

Materiales bioinorgánicos de paladio con compuestos orgánicos derivados de la tiosemicarbazona de actividad antitumoral

Wilfredo Hernández Gorriti,* Juan Paz Castillo, Abraham Vaisberg,
Evgenia Spodine, Rainer Richter, Lothar Beyer

Ingeniería Industrial n° 26, 2008, ISSN 1025-9929, pp. 149-173

Resumen: El presente trabajo informa acerca de la preparación, caracterización y actividad antitumoral de nuevos compuestos orgánicos (ligantes) del tipo tiosemicarbazona, $RCH=N-NHC(S)-NH_2$ [R=pirrol-2-carboxaldehído y tiofeno 2-carboxaldehído] y sus complejos metálicos de paladio(II). El análisis elemental y las técnicas espectroscópicas de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón y carbono revelan que los ligantes tiosemicarbazonas están desprotonados y se encuentran enlazados al centro metálico a través de dos átomos de nitrógeno (N) y azufre (S) en una configuración *trans*.

Palabras clave: Tiosemicarbazona; complejos de paladio(II); actividad citotóxica / antitumoral; crecimiento celular.

Bioinorganic materials of palladium with organic compounds derived from the thiosemicarbazone of antitumor activity

Abstract: The present work informs about the preparation, characterization and the antitumor activity of new organic compounds (ligands) from thiosemicarbazone (HL), $RCH=N-NHC(S)-NH_2$ [R= pyrrol-2-carboxaldehyde and thiofen 2-carboxaldehyde] and their palladium (II) complexes. The elemental analysis and spectroscopic techniques of infrared and nuclear magnetic resonance of carbon and proton, reveal that the thiosemicarbazone ligands are deprotonated and they are bonded to the metal through the nitrogen and sulfur atoms in a *trans* configuration.

Keywords: Thiosemicarbazone, Palladium(II) complexes; Antitumor / cytotoxic activity; Cell growth.

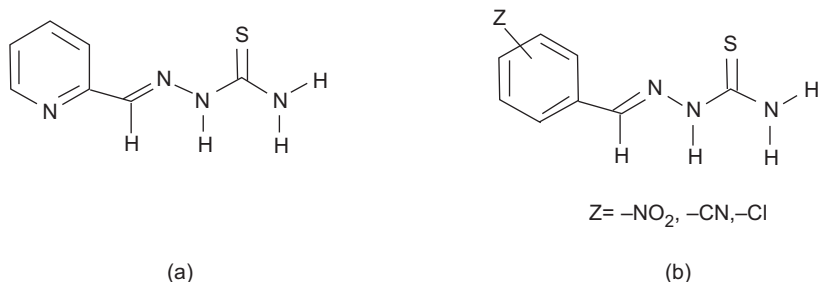
* Agradece las facilidades brindadas por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos derivados de las tiosemicarbazonas, $R-HC=N-NH-C(S)-NH_2$, y sus complejos metálicos de Fe(II), Cu(II), Ag(I), Au(III), Pt(II) y Pd(II) presentan un amplio perfil farmacológico y constituyen una importante clase de compuestos cuyas propiedades terapéuticas han sido estudiadas en la química medicinal inorgánica (West, 1993: 49).

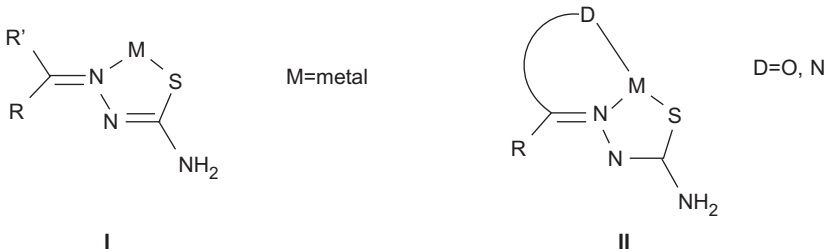
La gran facilidad de poder modificar el grupo terminal R de las tiosemicarbazonas por grupos piridina (figura 1), benzaldehído (figura 1) y fenol hace atractiva esta investigación para poder preparar una amplia variedad de ligantes orgánicos y sus respectivos complejos metálicos de *paladio(II)* (Koo, 2002: 613).

Figura 1
Derivados de la tiosemicarbazona



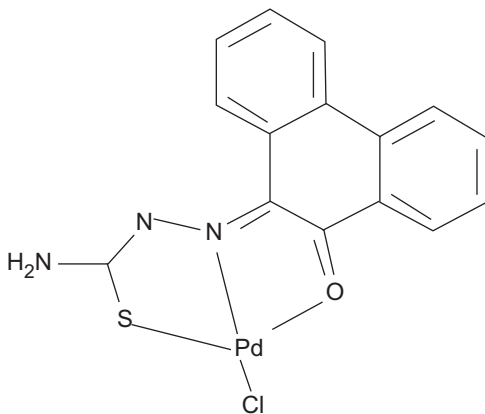
Los ligantes tiosemicarbazona desprotonados usualmente se coordinan al metal (Pt, Pd, Cu, Ru) a través de los átomos dadores oxígeno, nitrógeno y azufre en su forma bidentada (N, S) (I) o tridentada (N,N,S o O,N,S) (II) (figura 2), para formar complejos quelatos con una geometría cuadrada plana (Jayasree, 1993: 85).

Figura 2
Modos de enlace del ligante derivado de la tiosemicarbazona
hacia el centro metálico



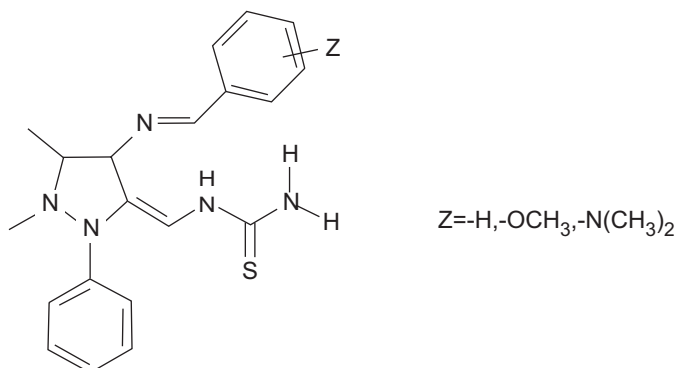
Estudios de citotoxicidad realizados en la línea de células cancerígenas de pecho humano han mostrado que el complejo de paladio(II) con el ligante tridentado (O, N, S) fenantrenoquinona tiosemicarbazona (figura 3), de geometría cuadrada plana, presenta un gran efecto antiproliferante al producir la muerte celular via apoptosis (Yakuphanoglu, 2002: 1865).

Figura 3
Estructura molecular de complejo (cloro)
(fenantrenoquinona tiosemicarbazonato) paladio(II)



Los ligantes tiosemicarbazonas heterocíclicas (N, N, S) (figura 4) ejercen sus benéficas propiedades terapéuticas en células tumorales de mamíferos al inhibir la ribonucleótido reductasa (contiene Fe^{3+}), enzima encargada de la síntesis de los precursores del ADN. La geometría molecular cuadrada plana de estos complejos metálicos es primordial en la intercalación con las bases nitrogenadas del ADN celular tumoral, logrando de esta manera inhibir la síntesis del ADN (Lobana, 1997: 4289).

