



Universidad de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de
nuevos selenoésteres con actividad
antiproliferativa, citotóxica y quimiopreventiva*

Enrique Domínguez Álvarez



Universidad de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de
nuevos selenoésteres con actividad
antiproliferativa, citotóxica y quimiopreventiva*

Memoria presentada por D. Enrique Domínguez Álvarez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 19 de septiembre de 2012

Dr. Juan Antonio Palop Cubillo

Dra. Carmen Sanmartín Grijalba

A José Manuel, *in memoriam*.

Para Luciano, María Luisa, Lourdes y María Lourdes.

Sólo sé que no sé nada / I know that I know nothing
Sócrates

Obedeced más a los que enseñan que a los que mandan
/ Obey more those who teach than those who order
San Agustín de Hipona

Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades
/ Rely on time, it uses to give sweet solutions to many bitter inconvenients
Miguel de Cervantes Saavedra

Las buenas acciones nos ennoblecen, y somos hijos de nuestros actos
/ Good actions ennoble us, and we are the sons of our deeds
Miguel de Cervantes Saavedra

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y la ayuda de mis padres Luciano y María Luisa; ni tampoco sin los ánimos de mi abuela Lourdes y mi tía María Lourdes. Por ello quiero nombrarlos en primer lugar, por estar siempre apoyándome, tanto en los buenos como en los malos momentos, aunque fuera a distancia por vivir en ciudades distintas.

Mi agradecimiento más sincero a mi director de tesis, el doctor Juan Antonio Palop, por todo su tiempo, ayuda y guía durante la realización de este trabajo de investigación; y también por introducirme en su día con sus excelentes clases magistrales en el mundo de la Química Orgánica. También quiero agradecer a la doctora Carmen Sanmartín toda la ayuda que me ha brindado estos años, sin la cual tampoco este trabajo habría visto la luz. Asimismo, mi total gratitud a la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (ADA) por el apoyo económico proporcionado durante la realización de la tesis a través de la Beca de Excelencia; y a Bancaja por la concesión de una ayuda para la realización de la estancia en el extranjero.

A las doctoras Font, Lizarraga y González-Peñas; y a otros profesores de la Universidad de Navarra ajenos al departamento como los doctores Fernández Álvarez y García Granero; mi más sincero agradecimiento por atenderme y resolverme las dudas puntuales que me han ido surgiendo sobre sus respectivos temas. A la Dr. Celia Prior y al Dr. Alfonso Calvo, mi gratitud por su inestimable trabajo en la evaluación biológica de los compuestos. Y a todos los profesores de las licenciaturas en Química y Bioquímica de la Universidad, mi agradecimiento por el impagable papel desempeñado en mi formación académica y por el apoyo proporcionado durante todos estos años.

Al doctor Claus Jacob le agradezco enormemente que me abriera de par en par las puertas de su laboratorio y me hiciera con su ayuda mucho más fácil el asentarme y vivir en un país diferente durante un periodo de tiempo tan largo; así como que me facilitara la realización de nuevos ensayos de mis productos // An enormous thank you to Dr. Claus Jacob for throwing open his laboratory doors for me. Also, for easing my arrival and life in such a different country for the long term, and for giving me the opportunity to perform new assays of my compounds in his department.

Dentro del laboratorio de Pamplona quiero destacar el apoyo de Iosu, compañero en Pamplona, amigo en Alemania y ayudante mientras estuvo en el laboratorio. Muchas reacciones, tanto de uno como de otro, no habrían sido posibles sin todas las ideas que durante estos años hemos ido intercambiando. Para Rosa, aparte de mi agradecimiento por sus ayudas, y consejos, mis mejores deseos en su nueva vida. Para Eli, gracias por los incontables espectros, elementales, “agobios” y charlas compartidos durante toda la tesis. A Gilo y Álvaro, alumnos colaboradores, mi agradecimiento por su ayuda. Lo mismo para Pilar, por su colaboración primero como alumna y luego como compañera de laboratorio; y para Aleix, por ser un buen amigo, compañero de carrera y de trabajo.

Al resto de los compañeros, tanto de grupo de investigación como de laboratorio, quiero agradecerles su apoyo y disposición para enseñarme cosas de gran utilidad para la vida diaria profesional de un químico.

A los compañeros en Saarbrücken les agradezco enormemente el que me facilitaran la estancia por su acogida con los brazos abiertos, por su amistad sincera, por enseñarme tantas cosas nuevas y por hacer que el trabajar dentro de un crisol de culturas, religiones e idiomas haya sido una experiencia inolvidable y muy enriquecedora. A Mohamed, جزيلة شكرا, por tantos buenos momentos, tanto en Alemania como en la actualidad. A Ada, *grazie* por su ayuda tanto como compañera en el trabajo, como amiga y como vecina, y por enseñarme los ensayos *in vitro*. A Peng, 非常感謝 por facilitarme todos los papeleos de la llegada y por ser un diccionario alemán-inglés andante. A Khairan y Andrea, *terima kasih* y *thank you*, por explicarme los experimentos con nematodos. A Clemens, *vielen Dank* por la ayuda con la electroquímica. A Brigitte, *dziękujemy* por echarme siempre una mano con todos los papeleos cotidianos en alemán. Y a Vincent y Thomas, *merci* y *vielen Dank* por realizar ensayos biológicos de mis productos. Y நன்றி! para Uma por su colaboración y amistad // Many thanks to my colleagues at Saarbrücken, for welcoming me with open arms and making the stay in Germany much more enjoyable. My most sincere thanks for their friendship, for teaching me so many new things and for making the work in an environment with so many cultures, religions and languages such an unforgettable and enriching experience. To Mohamed, جزيلة شكرا, for so many good moments, both in Germany and nowadays. To Ada, *grazie* for your help as colleague, friend and neighbour; and for teaching me the *in vitro* assays. To Peng, 非常感謝, for facilitating me all the administrative papers of the arrival and for being a walking German-English translator. To Khairan and Andrea, *terima kasih* and *thank you*, for explaining the nematode assays to me. To Clemens, *vielen Dank* for the help with the electrochemistry. To Brigitte, *dziękujemy* for her advice in the administrative German issues. And to Vincent and Thomas, *merci* and *vielen Dank* for their work in the biological assays of my compounds. And to Uma, நன்றி! for her friendship and collaboration.

No quiero olvidar tampoco la ayuda de Raquel, mi compañera de viaje, y fatigas, por sus útiles consejos en aspectos de estilo y diseño gráfico; y, sobre todo, por haber estado animándome, y muy especialmente en los últimos años, los más complicados por el estrés y por la carga de trabajo.

A los amigos de la bici (Víctor, Jorge, Juanto, Miguel, Ander, Pedro, Jesús, Javi, Joserra, Javier, Ramón, Ricardo, Dani,...), por tantos ratos de desconexión repartidos por las montañas de la geografía española. No puedo dejar de acordarme de vosotros, por acompañarme en las pedaladas más relajadas de la escalada del gran puerto “*Hors Catégorie*” que es realizar una tesis doctoral.

Por último, gracias a los amigos de Zamora, de Sanabria, de Pamplona y de Larraona (Pablo, Juan, Jaime, Ignacio, Nacho, Carlos, Andrés, Pedro, Javier, Rafa, Cristóbal, Gorka, Micah, Manu, Ortega, Martín, Carmen, Ana, Angelines, Matilde, Mari Ángeles,...) por tantos buenos momentos durante todos estos años.

Índice

ÍNDICE / INDEX

Capítulos bilingües / Chapters in Spanish and English:

Glosario de abreviaturas / Abbreviations Glossary	IX
III. Hipótesis / Hypothesis	47
- <i>Hipótesis</i>	49
- <i>Hypothesis</i>	50
IV. Objetivos / Aims	51
- <i>Objetivos</i>	53
- <i>Aims</i>	56
IX. Conclusiones / Conclusions	271
- <i>Conclusiones</i>	273
- <i>Conclusions</i>	275

Índice completo

Índice	I
Glosario de abreviaturas / Abbreviations Glossary	IX
I. Introducción	1
1. <i>Cáncer</i>	3
- Situación actual y epidemiología del cáncer	4
- Bases moleculares del cáncer	8
- Causas del cáncer	9
▪ <i>Factores de riesgo relacionados con los hábitos</i>	9
▪ <i>Cáncer inducido por radiación</i>	10
▪ <i>Cáncer inducido por agentes químicos</i>	10
▪ <i>Cáncer inducido por radicales libres (envejecimiento tisular)</i>	10
▪ <i>Cáncer inducido por infecciones víricas o bacterianas</i>	11
▪ <i>Susceptibilidad genética al cáncer</i>	11
- Tratamientos	11
▪ <i>Cirugía</i>	11
▪ <i>Radioterapia</i>	12
▪ <i>Quimioterapia</i>	12

2. Muerte Celular: Apoptosis y Necrosis	18
- Apoptosis: Cambios morfológicos y fisiológicos	19
- Vías de señalización activadoras de la apoptosis	20
- Caspasas	20
3. Radicales Libres y Estrés Oxidativo	21
- El estrés oxidativo	21
- Radicales libres: ROS y RNS	22
- Mecanismos antioxidantes celulares	24
4. Selenio	25
- Selenio: Historia y abundancia	25
- Selenio: Producción y aplicaciones	25
- El selenio como oligoelemento	26
- Selenio en alimentos	27
- Selenocompuestos biológicos	27
▪ <i>Selenoaminoácidos</i>	28
▪ <i>Selenoproteínas</i>	29
▪ <i>Otros selenocompuestos no proteicos</i>	29
- Metabolismo del selenio	29
- Funciones biológicas del selenio	30
II. Antecedentes y Justificación	33
1. Selenio y cáncer	35
- Selenoderivados como quimiopreventivos y/o antitumorales	35
- Estudios del selenio como agente quimiopreventivo	36
▪ <i>Estudios nutricionales</i>	36
▪ <i>Estudios de marcadores de selenio</i>	36
▪ <i>Estudios con animales</i>	36
▪ <i>Ensayos epidemiológicos</i>	37
- Selenoderivados con actividad antitumoral	38
▪ <i>Selenoderivados inorgánicos</i>	38
<i>Dióxido de selenio</i>	38
<i>Selenito sódico</i>	39
▪ <i>Selenoderivados orgánicos</i>	39
<i>Metilselenol</i>	39
<i>Ácido metilselenínico</i>	39
<i>Selenoaminoácidos y derivados</i>	39
<i>Difenildiseleniuro</i>	40
<i>Ebselen y derivados</i>	40
<i>Selenocianuros</i>	40

- Mecanismos de acción antitumoral de los compuestos	40
▪ <i>Reducción del estrés oxidativo</i>	41
▪ <i>Inducción de mutaciones</i>	41
▪ <i>Inhibición de la angiogénesis</i>	41
▪ <i>Inducción de la apoptosis</i>	42
2. Azufre, selenio y nematodos	43
- Nemotoxicidad del selenio y derivados	43
- Nemotoxicidad del azufre y derivados	43
3. Antecedentes del grupo de investigación	45
- Selenio y cáncer	45
- Selenio y parásitos	45
III. Hipótesis / Hypothesis	47
- <i>Hipótesis</i>	49
- <i>Hypothesis</i>	50
IV. Objetivos / Aims	51
- <i>Objetivos</i>	53
- <i>Aims</i>	56
V. Plan de Trabajo	59
1. Diseño y Síntesis Química	61
2. Determinación Estructural	63
3. Valoraciones de Actividad	64
- Evaluación de Citotoxicidad	64
- Evaluación Quimiopreventiva	65
- Evaluación de Nemotoxicidad	65
VI. Síntesis Química	67
1. Series de selenoésteres desarrolladas	69
2. Esquemas generales de síntesis	71
3. Métodos sintéticos	73
- Método sintético general	73
1. <i>Cloración del ácido carboxílico con cloruro de tionilo</i>	74
2. <i>Formación del agente selenante</i>	75
3. <i>Formación del arilcarbonilseleniuro a partir del cloruro de ácido</i>	75
4. <i>Ataque nucleofílico del arilcarbonilseleniuro sobre ácido bromoacético</i>	76
- Otros métodos sintéticos	76
▪ <i>Selenoésteres de metiloxicarbonilmetilo y 2-metiloxicarboniletilo</i>	76

<i>Esterificación de un selenoéster de carboximetilo con catálisis ácida</i>	77
• <i>Selenoanhídridos</i>	78
<i>Reacción de ciclación</i>	79
4. <i>Procesos Sintéticos</i>	81
- Instrumental empleado	81
- Serie I: Selenoésteres de carboxialquilo	83
- Serie II: Selenoésteres de carbamoilmetilo	105
- Serie III: Selenoanhídridos	110
- Serie IV: Selenoésteres de R''-oxicarbonilalquilo	113
- Serie V: Selenoésteres de acilalquilo	137
- Serie VI: Selenoésteres de metilo	141
VII. Análisis Orgánico	151
1. <i>Espectroscopía de Infrarrojo</i>	153
- Espectro infrarrojo de un selenoéster	153
- Tensión C=O de carbonilo de selenoéster	154
- Espectros IR de los derivados de las diferentes series	156
2. <i>Espectroscopía de RMN</i>	162
- Espectroscopía de ¹ H-RMN	162
• <i>Señales de los principales R'</i>	163
• <i>Espectros de ¹H-RMN de los derivados de las diferentes series</i>	164
- Espectroscopía de ¹³ C-RMN	169
• <i>Metileno en α al átomo de selenio</i>	169
• <i>Carbonos carbonílicos</i>	169
• <i>Señales de los principales R'</i>	172
• <i>Señales adicionales en R</i>	173
3. <i>Espectrometría de Masas</i>	174
- Espectro de Masas tipo	175
- Derivados del ácido <i>p</i> -clorobenzoico	175
- Derivados del ácido benzoico	177
- Derivados del ácido fenilacético	179
- Derivados del ácido 3,5-dimetoxibenzoico	180
- Diselenodiésteres (<i>Serie VI.B</i>)	182
4. <i>Ensayos de Estabilidad</i>	184
VIII. Valoraciones de Actividad	189
A. <i>Evaluación de Citotoxicidad</i>	191
1. <i>Material y Métodos</i>	193
- Método del MTT:	193

• <i>Fundamento</i>	193
• <i>Metodología</i>	194
- Método del Cristal Violeta:	200
• <i>Fundamento</i>	200
• <i>Metodología</i>	200
2. Resultados y Discusión	206
- Método del MTT	206
• <i>Evaluación preliminar de la citotoxicidad (PC-3)</i>	207
• <i>Ensayos de Selectividad (RWPE-1 / PC-3)</i>	214
• <i>Ensayos de citotoxicidad en otras líneas tumorales</i>	216
• <i>Discusión final</i>	219
- Método del Cristal Violeta	221
• <i>Evaluación de la citotoxicidad por el método del cristal violeta</i>	221
• <i>Resultados en las líneas murinas</i>	225
• <i>Integración de los resultados</i>	226
• <i>Descarte de falsos positivos en los ensayos del MTT</i>	227
B. Evaluación Quimiopreventiva	229
1. Material y Métodos	231
- Análisis Electroquímico: Voltametría Cíclica	231
• <i>Fundamentos de la Voltametría Cíclica</i>	231
• <i>Aplicaciones de la Voltametría Cíclica</i>	235
• <i>Metodología</i>	236
- Ensayos “ <i>in vitro</i> ”	238
• <i>Ensayo del tiofenol: determinación de la actividad peroxidasa</i>	238
• <i>Determinación de la eliminación del radical DPPH</i>	241
2. Resultados y Discusión	244
- Análisis Electroquímico: Voltametría Cíclica	244
• <i>Ensayos preliminares</i>	244
• <i>Screening electroquímico</i>	246
- Ensayos “ <i>in vitro</i> ”	253
• <i>Actividad peroxidasa de los selenoésteres</i>	253
• <i>Eliminación de DPPH por los selenoésteres</i>	256
- Integración de los resultados	259
C. Evaluación Nematicida	261
1. Material y Métodos	263
- Ensayos de Nemotoxicidad	263
2. Resultados y Discusión	267
- Ensayos de Nemotoxicidad	267

IX. Conclusiones / Conclusions	271
- <i>Conclusiones</i>	273
- <i>Conclusions</i>	275
X. Anexos	277
1. Síntesis Química	279
- Relación de Productos Sintetizados	279
2. Valoraciones de Actividad	285
- A. Evaluación de Citotoxicidad	285
1. Método del MTT	285
▪ <i>Líneas celulares empleadas</i>	285
▪ <i>Curvas dosis-respuesta. Ensayos de citotoxicidad-selectividad</i>	288
▪ <i>Valores de confianza de los parámetros calculados</i>	293
2. Método del Cristal Violeta	299
▪ <i>Líneas celulares empleadas</i>	299
▪ <i>Curvas dosis-respuesta de los selenoésteres</i>	302
▪ <i>Curvas dosis-respuesta de fármacos quimioterapéuticos</i>	308
▪ <i>Índices de selectividad de los selenoésteres</i>	309
▪ <i>Valores de confianza de las IC₅₀ calculados</i>	310
- C. Evaluación de Nemotoxicidad	313
▪ <i>Curvas dosis-respuesta.</i>	313
▪ <i>Valores de confianza de los parámetros calculados</i>	315
XI. Bibliografía	317
XII. Figuras empleadas	341

***Glosario de Abreviaturas /
Abbreviations Glossary***

GLOSARIO DE ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS GLOSSARY

A

α : Coeficiente de transferencia, voltametría (*Transfer coefficient, voltammetry*).

A549: Línea celular humana de carcinoma de pulmón (*Human lung carcinoma cell line*).

ab.rel.: Abundancia relativa, EM (*Relative abundance, EM*).

Abs: Absorbancia (*Absorbance*).

ATCC: Centro americano que guarda las líneas celulares de referencia (*American Type Culture Collection*).

Apaf-1: Factor 1 activante de peptidasa apoptótica (*Apoptotic peptidase activating factor-1*).

B

BBSKE: 1,2-bis[1,2-benzoisosenazolona-3-(2H)-cetona]etano (*1,2-bis[1,2-benzisosenazolone-3-(2H)ketone]ethane*).

BPE: Extracto de pituitaria bovina (*Bovine pituitary extract*).

C

Caspasa: Cisteín-aspartato proteasa (*Caspase, cystein-aspartate-protease*).

CIMA: Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra (*Applied Medical Research Center, Universidad de Navarra*).

Cdc27: Proteína 27 del ciclo de división celular (*Cell division cycle 27 homolog*).

CDCl₃: Cloroformo deuterado (*Deuterated chloroform*).

CHN: Análisis elemental carbono-hidrógeno-nitrógeno (*Carbon-hydrogen-nitrogen elemental analysis*).

c-myc: Gen regulador (*Regulator gene*).

COSY, ¹H-¹H: Espectroscopía RMN de correlación, experimento de RMN bidimensional (*Correlation spectroscopy, a two-dimensional NMR experiment*).

CT26: Línea celular de carcinoma murino de colon (*Murine colon carcinoma cell line*).

CV: Cristal violeta (*Violet crystal*).

D

- d:** Banda de intensidad débil, IR (*Low intensity band, IR*).
- Doblete, RMN (*Doublet, NMR*).
- δ:** Desplazamiento químico, RMN (*Chemical shift, NMR*).
- \bar{D} : Desviación media respecto de la media (*Median deviation respect the median*).
- dd:** Doble doblete, RMN (*Doble doublet, NMR*).
- ddd:** Doble doble doblete, RMN (*Doble doble doublet, NMR*).
- ddt:** Doble doble triplete, RMN (*Doble doble triplet, NMR*).
- ΔE_p : Diferencia de potenciales, voltametría (*Potentials interval, voltammetry*).
- dt:** Doble triplete, RMN (*Doble triplet, NMR*).
- DIO:** Yodotironina deiodinasa, selenoproteína (*Iodothyronine deiodinase*).
- DIP:** Inserción directa por sonda, EM (*Direct insertion probe, MS*).
- DL₅₀:** Dosis letal 50 % (*Lethal dose 50 %*).
- DMEM:** Medio de cultivo celular modificado Eagle de Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle medium for cell culture*).
- DMSO:** Dimetilsulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*).
- DMSO-d₆:** Dimetilsulfóxido deuterado (*Deuterated dimethyl sulfoxide*).
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico, ADN (*Deoxyribonucleic acid*).
- DNA-PK:** Proteína quinasa dependiente de DNA (*DNA-dependent protein kinase*).
- Doxo.:** Doxorubicina (*Doxorubicine*).
- DPPH:** Radical 2,2-difenilpicrilhidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical*).

E

- E° : Potencial formal o estándar de reducción, voltametría cíclica (*Formal or standard reduction potential, cyclic voltammetry*).
- EM:** Espectrometría de masas (*MS, Mass spectrometry*).
- E_{mid} : Potencial formal de reducción, voltametría cíclica (*Formal reduction potential, cyclic voltammetry*).
- $E_{p/2}$: Potencial al cual la intensidad es la mitad de la máxima del pico, voltametría cíclica (*Potential in which current is half of the peak maximum, cyclic voltammetry*).
- E_{pa} : Potencial anódico, voltametría cíclica (*Anodic potential, cyclic voltammetry*).
- E_{pc} : Potencial catódico, voltametría cíclica (*Cathodic potential, cyclic voltammetry*).
- ERK 1/2:** Quinasa extracelular regulada 1/2 (*Extracellular regulated kinase 1/2*).
- eV:** Electronvoltio (*Electronvolt*).

F

- f:** Banda de intensidad fuerte, IR (*High intensity band, IR*).

F: Constante de Faraday, electroquímica (*Faraday constant, electrochemistry*).

FADD: Proteína con dominios de muerte asociada a Fas (*Fas-associated protein with death domains*).

Fap: Poliposis adenomatosa familiar (*Familial adenomatous polyposis*).

FasL: Ligando del receptor Fas (*Familial adenomatous polyposis*).

FCS: Suero fetal de ternera (*Fetal calf serum*).

FD: Fusión con descomposición, en determinación de puntos de fusión (*Melting with decomposition, in melting points determination*).

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*).

G

GPx: Glutathion peroxidasa, selenoproteína (*Glutathione peroxidase, selenoprotein*).

H

HDL: Lipoproteína de alta densidad (*High-density lipoprotein*).

HepG2: Línea celular humana de carcinoma hepático (*Human hepatic carcinoma cell line*).

HMBC, ¹³C-¹H: Espectroscopía de correlación de enlaces múltiples, experimento de RMN bidimensional (*Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy, a two-dimensional NMR experiment*).

HMQC, ¹³C-¹H: Espectroscopía de correlación de enlaces simples, experimento de RMN bidimensional (*Heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy, a two-dimensional NMR experiment*).

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (*High pressure liquid chromatography*).

H-ras: Oncogén (*Oncogen*).

HT29: Línea celular humana de adenocarcinoma de colon (*Human colorectal adenocarcinoma cell line*).

HTLV-1: Virus linfotrópico humano de tipo 1 de células T (*human T-cells lymphotropic virus type 1*).

HUVEC: Línea celular humana de endotelio de cordón umbilical (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

I

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*).

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50 % (*Inhibitory concentration 50 %*).

IG₅₀: Concentración inhibitoria 50 % del crecimiento (*Growth inhibition 50 %*).

i_{pa} : Intensidad anódica, voltametría cíclica (*Anodic current, cyclic voltammetry*).

i_{pc} : Intensidad catódica, voltametría cíclica (*Cathodic current, cyclic voltammetry*).

IR: Espectroscopía de infrarrojo (*Infrared spectroscopy*).

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

J

J: Constante de acoplamiento dipolo-dipolo indirecto, RMN (*Spin-spin coupling constant, NMR*).

K

k-ras: Oncogén (*Oncogen*).

K-SFM: Suero libre de queratinocitos (*Keratinocyte serum free medium*).

L

LC₅₀: Concentración letal 50 % (*Lethal concentration 50 %*).

LDL: Lipoproteína de baja densidad (*Low-density lipoprotein*).

M

m: Banda de intensidad media, IR (*Medium intensity band, IR*).

 Multiplete, RMN (*Multiplet, NMR*).

M: Mol (*Mole*).

M⁺: Ión o fragmento molecular en EM (*Molecular ion in MS*).

MAPK: Protein quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*).

MCF-7: Línea celular humana de adenocarcinoma de mama (*Human breast adenocarcinoma cell line*).

Met-RNA_t: RNA de transferencia de metionina (*Metionyl transfer RNA*).

MS-DIP: Espectrometría de masas con inserción directa por sonda (*Direct insertion probe mass spectrometry*).

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (*Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

mV: Milivoltio (*Millivolt*).

m/z: Relación masa/carga, EM (*Mass-charge relation, EM*).

N

$\tilde{\nu}$: Número de ondas, IR (*Wavenumber, IR*).

n: Número de electrones intercambiados en un proceso redox (*Number of electrons involved in a redox reaction*).

N₀: Número de nematodos vivos, a tiempo cero (*Number of alive nematodos, at zero time*).

N_{24h}: Número de nematodos vivos, a las 24 h (*Number of alive nematodos, at 24 h*).

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).

NCI: Instituto nacional del cáncer de los Estados Unidos (*United States National Cancer Institute*).

NF- κ B: Factor nuclear kappa promotor de cadena ligera de células B activadas (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

NIH-3T3: Línea celular de fibroblasto embrionario murino (*Murine embryonic fibroblast cell line*).

NK (célula): Célula asesina natural (*Natural Killer cell*).

NOESY, ¹H-¹H: Espectroscopía de efecto nuclear de Overhauser, experimento de RMN bidimensional (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy, a two-dimensional NMR experiment*).

NOS: Óxido nítrico sintasa (*Nitric oxide synthase*).

NPC: Prevención nutricional del cáncer, estudio epidemiológico americano (*Nutritional Prevention of Cancer trial, an epidemiologic american study*).

NP40: Nonilfenoxipolietoxietanol, detergente (*Nonyl phenoxypolyethoxyethanol, detergent*).

O

OVCAR-3: Línea celular humana de adenocarcinoma ovárico (*Human ovarian adenocarcinoma cell line*).

P

p21: Inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*).

p27: Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*).

p53: Proteína tumoral 53 (*Tumor protein 53*).

PARP: Polimerasa de poli-ADP ribosa (*Poly-ADP ribose polymerase*).

PBS: Buffer fosfato salino (*Phosphate buffer saline*).

PC-3: Línea celular humana de cáncer de próstata andrógeno-independiente (*Human prostate cancer androgen-independent cell line*).

PKC: Proteína quinasa C (*Protein kinase C*).

PM: Peso molecular (*Molecular weight*).

PSA: Antígeno específico de próstata (*Prostate specific antigen*).

Q

q: Cuadruplete, RMN (*Quartet, NMR*).

R

r: Ratio entre la velocidad reacción catalizada y no catalizada, ensayo GPx (*Rate between the catalyzed and non-catalyzed reaction, GPx assay*).

R: Constante universal de los gases ideales (*Universal gas constant*).

RMN: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (*NMR, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*).

RMN, ¹H: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (*¹H-NMR, Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*).

RMN, ¹³C: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (*¹³C-NMR, ¹³Carbon Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*).

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*).

RNS: Especies reactivas de nitrógeno (*Reactive nitrogen species*).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*).

RPMI 1640: Medio de cultivo celular carente de *L*-glutamina, ácido fólico y bicarbonato sódico (*Cell culture medium without glutamine, folic acid and bicarbonate*).

RWPE-1: Línea celular humana no tumoral de epitelio prostático (*Non-tumoral human cell line derived of prostate epithelium*).

S

s: Singlete, RMN (*Singlet, NMR*).

σ: Desviación típica (*Standard deviation*).

sa: Singlete ancho, RMN (*Broad singlet, NMR*).

sc: Singlete con cola, RMN (*Tailed singlet, NMR*).

Secis: Secuencia de inserción de selenocisteína (*Selenocysteine insertion sequence*).

Secys; Selenocisteína (*Selenocysteine*).

SELECT: Prevención nutricional del cáncer con selenio y vitamina E, estudio epidemiológico americano (*Selenium and vitamin E cancer prevention trial, an epidemiologic american study*).

Semet: Selenometionina (*Selenomethionine*).

SI: Índice de selectividad (*Selectivity index*).

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (*Acquired immunodeficiency syndrome*).

SN2: Sustitución nucleofílica de orden 2 (*Bimolecular nucleophilic substitution*).

SOD: Superóxido dismutasa (*Superoxide dismutase*).

SV40: Poliomavirus vacuolante 40 de simios (*simian vacuolating polyomavirus 40*).

T

t: Triplete, RMN (*Triplet, NMR*).

3T3: Línea celular de fibroblasto embrionario murino (*Murine embryonic fibroblast cell line*).

T₃: Triyodotironina, hormona tiroidea (*Triiodothyronine, thyroid hormone*).

T₄: Tiroxina o tetrayodotironina, hormona tiroidea (*Thyroxine, thyroid hormone*).

td: Triple doblete, RMN (*Triple doublet, NMR*).

tt: Triple triplete, RMN (*Triple triplet, NMR*).

TGI: Concentración a la que se produce la inhibición total del crecimiento (*Total growth inhibition concentration*).

THF: Tetrahidrofurano (*Tetrahydrofuran*).

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (*Tumor necrosis factor- α*).

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (*TNF-related apoptosis induced ligand*).

t-RNA: RNA de transferencia (*Transfer RNA*).

TrxR: Tiorredoxina reductasa, selenoproteína (*Thioredoxin Reductase*).

U

UGA: Codón de parada con secuencia uracilo-guanina-adenina (*Stop codon, sequence uracil-guanine-adenine*).

uma: Unidad de masa atómica (*Atomic mass unit*).

UV: Ultravioleta (*Ultraviolet*).

V

v: Velocidad de barrido, voltimetría cíclica (*Scan rate, cyclic voltammetry*).

Viabilidad, ensayos de nemotoxicidad (*Viability, nemotoxicity assays*).

V: Voltio (Volt).

v_c: Velocidad de la reacción catalizada, ensayo GPx (*Catalyzed reaction rate, GPx assay*).

Vid.: Abreviatura del latín “*vide*”, véase (*Abbreviation of the Latin “vide”, look at*).

Vinc.: Vincristina (*Vincristine*).

v_{nc}: Velocidad de la reacción no catalizada, ensayo GPx (*Non-catalyzed reaction rate, GPx assay*).

W

WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*).

WNT7B: Oncogén (*Oncogen*).

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Con la palabra cáncer se hace referencia a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por la conversión de una célula sana en un grupo de células malignas capaces de dividirse y crecer incontroladamente, llegando a suponer un peligro para la salud e integridad del resto del organismo^{1,2}. Con el fin de distinguir las células tumorales malignas de las sanas Hanahan y Weinberg proponen las seis propiedades diferenciadoras de las células tumorales con respecto a las células sanas, las cuales se detallan a continuación y se muestran esquemáticamente en la *Figura 1.1*³:

1 - Se dividen rápidamente sin necesidad de recibir estímulos externos en forma de señales de crecimiento.

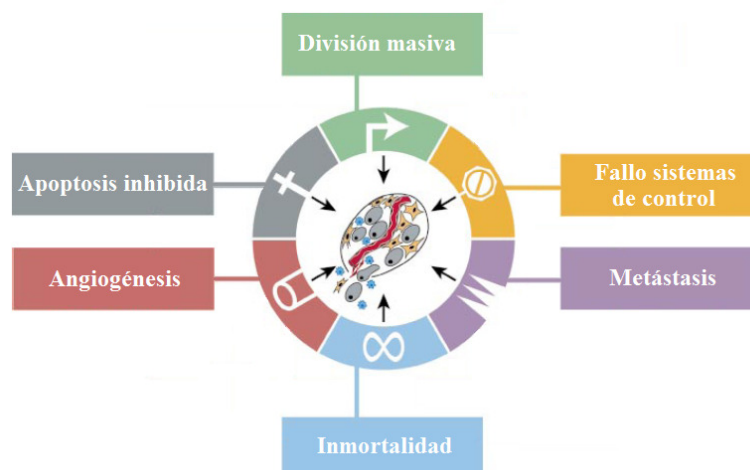
2 - No pueden desencadenar los procesos apoptóticos, a pesar de tener gravemente dañado su genoma, por tenerlos fuertemente reprimidos.

3 - No responden a señales de inhibición del crecimiento liberadas por otras células al no funcionar correctamente sus sistemas de control del ciclo celular.

4 - Liberan sustancias que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, para asegurarse un suministro de nutrientes que les permita dividirse rápidamente. Este proceso se conoce como angiogénesis.

5 - Pueden invadir tejidos adyacentes y migrar por el cuerpo colonizando órganos distintos del de partida. Este proceso de colonización se conoce como metástasis.

6 - Pueden dividirse ilimitadamente, al contrario que las células normales, las cuales sólo pueden replicarse un número finito de veces.



*Figura 1.1: Propiedades diferenciadoras de una célula tumoral maligna*³.

Situación actual y epidemiología del cáncer

El cáncer es actualmente una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. En España, según las estadísticas oficiales del Ministerio de Sanidad y tal y como se muestra en la *Figura 1.2*, fue la segunda causa de muerte en el año 2009, sólo superada por las enfermedades cardiovasculares ⁴.

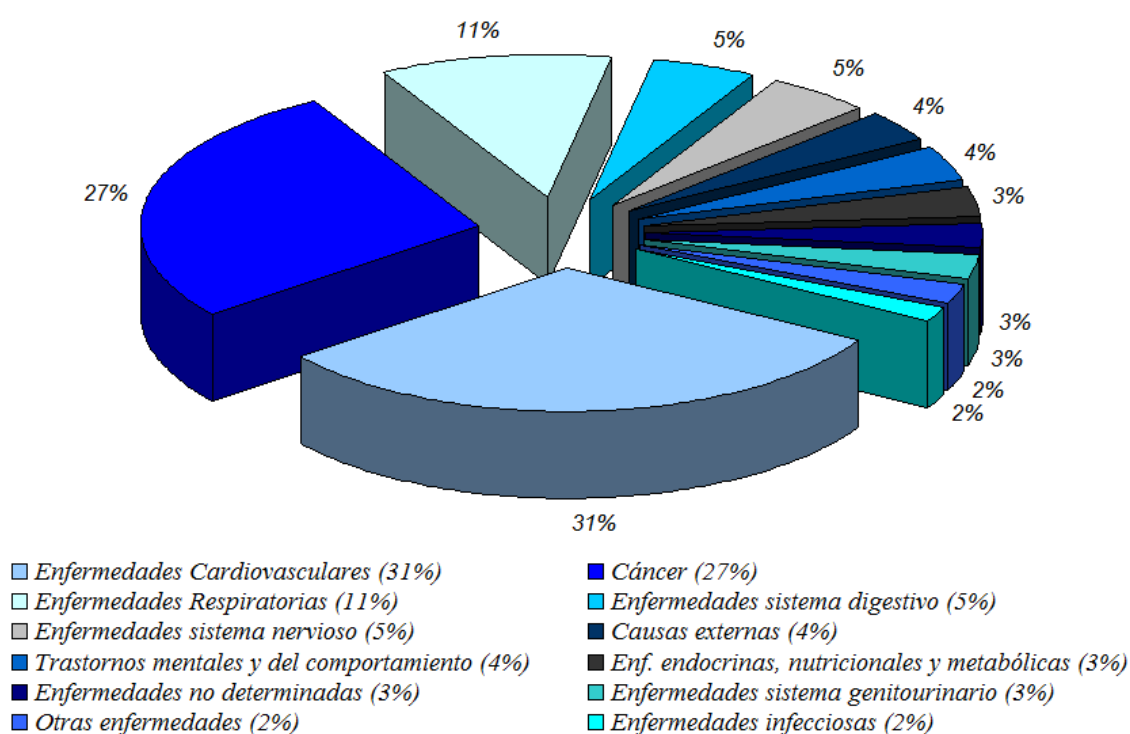


Figura 1.2: Defunciones por causa de muerte. España, 2009 ⁴.

La prevalencia del cáncer es mayor en hombres que en mujeres, posiblemente por el mayor estrés oxidativo al que están expuestos. El cáncer fue la primera causa de muerte de los varones españoles en el año 2009, al producir el 32,6 % de las defunciones frente al 27,5 % de decesos debidos a las enfermedades coronarias. En mujeres el orden se invierte: las enfermedades cardiovasculares y el cáncer suponen el 35,1 % y el 21,6 % de las defunciones, respectivamente.

En números absolutos, desde el año 2004, más de 100.000 personas fallecen debido a esta enfermedad cada año en España ⁴. Como ejemplo comparativo, en el año 2008 el cáncer causó 104.054 defunciones en España ⁴, 215.442 en Alemania ⁵ y 565.469 en los Estados Unidos ⁶. La cifra de fallecimientos estimada por el IARC para dicho año en todo el mundo - 7,57 millones ⁷ - es superior a la población actual conjunta de las ciudades de Berlín y Madrid - 6,73 millones ^{8,9} - y supone que cada cuatro segundos una persona muere en el mundo a causa del cáncer.

El cáncer es una enfermedad cuyo desarrollo es lento, llegando en algunos casos a requerir años e incluso décadas. Por esta razón, el riesgo de padecer cáncer aumenta con la edad y, en consecuencia, en aquellos países en los cuales la esperanza de vida sea mayor, su tasa de incidencia será más elevada al vivir la población de los mismos el tiempo suficiente para que pueda desarrollarse la enfermedad¹⁰. Así, tal y como se observa en la *Figura 1.3*, es una enfermedad más frecuente en las naciones desarrolladas que en las subdesarrolladas⁷.

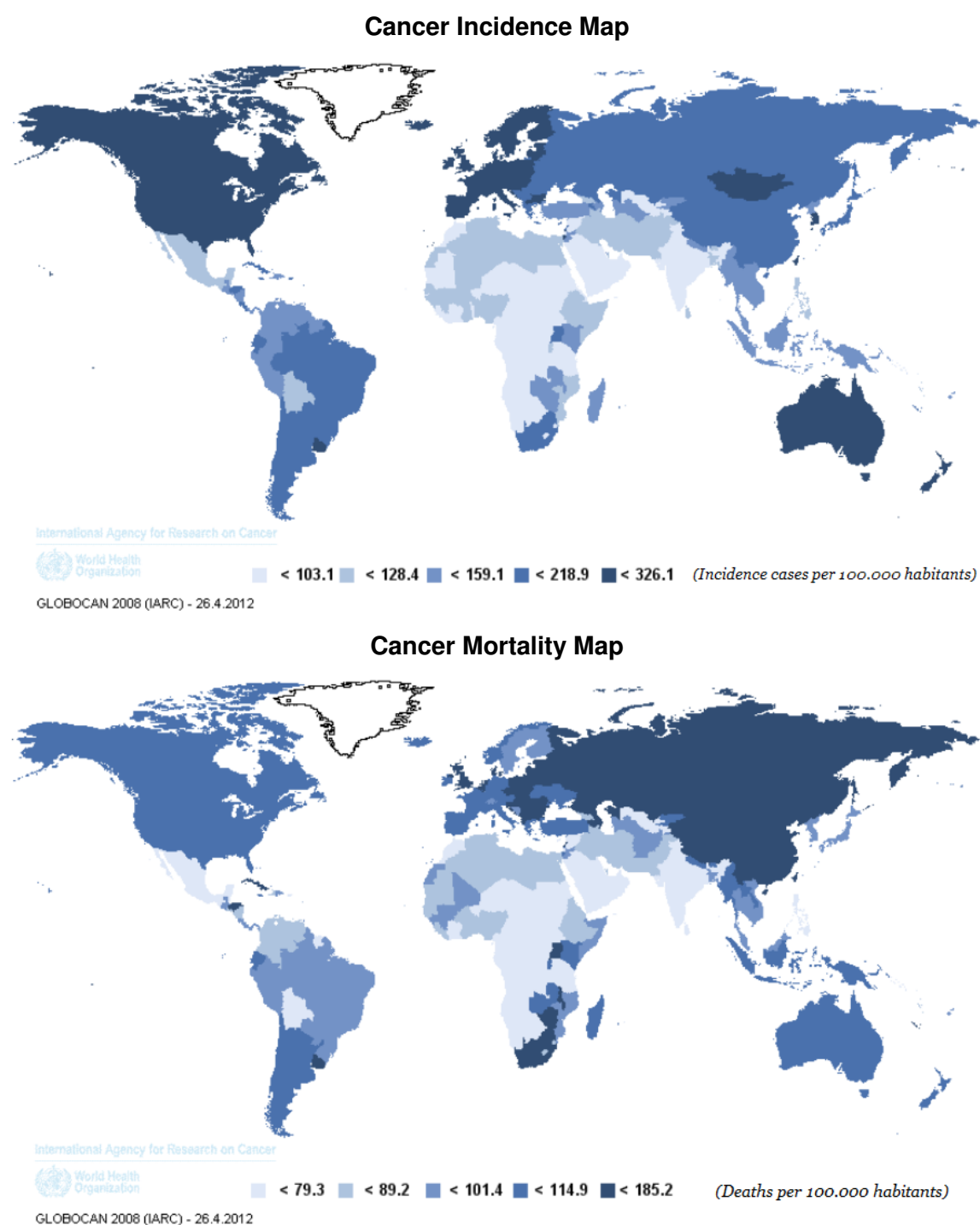


Figura 1.3: Incidencia y mortalidad del cáncer por países⁷.

