



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE RUTENIO CON DERIVADOS DE
LA STAUROSPORINA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LIC. MARÍA OLGA VAQUERA IBARRA

DR. RONAN LE LAGADEC
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE RUTENIO CON
DERIVADOS DE LA STAUROSPORINA**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LIC. MARÍA OLGA VAQUERA IBARRA



Ciudad de México, julio del 2020.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens Facultad de Química, UNAM

SECRETARIO: Dr. José Ivan Castillo Pérez Instituto de Química, UNAM

VOCAL: Dra. Larissa Alexandrova Instituto de Investigación en Materiales, UNAM

VOCAL: Dr. Jean Michel Grevy Macquart Centro de Investigaciones Químicas, UAEM

VOCAL: Dr. David Morales Morales Instituto de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de química inorgánica 2
Instituto de química
Ciudad Universitaria, UNAM

TUTOR:

Dr. Ronan Le Lagadec

SUSTENTANTE:

Lic. María Olga Vaquera Ibarra

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ronan Le Lagadec, por permitirme desarrollar este proyecto bajo su tutela, por su infinita paciencia, por la requerida exigencia y por sus valiosas enseñanzas.

A los sinodales: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens, Dr. José Ivan Castillo Pérez, Dra. Larissa Alexandrova, Dr. Jean Michel Grevy Macquart y Dr. David Morales Morales, por sus lucrativas aportaciones y por su apoyo en la revisión de este trabajo.

Al CONACyt, por el proyecto de ciencia básica A1-S-15068 y el proyecto CONACyT ECOS Nord 279063, que brindaron financiamiento para este proyecto, así como por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (No. CVU: 844411).

A DGAPA, por el financiamiento a través del proyecto PAPIIT IN-207419.

Gracias a mis padres, Humberto Vaquera y Olga Ibarra por ser los principales promotores de mis sueños y por cada día alentarme a ser una mejor persona. A mi hermana Celia Vaquera, por ser un modelo a seguir, por su increíble bondad y apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio y de clases, Andrés Solís, Nicolás Sánchez, Carolina Torres, Fernando Martínez, Manuel Roque, Eduard Torres, Juan Carlos Temich, Elkin Sánchez, Camilo Restrepo, Isabel Murillo, Luis Tiscareño, Mauricio Villaverde, Alicia Reyes, Belén Escobar, Miroslava Arronte, Emmanuel Figueroa, Héctor Torres, Rodary Dymarcuz, Claudia Villamizar, Bertín Anzaldo, Mitzy Amador y Fernanda Córdoba por la motivación, consejos y memorables experiencias.

A Serhii Samoilov por ser una maravillosa persona que me ha enseñado con su ejemplo que es posible salir adelante trabajando arduamente. X

A mis amigos, Dulce Monroy, Gustavo Álvarez, Arely Ortiz, Adriana García, Alejandra De la Rosa, Ángel Castañeda, Paulina Levario, Valeria Ramirez y Maximiliano De la Higuera por estar siempre presente en los eventos más importantes de mi vida.

Al Posgrado de Ciencias químicas, al Instituto de Química y a mis profesores por la formación profesional.

El presente trabajo fue presentado en la modalidad de póster en los siguientes congresos:

- Simposio interno del instituto de química
19-21 Junio, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México.
- 7° Simposio latinoamericano de química de coordinación y organometálica (SILQCOM7).
27-30 Agosto 2019, Cartagena de Indias, Colombia
- Conferencia internacional sobre polímeros y materiales avanzados (POLYMAT).
20-25 Octubre 2019, Huatulco, México.

Resumen

Las proteínas quinasas son enzimas que activan un gran número de procesos biológicos en la célula, algunos de ellos, asociados directamente con el desarrollo del cáncer. Al respecto, se ha reportado que algunos compuestos de Ru(II) con ligantes de indolocarbazol como la staurosporina, han tenido gran influencia en el diseño de nuevos compuestos de Ru(II) como agentes inhibidores de proteínas quinasas en la vía de señalización Hippo.

Por su parte, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en estudiar la actividad citotóxica y los mecanismos de acción de compuestos ciclometalados con un ligante C^N (C^N = 2-fenilpiridina ciclometalada). Los prometedores resultados observados en ambas clases de compuestos (compuestos ciclorutenados y compuestos con ligantes derivados de la staurosporina), inspiró el desarrollo del presente trabajo.

Inicialmente se pensó que el incorporar la staurosporina como ligante a los compuestos ciclorutenados estudiados en nuestro grupo, aportaría información valiosa para el diseño racional de fármacos mas eficientes y menos tóxicos a los empleados actualmente en la quimioterapia. En este escrito se presenta la síntesis de dos nuevos compuestos ciclometalados de rutenio, empleando como ligantes moléculas inspiradas en la staurosporina.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 <i>Cáncer</i>	10
2.2 <i>Metales de transición como agentes anticancerosos</i>	14
2.2.1 Rutenio como agente anticanceroso	19
2.2.1 Citotoxicidad de compuestos de rutenio(II)	19
2.2.2 Compuestos ciclometalados de rutenio	23
2.3 <i>Proteína quinasas</i>	31
2.3.1 Vía de señalización Hippo en cáncer	33
2.3.2 Compuestos de rutenio(II) como inhibidores de proteína quinasas	36
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 <i>Objetivo general</i>	41
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	41
5. METODOLOGÍA	42
5.1 <i>Reactivos y disolventes</i>	42
5.2 <i>Equipos y técnicas espectroscópicas</i>	42
5.3 <i>Síntesis de los ligantes</i>	43
5.3.1 Reacciones para la síntesis del ligante 22	43
5.3.2 Reacciones para la síntesis del ligante 26	51
5.4 <i>Obtención de complejos de rutenio precursores</i>	55
5.4.1 Síntesis del precursor de rutenio 30	55
5.4.2 Síntesis del precursor de rutenio 33	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1 <i>Diseño de los complejos</i>	61
6.2 <i>Síntesis de los ligantes</i>	63
6.3 <i>Síntesis de los complejos precursores de rutenio</i>	74
6.4 <i>Pruebas de coordinación de ligante</i>	75
6.4.1 Reacción del precursor de rutenio 30 con el ligante 18	75
6.4.2 Intento de reacción del precursor de rutenio 33 con el ligante 18	81
6.4.3 Intento de reacción del precursor de rutenio 30 con el ligante 24	83
6.4.4 Intento de reacción del precursor de rutenio 33 con el ligante 24	83
6 CONCLUSIONES	87
7 PERSPECTIVAS	88
8 REFERENCIAS	89

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades con gran incidencia y que provoca más muertes a nivel mundial; tan solo en 2018 se registraron más de 18 millones de casos y más de 9 millones de muertes asociadas a este padecimiento. Según estimaciones de la organización mundial de la salud, para el 2040 la incidencia de casos de cáncer se incrementará más del 60% (>11 millones de casos) y la mortalidad aumentará en un 71% (>6 millones de muertes) [1].

Entre los tratamientos oncológicos disponibles, uno de los más empleados es la quimioterapia, que actúa previniendo la división celular y desencadenando la muerte de las células cancerosas por diversos mecanismos [2]. El fármaco cisplatino y algunos derivados como el carboplatino y el oxaliplatino son de los más utilizados actualmente en la clínica para el tratamiento de numerosas formas de cáncer humano, aunque su valor terapéutico está limitado por la toxicidad dependiente de la dosis y la resistencia adquirida. En total, un paciente puede experimentar cualquier combinación de alrededor de 40 efectos secundarios que van desde diarrea, vómito, alopecia, astenia hasta nefrotoxicidad en el caso del cisplatino, mielosupresión en el caso del carboplatino y neurotoxicidad por parte del oxaliplatino. Los efectos secundarios pueden requerir que los pacientes suspendan el tratamiento [3].

Por estas razones, se está investigando una variedad de compuestos a base de otros metales como agentes anticancerosos alternativos. Algunos compuestos con metales de transición del grupo VIII (hierro, rutenio y osmio) son muy prometedores ya que han demostrado una alta actividad citotóxica en células cancerígenas y una menor toxicidad en células sanas en comparación con complejos de platino. Tomando en cuenta estas ventajas, nuestro grupo de investigación ha preparado complejos ciclometalados de rutenio(II) (RDC) y osmio(II) (ODC) altamente tóxicos en células cancerosas [4].

El emplear rutenio resulta de particular interés ya que en comparación con el platino, el rutenio tiene un mayor número de coordinación (usualmente 6 sitios vacantes), adquieren diversas geometrías (octaédrica, bipirámide trigonal, medio sándwich, entre otras) y

varios estados de oxidación (comúnmente 0, +2, +3 y +4 aunque se han reportado compuestos con estados de oxidación desde -2 hasta +8). Además, se considera menos tóxico, aparentemente porque puede entrar en las rutas metabólicas del hierro e ingresar a las células cancerosas por los receptores de transferrina sobreexpresados en la superficie celular, actuando como un fármaco dirigido [2]. Otra de sus propiedades destacables, es que los compuestos basados en Ru(II) pueden funcionar también como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica, que ha demostrado ser una nueva modalidad de oncoterapia eficaz y no invasiva [5].

En la gama de compuestos de rutenio estudiados para tratar el cáncer destacan los complejos NAMI-A, KP1019, KP1339 y TLD-1433 ya que lograron entrar a fases clínicas, así como DW1/2 que entró a fases preclínicas. El compuesto de Ru(II), DW1/2 y complejos derivados con ligantes de alcaloides de indolocarbazol como la staurosporina, han tenido gran influencia en el diseño de nuevos compuestos de Ru(II) como agentes anticancerosos por presentar una notable actividad citotóxica en el rango nanomolar y se ha comprobado que actúan como inhibidores de proteína quinasas [2].

Los resultados prometedores que ha mostrado esta clase de compuestos, inspiró el desarrollo del presente trabajo. En este escrito se presentan varios intentos realizados para sintetizar cuatro nuevos complejos ciclometalados de rutenio con ligantes derivados de la staurosporina y se esperaba en este año poder realizar estudios sobre su posible actividad biológica como una extensión a este proyecto.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2018 ocasionó más de 9 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad y cerca del 70% de las muertes asociadas a cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos, debido en gran medida, a limitantes económicas para someterse a un tratamiento y a la falta de detección temprana [6].

Frecuentemente el cáncer se asocia como una condición única, aunque en realidad consiste en más de 100 tipos diferentes. Estas enfermedades se caracterizan por un crecimiento y propagación descontrolada de células anormales, que suelen acumularse en una masa o tumor amorfo [7]. Las células cancerosas pueden adquirir resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia, lo que ha dificultado conseguir un tratamiento efectivo [8].

Aunque las causas del cáncer siguen siendo en gran medida desconocidas, normalmente se asocia a factores genéticos y a tres categorías de agentes carcinógenos externos: agentes físicos (radiaciones ultravioletas e ionizantes), agentes biológicos (determinados virus, bacterias y parásitos) y agentes químicos (componentes del humo de tabaco, contaminantes del agua como el arsénico, entre otros) [6]. Por otra parte, se ha observado que factores como la edad avanzada, la obesidad, la inactividad física y los malos hábitos alimenticios aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad [9].

El cáncer puede surgir en prácticamente cualquier parte del cuerpo (sangre, huesos, piel, ojos, colon, vejiga, próstata, estómago, senos, pulmones, hígado, páncreas, ovarios entre otros sitios) y comportarse de manera diferente según su tejido de origen y además, puede seguir un proceso metastásico. La metástasis se caracteriza por una serie de pasos secuenciales: la formación de un tumor primario, el proceso de angiogénesis, el tránsito de las células diseminadas en el torrente sanguíneo y la colonización para formar un tumor secundario al llegar a un sitio secundario adecuado (**Figura 1**) [10].

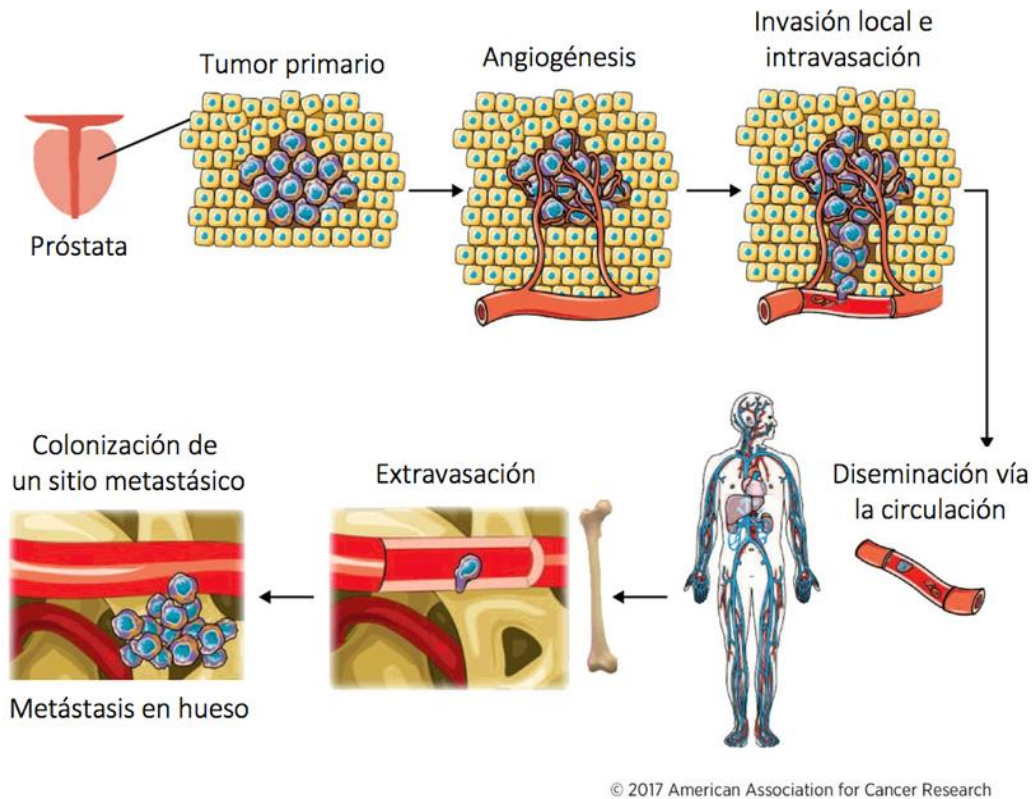
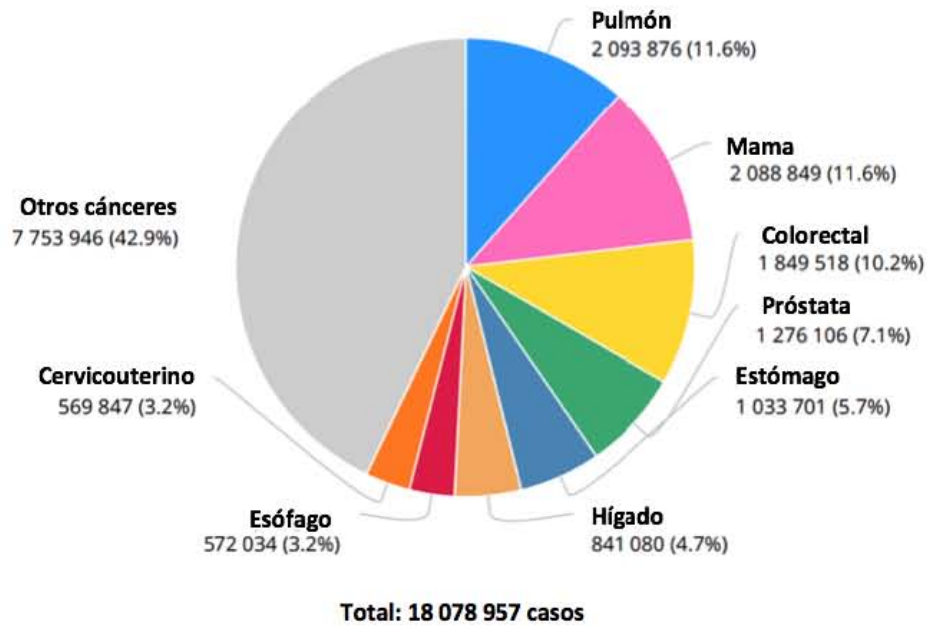


Figura 1. Pasos del proceso metastásico [10].

Los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en el 2018 a nivel mundial, fueron el cáncer pulmonar (11.6%), el mamario (11.6%), el colorectal (10.2%), de próstata (7.1%) y el gástrico (5.7%); asimismo, los que causaron un mayor número de fallecimientos en ese año fueron el pulmonar (18.4%), el colorectal (9.2%), el gástrico (8.2%), el hepático (8.2%) y el mamario (6.6%) como se puede observar gráficamente en la **Figura 2** [1].

Número de nuevos casos en 2018, ambos sexos, todas las edades



Número de muertes en 2018, ambos sexos, todas las edades

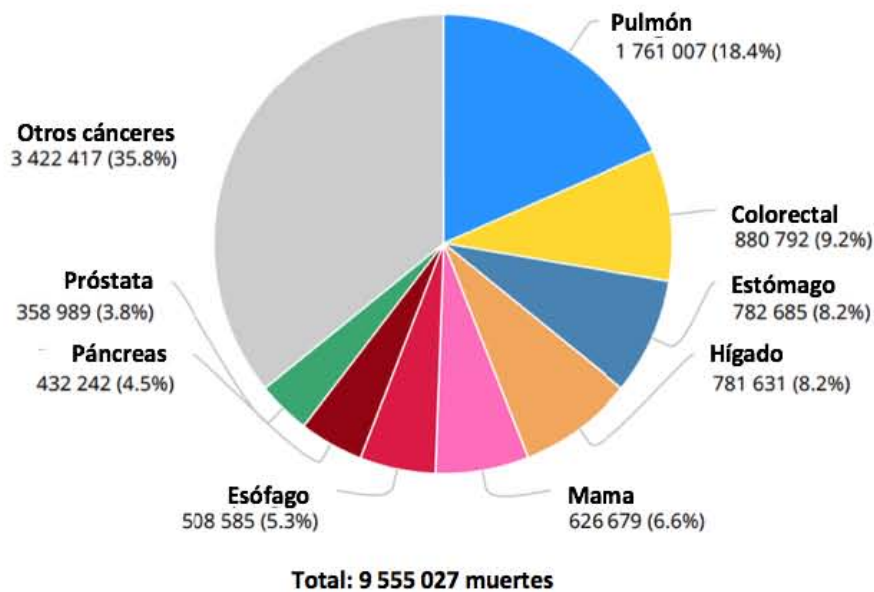


Figura 2. Nuevos casos de cáncer en el mundo registrados en 2018 (arriba), muertes asociadas a cáncer en 2018 (abajo) [1].

Según predicciones del “Global Cancer Observatory”, se estima que en 20 años habrá un aumento de personas con cáncer del 63% y un aumento en el índice de mortalidad de más del 71% (**Tabla 1**) [1].

Tabla 1. Estimación de nuevos casos de cáncer y mortalidad asociada a nivel mundial en el 2040 [1].

	Número en 2018	Número en 2040	Cambio demográfico
Incidencia	18,078,957	29,532,994	11,454,037 (+63.4%)
Mortalidad	9,555,027	16,388,459	6,833,432 (+71.5%)

todos los tipos de cáncer, ambos sexos y todas las edades

El tratamiento para los distintos tipos de cáncer depende de sus respectivas particularidades, pero en general los tratamientos disponibles son los siguientes [11]:

Cirugías: remueve un tumor sólido mediante una intervención quirúrgica.

Radioterapia: usa altas dosis de energía de rayos X o rayos gama para dañar el ADN y matar células cancerosas.

Quimioterapia: se utilizan fármacos para matar células cancerosas.

Hormonoterapia: se bloquean hormonas que nutren algunos tipos de cáncer como el de mama y de próstata.

Otros: incluyen el trasplante de médula ósea, la inmunoterapia y la terapia dirigida.

Una de las mayores preocupaciones en el sector salud a nivel mundial, es que actualmente no existe una terapia oncológica que pueda curar la mayoría de las formas de tumores diseminados, por lo que es primordial y necesario el desarrollo de nuevos fármacos activos [2].

2.2 Metales de transición como agentes anticancerosos

Se tiene reporte de una enorme cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que han sido estudiados como agentes anticancerosos, no obstante, los metales de transición ofrecen características únicas que pueden ser aprovechadas en sistemas biológicos, que incluyen [12]:

Variación de la carga: dependiendo de su esfera de coordinación, pueden formar especies catiónicas, aniónicas o neutras. Asimismo, los iones cargados positivamente en disolución acuosa se pueden enlazar a moléculas biológicas cargadas negativamente.

Estructura: los metales se pueden coordinar a un mayor número de ligantes en comparación con un átomo de carbono, consiguiendo geometrías, longitudes y ángulos de enlace que no pueden tener las moléculas orgánicas convencionales. Además, el incremento en los ligantes conlleva a un aumento en las posibilidades estructurales que se pueden explorar. Por ejemplo, un centro metálico hexacoordinado puede tener hasta 30 estereoisómeros (ver **Nota 1**), en contraste con los 2 que puede tener un carbono con 4 ligantes (**Figura 3**).

Interacción metal-ligante: las propiedades termodinámicas y cinéticas de las interacciones metal-ligante influyen en las reacciones de intercambio de los ligantes cuando interactúan con moléculas biológicas.

Nota 1. Los estereoisómeros quirales (enantiómeros y diastereoisómeros) son fundamentales en la preparación de compuestos destinados a actuar en organismos con fines terapéuticos. En la mayoría de los procesos biológicos, la interacción fármaco-receptor es análoga a la unión de dos piezas de un rompecabezas, pues sólo la molécula con la configuración adecuada “encajará” en el sitio activo del receptor y el fármaco presentará un efecto mayor cuanto mejor sea esta compatibilidad [13].

Propiedades de ácido de Lewis: debido a la alta afinidad electrónica, la mayoría de los iones metálicos pueden polarizar fácilmente grupos que se coordinan con ellos, lo que facilita su hidrólisis.

Orbital d parcialmente lleno: influye en las propiedades magnéticas y electrónicas que pueden tener los complejos.

Actividad redox: El estado de oxidación de los iones metálicos es importante para el desempeño de muchas de las reacciones enzimáticas. Frecuentemente, los iones metálicos participan en la acumulación de carga en sitios redox activos y sirven para activar los sustrato. De hecho, es posible controlar el potencial redox de los complejos de tal manera que se pueden favorecer reacciones redox con sustratos biológicos.

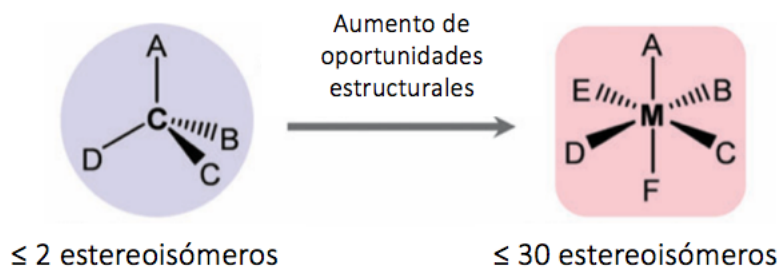


Figura 3. Número de posibles estereoisómeros como indicador de oportunidades estructurales que puede proporcionar un solo átomo central [14].

En los años 1960, Barnett Rosenberg descubrió que la molécula de cisplatino era un agente anticanceroso, con tasas de supervivencia del paciente por arriba del 90% en el tratamiento de cáncer testicular [15]. A pesar de su trascendental éxito, el valor terapéutico del cisplatino se vio limitado por la toxicidad dependiente de la dosis, la resistencia adquirida y un gran número (alrededor de 40) de efectos secundarios que causa, entre los que se incluyen vómito, alopecia, astenia y nefrotoxicidad [3]. Desde entonces, ha habido un gran interés en complejos de Pt(II) y otros metales para fines terapéuticos.

La quimioterapia se ha revolucionando enfocándose en un diseño racional de compuestos inorgánicos para mejorar la actividad terapéutica en los diferentes tipos de cáncer. Se han sintetizado y probado en células cancerosas más de 3,000 derivados de platino y se han explorado otros compuestos de coordinación de oro, rutenio, titanio, cobre, entre otros, que tienen registros en fases preclínicas y clínicas (**Figura 4**) [12].

Los compuestos a base de Pt(II) (por ejemplo cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y lobaplatino) son el tratamiento de primera línea en varios tipos de cáncer, ya sea solos, en combinación con radioterapia o con otros medicamentos antitumorales. Sus efectos citotóxicos son el resultado de la formación de aductos con el ADN (**Figura 5**), que por muchos años fue el principal blanco para generar la apoptosis. Sin embargo, en la actualidad se conocen otras vías de acción que han sido estudiadas para complejos de Pt, Au, Ru, Ti, Pd, Ir Cu, V, Co, Ga y Os que se resumen en la **Figura 6** [15].

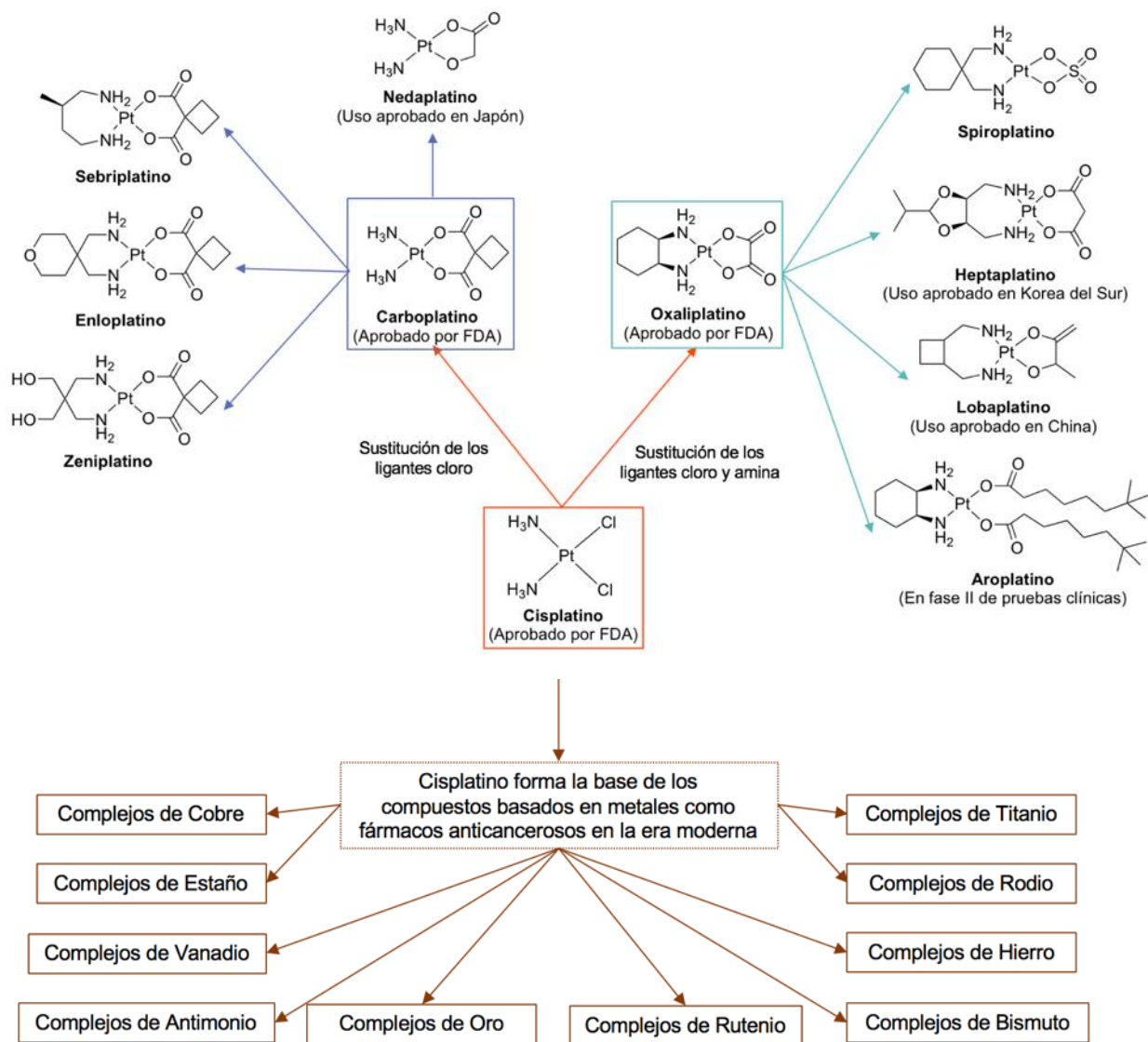


Figura 4. Evolución de los complejos de coordinación a partir del cisplatino en la terapia del cáncer [12].

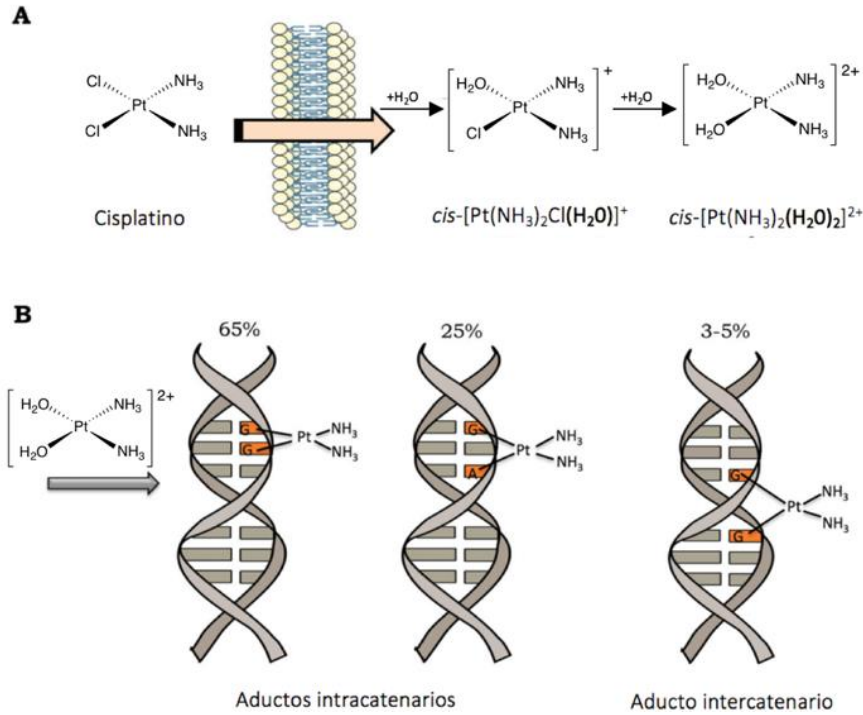


Figura 5. Activación del cisplatino y daño al ADN. A) Activación del cisplatino por el intercambio de cloruro por moléculas de agua. B) Formación de enlaces covalentes del cisplatino con el ADN [16].