Figura 4
Tiosemicarbazona heterocíclica



Hernández y colaboradores han informado que la estructura molecular del complejo de paladio(II), *trans*- PdL_2 [$\text{HL} = 3\text{-CN-benzaldehído tiosemicarbazona}$] (figura 5a), preparada en el laboratorio de química (Docimasia) de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad de Lima fue resuelta por el método de difracción de rayos X en la Universidad de Leipzig. El complejo de paladio(II) muestra una geometría cuadrada plana con dos ligantes orgánicos desprotonados (L) enlazados al ion Pd^{II} a través de los átomos nitrógeno(N) y azufre (S) en una configuración *trans* (Hernández, 2008). Además, este complejo metálico presenta una mayor citotoxicidad ($\text{CI}_{50} = 0.45 \mu\text{M}$) frente a células leucémicas mielogéneas de humano (K562) comparado con la actividad citotóxica del cisplatino, *cis*- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (figura 5b), evaluada frente a células leucémicas promielocítica aguda de humano (HL60) ($\text{CI}_{50} = 7 \mu\text{M}$) (Beraldo, 2004: 461).

Figura 5a
Estructura molecular
del complejo cis-Pt(L¹)₂

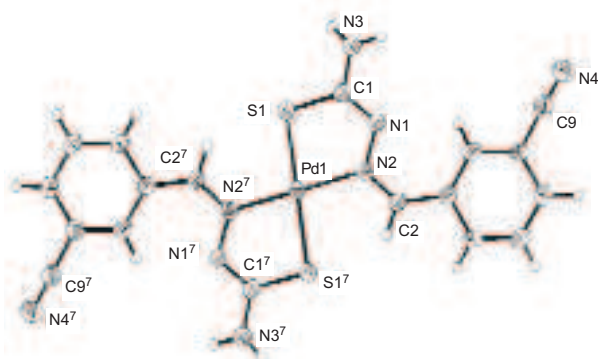
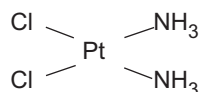


Figura 5b
Fórmula estructural
del cisplatino



En este trabajo, los autores han llevado a cabo la preparación, caracterización y ensayos de la actividad citotóxica de estos nuevos derivados de la tiosemicarbazona, R'-CH=N-NHC(S)-NH₂ [R'=pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tiofeno 2-carboxaldehído tiosemicarbazona y sus respectivos complejos metálicos de paladio(II), y la evaluación citotóxica de estos compuestos en diferentes líneas de células tumorales de humano.

2. MÉTODO EXPERIMENTAL

2.1 Materiales y mediciones

El tetracloroplatinato(II) de potasio (K₂PtCl₄) y el tetracloropaladato(II) de potasio (K₂PdCl₄) fueron adquiridos de la compañía Aldrich. Todos los demás reactivos y solventes (Aldrich) fueron de grado analítico y se usaron tal como se compraron. El análisis elemental fue determinado en un microanalizador elemental Fisons-Carlo Erba 1108. Los espectros infrarrojos (IR) fueron registrados en estado sólido (pastillas de KBr) en un espectrofotómetro Bruker FT-IR IFS 55 Equinox, en el rango de 4000 - 400 cm⁻¹. Los espectros de masas-FAB(+) fueron registrados en un espectrómetro modelo ZAB-HSQ (V.G. nalytical Ltd.), empleando el alcohol 3-nitrobencilo como matriz. Los espectros de RMN-¹H (300 MHz) y RMN-¹³C (75.5 MHz) fueron registrados en un espectrómetro Bruker advance DRX 300 a 300 K

usando CDCl_3 como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) fueron medidos con respecto al tetrametilsilano (TMS) en el caso ^1H y ^{13}C .

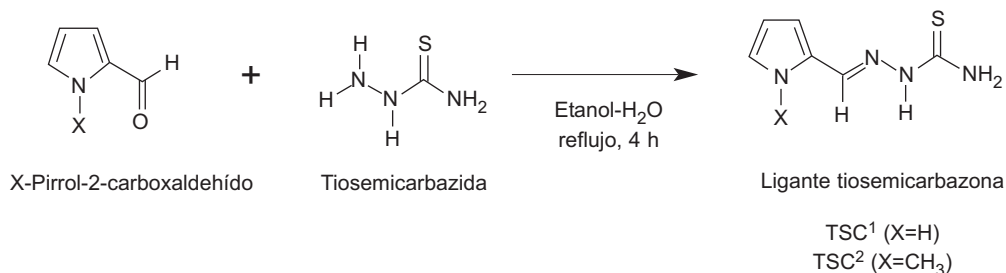
2.2 Síntesis de ligantes orgánicos

Los ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (TSC^1 y TSC^2) y tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (TSC^3 y TSC^4) fueron preparados de acuerdo con el método informado (Castiñeiras, 2001: 441).

2.2.1 Ligantes pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (esquema 1)

En un balón de 250 mL se disuelve 4.56 g (50 mmol) de tiosemicarbazida en 150 mL de agua caliente. A esta solución se le adiciona gota a gota una solución de pirrol-2-carboxaldehído (50 mmol, 4.76 g) en etanol (60 mL) bajo agitación constante. Luego, la mezcla final se somete a reflujo por cuatro horas. La reacción continúa por una hora adicional a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla de reacción se concentra hasta reducir la mitad de su volumen en el rotavapor y luego se deja evaporar a temperatura ambiente. Después de varios días se observa la formación de cristales en forma de agujas de color marrón. Estos cristales se lavan dos veces con agua helada (10 mL) y tres veces con etanol frío (20 mL). Finalmente, el producto obtenido (5.47 g) se seca al vacío por 5 horas.

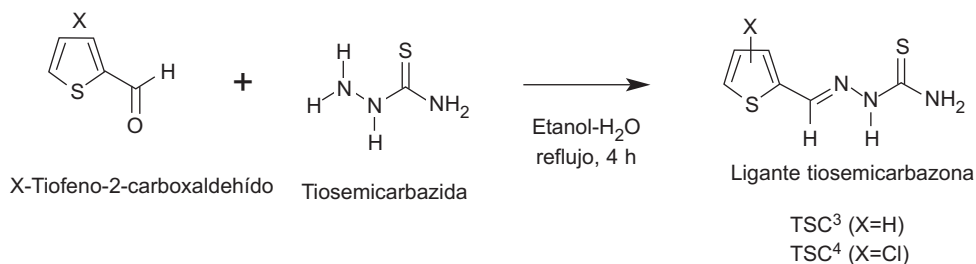
Esquema 1 Síntesis de los ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona



2.2.2 Ligantes tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (Esquema 2)

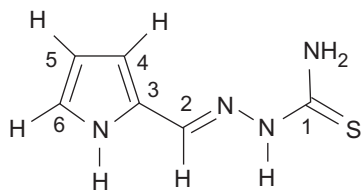
En un balón de 250 mL se disuelve 2.73 g (30 mmol) de tiosemicarbazida en 100 mL de agua caliente. A esta solución se le adiciona gota a gota, durante 20 minutos, una solución de tiofeno-2-carboxaldehído (30 mmol, 3.0 mL) en etanol (30 mL) bajo agitación constante. Luego, la mezcla final se somete a reflujo por cuatro horas. La reacción continúa por una hora adicional a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla de reacción se filtra y el sólido de color amarillo pálido se lava dos veces con agua helada (10 mL) y tres veces con etanol frío (20 mL). Finalmente, el producto obtenido (4.80 g) se seca al vacío por cinco horas.