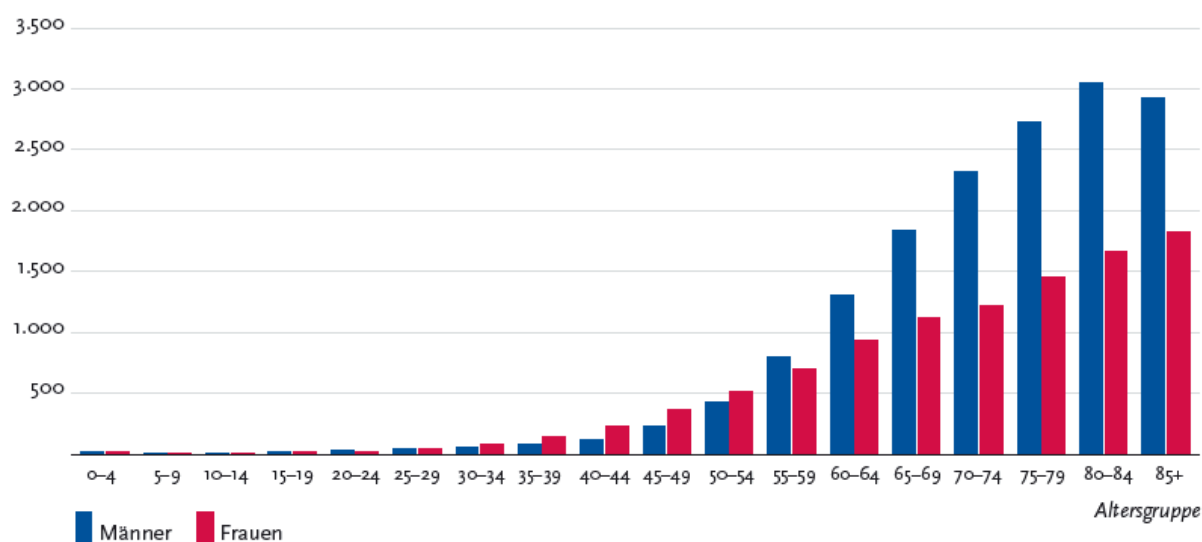
Sin embargo, la incidencia no sólo depende de la edad, sino que otros factores como la alimentación, el estilo de vida y la exposición a agentes carcinógenos desempeñan un papel destacado. En cambio, la mortalidad no está tan ligada a los factores descritos al depender además de otras variables como los recursos dedicados por el sistema sanitario de cada país a la detección y tratamiento del cáncer.

El aumento de la incidencia del cáncer asociado al envejecimiento puede observarse en la *Figura 1.4*, extraída del informe “*Krebs in Deutschland 2012*”⁵, en la cual se representan gráficamente las tasas de incidencia (*Erkrankungsraten*) del cáncer en función del intervalo de edad considerado (*Altersgruppe*) entre hombres (*Männer*) y mujeres (*Frauen*) en Alemania en los años 2007-2008. La enfermedad, al igual que en el caso español previamente estudiado⁴, afecta en mayor medida al sexo masculino que al femenino. La bajada de la incidencia en los varones a partir de los 84 años puede deberse al riesgo de padecer cualquier otra enfermedad con consecuencias fatales por la elevada edad, claramente por encima de la esperanza de vida.

Abbildung 3.1.4

Altersspezifische Erkrankungsraten nach Geschlecht ICD-10 C00 – 97 ohne C44, 2007 – 2008

je 100.000



*Figura 1.4: Incidencia del cáncer en Alemania, en función del sexo y de la edad*⁵.

Estudios similares en Estados Unidos - serie *Cancer Facts & Figures* de la American Cancer Society¹¹ - y en Navarra - Ardanaz *et al*¹² - confirman el aumento de la incidencia con la edad, demostrando que los datos alemanes mostrados no son una excepción y que pueden extrapolarse a otros países. En el estudio realizado por Ardanaz y colaboradores en Navarra¹² también se observa la bajada de la incidencia del cáncer en hombres de edad avanzada. Esta relación entre el cáncer y el envejecimiento tiene como consecuencia que en el futuro la prevalencia de la enfermedad será mayor, debido al aumento de la esperanza de vida y de la población mundial. De hecho, según los datos recogidos en la página web “*Globocan*”⁷, de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) de la *World Health Organization* (WHO), se estima que el número de fallecimientos a causa del cáncer en el año 2030 se elevará hasta los 13,1 millones, valor superior, por ejemplo, a la población de Pekín/Beijing - 11,7 millones¹³.

Una vez conocido el alcance local y global del cáncer la siguiente pregunta es saber en qué órganos se desarrolla la enfermedad con mayor frecuencia. En el estudio Globocan se incluyen figuras con la incidencia y mortalidad de los cánceres más extendidos en la población mundial (Figura 1.5), que son los cánceres de pulmón, próstata y colon en hombres; y los de mama, colon y útero en mujeres.

Por la menor esperanza de vida de la población de los países en desarrollo, en dichas naciones los cánceres más frecuentes son los asociados a deficiencias nutricionales, a infecciones, o a hábitos de vida insanos que aumenten el riesgo de padecer cáncer. O sea, son más frecuentes el cáncer de estómago (causado por infección con *Helicobacter pylorii*), los cánceres del sistema digestivo relacionados con la malnutrición y los cánceres de pulmón e hígado, asociados al tabaquismo y al alcoholismo, respectivamente ¹⁴. Así, por el gran porcentaje que supone dentro de la población global la de los países en desarrollo, en los países industrializados hay variaciones significativas con respecto a los datos globales de la Figura 1.5. Como ejemplo, en los EEUU (Figura 1.6) el cáncer de pulmón tiene una menor incidencia en varones, pero escala posiciones en las mujeres ¹¹. El estudio navarro ¹² proporciona datos similares a los americanos.

La Figura 1.5 da además una idea de los porcentajes de mortalidad de cada tipo de cáncer. Sin lugar a dudas, de entre los mostrados el más mortífero es el cáncer de pulmón, el cual en 2008 causó un número fallecimientos equivalentes al 85,6% de los nuevos casos diagnosticados en dicho año. En el lado opuesto se encuentran los cánceres de próstata en hombres y de mama en mujeres, en los cuales los porcentajes de decesos con respecto al de nuevos casos disminuyen al 28,7 % y al 33,1 %, respectivamente.

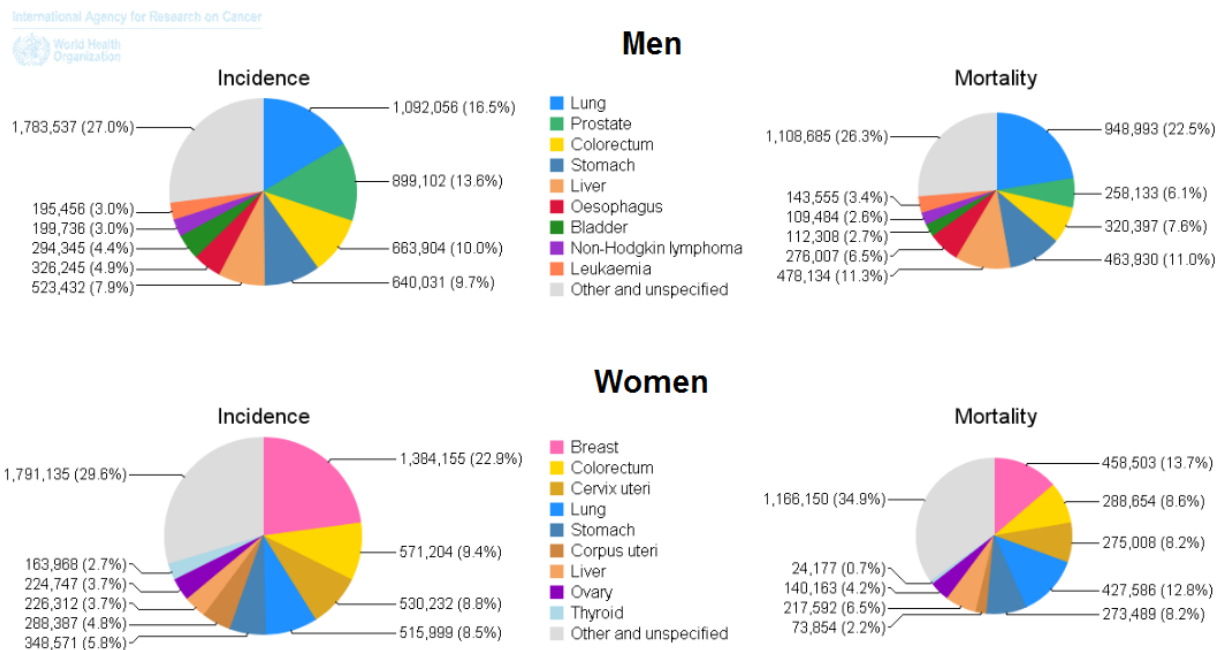
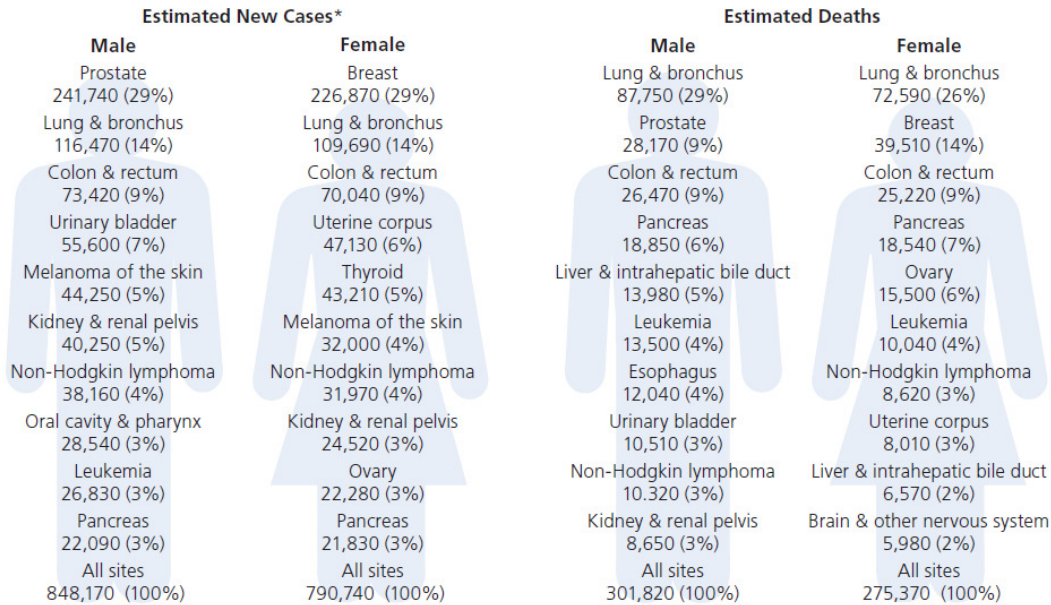


Figura 1.5: Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población mundial en el año 2008, por sexos. Informe Globocan (IARC) ⁷.



*Excludes basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

©2012, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

Figura 1.6: Cáncer: incidencia y mortalidad estimadas para los distintos tipos de cáncer en los EEUU (2011) ¹¹.

Bases moleculares del cáncer

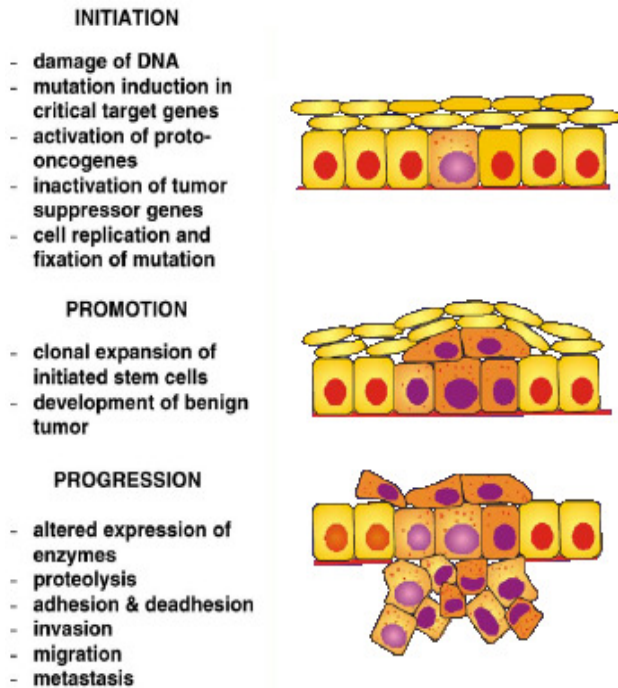


Figura 1.7: Etapas de la carcinogénesis ¹⁴.

La transformación de una célula normal en una célula tumoral es un proceso lento que transcurre a través de tres etapas diferenciadas: iniciación, promoción y progresión, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1.7. Desde el comienzo hasta la enfermedad propiamente dicha pueden pasar años.

El cáncer se desarrolla cuando una célula sufre una serie de mutaciones sucesivas que afectan a los mecanismos reguladores de la división celular y de la apoptosis. Si dichos cambios no alteraran dichos mecanismos, la supervivencia de la célula tumoral no sería viable, puesto que en circunstancias normales, cuando una mutación es detectada y la célula no es capaz de corregirla, se activa la cascada de reacciones que conducen a la apoptosis o muerte celular programada.

La aparición de la primera mutación se conoce como fase de iniciación. La etapa posterior en la cual se van acumulando mutaciones y la célula va ganando malignidad al diferenciarse poco a poco de las células sanas, a la vez que aumenta su velocidad de división, es la fase de promoción y en sí no tiene porque ser patológica: los tumores benignos son los que se encuentran en esta fase y por sí solos no producen la enfermedad; aunque con el tiempo puedan evolucionar hacia un tumor maligno. La extensión de esta etapa en el tiempo es una de las causas que explican el hecho de que el cáncer sea una enfermedad asociada al envejecimiento.

Una vez que el tumor se encuentra descontrolado adquiere la capacidad de invadir los tejidos del órgano en el cual se ha desarrollado el tumor. En los casos más severos, las células tumorales pueden adquirir la capacidad de migrar y colonizar otros tejidos corporales distintos del original, extendiendo así la enfermedad por el resto del cuerpo humano. Este último proceso se conoce con el nombre de metástasis. Esta etapa invasiva, bien sea local o metastática, constituye la tercera fase o fase de progresión, que representa la enfermedad propiamente dicha ^{1,2,10,15-17}.

Causas del cáncer

Para que una célula normal se transforme en una célula cancerosa se han de producir una serie de mutaciones sucesivas. Ahora bien, los agentes que pueden inducir dichas mutaciones son muy variados: agentes químicos presentes en el medio, radiación, infecciones víricas, parasitarias o bacterianas; hábitos perjudiciales para la salud como el tabaco; estilos de vida como el sedentarismo, especies radicalarias de oxígeno generadas como subproductos del metabolismo celular...

Un agente cualquiera de los anteriores puede producir cáncer por sí solo, pero lo más frecuente es que la enfermedad esté producida por la acción combinada de dos o más factores. A continuación se estudiará cómo pueden producir cáncer distintos agentes químicos, físicos o biológicos ^{1,2,14}.

Factores de riesgo relacionados con los hábitos

Se ha demostrado que determinados hábitos y estilos de vida aumentan el riesgo de desarrollar cáncer. Entre ellos cabría citar los siguientes, que inducen cáncer en las localizaciones indicadas ^{2,14,18}:

- *Tabaco*: Cáncer de pulmón, laringe, esófago, vejiga, riñón, garganta, estómago, páncreas, cérvix, boca.
- *Exposición al sol y a lámparas UV*: Cáncer de piel y melanoma.
- *Alcohol*: Cáncer de hígado, mama, garganta, esófago y laringe.
- *Dieta poco equilibrada rica en grasas*: Cáncer de colon, próstata y útero.
- *Obesidad y sedentarismo*: Cáncer de mama, colon, esófago, riñón y útero.

Cáncer inducido por radiación

Los distintos tipos de radiación de alta energía pueden dañar el DNA, y en consecuencia, producir cáncer. De hecho, los rayos X y los rayos gamma se conocen como radiación ionizante. Ambos, al atravesar los tejidos generan radicales libres y especies reactivas de oxígeno que pueden reaccionar con el DNA, provocando roturas del mismo, mutaciones puntuales o translocaciones cromosómicas; entre otros efectos. Las principales fuentes de radiación ionizante son los isótopos radiactivos y la radiación cósmica^{1,14,17}. La radiación ultravioleta, a su vez, produce dímeros de pirimidinas, los cuales, si no son reparados correctamente, pueden producir mutaciones puntuales¹⁹.

Cáncer inducido por agentes químicos

Desde antiguo se conoce que la exposición a determinados compuestos químicos por parte de trabajadores de profesiones muy concretas (mineros, industria textil...) era responsable de la aparición de enfermedades que no se daban en el resto de la población, entre las cuales se encontraban algunos tipos determinados de cáncer producidos por agentes químicos. En la *Figura 1.8* se recogen los carcinógenos químicos más conocidos, agrupados en distintas familias en función de su estructura^{1,14,18,20-21}.

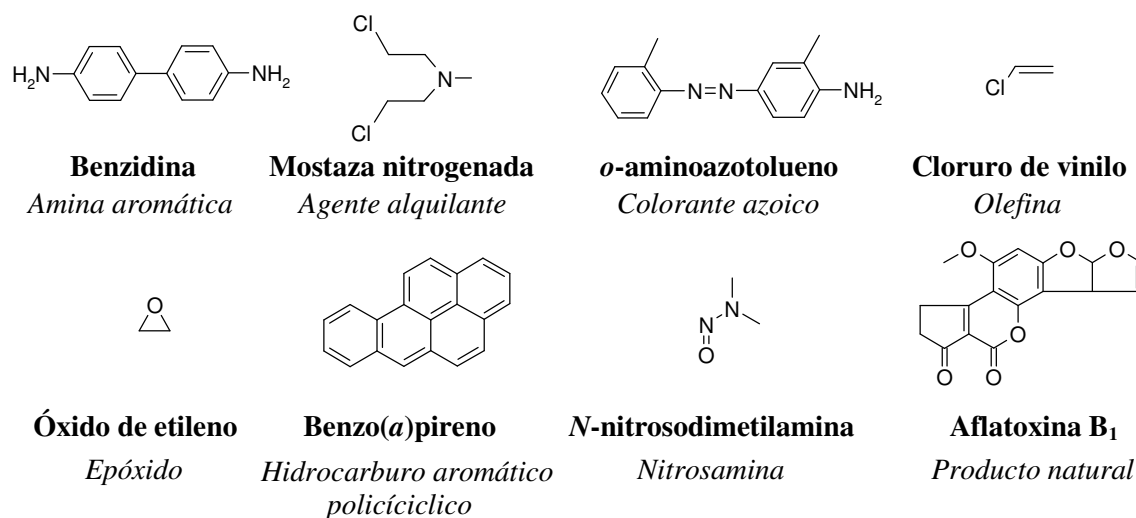


Figura 1.8: Estructuras de algunos carcinógenos químicos representativos.

Cáncer inducido por radicales libres (envejecimiento tisular)

Los radicales libres generados como subproductos del metabolismo celular dañan el DNA y otras estructuras celulares. La mayoría de estas lesiones son reparadas, pero las que se mantienen debido a los fallos del sistema de reparación se van acumulando a lo largo del tiempo, permitiendo que el DNA pueda sufrir la serie de mutaciones sucesivas que conducen al cáncer^{1,14}. Por esta razón la incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, tal y como se ha visto previamente¹⁰.

Cáncer inducido por infecciones víricas o bacterianas

Se ha probado la relación entre determinadas enfermedades víricas y bacterianas con ciertos tumores malignos en animales y en humanos. Entre otros agentes víricos, el virus de la hepatitis B aumenta la incidencia de cáncer de hígado, existe una relación entre algunas cepas de papilomavirus y el cáncer de cérvix en mujeres, y la infección con el virus HTLV-1 se asocia a ciertas leucemias.

Por otro lado, la bacteria *Helicobacter pylori* produce úlceras de estómago; las cuales pueden, con el tiempo, producir cáncer de estómago^{1,14,18}.

Susceptibilidad genética al cáncer

Existen mutaciones en ciertos genes que, además de producir una enfermedad de transmisión genética, aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en los portadores de las mismas. En su mayoría son alteraciones de genes involucrados en la reparación de daños en el DNA o en la metabolización de toxinas^{1,14,22}. Como ejemplo, la formación de pólipos en el colon, previa al cáncer de colon, es más frecuente en familias que poseen mutaciones en el gen responsable de la FAP o *Familiar adenomatous polyposis*²².

Tratamiento del cáncer

El objetivo final del tratamiento del cáncer es eliminar la totalidad de las células tumorales presentes en el organismo del paciente. Cuando lo anterior no sea posible, como es el caso de los cánceres diseminados (leucemias, linfomas) o de los tumores metastáticos, el fin del tratamiento es reducir el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia del paciente.

Atacar de forma selectiva a las células tumorales, por sus similitudes con las células normales, es una ardua tarea que requiere la utilización de al menos dos técnicas diferentes de las tres más comúnmente empleadas en terapia del cáncer: cirugía, radioterapia y quimioterapia; las cuales se estudian a continuación^{1,2,23-26}. Existen otras técnicas²³⁻²⁵, pero su estudio se escapa de los objetivos de este trabajo.

Cirugía

Es el tratamiento más antiguo de todos los existentes. En sus orígenes su objetivo consistía en extirpar el tumor primario y las regiones adyacentes, buscando retirar la mayor cantidad de tejido tumoral posible; hoy día sus aplicaciones son más amplias al extenderse a otros ámbitos como la prevención del cáncer mediante la extirpación de tumores benignos y el diagnóstico de la enfermedad a través de biopsias^{2,24}.

Radioterapia

La radioterapia utiliza radiación ionizante como protones de alta energía o electrones con el fin de generar mutaciones en las células cancerosas que las hagan inviables, aprovechando su mayor sensibilidad a la radiación por su alta tasa de división celular. Se emplea como terapia curativa en cánceres sensibles a la radiación, y como una forma de reducir el volumen tumoral antes de una operación quirúrgica^{2,24}.

Quimioterapia

La quimioterapia emplea fármacos citotóxicos con el fin de destruir las células tumorales de forma selectiva^{2,23,24}. Los fármacos quimioterapéuticos disponibles hoy día son relativamente eficaces, pero los efectos secundarios asociados a los mismos son muy frecuentes: pueden causar, entre otras afecciones, náuseas, vómitos, insuficiencia renal, necrosis, flebitis, alopecia, lesiones hepáticas, fibrosis pulmonar, anemia, esterilidad, trombocitopenia, leucopenia e incluso cánceres en otras localizaciones. Esto se debe a que la mayor parte de los fármacos no atacan selectivamente a las células tumorales, sino a aquellas células que están en procesos de replicación celular; afectando, en consecuencia, a tejidos sanos que dividen con frecuencia, tales como la médula ósea y el epitelio²². Por lo anterior y por la aparición de resistencias a los fármacos existentes la investigación y desarrollo de nuevos compuestos más eficaces y con menores efectos secundarios mejoraría no sólo la tasa de supervivencia de los enfermos, sino también la calidad de vida de los mismos.

Existen varias familias de fármacos antitumorales con aplicaciones tanto en quimioterapia como en prevención del cáncer²³⁻²⁶:

Antimetabolitos

Son compuestos que mimetizan metabolitos del organismo por tener estructuras correlacionables, lo que les permite competir con ellos por los sitios de unión o regulación de distintas enzimas, afectando al funcionamiento de las mismas.

La mayoría son análogos o bien de las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas o bien de los nucleósidos que forman parte del DNA, con lo cual interfieren en los procesos de replicación del DNA necesarios para la división celular. Los análogos del ácido fólico, por su parte, inhiben la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa, evitando así la síntesis del ácido fólico, un compuesto esencial para la síntesis de las bases nitrogenadas que constituyen el DNA.

En la *Tabla 1.1* y en la *Figura 1.9* se incluyen los fármacos más conocidos de esta familia, así como sus estructuras químicas²³⁻²⁶.

Tabla 1.1: Ejemplos de antitumorales de la familia de los antimetabolitos.

Familia	Compuesto	Enzima
Análogos ácido fólico ²⁷	Aminopterina	Dihidrofolato reductasa (-)
	Metotrexato	Dihidrofolato reductasa (-)
	Raltitrexed	Timidilato sintasa (-)
Análogos de pirimidinas ²⁸	5-Fluorouracilo	Timidilato sintasa (-)
Análogos de citidina ²⁹	Citarabina	DNA Polimerasa (-)
Análogos de purinas ³⁰	Fludarabina	Ribonucleótido reductasa (-)
	6-Tioguanina	DNA (daño), apoptosis (+)
Hidroxiurea ³¹	Hidroxiurea	Ribonucleótido reductasa (-)

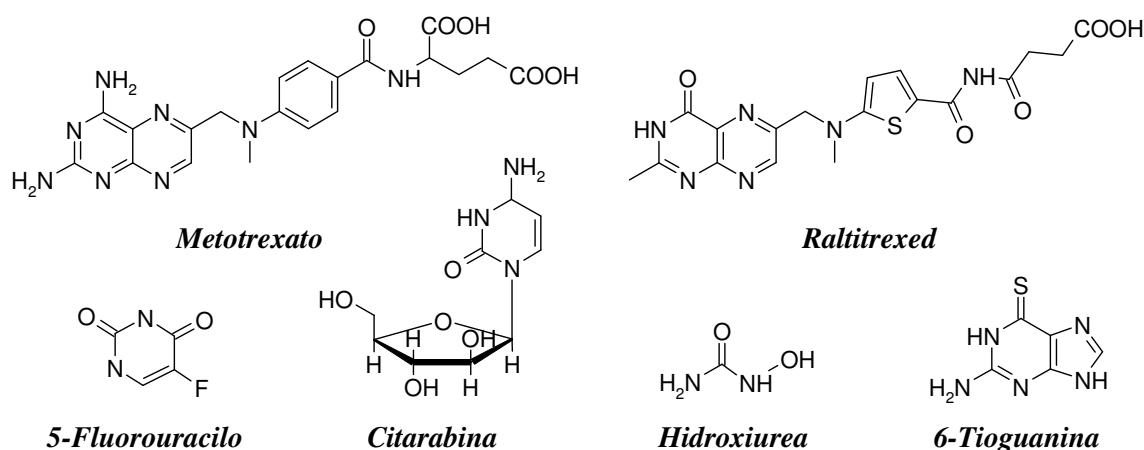


Figura 1.9: Estructuras de fármacos antimetabolitos representativos.

Agentes Alquilantes

Son compuestos muy reactivos que alquilan aleatoriamente moléculas biológicas con centros nucleófilos. Cuando alteran el DNA pueden originar mutaciones o dañarlo de tal forma que se induce la apoptosis de la célula afectada al no poder repararse el daño. La diana más frecuente de estos agentes es, de hecho, el N7 de la guanina. En la Figura 1.10 se muestran las estructuras de agentes alquilantes seleccionados entre los más conocidos, que se citan a continuación²³⁻²⁶:

- *Mostazas nitrogenadas*³²: Mecloretamina, melfalán, clorambucilo, ifosfamida.
- *Alquilsulfonatos*^{23,26}: Busulfán, clomesoma.
- *Aziridinas*^{23,26}: Tiotepa, trietilenmelamina, trenimon.
- *Epóxidos*²⁶: Dianhidrogalactitol, dibromodulcitol.
- *2-cloroetilnitrosoureas*²³: Cloroetilnitrosourea, carmustina, lomustina, semustina.
- *Compuestos de platino*³³: Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.
- *Alquilantes atípicos*^{23,26}: Procarbazina, dacarbazina, temozolamida.

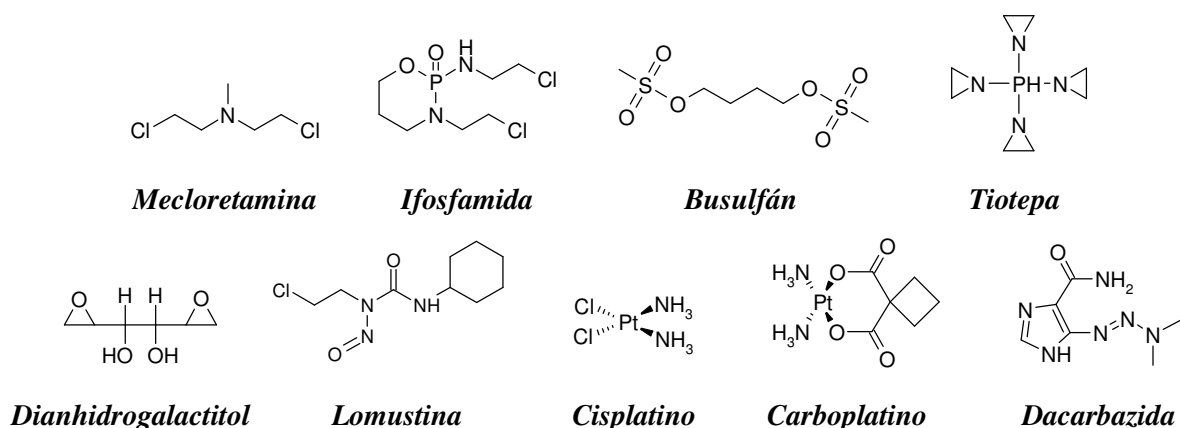


Figura 1.10: Estructuras de agentes alquilantes representativos.

Productos naturales

Este grupo de agentes quimioterapéuticos engloba a aquellos compuestos que o bien se han aislado a partir de organismos naturales, o bien son derivados semisintéticos de productos aislados en dichos organismos. Sus mecanismos de acción son muy diversos; siendo los más importantes la inhibición de enzimas topoisomerasas (inhibidores de topoisomerasas) y la alteración del funcionamiento de los microtúbulos (agentes antimicrotubulares). Por otro lado, se han descubierto ciertos antibióticos antitumorales, que si bien pueden actuar como los derivados anteriores, se estudian por separado al tener otros posibles mecanismos de acción²³⁻²⁶.

Agentes antimicrotubulares

Existen agentes que alteran la estructura polimérica de los microtúbulos, al desestabilizarlos y evitar su formación (alcaloides de la Vinca) o al inducir una hiperpolimerización que rinde microtúbulos no funcionales (taxanos). Tanto unos como otros, al interferir en la correcta formación del huso mitótico, impiden la correcta división celular de las células tumorales²³⁻²⁶. Los agentes antitumorales más destacados (*vid. Figura 1.11*) son los siguientes:

- *Desestabilizantes - Alcaloides de Vinca rosacea*³⁴: Vincristina y vinblastina (productos naturales); vindesina, vinorelbina y vinflunina (análogos semisintéticos).
- *Estabilizantes - Taxanos*³⁵: Paclitaxel (o taxol, extraído de *Taxus brevifolia*), docetaxel (análogo semisintético obtenido a partir de extractos de *Taxus baccata*).

Inhibidores de topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas que reducen el superenrollamiento del DNA durante la replicación al realizar cortes en la doble hélice, relajarla y unirla de nuevo. Existen dos topoisomerasas distintas (I y II), y la inhibición de cualquiera de ellas por derivados químicos induce la muerte celular programada²³⁻²⁶. Los inhibidores más conocidos (*vid. Figura 1.11*) son los siguientes:

- *Inhibidores de la topoisomerasa I*³⁶: Camptotecina (extraída de *Camptotheca accuminata*); topotecan, irinotecan y 9-aminocamptotecina (análogos semisintéticos).
- *Inhibidores de la topoisomerasa II*: Etopósido³⁷ y tenipósido³⁸, extraídos de *Podophyllum peltatum*; antraciclinas y mitoxantrona (*vid.* antibióticos antitumorales).

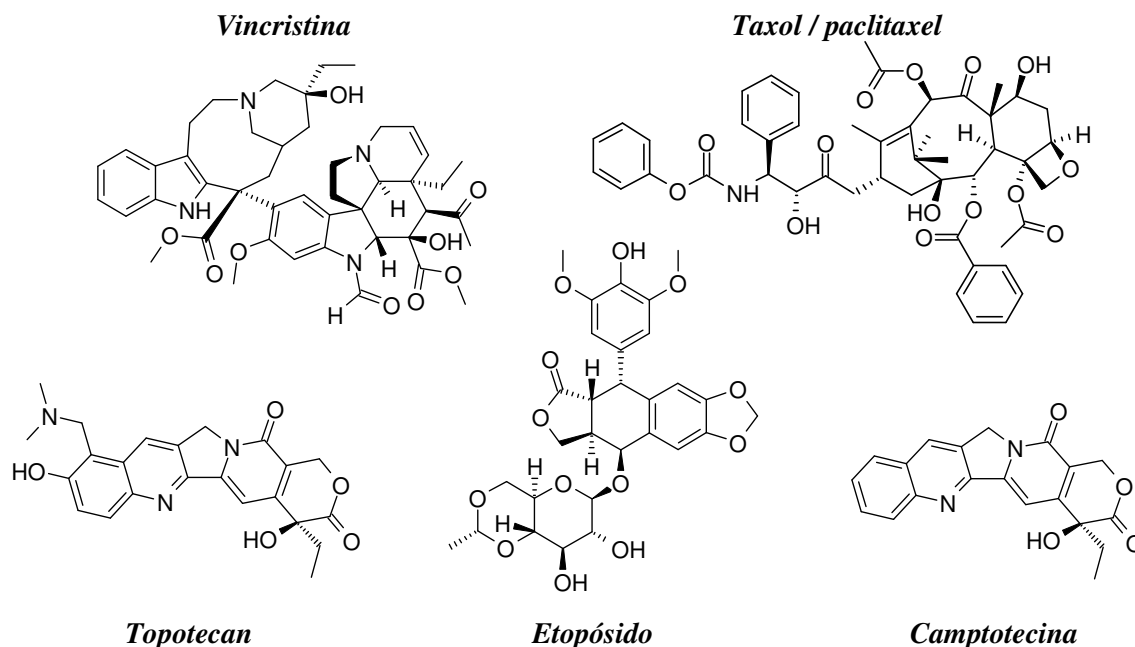


Figura 1.11: Estructuras de agentes antimicrotubulares e inhibidores de topoisomerasas.

Antibióticos antitumorales:

Se han aislado antibióticos antitumorales a partir de cultivos bacterianos. Las estructuras de estos derivados, y sus mecanismos de acción antineoplásica son muy diversos: algunos actúan como intercalantes del DNA, otros como inhibidores de topoisomerasas y unos terceros fragmentan el DNA. En la *Tabla 1.2* y en la *Figura 1.12* se muestran los mecanismos de acción antineoplásica y las estructuras de los principales antibióticos antitumorales²³⁻²⁶.

Tabla 1.2: Principales antibióticos antitumorales.

Familia	Compuesto	Mecanismo
Antraciclinas ³⁹	<i>Doxorubicina</i>	Intercalantes DNA
	<i>Daunorubicina</i>	Inhibidores topoisomerasa II
	<i>Epirubicina</i>	Inducción apoptosis
Antracenodionas	<i>Mitoxantrona</i> ⁴⁰	Inhibidor de topoisomerasa II
Otros ^{23,25-26}	<i>Actinomicina</i>	Intercalante DNA
	<i>Mitomicina C</i>	Inhibidor replicación DNA
	<i>Bleomicinas</i>	Fragmentación DNA

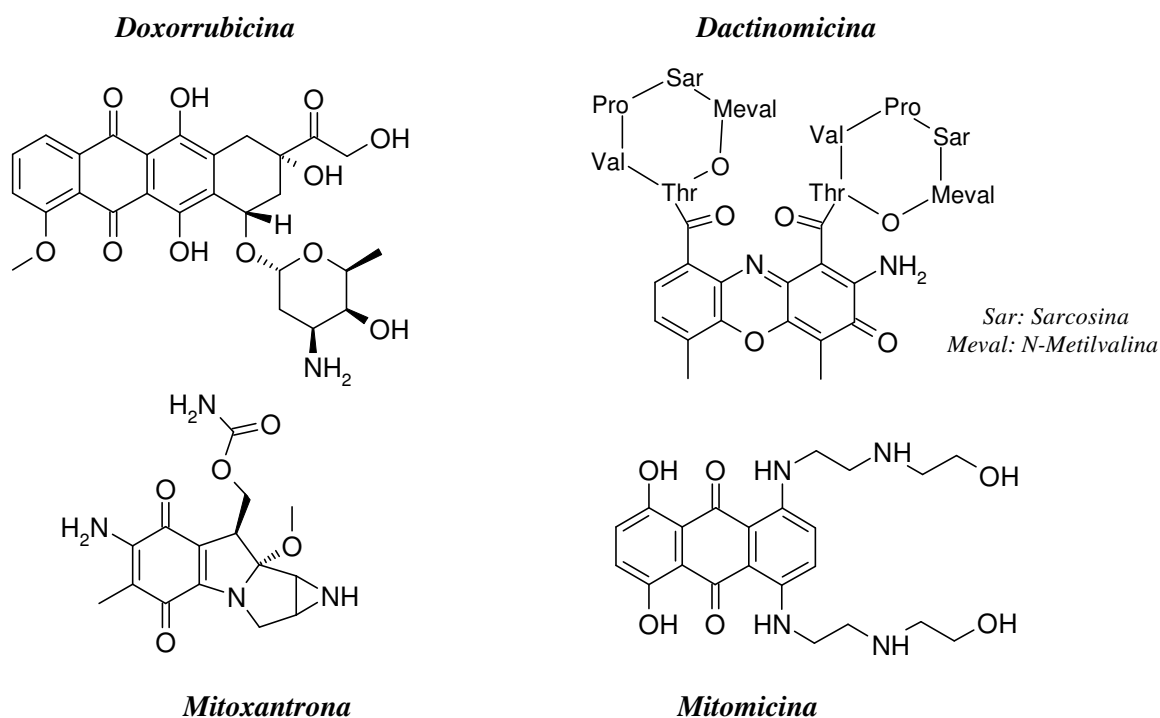


Figura 1.12: Estructuras de los principales antibióticos antitumorales.

Otros antitumorales

Finalmente, pueden emplearse como antitumorales ciertas moléculas biológicas que desempeñan un papel importante en el funcionamiento del organismo, tales como los anticuerpos. Por otro lado, la utilización de agonistas o antagonistas de hormonas y de inhibidores de enzimas involucradas en la regulación de las vías de señalización intracelular, como las proteínquinasas, es otra estrategia común en oncología²³⁻²⁶.

En algunos cánceres se encuentra que las células tumorales expresan ciertas proteínas de membrana necesarias para el crecimiento celular en niveles superiores a lo habitual. En estos casos es factible atacar a las células tumorales con anticuerpos que reconozcan específicamente la proteína sobreexpresada, interfiriendo así en su correcto funcionamiento. Así, algunos de los anticuerpos más comúnmente empleados en terapia del cáncer son los siguientes: *trastuzumab*, *bevacizumab*, *cetuximab* y *rituximab*^{23,25,41}.

Cuando se encuentra que las células tumorales son sensibles a la acción o a la ausencia de una hormona concreta, el uso de hormonas o de inhibidores de las mismas, respectivamente, afecta de forma notable a la viabilidad y crecimiento de dichas células. Es frecuente el empleo de estos derivados en tumores localizados en tejidos que precisan del aporte de hormonas sexuales para su correcto crecimiento y funcionamiento, como por ejemplo, los cánceres de próstata, mama y endometrio. Así, se emplean antagonistas de estrógenos como el *tamoxifeno* en cáncer de mama; antagonistas de andrógenos como la *flutamida* en cáncer de próstata y derivados de hormonas gestágenas en cáncer de mama como la *medroxiprogesterona* y el *megestrol*^{23,25,26,42}.