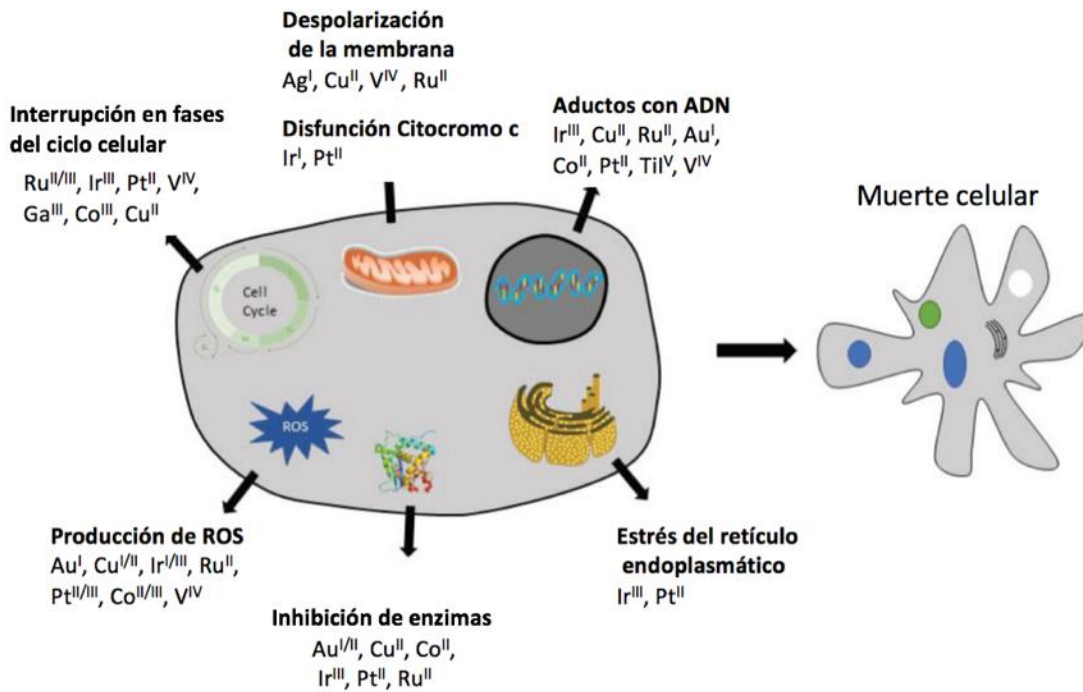


Figura 6. Esquemización de los mecanismos de acción de complejos metálicos que promueven la muerte celular [15].

2.2.1 Rutenio como agente anticanceroso

Entre los diversos metales de transición empleados como agentes anticancerosos, los compuestos de rutenio son una opción muy atractiva e intrigante en comparación a la quimioterapia basada en platino. En contraste a los compuestos de Pt(II) que solo forman complejos cuadrados planos, el rutenio tiene hasta seis sitios de coordinación permitiendo que los complejos puedan adquirir diferentes geometrías (octaédrica, bipirámide trigonal o pirámide de base cuadrada) y puedan ocupar un mayor número de posiciones espaciales, permitiendo la exploración de una mayor y variada gama de ligantes. Los ligantes juegan un papel fundamental ya que tienen diferentes cinéticas de intercambio que pueden modular la reactividad del complejo [15,17].

Por otro lado, los complejos de rutenio pueden existir en múltiples estados de oxidación (II, III y IV) bajo condiciones fisiológicas, una ventaja en el ambiente reductor de los tejidos cancerosos [15]. Aunado a esto, son activos en algunas líneas celulares resistentes a cisplatino, presentan múltiples mecanismos de acción que conllevan a la muerte celular (**Figura 6**) y tienen menor toxicidad que los complejos de platino [2].

La menor toxicidad del rutenio se debe en parte a la capacidad del Ru(III) de utilizar los mecanismos de transporte del hierro, es decir, puede unirse a moléculas biológicas en el torrente sanguíneo como la albúmina y la transferrina, disminuyendo así la concentración de rutenio en el plasma sanguíneo y aumentando la concentración que puede llegar a las células de cáncer. Además, el rutenio tiene una mayor selectividad a células tumorales con receptores de transferrina sobreexpresados que a tejidos sanos [12,15,18].

2.2.1 Citotoxicidad de compuestos de rutenio(II).

Hay una gran cantidad de complejos de rutenio con diferentes ligantes que han sido probados o están siendo estudiados como potenciales agentes anticancerosos. Hasta ahora los compuestos de rutenio(III) NAMI-A, KP1019, (N)KP1339 y de rutenio(II)

TLD1433 han llegado a diferentes fases de ensayos clínicos (**Figura 7**) [19]. Para aceptar un nuevo tratamiento, el fármaco tiene que pasar por distintas fases de ensayos clínicos (I-IV) en humanos. Cada fase tiene objetivos diferentes [20]:

Fase I: definir la máxima dosis tolerable y realizar estudios farmacocinéticos.

Fase II: establecer la eficacia del fármaco candidato y evaluar los efectos secundarios.

Fase III: comparar si el tratamiento es mejor que un tratamiento estándar.

Fase IV: vigilancia post-comercialización de efectos secundarios a largo plazo.

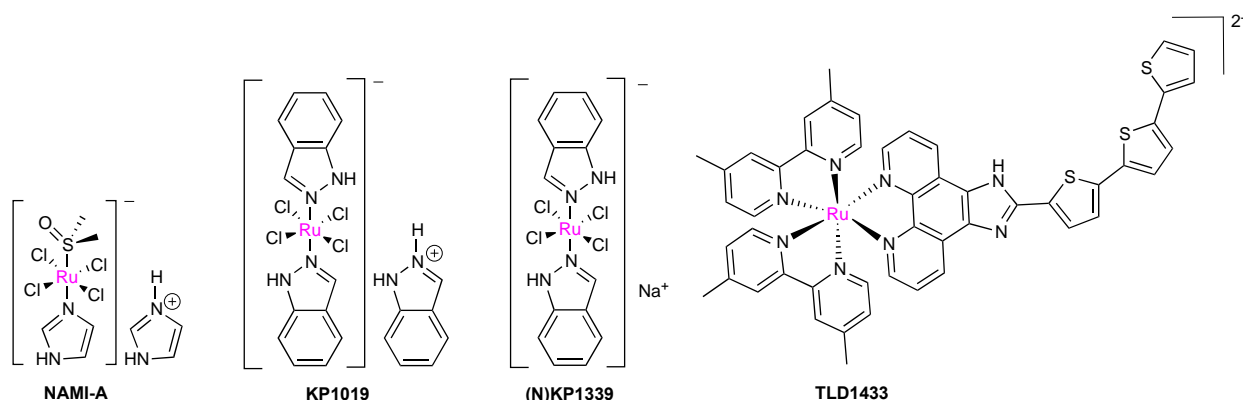


Figura 7. Estructuras de los complejos de rutenio estudiados en fases clínicas [19].

El primero en entrar a ensayos clínicos fue el imidazolio de *trans*-[tetracloro(dimetil sulfóxido)(imidazol)rutenato(III)] (NAMI-A) estudiado por el grupo de Alessio. Este compuesto presentó una baja citotoxicidad pero fue capaz de inhibir hasta en un 100% la metástasis de los tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas (*non small cell lung cancer*) en la fase I de las pruebas clínicas [21]. El éxito en el control de la metástasis fue asociado en parte con la disminución de la angiogénesis tumoral, pero también a que el compuesto NAMI-A se enlaza selectivamente a las células metastásicas que tienen diferencias significativas a las células del tumor primario (**Figura 8**) [22]. Sin embargo, en la fase II de los ensayos clínicos, mostró una eficacia limitada en la progresión de la enfermedad, lo que restringió la realización de más estudios [19].

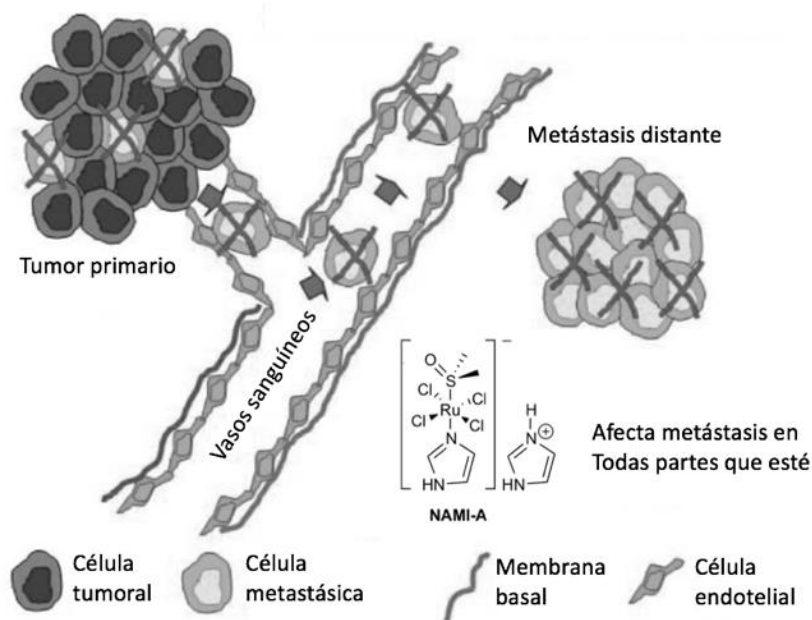


Figura 8. Efecto anti-metastásico selectivo por NAMI-A y una disminución menor del tumor primario [22].

El compuesto KP1019 sintetizado por el grupo de Keppler y relacionado estructuralmente al NAMI-A, logró entrar a la primera fase clínica en pacientes con cáncer de colon. Este compuesto actúa rompiendo el equilibrio redox en la célula, lo que bloquea la síntesis de ADN e induce la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Sin embargo, la baja solubilidad en agua limitó que se siguiera estudiando. Actualmente, su versión soluble en agua, la sal de sodio (N)KP1339 se encuentra en pruebas clínicas [19].

Asimismo, el TLD1433 es un compuesto polipiridínico de Ru(II) que está en fase II de ensayos clínicos en el tratamiento de cáncer de vejiga con terapia fotodinámica (Ver **Nota 2**). El TLD1433 sintetizado por McFarland, mostró propiedades anticancerosas y fototóxicas intrínsecas con un IC₅₀ en el rango micromolar [19,23].

Nota 2. La terapia fotodinámica (PDT) es un tratamiento que requiere luz y la aplicación sistémica o local de un compuesto o medicamento, a veces denominados como agentes fotosensibilizantes. Clínicamente se utiliza para tratar diversas afecciones, incluida la psoriasis, la aterosclerosis, cánceres malignos, entre otros. Los medicamentos solo funcionan después de haber sido activados por ciertos tipos de luz y el efecto se limita a la región donde se combinan la luz y el fármaco para que se destruya el tejido maligno, mitigando así los efectos secundarios asociados con la quimioterapia [24,25].

Además de los compuestos de coordinación como el NAMI-A y el KP1019, varios tipos de compuestos organometálicos tienen potencial como agentes inhibidores de tumores. Los complejos más exhaustivamente estudiados son la familia de los compuestos tipo medio sándwich mejor conocidos como *piano-stool* (silla de piano), caracterizados por tener tres sitios de coordinación del átomo de rutenio ocupados por un anillo aromático neutro o aniónico [26]. Entre los compuestos con un ligante areno neutro, se encuentra la familia de compuestos denominados RAPTA, que ya han sido evaluados en modelos pre-clínicos [12].

Los compuestos RAPTA tienen la fórmula general $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (**Figura 9**). Estructuralmente, cuentan con un ion de Ru(II) estabilizado por un ligante areno, la fosfina anfifílica PTA (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano) y dos ligantes lábiles que usualmente son cloruros. Los compuestos RAPTA-T y RAPTA-C exhibieron baja toxicidad *in vivo* y demostraron una acción notable sobre los tumores metastásicos [12,26]. Interesantemente, las respuestas en sistemas biológicos de los compuestos RAPTA pueden modularse de manera sistemática manipulando los grupos unidos al anillo areno [2,23].

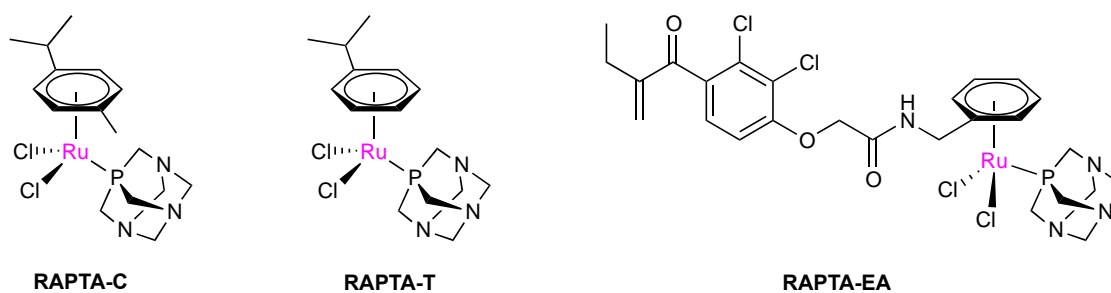


Figura 9. Compuestos RAPTA en fase preclínica [23].

2.2.2 Compuestos ciclometalados de rutenio

La ciclometalación se refiere a la activación de un enlace C-R mediada por un metal de transición para formar un metalociclo que comprende un nuevo enlace σ metal-carbono (**Figura 10**). Típicamente, hay una coordinación inicial del centro metálico a través de un átomo donador y posteriormente ocurre una activación intramolecular del enlace C-R, que cierra el ciclo metálico. La activación efectiva del enlace C-R frecuentemente es un proceso asistido por heteroátomos donantes como N, O, P, S, Se y As, aunque también se conocen casos de activación de enlaces C-R asistidos por carbono [27].

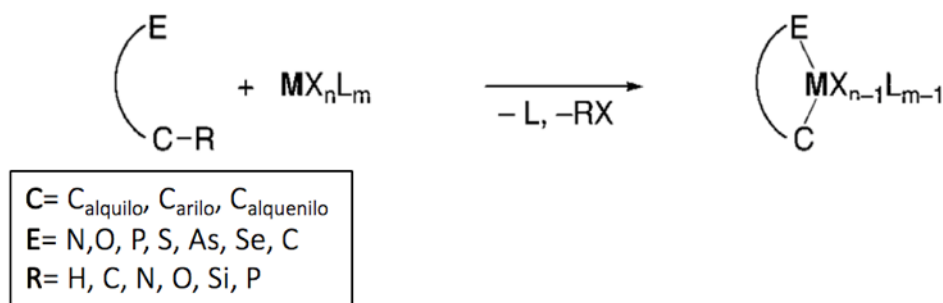


Figura 10. Reacción de ciclometalación [27].

La ciclometalación puede ocurrir a través de distintos mecanismos, como la activación de C-H por el átomo de metal, la transmetalación, mediante una adición oxidativa, entre otros [27]. En este contexto, nuestro grupo de investigación fue pionero en sintetizar y estudiar una serie de complejos ciclometalados de Ru(II) (**Figura 11**), denominados RDC (*Ruthenium Derived Compounds*). [28,29,30].

Previo a los estudios biológicos realizados por nuestro grupo de investigación, algunos de los compuestos de Ru(II) que se habían probado como agentes anticancerosos, contienen ligandos polipiridínicos que se unen débilmente al metal a través de un N, por lo que es muy factible que en algún momento en pruebas *in vivo*, los ligandos se disocien del metal y aminoren su actividad. En cambio, se razonó que en los RDC al tener un

enlace C-M σ -estabilizado por la coordinación intramolecular de un heteroátomo, los ligandos podrían permanecer unidos al metal durante todo el proceso biológico, mientras que los ligandos más lábiles podrían disociarse y unirse a moléculas como a proteínas o al ADN [28].

Aunado a lo anterior, en otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que los RDC son mediadores muy eficientes en la transferencia de electrones hacia o desde sitios activos oxidados o reducidos de enzimas redox [31], por lo que se decidió probar la actividad en células tumorales y se compararon con la actividad del cisplatino y de los compuestos de coordinación **C1** y **C2**. Los resultados presentados en la **Tabla 2**, demostraron que algunos RDC tienen una citotoxicidad igual o mayor que el cisplatino, al igual que una mayor eficiencia en comparación a las dos referencias de compuestos de coordinación [28].

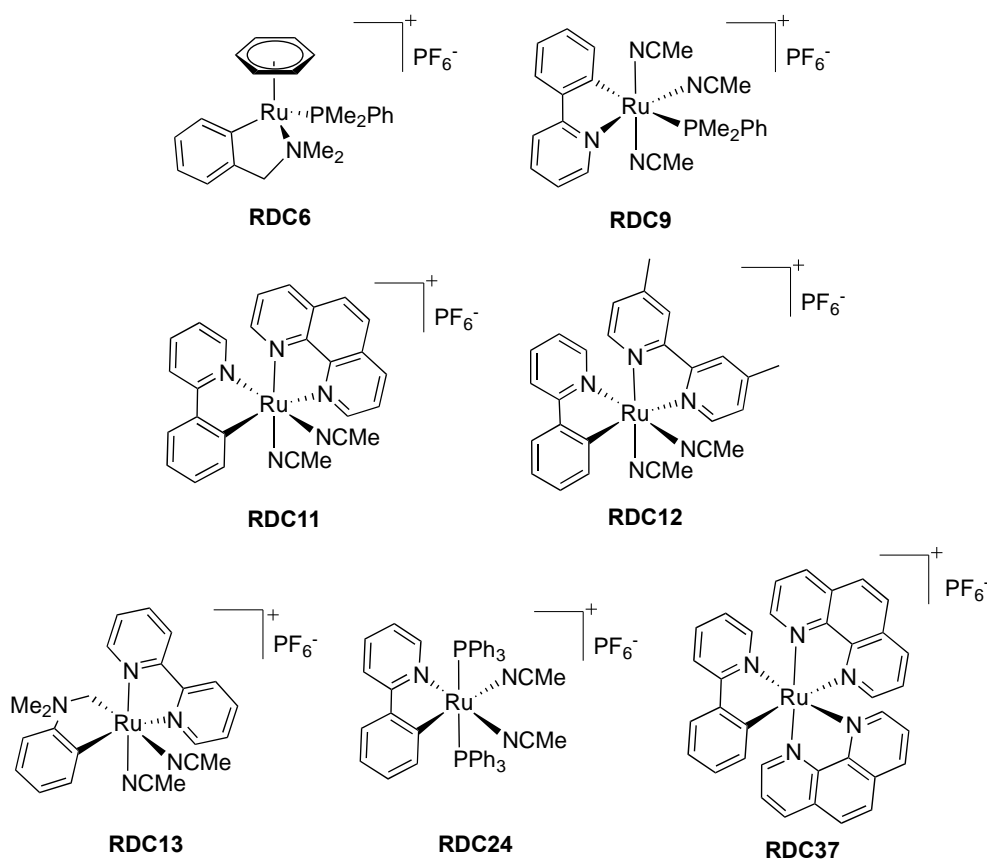


Figura 11. Ejemplos de RDCs [26,28].

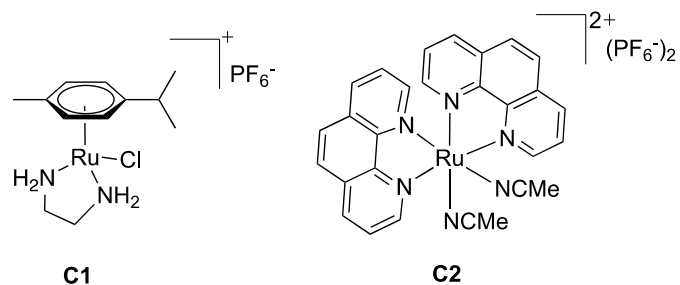


Tabla 2. Comparación entre la citotoxicidad de los RDC, del cisplatino y de compuestos de coordinación (**C1** y **C2**) en distintas líneas celulares. Valores de IC₅₀ reportados en μM [28].

	Línea celular		
	A-172 (cáncer de cerebro)	HCT-116 (cáncer de colón)	RDM-4 (linfoma)
RDC6	4.8	3	30
RDC9	1.7	3	10
RDC11	1.9	3	10
RDC12	3	3	10
RDC13	12	10	10
RDC24	15	5	---
RDC37	---	< 2	---
Cisplatino	3.9	3	3
C1	5	20	---
C2	>50	>50	---

En la familia de los RDCs, el compuesto RDC11 fue uno de los que presentó resultados muy prometedores y por lo tanto, uno de los más estudiados por nuestro grupo de investigación. Entre las ventajas observadas, las células no mostraron resistencia al RDC11 en pruebas *in vitro* con distintas líneas celulares cancerosas en contraste con el cisplatino (**Tabla 3**), y no presentó efectos secundarios severos en hígado, pulmón o en el sistema neuronal en ensayos con ratones. Además, se demostró que los RDCs se concentraban tanto en el núcleo como en el retículo endoplásmico, lo que está asociado a la activación de diferentes vías de señalización y se asocia con la mayor citotoxicidad exhibida [21].

Por otro lado, se observó que el aumento de la planaridad del ligante incrementa la lipofilicidad de algunos complejos de rutenio. La relación estructura-actividad reveló que la mayor lipofilicidad incrementa significativamente la captación celular que puede ser

parcialmente responsable de la mejor respuesta en la toxicidad [19]. Interesantemente, la capacidad de los RDCs para interactuar con el ADN, su potencial redox y su selectividad a células de cáncer de diferentes tejidos, cambia dependiendo de las características de los ligantes enlazados al rutenio. Este control en las propiedades dependiente de los ligantes, brindan la esperanza de que sea posible generar medicamentos de una misma familia de compuestos pero dirigidos a diferentes tipos de cáncer [21].

Tabla 3. Comparación entre la citotoxicidad del cisplatino y del RDC11 en distintas líneas celulares. Valores de IC₅₀ reportados en μM. [21].

Línea celular	Cisplatino	RDC11
TK6-WT (cáncer en la sangre)	6	3
TK6-NH32 (cáncer en la sangre)	12	4
2008-WT (cáncer cervical)	10	5
2008 ATP7B (cáncer cervical)	25	6
A2780 WT (cáncer de ovario)	10	2
A2780/CIS(cáncer de ovario)	30	2.5
U87 WT (cáncer de cerebro)	10	7.5
U87/CIS (cáncer de cerebro)	25	8.5

WT= sensible a cisplatino, CIS= resistente a cisplatino

El enlace organometálico carbono-metal confiere propiedades únicas en cuanto a la estabilidad y potencial redox del complejo, y se ha demostrado que juegan un papel fundamental en la actividad citotóxica. De hecho, los RDCs han mostrado una citotoxicidad *in vitro* superior a los equivalentes complejos de coordinación de Ru(II) con ligantes bi o tridentados. Muchos de los RDCs han presentado valores de IC₅₀<10 μM, mientras que se obtuvieron IC₅₀> 50 μM en compuestos donde el enlace C-Ru está ausente, como en [Ru(phen)₂(MeCN)₂](PF₆)₂ o [Ru(bipy)₃](PF₆)₂ (phen = 1,10-fenantrolina; bipy = 2,2'-bipiridina), que son los equivalentes polipiridínicos de RDC11 y RDC34 respectivamente [26].

Con base en los ejemplos publicados en la literatura y los observados por nuestro grupo de investigación, resulta muy difícil predecir el comportamiento que tendrán los complejos ciclometalados de rutenio. Por ejemplo, el compuesto **4** (**Figura 12**) tuvo un comportamiento inesperado [5,26]; los estudios en células de melanoma humano (SK-MEL-28) mostraron que **4** no era tóxico en la oscuridad ($EC_{50} > 300 \mu\text{M}$), pero si presentó un alto efecto fototóxico ($EC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$) cuando se le irradió con luz. El grupo de McFarland atribuyó este comportamiento a la presencia del ligante ciclometalado π -expansivo [5].

Esta conclusión la determinaron tras comparar el compuesto **4** con los compuestos **1-3** (**Figura 12**) relacionados estructuralmente, pero con una conjugación- π reducida en el ligante ciclometalado, es decir, con menos anillos aromáticos conectados a la unidad $N^{\wedge}C$. En este estudio, los compuestos **1-3** mostraron desde un inicio una alta toxicidad en la oscuridad, y también exhibieron un incremento en la toxicidad al irradiarles luz. Coincidentemente al comparar el índice fototóxico (PI; relación entre $EC_{50}(\text{oscuridad})$ y $EC_{50}(\text{luz})$), se observó que la contribución de la luz a la fotocitotoxicidad fue disminuyendo consecutivamente en los sistemas con ligantes menos π -expansivo en comparación con el compuesto **4** [5].

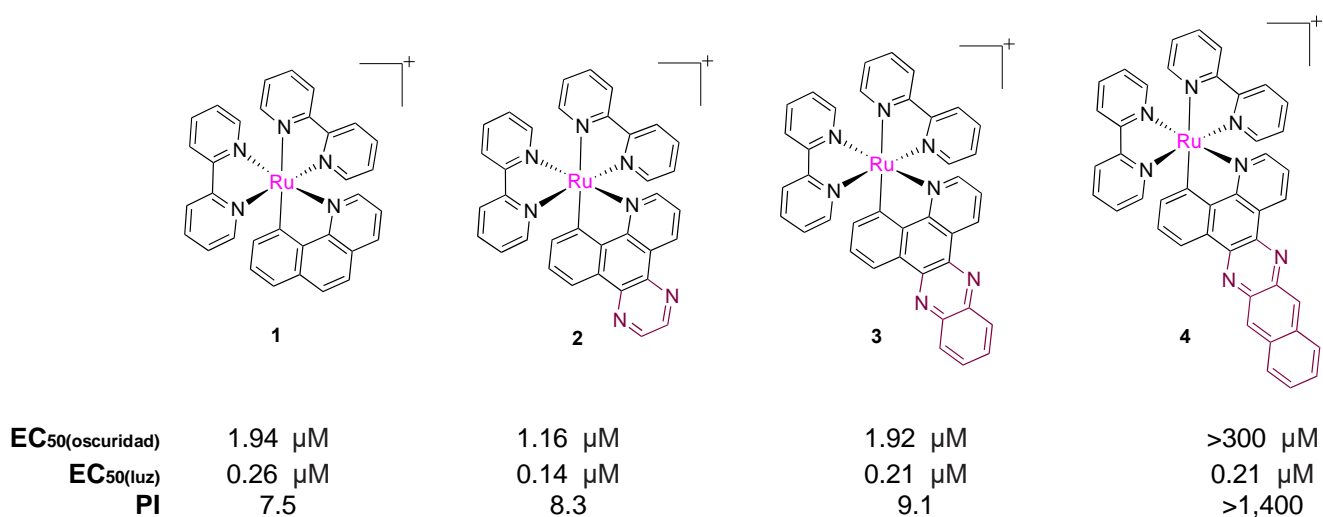


Figura 12. Comparación de EC_{50} en la oscuridad y después de irradiarles luz e índice fototóxico (PI) de compuestos ciclometalados de Ru(II) con ligantes π -expansivos en la unidad $N^{\wedge}C$ en estudios con la línea celular SK-MEL-28 (melanoma humano) [5].

Sin embargo, en un estudio reciente, nuestro grupo de investigación comparó el índice fototóxico de los compuestos **2** y **3** en líneas celulares de cáncer gástrico (KATO III y AGS; **Tabla 4**) [32]. Al comparar los PI obtenidos con los reportados en la línea celular de melanoma humano [5], no se observó el mismo comportamiento fototóxico. Es decir, en el estudio con células de cáncer gástrico, se obtuvieron valores de PI mayores para el compuesto **3** que para el compuesto **2**. Aunque de igual manera, ambos compuestos presentaron una alta toxicidad en la oscuridad, y también exhibieron un incremento en la toxicidad al irradiarles luz. Como se mencionó anteriormente, es muy difícil poder predecir el comportamiento que tendrán los complejos ciclometalados de rutenio, ya que como en este ejemplo, pueden haber variaciones en el comportamiento de un mismo compuesto frente a distintas líneas celulares.

Tabla 4. Índice fototóxico (PI) y valores de IC₅₀ en oscuridad y tras irradiación con luz (μM) de los compuestos ciclometalados **2** y **3** en líneas celulares de cáncer gástrico [32].

Compuesto	KATO III			AGS		
	Oscuridad	Luz	PI	Oscuridad	Luz	PI
2	0.91	0.27	3.37	0.87	0.34	2.56
3	0.41	0.35	1.17	1.30	0.75	1.73

A diferencia de otras familias de compuestos, los compuestos ciclorutenados tienen cierta estabilidad adicional debido al metalociclo Ru(C^N), lo cual ha permitido realizar estudios de la actividad del rutenio dentro de la célula y ha brindado información valiosa del mecanismo de acción de compuestos que contienen rutenio [26]. Por ejemplo, se han logrado grandes avances en la farmacoterapia dirigida con moléculas organometálicas, en donde el residuo orgánico se une al sitio activo de una enzima y el ion de rutenio se enlaza a los residuos cercanos de la misma enzima [12].