Esquema 2 Síntesis de los ligandos derivados del tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona

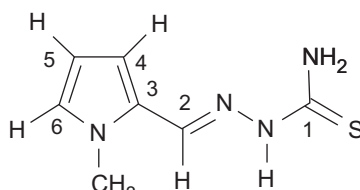


Los rendimientos y caracterización de los ligandos orgánicos están resumidos en las tablas 1-4. Los ligandos (figura 6) fueron caracterizados por análisis elemental (tabla 1), espectroscopía de infrarrojo (IR) (tabla 2) y resonancia magnética nuclear (RMN ¹H y ¹³C) (tablas 3 y 4).

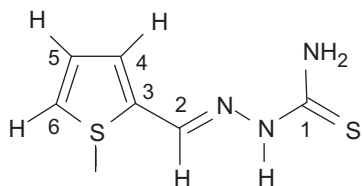
Figura 6
Fórmulas estructurales de los ligantes orgánicos derivados
del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona y
tiofeno 2-carboxaldehído tiosemicarbazona



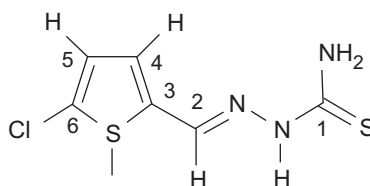
TSC¹



TSC²



TSC³



TSC⁴

Tabla 1
Rendimientos y resultados de análisis elemental
[% Exp.(Calc.)] de los ligantes sintetizados

Comp.	Rendimiento (%)	Fórmula general/ (PM)	% C	% H	% N	% S
TSC ¹	65,0	C ₆ H ₈ N ₄ S (168,2)	42,8 (42,8)	4,7 (4,8)	33,8 (33,3)	18,9 (19,1)
N TSC ²	85,0	C ₇ H ₁₀ N ₄ S (188,2)	45,8 (46,1)	5,9 (5,5)	29,4 (30,7)	16,9 (17,6)
TSC ³	94,0	C ₆ H ₇ N ₃ S ₂ (185,27)	38,9 (38,9)	3,6 (3,8)	22,4 (22,7)	34,6 (34,6)
TSC ⁴	65,0	C ₆ H ₆ N ₃ S ₂ Cl (219,7)	32,4 (32,8)	2,4 (2,8)	18,4 (19,1)	28,9 (29,2)

Tabla 2
Frecuencias vibracionales ($\nu(\text{cm}^{-1})$) obtenidos a partir de los espectros de IR para los ligantes sintetizados*

Compuesto	$\nu(-\text{NH}_2)$	$\nu(-\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$
TSC ¹	3448 (m)	3153 (i,a)	1588 (i)	1110 (m)
TSC ²	3411(a)	3153 (ad)	1593 (m)	1107 (m)
TSC ³	3413 (m)	3140 (m)	1586 (m)	1102 (m)
TSC ⁴	3440 (m)	3156 (m)	1591 (i)	1102 (m)

* i = banda intensa, m = banda media, d = banda débil, a = banda ancha

Tabla 3
Datos de desplazamientos químicos (δ , ppm) obtenidos a partir de los espectros de RMN-¹H para los ligantes sintetizados

Compuesto	$\delta (-\text{CH}=\text{N})$	$\delta (-\text{NH})$	$\delta (\text{NH}_2)$	δ (anillo pirrol o tiofeno)
TSC ¹	7.82 (s, 1H)	11.28 (s, 1H)	8.08 y 7.97 (s, 2H, NH ₂)	6.37 (d, H ⁴) 6.08 (d,d, H ⁵) 6.95 (d, H ⁶) 11.34 (s, N-H)
TSC ²	8.01 (s, 1H)	11.13 (s, 1H)	8.05 y 7.37 (s, 2H, NH ₂)	6.91 (d, H ⁴) 6.05 (t, H ⁵) 6.49 (d,d, H ⁶) 3.43 (s, N-CH ₃)
TSC ³	8.01 (s, 1H)	9.45 (s, 1H)	6.30 y 7.17 (s, 2H, NH ₂)	7.30 (d, H ⁴) 7.08 (d,d, H ⁵) 7.41 (d, H ⁶)
TSC ⁴	8.11 (s, 1H)	11.42 (s, 1H)	7.62 (d, 2H, NH ₂)	7.07 (d, H ⁴) 7.27 (d, H ⁵)

s = singlete, d = doblete, t = triplete

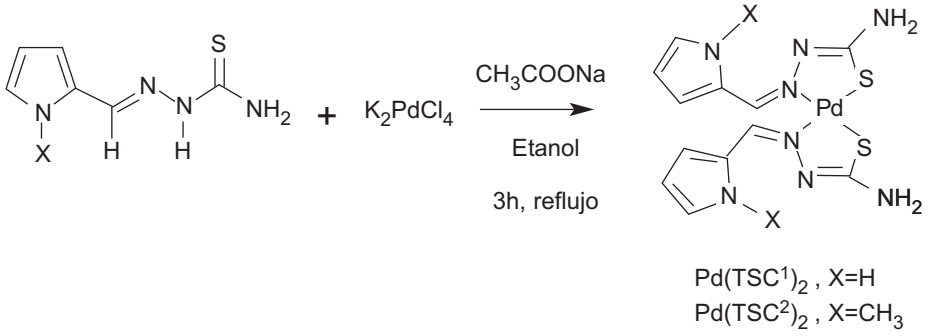
Tabla 4
Datos de desplazamientos químicos (δ , ppm) obtenidos a partir de los espectros de RMN- ^{13}C para los ligantes sintetizados

Compuesto	δ (CH_3)	δ (C=N)	δ (tiofeno aromático)	δ (C=S)
TSC ¹	–	133.8	127.6 (C3)	177.4
H			121.7 (C4)	
			109.2 (C5)	
			112.8 (C6)	
TSC ²	36.3	136.5	108.3 (C3)	176.8
			128.2 (C4)	
			115.1 (C5)	
			126.7 (C6)	
TSC ³	–	137.7	138.6 (C3)	177.7
			128.8 (C4)	
			129.9 (C5)	
			130.5 (C6)	
TSC ⁴	–	137.4	138.2 (C3)	177.9
			128.1 (C4)	
			130.8 (C5)	
			131.3 (C6)	

