



**Universidad**  
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

# **Diseño de potenciales agentes anticancerígenos**

## **Design of potential anticancer agents**

Autor

**María Lahoz Sánchez**

Director

**Elena Cerrada Lamuela**

Facultad de Ciencias

2018

ELENA CERRADA LAMUELA, Profesora Titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza.

**CERTIFICA**

Que la presente memoria titulada “Diseño de potenciales agentes anticancerígenos” ha sido realizada en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la universidad de Zaragoza, bajo mi dirección, autorizando la presentación.

Zaragoza, septiembre de 2018

Fdo.: Dra. Elena Cerrada

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	4
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
3.1 Síntesis de los productos de partida	
3.1.1 Preparación de 2-Hidroxichalconas (CL-1).....	5
3.1.2 Preparación de las Chalconas alquiladas (CL-2).....	7
3.2 Preparación de complejos oro fosfina .....	9
3.2.1. Preparación de complejos de Au con PTA.....	9
3.2.2. Preparación complejos de Au con PPh <sub>3</sub> .....	10
3.2.3. Preparación de complejos oro carbeno .....	12
3.2 Propiedades físico-químicas	
3.2.3 Coeficiente de reparto octanol-agua.....	13
3.2.4 Medidas de estabilidad.....	14
3.3 Ensayos biológicos	
3.5.1. Ensayo MTT .....	15
3.5.2. Test de Ames.....	16
3.5.3. Marcaje y visualización de núcleos mediante microscopía de fluorescencia..	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Técnicas y equipos utilizados .....	18
4.2 Síntesis de productos y caracterización.....	18
4.3. Estudio físico- químico	
4.3.1 Preparación de las disoluciones para la medida de log D <sub>7.4</sub> .....	22
4.3.2. Preparación de las disoluciones para las medidas de estabilidad.....	23
4.4. Estudio biológico	
4.4.1. Ensayo MTT.....	23
4.4.2. Test de Ames .....	23
4.4.3. Marcaje y visualización de núcleos mediante fluorescencia .....	24
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

## **ABREVIATURAS**

<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>δ</b>	Desplazamiento
<b>DMEM</b>	Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doblete de dobletes
<b>ddd</b>	Doblete de doblete de dobletes
<b>IR</b>	Espectroscopía infrarroja
<b>m</b>	Multiplete
<b>Ph</b>	Grupo fenilo
<b>Hz</b>	Hercios
<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>Me</b>	Metilo
<b>M</b>	Molaridad
<b>mmol</b>	Milimol
<b>μL</b>	Microlitro
<b>g</b>	Gramo
<b>Rto</b>	Rendimiento
<b>t</b>	Triplete
<b>tht</b>	Tetrahidrotiofeno
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

## **RESUMEN**

El desarrollo de nuevas investigaciones contra el cáncer es primordial en la actualidad. Tras el descubrimiento de la actividad anticancerígena del cisplatino, ha sido de gran interés la síntesis de nuevos complejos de coordinación y organometálicos como agentes anticancerígenos.

Este trabajo tiene por objetivo el diseño de agentes anticancerígenos basados en oro(II) empleando como ligandos, moléculas derivadas de chalconas. Las chalconas son precursores de los flavonoides que presentan una variedad de propiedades biológicas, entre las que destaca la actividad anticancerígena. Para completar la esfera de coordinación del centro metálico se han empleado ligandos del tipo fosfina y carbeno, tales como PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), trifenilfosfina y 1,3-bis(2,6-di-*i*-propilfenil)imidazol-2-ilideno), con el objetivo de modificar el carácter lipófilo del complejo resultante y conseguir establecer un balance entre lipofilicidad e hidrofiliicidad para favorecer su distribución y su entrada a las células. La elección, tanto del metal de transición como de los ligandos, es fundamental para diseñar un fármaco eficaz respecto a su difusión a través del organismo y su actividad antitumoral.

Se llevó a cabo una serie de ensayos físico-químicos y biológicos sobre los nuevos complejos, basados en el estudio del coeficiente de reparto octanol-agua, así como medidas de estabilidad tras su incubación a 37°C durante 24 horas en condiciones fisiológicas, permitiendo conocer si el carácter lipofílico se encontraba en el rango permitido para su administración y si conservaba su estructura tras 24 horas sin descomposición aparente. Los ensayos biológicos se basaron en el ensayo MTT, test de Ames, además del marcaje y visualización de los núcleos de las células. De esta forma se estudió la capacidad anticancerígena de los complejos coordinados con PTA, así como su ausencia de capacidad mutagénica.

Tras resultados obtenidos, se concluye que los complejos sintetizados muestran tener un potencial adecuado para su estudio en profundidad como fármacos contra el cáncer.

## **ABSTRACT**

The development of new investigations against the cancer is essential at present. After the discovery of the anticancer activity of cisplatin, the synthesis of new metallic complexes as anticancer agents has been of great interest.

The design of anticancer agents based on metals, in particular gold (I) with molecules derived from chalcones as ligands, has been the main objective of this work. The chalcones are precursors of the flavonoids, that present a variety of biological properties, among which the anti-cancer activity stands out. To complete the coordination sphere of the metal center, ligands of the type phosphine and carbene have been used, such as PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane), triphenylphosphine and 1,3-bis (2,6-dihydro) i-propylphenyl imidazol-2-ylidene), with the aim of lipophilic character modification and achieving a balance between lipophilicity and hydrophilicity to favor their distribution and entrance to the cells. The choice, both of the transition metal and of the ligands, is fundamental to design an effective drug with respect to its diffusion through the organism and its antitumor activity.

A series of physical-chemical and biological tests were carried out on the new complexes, based on the study of the partition coefficient octanol-water, as well as stability measurements after incubation at 37 ° C for 24 h under physiological conditions. These experiments allow knowing the optimal lipophilic character for their administration and their stability in buffered solution after 24 h.. The biological assays were based on the MTT test, Ames test, besides the marking and visualization of the nuclei of the cells. In this way, the anticancer capacity of the complexes coordinated with PTA was studied, as well as their lack of mutagenic ability.

After the results, we can conclude that the synthesized complexes show to have a suitable potential for its in-depth study as anticancer drugs.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por un crecimiento celular incontrolado en un tejido sólido originando células que van perdiendo poco a poco su morfología normal. En la actualidad se ha convertido en la segunda causa de muerte en el mundo, por lo que su estudio y posible erradicación supone todo un reto.

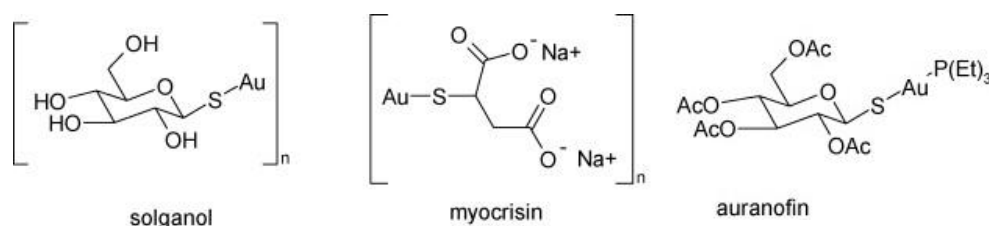
A pesar de los enormes esfuerzos en el desarrollo de nuevos estudios y nuevas estrategias quimioterapéuticas para el tratamiento de los distintos tipos de cáncer, sigue siendo la principal preocupación en todo el mundo.

Gran parte de las investigaciones del cáncer llevadas a cabo durante las últimas décadas han impulsado a los investigadores a comprender su fisiopatología, mecanismo de señalización y desarrollo de terapias estratégicas que pueden tratar el cáncer de manera efectiva.<sup>1</sup>

Los tratamientos empleados en la actualidad contra el cáncer se centran principalmente en la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. La radioterapia es capaz de matar el cáncer de forma local, pero también puede matar células sanas cercanas y la quimioterapia suele dar lugar a efectos secundarios, debido a la escasa selectividad de los fármacos empleados. Consecuentemente, es necesario desarrollar nuevas moléculas que lleven a mejores resultados terapéuticos no sólo por producir mayor grado de muerte celular, sino de una forma más selectiva.<sup>2</sup>

Las primeras investigaciones en quimioterapia se centraron en fármacos de naturaleza orgánica, hasta el descubrimiento del cisplatino (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) como agente antitumoral. El cisplatino es capaz de inhibir el crecimiento de las células cancerosas debido a su capacidad para inhibir la síntesis y reparación del DNA por modificaciones de su estructura tridimensional. Se viene empleando para tratar el cáncer de testículos, útero y tumores genito-urinarios, pero presenta graves efectos secundarios tales como toxicidad renal, hepática y sordera.<sup>3,4</sup> A partir del cisplatino, se han descrito otros complejos de platino similares, tales como carboplatino, oxaliplatino o nedaplatino, que, aunque son efectivos, todavía producen efectos secundarios importantes y su espectro de acción es limitado.<sup>5</sup> Por ello, durante los últimos años, se ha extendido la investigación en agentes quimioterapéuticos basados en otros metales diferentes al platino, entre los que se incluye por ejemplo rutenio y oro.

Desde la antigüedad, el oro ha sido un elemento de gran interés por sus diferentes propiedades, destacando las curativas. Su uso en la medicina se popularizó en el siglo XX al descubrir que el complejo K[Au(CN)<sub>2</sub>] actuaba sobre la bacteria causante de la tuberculosis.<sup>6</sup> A partir de este descubrimiento se sintetizaron nuevos compuestos con oro(I) con el fin de utilizarse como fármacos eficaces administrados por vía oral, tales como el auranofin, miocrisin y solganol, todos ellos efectivos contra la artritis reumatoide (Figura 1).<sup>7,8</sup>



**Figura 1.** Primeros complejos de oro(I) utilizados como fármacos

En la síntesis de un fármaco basado en complejos de metales de transición es importante la elección del ligando de la esfera de coordinación, para favorecer su estabilidad y solubilidad y modular su permeabilidad a través de las membranas celulares, incrementando así su actividad anticancerígena.

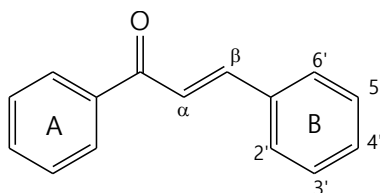
En las actuales investigaciones de fármacos, destaca el oro debido a su alta capacidad de coordinación, siendo de gran importancia el estudio de distintos ligandos que se coordinan al centro metálico para una biodistribución por el organismo y actividad anticancerígena más eficaz.

Los complejos sintetizados en este trabajo tienen como objetivo poder transportarse a través de la sangre y atravesar la bicapa lipídica de las células, por lo que es necesario un equilibrio entre hidrosolubilidad y liposolubilidad. Igualmente, interesa que alguno de los ligandos coordinados al metal presente propiedades citotóxicas propias y que, por tanto, al ser administrado al organismo realice una actividad intrínseca de forma que se potencie la actividad final, en simbiosis con la del centro metálico.

Los productos naturales han mostrado una prometedora actividad anticancerígena,<sup>9</sup> y entre ellos destacan los flavonoides, que son metabolitos secundarios de las plantas sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-coenzima A. Los flavonoides consisten en una familia diversa de compuestos del tipo polifenol, que han mostrado tener propiedades beneficiosas para la salud humana entre las que se incluyen: antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.<sup>10,11,12</sup> La síntesis de flavonas se puede llevar a cabo en 2 pasos mediante una condensación Claisen-Schmidt en medio básico generando una chalcona como intermedio, que posteriormente se ciclará en presencia de agua oxigenada. Al igual que las flavonas, sus precursores, las chalconas, han demostrado tener actividad anticancerígena debida principalmente a su capacidad para inhibir la actividad de por ejemplo enzimas tales como topoisomerasa-II, catepsina-K o del proteasoma entre otros.<sup>13</sup>

La química de las chalconas sigue siendo una fascinación entre los investigadores en el siglo XXI debido a su química simple, facilidad de síntesis, capacidad de reemplazamiento de los hidrógenos para producir una gran variedad de derivados y su diversidad en cuanto a actividades biológicas como antimicrobianos, anticancerígeno, antioxidante y antiinflamatorio.