Por último, las proteínquinasas son elementos clave de las rutas de señalización intracelular que determinan procesos tales como la muerte celular, la expresión de genes, la división celular... Así, el empleo de inhibidores de la acción de estas enzimas puede bloquear procesos vitales para célula, impidiendo su crecimiento. *Imatinib*, *erlotinib* y *sorafenib* son algunos de los inhibidores de quinasas más conocidos^{23,25,43}. En la *Figura 1.13* se muestran las estructuras de algunos antitumorales seleccionados de entre los estudiados en este último apartado.

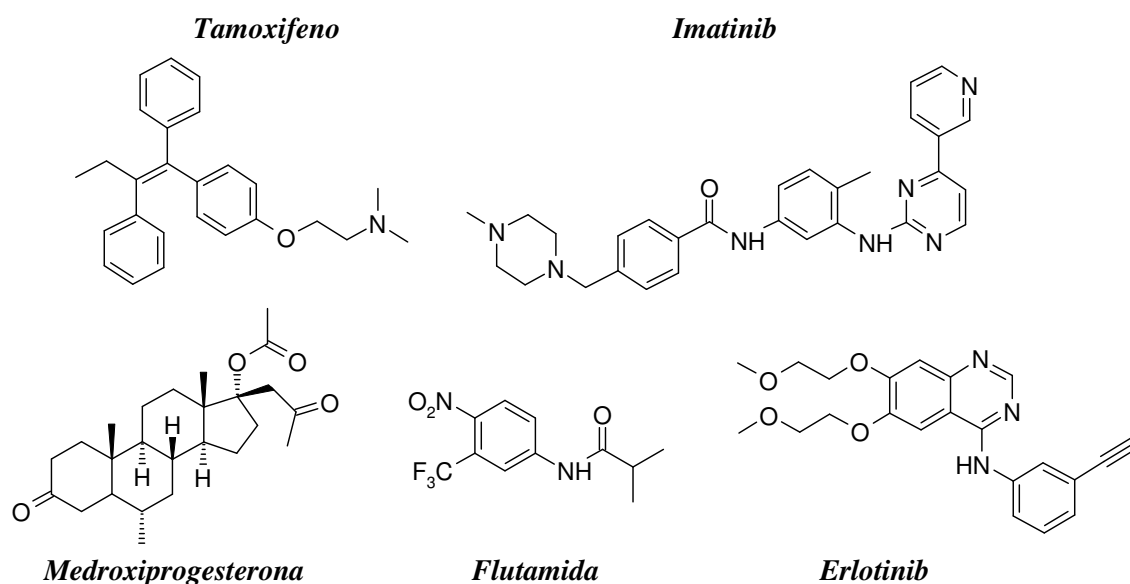


Figura 1.13: Estructuras de una selección de antagonistas de hormonas, inhibidores de proteín quinasa y hormonas empleadas en terapia del cáncer.

2. MUERTE CELULAR: APOPTOSIS Y NECROSIS

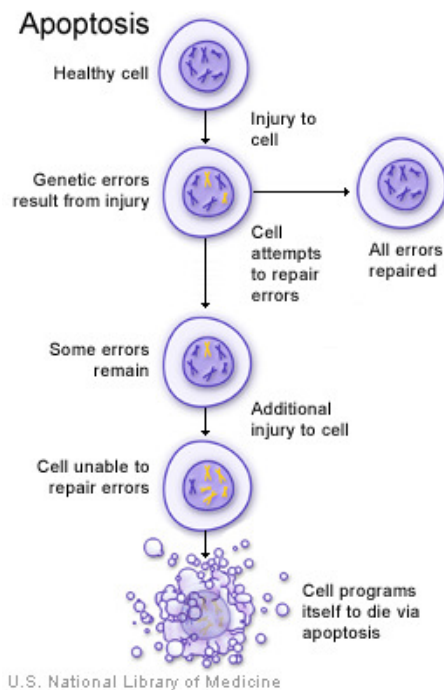
La apoptosis es un mecanismo a través del cual ciertas células mueren de forma controlada al sufrir una serie ordenada de procesos bioquímicos genéticamente programados; de ahí el nombre de muerte celular programada⁴⁴. En cambio, los procesos necróticos son diferentes a los apoptóticos debido a que en ellos una o varias células se rompen de forma incontrolada, liberando su contenido al medio extracelular al no poder soportar un estrés interno o externo⁴⁴⁻⁴⁸. Gracias a la apoptosis el organismo puede realizar una serie de funciones que en otro caso se verían muy dificultadas⁴⁴⁻⁴⁹:

- Destruir selectivamente células cuya supervivencia y proliferación pueda suponer un riesgo para el resto del organismo. Así, las células sanas están programadas para entrar en apoptosis al sufrir un daño⁴⁴⁻⁴⁸, tal como se refleja en la *Figura 1.14*.

- Eliminar células incapacitadas para desarrollar su función de forma adecuada por un incorrecto desarrollo. Dos ejemplos clásicos son los linfocitos que reconocen como extrañas las células propias y las neuronas que no han establecido sinapsis funcionales⁴⁴⁻⁴⁸.

- Mantener constante el número de células en tejidos y órganos en la etapa adulta, lo que se conoce como homeostasis tisular. Si este equilibrio falla se producen hiperplasias o atrofas según predomine la proliferación o la muerte celular, respectivamente⁴⁴⁻⁴⁸.

- Dar forma a los órganos eliminando las células de determinadas regiones durante la etapa embrionaria. Por ejemplo, la pérdida de las células del espacio interdigital en la formación de manos y pies^{44-48,51}.



*Figura 1.14: Proceso apoptosis*⁵⁰.

La necrosis, por su parte, juega un papel polémico. A primera vista no tiene funciones biológicas tan definidas como la apoptosis, sino que es la consecuencia del sufrimiento por parte de la célula de daños irreversibles causados por agentes externos como un golpe o una quemadura; o internos como una sobreproducción de radicales libres^{44,45,51}. Sin embargo, estudios recientes plantean que la necrosis puede tener un cierto grado de regulación, al existir una serie de mecanismos intermedios entre la apoptosis y la necrosis que reciben el nombre de necroptosis^{49,53-55}. Aparte, existen otros procesos de muerte celular programada como la autofagia^{49,53,54,56}. La descripción de estos mecanismos alternativos de muerte celular se escapa del objetivo de este trabajo.

En línea con lo anterior, la apoptosis y la necrosis son las situaciones extremas de la muerte celular, y cada una se caracteriza por presentar un conjunto concreto de manifestaciones bioquímicas y macroscópicas. En la *Tabla 1.3*^{44-46,52} se muestran las diferencias más destacadas entre las dos formas de muerte celular.

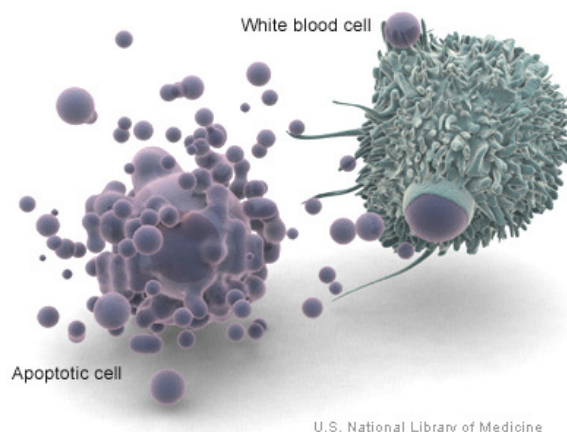
Tabla 1.3: Diferencias entre apoptosis y necrosis.

Característica	Necrosis	Apoptosis
<i>Participación celular</i>	Pasiva	Activa
<i>Volumen celular</i>	Aumenta	Disminuye
<i>Cromatina nuclear</i>	Condensación difusa	Condensación compacta
<i>DNA</i>	Fragmentación irregular	Fragmentación internucleosomal
<i>RNA ribosomal</i>	Degradación irregular	Degradación regular
<i>Orgánulos</i>	Fusión con lisosomas	Mantienen su integridad
<i>Membrana plasmática</i>	Pierde integridad	Mantiene su impermeabilidad
<i>Citoesqueleto</i>	Se desorganiza	Mantiene su integridad
<i>Citoplasma</i>	Se vierte al espacio intercelular	Se conserva en los cuerpos apoptóticos
<i>Activación proteasas</i>	Inespecífica	Específica: Caspasas
<i>Estrés oxidativo</i>	En etapas tardías	Durante todo el proceso
<i>Catabolismo lípidos</i>	Inespecífico	Producción de ácido araquidónico y de ceramida
<i>Inflamación</i>	Presente	Ausente
<i>Cicatrización</i>	Presente, a menudo con fibrosis	Ausente

Apoptosis: cambios morfológicos y fisiológicos

Durante el proceso apoptótico la célula moribunda presenta unos cambios morfológicos característicos. Entre dichos cambios destacan la condensación cromatínica, la reducción del volumen celular por condensación del citoplasma, la fragmentación internucleosomal del DNA, y la formación de los cuerpos apoptóticos que contienen orgánulos en su interior y que son fagocitados por macrófagos o por células vecinas^{44,49,57}.

Al no verterse el contenido de la célula a la matriz extracelular no tienen lugar las reacciones inflamatorias^{45,46,52} típicas de la necrosis. En la *Figura 1.15*⁵⁸ se muestra la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por una célula del sistema inmune.



*Figura 1.15: Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos*⁵⁸.

Vías de señalización activadoras de la apoptosis

La apoptosis puede desencadenarse a través de dos rutas bioquímicas principales:

- *Vía Extrínseca*: Se desarrolla en respuesta a señales externas inductoras de apoptosis (TNF, FasL, TRAIL...), que inducen la muerte celular al unirse a sus receptores de membrana, los cuales activan a las *procaspasas 8 y 10*, enzimas que pueden, por su parte, iniciar la cascada de reacciones de la vía extrínseca^{45,46,49,59,60}.
- *Vía Intrínseca*: Se activa a través de las mitocondrias en respuesta a una señal externa (por intercomunicación con la vía extrínseca) o interna, como la presencia de daños irreparables en el DNA. Con este fin las mitocondrias liberan moléculas de *citocromo c* al citoplasma, las cuales activan a la *procaspasa-9* a través de la proteína *Apaf-1*, iniciando así la cascada de reacciones de la vía intrínseca^{45,46,49,59,61}.

Las dos vías terminan activando la *caspasa-3*, bien a través de la acción de las *procaspasas 8 y 10* (vía extrínseca) ó *9* (vía intrínseca). Una vez activada la *caspasa-3* los procesos son comunes a ambas rutas. Dicha enzima, al igual que las *procaspasas*, forma parte de una familia de proteínas que desempeña un papel clave en los procesos apoptóticos: las *caspasas* o *cisteín-aspartato proteasas*. En células normales se encuentran en forma de proenzimas inactivas (*procaspasas*) que se activan “en cascada” a lo largo de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis^{45,46,49,59-61}.

Caspasas

Las caspasas son las proteínas que inician y ejecutan los procesos apoptóticos. Estas proteínas se agrupan en dos subfamilias: las caspasas inflamatorias y las apoptóticas, dividiéndose estas últimas a su vez entre caspasas iniciadoras y ejecutoras.

Siete caspasas diferentes están involucradas en los procesos apoptóticos: las caspasas 2, 8, 9 y 10 son iniciadoras; mientras que las caspasas 3, 6 y 7 son ejecutoras. Las caspasas se sintetizan como proenzimas que necesitan ser activadas a través de la retirada por proteólisis de un dominio inhibidor. La diferencia entre los dos subgrupos de caspasas apoptóticas reside en que las iniciadoras lo hacen por autólisis inducida por un cambio conformacional producido al unirse a ciertas proteínas (proteína FADD en la vía extrínseca y complejo Apaf-1-Citocromo c en la intrínseca); mientras que las ejecutoras se activan por proteólisis mediada por las caspasas iniciadoras^{46,59-64}.

Las caspasas ejecutoras, y en especial la *caspasa-3*, proteolizan sustratos muy diversos, entre los cuales se pueden citar los siguientes: proteínas citoplasmáticas estructurales (actina, gelsolina, rabaptina-5...), proteínas de vías de señalización (fosfolipasas, citoquinas...), proteínas nucleares (lámina A, receptor de lámina B, proteínas de unión a RNA...), proteínas involucradas en la replicación, transcripción y reparación del DNA (RNA polimerasa, DNA-PK, DNA topoisomerasas, PARP...), protein-quinasas (PKC, MAPK...) y proteínas de control del ciclo celular (p21, p27, Cdc27, proteínas ubiquitinadas...) ^{46,61-64}.

3. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Tal y como se ha estudiado previamente, los radicales libres generados como subproductos pueden dañar tanto el DNA como las proteínas celulares, gracias a su alta reactividad. La mayoría de las lesiones anteriores son reparadas y un gran número de lesiones adicionales son evitadas gracias a la acción preventiva de los sistemas de defensa antioxidante, pero algunos daños se mantienen y su acumulación en el tiempo puede originar una neoplasia^{1,14,17,65-70}.

Los efectos nocivos del estrés oxidativo no se limitan al cáncer: dicho estrés también puede ser la causa de otras enfermedades, entre las cuales se podrían destacar las siguientes: aterosclerosis, Alzheimer, Parkinson, Huntington, diabetes, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades inflamatorias del intestino, sida, artritis reumatoide, cataratas, retinopatías, isquemia, hipertensión pulmonar^{17,65,71,72}...

Viendo la estrecha relación existente entre el estrés oxidativo y el cáncer (entre otras enfermedades), el estudio del primero puede proporcionar claves que ayuden a combatir el cáncer. A continuación se expondrá brevemente qué es el estrés oxidativo, qué lo produce y cómo puede ser combatido.

El estrés oxidativo

El hecho de que nuestras células tengan un metabolismo aerobio les permite obtener energía a partir de los glúcidos y grasas con mayor rendimiento, pero al mismo tiempo, supone un riesgo. En primer lugar, el oxígeno es una molécula muy reactiva, y puede ser reducido en el medio reductor de la célula, liberando radicales libres como el anión superóxido. Aparte, la cadena respiratoria mitocondrial tiene una tasa de error: aunque sea ínfimo, un cierto porcentaje de radicales libres escapan de la misma.

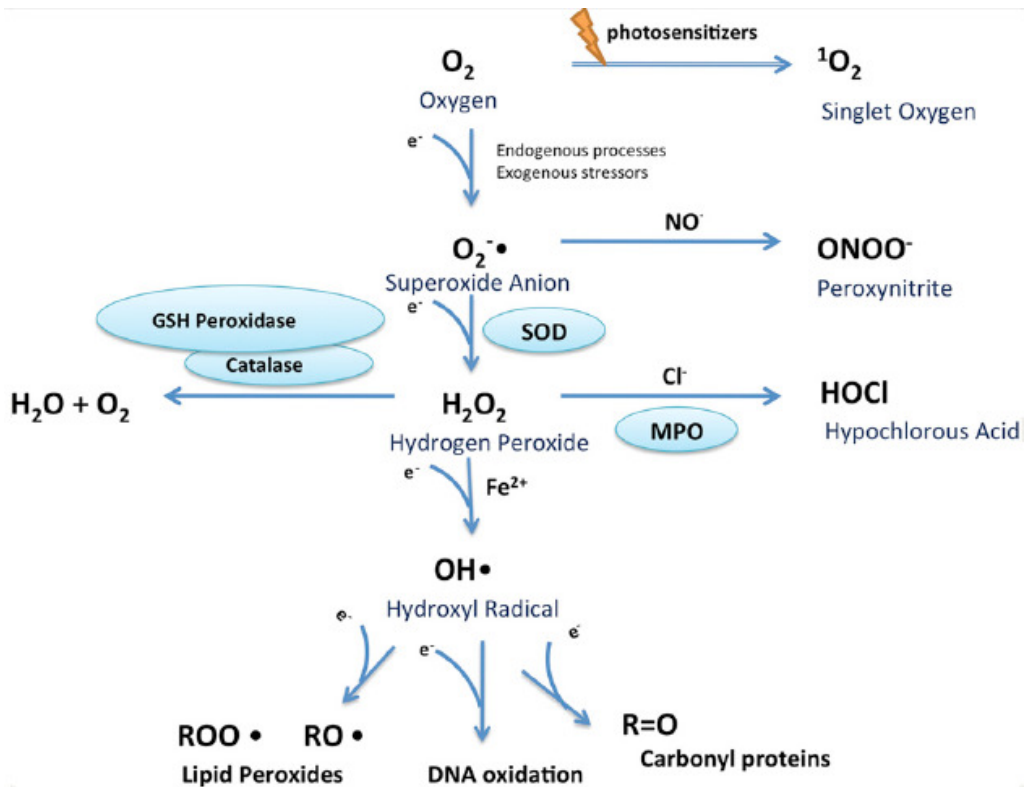
En ambos casos los radicales generados pueden reaccionar con especies presentes en el citoplasma celular, dando lugar a radicales más dañinos, como el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el anión peroxinitrito (ONOO^-), entre otros. La reactividad de estos últimos es tan elevada que pueden alterar el DNA induciendo mutaciones o dañar proteínas importantes para la supervivencia celular.

La célula dispone de mecanismos de defensa eficientes contra estos radicales libres y es capaz, a través de distintos mecanismos, prevenir los daños o reducirlos a la mínima expresión. No obstante, en ciertas situaciones (inflamación, estrés, exposición a contaminantes...) puede romperse el equilibrio. Entonces, la generación de radicales sería mayor que la retirada de los mismos por los sistemas antioxidantes, con lo cual no todos los daños podrían ser prevenidos o neutralizados. Esta ruptura del equilibrio es lo que se conoce como estrés oxidativo^{17,65,68,69,73-75}.

Radicales libres: ROS y RNS

Los radicales libres se dividen clásicamente en dos grandes grupos: las especies reactivas de oxígeno (ROS - Reactive Oxygen Species) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS - Reactive Nitrogen Species). Las ROS más importantes a nivel celular son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). Entre las RNS destacan el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$)^{17,65,68,76-78}. Existen otras ROS y RNS minoritarias, cuyo estudio queda fuera de los objetivos de este trabajo.

En la *Figura 1.16*⁷⁸ se muestra un esquema simplificado que ilustra cómo se generan y cómo las células eliminan las ROS y RNS más importantes, las cuales se estudiarán a continuación brevemente y por separado.

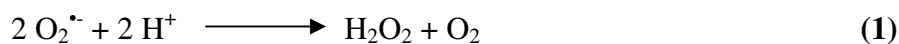


*Figura 1.16: Generación y eliminación de los ROS y RNS más importantes*⁷⁸.

Anión superóxido:

Se genera principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando el oxígeno capta un electrón proveniente de la misma, aunque también puede generarse por la actividad de enzimas como las NADPH oxidasas y la xantina oxidasa.

El radical superóxido es neutralizado al ser convertido en peróxido de hidrógeno por la acción de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) o por dismutación espontánea a oxígeno y peróxido de hidrógeno, mostrada en (1), siendo estos procesos rápidos y, por lo general, eficientes.

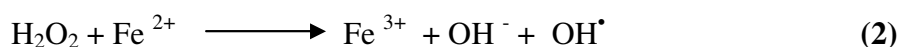


En sí mismo, el radical superóxido es poco reactivo. Su toxicidad es debida a la posible reacción con otros radicales para generar especies más reactivas^{17,65,68,76-80}.

Peróxido de hidrógeno:

Su principal fuente es la eliminación de superóxido a través de las SOD o por dismutación espontánea. Las enzimas que retiran el peróxido de hidrógeno son las catalasas y las peroxidasas; siendo las primeras las más eficientes al neutralizarlo por dismutación en agua y oxígeno diatómico. Las peroxidasas, entre las que se encuentran las glutatión peroxidasas que contienen selenio en su centro activo, emplean por su parte un sistema complejo de oxidación/reducción de tioles.

El peróxido de hidrógeno es más tóxico que el superóxido por su mayor vida media, la cual le permite alcanzar compartimientos celulares más lejanos^{17,65,68,76-78,80,81}. Es menos reactivo, pero en presencia de metales divalentes da la reacción de Fenton, mostrada en (2), en la que se genera el radical hidroxilo, más tóxico^{17,65,68,76-78,80-83}.



Radical hidroxilo:

Este radical libre es una de las especies más reactivas que existen: reacciona prácticamente al instante con cualquier compuesto orgánico. Puede dañar las bases nitrogenadas e inducir roturas del DNA, así como alterar proteínas por reaccionar con los aminoácidos o con los metales presentes en los centros activos de las mismas.

Es muy difícil prevenir la acción de este radical por su reactividad inespecífica. La célula, para disminuir el riesgo, acumula sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión, tocoferol, carotenoides...), y protege el DNA al unirlo a proteínas como las histonas. Por otro lado, secuestra u oxida los metales divalentes, para reducir su concentración y disminuir así la generación del radical^{17,65,68,76-78,80-83}.

Óxido nítrico:

Se forma por acción de las óxido nítrico sintasas (NOS), las cuales catalizan la transformación de la arginina en NO^{\cdot} y citrulina. Por su baja reactividad, la célula lo emplea en procesos de señalización, y es, además, utilizado por el sistema inmune para combatir infecciones^{17,65,68,76,77,84,85}. Su riesgo deriva de que su reacción con el radical superóxido genera el anión peroxinitrito, mucho más reactivo^{17,65,68,76,77,85-88}.



Anión peroxinitrito:

El anión peroxinitrito es un cruce de caminos. Puede protonarse para generar ácido peroxinitroso, el cual descompone liberando radicales muy reactivos (OH^\bullet y NO_2^\bullet) de forma cuantitativa. O puede carbonatarse con el dióxido de carbono presente en la célula para formar nitrosoperoxicarbonato ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$). Este anión descompone en NO_3^- , CO_2 , $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y NO_2^\bullet , siendo mayoritarias las dos primeras especies (inertes), sobre los radicales, con lo cual la toxicidad, aún elevada, es menor que en la descomposición.

En ambos casos, se generan radicales muy reactivos: OH^\bullet , $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y NO_2^\bullet ; los cuales pueden hidroxilar, carbonatar y nitrar, respectivamente, de forma inespecífica a prácticamente cualquier compuesto orgánico presente en la célula^{17,65,68,76,77,85-88}.

Mecanismos antioxidantes celulares

Tal y como se ha ido exponiendo en el apartado anterior, las células han desarrollado diferentes mecanismos para combatir el estrés oxidativo. Los más destacados son la acción de enzimas antioxidantes y la acumulación de antioxidantes, aunque existen otros mecanismos como el secuestro de metales por proteínas. Las enzimas y los antioxidantes más conocidos son los siguientes:

- *Enzimas antioxidantes:* superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas, catalasas, tiorredoxinas, hemooxigenasas...
- *Antioxidantes:* glutatión, ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, derivados de selenio...

Las enzimas citadas actúan en su mayor parte neutralizando de forma selectiva a los ROS o RNS que reconocen específicamente. En cuanto a los antioxidantes, la célula los emplea como una barrera frente a los radicales libres: los acumula para que, por su mayor afinidad por los ROS y los RNS, sean la diana de los mismos; evitando así que el daño oxidativo afecte a los compuestos y estructuras celulares^{17,65,68,76,80,82,84,86}.

De entre los mecanismos anteriores, la acción enzimática de las glutatión peroxidasas y de las tiorredoxinas se apoya en las propiedades redox del selenio, al pertenecer dichas enzimas a la familia de las selenoproteínas, las cuales se estudiarán con más detalle en el capítulo dedicado al selenio.

4. SELENIO

Selenio: Historia y abundancia.

El selenio, elemento perteneciente al grupo de los anfígenos, fue descubierto en 1.817 por los químicos suecos Jöns Jakob Berzelius y Johann Gottlieb Gahn⁸⁹ al estudiar un residuo metálico obtenido al producir ácido sulfúrico en cámaras de plomo. Inicialmente pensaron que dicho residuo estaba formado por telurio, por tener idénticas propiedades químicas, pero al analizarlo descubrieron que era un elemento distinto.

Al ser el nuevo elemento similar al telurio (nombre derivado del latín *Tellus*, Tierra) y de menor peso atómico; Berzelius le dio el nombre de selenio (del griego *σεληνη*, luna) para completar la analogía con la Tierra y la Luna^{90,91}.

Es un elemento bastante raro: de hecho, en promedio, en cada tonelada de corteza terrestre hallaríamos solamente en torno a 50 mg de selenio. En la naturaleza puede encontrarse en estado nativo, pero es mucho más frecuente descubrirlo asociado a minerales sulfurosos que contienen diversos metales como Cu, Ag, Zn, Fe, Co, As, Hg, etc. Por ejemplo, pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2), covellina (CuS), calcosina (Cu_2S), acantita (Ag_2S), esfalerita (ZnS), cobaltita (CoAsS), cinabrio (HgS)⁹¹...

Selenio: Producción y aplicaciones

El selenio se obtiene principalmente como subproducto del refinado electrolítico del cobre a partir de óxidos de cobre. En este proceso, el cobre se deposita en el cátodo, mientras que el ánodo queda recubierto por unos depósitos térreos, los cuales se emplean para obtener diferentes elementos (Se, Te, Au, Ag,..). También puede aislarse de los lodos resultantes de la fabricación de ácido sulfúrico. Es un elemento cuyos minerales son tan raros que no es rentable obtenerlo directamente a partir de ellos^{91,92}.

Se estima que la producción anual en 2010 osciló entre 3.000 y 3.500 t. Las principales aplicaciones fueron: industria metalúrgica (30%), fabricación de vidrio (30%), agricultura (10%), industria química y colorantes (10%) y electrónica (10%)⁹³.

El elemento en su forma metálica es un semiconductor cuya conductividad, por el efecto fotoeléctrico, aumenta de forma proporcional a la radiación luminosa que recibe, siempre y cuando la radiación incidente tenga la energía adecuada. Dicha propiedad convierte al selenio en un elemento profusamente empleado en células fotovoltaicas y tóneres de fotocopiadoras^{89-92,94,95}. No obstante, últimamente el elemento metálico está siendo desplazado por el silicio de alta pureza en las células fotovoltaicas y por compuestos orgánicos fotorreceptores en las máquinas xerográficas⁹⁴.

El selenio como oligoelemento

El selenio es un elemento controvertido: es perjudicial para la salud tanto por defecto como por exceso: se ha descrito la existencia tanto de enfermedades asociadas a deficiencias de selenio como intoxicaciones causadas por él. Es más, aunque el elemento fue descubierto por Berzelius en 1.817, los síntomas de las intoxicaciones por selenio se conocen desde la época de los viajes de Marco Polo, en el siglo XIII^{89,96}. De este modo, se consideró que este elemento era tóxico hasta la publicación en 1.957 de los trabajos de Schwarz y Foltz, quienes descubrieron la capacidad del selenio para prevenir enfermedades hepáticas en ratones al estar presente en bajas concentraciones⁹⁷.

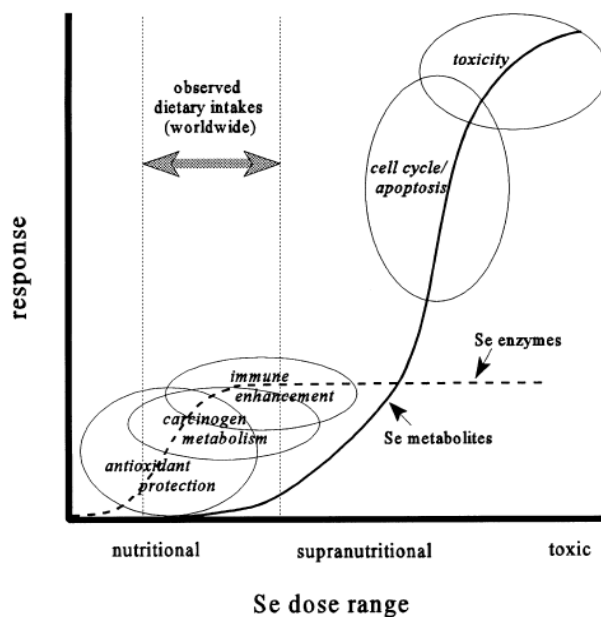


Figura 1.17: Selenio: acción como nutriente y como tóxico en función de la dosis diaria¹⁰⁰.

Debido a la ambivalencia del selenio en función de la concentración, gráficamente mostrada en la Figura 1.17, la administración norteamericana ha fijado tanto una ingesta diaria recomendada de 55 $\mu\text{g}/\text{Se}$ al día como un límite de ingesta diaria, cifrado en 400 $\mu\text{g}/\text{Se}$ diarios. El primer valor hace referencia a la ingesta diaria necesaria para maximizar la actividad de las selenoproteínas; mientras que el segundo busca indicar el valor máximo ingerible sin riesgo de manifestar efectos clínicos adversos. Los dos valores se refieren a personas adultas; en infantes son inferiores y varían en función de la edad^{98,99}.

Cuando la ingesta diaria cae de forma recurrente claramente por debajo del primer límite o supera continuamente el segundo, existe un riesgo de padecer alguna de las principales enfermedades asociadas con la ingesta de selenio, deficiente o excesiva, las cuales son las siguientes^{89,99-101}:

- *Enfermedad de Keshan*: Es una cardiomiopatía infantil producida por diversos patógenos (coxsakievirus, streptococos, toxinas...) propia de regiones chinas con bajas concentraciones de selenio en el suelo. Son patógenos que, aunque normalmente causan infecciones benignas, en individuos con bajos niveles de selenio en sangre pueden actuar con virulencia^{99,102,103}. Estudios alimentarios han demostrado que la ingesta de selenio en cantidades adecuadas previene la enfermedad^{99,103}.
- *Enfermedad de Kashin-Beck y cretinismo mixedematoso*: Son enfermedades producidas por la deficiencia conjunta de yodo y selenio. Sus síntomas se deben a la imposibilidad de convertir la hormona tiroidea T_4 en T_3 por la baja actividad de la iodotironina deiodinasa, una selenoenzima^{104,105}.

- *Selenosis*: Esta enfermedad se produce por una ingesta recurrente y excesiva de selenio (por encima de 850 µg/día). Los síntomas característicos más característicos de esta intoxicación son los siguientes: caída de pelo, problemas nerviosos, uñas quebradizas, manchas en la piel y olor del aliento a ajo^{96,99}.

Selenio en alimentos

Los niveles de selenio en los alimentos son muy variables: dependen de la concentración del elemento en el suelo. Esta dependencia es muy marcada en frutas y verduras, aunque no tanto en carnes. Teniendo presente lo anterior, y no perdiendo de vista las variaciones entre las distintas localizaciones geográficas, de acuerdo con los datos bibliográficos la concentración de selenio es mayor en carnes, legumbres y frutos secos que en frutas, cereales y verduras¹⁰⁶. Como ejemplo, algunas concentraciones halladas en alimentos españoles son¹⁰⁷: maíz, 2,1-7,6 ng/g; pan, 31,5-77,9 ng/g y alubias, 152,1-268,7 ng/g. A modo ilustrativo, trasladando los datos a la ingesta diaria y tomando el pan como referencia, comer media barra de pan al día (aproximadamente 125 gramos) supondría, de media, la ingesta de en torno a 7 µg de selenio.

Las deficiencias o intoxicaciones de selenio pueden darse, respectivamente, en regiones con suelos pobres o muy ricos en el elemento en las que se practique una agricultura o ganadería de subsistencia; estando limitado el consumo de alimentos producidos en otras zonas. En los países desarrollados los sistemas de distribución de alimentos mezclan y distribuyen aleatoriamente los alimentos producidos en suelos con distintas concentraciones de selenio, evitando la aparición de estas enfermedades^{98,99}.

Los selenocompuestos presentes en cada alimento varían de unos alimentos a otros. Así, en cereales, el selenio suele encontrarse en forma de selenometionina. En las carnes predomina la selenocisteína, y en los pescados, la selenoína. Por último, el se halla en forma de Se-metilselenocisteína y γ -glutamyl-Se-metilselenocisteína en ciertas verduras como el brócoli y la cebolla¹⁰⁶.

Selenocompuestos biológicos

En el cuerpo humano, el selenio puede encontrarse presente en diversas formas químicas. Entre otros, se pueden citar los siguientes^{99, 110-112}:

- *Selenoaminoácidos*: selenometionina, selenometilselenocisteína, selenocisteína.
- *Selenoproteínas*: incorporan selenocisteína en una proporción definida.
- *Otros selenocompuestos orgánicos no proteicos*: metilselenol, dimetilselenol, glutathion-selenol, diselenodiglutathion, catión trimetilselenonio.
- *Selenocompuestos inorgánicos*: selenito sódico, seleniuro de hidrógeno, selenato sódico, selenofosfato.

Cada uno de estos selenocompuestos tiene una determinada función biológica. Los efectos biológicos más destacados, tanto del selenio como de los distintos compuestos selenados vienen resumidos a continuación:

Selenoaminoácidos

Los selenoaminoácidos más importantes son la selenometionina (Semet) y la selenocisteína (Secys). Ambos sustituyen un átomo de azufre por un átomo de selenio. En las proteínas la selenometionina sustituye aleatoriamente a la metionina debido a que el Met-tRNA no distingue entre la metionina y la selenometionina. El aminoácido selenado no desempeña ninguna función biológica especial aparte de ser el reservorio de selenio en el organismo: puede convertirse en selenocisteína y en otras formas orgánicas de selenio. No puede ser sintetizado por el organismo, por lo que ha de obtenerse a través de la dieta ^{113,114}.

En cambio, la selenocisteína forma parte de las selenoproteínas y está codificada por el codón de terminación UGA. Para evitar que el ribosoma finalice la síntesis de la proteína naciente al leer dicha secuencia, ésta ha de estar acompañada por una estructura especial, la SECIS (secuencia de inserción de selenocisteína); que sirve de anclaje a las proteínas y factores de transcripción que permiten la inclusión del selenoaminoácido en la proteína naciente ^{111,112,115-118}, formando el "selenosoma" mostrado en la *Figura 1.18*. La selenocisteína puede obtenerse a partir de la dieta, pero se encuentra en pequeñas cantidades en los alimentos (a excepción de la carne) y, por lo tanto, es más frecuente su síntesis a partir de selenometionina ¹⁰⁶.

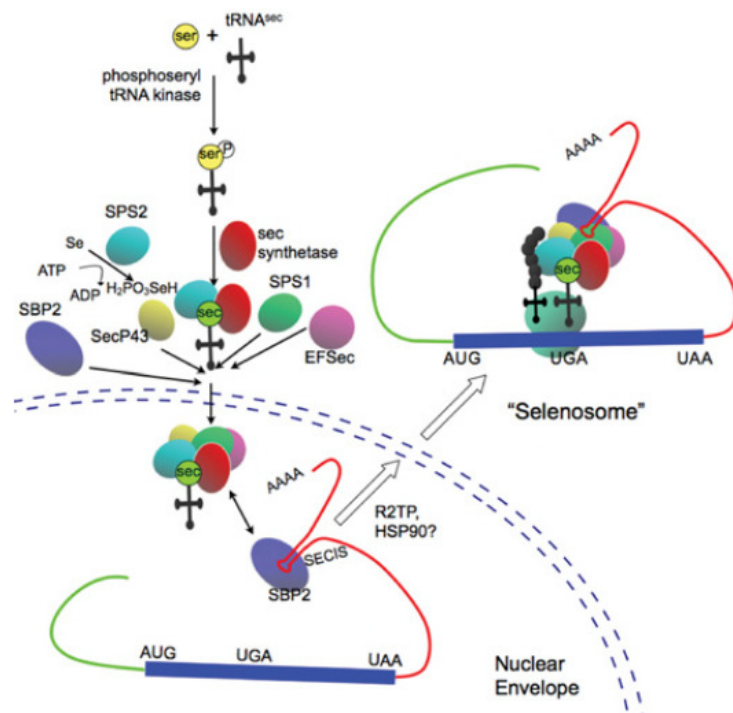


Figura 1.18: Maquinaria requerida para la inserción de selenocisteína en la síntesis de selenoproteínas ¹¹⁸.

Adicionalmente, en algunos alimentos pueden encontrarse en cantidades importantes derivados de la selenocisteína, tales como la Se-metilselenocisteína y la γ -glutamil-Se-metilselenocisteína. Estos derivados tienen en los organismos de los que proceden la función de acumular selenio. Sus propiedades antitumorales ^{111,112,119,120} se revisarán en Antecedentes.

Selenoproteínas

Las selenoproteínas son las proteínas que incorporan selenocisteína en una proporción definida. Son las siguientes:

- *Glutación peroxidasa (GPx)*^{99,111,112,117,118,121}: Reduce el estrés oxidativo al eliminar el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos de fosfolípidos y colesterol, jugando así un importante papel en la prevención del cáncer, al retirar especies que puedan dañar las estructuras celulares o producir mutaciones en el DNA. Existen cinco GPx humanas diferentes y la selenocisteína presente en el centro activo es indispensable para el funcionamiento de la enzima. El selenoaminoácido se oxida a ácido selenínico, reduciendo el hidroperóxido o peróxido a alcohol o a agua. La reversión al estado original está mediada por el glutatión.
- *Tiorredoxina reductasa (TrxR)*^{99,111,112,117,118,121}: Reduce la tiorredoxina oxidada a su forma activa, la cual participa en procesos esenciales para la célula como la síntesis de desoxirribonucleótidos.
- *Iodotironina deiodinasa (DIO)*^{111,112,117,118,121}: Convierte la tiroxina (T₄), una hormona tiroidea biológicamente inactiva; en su forma activa: la triyodotironina (T₃).
- *Selenoproteína P*^{99,111,112,118,121,122}: Tiene propiedades antioxidantes y actúa como proteína transportadora de selenio a través del sistema circulatorio.
- *Selenoproteínas W, R y 15; y otras*^{99,111,112,121}: No se conocen sus funciones, aunque se cree que participan en la defensa frente al estrés oxidativo^{118,123}.

Otros selenocompuestos no proteicos

El resto de los selenocompuestos, entre los cuales destacan el metilselenol y el seleniuro de hidrógeno, tienen funciones biológicas muy variadas, muchas de las cuales están relacionadas con el cáncer. La mayoría de los compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, son productos del metabolismo de los selenoaminoácidos.

Metabolismo del selenio

En la *Figura 1.19* se muestra la absorción, el metabolismo y el transporte de selenio en el organismo. Los selenocompuestos principales absorbidos en la dieta son la selenometionina, el selenito sódico y el selenato sódico; aunque también pueden absorberse selenocisteína y metilselenocisteína, menos frecuentes en alimentos. Los diferentes selenoderivados tomados de los alimentos se reducen a seleniuro de hidrógeno (H₂Se). La salvedad es la incorporación de parte de la selenometionina a proteínas en lugar de la metionina, su equivalente azufrado; funcionando de este modo las proteínas normales como reservorio de selenio en el organismo^{99,111,112,124}.

El H_2Se es utilizado en la síntesis endógena de selenocisteína, la cual se emplea en la biosíntesis de las selenoproteínas. La selenocisteína absorbida de los alimentos no puede incorporarse directamente a las proteínas al ser necesaria su formación de novo en el selenocisteil-tRNA. El exceso de selenio se excreta previa metilación por las vías respiratoria, fecal y renal^{99,111,112,124,125}, aunque también pueden desecharse otros selenocompuestos por vía renal¹²⁵. La eliminación a través de la vía respiratoria es la responsable del aliento con “olor a ajo” típico de la selenosis¹²⁴.