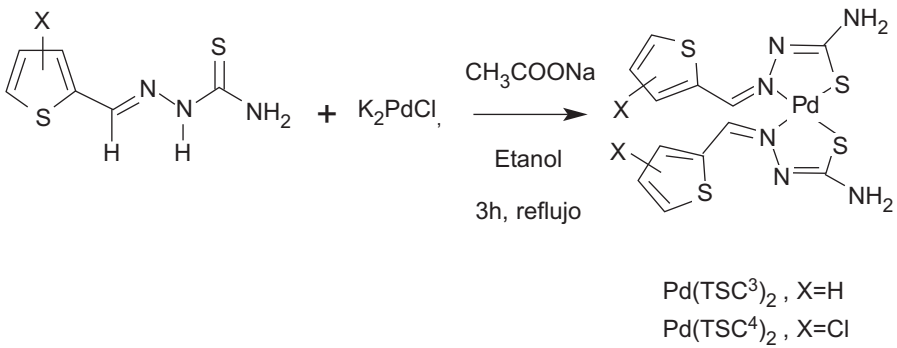
2.3 Síntesis de los complejos de paladio(II) con ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (Esquemas 3 y 4)

Una solución de la sal metálica K_2PdCl_4 (0.326 g, 1.0 mmol) en agua-etanol (2:1, 35 mL), se adiciona gota a gota durante 20 minutos a una solución caliente del ligante pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (0.336 g, 2 mmol) o del ligante tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (0.37 g, 2 mmol) en etanol (60 mL) bajo agitación constante. Luego, a la mezcla final se le agrega una solución de acetato de sodio (0.164 g, 2 mmol) en agua (2 mL) y se somete a reflujo por tres horas. Al finalizar la reacción, se forma un precipitado de color amarillo. La mezcla de reacción se filtra y el sólido se lava con agua helada y etanol frío (50 mL). Finalmente, el precipitado (0.44-0.47 g) se seca al vacío por 3 horas. Rendimiento: $\text{Pd}(\text{TSC}^1)_4$: 68%, $\text{Pt}(\text{TSC}^2)_4$: 66%, $\text{Pd}(\text{TSC}^3)_4$: 94%, $\text{Pt}(\text{TSC}^4)_4$: 89%.

Esquema 3
Preparación de los complejos de paladio(II) con ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona



Esquema 4
Preparación de los complejos de paladio(II) con ligantes derivados del tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona



Los complejos de paladio(II) fueron caracterizados por análisis elemental (tabla 5), espectroscopía de masas-FAB(+), infrarrojo (IR) (tabla 6) y RMN-¹H (tabla 7).

Tabla 5
Rendimientos y resultados de análisis elemental [% Exp.(Calc.)]
de los complejos de paladio(II) sintetizados

Comp.	Rendimiento (%)	Fórmula general/ (PM)	% C	% H	% N	% S
Pd(TSC ¹) ₂	68.0	C ₁₂ H ₁₄ N ₈ S ₂ Pd (440.85)	32,2 (32,7)	3,1 (3,2)	24,8 (25,4)	14,9 (14,5)
Pd(TSC ²) ₂	66.0	C ₁₄ H ₁₈ N ₈ S ₂ Pd (468.90)	35,4 (35,9)	3,6 (3,9)	23,2 (23,9)	13,3 (13,7)
Pd(TSC ³) ₂	94,0	C ₁₂ H ₁₂ N ₆ S ₄ Pd (474.95)	30,3 (30,4)	2,4 (2,6)	17,4 (17,7)	26,9 (27,0)
Pd(TSC ⁴) ₂	90,0	C ₁₂ H ₁₀ N ₆ S ₄ Cl ₂ Pd (543.8)	25,9 (26,5)	1,8 (1,9)	15,2 (15,5)	22,7 (23,6)

Tabla 6
Frecuencias vibracionales (ν, cm⁻¹) obtenidos a partir de los espectros de IR para los complejos de paladio(II) y platino(II) con ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tifenno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona sintetizados*

Compuesto	ν(-NH ₂)	ν(-NH)	ν(C=N)	ν(C=S)
Pd(TSC ¹) ₂	3343 (m)	–	1570 (m)	1045 (d)
Pd(TSC ²) ₂	3279(d)	–	1582 (i)	1020 (m)
Pd(TSC ³) ₂	3277 (m,a)	–	1575 (m)	1040 (d)
Pd(TSC ⁴) ₂	3303 (d)	–	1573 (m)	1070 (d)*

* i = banda intensa, m = banda media, d = banda débil, a = banda ancha

Tabla 7
Datos de desplazamientos químicos (δ , ppm) obtenidos a partir de los espectros de RMN- ^1H para los complejos de paladio(II) y platino(II) con ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona sintetizados

Compuesto	δ (-CH ₃)	δ (-CH=N)	δ (NH ₂)	δ (Tiofeno, aromático)
Pd(TSC ²)	3.7 (s, 1H)	7.25 (s, 1H)	6.93 (s)	7.47 (d,d, H ⁶) 6.13 (t, H ⁵) 7.02 (d, H ⁴)
Pd(TSC ⁴)	—	7.55 (s, 1H)	7.67 (s,a)	6.81 (d, H ⁴) 7.78 (t, H ⁵)

d = doblete, t = triplete, s = singlete, a = ancha

2.4 Actividad biológica

2.4.1 Líneas de células tumorales de humano

La citotoxicidad de los extractos que contienen a los ligantes orgánicos y sus complejos de paladio(II) en DMSO fue evaluada *in vitro* en diferentes líneas de células tumorales de humano empleando el método de la sulforodamina B (SRB) (Skehan, 1990: 1107). Las cinco líneas de células tumorales de humano ensayadas fueron las siguientes: carcinoma prostático (DU145), adenocarcinoma de pecho (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma prostático (PC3) y leucemia mielogénea crónica (K562), fueron obtenidas del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El medio de cultivo empleado para el crecimiento celular fue DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado con suero de bobino fetal al 10% y gentamicina. Las células crecieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% CO₂.

2.4.2 Ensayos de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los extractos preparados, las células tumorales a una concentración de 9×10^3 - 3×10^4 células/mL de medio de cultivo fueron colocadas en placas de 96 pocillos con su

correspondiente medio de cultivo e incubado a 37°C en una atmósfera de 95% de aire húmedo y 5% de CO₂ por 24 horas. Las células contenidas en cada pocillo fueron fijadas *in situ* con ácido tricloroacético (ATC) para obtener los valores de células a un tiempo cero antes de adicionar los extractos. Luego se adicionaron los extractos en un rango de concentraciones de 0.05 - 50 µM en DMSO y fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 95% de aire húmedo y 5% de CO₂ por 48 horas adicionales. El ensayo fue terminado por la adición de TCA frío. Luego, a cada pocillo se le adicionó una solución de sulforodamina B 0.4% (w/v) disuelta en ácido acético al 1%. Al final del periodo de tinción, el colorante no reaccionado fue removido y lavado cuatro veces con una solución de ácido acético al 1%. Después de secar con aire los pocillos, el colorante que reaccionó fue solubilizado con una base Tris 10 mM (pH = 10.5) y la lectura de la absorbancia se realizó en el lector de placas automatizado, a una longitud de onda de 550 nm. El valor CI₅₀ fue definido como la concentración micromolar necesaria para reducir al 50% el crecimiento celular tumoral y cada valor fue determinado por un análisis de regresión lineal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de ligantes derivados de la tiosemicarbazona

Los ligantes pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona fueron preparados con altos rendimientos (65-94 %) mediante la reacción del derivado de pirrol o tiofeno con la tiosemicarbazida en etanol.