Con respecto a lo anterior, el grupo de Meggers ha desarrollado una extensa serie de eficaces inhibidores de quinasas como el compuesto DW1/2 (**Figura 13**). Las estructuras de los complejos de Meggers están inspiradas en la staurosporina, que inhibe proteínas quinasa al unirse competitivamente al sitio de unión de ATP de la enzima [26].

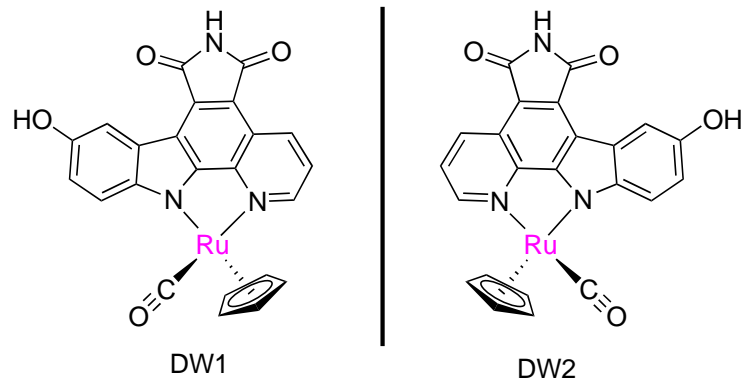


Figura 13. Estructura de los enantiómeros DW1 y DW2 [21].

En la siguiente tabla (**Tabla 5**), se resumen las principales características de algunos compuestos descritos en este capítulo [21].

Tabla 5. Principales características de algunos compuestos de rutenio II y III mencionados en este capítulo [21].

	NAMI-A	KP1019	RM175	RAPTA-T	RDC11	DW1/2
Estado de oxidación del Ru	III Se reduce fácilmente en presencia de reductores biológicos	III Se reduce fácilmente en presencia de reductores biológicos	II Coordinación con N7-Guanina e interacciones no covalentes debido a ligantes areno	II Menos que el cisplatino	II Interacciones débiles con el ADN y daños limitados en el ADN en comparación con el cisplatino	II Sin interacción con el ADN
Interacciones con ADN	Pocas y más débiles que el cisplatino	similar al cisplatino pero más débil				
Superación de la resistencia del cisplatino	Activo en tumores intrínsecamente resistentes al cisplatino.	Activo en tumores intrínsecamente resistentes al cisplatino.	Activo en el carcinoma de ovario A2780 resistente al cisplatino	Desconocido	Menos sensible a los mecanismos de resistencia al cisplatino.	Desconocido
Citotoxicidad <i>in vitro</i> (orden de magnitud)	Muy baja: <10 ⁻⁴ M en casi todas las líneas celulares.	10 ⁻⁵ M en líneas celulares de carcinoma colorrectal	10 ⁻⁶ M en varias líneas celulares	Bajo: 10 ⁻⁵ M-10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M-5x10 ⁻⁶ M en varias líneas celulares	10 ⁻⁶ M-10 ⁻⁴⁵ M en líneas celulares de melanoma
Actividad <i>in vivo</i>	Selectivo hacia tumores secundarios (metástasis)	Citotóxico para tumores primarios	Citotóxico para tumores primarios	Cierta selectividad hacia tumores secundarios (metástasis)	Citotóxico para tumores primarios	No determinado
Principal tipo de tumor afectado	Metástasis pulmonares de cualquier tipo de tumores sólidos (ratón, humano)	Cáncer colorrectal (animal, humano)	Sin histotipo específico (animal, humano)	Probado en carcinoma mamario en ratón	Sin histotipo específico (animal, humano)	Desconocido
Supuestos blancos y mecanismo de acción	Interacciones múltiples con componentes del microambiente tumoral	Probablemente ADN. Apoptosis a través de la vía mitocondrial y formación de ROS	ADN Papel de p53 y p21 en la detención del crecimiento, y de p53 y Bax en la respuesta apoptótica	Desconocido. Modulación del citoesqueleto celular.	Probablemente ADN. Apoptosis a través de mecanismos independientes y dependientes de p53, modulación de genes de la vía del estrés del retículo endoplásmico y de sus productos	GSK3β. Muerte celular apoptótica mediada por p53 y la vía mitocondrial intrínseca en células de melanoma
Etapas de desarrollo	Fases clínicas I y II	Fase clínica I	Fase preclínica	Fase preclínica	Fase preclínica	Fase preclínica

2.3 Proteína quinasas

Las proteína quinasas, también conocidas como quinasas o cinasas, son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato (PO_4) proveniente del nucleótido adenosín trifosfato (ATP) al hidroxilo de un aminoácido en una proteína, principalmente a serina, treonina o tirosina, aunque también se transfieren a otros aminoácidos como la histidina formando un enlace fosfoéster [33,34]. En conjunto con las fosfatasas (enzimas que quitan un grupo fosfato de la proteína), las quinasas mantienen el ciclo celular activando un gran número de procesos biológicos de las proteínas en la célula, mientras que las fosfatasas correspondientes revierten esta acción (**Figura 14**) [33].

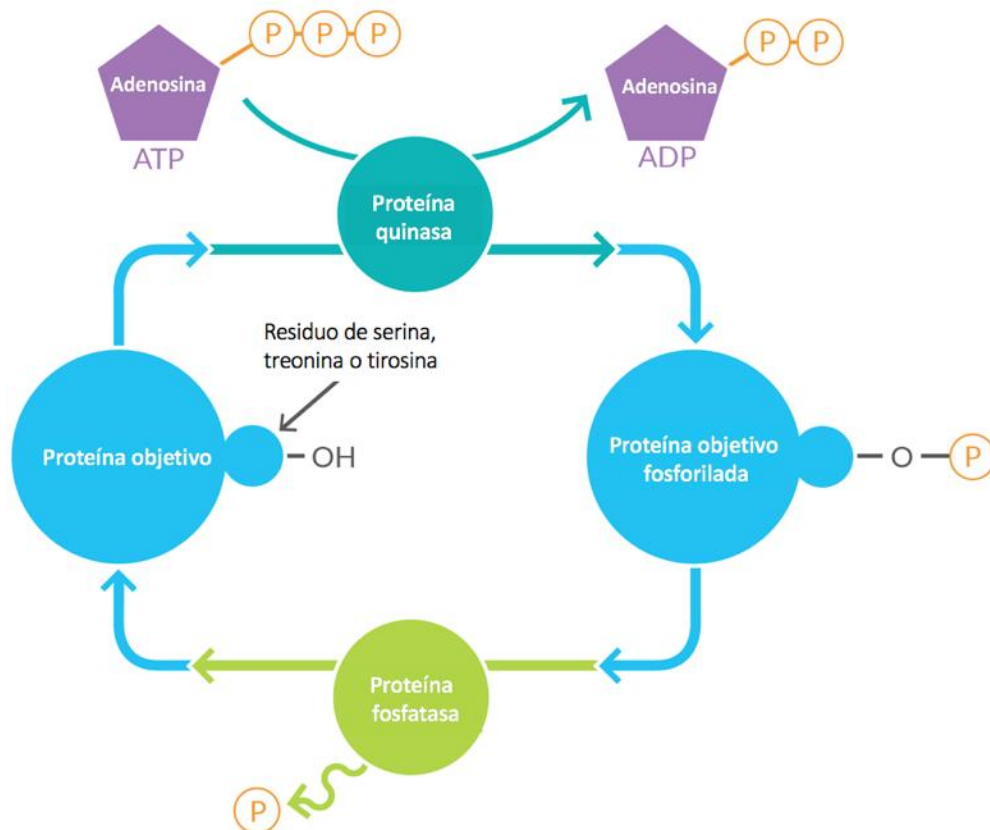


Figura 14. . Proceso de fosforilación y desfosforilación de un residuo de aminoácido catalizado por las proteínas quinasa y fosfatasa respectivamente [35].

El gran interés en el diseño de moléculas que tengan la capacidad de inhibir a las quinasas, ha convertido a estas enzimas en uno de los principales objetivos biológicos en la actualidad. Tan solo del 2003 al 2017 se han aprobado por la FDA 37 inhibidores de quinasas para el tratamiento de tumores malignos como el cáncer de mama y de pulmón y más de 250 inhibidores de quinasas se han sometido a ensayos clínicos o se encuentran en la etapa preclínica de desarrollo de fármacos [33,35].

Hasta ahora se conocen alrededor de 538 quinasas codificadas en el genoma humano, aunque muchas permanecen poco estudiadas, se sabe que fosforilan hasta un tercio del proteoma humano [33]. Muchas de estas quinasas están asociadas con la iniciación, proliferación y supervivencia de células de cáncer humano, por lo que se pueden usar inhibidores de quinasas en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por la hiperactividad de las proteínas quinasas, incluidas las quinasas con mutaciones o sobre expresadas en el cáncer, como es el caso de las quinasas MST1/MST2 que participan en la vía de señalización Hippo (ver **capítulo 2.3.1**).

Debido a la gran variedad, categorizar a las proteína quinasas es muy complicado. En la **Figura 15** se muestra una clasificación muy general en función de sus roles distintivos en las células de cáncer. En este sentido, el primer grupo de quinasas fue en un principio el principal blanco terapéutico [33], aunque ahora se tiene interés en una amplia gama de quinasas, por ejemplo, en las quinasas MST1 antes mencionadas, pertenecientes a la familia de quinasas S/T Ste20 (Ver **Nota 3**).

Nota 3. Las quinasas S/T Ste20 son una superfamilia de quinasas que se dividen en dos grupos, las PAK (quinasas activadas por p21) y las GCK (quinasas del centro germinativo). Estos dos grupos se subdividen en 10 subfamilias: PAK-I y II y GCK-I a la VIII. Las quinasas pertenecientes a Ste20 juegan papeles esenciales en distintas vías de señalización que regulan procesos celulares fundamentales como el control del ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento celular y las respuestas al estrés celular [34].

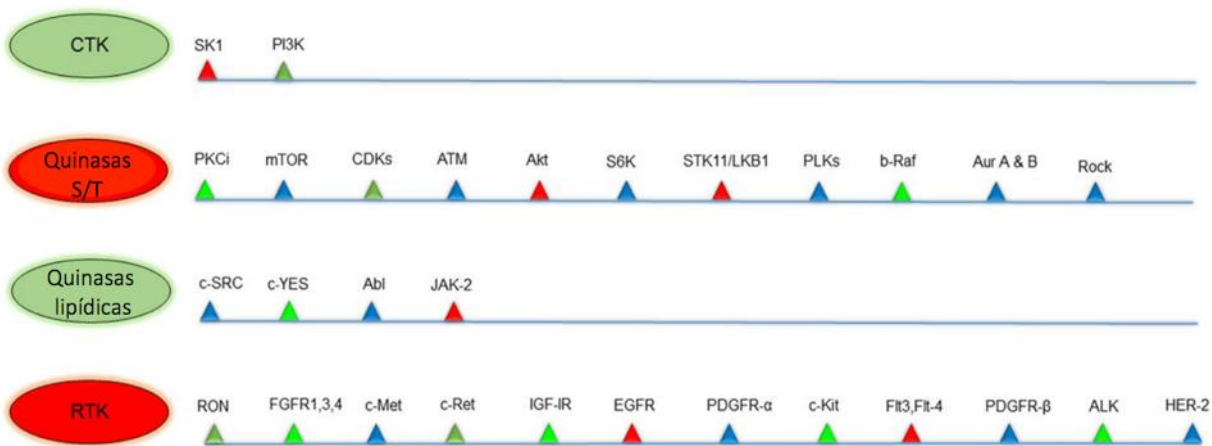


Figura 15. Categorización de quinasas implicadas en cáncer humano [33].

CTK: tirosina quinasa citoplasmática; **Quinasa S/T:** serina/treonina quinasa; **LK:** quinasa lipídica; **RTK:** tirosina quinasa receptora.

2.3.1 Vía de señalización Hippo en cáncer

La vía de señalización Hippo ha sido muy estudiada en los últimos años ya que se ha determinado que su desregularización está implicada en distintos desórdenes como el cáncer. Sin embargo, el mecanismo de acción de esta ruta no está completamente elucidado, y por tanto, hay varios grupos de investigación, incluido el nuestro, interesados en tener un mejor entendimiento de esta ruta para poder diseñar fármacos más eficaces en la terapia de cáncer.

La vía de señalización Hippo es una vía altamente conservada en vertebrados que modula genes clave para regular una gran cantidad de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, la autorrenovación de células madre, la supervivencia, la diferenciación, la determinación del destino celular, el tamaño de los órganos y la homeostasis de los tejidos [37]. Los componentes fundamentales de la vía Hippo en mamíferos son las quinasas MST1/2 (MST1/MST2), LATS1/2 (LATS1/LATS2) y las proteínas YAP (*YES-associated protein*) y TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*). A su vez, la actividad de las quinasas MST1/2 y LATS1/2 dependen respectivamente de sus interacciones con las proteínas Salvador homolog 1 (SAV1) y el activador de quinasas MOB1A/B [8].

Cuando la vía Hippo se activa (Hippo “on”), múltiples señales regulan la fosforilación de las quinasas MST1/2 que a su vez activan a LATS1/2-MOB1A/B por fosforilación. Después, el complejo LATS1/2-MOB1A/B fosforila directamente a YAP/TAZ. Esta fosforilación inhibe a YAP/TAZ por dos mecanismos: i) promueve la retención citoplasmática al crear un sitio de enlace en proteínas 14-3-3. ii) ocurre una segunda fosforilación que promueve la degradación proteolítica (**Figura 16-izquierda**) [38,39].

Por el contrario, cuando las quinasas LATS1/2 están inactivas (Hippo “off”), las proteínas YAP/TAZ no se fosforilan y se acumulan en el núcleo en donde forman un complejo con el factor de transcripción TEAD (TEAD1-4). Este complejo regula la expresión de genes que promueven el crecimiento, la proliferación, la migración y la supervivencia celular como CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), CYR61 (inductor angiogénico rico en cisteína 61), entre otros. (**Figura 16-derecha**) [38,39].

La hiperactivación de los reguladores transcripcionales YAP/TAZ observada en cánceres humanos está asociada a cambios en tumores sólidos al incrementar la generación de células madre de cáncer, la proliferación y la supervivencia celular (**Figura 17**). Aunque por otro lado, el complejo TEADs-YAP/TAZ induce la expresión de genes que pueden promover la regeneración de órganos después de una lesión, por lo tanto, la activación controlada de YAP y TAZ resultaría muy útil para la medicina regenerativa [38,40].

Una hipótesis alentadora es que sería posible inducir la "normalización" de las células tumorales al revertirlas a un fenotipo benigno. Como se ha discutido en los párrafos anteriores, la inactivación de alguno de los componentes de la vía Hippo provocaría un crecimiento anormal de los órganos, no obstante, esta es una condición reversible, porque cuando se interrumpen los estímulos inductores de YAP/TAZ, el órgano vuelve a su tamaño correcto, perdiendo el exceso de células por apoptosis. El cómo se normaliza el órgano después del crecimiento excesivo sigue siendo un misterio; una posibilidad es que mientras el órgano retrocede a su tamaño adecuado, las señales locales indican la muerte o la supervivencia de cada célula individual con gran especificidad [40].

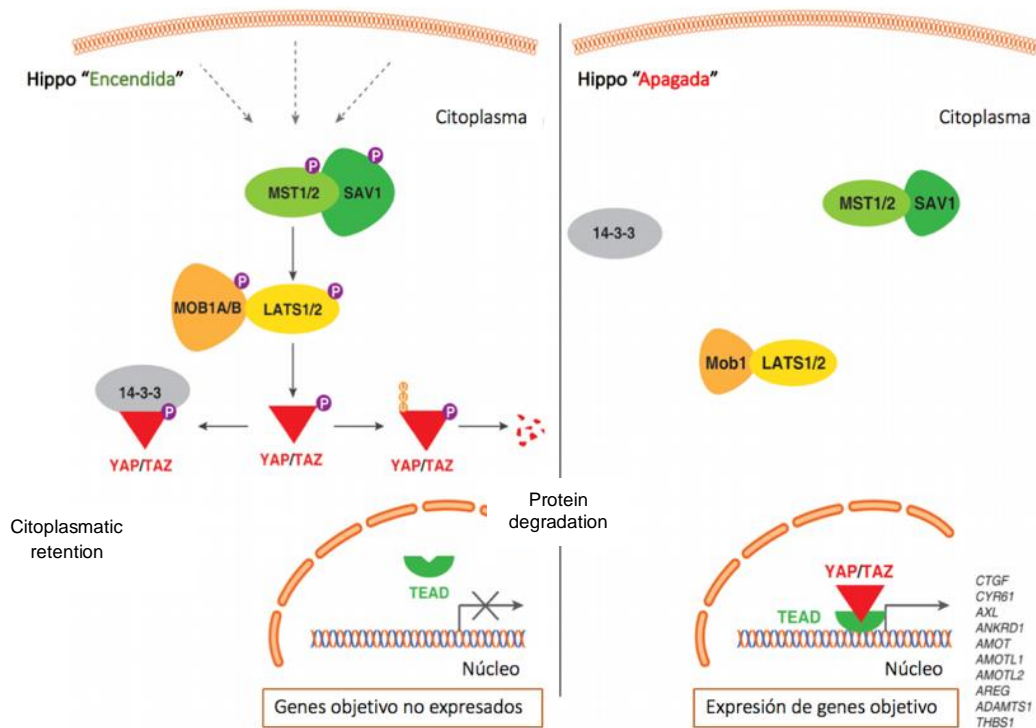


Figura 16. Representación esquemática de la vía de señalización Hippo en células endoteliales humanas. Ruta Hippo activada (**izquierda**). Una cascada de señales regulan la fosforilación de las quinasas MST1/MST2, LATS1/LATS2 y fosforila a las proteínas YAP/TAZ. La fosforilación de YAP/TAZ promueve que se una a las proteínas 14-3-3 que estimulan la retención citoplasmática o promueve la degradación proteolítica. Ruta Hippo inactivada (**derecha**). YAP/TAZ no están fosforiladas, se localizan en el núcleo, forman un complejo con el factor de transcripción TEAD y regulan los genes necesarios para la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales [39].

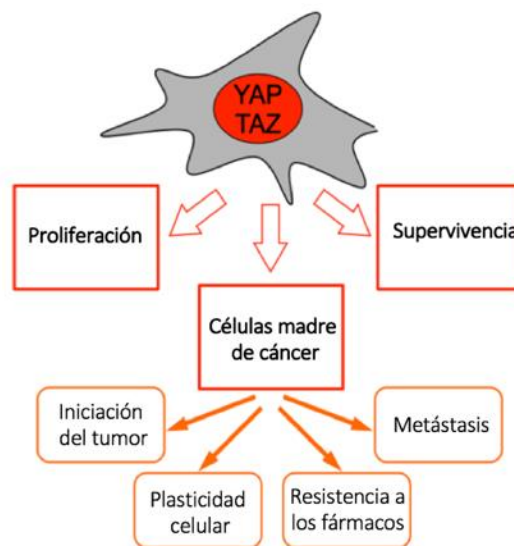


Figura 17. Representación de las funciones de YAP/TAZ en las células de cáncer [40].

En la última década se ha estado estudiando la inhibición farmacológica de los diferentes componentes de la ruta Hippo con el fin de tener una mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en esta ruta y tener las herramientas para poder sugerir estrategias innovadoras para el tratamiento del cáncer [40]. Al respecto, la verteporfina fue el primer compuesto encontrado que inhibe la interacción del complejo YAP/TEAD, evitando el sobrecrecimiento hepático [41].

Por otro lado, se ha reportado que algunos complejos de rutenio con el fragmento $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})\text{RuII}]$ y ligantes derivados de la staurosporina son inhibidores muy potentes y específicos de la proteína quinasa MST1, con valores de IC_{50} del orden nanomolar. Por lo tanto, el diseño y síntesis de moléculas con un blanco específico de la ruta Hippo, representaría un paso importante en la elucidación de su mecanismo de acción y para el desarrollo de nuevas estrategias en la quimioterapia [42].

2.3.2 Compuestos de rutenio(II) como inhibidores de proteína quinasas

Como se mencionó en las secciones anteriores, las proteína quinasas están entre los principales objetivos biológicos con fines terapéuticos contra cáncer humano debido a su papel en la regulación de mecanismos celulares que involucran su muerte y división. Aunque difieren en cómo se regula su función catalítica, estas enzimas conservan su dominio catalítico en secuencia y estructura (el dominio catalítico contiene secuencias consenso para la unión de ATP, la región de transferencia del fosfato y el sitio de unión del sustrato) entre los miembros de una misma familia de quinasas [34,43].

Las quinasas MST1, pertenecientes a la familia Ste20, son de los principales componentes en la vía de señalización Hippo, en donde la desregularización de la vía se ha implicado en distintas enfermedades incluyendo el cáncer, por lo que hay un gran interés en estudiar la actividad de estas enzimas en células de cáncer. Para llevar a cabo los estudios mecanísticos, el grupo de Meggers se ha inspirado en la staurosporina (**Figura 18-b**), una clase de alcaloide de indolocarbazol natural competitivo con ATP, que inhibe con una eficacia de moderada a alta a quinasas de la familia Ste20 [42].

Meggers y su grupo han logrado sintetizar una serie de complejos de rutenio con un ligante bidentado de indocarbazol derivado de la staurosporina (**Figura 19**), que tiene un comportamiento análogo al inhibidor de quinasas orgánico convencional. Estos complejos, se ubican en el sitio de unión a ATP y forman puentes de hidrógeno mientras que la esfera restante del ligante puede también crear interacciones con otras partes del sitio de unión a ATP (**Figura 18**) [44].

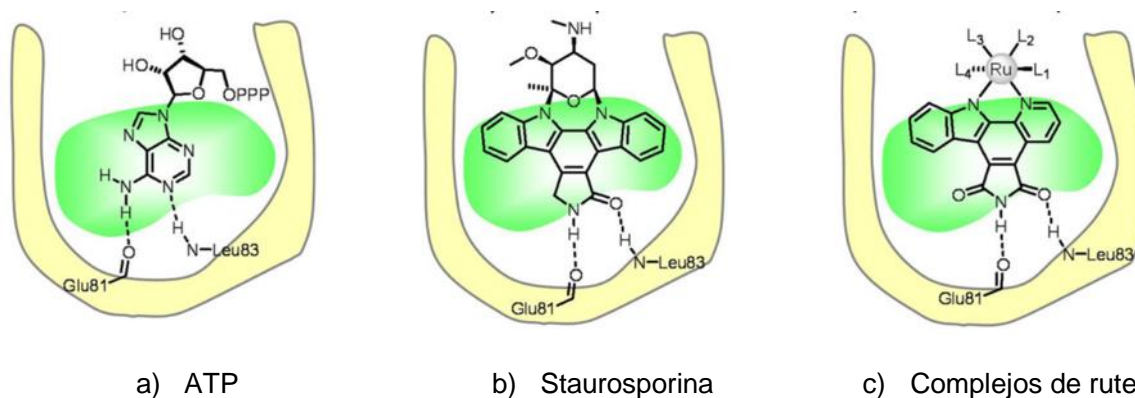


Figura 18. Representación del bolsillo de enlace a ATP de quinasas dependientes de ciclina (CDK2) con a) ATP, b) estaurosporina y c) complejos de rutenio derivados de indolocarbazol. El área verde indica una región de alta hidrofobicidad [44].

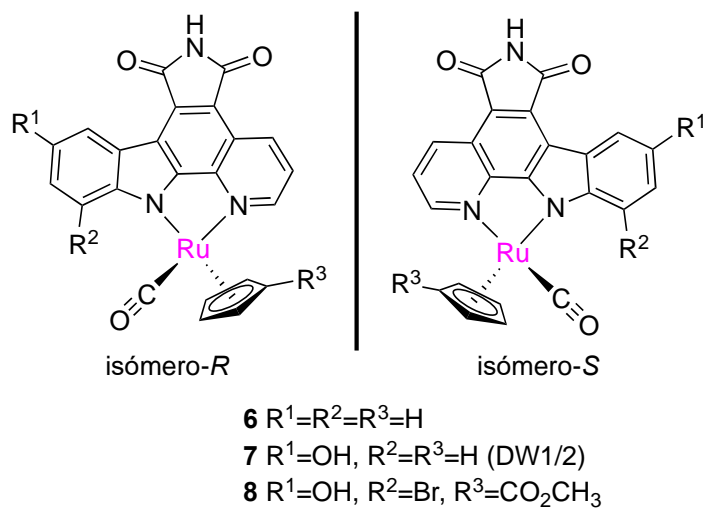


Figura 19. Complejos de rutenio de medio sándwich que son inhibidores potentes de proteínas quinasas GSK-3 y/o Pim-1. La configuración absoluta en el centro de rutenio se ha asignado de acuerdo con el orden de prioridad de los ligantes siendo $\eta^5-C_5H_5 >$ piridina $>$ indol $>$ CO [42].

Una de las ventajas de reemplazar inhibidores orgánicos con complejos metálicos es que se puede modular la afinidad y la especificidad hacia ciertas moléculas [22]. Por ejemplo, la quinasa PAK-1 es un caso especial ya que tiene un sitio de unión de ATP particularmente abierto que dificulta la unión de moléculas orgánicas convencionales, pero es especialmente adecuado para llenarlo con complejos octaédricos voluminosos y rígidos (**Figura 20**) [14]. Asimismo, es posible modular la afinidad considerablemente al realizar variaciones de los grupos funcionales en los ligantes, como al introducir un grupo hidroxilo al anillo del indol [22]. Por ejemplo el enantiómero-*R* del compuesto **7** (**Figura 19**), que tiene un grupo OH y Br en el indol es altamente selectivo solo para GSK-3 en un panel de 57 quinasas [42].

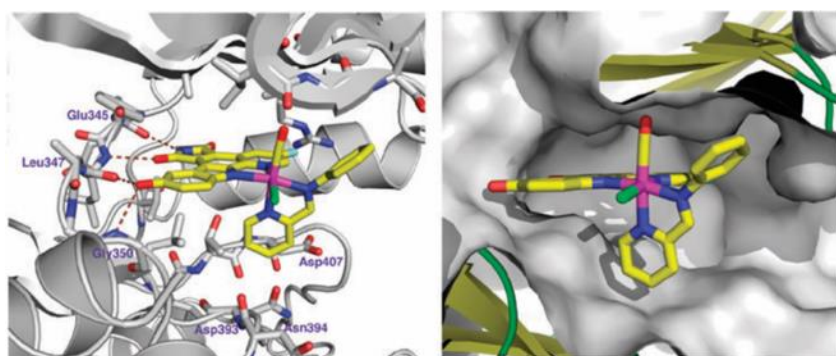


Figura 20. Estructura de la proteína quinasa PAK1 con el inhibidor Λ - FL172. Interacciones de puentes de hidrógeno (izq.). Coincidencia entre la forma del sitio activo y la esfera de coordinación del complejo de rutenio (der.) [14].

Para lograr el tamaño y la forma complementaria para el bolsillo del sitio activo de la enzima y así obtener compuestos inhibidores altamente selectivos y potentes de quinasas MST1, ha sido necesaria tanto la separación de enantiómeros, como realizar distintas sustituciones adicionales en los ligantes de los complejos [33,42]. Por ejemplo, Meggers y colaboradores han diseñado y sintetizado el compuesto enantioméricamente puro **9E1** (**Figura 21**) que tiene un IC_{50} de 45nM para MST1 y una mayor selectividad (alrededor de 25 veces más) para esta enzima en comparación con otras quinasas Ste-20 relacionadas, como PAK1 o PAK4 [33].

Asimismo, han estudiado la interacción de algunos complejos de rutenio con enzimas de la misma familia de MST1 para tomar los resultados como punto de partida para el desarrollo de inhibidores de quinasas MST1 optimizados para posibles aplicaciones terapéuticas [2]. Siguiendo esta estrategia se han descubierto inhibidores de quinasas muy selectivos en el rango nanomolar y picomolar en distintas líneas celulares (**Figura 21**) [14].

