

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Escuela de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología**

**Unidad Valle de las Palmas**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS DE Cu(II) Y Ni(II)  
DERIVADOS DE PIRAZOLES Y BIS (IMINO) PIRIDINAS**

Tesis que para obtener el título de:

**BIOINGENIERO**

Presenta:

**Alan Saúl Álvarez Suarez**

Directora de Tesis:

**Ana Leticia Iglesias**

**Tijuana, B.C**

**25 de Septiembre, 2017**

Al Tiempo. A la Vida. Al Universo.

A todos aquellos curiosos apasionados cuyo nombre se desconoce o fue olvidado, aquellos que permiten el progreso del conocimiento gracias a su ignorancia consciente.

A mis padres y familiares,

Por haber sido los arquitectos de mis cimientos y por haber contribuido indirectamente en este escrito al haberme ayudado a convertirme en la persona que soy.

A todos mis maestros y tutores,

Por haberme enseñado muchas de las cosas que se y por ser guías en mi desarrollo profesional y consejeros en mi desarrollo personal

A mis amigos y compañeros,

Por su apoyo y enseñanzas, por sus consejos, por todos los momentos, por su ayuda, su amor y paciencia, por su presión, por su presencia y por su mera existencia.

A ti,

Por haberte tomado el tiempo de leer unas líneas completamente ajenas al contenido de esta Tesis y por tu interés y/o curiosidad en los temas desarrollados en las páginas siguientes.

Que la curiosidad te lleve lejos.

## Índice

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                      | <b>6</b>  |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                       | <b>8</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                            | <b>9</b>  |
| <b>OBJETIVO GENERAL .....</b>                                       | <b>12</b> |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>                                  | <b>12</b> |
| <b>CAPÍTULO 1   MARCO TEÓRICO.....</b>                              | <b>13</b> |
| <b>1.1 Introducción a los pirazoles.....</b>                        | <b>14</b> |
| 1.1.1 Ligantes heterocíclicos .....                                 | 16        |
| 1.1.2 Compuestos de coordinación .....                              | 16        |
| <b>1.2 Bioactividad de los complejos basados en pirazoles .....</b> | <b>18</b> |
| 1.2.1 Anticancerígenos.....                                         | 18        |
| 1.2.2 Antibióticos. ....                                            | 19        |
| 1.2.3 Antiglucémicos. ....                                          | 20        |
| <b>1.3 Otras aplicaciones. ....</b>                                 | <b>21</b> |
| 1.3.1 Antioxidantes:.....                                           | 21        |
| 1.3.2 Inhibidores del Virus de la Hepatitis C (HCV):.....           | 22        |
| 1.3.3 Antagonistas de los canales de Sodio (Na):.....               | 22        |
| 1.3.4 Inhibidores de la Osteoclastogénesis: .....                   | 23        |
| <b>1.4 Hipótesis .....</b>                                          | <b>23</b> |
| <b>CAPÍTULO 2   MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                       | <b>24</b> |
| <b>2.1 Materiales.....</b>                                          | <b>25</b> |
| 2.1.1 Ligantes .....                                                | 25        |
| 2.1.2 Iones metálicos y solventes .....                             | 25        |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.2 Metodología experimental .....</b>                                    | <b>26</b> |
| 2.2.1 Síntesis de complejos .....                                            | 26        |
| 2.2.2 Extracción de las fases solidas .....                                  | 28        |
| 2.2.3 Determinación de punto de fusión. ....                                 | 29        |
| 2.2.4 Caracterización mediante FTIR/ATR .....                                | 31        |
| 2.2.5 Prueba biológica de actividad antimicrobiana .....                     | 32        |
| 2.2.6 Ensayo citotóxico $CI_{50}$ con células HCT116 de cáncer de colon..... | 34        |
| <br><b>CAPÍTULO 3   RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                          | <b>36</b> |
| <br><b>3.1 Caracterización.....</b>                                          | <b>37</b> |
| 3.1.1.1 Productos del ligante 1 + $CuCl_2$ .....                             | 37        |
| 3.1.1.2 Productos del ligante 1 + $NiCl_2$ .....                             | 39        |
| 3.1.1.3 Productos del ligante 1 + Triflato de Cobre (II) .....               | 41        |
| 3.1.1.4 Productos del ligante 2 + $CuCl_2$ .....                             | 44        |
| 3.1.1.5 Productos del ligante 3 + $CuCl_2$ y Triflato Cobre (II).....        | 46        |
| 3.1.2 Prueba de solubilidad .....                                            | 49        |
| 3.1.3 Rendimiento de reacción .....                                          | 50        |
| 3.1.4 Espectroscopia UV-Vis .....                                            | 51        |
| 3.1.5 Punto de fusión .....                                                  | 55        |
| <br><b>3.2 Análisis antimicrobiano .....</b>                                 | <b>57</b> |
| 3.2.1 Interpretación de las tablas de resultados .....                       | 57        |
| 3.2.5 Discusión de los resultados de inhibición.....                         | 60        |
| <br><b>3.3 Ensayo de Citotoxicidad .....</b>                                 | <b>63</b> |
| <br><b>CONCLUSIONES. ....</b>                                                | <b>65</b> |
| <b>EXPERIMENTAL .....</b>                                                    | <b>66</b> |
| <b>REFERENCIAS .....</b>                                                     | <b>70</b> |

## Índice de Figuras

|                    |                                                                                                                                      |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b>  | Diversidad estructural de heterociclos en el grupo de los azoles.....                                                                | 14 |
| <b>Figura 1.2</b>  | Configuraciones reducidas del anillo de pirazol, pirazolina y pirazolidina.....                                                      | 14 |
| <b>Figura 1.3</b>  | Moléculas isométricas, 3-metilpirazol y 5-metilpirazol.....                                                                          | 14 |
| <b>Figura 1.4</b>  | Estructura química de fármacos comerciales que contienen el anillo de pirazol<br>Celebrex, Sildenafil, Rimonabant y Difenamizol..... | 15 |
| <b>Figura 1.5</b>  | Estructura general del ligante Bis (imino) piridina.....                                                                             | 17 |
| <b>Figura 1.6</b>  | dichloro-bis (pyrazole) platinum (II), complejo con actividad citotóxica mayor a<br>cisplatino, reportado por Keter et al.....       | 19 |
| <b>Figura 1.7</b>  | Complejos sintetizados por Kumar S. et al. Con actividad antimicrobiana.....                                                         | 20 |
| <b>Figura 1.8</b>  | Complejos de Cu(II) reportados en la literatura con actividad antioxidante.....                                                      | 21 |
| <b>Figura 1.9</b>  | Complejo de pirazol trisustituído como inhibidor del HCV.....                                                                        | 22 |
| <b>Figura 1.10</b> | Compuesto reportado como tratamiento del dolor neuropático.....                                                                      | 23 |
| <b>Figura 1.11</b> | Compuesto inhibidor de la proliferación y diferenciación de osteoclastos.....                                                        | 23 |
| <b>Figura 2.1</b>  | Estructura del ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole de Aldrich.....                                                                      | 25 |
| <b>Figura 2.2</b>  | Equipo de secado al vacío para muestras sensibles al agua.....                                                                       | 29 |
| <b>Figura 2.3</b>  | Representación de las fases del compuesto en el bloque del fusionómetro.....                                                         | 30 |
| <b>Figura 2.4</b>  | Equipo de espectrofotometría de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum Two®.....                                                           | 32 |
| <b>Figura 2.5</b>  | Complejos disueltos en DMSO a una concentración de 10 mg/ml.....                                                                     | 32 |
| <b>Figura 2.6</b>  | Disposición de pozos en una microplaca.....                                                                                          | 33 |
| <b>Figura 3.1</b>  | Espectro FTIR del complejo 1-Cu-1.....                                                                                               | 37 |

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.2</b> Espectro FTIR del complejo 1-Cu-2.....                                                                                                                                    | 37 |
| <b>Figura 3.3</b> Espectro FTIR de 1-Cu-3.....                                                                                                                                              | 38 |
| <b>Figura 3.4</b> Comparación de espectros FTIR de complejos de A + CuCl <sub>2</sub> .....                                                                                                 | 38 |
| <b>Figura 3.5</b> Espectro de infrarrojo de 1-Ni-1.....                                                                                                                                     | 39 |
| <b>Figura 3.6</b> Espectro FTIR de la muestra 1-Ni-2.....                                                                                                                                   | 40 |
| <b>Figura 3.7</b> Comparación de espectros de FTIR de 1-Ni-1 y 1-Ni-2 con 1.....                                                                                                            | 40 |
| <b>Figura 3.8</b> Espectro de FTIR del complejo 1-Tf-1.....                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Figura 3.9</b> Espectro de infrarrojo del compuesto 1-Tf-2.....                                                                                                                          | 42 |
| <b>Figura 3.10</b> Comparación de espectros de los complejos 1-Tf-1 y 1-Tf-2 con 1.....                                                                                                     | 42 |
| <b>Figura 3.11</b> Espectro FTIR del complejo 2-Cu-1.....                                                                                                                                   | 44 |
| <b>Figura 3.12</b> Espectro de infrarrojo del compuesto 2-Cu-2.....                                                                                                                         | 44 |
| <b>Figura 3.13</b> Espectro de FTIR de 2-Cu-3.....                                                                                                                                          | 45 |
| <b>Figura 3.14</b> Comparación de espectros de FTIR de los complejos de 2 + CuCl <sub>2</sub> .....                                                                                         | 45 |
| <b>Figura 3.15</b> Espectro de infrarrojo del complejo 3-Cu.....                                                                                                                            | 46 |
| <b>Figura 3.16</b> Espectro FTIR del compuesto 3-Tf.....                                                                                                                                    | 47 |
| <b>Figura 3.17</b> Comparación de espectros de 3-Cu y 3-Tf con el ligante 3.....                                                                                                            | 47 |
| <b>Figura 3.18</b> Transiciones de electrones en espectroscopia UV/Vis.....                                                                                                                 | 51 |
| <b>Figura 3.19</b> Estructura de los ligantes “B” y “C”. Estructura propuesta para complejos<br>resultantes de la reacción del ligante “A” con CuCl <sub>2</sub> donde R es el ligante..... | 56 |
| <b>Figura 3.20</b> Estructura química de la gentamicina.....                                                                                                                                | 58 |
| <b>Figura 3.21</b> Escala de interpretación de los resultados de inhibición bacteriana.....                                                                                                 | 58 |

## Índice de Tablas

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 2.1</b> Nomenclatura asignada a compuestos.....                                                             | 27 |
| <b>Tabla 2.2</b> Nombres y combinaciones de complejos evaluados.....                                                 | 27 |
| <b>Tabla 3.1</b> Picos de absorción de IR de muestras del ligante 1 con CuCl <sub>2</sub> .....                      | 39 |
| <b>Tabla 3.2</b> Picos de absorción de IR de muestras de 1 con NiCl <sub>2</sub> .....                               | 41 |
| <b>Tabla 3.3</b> Picos de absorción de IR de muestras de 1 con Triflato de Cobre (II).....                           | 43 |
| <b>Tabla 3.4</b> Picos de absorción de IR de muestras de 2 con CuCl <sub>2</sub> .....                               | 46 |
| <b>Tabla 3.5</b> Picos de absorción de IR de muestras de 3 con CuCl <sub>2</sub> y Triflato de Cobre (II).....       | 48 |
| <b>Tabla 3.6</b> Picos de absorción característicos de los ligantes.....                                             | 48 |
| <b>Tabla 3.7</b> Resultados de las pruebas de solubilidad.....                                                       | 49 |
| <b>Tabla 3.8</b> Rendimiento porcentual de reacciones de síntesis de los compuestos.....                             | 50 |
| <b>Tabla 3.9</b> Absorciones características de los complejos sintetizados.....                                      | 53 |
| <b>Tabla 3.10</b> Absorciones características de ligantes.....                                                       | 54 |
| <b>Tabla 3.11</b> Resumen de temperaturas de fusión.....                                                             | 56 |
| <b>Tabla 3.12</b> Resultados de concentración mínima inhibitoria (MIC) para los compuestos<br>evaluados.....         | 59 |
| <b>Tabla 3.13</b> Resultados condensados expresados en porcentajes de inhibición de los compuestos<br>evaluados..... | 60 |
| <b>Tabla 3.14</b> Principales mecanismo de acción de grupos de antimicrobianos representativos.....                  | 62 |
| <b>Tabla 3.15</b> Resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad sobre células HCT-116.....                        | 63 |
| <b>Tabla 3.16</b> Principales mecanismos de acción y anticancerígenos representativos.....                           | 64 |

## Introducción

La creciente demanda por nuevos antibióticos debido a la mutación de cepas bacterianas que las hace resistentes a los tratamientos actuales, y la carencia de tratamientos quimioterapéuticos efectivos con baja toxicidad sistémica y un amplio espectro de acción sobre células cancerígenas, crean la necesidad de explorar las diferentes cualidades biológicas de compuestos novedosos. Para este estudio, se analizó la actividad de compuestos basados en pirazoles, así como sus complejos de coordinación.

El amplio espectro de propiedades terapéuticas que poseen los fármacos relacionados con los pirazoles ha atraído la atención de científicos para sintetizar una gran cantidad de agentes quimioterapéuticos. Existen numerosas ventajas en utilizar pirazoles y sus derivados como farmacoporo, ya que se pueden lograr una gran cantidad de propiedades farmacológicas acompañadas con un buen perfil de seguridad [1]. Los pirazoles están presentes en una amplia variedad de fármacos líderes en el mercado, son conocidos por poseer muchas aplicaciones, entre las que destacan su actividad anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiglicémica, analgésica, antipirética, antioxidante y antiviral.

Debido a la actividad biológica intrínseca que poseen estos compuestos, se sintetizaron complejos con potencial farmacológico. Las moléculas organometálicas, con un metal en su núcleo, suelen poseer una carga positiva que les permite unirse a las bio-moléculas negativamente cargadas, convirtiendo en excelentes blancos a las proteínas y a los ácidos nucleicos. De esta manera, se busca aumentar la actividad biológica que alguno de estos complejos pueda poseer. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la actividad biológica de compuestos de coordinación de Cu(II) y Ni(II) basados en ligantes derivados de pirazoles y bis (imino) piridinas para establecer los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) para tres cepas bacterianas distintas Gram positivas y Gram negativas presentes en el cuerpo humano, pero que pueden llegar a causar infecciones (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*); así como la caracterización de los compuestos mediante técnicas espectroscópicas.

Inicialmente, fue necesario inicialmente disolver los ligantes e iones metálicos (cloruro cúprico, cloruro de níquel hexahidratado y triflato de cobre (II)) individualmente en solventes apropiados para cada uno. Se evitó usar solventes cuyo punto de ebullición fuese muy alto (mayor a 100°C) ya

que podrían representar un problema al momento de la extracción de las fases sólidas de los complejos. Las soluciones se ajustaron a distintas relaciones estequiométricas, modificando la relación molar del ligante con respecto a la sal metálica. Para llevar a cabo la reacción, las soluciones del ligante y el ion metálico se transfirieron a un vial y se agitaron el tiempo suficiente para que se formara un precipitado o se observara un cambio de color o de transparencia, los cuales son indicadores de la formación de un complejo. Posteriormente, se secó el solvente y se lavaron con etanol un par de veces, antes de eliminar completamente los solventes usando una línea de secado al vacío o un equipo de rotavapor. En este punto, los complejos limpios y completamente secos fueron sometidos a pruebas de caracterización y evaluación farmacológica.

Tras la caracterización fisicoquímica, los compuestos demostraron poseer un punto de fusión relativamente elevado y una baja solubilidad en la mayoría de los solventes, los resultados de espectroscopia de FTIR-ATR y UV-Vis demostraron el cambio en los grupos funcionales de los ligantes al coordinarse con los distintos metales utilizados.

Los compuestos evaluados en el análisis de bioinhibición demostraron poseer una actividad mayor hacia bacterias Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) en comparación con la línea bacteriana Gram positiva utilizada durante el estudio (*S. aureus*) destacando el compuesto 1-Cu-1 al poseer una actividad superior a la presentada por el antibiótico de control, gentamicina. La mayoría de los ligantes por su propia cuenta presentaron una actividad de inhibición mucho más alta que sus complejos con metales ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  y  $\text{TfCu(II)}$ ), destacando los ligantes 2, 3 y 4. En los resultados de la prueba de citotoxicidad, resaltaron el ligante 5 y el compuesto 4-Cu, ya que requirieron una concentración igual o menor que el anticancerígeno control, Etopósido, para prevenir el crecimiento de al menos el 50% de las células.

Se descubrió que tanto los complejos como sus ligantes tienen el potencial de ser de interés farmacológico debido a sus distintas características de bioactividad, se observaron diferencias notables en la actividad de bioinhibición tanto de bacterias como de células cancerígenas entre los ligantes solos y sus complejos con las sales metálicas. En el caso de los ligantes 2, 3 y 4 presentaron una actividad citotóxica mayor que sus complejos. Caso contrario para el ligante 1, el cual demostró un aumento de potencial inhibitorio con la presencia del metal. Estudios posteriores tienen el potencial de explicar los mecanismos de reacción y estructura de los compuestos con actividad biológica destacada reportados en este trabajo.



## Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de ligantes derivados de pirazoles y bis (imino) piridinas, así como sus compuestos de coordinación con metales como el Cu(II) y Ni(II), estableciendo valores de concentración mínima inhibitoria para tres cepas bacterianas distintas e índice de citotoxicidad media (IC<sub>50</sub>) en células cancerígenas; así como caracterizar dichos compuestos mediante técnicas espectroscópicas.

## Objetivos Específicos

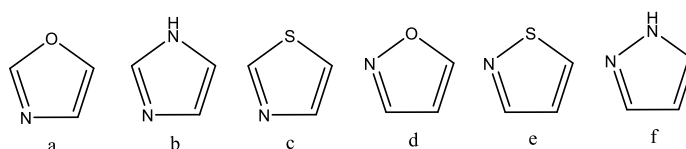
- Sintetizar una variedad de complejos metálicos utilizando ligantes basados en pirazoles y bis (imino piridinas).
- Caracterizar los complejos mediante FTIR y UV-Vis.
- Realizar pruebas de evaluación de actividad antimicrobiana utilizando tres cepas bacterianas distintas y un antibiótico comercial como control positivo.
- Calcular los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) para los diferentes ligantes y sus complejos metálicos.
- Comparar la actividad biológica de los ligantes contra sus complejos mediante el análisis de los resultados de los ensayos antimicrobianos.
- Realizar pruebas de actividad anticancerígena utilizando la línea celular HCT-116.
- Calcular los valores de índice de citotoxicidad media (IC<sub>50</sub>) para los diferentes ligantes y complejos metálicos.
- Comparar la actividad biológica de los ligantes contra sus complejos mediante el análisis de los resultados de los ensayos de citotoxicidad.
- Analizar la influencia del metal sobre la bioactividad de los compuestos.
- Identificar los compuestos cuya bioactividad los posicione como sustancias de interés biológico.

## Capítulo 1 | Marco Teórico

---

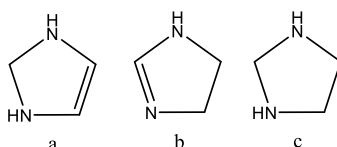
## 1.1 Introducción a los pirazoles

Los azoles son compuestos heterocíclicos que en su mayoría se derivan del furano, pirrol y tiofeno por sustitución de uno o más grupos CH por átomos de N con hibridación  $sp^2$ . Las diferentes combinaciones entre la cantidad y la posición de los átomos sustituidos dan lugar a una gran variedad de sistemas anulares, entre los cuales destacan el oxazol (1.1a), imidazol (1.1b), tiazol (1.1c), isoxazol (1.1d), isotiazol (1.1e) y el heterociclo de interés en este trabajo, el pirazol (1.1f) [2].



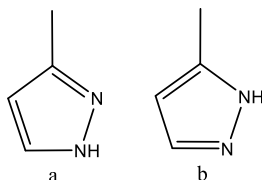
**Figura 1.1** Diversidad estructural de heterociclos en el grupo de los azoles.

Los pirazoles pertenecen a la familia de los 1,2-azoles y son una clase importante de compuestos heterocíclicos de cinco miembros, contienen dos enlaces dobles y dos átomos de nitrógeno adyacentes uno al otro en su anillo. Las formas parcialmente reducidas de los pirazoles (1.2a y 1.2b) se denominan pirazolinas, mientras que la forma completamente reducida se le denomina pirazolidina (1.2c) [2].