Una de las dificultades que se presentó en la obtención de los ligantes derivados de la tiosemicarbazona fue la poca solubilidad de la tiosemicarbazida en etanol a temperatura ambiente. Este problema fue solucionado sometiendo la mezcla a un calentamiento a 50°C. Con respecto a la preparación de los ligantes derivados del tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (TSC³ y TSC⁴). En la mezcla de reacción final se obtuvo un precipitado como producto orgánico. A pesar de su recristalización en una mezcla CHCl₃-C₂H₅OH (1:2, v/v), se obtuvo un sólido amarillo pálido. Sin embargo, en la obtención de los ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (TSC¹ y TSC²), el producto final fue una solución de color marrón que, aprovechando la lenta evaporación del solvente a temperatura ambiente, permitió obtener cristales largos en forma de agujas.

3.2 Complejos de paladio(II)

Los complejos de paladio(II) con ligantes derivados del pirrol-2-carboxaldehído y tiofeno-2-carboxaldehído fueron preparados con rendimientos en el rango de 66 - 94%, mediante la reacción del ligante tiosemicarbazona en etanol y la sal metálica de K_2PdCl_4 en una relación molar ligante: metal de 2:1, seguido por la adición del acetato de sodio en agua. Con respecto a la preparación de los complejos de paladio(II), en la mezcla de reacción final, los complejos metálicos se obtuvieron como sólidos y la recristalización de los complejos $Pd(TSC^3)_2$ y $Pd(TSC^4)_2$ en CH_2Cl_2 - C_2H_5OH (1:3, v/v) produjo cristales; sin embargo, estos cristales no fueron de buena calidad para su determinación estructural por difracción de rayos X.

3.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

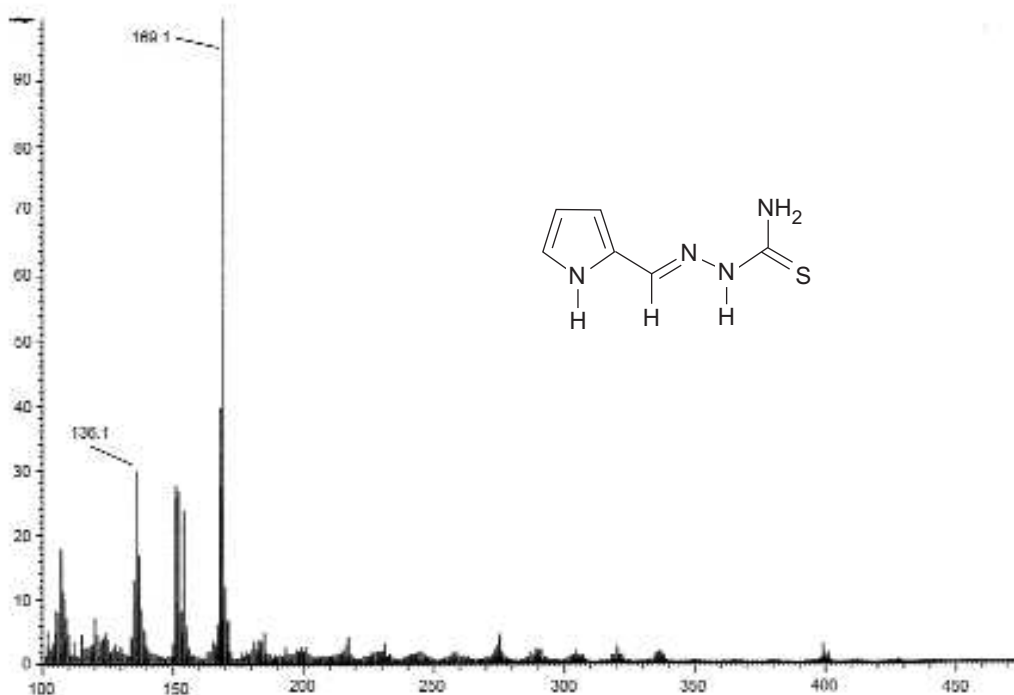
En todos los espectros IR las vibraciones asignadas entre 3140-3155 cm^{-1} al estiramiento N-H para los ligandos HL, desaparecen después de la formación del complejo metálico, lo cual indica la desprotonación del grupo tioamido (-NHCS) en los ligantes, originando una deslocalización electrónica entre los grupos tiocarbonilo (C=S) e imino (C=N) que se manifiesta por el desplazamiento de las bandas de absorción a menores frecuencias con respecto a los espectros de los correspondientes ligantes. Las bandas de absorción de mediana intensidad en los intervalos de 1588-1596 cm^{-1} y 1102-1110 cm^{-1} asignadas a las vibraciones $\nu(C=N)$ y $\nu(C=S)$, respectivamente, están desplazadas hacia frecuencias más bajas (1570-1582 cm^{-1} y 1020-1070 cm^{-1} , respectivamente) en la formación de los complejos de paladio(II). Estos resultados indican que los ligantes desprotonados están coordinados al metal paladio a través de los átomos dadores nitrógeno y azufre (Seleem, 2005; 1003). Además, la banda de absorción correspondiente al grupo NH_2 que aparece en los espectros IR para los ligantes, se mantiene en la formación de los complejos de paladio(II), lo cual indica la no coordinación del grupo $-NH_2$ al centro metálico (Ackerman, 1999: 2759).

3.4 Espectros de masas

Los espectros de masas FAB(+) de los ligantes tiosemicarbazona y sus complejos de paladio(II) revelan que las señales de los iones moleculares están de acuerdo con las fórmulas estructurales propuestas.