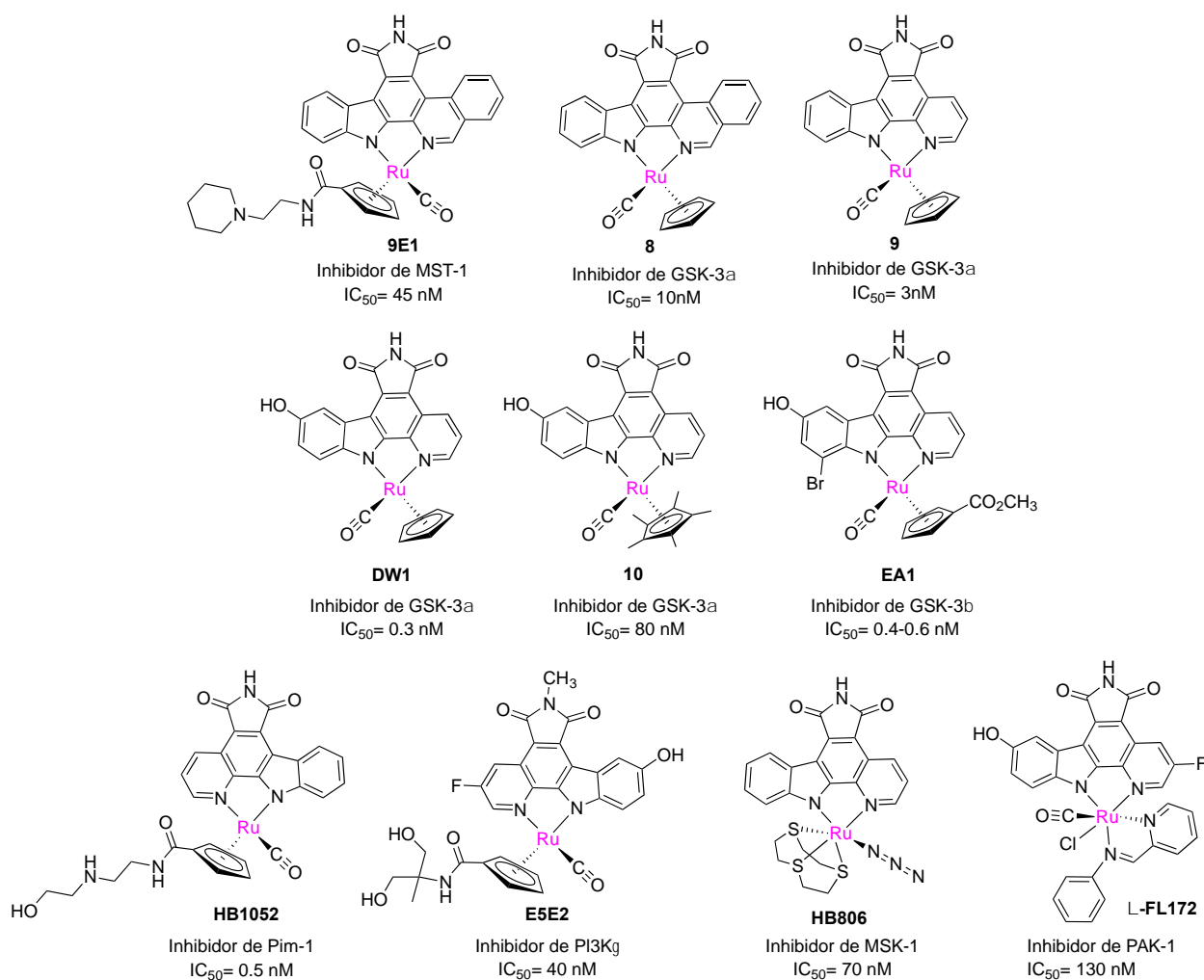


Figura 21. Complejos de rutenio inhibidores de proteínas quinasas [14,42,45].

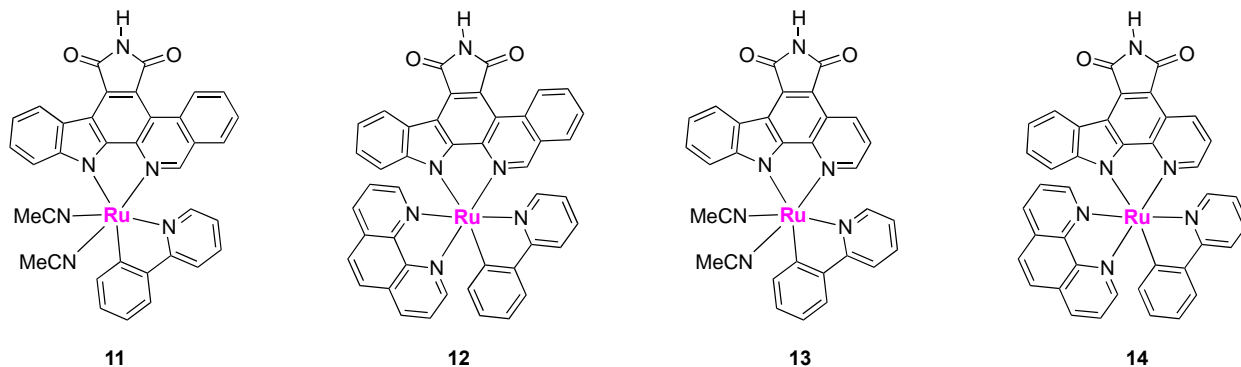
3. HIPÓTESIS

Los complejos organometálicos ciclorutenados con un ligante bidentado de indolcarbazol derivado de la staurosporina proporcionarán estructuras octaédricas rígidas y selectivas al sitio de unión de ATP en quinasas MST1, un blanco específico de la ruta Hippo. Además, la modificación de los otros ligantes en el complejo permitirá un control sobre las propiedades fisicoquímicas, como los potenciales redox y la lipofilidad. Estos complejos podrán utilizarse para realizar estudios dirigidos al entendimiento del mecanismo de acción de la ruta Hippo en el desarrollo de tumores y para el diseño de nuevas estrategias en la quimioterapia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nuevos complejos ciclometalados de rutenio con ligantes bidentados de indolcarbazol derivado de la staurosporina (compuestos **11-14**).



4.2 Objetivos específicos

- Encontrar las condiciones de reacción para activar los ligantes bidentados (HN[^]N) empleando intermediarios en la síntesis de los ligantes derivados de la staurosporina.
- Sintetizar ligantes de indolcarbazol derivados de la staurosporina.
- Realizar la coordinación de los ligantes de indolcarbazol a rutenio.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos y disolventes

Todos los reactivos empleados fueron comprados en *Sigma-Aldrich*, a excepción de RuCl_3 que fue adquirido en *Pressure Chemicals*. Los disolventes utilizados fueron grado HPLC de la marca *Fermont* a excepción del acetonitrilo anhidro y del 1,2-dicloroetano anhidro que fueron comprados en *Sigma-Aldrich* y se usaron directamente del envase. Los otros disolventes utilizados fueron destilados y secados previo a su uso con su respectivo agente desecante como se describe en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Disolventes y agentes desecantes utilizados.

Disolvente	Agentes desecantes
Acetato de etilo	Carbonato de potasio
Acetona	Sulfato de calcio (Drierite®)
Acetonitrilo	Pentóxido de fósforo
Diclorometano	Pentóxido de fósforo
Etanol	Etóxido de magnesio
Éter	Sodio metálico
Hexano	Sodio metálico
Tetrahidrofurano	Sodio metálico

5.2 Equipos y técnicas espectroscópicas

La caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C se llevó a cabo en un equipo Bruker Advance 300. La espectrometría de masas se realizó con la técnica de ionización DART (*Direct Analysis in Real Time*) en un equipo JEOL AccuTOF™ JMS-T100LC. Los experimentos de espectroscopía de infrarrojo se realizaron en un equipo Bruker Alfa-P, por la técnica de reflectancia difusa (ATR). Además se utilizó una línea doble de vacío-nitrógeno/argón para las reacciones.

5.3 Síntesis de los ligantes

Los ligantes **22** y **26** derivados de la staurosporina se sintetizaron con base en la referencia reportada en cada caso y en su mayoría, su obtención fue confirmada por las técnicas de IR, RMN (^1H , ^{13}C) y espectrometría de masas con la técnica de ionización DART (algunos compuestos, según se indica, solo se caracterizaron por 1 o 2 de las técnicas mencionadas). Los compuestos presentados en esta sección no se caracterizaron por difracción de rayos X ni por la técnica de análisis elemental, debido a que los datos adquiridos coincidieron con los reportados en RMN e IR.

5.3.1 Reacciones para la síntesis del ligante **22**

⇒ Síntesis de α -azidoacetona.

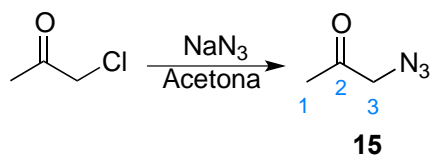


Figura 22. Síntesis de α -azidoacetona **15**.

Se siguió la metodología reportada por Martínez-Castañeda *et. al.* (Figura 22) [46]. En un matraz con acetona seca (50 mL), se añadió 1-cloropropan-2-ona (1.85 g, 20 mmol) y azida de sodio (2.60 g, 40 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente la mezcla de reacción se filtró al vacío y el filtrado se lavó con acetona. El disolvente filtrado fue evaporado obteniendo un aceite que se diluyó en dietiléter (50 mL) y se lavó con agua destilada (3x15mL). Finalmente la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó al vacío obteniendo 1-azidopropan-2-ona (**15**) como un líquido amarillo (1.76 g, 89% de rendimiento).

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 3.96 (s, 2H, H2), 2.18 (s, 3H, H3)

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ : 202.10 (C2), 57.83 (C3), 27.01 (C1)

IR (cm^{-1}) ν : 2110 (ν N=N=N), 1750 (ν C=O)

EM (DART) m/z : 100 (M+H)

⇒ Síntesis del *o*-ftalaldehído.

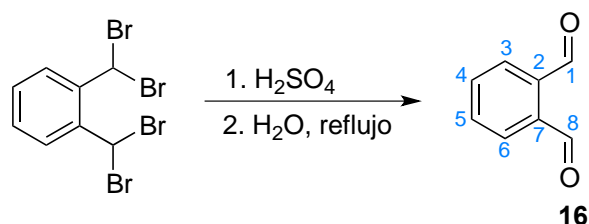


Figura 23. Síntesis de *o*-ftalaldehído **16**.

Se basó en la metodología reportada por Zhu y Wang (**Figura 23**) [47]. En un matraz de dos bocas se mezcló 1,2-bis(dibromometil)benzeno (3.11 g, 7.4 mmol) con ácido sulfúrico concentrado (13.32 g, 133.2 mmol) y se calentó hasta que se disolvió por completo el 1,2-bis(dibromometil)benzeno (rango de 3-4 horas) a 60 °C. Durante este intervalo de tiempo se fue purgando el sistema con argón (1-2 minutos de flujo cada 10 minutos) para desplazar el bromo gaseoso desprendido de la reacción. Cuando ya no se observó presencia de este gas naranja en el matraz, se esperó a que la mezcla llegara a temperatura ambiente y se colocó en un baño de hielo. Posteriormente se le adicionó bicarbonato de sodio (4.97 g, 59.2 mmol). Al detenerse el burbujeo, se adicionó hielo lentamente al matraz (200 g) obteniendo una mezcla color azul y se esperó a que la mezcla de reacción llegara a temperatura ambiente. Esta solución se colocó a reflujo durante 18 horas. Al finalizar la reacción, se adicionó acetato de etilo y se extrajo la fase orgánica. Se hicieron lavados con una solución saturada de cloruro de sodio y una solución saturada de carbonato de sodio. La fase orgánica se recuperó y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se removió el disolvente en un rotavapor, obteniendo un sólido amarillo. Finalmente se obtuvieron cristales amarillos de **16** tras recristalizar en hexano (0.98 g, 74% de rendimiento).

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 10.52 (s, 2H, **H1** y **H8**), 7.96 (dd, $J = 5.6, 3.6$ Hz, 2H, **H3** y **H6**), 7.77 (dd, $J = 5.6, 3.6$ Hz, 2H, **H4** y **H5**).

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ : 192.2 (**C1** y **C8**), 136.0 (**C2** y **C7**), 133.5 (**C4** y **C5**), 130.7 (**C3** y **C6**)

EM (DART) m/z : 135 (M+H)

⇒ Síntesis de 3-acetilisquinolina.

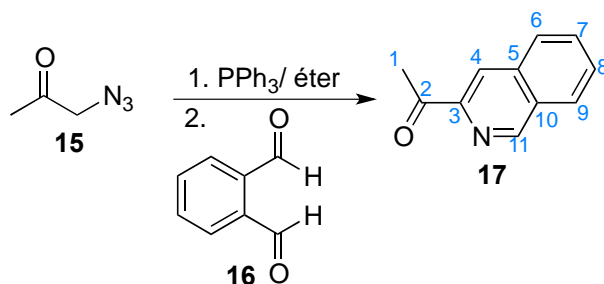


Figura 24. Síntesis de 3-acetilisquinolina **17**.

Para la síntesis de la 3-acetilisquinolina (**Figura 24**), se realizaron varias modificaciones a la metodología reportada por Aubert *et. al.* [48]. Se prepararon por separado, en tubos de Schlenk y bajo atmósfera de N_2 , una disolución de α -azidoacetona **15** (0.25 g, 2.5 mmol) en dietiléter (15 mL) y una disolución de trifenilfosfina (0.66 g, 2.5 mmol) en dietiléter (15 mL) y se dejaron enfriar ambos tubos a -5 °C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió la solución de trifenilfosfina a la solución de α -azidoacetona a través de una cánula. Se dejó en agitación a -5 °C durante 2.5 horas para la formación del iminofosforano. En otro tubo de Schlenk se colocó una disolución de *o*-ftalaldehído **16** (0.28 g, 2.08 mmol) en dietiléter (20 mL) bajo atmósfera de N_2 y se dejó enfriar a -5 °C. Posteriormente, se añadió la solución del iminofosforano al Schlenk con *o*-ftalaldehído mediante una cánula. Se dejó una hora en agitación a -5 °C y después toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel, empleando una mezcla 3:1 (hexano: acetato de etilo) y se recristalizó en éter:hexano (1:1) obteniendo 3-acetilisquinolina **17** como un sólido amarillo (0.11 g, 30-35% de rendimiento).

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 9.27 (s, 1H, H11), 8.46 (s, 1H, H4), 8.06-7.95 (m, 2H, H6 y H9), 7.79-7.69 (m, 2H, H7 y H8), 2.82 (s, 3H, H1).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 200.42 (C2), 152.06 (C11), 147.82 (C3), 135.62 (C5), 131.12 (C7), 130.26 (C8), 129.57 (C6), 128.75 (C9), 127.68 (C10), 120.40 (C4), 26.68 (C1).

IR (cm^{-1}) ν : 3000, 1684 (ν C=O), 1619, 1580 (ν C=N_{Arom}), 1217, 754, 682, 549, 462.

EM (DART) m/z : 172 (M+H).

⇒ Síntesis de 3-(1-(2-fenilhidrazono)etil)isoquinolina.

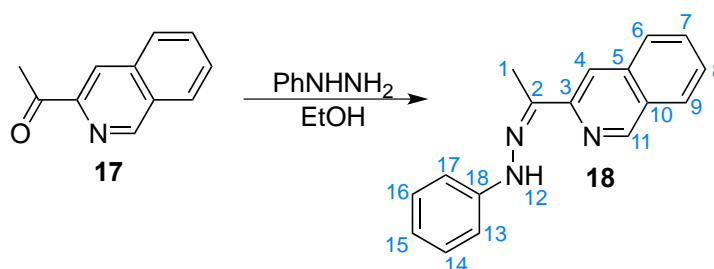


Figura 25. Síntesis de 3-(1-(2-fenilhidrazono)etil)isoquinolina **18**.

Se siguió la metodología reportada por Meggers *et. al.* (**Figura 25**) [45]. A una suspensión de 3-acetilisiquinolina **17** (0.40 g, 2.34 mmol) en etanol absoluto (0.57 mL), se le adicionó una gota de ácido sulfúrico y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se añadió fenilhidrazina (0.23 mL, 2.34 mmol) y la suspensión se calentó a reflujo durante 2 horas. La solución obtenida se enfrió en el congelador durante 30 minutos y se filtró al vacío en un embudo Büchner para recuperar el precipitado formado. El sólido obtenido se lavó con etanol frío y se secó al vacío para obtener **18** como un sólido amarillo pálido (0.49 g, 80% de rendimiento).

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.20 (s, 1H, H11), 8.43 (s, 1H, H4), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H9), 7.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 7.65 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H8), 7.57 (br s, 1H, H12), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H7), 7.36 – 7.23 (m, 4H, H13, H14, H16 y H17), 6.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H15), 2.47 (s, 3H, H1).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 151.04 (C11), 150.18, 144.91 (C2, C3), 142.10 (C18), 136.73 (C5), 130.91 (C10), 129.38 (C7), 127.97 (C16, C14), 127.79 (C9), 127.44 (C8), 127.28 (C6), 120.60 (C4), 116.33 (C15), 113.52 (C17, C13), 10.94 (C1).

IR (cm^{-1}) ν : 3234 (ν N-H), 3049, 1636 (ν C=N), 1573 (ν C=N_{Arom}), 1497, 1451, 1387, 1298, 1256, 1151, 1080, 1022, 881, 470.

EM (DART) m/z : 262 (M+H).

⇒ Síntesis de 3-(1*H*-indol-2-il)isoquinolina.

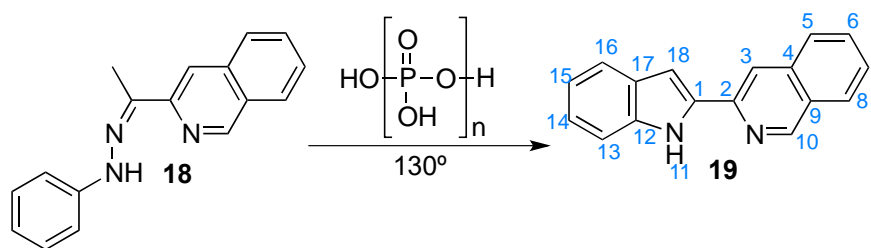


Figura 26. Síntesis de 3-(1*H*-indol-2-il)isoquinolina **19**.

Se basó en la metodología para la síntesis de indoles reportada por Tompkins *et. al.* (**Figura 26**) [49]. Se colocaron en un matraz 3-(1-(2-fenilhidrazono)etil)isoquinolina **18** (0.1g, 0.38 mmol) y ácido polifosfórico (~0.3 g, 2.41 mmol). El matraz se colocó en un baño de aceite a 130°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar a 70°C y se le añadió agua fría. Posteriormente se basificó la reacción con hojuelas de hidróxido de sodio hasta llegar a un $\text{pH} > 10$. Se adicionó diclorometano y se extrajo la fase orgánica. Se hicieron lavados con una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor. El sólido obtenido se purificó por cromatografía de columna en sílica gel utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo (5:1), obteniendo **19** como un sólido amarillo (0.02g, 18% de rendimiento).

^1H RMN (CDCl_3) δ : 10.02 (br s, 1 H, H11), 9.24 (s, 1 H, H10), 8.15 (s, 1H, H3), 7.94 (d, $J = 8.2$, 1H, H5), 7.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H8), 7.73 – 7.66 (m, 2H, H6, H7), 7.55 (ddd, $J = 8.1$, 6.8, 1.2 Hz, 1H, H16), 7.42 (d, $J = 8.1$, 1H, H18), 7.23 (ddd, $J = 8.2$, 7.0, 1.3 Hz, 1H, H13), 7.19 – 7.11 (m, 2H, H14, H15).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 152.18 (C10), 144.44 (C2), 137.33 (C12), 136.80 (C4), 136.65 (C1), 130.95 (C6), 129.46 (C17), 127.93 (C8), 127.08 (C7), 126.85 (C5), 124.94 (C9), 122.84 (C14), 121.05 (C16), 120.25 (C15), 115.73 (C3), 111.50 (C13), 99.61 (C18).

IR (cm^{-1}) ν : 2926, 2091, 1592 ($\nu \text{ C}=\text{N}_{\text{Arom}}$), 1456, 1264, 756 ($\nu \text{ C-H}$).

EM (DART) m/z : 245 (M+H)

⇒ Protección de 3,4-dibromo-1H-pirrol-2,5-diona

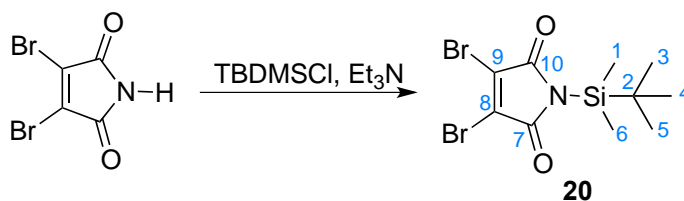


Figura 27. Síntesis de 3,4-dibromo-1-(*tert*-butildimetilsilil)-1H-pirrol-2,5-diona **20**. TBDMSCl= cloruro de *t*-butildimetilsililo.

Se siguió la metodología reportada por Brenet *et. al.* (**Figura 27**) [50]. Se disolvió 3,4-dibromo-1H-pirrol-2,5-diona (0.51g, 2 mmol) en diclorometano y se agitó a temperatura ambiente. Se adicionaron sucesivamente cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBMSCl, 0.30 g, 2 mmol) y trietilamina (278 μL , 2 mmol). La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Continuamente se adicionó diclorometano y se filtró la mezcla al vacío en un embudo Büchner. El diclorometano se evaporó y el sólido se disolvió en pentano. Se filtró la sal de trietilamina hidrociorada precipitada en un embudo de vidrio con papel filtro y se hicieron lavados con pentano. Finalmente se evaporó el disolvente y se obtuvo **20** como un sólido amarillo (0.7 g, 95% de rendimiento).

^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.94 (s, 9H, H3, H4 y H5), 0.45 (s, 6H, H1 y H6).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 168.85 (C7, C10), 131.70 (C8, C9), 26.22 (C2), 19.01 (C3, C4, C5), -4.45 (C1, C6).

IR (cm⁻¹) ν : 1765 (ν C=O), 1720 (ν C=O), 1620, 1310 (ν C-N), 1090, 1010 (ν C-N-C), 750, 600 (ν C-Br).

EM (DART) m/z: 370 (M+H).

⇒ Síntesis de 3-bromo-1-(*tert*-butildimetilsilil)-4-(2-(isoquinolin-3-il)-1*H*-indol-3-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona.

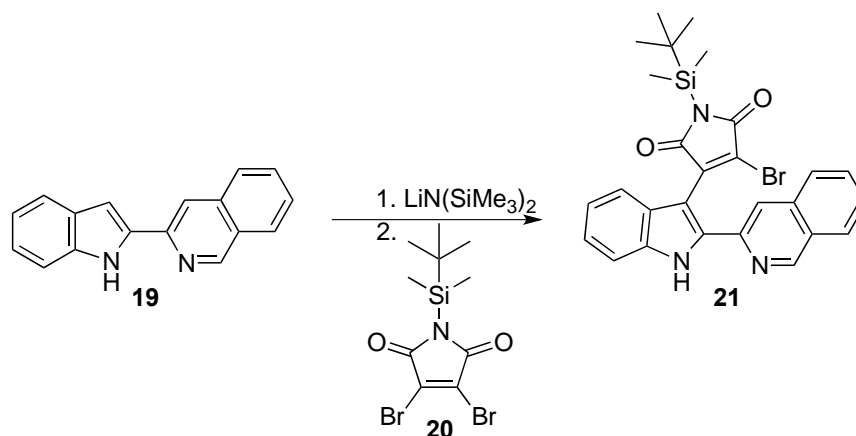


Figura 28. Síntesis de 3-bromo-1-(*tert*-butildimetilsilil)-4-(2-(isoquinolin-3-il)-1*H*-indol-3-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona **21**.

Se siguió la metodología reportada por Meggers *et al* (**Figura 28**) [45]. Se colocó una solución de 3-(1*H*-indol-2-il)isoquinolina **19** (0.1g, 0.41mmol) en THF (1.1 mL) bajo atmósfera de argón y se enfrió en un baño de hielo seco/acetona. Posteriormente se le adicionó bis(trimetilsilil)amida de litio (1M en THF, 0.86 mL, 0.86 mmol) gota a gota durante 15 minutos. La reacción se dejó en agitación en el baño de hielo seco/acetona durante 15 minutos más y se obtuvo una solución naranja. En otro tubo de Schlenk bajo atmósfera de argón, se colocó una disolución de **20** (0.15 g, 0.41 mmol) en THF (1.1 mL) y se enfrió en el baño de hielo seco/acetona. Consecutivamente se adicionó toda la disolución de **20** mediante una jeringa al material litiado y se dejó en agitación 15 minutos en el baño de hielo y una hora adicional a temperatura ambiente obteniendo una solución púrpura. Transcurrido este tiempo, se añadió HCl 10% (15 mL) a la reacción y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con bicarbonato de sodio, cloruro de sodio y agua y se secó con sulfato de magnesio. Se filtró y se evaporó el disolvente para

obtener el crudo de **21** como un sólido naranja que no es estable en cromatografía en columna por lo que se llevó sin purificar al siguiente paso.

IR (cm⁻¹) ν : 3229 (ν N-H), 1775 (ν C=O_{asimétrica}), 1722 (ν C=O_{simétrica}), 1364 (ν C-N), 1025, 735 (ν C-N-C).

⇒ Obtención de 8-(*tert*-butildimetilsilil)indol[3,2-*c*]pirrolo[3,4-*a*]fenantridin-7,9(8*H*,14*H*)-diona.

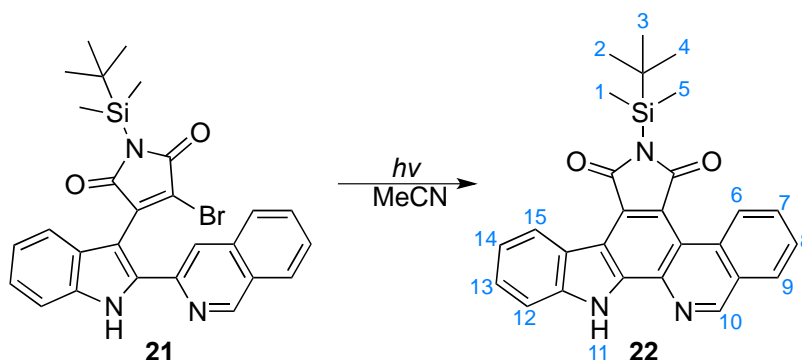


Figura 29. Síntesis de **22**.

Se siguió la metodología reportada por Meggers *et. al.* (Figura 29) [45]. Se colocó en un fotoreactor de UV el crudo de la reacción anterior (0.15 g) y se disolvió en 220 mL de acetonitrilo anhidro. La disolución fue fotolizada con una lámpara de presión media, con una constante purga de argón por 4 horas. Se obtuvo una suspensión amarilla que se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de columna en sílica gel con una mezcla CH₂Cl₂-MeOH (20:1) y se obtuvo **22** como un sólido amarillo (0.03 g, 18%, rendimiento calculado partiendo de 0.1 g del indol **19**).

¹H RMN (CDCl₃) δ : 10.20 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 10.15 (brs, 1H, H11), 9.28 (s, 1H, H10), 9.19 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.00 (t, J = 8.6, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 8.0, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7, 7.6 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 8.1, 6.0, 2.2 Hz, 1H), 1.10 (s, 9H, H2, H3 y H4), 0.70 (s, 6H, H1 y H5).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 154.42 (C10), 140.41, 131.89 (C7), 129.84, 128.92, 128.69, 127.91 (C9), 126.45 (C6), 121.67, 121.01 (C15), 120.79 (C14), 116.07, 111.37 (C12), 26.78, 19.33 (C2, C3, C4), -3.45 (C1, C5).

IR (cm^{-1}) ν : 3461, 3128 (ν N-H), 2954, 2854, 1741 (ν C=O), 1683 (ν C=O), 1606, 1533, 1448, 1297 (ν C-N), 1082, 813, 750.

5.3.2 Reacciones para la síntesis del ligante 26

⇒ Síntesis de 2-(1-(2-fenilhidrazono)etil)piridina.

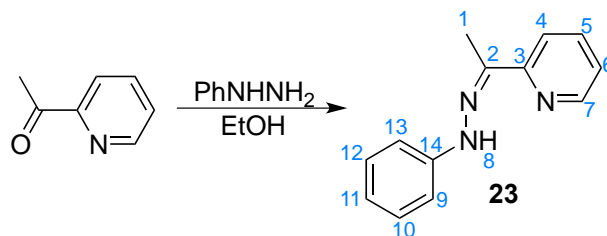


Figura 30. Síntesis de 2-acetilpiridinafenilhidrazona 23.

Se siguió la metodología reportada por Tompkins *et. al.* (**Figura 30**) [49]. Se calentó a 50 °C por 90 minutos una mezcla de 2-acetilpiridina (2.0 g, 0.02 mmol), fenilhidrazina (1.6 mL, 0.02 mmol) y etanol (1.2 mL). Al finalizar este tiempo se observó la formación de un precipitado que fue filtrado y lavado con etanol frío, obteniendo un sólido amarillo pálido (3.80 g, 90% de rendimiento).

^1H RMN (CDCl_3) δ : 8.46 (d, J = 4.9 Hz, 1H, H7), 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H4), 7.58 (ddd, J = 8.1, 7.4, 1.8 Hz, 1H, H5), 7.47 (br s, 1H, H8), 7.29–7.18 (m, 1H, H6), 7.17 – 7.04 (m, 4H, H9, H10, H12, H13), 6.87–6.78 (m, 1H, H11), 2.30 (s, 3H, H1).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 156.51 (C3), 148.39 (C7), 144.79 (C2), 142.17 (C14), 136.06 (C5), 129.44 (C10, C12), 122.43 (C6), 120.72 (C11), 120.05 (C4), 113.41 (C13, C9), 9.90 (C1).
EM (DART) m/z : 212 (M+H).

⇒ Síntesis de de 2-(piridin-2-il)-1*H*-indol.

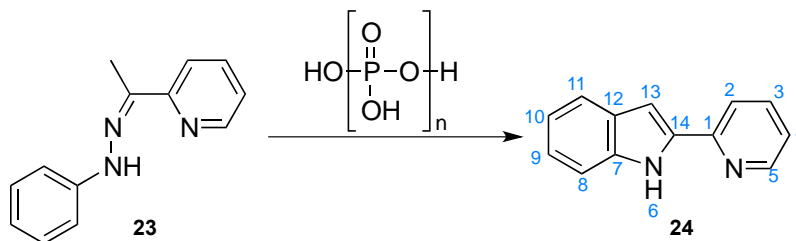


Figura 31. Síntesis de 2-(piridin-2-il)-1*H*-indol **24**.

Se basó en la metodología reportada por Lemster *et. al.* (**Figura 31**) [51]. Se calentó ácido polifosfórico (~20 mL) en un matraz y se calentó a 120 °C hasta que se volvió menos viscoso. A continuación, se añadió lentamente 2-acetilpiridina (2.15 g, 10 mmol) en un periodo de 10 minutos y se mantuvo por 1.5 horas en agitación y calentamiento a 130 °C. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y cuidadosamente se procedió a la hidrólisis añadiendo agua y hojuelas de hidróxido de sodio. El sólido resultante fue filtrado al vacío en un embudo Büchner y se disolvió en acetona. Posteriormente se colocó esta disolución a reflujo durante 10 minutos y al concluir el tiempo se filtró al vacío en caliente. Se evaporó el disolvente recuperado del filtrado y se obtuvo un sólido color café que se purificó por cromatografía de columna en sílica gel con una mezcla hexano-acetato de etilo (5:1), obteniendo **24** como un sólido amarillo (0.95 g, 49% de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 10.23 (br s, 1H, **H6**), 8.61 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, **H5**), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, **H2**), 7.78 – 7.64 (m, 2H, **H3**, **H4**), 7.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **H8**), 7.30 – 7.10 (m, 3H, **H9**, **H10**, **H11**), 7.07 (d, 2.1 Hz, 1H, **H13**).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 150.3$ (**C1**), 148.9 (**C5**), 136.7(**C7**, **C3**), 136.6 (**C14**), 136.5 (**C12**), 129.0 (**C13**), 123.1 (**C4**), 121.9 (**C9**), 121.1 (**C2**), 120.1 (**C11**), 119.8 (**C10**), 111.4 (**C8**), 100.6 (**C13**).

