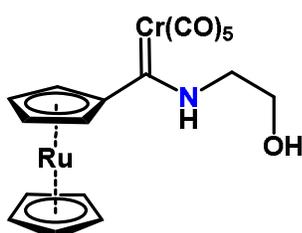
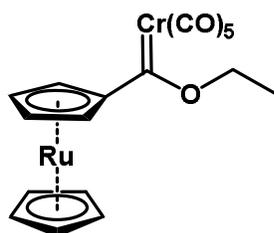
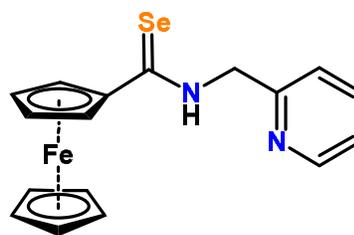
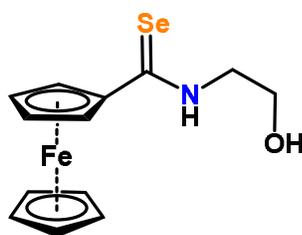
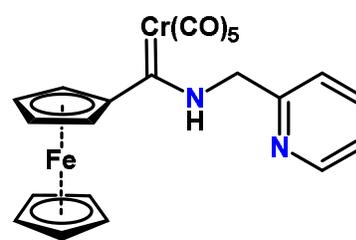
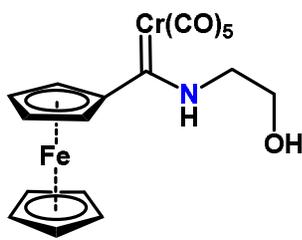
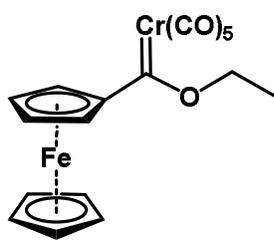
AcOEt	Acetato de etilo
Å	Angström (unidad de medida)
A	Amperio
atm	Atmósfera
°C	Grados Celsius
Cp	Ciclopentadienilo
cm	Centímetros
δ	Desplazamiento químico
d	Señal doble
DART	Análisis directo en tiempo real
dd	Señal doble de dobles
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometría de masas
Eq	Equivalente
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
FAB ⁺	Bombardeo por átomos rápidos
Fc	Ferroceno
h	Horas
GPx	Glutación Peroxidasa
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
m/z	Relación masa/carga
mg/cm ³	Densidad
mg	Miligramo

min	Minutos
mL	Mililitro
No	Número
NCI	National Cancer Institute USA
ORTEP	Programa de trazado de elipsoide térmico Oak Ridge
ppm	Partes por millón
q	Señal Cuádruple
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
Rc	Rutenoceno
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
s	Señal simple
sust.	Sustituido
SODs	Superóxido dismutasa
t	Señal triple
TA	Temperatura ambiente
<i>t</i> -BuLi	<i>ter</i> -butil litio
THF	Tetrahidrofurano
v	Frecuencia de vibración
V	Volts
μ	Coefficiente de absorción
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata
HeLa	Línea celular de cáncer cervical
U251	Línea celular de cáncer Glía del sistema nervioso central
K562	Línea celular de cáncer de leucemia
HCT-15	Línea celular de cáncer de colon
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
SKLU	Línea celular de cáncer de pulmón

ÍNDICE TEMÁTICO

Índice de compuestos	1
Introducción	2
Antecedentes	4
Rc y Fc	4
Cáncer y Se	11
Selenio	11
Selenoamidas	15
Objetivos	17
Resultados y Discusión	18
Síntesis Etoxicarbeno	19
Síntesis Aminocarbeno	24
Síntesis de Selonoamidas	26
Pruebas Biológicas	39
Metodología Experimental	45
Análisis Espectroquímico	47
Conclusiones	50

Índice de compuestos



INTRODUCCIÓN

Química, ciencia que se divide en diversas disciplinas, de entre las cuales podemos encontrar la química de compuestos organometálicos (Química organometálica) definidos como aquellos que poseen un enlace directo entre un átomo de carbono y un metal o metaloide. Esta área se conecta de forma directa con la química medicinal surgiendo el termino bio-organometálica, que se conoce como el estudio de biomoléculas o moléculas biológicamente activas con al menos un átomo de carbono unido directamente a un metal o metaloide, descrito así por Gérard Jaouen en 1985. Desde entonces, se ha estudiado la incorporación de este tipo de enlace M-C en el diseño de nuevos fármacos con actividad anticancerígena, antimalárica, antifúngica y como intercaladores de DNA. En la actualidad, se han desarrollado fármacos que contienen al ferroceno e incluso algunos con rutenoceno con excelente actividad citotóxica.

Por otra parte, se han informado compuestos organoselenados, los cuales poseen al menos un átomo de carbono unido a un átomo de selenio teniendo diferentes propiedades farmacológicas, como por ejemplo propiedades antioxidantes, antibacteriales, antiparasitarias e incluso anticancerígenas. En 2012, nuestro grupo de investigación describió la síntesis de una nueva serie de ferrocenil selenoamidas que fueron preparadas a partir de diversos compuestos aminocarbena. En el trabajo resalta la presencia de enlaces dobles C=Se, de los cuales existen pocos reportes en la literatura y los existentes han mostrado una actividad biológica interesante.

En este trabajo se describen las generalidades sobre metalocenos teniendo como centro metálico Fe y Ru. Se ejemplifican algunos compuestos reportados en la literatura los cuales poseen alguno de estos fragmentos organometálicos en su estructura observando una actividad biológica importante.

Posteriormente, se discuten y ejemplifican algunas generalidades de Se y compuestos organoselenados, los cuales presenten una alta actividad biológica. Así mismo se muestran algunos métodos de síntesis para la obtención de selenoamidas. Por último, presentamos los resultados obtenidos de las pruebas biológicas CI_{50} que se realizaron a los compuestos organoselenados, comparando el efecto que se observa al cambiar el metaloceno, modificando la actividad o selectividad frente a las líneas celulares de cáncer humano.

Ferroceno y Rutenoceno.

En la década de los 50's fue descubierto simultáneamente por Kealy, Pauson y Miller el primer metalloceno. Los dos primeros realizaban la síntesis de fulvaleno mediante la oxidación del reactivo de Grignard del ciclopentadienilo con FeCl_3 , sin embargo, el resultado no fue el esperado obteniendo finalmente un compuesto con la fórmula mínima $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (Esquema 1).¹



Esquema 1. Propuesta de reacción para la obtención de Fc.

En 1952, se realizó la caracterización del compuesto obtenido por dos diferentes grupos de trabajo: Fischer propuso una estructura de doble cono, basándose en el análisis de densidad electrónica por espectroscopía de rayos X; por otro lado, Wilkinson y Woodward propusieron una estructura tipo sándwich basándose en espectroscopía IR. Es así como se determinó la estructura de este grupo de compuestos, conformado por dos anillos de ciclopentadienilo con un centro metálico. Debido al comportamiento de los anillos presentes, similar al benceno, es que se denominan metallocenos, con la fórmula $\text{M}(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2$ (Figura 1).

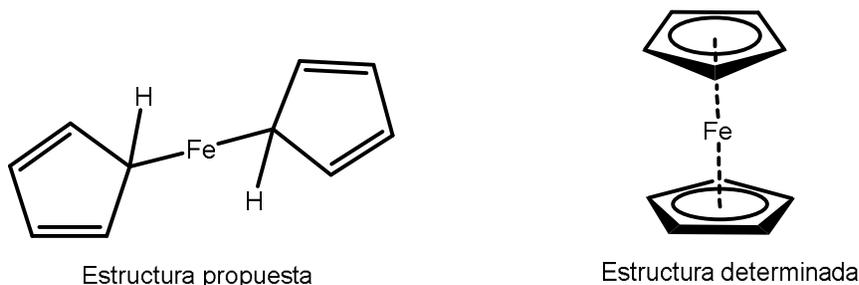


Figura 1. Estructura determinada del Fc.

¹ C. Elschenbroich, A. Salzer, *Organometallics*, Weinheim, New York, Basel. Cambridge, 2^o ed. pp 315.

El descubrimiento de este tipo de compuestos dió pie a diversos estudios y nuevas rutas sintéticas. Uno de los metallocenos más estudiados es el Fc, debido a las propiedades que tienen sus derivados, generalmente son compuestos no tóxicos, robustos, lipofílicos y con buenas propiedades redox,² esto ha logrado que el Fc sea un motivo estructural frecuente en compuestos con posible actividad dentro de la química medicinal.

En 1997, el grupo de investigación del Dr. Joauen realizó la síntesis de diversos compuestos denominados ferrocifenos: ferrocifenol e hidroxifenol. Estos compuestos combinan las propiedades anticancerígenas del Tamoxifen y las propiedades del Fc, aumentando la actividad de dicho compuesto sobre células de cáncer humano.³ Por otra parte, existen modificaciones, donde se intercambia el grupo hidroxilo por un grupo amino cambiando las propiedades; este compuesto mostró actividad bactericida⁴(Figura 2).

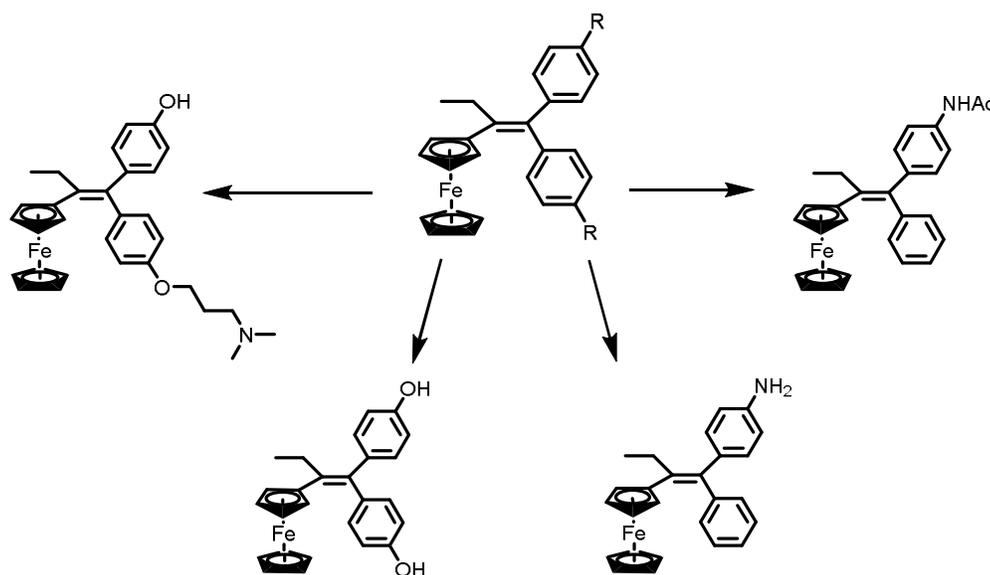


Figura 2. Derivados de ferrocifeno.

² D. R. Van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5931.

³ E. Meléndez. *Inorganica Chim, Acta* **2012**, *393*, 36.

⁴ M. El Arbi, O. Pigeon, S. Top, A. Rhouma, S. Aifa, A. Rebai, A. Vessières, M. Plamont, G Jaouen. *J. Organomet. Chem.* **2011** *696*, 1038.

Tomando este evento como punto de partida, los científicos iniciaron la búsqueda de nuevos fármacos o bien de realizar modificaciones en las estructuras de los ya existentes con el fin de potenciar o mejorar las propiedades farmacológicas de dichos compuestos. Es por esto que, siguiendo el camino del Dr. Jaouen, el Dr. Biot sintetizó diferentes moléculas que tuviesen en su estructura la ferroquina, un compuesto análogo a la cloroquina,⁵ observando una mejor actividad frente a las cepas resistentes a la malaria. Otro ejemplo claro de este tipo de compuestos es la ferrocenil-penicilina, la cual al tener ferroceno en su estructura, mejoran su actividad como antibiótico⁶ (Figura 3).

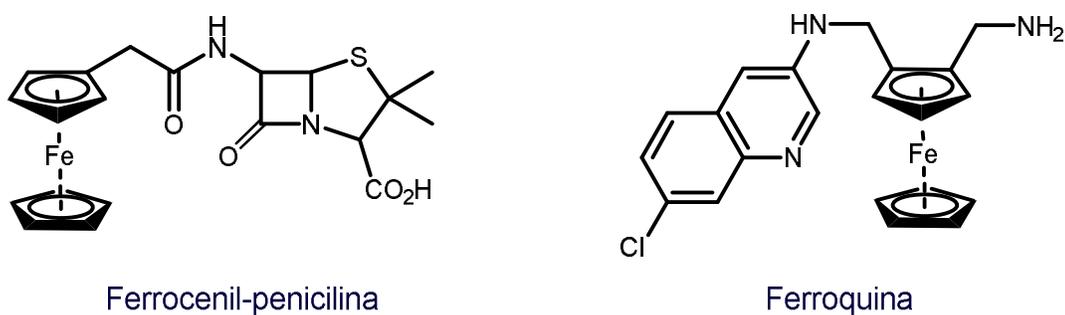


Figura 3. Fármacos modificados con Fc.

El Rc al igual que el Fc es otro metalloceno que en los últimos años ha sido estudiado y al cual se le atribuyen algunas propiedades biológicas importantes, e incluso se han realizado algunos estudios comparativos entre Fc y Rc, observando en múltiples ocasiones una mejor actividad citotóxica, bactericida y antiinflamatoria.

⁵ C. Biot, G. Glorian, L. A. Maciejewski, and J. S. Brocard, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715.

⁶ a) E.I. Edwards, R. Epton, G. Merr, *J. Organomet, Chem*, **1979**, *168*, 259. b) A.I. Francisco, Vargas, M. D. *Rev. Virtual Quim.* **2010**, *2*, 118.