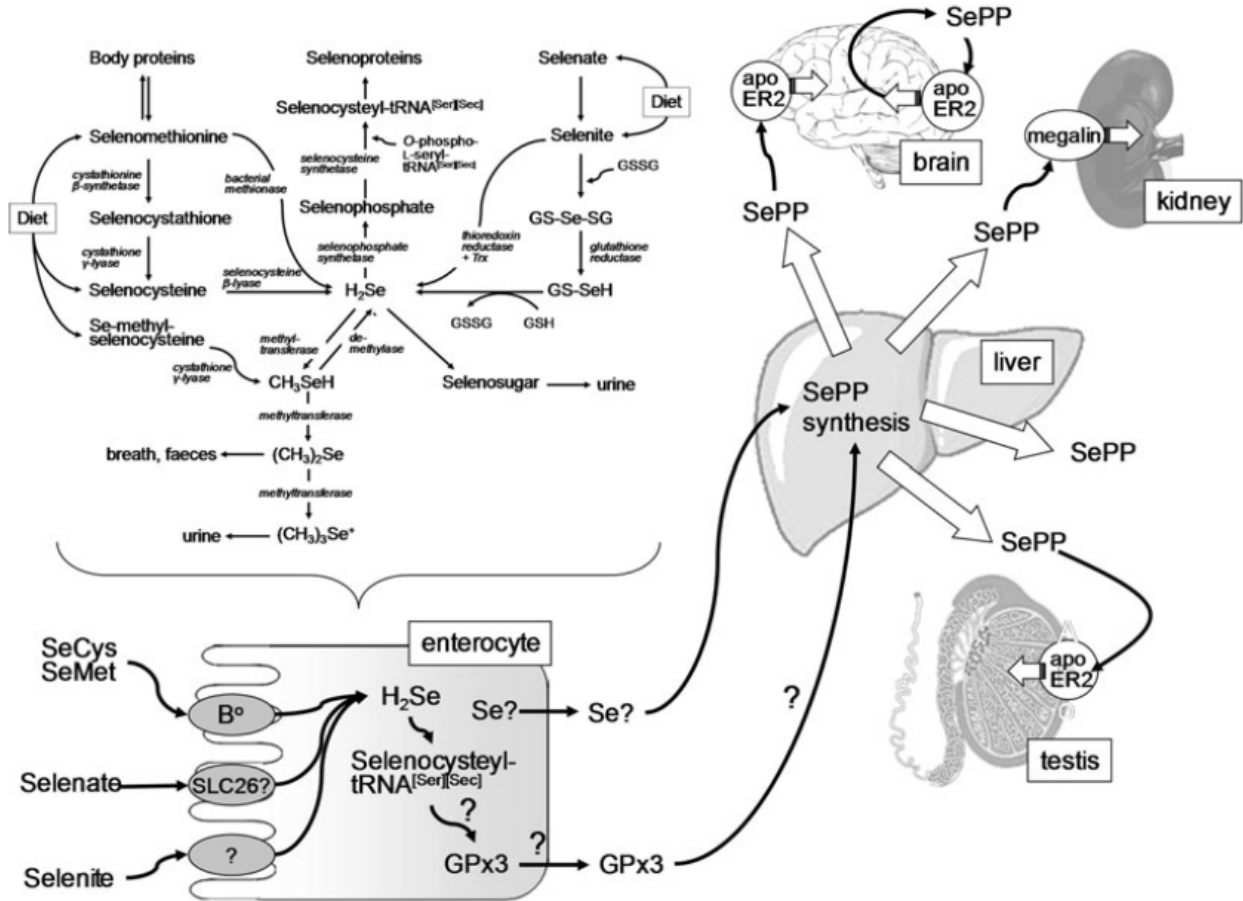


Figura 1.19: Metabolismo, absorción y transporte de selenio en el organismo⁹⁹.

Por último, la selenoproteína P, sintetizada en el hígado, desempeña un importante papel en el mantenimiento de la homeostasia del selenio y en el transporte y distribución de selenio entre distintos órganos, siendo además un importante reservorio de selenocisteína^{99,122,126}.

Funciones biológicas del selenio

Los selenocompuestos ejercen distintos efectos sobre el organismo. Algunos de los efectos biológicos más destacados no relacionados con el cáncer y con el estrés oxidativo (los cuales se estudiarán más adelante en Antecedentes) son los siguientes:

- *Función tiroidea:* La iodotironina deiodinasa (DIO) transforma la hormona tiroidea T₄ en su forma activa T₃. La deficiente ingesta de selenio durante periodos prolongados de tiempo puede producir enfermedades tiroideas, como la enfermedad de Kashin-Beck^{99,104-106, 109,127}.
- *Sistema inmune:* El selenio estimula la proliferación de linfocitos T citotóxicos y células NK^{99,109,127,128}.
- *Defensa contra infecciones virales.* La deficiencia en selenio debilita el sistema inmune y, por el mayor estrés oxidativo, favorece que las infecciones víricas sean más frecuentes y virulentas al aumentar la tasa de mutaciones víricas^{99,109,129}. Algunos virus cuya virulencia aumenta en situaciones de deficiencia de selenio son los que causan la gripe^{99,103}, las hepatitis B y C^{99,129}, la enfermedad de Keshan^{99,103} y el SIDA^{99,109,127,130}.
- *Enfermedades neuronales y mentales:* La selenoproteína P protege a las neuronas del estrés oxidativo que causa enfermedades neuronales ligadas a la edad (Alzheimer, Parkinson, deterioro cognitivo, demencia...): diversos estudios indican la existencia de una relación entre los bajos niveles de selenio en sangre y el riesgo de sufrir dichas patologías^{109,127,129,131,132}. Asimismo, algunos estudios han observado una correlación entre los bajos niveles de selenio y trastornos nerviosos como la depresión y la ansiedad^{127,129,133}.
- *Enfermedades cardiovasculares:* La deficiencia de selenio es una de las causas de la enfermedad de Keshan^{99,102, 103,129}, la cual es una cardiomiopatía ya previamente citada. Un estudio señala que el presentar bajos niveles de selenio en sangre aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares^{99,109,127,134,135}. Según un estudio inglés, el aporte de selenio a la dieta a través de suplementos alimentarios reduce el colesterol en sangre y aumenta el ratio HDL / LDL^{109,136}, lo cual disminuye el riesgo de sufrir arteroesclerosis a causa de la peroxidación lípidica en vasos sanguíneos.
- *Diabetes de tipo 2:* Aunque en pacientes diabéticos se han observado bajos niveles de selenio en sangre, por obtenerse resultados controvertidos en diferentes estudios, no se puede afirmar que el aumento la ingesta de selenio a través de suplementos alimentarios reduzca el riesgo de sufrir diabetes^{109,127}.
- *Hipertensión:* Dos estudios muestran una posible relación entre la hipertensión y los bajos niveles de selenio en sangre¹³⁴.
- *Asma:* Se ha encontrado una relación entre la incidencia de asma y los bajos niveles de selenio en sangre, especialmente en niños; aunque no todos los estudios apuntan en la misma dirección. Se requieren estudios adicionales para aclarar el papel del selenio en esta enfermedad ligada al estrés oxidativo^{99,109,137}.
- *Artritis:* Los pacientes con osteoartritis y con artritis reumatoide presentan bajos niveles de selenio en sangre; y la enfermedad de Kashin-Beck, asociada a la deficiencia de selenio, es similar a la osteoartritis; con lo cual el selenio parece tener un efecto protector frente a la artritis. No obstante, a día de hoy no se pueden confirmar, por existir resultados contrarios en diversos estudios, las aplicaciones preventivas y terapéuticas del selenio en la artritis^{99,127,138}.

- *Reproducción:* El tener niveles adecuados de selenio en sangre reduce el riesgo de aborto y de complicaciones durante el embarazo; al mismo tiempo que favorece la fertilidad masculina^{99,109,129,139}.
- *Defensa contra enfermedades causadas por nematodos:* De acuerdo con los estudios de Morgan¹⁴⁰ y de Li¹⁴¹, compuestos de selenio como la selenometionina y el selenito sódico, presentes en los organismos de forma natural, tienen una cierta nemotoxicidad (para más información, *vid.* Antecedentes). Aunque las investigaciones en este campo son escasas y se precisa la realización de estudios más exhaustivos, estos trabajos pioneros en esta rama de la parasitología indican que el selenio y/o sus derivados podrían emplearse como agentes nematocidas en el tratamiento de las enfermedades causadas por los gusanos cilíndricos no anillados del *phylum Nemata*, causantes de enfermedades tanto conocidas, tales como la triquina¹⁴²⁻¹⁴⁴ y la anisakiasis¹⁴⁹⁻¹⁵¹; como de ciertas dolencias frecuentes en países tropicales. Entre estas últimas cabría destacar la ascariasis¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, la anquilostomiasis¹⁴⁸, la dracunculiasis¹⁵¹, la tricuriasis o trichuriasis¹⁴⁹, la filariasis y la elefantiasis¹⁵⁰; y la toxocariasis¹⁵².
- *Otras enfermedades:* Por último, se ha descrito la relación entre el selenio y otras enfermedades (pancreatitis, inflamaciones crónicas, leishmaniasis, tuberculosis, chagas, filariasis, esclerosis lateral amiotrófica...); aunque, al igual que en casos anteriores, se requieren estudios adicionales para esclarecer el papel jugado por el selenio en cada enfermedad concreta¹²⁷.

II. Antecedentes y justificación

II. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

1. SELENIO Y CÁNCER

Selenoderivados como quimiopreventivos y/o antitumorales

Un número elevado de selenoderivados, tanto orgánicos como inorgánicos, han sido estudiados como agentes quimiopreventivos de cáncer y/o como compuestos tóxicos para células tumorales. Entre ellos se podrían destacar la selección de especies orgánicas e inorgánicas de selenio mostrada en la *Figura 2.1* ^{110-112,124,127}.

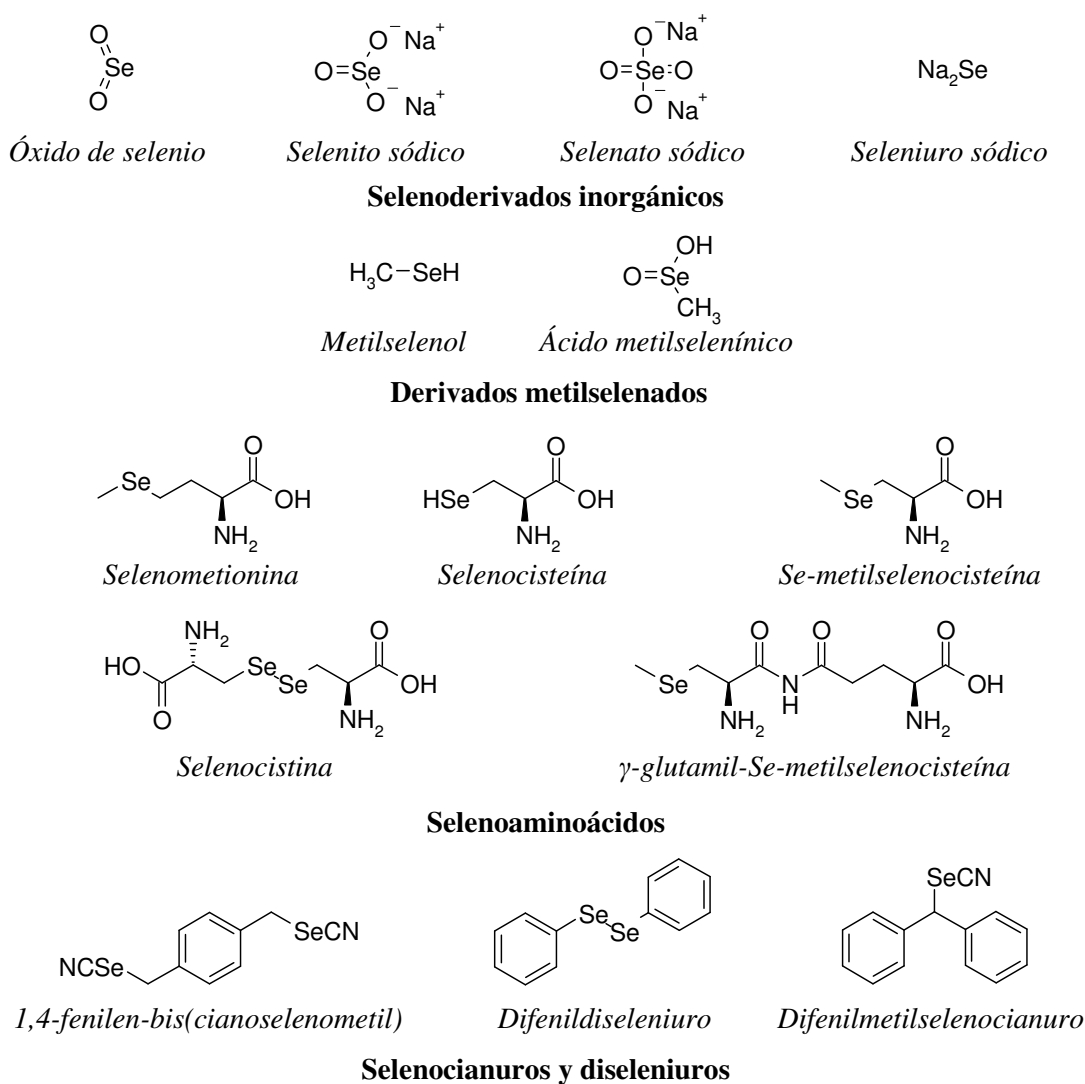


Figura 2.1: Estructura de selenoderivados seleccionados con potenciales aplicaciones quimiopreventivas y/o antitumorales.

Estudios del selenio como agente quimiopreventivo

Durante los últimos años se ha investigado con profusión acerca de la capacidad del selenio y de sus derivados para actuar como agentes quimiopreventivos de cáncer. Se han publicado estudios científicos de diferentes tipos: nutricionales, de marcadores de selenio, con animales, y, por último, estudios epidemiológicos en los que se aumenta la ingesta de selenio con suplementos^{100,109,124,127,129,134,153,154}. A continuación se citarán brevemente los trabajos más destacados encontrados en la bibliografía, resaltando la importancia de los estudios epidemiológicos a gran escala (NPC y SELECT).

Estudios nutricionales

En los años 70-90, para analizar si un determinado compuesto podía o no actuar como agente preventivo de cáncer, se estudiaba la presencia del mismo en alimentos de diferentes regiones o países, y se buscaba correlacionar dicha mayor o menor presencia con la incidencia y mortalidad del cáncer en dicha región.

Al contrario que los estudios epidemiológicos que se revisarán más adelante, los trabajos anteriores no pretenden aumentar la ingesta de selenio, sino estimar dicha ingesta en varias poblaciones y comparar los datos con la epidemiología del cáncer. Con esta metodología, diferentes grupos investigadores han observado que al aumentar la ingesta media de selenio en una población, se reduce la mortalidad asociada al cáncer dentro de la misma¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Estudios de marcadores de selenio

Una segunda aproximación fue el análisis de la presencia de selenio en muestras biológicas de voluntarios y la búsqueda de correlaciones entre la incidencia del cáncer y los niveles de selenio detectados. Las muestras donde se determinan los niveles de selenio con mayor frecuencia son el plasma sanguíneo y las uñas de los pies.

Siguiendo este procedimiento, varios estudios han observado una relación inversa entre las concentraciones de selenio determinadas en las muestras analizadas y el riesgo de padecer cánceres en diferentes localizaciones; siendo las reducciones más destacadas las encontradas en los cánceres de próstata^{159,160}, colon¹⁶¹, páncreas¹⁶², estómago¹⁶³ y mama¹⁶⁴.

Ensayos con animales

Un tercer tipo de ensayos son aquellos en los cuales se exponen animales de experimentación a carcinógenos conocidos, al mismo tiempo que se les suministra selenio, con el fin de estudiar si este último puede prevenir o al menos reducir la aparición de tumores en los animales tratados con respecto al grupo control no tratado con selenio. Los resultados de dichos estudios muestran que el número de tumores observados y el tamaño de los mismos son menores en los animales que han ingerido selenio que en los incluidos en el grupo control¹⁶⁵⁻¹⁶⁹.

Ensayos epidemiológicos

En los ensayos epidemiológicos se suministran durante un largo periodo de tiempo suplementos diarios de selenio a los voluntarios participantes; y se estudia la incidencia de cáncer a lo largo del tiempo. Por esta razón sus resultados son por lo general más concluyentes que los proporcionados por los estudios vistos hasta ahora. Entre los estudios epidemiológicos destacan los revisados a continuación, pudiéndose ampliar información de ser necesario acudiendo a las investigaciones bibliográficas realizadas por Lee *et al*¹⁷⁰ y por Whanger¹⁵⁴.

Estudios en China

Li *et al*^{171,172} y Yu *et al*^{173,174} han llevado a cabo estudios a gran escala de la prevención de cáncer mediante la ingesta de suplementos de selenio en las regiones chinas de Linxian y de Qidong, respectivamente.

En los estudios de Li en Linxian se analizaba la influencia de suplementos nutricionales con selenio, tanto solo¹⁷¹ como junto con otros antioxidantes (β -caroteno y vitamina E)¹⁷²; consistiendo el aporte de selenio en ambos estudios en 50 μ g de levadura enriquecida con selenio. Los autores observaron pequeños descensos de la incidencia del cáncer de esófago en ambos casos. En el estudio con otros antioxidantes se analizó adicionalmente la relación de la ingesta de los suplementos con la prevención de los cánceres de pulmón y de esófago; encontrándose de nuevo una correlación inversa moderada entre la ingesta de selenio y la incidencia de dichos cánceres.

Por su parte, Yu ha determinado en sus trabajos que la ingesta de suplementos dietéticos de selenio disminuye de forma significativa la incidencia de cáncer de hígado en la región de Qidong. La suplementación se realizó a través del suministro de sal normal a 5 ciudades control y de sal con selenito sódico a una sexta ciudad^{173,174}.

NPC (Nutritional Prevention of Cancer)

Clark y colaboradores llevaron a cabo el NPC (*Nutritional Prevention of Cancer*) en los Estados Unidos. En este estudio se dieron suplementos nutricionales orales a 1.312 voluntarios, quienes se dividieron en dos grupos, uno de los cuales recibió un placebo y el otro, 200 μ g diarios de selenio procedente de levadura selenizada. El objetivo inicial era estudiar el efecto de la ingesta de selenio sobre el desarrollo de nuevos carcinomas de piel, al tener todos los voluntarios antecedentes de dicho cáncer. No obstante, los autores monitorizaron otros tipos de cáncer (pulmón, mama, colon, próstata...), convirtiendo así este estudio en un referente en el campo de la prevención del cáncer por el selenio y sus derivados.

Los datos del NPC indican que la incidencia del cáncer durante el desarrollo del estudio es significativamente menor en el grupo tratado con selenio que el que recibió un placebo. La reducción es más acusada en los cánceres de pulmón, próstata y colon. Por el contrario, la incidencia del cáncer de mama aumenta entre las voluntarias que reciben selenio con respecto a las que toman el placebo¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial)

Ante los prometedores resultados experimentales del NPC en prevención nutricional del cáncer empleando suplementos de selenio, se diseñó un segundo estudio estadounidense a gran escala, el SELECT (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*); siendo el aminoácido selenometionina la forma química de selenio empleada en los complementos alimentarios. En este estudio sólo participaron voluntarios del sexo masculino al ser la determinación de la influencia del selenio sobre el cáncer de próstata el objeto principal de SELECT; aunque en los puntos de control secundarios se tomaron los datos de incidencia de cáncer en otras localizaciones. Los participantes se dividieron en cuatro grupos, los cuales recibieron suplementos que contienen selenio, vitamina E, ambos de forma conjunta o placebo¹⁷⁸.

Al contrario que en el estudio del NPC, los autores del SELECT encontraron que la incidencia de cáncer es mayor en los grupos de voluntarios tratados con selenio o con selenio y vitamina E que en el grupo que recibe el placebo¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Aunque el estudio SELECT pone en duda la capacidad del selenio y sus derivados para prevenir el cáncer, algunos expertos en este campo creen que el resultado negativo puede deberse a una incorrecta selección del selenoderivado presente en los complementos dietéticos entregados a los voluntarios. De hecho, la especie selenada utilizada en SELECT fue diferente de la empleada por el NPC: selenometionina versus levadura selenizada; la cual si bien tiene una alta concentración del selenoaminoácido, presenta también otros compuestos tales como la selenometilselenocisteína, derivado que es significativamente más activo en ensayos *in vitro*. Por esta razón sería deseable la realización de un nuevo estudio a gran escala que considere este aspecto^{120,192}.

Selenoderivados con actividad antitumoral

Actualmente se están publicando muchos estudios sobre las propiedades antitumorales de diferentes selenoderivados. Aunque en un principio se trabajó con compuestos inorgánicos, investigaciones sucesivas descubrieron que los derivados organoselénicos presentan actividades iguales o superiores y con menor toxicidad. A continuación se revisarán brevemente los selenoderivados más conocidos y/o activos, tanto orgánicos como inorgánicos.

Selenoderivados inorgánicos

Dióxido de selenio

Se ha investigado poco sobre la actividad antitumoral del dióxido de selenio. No obstante, varios estudios chinos, como el trabajo de Wei *et al* indican que el dióxido de selenio (SeO₂) puede inducir procesos apoptóticos en células tumorales, pudiendo ser el mecanismo la sobreexpresión de la proteína p53¹⁸³.

Selenito sódico

El selenito sódico es posiblemente uno de los selenoderivados estudiados con mayor profundidad. Tiene capacidad para inducir procesos apoptóticos en células tumorales de diferentes localizaciones¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ tanto por su genotoxicidad¹⁸⁷ como por inducción de las especies reactivas de oxígeno^{184,185}.

Otra forma de selenio inorgánico, como el seleniuro sódico, desempeña un papel importante en el metabolismo del selenio^{99,111} al ser tóxico en altas concentraciones por generar radicales libres que inducen mutaciones en el genoma¹⁸⁸.

Selenoderivados orgánicos

Metilselenol

El metilselenol se genera de forma endógena al ser uno de los productos intervinientes en el metabolismo de los selenoaminoácidos. En altas concentraciones tiene un efecto antiangiogénico e inductor de la apoptosis por inhibición la proteína ERK 1/2 (extracelullar-regulated kinase 1/2) y del oncogén c-myc^{189,190}.

Ácido metilselenínico

Este ácido es posiblemente uno de los selenoderivados mejor conocidos. Actúa contra las células tumorales inhibiendo la angiogénesis¹⁹¹ e induciendo los procesos apoptóticos^{191,192}. De entre los selenoaminoácidos, derivados de los anteriores y selenocompuestos inorgánicos, según un estudio danés, el ácido metilselenínico tiene la mayor potencia citotóxica¹⁹³.

Selenoaminoácidos y derivados

La acción de los selenoaminoácidos es predominantemente antioxidante y quimiopreventiva, al ser moléculas presentes de forma natural en el organismo y que tienen una serie de funciones biológicas. Desde el punto de vista de la actividad antitumoral, presentan mayor interés derivados de los selenoaminoácidos tales como la selenocistina, la selenometilselenocisteína y la γ -glutamilselenocisteína.

La selenocistina destaca por sus propiedades antitumorales dentro de este grupo de selenocompuestos, al inducir la apoptosis mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) en líneas celulares tumorales¹⁹⁴.

En el otro extremo, la selenometilselenocisteína no tiene actividad citotóxica significativa por sí mismo al ser un compuesto inhibidor de la angiogénesis. No obstante, el combinar este derivado metilado de la selenocisteína con un agente quimioterápico clásico en un mismo tratamiento puede mejorar sensiblemente la actividad por separado de ambos al actuar de forma sinérgica^{193,195,196}.

Finalmente, las propiedades antitumorales de la γ -glutamilselenocisteína son comparables a las de la selenometilselenocisteína¹¹⁹.

Difenildiseleniuro

Este derivado simétrico combina en la misma molécula de una forma simple dos elementos estructurales que pueden proporcionar al derivado que los contenga de forma individual actividad antitumoral: la presencia de selenio en la estructura molecular y la simetría de la misma^{197,198}. Además, es posible incrementar dicha actividad a través de la inclusión de sustituyentes en los anillos bencénicos^{197,199}. La acción citotóxica del difenildiseleniuro podría deberse a la inducción de apoptosis^{198,199}.

Ebselen y derivados

El selenoderivado 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona, o ebselen actúa como un agente antioxidante y antiinflamatorio, aunque también puede inducir los procesos de muerte celular programada, por interferencia con los derivados azufrados responsables de la homeostasis redox intracelular²⁰⁰. Asimismo, otro posible mecanismo de acción es la sensibilización de las células tumorales a la apoptosis inducida por moléculas inflamatorias como el TNF- α ²⁰¹. Derivados del ebselen como el BBSKE (1,2-bis[1,2-benzoisoselenazolona-3-(2H)cetona]etano) tienen un mayor poder citotóxico y proapoptótico²⁰².

Selenocianuros

Antecedentes tanto del propio grupo de investigación¹⁹⁷ como encontrados en bibliografía¹²⁷ indican que compuestos con el grupo funcional selenocianuro actúan como agentes citotóxicos e inductores de la apoptosis en líneas celulares tumorales. Entre estos derivados destaca la actividad del 1,4-fenilen-bis(metilenselenocianuro)²⁰³.

Mecanismos de acción antitumoral de los selenoderivados

En este apartado se pretende ofrecer una visión panorámica de los mecanismos a través de los cuales actúan los selenoderivados, sin profundizar en los mismos por quedar fuera de los objetivos de esta Tesis Doctoral el hacer estudios mecanísticos de la acción de los selenocompuestos planteados en la misma.

Jackson y Combs resumen gráficamente en una imagen los mecanismos de acción antitumoral más conocidos del selenio y de sus metabolitos, así como su interrelación con los procesos involucrados en la carcinogénesis (*Figura 2.2*)²⁰⁴. Entre los mecanismos indicados por Jackson y Combs, podrían destacarse la protección frente a la acción de los radicales libres, la activación de los procesos apoptóticos, la inhibición de la angiogénesis y la inducción de mutaciones en el ADN. A continuación se analizan brevemente estos mecanismos.

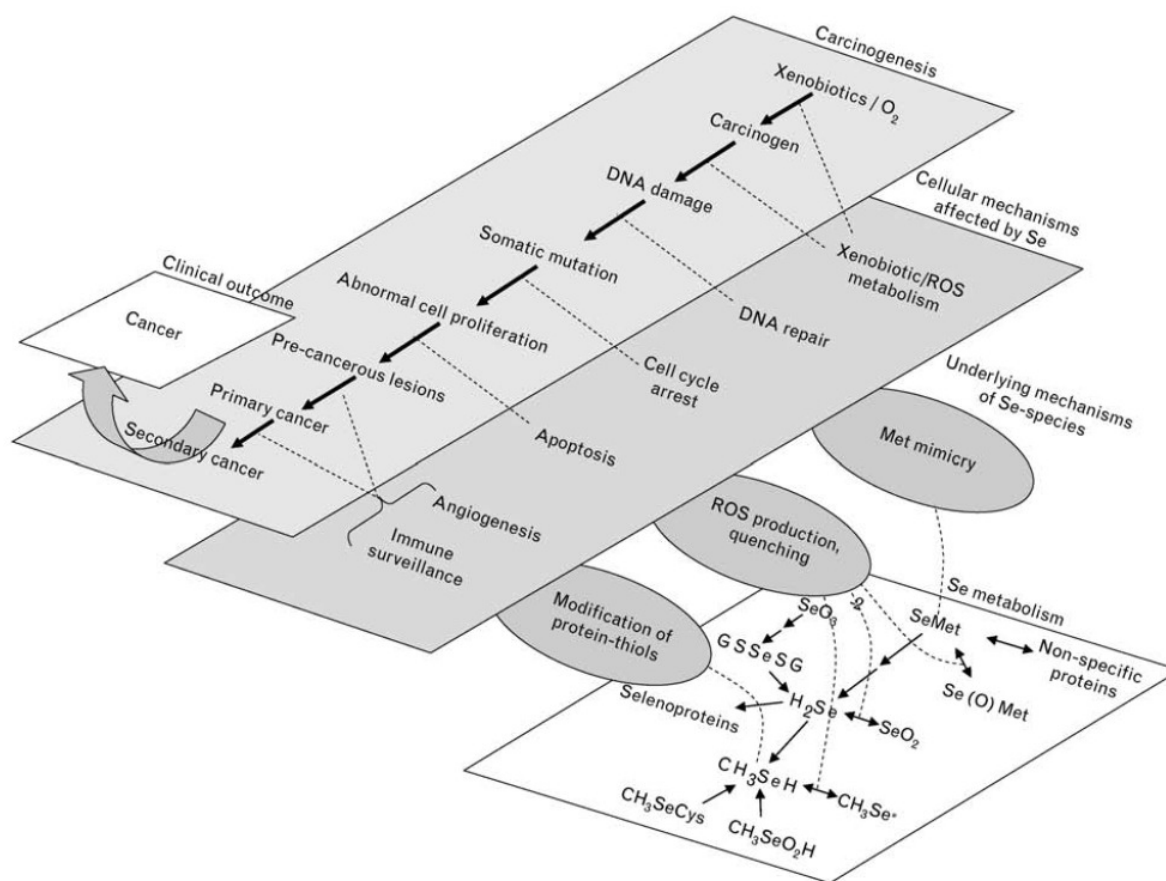


Figura 2.2: Mecanismos de acción de los derivados de selenio contra el cáncer²⁰⁴.

Reducción del estrés oxidativo

Los mecanismos relacionados con la neutralización de radicales libres por parte de selenocompuestos como las selenoproteínas se han estudiado previamente en los apartados dedicados al Estrés Oxidativo y al Selenio en la Introducción (*vid* pág 21-24 y 27-32, respectivamente).

Inducción de mutaciones

Algunos derivados de selenio, como el selenito sódico^{187,204} y el seleniuro sódico¹⁸⁸, pueden causar daños en el genoma. Dichos daños son detectados por los sistemas de control celular, y pueden inducir, en consecuencia, los procesos apoptóticos en células tumorales²⁰⁴.

Inhibición de la angiogénesis

Compuestos metilados de selenio como la selenometilselenocisteína y el metilselenol inhiben la irrigación del tumor a través de la inhibición de la formación de vasos sanguíneos, más conocida como angiogénesis. Si bien administrar un inhibidor de la angiogénesis no permite eliminar un tumor, el hacerlo conjuntamente con otro agente antitumoral puede potenciar significativamente la acción de este último^{195,196,204}.

Inducción de la apoptosis

Muchos derivados organoselénicos tienen capacidad para inducir los procesos apoptóticos o de muerte celular programada. Los mecanismos a través de los cuales los selenocompuestos ejercen dicha acción son muy diversos ^{154,204}.

Por citar algunos mecanismos, la selenocistina y el seleniuro sódico inducen la apoptosis mediada por ROS ¹⁹⁴; el metilselenol lo hace a través de la inhibición de la proteína ERK 1/2 ^{189,190}, el selenito y el seleniuro sódico producen mutaciones en el genoma que activan la vía intrínseca y el ebselen sensibiliza a las células a la apoptosis mediada por el TNF- α ²⁰¹. Whanger cita ¹⁵⁴ entre otros mecanismos alternativos los siguientes: cambios en la expresión de genes de proteínas como el NF- κ B, regulación de la proteína quinasa C y de la ciclín-quinasa 2, y activación de las caspasas.

2. AZUFRE, SELENIO Y NEMATODOS

Nemotoxicidad del selenio y derivados

Aunque el número de estudios de la acción ejercida por selenoderivados en nematodos es reducido, la bibliografía encontrada pone de relieve la nemotoxicidad de estos compuestos.

Morgan¹⁴⁰ plantea que el selenito sódico y la selenometionina actúan como nemotóxicos en nematodos adultos de la especie *Caenorhabditis elegans*, aunque a concentraciones relativamente elevadas, con valores de IC₅₀ a las 24 horas entre 1 y 5 mM para el anión inorgánico y entre 5 y 10 mM en el caso del selenoaminoácido.

Un artículo taiwanés¹⁴¹ aporta un novedoso enfoque al estudiar el efecto ejercido por la adición de bajas concentraciones de selenito sódico sobre el crecimiento de *Caenorhabditis elegans*. Los autores descubrieron que la presencia en el medio de cultivo de selenito en concentraciones en el rango nanomolar (10-50 nM) favorece el desarrollo de los gusanos. Sin embargo, al elevar la concentración del anión a 20 µM comienzan a aparecer efectos tóxicos como el retardo del desarrollo y la sensibilización frente a otros agentes.

El mecanismo a través del cual los selenoderivados actúan contra los nematodos podría basarse, según Estevez *et al*²⁰⁵ en la inducción de daños degenerativos en el sistema nervioso de los gusanos.

Sin embargo, no se han encontrado en bibliografía antecedentes de compuestos organoselénicos sintéticos como agentes nemotóxicos. En ese sentido, el hallazgo de actividad nematocida en selenoderivados orgánicos que no están presentes de forma natural en los sistemas biológicos sería una novedad bibliográfica.

Nemotoxicidad del azufre y derivados

De acuerdo con la bibliografía, algunos derivados azufrados se encuentran entre los medicamentos más frecuentemente utilizados en práctica clínica para tratar enfermedades causadas por nematodos, tales como triquinosis, ascariasis, elefantiasis y oncocercosis.

Así, en el tratamiento de la triquinosis se emplea albendazol y tiabendazol, entre otros agentes, ya que existen otros antihelmínticos no azufrados (ivermectina, mebendazol...) ²⁰⁶. El albendazol es utilizado como medicamento contra la filariasis y la oncocercosis ²⁰⁷. Y el levamisol se usa en el tratamiento de la ascariasis, triquinosis y anquilostomiasis ²⁰⁸.

La *Figura 2.3* recoge las fórmulas moleculares de los agentes nematocidas azufrados anteriormente citados:

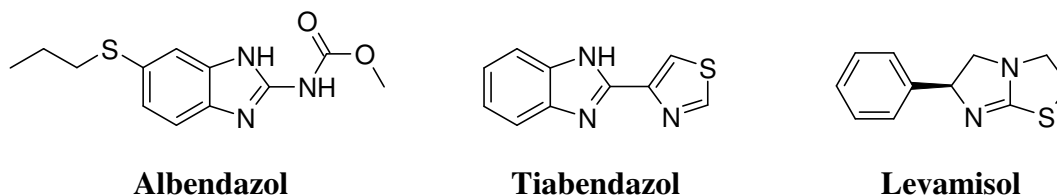


Figura 2.3: Estructuras de derivados azufrados empleados como nematocidas.

Por otro lado, ciertos alquilsulfuros volátiles presentes en especies del género *Allium*, que incluye entre otras especies a la cebolla (*Allium cepa*) y al ajo (*Allium sativum*) presentan actividad nematocida²⁰⁹⁻²¹². Se observa que los nematodos comienzan a moverse de forma agitada al entrar en contacto con disoluciones concentradas de alquilsulfuros²¹², hecho que puede estar relacionado con una posible inducción de daños neuronales, al igual que en el caso de los selenoderivados²⁰⁵. Otro posible mecanismo de acción podría ser la disolución de la epidermis del nematodo por parte del compuesto azufrado con el posterior vertido del contenido del organismo al exterior, tal y como indican las observaciones de Anwar²¹².

Conociendo el paralelismo entre las propiedades fisicoquímicas del azufre y del selenio, y la similitud de la acción biológica de aminoácidos azufrados y selenados como la metionina, cisteína, selenometionina y selenocisteína, y teniendo en cuenta los antecedentes existentes de ciertos derivados selenados como nematocidas, se plantea que algunos compuestos organoselénicos que contengan dicho elemento en un entorno alquílico puedan presentar actividad nematocida.

3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Selenio y cáncer

Un grupo investigador del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra lleva años trabajando en el campo del diseño de nuevos compuestos orgánicos, selenados o no, como nuevos agentes citostáticos y citotóxicos en células tumorales.

El grupo ha desarrollado diversos derivados nitrogenados simétricos, no selenados, encontrando que la simetría molecular potencia la actividad citotóxica de los compuestos que poseen dicha propiedad²¹³⁻²¹⁶.

Más recientemente ha trabajado en el diseño de nuevos derivados organoselenados como antiproliferativos y citotóxicos; campo en el cual se enmarca este trabajo de investigación. Dentro de estos compuestos organoselénicos se han considerado diferentes estructuras: selenoésteres de carboxietilo²¹⁷, diseleniuros y selenocianatos²¹⁸, selenodiazoles²¹⁹, selenocarbamatos²²⁰ y derivados selenados con anillos de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina²²¹.

Selenio y parásitos

Ciertos selenoderivados de los anteriormente citados han sido ensayados como nuevos agentes leishmanicidas, para conocer las potenciales aplicaciones de los compuestos organoselénicos contra los protozoos causantes de esta extendida enfermedad tropical causada por protozoos del género *Leishmania*^{218,222}.

III. Hipótesis / Hypothesis

III. HIPÓTESIS

Como consecuencia del estudio realizado sobre la actividad biológica del selenio, se propone que los derivados organoselénicos que contienen el grupo funcional selenoéster y responden a la fórmula general mostrada en la *Figura 3.1* pueden ejercer una acción dual antineoplásica y quimiopreventiva contra el cáncer.

El mecanismo de acción propuesto que podría explicar esta actividad dual se basa en la hidrólisis del selenoéster, la cual libera al medio especies iónicas de selenio que presentan actividad antitumoral y son susceptibles de sufrir reacciones de oxidación-reducción gracias a su carácter iónico. Es decir, se propone que los derivados planteados actúan como un profármaco que transporta el fármaco al interior celular, donde la ruptura del selenoderivado inicial genera las especies iónicas activas de selenio responsables en última instancia de la acción antioxidante, antiproliferativa y citotóxica de los selenoésteres.

Los compuestos objetivo presentan como elemento estructural característico el grupo selenoéster con un grupo *R* unido al selenio y un resto *R'* conteniendo un grupo aromático enlazado directamente o a través de un espaciador alifático al carbono carbonílico del selenoéster. La fórmula general se muestra en la *Figura 3.1*.

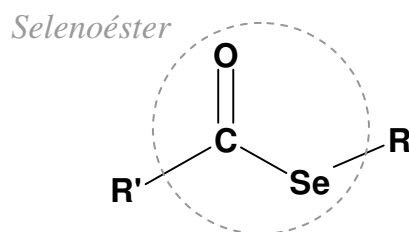


Figura 3.1: Fórmula general de los compuestos.

III. HYPOTHESIS

After reviewing the study performed concerning the biological activity of the selenium, it is proposed that organoselenium derivatives with the selenoester functional group, as shown in the *Figure 3.1*, can develop a dual antitumoral and chemopreventive activity against cancer.

The proposed mechanism that may explain this dual activity lies in the hydrolysis of the selenoester group. This breakdown allows the liberation to the medium of selenium anions, with antitumor properties and the possibility of taking part in oxidation-reduction reactions due to the charged selenium atom. In other words, it is suggested that the novel selenoesters act as a prodrug that transports the drug towards the cell cytoplasm. Inside the cell, the breakdown of the carrier molecule liberates the active ionic chemical forms of selenium with antioxidant, antiproliferative and cytotoxic properties in cells.

The compounds presented in this research work have a selenoester group as the main structural and pharmacophoric feature. Selenium atom is bounded to a group *R*. On the other hand, the carbonyl group is linked directly or through an alkyl bridge to an aromatic or heteroaromatic ring with or without substituents. The whole substituents-ring-bridge is denoted with the *R'* symbol in the general structure shown in *Figure 3.1*.

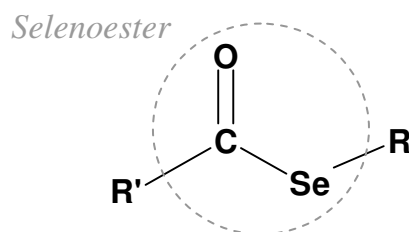


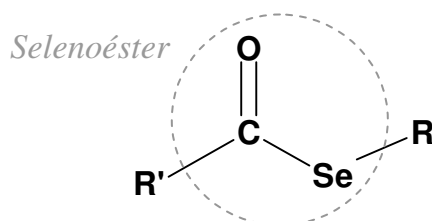
Figure 3.1: Chemical structure of the selenocompounds.

IV. Objetivos / Aims

IV. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es comprobar la hipótesis planteada en el apartado anterior: verificar que los selenoderivados diseñados ejercen una acción dual contra el cáncer al comportarse como nuevos productos con propiedades antitumorales y quimiopreventivas; siendo el mecanismo de acción de los compuestos la hidrólisis del selenoéster en el interior celular, con la consiguiente liberación de las especies activas que son las responsables últimas de la actividad antioxidante en células no tumorales y citotóxica en células neoplásicas.

Los compuestos incluidos en este trabajo de investigación responden a la estructura general abajo representada; donde R es un grupo alquílico unido al selenio, funcionalizado o no con derivados carboxílicos y carbonílicos; y R' , un anillo aromático o heteroaromático, sustituido o no, enlazado al carbono carbonílico del selenoéster directamente o a través de un espaciador alifático.



En la modulación de la estructura, a priori, es deseable facilitar la ruptura del selenoéster a través de la inclusión de restos R' y R que proporcionen, después de la hidrólisis, especies iónicas estables que desplacen el equilibrio químico hacia la ruptura, potenciando la actividad. De este modo, un anillo aromático directamente unido al carbonilo del selenoéster favorecería la hidrólisis gracias a la estabilidad del catión acilo resultante de la misma, estabilidad que puede aumentarse incluyendo sustituyentes electrodonantes tales como los grupos metoxilo, los cuales facilitan la distribución de la carga por el sistema aromático y por sus sustituyentes. En cuanto al resto alquílico unido a selenio, la inclusión en la cadena del mismo de grupos que retiren carga, como un carbonilo de cetona o un ácido carboxílico, favorece la ruptura al estabilizar el fragmento resultante.