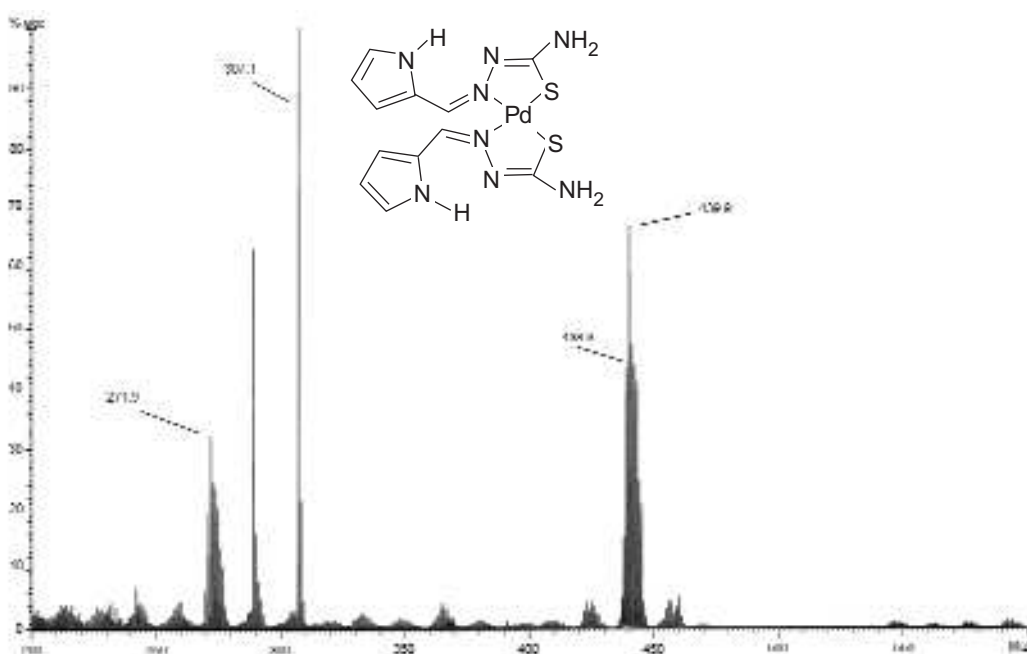
El espectro de masas FAB(+) del ligante TSC¹ (figura 7) muestra la señal de m/z igual a 169.1 (Mteórico = 168.2). Este resultado indica que la masa molar del ligante preparado TSC1 está de acuerdo con la fórmula propuesta. Las demás señales que se observan en los espectros de masas representan la sucesiva degradación de la molécula.

Figura 7
Espectro de masas-FAB(+) del ligante TSC¹



Como se ve en la figura 8, la señal de m/z que se observa a 439.9 para el complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^1)_2$ ($M_{\text{calculado}} = 440.8$) confirma la fórmula estructural propuesta.

Figura 8
Espectro de masas-FAB(+) del complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^1)_2$



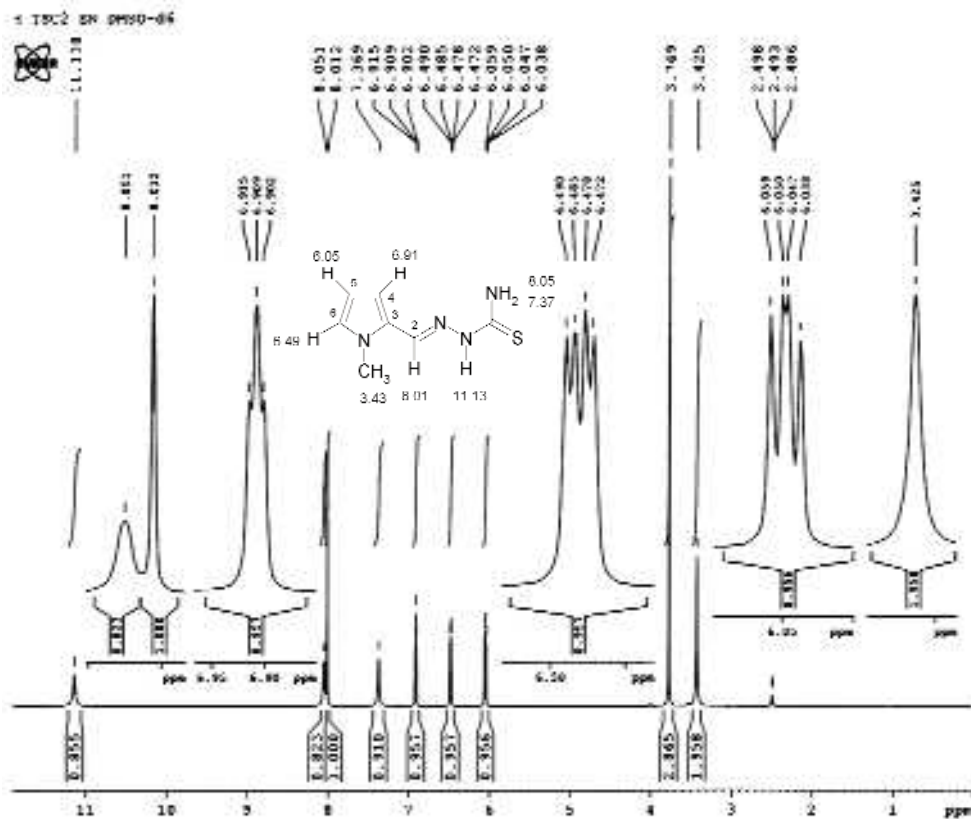
3.5 Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C

Las asignaciones de las líneas de resonancias de ^1H y ^{13}C para los ligandos derivados de la tiosemicarbazona y sus complejos de paladio(II) fueron obtenidas a partir de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) registrados en DMSO-d_6 a 300 K.

3.5.1 Ligantes

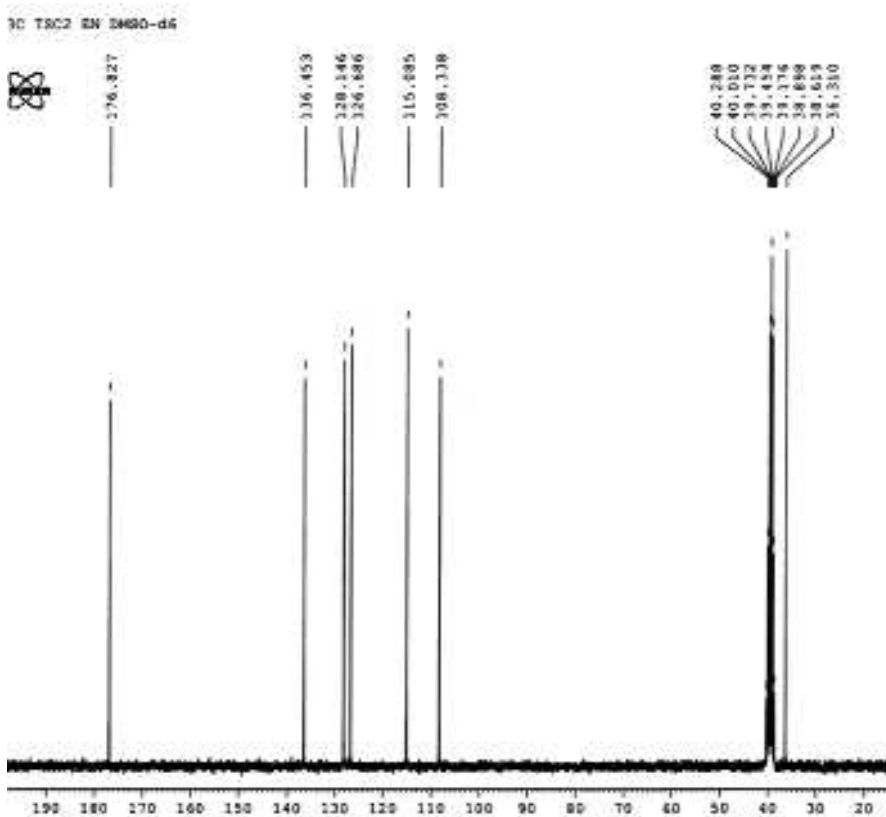
En el espectro de RMN-¹H del ligante TSC² (figura 9), las líneas de resonancia del grupo =N-N-H aparecen como un singlete a 11.13 ppm, mientras que el protón del grupo H-C=N- se observa a 8.01 ppm. Los protones del anillo tiofeno H⁴ y H⁵ aparecen como dobletes en el espectro a 6.91 y 6.05 ppm, respectivamente. El efecto que provoca al reemplazar un hidrógeno del nitrógeno pirrol por un grupo -CH₃ es darle una mayor basicidad al ligante TSC², que se evidencia por el desplazamiento químico obtenido a 3.43 ppm con respecto al desplazamiento químico observado para el ligante TSC¹(11.34 ppm).