Continuando con la incorporación de metallocenos en compuestos con actividad citotóxica se ha observado que el R_c al estar unido a β-dicetonas (Figura 4) muestra una mejor actividad citotóxica frente a células de cáncer humano como: HeLa (cuello uterino humano cáncer epitelioides), COR L23 (pulmón humano de carcinoma) y el CoLo 320DM resistente a platino (colon rectal humano) y líneas celulares de cáncer COR L23 / CPR comparado con fármacos comerciales.⁷

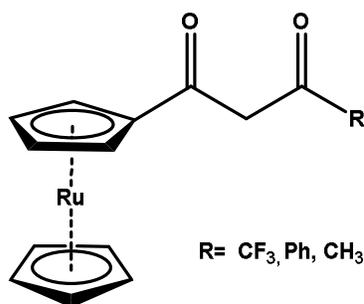


Figura 4. Rutenoceno unido a β-dicetona.

Siguiendo con el estudio de la influencia del F_c y R_c, en el 2016 se informó la modificación de compuestos ya utilizados como fármacos, tal es el caso de las β-lactamas (Figura 5), las cuales al incluir el fragmento organometálico en la estructura presentan una mejor actividad como antibiótico frente a cepas resistentes, siendo mejores aquellos que tienen rutenoceno.⁸

⁷ K. Christian Kemo, J. Margo, Nelli, Constance E.J. Resnburg, Jannie. C. Swarts. *Anticancer Research*. **2012** 32, 2915.

⁸ E. M. Lewandowski, Ł. Szczupak, S. Wong, J. Skiba, A. Guspiel, J. Solecka, V. Vrček, K. Kowalski, and Y. Chen, *Organometallics*, **2017**, 36 (9), 1673.

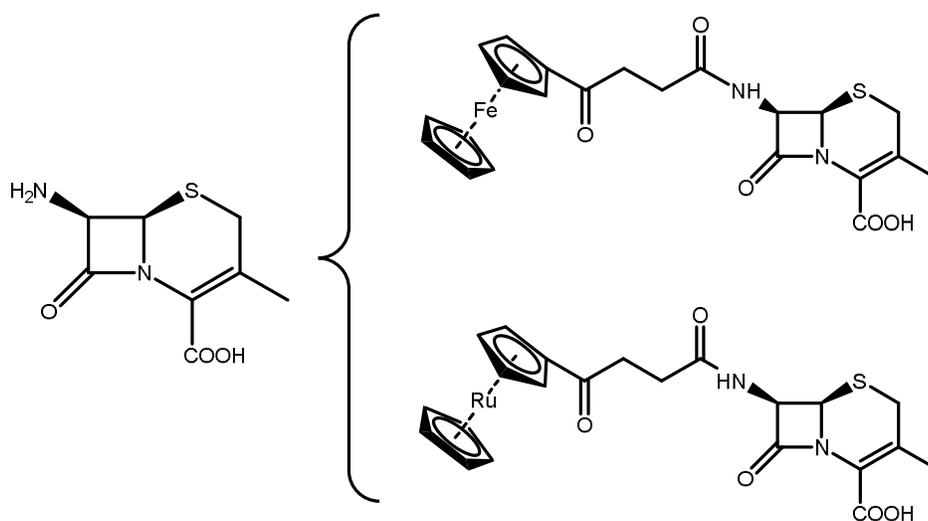


Figura 5. Metalocenos unidos a β -lactamas.

Por otra parte, el estudio de nuevos agentes antibacterianos se va encaminado prácticamente a la síntesis de compuestos puramente orgánicos, como la formación de péptidos antimicrobianos dirigidos a la membrana celular y que han presentado una actividad prometedora. Sin embargo, observamos que en algunos casos existen bacterias que han desarrollado resistencia hacia este tipo de compuestos. Tal es el caso de *Pseudomonas Auroginosa*, que es causante de diversas infecciones. Es por ello, que se busca la formación de compuestos antibacterianos teniendo un fragmento metálico, específicamente restos organometálicos como Fc y Rc.

En este contexto, diferentes grupos de investigación han llevado a cabo la modificación de péptidos simples antimicrobianos como el AMP buscando modificar las propiedades de los conjugados y por lo tanto la actividad y selectividad del agente antibacteriano.

En el caso del OM-AMP con Fc se observó una alteración del potencial redox del fragmento organometálico, lo cual conduciría a un antibiótico más activo. Sin embargo, al cambiar de Fc a Rc el OM-AMP resulto 8 veces más activo.

La actividad de estos péptidos-organometálicos se atribuye a las propiedades lipofílicas de Fc y Rc calculadas mediante el tiempo de retención de cada uno de éstos en cromatografía HPLC. Por otra parte, el Dr. Albada ha propuesto que la actividad mejorada del OM-AMP con Rc podría ser atribuida al tamaño de éste en comparación al Fc, además de la potencial capacidad del Ru para formar enlaces de H a través de la expansión de su número de coordinación, este hecho podría explicar que la membrana bacteriana se vea mayormente alterada cuando las bacterias fueron expuestas a Rc- AMP (Figura 6).⁹

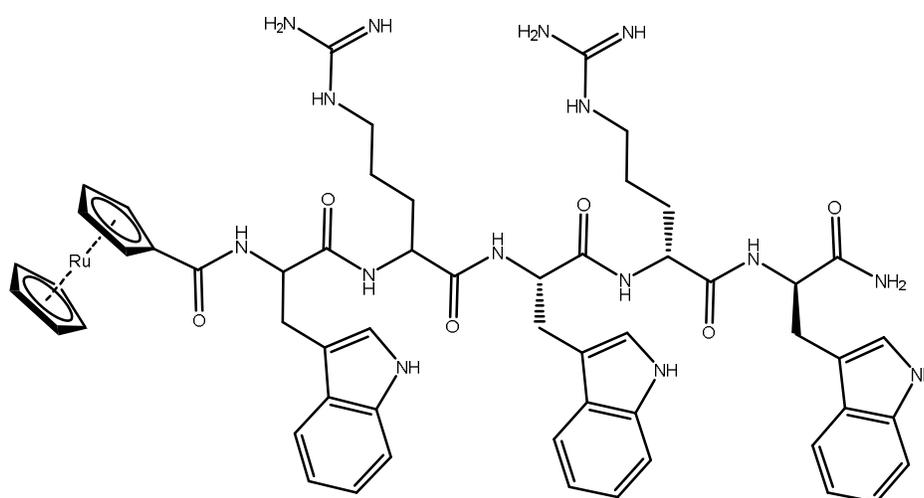


Figura 6. Péptido Rc-AMP

Como podemos ver, en los ejemplos anteriores observamos que se modifica la actividad de cada uno de los compuestos y también vemos la diferencia que presenta cada uno dependiendo del metalloceno que esté presente en la estructura. Esto demuestra que aunque pertenezcan a la misma familia las propiedades fisicoquímicas cambian significativamente.

⁹ a) B. Albada, N. Metzler-Nolte. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2510. b) H. Bauke Albada, P. Prochnow, S. Bobersky, J. E. Bandow, N. Metzler-Nolte, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4453.

En primer lugar, sus potenciales redox difieren $Fc = 0.307 \text{ V}$ y $Rc = 0.693 \text{ V}$ respectivamente. En presencia de grupos electroattractores el estado de oxidación se ve afectado y disminuye, teniendo un efecto contrario cuando hay sustituyentes electrodonadores. Además del potencial redox, el tamaño y las propiedades químicas también difieren, el volumen de la fracción Fc es significativamente más pequeño que el de Rc : $V_{Fc} = 767 \text{ \AA}^3$ y $V_{Rc} = 818 \text{ \AA}^3$.

Además de la longitud del enlace M-C y la distancia que existe entre los anillos Cp, modifican las propiedades químicas. Como se mencionó anteriormente el ion de rutenio (II) actúa como base de Lewis capaz de formar enlaces de hidrógeno, a diferencia del Fc .¹⁰

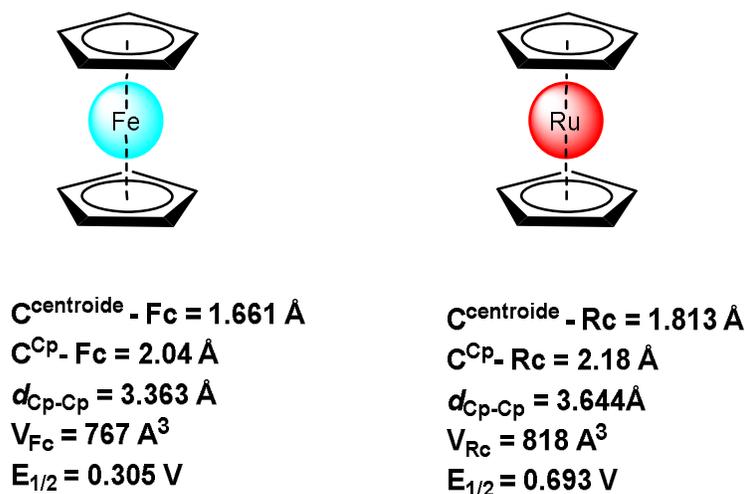


Figura 7. Comparación de distancias C-M y potenciales redox de metallocenos.

Por lo anterior en este trabajo, nos hemos dado a la tarea de sintetizar compuestos que tengan el grupo metalloceno en su estructura y poder observar si existen diferencias significativas dentro de las propiedades citotóxicas en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

¹⁰ B. Albada, N. Metzler-Nolte. *Am. Chem. Soc. Chem. Rev.* **2016**,116,19,11797.

Cáncer y Se

En la actualidad una de las mayores afectaciones para la salud es el cáncer debido a que es la principal causa de muerte a nivel mundial. Solo en 2015 se calculó que provocó 8.8 millones de defunciones, y se identifican 5 principales tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y de mama (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017).¹¹

Este padecimiento se debe a que las células del organismo generan las llamadas especies reactivas de oxígeno conocidas como ROS, resultantes de compuestos oxigenados. Las especies más comunes son los radicales superóxido O_2^- , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales hidroxilo, causando estos la degeneración de diferentes biomoléculas induciendo al estrés oxidativo.

Actualmente se sabe que existen diferentes enzimas las cuales actúan como antioxidantes tales como la selenoproteína P, selenoproteína W, superóxido dismutasa SODs, catalasa y Glutación Peroxidasa GPx; estas, ayudan a eliminar y a trapar directamente a las ROS,¹² teniendo actividad similar a la vitamina C y E las cuales también sirven como antioxidantes.

Generalidades Se

El Selenio es un metaloide que forma parte de la familia 16 en la tabla periódica, fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius. El nombre de este elemento proviene de *Selene*, diosa de la Luna.¹³

El selenio es un oligoelemento, es decir, un elemento esencial en la dieta de los mamíferos. En 1973 se descubrió la enzima glutatión peroxidasa (GPx) que contiene un residuo de selenocisteína¹⁴ considerado ahora el 21º aminoácido natural (Figura 8). Se observó que

¹¹ Organización Mundial de la Salud (OMS) 22/11/2018. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

¹² a) P.D. Whanger, *Cel. Mo. Life. Sci.* **2000**, 57, 1846. b) B.Moghaszadeh, A. H. Beggs, *Physiology*, **2006**, 21, 307.

¹³ T. Wirth (ed.), *Organoselenium Chemistry* 2012, Wiley-VCH Verlag & Co, KGaA, Weinheim, Germany.

¹⁴ a) G. Mugesh, *Curr. Chem. Biol.* **2013**, 7, 47. b) T. C. Stadtman. *Annu. Rev. Biochemistry.* **1996**, 65, 83.

gracias a las propiedades redox del Se en la enzima, ésta posee propiedades catalíticas, de tal manera que puede proteger a las células de daño oxidativo.

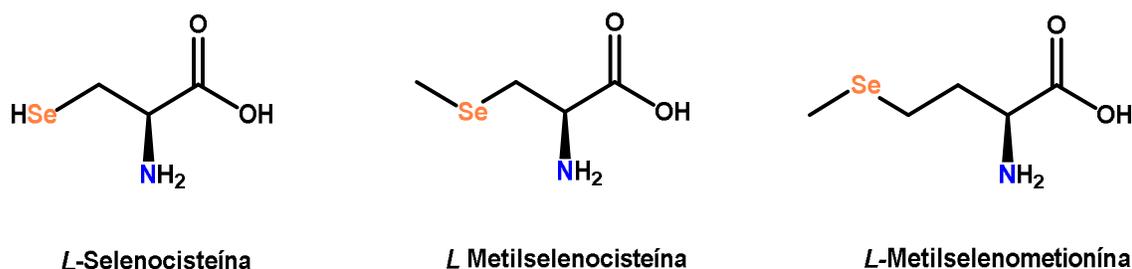


Figura 8. Selenoaminoácidos.

Con el descubrimiento de la importancia del selenio en los seres vivos, diferentes grupos de investigación se dieron a la tarea de estudiar más sobre este elemento y sus propiedades biológicas, lo que dio pie a la síntesis de diferentes compuestos con al menos un átomo de Se en la estructura y observar si son capaces o no de llevar a cabo funciones parecidas a las selenoenzimas ya conocidas.

En la literatura se describe una variedad de compuestos organoselenados, los cuales tienen una posible actividad en el campo de la química medicinal. Una de las moléculas hasta ahora sobresaliente es el Ebselena (Figura 9), el cual en su estructura posee un heterociclo de cinco miembros con un átomo de selenio, al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias,¹⁵ este compuesto tiene como acción el mimetizar la actividad de la enzima GPx, este compuesto es un buen inhibidor de diferentes enzimas

¹⁵ S. Kumar, J. Yan, J. Poon, V. P. Singh, X. Lu, M. K. Ott, L. Engman, S Kumar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3729.

encargadas de la transferencia de electrones en la respiración celular, como el citocromo P-450 y lipoxigenasas LOX entre algunas otras.¹⁶

Otro compuesto que ha dado buenos resultados como anticancerígeno teniendo una alta selectividad y baja toxicidad es el Etaseleno (Figura 9), este compuesto tiene una alta actividad contra diferentes células de cáncer humano como HeLa (cáncer cervical), A549 (pulmón), LoVo (colon), HL60 y K562 (leucemia), entre otras. En la literatura se informa que la actividad depende de inhibir la enzima TrxR1 citosólica la cual es resistente a quimioterapia.¹⁷

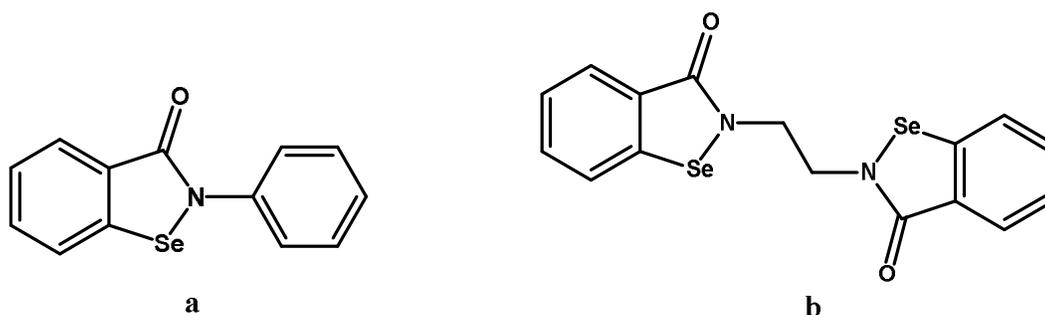


Figura 9. a) Ebseleno, b) Etaseleno.