Las chalconas son cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, también conocidas como bencilidenacetofenonas. El modelo de chalcona, como farmacóforo, está dividido en tres regiones (Figura 2). La Región A requiere un anillo aromático, la región B también formado por un anillo aromático y la región intermedia está compuesta de una enona.<sup>14</sup>



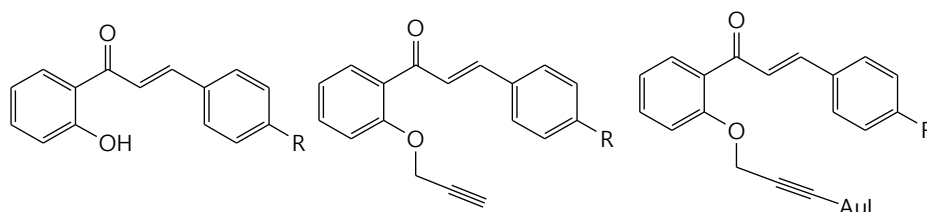
**Figura 2.** Estructura de la chalcona

Se han realizado cuantiosas investigaciones para sintetizar derivados de chalcona y estudiar su actividad citotóxica en distintas líneas celulares de cáncer. Un factor importante que influye en la actividad anticancerígena de las chalconas parece ser el enlace insaturado en  $C\alpha$  y  $C\beta$ , además, la presencia de sustituyentes del tipo hidroxilo y metoxi en el anillo A.<sup>15</sup>



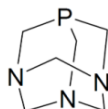
Ya hemos comentado la importancia de la elección de los ligandos en la esfera de coordinación del metal a la hora de diseñar un potencial agente anticancerígeno basado en un complejo metálico. Además de poder favorecer la estabilidad y solubilidad del complejo resultante, si uno de los ligandos presenta actividad biológica por sí sólo, puede finalmente producirse un efecto aditivo, incrementando así la actividad biológica final.

Con esta premisa, en este trabajo hemos seleccionado como ligandos en primer lugar moléculas derivadas de 2-hidroxichalconas a las que coordinaremos unidades oro-fosfina u oro-carbeno. Dado que los centros metálicos de oro(I) actúan como ácidos blandos según la teoría HSAB, la coordinación al oxígeno del grupo hidróxido estaría desfavorecida, por lo que, para favorecer dicha coordinación, procederemos inicialmente a una alquilación de dicho grupo con bromuro de propargilo, que originará un alquino terminal, fácilmente accesible por centros de oro(I), tras su deprotonación (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura de 2-hidroxichalconas, chalconas alquiladas y complejos de oro con chalconas

En el caso de fosfinas coordinadas al centro metálico, hemos elegido la fosfina soluble en agua la 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano o PTA (Figura 4). Su elevada solubilidad en agua se debe a la capacidad de establecer puentes de hidrógeno entre sus átomos de nitrógeno y el disolvente. Se trata de una fosfina única debido a sus mínimos efectos estéricos con estabilidad térmica, resistencia a la oxidación y solubilidad en agua y en otros disolventes como metal DMSO, diclorometano o cloroformo.

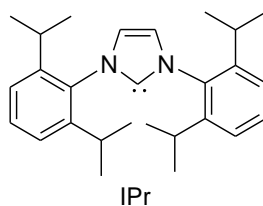


**Figura 4.** 1,3,5-triaza7-fosfaadamantano (PTA)

Durante los últimos años se han estudiado un elevado número de complejos de metales de transición, entre los que se incluyen complejos de rutenio y de oro con el ligando PTA, que han mostrado actividad anticancerígena frente a una diversidad de líneas cancerosas.<sup>16-19</sup>

Además de las fosfinas, los ligandos del tipo carbeno N-heterocíclico dan lugar a complejos metálicos muy estables que han sido estudiados en diferentes aplicaciones entre las que se incluye como potenciales metalofármacos.<sup>20,21</sup>

Los carbenos de 5 miembros, como por ejemplo el que hemos empleado en este trabajo (Figura 5), derivados del imidazol-2-ilideno, son especies neutras con un carbono situado entre los dos átomos de nitrógeno, con un par de electrones libres capaces de coordinarse tanto a metales duros como blandos, haciéndolos incluso más versátiles que las fosfinas.



**Figura 5.** 1,3-bis(2,6-di-*i*-propilfenil)imidazol-2-ilideno (IPr)

## **2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**

El desarrollo de este trabajo de investigación se basa en cuatro objetivos principales:

- Síntesis y caracterización de nuevos complejos de oro, así como la familiarización con las técnicas más habituales.  
Para su desarrollo, se llevará a cabo en primer lugar la síntesis de chalconas con diferentes sustituyentes en el anillo B, así como su alquilación con bromuro de propargilo. Tras la preparación de los cloro derivados de oro de partida, tanto los complejos con fosfina como con los carbeno complejos se les hará reaccionar con las chalconas alquiladas dando lugar a los correspondientes derivados alquino fosfina y alquino carbeno.  
Los nuevos complejos serán estudiados con diferentes técnicas estructurales: espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectroscopia ultravioleta visible, para su caracterización completa.
- Estudio físico-químico/farmacocinético de los compuestos sintetizados para su posible aplicación como agentes anticancerígenos.  
Se realizarán medidas de estabilidad de los complejos para evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo en condiciones fisiológicas tras su incubación a 37 °C, así como las medidas de coeficiente de reparto n-octanol/agua para estudiar su carácter lipofílico e hidrofílico, con la finalidad de dar una percepción de su biodistribución por el organismo, así como su capacidad para difundir en las membranas plasmáticas.
- Estudio biológico basado en tres ensayos: ensayo MTT, marcaje y visualización de núcleos mediante microscopía de fluorescencia y test de Ames. Se estudiará su capacidad de inducir la muerte celular, así como su capacidad mutagénica.
- Familiarización con diferentes fuentes bibliográficas y con el protocolo a seguir en una presentación de un trabajo de investigación.

### 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

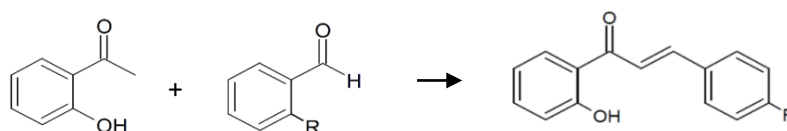
En este apartado se incluye el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo.

#### 3.1. Síntesis de los productos de partida

##### 3.1.1. Preparación de 2-Hidroxichalconas (CL-1)

Como se ha indicado anteriormente en la introducción, las moléculas del tipo chalcona pueden ser un candidato adecuado para ser empleadas como ligando en la coordinación al centro metálico de oro(I), gracias a su actividad anticancerígena, además de la facilidad de su síntesis. Se han sintetizado chalconas con distintos sustituyentes con la idea de diseñar el ligando más biocompatible.

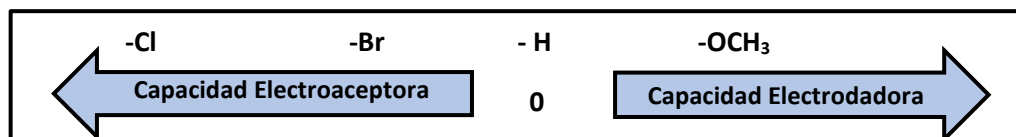
La síntesis se lleva a cabo mediante una condensación aldólica de Claisen-Schmidt de un benzaldehído no enolizable y una acetofenona enolizable empleando hidróxido de sodio (40%) como catalizador en etanol desgasificado.



**Ecuación 1.** Síntesis de 2-hidroxichalconas

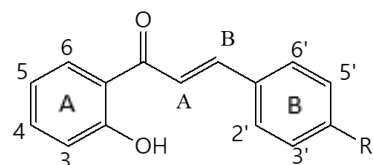
El procedimiento de síntesis ya había sido descrito previamente en la bibliografía científica<sup>22</sup> para los sustituyentes R = H, Cl y OMe. En nuestro caso además de los ya descritos, hemos incluido la síntesis del que lleva el sustituyente R = Br. Se han obtenido buenos rendimientos con los cuatro sustituyentes empleados y además hemos completado la caracterización de los mismos mediante las técnicas espectroscópicas convencionales, asignando todas las señales de RMN a cada uno de los átomos de la estructura.

La reacción se ha realizado con diferentes sustituyentes en la posición *para*- del benzaldehído, anillo B (Figura 7). Los sustituyentes R empleados tienen diferencias respecto a la capacidad electrodadora y electroaceptora, con el fin de estudiar su influencia en el compuesto resultante (figura 6).



**Figura 6.** Clasificación de los sustituyentes según su capacidad electroaceptora y electrodadora

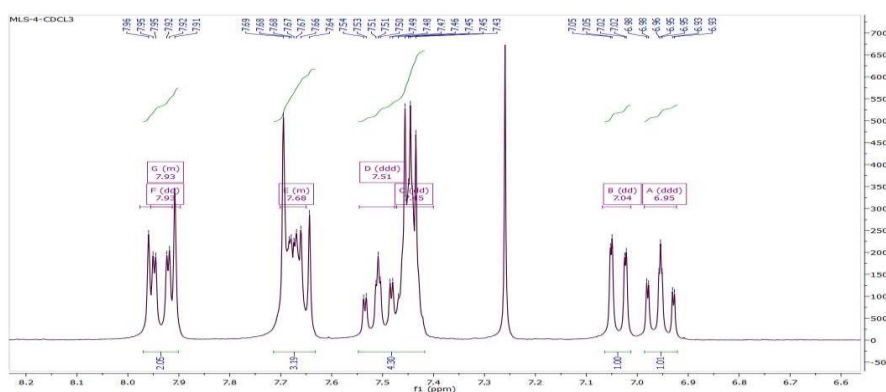
Se ha asignado la siguiente numeración a la estructura de CL-1, como apoyo para la comprensión de las señales espectroscópicas:



R = H (**CL-1a**), Br (**CL-1b**), Cl (**CL-1c**), OMe (**CL-1d**)

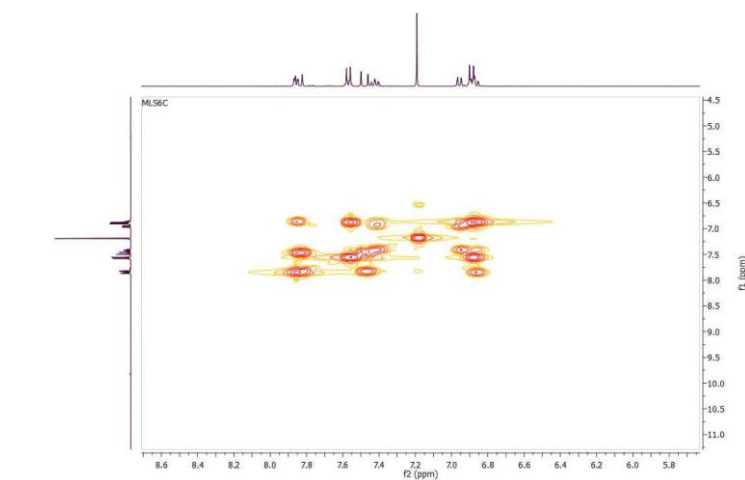
**Figura 7.** Estructura de la 2-hidroxicalcona con la numeración de las posiciones fenílicas. Los espectros, tanto de resonancia magnética nuclear como de espectroscopía infrarroja, resultan tener un patrón característico con diferencias en los desplazamientos según la naturaleza del sustituyente.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se observan dobletes de dobletes para los protones  $\text{H}^3$  y  $\text{H}^6$  del anillo A; dobletes de dobletes de dobletes para los protones  $\text{H}^4$  y  $\text{H}^5$ ; un sistema AB para los protones del doble enlace y en el caso de benceno B *para*-disustituido se detecta un sistema AA'XX' en el que las señales de los protones  $\text{H}^{3'}$ ,  $\text{H}^{5'}$  son las más afectadas por el sustituyente R. Se toma como referencia el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de la chalcona **CL-1a** (Figura 8) para comparar los desplazamientos de los distintos sustituyentes.



**Figura 8.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **CL-1a** (R= H)

La asignación de los hidrógenos se ha realizado con la ayuda de un espectro bidimensional H,H-COSY (figura 9).



**Figura 9.** Espectro H,H-COSY de **CL-1a**

En la tabla se muestra la influencia del sustituyente R en los desplazamientos químicos de los hidrógenos del anillo B, siendo más afectados por encontrarse en las posiciones más cercanas.

Chalcona	CL-1a (R=H)	CL-1b (R=Br)	CL-1c (R=Cl)	CL-1d (R=OCH <sub>3</sub> )
$\delta$ (ppm) H <sup>3'</sup> , H <sup>5'</sup>	7.43	7.54	7.42	6.95
$\delta$ (ppm) H <sup>2'</sup> , H <sup>6'</sup>	7.67	7.58	7.61	7.65

**Tabla 1.** Desplazamiento de los H del fenilo B

Se observa como los grupos electroattractores afectan ligeramente al desplazamiento de los hidrógenos hacia campo alto. Esto es debido a que los halógenos son aceptores por efecto inductivo, pero por efecto de resonancia ceden densidad electrónica. La posición *orto*- respecto de R está más afectada por el efecto de resonancia, ya que la carga negativa queda sobre esta posición y por tanto tienen un exceso de densidad electrónica. Ambos efectos están compensados, pero al ser más fuerte el efecto de resonancia están ligeramente más apantallados.