Figura 9
Espectro de RMN-¹H para el ligante TSC²



El espectro de RMN- ^{13}C para el ligante TSC^2 (figura 10) muestra una resonancia a 136.5 ppm que se asigna al grupo $-\text{C}=\text{N}$. El grupo tio-carbonilo ($-\text{C}=\text{S}$) aparece a 176.8 ppm y este valor es similar al encontrado para el ligante TSC^1 (177.4 ppm). El carbono metílico ($-\text{CH}_3$) aparece desplazado 2.3 ppm hacia campo bajo con respecto al desplazamiento químico normal para este grupo funcional (1.0 ppm) debido al nitrógeno del anillo pirrol. El efecto del grupo metílico en el anillo pirrol también se refleja por el desplazamiento del carbono C-5 hacia campo alto (115.1 \rightarrow 109.2 ppm) debido al efecto dador del grupo $-\text{CH}_3$.

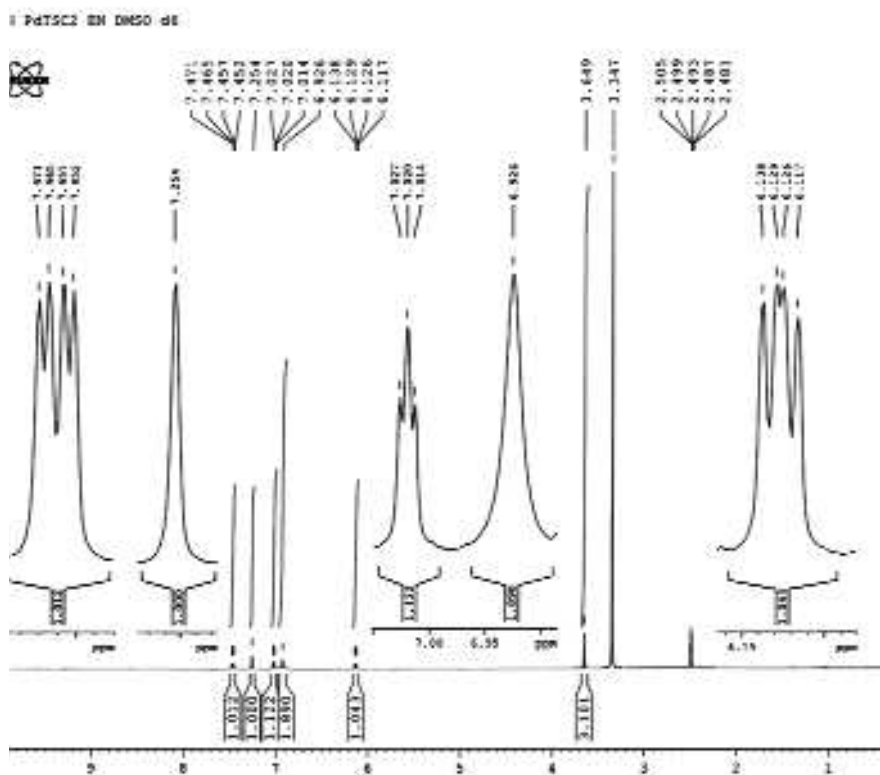
Figura 10
Espectro de RMN- ^{13}C para el compuesto TSC^2



3.5.2 Complejos de paladio(II)

En los espectros de RMN-¹H de los complejos de paladio(II), la desaparición de la señal correspondiente al grupo -N-H-C(=S) presente en los ligantes (9.45 - 11.42 ppm) confirma la desprotonación de dichos ligantes y la formación de los complejos metálicos. Las resonancias de los protones de la amina terminal NH₂ persisten en el complejo Pd(TSC²)₂ (6.93 ppm.) (figura 11). Los protones del grupo HC=N se desplazan entre 0.1 y 0.1 ppm hacia campo bajo en la formación de los complejos metálicos, lo cual confirma el enlace del nitrógeno hacia el centro metálico.

Figura 11
Espectro de RMN-¹H del complejo de paladio(II), Pd(TSC²)₂



3.6 Actividad biológica

3.6.1 Ligantes

La actividad antitumoral *in vitro* de los ligantes tiosemicarbazona y sus complejos de paladio(II) fueron evaluadas en 5 líneas de células tumorales de humano, después de 24 horas de haber sido sembradas en el medio de cultivo. Las células tumorales fueron incubadas por un período adicional de 48 horas con cada uno de los ligantes o sus respectivos complejos de paladio(II) (0.05-50 μM) a 37°, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa (incubadora de CO_2).

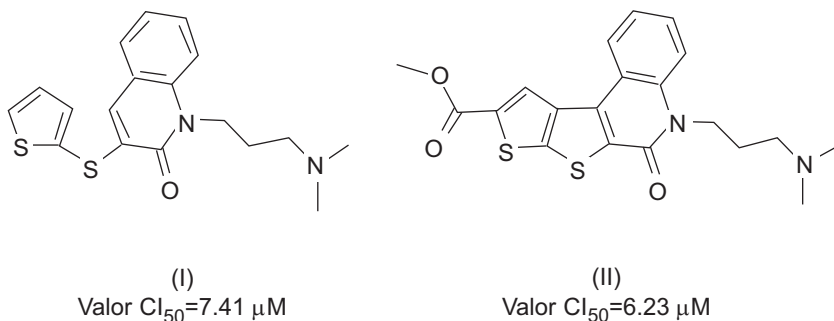
La actividad citotóxica *in vitro* evaluada para los ligantes tiosemicarbazona registraron valores de CI_{50} en el rango de 19 - 324 μM sobre el crecimiento tumoral de todas las líneas celulares.

Tabla 8
Valores de CI_{50} (μM) para los ligandos derivados del pirrol-2-carboxaldehído tiosemicarbazona en diferentes líneas de células tumorales

Línea celular tumoral	TSC ¹	TSC ²	TSC ³	TSC ⁴
DU145	77.28	242.22	53.98	95.91
MCF-7	111.16	184.73	70.92	125.69
HT-29	71.87	229.09	88.36	89.57
PC3	29.01	119.54	19.11	81.69
K562	77.58	324.30	216.44	67.65

Entre los ligantes ensayados (tabla 8) los que presentaron mayor actividad antitumoral fueron los ligantes TSC¹ y TSC³ frente a la línea celular de carcinoma prostático (PC3) con valores de CI_{50} de 29.01 y 19.11 μM , respectivamente. Sin embargo, la citotoxicidad del ligante TSC³ fue de 2.5 - 3.0 veces menor que otros ligantes orgánicos derivados del tiofeno (figura 12) (Ali, 2002: 141).