En 2007, se reportó una familia de compuestos imidoselenocarbamatos los cuales han mostrado tener futuro como antitumorales, esto debido a los resultados que se mostraron de las pruebas *in vitro* frente a líneas celulares de cáncer humano, presentando una alta actividad citotóxica en células de adenocarcinoma prostático.¹⁸

¹⁶ a) M. J. Parnham, H. Siesbiochem. *Pharmacol.* **2013**, *86*, 1248. b) M. Ibrahim, W. Hassan, A. M. Deobald, A. L. Braga, J. B. T. Rocha *Biol Trace Elem Res.* **2012**, *149*,399.

¹⁷ L. Wang, J. Fu, J. Wang, C. Jin, X. Ren, Q. Tan, J. Li, H. Yin, K. Xiong, T. Wang, X Liu, H. Zeng, *Free Radiac. Biol. Med* **2012**, *52*, 898.

¹⁸ D. Plano, C. Sanmartín, E. Moreno, C Prior, A. Calvo, J. A. Palop, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6853

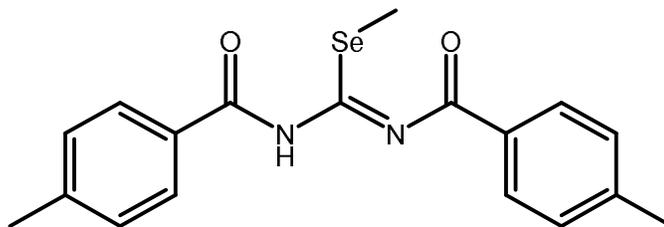


Figura 10. Imidoselenocarbamato.

Con el descubrimiento del Ebseleno y sus posibles aplicaciones en el área de farmacia, diferentes grupos de investigación optaron por seguir estudiando y sintetizando compuestos organoselenados capaces de mimetizar la acción que tiene la enzima GPx, esta como recordamos tiene un selenoaminoácido en la estructura. Tomando en cuenta lo anterior se reportan algunos compuestos “biomiméticos” de dicha enzima con actividad antiinflamatoria.¹⁹

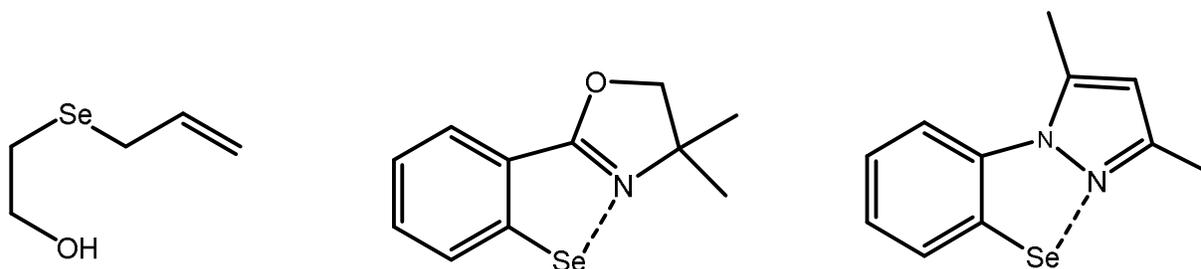


Figura 11. Compuestos análogos de Ebseleno.

¹⁹ T. G. Back, Ziad Moussa *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12104.

Selenoamidas

Las selenoamidas son compuestos análogos al grupo amida, con un enlace doble selenio-carbono (Se=C), y que han ganado gran interés en los últimos años debido a la importante actividad biológica que presentan y además sirven como intermediarios versátiles en la formación de compuestos heterocíclicos, los cuales muestran propiedades antitumorales en animales y actividad antiviral de amplio espectro en cultivo celular,²⁰ llevando a cabo una acción mimética a la enzima glutatión peroxidasa y actuando como atrapadores del radical superóxido (O_2^-) así como inhibiendo la acción de este(Figura 12).²¹

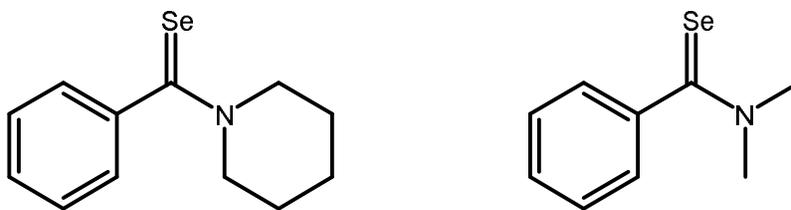


Figura 12. Selenoamidas atrapadoras del radical superóxido.

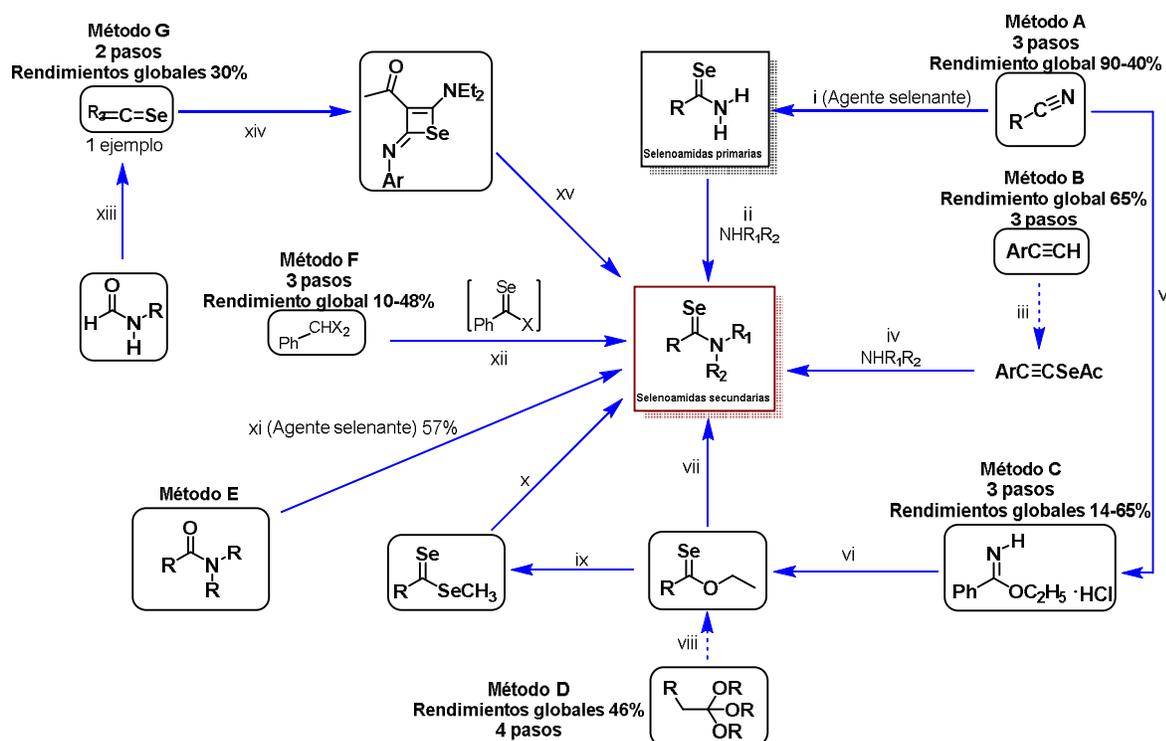
Aun cuando la actividad de las selenoamidas ha sido prometedora en cuanto a sus aplicaciones dentro de la química medicinal, existe una limitante, puesto que se reportan muy pocos métodos de síntesis en los cuales se observan bajos rendimientos, tiempos largos de reacción y condiciones drásticas para su preparación (Esquema 2).

²⁰ a) F. Bailly, N. Azaroual, J. Bernier. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4623. b) M. Koketsu, H. Ishihara, *Current Organic Chemistry*, **2003**, *7* (2), 175.

²¹ a) H. Tsukagoshi, M. Koketsu, M. Kato, M. Kurabayashi, A. Nishina, H. Kimura, *FEBS Journal*. **2007**, *274*, 6046.

b) N. Tanahashi, M. Koketsu, *Tetrahedron Letters*. **2011**, *52*, 4650.

c) H. Takahashi, A. Nishina, H. Kimura, K. Motoki, M. Koketsu, H. Ishihara, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 207.



A: i) Reactivo de Woollins, P_2Se_5 , H_2Se , Al_2Se_3 , NaSeH , Selenobenzoato de potasio; ii) NHR_1R_2 , EtOH, HCl, 100 °C, 5h; NHR_1R_2 , DMF, HCl, 100 °C, 3 h; B: iii) Éter, BuLi, Se, AcCl, 0 °C; iv) NHR_1R_2 , Éter, 20 °C, 3 h; C: v) ROH, HCl, Éter, 0 °C vi) Acetimidato de etilo, Piridina, Trietilamina, H_2Se , -30 °C; vii) Mg, EtBr, NH_2R , Éter, 1 h; D: viii) Trialkil orthobenzoato, $(\text{Me}_3\text{Al})_2\text{Se}$, Tolueno-Dioxano, 50°C, 3h; ix) $(\text{CH}_3)_2\text{AlSeCH}_3$, Tolueno; x) NHR_1R_2 , THF, 0°C; E: xi) $(\text{BuAlSe})_n$, $\text{Me}_2\text{AlSeAlMe}_2$, Se, HSiCl_3 , Et_4WSe_4 , LiAlHSeH , Reactivo de Woollins, Selenuro de bis(1,5-cyclooctanodiilboril); F: xii) NaH, Se, NHR_1R_2 , HMPA, 120 °C; G: xiii) *N*-arilformamida, Et_3N , Se, Tolueno reflujo, 10h; xiv) 4-dietilamino-3-butin-2-ona, THF reflujo; xv) NHR_1R , THF reflujo

Esquema 2. Síntesis de selenoamidas.

Objetivos.

Objetivo general.

- Sintetizar 4 diferentes metaloceno–selenoamidas empleando una reacción de desmetalación seleniurativa de aminocarbenos de Fischer y determinar su potencial actividad citotóxica frente a 5 diferentes líneas celulares de cáncer humano y observar la influencia que tiene el cambio del metaloceno en la estructura.

Objetivos particulares.

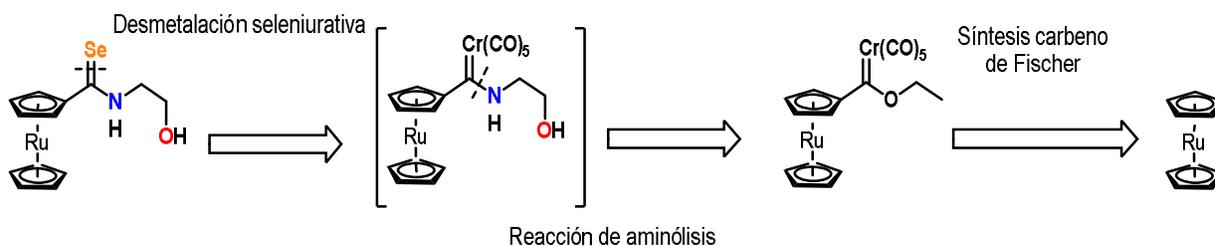
- Realizar la síntesis de aminocarbenos de Fischer mediante una reacción de aminólisis a partir de 2 diferentes aminas (etanolamina, 2-picolilamina).
- Sintetizar las metaloceno-selenoamidas a partir una reacción de desmetalación seleniurativa de los aminocarbenos de Fischer sintetizados.
- Determinar el potencial citotóxico de las metaloceno–selenoamidas mediante un screening primario a una concentración 50 μM en diferentes líneas celulares de cáncer humano.
- Obtener valores de concentración inhibitoria (CI_{50}) de los compuestos sintetizados frente a las líneas celulares de cáncer humano que hayan mostrado tener alguna posible actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer humano.

Resultados y discusión

Hoy en día, dentro de la química inorgánica medicinal, los compuestos organoselenados han llamado la atención debido a que poseen actividad biológica interesante sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano. Las selenoamidas son un grupo muy poco explorado comparado con otros compuestos que en su estructura poseen un átomo de selenio.

Dicho lo anterior nuestro grupo de trabajo se dió a la tarea de desarrollar una nueva síntesis de selenoamidas mediante una reacción de desmetalación seleniurativa del correspondiente aminocarbeno de Fischer bajo condiciones suaves de reacción y tiempos cortos utilizando una mezcla de Se/NaBH_4 como agente selenante a temperatura ambiente.²²

Con base en lo anterior, se propone el análisis retrosintético para la obtención de selenoamidas, teniendo un fragmento aminoalcohol y un fragmento metaloceno (Esquema 3).

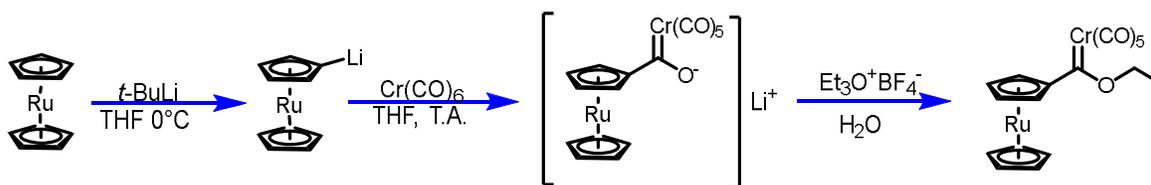


Esquema 3. Análisis retrosintético para la formación de selenoamidas.