No obstante, no es deseable diseñar derivados cuya ruptura esté tan favorecida que pueda producirse antes de que el compuesto acceda al interior de las células diana. En este caso, las especies iónicas generadas en la hidrólisis extracelular no afectarían a las células tumorales por su carácter hidrofílico, el cual impediría a dichas especies atravesar la membrana y entrar en las células. Por otro lado, debido a la presencia en la mayoría de los compuestos de un grupo polar dentro del sustituyente R , es aconsejable estudiar también el efecto de introducir en R' un espaciador alifático corto de 1-2 carbonos para aumentar la lipofilia del selenoderivado y, por ende, favorecer su camino

al interior de la célula. La modulación de la polaridad del sustituyente *R* puede tener la misma acción. En consecuencia, para estudiar este efecto se plantean en este trabajo compuestos con restos *R* cuya complejidad, para barrer el espectro de polaridad, varía desde un simple grupo metilo hasta restos alquílicos complejos que contienen grupos polares con mayor o menor polaridad, tales como ácidos, amidas, ésteres y cetonas.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación es diseñar selenoésteres de labilidad regulada de modo que la hidrólisis de los mismos tenga lugar, pero no sin antes dar tiempo suficiente al selenoderivado para alcanzar el interior de las células sin hidrolizarse por el acceso previo.

En base a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en el diseño, en la síntesis y en la evaluación biológica de compuestos antitumorales, en la modulación de la actividad dual antineoplásica y quimiopreventiva de los selenoésteres y en la orientación de ulteriores síntesis en función de los resultados previos se pondrá el acento en las propiedades citotóxicas y antiproliferativas de los compuestos, sin perder de vista la evaluación final de los mismos como antioxidantes.

Se trabaja en el campo del cáncer debido al interés clínico y social suscitado por esta enfermedad: una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, donde el 20-25 % de los fallecimientos se deben a este conjunto de dolencias. Según la IARC (International Agency for Research on Cancer) 7,57 millones de personas murieron el año 2008 a causa del cáncer en todo el mundo, y estima que el número de fallecimientos aumentará a 13,1 millones en el año 2030 ⁷.

Estos datos justifican la necesidad de trabajar en el desarrollo de nuevas terapias que permitan combatir el cáncer y reducir su tasa de mortalidad. La tasa de incidencia en el mundo está aumentando paulatinamente tanto en términos porcentuales como en términos absolutos debido al aumento de la esperanza de vida y de la población mundial, respectivamente. La investigación en nuevas estructuras con potenciales usos terapéuticos en cáncer es prioritaria debido a los efectos secundarios originados por los medicamentos presentes en el mercado. De este modo, la investigación oncológica en quimioterapia está centrada en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales que tengan una mayor potencia y tolerancia que los ya existentes.

Otro tema sobre el que se está investigando actualmente de una forma prolífica es la prevención del cáncer. Se han efectuado estudios, algunos a gran escala, con diferentes antioxidantes, con el fin de evaluar su capacidad para evitar la aparición de tumores ^{120, 175-182}.

A día de hoy, el selenio es uno de los pocos elementos estructurales que proporciona a los compuestos orgánicos que lo contienen actividad citotóxica en tumores y quimiopreventiva en células normales. En este trabajo se trata de verificar si es posible combinar ambos efectos en un único compuesto organosélenico.

Por último, debido a que la bibliografía describe que ciertos alquilsulfuros poseen actividad antiparasitaria y nematocida ²⁰⁹⁻²¹², y dado que las estructuras diseñadas en este trabajo tienen un átomo de selenio unido a un resto alquílico, se ha propuesto la posibilidad de que los compuestos selenados puedan tener igual o mayor potencia nemotóxica como consecuencia del paralelismo existente entre la química y las

propiedades tanto del azufre y del selenio como de los compuestos azufrados y selenados. En consonancia, parece razonable evaluar la actividad nemotóxica de estos derivados de selenio para ampliar el conocimiento de sus posibles aplicaciones.

Aunque se han publicado artículos referidos a la nemotoxicidad de compuestos organoselénicos presentes en las células de forma fisiológica, como la selenocisteína y la selenometionina^{140,141,205}; a día de hoy no hay bibliografía sobre la toxicidad en nematodos de compuestos organoselenados de nueva síntesis. Por lo tanto, el hallazgo de actividad nematocida en los selenoésteres presentados en este trabajo supondría una novedad bibliográfica.

Para alcanzar el objetivo genérico descrito y demostrar la hipótesis propuesta se plantean los siguientes objetivos parciales:

I. Diseñar y sintetizar nuevos derivados organoselénicos con potencial actividad dual citotóxica en células tumorales y quimiopreventiva en células sanas.

II. Caracterizar los compuestos obtenidos mediante el empleo de técnicas de análisis orgánico instrumental, y verificar si alcanzan el grado de pureza requerido para la realización de pruebas biológicas.

III. Evaluar la citotoxicidad de los selenoderivados en líneas celulares tumorales seleccionadas y la selectividad de su efecto con respecto a células sanas, empleando los resultados en el diseño de nuevos derivados más potentes y selectivos.

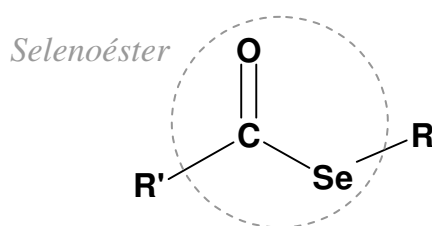
IV. Una vez comprobada la actividad antitumoral, verificar la dualidad de acción estudiando las propiedades quimiopreventivas de los compuestos, buscando conocer tanto el mecanismo de acción como las posibles aplicaciones de los mismos en la prevención del cáncer.

V. Efectuar ensayos de nemotoxicidad de los selenoderivados obtenidos para evaluar si presentan la actividad nematocida esperada en base a las similitudes estructurales existentes con derivados azufrados con aplicaciones nematocidas.

IV. AIMS

The main goal of this work is to verify the hypothesis: to confirm that the organoselenium compounds designed play a dual action against cancer for being molecules with anticancer and chemopreventive features. Also, that the aforementioned biological behaviour is a possible consequence of the selenoester breakdown inside cells, which liberates the ultimate active ions with antioxidant and cytotoxic roles in healthy and cancer cells, respectively.

Structures presented in this work answer to the chemical formula shown below, where the *R* moiety linked to the selenium atom is an alkyl group with or without carboxylic or carbonyl functional groups; and *R'*, an aromatic or heteroaromatic ring with or without substituents that is bounded to the carbonyl directly or through an aliphatic bridge.



At a first sight, in the structure modelization it is pretended to ease the selenoester breakdown through the inclusion of *R'* and *R* moieties that render, after the hydrolysis, stable ionic species which displace the chemical equilibrium towards the breakdown. So, an aromatic ring directly bounded to the selenoester carbonyl should favour the hydrolysis due to the stability of the acyl cation produced in the process. Furthermore, this stability can be increased through the inclusion of electron donating substituents such as methoxyl groups, which facilitate the charge distribution along the aromatic system and substituents. Regarding the alkyl moiety directly bounded to the selenium atom, the inclusion of electron withdrawing groups, alike a ketone or a carboxylic acid facilitates the breakdown for stabilizing the resulting fragments.

However, it is not desirable to design derivatives whose breakdown is so favoured that it can be produced before the arrival of the compound to the inner medium of the target cells. In this case, the ionic species generated in the extracellular hydrolysis would not attack the cancer cells due to their hydrophilic properties, which prevent the ions to cross the cell membrane and, consequently, the access to the cells. On the other hand, due to the presence of a polar group inside the *R* moiety, it is also advisable to study the effect of the inclusion in *R'* of a short aliphatic bridge of 1-2 methylene groups for increasing the selenoderivative lipophilicity and, so, ease its path towards the cell organelles. The polarity modulation of the *R* moiety may get the same objective. Therefore, selenocompounds with *R* substituents of different complexity are planned in

this research to study the effect of the polarity over the biological activity. The polarity varies from a simple apolar methyl group to complex alkyl moieties with groups of different polarity, such as acids, amides, esters and ketones.

In short words, the aim of this research work is the design of selenoesters whose breakdown is controlled in a way that the hydrolysis can occur but not as fast as it does not give enough time to the selenoderivative to reach the cell compartments where the desired compound action takes place.

The modulation of the dual anticancer and chemopreventive activity and the design of new compounds in function of the previous results will be focused mainly in the cytotoxic and antiproliferative properties of the selenoesters due to the experience of our research group in the design, synthesis and biological evaluation of antitumour compounds. Nevertheless, the evaluation of the selenoderivatives as antioxidants will be always considered.

Cancer field is chosen because of the clinical and social interest created by this illness, which is one on the main death causes in the developed countries, where it produces the 20-25% of the deceases. According to the IARC (International Agency for Research on Cancer) 7.57 million people died in 2008 due to cancer worldwide. Additionally, estimations predict 13.1 million deaths in 2030 ⁷.

These data justify the work in the development of new therapies that allow the humankind to defeat the cancer illnesses and to reduce the mortality rates. Besides, it is important to signal that the incidence rate is arising slowly both in percentage and absolute terms, because of the increase of the life expectancy and the world population, respectively. For these reasons, and also for reducing the adverse drug reactions of the drugs available nowadays, the research in novel structures with potential therapeutic applications is a priority. Consequently, the oncologic investigation is focused in the search of more potent and secure new antitumoral agents that the ones mostly used currently in clinical practice.

On the other hand, cancer prevention is the other main field of research on cancer. Recently, several studies have been realized to evaluate the capacity of different antioxidants to prevent the origin and development of cancer tumours ^{120,175-182}.

Nowadays, selenium is one of the few structural elements that give cytotoxic and chemopreventive activity to the organic compounds that include them. The aim of this work is to verify whether it is possible to combine the two effects in the same organoselenium derivative.

Finally, considering that certain alkylsulfides, according to previous articles, possess antiparasitary and nematicidal activity ²⁰⁹⁻²¹² and taking also into account that the structures presented in this work include a selenium atom bounded to an alkyl group; it is suggested that the novel selenium compounds presented in this work could have equal or higher nemotoxyc activity due to the structural parallelism of the chemistry and properties of sulfur and selenium, on one hand; and of sulfur and selenium compounds, on the other hand. Consequently, evaluating the nematicidal properties of the novel derivatives is interesting to broaden the knowledge of the possible applications of selenocompounds.

Although several articles have been published about the nemotoxicity of organoselenium derivatives with biological functions, such as the selenoaminoacids selenomethionine and selenocysteine^{140,141,205}; there is no bibliography available nowadays in the subject of the toxicity of organic selenocompounds synthesized in laboratories. For these reason, the finding of nematocidal activity in novel derivatives as the selenoesters would open a new field in the bibliography.

The following partial aims are outlined to demonstrate the proposed hypothesis and to accomplish the general objective previously described:

- I.** To design and to synthesize novel organoselenium derivatives with potential cytotoxic in tumour cells and chemopreventive in healthy cells dual activity.
- II.** To characterize the new compounds through the use of instrumental organic analysis techniques; and to verify whether they reach the purity required for the performance of biological tests.
- III.** To evaluate the selenoderivatives cytotoxicity in selected cancer cell lines and the selectivity of their action in comparison to the one observed in non-tumoral cells. Results will be utilized in the design of more potent and selective new derivatives.
- IV.** After proving the antitumoral activity, to study the chemopreventive properties of the compounds to verify the antioxidant and cytotoxic dual activity. The aim is also to know the antioxidant action mechanisms and the potential applications of the selenoesters in cancer prevention.
- V.** Performing nemotoxicity assays of the selenoderivatives obtained to evaluate whether they present the expected nematocidal activity in base to the structural parallelism existents with nemotoxic sulfur derivatives.

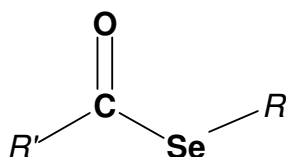
V. Plan de Trabajo

V. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo propuesto para alcanzar cada uno de los cinco objetivos planteados en el apartado anterior se expone y desarrolla a continuación:

1. DISEÑO Y SÍNTESIS QUÍMICA

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se enmarca en la investigación sobre compuestos organoselénicos desarrollada en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra. Los selenoderivados objeto de estudio de este trabajo de investigación contienen el grupo funcional selenoéster (-COSe-) y responden a la siguiente estructura general (*vid. Tabla 10.1*, págs. 279-284).



En la fórmula mostrada R' es un resto aromático o heteroaromático enlazado al carbono carbonílico del selenoéster o bien directamente o bien a través de un espaciador alifático corto, sustituido o no, de uno o dos metilenos. En la modulación del anillo heteroaromático se trabajará con heterociclos π -excedentes (tiofeno) y π -deficientes. Dentro de estos últimos se considerará la síntesis de derivados que contengan heterociclos monocíclicos (piridina, pirazina) y bicíclicos (quinolina).

El anillo se sustituirá con sustituyentes electrodonantes y electroatrayentes para estudiar la influencia ejercida por ellos tanto sobre la actividad en células tumorales como sobre la hidrólisis del selenoéster. Por las limitaciones sintéticas que conlleva la introducción de selenio en la molécula a través de reacciones con reductores enérgicos (NaBH_4 , LiAlH_4) se trabajará con sustituyentes que no permitan la inactivación de los reductores por formación de puentes de hidrógeno ni tengan grupos funcionales susceptibles de reaccionar con dichos agentes. Este hecho restringe la lista de sustituyentes a los siguientes grupos: alcoxilo y tioalquilo (*electrodonantes π*), alquilo (*electrodonante σ*), halo (*electroatrayente σ*) y ciano (*electroatrayente π*).

Por otro lado, con las variaciones del resto alquílico R (*vid. Tabla 6.1*, pág. 69) se pretenderá modular tanto el volumen como la polaridad del fragmento molecular que queda unido al selenio tras la hidrólisis. La polaridad se modifica mediante la variación del grupo funcional presente en el resto R ; definiendo dicho grupo funcional la serie en la cual se incluirá cada selenoéster. Se trabajará siguiendo un orden aproximadamente decreciente de polaridad: ácidos (*Serie I*), amidas (*Serie II*), anhídridos (*Serie III*), ésteres (*Serie IV*), cetonas (*Serie V*) y la reducción de R a un grupo metilo (*Serie VI*).

El trabajo sintético se dividirá en dos etapas para estudiar por separado la modulación de la actividad citotóxica en tumores a través de la variación primero de R' y posteriormente de R . Los selenoésteres que se obtengan se testarán en la línea celular PC-3 (adenocarcinoma de próstata). De este modo, la modulación de la actividad se realizará con los datos que se recojan en dichas células, aunque se estudiarán también las variaciones sugeridas por las pruebas efectuadas en otras líneas. Por la experiencia del grupo investigador en el diseño de derivados antitumorales, el trabajo se focalizará en este aspecto, aunque sin olvidar la modulación de la actividad quimiopreventiva.

La modulación inicial del sustituyente, del anillo y del espaciador presentes en R' se realizará empleando como resto R el grupo 1-carboximetilo ($-CH_2COOH$) y buscará determinar qué combinaciones sustituyente-anillo-espaciador potencian la actividad antitumoral, a través del estudio de las propiedades antiproliferativas y antitumorales tanto de los selenoésteres que se sintetizan en este trabajo como de aquellos ya existentes en la quimioteca del grupo de investigación^{197,217}. Se planteará además la disustitución del anillo aromático con dos grupos $-COSeCH_2COOH$ para introducir un elemento de simetría, al demostrar resultados previos del grupo investigador el efecto positivo ejercido por la simetría en el diseño de nuevos fármacos antitumorales²¹³⁻²¹⁶.

Tras la modulación de R' , se conocerán los 4-5 conjuntos de sustituyentes, anillos y espaciadores más convenientes de acuerdo con los objetivos de este trabajo de investigación, y se podrá iniciar la segunda fase del mismo. En dicha fase, trabajando con los R' más activos, se irá modificando sucesivamente el resto R con el objetivo de modular la citotoxicidad a través de la variación de la polaridad y volumen tanto de R como del fragmento $-SeR$ resultante tras la hidrólisis del selenoéster.

La modulación de la polaridad se efectuará mediante la inclusión en el extremo final de R de los siguientes grupos funcionales; de diferente polaridad:

- *Amidas*: Se trabajará en primer lugar con amidas primarias. Si los resultados son prometedores, se estudiarán amidas secundarias seleccionadas en base a criterios de volumen, impedimento estérico y modulación de la hidrólisis del selenoéster.
- *Anhídridos*: Se plantea únicamente la síntesis del selenoanhídrido derivado del anhídrido ftálico al no ser de aplicación, por tema de accesibilidad de los reactivos y de simetría, la modulación previa realizada en R' .
- *Ésteres carboxílicos*: Se buscará obtener compuestos con diferentes restos alquílicos o arílicos unidos al oxígeno, para evaluar cuál es el más conveniente en términos biológicos al estudiar cómo influyen factores como el mayor o menor impedimento estérico, la facilidad de rotura de los ésteres de selenio y oxígeno y la presencia o ausencia de un anillo aromático. Con este fin, se buscará obtener ésteres metílicos, *terc*-butílicos y fenílicos.
- *Cetonas*: Dentro de las cetonas se plantearán tres subseries (metilcetonas, *terc*-butilcetonas y fenilcetonas), siguiendo el mismo esquema que en la serie anterior.
- *Resto alquílico*: Se sintetizarán derivados mono y difuncionalizados con el grupo $-COSeCH_3$ para estudiar el efecto de la adición de un segundo grupo funcional y de la ganancia de simetría molecular sobre la actividad.

2. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

Los selenoésteres sintetizados se caracterizarán de forma inequívoca mediante el empleo de técnicas de determinación estructural basadas en espectroscopía infrarroja, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y de carbono 13, espectrometría de masas y análisis elemental.

Adicionalmente, se planteará la realización de estudios de estabilidad a través de la obtención de espectros de RMN de protón a diferentes tiempos y en condiciones extremas con el objetivo de asegurar que los compuestos son estables en disolución, de cara a la realización de ensayos biológicos.

3. VALORACIONES DE ACTIVIDAD

A. Evaluación de Citotoxicidad

Se realizará un screening preliminar de la citostaticidad y la citotoxicidad de todos los selenoésteres presentados en esta Tesis Doctoral en la línea celular PC-3 (adenocarcinoma de próstata) en el Laboratorio de Oncología del *Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)* de la *Universidad de Navarra*. Los ensayos serán efectuados por Dña. Celia Prior siguiendo el método del MTT, y los datos se emplearán en la modulación de la actividad biológica y en la selección de los restos *R* y *R'* potenciadores de la inhibición del crecimiento y de la actividad citotóxica de los productos en esta línea celular.

La elección de la línea celular PC-3 para la realización del screening preliminar se debe a que en los estudios quimiopreventivos con selenio (NPC, SELECT) se analiza la influencia de la suplementación alimentaria con selenio sobre el desarrollo de cáncer de próstata^{120,175-182}. Por otro lado, gran parte de los estudios de citotoxicidad de compuestos organoselénicos, tanto de la bibliografía como del grupo de investigación, emplean líneas tumorales prostáticas^{217,220,223,224}.

Conocida la actividad de todos selenoderivados en las células tumorales PC-3, se determinará la selectividad de la acción de aquellos compuestos con mayor actividad en dicha línea tumoral frente a RWPE-1, una línea no tumoral de próstata, siguiendo el método del MTT. Asimismo, se realizarán ensayos de citotoxicidad en otras líneas celulares tumorales de los selenoésteres con mayor actividad en próstata, siguiendo la misma metodología con el fin de profundizar en el estudio de la acción biológica de los selenoésteres y valorar sus aplicaciones frente a diferentes tumores.

El selenio es un elemento que presenta una actividad redox no despreciable, la cual puede influir en la determinación de la citostaticidad y citotoxicidad a través del método del MTT, al existir la posibilidad de que se produzca una reacción indeseada entre el selenio y el agente colorimétrico redox. De este modo, para descartar que los resultados anteriores se deban a interferencias, se concertará una colaboración con el *Laboratoire d'Immunologie* de la *Faculté de Médecine (Université Paris Descartes, Francia)*, para determinar la citotoxicidad de los selenoésteres más activos frente a un panel de líneas tumorales y sanas, siguiendo la metodología del cristal violeta, la cual es independiente de los procesos redox.

Se trabajará con el laboratorio de París citado ya que emplea esta técnica de forma habitual en sus investigaciones²²⁵. Los experimentos concertados con este centro colaborador serán efectuados por los Drs. Vincent Jamier y Christiane Chereau bajo la dirección del Prof. Dr. Frederic Batteux.

El principal criterio que se considerará en la selección de los derivados a analizar con mayor profundidad por los centros colaboradores de Pamplona y París es la actividad preliminar en la línea celular PC-3: se buscará ampliar el conocimiento tanto de la acción citotóxica y citostática en otras líneas celulares de los selenoésteres con mayor actividad en las células PC-3 como de la selectividad de la actividad biológica de dichos selenoderivados.

B. Evaluación Quimiopreventiva

Después de confirmar la citotoxicidad de los selenoésteres en células tumorales, se determinará si tienen además potenciales aplicaciones en la prevención del cáncer, con el fin de demostrar la acción dual de los compuestos en el tratamiento y en la prevención de esta enfermedad. Por lo tanto, para explorar este campo se estudiarán selenoésteres representativos de todas las series (prestando especial atención a aquellos con mayor actividad citotóxica y antiproliferativa) a través de la aplicación de técnicas electroquímicas como la voltametría cíclica para evaluar cuáles tienen actividad redox.

Si se verifica esta actividad con los datos voltamétricos, se realizarán ensayos bioquímicos "*in vitro*" para determinar el posible mecanismo de acción antioxidante de los selenoésteres en los sistemas biológicos. Concretando, se evaluará tanto la actividad peroxidasa o eliminadora de peróxido de hidrógeno como la capacidad para destruir el radical DPPH o difenilpicrilhidrazilo de una selección reducida de los compuestos.

Las pruebas electroquímicas y bioquímicas, así como los ensayos de toxicidad en nematodos, mostrados a continuación, se efectuarán durante la estancia a realizar en Saarbrücken (Saarland/Sarre, Alemania) bajo la supervisión del Prof. Dr. Claus Jacob, en el *Abteilung Bioorganische Chemie* de la *Universität des Saarlandes*.

C. Evaluación de Nemotoxicidad

Por último, se evaluará una selección de selenoésteres como nematocidas en la especie *Steinernema feltiae*, con el fin de conocer si las estructuras diseñadas como antitumorales tienen además actividad antiparasitaria al igual que moléculas similares que contienen azufre. Por motivos de seguridad se trabajará con un nematodo inocuo en humanos, con lo cual los resultados no serán directamente extrapolables a nematodos que causan enfermedades en humanos; aunque darán una idea preliminar aceptable del potencial de los derivados como nuevos agentes antiparasitarios y nematocidas.

VI. Síntesis Química

VI. SÍNTESIS QUÍMICA

I. SERIES DE SELENOÉSTERES DESARROLLADAS

Los selenoésteres presentados en este trabajo de investigación, con una fórmula general $R'COSeR$, tienen un resto alquílico R cuya función es modular tanto la polaridad como el volumen del fragmento RSe^- liberado al medio celular tras la hidrólisis del selenoéster mediante la inclusión o no en el resto alquílico R de grupos funcionales carboxílicos y carbonílicos de distinta polaridad.

De este modo, las seis series de selenoésteres desarrolladas son:

- *Serie I:* Selenoésteres de carboxialquilo.
- *Serie II:* Selenoésteres de carbamoilalquilo.
- *Serie III:* Selenoanhídridos.
- *Serie IV:* Selenoésteres de R-oxicarbonilalquilo.
- *Serie V:* Selenoésteres de acilalquilo.
- *Serie VI:* Selenoésteres de metilo.

En algunas series se han estudiado ciertas variantes sintéticas seleccionadas que definen distintas subseries. En la *Tabla 6.1* se listan las diferentes subseries con las cuales se ha trabajado, en función del resto R utilizado en cada una de ellas.

Tabla 6.1a: Series desarrolladas en función del sustituyente R.

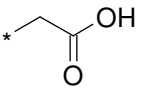
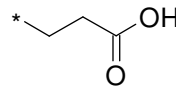
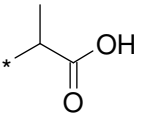
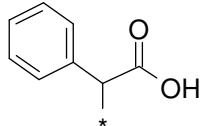
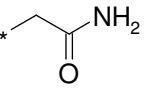
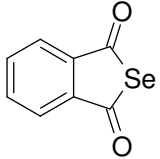
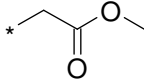
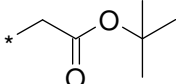
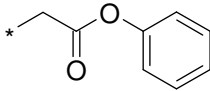
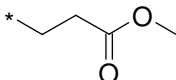
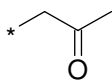
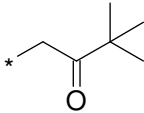


Serie	R	Serie	R
<i>I.A-B -Selenoésteres de carboximetilo</i>		<i>I.C - Selenoésteres de 2-carboxietilo</i>	
<i>I.C. - Selenoésteres de 1-carboxietilo</i>		<i>I.D - Selenoésteres de fenilcarboximetilo</i>	
<i>II - Selenoésteres de carbamoilmetilo</i>		<i>III - Selenoanhídridos</i>	

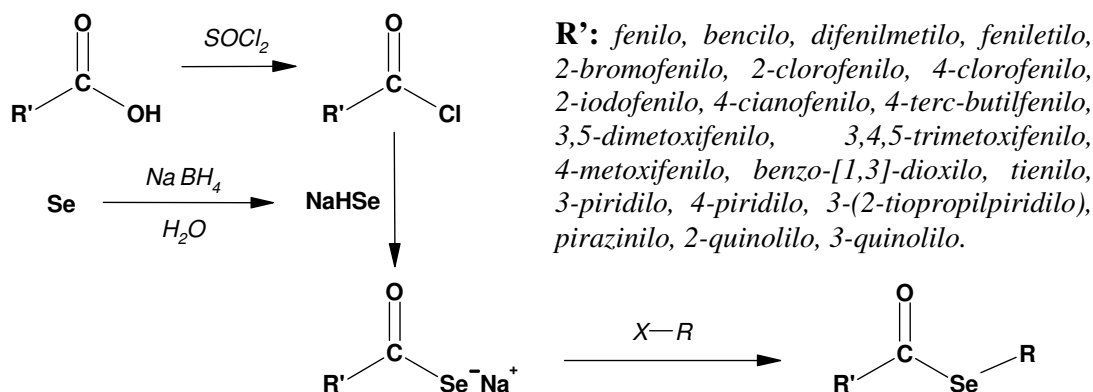
Tabla 6.1b: Series desarrolladas en función del sustituyente R.

Serie	R	Serie	R
IV.A - Selenoésteres de metiloxicarbonilmetilo		IV.B - Selenoésteres de terc-butiloxicarbonilmetilo	
IV.C - Selenoésteres de feniloxicarbonilmetilo		IV.D - Selenoésteres de metiloxicarboniletilo	
V.A - Selenoésteres de 2-oxopropilo		V.B - Selenoésteres de 3,3-dimetil-2-oxobutilo	
VI.A - Selenoésteres de metilo		VI.B - Diselenoésteres de dimetilo	

2. ESQUEMAS GENERALES DE SÍNTESIS

Método Sintético General

Series I.A-D, II, IV.B-C, V, VI.A-B.

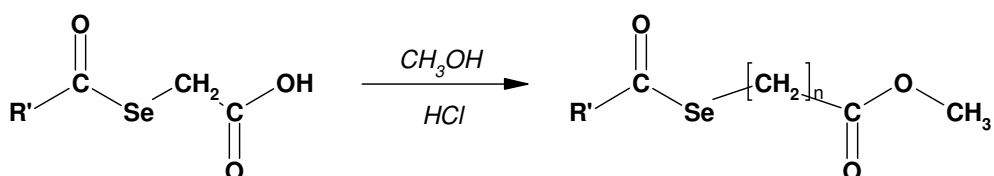


R: *Dependiente de la serie. Ver Método Sintético (Tabla 6.1).*

Otros Métodos de Síntesis

Selenoésteres de metiloxycarbonilmetilo y 2-metiloxycarboniletilo

Series IV.A y IV.D.



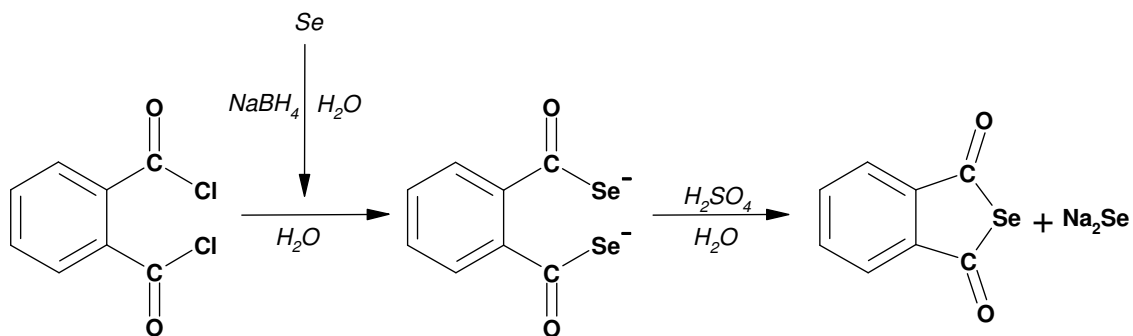
R': *Bencilo, fenilo, 2-clorofenilo, 4-clorofenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, tienilo.*

n: 1 (IV.A), 2 (IV.D).

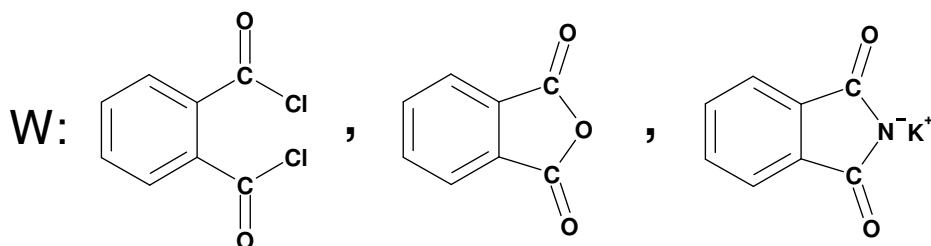
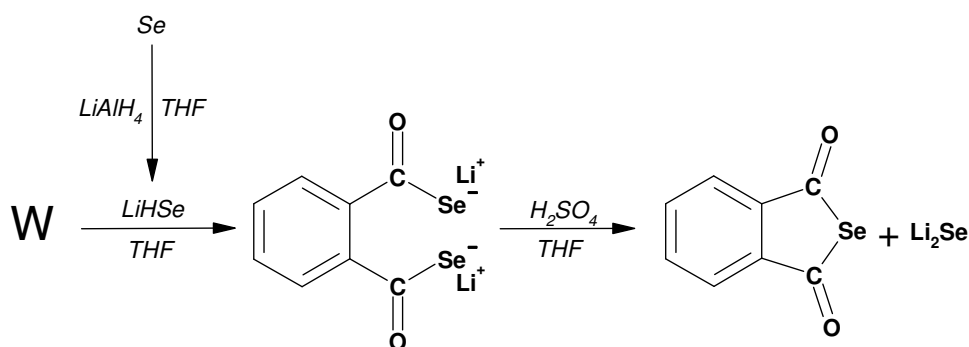
Selenoanhídridos

Serie III

I) Reacción con Borohidruro de Sodio



II) Reacción con Hidruro de Litio y Aluminio



3. MÉTODOS SINTÉTICOS

Método Sintético General

Series I.A-D, II, IV.B-C, V, VI.A-B.

La mayoría de los compuestos presentados en este trabajo de investigación pueden sintetizarse a partir de ácidos carboxílicos siguiendo una ruta sintética general de cuatro etapas realizadas sin purificar ni identificar los productos intermedios, tal y como se representa en la *Figura 6.1*.

En aquellos casos en los cuales el correspondiente cloruro de ácido es comercial se prescinde de la primera etapa de la síntesis por no ser necesaria.

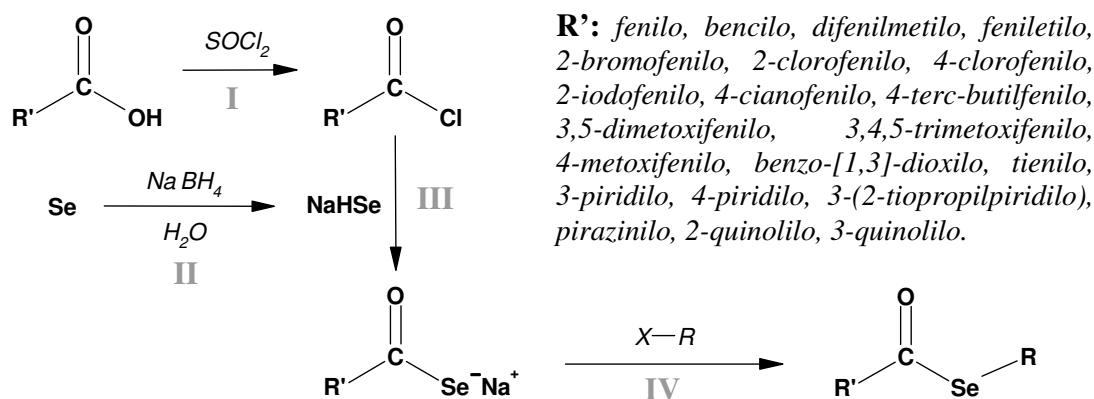


Figura 6.1: Esquema general de síntesis de los selenoésteres.

El halogenuro de alquilo utilizado en la última etapa de la síntesis proporciona al selenoéster final el sustituyente *R* que definirá la serie en la cual se encuadra cada molécula.

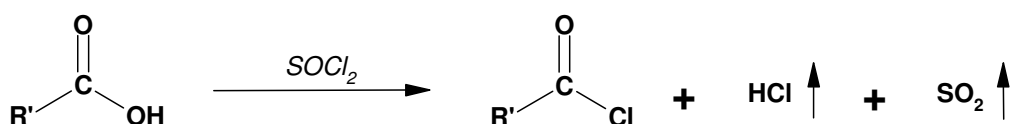
En la *Tabla 6.2*, mostrada en la siguiente página, se listan los diversos *R* y *X* de los halogenuros de alquilo con los cuales se ha trabajado; así como el número de compuestos incluidos en cada serie. Aquellos selenoderivados cuyo procedimiento sintético difiere del expuesto en la *Figura 6.1* se marcan con un asterisco en la columna de la *Tabla 6.2* referida al halógeno presente en el halogenuro de alquilo.

Al ser mínimas las diferencias entre los mecanismos de las rutas sintéticas que llevan a los compuestos de las distintas series citadas en la *Tabla 6.2* por cambiar únicamente el halogenuro de alquilo empleado, a continuación se expone como ejemplo extrapolable a los selenoésteres de las restantes series el mecanismo propuesto para explicar la formación de un selenoéster de carboximetilo genérico (*Serie I.A*) a través de cuatro pasos.

Tabla 6.2: Series desarrolladas en función del sustituyente R (S. = Selenoésteres).

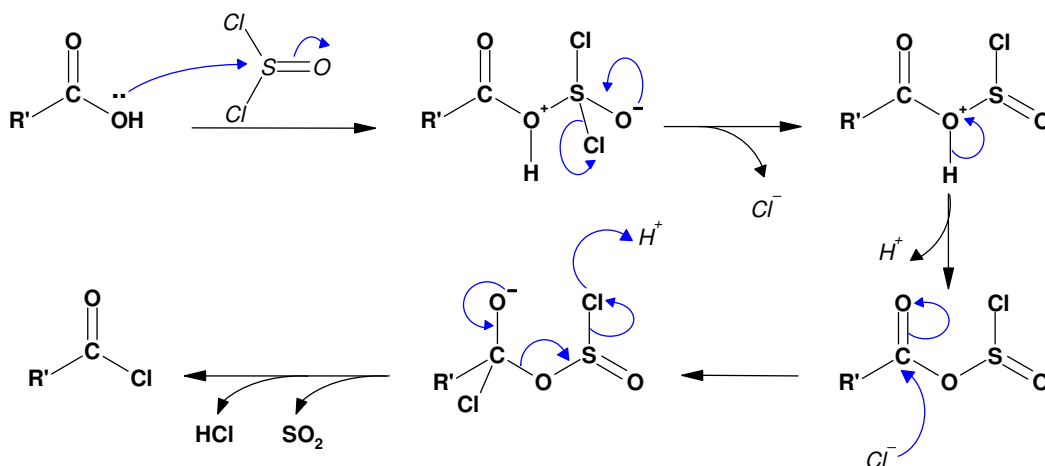
Serie	Compuestos	R	X	Nº C.
I.A-B	Selenoésteres de carboximetilo	Carboximetilo	-Br	17
I.C	Selenoésteres de 1-carboxietilo	1-Carboxietilo	-Br	1
I.C	Selenoésteres de 2-carboxietilo	2-Carboxietilo	-Br	1
I.D	S. de carboxifenilmetilo	Carboxifenilmetilo	-Br	1
II	S. de carbamoilmetilo	Carbamoilmetilo	-Cl	4
III	Selenoanhídridos	-	*	1
IV.A	S. de metiloxicarbonilmetilo	Metiloxicarbonilmetilo	*	7
IV.B	S. de terc-butiloxicarbonilmetilo	Terc-butiloxicarbonilmetilo	-Br	4
IV.C	S. de feniloxicarbonilmetilo	Feniloxicarbonilmetilo	-Br	3
IV.D	S. de 2-metiloxicarboniletilo	2-Metiloxicarboniletilo	*	1
V.A	Selenoésteres de acilpropilo	2-Oxopropilo	-Cl	1
V.B	Selenoésteres de acilbutilo	3,3-Dimetil-2-oxobutilo	-Cl	2
VI.A	Selenoésteres de metilo	Metilo	-I	4
VI.B	Diselenoésteres de dimetilo	Metilo	-I	4

I. Cloración del ácido carboxílico con cloruro de tionilo



En la primera etapa de la ruta sintética se clora el ácido carboxílico con cloruro de tionilo a reflujo, aislándose así de forma prácticamente cuantitativa el cloruro de ácido que se utilizará como reactivo en la tercera etapa de la síntesis.

El mecanismo propuesto para esta reacción²²⁶ se describe a continuación:



En algunos casos, al formarse en la cloración anterior el hidrocioruro del cloruro de ácido, será necesario suspender el hidrocioruro en cloroformo y tratarlo con la cantidad equivalente de trietilamina para liberar el ácido clorhídrico como paso previo a la adición sobre el seleniuro ácido de sodio. Sin embargo, en otras síntesis, debido a la disponibilidad del cloruro de ácido como reactivo comercial, esta etapa no será necesaria y se podrá iniciar la reacción directamente en la segunda etapa.

II. Formación del agente selenante

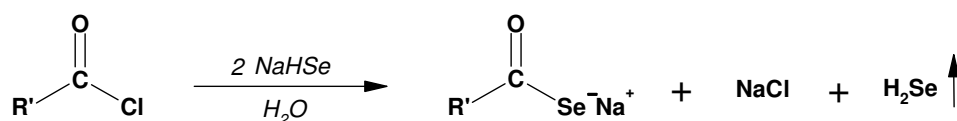


Con esta reacción se obtiene un agente selenante, el seleniuro ácido de sodio, para emplearlo en la selenación del correspondiente cloruro de ácido utilizado en la síntesis. Se sigue una variante de la metodología descrita por Klaymann y Griffin²²⁷, que consiste en hacer reaccionar selenio gris con borohidruro sódico en una proporción molar 1:2 en un medio acuoso. El único cambio significativo introducido en la reacción ha sido la eliminación de la atmósfera de nitrógeno descrita en el artículo al comprobar que no es necesaria para la correcta síntesis de los selenoésteres²¹⁷.

La reacción a temperatura ambiente y presión atmosférica del selenio gris en polvo con borohidruro sódico es extremadamente enérgica y exotérmica; liberándose a la atmósfera hidrógeno y generándose hidroseleniuro ácido de sodio, tal y como determinó Klaymann a partir de las constantes de acidez del HSe⁻ y del H₂Se y del pH de la disolución: observó que se obtiene el primero en un porcentaje cercano al 100%.