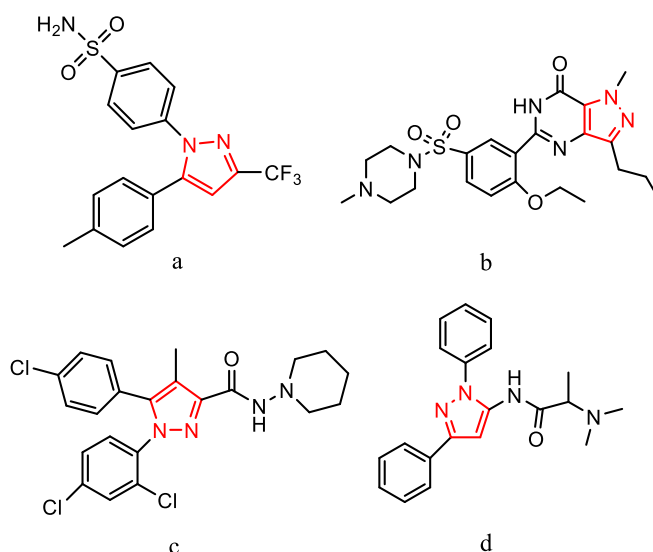
**Figura 1.2** Configuraciones reducidas del anillo de pirazol, pirazolina (a, b) y pirazolidina (c).

El pirazol es el compuesto con más altos puntos de fusión y ebullición de la familia de los 1,2-azoles ( $68^{\circ}\text{C}$  y  $187^{\circ}\text{C}$ , respectivamente), exhibe un rápido tautomerismo, lo que facilita la conversión de isómeros estructurales en las posiciones 3 y 5 (figura 1.3) [2].



**Figura 1.3** Moléculas isométricas, 3-metilpirazol (a) y 5-metilpirazol (b).

Esta clase de heterociclos nitrogenados no son comúnmente encontrados en la naturaleza, posiblemente por la dificultad que representa construir un enlace N-N en un organismo vivo [3], a pesar de eso, muchos derivados sintéticos poseen una posición excepcional en el desarrollo de medicamentos y pesticidas debido a sus diversas actividades biológicas. El anillo de pirazol está presente en una amplia variedad de fármacos líderes en el mercado, tales como Celebrex (1.4a), Sildenafil (1.4b), Rimonabant (1.4c) y Difenamizol (1.4d) entre otros. Son compuestos conocidos por poseer muchas aplicaciones, entre las que destacan su actividad anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiglicémica, analgésica, antipirética, antioxidante y antiviral [4].



**Figura 1.4** Estructura química de fármacos comerciales que contienen el anillo de pirazol (resaltado en rojo) Celebrex (a), Sildenafil (b), Rimonabant (c) y Difenamizol (d)

Los pirazoles poseen una historia ilustre; en 1883, un químico alemán llamado Ludwig Knorr fue el primero en descubrir la acción antipirética en humanos de un derivado de pirazol, bautizó al compuesto como antipirina (2,3- dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona). Este compuesto poseía cualidades analgésicas, antipiréticas y antirreumáticas. A partir de entonces y hasta la fecha, el interés en estos compuestos ha aumentado y se han ido descubriendo nuevas estructuras con actividad biológica interesante [4].

El núcleo de pirazol es térmica e hidrolíticamente estable. Cuando este actúa como un ligante, se coordina con metales y metaloides a través de 2-N. Cuando se desprotona, el pirazol se convierte en el ion pirazolina, el cual puede coordinarse a través de ambos átomos de nitrógeno como un

ligante bidentado. A pesar de que el término “bidentado” frecuentemente se relaciona con “quelatos”, no es el caso para el anillo del pirazol, a que estos no pueden formar agentes quelantes [5].

### *1.1.1 Ligantes heterocíclicos*

Un ligante, por definición, es un ion o una molécula neutra o que está directamente adherida al átomo o ion metálico central mediante enlaces de coordinación, como regla general, los ligantes deben poseer pares de electrones libres que puedan ceder al átomo o ion metálico central para formar el enlace covalente de coordinación; los ligantes se consideran como bases de Lewis, mientras que los iones metálicos centrales actúan como ácidos de Lewis. Existen tres tipos de ligantes, los ligantes monodentados (aquellos que solo tiene un átomo donador), los ligantes bidentados (que poseen dos átomos donadores) y los ligantes polidentados (los cuales pueden ser tri, tetra, penta, exadentados, etc.) [6].

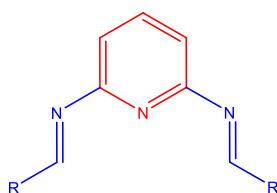
Los compuestos bidentados y tridentados nitrógeno-heterocíclicos de seis miembros, tales como 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina y 2,2':6',2''-terpiridina han sido extensivamente usados en química de metales de transición; La característica clave de estos heterociclos es su deficiencia de electrones  $\pi$ , por lo tanto, se comportan como excelentes aceptores  $\pi$  y proveen sitios para la coordinación de metales. Por otro lado, los anillos heterocíclicos de 5 miembros, pirazoles, son  $\pi$ -excesivos, lo que los convierte en pobres aceptores de electrones  $\pi$ ; de hecho, los pirazoles son mejores donadores de electrones  $\pi$ . Una situación muy curiosa sucede cuando un heterociclo de seis miembros, tal como la piridina, se une directamente en un sistema de ligando con un heterociclo de 5 miembros como el pirazol. Los complejos de dichos ligantes dan lugar a propiedades electrónicas significativamente distintas [7].

### *1.1.2 Compuestos de coordinación*

Las propiedades de compuestos de coordinación unidos a elementos metálicos, ya sea en complejos de coordinación inorgánicos clásicos o en compuestos organometálicos están determinadas en gran manera por la naturaleza de los ligantes unidos al ion metálico [7]. La adición de iones metálicos en posiciones estratégicas de una molécula puede ser una herramienta poderosa y versátil en la elaboración de moléculas con actividad biológica, ya que puede influenciar drásticamente las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de la molécula, potenciando el transporte y

absorción de la misma en el cuerpo. Esto se debe a la habilidad de los metales para influenciar las propiedades electrónicas de los complejos resultantes cuando se unen a fragmentos orgánicos; generalmente mejorando la relevancia terapéutica del compuesto [8].

Las bases de Schiff son un tipo de grupo funcional que estructuralmente son homólogos a los aldehídos o las cetonas, sin embargo, en estos grupos, el grupo carbonilo ( $C=O$ ) se reemplaza por un grupo imino; estos compuestos son producto de la condensación de aminas primarias y compuestos carbonílicos. Los ligantes tipo base de Schiff son especialmente importantes en el campo de la química de coordinación, ya que estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos estables con iones metálicos [9]. Los ligantes Bis (imino) son compuestos que pertenecen al grupo de las diiminas, que como su nombre lo indica, son compuestos orgánicos que contienen dos grupos imino en su estructura, de la forma  $RCH=NR'$ . Se nombran como Bis (imino) piridina (fig. 1.5), a los ligantes que contienen una piridina en su estructura. Los compuestos que poseen una piridina unida a un sistema heterocíclico son de importancia en química natural y en síntesis orgánica; las sales de piridinas han sido utilizadas como agente acilantes, como catalizadores y como agentes antimicrobianos [10]. Los ligantes Bis (imino) son atractivos debido a su gran capacidad de coordinación debido a dos átomos donadores (N, N) y al hecho que pueden ser fácilmente ensambladas de compuestos disponibles comercialmente, como el *trans* 1,2-ciclohexanediamina (enantiomericamente puro) y una variedad de aldehídos precursores, esto permite el ajuste electrónico del centro metálico y la manipulación del efecto estérico [11].



**Figura 1.5** Estructura general del ligante Bis (imino) piridina, resaltados los grupos imino (azul) y la estructura de la piridina (rojo), donde R pueden ser otras moléculas.

## 1.2 Bioactividad de los complejos basados en pirazoles

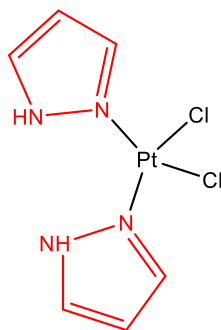
### 1.2.1 *Anticancerígenos.*

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años [12].

Los complejos con actividad anticancerígena pueden ser trazados hasta el imprevisto descubrimiento del cisplatino realizado por Rosenberg y su equipo en la década de los 60's [13]; el cisplatino es una molécula sencilla que posee una excelente actividad en contra de varios tipos de cáncer, sin embargo; su elevada toxicidad es una preocupación constante y hace que su uso sea limitado a causa de sus efectos secundarios, los cuales incluyen nefrotoxicidad, náusea y vómito; por esta razón se continúa con la investigación de compuestos nuevos que sean menos tóxicos, y que imiten la actividad del cisplatino. Además, el desarrollo de tumores fármaco-resistentes es un problema común cuando se sigue un tratamiento de cisplatino, de esto surge la necesidad de crear nuevos fármacos que superen estas limitaciones [14].

El cisplatino fundó la base del diseño de fármacos con actividad anticancerígena. Generalmente, moléculas organometálicas con un metal en su núcleo, tales como el cisplatino poseen una carga positiva que les permite unirse a las bio-moléculas negativamente cargadas, convirtiendo en excelentes blancos a las proteínas y a los ácidos nucleicos [15]. Tradicionalmente, los fármacos de quimioterapia ejercen sus efectos citotóxicos al inducir la apoptosis indirectamente, como resultado de un daño al ADN [16].

Complejos basados en el anillo de pirazol con una estructura similar al cisplatino (fig. 1.6) poseen el potencial de ser utilizados como agentes anticancerígenos. Se ha demostrado que la reactividad de los complejos es dependiente de la estereoquímica del ligando que se adhiere al ion metálico, la variación de estos ligantes puede ofrecer mejoras en la bioactividad del compuesto [14].



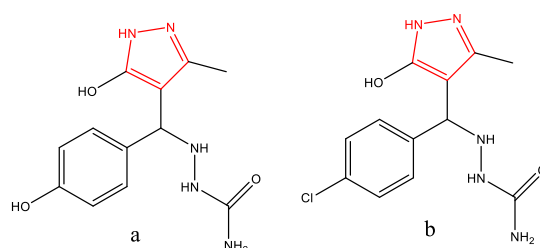
**Figura 1.6** Dichloro-bis (pyrazole) platinum (II), complejo de pirazol (rojo) con actividad citotóxica mayor a cisplatino, reportado por Keter et al. [14].

### 1.2.2 Antibióticos.

Los antibióticos y otros medicamentos similares, conocidos en conjunto como agentes antimicrobianos, han sido utilizados durante los últimos 70 años para tratar pacientes con enfermedades infecciosas. Desde la década de los 40's estos medicamentos han reducido en gran manera las enfermedades y las muertes causadas por infecciones, sin embargo, estos compuestos han sido utilizados tan extensamente y por tanto tiempo que los organismos infecciosos, como bacterias, parásitos, virus y hongos se han adaptados a tolerar los fármacos que deberían atacarlos, convirtiéndolos en un tratamiento menos que efectivo [17].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decretado la resistencia antimicrobiana como una amenaza global a la salud publica presente en todas las regiones del mundo. En 2013, aparecieron alrededor de 480 000 nuevos casos de tuberculosis multi-resistente en 100 países distintos. Existen una gran cantidad de bacterias que causan infecciones comunes (como neumonía, infecciones sanguíneas y del tracto urinario) en todo el mundo. Un gran porcentaje de las infecciones nosocomiales, también conocidas como infecciones intrahospitalarias, son causadas por bacterias altamente resistentes, como la *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) o bacterias Gram-negativas multi-resistentes [18]. Debido a esto, surge la necesidad de crear compuestos que se superpongan a la resistencia generada por estos organismos. [8] Ante esta problemática, investigadores se han dado a la tarea de desarrollar agentes antibacterianos con conceptos novedosos. La síntesis de complejos con un amplio espectro de actividad biológica representa una ventana de posibilidades el desarrollo de moléculas innovadoras que funcionen bajo una variedad de ambientes distintos.

Se han desarrollado compuestos como la 2-((5-hydroxy-3-methyl-1H-pyrazol-4-yl) (4-hydroxyphenyl) methyl) hydrazine-1-carboxamide (fig. 1.7a) que han demostrado tener una actividad en contra de la bacteria Gram-negativa *E. coli* mejor que el antibiótico Ciprofloxacino, el cual requiere una Concentración de Inhibición Media (IC<sub>50</sub>) de 0.5 µg/ml, mientras que con este compuesto se requiere solo una IC<sub>50</sub> de 0.25 µg/ml. De la misma forma, la 2-((4-chlorophenyl) (5-hydroxy-3-methyl-1H-pyrazol-4-yl) methyl) hydrazine-1-carboxamide (fig. 1.7b) demostró actividad contra el hongo *A. Níger* con una zona de inhibición de 24 mm, mejor que el antimicótico Clotrimazol, que demostró una zona de inhibición de solo 22 mm [19].



**Figura 1.7** Complejos con pirazoles sintetizados por Kumar S. et al. [19] Que demostraron actividad antimicrobiana.

### 1.2.3 Antiglucémicos.

La diabetes Mellitus es un desorden metabólico caracterizado por una hiperglucemia crónica; el aumento de glucosa en la sangre viene acompañado de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas como resultado de una disminución o una completa ausencia en la secreción de insulina. Esta enfermedad es una de las más comunes a nivel mundial, afecta a aproximadamente a 200 millones de personas en todo el mundo y otros 300 millones corren el riesgo de padecerla [20].

El método más aceptado para controlar esta enfermedad consiste en mantener los niveles de glucosa en la sangre lo más cercano a los rangos normales como sea posible, esto se logra mediante la inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, enzimas involucradas en la digestión de carbohidratos, lo que reduce considerablemente el incremento de la glucosa postprandial al retrasar el proceso de hidrólisis y absorción. Debido a esto, compuestos inhibidores de estas enzimas pueden representar un tratamiento adecuado para este padecimiento. Algunos de estos inhibidores son la acarbosa y el migitol, estos compuestos inhiben de forma reversible las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, retardando

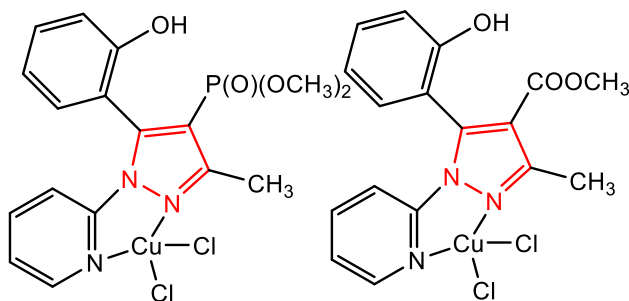
la absorción de carbohidratos y reduciendo la hiperglucemia postprandial. La dosis inicial aconsejada es de 25 al iniciar las comidas y sin masticar. La dosis debe ser aumentada semanalmente para minimizar los efectos secundarios, hasta llegar a la dosis de 300 mg/día, que es la dosis habitual [20].

Se ha demostrado que complejos de pirazol funcionalizados tienen una excelente actividad de inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, comparable con la actividad de la acarbosa, lo que los convierte en fármacos potenciales para el tratamiento de la diabetes [21].

### 1.3 Otras aplicaciones.

#### 1.3.1 Antioxidantes:

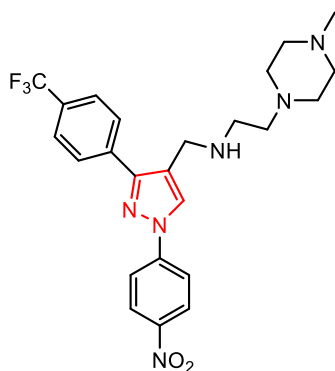
Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  son producidas en las células mediante procesos metabólicos aeróbicos o como resultado de una interacción con agentes exógenos. Pequeñas cantidades de ROS son esenciales para un adecuado funcionamiento celular, pero en mayor cantidad son causantes de lo que se conoce como “estrés oxidativo”, una condición a la que se le han atribuido algunas enfermedades progresivas de la edad. El cobre (II) juega un papel importante en todos los organismos vivos como elemento traza. Debido a la capacidad redox de sistemas  $Cu(II)/Cu(I)$  y la interacción de complejos de cobre con complejos biológicos, se ha estudiado su uso con ligantes biomiméticos basados en el pirazol mostrados en la figura 1.8 se ha demostrado su actividad antioxidante al emular la actividad enzimas que limpian as ROS [22].



**Figura 1.8** Complejos de  $Cu(II)$  reportados en la literatura que presentan actividad antioxidante. La sección del pirazol en el ligante se resalta en rojo.

### 1.3.2 Inhibidores del Virus de la Hepatitis C (HCV):

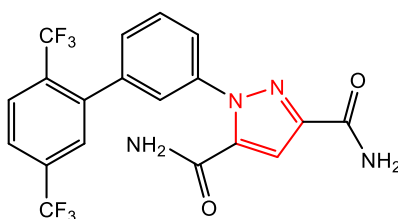
La hepatitis C es una preocupación global, es una enfermedad crónica del hígado que afecta a más del 3% de la población global. Existe una gran diversidad de genotipos del HCV ya que su genoma es muy susceptible a modificaciones durante su replicación. Esto genera un problema al momento de dar un tratamiento. Se ha estudiado la actividad que poseen compuestos con un núcleo de pirazol trisustituído (fig.1.9) como inhibidores efectivos de la replicación del HCV de mediana potencia. La presencia de aminas en las moléculas estudiadas por Whang et al. Demostró ser crucial para la efectividad antiviral de compuestos basados en pirazoles [23].



**Figura 1.9** Complejo de pirazol trisustituído que demostró tener actividad considerable como inhibidor del HCV con un  $EC_{50}=0.11\mu M$ .

### 1.3.3 Antagonistas de los canales de Sodio (Na):

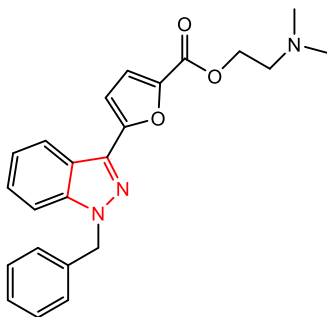
Los bloqueadores de los canales de Sodio han demostrado poseer un papel clave en el tratamiento del dolor neuropático, el cual es causado cuando se produce una herida en el sistema nervioso central o periférico lo que sobre-expresa ciertos subtipos de canales de Na, ( $Na_v 1.7$  y  $Na_v 1.8$ ). Sin embargo, los antagonistas actuales proveen solo alivio parcial del dolor y poseen efectos adversos que limitan su uso. Se han desarrollado potentes compuestos antagonistas de los canales de Na que incluyen el anillo del pirazol en su estructura (fig. 1.10) y que poseen una eficacia sobresaliente en el tratamiento de dolor neuropático, con mínimos efectos adversos cardiacos y del sistema nervioso central [24].



**Figura 1.10** Compuesto reportado por Tyagarajan, S. Et al que demuestra una excelente eficacia como tratamiento del dolor neuropático en un modelo de nervio espinal de rata.

#### 1.3.4 Inhibidores de la Osteoclastogénesis:

Conforme los seres humanos van creciendo, las enfermedades relacionadas con la edad van siendo cada vez más prevalentes, tal es el caso de la osteoporosis. Los efectos adversos y la baja respuesta a los métodos actuales de tratamiento se observan comúnmente, lo que sugiere una necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos. Ting-Hao [25] ha demostrado la capacidad que poseen compuestos derivados del pirazol, como el 2-(dimethylamino) ethyl 5-(1-benzyl-1H-indazol-3-yl) furan-2-carboxylate (fig. 1.11) como agentes inhibidores de la osteoclastogénesis y de la actividad de reabsorción de hueso de los osteoclastos, lo que los convierte en compuestos con un gran potencial para ser usados como agentes terapéuticos para tratar la osteoporosis.



**Figura 1.11** Compuesto inhibidor de la proliferación y diferenciación de osteoclastos, demostró la inhibición de la pérdida de masa ósea en ratones.

### 1.4 Hipótesis

Los ligante basados en pirazoles y bis (imino piridinas) son moléculas que poseen intrínsecamente propiedades de interés biológico, se espera observar una variación en la actividad antimicrobiana y anticancerígena entre los ligantes solos y sus complejos con los distintos metales.