IR (cm^{-1}): ν 3550 (N-H), 2926, 1264 (ν C-N), 756 (ν C-H).

EM (DART) m/z : 195 (M+H).

⇒ Síntesis de 3-bromo-1-(*tert*-butildimetilsilil)-4-(2-(piridin-2-il)-1*H*-indol-3-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona.

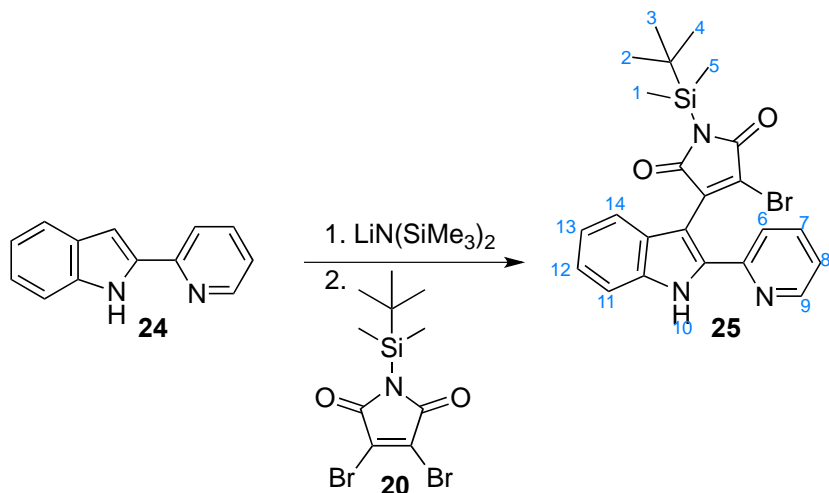


Figura 32. Síntesis de **25**.

Se siguió la metodología reportada por Meggers *et. al.* (**Figura 32**) [45]. Una disolución de pirridoindol **24** (0.95 g, 4.89 mmol) en THF anhidro (12.7 mL) bajo argón, se agitó en un baño de hielo seco/acetona. Posteriormente se le adicionó bis(trimetilsilil)amida de litio (1M en THF, 10.36 mL, 10.35 mmol) gota a gota durante 15 minutos. La reacción se dejó en agitación en el baño de hielo seco/acetona durante 30 minutos más y se obtuvo una disolución naranja. En otro tubo de Schlenk bajo atmósfera de argón, se colocó una solución de **20** (1.8 g, 4.89 mmol) en THF anhidro (12.7 mL) y se enfrió en el baño de hielo seco/acetona. Consecutivamente se adicionó toda la disolución de **20** mediante una jeringa al material litiado y se dejó en agitación 15 minutos en el baño de hielo y 45 minutos adicionales a temperatura ambiente obteniendo una solución púrpura. Transcurrido este tiempo, se añadió HCl 10% (113 mL) a la reacción y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con soluciones saturadas de bicarbonato de sodio y de cloruro de sodio y se secó con sulfato de magnesio. Se intentó purificar por cromatografía en columna pero la mayor parte del crudo de reacción se quedó retenido en la sílice, por lo que se tuvo que repetir la reacción y se procedió a la siguiente reacción sin purificar. Se caracterizó por IR, los datos de ¹H NMR descritos son los reportados.

IR (cm⁻¹) ν : 3229 (ν N-H), 2925, 2853, 1776 (ν C=O asimétrica), 1723 (ν C=O simétrica), 1573, 1514, 1471, 1322 (ν C-N), 1255, 850, 790, 736 (ν C-N-C).

¹H NMR (CDCl₃) δ : 10.13 (br s, 1H, H10), 8.67 (ddd, J = 4.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H, H9), 7.65 (d, J = 7.9, 1H, H6), 7.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H7), 7.41 (d, J = 8.0, 1H, H8), 7.33 (dd, J = 7.1, 1.2 Hz, 1H, H14), 7.29 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H11), 7.24 – 7.21 (m, 2H, H12, H13), 0.99 (s, 9 H, H2, H3, H4), 0.48 (s, 6 H, H1, H5).

⇒ Síntesis de 6-(*tert*-butildimetilsilil)pirido[2,3-*a*]pirrolo[3,4-*c*]carbazol-5,7(6*H*,12*H*)-diona.

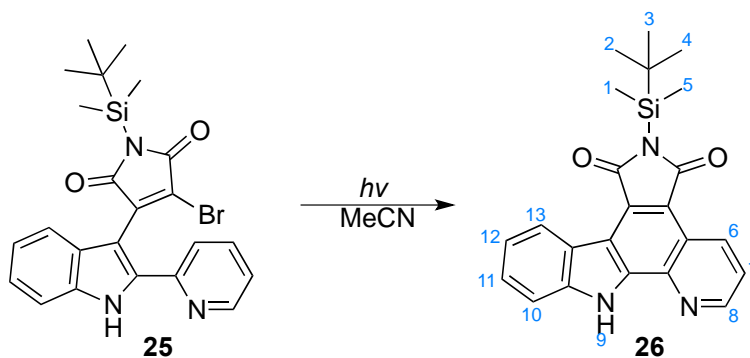


Figura 33. Síntesis de 26.

Se repitió la metodología de Meggers *et. al.* (Figura 33) [45] descrita para la síntesis de 22. Se observó muy poca o nula solubilidad en los disolventes orgánicos probados, lo que dificultó la purificación y caracterización del compuesto. No se logró calcular el rendimiento de esta reacción. Se caracterizó por IR, los datos de ¹H NMR descritos son los reportados.

IR (cm⁻¹) ν : 2963, 2365, 1782 (ν C=O asimétrica), 1725 (ν C=O simétrica), 1580, 1400, 1260, 1090.

¹H NMR (CDCl₃) δ : 10.36 (br s, 1H, H9), 9.44 (dd, J = 8.5, 1.4 Hz, 1H, H6), 9.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H8), 9.01 (dd, J = 4.2, 1.5 Hz, 1H, H13), 7.65 (dd, J = 8.5, 4.3 Hz, 1H, H7), 7.58 (m, 2H, H10, H11), 7.45 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H12), 1.09 (s, 9H, H2, H3, H4), 0.66 (s, 6H, H1, H5).

5.4 Obtención de complejos de rutenio precursores

Los complejos **30** y **33** han sido extensamente empleados en nuestro grupo de investigación, se sintetizaron conforme a la referencia reportada en cada caso y se comprobó su obtención por la técnica de ^1H RMN e IR en algunos casos.

5.4.1 Síntesis del precursor de rutenio **30**

⇒ Síntesis de $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$.

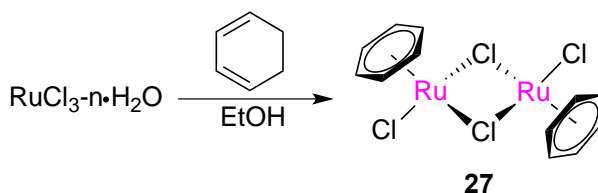


Figura 34. Síntesis de $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$ **27**.

Se empleó el método reportado por Zelonka y Baird (**Figura 34**) [52]. Se añadió 1,3-ciclohexadieno (6 mL, 62.90 mmol) a una solución de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.70g, 6.5 mmol) en 100 mL de etanol acuoso al 90%. La solución se calentó a 45 °C por 3 horas. Posteriormente, se redujo el volumen de la solución a ~30 mL y precipitó un sólido rojizo. El precipitado fue filtrado al vacío y lavado con etanol, obteniendo **27** como un sólido rojo (1.19 g, 73% rendimiento). La caracterización fue conforme a lo reportado.

^1H NMR (CD_3CN) δ : 4.30 (s, 12 H).

⇒ Síntesis de $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)]\text{PF}_6$.

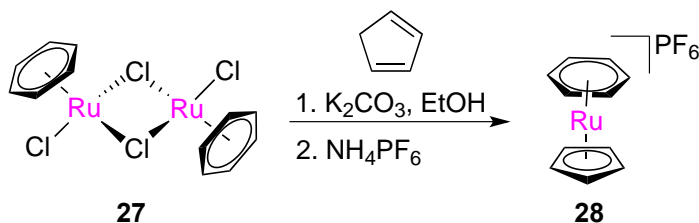


Figura 35. Síntesis de $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)]\text{PF}_6$ **28**.

Se utilizó el método reportado por Trost y Older (**Figura 35**) [53]. Se colocó el compuesto $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}_2]_2$ **27** (1.18 g, 2.36 mmol) con etanol (50 mL) en un matraz. Posteriormente se le añadió ciclopentadieno (3.5 mL, 42.4 mmol) recién destilado. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C por 7 horas con agitación vigorosa. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se filtró a través de una columna de celita. Consecutivamente, se pasaron 40 mL de etanol adicionales en la columna de celita. Se concentró en un rotavapor el etanol filtrado hasta llegar a un volumen de ~20 mL y se le añadió una disolución acuosa de NH₄PF₆ (1.6 g, 9.8 mmol, en 16 mL de H₂O), formándose un precipitado café. El disolvente remanente se evaporó en un rotavapor y la suspensión resultante se enfrió por varias horas. La mezcla de reacción se filtró al vacío recuperando un sólido café. El precipitado se disolvió en un mínimo de acetona y se añadió éter dietílico gota a gota hasta que ya no se observó la formación de precipitado. Se recuperó el precipitado por filtración al vacío y se obtuvo **28** como un sólido café (1.29 g, 70% de rendimiento).

¹H NMR (CD₃CN) δ: 4.46 (s, 5H, Cp), 3.65 (s, 6H, benceno).

⇒ Síntesis de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$.

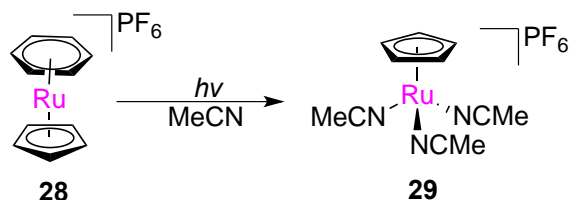


Figura 36. Síntesis de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ **29**.

Se utilizó la síntesis reportada por Trost y Older (**Figura 36**) [53]. En un reactor de fotólisis de cuarzo de 250 mL, se preparó una disolución de $[(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{C}_5\text{H}_5)]\text{PF}_6$ (**28**) (1.70 g, 4.37 mmol) y acetonitrilo (200 mL). La disolución fue desoxigenada burbujeando un flujo de argón por 30 minutos. Posteriormente se irradió la solución por 12 horas con una lámpara de presión media de Hg con una potencia de 450 W. Tras evaporar el disolvente al vacío se obtuvo **29** como un sólido café claro sensible al aire (1.86 g, 98% de rendimiento).

$^1\text{H RMN}$ (CD_3CN) δ : 4.31 (s, 5H, Cp), 1.99 (s, 9H, MeCN).

⇒ Síntesis de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{CO}]\text{PF}_6$.

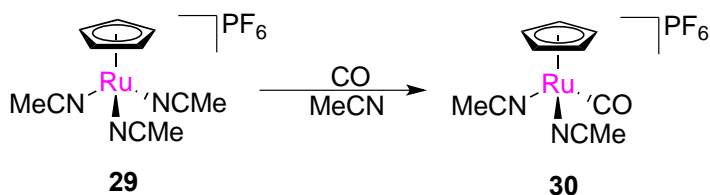


Figura 37. Síntesis de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{CO})]\text{PF}_6$ **30**.

Siguiendo la metodología reportada por Gill y Mann (**Figura 37**) [54], en un tubo de Schlenk previamente desoxigenado mediante 3 ciclos de vacío-argón, se añadió el compuesto **29** (0.66 g, 1.5 mmol) y acetonitrilo anhidro (8 mL). Posteriormente se burbujeó la disolución con $\text{CO}_{(g)}$ por 20 minutos a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente a sequedad y se obtuvo **30** como un sólido amarillo sensible al aire (0.62 g, 96% de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN) δ : 4.65 (s, 5H, Cp), 1.94 (s, 6H, MeCN).

IR (cm^{-1}) ν : 2004 (ν C=O).

5.4.2 Síntesis del precursor de rutenio **33**

\Rightarrow Síntesis de $[(\text{C}_6\text{H}_4\text{-}2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N})\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$.

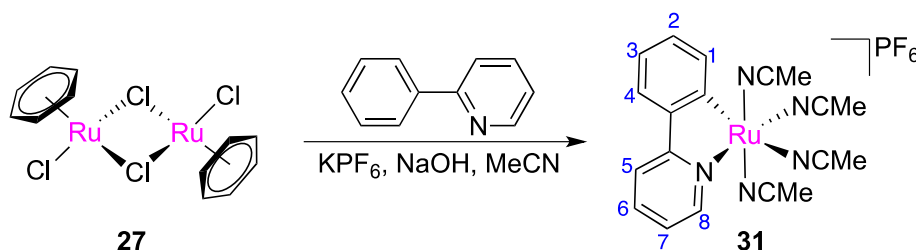


Figura 38. Síntesis de $[(\text{C}_6\text{H}_4\text{-}2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N})\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ **31**.

Se sintetizó el compuesto **31**, siguiendo la metodología reportada por Fernandez *et. al.* (**Figura 38**) [55]. Se mezcló el complejo de rutenio **27** (1.5 g, 3.01 mmol) con KPF_6 (2.22 g, 12.04 mmol), NaOH (0.48 g, 6.02 mmol), y 2-fenilpiridina (6.02 mmol) y 50 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se calentó a 50 °C por 20 horas. La suspensión amarilla resultante se evaporó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna en Al_2O_3 usando inicialmente CH_2Cl_2 como eluyente, y aumentando después la polaridad con diferentes mezclas CH_2Cl_2 :MeCN. Se colectó la fracción amarilla de la columna y se evaporó hasta sequedad obteniendo **31** como un sólido amarillo (2.21 g, 65% de rendimiento). La caracterización fue conforme a lo reportado.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 300 MHz) δ : 8.89 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, H8), 7.95 (dd, $J=7.4$, 0.8 Hz, 1H, H1), 7.86 (d, 8.2 Hz, 1H, H5), 7.72 (td, $J=8.0$, 1.5 Hz, 1H, H6), 7.70 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, H4), 7.15 (td, $J=6.0$, 1.4 Hz, 1H, H7), 7.07 (td, $J=7.4$, 1.4 Hz, 1H, H2), 6.95 (td, $J=7.7$, 0.8 Hz, 1H, H3), 2.49 (s, 3H, MeCN), 2.13 (s, 3H, MeCN), 1.94 (s, 6H, MeCN).

IR (cm^{-1}) ν : 2268 (ν C \equiv N), 834 (ν P-F).

⇒ Síntesis de *cis*-[Ru(2-C₆H₄-2'-py-κC,N)(phen)(NCMe)₂]PF₆.

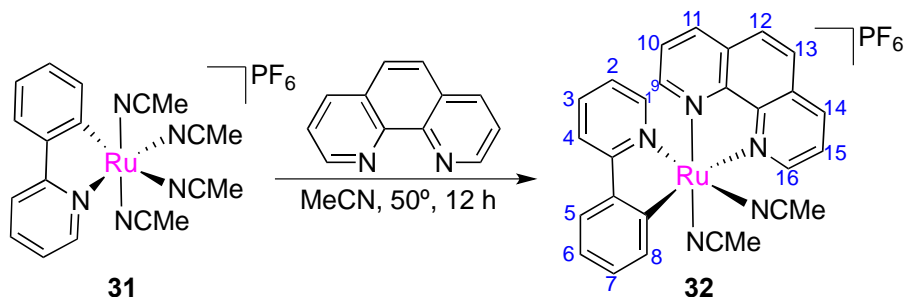


Figura 39. Síntesis de **32**.

Se sintetizó el compuesto **32** siguiendo la metodología reportada por Ryabov *et. al.* (**Figura 39**) [56]. Se añadió a un matraz de Schlenk el complejo **31** (0.33 g, 0.585 mmol) y fenantrolina (0.105 g, 0.583 mmol) y se desoxigenaron al vacío. El matraz fue purgado tres veces con N₂ y se le añadió MeCN anhidro (40 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 15 h. Se evaporó el disolvente al vacío y el residuo se disolvió en 10 ml de CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía en columna con Al₂O₃. Se concentró la fracción roja recuperada y se obtuvo **32** como un sólido rojizo (0.31 g, 80% de rendimiento). La caracterización fue conforme a lo reportado.

¹H RMN (300 MHz, CD₃CN) δ: 9.70 (dd, *J*=5.5, 2.0, 1H, **H16**), 8.70 (dd, *J*=9.0, 1.3 1H, **H8**), 8.28 (td, *J*=7.1, 1.3, 1H, **H4**), 8.22-8.13 (m, 3H), 8.16 (d, *J*=9.0, 1 H, **H12** ó **H13**), 8.03 (d, *J*=9.0, 1H, **H12** ó **H13**), 7.85 (td, *J*=7.5, 0.6, 2H, **H7**), 7.47 (td, *J*=7.8, 1.6, 1H, **H15**), 7.37-7.32 (m, 2H), 7.27 (dd, *J*=7.8, 1.1, 1H, **H3**), 7.10 (td, *J*=8.0, 1.3, 1H, **H6**), 6.57 (td, *J*=5.1, 0.8, 1H, **H2**), 2.28 (s, 3H, **MeCN**), 2.06 (s, 3H, **MeCN**).

IR (cm⁻¹) ν: 2952, 2923 (ν C-H), 2262 (ν C≡N), 833 (ν P-F).

⇒ Síntesis de *trans*-[Ru(2-C₆H₄-2'-py-κC,N)(phen)(NCMe)₂]PF₆.

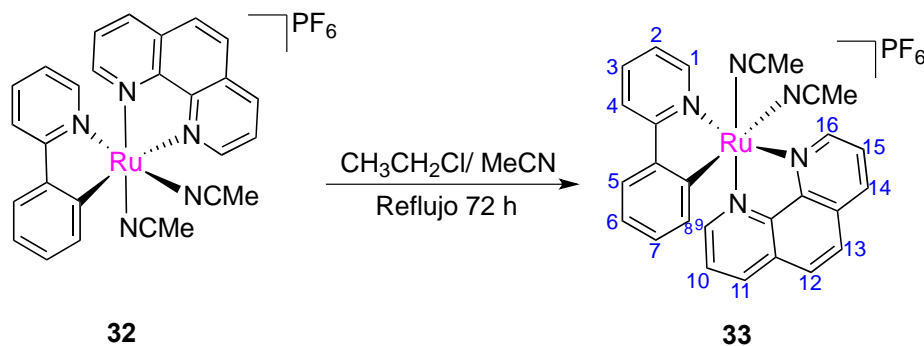


Figura 40. Síntesis de **33**.

Se sintetizó el compuesto **33** siguiendo la metodología reportada por Boff *et. al.* (**Figura 40**) [29]. Se añadió el compuesto **32** (100 mg, 151 μmol) a un tubo de Schlenk, el cual fue desoxigenado al vacío y purgado con N₂. Se adicionó al tubo una mezcla diclorometano/ acetonitrilo 10:1 (15 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 72 horas. Después de este tiempo, se redujo el volumen del disolvente y se purificó en una columna de Al₂O₃ usando una mezcla 9:1 CH₂Cl₂/MeCN como eluyente. La fracción púrpura oscura se recogió y se evaporó a sequedad al vacío, obteniendo **33** como un sólido morado (74.92 mg, 75% de rendimiento). La caracterización fue conforme a lo reportado.

¹H RMN (300 MHz, CD₃CN) δ: 9.61 (d, *J*=5.1, 1H, H16), 9.25 (d, *J*=5.7, 1H, H8), 8.55 (d, *J*=8.3, 1H, H11), 8.20 (d, *J*=8.3, 1H, H5), 8.12 (d, *J*=9.0, 1H, H14), 8.05 (d, *J*=6.0, 1H, H12 ó H13), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.91 (t, *J*=7.4, 1H, H7), 7.87 (d, *J*=5.4, 1H, H6), 7.69 (d, *J*=7.8, 1H, H15), 7.41-7.36 (m, 2H), 6.68 (t, *J*=7.1, 1H, H3), 6.47 (t, *J*=7.7, 1H, H2), 6.02 (d, *J*=7.5, 1H, H10), 2.28 (s, 3H, MeCN), 1.97 (s, 3H, MeCN).

IR (cm⁻¹) ν: 2265 (ν C≡N), 830 (ν P-F).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Diseño de los complejos

Con base en los antecedentes, el presente trabajo tenía como principal objetivo sintetizar los compuestos **8** y **9** reportados por Meggers [45] (**Figura 41**), así como 4 nuevos compuestos ciclometalados de rutenio con ligantes bidentados derivados de la staurosporina (compuestos **11-14**, **Figura 42**). Se pensaba que la selección de estos ligantes en los rutenociclos permitiría el desarrollo de inhibidores mejorados de la quinasa MST1. La obtención de estos compuestos representaría un paso importante para la elucidación del mecanismo de acción de la ruta Hippo y para el desarrollo de nuevas estrategias en la quimioterapia.

En primera instancia se planteó un análisis retrosintético (**Figura 43**) para la síntesis de los compuestos nuevos. Para este análisis se consideró que la sustitución de dos ligantes lábiles en complejos ciclometalados de rutenio permitiría la introducción de un quelato derivado de la staurosporina.

Para poder obtener los complejos **11-14** planteados, el proyecto se dividió en 3 etapas: i) síntesis de los ligantes, ii) síntesis de los precursores de rutenio, iii) síntesis de los complejos de rutenio.

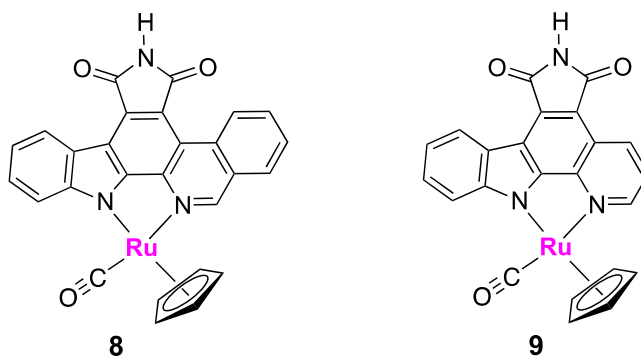


Figura 41. Complejos de rutenio con ligantes derivados de la staurosporina reportados [45].

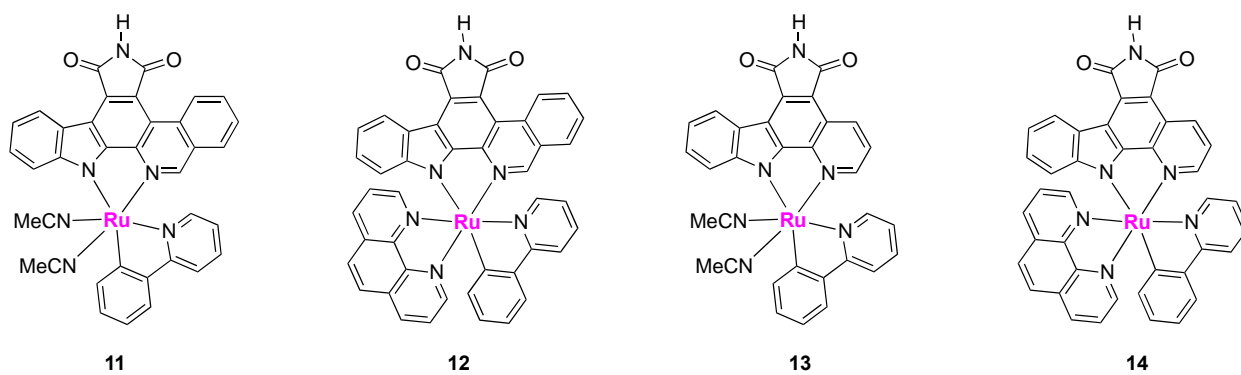


Figura 42. Complejos ciclometalados de rutenio con ligandos derivados de la staurosporina propuestos.

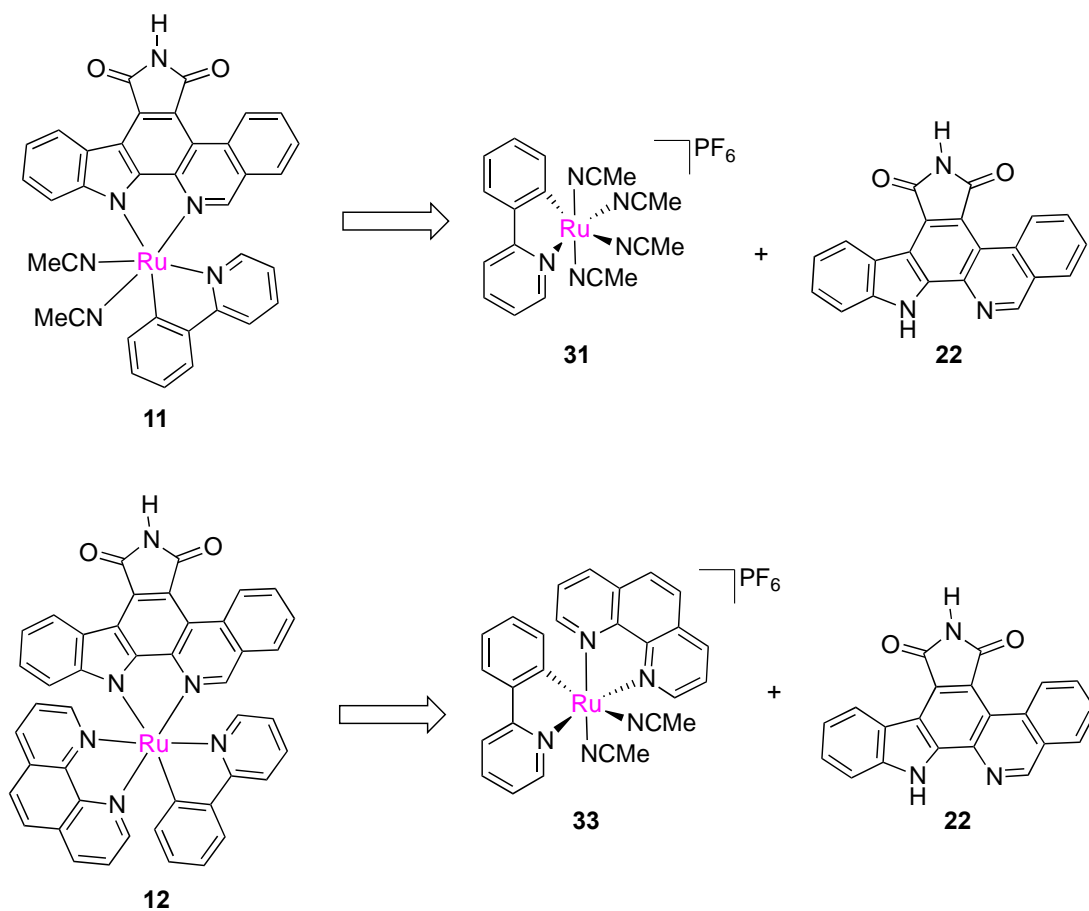


Figura 43. Análisis retrosintético para la obtención de los complejos **11** y **12**.

6.2 Síntesis de los ligantes

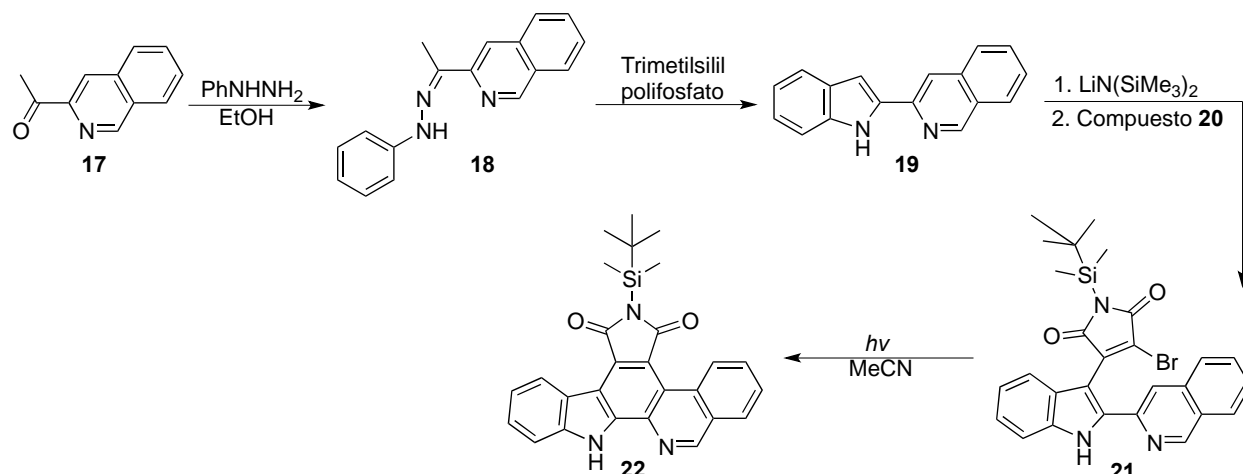
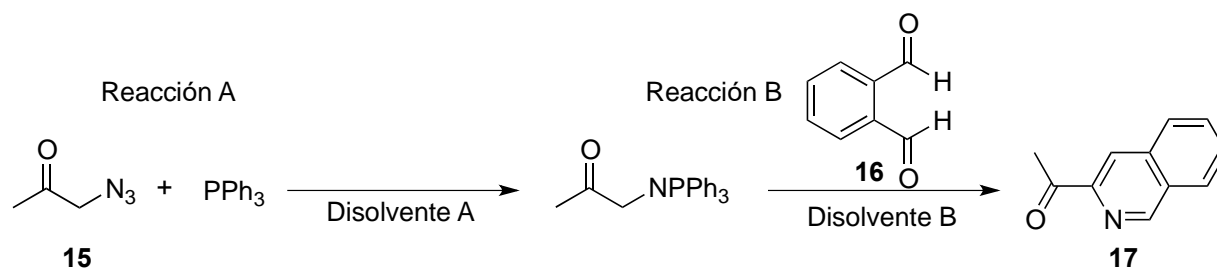


Figura 44. Ruta sintética reportada para la obtención del ligante **22** [45].