Figura 12
Derivados de los ligandos orgánicos que contienen el anillo tiofeno



Por otro lado, el complejo $Pd(TSC^4)_2$ con el átomo de cloro en el anillo tiofeno mostró una mayor actividad citotóxica a bajas concentraciones micromolares de inhibición ($CI_{50} = 4.55 \mu$ M,) (Tabla 9) con respecto a los demás complejos de paladio(II) frente a la línea celular de carcinoma prostático de humano (PC3).

Tabla 9
Valores de CI_{50} (μ M)* para los complejos de paladio(II) con ligandos derivados del pirrol 2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tiofeno 2-carboxaldehído tiosemicarbazona evaluados *in vitro* frente a diferentes líneas de células tumorales

Línea celular tumoral	$Pd(TSC^1)_2$	$Pd(TSC^2)_2$	$Pd(TSC^3)_2$	$Pd(TSC^4)_2$
DU145	30.39	59.97	26.11	15.16
MCF-7	55.12	71.74	46.94	9.10
HT-29	34.71	39.52	19.16	13.65
PC3	27.61	35.53	25.37	4.55
K562	27.22	63.19	53.46	54.02

* CI_{50} corresponde a la concentración requerida para inhibir al 50% el crecimiento celular cuando las células son expuestas a los compuestos durante 48 horas. Cada valor es el promedio de dos experimentos independientes.

En general, los complejos de paladio(II) presentaron mayor citotoxicidad (tabla 9) con respecto a sus ligandos tiosemicarbazonas TSC^{1-4} (tabla 8) sobre el crecimiento celular tumoral. Estos resultados

indican que la actividad citotóxica aumenta drásticamente cuando los ligantes se encuentran coordinados al ión paladio(II).

El complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^4)_2$ resultó ser el más citotóxico frente a las líneas celulares tumorales DU145, MCF-7 y HT-29, con valores de CI_{50} de 15.16, 9.10 y 13.65 μM , respectivamente. Es probable que la mayor citotoxicidad presentada por el complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^4)_2$ frente a la línea celular tumoral PC3 pueda estar relacionada con la intercalación de este complejo metálico o interacción de los átomos de azufre y cloro con las bases nitrogenadas del ADN celular tumoral, provocando cambios conformacionales en la doble hélice del ADN, que producen, finalmente, la muerte celular (Casas, 2000: 197).

Con respecto a la línea celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de pecho de humano), el complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^4)_2$ mostró una mayor actividad citotóxica ($\text{CI}_{50}=9.10 \mu\text{M}$) con respecto a otro complejo de paladio(II) de fórmula $\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}$ (HL= 1,2-naftoquinona-1-tiosemicarbazona ($\text{CI}_{50}=12.94 \mu\text{M}$). Probablemente, la presencia del anillo tiofeno con el átomo de cloro enlazado al carbono imino del ligando quelato y la geometría molecular cuadrada plana de este complejo de paladio(II) sintetizado pueden ser un factor importante en su interacción con el ADN de las células tumorales (Liberta, 1992: 121).

4. CONCLUSIONES

- Las fórmulas estructurales propuestas de los ligantes pirrol 2-carboxaldehído tiosemicarbazona y tiofeno 2-carboxaldehído tiosemicarbazona y sus complejos de paladio(II) están de acuerdo con el análisis elemental y datos espectroscópicos obtenidos.
- Los ligantes tiosemicarbazonas preparados se encuentran enlazados bidentadamente al ión paladio(II), a través de los átomos dados de nitrógeno y azufre.
- Los complejos de paladio(II) presentan mayor citotoxicidad que sus ligantes tiosemicarbazonas a bajas concentraciones micromolares de inhibición frente a diferentes líneas de células tumorales de humano.
- El complejo $\text{Pd}(\text{TSC}^4)_2$ resultó ser el más citotóxico con respecto a los demás complejos de paladio(II) frente a las líneas celulares tumorales DU145, MCF-7, HT-29 y PC3.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, L.; Franwick, P. y M. Green. *Polyhedron* 18, 1999.
- Ali, M.; Mirza, A.; Butcher, R.; Tarafder, M.; Keat, T. y A. Ali. *J. Inorg. Biochem.* 92, 2002.
- Beraldo, H. *Quim. Nova* 27, 2004.
- Casas, J.; García-Tasende, M. y J. Sordo. *Coord. Chem. Rev.* 209, 2000.
- Castiñeiras, A.; Carballo, R. y T. Perez. *Polyhedron* 20, 2001.
- Hernández, W.; Paz, J.; Spodine, E.; Vaisberg, A.; Richter, R. y L. Beyer. *Bioinorg. Chem. Appl.*, (en edición).
- Jayasree, S. y K. Aravindakshan. *Transition Met. Chem.*, 18, 85, 1993.
- Koo, B. K. y Uk. Lee. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23, 2002.
- Liberta, A. y D. West. *Biometals* 5, 1992.
- Lobana, T.; Sánchez, A.; Casas, J.; Castiñeiras, A.; Sordo, J.; Tasende, M. y M. López. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997.
- Seleem, H.; Emara, A. y M. Shebl. *J. Coord. Chem.* 58, 2005.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S. y M. Boyd. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1990.
- West, D. X.; Libert, A. E.; Padhye, S. B.; Chikate, R. C.; Sonawane, P. B.; Kumbhar, A. S. y R. G. Yerande. *Coord. Chem. Rev.*, 123, 1993.
- Yakuphanoglu, F.; Balaban, A.; Dagdelen, F.; Aydogdu, Y.; Sekerci, M. y B. Erk. *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.* 32, 2002.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Actividad citotóxica. Es la potencialidad que presentan los compuestos de disminuir el crecimiento de las células tumorales luego de ser cultivados en las diferentes líneas celulares tumorales.

Bandas de absorción. Señales características del grupo funcional orgánico de los compuestos preparados.

Complejo metálico. Compuesto orgánico enlazado a un ión metálico.

Configuración. Es el arreglo de los átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno enlazados con el centro metálico. Si estos átomos están en un mismo lado respecto al metal, adoptan la configuración *cis*- y si están en lados opuestos adoptan la configuración *trans*-.

In vitro. Es la acción que presentan los compuestos sobre células vivas cultivadas en placas de cultivo.

Ligantes. Compuestos orgánicos que se enlazan a los metales de transición a través de los átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno.

Ligante bidentado. Compuesto orgánico que presenta dos átomos dadores de electrones.

Ligante tridentado. Compuesto orgánico que presenta tres átomos dadores de electrones.

Línea celular tumoral. Son los diferentes tipos de células tumorales: carcinoma, adenocarcinoma y leucemia.

Líneas de resonancia. Señales correspondientes a los hidrógenos o carbonos presentes en los compuestos preparados.

Valor CI_{50} . Es la concentración micromolar necesaria para disminuir el crecimiento celular tumoral al 50%.