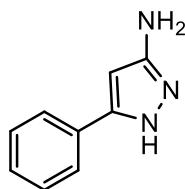
## Capítulo 2 | Materiales y métodos

---

## 2.1 Materiales

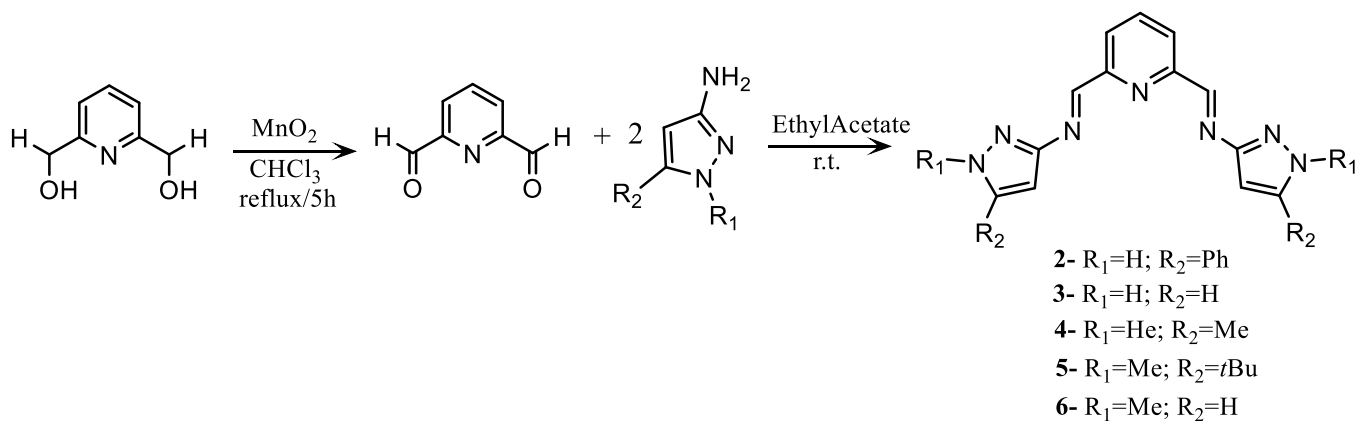
### 2.1.1 Ligantes

Para la síntesis de los complejos se utilizó el ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole (98%) (Sigma-Aldrich) (CAS: 1572-10-7), el cual posee un peso molecular de 159.19 g/mol y un punto de fusión de 124-127 °C (fig. 2.1).



**Figura 2.1** Estructura del ligante 1, 3-Amino-5-Phenylpyrazole.

Además del ligante mencionado anteriormente, se evaluaron también ligantes sintetizados en el laboratorio por el grupo, mediante la serie de reacciones mostradas en el esquema 1[26].



**Esquema 1.** Ligantes utilizados sintetizados en el laboratorio.

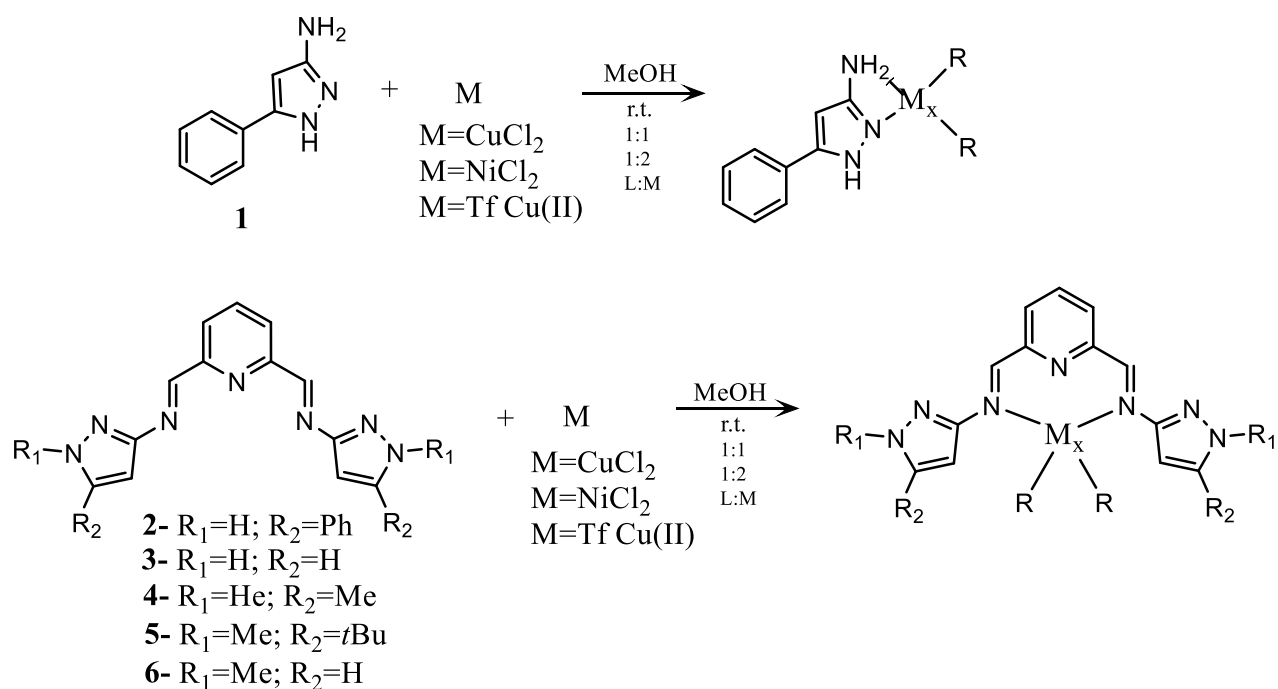
### 2.1.2 Iones metálicos y solventes

Los iones metálicos a partir de los cuales se realizaron las reacciones de síntesis de los complejos fueron obtenidos de sales de cloruro de cobre (II), cloruro de Níquel (II) y triflato de cobre (II), todas de grado analítico. Se utilizó metanol para la disolución de los componentes previos a la reacción se y para la preparación de las muestras para el análisis antimicrobiano, se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich).

## 2.2 Metodología experimental

### 2.2.1 Síntesis de complejos

La metodología de síntesis de los complejos se presenta de manera resumida en el esquema 2. Consiste en realizar una preparación con una relación estequiométrica 1:1 o 1:2 del ligante con respecto a la sal metálica. Primero se pesó la masa necesaria del ligante y se disolvió en aprox. 5 ml de metanol, luego se siguió el mismo procedimiento para preparar la solución con la sal metálica, cada uno de los componentes se disolvieron por separado para posteriormente mezclarlos y hacerlos reaccionar, dejando el producto resultante en agitación. Al momento de mezclar los componentes, en ocasiones se observó la formación instantánea de un precipitado o un cambio de coloración, estos comportamientos son anotados para ser reportados posteriormente.



**Esquema 2.** Metodología de síntesis de complejos con estructuras de coordinación propuestas.

**Tabla 2.1** Nomenclatura asignada a compuestos.

| Ligantes | Sales Metálicas       |                        |                        |
|----------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Numero   | Cloruro de cobre (II) | Cloruro de níquel (II) | Triflato de cobre (II) |
|          | Cu                    | Ni                     | Tf                     |
| 1        | 1-Cu                  | 1-Ni                   | 1-Tf                   |
| 2        | 2-Cu                  | 2-Ni                   | 2-Tf                   |
| 3        | 3-Cu                  | 3-Ni                   | 3-Tf                   |
| 4        | 4-Cu                  | 4-Ni                   | 4-Tf                   |
| 5        | 5-Cu                  | 5-Ni                   | 5-Tf                   |
| 6        | 6-Cu                  | 6-Ni                   | 6-Tf                   |

\* Nota: se agregó un “-#” al final del código, correspondiente al número de reacción, en caso de existir modificaciones en sus características de síntesis.

Mientras que la tabla 2.1 ofrece un mapa con las nomenclaturas asignadas, la tabla 2.2 resume los diferentes compuestos evaluados, se especificó el nombre que se le asignó al complejo siguiendo la nomenclatura explicada anteriormente, el nombre del ligante utilizado y el nombre de la sal metálica utilizada, así como la relación estequiométrica entre ambas.

**Tabla 2.2** Nombres y combinaciones de complejos evaluados.

| Código        | Ligante                  | Sal Metálica      | Relación Molar<br>L:M |
|---------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|
| <b>1-Cu-1</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole | CuCl <sub>2</sub> | 2:1                   |
| <b>1-Cu-2</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole | CuCl <sub>2</sub> | 1:1                   |
| <b>1-Cu-3</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole | CuCl <sub>2</sub> | 2:1                   |
| <b>1-Ni-1</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole | NiCl <sub>2</sub> | 2:0.58                |
| <b>1-Ni-2</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole | NiCl <sub>2</sub> | 2:1                   |

|               |                                                                                              |                   |     |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----|
| <b>2-Cu-1</b> | (1E,1'E)-N,N'-(pyridine-2,6-diyl)bis(1-(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methanimine                 | CuCl <sub>2</sub> | 1:1 |
| <b>2-Cu-2</b> | (1E,1'E)-N,N'-(pyridine-2,6-diyl)bis(1-(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methanimine                 | CuCl <sub>2</sub> | 1:2 |
| <b>2-Cu-3</b> | (1E,1'E)-N,N'-(pyridine-2,6-diyl)bis(1-(5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methanimine                 | CuCl <sub>2</sub> | 1:3 |
| <b>1-Tf-1</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole                                                                     | Triflato Cu(II)   | 2:1 |
| <b>1-Tf-2</b> | 3-Amino-5-Phenylpyrazole                                                                     | Triflato Cu(II)   | 4:1 |
| <b>3-Cu</b>   | (Z)-N-(6-(((E)-(1H-pyrazol-3-yl)methylene)amino)pyridin-2-yl)-1-(1H-pyrazol-3-yl)methanimine | CuCl <sub>2</sub> | 1:1 |
| <b>3-Tf</b>   | (Z)-N-(6-(((E)-(1H-pyrazol-3-yl)methylene)amino)pyridin-2-yl)-1-(1H-pyrazol-3-yl)methanimine | Triflato Cu(II)   | 1:2 |
| <b>4-Cu</b>   | (1E,1'E)-N,N'-(pyridine-2,6-diyl)bis(1-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)methanimine)                | CuCl <sub>2</sub> | 1:1 |

### 2.2.2 Extracción de las fases solidas

Las fases solidas obtenidas a partir de los sistemas previamente descritos fueron separadas mediante la evaporación del solvente en el cual se llevó a cabo la reacción. Para los complejos de CuCl<sub>2</sub> y NiCl<sub>2</sub> se utilizó un método de separación con rotavapor; se depositó la solución o la suspensión del complejo (según fuere el caso) en un matraz bola de 150 ml y se lavó con metanol cualquier residuo que haya quedado en vial para ser pasado al matraz. Posteriormente, el matraz se colocó en la boquilla del equipo, procurando usar grasa de silicón suficiente para asegurar un sello hermético. La columna de condensación del equipo fue preparada con un baño de acetona y hielo seco y se mantuvo bajo observación continua, para agregar más hielo al paso que este se evaporaba. Una vez preparado el equipo se procedió a encenderlo, para después posicionar el matraz en un baño de agua a 25 °C y hacerlo girar a 85 rpm. En este punto, se encendió la bomba de vacío y la válvula de vacío se abrió cuidadosamente; se dejó correr el equipo por aproximadamente una hora, supervisando la evaporación del solvente. Una vez completamente seco el complejo, se lavó con metanol y se repitió el proceso de secado, este procedimiento se realizó tres veces. Completados estos ciclos, se extrajo el sólido del matraz raspando las paredes con una espátula y fue depositado

en el interior de un vial limpio que se pesó antes y después de contener el producto, para saber la cantidad de complejo recuperado.

Para los complejos de triflato de cobre (II) que fueron sintetizados dentro de la caja seca, se siguió un protocolo de extracción de fases solidas ligeramente distinto. Dentro de la caja seca, las suspensiones de los complejos fueron transferidos a matraces Schlenk que fueron cerrados para que en su interior se mantuviera una atmosfera inerte de argón. Se retiraron de la caja seca y se colocaron en la línea de secado al vacío, la cual fue purgada con argón antes de abrir los matraces y permitir que el vacío evaporara el solvente para secar la muestra. El equipo utilizado se muestra en la figura 2.2.

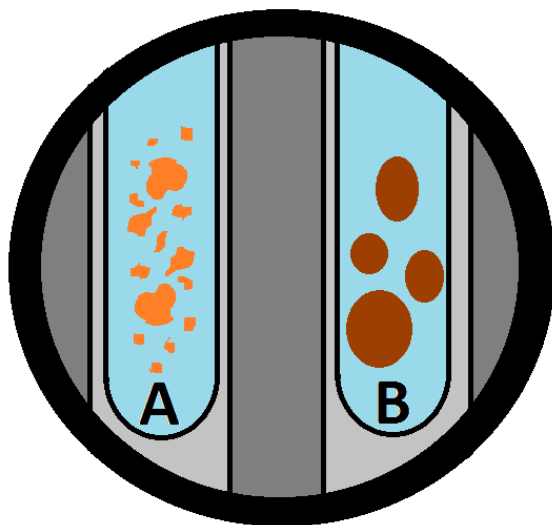


**Figura 2.2** Equipo de secado al vacío para muestras sensibles al agua.

### *2.2.3 Determinación de punto de fusión.*

Con el objetivo de determinar las temperaturas de fusión y de degradación de los diferentes compuestos sintetizados, se realizó una prueba sencilla utilizando un par de fusionómetros Stuart SMP10 de acuerdo al protocolo de uso explicado a continuación. Debido a las limitaciones del tiempo necesario para que el dispositivo alcance la temperatura optima y el hecho que solo se puedan analizar dos muestras a la vez, se corrieron en paralelo dos análisis, uno de aumento

temperatura rápida y uno de aumento lento. Inicialmente, se colocó una pequeña cantidad de muestra en el extremo sellado de tubos capilares para después ser insertados en el porta muestras del fusionómetro de aumento rápido, calibrado a la temperatura máxima de 300 °C. Se observó la evolución del estado de agregación desde la temperatura ambiente hasta la temperatura aproximada en la que se observó la fusión del complejo. Para determinar la temperatura de fusión correcta, se restaron 20 °C a la temperatura a la que el compuesto demostró un cambio de estado y se calibró a esta temperatura el fusionómetro de aumento lento. De la misma manera, se mantuvo la muestra bajo observación constante hasta que se observó un cambio en el estado de agregación y se registró esta temperatura. Durante el transcurso de este experimento, se permitió que el fusionómetro de aumento rápido se enfriara a temperatura ambiente para después repetir el proceso con un compuesto distinto. Las diferencias observadas entre los estados de agregación (partículas sólidas, y pequeñas gotas de compuesto líquido), se visualizan en la figura 2.3. Los compuestos que no demostraron un cambio en su fase dentro del rango máximo de temperatura del fusionómetro fueron reportados simplemente como “temperatura >300 °C”.

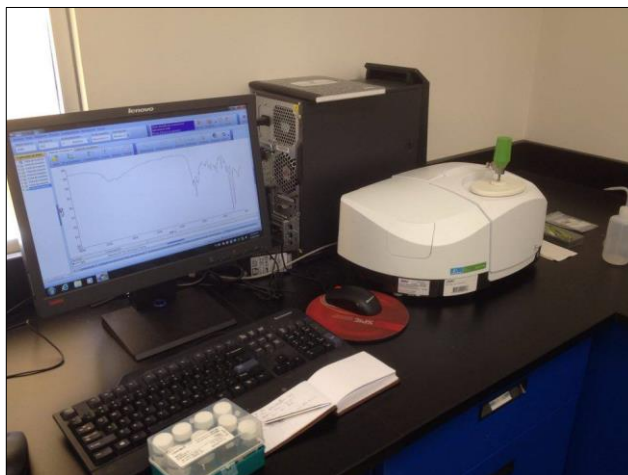


**Figura 2.3** Representación de la fase sólida del compuesto en el bloque del fusionómetro (A) y del complejo al alcanzar su temperatura de fusión (B).

#### 2.2.4 Caracterización mediante FTIR/ATR

La técnica de espectroscopía infrarroja es extensamente empleada para el reconocimiento y el análisis cuantitativo de unidades estructurales en compuestos desconocidos. La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende desde el límite rojo del espectro visible hasta la región de microondas; incluye las longitudes de onda entre 14 000 y 20  $\text{cm}^{-1}$ , aunque el rango espectral más utilizado es el infrarrojo medio, cuya región va desde 4 000 hasta 200  $\text{cm}^{-1}$ . La espectroscopía infrarroja comprende la examinación del giro, doblamiento, rotación y los movimientos vibraciones de los átomos de una molécula. Al entrar en contacto con la radiación infrarroja, porciones de la radiación incidente son absorbidas a longitudes de onda específicas, la gran cantidad de vibraciones que ocurren simultáneamente producen un espectro de absorción altamente complejo que es característico de los grupos funcionales que componen la molécula, así como su composición general [27].

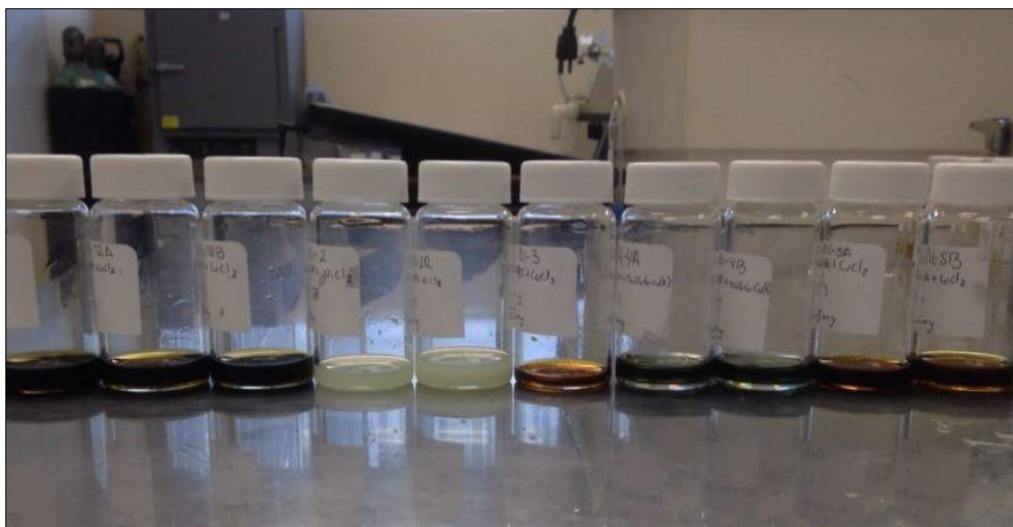
Para la determinación de los grupos funcionales presentes en los complejos se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se utilizó el equipo de ATR (Reflexión total atenuada) Perkin Elmer Spectrum Two® (Fig. 2.4) conforme a las siguientes instrucciones de uso: El cristal y la punta metálica del equipo se limpiaron con un paño suave y acetona, para después colocar con cuidado la punta metálica en el extremo inferior del brazo, soportando con una mano la parte superior de la perilla. Se corrió un barrido de fondo, asegurándose que el brazo no estuviera sobre el cristal, con unas pinzas, se tomó un poco de muestra y se colocó sobre el cristal, procurando cubrirlo completamente. Se posicionó el brazo sobre el cristal, para después girar la perilla en sentido de las manecillas del reloj y presionar la muestra para formar una película uniforme sobre el cristal, ajustando mientras se observaba el indicador de fuerza. Una vez ajustada la fuerza y observando una vista previa satisfactoria del espectro, se corrió el barrido de la muestra, completado el análisis, se nombró y guardó el archivo; para liberar la fuerza, se giró la perilla en sentido contrario a las manecillas del reloj. Se movió fuera de posición el brazo y la punta metálica se removió cuidadosamente. El cristal y la punta metálica utilizada se limpiaron con un paño suave y acetona.



**Figura 2.4** Equipo de espectrofotometría de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum Two®.

### 2.2.5 Prueba biológica de actividad antimicrobiana

La prueba presuntiva de actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de micro dilución. Se realizó la inoculación de tres cepas patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*) previamente incubadas por 24 horas a 35 °C en medio Mueller Hinton (MHB a 23 g/l) en microplacas de 96 pozos. En estas placas se colocaron las muestras a una concentración de 10 mg/ml en DMSO (fig. 2.5) y se adicionó el medio de inoculado.



**Figura 2.5** Complejos disueltos en DMSO a una concentración de 10 mg/ml.

Se utilizaron como controles (Gentamicina como control positivo, y medio de cultivo MHB inoculado como control negativo) para verificar la inhibición y el crecimiento normal del organismo patógeno. Para establecer la MIC (concentración inhibitoria mínima), se siguió el protocolo explicado a continuación. La prueba se realizó por triplicado, la disposición de la microplaca (fig. 2.6) permitió analizar 3 compuestos por placa considerando 8 diluciones seriadas para cada una de las muestras a probar



**Figura 2.6** Disposición de pozos en una microplaca.

En la fila A de cada una de las microplacas se depositó un volumen de 96  $\mu$ l y a partir de la fila B y hasta la H, se depositaron 50  $\mu$ l de medio MHB. Posteriormente, se adicionaron 4  $\mu$ l de cada una de las muestras preparadas a una concentración de 10 mg/ml en DMSO a la fila A y se homogeneizó completamente. Después, se tomaron 50  $\mu$ l del homogenizado de la fila A, y se trasvasó a la fila B homogenizando y completando un volumen total de 100  $\mu$ l, de los cuales se tomó un volumen de 50  $\mu$ l que fueron trasvasados a la fila C, repitiendo consecutivamente este procedimiento hasta que se llegó a los pozos de la fila H, del cual se descartaron los 50  $\mu$ l sobrantes. Terminado el proceso de diluciones seriadas se obtuvieron 8 diluciones con las siguientes concentraciones: 0.4; 0.2; 0.1; 0.05; 0.025; 0.0125; 0.00625 y 0.003125 mg/ml de las muestras de interés y a cada uno de los pozos se le agregaron 50  $\mu$ l de medio MHB inoculado con la cepa patógena a probar.