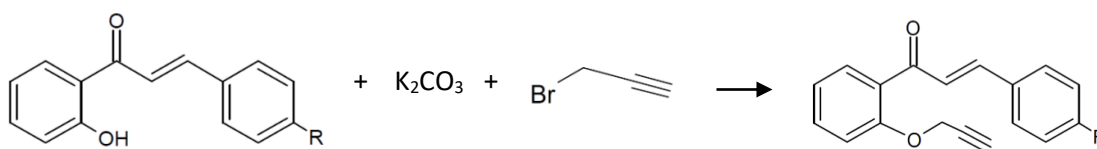
Los hidrógenos del sustituyente metoxi se ven más desplazados a campo alto. El sustituyente metoxi tiene menor carácter aceptor de electrones que los halógenos por efecto inductivo, debido a ello retira menos y la densidad electrónica en torno a los H será mayor, provocando que estén menos apantallados los hidrógenos. Además de tener el mismo efecto resonante que los sustituyentes halogenados, de forma que se favorece un mayor desplazamiento hacia campo alto.

Los espectros de <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-RMN, muestran tres señales características: la del grupo carbonilo en todas las chalconas en torno a 194 ppm, la del alcohol en 164 ppm y la del doble enlace en torno a 145 ppm (C $\alpha$ ) y 120 ppm (C $\beta$ ).

Respecto a los espectros de IR, se observa en todos los casos una banda ancha característica del grupo -OH con una frecuencia en torno a 3000-3300 cm<sup>-1</sup>, una banda estrecha en torno 1640 cm<sup>-1</sup> del alqueno y otra banda estrecha y alargada en torno a 1600 cm<sup>-1</sup> propia del grupo carbonilo (Espectros representados en los anexos).

### 3.1.2. Preparación de las Chalconas alquiladas (CL-2)

Se ha llevado a cabo la alquilación de las chalconas descritas en el apartado anterior en el grupo -OH. En primer lugar, se debe deprotonar este grupo hidroxilo con carbonato de potasio y a continuación alquilarlo mediante la adición de bromuro de propargilo. Se obtienen los correspondientes derivados alquilados de las chalconas con un grupo alquino, que posteriormente podrá coordinarse a un centro metálico de oro(I) tras su previa deprotonación.

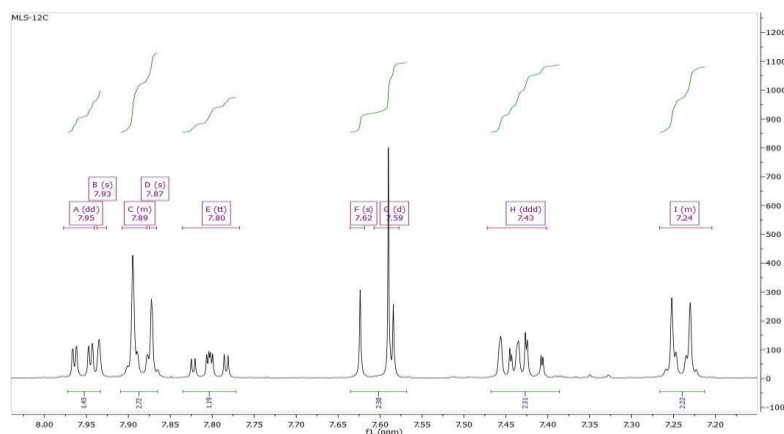


R = H (**CL-2a**), Br (**CL-2b**), Cl (**CL-2c**), OMe (**CL-2d**)

### Ecuación 2. Síntesis de las chalconas alquiladas

Como en el caso anterior, los espectros observados tanto de RMN como de IR tienen un patrón característico, existiendo diferencias respecto a los desplazamientos químicos debidas al efecto del sustituyente R.

Se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del derivado alquino de la **CL-1d** como ejemplo (Figura 10), siendo representados el resto de los espectros en los anexos.



**Figura 10.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de **CL-1d**

Como en el caso anterior, para una correcta asignación de los hidrógenos se ha realizado un espectro bidimensional H,H-COSY. Las señales debidas al  $\text{H}^3$  (anillo A) son las más afectadas por la alquilación, de modo que en todos los casos se aprecia un desplazamiento hacia campo alto. En cuanto a los protones del anillo B, se repite la misma variación y desplazamiento que habíamos observado en las chalconas de partida. En la tabla se muestran las variaciones de los desplazamientos químicos de los hidrógenos del anillo B tras la alquilación.

Derivados de la chalcona	CL-2a (R=H)	CL-2b (R=Br)	CL-2c (R=Cl)	CL-2d (R=OCH <sub>3</sub> )
$\delta$ (ppm) $\text{H}^{3'}$ , $\text{H}^{5'}$	7.39	7.44	7.35	6.91
$\delta$ (ppm) $\text{H}^{2'}$ , $\text{H}^{6'}$	7.59	7.54	7.55	7.59

**Tabla 2.** Desplazamiento de los protones del fenilo B

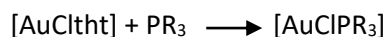
Los hidrógenos de los sustituyentes en posición *orto*- al sustituyente R están más desplazadas respecto a los de la posición *meta*-. El sustituyente metoxi influye más en el desplazamiento respecto al resto, ya que se trata de un grupo menor carácter aceptor de electrones, teniendo las posiciones *orto*- más afectadas porque el efecto inductivo es mayor a distancias menores. Adicionalmente se observa un triplete en torno a 2,4 ppm debido al protón del alquino y un doblete centrado en torno a 4,7 ppm que corresponde al grupo  $-\text{CH}_2$  del grupo propargilo.

En los espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN, permanecen las señales características del grupo carbonilo en torno a 194 ppm y el doble enlace en torno a 145 ppm ( $\text{C}\alpha$ ) y 120 ppm ( $\text{C}\beta$ ). Aparecen variaciones respecto a las chalconas de partida ya que la señal del carbono del grupo  $-\text{OH}$  también se ha desplazado hacia campo alto tras su alquilación, además aparecen nuevas señales en torno a 79 y 56 ppm debidas a triple enlace y al  $-\text{CH}_2-$  del grupo propargilo respectivamente.

En los espectros de IR, se observa en todos los casos como la banda ancha correspondiente al alcohol ha desaparecido debido a su alquilación. Aparecen dos bandas estrechas correspondientes a la incorporación de grupo alquino, en torno a  $3200\text{ cm}^{-1}$  del hidrógeno enlazado con el triple enlace y a  $2100\text{ cm}^{-1}$  del triple enlace. Se mantienen las bandas características en torno a  $1600\text{ cm}^{-1}$  del grupo carbonilo y  $1640\text{ cm}^{-1}$  del alqueno.

### 3.2. Preparación de complejos oro fosfina

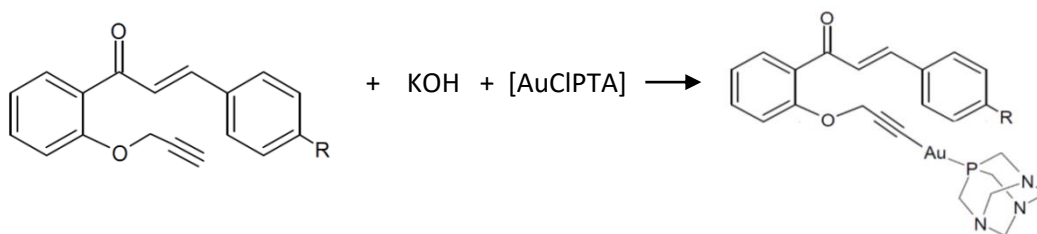
Para la síntesis de los complejos oro-fosfina con las chalconas alquiladas en primer lugar se han sintetizado los complejos de oro(I)  $[\text{AuClPR}_3]$  ( $\text{PR}_3 = \text{PTA}, \text{PPh}_3$ ) que se han empleado como productos de partida y que se harán reaccionar posteriormente tras la deprotonación de las chalconas alquiladas. Su preparación consiste en la adición de la fosfina  $\text{PR}_3$  sobre una disolución de  $[\text{AuCltht}]$  (tht = tetrahidrotiofeno) en diclorometano, de forma que el tht, al tratarse de un ligando lábil, se desplaza con facilidad sustituyéndose por la correspondiente fosfina.



#### Ecuación 3. Síntesis de $[\text{AuClPR}_3]$

##### 3.2.1. Preparación de complejos de Au con PTA

La síntesis de alquino complejos de PTA se ha realizado deprotonando el protón del grupo alquino con hidróxido de potasio en etanol y la posterior reacción con  $[\text{AuClPTA}]$ . En todos casos se obtienen sólidos estables al aire y con rendimientos aceptables en torno a 55 - 70%.



$\text{R} = \text{H}$   $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PTA}]$  (1),  $\text{Br}$   $[\text{Au}(\text{CL-2b})\text{PTA}]$  (2),  $\text{Cl}$   $[\text{Au}(\text{CL-2c})\text{PTA}]$  (3),  $\text{OMe}$   $[\text{Au}(\text{CL-2d})\text{PTA}]$  (4)

#### Ecuación 4. Síntesis de complejos de oro con PTA

Los espectros de todos los complejos de PTA, como era de esperar, presentan una gran similitud. En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, ha desaparecido la señal del protón del grupo alquino que nos indica que se ha deprotonado adecuadamente el derivado de chalcona. La ausencia del hidrógeno provoca que la señal debida al  $-\text{CH}_2-$  tenga una multiplicidad de singlete en lugar de un doblete ya que no tiene hidrógenos vecinos a los que acoplarse. Aparecen las señales características de la fosfina PTA, que aparecen como un sistema AB para los protones metilénicos del grupo  $\text{NCH}_2\text{N}$  y un singlete correspondiente al grupo  $\text{NCH}_2\text{P}$ , confirmando así la síntesis del complejo deseado. Se muestra como ejemplo de lo indicado el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PTA}]$  (Figura 11).

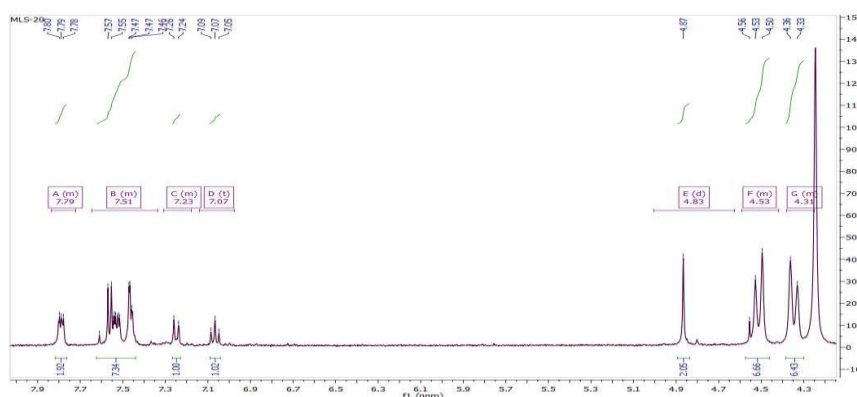


Figura 11. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PTA}]$  (1)

Los espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN demuestran que se ha coordinado la fosfina al centro metálico en todos los complejos, apareciendo un singlete en torno a -49 ppm (tabla 3), desplazada hacia campo bajo con respecto al producto de partida  $[\text{AuClPTA}]$ , que aparece en torno a -51 ppm.

Complejo	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (ppm)
$[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PTA}]$ (1)	- 48.8
$[\text{Au}(\text{CL-2b})\text{PTA}]$ (2)	- 48.7
$[\text{Au}(\text{CL-2c})\text{PTA}]$ (3)	- 49.0
$[\text{Au}(\text{CL-2d})\text{PTA}]$ (4)	- 48.3

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos de los fósforos en los complejos con PTA

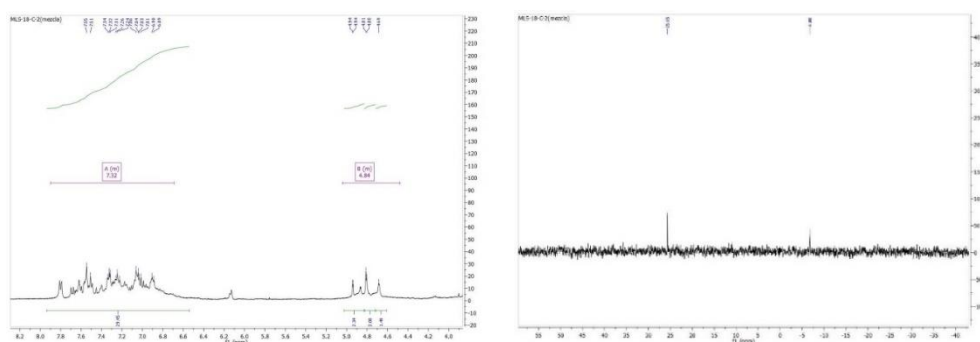
En los espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN, permanecen las señales características del grupo carbonilo en torno a 194 ppm, el doble enlace en torno a 142 ppm y 125 ppm, así como la señal del carbono del grupo éster en torno a 160 ppm. La coordinación de la unidad Au-PTA al alquino desplaza a campo bajo la señal del mismo, hasta un desplazamiento de 97 ppm, mientras que la señal del grupo  $-\text{CH}_2$  fruto de la alquilación permanece en torno a 57 ppm.