Se decidió seguir la ruta sintética reportada para la obtención del ligante **22** (**Figura 44**) [45], aunque no fue posible adquirir comercialmente la isoquinolina **17**, por lo que decidió sintetizar **17** siguiendo la metodología reportada por Aubert *et al.* [48] a partir de α -azidoacetona y *o*-ftalaldehído (**Figura 24**). No obstante, siguiendo este procedimiento no se logró obtener más del 11% de rendimiento. Debido a esto, se realizaron distintas modificaciones a las condiciones de reacción.

La metodología original consiste en añadir trifetilfosfina (1 equivalente) a una disolución de α -azidoacetona **15** (1 equivalente) con CH_2Cl_2 para formar el iminofosforano intermediario (Reacción A) a 0°C . Posteriormente se añade la disolución resultante a una disolución de *o*-ftalaldehído **16** (1 equivalente) en CH_2Cl_2 y se deja en agitación una noche a temperatura ambiente (Reacción B). Durante la optimización se cambiaron las variables de temperatura, tiempo de reacción, disolvente, relación equimolar, orden de adición de los reactantes, atmósfera inerte y se añadieron aditamentos como malla molecular y sulfato de magnesio para tratar de desplazar el equilibrio de la reacción. Las variables y los rendimientos (desde trazas hasta 34%) de algunas de estas pruebas, se resumen en la **Tabla 7**. Además se observó que el rendimiento disminuye hasta en un 17% al aumentar la concentración de los reactantes en la disolución. Finalmente, se emplearon las condiciones de la entrada 9 de la **Tabla 7**.

Tabla 7. Optimización de condiciones para la obtención de la isoquinolina **17**.



#	Reacción A					Reacción B				
	Equivalentes C ₃ H ₅ ON ₃	Equivalentes PPh ₃	Disolvente 1	Tiempo de reacción	Temperatura	Equivalentes de C ₈ H ₆ O ₂	Disolvente 2	Tiempo de reacción	Temperatura	% Rendimiento
1	1	1	CH ₂ Cl ₂	3 hrs	0 °C	1	CH ₂ Cl ₂	12 hrs	25 °C	8%
2	1	1	CH ₂ Cl ₂	10 hrs	0 °C	1	CH ₂ Cl ₂	12 hrs	25 °C	4-10%
3	1	1	CH ₂ Cl ₂	24 hrs	0 °C	1	CH ₂ Cl ₂	12 hrs	25 °C	11%
					-10 °C					13%
4	1	1	CH ₂ Cl ₂	48 hrs	0 °C	1	CH ₂ Cl ₂	72 hrs	40 °C	7%
					-10 °C				25 °C	17%
5	1	1	CH ₂ Cl ₂	72 hrs	-5 °C	1	CH ₂ Cl ₂	72 hrs	50 °C	0.5-4%
6	1	1	CH ₂ Cl ₂	12 hrs	-5 °C	1	Tolueno	12 hrs	25 °C	<5%
7	1	1	CH ₂ Cl ₂	12 hrs	-5 °C	1	Éter	12 hrs	25 °C	<5%
8	1	1	Éter	12 hrs	25 °C	1	Éter	12 hrs	25 °C	6%
9	1.5	1.5	Éter	3 hrs	-5 °C	1	Éter	12 hrs	25 °C	34%
10	1.5	1.5	Tolueno	3 hrs	-5 °C	1	Tolueno	18 hrs	100 °C	30%

El compuesto *o*-ftalaldehído **16** empleado en la síntesis anterior también fue sintetizado en nuestro laboratorio, tomando como referencia la metodología reportada por Zhu y Wang [47]. Sin embargo, esta metodología involucra el uso de ácido sulfúrico fumante (H₂SO₄•xSO₃) y se optó por reemplazarlo con H₂SO₄ concentrado y calentamiento a 60 °C por 4 horas con purgas constantes con argón para desplazar el bromo desprendido durante el calentamiento. Se logró obtener rendimientos por arriba del 70%.

Una vez que se logró reunir 2 gramos del compuesto **17** se procedió a seguir la ruta planteada en la **Figura 44** y se sintetizó el compuesto **18**. Para aumentar el rendimiento obtenido de ~60%, fue necesario añadir una cantidad catalítica de H₂SO₄ (1 gota por cada 0.4 g del compuesto **17**) y hacer lavados al precipitado formado, con una mezcla

10:1 agua destilada:EtOH, en vez de solo lavados con etanol, ya que **18** es parcialmente soluble en etanol. Se logró aumentar el rendimiento a >80%, que es similar al reportado.

Continuando con la ruta sintética de la **Figura 44**, se intentó replicar (3 veces) la metodología reportada para la síntesis del indol **19**, pero los rendimientos obtenidos no sobrepasaron el 10%. La metodología reportada [45] consiste en mezclar la hidrazona **18** (5.36 mmol) con ácido polifosfórico trimetilsilil éster y calentar a 150 °C por 12 horas. Transcurrido este tiempo se debe neutralizar con NaOH, extraer con acetato de etilo y purificar por cromatografía en columna con sílica gel.

Se probó modificando algunos parámetros de la reacción descrita en el párrafo anterior; se incrementó la temperatura (de 150 °C a 180 °C), se aumentó y disminuyó el tiempo de reacción (se probaron 4, 8 y 18 horas). Sin embargo, no hubo un cambio significativo en el rendimiento por lo que se optó por cambiar de metodología.

Revisando en la literatura, no se encontró otro reporte específicamente para la síntesis del indol **19**, así que se siguieron metodologías generales para la formación de indoles con diferentes sustituyentes. Se probaron 4 diferentes metodologías que se resumen a continuación:

Método 1 (Figura 45): Se intentó hacer una síntesis de indol de Fischer catalizada por ácido y se mezcló **18** con metanol y H₂SO₄. Se decidió llevar a cabo la reacción en un horno de microondas por 5 minutos a 65 °C. No se observó la formación de **19**.

Variaciones: Se probó dejar la reacción por 15 y 30 minutos en el equipo de microondas a 65 °C. También se sustituyó el metanol por etanol. No se apreció ningún cambio. Por otro lado, se intentó poniendo a reflujo la mezcla durante 1 noche en lugar de usar la frecuencia de microondas pero tampoco se observó la formación de **19**.

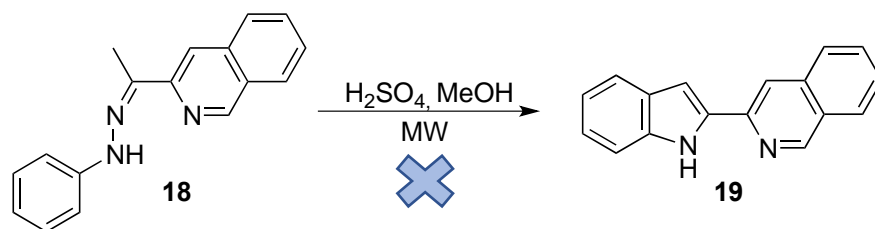


Figura 45. Primer intento de síntesis del indol **19** por microondas (MW).

Método 2 (Figura 46): Se mezcló la isoquinolina **17** (1 eq.) con clorhidrato de fenilhidrazina (1 eq.) y ácido acético (28 eq.). La mezcla de reacción se puso a reflujo por 2 horas. Transcurrido este tiempo se detectó por cromatografía en capa fina (TLC) la formación del indol **19** y la hidrazona **18**. Sin embargo, tras purificar se comprobó que el producto mayoritario fue la hidrazona **18** y solo se formaron trazas del compuesto de interés.

Variaciones: Se cambió el tiempo de reflujo por 1, 8, 12 y 18 horas. No hubo ningún cambio significativo.

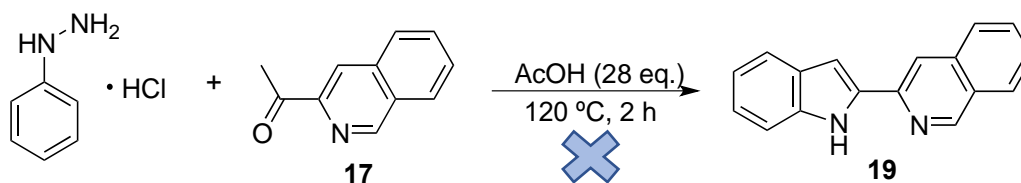


Figura 46. Segundo intento de síntesis del indol **19**.

Método 3 (Figura 47): Se basó en la metodología reportada por Lipinska y Czamocki [57] para la síntesis de indoles. Se preparó una mezcla 0.16 M $ZnCl_2$ /dietilenglicol calentando hasta obtener un líquido amarillo. Posteriormente se añadió a la mezcla la hidrazona **18** (0.5 mmol) y se debía irradiar con frecuencias de microondas a 190 °C durante 7 minutos. Desafortunadamente, el equipo de microondas utilizado no logró llegar a esa temperatura y se apagó sistemáticamente al pasar los 100 °C. Por este motivo se intentó realizar la reacción a 100 °C por 7, 10 y 15 minutos pero solo se formaron trazas de **19**.

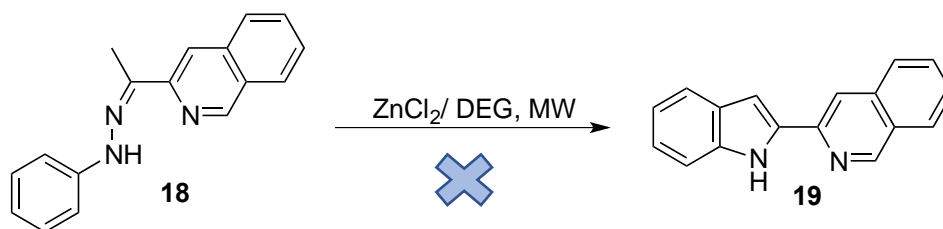


Figura 47. Tercer intento de síntesis del indol **15**. DEG= Dietilenglicol, MW= microondas.

Intento 4 (Figura 48): Se basó en la metodología para la síntesis de indoles reportada por Tompkins *et al* [49] que consiste en mezclar la hidrazona **19** con ácido polifosfórico y calentar a 130 °C. Posteriormente la mezcla de reacción se debe neutralizar, extraer con diclorometano y purificar por cromatografía. Se probaron distintos tiempos de reacción (0.5, 1.5, 6 y 12 horas) y temperaturas de 130 °C, 150 °C y 180 °C. Los mejores resultados se lograron obtener a 130 °C y 6 horas de reacción, con un rendimiento del 18%.

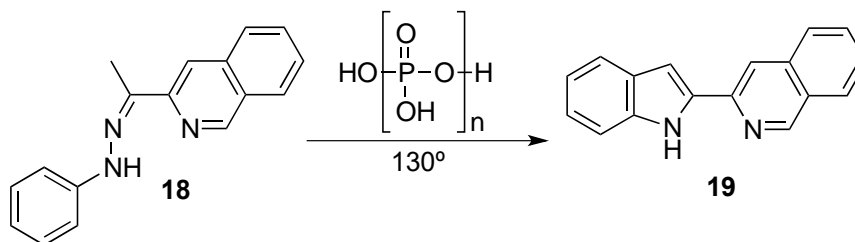


Figura 48. Reacción para la obtención de 3-(1*H*-indol-2-il)isoquinolina **19**.

Continuando con la ruta de síntesis (**Figura 44**) se preparó el compuesto **21** tal cual la referencia, en donde los autores llevan el crudo de reacción de este compuesto a la siguiente reacción, ya que no es estable para cromatografía en columna.

Se obtuvo el espectro de IR del sólido, en donde se puede distinguir la señal de estiramiento N-H a 3229 cm^{-1} y también se observan las bandas vibracionales características del anillo imídico [58]: tensión (*stretching*) asimétrica y simétrica de C=O en 1775 cm^{-1} y 1722 cm^{-1} , tensión del enlace C-N en 1364 cm^{-1} , tensión transversal del enlace C-N-C del ciclo imídico en 1025 cm^{-1} y la flexión (*bending*) fuera del plano del enlace C-N-C en 735 cm^{-1} .

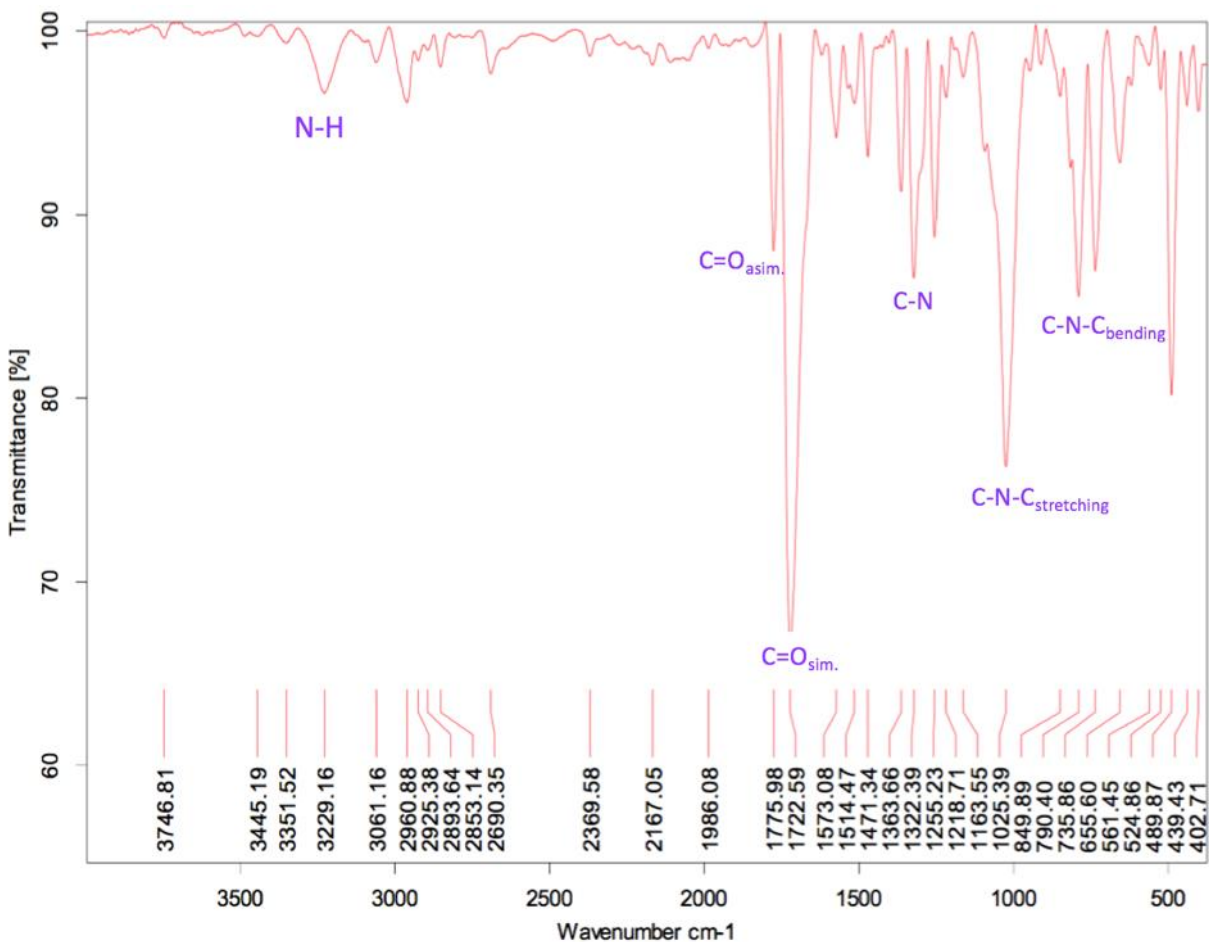


Figura 49. Espectro de IR de la molécula 21.

Posteriormente, se llevó a cabo la última reacción de la ruta sintética de la **Figura 44**. El compuesto obtenido presentó muy baja solubilidad en todos los disolventes probados (MeCN, MeOH, EtOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , H_2O , AcOEt, entre otros). A pesar de este

inconveniente, se procedió a la purificación por cromatografía en columna con sílica gel conforme a lo reportado, sin embargo, la mayor parte de la muestra se retuvo en la parte superior de la columna como un sólido, y sólo se recuperó **22** con un 18% de rendimiento (calculado partiendo de 0.1 g del indol **19**).

Con la fracción del compuesto **22** que se logró disolver en CDCl_3 , se pudo caracterizar el producto de la reacción por ^1H RMN, en donde la integración corresponde a los 25 H esperados (**Figura 50**). Cabe mencionar que debido a la solubilidad muy baja del compuesto, fue necesario dejar el tubo con la muestra en el sonicador por 30 minutos, calentar algunos segundos a baño María, retirar del calentamiento e ir agitando vigorosamente la muestra y finalmente filtrar el precipitado remanente para poder adquirir dicho espectro.

Lamentablemente, debido a los muy bajos rendimientos obtenidos en las reacciones anteriores, la cantidad final obtenida fue de ~30 mg, por lo que no fue suficiente para poder realizar las reacciones de intercambio de ligante planteadas. Aunado a esto, no fue posible replicar esta síntesis o diseñar una nueva síntesis debido a factores fuera de nuestro alcance (tiempo de importación de reactivos y duración del programa de maestría, entre otros).

Asimismo se adquirió el espectro de ^{13}C RMN (**Figura 51**), aunque en este caso se detectaron 16 de las 24 señales esperadas, ya que no se logran apreciar las señales de algunos carbonos cuaternarios, muy probablemente debido a la baja concentración de la muestra. Sin embargo, las demás señales coinciden con lo reportado.

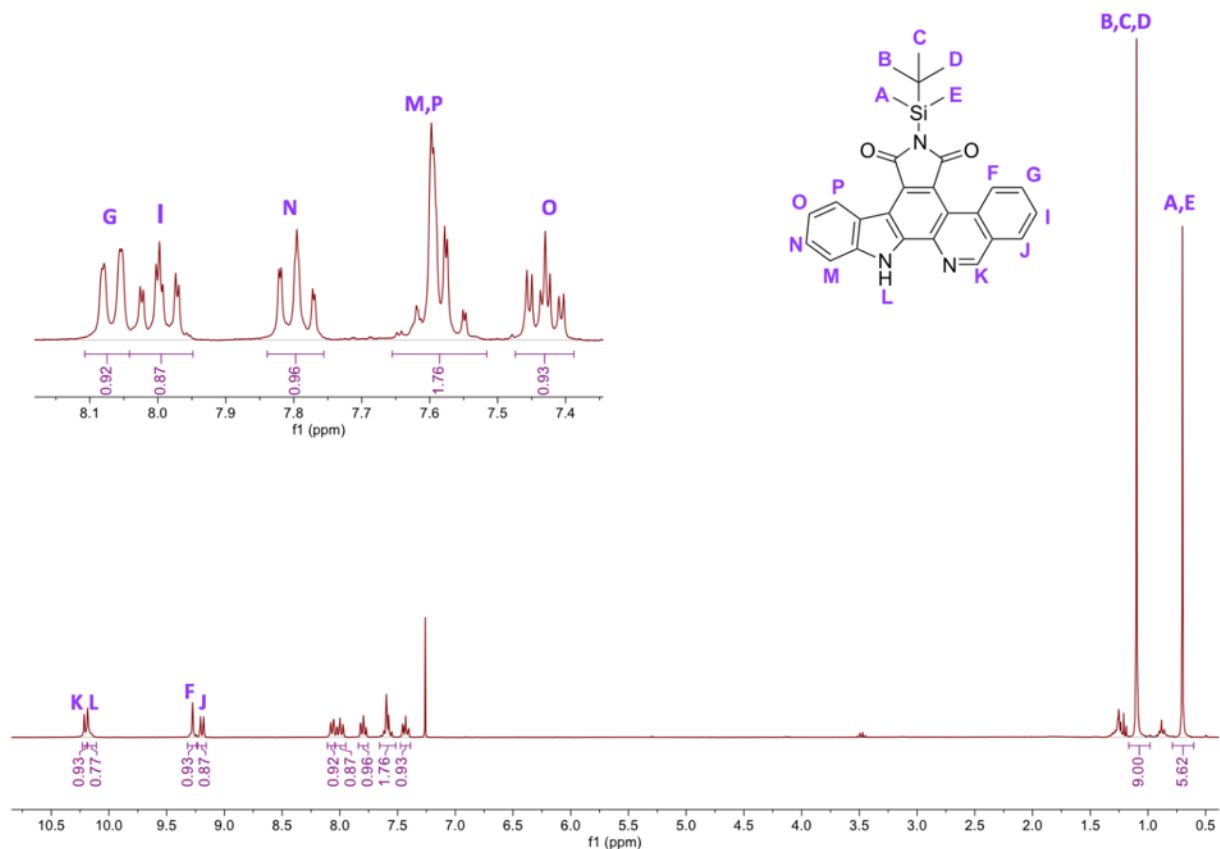


Figura 50. Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) de la molécula 22.

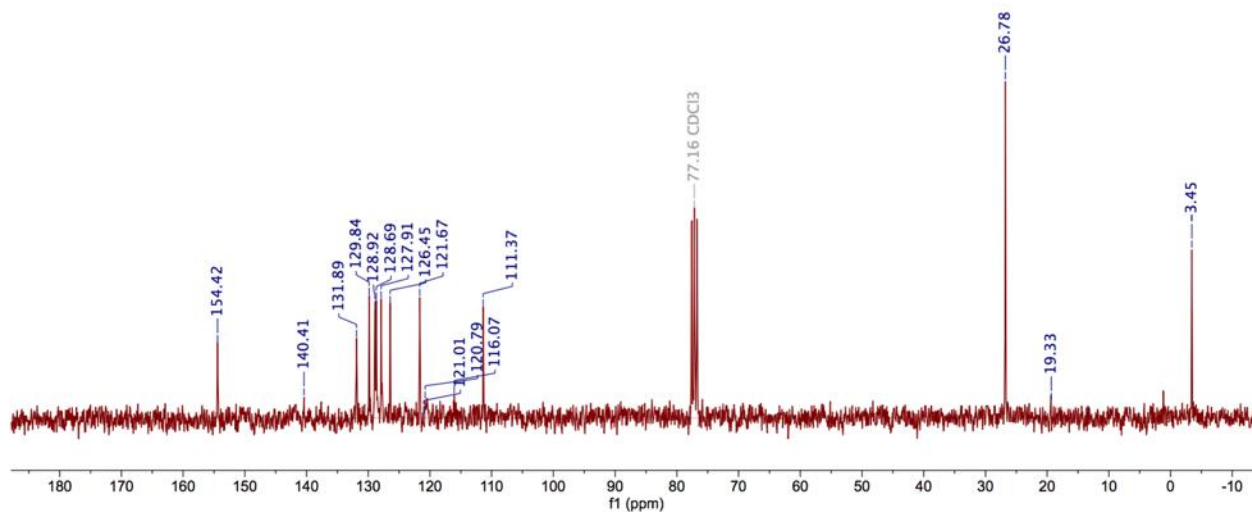


Figura 51. Espectro de ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) de la molécula 22.

Si bien las metodologías reportadas para la síntesis de la isoquinolina **17**, el indol **19** y el ligante **22** describen rendimientos moderados (~30-50%), no se lograron reproducir dichos rendimientos y fue necesario realizar distintas modificaciones en los métodos reportados.

Debido a los bajos rendimientos obtenidos para sintetizar el ligante **22**, se optó por intentar preparar el ligante **26**, estructuralmente similar a **22** pero con un anillo aromático menos. Para la obtención del ligante **26**, las reacciones se realizaron conforme a la síntesis reportada [45], a excepción de la síntesis del indol **24**, en donde se empleó ácido polifosfórico en lugar de ácido polifosfórico trimetilsilil éster (**Figura 52**).

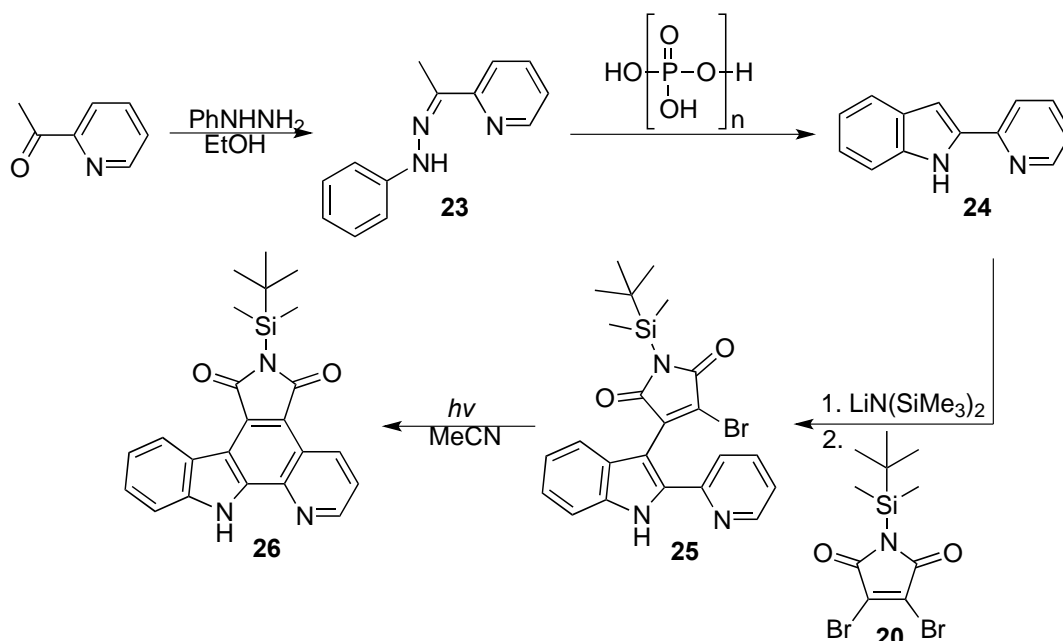


Figura 52. Procedimiento general para la obtención del ligante **26** [43].

Al igual que en la síntesis del ligante **22**, el compuesto **26** fue muy poco soluble en los disolventes orgánicos probados (CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}_2$, CHCl_3 , MeOH , EtOH , MeCN , Et_2O , Acetona, H_2O , AcOEt , Tolueno, DMSO), lo que dificultó su purificación. Se intentó purificar por cromatografía en columna con sílica gel, pero de manera similar que con el compuesto **22**, la mayor parte de la muestra se quedó retenida en la columna.

Como se ha discutido, una particularidad de los ligantes **22** y **26** que se intentaron preparar y que fue una gran limitante para cumplir los objetivos del proyecto, fue la baja solubilidad que presentaron ambos compuestos en disolventes orgánicos. En relación con esta problemática, en la metodología reportada por Meggers *et. al.* [45] para el ligante **26**, se menciona que inicialmente ellos tampoco lo pudieron utilizar como sustrato para pruebas de coordinación debido a la muy pobre solubilidad de este compuesto. A raíz de esto, Meggers y colaboradores incorporaron un grupo $-\text{SiR}_3$ (proveniente de TBSCl; cloruro de *tert*-butildimetilsililo) para aumentar la solubilidad de la molécula y así, lograron sintetizar una serie de ligantes similares estructuralmente (entre ellos el ligante **22**) y pudieron llevar a cabo las reacciones de coordinación al rutenio.

Relacionando los resultados obtenidos con la problemática inicial del grupo de Meggers, cabe la posibilidad de que se haya perdido significativamente el grupo $-\text{SiR}_3$ en alguna de las dos reacciones en las que está involucrado: i) litiación para la obtención de **21** o **25**, ii) fotólisis para la obtención de **22** o **26**. El grupo protector TBS utilizado es resistente a bases fuertes apróticas y a temperaturas debajo de los $0\text{ }^\circ\text{C}$, pero hay reportes de ser lábil a ácidos [59]. Por las características mencionadas se piensa que la base $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ empleada en la reacción de litiación no interfirió en la posible desprotección. Sin embargo, para finalizar esta reacción fue necesario un tratamiento con una solución acuosa de HCl al 10% (**Figura 53**). Se piensa que un exceso del ácido podría haber producido en cierta medida la ruptura del enlace Si-N (energía de enlace (D)= 355 kJ/mol) y la formación de un enlace Si-O (D= 452 KJ/mol) más fuerte (**Figura 54**).