Las microplacas fueron sometidas a incubación a 35 °C y la toma de lectura se realizó transcurridas 24, 48 y 72 horas de exposición. Para observar el efecto inhibitorio que tuvieron las muestras sobre las cepas durante este tiempo se leyó la absorbancia de dichas muestras con la ayuda de un lector

de microplacas a 492 nm y se realizó el cálculo del efecto inhibitorio con respecto al blanco o control negativo siguiendo la ec.1.

$$Efecto\ Inhibitorio = \left( \frac{Abs\ Ctrl^{(-)} - Abs\ Mtra\ Xhr}{Abs\ Ctrl^{(-)}} \right) * 100$$

**Ec.1**

Fórmula para calcular el efecto inhibitorio de los compuestos sobre las cepas patógenas.

#### *2.2.6 Ensayo citotóxico $CI_{50}$ con células HCT116 de cáncer de colon*

El ensayo para para calcular el índice de citotoxicidad media ( $CI_{50}$ ) se realizó para la determinación de la viabilidad de los compuestos evaluados, la primera sección de este experimento consiste en el cultivo celular sobre las cuales se realizó el ensayo, para esto se ajustó una incubadora 24 horas antes de la prueba a 37 °C y 5 %  $CO_2$ , y un baño de agua, también a 37 °C, una vez hecho esto, se descongeló el medio completo de cultivo a temperatura ambiente (37 °C en baño de agua o pre incubado el volumen requerido de 20 ml por cepa, durante 15 minutos en una placa nueva). Con un criotubo, se retiraron las células de cáncer de colon HCT-116 del tanque de nitrógeno o del ultra congelador. Se calentó el vial rápidamente frotándolo con las manos con guantes o colocándolo en un baño de agua a 37 °C. Una vez realizado esto, se limpió la superficie del criotubo con etanol al 70 %/ 30 % agua destilada y fue colocado dentro de la campana. Posteriormente, el tubo fue centrifugado durante medio minuto, se retiró el medio, se sacó la placa con el medio preincubado, y fue añadido 1 ml de ese medio completo preincubado al tubo con las células, para ser mezclado cuidadosamente y trasferido todo el contenido a la placa con el medio restante, homogenizando con cuidado. Se etiquetó la placa de cultivo celular, con el nombre de la cepa “HCT-116, numero de traspaso P #0 (cultivo inicial), y la fecha. Una vez creado el cultivo inicial de células HCT-116 de 20 ml volumen final, se colocó la caja Petri en la incubadora con 5 %  $CO_2$  a 37 °C. Se revisó la adhesión de las células a las 24 horas, en caso de estar adheridas, se cambió el medio por uno nuevo (preincubado). Las células fueron incubadas de 3 a 4 días y traspasadas a una nueva placa (P #1) al 5to día, para ser empleadas en el bioensayo.

Para la preparación de las microplacas para el ensayo fue necesario desenvolver el número de microplacas requeridas para el número de muestras sujetas al estudio y 2 canaletas de plástico

estériles, colocando todo dentro de la campana, se agregó una pequeña cantidad de medio completo a una de las canaletas de plástico. Fueron agregados 150  $\mu$ l de medio completo a los pocillos correspondientes a los blancos (G11 y H11) en cada microplaca. Se desechó el sobrante de medio completo de la canaleta y ahí mismo se agregó la solución celular previamente preparada (homogenizada previamente). Posteriormente fueron agregados 175  $\mu$ l de la solución celular a todos los pocillos de la primera fila (A1 a A12) y 150  $\mu$ l de la solución celular al resto de los pocillos de cada microplaca, evitando los pocillos de los blancos. Finalmente, se colocaron las microplacas en la incubadora por 24 horas.

La adición de las muestras en las microplacas preparadas se realizó mediante el protocolo establecido, para el cual inicialmente se descongelaron las muestras bajo estudio, mezclándolas bien. Se agregaron 25  $\mu$ l de cada muestra en su pocillo correspondiente (iniciando por el pocillo A1 hasta el A10). Registrando en la bitácora la posición de cada muestra. Posteriormente, se agregaron 25  $\mu$ l de DMSO al pocillo A11 (control negativo), y 25  $\mu$ l del agente anticancerígeno Etopósido al pocillo A12 (control positivo). Se realizó una dilución serial de 50  $\mu$ l desde la primera fila hasta la última fila, evitando los pocillos de los blancos y mezclando en cada dilución. Con mucho cuidado de no generar burbujas. Finalmente, las microplacas fueron colocadas en la incubadora por 72 horas.

Se utilizó un indicador de metabolismo celular en las microplacas incubadas, para esto se descongeló el indicador MTS-PMS (solución altamente fotosensible, se mantuvo protegida de la luz), posteriormente, se agregó la cantidad total requerida del indicador en otra canaleta de plástico estéril, se sacaron las microplacas de incubación y fueron agregados 20  $\mu$ l a todos los pocillos excepto las dos primeras filas (A y B) para posteriormente colocar de nuevo las microplacas en incubación por 3 horas.

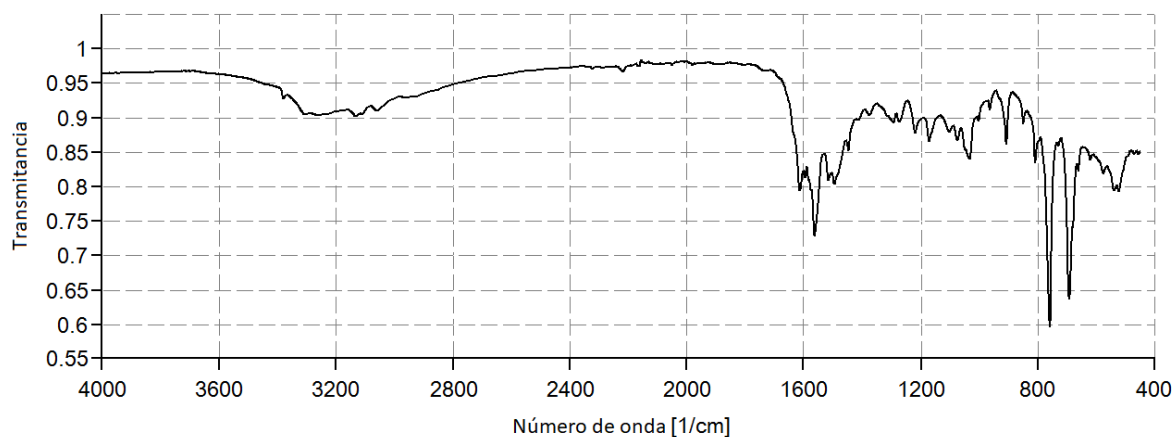
Para la lectura de las placas, transcurridas las 3 horas de incubación, se sacaron una a la vez, y dependiendo del volumen final, se transfirieron de 60 a 100  $\mu$ l de cada pocillo a una nueva placa (con cuidado de no toca el fondo o generar burbujas en la nueva placa) para leerlas en el lector de microplacas a 492 nm. Finalmente, los pocillos oscuros indicaron que la muestra no es activa (las células están vivas y metabolizando el indicador). Mientras que los pocillos claros indicaron que la muestra es activa (las células están muertas y no metabolizaron el indicador). Se colocó cada placa en el lector y se midió la absorbancia.

## Capítulo 3 | Resultados y Discusión

---

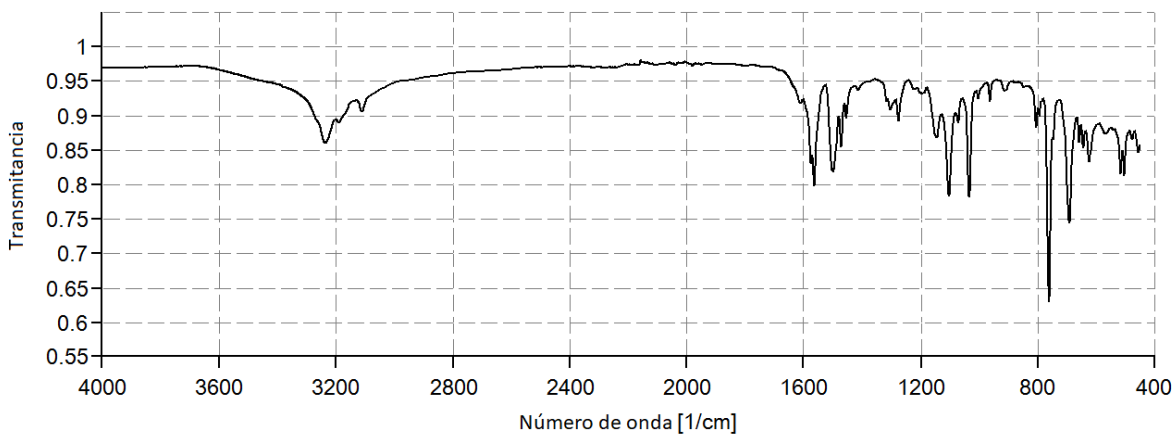
### 3.1 Caracterización

#### 3.1.1.1 Productos del ligante 1 + $\text{CuCl}_2$



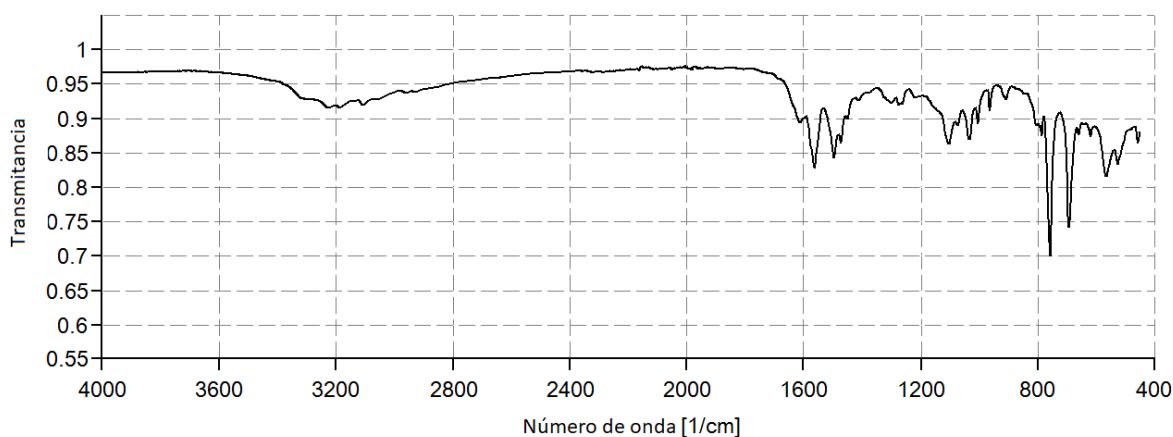
**Figura 3.1** Espectro FTIR del complejo 1-Cu-1.

En la figura 3.1 se aprecia el espectro de FTIR de la muestra 1-Cu-1, sintetizada mediante la reacción del ligante 1 con  $\text{CuCl}_2$ , los picos que destacan son los que corresponden a  $3133 \text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1615 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $758 \text{ cm}^{-1}$  y  $691 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$ ).



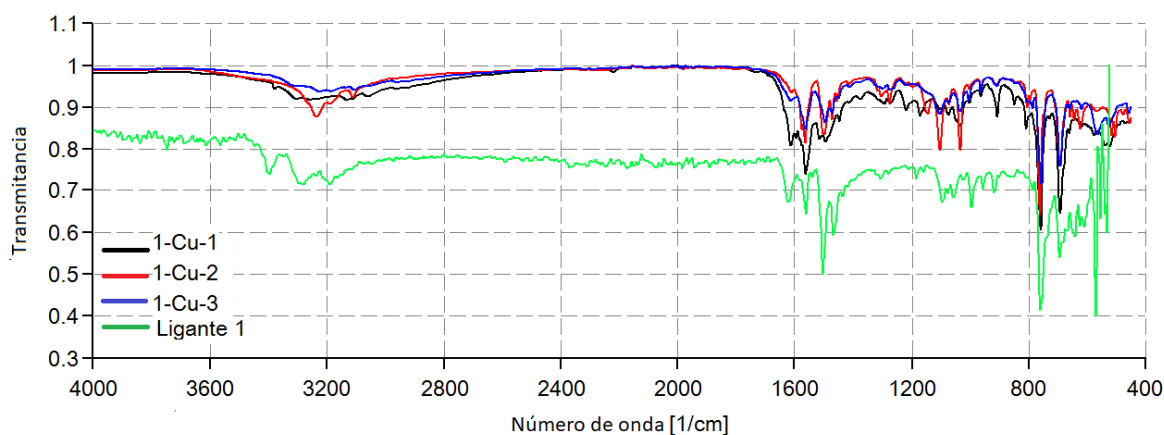
**Figura 3.2** Espectro FTIR del complejo 1-Cu-2.

La figura 3.2 muestra el espectro del complejo resultante de la reacción del ligante 1 con  $\text{CuCl}_2$  con una relación estequiométrica 1:1; destacan los picos que corresponden al número de onda:  $3236\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1613\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $761\text{ cm}^{-1}$  y  $691\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



**Figura 3.3** Espectro FTIR de 1-Cu-3.

La figura 3.3 muestra el espectro del compuesto 1-Cu-3, cuya relación estequiométrica de ligante con respecto a la sal de cobre es de 2:1 respectivamente. Los picos que destacan son:  $3225\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1611\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $756\text{ cm}^{-1}$  y  $692\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



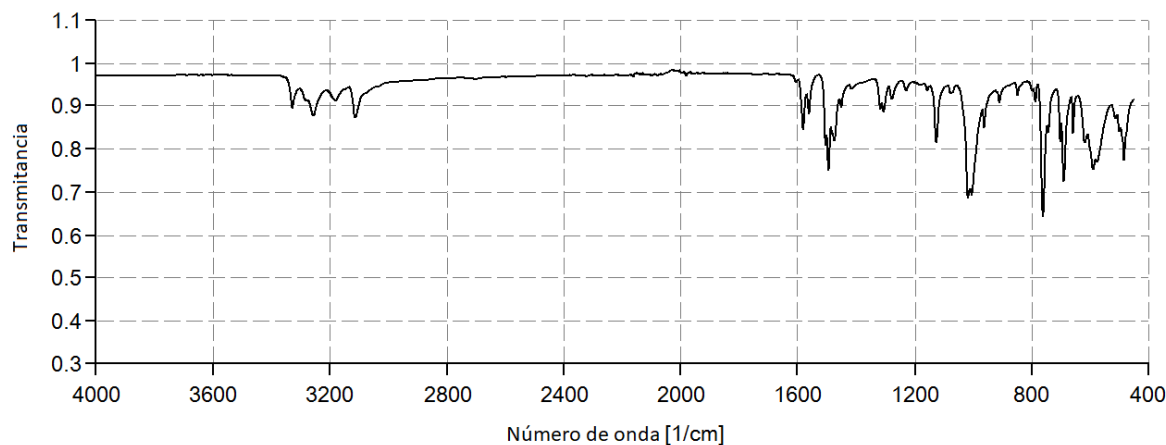
**Figura 3.4** Comparación de espectros FTIR de complejos de 1 +  $\text{CuCl}_2$ .

Al observar la figura 3.4 y la tabla 3.1 puede percibirse una tendencia al cambiar la relación estequiométrica, al aumentar la concentración del ligante con respecto a la sal de cobre, los picos del espectro se van desplazando más hacia un número de onda menor, lo que supone una menor frecuencia de vibración, que a su vez podría interpretarse como un incremento en la coordinación del metal en zonas del ligante ya que la frecuencia de vibración de una molécula es inversamente proporcional a su masa [28]. El desplazamiento más notorio ocurre en el pico de  $1611\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo  $\text{NH}_2$ , dicho desplazamiento puede ser producto de la coordinación del cobre en dicho grupo del ligante. La disminución en la amplitud de los picos correspondientes al grupo N-H que van de  $3400\text{--}3190\text{ cm}^{-1}$  observados en los complejos y presentes en el ligante solo, se le atribuye a que los complejos no fueron secados adecuadamente antes de ser analizados con el equipo de espectroscopia infrarroja. Una diferencia de aproximadamente  $10\text{ cm}^{-1}$  se interpreta como una coordinación definitivamente a través del  $\text{NH}_2$ .

**Tabla 3.1** Picos de absorción de IR de muestras del ligante 1 con  $\text{CuCl}_2$ .

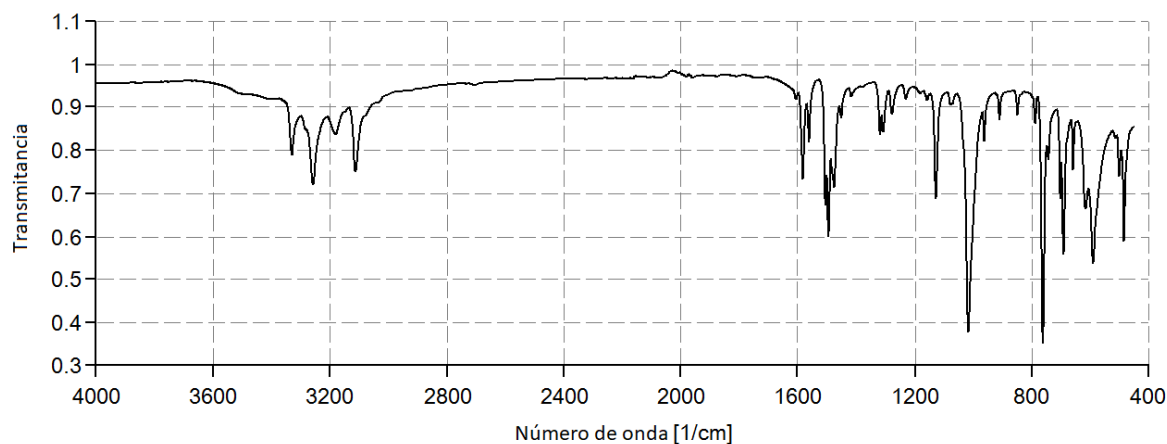
| Compuesto | N-H                         | NH <sub>2</sub>       | C=C                       |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Ligante 1 | 3396; 3280 $\text{cm}^{-1}$ | 1623 $\text{cm}^{-1}$ | 760; 694 $\text{cm}^{-1}$ |
| 1-Cu-1    | 3133 $\text{cm}^{-1}$       | 1615 $\text{cm}^{-1}$ | 758; 691 $\text{cm}^{-1}$ |
| 1-Cu-2    | 3236 $\text{cm}^{-1}$       | 1613 $\text{cm}^{-1}$ | 761; 691 $\text{cm}^{-1}$ |
| 1-Cu-3    | 3225 $\text{cm}^{-1}$       | 1611 $\text{cm}^{-1}$ | 756; 692 $\text{cm}^{-1}$ |

### 3.1.1.2 Productos del ligante 1 + $\text{NiCl}_2$



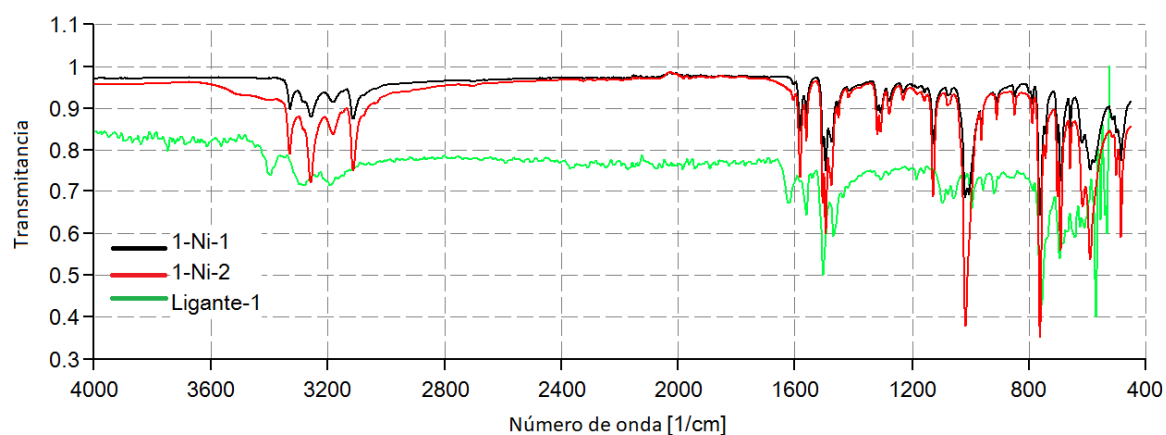
**Figura 3.5** Espectro de infrarrojo de 1-Ni-1.