En los espectros de infrarrojo se observa la desaparición de la banda de vibración del hidrogeno del alquino confirmándonos que todo el producto de partida se ha deprotonado adecuadamente. Se mantienen las bandas estrechas del triple enlace, del doble enlace y del grupo carbonilo, en torno a 2100, 1640 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

### 3.2.2. Preparación de complejos de Au con $\text{PPh}_3$

La síntesis de alquino complejos de oro con  $\text{PPh}_3$  se intentó por el mismo procedimiento empleado en el apartado anterior, sin embargo, la deprotonación del hidrógeno del grupo alquino con hidróxido de potasio en etanol y la posterior reacción con  $[\text{AuClPPh}_3]$ , dió como producto final una mezcla de productos.

En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se observan señales adicionales y las integrales de los protones indican que hay más de los que debería (figura 12). Además, el espectro de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN nos revela que sigue habiendo producto de partida  $[\text{AuClPPh}_3]$  sin reaccionar, aun dejando largos tiempos de reacción.

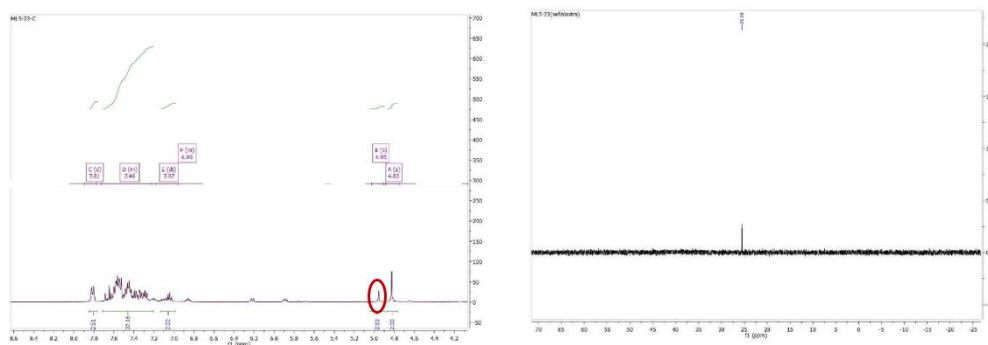


**Figura 12.** Espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$  (5)

Se comprobó si cambiando el disolvente por metanol se favorecía la reacción, de forma que se obtuvo el producto deseado pero impurificado ya que se detecta en todos los espectros una



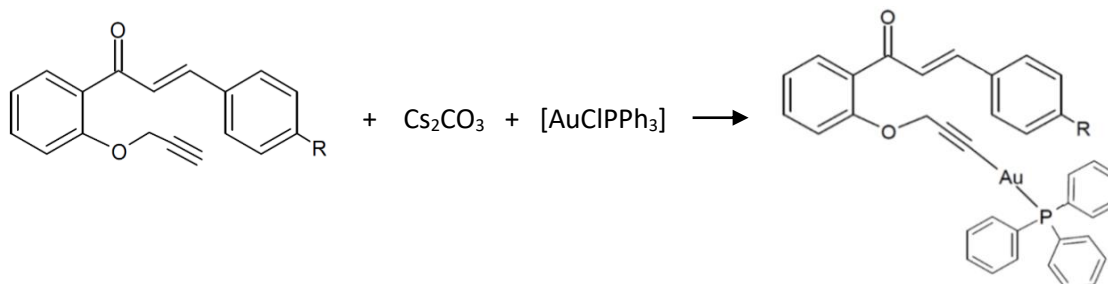
señal adicional (Figura 13). Los espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN muestran que todo el producto de partida ha reaccionado, apareciendo una única señal.



**Figura 13.** Espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$  (5)

Las siguientes alternativas del método se centraron en reemplazar la base. Se probó sustituyendo la base por carbonato de potasio, descartándose este método ya que los espectros muestran que hay productos de partida. La base no es suficientemente fuerte para deprotonar el alquilo.

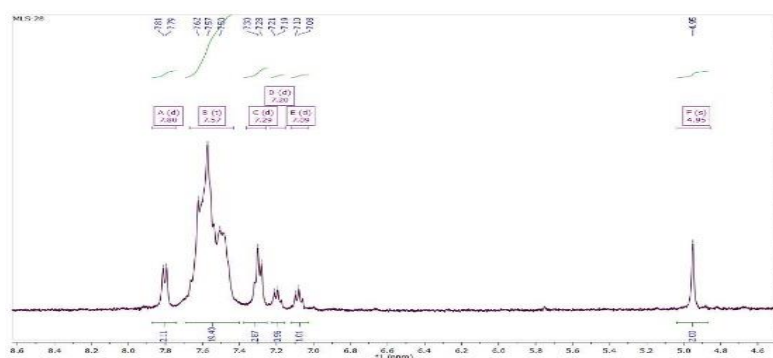
Finalmente se obtuvo el método adecuado, utilizando como base carbonato de cesio en exceso en diclorometano. Se sintetizaron así los complejos con los sustituyentes H y Br (ecuación 5).



R = H  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$  (5) y R = Br  $[\text{Au}(\text{CL-2b})\text{PPh}_3]$  (6)

**Ecuación 5.** Síntesis de complejos con oro  $\text{PPh}_3$

En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, ha desaparecido la señal del protón del alquino variando la multiplicidad de la señal de  $-\text{CH}_2-$  a un singlete. Aparecen las bandas del grupo  $\text{PPh}_3$  confirmando que se ha coordinado al centro metálico. Se muestra como ejemplo el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$  (5).



**Figura 14.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$  (5)

En los espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN aparece un singlete en torno 41 ppm (tabla 4), desplazado en 8 ppm hacia campo bajo con respecto al producto de partida, mostrando que se ha producido la coordinación de la unidad  $\text{AuPPh}_3$  a la chalcona alquilada.

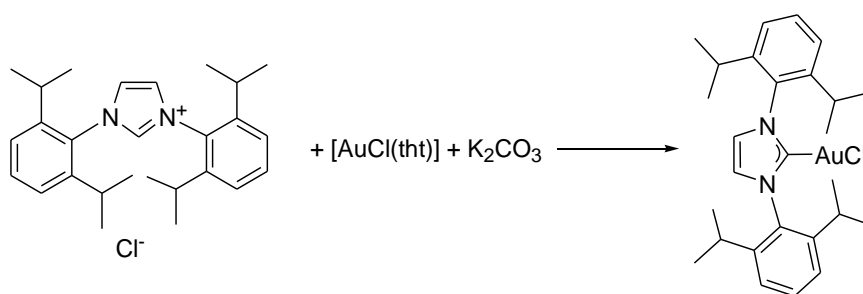
Complejo	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (ppm)
$[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{PPh}_3]$ ( <b>5</b> )	41.5
$[\text{Au}(\text{CL-2b})\text{PPh}_3]$ ( <b>6</b> )	41.3

**Tabla 4.** Desplazamiento químico de los fósforos de los complejos con  $\text{PPh}_3$

Los espectros de infrarrojo confirman la deprotonación del hidrógeno del alquino al desaparecer la banda en torno a  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Se mantienen las bandas estrechas del triple enlace, del doble enlace y del grupo carbonilo, en torno a  $2100$ ,  $1640$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

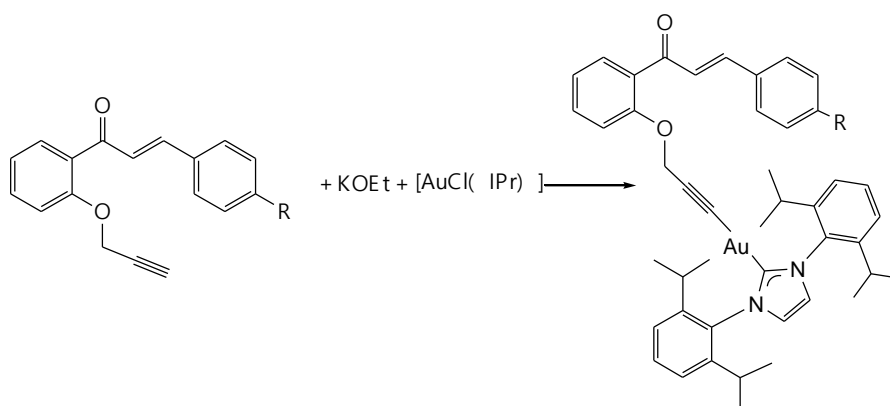
### 3.2.3. Preparación de complejos oro carbeno

La síntesis del carbeno complejo de oro consiste en la adición de  $[\text{AuCl}(\text{tht})]$  sobre la sal de imidazolio  $[\text{IPr-H}]\text{Cl}$  en presencia de carbonato de potasio, como base para deprotonar. El procedimiento seguido ha sido publicado anteriormente en nuestro grupo de trabajo<sup>23</sup> y solo funciona con carbenos voluminosos.



**Ecuación 6.** Síntesis del complejo  $[\text{ClAuIPr}]$

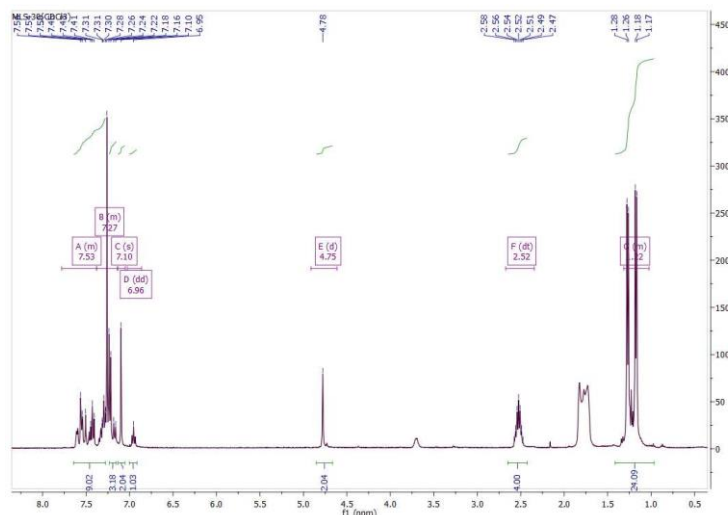
La síntesis de alquino complejos de oro con el carbeno IPr se ha realizado de igual forma a la descrita para los complejos  $\text{AuPTA}$ , es decir, deprotonando el protón del grupo alquino con hidróxido de potasio en etanol y la posterior coordinación de la unidad oro-carbeno tras la adición del complejo  $[\text{AuClIPr}]$ .



$\text{R} = \text{H}$   $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{IPr}]$  (**7**),  $\text{Br}$   $[\text{Au}(\text{CL-2b})\text{IPr}]$  (**8**),  $\text{Cl}$   $[\text{Au}(\text{CL-2c})\text{IPr}]$  (**9**),  $\text{OMe}$   $[\text{Au}(\text{CL-2d})\text{IPr}]$  (**10**)

**Ecuación 7.** Síntesis de complejos de oro con IPr

A continuación, se muestra como ejemplo el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{IPr}]$  (**7**), teniendo el resto de complejos un patrón similar. Las diferencias de los desplazamientos son debidas al sustituyente R siendo esta vez más complicado asignar cada desplazamiento, ya que se observa una acumulación de señales en la región de fenilos, debido a la presencia de los protones del anillo bencénico del carbeno.



**Figura 15.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de  $[\text{Au}(\text{CL-2a})\text{IPr}]$  (**7**)

El espectro muestra el singlete del grupo  $-\text{CH}_2-$  del propargilo centrado en torno a 5 ppm, además de las señales características de los grupos isopropilo, un septuplete en torno a 2.5 ppm debido al protón del isopropilo ( $-\text{CHMe}_2-$ ), dos dobletes de los metilos del isopropilo en torno a 1 ppm y un singlete correspondiente a los dos protones del anillo de imidazolio en torno a 7 ppm.

En los espectros de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -apt RMN se observan las señales propias de la chalcona alquilada sin apenas modificación en los desplazamientos químicos, salvo la señal debida al carbono del alquino que al igual que se observaba en los complejos con PTA se ha desplazado a 97 ppm tras la coordinación al centro metálico. Se pueden identificar además las señales debidas a los 2 carbonos del anillo N-heterocíclico en torno a 124 ppm, el carbono cuaternario unido al centro de oro a 192 ppm, así como las derivadas de los grupos isopropilo, centradas en torno a 29 ppm ( $\text{CHMe}_2$ ) y 24 ppm (Me).

En los espectros de infrarrojo, la banda del hidrógeno del alquino desaparece. Se mantienen las bandas estrechas y alargadas correspondientes al triple enlace, el doble enlace y el grupo carbonilo, en torno a 2100, 1640 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

### 3.3. Propiedades físico-químicas

#### 3.3.1. Coeficiente de reparto octanol-agua

Para diseñar un fármaco hay que tener en cuenta sus propiedades de administración/absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME), incluyendo su estabilidad y toxicidad.

El carácter lipofílico de un compuesto es una característica intrínseca que tiene una gran importancia respecto a las propiedades anteriores. La lipofilia está directamente relacionada con su capacidad de difundir a través de la capa lipídica de la membrana celular, afectando directamente tanto a su actividad biológica como a su toxicidad.