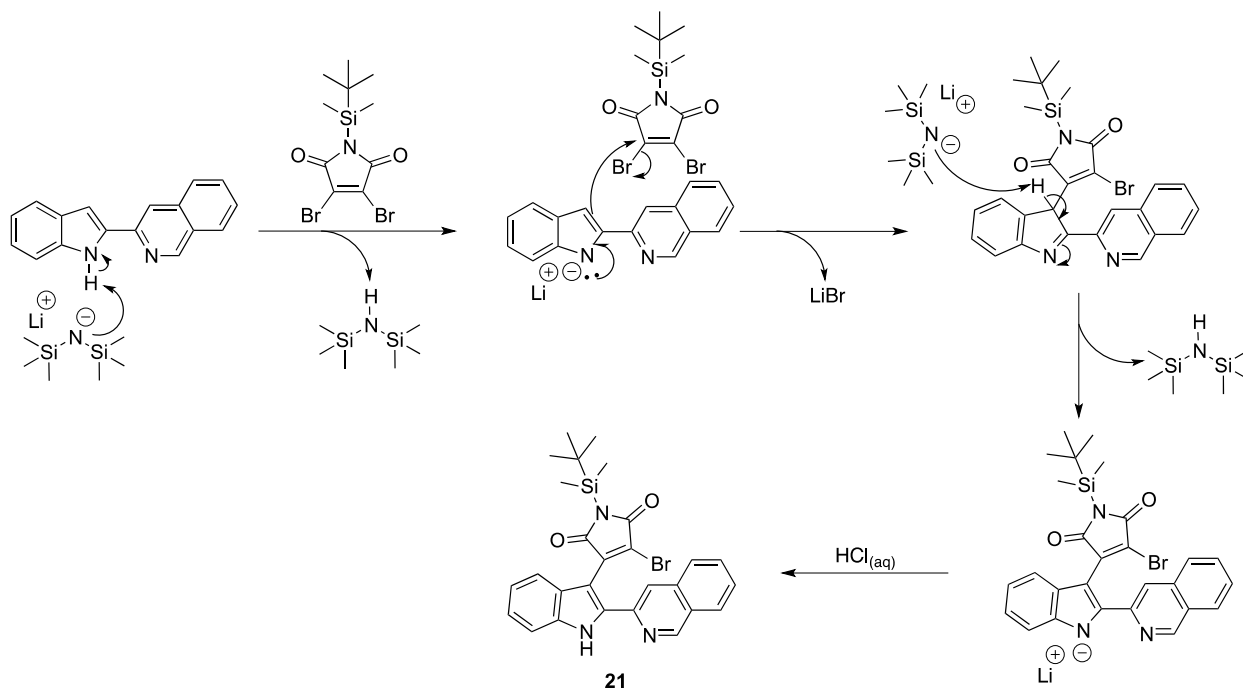


Figura 53. Mecanismo propuesto para la formación de **21**

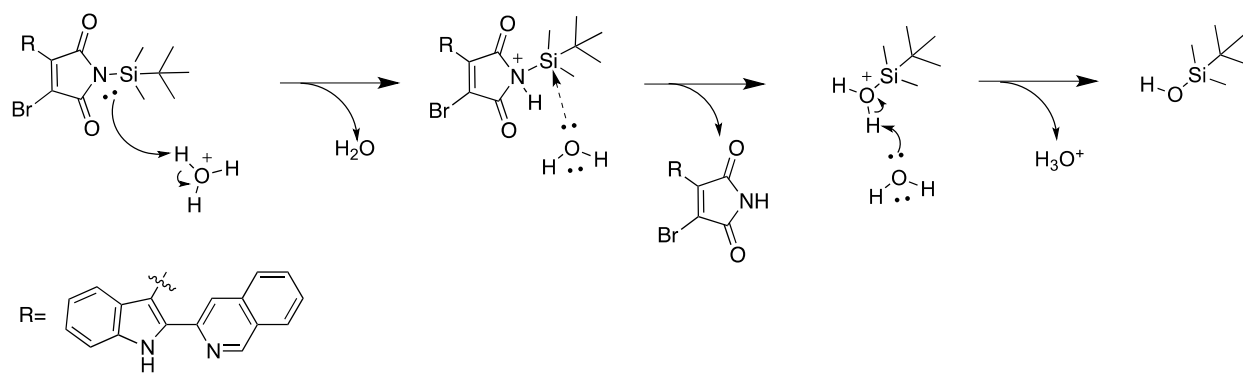


Figura 54. Posible mecanismo para la pérdida del grupo $-\text{SiMe}_2(\text{CMe}_3)$.

6.3 Síntesis de los complejos precursores de rutenio

Se lograron obtener los 3 precursores de rutenio **30**, **31** y **33** planeados para llevar a cabo este proyecto (**Figura 55**) con rendimientos conforme a lo reportado, en el rango de 65-75%.

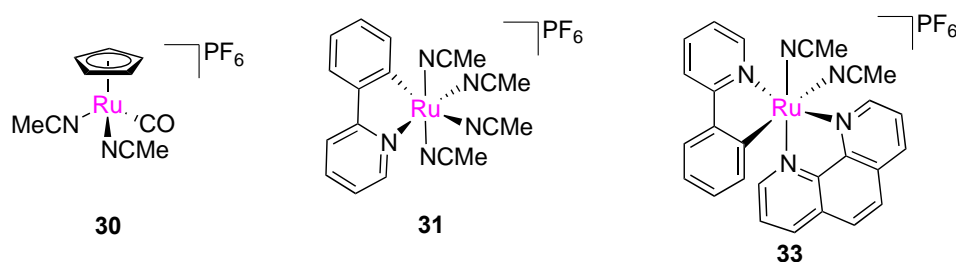


Figura 55. Precursores de rutenio sintetizados

Los complejos precursores de rutenio **31** y **33** se escogieron por contar con un fragmento ciclometalado de 2-fenilpiridilo (phpy) y ligantes lábiles que permitirían realizar un intercambio por quelatos derivados de la staurosporina. Además, estos compuestos han sido estudiados por nuestro grupo de investigación en la última década, y se ha logrado recopilar información valiosa en cuanto a su síntesis y su reactividad. Por ejemplo, se determinó que el compuesto **33** presenta una notablemente mayor reactividad en reacciones de intercambio de ligantes, en comparación a su isómero cinético **32** (**Figura 56**) [30,60].

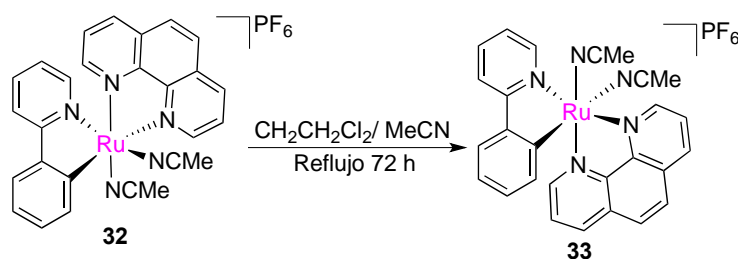


Figura 56. Isómeros cinético (**32**) y termodinámico (**33**).

En los estudios realizados por nuestro grupo de investigación, los dos ligantes MeCN en **32**, ambos *trans* a un átomo de N con hibridación sp² no pudieron ser sustituidos por otro

ligante. Por el contrario, su isómero **33** en el que un MeCN se encuentra en posición *trans* al átomo de C del anillo del fenilo *orto*-metalado a rutenio, las reacciones de sustitución de ligante se dieron rápida y cuantitativamente al probarse con varios ligantes monodentados y bidentados [30,60]. Asimismo, se determinó que los ligantes MeCN en **33** pueden ser fácilmente sustituidos por quelatos N^N gracias al gran efecto *trans* del átomo de C del ligando phpy ciclorutenado.

6.4 Pruebas de coordinación de ligante.

Debido a que no se logró obtener suficiente cantidad de los ligantes **22** y **26**, se optó por realizar pruebas de intercambio de los dos acetonitrilos lábiles de los precursores de rutenio **26** y **29** sintetizados, por un quelato N^N, empleando la hidrazona **18** y el indol **24**, que son precursores de los ligantes **22** y **26** respectivamente. Se decidió utilizar estos compuestos ya que fueron los que se lograron obtener en rendimientos significativos.

6.4.1 Reacción del precursor de rutenio **30** con el ligante **18**

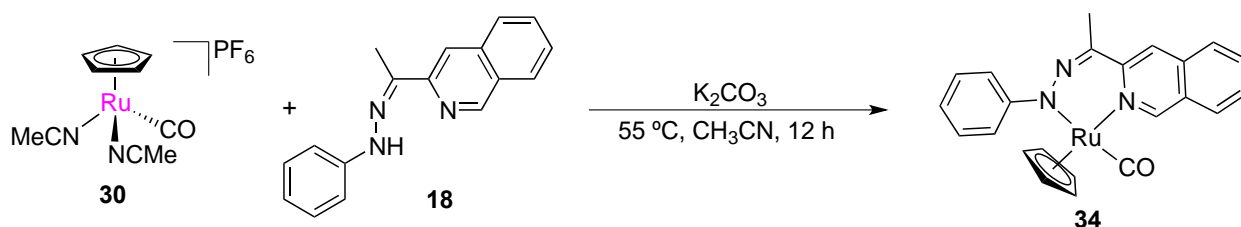


Figura 57. Reacción de intercambio de ligante

Se emplearon las condiciones de reacción reportadas por Meggers (Figura 57) [45] para obtener el compuesto **8**. Se colocaron el precursor de rutenio **30** (1 eq.), el compuesto **18** (1 eq.), K_2CO_3 (1.2 eq.) y acetonitrilo en un tubo de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento a $55\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. En el transcurso de este tiempo, la disolución inicialmente amarilla pasó a un

color rojo intenso. Al terminar el tiempo de reacción, se evaporó a sequedad y se obtuvo un sólido rojo que se purificó por cromatografía en columna con Al_2O_3 , empleando una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeCN}$ (9:1) como eluyente. Se observó cualitativamente (cambio de color rojo a café) que este compuesto se descompone en estado sólido, aun manteniéndolo en atmósfera inerte.

CARACTERIZACIÓN

Se caracterizó el compuesto **34** mediante espectrometría de IR (**Figura 58**) y ^1H RMN (**Figura 59, tabla 8**). No fue posible caracterizar este compuesto por difracción de rayos X, análisis elemental ni por espectrometría de masas debido a que el compuesto sufrió descomposición en el proceso de purificación, al tratar de eliminar los residuos de la materia prima.

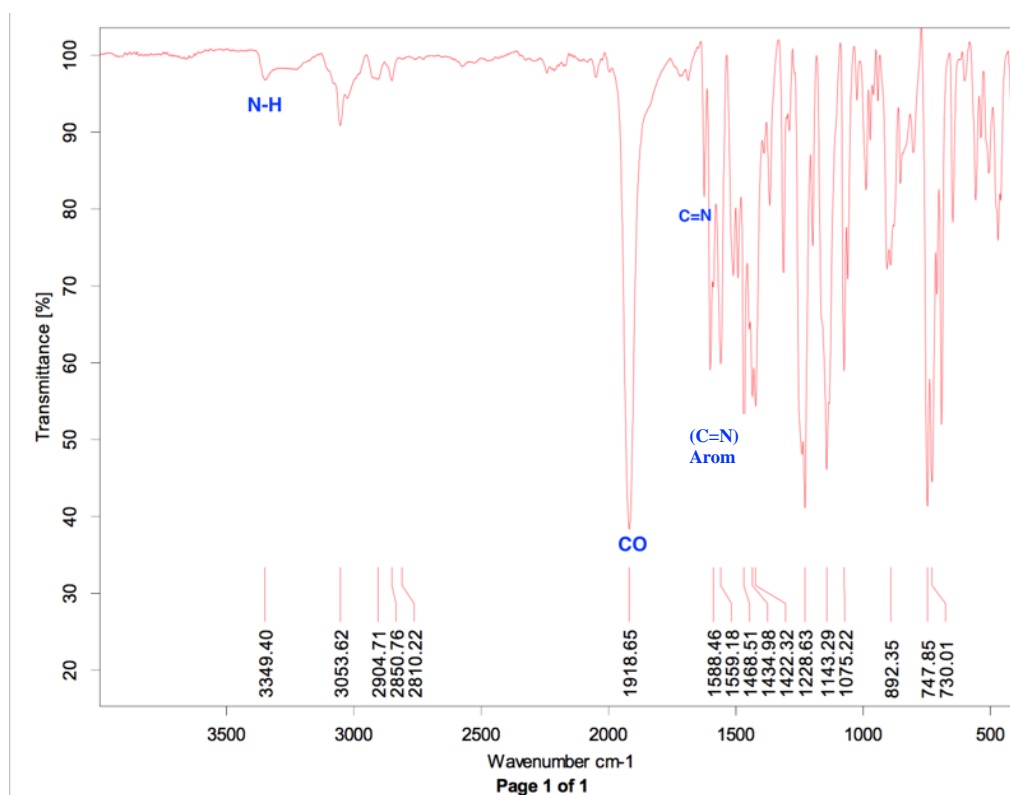


Figura 58. Espectro de IR del compuesto **34**.

IR.

En el espectro de IR se puede distinguir la banda de vibración del ligante CO a una frecuencia de 1918 cm^{-1} . Si se compara este valor con el del precursor de rutenio **30** a 2004 cm^{-1} (a un mayor número de onda), se puede concluir que en el compuesto obtenido hay una mayor retrodonación π del rutenio al ligante CO, es decir, que la coordinación con el ligante N[^]N está provocando un aumento en la densidad electrónica del centro metálico.

Otro factor clave en la caracterización, es la ausencia de la banda intensa a 831 cm^{-1} (característica del anión PF_6^-), ya que se esperaba la formación de un complejo neutro. Otras señales que se pueden distinguir en el espectro son la banda del estiramiento $\text{C}=\text{N}$ del enlace de la hidrazona en $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ y la señal en 1588 cm^{-1} del enlace $(\text{C}=\text{N})_{\text{arom}}$. Por otro lado, se observa una banda en 3349 cm^{-1} del enlace N-H, lo cual indica la presencia de ligante **18** libre.

^1H RMN.

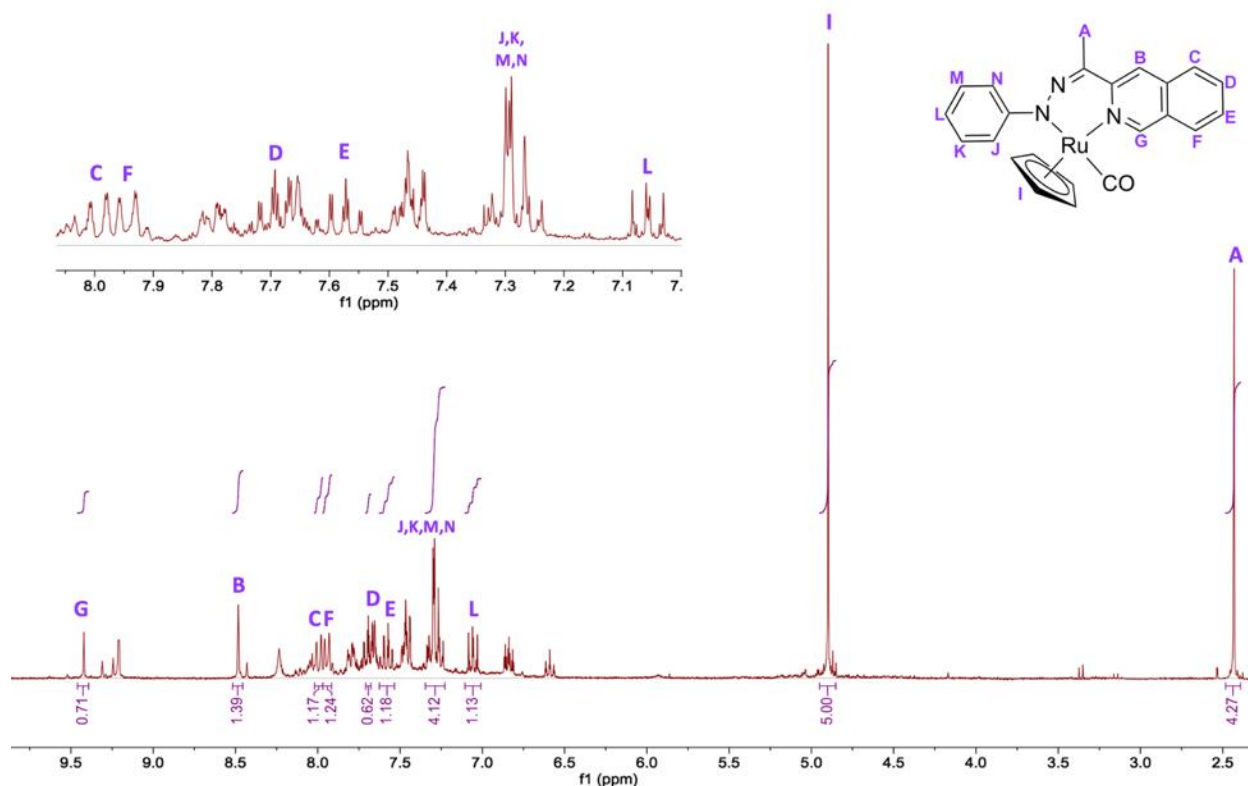


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (CD_3CN) del compuesto **34**.

Tabla 8. Caracterización del compuesto **34**. La Integración presentada es relativa, no se tomó en cuenta la integración del ligante libre presente en la muestra.

H asignado	δ (ppm)	Multiplicidad	Integración
A	2.43	s	4 H
I	4.90	s	5 H
L	7.10-7.01	m	1 H
J,K, M, N	7.35-7.23	m	4 H
E	7.57	t	1 H
D	7.69	t	1 H
F	7.94	d	1 H
C	7.99	d	1 H
B	8.48	s	1 H
G	9.42	s	1 H

Los datos obtenidos en ^1H RMN confirman la presencia de todos los H esperados en el complejo **34** propuesto. En el espectro adquirido se pueden observar señales del ligante libre, por lo que se realizó una integración relativa de las señales de interés sin tomar en cuenta las señales del ligante **18** (Tabla 8). Sin embargo, se aprovecharon las señales con multiplicidades y δ conocidos para poder asignar los H aromáticos en la región de 7.69 -7.10 ppm. En el espectro de la Figura 60 se muestra la comparación de los protones pertenecientes al compuesto **34** y al ligante **18**.

Para la integración de las señales del espectro, se tomaron como referencia los 5 H del ciclopentadienilo (H_I). Esta señal tuvo un desplazamiento a campo bajo de 0.25 ppm en comparación al precursor de rutenio **30**. En cuanto a los otros sistemas aromáticos del compuesto, se pueden distinguir claramente en el espectro las señales de H_G , H_B y H_L ; H_G tuvo un desplazamiento de 0.22 ppm a campo bajo, H_B de 0.05 ppm y H_L de 0.16 ppm. Las señales de H_C y H_F aparecen como dobletes en 7.99 y 7.94 ppm respectivamente, lo cual indica un desplazamiento a campo bajo de 0.07 ppm en ambos casos. A su vez, las señales para los 4 H aromáticos del grupo fenilo (H_J , H_K , H_M y H_N) aparecen en la región de 7.35-7.23 ppm. Además, se puede distinguir un multiplete correspondiente a H_L que tuvo un desplazamiento a campo bajo de 0.16 ppm. Los

desplazamientos de estas señales nos indican que hubo un cambio en las nubes electrónicas de los sistemas π de los anillos aromáticos, en comparación con el ligante libre **18**.

Finalmente, la integración de los H_A no concuerda exactamente con lo esperado (3 H). Es muy factible que esto se deba a una superposición con la señal del ligante libre, ya que los H_A están en una posición lo suficientemente alejados del centro metálico y puede ser que no resienten influencia electrónica tras la coordinación al rutenio.

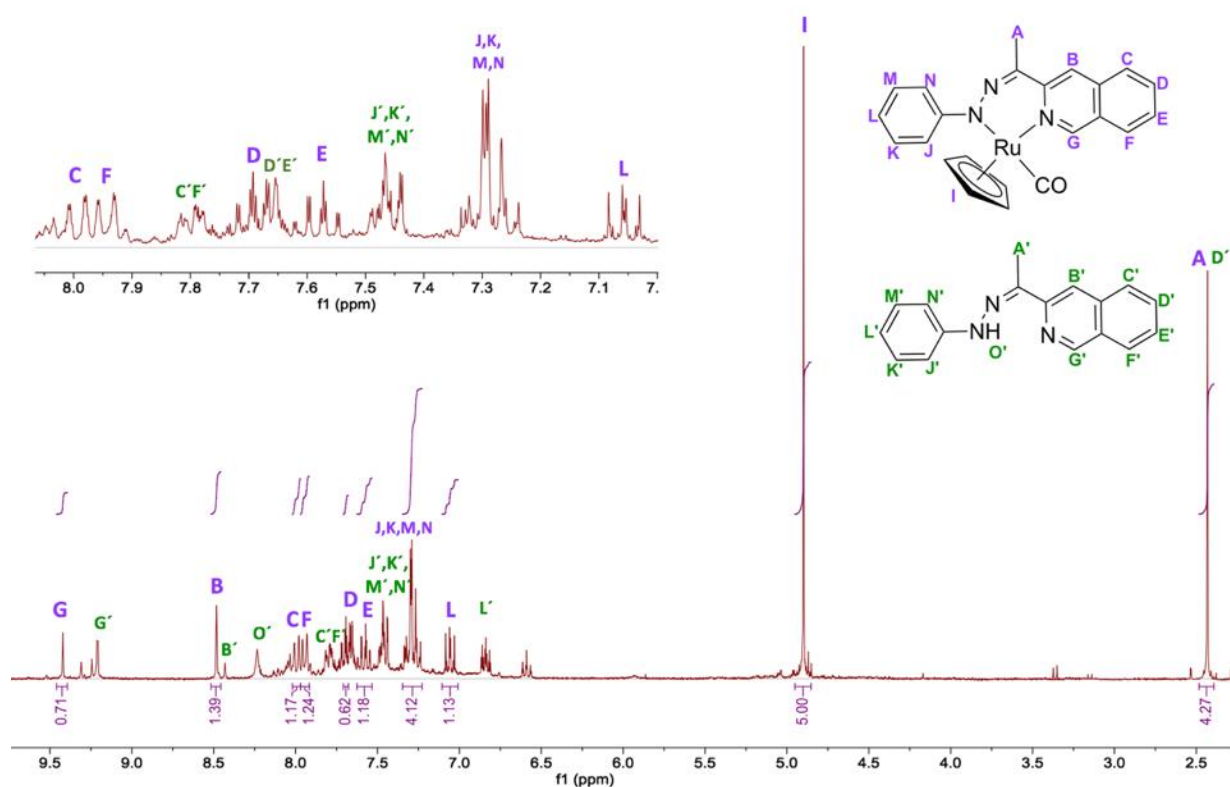


Figura 60. Asignación de señales en RMN 1H (CD_3CN) del compuesto **34** y del ligante **18** presente en la muestra.

Adicionalmente, se intentó purificar el compuesto por cristalización, con la técnica de difusión lenta en una mezcla diclorometano: éter. Sin embargo, se observó descomposición del producto antes de la formación de cristales.

MECANISMO DE REACCIÓN

Se piensa que la formación del complejo **34** pudo ocurrir mediante un mecanismo disociativo (**Figura 61**). En esta propuesta, en primer lugar se genera un sitio vacante al removerse alguno de los dos ligandos lábiles de acetonitrilo, obteniendo una especie a 16 electrones $[\text{RuL}_4\text{X}]^+$. Posteriormente se coordina el ligante (HN^N) al metal a través de un átomo de N, formando una especie a 18 electrones $[\text{RuL}_5\text{X}]^+$. Consecutivamente, se coordina al rutenio el otro N del ligante mediante un intercambio con un ligante de acetonitrilo. En el siguiente paso del mecanismo interviene la base (K_2CO_3) presente en el medio de reacción, sustrayendo un protón enlazado a N del ligante coordinado. Se piensa que esta desprotonación ocurre hasta este punto ya el H en cuestión no es lo suficientemente ácido para ser removido por el carbonato de potasio ($\text{p}K_a$ hidrazona ≈ 20). No obstante, cuando el átomo de N se une a rutenio, aumenta la acidez de dicho protón, generando finalmente el compuesto **34**.

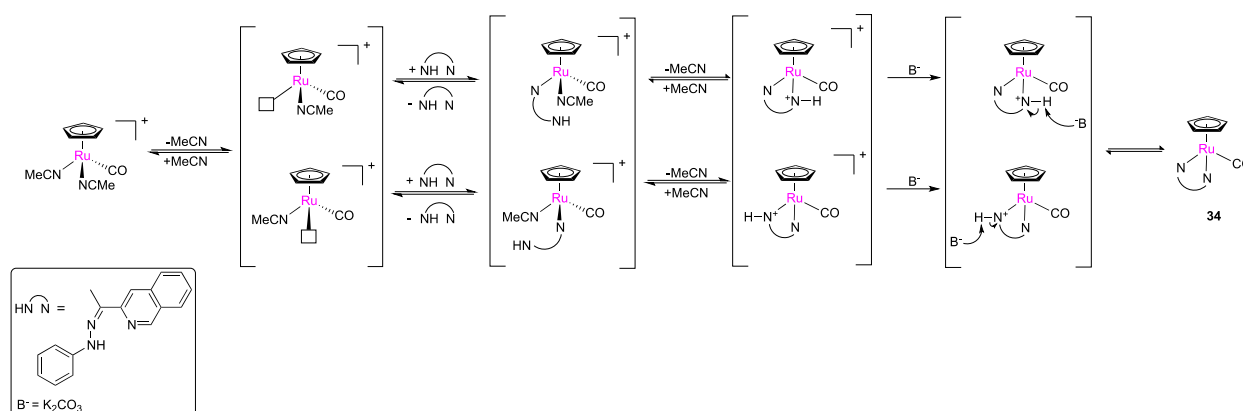


Figura 60. Posible mecanismo para la formación de **34**.

6.4.2 Intento de reacción del precursor de rutenio **33** con el ligante **18**

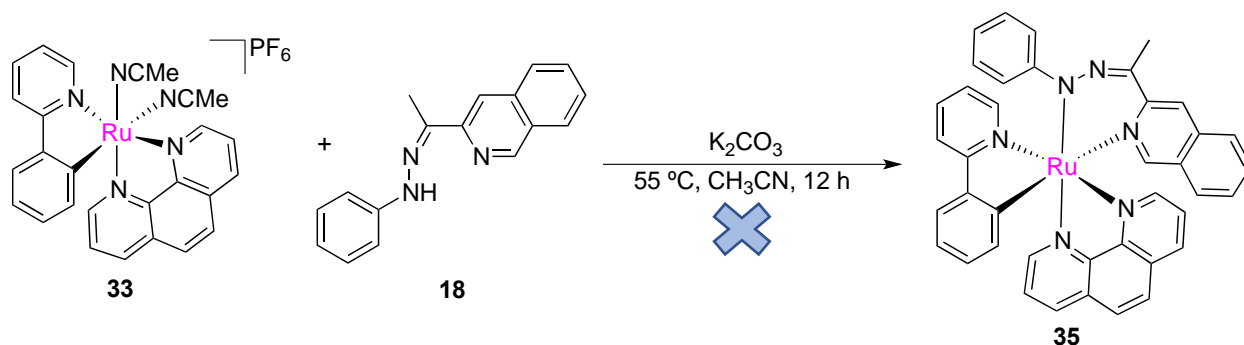


Figura 61. Intento de reacción para obtención de **35**.

Como un primer intento de reacción, se replicaron las condiciones de la reacción anterior, en donde los datos obtenidos indican que se obtuvo el complejo esperado. Se colocaron el precursor de rutenio **33** (1 eq.), el compuesto **18** (1 eq.), K₂CO₃ (1.5 eq.) y acetonitrilo en un tubo de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento a 55 °C por 12 horas (**Figura 61**). Al terminar el tiempo de reacción, se evaporó a sequedad y se obtuvo un sólido morado que se purificó por cromatografía en columna con Al₂O₃, empleando diferentes mezclas de CH₂Cl₂:MeCN como eluyente.

En la caracterización por ¹H RMN (**Figura 62**) se observan señales en 9.50, 9.28, 8.97 y 8.64 ppm, que podrían corresponder a un desplazamiento en las señales de **33** debido a la formación del complejo **35**, sin embargo, hay bastante ruido en el espectro adquirido y las señales no están bien definidas. Se obtuvo además el espectro de IR (**Figura 63**) del producto disuelto en acetonitrilo y se aprecia la banda de estiramiento de C=N correspondiente a la hidrazona, pero también se observa la banda característica de PF₆, que no debería aparecer puesto que se esperaba obtener un compuesto neutro. No se obtuvo ninguna evidencia contundente que indique la formación del compuesto **35**.

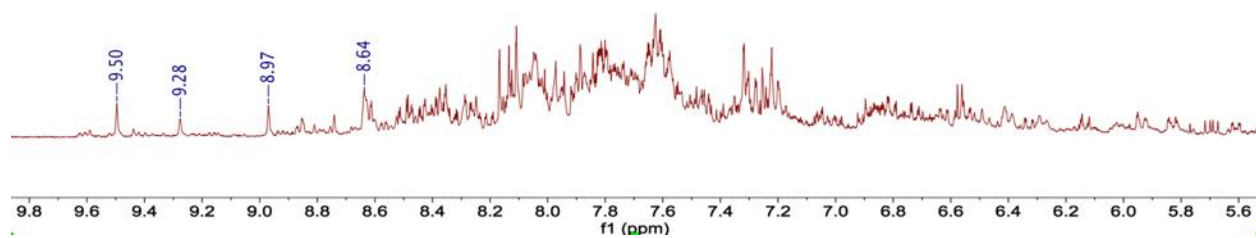


Figura 62. Espectro de RMN ^1H (CD_3CN) del producto de la reacción entre el precursor de rutenio **33** y la hidrazona **18**.