La figura 3.5 muestra el espectro de FTIR objetivo de la muestra 1-Ni-1 que se sintetizó al reaccionar el ligante 1 con  $\text{NiCl}_2$ . Los picos del espectro que destacan corresponden a  $3329$ ,  $3257$ ,  $3113\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1607\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $761\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



**Figura 3.6** Espectro FTIR de la muestra 1-Ni-2.

En la figura 3.6 se puede observar el espectro FTIR del complejo 1-Ni-2, sintetizado al reaccionar el ligante 1 con el  $\text{NiCl}_2$  con una relación molar de ligante con respecto al metal de 2:1. Los picos más relevantes en el espectro son  $3330$ ,  $3258$ ,  $3112\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $1605\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ )  $761.61\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



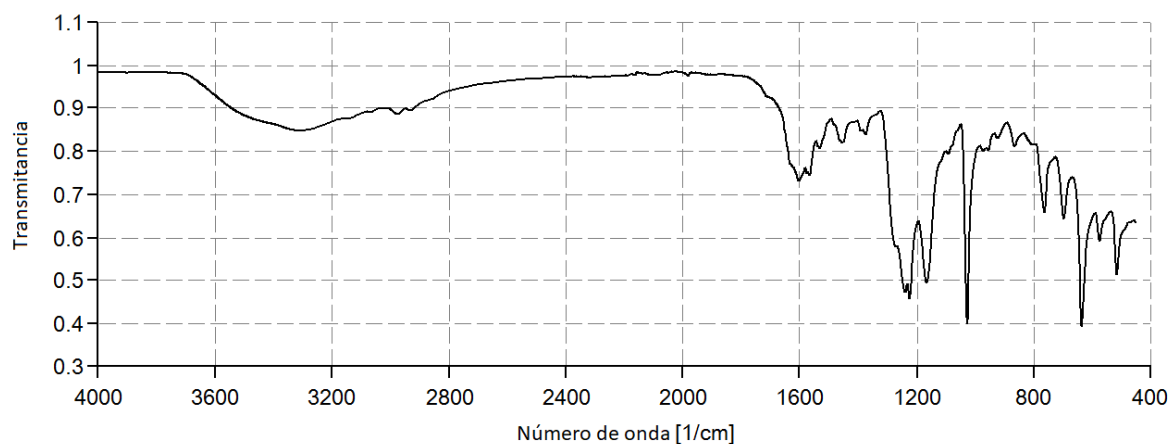
**Figura 3.7** Comparación de espectros de FTIR de las muestras 1-Ni-1 y 1-Ni-2 con el ligante de partida, 1.

La diferencia entre los picos de los espectros correspondientes al grupo  $\text{-NH}_2$  que van desde  $3400\text{-}3190\text{ cm}^{-1}$  de los espectros mostrados en la figura 3.7 puede interpretarse como la coordinación del metal en el ligante 1, al aumentar la cantidad de níquel con respecto a ligante, se observa un que las longitudes de onda de los picos tienden hacia un número menor de onda, los que supone una disminución de energía ante el alargamiento del enlace debido a la donación del par de electrones por parte del metal, que se coordina en el sitio  $\text{NH}_2$  adyacente; Se deduce que la coordinación fue en este sitio debido al cambio notorio presente en el pico correspondiente ( $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ).

**Tabla 3.2** Picos de absorción de IR de muestras de 1 con  $\text{NiCl}_2$ .

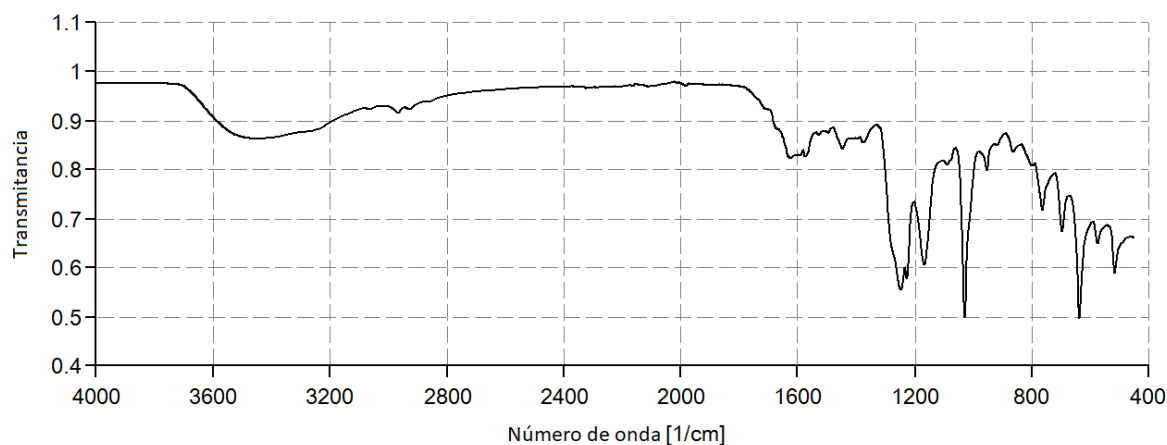
| Compuesto | N-H                               | $\text{NH}_2$         | C=C                       |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Ligante 1 | 3396; 3280 $\text{cm}^{-1}$       | 1623 $\text{cm}^{-1}$ | 760; 694 $\text{cm}^{-1}$ |
| 1-Ni-1    | 3329; 3257; 3113 $\text{cm}^{-1}$ | 1607 $\text{cm}^{-1}$ | 761 $\text{cm}^{-1}$      |
| 1-Ni-2    | 3330; 3258; 3112 $\text{cm}^{-1}$ | 1605 $\text{cm}^{-1}$ | 761.61 $\text{cm}^{-1}$   |

### 3.1.1.3 Productos del ligante 1 + Triflato de Cobre (II)



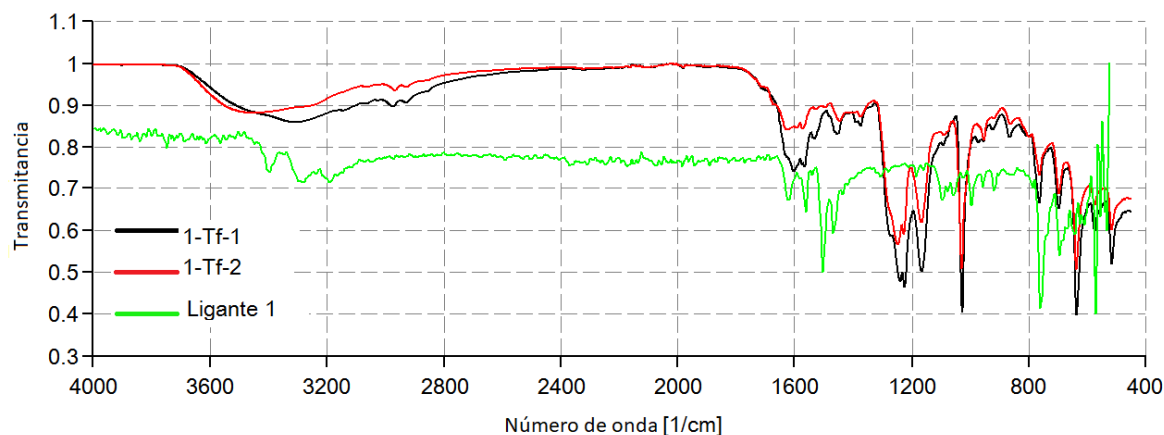
**Figura 3.8** Espectro de FTIR del complejo 1-Tf-1.

En la figura 3.8 se aprecia el espectro de infrarrojo obtenido de la muestra sintetizada mediante la reacción del ligante 1 con el Triflato de cobre (II) siguiendo una relación estequiométrica de 2:1 de ligante y sal metálica respectivamente. Del espectro pueden identificarse como picos principales:  $1604\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $1567\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$ ),  $1240\text{ cm}^{-1}$ ,  $1224\text{ cm}^{-1}$  (Triflato).



**Figura 3.9** Espectro de infrarrojo del compuesto 1-Tf-2.

El complejo 1-Tf-2 se sintetizó mediante la reacción del ligante 1 con el Triflato de cobre, con una relación molar de 4:1 respectivamente, de la gráfica mostrada en la figura 3.13, se aprecia que los picos que destacan son  $1622\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$ ),  $1573\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$ ),  $1248\text{ cm}^{-1}$ ,  $1226\text{ cm}^{-1}$  (Triflato).



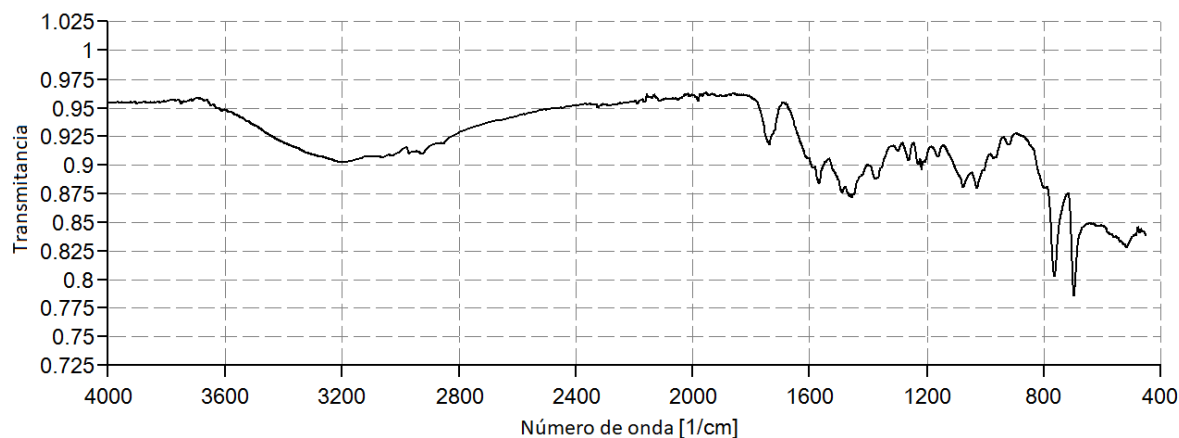
**Figura 3.10** Comparación de espectros de los complejos 1-Tf-1 y 1-Tf-2 con el ligante 1.

La coordinación del Triflato con el ligante 1 puede notarse en la comparación de los espectros de la figura 3.10, puede observarse la presencia de los picos característicos del triflato de cobre (II) ( $\sim 1200$ ) en los complejos 1-Tf-1 y 1-Tf-2 y la ausencia de estas bandas en el espectro correspondiente al ligante solo. El objetivo de la coordinación del triflato con los ligantes, es aumentar su solubilidad de los complejos resultantes, puede notarse que existe una diferencia entre la solubilidad de los compuestos sintetizados con la sal de  $\text{CuCl}_2$  y la del triflato de cobre (II), esta diferencia puede observarse en la sección de prueba de solubilidad. La tabla 3.3 resume los valores de los picos de absorción principales encontrados en estos espectros. La ausencia de los picos correspondientes a las aminas del ligante 1 en los espectros de los complejos, puede ser debido a que las muestras no fueron adecuadamente secadas previo al análisis, lo que genera la presencia del pico ancho característico del OH.

**Tabla 3.3** Picos de absorción de IR de muestras de 1 con Triflato de Cobre (II).

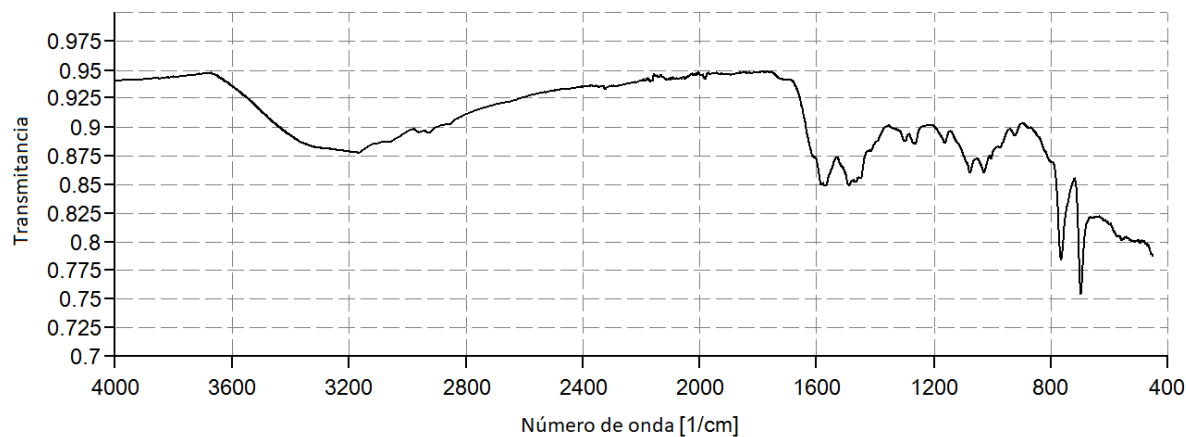
| Compuesto | NH <sub>2</sub>       | C=C                   | Triflato de cobre (II)      |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Ligante 1 | 1623 cm <sup>-1</sup> | 1562 cm <sup>-1</sup> | -                           |
| 1-Tf-1    | 1604 cm <sup>-1</sup> | 1567 cm <sup>-1</sup> | 1240; 1224 cm <sup>-1</sup> |
| 1-Tf-2    | 1622 cm <sup>-1</sup> | 1573 cm <sup>-1</sup> | 1248; 1226 cm <sup>-1</sup> |

### 3.1.1.4 Productos del ligante 2 + CuCl<sub>2</sub>



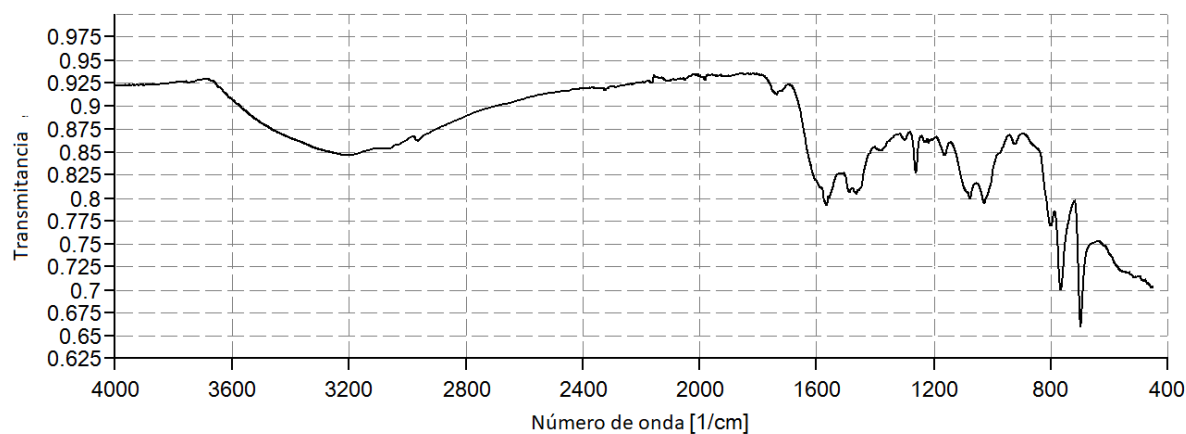
**Figura 3.11** Espectro FTIR del complejo 2-Cu-1.

El complejo 2-Cu-1 es el resultado de la reacción del ligante 2 con el CuCl<sub>2</sub> a una relación molar de 1:1 de ligante: metal, los picos que resaltan en la gráfica corresponden a los grupos presentes en el anillo del pirazol: 1572 cm<sup>-1</sup> (C=N), 1456 cm<sup>-1</sup> (C-H<sub>2</sub>), 763 cm<sup>-1</sup> y 696 cm<sup>-1</sup> (C=C).



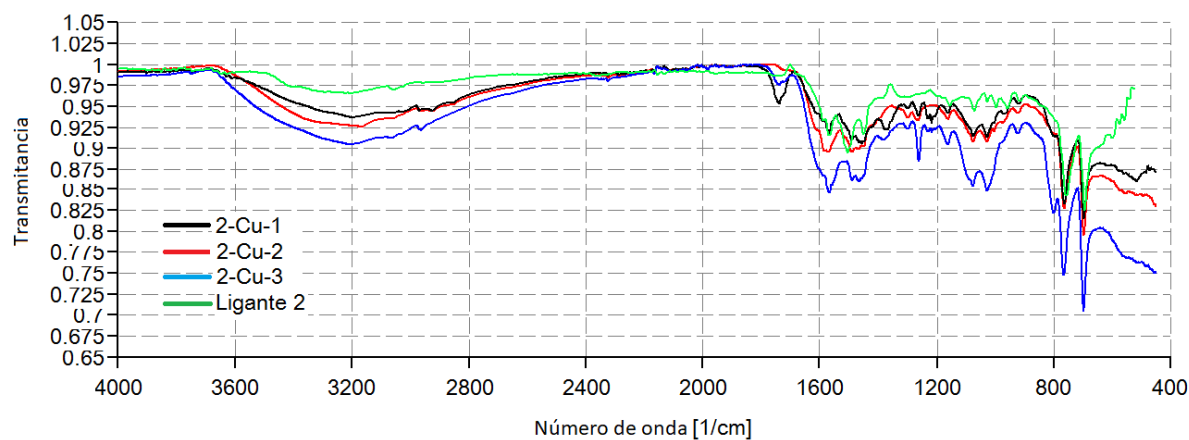
**Figura 3.12** Espectro de infrarrojo del compuesto 2-Cu-2.

En la figura 3.12 se muestra el espectro de FTIR del producto del ligante 2 y el CuCl<sub>2</sub> con una relación molar de ligante y metal de 1:2, respectivamente. Los picos de mayor intensidad en la gráfica son: 1571 cm<sup>-1</sup> (C=N), 1490 cm<sup>-1</sup> (C-H<sub>2</sub>), 764 cm<sup>-1</sup> y 696 cm<sup>-1</sup> (C=C); Dichos picos son característicos del anillo de pirazol



**Figura 3.13** Espectro de FTIR de 2-Cu-3.

El compuesto 2-Cu-3 es el producto de la reacción del ligante 2 con el  $\text{CuCl}_2$  a una relación estequiométrica de 1:3 de ligante y metal respectivamente, su espectro de infrarrojo de muestra en la figura 3.13, y los picos que destacan son:  $1565\text{ cm}^{-1}$  (C=N),  $1489\text{ cm}^{-1}$  (C-H<sub>2</sub>),  $765\text{ cm}^{-1}$  y  $767\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



**Figura 3.14** Comparación de espectros de FTIR de los complejos de 2 +  $\text{CuCl}_2$ .

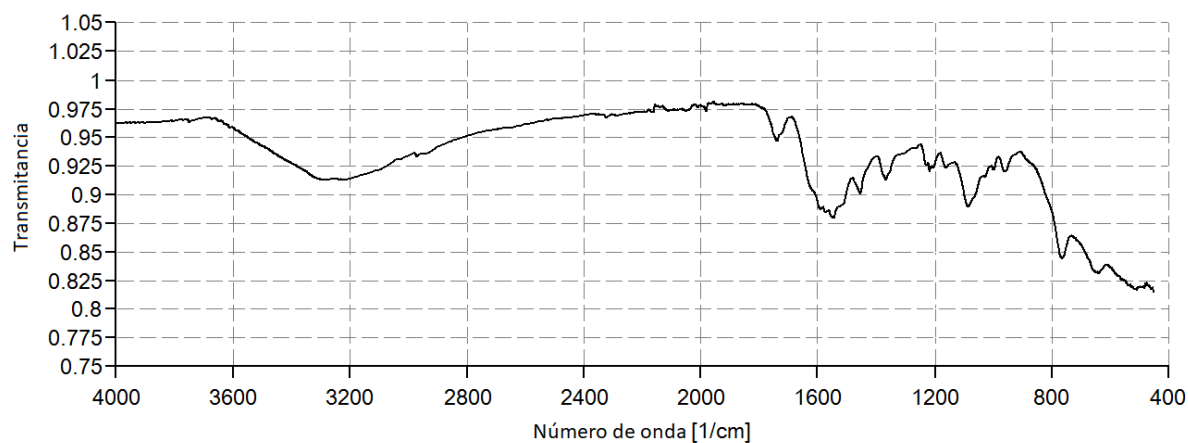
Al observar la figura 3.14, se puede apreciar que al aumentar la concentración molar del metal respecto al ligante en cada una de las muestras (1:1, 1:2 y 1:3 para 2-Cu-1, 2-Cu-2 y 2-Cu-3 respectivamente), el desfaseamiento de los picos es ligero, sin embargo, en el pico correspondiente al grupo C=N ( $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ) se observa un desfaseamiento regular hacia un número de onda menor

conforma se incrementa la concentración del metal, además de un incremento en la amplitud de los picos, lo que sugiere un incremento en la concentración de los grupos analizados [29]; del desplazamiento del pico de  $1567\text{ cm}^{-1}$  se puede deducir que la coordinación del metal se da en el grupo C=N.