²² A. I. Gutiérrez-Hernández, J. G. López-Cortés, M. C. Ortega-Alfaro, M. T. Ramírez-Apan, José de Jesús Cázares Marinero, R. A. Toscano. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4652.

Síntesis de etoxicarbeno de Fischer.

Observando el análisis retrosintético, se llevó a cabo la síntesis del etoxicarbeno de Fischer bajo las siguientes condiciones de reacción (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de etoxicarbeno de Fischer.

La reacción ocurrió en condiciones anhidras y bajo atmosfera de nitrógeno, en un principio se realiza la litiación del rutenoceno para formar el rutenocenuro de litio a partir de la adición de *tert*-BuLi al rutenoceno en THF como disolvente a 0 °C. Posteriormente se adiciona Cr(CO)₆ para la formación del acilmetalato como intermediario de reacción. Como último paso, se realiza una alquilación utilizando tetrafluoroborato de trietiloxonio en agua, teniendo como producto final el etoxicarbeno de Fischer, con un rendimiento final del 85%, mientras que del rutenoceno es del 98%. La purificación de los compuestos se lleva a cabo mediante el método de cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria silica en gel y como fase móvil mezcla hexano/acetato de etilo. En el caso de ambos carbenos el sistema que se maneja es 90:10 correspondientemente.

Dentro de la caracterización de los compuestos fue posible obtener algunos monocristales y así realizar el estudio de difracción de rayos X, observando la estructura que presentan, las distancias y ángulos de enlace entre sus átomos.

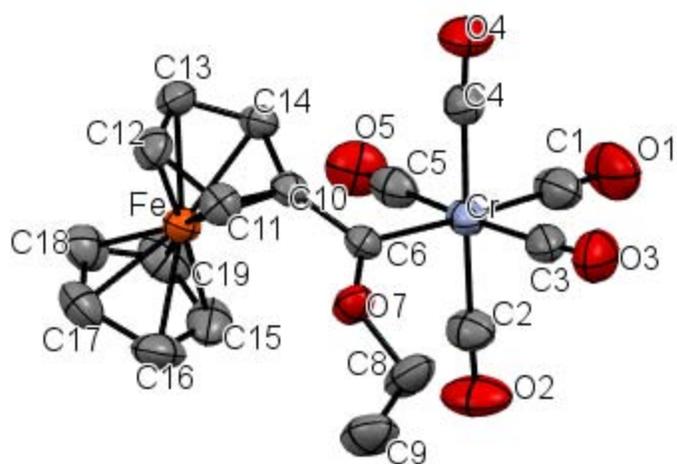


Figura 13. Proyección ORTEP del carbeno de Fischer 1.

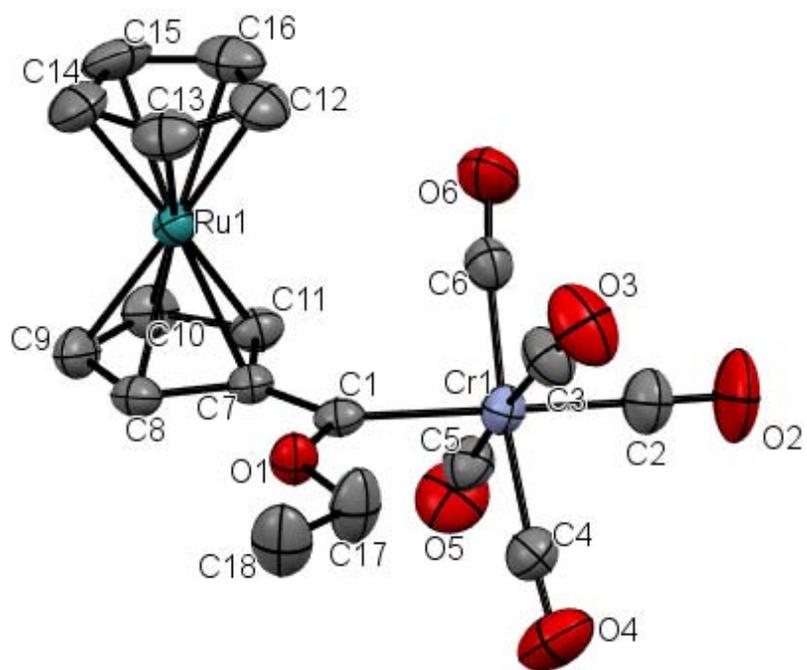


Figura 14. Proyección ORTEP del carbeno de Fischer 4.

Tabla 1. Distancia y ángulos de enlace para el etoxicarbena 1 y 5.

Distancia de enlace (Å)		Ángulo de enlace (°)	
Etoxicarbena 1			
Cr—C6	2.084 (2)	O7—C6—C10	105.58 (17)
C6—O7	1.317 (2)	O7—C6—Cr	128.80 (15)
C6—C10	1.452 (3)	C10—C6—Cr	125.48 (15)
Fe—C11	2.023 (2)		
Fe—C16	2.037 (2)		
Etoxicarbena 4			
Cr1—C1	2.087 (5)	O1—C1—C7	106.0 (4)
C1—O1	1.322 (5)	O1—C1—Cr1	128.1 (4)
C1—C7	1.459 (7)	C7—C1—Cr1	125.7 (3)
Ru—C11	2.164(5)		
Ru—C16	2.159 (6)		

Tabla 2. Datos cristalográficos para los etoxicarbena 1 y 5

Formula	$C_{18}H_{14}CrFeO_6$	$C_{18}H_{14}CrO_6Ru$
Tamaño del Cristal	0.27 × 0.26 × 0.26 mm	0.41 × 0.30 × 0.19 mm
Color	Rojo oscuro	Naranja
Sistema Cristalino	Ortorómbico	Monoclínico
Grupo especial	$P2_12_12_1$	$P2_1/n$

Dimensiones de Celda Unitaria		
<i>a</i> (Å)	7.4013 (3)	11.612 (9)
<i>b</i> (Å)	13.551 (1)	11.7532 (8)
<i>c</i> (Å)	17.921 (1)	13.8558 (9)
α (°)	90	90
β (°)	90	108.426 (2)
Γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å³)	1797.4 (2)	1795.5 (2)
<i>Z</i>	4	4
Densidad (mg/m)	1.604	1.773
No. de Reflexiones Colectadas	24932	5294
No. de Reflexiones independientes	6477	5294
Método de corrección absorción	Analítico	multi-scan
Máximos y Mínimos	0.759 y 0.684	0.746 y 0.442
Datos/restricciones /parametros	6477/0/291	5294/0/237
Índice Final R [<i>I</i>>2<i>sigma</i>(<i>I</i>)]	R1=0.0398 wR2= 0.058	R1=0.0561 wR2= 0.1483
Índice R (todos los	R1= 0.0604	R1=0.1003

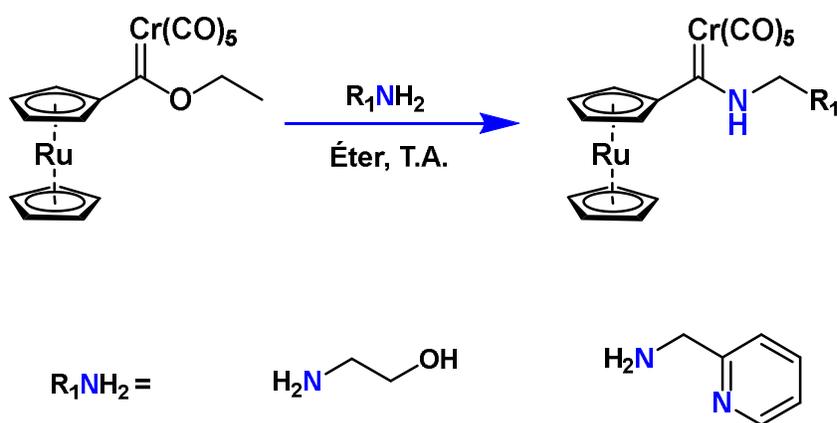
datos)	wR2=0.0619	wR=0.1773
Goof	0.995	1.046
Coeficiente de absorción (μ)	1.44 mm ⁻¹	1.48 mm ⁻¹

El análisis del estudio de difracción de rayos X del carbeno de Fischer con Fc, nos muestra el carbono carbénico (C6) unido al Cr con una distancia de enlace de 2.084(2) Å, este compuesto muestra una distancia de enlace de 1.452 (3) Å entre el C6-C10. Otro dato importante que se puede obtener de la tabla es el ángulo alrededor del C carbénico con un valor de 359.86°, lo cual nos dice que tiene una geometría trigonal plana. Así mismo el análisis para el carbeno de Fischer con Rc, nos muestra el carbono carbenico (C1) unido a al Cr con una distancia de enlace de 2.087 (5) Å; este compuesto muestra también la distancia de enlace entre C1-C7 que es 1.459 (7)Å. Otro dato importante que se puede obtener de la tabla es el ángulo alrededor del C carbénico con un valor de 359.8° lo cual nos dice que posee la misma geometría que el anterior (Figura 13 y 14).

Comparando ambos carbenos el de Fc y Rc observamos que las distancias de enlace entre el carbono carbénico y el Cr es parecido al igual que la distancia de enlace entre este carbono y el carbono unido al Cp del fragmento organometálico. Las diferencias que se observan entre ambos carbenos de Fischer es la distancia que existe entre los Cp de cada uno, la distancia en el Fc es 3.293 Å, mientras que en el Ru es 3.665 Å, lo cual observamos coincide con lo descrito en la literatura.¹²

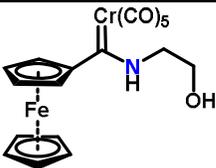
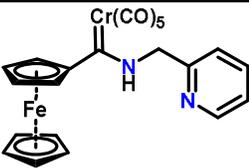
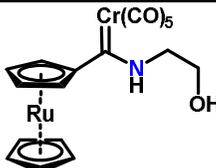
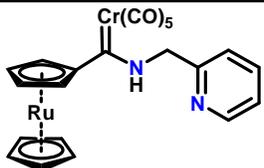
Síntesis de aminocarbena de Fischer

Para la formación del aminocarbena, aprovechamos el carácter electrofílico que poseen los carbenos de Fischer, llevando a cabo una reacción de sustitución nucleofílica mediante el método de adición-eliminación donde el alcóxido es sustituido vía una reacción de aminólisis. Las condiciones de reacción no son drásticas y procede en tiempos cortos. Siguiendo el análisis retrosintético planteado el siguiente paso es la obtención del aminocarbena por lo cual se continuó con la siguiente metodología (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis de aminocarbena de Fischer.

Tabla 3. Resultados de reacción para síntesis de aminocarbena.

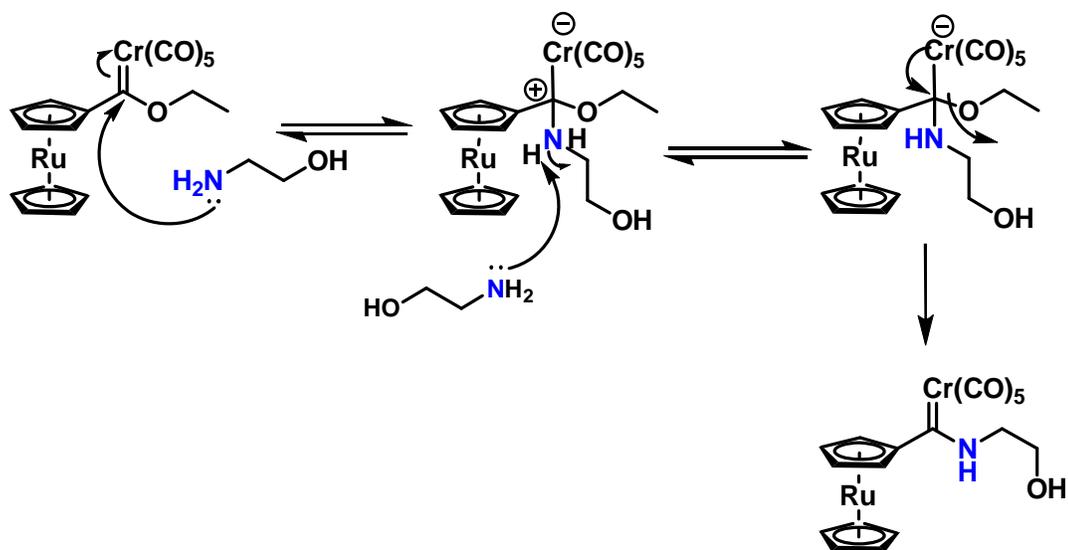
Aminocarbena			
 2a	 2b	 5a	 5b
90%	94%	87%	98%

3 equivalentes de la amina correspondiente, tiempo de reacción 5-10 min, T.A.

Observando los resultados de la tabla 3, podemos ver que se logra la formación de los aminocarbenos deseados con rendimientos por arriba del 80%, para esto es necesario agregar un exceso de la amina correspondiente (etanolamina, 2-picolilamina). Finalmente, los compuestos sintetizados se purifican mediante la técnica de cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria sílice gel y como fase móvil mezclas de hexano- acetato de etilo.

Para la formación del aminocarbeno de Fischer se propone el siguiente mecanismo tomando como ejemplo la reacción del carbeno de rutenoceno con etanolamina donde existe una sustitución del grupo alcóxido por el grupo amino.

En el mecanismo de reacción propuesto, observamos que el par de electrones de la amina ataca al carbono carbénico deslocalizando la carga hacia el átomo de Cr, posteriormente una segunda molécula de la amina abstrae un hidrógeno del átomo de nitrógeno, deslocalizando la carga negativa que posee el átomo de Cr formando un doble enlace Cr=C desplazando el grupo etoxilo de la molécula, formando así el aminocarbeno correspondiente.