Con el fin de evitar un sobrecalentamiento del medio de reacción o una reacción explosiva, el borohidruro ha de adicionarse en pequeñas porciones, esperando a que finalice el desprendimiento de gases antes de añadir la siguiente porción. Una vez terminada la reacción, el producto se emplea en la siguiente reacción sin realizar ninguna purificación.

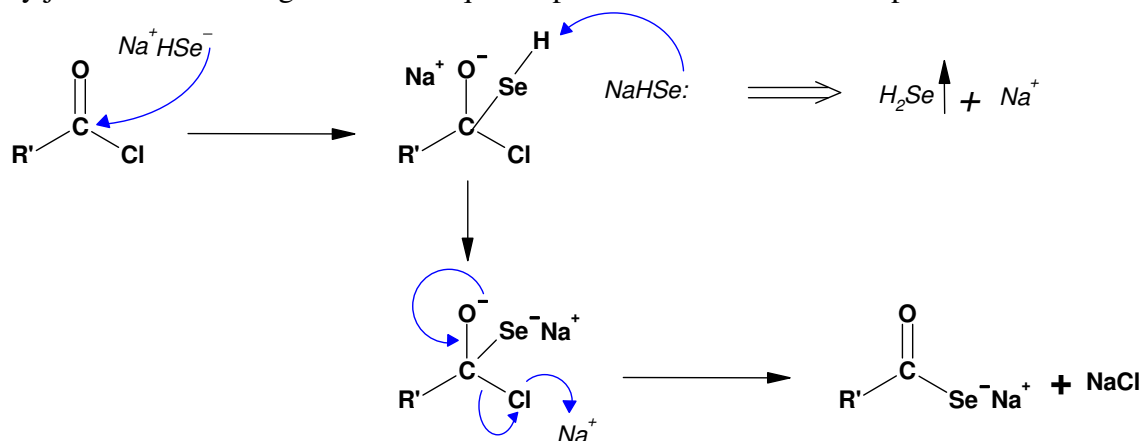
III. Formación del arilcarbonilseleniuro a partir del cloruro de ácido



Tanto esta etapa como la siguiente han sido descritas por Filgueiras de Athayde-Filho²²⁸. Se observa que se produce antes la reacción de selenación que la hidrólisis del cloruro de ácido. La explicación a este hecho podría deberse a que las especies intermedias de selenio formadas tienen un mayor poder nucleófilo que el agua. En consecuencia, se procede añadiendo el cloruro de ácido sobre la disolución de seleniuro ácido de sodio obtenida en la etapa anterior siempre y cuando el cloruro sea soluble en agua. Si no, se adiciona disuelto en 20 mL de cloroformo para evitar la hidrólisis.

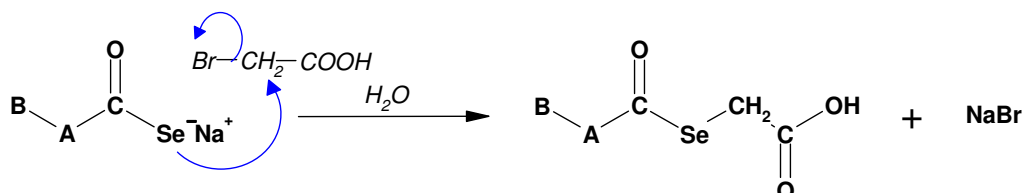
Se deja reaccionar durante una hora con agitación magnética, manteniendo la temperatura entre 40-50 °C para favorecer el proceso y evitar que una baja temperatura ambiental disminuya sensiblemente el rendimiento. Al término de la hora se filtra la

suspensión resultante con el fin de retirar el precipitado de sales bóricas formado. Es posible que el mecanismo de reacción curse a través de una sustitución nucleófila en el acilo en la cual el agente nucleófilo sería el seleniuro ácido de sodio. La formación de ácido selenhídrico y su posterior desprendimiento a la atmósfera apoyaría el mecanismo y justificaría el desagradable olor que desprende la reacción en este paso.



IV. Ataque nucleófilo del arilcarbonilseleniuro sobre ácido bromoacético

En la última etapa se adiciona ácido bromoacético sobre el filtrado del medio de reacción del paso anterior. A temperatura ambiente la reacción es muy rápida: en pocos segundos se forma un precipitado y en diez minutos se puede dar por concluida la reacción cuando el haluro de alquilo empleado es primario. En series en las cuales se emplean haluros secundarios (*Series I.C-D*) el tiempo de reacción es sensiblemente mayor. Se propone como mecanismo una sustitución nucleófila de orden 2 (SN2) cuyo agente nucleófilo es el seleniuro obtenido en la etapa previa.



Otros Métodos Sintéticos

Selenoésteres de metiloxycarbonilmetilo y 2-metiloxycarboniletilo

Series IV.A y IV.D.

Los ésteres metílicos de los selenoésteres de carboximetilo (*Serie I.A*) se preparan a partir de dichos ácidos por esterificación de Fischer-Speier utilizando ácido clorhídrico como catalizador y metanol como reactivo y como disolvente.

La síntesis de los ésteres metílicos consta entonces de cinco etapas, mostradas en la *Figura 6.2*. Las cuatro primeras serían las descritas en el procedimiento sintético general, las cuales llevan a la obtención del selenoéster de carboximetilo o carboxietilo utilizado como reactivo en la reacción de esterificación.

En este apartado se propone un mecanismo para la quinta etapa de la ruta sintética: la esterificación final. El mecanismo se aplica, por simplificar, a los selenoésteres de metiloxycarbonilmetilo (*Serie IV.A*). El mismo mecanismo, con las modificaciones necesarias en las estructuras, sería aplicable a los selenoésteres de 2-metiloxycarboniletilo (*Serie IV.D*).

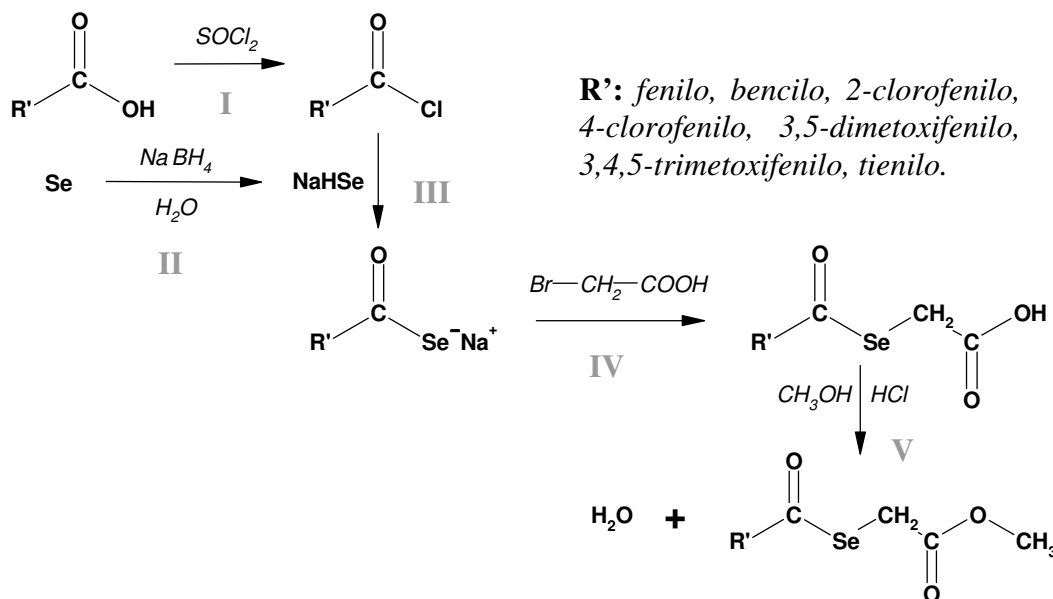
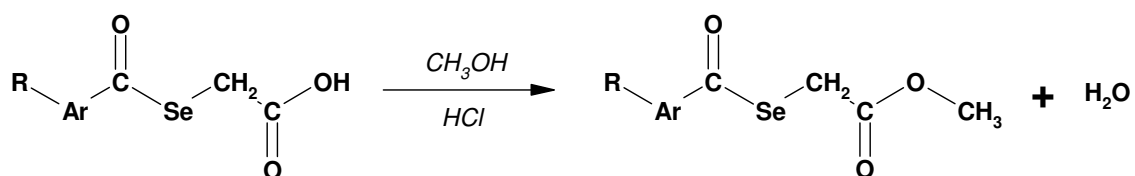


Figura 6.2: Esquema general de síntesis de los selenoésteres de las Series IV.A y IV.D.

Al aplicar esta vía sintética a los selenoésteres de *terc*-butiloxycarbonilmetilo (*Serie IV.B*) y feniloxycarbonilmetilo (*Serie IV.C*) no tiene lugar la esterificación final o el rendimiento de la misma impide la obtención de una cantidad de compuesto suficiente para proceder a su purificación, caracterización instrumental y evaluación biológica. Por lo tanto, para sintetizar dichos selenoésteres se utiliza el procedimiento general, pero empleando bromoacetato de *terc*-butilo y bromoacetato de fenilo, respectivamente, en lugar de ácido bromoacético.

Esterificación de un selenoéster de carboximetilo con catálisis ácida:

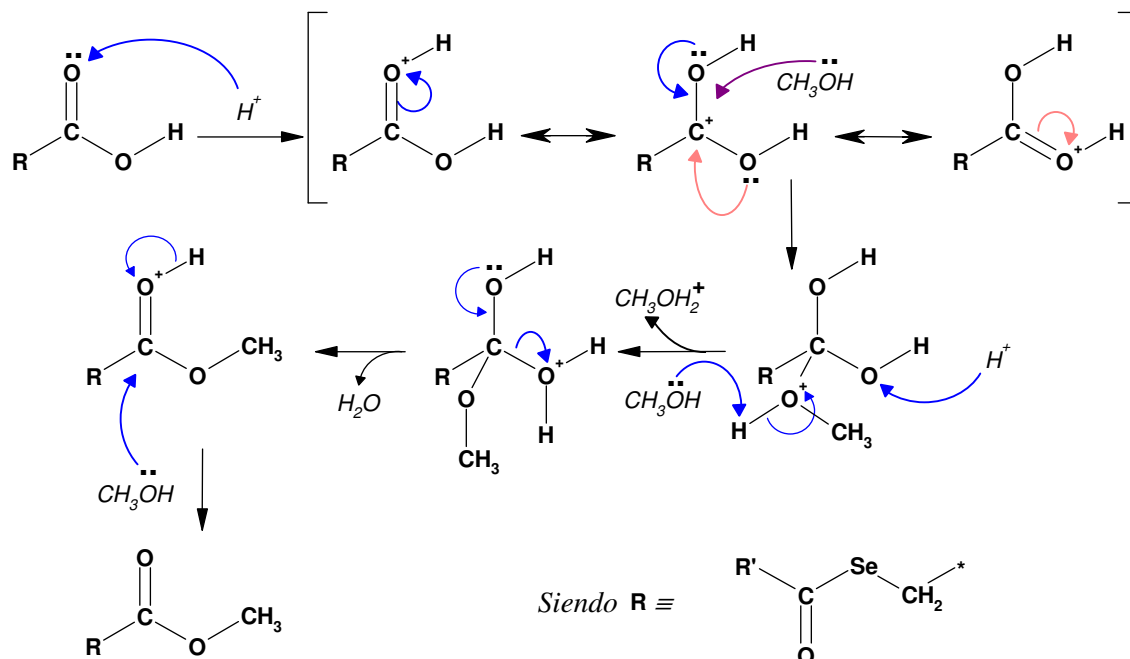


Para obtener los selenoésteres de metiloxycarbonilmetilo se hace reaccionar durante cuatro horas el correspondiente selenoéster de carboximetilo con metanol en exceso y a reflujo en presencia de ácido clorhídrico como catalizador, siguiendo el procedimiento de la esterificación de Fischer-Speier.

Tras la reacción el éster se aísla por extracción con disolventes halogenados, previa adición de agua para facilitar la separación de las fases.

En una esterificación clásica se utiliza ácido sulfúrico como catalizador para retirar el agua formada en el proceso, gracias a su higroscopicidad. No obstante, se ha preferido emplear ácido clorhídrico en vez de ácido sulfúrico para evitar que este último pueda oxidar o hidrolizar el átomo de selenio presente en la molécula.

En el mecanismo propuesto para esta reacción²²⁹ es el siguiente:



Selenoanhídridos

Serie III

El selenoanhídrido sintetizado se ha obtenido partiendo de diferentes derivados de ácido; por mono y diselenación previa con HSe^- preparado *in situ* bien mediante la reacción previamente estudiada, o bien empleando un reductor más potente, como el hidruro de aluminio y litio. Una vez mono o diselenado el derivado carboxílico difuncionalizado, se deshidrata con ácido sulfúrico para obtener el anhídrido de selenio.

La ruta sintética efectuada empleando borohidruro sódico (NaBH_4) consta de las tres etapas mostradas en la *Figura 6.3*. La vía sintética en la cual el agente reductor es el hidruro de aluminio y litio (LiAlH_4) da una mayor versatilidad al poder emplear otros reactivos diferentes del cloruro de ftaloílo, como, por ejemplo, el anhídrido ftálico y la N-hidroxiftalimida. El rendimiento, a igual reactivo de partida, es mayor si se emplea como agente reductor hidruro de aluminio y litio que borohidruro sódico.

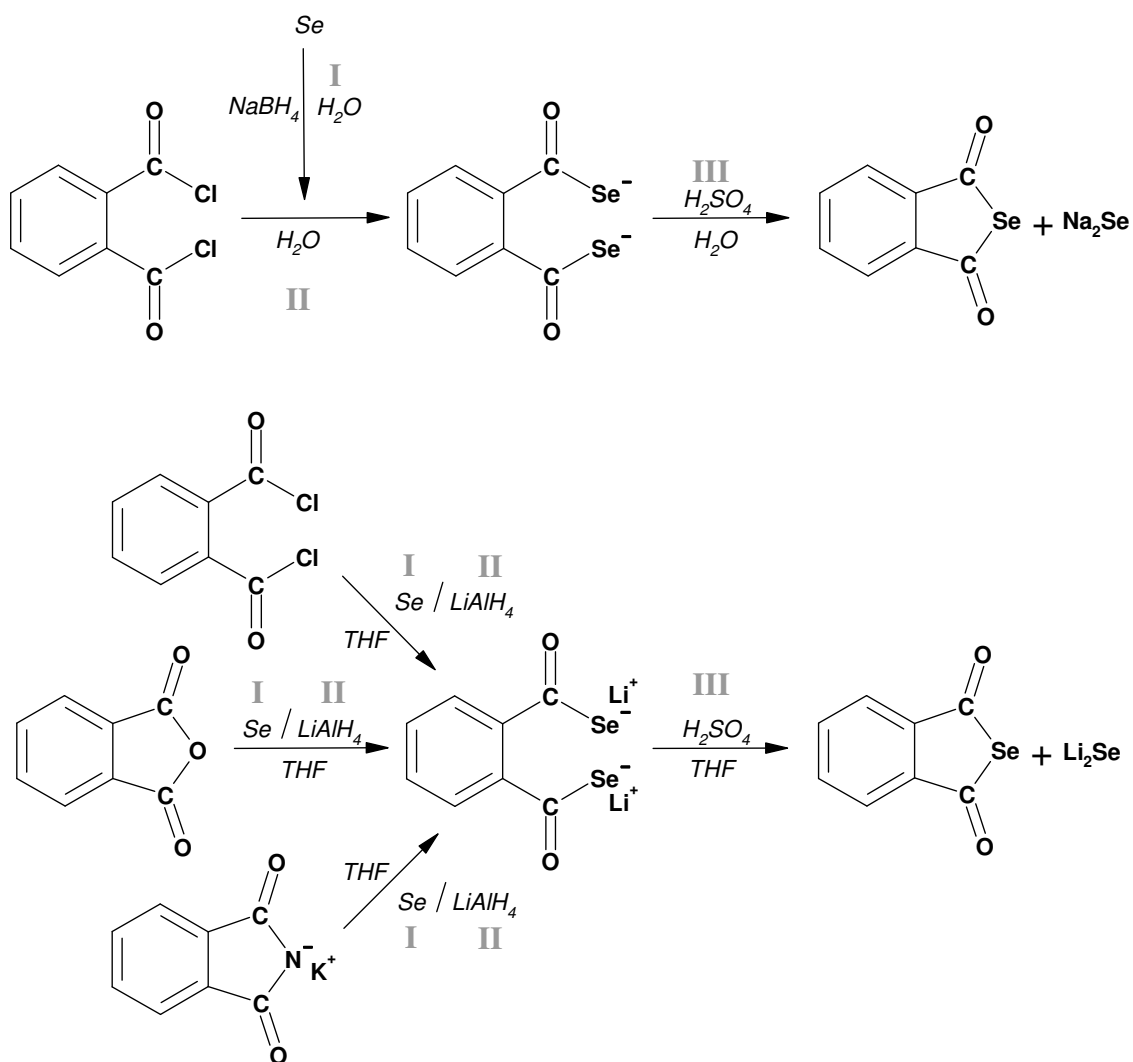


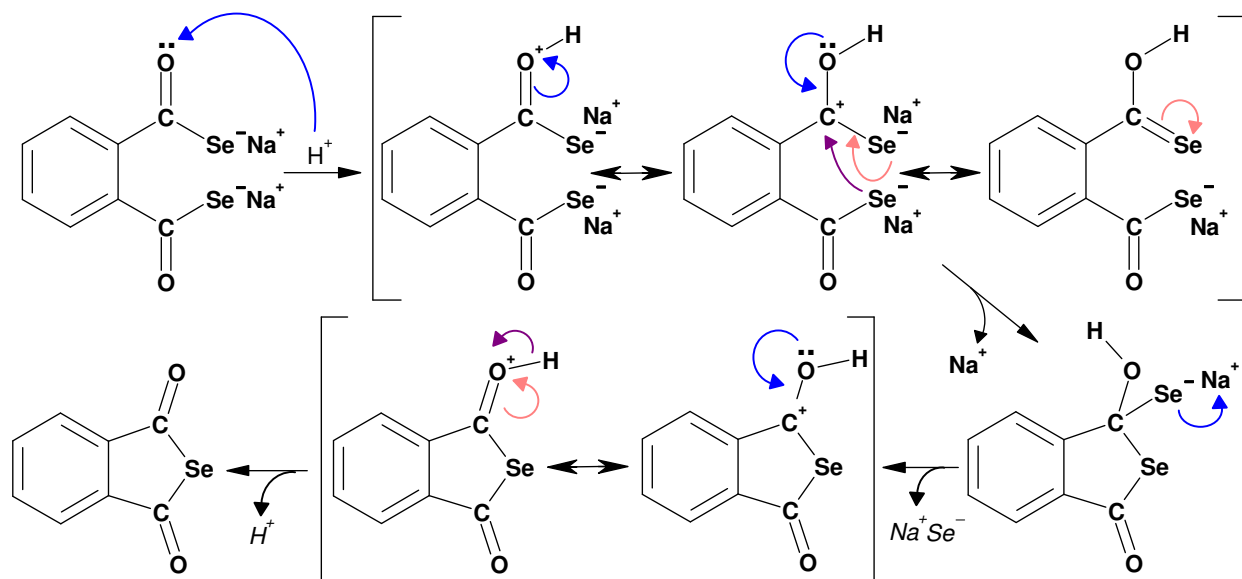
Figura 6.3: Esquema general de síntesis del selenoanhídrido por diselenación, empleando como agente reductor NaBH₄ (arriba) y LiAlH₄ (abajo).

Reacción de ciclación

La reacción diferencial de las rutas sintéticas de esta serie es la reacción final de ciclación que permite formar el anhídrido cíclico. El producto final puede obtenerse por deshidratación o deshidroselenación, según corresponda, dependiendo de si el ácido sulfúrico se añade sobre un acilseleniuro o sobre un diacildiseleniuro.

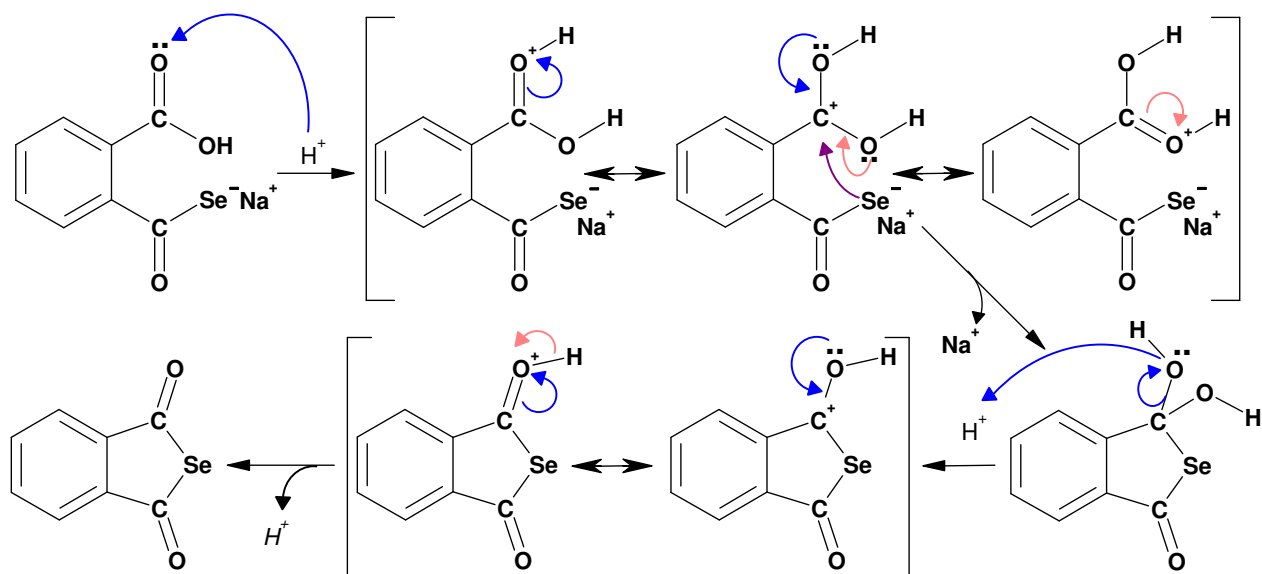
Derivados diselenados

Si se añade selenio y agente reductor en exceso se produce el intermedio diselenado. El mecanismo propuesto a continuación puede explicar la formación del anhídrido de selenio a partir del diacildiseleniuro disódico a través de una reacción intramolecular catalizada por ácido sulfúrico.



Derivados monoselenados

En el caso de que la cantidad adicionada de agente reductor sólo sea suficiente para convertir sólo uno de los cloruros de ácido en el grupo acilseleniuro, un mecanismo de ciclación podría ser el siguiente:



4. PROCESOS SINTÉTICOS

Instrumental Empleado

Las pruebas analíticas efectuadas en la determinación estructural de los compuestos organoselénicos sintetizados en este trabajo de investigación se han llevado a cabo empleando los siguientes instrumentos y materiales:

- Los espectros de infrarrojo se han registrado con un espectrofotómetro FT-IR Nexos Euro de Thermo Nicolet con el programa informático Omnic 6.0, empleando pastillas de bromuro potásico en el análisis de compuestos sólidos y de cloruro sódico en el de compuestos líquidos.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear se han efectuado en un equipo Bruker 400 Ultrashield™ (400 MHz), empleando como disolventes deuterados dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) y cloroformo ($CDCl_3$) deuterados. Se han obtenido los espectros de RMN de protón (1H) y de carbono (^{13}C) de todos los derivados sintetizados, con la salvedad de los espectros de ^{13}C de aquellos selenoésteres en los cuales su inestabilidad en disolución no ha permitido la obtención de espectros lo suficientemente definidos para su interpretación. Cuando se ha considerado necesario para la correcta determinación estructural del compuesto o de la serie o subserie, dependiendo del caso, se han efectuado los espectros bidimensionales (1H - 1H COSY, 1H - 1H NOESY, ^{13}C - 1H HMBC y ^{13}C - 1H HMQC) que han sido necesarios en cada caso. Asimismo, los ensayos de estabilidad se han realizado tomando con este equipo espectros de protón a distintos tiempos y comparando las integraciones de los productos de degradación con las correspondientes a las señales propias del compuesto. Cuando ha sido necesario se han obtenido espectros de protón adicionales previa adición de agua pesada para la determinación de protones intercambiables. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J), en hertzios (Hz).
- Los análisis elementales (C, H, N) se han llevado a cabo en un microanalizador LECO CHN-900, siendo el intervalo de error admitido para los productos finales de un 0,4 % para cada elemento estudiado, obviándose el dato relativo a la determinación de nitrógeno en aquellos selenocompuestos carentes de dicho elemento. Las muestras fueron previamente secadas a presión reducida, primero en oliva y luego en desecador con pentóxido de fósforo.
- Los espectros de masas se han obtenido con un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973N de ionización por impacto electrónico a 70 eV en el cual las muestras se introducen mediante inserción directa por sonda (DIP, MS-DIP). En los espectros se ha indicado el ión molecular (M^{+}) o picos asociados ($M^{+}+1$, $M^{+}+2...$) cuando se han registrado, así como los fragmentos correspondientes a las roturas más

representativas para cada compuesto; expresándose la abundancia de los mismos en función del porcentaje relativo con respecto a la abundancia del fragmento más frecuentemente registrado en cada espectro.

- Las temperaturas de fusión de los compuestos sólidos sintetizados se han determinado empleando un equipo Mettler FP80, y los resultados se expresan en grados centígrados (°C). Para determinar los puntos de fusión se ha realizado un doble experimento con el fin de obtener un dato más fiable. En un primer experimento se programó una velocidad de calentamiento elevada (15 °C/min) para situar el punto de fusión; y en un segundo con una velocidad menor (3 °C/min) en las temperaturas próximas al punto de fusión encontrado en el ensayo anterior.

- Cuando se ha precisado emplear la técnica de la cromatografía en capa fina, se han empleado como fase estacionaria cromatofolios de gel de sílice Macherey-Nagel, Alugram SIL G/UV₂₅₄-818133 de 0,2 mm de espesor. Con el fin de determinar la fase móvil más adecuada en cada caso se han llevado a cabo estudios de desarrollo del correspondiente compuesto en las placas mencionadas con diferentes disolventes y mezclas de los mismos.

- Para preparar el relleno de las cromatografías en columna se ha utilizado sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) de Merck (referencia 1.09385.2500).

Serie I: Selenoésteres de carboxialquilo

Los selenoésteres de carboxialquilo sintetizados en este trabajo se clasifican en cuatro grupos en función de los restos R y R' y sus estructuras pueden consultarse en la *Tabla 6.3*. En un primer grupo se incluyen los compuestos que tienen como resto R' un anillo bencénico, sustituido o no, unido al carbono carbonílico directamente o a través de un espaciador alifático corto. Los productos con un anillo heteroaromático en el sustituyente R' se incluyen en el segundo grupo; mientras que la tercera subdivisión de esta primera serie engloba los selenoésteres de carboxietilo aislados; y la cuarta, al derivado con un resto fenilo en R .

Tabla 6.3a: Estructuras de los selenoésteres de carboxialquilo obtenidos.

I.A Fenil/alquilselenoésteres de carboximetilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
I.A1		I.A2	
I.A3		I.A4	
I.A5		I.A6	
I.A7		I.A8	
I.A9		I.A10	

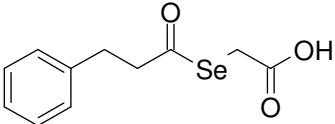
Tabla 6.3b: Estructuras de los selenoésteres de carboxialquilo obtenidos.

I.B Heteroarilselenoésteres de carboximetilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
<i>I.B1</i>		<i>I.B2</i>	
<i>I.B3</i>		<i>I.B4</i>	
<i>I.B5</i>		<i>I.B6</i>	
<i>I.B7</i>			
I.C Selenoésteres de 1/2-carboxietilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
<i>I.C1</i>		<i>I.C2</i>	
I.D Selenoésteres de carboxifenilmetilo			
Ref.	Estructura		
<i>I.D1</i>			

Procesos sintéticos

A continuación se exponen los compuestos englobados en esta primera serie:

3-Fenilpropanoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A1	
Peso Mol.	275,69	
Fórmula Mol.	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Se.1/4H ₂ O	
Punto Fusión	65 - 69 °C	
Aspecto	Sólido amarillo pálido	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,13 g de cloruro de 3-fenilpropanoílo (12,66 mmol; 1,88 mL), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un aceite cuya precipitación se induce por adición de éter-hexano. Al filtrar se aísla un sólido marrón que se recrystaliza de hexano, obteniéndose un sólido amarillo pálido (400 mg, 12 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3426 (d, tensión O-H); 3068, 3029, 3002 (d, tensión C-H aromáticos); 2959, 2934, 2890 (d, tensión C-H alifáticos); 1708 (f, tensión C=O de ácido); 1686 (m, tensión C=O de selenoéster).

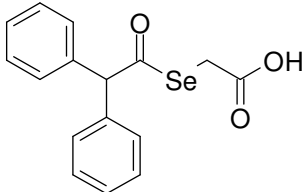
¹H-RMN (¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,03 (s, 4H, ArCH₂CH₂CO); 3,69 (s, 2H, SeCH₂); 7,20-7,26 (m, 3H, 2H₃+H₄); 7,30-7,34 (m, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 2,90 (s, *J* = 7,5 Hz, 2H, ArCH₂CH₂CO); 3,07 (s, 2H, ArCH₂CH₂CO); 3,58 (s, 2H, SeCH₂); 7,18-7,30 (m, 5H, H_{Ar}); 12,61 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,2 (SeCH₂); 31,5 (ArCH₂CH₂); 49,3 (CH₂CH₂CO); 127,0 (C₄); 128,7 (2C₂); 129,1 (2C₃); 139,8 (C₁); 176,9 (COOH); 198,6 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 133 (5), 104 (71), 91 (100), 77 (37), 65 (20), 51 (29)

CHN - C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Se.1/4H ₂ O	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	47,93	4,57
<i>Hallado</i>	48,06	4,07

Difeniletanoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A2	
Peso Mol.	337,76	
Fórmula Mol.	C ₁₆ H ₁₄ O ₃ Se.1/4H ₂ O	
Punto Fusión	127 - 130 °C	
Aspecto	Cristales amarillo-verdosos	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,92 gramos de cloruro de difenilacetilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco anaranjado que se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose cristales amarillo-verdosos (0,687 g, 16 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3406 (d, tensión COO-H); 3052, 3020 (d, tensión C-H aromáticos); 2962, 2896 (d, tensión C-H alifáticos); 1720 (m, tensión C=O de ácido); 1693 (f, tensión C=O de selenoéster).

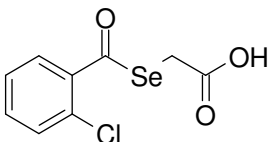
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,68 (s, 2H, SeCH₂); 5,23 (s, 1H, CHCOSe); 7,31-7,40 (m, 10 H, H_{Ar}). DMSO-*d*₆, δ : 3,60 (s, 2H, SeCH₂); 5,59 (s, 1H, CHCOSe); 7,29-7,37 (m, 10 H, H_{Ar}); 12,68 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 26,2 (SeCH₂); 68,4 (Ar₂CH); 128,4 (2C₄); 129,2 (4C₂); 129,7 (4C₃); 137,5 (2C₁); 176,5 (COOH); 200,6 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 337 (M⁺-1, 1), 194 (5), 167 (100), 152 (21), 141 (1), 139 (4), 115 (4), 89 (3), 77 (3), 63 (3), 51 (3).

CHN - C ₁₆ H ₁₄ O ₃ Se.1/4H ₂ O	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	56,90	4,33
<i>Hallado</i>	56,88	4,11

2-Clorobenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A3	
Peso Mol.	277,57	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₇ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	123 - 125 °C	
Aspecto	Sólido acicular blanco-brillante	

Procedimiento Experimental

Se cloran 1,98 gramos de ácido 2-clorobenzoico (12,66 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 2-clorobenzoylo sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 g de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido grumoso anaranjado que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido acicular blanco brillante (1,442 g, 41 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3356 (d, tensión COO-H libre); 3300-2200 (m, tensión COO-H asociada); 3071, 3001 (m, tensión C-H aromáticos); 2962, 2892, 2834 (m, tensión C-H alifáticos); 1707 (f, tensión C=O de ácido); 1681 (f, tensión C=O de selenoéster).

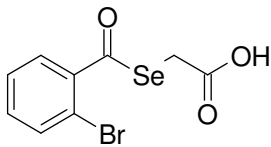
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,89 (s, 2H, SeCH₂); 7,37-7,43 (m, 1H, H₅); 7,49-7,50 (m, 2H, H₄+H₃); 7,76-7,79 (m, 1H, H₆). DMSO-*d*₆, δ : 3,83 (s, 2H, SeCH₂); 7,52-7,56 (m, 1H, H₅); 7,63-7,65 (m, 2H, H₄+H₃); 7,79 (d, 1H, H₆), 12,85 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 26,7 (SeCH₂); 127,4 (C₅); 129,9 (C₃); 131,0 (C₂); 131,7 (C₆); 133,6 (C₄); 137,7 (C₁); 176,3 (COOH); 191,9 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 139/141 (100/34 (Cl), 111/113 (55/14 (Cl), 85/87 (7/3), 75 (51), 50 (35).

CHN - C ₉ H ₇ ClO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	38,95	2,54
<i>Hallado</i>	38,97	2,52

2-Bromobenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A4	
Peso Mol.	322,02	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₇ BrO ₃ Se	
Punto Fusión	124 - 128 °C	
Aspecto	Sólido acicular blanco-rosáceo	

Procedimiento Experimental

Se cloran 2,54 gramos de ácido 2-bromobenzoico (12,66 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 2-bromobenzoílo sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 g de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido pulverulento rojizo que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido acicular blanco-rosáceo (1,318 g, 32 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3347 (d, tensión COO-H libre); 3300-2200 (m, tensión COO-H asociada); 3072, 3006 (f, tensión C-H aromáticos); 2942, 2890 (f, tensión C-H alifáticos); 1703 (f, tensión C=O de ácido); 1684 (f, tensión C=O de selenoéster).

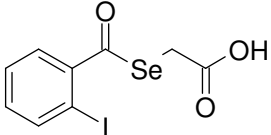
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,89 (s, 2H, SeCH₂); 7,40 (td, $J_{5-6} = 1,8$ Hz, $J_{5-4} = 7,5$ Hz, $J_{5-3} = 8,9$ Hz, 1H, H₅); 7,44 (td, $J_{4-3} = 1,4$ Hz, $J_{4-6} = 7,6$ Hz, 1H, H₄); 7,70 (dd, 1H, H₃); 7,72 (dd, 1H, H₆). **DMSO-*d*₆**, δ : 3,83 (s, 2H, SeCH₂); 7,52-7,60 (m, 2H, H₄+H₅); 7,75 (dd, 1H, H₃); 7,79 (dd, 1H, H₆), 12,85 (Sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 26,8 (SeCH₂); 118,7 (C₂); 127,9 (C₅); 129,8 (C₆); 133,5 (C₆); 135,0 (C₃); 139,9 (C₁); 176,2 (COOH); 193,1 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 183/185 (100/97, Br), 155/157 (34/33, Br), 121 (13), 104 (4), 76 (35), 50 (29).

CHN - C ₉ H ₇ BrO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	33,57	2,19
<i>Hallado</i>	33,14	2,02

2-Yodobenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A5	
Peso Mol.	369,02	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₇ IO ₃ Se	
Punto Fusión	105 - 108 °C	
Aspecto	Cristales amarillos-rojizos	

Procedimiento Experimental

Se cloran 4,02 gramos de ácido 2-yodobenzoico (16,22 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adicionan lentamente y con agitación 1,28 g de borohidruro sódico (36,75 mmol) sobre una suspensión de 1,28 g de selenio gris (16,22 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 2-yodobenzoylo sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,25 g de ácido bromoacético (16,22 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido rojizo que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose cristales amarillos-rojizos (185 mg, 3 % de rendimiento).

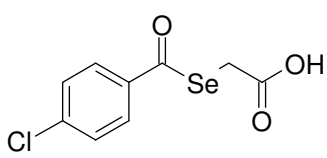
IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3337 (d, tensión COO-H libre); 3200-2300 (m, tensión COO-H asociada); 3065, 3006 (m, tensión C-H aromáticos); 2943, 2898 (m, tensión C-H alifáticos); 1702 (f, tensión C=O de ácido); 1677 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,90 (s, 2H, SeCH₂); 7,23 (dt, $J_{5-3} = 1,5$ Hz, $J_{5-6} = 7,9$ Hz, $J_{5-4} = 7,7$, 1H, H₅); 7,48 (dt, $J_{4-6} = 0,4$ Hz, $J_{4-3} = 7,7$ Hz, 1H, H₄); 7,69 (dd, 1H, H₃); 8,00 (dd, 1H, H₆).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 231 (100), 203 (28), 121 (6), 104 (5), 93 (7), 76 (33), 65 (17), 50 (20).

CHN - C ₉ H ₇ IO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	29,29	1,91
<i>Hallado</i>	29,14	1,92

4-Clorobenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A6	
Peso Mol.	277,57	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₇ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	135 °C, FD	
Aspecto	Sólido acicular blanco brillante	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 1,28 g de borohidruro sódico (31,20 mmol) sobre una suspensión de 1,28 g de selenio gris (15,00 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,63 gramos (1,92 mL) de cloruro de 4-clorobenzóilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,08 gramos de ácido bromoacético (15,00 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido rosáceo que se recristaliza de tolueno, obteniéndose un sólido acicular blanco brillante (0,606 g, 15 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3347 (d, tensión COO-H libre); 3330-2300 (f, tensión COO-H asociada); 3097, 3026 (f, tensión C-H aromáticos); 2957, 2904 (f, tensión C-H alifáticos); 1697 (f, tensión C=O de ácido); 1686 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,88 (s, 2H, SeCH₂); 7,47 (d, $J_{3-2} = 8,4$ Hz, 2H, 2H₃); 7,85 (d, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,81 (s, 2H, SeCH₂); 7,66 (d, $J_{3-2} = 8,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,91 (d, 2H, 2H₂); 12,89 (sa, 1H, COOH).

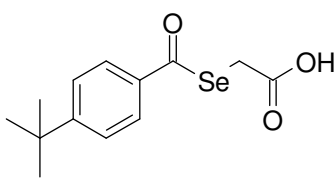
¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,5 (SeCH₂); 129,1 (2C₂); 129,8 (2C₃); 136,5 (C₄); 141,2 (C₁); 176,5 (COOH); 191,5 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 257/258/259/260/261/263/265 (3/3/8/1/14/7/1, Se, Cl*), 139/141 (100/37, Cl), 111/113 (30/10, Cl), 93 (2), 85/87 (2/1, Cl), 75 (19), 50 (6).

*Cálculo abundancias teóricas Se-Cl para fragmento *m/z* = 261: 2/2/7/1/14/6/1

CHN - C ₉ H ₇ ClO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	38,95	2,54
<i>Hallado</i>	38,70	2,43

4-Terc-butilbenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A7	
Peso Mol.	299,23	
Fórmula Mol.	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ Se	
Punto Fusión	99 - 103 °C FD	
Aspecto	Sólido terroso	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,49 gramos (2,30 mL) de cloruro de 4-tercbutilbenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco anaranjado que se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido terroso (0,736 g, 19 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3100-2700 (d, tensión COO-H); 3058, 3032 (d, tensión C-H aromáticos); 2964, 2930, 2899, 2865 (m, tensión C-H alifáticos); 1715 (f, tensión C=O de ácido); 1666 (f, tensión C=O de selenoéster).

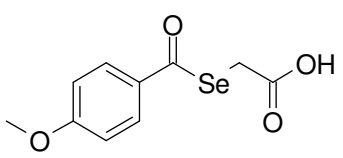
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,36 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,85 (s, 2H, SeCH₂); 7,51 (d, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 7,86 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 1,31 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,79 (s, 2H, SeCH₂); 7,60 (d, $J_{3-2} = 8,4$ Hz, 2H, 2H₃); 7,83 (d, 2H, 2H₂); 12,74 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,1 (SeCH₂); 31,4 (C(CH₃)₃); 35,7 (C(CH₃)₃); 126,4 (2C₃); 127,8 (C₁); 135,6 (2C₂); 158,5 (C₄); 176,6 (COOH); 192,2 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 299 (M⁺-1, 1), 163 (100), 161 (79), 146 (8), 135 (24), 118 (10), 105 (5), 103 (5), 91 (25), 77(9), 65 (3), 51 (3).