**Tabla 3.4** Picos de absorción de IR de muestras de 2 con  $\text{CuCl}_2$ .

| Compuesto | C=N                   | C-H2                  | C=C                       |
|-----------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Ligante 2 | $1570\text{ cm}^{-1}$ | $1450\text{ cm}^{-1}$ | $756; 694\text{ cm}^{-1}$ |
| 2-Cu-1    | $1572\text{ cm}^{-1}$ | $1456\text{ cm}^{-1}$ | $763; 696\text{ cm}^{-1}$ |
| 2-Cu-2    | $1571\text{ cm}^{-1}$ | $1490\text{ cm}^{-1}$ | $764; 696\text{ cm}^{-1}$ |
| 2-Cu-3    | $1565\text{ cm}^{-1}$ | $1489\text{ cm}^{-1}$ | $765; 767\text{ cm}^{-1}$ |

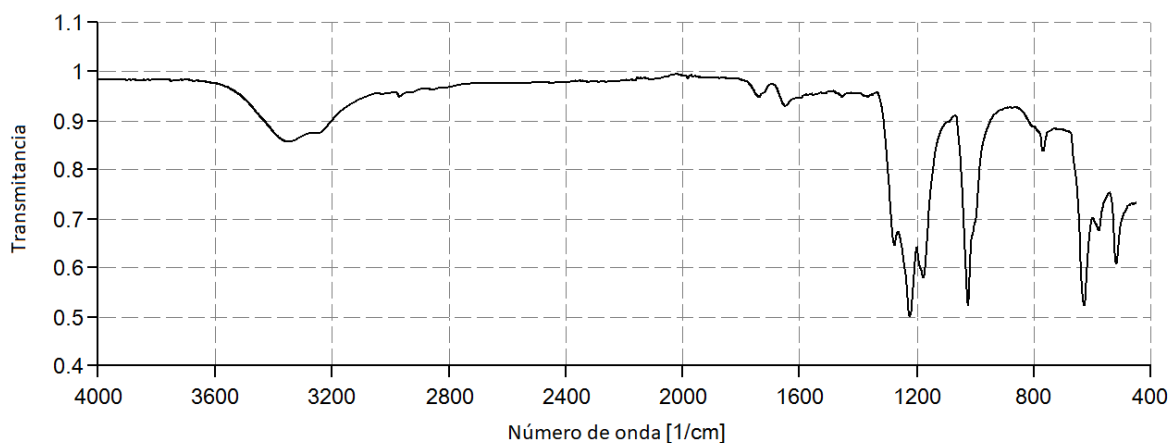
### 3.1.1.5 Productos del ligante 3 + $\text{CuCl}_2$ y Triflato Cobre (II)



**Figura 3.15** Espectro de infrarrojo del complejo 3-Cu.

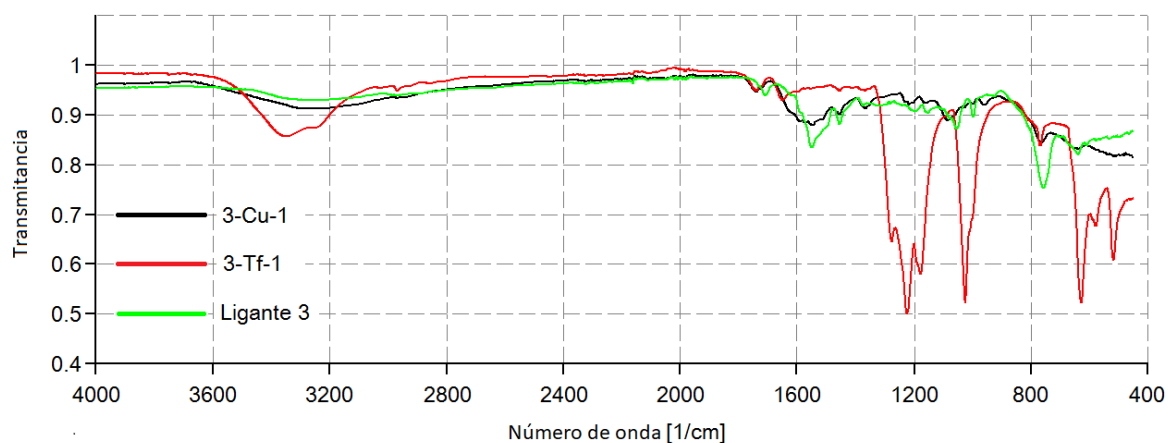
El complejo 3-Cu mostrado en la figura 3.15 es el producto de la reacción del ligante 3 con la sal de  $\text{CuCl}_2$  a una relación estequiométrica de 1:1 respectivamente, del espectro mostrado en la figura,

se alcanzan a rescatar como picos importantes los correspondientes a:  $1737\text{ cm}^{-1}$  (C=N),  $1456\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ),  $763\text{ cm}^{-1}$ ,  $650\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



**Figura 3.16** Espectro FTIR del compuesto 3-Tf.

En la figura 3.16 se muestra el espectro de infrarrojo que se obtuvo de la reacción del ligante 3 con el Triflato de Cobre (II) con una relación molar de 1:2 respectivamente, de la gráfica correspondiente al compuesto 3-Tf, destacan los picos correspondientes a:  $1749\text{ cm}^{-1}$  (C=N),  $1275\text{ cm}^{-1}$ ,  $1225\text{ cm}^{-1}$  (Triflato),  $766\text{ cm}^{-1}$ ,  $627\text{ cm}^{-1}$  (C=C).



**Figura 3.17** Comparación de espectros de los complejos 3-Cu y 3-Tf con el espectro del ligante 3.

En la figura 3.17 se muestra la comparación de los espectros de los compuestos evaluados con el ligante 3, puede notarse como las 3 muestras mantienen una posición relativamente constante en el

pico correspondiente al grupo C=N, al comparar los espectros del complejo 3-Cu con el ligante 3, puede observarse que el complejo presenta una disminución en la amplitud del pico correspondiente a C=N ( $1737\text{ cm}^{-1}$ ) en comparación con el ligante solo, esto puede atribuirse a la coordinación del metal en el ligante. El espectro de 3-Tf demuestra de forma bastante notoria la presencia de los picos correspondientes al triflato de cobre ( $1248; 1226\text{ cm}^{-1}$ ), picos que no están presentes en el espectro del ligante solo, esto sugiere que la coordinación del metal con el ligante se realizó de manera exitosa.

**Tabla 3.5** Picos de absorción de IR de muestras de 3 con  $\text{CuCl}_2$  y Triflato de Cobre (II).

| Compuesto | C=N                   | C=C                       | $\text{CH}_2$         | Triflato de cobre (II)      |
|-----------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Ligante 3 | $1713\text{ cm}^{-1}$ | $758\text{ cm}^{-1}$      | $1458\text{ cm}^{-1}$ | -                           |
| 3-Cu      | $1737\text{ cm}^{-1}$ | $763; 650\text{ cm}^{-1}$ | $1454\text{ cm}^{-1}$ | -                           |
| 3-Tf      | $1749\text{ cm}^{-1}$ | $766; 627\text{ cm}^{-1}$ | -                     | $1248; 1226\text{ cm}^{-1}$ |

En la tabla 3.6 se muestran los resultados condensados de los picos de vibración característicos correspondientes a los distintos grupos funcionales presentes en los ligantes.

**Tabla 3.6** Picos de absorción característicos de los ligantes.

| Ligante | N-H                               | $\text{NH}_2$         | $\text{CH}_2$         | C=C                       |
|---------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1       | $3396; 3280\text{ cm}^{-1}$       | $1623\text{ cm}^{-1}$ | -                     | $760; 694\text{ cm}^{-1}$ |
| 2       | -                                 | $1621\text{ cm}^{-1}$ | $1450\text{ cm}^{-1}$ | $756; 694\text{ cm}^{-1}$ |
| 3       | $3217\text{ cm}^{-1}$             | $1713\text{ cm}^{-1}$ | $1458\text{ cm}^{-1}$ | $758\text{ cm}^{-1}$      |
| 4       | $3247\text{ cm}^{-1}$             | $1618\text{ cm}^{-1}$ | -                     | -                         |
| 5       | $3205\text{ cm}^{-1}$             | $1618\text{ cm}^{-1}$ | $1460\text{ cm}^{-1}$ | $692\text{ cm}^{-1}$      |
| 6       | $3099; 2961; 2922\text{ cm}^{-1}$ | $1612\text{ cm}^{-1}$ | $1463\text{ cm}^{-1}$ | $748; 701\text{ cm}^{-1}$ |

### 3.1.2 Prueba de solubilidad

Para la determinación de los solventes a utilizar, se siguió una prueba sencilla de solubilidad de los compuestos en una gama de solventes, los resultados obtenidos se reportan en la tabla 3.7.

**Tabla 3.7** Resultados de las pruebas de solubilidad, donde S=Soluble P=Parcialmente soluble y N=No soluble.

| Solvente | Cloroformo | Acetato de etilo | Isopropanol | Etanol | Éter etílico | Butanol | Acetona | DMSO |
|----------|------------|------------------|-------------|--------|--------------|---------|---------|------|
| 1-Cu-1   | P          | N                | N           | P      | N            | P       | P       | S    |
| 1-Cu-2   | N          | N                | N           | N      | N            | N       | N       | S    |
| 1-Cu-3   | P          | N                | N           | N      | N            | N       | N       | S    |
| 1-Ni-1   | N          | P                | N           | N      | N            | P       | P       | S    |
| 1-Ni-2   | N          | N                | N           | N      | N            | N       | N       | S    |
| 2-Cu-2   | N          | N                | N           | P      | N            | N       | N       | S    |
| 1-Tf-1   | P          | P                | S           | S      | N            | S       | S       | S    |
| 1-Tf-2   | P          | P                | S           | S      | N            | S       | S       | S    |
| 2-Cu-1   | N          | N                | N           | P      | N            | N       | N       | S    |
| 2-Cu-3   | N          | N                | N           | N      | N            | N       | N       | S    |
| 3-Cu     | N          | N                | N           | N      | N            | N       | N       | P    |
| 3-Tf     | N          | N                | P           | P      | N            | P       | P       | S    |

La solubilidad de un compuesto químico es uno de los factores más importantes que determinan su actividad biológica. En muchos casos, un compuesto que muestra una buena actividad cuando es

administrado de cierta forma podría ser completamente inactivo si es administrado de alguna manera distinta, esto debido a que la cantidad adecuada del compuesto podría no alcanzar el sitio de acción, por lo que es probable que una solubilidad inadecuada disminuya la disponibilidad del compuesto en el organismo [30].

### 3.1.3 Rendimiento de reacción

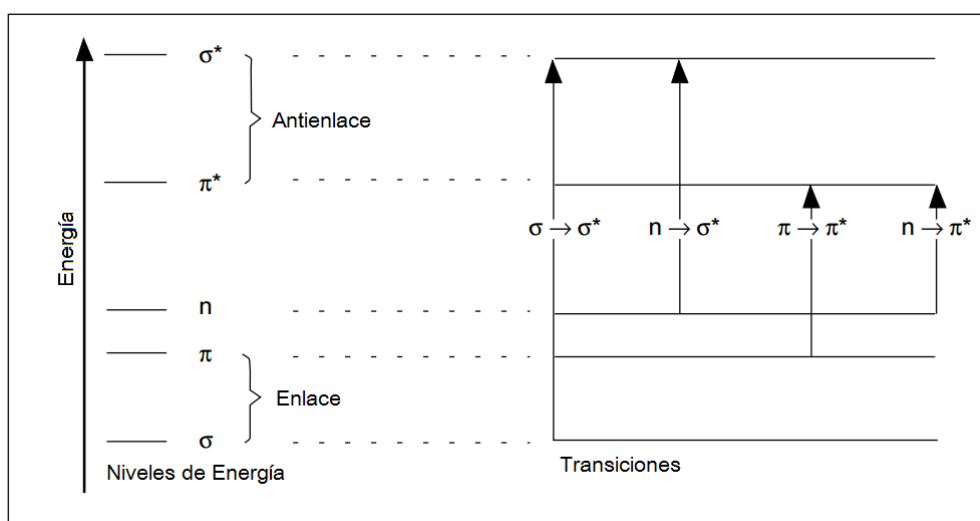
El rendimiento de las síntesis de los distintos complejos se puede ver influenciado por innumerables factores distintos, como la temperatura, el tipo de contenedor, la presión, el medio en el que se lleva a cabo la reacción y el estado de agregación de los reactivos. Dependiendo de estos factores, la reacción puede llevarse a cabo o no, o completarse parcialmente hasta llegar a un equilibrio que no siempre es lo que se calculó [31]. En la tabla 3.8 se presentan los resultados calculados para el rendimiento porcentual de reacción.

**Tabla 3.8** Rendimiento porcentual de reacciones de síntesis de los compuestos.

| Compuesto | Porcentaje de rendimiento |
|-----------|---------------------------|
| 1-Cu-1    | 58%                       |
| 1-Cu-2    | 58%                       |
| 1-Cu-3    | 68.4%                     |
| 1-Ni-1    | 64.7%                     |
| 1-Ni-2    | 65%                       |
| 2-Cu-2    | 42%                       |
| 2-Cu-1    | 66.9%                     |
| 2-Cu-3    | 46%                       |
| 3-Cu      | 89%                       |
| 3-Tf      | 81%                       |

### 3.1.4 Espectroscopia UV-Vis

Los electrones de valencia generalmente pueden encontrarse en uno de tres tipos distintos de orbitales: de enlace sencillo (llamados también  $\sigma$ ), de enlace doble o triple (enlaces tipo  $\pi$ ) y orbitales de no enlace (pares de electrones solos). Los orbitales de enlace sigma tienen a poseer una energía menor que los orbitales tipo  $\pi$ , los que a su vez tienen una menor energía que los orbitales de no enlace. Cuando absorben radiación electromagnética de la frecuencia adecuada, ocurre una transición de uno de estos orbitales a un orbital vacío, usualmente un orbital de anti enlace,  $\sigma^*$  o  $\pi^*$  (figura 3.18).



**Figura 3.18** Transiciones de electrones en espectroscopia UV/Vis.

La ley de Beer establece que la absorción es proporcional al número de moléculas (esto aplica solo a soluciones diluidas), por su parte, la ley de Lambert establece que la fracción de radiación absorbida es independiente de la intensidad de la radiación; de la combinación de estas dos leyes, se deriva la ley de Beer-Lambert (Ecuación 2).

$$\text{Log}_{10} \frac{I_o}{I} = \epsilon lc$$

**Eq. 2**

Dónde:  $I_o$  = intensidad de la radiación incidente

$I$  = intensidad de la radiación transmitida

$\epsilon$  = coeficiente de absorción molar (expresada en  $\text{mol}^{-1}$ ,  $\text{dm}^3$  o  $\text{cm}^{-1}$ )

$l$  = longitud del contenedor de la solución expresada en cm

$c$  = concentración de la especie absorbente

El valor de  $\text{Log}_{10} (I_o/I)$  se conoce absorbancia y puede leerse directamente del espectro, el coeficiente de absorción molar,  $\epsilon$ , es de utilidad ya que es independiente de la concentración y la longitud recorrida por la luz, mientras que la absorción depende de ambas. Otro tipo de información importante que se extrae con esta técnica es la longitud de onda a la que ocurre la absorción máxima, referida como  $\lambda_{\text{max}}$ . Cuando se conocen estos últimos dos datos, es posible identificar una sustancia, a pesar de que esta técnica no es comúnmente utilizada para la identificación. Una aplicación más frecuente es la determinación de la concentración, que puede hacerse cuando se conocen los valores de  $\epsilon$  y  $\lambda_{\text{max}}$ ; Estas dos variables son bastante influenciadas por la naturaleza del solvente, y para compuestos orgánicos, del grado de sustitución y conjugación [32].

Los resultados condensados de los análisis de espectroscopia UV-Vis para los complejos se pueden observar en la tabla 3.9 mientras que los resultados de este análisis para los ligantes se presentan en la tabla 3.9.

**Tabla 3.9** Absorciones características de los complejos sintetizados.

| Compuesto | Espectro de Absorción UV-Vis (DMSO $1 \times 10^{-4}$ mol)                                                                                                                                    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1-Cu-1    | $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}; \epsilon = 17,580 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 382 \text{ nm}; \epsilon = 1,980 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ |
| 1-Cu-2    | $\lambda_{\text{max}} = 269 \text{ nm}; \epsilon = 19,870 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}; \epsilon = 1,030 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ |
| 1-Cu-3    | $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}; \epsilon = 28,080 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 382 \text{ nm}; \epsilon = 5,030 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ |
| 1-Ni-1    | $\lambda_{\text{max}} = 271 \text{ nm}; \epsilon = 23,040 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}; \epsilon = 200 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$   |
| 1-Ni-2    | $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}; \epsilon = 21,170 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}; \epsilon = 70 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$    |
| 2-Cu-2    | $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}; \epsilon = 6,810 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}; \epsilon = 380 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$    |
| 1-Tf-1    | $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}; \epsilon = 12,400 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}; \epsilon = 850 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$   |
| 1-Tf-2    | $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}; \epsilon = 19,700 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}; \epsilon = 1990 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  |
| 2-Cu-1    | $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}; \epsilon = 22,220 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 452 \text{ nm}; \epsilon = 1630 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  |
| 2-Cu-3    | $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}; \epsilon = 19,010 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}; \epsilon = 1257 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  |
| 3-Cu      | $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}; \epsilon = 570 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 456 \text{ nm}; \epsilon = 210 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$      |
| 3-Tf      | $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}; \epsilon = 28,670 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$<br>$\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}; \epsilon = 250 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$   |

**Tabla 3.10** Absorciones características de ligantes.

| Ligante | Espectro de Absorción UV-Vis (DMSO $1 \times 10^{-4}$ mol)                                           |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       | $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$ ; $\varepsilon = 18,270 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  |
| 2       | $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$ ; $\varepsilon = 18,320 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  |
| 3       | $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ ; $\varepsilon = 970 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$     |
| 4       | $\lambda_{\text{max}} = 329 \text{ nm}$ ; $\varepsilon = 3043 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$    |
| 5       | $\lambda_{\text{max}} = 322 \text{ nm}$ ; $\varepsilon = 340.130 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ |

El ligante 1 expresó un pico con una absorptividad molar de  $18,270 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  en el espectro del ultra violeta a una longitud de onda de  $266 \text{ nm}$ , sin más picos cercanos al espectro visible; La formación de los complejos de coordinación da como resultado la presencia de un pico de absorción cercano al espectro de luz visible ( $\sim 400 \text{ nm}$ ), esto debido a la coordinación del metal y la estabilización del enlace a una energía menor, este pico sirve como indicador de formación de los complejos de coordinación.

Los complejos del ligante 1 con  $\text{CuCl}_2$  demostraron la presencia de un pico en la longitud de onda de  $\sim 380 \text{ nm}$  con absorptividades molares que subían hasta los  $5030 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  además del pico característico esperado para el ligante 1. En los compuestos resultantes de la combinación del ligante 1 con el  $\text{NiCl}_2$  se observó la presencia de un pico en la longitud de onda cercano a los  $400 \text{ nm}$ , sin embargo, la absorptividad molar fue relativamente baja, con solo  $70 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  lo que indica la formación del complejo de coordinación, pero a una concentración menor.

En los complejos del ligante 2 con el  $\text{CuCl}_2$  se presentó el pico que indica la coordinación del metal con el ligante al observar la presencia de una banda en los  $450 \text{ nm}$  con una absorptividad molar de alrededor de  $1250 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ; La presencia de dicho pico no es observable en el espectro de UV-Vis del ligante 2 solo, en este espectro, no existe ningún pico por encima de los  $410 \text{ nm}$ .

Los compuestos resultantes de la combinación del ligante 1 con el Triflato dieron como resultado una banda que indica la coordinación del metal con el ligante en la longitud de onda de los  $396 \text{ nm}$ , esta banda presento una absorptividad molar de hasta  $1980 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , cabe destacar que en el

espectro de UV-Vis del ligante 1, no se observa la presencia de ningún pico por encima de los 340 nm, de manera que los resultados obtenidos corroboran la coordinación del metal con el ligante.

Finalmente, los compuestos que resultaron de la combinación del ligante 3, tanto con el  $\text{CuCl}_2$  como con el Triflato de Cobre (II) presentaron la presencia de las bandas indicadoras de la coordinación del metal, en la longitud de onda de 456 nm para el  $\text{CuCl}_2$  y 460 nm para el Triflato, con absorptividades molares de  $210 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  y  $250 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  respectivamente. La presencia de un pico por encima de los  $\sim 396 \text{ nm}$  es indicador de la formación del complejo de coordinación, ya que no existen picos por encima de esta longitud de onda en el espectro de UV-Vis del ligante solo. La presencia del ensanchamiento de los picos se hacía longitudes de onda mayores con menor energía se interpreta como indicadores de las transiciones  $n-\pi^*$  y  $\pi-\pi^*$  en los ligantes 1, 2 y 3. Los compuestos cuya absorptividad molar es superior a los  $10,000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  proporciona una sensibilidad elevada, simplificando su detección. Estos compuestos se podrían clasificar como complejos de transferencia de carga Ligante-Metal debido a la capacidad de los ligantes e iones metálicos utilizados para actuar como dadores y aceptores de electrones y a la alta absorptividad molar de estos compuestos [33].