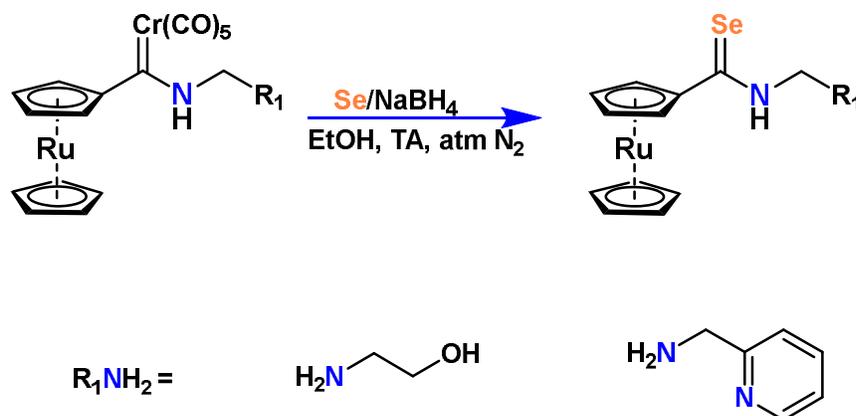


Esquema 6. Mecanismo propuesto para la formación de aminocarbenos de Fischer.

Síntesis de selenoamidas.

Teniendo como intermediarios los aminocarbenos de Fischer correspondientes y con base al análisis retrosintético planteado se realiza la síntesis de las selenoamidas mediante una reacción de desmetalación seleniurativa. Comenzando con la formación de la mezcla selenante de Se/NaBH₄, en EtOH como disolvente, para la cual se necesitan 10 eq de cada reactivo con respecto al aminocarbeno, la reacción se lleva a cabo a 0°C debido a que es exotérmica y bajo atmósfera de nitrógeno y en agitación durante 30 min, teniendo como coloración final un tono vino.

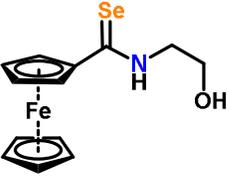
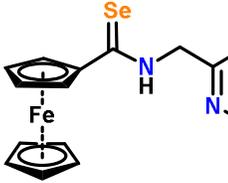
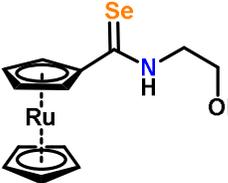
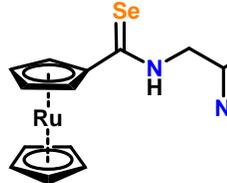
Como último paso de la síntesis, a la mezcla anterior se adiciona el aminocarbeno dejando la reacción durante 2 horas. El tiempo de reacción para cada uno puede variar, por lo que se puede seguir la reacción mediante cromatografía en placa fina hasta que no se tenga evidencia de la materia prima.



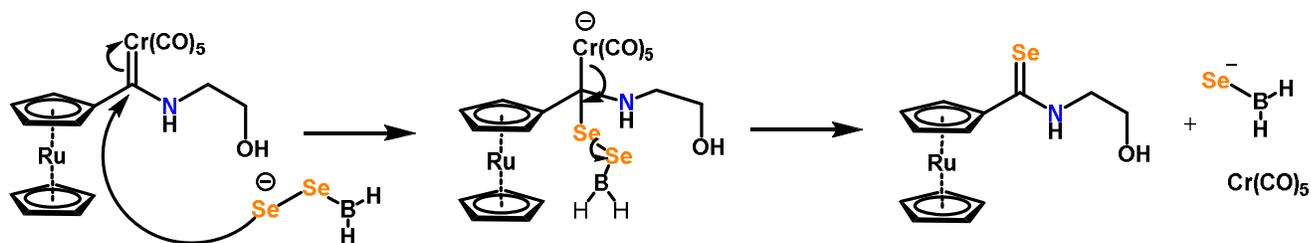
Esquema 7. Síntesis de selenoamidas a partir de aminocarbeno de Fischer.

Al término de la reacción, los compuestos se purifican mediante cromatografía en columna como se describió anteriormente, mostrando los resultados obtenidos en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimientos de la reacción de desmetalación seleniurativa.

Selenoamidas			
 3a	 3b	 6a	 6b
85%	79%	80%	78%
Sólido anaranjado	Sólido café	Sólido amarillo	Sólido amarillo

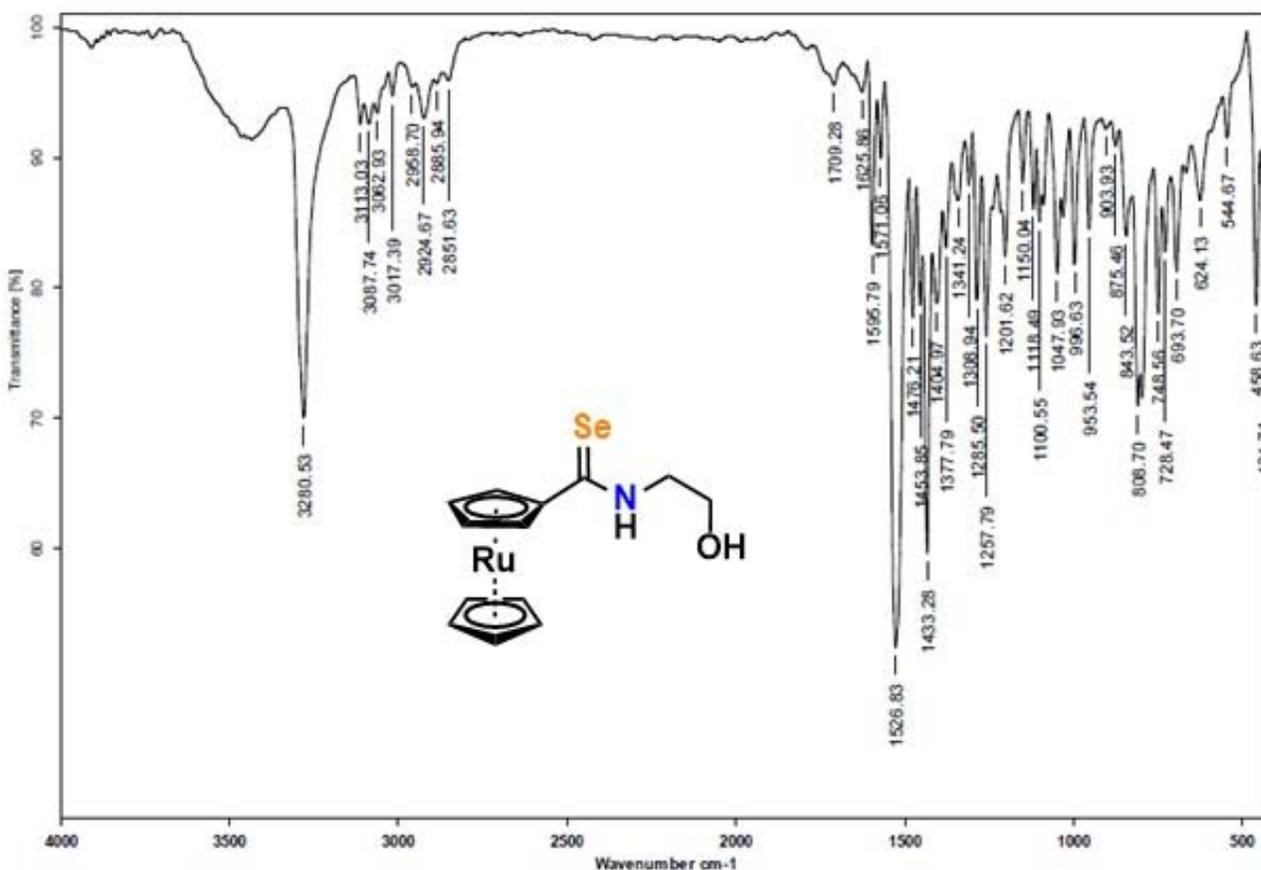
Para este último paso se plantea un mecanismo de reacción, donde es necesaria la formación del diselenuro a partir de la reacción que ocurre entre Se y NaBH₄, esto se propone con base a lo reportado en la literatura.²³ Una vez formado el diselenuro ocurre un ataque nucleofílico hacia el carbono carbénico el cual es altamente electrofílico formando un intermediario clave para finalmente llevar a cabo la eliminación del fragmento metálico rompiendo el enlace C=Cr y formando el nuevo doble enlace C=Se



Esquema 8. Propuesta del mecanismo de reacción para la formación de selenoamidas a partir del aminocarbene de Fischer.

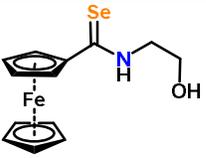
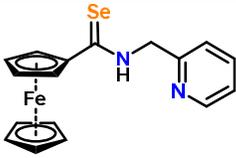
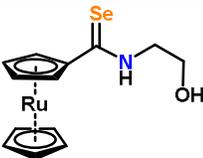
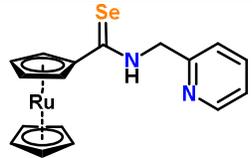
²³ a) J.M. Lalancette, J.R. Brinl, *Can. J.Chem.* **1971**, 49, 2990. b) J.M. Lalancette, A. Frech, *Can. J.Chem.* **1970**, 48, 2367.

Los selenoamidas obtenidas se caracterizaron mediante diferentes técnicas espectroscópicas: espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . Para el caso del compuesto **6a** el espectro de infrarrojo muestra una banda de mediana intensidad correspondiente a la vibración N-H en 3280 cm^{-1} . Se observa una banda de alta intensidad en 1526 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace Se=C y una banda de mediana intensidad en 1433 cm^{-1} asociada a la vibración C-N tomando en cuenta que estas vibraciones se encuentran en un rango de $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$.



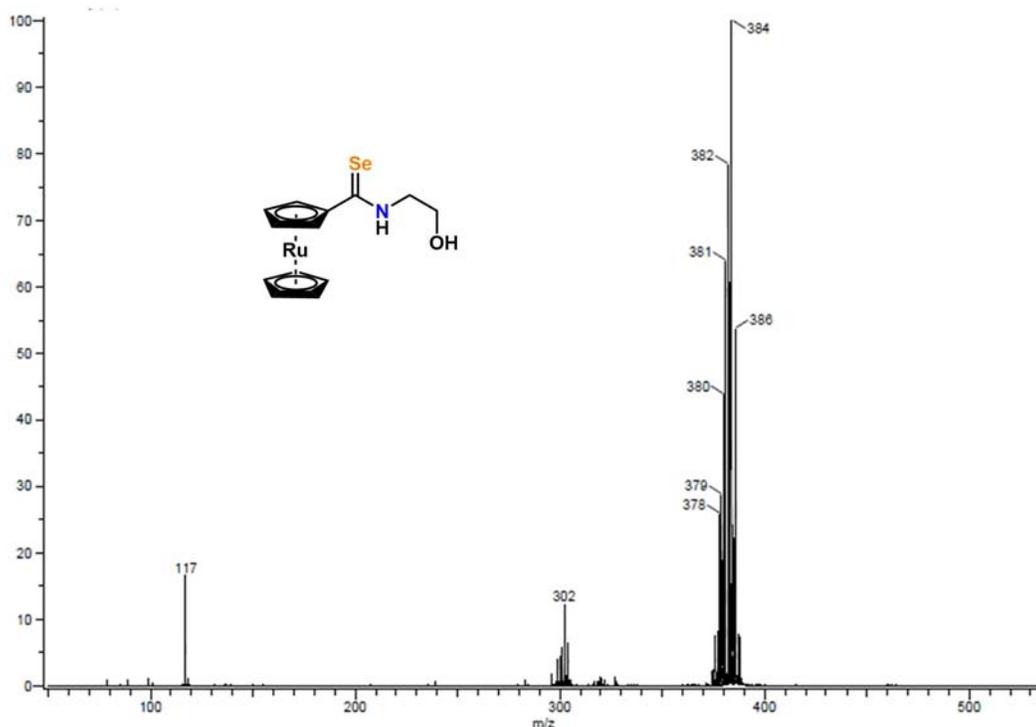
Espectro 1. Espectro IR de la selenoamida 6a. (KBr)

Tabla 5. Datos IR (KBr) para las selenoamidas sintetizadas.

Vibraciones	Selenoamidas			
	 3a	 3b	 6a	 6b
ν (N-H)	3222	3250	3280	3283
ν (C=Se)	1542	1522	1526	1546
ν (C-N)	--	1431	1433	--