El balance entre lipofilia e hidrofilia, se puede calcular mediante el coeficiente de reparto entre n-octanol y agua en condiciones isotónicas ( $\log D$ ). El  $\log D$  se obtiene a partir de la medida de las concentraciones en el espectrofotómetro de absorción UV-vis. En nuestro caso, se ha calculado el  $\log D_{7.4}$  ya que la disolución acuosa es isotónica con un pH de 7.4 (ecuación 8).

$$\log D = \log \frac{[\text{Compuesto}]_{\text{octanol}}}{[\text{Compuesto}]_{\text{agua}}}$$

**Ecuación 8.** Expresión del coeficiente de reparto

Complejo	Log $D_{7.4}$	Complejo	Log $D_{7.4}$
[Au(CL-2a)PTA] (1)	1.1	[Au(CL-2b)PPh <sub>3</sub> ] (6)	0.79
[Au(CL-2b)PTA] (2)	0.81	[Au(CL-2a)IPr] (7)	2.05
[Au(CL-2c)PTA] (3)	1.02	[Au(CL-2b)IPr] (8)	0.74
[Au(CL-2d)PTA] (4)	1.29	[Au(CL-2c)AuIPr] (9)	1.44
[Au(CL-2a)PPh <sub>3</sub> ] (5)	0.96		

**Tabla 5.** Valores del coeficiente de reparto

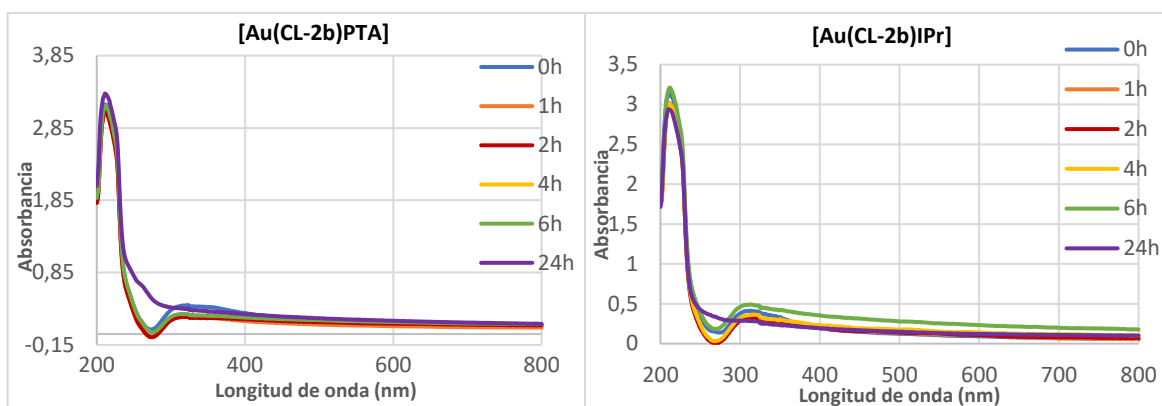
Un equilibrio entre carácter lipófilo e hidrófilo daría un valor en torno a cero siendo, lo que indicaría una solubilidad similar tanto en el disolvente orgánico como en agua. En nuestro caso, se aprecia un cierto carácter lipófilico al presentar unos valores superiores a 0 y en torno a 1 en todos los casos, excepto en el caso del complejo [Au(CL-2a)IPr] (7) que presenta un valor de 2, superior al resto y que a priori pudiera favorecer una mayor retención del complejo en el interior de la célula pudiendo provocar mayores efectos secundarios, al dificultar su eliminación. Se observa precisamente que los valores menores de  $\log D$  corresponden a los complejos en los que el sustituyente R de la chalcona es un átomo de Br, dándoles finalmente un menor carácter lipófilo.

Este carácter lipófilo podría permitir que los compuestos preparados en este trabajo pudieran atravesar las membranas celulares con mayor facilidad.

### 3.3.2. Medidas de estabilidad

Se ha estudiado la estabilidad de los complejos de PTA y del carbeno IPr en condiciones fisiológicas a 37°C durante 24 horas mediante la evolución de los espectros de absorción, para concluir si son estables o por el contrario evolucionan a la formación de especies nuevas por procesos de hidrólisis o se forman nanopartículas por procesos de descomposición del oro.

Se muestran dos de los espectros de visible-UV obtenidos para cada tipo de complejo estudiado, el resto de los espectros se encuentran en los anexos.



**Figura 16.** Espectro UV- Vis de [Au(CL-2b)PTA] (2) y [Au(CL-2b)IPr] (8) a lo largo del tiempo

Se observa como a lo largo del tiempo se produce una disminución de la absorbancia de los complejos, pudiendo ser causada por una disminución de la solubilidad o degradación del complejo. Además, se observan la desaparición de una banda en torno a 300 nm a las 24 horas pudiendo atribuirse a procesos de disociación o procesos de hidrólisis.

Es importante que no haya aparecido ninguna banda en torno a los 500 nm en ninguno de los complejos, lo que nos indica que no se produce la descomposición del oro(I) a oro metálico.

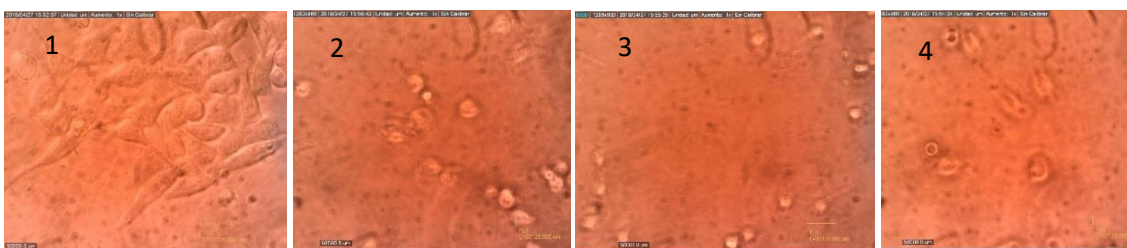
### 3.4. Ensayos biológicos

#### 3.4.1. Ensayo MTT

Se ha estudiado la citotoxicidad de los complejos de PTA con el fin de evaluar la efectividad de estos sobre la inhibición de las funciones biológicas celulares. Se ha empleado la técnica MTT sobre células adherentes HeLa (cáncer cervical). Este ensayo nos permite calcular el valor  $IC_{50}$  de forma que nos muestra la cantidad de complejo que es requerida para que la viabilidad de un cultivo celular se vea reducida al 50%.

El bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) pertenece a la familia de las sales de tetrazolio que al reducirse se convierte en formazán. En esta reducción se aprecia un cambio de color de amarillo a violeta, es debido a esto que se mide la absorbancia a 550 nm. Esta reducción se debe a la acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales. Cuando esta reacción ocurre se aprecia un precipitado violeta-morado.

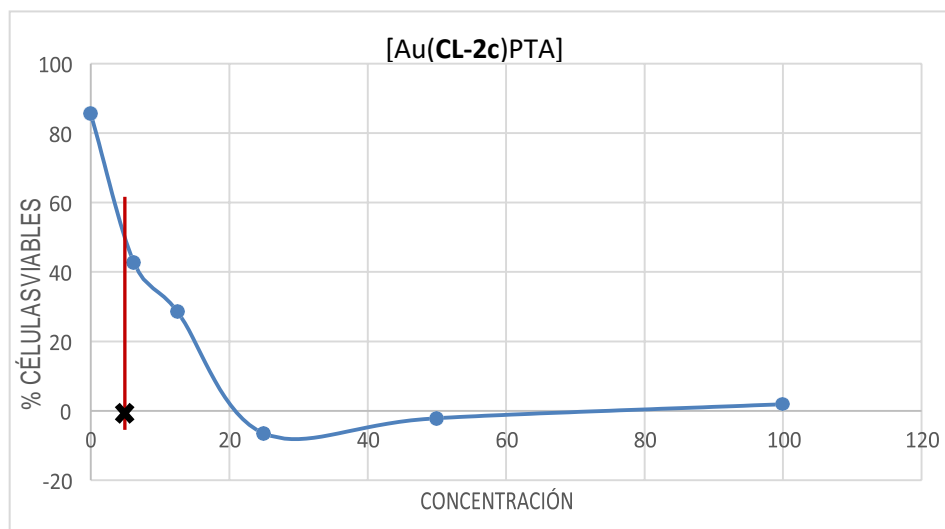
Para la realización de este ensayo, se ha elegido los complejos [Au(CL-2b)PTA] (2), [Au(CL-2c)PTA] (3) y [Au(CL-2d)PTA] (4) disueltos en DMSO para posteriormente ser incubados junto con las células cancerígenas HeLa. A partir de las células control se pueden apreciar las variaciones de la muestra debidas a la citotoxicidad de los complejos.



**Figura 17.** 1: control; 2: [Au(CL-2b)PTA] (2); 3:[Au(CL-2c)PTA] (3); 4:[Au(CL-2d)PTA] (4)

En el control se aprecian las células sanas con aspecto alargado. Las células tratadas con el complejo presentan una diferencia de aspecto debida a la muerte celular y la compactación del ADN. Las células observadas están en mitosis y los espacios en los que no se observan células en consecuencia de esta muerte celular.

A partir de los ensayos de MTT se determina el porcentaje de células vivas por espectroscopia UV-vis, tras el tratamiento de las mismas con diferentes concentraciones del complejo ensayado. Después de la representación en una gráfica con respecto a las concentraciones, se traza una línea recta en el porcentaje del 50% y se calcula la concentración en la que corta con cada uno de los compuestos.



**Figura 18.** Representación del ensayo MTT de [Au(CL-2c)PTA] (3)

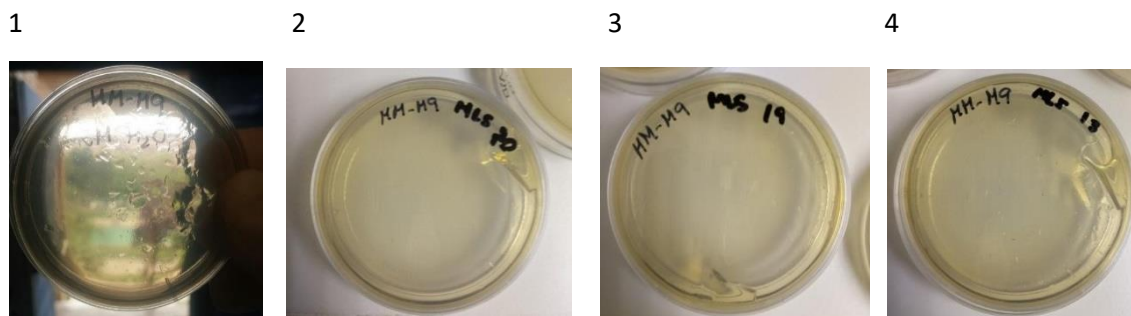
El cálculo de la IC para el 50% de las células HeLa nos dio un valor aproximado de 5  $\mu$ M en todos los casos. Los tres complejos tienen una reacción muy similar, provocando la muerte en un mismo número de células tumorales con una dosis equivalente.

### 3.4.2. Test de Ames

Se realizó el test de Ames para conocer la capacidad mutagénica de los complejos de oro con PTA, ya que nos interesa que no sean mutágenos y se espera que sirvan como agentes anticancerígenos.

Un compuesto es mutágeno cuando induce neoplasia (carcinógeno) e interacciona con el DNA. Este test se basa en cepas que están especialmente sintetizadas para producir una mutación puntual en los genes necesarios para sintetizar histidina, que permite la detección de mutágenos que actúan a través de diferentes mecanismos.

Se ha utilizado una cepa de *E. coli* WP2 que presenta una mutación en el gen *trpE*. Esta mutación la convierte de auxótrofa a triptófano, es decir, que solo crece en medios ricos en triptófano. El test de Ames se basa en la capacidad mutagénica del complejo, pudiendo causar mutaciones genéticas que provocasen la reversión en la auxotrofía de la cepa, de forma que el crecimiento dejaría de ser dependiente del triptófano. La capacidad mutágena sobre el DNA es aleatoria, es decir, no se sabe sobre qué regiones del DNA tendrá lugar, por lo que un mayor índice de mutagenicidad provocará una mayor probabilidad de reversión de la auxotrofía. En este test, se considera que un compuesto es mutágeno si el número de colonias es 2-3 veces superior al control.