### *3.1.5 Punto de fusión*

El punto de fusión es una propiedad física empleada para identificar algún compuesto, es comúnmente utilizado como un indicador de pureza. El punto de fusión de un sólido se define como la temperatura a la que la fase sólida existe en equilibrio con la fase líquida a una atmósfera de presión [34].

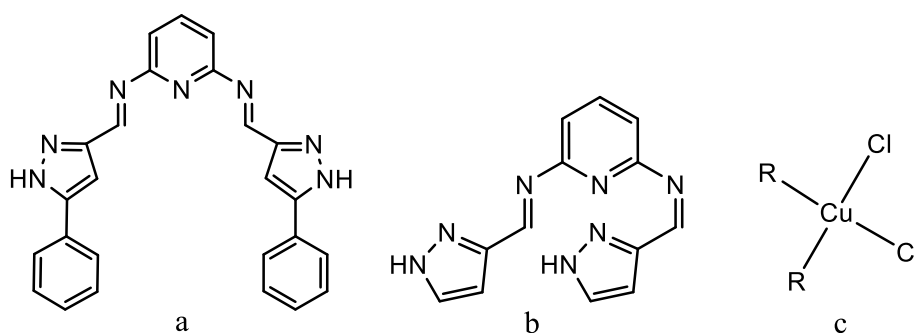
Además de especificar la temperatura de transición de fase sólida a líquida de una sustancia, y de ser usado como indicador para conocer si una sustancia es sólida o líquida bajo condiciones normales, el punto de fusión tiene numerosas aplicaciones en bioquímica y las ciencias ambientales debido a su relación con la solubilidad [35].

Los resultados obtenidos de las pruebas de punto de fusión en los complejos sintetizados se resumen en la tabla 3.11. Las temperaturas de fusión de los ligantes fueron de  $125^\circ\text{C}$  para el ligante 1, mientras que para los ligantes 2-6 la temperatura de fusión fue  $>300^\circ\text{C}$

**Tabla 3.11** Resumen de temperaturas de fusión.

| Muestra     | 1-Cu-1 | 1-Cu-2 | 1-Cu-3 | 1-Ni-1 | 1-Ni-2 | 2-Cu-2 | 1-Tf-1 | 1-Tf-2 | 2-Cu-1 | 2-Cu-3 | 3-Cu | 3-Tf |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| Temp.<br>°C | >300   | 172    | >300   | >300   | >300   | >300   | 205    | 105    | >300   | >300   | >300 | >300 |

Puede observarse como la mayoría de complejos posee una temperatura de fusión muy alta, en casi todos los casos, esta temperatura excede los 300 °C. Las altas temperaturas de fusión están relacionadas a una mayor cantidad de fuerzas intermoleculares y partiendo del tamaño de los ligantes iniciales, tal y como se ve en la figura 3.19, por tanto, es de esperarse que los complejos sintetizados posean temperaturas de fusión elevadas. Para sistemas moleculares, existe una regla empírica simple que relaciona el punto de fusión y la simetría de las moléculas de una sustancia, esta regla se denomina la regla de Carnelley, y dicta que “Entre dos o más compuestos isoméricos, aquellos cuyos átomos estén organizados de manera más simétrica compacta, tenderán a tener una temperatura de fusión mayor que la de aquellos cuya configuración atómica sea asimétrica o en forma de cadenas largas” [36]. Esta regla cobra sentido al observar la estructura química de los ligantes utilizados, puede observarse en la figura 3.19a y 3.19b que los ligantes 2 y 3 (respectivamente) poseen estructuras químicas propuestas muy simétricas, además de que la estructura de coordinación propuesta que se obtiene de la reacción del ligante 1 con la sal de cobre, da también como resultado una molécula simétrica, tal como se observa en la figura 3.19c.



**Figura 3.19** Estructura de los ligantes “2” (a) y “3” (b). Estructura propuesta para complejos resultantes de la reacción del ligante “1” con  $\text{CuCl}_2$  (c) donde R es el ligante.

### 3.2 Análisis antimicrobiano

Se utilizó la *Escherichia coli* como bacteria de estudio por ser una bacteria que inicia su crecimiento en el intestino del ser humano a las pocas horas después de nacer, este microorganismo es considerada flora normal, sin embargo, en ciertos casos puede representar una amenaza al actuar como organismo patógeno, causando distintos tipos de patologías, entre las cuales destacan la diarrea. La *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia* [37].

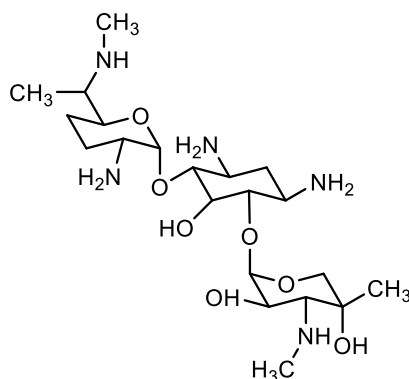
La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, es un organismo patógeno oportunista que normalmente es encontrada en el suelo y en las superficies de ambientes acuosos. Su adaptabilidad y gran resistencia a los antibióticos le permiten sobrevivir en una variedad de ambientes naturales y artificiales, incluidas superficies de uso cotidiano en las instalaciones dedicadas al cuidado de la salud, tales como hospitales y clínicas. Las infecciones causadas por este microorganismo usualmente son nosocomiales, y la mayoría está asociada a pacientes con defensas bajas, como las de aquellos que sufren de quemaduras severas o fibrosis quística [38].

La *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva de forma esférica, de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, estos organismos forman agrupaciones similares a los racimos de uvas, son comensales usualmente encontradas en la piel, en glándulas de la piel y en membranas mucosas, particularmente la nariz. Se estima que del 20% al 30% de las personas son portadores de esta bacteria, lo que representa un riesgo de infección elevado para aquellas personas con sistemas inmunológicos debilitados. Las infecciones por este tipo de microorganismo usualmente son contraídas en hospitales, y pueden presentarse en piel, tejidos suaves y el sistema respiratorio, aunque en casos severos puede llegar a ser causante de infecciones profundas graves, como endocarditis o la osteomielitis [39].

#### 3.2.1 Interpretación de las tablas de resultados

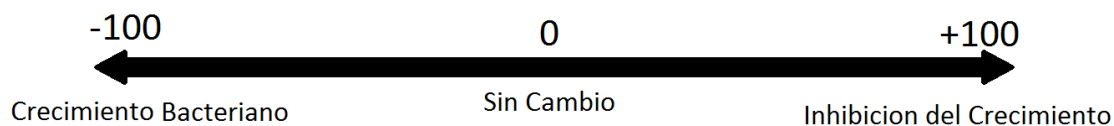
Los resultados de las pruebas antimicrobianas se obtuvieron originalmente como absorciones de cada uno de los pozos de la micro placa a la longitud de onda de 492 nm. Los datos fueron transformados a porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 1, mostrada en el capítulo 2 y

comparados contra un control de inhibición positiva, un antibiótico de uso común presente en el mercado, llamado gentamicina, cuya estructura se representa en la imagen 3.20.



**Figura 3.20** Estructura química de la gentamicina, antibiótico utilizado como control positivo.

Los valores de los resultados de inhibición son expresados en términos de la concentración mínima inhibitoria o MIC, por sus siglas en inglés (Minimal Inhibitory Concentration), la efectividad antimicrobiana de un compuesto usualmente se establece en términos de su MIC por sus siglas en inglés, esto quiere decir, la mínima concentración que se requiere para que el compuesto sea capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo [40]. Además, los resultados se expresan también en porcentajes positivo y negativo, en donde un resultado positivo significa que el compuesto presentó propiedades que le permitieron inhibir el crecimiento de la bacteria, mientras que un resultado negativo significa que el microorganismo tuvo los nutrientes requeridos para su crecimiento, aun con el compuesto en el medio de cultivo (figura 3.21).



**Figura 3.21** Escala de interpretación de los resultados de bioinhibición.

Las tablas siguientes resumen los resultados significativos de las lecturas de 24 y 48 horas obtenidos en el ensayo de inhibición para los compuestos evaluados sobre las tres líneas bacterianas estudiadas, los resultados están expresados en concentración mínima inhibitoria (tabla 3.12) y en porcentaje de inhibición (tabla 3.13).

**Tabla 3.12** Resultados de concentración mínima inhibitoria (MIC) para los compuestos evaluados, los valores se expresan en mg/ml (“-” = no hubo inhibición).

| Compuesto          | 24 horas       |                      |                  | 48 horas       |                      |                  |
|--------------------|----------------|----------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|
|                    | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| <b>1-Cu-1</b>      | 0.003125       | 0.003125             | 0.003125         | 0.000625       | 0.003125             | 0.025            |
| <b>1-Cu-2</b>      | 0.000625       | 0.003125             | 0.2              | -              | 0.003125             | 0.2              |
| <b>1-Cu-3</b>      | 0.0125         | 0.003125             | -                | -              | 0.003125             | -                |
| <b>1-Ni-1</b>      | 0.0125         | 0.003125             | 0.003125         | 0.003125       | 0.003125             | 0.003125         |
| <b>1-Ni-2</b>      | 0.4            | 0.003125             | -                | 0.4            | 0.003125             | 0.0125           |
| <b>2-Cu-2</b>      | -              | 0.003125             | -                | -              | 0.003125             | -                |
| <b>1-Tf-1</b>      | 0.0125         | 0.003125             | -                | -              | 0.003125             | -                |
| <b>1-Tf-2</b>      | 0.000625       | 0.003125             | -                | 0.2            | 0.003125             | -                |
| <b>2-Cu-1</b>      | 0.003125       | 0.003125             | -                | 0.003125       | 0.003125             | -                |
| <b>2-Cu-3</b>      | -              | 0.003125             | -                | -              | 0.003125             | 0.1              |
| <b>3-Cu</b>        | 0.1            | -                    | 0.4              | 0.1            | -                    | 0.003125         |
| <b>4-Cu</b>        | 0.4            | 0.4                  | 0.2              | 0.4            | -                    | -                |
| <b>6-Cu</b>        | -              | -                    | 0.4              | 0.003125       | -                    | 0.4              |
| <b>Ligante 1</b>   | 0.003125       | 0.003125             | -                | 0.0125         | 0.003125             | -                |
| <b>Ligante 2</b>   | 0.003125       | 0.003125             | -                | 0.003125       | 0.003125             | 0.025            |
| <b>Ligante 3</b>   | 0.003125       | 0.003125             | 0.003125         | 0.003125       | -                    | 0.003125         |
| <b>Ligante 4</b>   | 0.003125       | -                    | -                | 0.003125       | -                    | 0.003125         |
| <b>Ligante 5</b>   | 0.003125       | -                    | -                | 0.003125       | -                    | 0.003125         |
| <b>Gentamicina</b> | 0.003125       | 0.003125             | 0.003125         | 0.003125       | 0.003125             | 0.003125         |

**Tabla 3.13** Resultados condensados expresados en porcentajes de inhibición de los compuestos evaluados (“-” = no hubo inhibición).

| Compuesto   | 24 horas       |                      |                  | 48 horas       |                      |                  |
|-------------|----------------|----------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|
|             | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| 1-Cu-1      | 5.36           | 19.90                | 2.37             | 0.34           | 15.87                | 2.01             |
| 1-Cu-2      | 2.31           | 20.16                | 0.45             | -              | 13.80                | 1.58             |
| 1-Cu-3      | 7.35           | 19.43                | -                | -              | 10.88                | -                |
| 1-Ni-1      | 13.41          | 15.77                | 10.42            | 2.41           | 20.80                | 0.35             |
| 1-Ni-2      | 0.39           | 8.01                 | -                | 3.56           | 12.85                | 2.4              |
| 2-Cu-2      | -              | 19.24                | -                | -              | 7.55                 | -                |
| 1-Tf-1      | 3.03           | 23.07                | -                | -              | 9.2                  | -                |
| 1-Tf-2      | 2.63           | 23.63                | -                | 7.92           | 14.89                | -                |
| 2-Cu-1      | 6.22           | 18.69                | -                | 5.25           | 18.82                | -                |
| 2-Cu-3      | -              | 22.47                | -                | -              | 15.45                | 1.8              |
| 3-Cu        | -              | -                    | -                | -              | -                    | 20.6             |
| 4-Cu        | -              | -                    | -                | -              | -                    | -                |
| 6-Cu        | -              | -                    | -                | -              | -                    | -                |
| Ligante 1   | 5.07           | 11.49                | -                | 1.35           | 9.85                 | -                |
| Ligante 2   | 7.39           | 10.36                | -                | 4.23           | 13.04                | 1.57             |
| Ligante 3   | 26.4           | 9.7                  | 21.3             | 35.1           | -                    | 55               |
| Ligante 4   | 11.6           | -                    | -                | 12.5           | -                    | -                |
| Ligante 5   | 91.9           | -                    | -                | 92.2           | -                    | 19.1             |
| Gentamicina | 5.05           | 26.98                | 32.23            | 6.96           | 13.14                | 31               |

### 3.2.5 Discusión de los resultados de inhibición.

Los ensayos de efecto inhibitorio demostraron que los distintos complejos presentan una actividad mayor hacia bacterias Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) en comparación con la línea bacteriana Gram positiva utilizada durante el estudio (*S. aureus*). De entre los compuestos cuya actividad fue destacable, al inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli*, se encuentran los

compuestos 1-Cu-1 y 2-Cu-1, que presentaron una actividad mejor que la gentamicina al poseer un mayor porcentaje de inhibición transcurridas 24 horas. A su vez, los compuestos 1-Cu-1, 1-Cu-2, 1-Tf-2 y 2-Cu-3 resultaron poseer un efecto inhibitorio *hacia P. aeruginosa* comparable con el control a las 24 y 48 horas, e incluso superando al control en el caso de 1-Cu-1 y 2-Cu-3 a las 48 horas. Ningún complejo tuvo una actividad de inhibición de *S. aureus* cercana a la gentamicina. Los complejos con la menor actividad hacia las tres líneas bacterianas estudiadas que se registraron fueron el 3-Cu, 4-Cu y el 6-Cu, ya que, a pesar de tener una concentración mínima inhibitoria (MIC), no presentaron un porcentaje de inhibición considerable. Esto quiere decir, que para que un compuesto se considere como un antibiótico eficiente, debe poseer un porcentaje de inhibición alto con una MIC muy pequeña, de manera que se necesite administrar una baja cantidad del compuesto para inhibir el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos, de esta manera, a pesar que en los resultados se reportan compuestos cuya MIC se compara con la gentamicina usada como antibiótico control, el porcentaje de inhibición de estos compuestos es muy bajo como para ser considerado como eficaz, y por consiguiente, son descartados como candidatos prometedores.

La mayoría de los ligantes por su propia cuenta parecen tener una actividad de inhibición mucho más alta que sus complejos con otros metales ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  y  $\text{TfCu(II)}$ ) tal es el caso de los ligantes 2, 3 y 4. En el caso específico del ligante 5, no se evaluó la actividad de su complejo, sin embargo, en ligante en si posee una actividad inhibitoria muy fuerte hacia la *E. coli*, tanto a las 24 como a las 48 horas. El ligante 1, por otro lado, mejoró su actividad de inhibición al ser coordinado con las distintas sales metálicas, dándole en ciertos casos, mejores cualidades antibacterianas que la gentamicina. Basados en los resultados obtenidos, se considera que, para estudios posteriores, los ligantes 3 y 5 podrían considerarse como candidatos prometedores, y de la misma manera, los complejos 1-Ni-1, 1-Tf-2 y 1-Cu-1. Para comprender de manera acertada los mecanismos de acción de estos distintos compuestos sobre la actividad bacteriana, es necesario realizar ensayos de inhibición y acción específicos, dependiendo de la ruta metabólica que se desea estudiar, ya que los mecanismos por los cuales los compuestos químicos presentan actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento o promover la muerte de las células bacterianas son muy variados, algunos de estos mecanismos de acción de los principales grupos de antimicrobianos se presentan en la tabla 3.13 [41].

**Tabla 3.14** Principales mecanismos de acción de grupos de antimicrobianos representativos.

| Mecanismo de acción                                                | Grupos              | Compuestos representativos                            |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------|
| Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana                   | $\beta$ -lactámicos | Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactams, Carbapenems |
|                                                                    | Glucopéptidos       |                                                       |
|                                                                    | Bacitracina         |                                                       |
|                                                                    | Isoxazolidinas      |                                                       |
|                                                                    | Fosfonopéptidos     |                                                       |
| Alteración de la membrana citoplasmática                           | Polimixinas         | Daptomicina, Gramicidinas, Tirocidinas                |
|                                                                    | Lipopéptidos        |                                                       |
|                                                                    | Ionóforos           |                                                       |
|                                                                    | Formadores de poros |                                                       |
| Inhibición de la síntesis proteica                                 | Ácido Fusídico      | Gentamicina, Cloranfenicol, Mupirocina                |
|                                                                    | Anfenicoles         |                                                       |
|                                                                    | Estreptograminas    |                                                       |
|                                                                    | Lincosamidas        |                                                       |
|                                                                    | Macrólidos          |                                                       |
|                                                                    | Mupirocina          |                                                       |
|                                                                    | Oxazolidinonas      |                                                       |
| Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos | Tetraciclinas       | Norfloxacino, Ciprofloxacino, Moxifloxacino           |
|                                                                    | Quinolonas          |                                                       |
|                                                                    | Rifamicinas         |                                                       |
|                                                                    | Nitroimidazoles     |                                                       |
| Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos                     | Nitrofuranos        | Trimetoprima, Cotrimoxazol, Sulfametoxazol            |
|                                                                    | Sulfonamidas        |                                                       |
| Inhibidores de $\beta$ -lactamasas                                 | Diaminopirimidinas  | Ácido calvulánico, Sulbactam, Tazobactam              |
|                                                                    |                     |                                                       |

Valvo, J. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica. [41]

### 3.3 Ensayo de Citotoxicidad

Las propiedades antitumorales de las soluciones en DMSO de los compuestos fueron evaluados mediante el ensayo de viabilidad de las células de cáncer de colon humanas HCT-116, caracterizadas por ser agresivas, inestables e independientes de hormonas de crecimiento [42]. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de absorbancia de la muestra con respecto al control de referencia. El IC<sub>50</sub> representa la concentración del compuesto que posee un efecto letal en el 50% de las células, los resultados del análisis se resumen en la tabla 3.15.

**Tabla 3.15** Resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad sobre células HCT-116, utilizando Etopósido como control positivo.

| Compuesto | IC <sub>50</sub> (mg/ml) |
|-----------|--------------------------|
| 3-Cu      | 1                        |
| 4-Cu      | 0.3                      |
| 6-Cu      | 2.9                      |
| Ligante 3 | 0.9                      |
| Ligante 4 | -                        |
| Ligante 5 | 0.2                      |
| Etopósido | 0.3                      |

De los resultados puede enfatizarse que los dos compuestos con mejor actividad anticancerígena son el ligante 5 y el compuesto 4-Cu, al requerir una concentración igual o menor que el control positivo (Etopósido) para prevenir el crecimiento de al menos el 50 % de las células. El ligante 3 y su complejo 3-Cu, junto con el ligante 6 resultaron ser los compuestos menos eficaces en el ensayo. La explicación del motivo por el cual existe una variación entre el IC<sub>50</sub> del ligante con respecto a su complejo, o por qué compuestos con alguna estructura o grupos funcionales particulares poseen más actividad antitumoral que otros queda fuera del alcance de esta tesis, existe una múltiple cantidad de mecanismos de acción sobre los cuales los distintos compuestos pueden

actuar sobre las células cancerígenas, para la determinación de estos mecanismos se requieren numerosas pruebas cuyo estudio podría representar otra tesis por sí misma. Algunos ejemplos del mecanismo de acción de distintos fármacos anticancerígenos pueden encontrarse en la tabla 3.16 [43].

**Tabla 3.16** Principales mecanismos de acción y fármacos anticancerígenos representativos.

| Mecanismo de acción                       | Definición                                            | Ejemplo de sitio de acción (Fármaco)               |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Apoptosis                                 | Activación directa de vías de apoptosis               | BCL2                                               |
| Señalización                              | Interferencia en la transducción de señales           | BCR-ABL (Glivec)                                   |
| Invasión/Metástasis                       | Inhibición de propagación tumoral                     | Catepsina K                                        |
| Senescencia                               | Inducción de senescencia                              | Telomerasa                                         |
| Angiogénesis                              | Interferencia del suministro sanguíneo al tumor       | Facto de crecimiento vascular endotelial (Avastin) |
| Proteínas de membrana asociadas a tumores | Citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos        | CD20 (Rituxan)                                     |
| Replicación/Citocinesis                   | Interferencia en la síntesis de ADN, división celular | Microtúbulos (Taxol)                               |
| Metabolismo                               | Reducción de metabolito esencial                      | Timidilato Sintasa (5-FU)                          |
| Rotación de proteínas                     | Inhibición o aceleración de la rotación de proteínas  | Proteasoma (Velcade)                               |
| Epigenética                               | Remodelación de cromatina, metilación de ADN          | Histona deacetilasa                                |
| Respuesta al estrés                       | Interferencia de amortiguadores de estrés celulares   | HSP90                                              |

Kamb, A. (2005). What's wrong with our cancer models? Nature Reviews | Drug Discovery [43]

## Conclusiones.

Los compuestos evaluados, tanto complejos como sus ligantes tienen gran potencial de ser utilizados como sustancias de interés farmacológico debido a la naturaleza bioactiva de su estructura molecular, particularmente del anillo de pirazol y la Bis (imino) piridina, que actúan como farmacóforo en estas moléculas. Las técnicas de caracterización espectroscópica utilizadas para la determinación de las cualidades de las moléculas arrojaron resultados presuntivos sobre las características de coordinación entre los ligantes y las sales metálicas, sin embargo, dichos resultados no son suficientes para dar respuestas conclusivas sobre la estructura y las características moleculares específicas de los compuestos, para esto es necesario realizar otros ensayo como RMN, TGA, y DRX, de manera que se puedan estudiar la geometría y los mecanismos de reacción particulares.