CHN - C ₁₃ H ₁₆ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	52,18	5,39
<i>Hallado</i>	52,04	5,31

4-Metoxibenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A8	
Peso Mol.	273,15	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ Se	
Punto Fusión	104 – 107 °C FD	
Aspecto	Cristales aciculares amarillo-rojizos	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 7,00 mL de una disolución 1,00 M de hidruro de litio y aluminio (7,00 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de tetrahidrofurano anhidro, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,16 gramos de cloruro de 4-metoxibenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos; entonces se vierte la disolución resultante, previa filtración, sobre ½ kg de hielo y se deja precipitar. Se forma un sólido pastoso que se filtra, se lava con agua (3×15 mL) y se seca, aislándose un sólido blanco rosáceo que se recrystaliza de una mezcla CCl₄/CHCl₃ 2:1, obteniéndose cristales aciculares amarillo rojizos (0,556 g, 16 % de rendimiento).

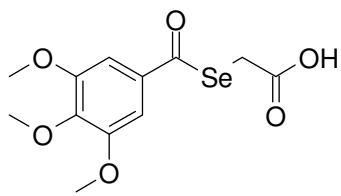
IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3030 (d, tensión C-H aromáticos); 2977, 2950, 2834 (d, tensión C-H alifáticos); 1707 (d, tensión C=O de ácido); 1692 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,83 (s, 2H, SeCH₂); 3,91 (s, 3H, OCH₃); 6,97 (d, $J_{3-2} = 9,0$ Hz, 2H, 2H₃); 7,90 (d, 2H, 2H₂).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 272 (M⁺-2, 1), 135 (100), 121 (5), 107 (10), 92 (13), 77 (15), 63 (7).

CHN - C ₁₀ H ₁₀ O ₄ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	43,97	3,69
Hallado	43,49	3,52

3,4,5-Trimetoxibenzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A9	
Peso Mol.	333,20	
Fórmula Mol.	C ₁₂ H ₁₄ O ₆ Se	
Punto Fusión	107 – 110 °C	
Aspecto	Sólido acicular amarillo pálido	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,68 g de borohidruro sódico (18,00 mmol) sobre una suspensión de 0,68 g de selenio gris (8,67 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,00 gramos de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoílo (8,67 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,20 gramos de ácido bromoacético (8,67 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco rosáceo que se recristaliza de etanol, obteniéndose un sólido acicular amarillo pálido (392 mg, 14 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3100-2400 (m, tensión COO-H); 3002 (m, tensión C-H aromáticos); 2948, 2837 (m, tensión C-H alifáticos); 1707 (f, tensión C=O de ácido); 1677 (f, tensión C=O de selenoéster).

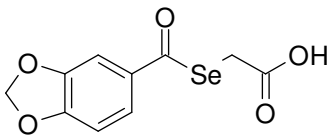
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,86 (s, 2H, SeCH₂); 3,94 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,95 (s, 3H, *p*-OCH₃); 7,16 (s, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,77 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,79 (s, 2H, SeCH₂); 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,14 (s, 2H, 2H₂); 12,79 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,6 (SeCH₂); 56,8 (*m*-OCH₃), 61,4 (*p*-OCH₃), 105,2 (2C₂); 133,3 (C₁); 143,8 (C₄); 153,8 (2C₃); 176,5 (COOH); 191,6 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 195 (100), 169 (18), 152 (22), 141 (50), 139 (18), 137 (17), 126 (15), 124 (10), 122 (11), 111 (29), 109 (27), 93 (31), 81 (28), 66 (38), 53 (28).

CHN - C ₁₂ H ₁₄ O ₆ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	43,26	4,24
<i>Hallado</i>	43,32	3,97

3,4-Metilendioxi-benzoselenoato de carboximetilo

Referencia	I.A10	
Peso Mol.	287,13	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₈ O ₅ Se	
Punto Fusión	139 – 140 °C	
Aspecto	Sólido blanco - rosáceo	

Procedimiento Experimental

Se cloran 3,33 gramos de ácido 3,4-metilendioxi-benzoico (20,00 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adicionan lentamente y con agitación 1,58 g de borohidruro sódico (41,80 mmol) sobre una suspensión de 1,58 g de selenio gris (20,00 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 3,4-metilendioxi-benzoselenoato sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,78 gramos de ácido bromoacético (20,00 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido de aspecto térreo que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco-rosáceo (2,681 g, 47 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3439 (d, tensión COO-H); 3020 (d, tensión C-H aromáticos); 2916 (d, tensión C-H alifáticos); 1701 (f, tensión C=O de ácido); 1675 (f, tensión C=O de selenoéster).

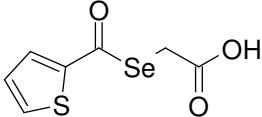
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,76 (d, $J_{\text{SeCH-6}} = 3,7$ Hz, 2H, SeCH₂); 6,18 (d, $J_{\text{OCH-5}} = 3,7$ Hz, 2H, OCH₂O); 7,09 (ddd, $J_{5-2} = 0,9$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, 1H, H₅); 7,34 (dd, $J_{2-6} = 2,9$ Hz, 1H, H₂); 7,55 (ddd, 1H, H₆); 12,79 (b s, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,3 (SeCH₂); 102,7 (OCH₂O); 107,4 (C₂); 108,8 (C₅); 124,7 (C₆); 132,6 (C₁); 148,8 (C₃); 153,2 (C₄); 176,5 (COOH); 190,5 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 149 (100), 121 (25), 91 (9), 65 (25), 63 (23).

CHN - C ₁₀ H ₈ O ₅ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	41,83	2,81
Hallado	41,56	2,67

2-Tiofencarbosenolato de carboximetilo

Referencia	I.B1	
Peso Mol.	249,15	
Fórmula Mol.	C ₇ H ₆ O ₃ SSe	
Punto Fusión	82 – 84 °C	
Aspecto	Sólido blanco	

Procedimiento experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,86 gramos (1,35 mL) de cloruro de 2-tiofencarbonilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 g de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite naranja inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; aislándose un aceite que al enfriar forma un precipitado que al filtrar y secar rinde un sólido blanco rojizo. Al recrystalizarlo en tetracloruro de carbono, se obtiene un sólido blanco (1,034 g, 33 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3300-2300 (f, tensión COO-H); 3103, 3071 (f, tensión C-H aromáticos); 2996, 2910, 2703, 2583 (f, tensión C-H alifáticos); 1712 (f, tensión C=O de ácido); 1642 (f, tensión C=O de selenoéster).

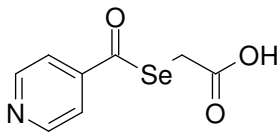
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,87 (s, 2H, SeCH₂); 7,17 (dd, $J_{4-5} = 3,9$ Hz, $J_{4-3} = 4,9$ Hz, 1H, H₄), 7,75 (dd, $J_{5-3} = 1,1$ Hz, 1H, H₅); 7,84 (dd, 1H, H₃); 10,75 (s1, 1H COOH). DMSO-*d*₆, δ : 3,80 (s, 2H, SeCH₂); 7,30 (dd, $J_{4-5} = 3,9$ Hz, $J_{4-3} = 4,9$ Hz, 1H, H₄), 8,02 (dd, $J_{5-3} = 1,1$ Hz, 1H, H₅); 8,16 (dd, 1H, H₃); 12,82 (b s, 1H COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,4 (SeCH₂); 128,6 (C₄); 132,6 (C₅); 134,7 (C₃); 142,7 (C₂); 176,5 (COOH), 182,8 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 250 (M⁺, 1), 222 (1), 111 (100), 93 (5), 83 (13), 57 (13).

CHN - C ₇ H ₆ O ₃ SSe	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	33,75	2,43
<i>Hallado</i>	33,45	2,54

4-Piridincarboselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B2	
Peso Mol.	244,11	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₇ NO ₃ Se	
Punto Fusión	119 - 121°C FD	
Aspecto	Cristales blanco amarillentos	

Procedimiento Experimental

Se tratan 2,25 g del hidrocloreto del cloruro de 4-piridincarbonilo (12,66 mmol) suspendido en 30 mL de cloroformo con 1,28 gramos (1,76 mL) de trietilamina (12,66 mmol) durante 20 minutos, para liberar el cloruro de ácido al destruir el hidrocloreto. Paralelamente, se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 4-piridincarbonilo libre, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 g de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido térreo que se recrystaliza de una mezcla cloroformo/acetona 15:1. La precipitación de unos cristales blanco amarillentos se induce por adición de éter/hexano (335 mg, 11 % de rendimiento).

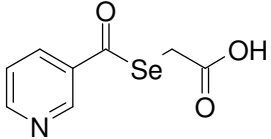
IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3447 (d, tensión COO-H); 3084, 3031 (d, tensión C-H aromáticos); 2990 (d, tensión C-H alifáticos); 1717 (d, tensión C=O de ácido); 1659 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,87 (s, 2H, SeCH₂); 7,78 (td, 2H, 2H₃); 8,85 (td, 2H, 2H₂).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 246 (M⁺ +1, 1), 156 (1), 106 (46), 78 (53), 51 (58), 50 (38).

CHN - C ₈ H ₇ NO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	39,36	2,89	5,74
Hallado	39,39	2,78	5,67

3-Piridincarboselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B3	
Peso Mol.	244,11	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₇ NO ₃ Se	
Punto Fusión	147 – 150 °C, FD	
Aspecto	Sólido pulverulento blanco amarillento	

Procedimiento Experimental

Se tratan 1,78 g del hidrocloreto del cloruro de 3-piridincarbonilo (10,00 mmol) suspendido en 30 mL de tetracloruro de carbono con 1,00 gramos (1,39 mL) de trietilamina (10,00 mmol) durante 20 minutos, para liberar el cloruro de ácido al destruir el hidrocloreto. Paralelamente, se adicionan lentamente y con agitación 0,79 g de borohidruro sódico (20,90 mmol) sobre una suspensión de 0,79 g de selenio gris (10,00 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; cuando se añade el cloruro de 3-piridincarbonilo libre, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,39 gramos de ácido bromoacético (10,00 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido térreo que se recristaliza de metanol, obteniéndose un sólido pulverulento blanco amarillento (364 mg, 15 % de rendimiento).

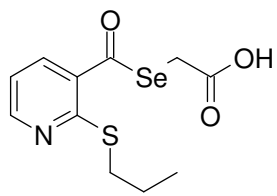
IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3431 (d, tensión COO-H); 3100, 3032 (d, tensión C-H aromáticos); 2988, 2943 (d, tensión C-H alifáticos); 1713 (d, tensión C=O de ácido); 1673 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 3,87 (s, 2H, SeCH₂); 7,61-7,65 (m, 1H, H₅); 8,26-8,30 (m, 1H, H₄); 8,87-8,90 (m, 1H, H₆); 9,02-9,03 (m, 1H, H₂); 12,84 (sa, 1H, COOH).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 239 (11), 106 (65), 105 (53), 78 (63), 51 (33).

CHN - C ₈ H ₇ NO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	39,36	2,89	5,74
Hallado	39,57	2,76	5,63

2-Tiopropil-3-piridincarbonoselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B4	
Peso Mol.	318,26	
Fórmula Mol.	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ SSe	
Punto Fusión	110 – 111 °C	
Aspecto	Cristales brillantes blanco-amarillentos	

Procedimiento Experimental

Se cloran 2,50 gramos de ácido (2-tiopropil)-3-piridincarboxílico (12,66 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de (2-tiopropil)-3-piridincarbonilo sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido pulverulento amarillo que se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose cristales brillantes de un color amarillo pálido (1,440 g, 36 % de rendimiento).

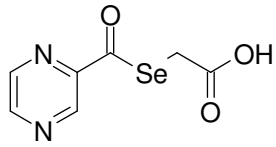
IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3431 (d, tensión COO-H); 3116, 3058 (d, tensión C-H aromáticos); 2966, 2918, 2870 (m, tensión C-H alifáticos); 1700 (m, tensión C=O de ácido); 1668 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 0,97 (ddt, $J_{1CH_3-SCH_2} = 7,2$ Hz, 3H, CH₃); 1,58-1,70 (m, 2H, SCH₂CH₂CH₃); 3,11 (dt, 2H, SCH₂CH₂CH₃); 3,81 (s, 2H: SeCH₂); 7,32 (dd, $J_{5-4} = 4,8$ Hz, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, 1H, H₅); 8,28 (dt, $J_{4-6} = 1,7$ Hz, 1H, H₄); 8,69 (dd, 1H, H₆); 12,89 (b s, 1H, COOH).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 182 (15), 180 (7), 178 (23), 169 (33), 164 (46), 155 (10), 150 (21), 138 (45), 111 (93), 93 (22), 79 (100), 51 (49).

CHN - C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ SSe	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	41,51	4,12	4,40
Hallado	41,28	3,90	4,24

Pirazincarboselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B5	
Peso Mol.	245,10	
Fórmula Mol.	C ₇ H ₆ N ₂ O ₃ Se	
Punto Fusión	139 – 141 °C	
Aspecto	Sólido rojo anaranjado	

Procedimiento Experimental

Se cloran 1,57 gramos de ácido 2-pirazincarboxílico (12,66 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Por obtenerse el cloruro de ácido como hidrocioruro, se suspende en 30 mL de cloroformo y se trata con 1,28 g (1,76 mL) de trietilamina (12,66 mmol) durante 20 minutos, para liberar el cloruro de ácido al destruir el hidrocioruro. Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 2-pirazincarbonilo libre, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 g de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido marrón que se recristaliza de isopropanol, obteniéndose un sólido rojo anaranjado (304 mg, 10 % de rendimiento).

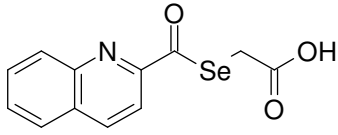
IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3449 (d, tensión COO-H); 3090 (d, tensión C-H aromáticos); 2914, 2834 (d, tensión C-H alifáticos); 1703 (d, tensión C=O de ácido); 1674 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 3,74 (s, 2H, SeCH₂); 8,87 (dd, $J_{6-3} = 1,2$ Hz, $J_{6-5} = 2,4$ Hz, 1H, H₆); 9,05 (dd, $J_{5-3} = 0,2$ Hz, 1H, H₅); 9,06 (dd, 1H, H₃); 12,73 (sa, 1H, COOH).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 247 (M⁺+1, 1), 108 (24), 80 (98), 79 (54), 69 (44), 57 (91), 52 (100).

CHN - C ₇ H ₆ N ₂ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	34,30	2,47	11,43
Hallado	34,18	2,49	11,37

2-Quinolincarboselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B6	
Peso Mol.	294,17	
Fórmula Mol.	C ₁₂ H ₉ NO ₃ Se	
Punto Fusión	131 – 132 °C, FD	
Aspecto	Sólido grumoso blanco	

Procedimiento Experimental

Se cloran 1,98 gramos de ácido 2-quinolincarbocílico (11,4 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Se adicionan lentamente y con agitación 0,90 g de borohidruro sódico (23,8 mmol) sobre una suspensión de 0,90 g de selenio gris (11,4 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 2-quinolincarbonilo sintetizado previamente, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,59 g de ácido bromoacético (11,4 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido pulverulento blanco-rosáceo que se recrystaliza de tolueno, obteniéndose un sólido grumoso blanco (187 mg, 6 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$): 3100-2500 (d, tensión COO-H); 3058, 2994 (m, tensión C-H aromáticos); 2950, 2910 (m, tensión C-H alifáticos); 1714 (f, tensión C=O de ácido); 1690 (f, tensión C=O de selenoéster).

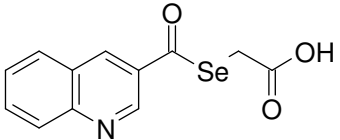
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 3,73 (s, 2H, SeCH₂); 7,82 (t, $J_{7-6} = 7,5$ Hz, $J_{7-8} = 8,0$ Hz, 1H, H₈); 7,94 (t, $J_{6-5} = 8,3$ Hz, 1H, H₇); 7,97 (d, 1H, H₆); 8,15 (d, 1H, H₉); 8,19 (d, $J_{3-4} = 8,4$ Hz, 1H, H₃); 8,66 (d, 1H, H₄); 12,68 (b s, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,8 (SeCH₂); 116,6 (C₃); 129,3 (C₆); 130,3 (C₇); 130,3 (C₉); 131,2 (C₅); 132,2 (C₈); 139,8 (C₄); 147,3 (C₁₀); 152,1 (C₂); 172,3 (COOH), 197,5 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 293 (M⁺-2, 1), 156 (23), 128 (100), 102 (12), 101 (20), 75 (9), 63 (2), 51 (5).

CHN - C ₁₂ H ₉ NO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	49,00	3,08	4,76
Hallado	49,33	3,13	4,75

3-Quinolincarboselenolato de carboximetilo

Referencia	I.B7	
Peso Mol.	294,17	
Fórmula Mol.	C ₁₂ H ₉ NO ₃ Se	
Punto Fusión	187 - 189 °C, FD	
Aspecto	Sólido naranja	

Procedimiento Experimental

Se cloran 0,56 gramos de ácido 3-quinolincarbónico (3,23 mmol) con 20 mL de cloruro de tionilo a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se elimina el SOCl₂ a presión reducida; arrastrándose el cloruro de tionilo residual por adición de tres porciones de 20 mL de tolueno y rotado tras cada adición. Por obtenerse el cloruro de ácido como hidrocloreto, se suspende en 30 mL de cloroformo y se trata con 0,33 g (0,45 mL) de trietilamina (3,23 mmol) durante 20 minutos, para liberar el cloruro de ácido al destruir el hidrocloreto. Se adicionan lentamente y con agitación 0,26 g de borohidruro sódico (6,87 mmol) sobre una suspensión de 0,26 g de selenio gris (3,23 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añade el cloruro de 3-quinolincarbonilo libre, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 0,45 gramos de ácido bromoacético (3,23 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido rojo-anaranjado que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de cloroformo y manteniéndolo 24 h agitando en presencia de carbón activo. Al filtrar, secar el líquido filtrado y eliminar el disolvente se obtiene un sólido naranja (87 mg, 9 % de rendimiento).

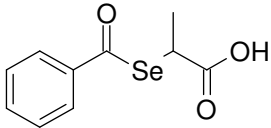
IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3405 (d, tensión COO-H libre); 3103, 3052, 3020 (d, tensión C-H aromáticos); 2960, 2924 (d, tensión C-H alifáticos); 1709 (m, tensión C=O de ácido); 1675 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 3,91 (s, 2H, SeCH₂); 7,77 (t, J_{6-7} = 7,6 Hz, 1H, H₇); 7,98 (t, 1H, H₈); 8,13 (d, J_{5-8} = 8,3 Hz, 1H, H₆); 8,31 (d, 1H, H₉); 9,07 (d, J_{4-2} = 1,8 Hz, 1H, H₄); 9,23 (d, 1H, H₂); 12,75 (bs, 1H, COOH).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 155 (43), 128 (55), 101 (26), 75 (15), 51 (7).

CHN - C ₁₂ H ₉ NO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	49,00	3,08	4,76
Hallado	48,95	3,23	4,66

Benzoselenoato de 1-carboxietilo

Referencia	I.C1	
Peso Mol.	257,15	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Se	
Punto Fusión	59 - 60 °C	
Aspecto	Cristales aciculares blanco-rosáceos	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,78 gramos (1,46 mL) de cloruro de benzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,94 gramos de ácido 2-bromopropiónico (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a 40 °C durante 1 hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco que se purifica por disolución en 60 mL de cloruro de metileno y posterior lavado con agua (3×30 mL). Después de filtrar, eliminar el disolvente y secar a vacío se obtienen cristales aciculares blanco-rosáceos (1,525 g, 47 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$): 3085, 3058, 3015 (d, tensión C-H aromáticos); 2928, 2730, 2629, 2543 (d, tensión C-H alifáticos); 1698 (f, tensión C=O de ácido); 1679 (f, tensión C=O de selenoéster); 1595, 1580, 1449, 1417 (m, tensión C-C aromático).

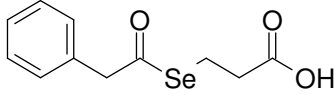
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,76 (d, $J_{CH_3-CH} = 7,2$ Hz, 3H, CHCH₃); 4,41 (q, 1H, SeCHCH₃); 7,50 (tt, $J_{3-2} = 8,2$ Hz, $J_{3-4} = 7,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,55 (tt, $J_{4-2} = 1,3$ Hz, 1H, H₄); 7,90 (dd, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 1,63 (d, $J_{CH_3-CH} = 7,2$ Hz, 3H, CHCH₃); 4,21 (q, 1H, SeCHCH₃); 7,59 (t, $J_{3-2} = 8,1$ Hz, 2H, 2H₃); 7,74 (tt, $J_{4-3} = 7,6$ Hz, $J_{4-2} = 1,2$ Hz, 1H, H₄); 7,88 (dd, 2H, 2H₂); 12,84 (s, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 18,4 (SeCHCH₃); 36,7 (SeCH); 127,8 (2C₂); 129,4 (2C₃); 134,7 (C₄); 138,4 (C₁); 179,4 (COOH); 193,7 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 258 (M⁺, 1), 241 (1), 213 (1), 105 (100), 85 (7), 77 (37), 71 (3), 57 (19), 51 (11).

CHN - C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	46,71	3,92
Hallado	46,65	3,76

Feniletanoselenoato de 2-carboxietilo

Referencia	I.C2	
Peso Mol.	271,18	
Fórmula Mol.	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Se	
Punto Fusión	88 - 89 °C	
Aspecto	Sólido blanco	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,96 g (1,67 mL) de cloruro de 2-fenilacetilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,94 gramos de ácido 3-bromopropiónico (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a 40 °C durante 1 hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco que se purifica primero en columna de silicagel, empleando acetato como fase móvil, y luego se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco (0,569 g, 17 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3064, 3028 (f, tensión C-H aromáticos); 2960, 2898, 2740, 2665, 2565 (f, tensión C-H alifáticos); 1709 (f, tensión C=O de ácido); 1689 (f, tensión C=O de selenoéster); 1600, 1582, 1491 (d, tensión C-C aromático).

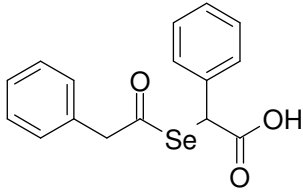
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,80 (t, $J_{CH(CO)-CH(Se)} = 6,9$ Hz, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,07 (t, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,87 (s, 2H, ArCH₂CO); 7,30 (dd, $J_{2-3} = 7,6$ Hz, $J_{2-4} = 1,8$ Hz, 2H, 2H₂); 7,34-7,38 (m, 3H, 2H₃+H₄). DMSO-*d*₆, δ : 2,61 (t, $J_{CH(CO)-CH(Se)} = 6,9$ Hz, 2H, SeCH₂CH₂CO); 2,91 (t, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,96 (s, 2H, ArCH₂CO); 7,29-7,37 (m, 5H, H_{Ar}); 12,31 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 19,6 (SeCH₂CH₂); 35,4 (CH₂CH₂CO); 54,5 (ArCH₂); 128,2 (C₄); 129,1 (2C₃); 130,5 (2C₂); 133,7 (C₁); 178,8 (COOH); 200,7 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 268/269/270/272/274 (M⁺, 1/1/2/4/1, Se), 119 (23), 105 (1), 91 (100), 77 (1), 65 (12), 51 (2).

CHN - C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	48,72	4,46
<i>Hallado</i>	48,62	4,28

Feniletanoselenoato de carboxifenilmetilo

Referencia	I.D1	
Peso Mol.	333,25	
Fórmula Mol.	C ₁₆ H ₁₄ O ₃ Se	
Punto Fusión	113 - 114 °C	
Aspecto	Sólido blanco pulverulento	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,59 g de borohidruro sódico (15,59 mmol) sobre una suspensión de 0,59 g de selenio gris (7,44 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,15 g (0,98 mL) de cloruro de 2-fenilacetilo (7,44 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,60 g de ácido α -bromofenilacético (7,44 mmol), dejándolo reaccionar a 40 °C durante 3 horas. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido pulverulento blanco grisáceo que se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco pulverulento (280 mg, 11 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3057, 3026 (m, tensión C-H aromáticos); 2938, 2908 (m, tensión C-H alifáticos); 1705 (f, tensión C=O de ácido); 1682 (m, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,87 (s, 2H, CH₂COSe); 5,20 (s, 1H, SeCH); 7,28-7,32 (m, 5H, 2H₂+2H₂+H₄); 7,33-7,37 (m, 3H, 2H₃+H₄); 7,39-7,41 (m, 2H, 2H₃). DMSO-*d*₆, δ : 4,00 (s, 2H, CH₂COSe); 5,04 (s, 1H, SeCH); 7,26-7,35 (m, 10H, Ar+Ar'); 13,00 (sa, 1H, COOH)¹.

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 46,9 (ArCHCO); 53,6 (ArCH₂); 128,6-128,7 (C₄-C₄'); 129,2-129,2-129,3 (2C₃-2C₂'-2C₃'); 130,8 (2C₂); 132,2 (C₁); 135,9 (C₁'); 177,3 (COOH); 199,6 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 312/313/314/**316**/316 (1/1/3/6/1, Se), 236 (6), 169 (7), 119 (14), 118 (32), 105 (1), 91 (100), 89 (20), 77 (3), 67 (8), 65 (11), 51 (3).

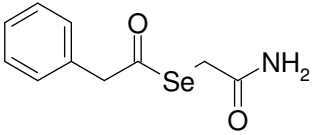
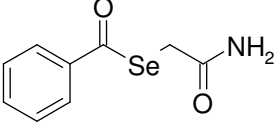
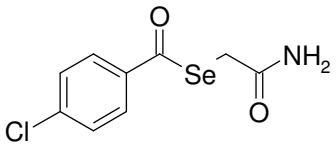
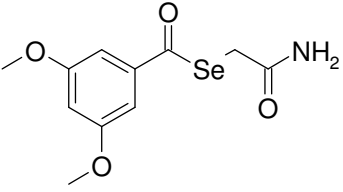
CHN - C ₁₆ H ₁₄ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	57,67	4,23
<i>Hallado</i>	57,38	4,28

¹ Ar: Anillo Ar-CH₂-COSe; Ar': Anillo Ar'-CH(Se-...)-COOH

Serie II: Selenoésteres de carbamoilmetilo

Los cuatro derivados organoselénicos incluidos en la *Serie II* se caracterizan por presentar una amida primaria en el resto alquílico directamente unido al selenio. Sus estructuras y referencias se muestran en la *Tabla 6.4*.

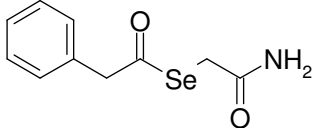
Tabla 6.4: Estructuras de los selenoésteres de carbamoilmetilo aislados.

II Selenoésteres de carbamoilmetilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
II.1		II.2	
II.3		II.4	

Procesos sintéticos

A continuación se exponen los compuestos agrupados en la *Serie II*:

Feniletanoselenoato de carbamoilmetilo

Referencia	II.1	
Peso Mol.	256,16	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂ Se	
Punto Fusión	107 -109 °C	
Aspecto	Sólido brillante blanco-grisáceo	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,96 g (1,67 mL) de cloruro de 2-fenilacetilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,18 g de cloroacetamida (12,66 mmol), dejándola reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido pulverulento negruzco, que contiene selenio metálico. Se purifica tratándolo con 50 mL de éter/metanol (9:1) para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. El selenoéster precipita al adicionar hexano al filtrado, obteniéndose por filtración posterior un sólido brillante blanco-grisáceo (1,685 g, 52 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3345, 3173 (m, tensión N-H); 3061, 3026 (d, tensión C-H aromáticos); 2982, 2925, 2798 (d, tensión C-H alifáticos); 1697 (f, tensión C=O de selenoéster); 1659 (f, tensión C=O de amida); 1697 (f, vibración N-H).

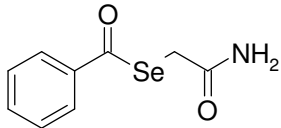
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,45 (s, 2H, SeCH₂); 3,91 (s, 2H, ArCH₂); 5,85, 6,15 (sa, 2H, CONH₂); 7,29-7,31 (m, 2H, 2H₂); 7,36-7,40 (m, 2H, 2H₃+H₄). DMSO-*d*₆, δ : 3,45 (s, 2H, SeCH₂); 3,99 (s, 2H, ArCH₂); 7,03, 7,49 (sa, 2H, NH₂); 7,33-7-36 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 27,4 (SeCH₂); 53,9 (ArCH₂); 128,6 (C₄); 129,2 (2C₃); 130,6 (2C₂); 132,4 (C₁); 172,8 (CONH₂); 201,9 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 253/254/255/257/259 (M⁺, 1/1/2/4/2, Se), 135/136/137/139/141 (3/4/7/13/3, Se), 118 (38), 91 (100), 77 (1), 65 (12), 51 (2).

CHN – C ₁₀ H ₁₁ NO ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	46,89	4,33	5,47
Hallado	46,78	4,51	5,43

Benzoselenoato de carbamoilmetilo

Referencia	II.2	
Peso Mol.	242,14	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₉ NO ₂ Se	
Punto Fusión	114 - 115 °C	
Aspecto	Sólido blanco brillante	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,78 gramos (1,47 mL) de cloruro de benzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,18 g de cloroacetamida (12,66 mmol), dejándola reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido higroscópico negrozco, que contiene selenio metálico. Se purifica tratándolo con 50 mL de éter/metanol (9:1) para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. El selenoéster precipita al adicionar hexano al filtrado, obteniéndose por filtración posterior un sólido blanco brillante (1,444 g, 47 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3383, 3191 (m, tensión N-H); 3055 (d, tensión C-H aromáticos); 2993, 2930 (d, tensión C-H alifáticos); 1654 (f, tensión C=O de selenoéster); 1625 (f, tensión C=O de amida); 1581 (m, vibración N-H).

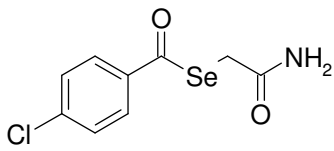
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,69 (s, 2H, SeCH₂); 5,92; 6,40 (sa, 2H, CONH₂); 7,50 (t, $J_{3-2} = 7,9$ Hz, $J_{3-4} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,66 (t, 1H, H₄); 7,91 (dd, 2H, $J_{2-4} = 1$ Hz, 2H₂).
DMSO-d₆, δ : 3,73 (s, 2H, CH₂); 7,15; 7,65 (sa, 2H, CONH₂); 7,59 (t, $J_{3-2} = 7,9$ Hz, $J_{3-4} = 7,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,74 (t, 1H, $J_{2-4} = 1$ Hz, H₄); 7,91 (dd, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 29,0 (SeCH₂); 127,7 (2C₂); 130,3 (2C₃); 135,3 (C₄); 138,8 (C₁); 170,8 (CONH₂); 194,4 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab.): 105 (100), 77 (46), 59 (10), 51 (13).

CHN - C ₉ H ₉ NO ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	44,64	3,75	5,78
Hallado	44,73	3,88	5,77

4-Clorobenzoselenoato de carbamoilmetilo

Referencia	II.3	
Peso Mol.	276,58	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₈ NCIO ₂ Se	
Punto Fusión	135 -136 °C	
Aspecto	Sólido esponjoso blanco	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,22 gramos (1,63 mL) de cloruro de 4-clorobenzóilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,18 gramos de cloroacetamida (12,66 mmol), dejándola reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido higroscópico rosado, que contiene selenio metálico. Se purifica tratándolo con 50 mL de éter/metanol (9:1) para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. El selenoéster precipita al adicionar hexano al filtrado, obteniéndose por filtración posterior un sólido esponjoso blanco (193 mg, 6 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3384, 3192 (m, tensión N-H); 3096 (d, tensión C-H aromáticos); 2971, 2923 (d, tensión C-H alifáticos); 1677 (f, tensión C=O de selenoéster); 1657 (f, tensión C=O de amida); 1586, 1573, 1486 (d, tensión C-C aromático); 1620 (d, vibración N-H).

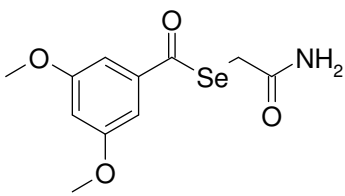
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,69 (s, 2H, SeCH₂); 5,35; 6,26 (sa, 2H, CONH₂); 7,50 (d, $J_{3-2} = 8,8$ Hz, 2H, 2H₃); 7,87 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 3,74 (s, 2H, SeCH₂); 7,16 (sa, 2H, CONH₂); 7,66 (d, $J_{3-2} = 8,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,91 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 28,6 (SeCH₂); 129,0 (2C₂); 130,5 (2C₃); 137,4 (C₄); 140,0 (C₁); 170,6 (CONH₂); 193,4 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 277 (M⁺, 1), 139/141 (100/34, Cl), 111/113 (31/10, Cl), 85/87 (4/1, Cl), 75 (15), 59 (5), 51 (5).

CHN - C ₉ H ₈ NCIO ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	39,08	2,92	5,06
Hallado	39,03	2,96	5,02

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de carbamoilmetilo

Referencia	II.4	
Peso Mol.	302,19	
Fórmula Mol.	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ Se	
Punto Fusión	121 - 124 °C	
Aspecto	Sólido pulverulento blanco	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,22 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,27 g de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 0,59 g de cloroacetamida (6,33 mmol), dejándola reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido higroscópico granate, que contiene selenio metálico. Se purifica tratándolo con 50 mL de éter/metanol (9:1) para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. El selenoéster precipita al adicionar hexano y eliminar parcialmente el disolvente a vacío, obteniéndose por filtración posterior un sólido pulverulento blanco (380 mg, 20 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3374, 3187 (f, tensión N-H); 3096 (d, tensión C-H aromáticos); 2972, 2931 (d, tensión C-H alifáticos); 1686 (m, tensión C=O de selenoéster); 1658 (f, tensión C=O de amida); 1599 (f, vibración N-H).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,67 (s, 2H, SeCH₂); 3,86 (s, 6H, OCH₃); 5,47; 6,29 (sa, 2H, CONH₂); 6,73 (t, $J_{4,2} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 7,04 (d, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,71 (s, 2H, SeCH₂); 3,82 (s, 6H, OCH₃); 6,85 (t, $J_{4,2} = 2,2$ Hz, 1H, H₄); 6,95 (d, 2H, 2H₂); 7,16; 7,65 (sa, 2H, CONH₂).

¹³C-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₃, δ): 29,3 (SeCH₂); 56,5 (OCH₃); 105,2 (2C₂); 106,6 (C₄); 140,9 (C₁); 161,7 (2C₃); 170,7 (CONH₂); 194,3 (COSe).

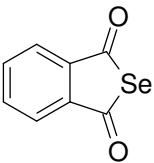
EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 303 (M⁺, 2), 165 (100), 137 (50), 122 (36), 107 (16), 94 (4), 92 (5), 79 (8), 77 (13), 69 (5), 63 (8), 51 (4).

CHN - C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ Se	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	43,72	4,34	4,64
Hallado	43,53	4,44	4,86

Serie III: Selenoanhídridos

La última serie de compuestos organoselénicos presentados en este trabajo consta de un único compuesto, el análogo selenado del anhídrido ftálico. Su estructura se muestra en la *Tabla 6.5* junto con su referencia.

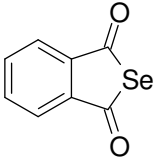
Tabla 6.5: Estructura del selenoanhídrido aislado.

III Selenoanhídridos	
Ref.	Estructura
III.1	

Proceso sintético

A continuación se incluye el proceso sintético y caracterización estructural del compuesto de la *Serie III*:

Benzo-[b]-selenofen-1,3-diona

Referencia	III.1	
Peso Mol.	211,08	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₄ O ₂ Se	
Punto Fusión	122 – 124 °C	
Aspecto	Sólido escamoso de color teja	

Procedimiento Experimental

Muestra caracterizada: Borohidruro sódico + Cloruro de ftaloílo

Se adicionan lentamente y con agitación 1,10 g de borohidruro sódico (29,0 mmol) sobre una suspensión de 1,10 g de selenio gris (13,9 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,41 g (1,00 mL) de cloruro de ftaloílo (6,94 mmol) disueltos en 20 mL de diclorometano, manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se añaden 10 mL de ácido sulfúrico, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El precipitado formado en las dos últimas reacciones se filtra, para luego suspender el sólido en 50 mL de cloroformo. Se filtra de nuevo, descartándose el sólido, y se elimina el disolvente a presión reducida para aislar un sólido naranja (0,694 gramos, 47 % de rendimiento). Al recristalizar de hexano, se obtiene un sólido de color anaranjado (262 mg, 18 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$): 3404 (m, armónico tensión C=O); 3089, 3016 (d, tensión C-H aromáticos); 1749 (d, tensión asimétrica C=O); 1685 (f, tensión simétrica C=O); 1576, 1448 (d, tensión C-C aromático).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 7,95 (dd, $J_{4-6,5-3} = 3,2$ Hz, $J_{4-3,5-6} = 5,7$ Hz, 2H, H₄+H₅); 7,98 (dd, 2H, H₃+H₆). **DMSO-d₆**, δ : 8,02 (dd, $J_{4-6,5-3} = 3,2$ Hz, $J_{4-3,5-6} = 5,7$ Hz, 2H, H₄+H₅); 7,98 (dd, 2H, H₃+H₆).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 124,0 (C₃+C₆); 135,3 (C₁+C₂), 142,2 (C₄+C₅), 194,5 (COSeCO).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 208/209/210/212/214 (M⁺, 2/2/4/11/2, Se), 104 (67), 92 (36), 77 (51), 76 (100), 65 (36), 50 (86).

CHN - C ₈ H ₄ O ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	45,52	1,91
Hallado	49,33	1,86

Otras reacciones: Hidruro de litio y aluminio

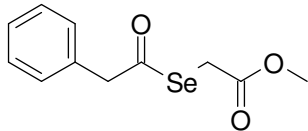
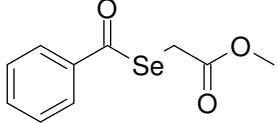
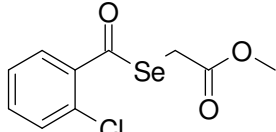
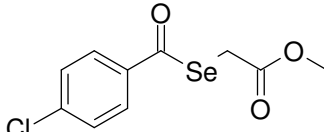
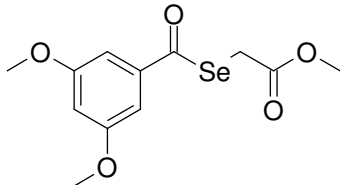
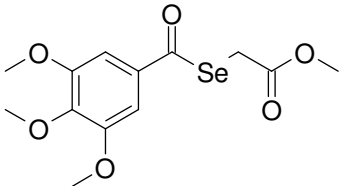
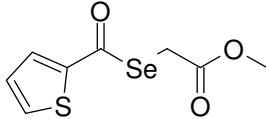
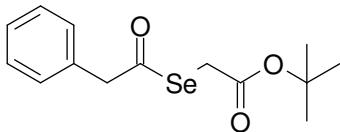
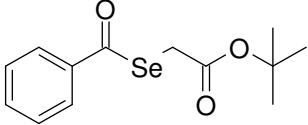
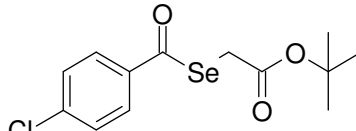
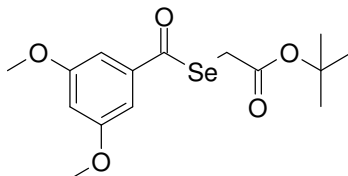
El producto final puede obtenerse reduciendo el selenio con hidruro de litio y aluminio en vez de hacerlo con borohidruro sódico. En este caso se comienza suspendiendo 1,10 gramos de selenio gris (13,9 mmol) en 20 mL de tetrahidrofurano anhidro, añadiéndose lentamente y con agitación 7,0 mL de hidruro de litio y aluminio 1M (7,0 mmol), dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,41 g (1,00 mL) de cloruro de ftaloílo (6,94 mmol) y se deja reaccionar durante ½ h a 50 °C. Después se adicionan gota a gota 10 mL de ácido sulfúrico y se filtra, descartando el sólido y recogiendo el líquido filtrado sobre ¼ kg de hielo. Transcurridas 3 h se filtra y seca para obtener un sólido naranja (1,378 gramos, 94 % de rendimiento). La formación del anhídrido se verifica comparando los espectros de infrarrojo y RMN con los recogidos para la muestra tratada con borohidruro. El rendimiento obtenido antes de recristalizar es superior al de la fracción sintetizada a partir de borohidruro, al pasar el rendimiento del 47 % al 94 %.