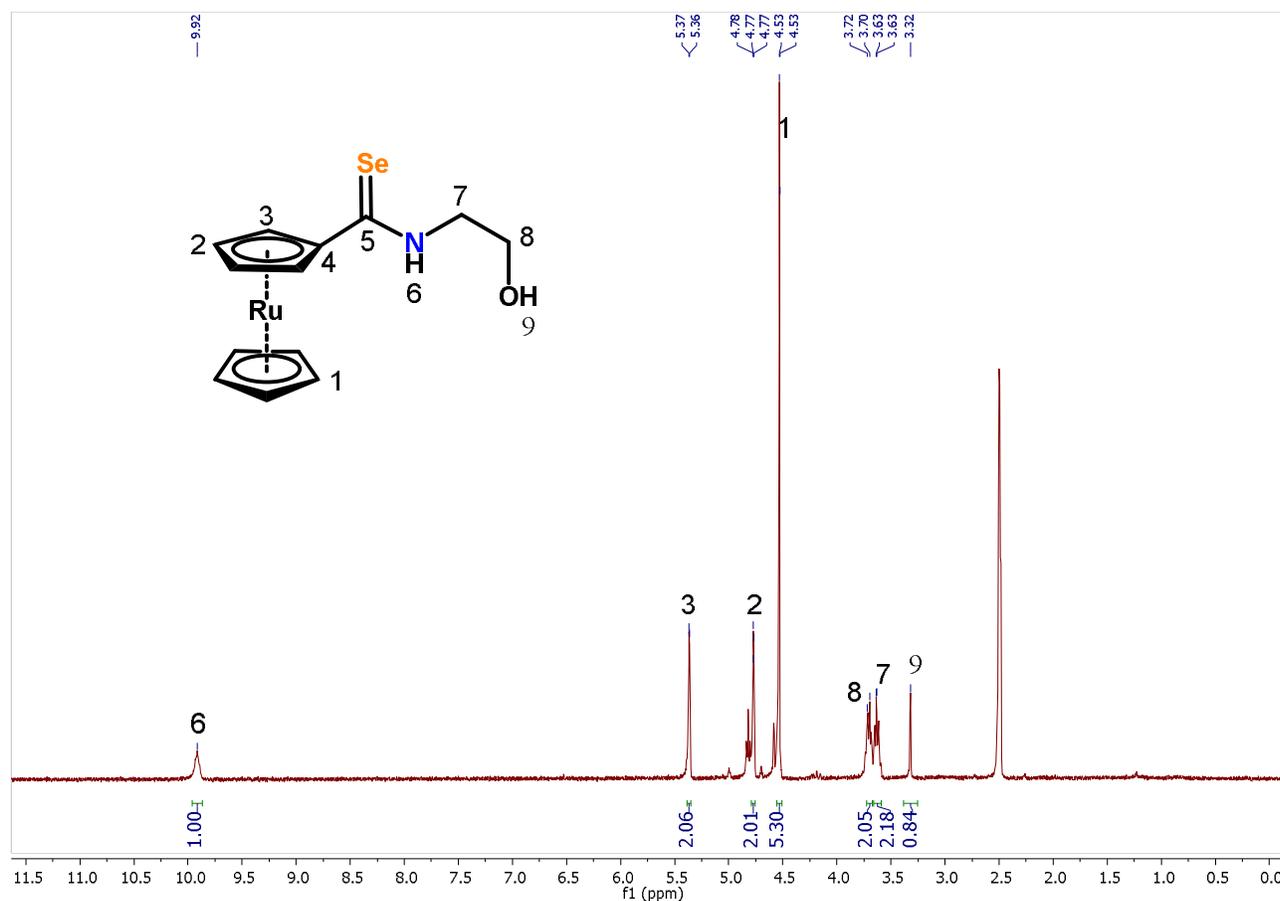
En la tabla 5 se observa que los compuestos sintetizados presentan una banda de absorción de mediana intensidad en 3222-3830 cm^{-1} correspondiente a la vibración N-H, en algunos casos la banda es ancha y esto se atribuye al grupo hidroxilo presente en el compuesto. Estos compuestos presentan otra banda absorción de alta intensidad en un intervalo de 1522-1546 cm^{-1} asignada a la vibración C=Se y en algunos casos se puede distinguir una banda de mediana intensidad en 1400-1450 cm^{-1} la cual corresponde a la vibración C-N.

En el caso de la caracterización por la técnica de espectrometría de masas del compuesto **6a**, la cual se realizó por el método DART⁺, se observa el pico base en 384 m/z el cual concuerda con el masa molecular esperado para el compuesto. También podemos ver un pico en 302 m/z esto se atribuye a la pérdida de una molécula de H_2Se a la cual le corresponde 81 m/z . Con respecto a los compuestos 3a, 3b y 6b se observa una pérdida de 80 m/z lo cual se atribuye a la pérdida de Se en el compuesto.



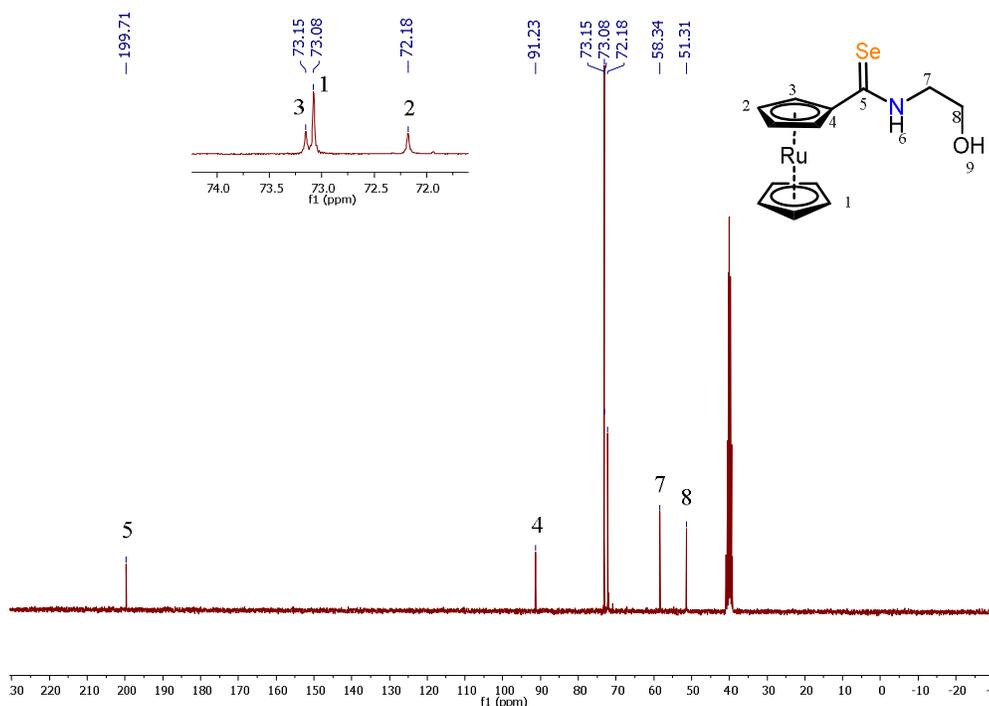
Espectro 2. Espectro EM (DART) de la selenoamida 6a.

En el espectro de RMN de ^1H de la selenoamida **6a** se observa hacia mayores ppm la señal que corresponde al hidrógeno de la amida (N-H) en un desplazamiento cerca de 9.923 ppm, a menores ppm encuentran las señales correspondientes al fragmento del R_c. Cerca de 4.53 ppm se observa una señal simple que integra para 5 hidrógenos que corresponden al ciclopentadieno no sustituido, 5.36 y en 4.78 ppm se observan dos señales que corresponden a los H 3 y 2. Finalmente a menores partes por millón en 3.71 y 3.63 ppm se observan señales correspondientes a los metilenos base de nitrógeno y oxígeno del grupo hidroxilo presentes en la molécula.



Espectro 3. Espectro de RMN ^1H (DMSO, 300MHz) de la selenoamida 6a.

Con respecto al análisis de RMN ^{13}C de la selenoamida **6a** se observa a hacia mayores ppm una señal en 199.7ppm correspondiente al selenocarbonilo C=Se. Las señales que corresponden al fragmento metalloceno las podemos observar en 73.0 ppm para el cp no sustituido en 91.2, 72.1 y 73.1 ppm se aprecian las señales pertenecientes a los átomos de carbono 4, 2 y 3 respectivamente, hacia menores partes por millón se observan dos señales de baja intensidad correspondientes a los metilenos de la cadena alquílica 58.3 para el C7 y 51.3 para el C8.



Espectro 4. Espectro RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz) de la selenoamida 6a.

A continuación, se muestran en la tabla 6 y 7, de manera general, el análisis espectroscópico de RMN de ^1H y ^{13}C de las selenoamidas sintetizadas. En el caso de RMN de ^1H se muestran señales cerca de 9.00 ppm correspondientes al átomo de H unido al nitrógeno, cerca de 4.00-4.50 ppm se encuentra una señal correspondiente al Cp no sustituido del fragmento metalocénico, mientras que en 4.50 – 5.00 ppm observamos señales que corresponden a los protones del Cp monosustituido. En lo que respecta a los metilenos unidos directamente al átomo de nitrógeno las señales se observan en 4.00, 4.50, 4.84 y 2.82. Para el caso de átomo de H unido directamente al átomo de oxígeno la señal se encuentra en 4.00 y 3.76, finalmente en el caso de hidrógeno del grupo hidroxilo la señal se aprecia en 2.06 ppm.

En lo que respecta a RMN de ^{13}C en la tabla 7 se muestra un comportamiento similar para los átomos de carbono que tienen en común. En el caso del átomo de C unido al átomo de Se observamos que se desplazan cerca de 200 ppm en todos los casos al igual que en el caso del *Cipso* vemos que tiene un desplazamiento cerca de 90 ppm.

Tabla 6. Señales RMN ^1H características de los compuestos 3a, 3b, 6a y 6b en ppm.

Compuesto	-NH	-OH	-NCH ₂	-OCH ₂	CpH(2)	CpH(3)	CpH
3a	8.28	2.06	4.00	4.00	4.5	4.93	4.21
3b	9.68	--	4.50	--	5.01	5.01	4.21
6a	9.92	3.32	3.82	3.71	4.78	5.36	4.53
6b	9.67	--	4.84	--	4.66	5.19	4.54

Tabla 7. Señales RMN ^{13}C características de los compuestos 3a, 3b, 6a y 6b en ppm.

Compuesto	C=Se	NCH ₂	C _{ipso}	Cp3	Cp2	Cp
3a	203.0	50.5	86.8	71.7	69.4	71.2
3b	202.0	52.7	87.5	69.5	70.9	71.4
6a	199.7	58.3	91.2	73.1	72.1	73.0
6b	201.4	52.7	93.5	71.4	71.3	72.5

Las estructuras de los compuestos 3a y 6a fueron confirmadas inequívocamente mediante difracción de rayos-X de monocristal (Figura 15y 16).

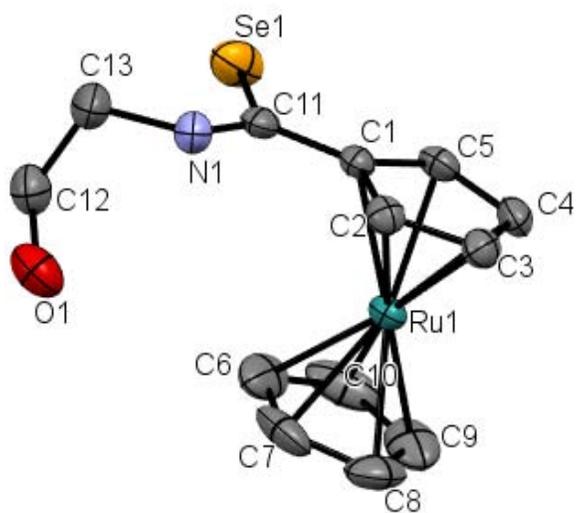


Figura 15. Proyección ORTEP de la selenoamida 6a.

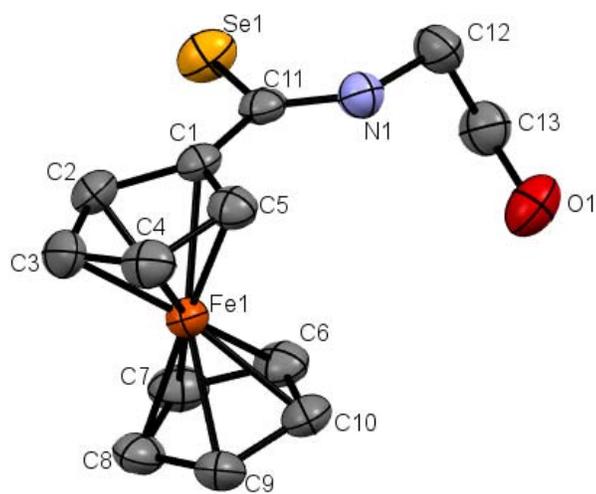


Figura 16. Proyección ORTEP de la selenoamida 3a.

Tabla 8. Distancia y ángulos de enlace de la selenoamida 6a y 3a.

Distancia de enlace (Å)		Ángulo de enlace (°)	
Selenoamida 6^a			
Ru1—C1	2.152 (2)	C11—N1—C13	126.1 (3)
Se1—C11	1.841 (3)	N1—C11—C1	116.3 (2)
N1—C11	1.315 (4)	N1—C11—Se1	122.6 (2)
N1—C13	1.455 (4)	C1—C11—Se1	121.0 (2)
C1—C11	1.469 (4)		
Selenoamida 3a			
Fe1—C1	2.023 (2)	C11—N1—C12	125.7 (2)
Se1—C11	1.838 (2)	N1—C11—C1	116.9 (2)
N1—C11	1.318 (3)	N1—C11—Se1	122.38 (17)
N1—C12	1.458 (3)	C1—C11—Se1	120.66 (16)
C1—C11	1.463 (3)		

Tabla 9. Datos cristalográficos de la selenoamida 6a y 3a.

Formula	C₁₃H₁₅NORuSe	C₁₃H₁₅FeNOSe
Tamaño del Cristal	0.37 × 0.23 × 0.09 mm	0.28 × 0.18 × 0.09 mm
Color	Amarillo	Rojo
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo especial	P $\bar{1}$	C2/c
Dimensiones de Celda Unitaria		
a (Å)	7.5315 (14)	17.9830 (19)

b (Å)	9.6659 (16)	7.4102 (8)
c (Å)	10.231 (2)	19.235 (2)
α (°)	78.282 (7)	90
β (°)	68.744 (5)	93.649 (2)
Γ (°)	68.863 (4)°	90
V (Å³)	645.2 (2)	2558.0 (5)
Z	2	8
Densidad (mg/m)	1.963	1.745
No. de Reflexiones Colectadas	25379	10155
No. de Reflexiones independientes	3781	2337
Método de corrección absorción	multi-scan	multi-scan
Máximos y Mínimos	0.746 y 0.526	0.705 y 0.425
Datos/restricciones/ Parámetros	3781/1/160	2337/172/206
Índice Final	R1=0.0356 y wR2=0.0490	R1= 0.0254 y wR2=0.0603
Índice R (todos los datos)	R1=0.0526 y wR2=0.0532	R1= 0.0315 y wR2=0.0629
Goof	1.171	1,059
Coefficiente de absorcion (μ)	4.02 mm ⁻¹	4.01 mm ⁻¹

Observando los datos cristalográficos de la estructura **6a** podemos ver que la distancia de enlace del C11 unido al selenio, es de 1.841 (3)Å. Tomando en cuenta este selenocarbonilo, tenemos que la suma de los ángulos alrededor de este es 359.9° indicando que presenta una geometría trigonal plana, al igual que en la estructura **3a** la distancia de enlace del C11 unido al selenio tiene una distancia de 1.838 (2)Å y la suma de los ángulos alrededor del selenocarbonilo es 359.94°. Esto nos dice que también posee una geometría trigonal plana. En el caso de este compuesto la estructura presenta desorden en el Cp no sustituido del ferroceno, formando dos orientaciones, (Figura 16) donde se observa solo la contribución mayoritaria.