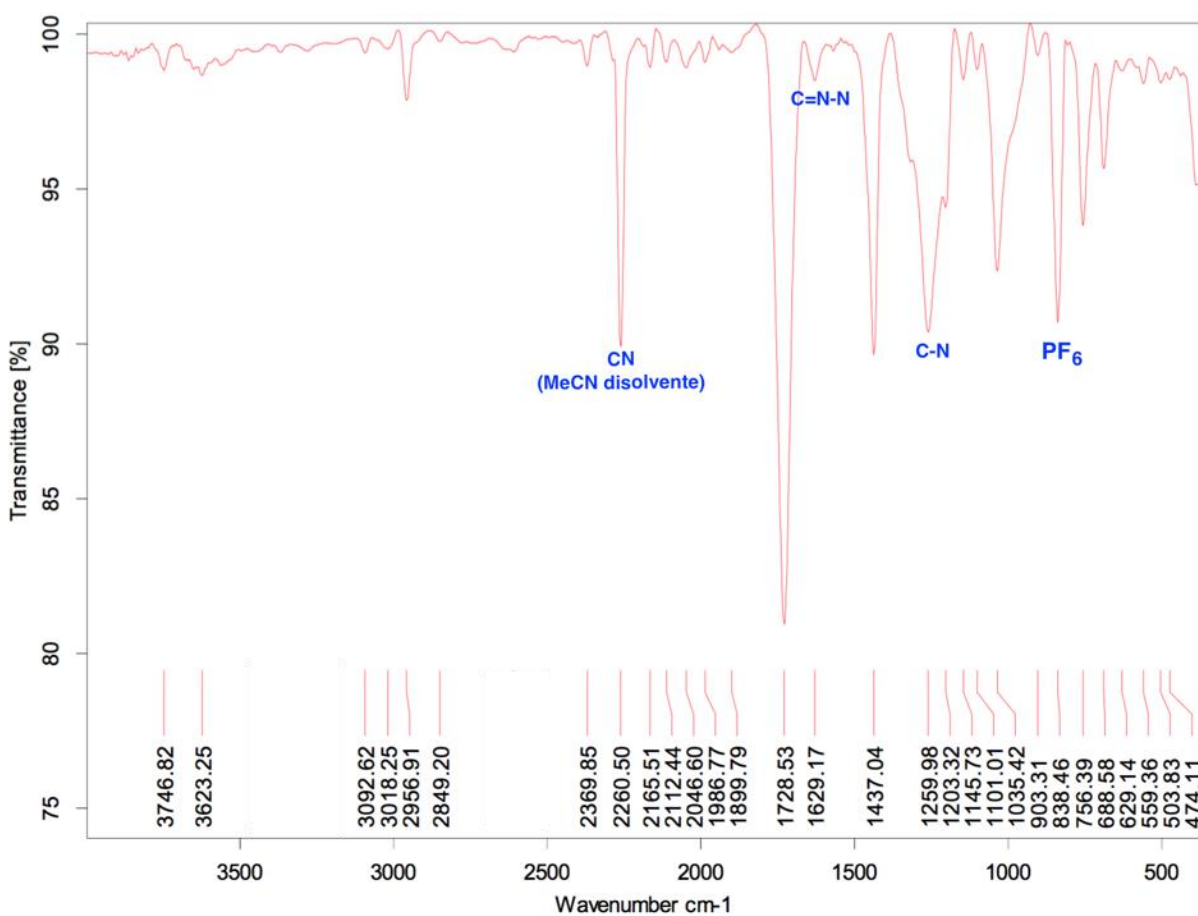


Figura 63. Espectro de IR del producto de reacción entre el precursor de rutenio **33** y la hidrazona **18**.

6.4.3 Intento de reacción del precursor de rutenio **30** con el ligante **24**

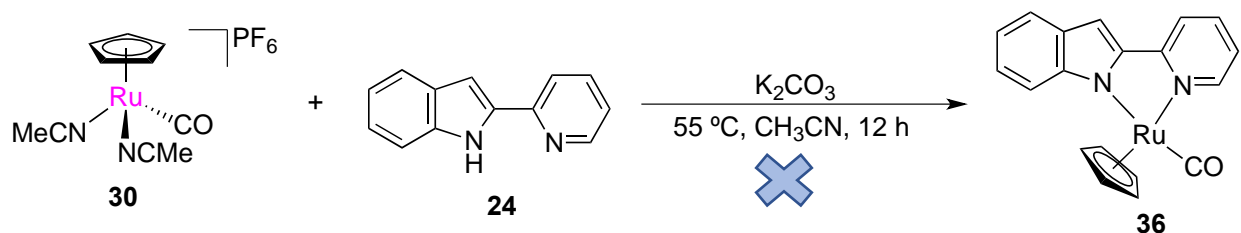


Figura 64. Intento de reacción para obtención de **36**.

Se colocaron el precursor de rutenio **30** (1 eq.), el compuesto **24** (1 eq.), K₂CO₃ (1.5 eq.) y acetonitrilo en un tubo de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento a 55 °C por 12 horas (**Figura 64**). Al terminar el tiempo de reacción, se evaporó a sequedad y se obtuvo un sólido café. El producto de reacción no se logró caracterizar. En el espectro de ¹H RMN adquirido aparece bastante ruido y señales indefinidas que parecen indicar la descomposición del posible producto.

6.4.4 Intento de reacción del precursor de rutenio **33** con el ligante **24**

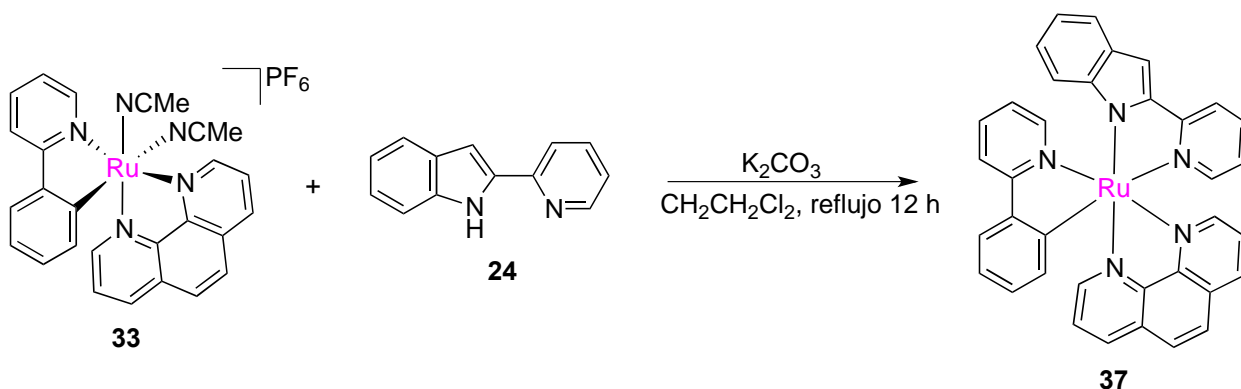


Figura 65. Intento de reacción para obtención de **37**.

Para realizar esta reacción, se decidió modificar las condiciones de reacción de las reacciones anteriores. Se colocaron el precursor de rutenio **33** (1 eq.), el compuesto **24** (1.2 eq.), K_2CO_3 (1.5 eq.) y dicloroetano en un tubo de Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 12 horas (**Figura 65**). Al terminar el tiempo de reacción, se evaporó a sequedad y se obtuvo un sólido morado estable al aire, y también estable en disolución. Se purificó el sólido obtenido por cromatografía en columna con Al_2O_3 . Se utilizó diclorometano como eluyente y se fue aumentando la polaridad poco a poco con diferentes mezclas $CH_2Cl_2/MeCN$. Se lograron separar 3 productos, dos fracciones color morado y una fracción amarilla.

CARACTERIZACIÓN.

1H RMN.

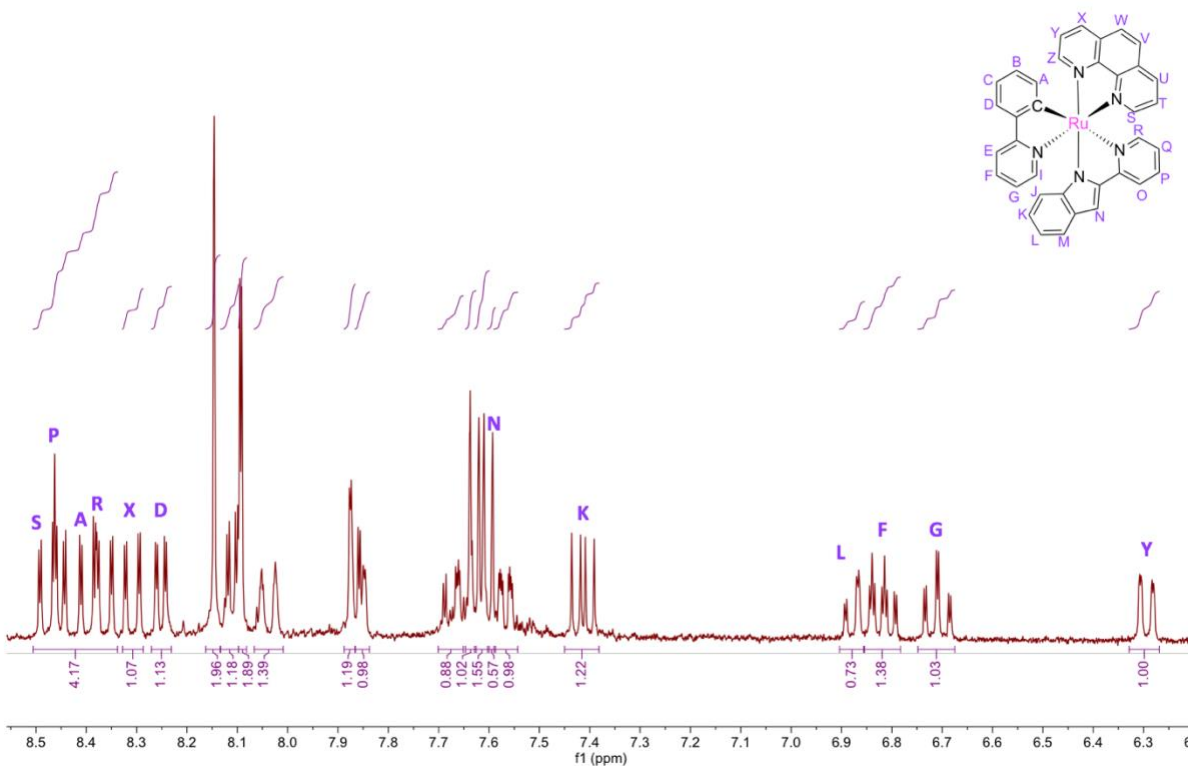


Figura 66. Espectro de RMN 1H (CD_3CN) del producto de la reacción de la **Figura 65**.

Tabla 9. Caracterización del compuesto **37**.

δ (ppm)	Multiplicidad	J_{H-H} (Hz)	Integración	H asignado
8.51 – 8.34	m	--	4 H	S, P, A, R
8.31	dd	8.2, 1.3	1 H	X
8.25	dd	5.3, 1.2	1H	D
8.15	d	0.5	2 H	--
8.11	dd	5.0, 1.4	1H	--
8.09	d	1.2	2 H	--
8.07 – 8.01	m	--	1 H	--
7.88	d	1.1	1 H	--
7.85	dd	3.0, 1.3	1 H	--
7.70 – 7.65	m	--	1 H	--
7.64	d	0.6	1 H	--
7.63 – 7.60	m	--	2 H	--
7.59	s	--	1 H	N
7.57	ddd	5.7, 1.6, 0.8	1 H	--
7.41	dd	8.2, 5.3	1 H	K
6.88	dd	7.2, 1.3	1 H	L
6.86 – 6.78	m	--	1 H	F
6.71	td	7.3, 1.3	1 H	G
6.30	dd	7.5, 0.9	1 H	Y

En el espectro de ^1H RMN de la primera fracción morada (**Figura 66**), la integración corresponde para las 25 señales esperadas para el compuesto **37** (**Tabla 9**). Se utilizó como referencia para la integración la señal de H_Y . Esta señal mostró un desplazamiento de 0.27 ppm a campo bajo, en comparación con el precursor **33**. Además, se pueden distinguir claramente las señales de H_F y H_G , que tuvieron un desplazamiento a campo bajo de 0.14 y 0.2 ppm respectivamente. Asimismo, se observa una señal de singulete correspondiente a H_N del ligante coordinado a 7.59 ppm, lo que confirma un desplazamiento a campo alto de 0.6 ppm en comparación al ligante libre. También se

pueden distinguir las señales de H_x y H_b, características del precursor **29** desplazadas a campo alto en 0.24 y 0.05 ppm.

Por otro lado, se le asignó el H más probable a otras señales del espectro, en relación con las multiplicidades y desplazamientos conocidos del precursor **29** y del ligante libre **24**. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos como (¹H-¹H) COSY, (¹H-¹³C) HSQC y (¹H-¹³C) HMBC para poder asignar las señales con una mayor certeza.

MECANISMO DE REACCIÓN

Se propone el siguiente mecanismo disociativo para la obtención de **37** (**Figura 67**). En este mecanismo se genera un sitio vacante al removerse alguno de los dos ligantes lábiles de acetonitrilo, obteniendo una especie a 16 electrones [RuL₄X]⁺. Posteriormente se coordina el ligante (HN⁺N) al metal a través de un átomo de N, formando una especie a 18 electrones [RuL₅X]⁺. Consecutivamente, se coordina al rutenio el otro N del ligante mediante un intercambio con un ligante de acetonitrilo. En el siguiente paso del mecanismo interviene la base (K₂CO₃) presente en el medio de reacción, sustrayendo un protón enlazado a N del ligante coordinado, generando finalmente el compuesto a 18 electrones [RuL₄X₂] **34**.

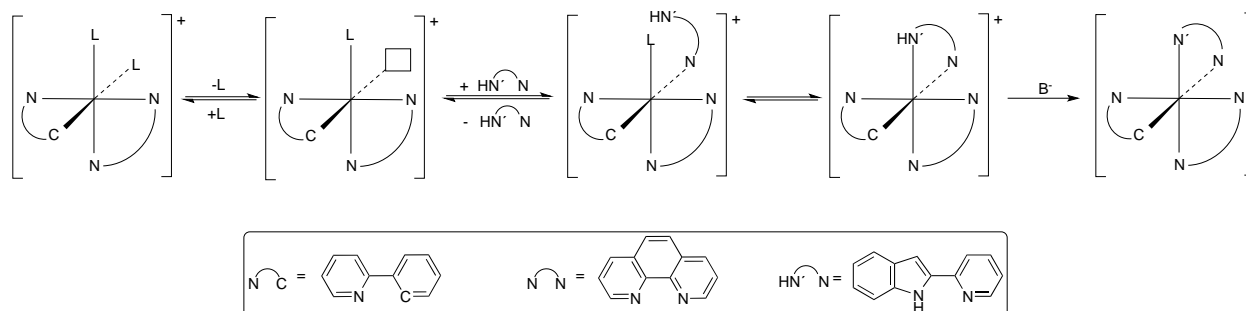


Figura 67. Mecanismo propuesto para la formación de **37**.

7. CONCLUSIONES

Se presentaron distintas adversidades en la metodología escogida para la síntesis del ligante **22**. No obstante, se buscaron y encontraron las condiciones de síntesis adecuadas para continuar con el proyecto, extendiendo la parte de síntesis orgánica contemplada inicialmente. Como un resultado colateral, el presente trabajo aporta nueva información experimental para la síntesis de los compuestos orgánicos **16**, **17** y **19**, intermediarios en la síntesis del ligante **22**.

Se lograron sintetizar los dos ligantes de indolcarbazol derivados de la staurosporina **22** y **26** contemplados, sin embargo, los rendimientos finales fueron bajos ~15 - 20%. Tomando en cuenta el largo trabajo de síntesis orgánica y los rendimientos obtenidos en las diferentes etapas de la síntesis, aunado a la casi nula solubilidad que presentaron estos ligantes en disolventes orgánicos, no fue posible llevar a cabo las reacciones de intercambio de ligante previstas para la obtención de los complejos **11-14** esperados.

Alternativamente, con la finalidad de probar la eficacia de la coordinación de ligantes bidentados tipo (HN[^]N), se realizaron diversas pruebas de coordinación con los precursores de rutenio **30** y **33** sintetizados, empleando como ligantes las moléculas de indol y de fenilhidrazona sintetizadas en las etapas intermedias para la obtención de los ligantes **22** y **26** respectivamente. De esta manera se lograron obtener 2 complejos de rutenio nuevos. Ambos compuestos se lograron caracterizar por espectrometría de ¹H RMN e IR.

8. PERSPECTIVAS

- Optimizar la última etapa en la síntesis de los ligantes **18** y **22** para poder obtener los ligantes derivados de la staurosporina en mayor rendimiento.
- Intentar aumentar la solubilidad en disolventes orgánicos de los ligantes **18** y **22** formando sales de litio.
- Efectuar reacciones de coordinación de ligante para obtener los complejos **30-35** que no se lograron obtener en el presente trabajo.
- Complementar la caracterización de los compuestos **36** y **39** empleando las técnicas de espectrometría de masas, difracción de rayos X y ^{13}C RMN.

9. REFERENCIAS

1. Global Cancer Observatory. (2018). Cancer tomorrow. Recuperado de <http://Gco.iarc.fr>
2. Thota, S.; Rodrigues, D.; Crans, D.; Barreiro, E. (2018). Ru(II) compounds: next-generation anticancer metallotherapeutics?. *J. Med. Chem.*, *61*, 5805-5821. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01689.
3. Oun, R.; Moussa, Y.; Wheate, N. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.*, *47*, 6645-6653. DOI: 10.1039/c8dt00838h.
4. Vidimar, V.; Licon, C.; Cerón-Camacho, R.; Guerin, E.; Coliat, P.; Venkatasamy, A.; Ali, M.; Guenot, D.; Le Lagadec, R.; Jung, A.; Freund, J.; Pfeffer, M.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Gaiddon, C. (2019). A redox ruthenium compound directly targets PHD2 and inhibits the HIF1 pathway to reduce tumor angiogenesis independently of p53. *Cancer Lett.*, *440-441*, 145-155. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.09.029.
5. Sainuddin, T.; McCain, J.; Pinto, M.; Yin, H.; Gibson, J.; Hetu, M.; McFarland, S. (2015). Organometallic Ru(II) photosensitizers derived from π -expansive cyclometalating ligands: surprising theranostic PDT effects. *Inorg. Chem.*, *55*, 83-95. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.5b01838.
6. OMS. (2019). Cáncer. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
7. National cancer institute. (2019). What Is Cancer?. Recuperado de: <https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/>
8. Han, Y. (2019). Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J. Transl. Med.*, *17*, 1-17. DOI: 10.1186/s12967-019-1869-4.
9. Causes of cancer and reducing your risk. (2020). Recuperado de: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer>.
10. De Groot, A.; Roy, S.; Brown, J.; Pienta, K.; Amend, S. (2017). Revisiting seed and soil: examining the primary tumor and cancer cell foraging in metastasis. *Mol. Cancer Res.*, *15*, 361-370. DOI: 10.1158/1541-7786.mcr-16-0436.
11. National Cancer Institute. (2019). Types of Cancer Treatment. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
12. Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. (2017). Metal complexes in cancer therapy-an update from drug design perspective. *Drug Des. Dev. Ther.*, *11*, 599-616. DOI: 10.2147/dddt.s119488.

13. Estereoquímica y su importancia en la industria farmacéutica. (2018). Recuperado de: <https://steemit.com/stem-espanol/@maryed/estereoquimica-y-su-importancia-en-la-industria-farmacaceutica>.
14. Meggers, E. (2009). Targeting proteins with metal complexes. *ChemComm.*, 1001-1010. DOI: 10.1039/b813568a.
15. Pedrosa, P.; Carvalho, A.; Baptista, P.; Fernandes, A. (2018). Inorganic coordination chemistry: where we stand in cancer treatment? [Ebook] (1ra ed., pp. 37-65). DOI: 10.5772/intechopen.80233
16. Rocha, C.; Silva, M; Quinet, A.; Cabral-Neto, J.; Menck, C. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73, 1-10. DOI: 10.6061/clinics/2018/e478s.
17. Marc Fourmigué, Lahcène Ouahab. (2009). *Conducting and magnetic organometallic molecular materials* [Ebook] (1st ed., p. 25). Disponible en: <https://link.springer.com>.
18. Alessio, E. (2016). Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, 1549-1560. DOI: 10.1002/ejic.201600986.
19. Liu, J.; Lai, H.; Xiong, Z.; Chen, B.; Chen, T. (2019). Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy. *ChemComm.*, 55, 9904-9914. DOI: 10.1039/c9cc04098f.
20. Fases de un ensayo clínico. (2020). Recuperado de: <https://rochepacientes.es/fases-de-un-ensayo-clinico/>
21. Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J.; Beijnen, J.; Sava, G. (2012). Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. *J. Inorg. Biochem*, 106, 90-99. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030.
22. Bergamo, A.; Sava, G. (2007). Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans.*, 1267-1272. DOI: 10.1039/b617769g.
23. Rausch, M.; Dyson, P.; Nowak-Sliwinska, P. (2019). Recent considerations in the application of RAPTA-C for cancer treatment and perspectives for its combination with immunotherapies. *Adv. Ther.*, 2, 1900042. DOI: 10.1002/adtp.201900042.
24. Tandon, Y.; Yang, M.; Baron, E. (2008). Role of photodynamic therapy in psoriasis: a brief review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 24, 222-230. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2008.00376.x.
25. Getting photodynamic therapy. (2020). Recuperado de: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/photodynamic-therapy.html>.
26. Gaiddon, C.; Pfeiffer, M. (2017). The fate of cycloruthenated compounds: from C-H activation to innovative anticancer therapy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, 1639-1654. DOI: 10.1002/ejic.201601216.

27. Albrecht, M. (2010). Cyclometalation using d-block transition metals: fundamental aspects and recent trends. *Chem. Rev.*, 110, 576-623. DOI: 10.1021/cr900279a.
28. Leyva, L.; Sirlin, C.; Rubio, L.; Franco, C.; Le Lagadec, R.; Spencer, J.; Bischoff, P.; Gaiddon, C.; Jean-Philippe, L.; Pfeffer, M. (2007). Synthesis of cycloruthenated compounds as potential anticancer agents. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 3055-3066. DOI: 10.1002/ejic.200601149.
29. Boff, B.; Ali, M.; Alexandrova, L.; Espinosa-Jalapa, N.; Saavedra-Díaz, R.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. (2013). Rational synthesis of heteroleptic tris(chelate) ruthenium complexes $[Ru^{II}(2-Ph-2'-Py)(L^{\wedge}L)(L^{\wedge}L')]PF_6$ by selective substitution of the ligand trans to the ruthenated phenyl ring. *Organometallics*, 32, 5092-5097. DOI: 10.1021/om400611t.
30. Rubio, L. (2003). Síntesis de complejos ciclometalados de rutenio (II) via activación del enlace C-H y sustitución de ligantes bidentados (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
31. Le Lagadec, R.; Alexandrova, L.; Estevez, H.; Pfeffer, M.; Laurinavičius, V.; Razumiene, J.; Ryabov, A. (2006). Bis-Ruthena(III)cycles $[Ru(C\cap N)_2(N\cap N)]PF_6$ as Low-Potential Mediators for PQQ Alcohol Dehydrogenase ($C\cap N = 2$ -phenylpyridinato or 4-(2-tolyl)pyridinato, $N\cap N =$ bpy or phen). *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 2735-2738. <https://doi.org/10.1002/ejic.200600375>
32. Solís-Ruiz, J.; Barthe, A.; Riegel, G.; Saavedra-Díaz, R.; Gaiddon, C.; Le Lagadec, R. (2020). Light activation of cyclometalated ruthenium complexes drives towards caspase 3 dependent apoptosis in gastric cancer cells. *J. Inorg. Biochem.*, 208, 111080. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111080
33. Bhullar, K.; Lagarón, N.; McGowan, E.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B.; Rupasinghe, H. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer*, 17, 1-20. DOI: 10.1186/s12943-018-0804-2
34. González, M. (2009). *Purificación y caracterización de una isoforma calcio dependiente de proteína quinasa c en mytilus galloprovincialis lmk* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España.
35. Cayman chemical. (2019). Kinase inhibitors. Recuperado de <https://www.caymanchem.com/news/kinase-inhibitors>
36. Strange, K.; Denton, J.; Nehrke, K. (2006). Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology*, 21, 61-68. DOI: 10.1152/physiol.00139.2005.
37. Calses, P.; Crawford, J.; Lill, J.; Dey, A. (2019). Hippo pathway in cancer: aberrant regulation and therapeutic opportunities. *Trends Cancer*, 5, 297-307. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.04.001.
38. Juan, W.; Hong, W. (2016). Targeting the Hippo signaling pathway for tissue regeneration and cancer therapy. *Genes*, 7, 55, 1-25. DOI: 10.3390/genes7090055.
39. Boopathy, G.; Hong, W. (2019). Role of Hippo pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 7, 1-12. DOI: 10.3389/fcell.2019.00049

40. Zanconato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell*, 29, 783-803. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.05.005.
41. Ma, X.; Li, P.; Chen, P.; Li, J.; Huang, H.; Wang, C.; Li, W.; Ding, J.; Zhao, Y.; Yu, F.; Qi, X.; Zhang, L. (2018). Staurosporine targets the Hippo pathway to inhibit cell growth. *J. Mol. Cell Biol.*, 10, 267-269. DOI: 10.1093/jmcb/mjy016.
42. Anand, R.; Maksimoska, J.; Pagano, N.; Wong, E.; Gimotty, P.; Diamond, S. Meggers, E.; Marmorstein, R. (2009). Toward the development of a potent and selective organoruthenium mammalian sterile 20 kinase inhibitor. *J. Med. Chem.*, 52, 1602-1611. DOI: 10.1021/jm8005806.
43. García, I. (2014). *Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador para enfermedades neurodegenerativas* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
44. Hicks, M.; Kettner, C. (2009). Chemical Biology with Organometallics. En E. Meggers. (Ed.), *Proceedings of the International Beilstein Symposium on Systems Chemistry* (pp. 109-119). Berlin: Logos-Verl.
45. Meggers, E.; Bregman, H.; Williams, D. (2005). Pyrido[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7(6H)-diones: Synthesis, cyclometalation, and protein kinase inhibition. *Synthesis*, 1521-1527. DOI: 10.1055/s-2005-865331.
46. Martínez-Castañeda, Á; Kędziora, K; Lavandera, I.; Rodríguez-Solla, H.; Concellón, C.; Del Amo, V. (2014). Highly enantioselective synthesis of α -azido- β -hydroxy methyl ketones catalyzed by a cooperative proline-guanidinium salt system. *ChemComm.*, 50, 2598. DOI: 10.1039/c3cc49371g
47. Zhu, P.; Lu, K.; Wang, D. (2007). Preparation of phthalaldehydes by hydrolysis of aromatic gem-tetrabromides. *ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc.*, 152-159. DOI: 10.1021/bk-2007-0967.ch007.
48. Aubert, T.; Farnier, M.; Hanquet, B.; Guillard, R. (1987). A new versatile synthesis of isoquinolines by condensation of iminophosphoranes with *o*-phthalaldehyde, *Synth. Commun.*, 17, 1831-1837, DOI: 10.1080/00397918708077328.
49. Tompkins, D.; Reilly, L.; Nelson, R.; Dolby, L.; Gribble, G. (2018). Synthesis of 6-oxo-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahydroindolo[2,3-*a*]quinolizine. *J. Heterocycl. Chem.*, 55, 1048-1052. DOI: 10.1002/jhet.3130.
50. Brenet, S.; Baptiste, B.; Philouze, C.; Berthiol, F.; Einhorn, J. (2013). BINOL-fused maleimides- a new class of C₂-symmetric chiral imides. *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 1041-1045. DOI: 10.1002/ejoc.201201525.
51. Lemster, T.; Pindur, U.; Lenglet, G.; Depauw, S.; Dassi, C.; Cordonnier, M. (2009). Photochemical electrocycloisolation of 3-vinylindoles to pyrido[2,3-*a*]-, pyrido[4,3-*a*]- and thieno[2,3-*a*]-carbazoles: Design, synthesis, DNA binding and antitumor cell cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 3235-3252. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.03.026.

52. Zelonka, R.; Baird, M. (1972). Benzene complexes of ruthenium(II). *Can. J. Chem.*, *50*, 3063-3072. DOI: 10.1139/v72-486.
53. Trost, B.; Older, C. (2002). A convenient synthetic route to [CpRu(CH₃CN)₃]PF₆. *Organometallics*, *21*, 2544-2546. DOI: 10.1021/om020143p.
54. Gill, T.; Mann, K. (1982). Photochemical properties of the cyclopentadienyl(η^6 -benzene)ruthenium(II) cation. The synthesis and reactions of a synthetically useful intermediate: the cyclopentadienyltris(acetonitrile)ruthenium(II) cation. *Organometallics*, *3*, 485-488. DOI: 10.1021/om00063a014.
55. Fernandez, S.; Pfeffer, M.; Rittleng, V.; Sirlin, C. (1999). An effective route to cycloruthenated N-ligands under mild conditions. *Organometallics*, *18*, 2390-2394. DOI: 10.1021/om9901067.
56. Ryabov, A.; Le Lagadec, R.; Estevez, H.; Toscano, R.; Hernandez, S.; Alexandrova, L.; Kurova, S.; Fischer, A.; Sirlin, C.; Pfeffer, M. (2005). Synthesis, characterization, and electrochemistry of biorelevant photosensitive low-potential orthometalated ruthenium complexes. *Inorg. Chem.*, *44*, 1626-1634. DOI: 10.1021/ic048270w.
57. Lipińska, T.; Czarnocki, S. (2006). A new approach to difficult Fischer synthesis: the use of zinc chloride catalyst in triethylene glycol under controlled microwave irradiation. *Org. Lett.*, *8*, 367-370. DOI: 10.1021/ol052255t.
58. Rojas, M. (2019). Synthesis and properties, of homo- and co-polyimides with asymmetric phenoxy groups (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
59. Kocięński, P. (2005). *Protecting groups*. Stuttgart: Thieme.
60. Barbosa, A.; Werlé, C.; Colunga, C.; Rodríguez, C.; Toscano, R.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. (2015). Further insight into the lability of MeCN ligands of cytotoxic cycloruthenated compounds: evidence for the antisymbiotic effect trans to the carbon atom at the ru center. *Inorg. Chem.*, *54*, 7617-7626. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.5b01236.