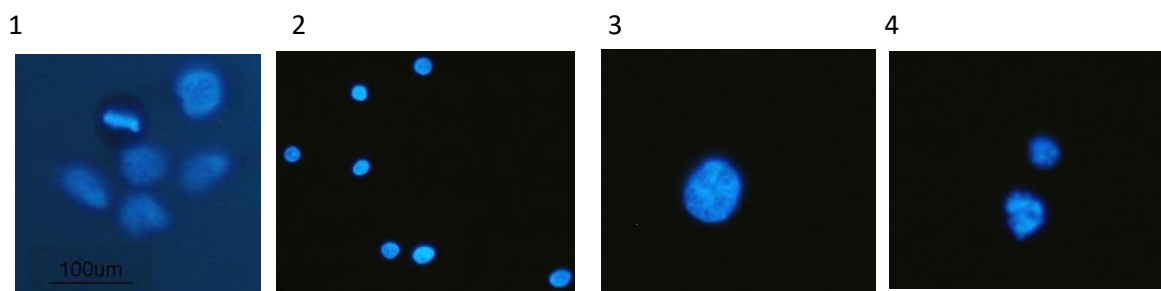
**Figura 19.** 1: control; 2:[Au(CL-2b)PTA] (2); 3:[Au(CL-2c)PTA] (3); 4:[Au(CL-2d)PTA] (4)

En el control no se observa la formación de colonias y las gotas son debidas al agua que se ha añadido para hacer el control. En las imágenes correspondientes a los complejos no se observa la aparición de colonias en ningún caso, lo que nos indica que ninguno es mutágeno. Al no producirse una mutación en el DNA no se provoca una alteración genética en las bacterias que permita el retorno al crecimiento en un soporte libre de triptófano. Se concluye que no hay crecimiento de colonias, y por tanto el número de colonias no es 2-3 veces superior al control, es decir, ninguno tiene capacidad mutagénica.

Es necesario señalar que se trata de un ensayo meramente cualitativo.

### 3.4.3. Marcaje y visualización de núcleos mediante microscopía de fluorescencia

Los complejos de PTA indicados anteriormente también han sido estudiados mediante fluorescencia en un cultivo de células previamente marcadas. Con ello, lo que se quiere observar es si estos compuestos inducen la muerte celular mediante apoptosis. La técnica que se utiliza es el marcaje celular y la fluorescencia. Este método es adecuado puesto que el marcador utilizado (Hoeschst 33342) se une al DNA y emite fluorescencia, por lo que es muy sencillo comprobar el estado del DNA. Así pues, las células que presenten el DNA compactado o se encuentren en proceso de división serán apoptóticas.



**Figura 20.** 1:control(células HeLa);2:[Au(CL-2b)PTA](2);3:[Au(CL-2c)PTA](3);4:[Au(CL-2d)PTA](4)

En la imagen control se percibe un número elevado de células en su estado natural de gran tamaño, donde el DNA no se encuentra compacto.

Las imágenes de las células HeLa en presencia de los complejos muestran apoptosis, es decir, se inducen la muerte celular en todos los casos.

En el complejo [Au(CL-2b)PTA] (2), se aprecian diferencias en el tamaño y forma confirmando que son células apoptóticas, aunque se observan mayor número de células que en los otros complejos por lo que inducen a la apoptosis en menor proporción. La célula mostrada del complejo [Au(CL-2c)PTA] (3) está en proceso de apoptosis debido a la activación de las nucleasas. Por último, en la imagen de [Au(CL-2d)PTA] (4) se observan dos células de menor tamaño con el DNA compactado, indicando que también se encuentra en apoptosis.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Técnicas y equipos utilizados

#### Espectrometría de infrarrojo (IR):

El espectrofotómetro utilizado ha sido el Perkin-Elmer Spectrum FT-IR Spectrum One, realizados en un rango de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ . Los compuestos evaluados se encuentran en estado sólido y estado aceitoso. La muestra se coloca sobre el cristal de alto índice de refracción. El rayo IR se refleja en el interior de forma que penetra a unas micras en la muestra y a continuación regresa al detector. Obteniéndose absorbancias correspondientes a la muestra.

#### Resonancia Magnética Nuclear (RMN o NMR):

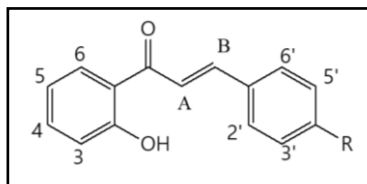
Esta técnica se ha empleado para protón, fosforo y carbono. Los instrumentos utilizados han sido el espectrofotómetro BRUKER-AV 400 (400 MHz para el  $^1\text{H}$ , 162 MHz para el  $^{31}\text{P}$  y 100 MHz para el  $^{13}\text{C}$ ) y ARX 300 (300 MHz para el  $^1\text{H}$ , 121 MHz para el  $^{31}\text{P}$  y 75,4 MHz para el  $^{13}\text{C}$ ). En todos los espectros  $^1\text{H}$  la referencia para los desplazamientos ( $\delta$ ) es el tetrametilsilano, y estos se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresarán en Hercios (Hz). Según la solubilidad de los compuestos, se han utilizado como disolvente DMSO- $d_6$  (dimetilsulfóxido deuterado) o  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado).

#### Espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis:

El espectrómetro utilizado ha sido el Termo Scientific, con lámparas de Deuterio ( $\lambda < 325 \text{ nm}$ ) y de Wolframio ( $\lambda > 325 \text{ nm}$ ), empleando cubetas de cuarzo.

### 4.2. Síntesis de productos y caracterización

#### Ligandos 2-Hidroxichalconas:



Se adicionan 3.32 mmol de 2-hidroxiacetofenona con 3.32 mmol de los distintos benzaldehídos para- sustituidos (para  $\text{R}=\text{OCH}_3$  3.12 mmol) en 5 ml de etanol desgasificado con argón en un matraz. Se agita durante 5 minutos y se añade 10 mmol de hidróxido de sodio en pellets. Se deja reaccionar durante 6-12 horas a temperatura ambiente. Se añade HCl (10%) y se observa cómo se disuelve adquiriendo un color anaranjado hasta llegar a precipitar un sólido amarillo a un  $\text{pH}=5$ . Se filtra a vacío y se seca con hexano.

**CL1a ( $\text{R}=\text{H}$ )  $\rightarrow$  1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona** Sólido amarillo. Rto: 82%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 12.81 (s, 1 H, OH), 7.94 (dd,  $J=1.5, 8.1 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.93 y 7.66 (sistema AB,  $J_{\text{AB}}=20 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}^{\text{A}}, \text{H}^{\text{B}}$ ), 7.68 y 7.45 (m, 5 H,  $\text{H}^{2',6'}$  y  $\text{H}^{3',5'}$ , Ph), 7.51 (ddd,  $J=1.6; 7.3; 8.6 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^5$ ); 7.04 (dd,  $J=0.9; 8.4 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^6$ ), 6.95 (ddd,  $J=1.1; 7.3; 8.2 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^4$ ).  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 193.8 (C=O), 163.6 (C-OH), 145.5 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.4 ( $\text{C}^5$ ), 134.6 ( $\text{C}^2$ ), 130.9 (Ph), 129.7 ( $\text{C}^3$ ), 129.0 (Ph), 128.7 (Ph), 120.1 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 120.0 ( $\text{C}^1$ ), 118.9 y 118.6 ( $\text{C}^3, \text{C}^5$ ). **IR( $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3399 (-OH), 1637 (-C=C), 1569 (-C=O).

**CL1b ( $\text{R}=\text{Br}$ )  $\rightarrow$  3-(4-bromofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona** Sólido amarillo. Rto: 86%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 12.74 (s, 1 H, OH), 7.91 (dd,  $J=1.6, 8.1 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.78 y 7.59 (sistema AB,  $J_{\text{AB}}=16 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}^{\text{A}}, \text{H}^{\text{B}}$ ), 7.52 y 7.46 (sistema AA'XX', 4 H,  $\text{H}^{2',6'}$  y  $\text{H}^{3',5'}$ ), 7.46 (ddd,  $J=1.6; 6.0; 8.6 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^5$ ); 6.98 (dd,  $J=0.9; 8.4 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^6$ ), 6.89 (ddd,  $J=1.1; 7.2; 8.2 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}^4$ ).



**$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 193.5 (C=O), 163.6 (C-OH), 144.0 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.6 ( $\text{C}^5$ ), 133.5 ( $\text{C}^2$ ), 132.3 ( $\text{C}^{3'}$ ,  $\text{C}^{5'}$ ), 129.9 ( $\text{C}^{2'}$ ,  $\text{C}^{6'}$ ), 129.6 ( $\text{C}^3$ ), 125.3 ( $\text{C}^{4'}$ ), 120.7 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 119.9 ( $\text{C}^{1'}$ ), 118.9 y 118.7 ( $\text{C}^6$ ,  $\text{C}^4$ ). **IR(v ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3062 (-OH), 1640 (-C=C), 1561 (-C=O).

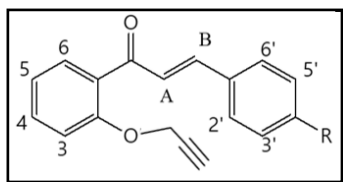
**CL1c (R= Cl)  $\rightarrow$  3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona** Sólido amarillo. Rto: 72%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 12.75 (s, 1 H, OH), 7.91 (dd,  $J=1.2$ , 8.1 Hz, 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.87 y 7.63 (sistema AB,  $J_{\text{AB}}=20$  Hz, 2 H,  $\text{H}^{\text{A}}$ ,  $\text{H}^{\text{B}}$ ), 7.60 y 7.41 (sistema AA'XX', 4 H,  $\text{H}^{2',6'}$  y  $\text{H}^{3',5'}$ ), 7.51 (ddd,  $J=1.5$ ; 9; 15 Hz, 1 H,  $\text{H}^5$ ); 7.04 (dd,  $J=0.9$ ; 8.4 Hz, 1 H,  $\text{H}^6$ ), 6.95 (ddd,  $J=1.2$ ; 9; 15 Hz, 1 H,  $\text{H}^4$ ).  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 193.5 (C=O), 163.6 (C-OH), 143.9 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.9 ( $\text{C}^2$ ), 136.6 ( $\text{C}^5$ ), 133.1 ( $\text{C}^{4'}$ ), 129.8 ( $\text{C}^{2'}$ ,  $\text{C}^{6'}$ ), 129.6 ( $\text{C}^3$ ), 129.4 ( $\text{C}^{3'}$ ,  $\text{C}^{5'}$ ), 120.6 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 119.9 ( $\text{C}^{1'}$ ), 118.9 y 118.7 ( $\text{C}^6$ ,  $\text{C}^4$ ). **IR(v ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3060 (-OH), 1639 (-C=C), 1563 (-C=O).

**CL1d (R=OCH<sub>3</sub>)  $\rightarrow$  1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona** Sólido amarillo. Rto: 61%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 12.94 (s, 1 H, OH), 7.93 (dd,  $J=1.6$ , 8.0 Hz, 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.91 y 7.55 (sistema AB,  $J_{\text{AB}}=16$  Hz, 2 H,  $\text{H}^{\text{A}}$ ,  $\text{H}^{\text{B}}$ ), 7.64 y 6.96 (sistema AA'XX', 4 H,  $\text{H}^{2',6'}$  y  $\text{H}^{3',5'}$ ), 7.49 (ddd,  $J=1.6$ ; 7.2; 8.6 Hz, 1 H,  $\text{H}^5$ ); 7.03 (dd,  $J=0.9$ ; 8.4 Hz, 1 H,  $\text{H}^6$ ), 6.94 (ddd,  $J=1.0$ ; 7.6; 8.2 Hz, 1 H,  $\text{H}^4$ ), 3.87 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 193.7 (C=O), 163.5 (C-OH), 162.0 ( $\text{C}^{4'}$ ), 145.4 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.1 ( $\text{C}^5$ ), 130.6 ( $\text{C}^{2'}$ ,  $\text{C}^{6'}$ ), 129.5 ( $\text{C}^3$ ), 127.3 ( $\text{C}^2$ ), 120.1 ( $\text{C}^{1'}$ ), 118.8 y 118.6 ( $\text{C}^6$ ,  $\text{C}^4$ ), 117.6 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 114.5 ( $\text{C}^{3'}$ ,  $\text{C}^{5'}$ ), 79.3 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 55.4 (OMe). **IR(v ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3026 (-OH), 1634 (-C=C), 1558 (-C=O).

#### 2-hidroxichalconas alquiladas:



Se adiciona 1 mmol de chalcona con 2 mmol de carbonato de potasio y 1,6 mmol de 1-bromo de alquínulo en 20 ml de acetona. Se mantiene a reflujo durante una noche. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra en tierras diatomeas. Se evapora la disolución hasta sequedad obteniendo un sólido o un aceite amarillo según el sustituyente.

**CL2a (R= H)  $\rightarrow$  3-fenil-1-(2-prop-2-iniloxi-fenil)-propenona.** Aceite amarillo. Rto: 51%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.66-7.58 (m, 3 H,  $\text{H}^3+\text{H}^{\text{A}}+\text{Ph}$ ), 7.53-7.36 (m, 6H,  $\text{H}^5$ ,  $\text{H}^{\text{B}}$ , Ph), 7.14 – 7.10 (m, 1 H,  $\text{H}^4$ ), 7.09–7.04 (m, 1 H,  $\text{H}^6$ ), 4.80 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2 H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.53 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1 H,  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ).  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 192.7 (C=O), 155.9 (C-O-), 143.5 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.2 ( $\text{C}^2$ ), 135.1, 132.7 ( $\text{C}^5$ ), 130.6 ( $\text{C}^3$ ), 130.3 (Ph), 129.9 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 128.8 y 128.5 (Ph), 121.8 ( $\text{C}^6$ ), 120.9 (Ph), 113.3 ( $\text{C}^4$ ), 79.6 ( $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ), 56.4 ( $-\text{CH}_2-$ ). **IR(v ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3286 ( $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ), 2121 ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), 1655 ( $-\text{C}=\text{C}$ ), 1599 ( $-\text{C}=\text{O}$ ).