Comparando ambas selenoamidas observamos que la distancia de enlace entre el C y el selenio (C=Se) es similar a las reportadas en la literatura. En cuanto a la celda unitaria de los compuesto **3a** y **6a** se observan interacciones tipo puente de hidrógeno intermoleculares entre el átomo de hidrógeno de la selenoamida y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo (N-H··O) y otro entre el átomo de selenio y el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo (O-H··Se). Comparando ambas selenoamidas observamos que las distancias de enlace difieren debido a que aquella que posee Fc presenta distancias más cortas que las que tienen Rc, estos compuestos al tener la capacidad de formar enlaces tipo puente de hidrógeno pueden tener una repercusión importante al momento de evaluar la actividad citotóxica de los mismos (Figura 17 y 18).

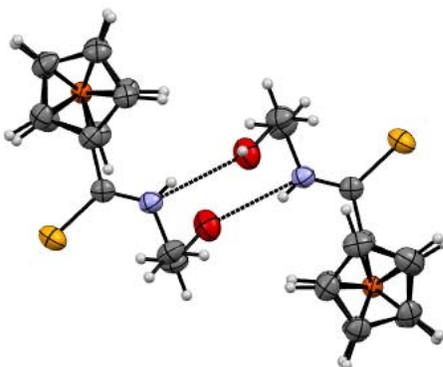


Figura 17. Dímero de la red cristalina del compuesto 3a.

Tabla 10. Datos de enlaces de hidrógeno para la selenoamida 3a.

D-H···A	d (D-H)	D (H-A)	D (D···A)	DHA
N1-H1···O1	0.76(2)	2.21(3)	2.906(3)	152(3)
O-H(1a)···Se(1)2	0.77(3)	2.55(3)	3.300(19)	165(4)

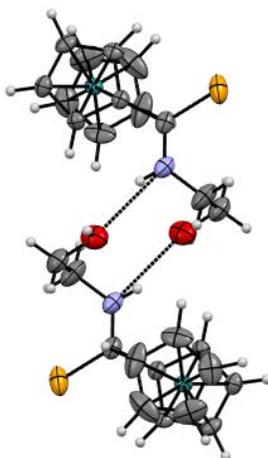


Figura 18. Dímero de la red cristalina del compuesto 6a.

Tabla 11. Datos de enlace de hidrógeno para la selenoamida 6a.

D-H··A	d (D-H)	D (H-A)	D (D··A)	DHA
N1-H1··O1	0.84(1)	2.54(2)	2.347(2)	161(4)
O-H(1A)··Se(1)2	0.82(3)	2.17(3)	2.932(4)	154(3)

Pruebas biológicas.

Con base en la información descrita en la literatura, sabemos que compuestos que poseen al menos un átomo de selenio en la estructura han presentado alta actividad biológica como antioxidante. Por otro lado, aquellos con un fragmento metaloceno han potenciado la actividad citotóxica, antiinflamatoria, antioxidante o bactericida.

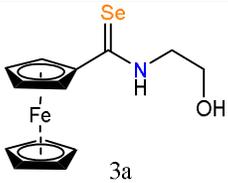
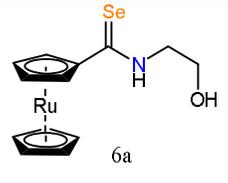
Para este trabajo se realizaron pruebas de citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano con el fin de saber y determinar la probable actividad biológica de las metaloceno selenoamidas observando el efecto al cambiar el grupo metaloceno. Se obtuvieron los resultados del primer ensayo, un screening primario con una concentración 50 μ M, en diferentes líneas celulares (U251=glía del sistema nervioso central, PC-3=próstata, K562=leucemia, HCT-15=colon, MCF-7=mama y SKLU=pulmón). Teniendo los valores de esta primera prueba se seleccionaron las líneas celulares cancerosas U251, PC-3 y HCT-15, en las cuales se observó tener una alta actividad, para posteriormente realizar una segunda prueba y conocer la concentración de inhibitoria media para estas líneas celulares seleccionadas.

Tabla 12. Datos de screening primario

compuesto	HCT-15	U251	PC-3	MCF-7	K562	SKLU-1
3a	98.51	98.71	88.6	100	62.68	95.7
3b	100	100	100	71.1	93.6	44.3
6a	62.9	100	100	54.55	100	100
6b	72.7	100	99.8	95.9	100	41.9

Con el propósito de tener una mayor información sobre la actividad citotóxica que presentan las metaloceno-selenoamidas sintetizadas, se determinó la concentración inhibitoria media mediante el protocolo NCI de los EUA en las líneas celulares de cáncer humano que presentaron mayor actividad, comparándolos frente a fármacos comerciales que se usan actualmente para el tratamiento del cáncer, como el *cis*-platino y el tamoxifeno.

Tabla 13. Cl_{50} (μ M) para los compuestos 3a y 6a.

Compuesto	HCT-15	U251	PC-3
 3a	4.4±0.09	7.2±0.5	16.0±0.2
 6a	30.2±2.9	2.1±0.1	11.8±2.5
<i>cis</i>-platino	13.5±0.7	9.5±0.7	20.3±1.2
tamoxifeno	13.3±1.1	12.9±1.3	11.7±0.9

Como podemos ver en los datos de la **Tabla 13** se presentan los resultados obtenidos de la prueba de Cl_{50} que se realizaron con las metaloceno selenoamidas **3a** y **6a**. Al analizar los datos, se observan resultados interesantes, al comparar los valores de los compuestos sintetizados con los valores de los fármacos de referencia tenemos que el compuesto **3a** presenta valores de Cl_{50} menores que dichos fármacos para las líneas celulares de HCT-15 (4.4±0.09) y U251 (7.2±0.5) respectivamente. En el compuesto **6a** el cual tiene R_c en la estructura, se observa un cambio significativo, si es comparado con los fármacos referencia, no se tienen buenos valores para todas las líneas celulares, únicamente para la línea celular

U251 (2.1 ± 0.1), por lo que podemos decir que esta metaloceno selenoamida presenta selectividad hacia una línea celular de cáncer humano.

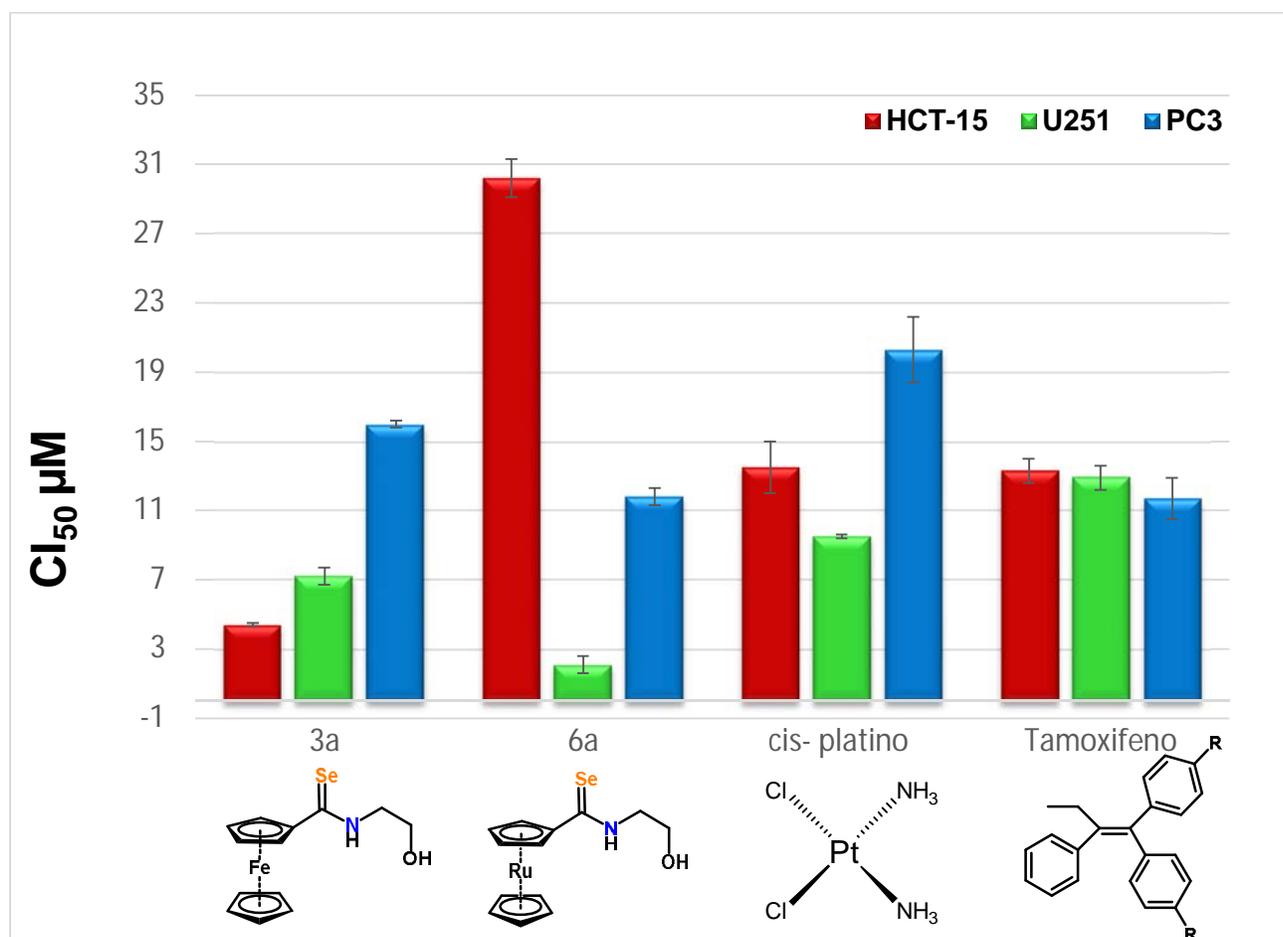
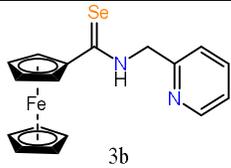
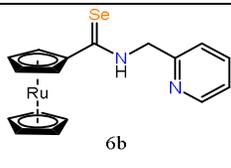


Figura 19. IC_{50} Para los compuestos 3a y 6a.

Tabla 14. Cl_{50} (μ M) para los compuestos 3b y 6b.

Compuesto	HCT-15	U251	PC-3
 3b	10.9±0.07	15.6±1.3	16.9±1.5
 6b	12.2±1.8	2.3±0.5	6.5±0.8
cis-platino	13.5±0.7	9.5±0.7	20.3±1.2
tamoxifeno	13.3±1.1	12.9±1.3	11.7±0.9

Al igual que en los compuestos anteriores, se realizó la prueba de Cl_{50} para las metaloceno selenoamidas con diferente fragmento amina. Analizando los datos, de igual manera observamos que del compuesto **3b** no presenta buenos resultados en comparación con los fármacos de referencia, sin embargo el compuesto **6b** presenta bajos valores de Cl_{50} en las líneas celulares U251 (2.3±0.5) y PC3 (6.5±0.8) con base en estos datos el compuesto **6b** presenta una alta actividad y selectividad frente a las células de cáncer humano U251.

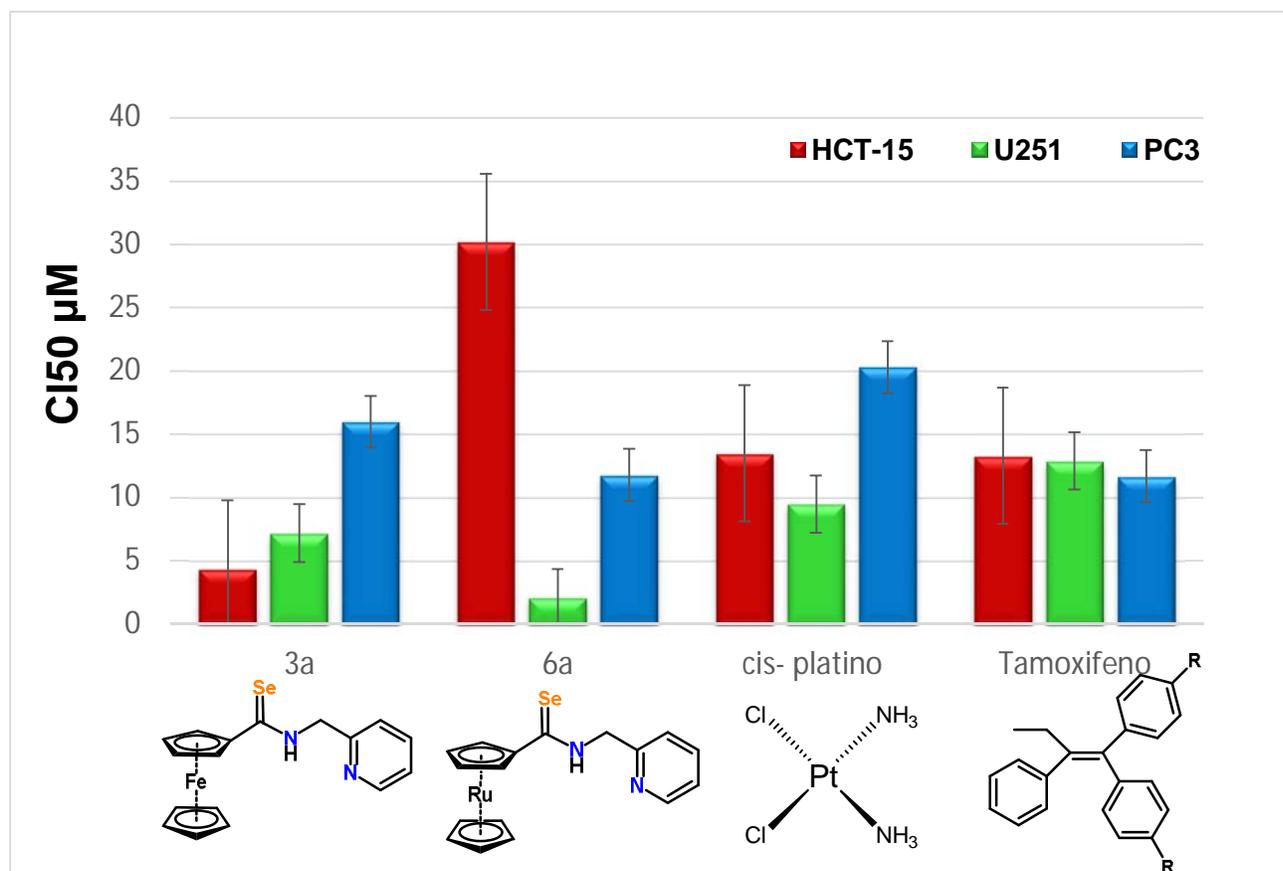


Figura 20. CI_{50} Para los compuestos 3b y 6b.