Se observaron diferencias notables en la actividad de inhibición de crecimiento bacteriano entre los ligantes solos y sus complejos con distintas sales metálicas, en el caso de los ligantes 2, 3 y 4, estos compuestos de manera individual resultaron poseer una actividad de bioinhibición mayor que la observada en sus complejos con  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  y  $\text{TfCu(II)}$ , mientras que para el ligante 1 la hipótesis resultó verdadera, ya que la presencia de las distintas sales metálicas aumentó el espectro de acción del compuesto. La mayoría de las sustancias evaluadas demostraron poseer una actividad inhibitoria mayor hacia las cepas bacterianas Gram negativas en comparación con las líneas bacterianas Gram positivas. Basados en los resultados de las pruebas, se puede concluir que los compuestos con mejor actividad de inhibición fueron los ligantes 3 y 5 y los complejos 1-Ni-1, 1-Tf-2 y 1-Cu-1.

Por su parte, los resultados del ensayo de citotoxicidad hacia células de cáncer de colon demostraron que los compuestos con mejor actividad anticancerígena fueron el complejo 4-Cu y el ligante 5, ya que requirieron una concentración menor que la del fármaco control para prevenir el crecimiento de al menos el 50% de las células cancerígenas, de esto se concluye que los compuestos antes mencionados tienen el potencial de ser utilizados como fármacos quimioterapéuticos en estudios posteriores, mismos que pueden retomar los resultados producidos en este proyecto, con el potencial de complementar el contenido al explicar mecanismos de reacción, acción y características químicas específicas de los compuestos con actividad biológica destacada reportados en este trabajo.

## Experimental

### 1-Cu-1 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + CuCl<sub>2</sub>

Para llevar a cabo la reacción, inicialmente se utilizaron 0.040 g (0.2512 mMol) de 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.020 g (0.1173 mMol) de sal de CuCl<sub>2</sub>, cada uno de los componentes se disolvió de manera individual en aprox. 5 ml de metanol y se agitaron hasta lograr una solución homogénea. Una vez disueltos completamente, se mezclaron y se dejó la solución resultante en agitación, dando como resultado un precipitado color café oscuro. Rendimiento = 0.0334 g, 58%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup> mol)  $\lambda_{\text{max}}$  = 266 nm,  $\epsilon$  = 17,580 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>;  $\lambda_{\text{max}}$  = 382 nm,  $\epsilon$  = 1980 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3133 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1615 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), 758 cm<sup>-1</sup> y 691 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### 1-Cu-2 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + CuCl<sub>2</sub>

Se realizó una preparación con una relación estequiométrica de 1:1, se añadieron 0.040 g (0.2512 mMol) de ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole en 0.0428 g (0.25106 mMol) de CuCl<sub>2</sub>, cada uno se disolvió por separado en aprox. 5 ml de metanol para posteriormente hacerlos reaccionar y dejar el producto resultante en agitación. Al momento de mezclar los componentes, se observó la formación instantánea de un precipitado color café amarillento. Rendimiento = 0.0714 g, 58%. PF = 172°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup> mol)  $\lambda_{\text{max}}$  = 264 nm,  $\epsilon$  = 19,870 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>;  $\lambda_{\text{max}}$  = 370 nm,  $\epsilon$  = 1030 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3236 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1613 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), 761 cm<sup>-1</sup> y 691 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### 1-Cu-3 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + CuCl<sub>2</sub>

Se siguió el mismo protocolo de preparación usado en la síntesis de 1-Cu-2, pero con un cambio en la relación molar de ligante/metal de 2:1, para lo que se pesaron 0.020 g (0.12564 mMol) de ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.0107 g (0.06276 mMol) de CuCl<sub>2</sub>; ambos disueltos en metanol. Al mezclar los componentes se observó un rápido cambio de coloración, pero sin la formación de un precipitado inmediato. El precipitado se formó transcurridos aprox. 10 minutos en agitación. Rendimiento = 0.021 g, 68.4%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup> mol)  $\lambda_{\text{max}}$  = 273 nm,  $\epsilon$  = 28,080 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>;  $\lambda_{\text{max}}$  = 382 nm,  $\epsilon$  = 5030 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3225 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1611 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), 756 cm<sup>-1</sup> y 692 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### **1-Ni-1 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + NiCl<sub>2</sub>**

Se pesaron 0.040 g (0.2512 mMol) de ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.020 g (0.07307 mMol) de NiCl<sub>2</sub>. Ambos compuestos fueron disueltos en aprox. 5 ml de metanol en viales separados. Una vez completamente disueltos, se mezclaron y se dejaron en agitación. No hubo reacción instantánea pero luego de unos minutos en agitación se observó la formación de un precipitado color verde claro. Rendimiento = 0.028 g, 64.7%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup>)  $\lambda_{\max}$  = 271 nm,  $\epsilon$  = 23040 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max}$  = 340 nm,  $\epsilon$  = 200 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3329, 3257, 3113 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1607 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), 761 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### **1-Ni-2 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + NiCl<sub>2</sub>**

La reacción se condujo preparando una relación estequiométrica de 2:1 del ligante y la sal respectivamente, se disolvieron 0.040 g (0.2512 mMol) de ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.0344 g (0.12568 mMol) de cloruro de níquel hexahidratado con metanol en viales separados. Para reaccionar, se mezclaron ambas soluciones y se dejó en agitación pues no se observó una reacción inmediata, sin embargo, después de unos minutos se formó un precipitado color verde claro. Rendimiento = 0.0485 g, 65.17%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup> mol)  $\lambda_{\max}$  = 269 nm,  $\epsilon$  = 21,170 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max}$  = 415 nm,  $\epsilon$  = 70 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3330, 3258, 3112 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1605 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>) 761.61 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### **2-Cu-2 | 2 + CuCl<sub>2</sub>**

Para sintetizar este complejo, se pesaron 0.010 g (0.02395 mMol) del ligante 2 y se suspendió en 5 ml de metanol (no se logró una disolución completa, se limitó a una suspensión homogénea.), esta suspensión se mezcló con una solución de 0.008 g (0.04693 mMol) de CuCl<sub>2</sub> en metanol. Para lograr una relación molar de 1:2 L: M. Durante la reacción se observó un cambio de coloración de la suspensión a café, posteriormente, la solución se volvió transparente con una tonalidad café. Rendimiento = 0.006 g, 42%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO 1x10<sup>-4</sup> mol)  $\lambda_{\max}$  = 294 nm,  $\epsilon$  = 6,810 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max}$  = 445 nm,  $\epsilon$  = 380 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 1571 cm<sup>-1</sup> (NH<sub>2</sub>), 1490 cm<sup>-1</sup> (C-H<sub>2</sub>), 764 cm<sup>-1</sup> y 696 cm<sup>-1</sup> (C=C)

### 1-Tf-1 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + Triflato cobre (II)

Debido a la reactividad del Triflato de cobre (II) con el agua, esta reacción se llevó a cabo dentro de una caja seca MBraun, en atmosfera inerte de argón. Se preparó una relación molar de 2:1 del ligante con la sal de cobre, se pesaron 0.025 g (0.015705 mMol) del ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.0284 g (0.07852 mMol) de Triflato de cobre (II), disolviéndolos en metanol seco para posteriormente hacerlos reaccionar. Se observó un cambio de coloración inmediato, tornándose a un color café cobrizo transparente que se dejó en agitación. PF = 205°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 263$  nm,  $\epsilon = 12,400$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ .  $\lambda_{\max} = 396$  nm,  $\epsilon = 850$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ . FTIR  $1604$   $\text{cm}^{-1}$  (C=N),  $1567$   $\text{cm}^{-1}$  (C=C),  $1240$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1224$   $\text{cm}^{-1}$  (Triflato).

### 1-Tf-2 | 3-Amino-5-Phenylpyrazole + Triflato cobre (II)

Este compuesto se sintetizó en la caja seca de la misma manera que el complejo 1-Tf-1, con la diferencia que la relación estequiométrica preparada fue distinta, de 4:1 del ligante con respecto al triflato de cobre (II), para lo que se pesaron 0.025 g (0.015705 mMol) del ligante 3-Amino-5-Phenylpyrazole y 0.0142 g (0.03926 mMol) del Triflato, la preparación fue la misma, observándose una reacción inmediata al mezclarlos, y la formación de un precipitado color verde grisáceo oscuro después de 24 horas de agitación. PF = 105°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 266$  nm,  $\epsilon = 19,700$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ .  $\lambda_{\max} = 396$  nm,  $\epsilon = 1990$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ . FTIR  $1622$   $\text{cm}^{-1}$  (C=N),  $1573$   $\text{cm}^{-1}$  (C=C),  $1248$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1226$   $\text{cm}^{-1}$  (Triflato)

### 2-Cu-1 | 2 + CuCl<sub>2</sub>

Se siguió el mismo protocolo de preparación que el usado para preparar el complejo 2-Cu-2, se pesaron 0.020 g (0.04790 mMol) de ligante 2 y 0.0081 g (0.04751 mMol) de CuCl<sub>2</sub> para dar una relación molar de 1:1, al reaccionarlos se observó un cambio de coloración instantáneo a café, se dejó agitar. Rendimiento = 0.0187 g, 66.9%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 267$  nm,  $\epsilon = 22,220$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ .  $\lambda_{\max} = 452$  nm,  $\epsilon = 1630$  L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mol}^{-1}$ . FTIR  $3200$   $\text{cm}^{-1}$  (N-H),  $1567$   $\text{cm}^{-1}$  (C=C),  $1456$   $\text{cm}^{-1}$  (C-H),  $763$   $\text{cm}^{-1}$  y  $696$   $\text{cm}^{-1}$  (C=C).

### **2-Cu-3 | 2 + CuCl<sub>2</sub>**

Se pesaron 0.020 g (0.04790 mMol) de ligante 2 y 0.0244 g (0.14313 mMol) de sal de cobre, para dar una relación molar de 1:3 L:M y preparar el complejo bajo el mismo protocolo de preparación seguido para 2-Cu-1, al momento de la reacción se observó un cambio de color café ligeramente verdoso. Rendimiento = 0.038 g, 46%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 266$  nm,  $\epsilon = 19,010$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max} = 450$  nm,  $\epsilon = 1257$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR 3191 cm<sup>-1</sup> (N-H), 1568 cm<sup>-1</sup> (C=C), 1489 cm<sup>-1</sup> (C-H), 765 cm<sup>-1</sup> y 767 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### **3-Cu | 3 + CuCl<sub>2</sub>**

Se realizó una disolución de 0.0084 g (0.04927 mMol) de sal de cobre en metanol y se suspendieron 0.013g (0.04904 mMol) del ligante en el mismo solvente, esto para hacer una reacción con una relación estequiométrica de 1:1, observado un cambio de color muy ligero a verde amarillento claro. Al ser tan ligero el cambio de coloración, se decidió multiplicar por 2 la cantidad de CuCl<sub>2</sub>, para lo que se agregaron, otros 8.4 mg y dar una relación molar final de 1:2. Se dejó agitar. Rendimiento = 0.00834 g, 89%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 278$  nm,  $\epsilon = 560$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max} = 456$  nm,  $\epsilon = 210$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR= 1737 cm<sup>-1</sup> (C=N), 1456 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>), 763 cm<sup>-1</sup>, 650 cm<sup>-1</sup> (C=C).

### **3-Tf | 3 + Triflato de cobre (II)**

Dentro de la caja seca, se prepararon las soluciones de ligante y Triflato de cobre, utilizando 0.013 g (0.04904 mMol) del ligante 3 y 0.0327 g (0.09041 mMol) de Triflato de cobre (II), para dar una relación molar de 1:2. Ambos reactivos se disolvieron en metanol seco para posteriormente hacerlos reaccionar, dando como resultado una suspensión color café claro ligeramente verdoso que se dejó agitar. Rendimiento = 0.0462 g, 81%. PF > 300°C. UV-Vis (DMSO  $1 \times 10^{-4}$  mol)  $\lambda_{\max} = 278$  nm,  $\epsilon = 28,670$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max} = 460$  nm,  $\epsilon = 250$  L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. FTIR= 1749 cm<sup>-1</sup> (C=N), 1275 cm<sup>-1</sup>, 1225 cm<sup>-1</sup> (Triflato), 766 cm<sup>-1</sup>, 627 cm<sup>-1</sup> (C=C).

## Referencias

- [1] El-Gamel, N. E., & Farghaly, T. A. (2013). Design and synthesis of novel complexes containing N-phenyl-1H-pyrazole moiety: Ni complex as potential antifungal and antiproliferative compound. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 469-475.
- [2] Universidad de Málaga, España, D. Collado. (2014). Capítulo 4. Azoles. In *Ampliación de química orgánica avanzada. Química de heterociclos*. España.
- [3] Elguero, J. (1984). Pyrazoles and their Benzo Derivatives. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 167-303.
- [4] Kumar, K. A., & Jayaroopa, P. (2013). Pyrazoles: Synthetic Strategies and Their Pharmaceutical Applications-An Overview, 5(4), 1473–1486.
- [5] Trofimenko, S. (1972). THE COORDINATION CHEMISTRY OF PYRAZOLE-DERIVED LIGANDS, 1657(9).
- [6] S. Natarajan (S/F). Coordination Chemistry and Ligand Exchange reactions in the Synthesis of New Functional Inorganic Compounds. Framework Solids Laboratory, Solid State and Structural Chemistry Unit, IISc. Retrieved November 2016 from: [https://fen.nsu.ru/posob/htt/xtt\\_natarajan\\_mof.pdf](https://fen.nsu.ru/posob/htt/xtt_natarajan_mof.pdf)
- [7] Mukherjee, R. (2000). Coordination chemistry with pyrazole-based chelating ligands: molecular structural aspects. *Coordination Chemistry Reviews*, 203(1), 151–218.
- [8] Keter, F. K., & Darkwa, J. (2012). Perspective: The potential of pyrazole-based compounds in medicine. *Biometals*, 25(1), 9-21.
- [9] Brodowska, K., & Łodyga-Chruścińska, E. (2014). Schiff bases - Interesting range of applications in various fields of science. *Chemik*, 68(2), 129–134.
- [10] Pernak, J. (2000). Synthesis of 3-substituted pyridinium salts. *Arkivoc*, 2000(6), 889–904.
- [11] Evans, D. A., Lectka, T., & Miller, S. J. (1993). Bis (imine) -Copper Complexes as Chiral Lewis Diels-Alder Reaction. *Tetrahedron Letters*, 34(44), 7027–7030.
- [12] Stewart, B. W., & Wild, C. (2014). World cancer report 2014.
- [13] Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E., & Mansour, V. H. (1969). Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 222(5191), 385-386.
- [14] Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J., & Meyer, M. (2008). In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II)

- complexes as anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(1), 127-138.
- [15] Holford, J., Sharp, S., Murrer, B., Abrams, M., & Kelland, L. (1998). In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473. *Br J Cancer British Journal of Cancer*, 77(3), 366-373.
- [16] Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256(1), 42-49.
- [17] CDC. (2016). Antibiotic / Antimicrobial Resistance. Retrieved March 16, 2016, from <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
- [18] WHO. (2015, April). Antimicrobial resistance. Retrieved March 16, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- [19] Kumar, R. S., Arif, I. A., Ahamed, A., & Idhayadhulla, A. (2015). Anti-inflammatory and antimicrobial activities of novel pyrazole analogues. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- [20] M. M., & U. C. (2008). Diabetes mellitus tipo 2: Protocolo de actuación Grupo de Estudio de la Diabetes en Atención Primaria de Salud (GEDAPS) de la Societat Catalana de Medicina Familiar i Comunitària Coordinador del protocolo.
- [21] Doddaramappa, S. D., Rai, K. L., Srikantamurthy, N., C., & Chethan, J. (2015). Novel 5-functionalized-pyrazoles: Synthesis, characterization and pharmacological screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3671-3675.
- [22] Kupcewicz, B., Sobiesiak, K., Malinowska, K., Koprowska, K., Czyz, M., Keppler, B., & Budzisz, E. (2012). Copper (II) complexes with derivatives of pyrazole as potential antioxidant enzyme mimics. *Med Chem Res*, 22(5), 2395-2402.
- [23] Hwang, J. Y., Kim, H., Park, D., Choi, J., Baek, S. M., Kim, K., et al. (2013). Identification of a series of 1, 3, 4-trisubstituted pyrazoles as novel hepatitis C virus entry inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(23), 6467-6473.
- [24] Tyagarajan, S., Chakravarty, P. K., Zhou, B., Taylor, B., Eid, R., Fisher, M. H., et al. (2010). Discovery of a novel class of biphenyl pyrazole sodium channel blockers for treatment of neuropathic pain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(24), 7479-7482.
- [25] Kuo, T., Lin, T., Yang, R., Kuo, S., Fu, W., & Hung, H. (2015). Novel Pyrazole Derivatives Effectively Inhibit Osteoclastogenesis, a Potential Target for Treating Osteoporosis. *J. Med. Chem. Journal of Medicinal Chemistry*, 58(12), 4954-4963.

- [26] Jaime Gabriel M. O. (2015) “SINTESIS y CARACTERIZACION DE LIGANTES TIPO BASES DE SCHIFF, BIS (IMINO) PIRIDINA y BIS (IMINO) BENCENO DERIVADOS DE 3-AMINO-PIRAZOLES”. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, B.C. México.
- [27] Pettinari, C., & Santini, C. (2010). IR and Raman Spectroscopy of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 1174–1186.
- [28] Michele Sherban-Kline (1999). 7. Infrared Spectroscopy: A Key to Organic Structure in Vol V “How Do You Know? The Experimental Basis of Chemical Knowledge”. Curriculum Units by Fellows of the Yale-New Haven Teachers Institute
- [29] Beer-Lambert Law. (S/F). Retrieved October 2016, from <http://life.nthu.edu.tw/~labcjw/BioPhyChem/Spectroscopy/beerslaw.htm>
- [30] Huuskonen, J. (2000). Estimation of aqueous solubility for a diverse set of organic compounds based on molecular topology. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 40, 773–777
- [31] N. De Leon. (S/F). Quantitative chemistry: theoretical and percent yield. Retrieved October 2016, from <http://www.iun.edu/~cpanhd/C101webnotes/quantchem/thtclandpctyld.html>
- [32] Ben Faust (1997) 4. Ultraviolet/Visible Espectroscopy. In: Modern Chemical Techniques (pp. 92-94).
- [33] Vogler, A.; Kunkely, H. (1999) Photochemistry induced by metal-to-ligand charge transfer excitation. Coord. Chem. Rev. 2000. 208: 321-329
- [34] Amrita.olabs.edu.in. (2013). Melting Point of an Organic Compound. Retrieved October 2016, from [amrita.olabs.edu.in/?sub=73&brch=7&sim=33&cnt=1](http://amrita.olabs.edu.in/?sub=73&brch=7&sim=33&cnt=1)
- [35] Deeb, O., Goodarzi, M., & Alfalah, S. (2011). Prediction of melting point for drug-like compounds via QSPR methods. Molecular Physics, 109(4), 507-516.
- [36] Carnelley, T. (1882). XIII. Chemical symmetry, or the influence of atomic arrangement on the physical properties of compounds. Philosophical Magazine Series 5, 13(79), 112-130.
- [37] Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Méx Salud Pública De México, 44(5).
- [38] Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens Disease Pathogens and Disease, 67(3), 159-173.

- [39] K. Plata, A. Rosato, & G. Wegrzyn. (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: Overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 597-612
- [40] Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 538–544.
- [41] Valvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
- [42] Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L., Fornari, E., Avenali, L., Khalife, H., & Gali-muhtasib, H. (2011). Antiproliferative activities of *Artemisia herba-alba* ethanolic extract in human colon cancer cell line (HCT116), 1(14), 55-59
- [43] Kamb, A. (2005). What's wrong with our cancer models? *Nature Reviews | Drug Discovery*, 4(February), 161–165.