**CL2b (R= Br)  $\rightarrow$  3-(4-bromo-fenil)-1-(2-prop-2-iniloxi-fenil)-propenona** Sólido marrón. Rto: 42%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.58 (dd,  $J = 1.9$ , 7.7 Hz, 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.51–7.25 (m, 7 H,  $\text{H}^{\text{A}}$ ,  $\text{H}^{\text{B}}$ ,  $\text{H}^5$ ,  $\text{H}^{3',5'}$ ,  $\text{H}^{2',6'}$ ), 7.05–6.97 (m, 2 H,  $\text{H}^6$ ,  $\text{H}^4$ ), 4.71 (d,  $J = 2.5$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.46 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1 H,  $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ).  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 192.1 (C=O), 156.0 (C-O-), 141.7 ( $\text{C}^{\text{A}}$ ), 136.3 ( $\text{C}^2$ ), 134.0 ( $\text{C}^{4'}$ ), 132.9 ( $\text{C}^{\text{B}}$ ), 132.0 ( $\text{C}^{2'}$ ,  $\text{C}^{6'}$ ), 130.7 ( $\text{C}^3$ ), 129.8 ( $\text{C}^{3'}$ ,  $\text{C}^{5'}$ ), 127.5 ( $\text{C}^5$ ), 121.8 ( $\text{C}^4$ ), 113.3 ( $\text{C}^6$ ), 78.8 ( $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ), 56.4 ( $-\text{CH}_2-$ ). **IR(v ( $\text{cm}^{-1}$ )):** 3224 ( $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ), 2114 ( $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ), 1645 ( $-\text{C}=\text{C}$ ), 1600 ( $-\text{C}=\text{O}$ ).

**CL2c (R= Cl)  $\rightarrow$  3-(4-cloro-fenil)-1-(2-prop-2-iniloxi-fenil)-propenona** Sólido marrón. Rto: 34%

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) 7.66 (dd,  $J = 1.6$ , 7.8 Hz, 1 H,  $\text{H}^3$ ), 7.52 y 7.35 (sistema AA'XX', 4H,  $\text{H}^{3',5'}$ ,  $\text{H}^{2',6'}$ ), 7.61–7.38 (m, 3 H,  $\text{H}^{\text{A}}$ ,  $\text{H}^{\text{B}}$ ,  $\text{H}^4$ ), 7.12-7.04 (m, 2 H,  $\text{H}^6$ ,  $\text{H}^4$ ), 4.79 (d,  $J=2.4$  Hz, 2 H,

CH<sub>2</sub>), 2.54 (t, J=2.4 Hz, 1 H, -C≡C-H) <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} -RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 192.2 (C=O), 156.0 (C-O-), 141.7 (C<sup>A</sup>), 136.1 (C<sup>2</sup>), 133.6 (C<sup>4'</sup>), 132.9 (C<sup>B</sup>), 130.7 (C<sup>3</sup>), 129.6 (C<sup>2'</sup>, C<sup>6'</sup>), 129.0 (C<sup>3'</sup>, C<sup>5'</sup>), 127.5 (C<sup>5</sup>), 121.8 (C<sup>4</sup>), 113.3 (C<sup>6</sup>), 78.7 (≡C-H), 76.2 (C≡C-H), 56.4 (-CH<sub>2</sub>) IR(v (cm<sup>-1</sup>)): 3223 (-C≡C-H), 2114 (-C≡C-), 1645 (-C=C), 1600 (-C=O).

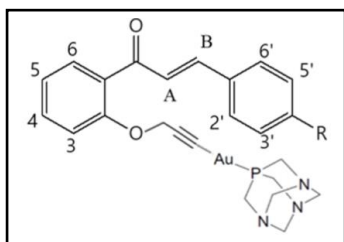
**CL2d (R= OCH<sub>3</sub>) → 3-(4-metoxi-fenil)-1-(2-prop-2-iniloxi-fenil)-propenona** Aceite amarillo. Rto: 68%

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.63 (dd, J= 1.7, 7.6 Hz, 1 H, H<sup>3</sup>), 7.61 y 7.25 (sistema AB, J<sub>AB</sub>= 16 Hz, 2 H, H<sup>A</sup>, H<sup>B</sup>), 7.56 y 6.84 (sistema AA'XX', 4H, H<sup>2',6'</sup> y H<sup>3',5'</sup>), 7.47 (ddd, J=1.8; 7.4; 8.4 Hz, 1 H, H<sup>5</sup>), 7.07-7.0 (m, 2H, H<sup>6</sup>+H<sup>4</sup>), 4.79 (d, J=2.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.52 (t, J=2.4 Hz, 1 H, C≡C-H) <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} -RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 192.6 (C=O), 161.5 (C-O-), 155.8 (C<sup>4'</sup>), 145.4 (C<sup>A</sup>), 136.2 (C<sup>5</sup>), 132.4 (C<sup>3</sup>), 130.4 y 130.2 (C<sup>2'</sup>, C<sup>6'</sup>), 124.9 (C<sup>B</sup>), 121.8 (C<sup>4</sup>), 118.7 (C<sup>6</sup>), 114.5 y 114.3 (C<sup>3'</sup>, C<sup>5'</sup>), 79.2 (≡C-H), 77.9 (C≡C-H), 56.4 (-CH<sub>2</sub>), 55.4 (OCH<sub>3</sub>). IR(v (cm<sup>-1</sup>)): 3287 (-C≡C-H), 2121 (-C≡C-), 1653 (-C=C), 1696 (-C=O).

#### Complejos oro fosfina:

Se adiciona en un matraz 1 mmol de [AuCltht] con 1 mmol de fosfina (PTA, PPh<sub>3</sub>) en 20 ml de diclorometano. Se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Aparece un precipitado blanco en una disolución transparente en el caso de PTA y una disolución incolora en el caso de PPh<sub>3</sub> que se concentra por evaporación a vacío y precipita con hexano. Finalmente, se filtra a vacío y se lava con hexano, obteniéndose un sólido blanco.

#### Complejos de Au chalcona con PTA:



Se adicionan 0.15 mmol del derivado alquilo de la chalcona con 0.22 mmol de hidróxido de potasio en 10 ml de etanol y se deja durante 10 minutos. Se adiciona 0.14 mmol de [ClAuPTA] y se deja durante 6 horas agitando a temperatura ambiente. Se evapora hasta sequedad y se adiciona diclorometano. Se filtra en tierras diatomeas y se evapora hasta un volumen mínimo. Se precipita con éter y se filtra a vacío.

**Complejo 1 (R= H) [Au(CL-2a)PTA] → Sólido blanco. Rto: 72%**

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.82–7.74 (m, 2 H, H<sup>3</sup>+ H<sup>A</sup>), 7.63-7.42 (m, 7 H, H<sup>3',5'</sup>+ H<sup>2',6'</sup>+ H<sup>5</sup> + H<sup>4'</sup> + H<sup>B</sup>), 7.29–7.23 (m, 1 H, H<sup>4</sup>), 7.10–7.03 (m, 1 H, H<sup>6</sup>), 4.88 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.51 y 4.34 (sistema AB, 6 H, NCH<sub>2</sub>N), 4.25 (s, 6 H, PCH<sub>2</sub>N). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} -RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) – 48.8 (s). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} -RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 191.9 (C=O), 156.9 (C-O-), 142.7 (C<sup>A</sup>), 135.1 (C<sup>2</sup>), 133.6 (C<sup>B</sup>), 130.9 (Ph), 130.1 (Ph), 129.5 (Ph), 129.1 (Ph), 127.9 (C<sup>5</sup>), 121.3 (C<sup>6</sup>), 114.6 (C<sup>4</sup>), 97.5 (-C≡C-), 72.3 (d, J=7.8 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 57.9 (CH<sub>2</sub>C≡C-), 51.3 (s, br NCH<sub>2</sub>P) IR (v (cm<sup>-1</sup>)): 2116 (-C≡C-), 1645 (-C=C), 1595 (-C=O).

**Complejo 2 (R= Br) [Au(CL-2b)PTA] → Sólido blanco. Rto: 52%**

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.78–7.75 (m, 2 H, H<sup>3</sup> + H<sup>A</sup>), 7.67 -7.50 (m, 6 H, H<sup>B</sup>+ H<sup>3',5'</sup>+ H<sup>2',6'</sup>+ H<sup>5</sup>), 7.24(m, 1 H, H<sup>6</sup>), 7.06 (ddd, J=0.8; 7.2; 14.8 Hz, 1 H, H<sup>4</sup>), 4.87 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.53 y 4.34 (sistema AB, J<sub>AB</sub>= 16 Hz, 6 H, NCH<sub>2</sub>N), 4.26 (s, 6 H, PCH<sub>2</sub>N). <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} -RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) – 49.0 (s). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} -RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 191.5 (C=O), 157.1 (C-O-), 141.2 (C<sup>A</sup>), 134.5 (C<sup>1</sup>), 133.7 (C<sup>5</sup>), 132.4 y 131.0 (C<sup>2',6'</sup> y C<sup>3',5'</sup>), 130.2 (C<sup>3</sup>), 129.2 (C<sup>2</sup>), 128.3, (C<sup>B</sup>), 124.2,

121.4 (C<sup>4</sup>), 114.7 (C<sup>6</sup>), 97.5 (-C≡C-), 72.3 (d, J = 8 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 58.2 (-CH<sub>2</sub>), 51.3 (d, J = 22.2 Hz, NCH<sub>2</sub>P). IR( $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)): 2116 (-C≡C-), 1645 (-C=C), 1595 (-C=O).

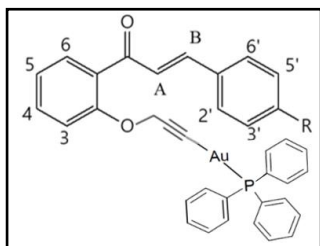
**Complejo 3 (R= Cl) [Au(CL-2c)PTA] →** Sólido blanco. Rto: 48%

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 7.76–7.57 (m, 5 H, H<sup>3</sup>+ sistema AB + H<sup>2',6'</sup>), 7.51–7.43 (m, 1 H, H<sup>5</sup>), 7.40–7.34 (m, sistema AA'XX', 2 H, H<sup>3',5'</sup>), 7.13 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, H<sup>6</sup>), 7.07–7.04 (m, 1 H, H<sup>4</sup>), 4.89 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.54 y 4.44 (sistema AB, J<sub>AB</sub>= 12 Hz, 6 H, NCH<sub>2</sub>N), 4.21 (s, 6 H, PCH<sub>2</sub>N). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) – 48.68 (s). **<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 191.5 (C=O), 157.3 (-C-O-), 140.6 (C<sup>A</sup>), 135.3 (C<sup>2</sup>), 133.4 (C<sup>5</sup>), 130.9 (C<sup>3</sup>), 130.1 y 128.9 (C<sup>3',5'</sup>, C<sup>2',6'</sup>), 128.0 (C<sup>B</sup>), 121.2 (C<sup>4</sup>), 113.4 (C<sup>6</sup>), 73.1 (d, J= 7.4 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 57.7 (CH<sub>2</sub>-), 52.2 (d, J=20 Hz, NCH<sub>2</sub>P). IR( $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)): 2116 (-C≡C-), 1645 (-C=C), 1595 (-C=O).

**Complejo 4 (R= OCH<sub>3</sub>) [Au(CL-2d)PTA] →** Sólido blanco. Rto: 57%

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 7.77–7.22 (m, 5 H, H<sup>6</sup>+ H<sup>A</sup>+ H<sup>B</sup>+ H<sup>3</sup>+ H<sup>5</sup>), 7.73 y 7.01 (sistema AA'XX', 4 H, H<sup>3',5'</sup>+ H<sup>2',6'</sup>), 7.09–7.04 (m, 1 H, H<sup>4</sup>), 4.86 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.89 y 4.34 (sistema AB, 6 H, NCH<sub>2</sub>N), 4.22 (s, 6 H, PCH<sub>2</sub>N), 3.82 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) – 48.31 (s). **<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 192.0 (C=O), 161.6 (C-O-), 156.7 (C<sup>4'</sup>), 142.9 (C<sup>A</sup>), 133.1 (C<sup>5</sup>), 131.0 (C<sup>2',6'</sup>), 130.0 (C<sup>3</sup>), 129.8, 127.7, 125.2 (C<sup>B</sup>), 121.3 (C<sup>4</sup>), 115.1 (C<sup>3</sup>, C<sup>5'</sup>), 114.5 (C<sup>6</sup>), 97.6 (-C≡C-), 72.3 (NCH<sub>2</sub>N), 57.9 (-CH<sub>2</sub>), 55.8 (-OCH<sub>3</sub>), 51.7 (NCH<sub>2</sub>P). IR( $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)): 2116 (-C≡C-), 1646 (-C=C), 1595 (-C=O).