Como vemos al comparar el grupo de selenoamidas sintetizadas en el presente trabajo, observamos la influencia del fragmento organometálico en la molécula, mostrando un bajo valor de CI_{50} en células U251 con la molécula que posee Ru. Además, podemos decir que tiene una mayor selectividad frente a esta línea de células cancerígenas incluso, al comparar con los fármacos de referencia que se utilizan para este tipo de cáncer.

Tomando en cuenta los resultados de la prueba CI_{50} , podemos decir que los compuestos sintetizados tienen una alta posibilidad de competir con los fármacos de referencia que actualmente son utilizados en el tratamiento de cáncer humano, debido a que tienen una alta actividad y en algunos casos demuestran selectividad sobre algunas células de cáncer humano.

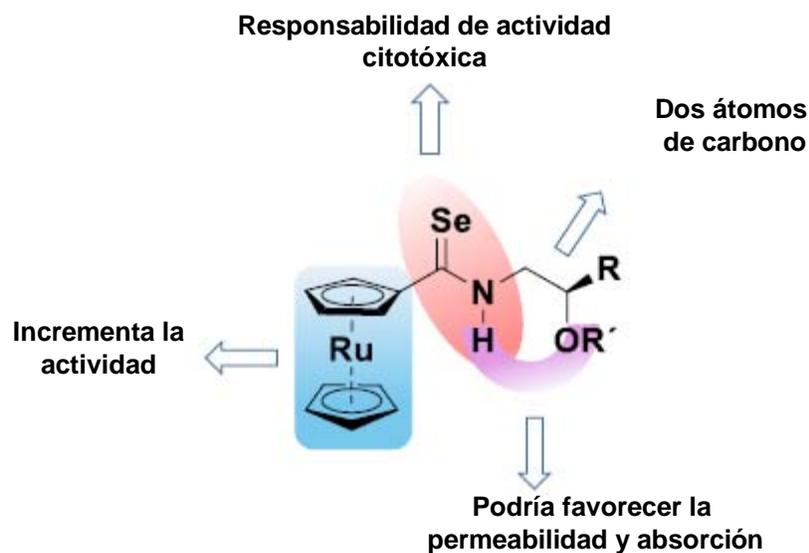


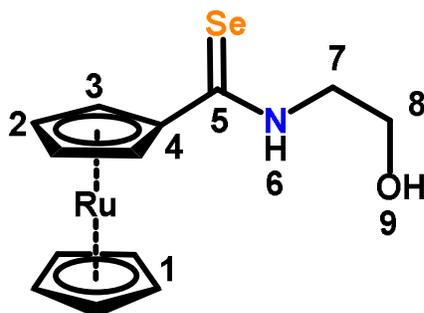
Figura 21. Factores estructurales clave para la formación de selenoamidas con alta actividad citotóxica.

Si bien sabemos que aquellos compuestos organometálicos con Fc o Rc descritos en la literatura, presentan alguna actividad biológica importante, observando la estructura general de las metaloceno selenoamidas, vemos que el fragmento organometálico influye de manera importante sobre la actividad citotóxica, se sabe que el Fc puede oxidarse al catión radical ferrocenio, el cual puede catalizar la formación de O_2^- y radicales hidroxilo en presencia de oxígeno. Por otra parte, se sabe la influencia que tienen estos radicales en la apoptosis y en el daño del ADN celular, Sin embargo, se ha demostrado que en ocasiones la presencia de este fragmento organometálico como parte de la estructura aumenta la estabilidad del compuestos y favorece la hidrofobicidad y no tanto el proceso redox que lleva a cabo.

Por otra parte si hablamos de los compuestos con Rc, tienen una manera diferente de actuar y esto se debe al tamaño, debido a que los dos Cp se encuentran a una mayor distancia, lo que nos hace pensar que en el interior lipofílico de la membrana el tiempo de retención de este aumenta. Se sabe que el Rc es capaz de formar enlaces puente de hidrógeno lo que

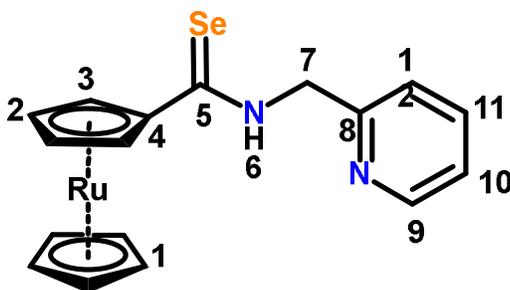
hace que la fuerza de interacción aumente y así la actividad de los compuestos que poseen este fragmento en la estructura.

Análisis Espectroscópico de Selenoamidas sintetizadas.



6a

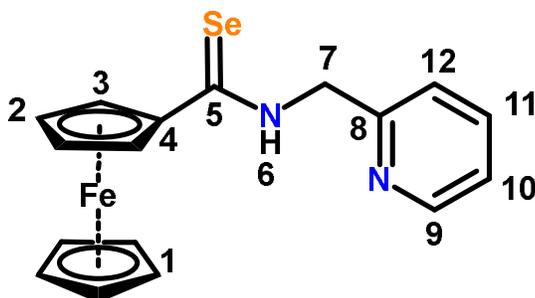
Sólido color amarillo (80%) IR ν (Pastilla KBr, cm^{-1}) 3222 (N-H), 1542 (C=Se). EM-DART+ m/z 382 [M^+], 302 [M^+]. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.92 (s, 1H, H-6), 5.36 (s, $J = 1.7$ Hz, 2H, H-3), 4.77 (s, $J = 1.5$ Hz, 2H, H-2), 4.53 (s, $J = 1.1$ Hz, 5H, H-1), 3.72 (t, 2H, H-8), 3.63 (t, 2H, H-7) 3.32 (s, 1H, H-9) RMN^{13}C (75 MHz, DMSO , ppm) δ 199.7 (C-5), 91.2 (C-4), 73.1 (C-3), 73.0 (C-1), 72.1 (C-2), 58.3 (C-7), 51.3 (C-8).



6b

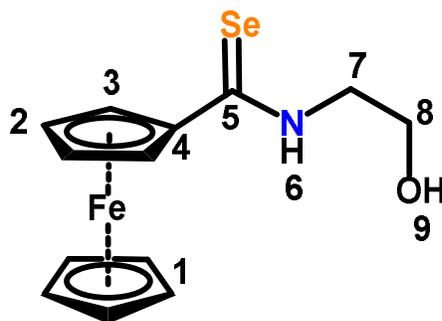
Sólido color amarillo (78%) IR ν (Pastilla KBr, cm^{-1}) 3283 (N-H), 1546 (C=Se). EM-DART+ m/z 429 [M^+], 349 [M^+ HSe]. RMN^1H (300MHz, CDCl_3 , ppm): δ 9.67 (s, 1H, H-6), 8.52 (d, $J = 5.1, 2.4$ Hz, 1H, H-9), 7.66 (t, $J = 7.7, 2.0$ Hz, 1H, H-11), 7.19 (s, 2H, H-10,12), 5.19 (q, $J = 1.6$ Hz, 2H, H-3), 4.84 (d, $J = 4.5, 1.8$ Hz, 2H,H-7), 4.66 (m, 2H,H-2), 4.54 (s, 5H, H-1). RMN

^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 201.4 (C-5), 153.9 (C-8), 148.8 (C-9), 137.0 (C-11), 122.8 (C-10), 122.2 (C-12), 93.5 (C-4), 72.5 (C-1), 71.4 (C-3), 71.3 (C-2), 52.7(C-7).



3b

Sólido color café (79%) IR v (Pastilla KBr, cm^{-1}) 3250 (N-H), 1522 (C=Se), 1431 (C-N) EM-DART⁺ m/z 383, 303 [M^+ Se]. **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3 , ppm): δ 9.68 (s, 1H, H-6), 8.62 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-9), 7.75 (m, 1H, H-11), 7.36 (d, 1H, H-12), 7.27 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-10), 5.1 (s, 4H, H-2,3), 4.50 (s, 2H, H-7), 4.21 (s, 5H, H-1). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 202.0 (C-5), 154.1 (C-8), 148.9 (C-9), 137.1 (C-11), 122.8 (C-10), 122.3 (C-12), 87.5 (C-4), 71.4 (C-1), 70.9 (C-2), 69.5 (C-3), 52.7(C-7).



3a

Sólido color naranjado (85%) IR v (Pastilla KBr, cm^{-1}) 3222 (N-H), 1542 (C=Se) EM-DART m/z 338 [M^+], 256 [M^+ HSe]. **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.24 (s, 1H, H-6), 4.93 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H, H-3), 4.50 (d, 2H, H-2), 4.21 (s, $J = 9.6, 6.2$ Hz, 5H, H-1), 4.00 (s, 4H, H-7,8), 2.06 (s, 1H, H-9). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 203.0 (C-5), 86.8 (C-4), 71.7 (C-3), 71.2 (C-1), 69.4 (C-2), 60.8 (C-8), 50.5 (C-7).

Metodología Experimental

Instrumentos y reactivos

Para la obtención de los compuestos sintetizados se utilizaron reactivos marca Sigma-Aldrich sin purificación adicional. Los disolventes utilizados fueron adquiridos de proveedores comerciales y sin ningún tratamiento posterior.

Para la caracterización de los compuestos obtenidos se usaron diferentes técnicas, RMN de ^1H y ^{13}C , en un equipo Bruker Avance 300 MHz para ^1H , 75 MHz para ^{13}C utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3), dimetil sulfóxido (DMSO) y acetona deuterada como disolvente. Para la espectroscopía de IR se utilizó la técnica de pastilla de KBr en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283B o 1420. La espectrometría se realizó en un equipo Jeol JMST100LC The AccuTOF empleando la técnica de DART⁺.

La purificación de los productos obtenidos se lleva a cabo mediante la técnica de cromatografía en columna teniendo como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil diferentes gradientes de hexano/acetato de etilo.

A manera de ejemplo, se describe la síntesis para formar el etoxicarbeno de Fc. Para esta reacción es necesario tener condiciones anhidras y bajo atmósfera de N_2 . En cuanto a la síntesis del etoxicarbeno de Rc sigue la misma metodología realizando los cálculos estequiométricos correspondientes y bajo las mismas condiciones.

Síntesis de etoxicarbeno

En un matraz de bola se adicionan 4 g de Fc (21.5mol), los cuales se disuelven en 40 mL de THF anhidro, a esta disolución se agregan lentamente 14 mL de *t*-BuLi (1.7M), este paso

se realiza a 0 °C con agitación constante observando un cambio de color de rojo a anaranjado oscuro.

Simultáneamente, en otro matraz se pesan 2.5 g de $\text{Cr}(\text{CO})_6$ (13.15 mmol) y se disuelven 30 en THF anhidro a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución con el anión del ferroceno se transfiere con una cánula a la suspensión que contiene al hexacarbonilo de cromo, o bien la adición de este compuesto puede ser en sólido, adaptando el sistema donde se lleva a cabo la primera reacción. Posteriormente se deja llegar a temperatura ambiente y en agitación durante 2 h.

Trascurrido este tiempo, se agregan 3 g de Et_3OBF_4 (13.6 mmol) como agente alquilante disuelto en agua con hielo y se agita vigorosamente observando un cambio de color rojo a guinda. La mezcla resultante se extrae con diclorometano/agua, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a sequedad. Finalmente se purifica por el método de cromatografía en columna con gel de sílice como fase estacionara y gradientes de hexano/acetato de etilo como fase móvil, obteniendo un sólido guinda y con un rendimiento de 90%.

Síntesis de aminocarbeno

Para llevar a cabo la reacción se pesa 1 g del etoxicarbeno (2.3 mmol) y se disuelven en 10 mL de éter etílico, posteriormente se agrega (3 eq) de la amina correspondiente (etanolamina (6.8 mmol), 2-picolilamina (7.38 mmol)). La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente siguiéndola por cromatografía en capa fina, en un tiempo de aproximadamente 10-15 minutos. La mezcla de reacción se extrae con diclorometano y agua, la fase móvil se seca con Na_2SO_4 . El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna con gel sílice como fase estacionaria y gradientes de hexano/acetato de etilo como fase móvil.

Síntesis de selenoamida

En un matraz bola se agrega NaBH_4 (10 eq) y se disuelve en 20 mL de etanol, llevando a 0 °C. Posteriormente se adiciona Se (10 eq) lentamente durante un tiempo de 30 minutos observando una tonalidad vino. La reacción se retira del baño de hielo y se agrega el aminocarbeno dejando en agitación por 2 h. Una vez terminado este tiempo, se evapora el disolvente y se realizan extracciones $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Finalmente se purifica en columna con gel de sílice como fase estacionara y gradientes de hexano/acetato como fase móvil.

Conclusiones

Se logró la síntesis 4 diferentes metalloceno-selenoamidas empleando una metodología sencilla a partir de intermediarios claves como lo son los aminocarbenos de Fischer lográndolas obtener en tiempos cortos y con buenos rendimientos de reacción.

Con lo que respecta al análisis citotóxico mediante el estudio de screening primario se observó que presentan una importante actividad específicamente sobre tres líneas celulares de cáncer humano: U251, PC-3 y HCT-15.

Con base al resultado obtenido del estudio de screening primario, se obtuvieron valores de concentración inhibitoria CI_{50} , mostrando que el cambio de metalloceno en dichos compuestos influye de una forma de manera importante sobre la actividad que presentan, tal es el caso de los compuestos que tienen Fc en la estructura ya que presentan una mejor actividad comparado contra los fármacos comerciales, por otro lado en el caso de los compuestos que poseen Rc, al igual que los compuestos anteriores presenta una mejor actividad sumando que tienen mayor selectividad sobre la línea celular de cáncer U251.