**Complejos de oro chalcona con PPh<sub>3</sub>:**



Se adiciona 0.15 mmol del derivado alquínico de la chalcona con 0.75 mmol de carbonato de cesio en 10 ml de diclorometano y se deja durante 10 minutos. Se adiciona 0.14 mmol de [ClAuPTA] y se deja durante 6 horas agitando a temperatura ambiente. Se evapora hasta un volumen mínimo. Se precipita con éter y se filtra a vacío, obteniéndose un sólido amarillento.

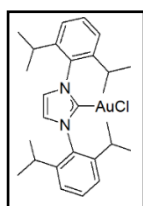
**Complejo 5 (R= H) [Au(CL-2a)PPh<sub>3</sub>] →** Sólido amarillo claro. Rto: 30%

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 7.81–7.79 (m, 2 H, H<sup>3</sup>, H<sup>A</sup>), 7.63–7.26 (m, 22 H, H<sup>3',5'</sup>+ H<sup>2',6'</sup>+ H<sup>5</sup>+ H<sup>4'</sup>+ H<sup>B</sup>+ PPh<sub>3</sub>), 7.23–7.15 (m, 1 H, H<sup>6</sup>), 7.10–7.05 (m, 1 H, H<sup>4</sup>), 4.95 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 41.50 (s). IR( $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)): 2137 (-C≡C-), 1655 (-C=C), 1600 (-C=O).

**Complejo 6 (R= Br) [Au(CL-2b)PPh<sub>3</sub>] (R= Br) →** Sólido amarillo claro. Rto: 35%

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 7.80–7.75 (m, 2 H, H<sup>3</sup>+ H<sup>A</sup>), 7.68–7.44 (m, 22 H, H<sup>3',5'</sup>+ H<sup>2',6'</sup>+ H<sup>5</sup>+ H<sup>4'</sup>+ H<sup>B</sup>+ PPh<sub>3</sub>), 7.33–7.28 (m, 1 H, H<sup>6</sup>), 7.11–7.05 (m, 1 H, H<sup>4</sup>), 4.95 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>). **<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) 41.33 (s). IR( $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)): 2140 (-C≡C-), 1649 (-C=C), 1600 (-C=O).

**Derivados Au carbeno:**



Se añaden 0.6 mmol de la sal de imidazolio con 0.6 mmol de [AuCltht] durante 15 minutos en 20 ml de diclorometano obteniéndose un precipitado blanco al que se le adicionan 4 mmol de carbonato de potasio. Se deja durante una hora a temperatura ambiente obteniéndose un sólido blanco. Se filtra en tierras diatomeas y se evaporan las aguas madres obteniendo un precipitado blanco.



- Disolución octanol: 100 ml de octanol.

Se dejan agitando durante 72 horas en un matraz para saturar ambas fases. Se centrifugan y se separan las fases.

Para el estudio de los compuestos, se mezcla 1 mg del compuesto con 4 ml de fase orgánica y 4 ml de fase acuosa. Se agitan en el baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se centrifugan para separar ambas fases. Se realiza el espectro de absorbancia en el espectrofotómetro de UV de cada una de las fases.

#### **4.3.2. Preparación de las disoluciones para las medidas de estabilidad**

Se preparan disoluciones de los compuestos en DMSO de concentración 10–20 mM, procurando que queden bien disueltas. A partir de esta se prepara una disolución  $10^{-4}$  M en PBS. Se adicionan 50 µl de la disolución preparada y se enrasa con 10 ml de PBS, realizando la primera medida. Posteriormente se incuban en un baño a 37 ° y se repiten las medidas a diferentes intervalos de tiempo durante 24 horas. El barrido de longitudes de onda se realiza entre 200 y 800 nm.

### **4.4. Estudio biológico**

#### **4.4.1. Ensayo MTT**

Se preparan 5 tubos eppendorf de cada compuesto, con una cantidad determinada de DMEM completo (DMEM + 5% suero fetal bovino +1mM Gln + Penicilina/Estreptomicina) y del compuesto.

En cada tubo hay 500 µl de medio de cultivo. Se adiciona 20 µl de una disolución de 5 mM de cada compuesto al primer tubo. De ese tubo adicionan 500 µl al siguiente tubo, repitiendo este proceso con cada tubo. De forma que se obtienen distintas concentraciones de cada compuesto 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µM con 500 µL de medio de cultivo.

Se añade en cada pocillo 100 µL de disolución de los compuestos donde había previamente 100 µL de células, reduciéndose la concentración del compuesto a la mitad.

Una fila de las filas se reserva para el control, donde habrá medio de cultivo y otra para el blanco, donde se adiciona 200 µL de DMEM completo. Se dejan las placas durante 24 h incubando a 37°. Se añaden 10 µl de MTT de concentración 5 mg/ml y se deja incubar durante dos horas. Se elimina el medio de cultivo por inversión sobre un papel y se adicionan 100 µl de DMSO. Se agitan 1 minutos las placas y se mide la absorbancia a 550 nm en un lector de placas.

#### **4.4.2. Test de Ames**

Se toma 1 ml de cultivo de E. coli WP2 crecido en LB y se centrifuga durante un minuto. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de suero fisiológico estéril. Se toma 500 µl de cultivo de E. coli WP2 crecido en LB y se centrifuga durante 1 min a 10000 rpm. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500 µl de suero fisiológico (PBS) estéril.

En 3 tubos eppendorf estériles, se adicionan 100 µl del cultivo de E. coli WP2 lavado en el paso. En uno de ellos, se añade 100 µl de agua estéril como control y en otro 100 µl de MMS como control positivo y en el último 100 µl del compuesto. Se vierte sobre la placa el contenido del eppendorf compuesto por el cultivo de E. coli y el compuesto y 2 ml de agar blando mínimo suplementado con triptófano (0,05 mM), precalentado a 45°C. Se deja distribuir el agar blando uniformemente, dejando solidificar sin voltear la placa. Se incuban las placas a 37°C durante 48 h. Tras este tiempo se procede a realizar el conteo de colonias.

#### 4.4.3. Marcaje y visualización de núcleos mediante fluorescencia

El ensayo se realiza en una placa de seis pocillos en la que hay un cubreobjetos sobre el que se han sembrado células adherentes de HeLa. A través de los resultados obtenidos en el ensayo MTT se decide añadir un volumen de compuesto al pocillo igual a 1,2  $\mu$ l (para añadir una concentración de 5  $\mu$ M en 3 ml a partir de una disolución de 5 mM). Se deja incubar 24 horas. Se añaden a los pocillos 3  $\mu$ l de Hoeschst 33342 (2 mg/ml) y se esperan 15 minutos. Se recupera el cubre con la ayuda de pinzas y se deja secando sobre papel de filtro. Se cogen dos portas y se identifica el compuesto que se va a poner en cada lugar. Posteriormente, se añade una gota (40  $\mu$ l) de Fluoromount-G en el portaobjetos, esta sustancia evita el quenching. Una vez eliminado el exceso de líquido, se sitúan los cubreobjetos sobre las gotas del portaobjetos de forma que las células queden en contacto con la gota. Se dejan incubar a temperatura ambiente durante una hora. Se observan las células en el microscopio de fluorescencia.

### 5. CONCLUSIONES

1. Hemos puesto a punto un procedimiento para la síntesis de 2-hidroxi-chalconas y chalconas alquiladas con bromuro de propargilo para una variedad de sustituyentes. El empleo de las diversas técnicas espectroscópicas tales como espectroscopia IR y espectroscopia RMN que incluye experimentos mono y bidimensionales, nos ha permitido realizar una completa caracterización de ambas familias de ligandos.
2. La desprotonación de la unidad alquino de las chalconas alquiladas y posterior reacción con derivados de oro(I) ha dado lugar a la preparación de 10 nuevos complejos metálicos al producirse la coordinación de unidades oro-fosfina y oro-carbeno al carbono del alquino terminal. La adecuada elección del medio básico ha permitido en el caso de los complejos con AuPPh<sub>3</sub> evitar la presencia de mezclas de productos debido a un probable equilibrio entre productos de partida y productos finales.
3. En todos los complejos se ha demostrado mediante el coeficiente de reparto que presentan un carácter lipofílico adecuado para realizar ensayos in vitro sobre células cancerosas.
4. Todos los complejos se pueden considerar relativamente estables en condiciones fisiológicas tras su incubación a 37 °C durante 24 h. Los complejos de carbeno parecen más estables que los de PTA ya que en los espectros de visible-UV de estos se produce la desaparición de alguna banda en las primeras horas apuntando que hay reactividad en disolución acuosa.
5. Se ha estudiado la citotoxicidad respecto a células HeLa de los complejos de PTA mediante un ensayo MTT, obteniéndose resultados prometedores. Además, dichos complejos son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis, sin producir efectos mutagénicos sobre el DNA.

### 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, *Cancer statistics*, **2015**.
2. J. Yellol, S.A. Perez, A. Buceta, G. Yellol, A. Donaire, P. Szumlas, P.J. Bednarski, G. Makhoulfi, C. Janiak; A. Espinosa, J. Ruiz, *Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure-Activity Relationship Study. J. Med. Chem.* **2015**, 58, 7310-7327.
3. B. Rosenberg, *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer Drug*, 1999, 4, 3.

4. B. Rosenberg, *Cancer*. **1985**, 55, 2303-2314.
5. A. A. Argyriou, P. Polychronopoulos, G. Iconomou, E. Chroni and H. P. Kalofonos, *Cancer Treat. Rev.* **2008**, 34, 368–377.
6. R.Koch, *An address on bacteriological research* 3. **1890**, 309, 199-210.
7. R.V.Parish and SM. Cottrill, *Gold Bull.* , **1987**, 20, 827.
8. Aditya Narayan Pande, Subhankar Biswas, Neetinkumar D. Reddy, B.S. Jayashree, Nitesh Kumar, C. Mallikarjuna Rao *In vitro and in vivo anticancer studies of 2'hydroxy chalcone derivates exhibit apoptosis in col on cancer cells by HDAC inhibition and cell cycle arrest.* **2017**, 16, 448-463.
9. E.R.T. Tieknik, *Phosphinegold(I) Thiolates Pharmacological Use and Potential*, *Bioinorg. Chem.Appl.* **2003**, 1, 53.
10. Teplova, V. V.; Isakova, E. P.; Klein, O. I.; Dergachova, D. I.; Gessler, N. N.; Deryabina, Y. I. *Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review).* *Appl. Biochem. Microbiol.* **2018**, 54, 221-237.
11. Mirossay, L.; Varinska, L.; Mojzis, J. *Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update.* *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19.
12. Raffa, D.; Maggio, B.; Raimondi, M. V.; Plescia, F.; Daidone, G. *Recent discoveries of anticancer flavonoids.* *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 142, 213-228.
13. Debarshi Kar Mahapatra, Sanjay Kumar Bharti, Vivek Asati. *Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives*, *Eur J Med Chem.* **2015**, 98, 69-114.
14. Chairil Anwar, Yogo Dwi Prasetyo, Sabirin Matsjeh, Winarto Haryadi, Eti Nurwening Sholikhah, and Nendrowati. *Synthesis of Chalcone Derivatives and Their in vitro Anticancer Test against Breast (T47D) and Colon (WiDr) Cancer Cell Line.* **2018**, 18, 102-107.
15. Robinson, T.P., Hubbard, IV, R.B., Ehlers, T.J., Arbiser, J.L., Goldsmith, D.J., and Bowen, J.P., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4007–4013.
16. Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G., *Approaching tumour therapy beyond platinum drugs Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates.* *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 106 (1), 90-99.
17. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M., *S-Propargylthiopyridine Phosphane Derivatives As Anticancer Agents: Characterization and Antitumor Activity.* *Organometallics* **2013**, 32 (13), 3710-3720.
18. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Atrian-Blasco, E.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M., *Gold(I) complexes with alkylated PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) phosphanes as anticancer metallodrugs.* *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 79, 164-172.
19. García-Moreno, E.; Cerrada, E.; Bolsa, M. J.; A. Luquin; Laguna, M., *Water-Soluble Phosphanes Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane and Their Reactivity towards Gold(I) Complexes.* *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 2020-2030.
20. Liu, W. K.; Gust, R. *Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor Metallodrugs.* *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 329, 191-213.
21. Ott, I. *On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs.* *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 1670-1681.
22. Yan-Lei Zhang, Yong-Qiang Wang. *Enantioselective biomimetic cyclization of 20-hydroxychalcones to flavanones.* **2014**.
23. Visbal, R.; Laguna, A.; Gimeno, M. C., *Simple and efficient synthesis of MCl(NHC) (M = Au, Ag) complexes.* *Chemical Communications* **2013**, 49 (50), 5642-5644.