Es posible aislar el selenoanhídrido siguiendo este procedimiento empleando otros derivados del ácido ftálico distintos del cloruro de ftaloílo, como el anhídrido ftálico (457 mg, 16 % de rendimiento) y la N-hidroxiftalimida (0,902 g, 62 % de rendimiento). La ftalimida, no obstante, da una reacción secundaria y forma un ciclo azoselenado que no ha podido aislarse con una pureza satisfactoria.

Serie IV: Selenoésteres de R''-oxicarbonilalquilo

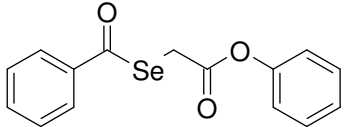
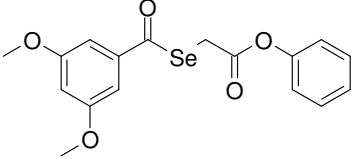
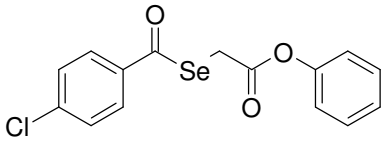
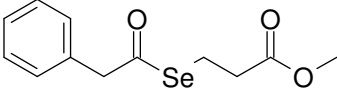
Se han sintetizado compuestos que presentan, además del selenoéster, un segundo éster carboxílico $-COOR''$ en el sustituyente alquílico unido al selenio (R). Se ha trabajado con tres restos R'' diferentes unidos al oxígeno: metilo, *terc*-butilo y fenilo. Las estructuras correspondientes a esta serie se muestran en la *Tabla 6.6a-b*.

Tabla 6.6a: Relación de estructuras de los selenoésteres aislados.

IV.A Selenoésteres de metiloxicarbonilalquilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
IV.A1		IV.A2	
IV.A3		IV.A4	
IV.A5		IV.A6	
IV.A7			
IV.B Selenoésteres de terc-butiloxicarbonilmétilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
IV.B1		IV.B2	
IV.B3		IV.B4	

La *Serie IV* se divide en cuatro subseries. En las tres primeras se incluyen compuestos con diferentes restos R'' , ordenados en función creciente de complejidad: *IV.A* - R'' = metilo, *IV.B* - R'' = *terc*-butilo, *IV.C* - R'' = fenilo. Por último, el único éster en el cual la cadena carbonada que separa el selenoéster del éster carboxílico es de dos carbonos en vez de uno se incluye aparte en la subserie *IV.D*.

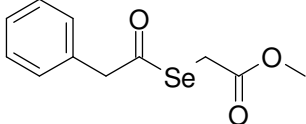
Tabla 6.6b: Relación de estructuras de los selenoésteres aislados.

IV.C Selenoésteres de feniloxycarbonilmetilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
<i>IV.C1</i>		<i>IV.C3</i>	
<i>IV.C2</i>			
IV.D Selenoésteres de metiloxycarboniletilo			
Ref.	Estructura		
<i>IV.D1</i>			

Procesos sintéticos

A continuación se exponen los compuestos englobados en la *Serie IV*:

Feniletanoselenoato de metiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.A1	
Peso Mol.	271,18	
Fórmula Mol.	C ₁₁ H ₁₂ O ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,20 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 0,98 gramos (0,83 mL) de cloruro de fenilacetilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 0,88 g de ácido bromoacético (6,33 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco pulverulento que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco (1,144 g, 35 % de rendimiento).

Se esterifican 0,50 g (1,94 mmol) del intermedio anteriormente sintetizado con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo brillante que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el éter a presión reducida se obtienen 132 mg de un líquido amarillo brillante. El rendimiento de la esterificación es del 25 % y el de la síntesis completa, del 9 %.

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3062, 3028 (d, tensión C-H aromáticos); 2951, 2846 (d, tensión C-H alifáticos); 1736 (m, tensión C=O de éster); 1704 (m, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,62 (s, 2H, SeCH₂); 3,70 (s, 3H, OCH₃); 3,89 (s, 2H, ArCH₂); 7,30-7,34 (m, 2H, 2H₂); 7,35-7,40 (m, 3H, 2H₃+H₄). DMSO-*d*₆, δ : 3,59 (s, 3H, OCH₃); 3,63 (s, 2H, SeCH₂); 4,03 (s, 2H, ArCH₂); 7,31-7,37 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,8 (SeCH₂); 53,1 (OCH₃); 53,7 (ArCH₂); 128,5 (C₄); 129,2 (2C₃); 130,6 (2C₂); 132,6 (C₁); 171,0 (COO); 198,8 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 272 (M^{+} , 1), 241 (1), 213 (1), 199 (1), 153 (1), 119 (10), 105 (5), 91 (100), 77 (4), 65 (17), 59 (5), 51 (5).

CHN - $C_{11}H_{12}O_3Se$	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	48,72	4,46
<i>Hallado</i>	48,90	4,28

Feniletanoselenoato de carboximetilo (producto intermedio)

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3006 (m, tensión C-H aromáticos); 2904, 2663, 2561 (m, tensión C-H alifáticos); 1704 (m, tensión C=O de ácido); 1689 (m, tensión C=O de selenoéster).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ), 3,62 (s, 2H, $SeCH_2$), 3,91 (s, 2H, $ArCH_2$); 7,31-7,33 (m, 2H, $2H_2$), 7,37-7,40 (m, 3H, $2H_3+H_4$). *DMSO- d_6* , δ : 3,54 (s, 2H, $SeCH_2$), 4,02 (s, 2H, $ArCH_2$); 7,30-7,39 (m, 5H, H_{Ar}); 12,61 (sa, 1H, COOH).

CHN - $C_{10}H_{10}O_3Se$	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	46,71	3,92
<i>Hallado</i>	46,45	3,84

Benzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.A2	
Peso Mol.	257,15	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,78 gramos (1,47 mL) de cloruro de benzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco rosáceo que se recristaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco grumoso (1,584 g, 51 % de rendimiento).

Se esterifican 0,50 g (2,06 mmol) del intermedio anteriormente sintetizado con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo brillante que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el éter a presión reducida se obtienen 184 mg de un líquido amarillo brillante. El rendimiento de la esterificación es del 35 % y el de la síntesis completa, del 18 %.

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3061, 3026, 3003 (m, tensión C–H aromático); 2952, 2850 (f, tensión C–H alifático); 1738 (f, tensión C=O éster); 1678 (f, tensión C=O de selenoéster); 1595, 1581, 1447, 1438 (m, tensión C–C aromático).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,77 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 2H, SeCH₂); 7,49 (dt, $J_{3-2} = 8,1$ Hz, $J_{3-4} = 7,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,64 (tt, $J_{4-2} = 1,3$ Hz, 1H, H₄); 7,92 (dd, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,66 (s, 3H, OCH₃); 3,91 (s, 2H, SeCH₂); 7,60 (t, $J_{3-4} = 7,6$ Hz, $J_{3-2} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,76 (t, $J_{4-2} = 1,2$ Hz, 1H, H₄); 7,90 (d, 2H, 2H₂).

^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 25,5 (SeCH₂); 53,2 (OCH₃); 127,8 (2C₂); 129,4 (2C₃); 134,5 (C₄); 138,8 (C₁); 171,1 (COO); 192,7 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 258 (M⁺, 1), 225/227 (1/2, Se), 199 (1), 105 (100), 77 (56), 59 (2), 51 (19).

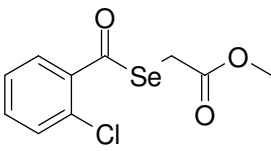
CHN - C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	46,71	3,92
<i>Hallado</i>	46,98	4,08

Benzoselenoato de carboximetilo (producto intermedio)

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3011 (f, tensión C-H aromáticos); 2920, 2665, 2562 (f, tensión C-H alifáticos); 1702 (f, tensión C=O de ácido); 1679 (f, tensión C=O de selenoéster).

^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 3,81 (s, 2H, SeCH₂); 7,59 (t, $J_{3-4} = 7,4$ Hz, $J_{3-2} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,75 (t, $J_{4-2} = 1,2$ Hz, 1H, H₄); 7,90 (d, 2H, 2H₂), 12,80 (sa, 1H, COOH).

2-Clorobenzoselenoato de metiloxycarbonilmetilo

Referencia	IV.A3	
Peso Mol.	291,59	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₉ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se esterifican 0,46 g (1,66 mmol) de 2-clorobenzoselenoato de carboximetilo (selenoéster *I.A3*, proceso sintético en la página 95) con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo brillante que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene de un líquido amarillo brillante (230 mg, 48 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3064, 3004 (m, tensión C–H aromático); 2952, 2846 (m, tensión C–H alifático); 1738 (f, tensión C=O éster); 1692 (f, tensión C=O de selenoéster); 1586, 1464, 1435 (f, tensión C–C aromático).

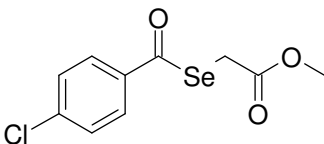
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,77 (s, 3H, OCH₃); 3,89 (s, 2H, SeCH₂); 7,35-7,39 (m, 1H, H₅); 7,46-7,48 (m, 2H, H₄+H₃); 7,75 (dd, 1H, H₆). *DMSO-d*₆, δ : 3,67 (s, 3H, OCH₃); 3,92 (s, 2H, SeCH₂); 7,52-7,56 (m, 1H, H₅); 7,64-7,66 (m, 2H, H₄+H₃); 7,80 (dd, 1H, H₆).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 26,9 (SeCH₂); 53,2 (OCH₃); 127,4 (C₅); 129,8 (C₃); 130,8 (C₂); 131,7 (C₆); 133,4 (C₄); 138,0 (C₁); 170,8 (COO); 192,1 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 294 (M⁺+2, 1), 261 (1), **139/141** (**100/34**, Cl), **111/113** (**38/11**, Cl), **85/87** (**5/1**, Cl), 75 (24), 59 (10), 50 (11).

CHN - C ₁₀ H ₉ ClO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	41,19	3,11
Hallado	40,83	2,86

4-Clorobenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.A4	
Peso Mol.	291,59	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₉ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	46 - 47 °C	
Aspecto	Sólido escamoso blanco brillante	

Procedimiento Experimental

Se esterifican 0,35 g (1,26 mmol) de 4-clorobenzoselenoato de carboximetilo (selenoéster *I.A6*, proceso sintético en la página 98) con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene de un líquido amarillo brillante (230 mg, 63 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3001 (d, tensión C–H aromático); 2945 (d, tensión C–H alifático); 1737 (f, tensión C=O éster); 1677 (f, tensión C=O de selenoéster); 1585, 1482 (m, tensión C–C aromático).

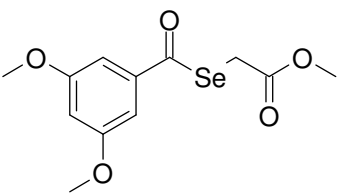
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,77 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 2H, SeCH₂); 7,48 (d, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 7,86 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 3,66 (sc, 3H, OCH₃); 3,92 (s, 2H, SeCH₂); 7,66 (d, $J_{3-2} = 8,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,92 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,7 (SeCH₂); 53,2 (OCH₃); 129,0 (2C₂); 129,7 (2C₃); 136,7 (C₄); 141,0 (C₁); 170,9 (COO); 191,5 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 278 (1), **191/193** (7/1, Cl), **175/177** (3/1, Cl), **139/141** (100/34, Cl), **111/113** (46/15, Cl), 91 (4), **85/87** (4/1, Cl), 75 (28), 65 (4), 50 (12).

CHN - C ₁₀ H ₉ ClO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	41,19	3,11
<i>Hallado</i>	41,49	3,16

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de metiloxycarbonilmetilo

Referencia	IV.A5	
Peso Mol.	317,20	
Fórmula Mol.	C ₁₂ H ₁₄ O ₅ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo anaranjado	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,54 g de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,76 gramos de ácido bromoacético (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se forma un precipitado que se filtra y se seca, aislándose un sólido blanco grumoso que se recrystaliza de tetracloruro de carbono, obteniéndose un sólido blanco (1,278 g, 33 % de rendimiento).

Se esterifican 1,00 g (3,30 mmol) del intermedio anteriormente sintetizado con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo brillante que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el éter a presión reducida se obtienen 558 mg de un líquido amarillo brillante que se purifica en columna de silicagel empleando como fase móvil hexano/acetato 4:1, obteniéndose 371 mg de un líquido amarillo brillante. El rendimiento de la esterificación es del 29 % y el de la síntesis completa, del 9 %.

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3091, 3005 (m, tensión C–H aromático); 2951, 2840 (f, tensión C–H alifático); 1738 (f, tensión C=O éster); 1668 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,77 (s, 3H, COOCH₃); 3,85 (s, 2H, SeCH₂); 3,85 (s, 6H, ArOCH₃); 6,71 (t, $J_{4-2} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 7,05 (d, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,66 (s, 3H, COOCH₃); 3,83 (s, 6H, ArOCH₃); 3,89 (s, 2H, SeCH₂); 6,88 (t, $J_{4-2} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 6,96 (d, 2H₂).

^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 25,7 (SeCH_2); 53,2 (COOCH_3); 56,1 (ArOCH_3), 105,4 (2C_2); 106,8 (C_4); 140,3 (C_1); 161,4 (2C_3); 171,1 (COO); 192,7 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 318 (M^+ , 1), 287 (1), 165 (100), 137 (25), 122 (31), 107 (15), 94 (7), 92 (8), 79 (10), 77 (16), 63 (15), 59 (7), 51 (10).

CHN - $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{Se}$	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	45,44	4,45
<i>Hallado</i>	45,39	4,42

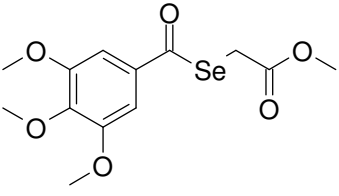
3,5-dimetoxibenzoselenoato de carboximetilo (producto intermedio)

IR (KBr , $\tilde{\nu}$) 3076, 3016 (m, tensión C-H aromáticos); 2940, 2839, 2660, 2560 (m, tensión C-H alifáticos); 1716 (m, tensión C=O de ácido); 1695 (m, tensión C=O de selenoéster).

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 3,85 (s, 2H, SeCH_2); 3,85 (s, 6H, ArOCH_3); 6,72 (t, $J_{4-2} = 2,3$ Hz, 1H, H_4); 7,04 (d, 2H₂). $\text{DMSO}-d_6$, δ : 3,80 (s, 2H, SeCH_2); 3,82 (s, 6H, ArOCH_3); 6,87 (t, $J_{4-2} = 2,1$ Hz, 1H, H_4); 6,95 (d, 2H₂); 12,80 (sa, 1H, COOH).

CHN - $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{Se}$	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	43,58	3,99
<i>Hallado</i>	43,48	3,94

3,4,5-Trimetoxibenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.A6	
Peso Mol.	347,23	
Fórmula Mol.	C ₁₃ H ₁₆ O ₆ Se	
Punto Fusión	36 - 38 °C	
Aspecto	Sólido grumoso blanco	

Procedimiento Experimental

Se esterifican 0,40 gramos (1,20 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzoselenoato de carboximetilo (selenoéster I.A9, proceso sintético en la página 101) con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un sólido grumoso blanco (203 mg, 49 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3000 (m, tensión C-H aromáticos); 2946, 2837 (m, tensión C-H alifáticos); 1738 (m, tensión C=O de éster); 1680 (m, tensión C=O de selenoéster).

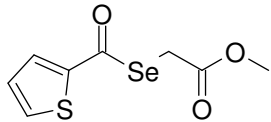
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ), 3,76 (s, 3H, COOCH₃); 3,85 (s, 2H, SeCH₂); 3,92 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,93 (s, 3H, *p*-OCH₃); 7,16 (s, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 3,66 (s, 3H, COOCH₃); 3,77 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,87 (sc, 6H, *m*-OCH₃); 3,89 (sc, 2H, SeCH₂); 7,13 (s, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,8 (SeCH₂); 53,2 (COOCH₃); 56,7 (*m*-OCH₃), 61,4 (*p*-OCH₃), 105,1 (2C₂); 133,5 (C₁); 143,7 (C₄); 153,7 (2C₃); 171,1 (COO); 191,6 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 350 (M⁺⁺+2, 1), 317 (1), 306 (5), 274 (3), 195 (100), 167 (4), 152 (9), 137 (6), 124 (6), 122 (6), 109 (6), 94 (4), 81 (6), 66 (6), 53 (4).

CHN - C ₁₃ H ₁₆ O ₆ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	44,97	4,64
<i>Hallado</i>	44,60	4,63

2-Tiofencarbosenolato de metiloxycarbonilmetilo

Referencia	IV.A7	
Peso Mol.	263,18	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₈ O ₃ SSe	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se esterifican 0,50 g (2,01 mmol) de 2-tiofencarbosenolato de carboximetilo (selenoéster *I.B1*, proceso sintético en la página 103) con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene de un líquido amarillo brillante (164 mg, 31 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3103, 3004 (m, tensión C–H aromático); 2951, 2847 (m, tensión C–H alifático); 1738 (f, tensión C=O éster); 1668 (f, tensión C=O de selenoéster).

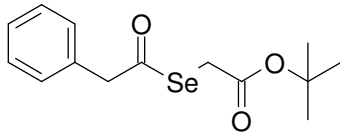
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,76 (s, 3H, OCH₃); 3,86 (s, 2H, SeCH₂); 7,17 (dd, $J_{4,5} = 3,9$ Hz, $J_{4,3} = 4,9$ Hz, 1H, H₄); 7,73 (dd, $J_{3,5} = 1,1$ Hz, 1H, H₃); 7,83 (dd, 1H, H₅). DMSO-*d*₆, δ : 3,66 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 2H, SeCH₂); 7,31 (dd, $J_{4,5} = 3,9$ Hz, $J_{4,3} = 4,9$ Hz, 1H, H₄); 8,03 (dd, $J_{3,5} = 1,1$ Hz, 1H, H₃); 8,18 (dd, 1H, H₅).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,6 (SeCH₂); 53,2 (OCH₃); 128,5 (C₄); 132,6 (C₅); 134,4 (C₃); 142,9 (C₂); 170,9 (COO), 182,8 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 264 (M⁺, 2), 233 (2), 205 (2), 191 (3), 111 (100), 83 (8), 73 (1), 57 (5).

CHN - C ₈ H ₈ O ₃ SSe	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	36,51	3,06
<i>Hallado</i>	36,87	3,10

Feniletanoselenoato de *terc*-butiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.B1	
Peso Mol.	313,26	
Fórmula Mol.	C ₁₄ H ₁₈ O ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo pálido	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 0,978 g (0,84 mL) de cloruro de fenilacetilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,235 gramos (0,94 mL) de bromoacetato de *terc*-butilo (6,33 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un líquido amarillo que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 24 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). El líquido resultante tras filtrar, secar y eliminar el disolvente se purifica nuevamente en columna de silicagel empleando tolueno como fase móvil, aislándose un líquido amarillo pálido (472 mg, 25 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3064, 3030 (d, tensión C-H aromáticos); 2979, 2932 (f, tensión C-H alifáticos); 1728 (f, tensión C=O de éster); 1714 (f, tensión C=O de selenoéster).

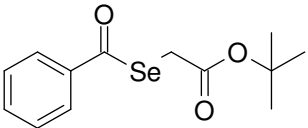
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,43 (s, 3H, C(CH₃)₃); 3,55 (s, 2H, SeCH₂); 3,89 (s, 2H, ArCH₂); 7,33-7,36 (m, 5H, H_{Ar}). DMSO-*d*₆, δ : 1,35 (s, 3H, C(CH₃)₃); 3,52 (s, 2H, SeCH₂); 4,02 (s, 2H, ArCH₂); 7,32-7,36 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,8 (SeCH₂); 28,3 (C(CH₃)₃); 53,9 (ArCH₂); 82,2 (C(CH₃)₃); 128,4 (C₄); 129,2 (2C₃); 130,5 (2C₂); 132,8 (C₁); 169,6 (COO); 198,9 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 316 (M⁺+2, 1), 258 (2), 241 (3), 213 (1), 204 (9), 193 (5), 177 (2), 119 (10), 105 (2), 91 (100), 85 (24), 65 (13), 57 (50), 51 (3).

CHN - C ₁₄ H ₁₈ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	53,68	5,79
<i>Hallado</i>	53,49	6,02

Benzoselenoato de *terc*-butiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.B2	
Peso Mol.	299,23	
Fórmula Mol.	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,78 g (1,47 mL) de cloruro de benzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,47 g (1,87 mL) de bromoacetato de *terc*-butilo (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un líquido amarillo que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 24 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). El líquido resultante tras filtrar, secar y eliminar el éter en rotavapor se purifica de nuevo en columna de silicagel empleando tolueno como fase móvil, aislándose un líquido amarillo pálido (0,987 g, 26 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3062 (d, tensión C-H aromáticos); 2978, 2932 (f, tensión C-H alifáticos); 1731 (f, tensión C=O de éster); 1677 (f, tensión C=O de selenoéster); 1596, 1582, 1479, 1448 (d, tensión C-C aromático).

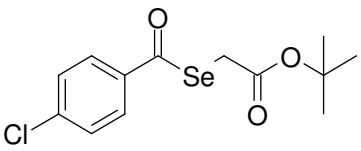
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,79 (s, 2H, SeCH₂); 7,49 (t, $J_{3-2} = 8,1$ Hz, $J_{3-4} = 7,9$ Hz, 2H, 2H₃); 7,63 (tt, $J_{4-2} = 1,3$ Hz, 1H, H₄); 7,92 (dd, 2H, 2H₂).
DMSO-*d*₆, δ : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,80 (s, 2H, SeCH₂); 7,59 (t, $J_{3-2} = 7,6$ Hz, $J_{3-4} = 7,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,75 (tt, $J_{4-2} = 1,2$ Hz, 1H, H₄); 7,90 (dd, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,6 (SeCH₂); 29,0 (C(CH₃)₃); 82,3 (C(CH₃)₃); 127,7 (2C₂); 129,3 (2C₃); 134,4 (C₄); 138,7 (C₁); 169,7 (COO); 193,1 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 240/241/242/**244**/246 (1/1/2/4/1, Se), 223/224/225/**227**/229 (1/1/2/4/1, Se), 105 (100), 77 (46), 57 (77), 51 (16).

CHN: No ha sido posible la realización de un Análisis Elemental de este compuesto líquido debido a sus propiedades fisicoquímicas.

4-Clorobenzoselenoato de *terc*-butiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.B3	
Peso Mol.	333,68	
Fórmula Mol.	C ₁₃ H ₁₅ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,22 g (1,63 mL) de cloruro de 4-clorobenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,47 gramos (1,87 mL) de bromoacetato de *terc*-butilo (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un líquido amarillo anaranjado que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 24 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). El líquido resultante tras filtrar, secar y eliminar el disolvente a presión reducida se purifica nuevamente en columna de silicagel empleando tolueno como fase móvil, obteniéndose un líquido amarillo brillante (328 mg, 8 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3090, 3061 (d, tensión C-H aromáticos); 2979, 2932 (f, tensión C-H alifáticos); 1731 (f, tensión C=O de éster); 1678 (f, tensión C=O de selenoéster).

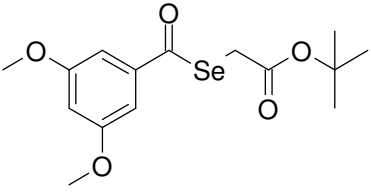
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,79 (s, 2H, SeCH₂); 7,47 (d, 2H, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H₃); 7,86 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,81 (s, 2H, SeCH₂); 7,66 (d, 2H, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H₃); 7,91 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,8 (SeCH₂); 29,2 (C(CH₃)₃); 82,5 (C(CH₃)₃); 129,0 (2C₂); 130,2 (2C₃); 136,7 (C₄); 140,6 (C₁); 169,4 (COO); 191,9 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 276 (3), **139/141** (20/7, Cl), **111/113** (13/4, Cl), 105 (22), 91 (6), 85 (3), 75 (10), 77 (16), 57 (100), 51 (10).

CHN - C ₁₃ H ₁₅ ClO ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	46,80	4,53
<i>Hallado</i>	46,52	4,67

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de *tert*-butiloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.B4	
Peso Mol.	359,28	
Fórmula Mol.	C ₁₅ H ₂₀ O ₅ Se	
Punto Fusión	65 - 66 °C	
Aspecto	Sólido pulverulento blanco	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,54 g de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 2,47 gramos (1,87 mL) de bromoacetato de *tert*-butilo (12,66 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un líquido amarillo anaranjado que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 24 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). El líquido resultante tras filtrar, secar y eliminar el disolvente a presión reducida se purifica nuevamente en columna de silicagel empleando hexano/acetato 4:1 como fase móvil, obteniéndose un sólido pulverulento blanco (0,952 g, 21 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3004 (m, tensión C–H aromático); 2980, 2934, 2844 (m, tensión C–H alifático); 1735 (f, tensión C=O éster); 1671 (f, tensión C=O de selenoéster); 2606, 2589, 1466, 1434 (f, tensión C–C aromático).

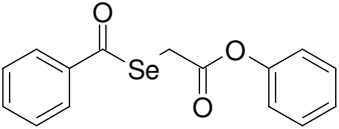
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,77 (s, 2H, SeCH₂); 3,85 (s, 6H, OCH₃); 6,70 (t, $J_{4,2} = 2,2$ Hz, 1H, H₄); 7,05 (d, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,78 (s, 2H, SeCH₂); 3,83 (s, 6H, OCH₃); 6,87 (t, $J_{4,2} = 2,2$ Hz, 1H, H₄); 6,95 (dd, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,8 (C(CH₃)₃); 29,2 (SeCH₂); 56,1 (OCH₃); 82,4 (C(CH₃)₃); 104,5 (2C₂); 106,0 (C₄); 140,6 (C₁); 161,4 (2C₃); 169,6 (COO); 193,0 (COSe).

EM (70 eV) m/z (abundancia relativa): 274/275/276/**278**/280 (2/1/3/**3**/1, Se), 165 (98), 137 (27), 122 (36), 107 (18), 94 (8), 92 (9), 79 (15), 77 (22), 63 (22), 57 (100), 51 (15).

CHN - C ₁₅ H ₂₀ O ₅ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	50,15	5,61
<i>Hallado</i>	50,00	5,48

Benzoselenoato de feniloxicarbonilmetilo

Referencia	IV.C1	
Peso Mol.	319,22	
Fórmula Mol.	C ₁₅ H ₁₂ O ₃ Se	
Punto Fusión	40 - 41 °C	
Aspecto	Sólido grumoso blanco	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,70 g de borohidruro sódico (18,50 mmol) sobre una suspensión de 0,70 g de selenio gris (8,50 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,245 g (1,03 mL) de cloruro de benzoílo (8,86 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,36 g (0,90 mL) de bromoacetato de fenilo (6,33 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 45 minutos (hasta decoloración del medio de reacción). Se forma un precipitado que se filtra, se seca y se purifica tratándolo con 100 mL de diclorometano para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. Tras lavar con agua (3×50 mL) se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, y se fuerza la precipitación de un sólido blanco por adición de agua y posterior rascado con varilla. El precipitado se filtra y se purifica de nuevo tratándolo con 100 mL de diclorometano para disolver el sólido y retirar las impurezas sólidas por filtración. Al eliminar el disolvente a presión reducida y adicionar agua aparece un precipitado que por filtración rinde un sólido grumoso blanco. (1,070 g, 53 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3062, 3017 (d, tensión C–H aromático); 2940 (d, tensión C–H alifático); 1739 (f, tensión C=O éster); 1679 (f, tensión C=O de selenoéster); 1592, 1484, 1447 (d, tensión C–C aromático).

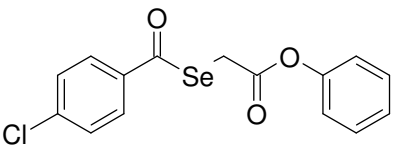
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 4,08 (s, 2H, SeCH₂); 7,15 (dd, $J_{2'-3'} = 8,3$ Hz, $J_{2'-4'} = 1,2$ Hz, 2H, 2H_{2'}); 7,25 (tt, $J_{4'-3'} = 7,7$ Hz, 1H, H_{4'}); 7,40 (dt, 2H, 2H_{3'}); 7,52 (dt, $J_{3'-4'} = 8,2$ Hz, $J_{3-2} = 8$ Hz, 2H, 2H₃); 7,66 (tt, $J_{4-2} = 1$ Hz, 1H, H₄); 7,95 (dd, 2H, 2H₂).
DMSO-*d*₆, δ : 4,16 (s, 2H, SeCH₂); 7,14 (d, $J_{2'-3'} = 7,8$ Hz, 2H, 2H_{2'}); 7,28 (t, $J_{4'-3'} = 7,6$ Hz, 1H, H_{4'}); 7,44 (t, 2H, 2H_{3'}); 7,61 (t, $J_{3'-4'} = 7,6$ Hz, $J_{3-2} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,77 (t, 1H, H₄); 7,94 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,7 (SeCH₂); 121,8 (2C_{2'}); 126,4 (C_{4'}); 127,8 (2C₂); 129,5 (2C₃); 129,8 (2C_{3'}); 134,6 (C₄); 138,3 (C₁); 151,2 (C_{1'}); 169,3 (COO); 192,4 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 223/224/225/**227**/229 (3/3/8/**16**/4, Se), 195/197/**199**/201 (1/1/**2**/2, Se), 187 (2), 105 (100), 77 (33), 94 (18), 65 (12), 51 (8).

CHN - C ₁₅ H ₁₂ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	56,44	3,79
<i>Hallado</i>	56,15	3,86

4-Clorobenzoselenoato de feniloxycarbonilmetilo

Referencia	IV.C2	
Peso Mol.	353,67	
Fórmula Mol.	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₃ Se	
Punto Fusión	67 - 68 °C	
Aspecto	Sólido pulverulento blanquecino	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,11 gramos (0,81 mL) de cloruro de 4-clorobenzofilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,36 g (0,90 mL) de bromoacetato de fenilo (6,33 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 45 minutos (hasta decoloración del medio de reacción). Se forma un precipitado que se filtra, se seca y se purifica tratándolo con 100 mL de diclorometano para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. Tras lavar con agua (3×50 mL) se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, y se fuerza la precipitación de un sólido blanco por adición de agua y posterior rascado con varilla. El precipitado se filtra y se purifica nuevamente en columna de silicagel empleando hexano/tolueno 11:9 como fase móvil, obteniéndose un sólido pulverulento blanquecino (0,547 g, 24 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3067, 3008 (d, tensión C–H aromático); 2960, 2926, 2854 (f, tensión C–H alifático); 1752 (f, tensión C=O éster); 1676 (f, tensión C=O de selenoéster); 1585, 1486, 1457 (m, tensión C–C aromático).

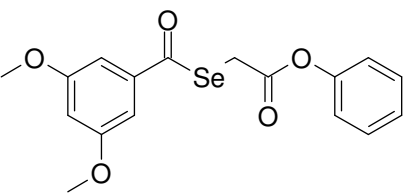
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 4,08 (s, 2H, SeCH₂); 7,14 (dd, $J_{2'-3'} = 7,6$ Hz, $J_{2'-4'} = 1$ Hz, 2H, 2H_{2'}); 7,26 (dt, $J_{4'-3'} = 7,7$ Hz, 1H, H_{4'}); 7,40 (t, 2H, 2H_{3'}); 7,49 (dd, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 7,89 (dd, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 4,18 (s, 2H, SeCH₂); 7,14 (d, $J_{2'-3'} = 7,7$ Hz, 2H, 2H_{2'}); 7,28 (t, $J_{4'-3'} = 7,7$ Hz, 1H, H_{4'}); 7,44 (t, 2H, 2H_{3'}); 7,68 (d, $J_{3-2} = 8,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,96 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 26,0 (SeCH₂); 121,7 (2C_{2'}); 126,5 (C_{4'}); 129,1 (2C₂); 129,8 (2C₃); 129,9 (2C_{3'}); 136,6 (C₄); 141,1 (C₁); 151,1 (C_{1'}); 169,1 (COO); 191,3 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab rel): 356 ($M^{+}+2$, 1), 300/302/303/304/306/308 (3/7/4/11/12/4, Se, Cl), 255/257/258/259/260/261/263/265 (1/3/2/6/1/12/5/1, Se, Cl), 232 (3), 215 (2), **139/141 (100/34, Cl)**, **111/113 (28/10, Cl)**, 94 (13), **85/87 (9/1, Cl)**, 77 (3), 75 (14), 59 (4), 50 (3).

CHN - C₁₅H₁₁ClO₃Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	50,94	3,14
<i>Hallado</i>	51,26	3,27

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de feniloxycarbonilmetilo

Referencia	IV.C3	
Peso Mol.	379,27	
Fórmula Mol.	C ₁₇ H ₁₆ O ₅ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,27 gramos de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra, se descarta el sólido y sobre el filtrado se añaden 1,36 g (0,90 mL) de bromoacetato de fenilo (6,33 mmol), dejándolo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora (hasta decoloración del medio de reacción). El producto aparece en el medio acuoso como un aceite inmiscible que se extrae con cloroformo (3×50 mL) y se lava con agua (3×50 mL) para luego secar y eliminar el disolvente a presión reducida; recuperándose un líquido amarillo anaranjado que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). El líquido resultante tras secar con sulfato sódico anhidro, filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se purifica nuevamente en columna de silicagel empleando como fase móvil hexano/acetato 4:1, obteniéndose un líquido amarillo brillante (0,625 g, 26 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3071, 3007 (m, tensión C–H aromático); 2940, 2839 (f, tensión C–H alifático); 1752 (f, tensión C=O éster); 1680 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 3,87 (s, 6H, OCH₃); 4,06 (s, 2H, SeCH₂); 6,73 (t, $J_{4-2} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 7,08 (d, 2H, 2H₂); 7,15 (dd, $J_{2-3} = 8,6$ Hz, $J_{2-4} = 1,1$ Hz, 2H, 2H₂); 7,25 (tt, $J_{4-3} = 7,4$ Hz, 1H, H₄); 7,40 (tt, 2H, 2H₃). DMSO-*d*₆, δ : 3,83 (s, 6H, m-OCH₃); 4,15 (s, 2H, SeCH₂COOPh); 6,89 (d, $J_{4-2} = 1,6$ Hz, 1H, H₄); 6,99 (d, 2H, 2H₂); 7,14 (d, $J_{2-3} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₂); 7,28 (t, $J_{4-3} = 7,4$ Hz, 1H, H₄); 7,44 (t, 2H, 2H₃).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 25,9 (SeCH₂); 56,1 (OCH₃); 105,5 (2C₂); 106,8 (C₄); 121,8 (2C₂); 126,4 (C₄); 129,8 (2C₃); 140,2 (C₁); 151,1 (C₁); 161,5 (2C₃); 169,2 (COO); 192,4 (COSe).

EM (70 eV) m/z (ab. rel.): 258 (3), 165 (100), 137 (25), 122 (35), 107 (18), 105 (19), 94 (18), 92 (9), 79 (14), 77 (32), 63 (23), 51 (22).

CHN - C₁₇H₁₆O₅Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	53,84	4,25
<i>Hallado</i>	53,74	4,37

Feniletanoselenoato de 2-metiloxicarboniletilo

Referencia	IV.D1	
Peso Mol.	285,20	
Fórmula Mol.	C ₁₂ H ₁₄ O ₃ Se	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo claro	

Procedimiento Experimental

Se esterifican 0,50 gramos (1,84 mmol) de feniletanoselenoato de carboximetilo (intermedio selenoéster *IV.A1*, proceso sintético en la página 123) con 20 mL de metanol a reflujo durante 4 horas, empleando ácido clorhídrico concentrado (5 gotas) como catalizador y siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina. Terminada la reacción se añaden 40 mL de cloroformo y 25 mL de agua; para después retirar la fase orgánica y extraer la fracción acuosa con cloroformo (2×30 mL). Se reúnen las tres porciones orgánicas, se lavan con agua (3×30 mL) y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, aislándose un líquido amarillo que se purifica en columna de silicagel empleando diclorometano como fase móvil, obteniéndose un líquido amarillo pálido (137 mg, 26 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3062, 3029 (m, tensión C–H aromático); 2952, 2846 (f, tensión C–H alifático); 1737 (f, tensión C=O éster); 1697 (f, tensión C=O de selenoéster).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,75 (t, $J_{CH(CO)-CH(Se)} = 7$ Hz, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,08 (t, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,69 (s, 3H, OCH₃); 3,86 (s, 2H, ArCH₂); 7,30 (dd, $J_{2-3} = 7,7$ Hz, $J_{2-4} = 1,8$ Hz, 2H, 2H₂); 7,34-7,39 (m, 3H, 2H₃+H₄). DMSO-*d*₆, δ : 2,70 (t, $J_{CH(CO)-CH(Se)} = 7$ Hz, 2H, SeCH₂CH₂CO); 2,95 (t, 2H, SeCH₂CH₂CO); 3,58 (s, 3H, OCH₃); 3,97 (s, 2H, ArCH₂); 7,29-7,37 (m, 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 20,1 (SeCH₂CH₂CO); 35,4 (SeCH₂CH₂CO); 52,2 (OC₃); 54,5 (ArCH₂); 128,2 (C₄); 129,0 (2C₃); 130,5 (2C₂); 133,2 (C₁); 173,0 (COO); 200,6 (COSe).

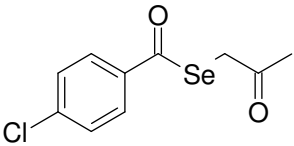
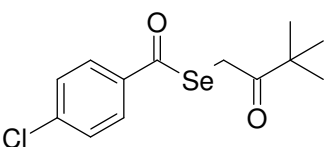
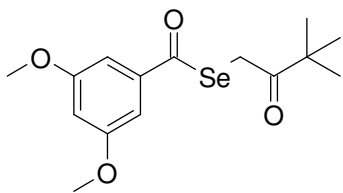
EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 284 (M⁺-2, 3), 203 (12), 191 (6), 175 (4), 165 (12), 129 (12), 125 (13), 119 (14), 115 (4), 111 (25), 109 (13), 105 (9), 101 (4), 97 (37), 91 (100), 83 (40), 77 (5), 73 (19), 65 (15), 59 (20), 57 (92), 55 (71), 51 (5).

CHN - C ₁₂ H ₁₄ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	50,54	4,95
<i>Hallado</i>	50,70	4,86

Serie V: Selenoésteres de acilalquilo

Se han sintetizado tres compuestos que contienen una cetona en la cadena lateral *R* unida al selenio, en vez de los grupos carboxilo, alquiloxi/feniloxicarbonilo o carbamoil vistos hasta la fecha; siendo uno de los derivados obtenidos una metilcetona, y los restantes, *tert*-butilcetonas. Se ha trabajado además en la síntesis de compuestos adicionales, entre ellos algunas fenilcetonas, sin éxito, por dificultades sintéticas en la purificación. Las estructuras de los derivados aislados se muestran en la *Tabla 6.7*.

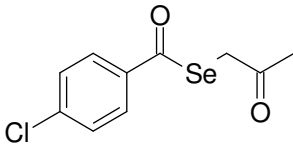
Tabla 6.7: Estructuras de los selenoésteres de acilalquilo obtenidos.

V.A Selenoésteres de oxopropilo			
Ref.	Estructura		
V.A1			
V.B Selenoésteres de oxobutilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
V.B1		V.B2	

Procesos sintéticos

A continuación se exponen los compuestos englobados en la quinta serie:

4-Clorobenzoselenoato de oxopropilo

Referencia	V.A1	
Peso Mol.	275,60	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₉ ClO ₂ Se	
Punto Fusión	41 - 42 °C	
Aspecto	Sólido blanco	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,11 g (0,81 mL) de cloruro de 4-clorobenzofilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 0,59 gramos (0,51 mL) de 1-cloro-2-propanona (6,33 mmol), dejándola reaccionar a 50 °C durante 1 hora. Se forma un precipitado que por filtración rinde un sólido esponjoso que se purifica tratándolo con 50 mL de cloruro de metileno para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (2×40 mL), se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra de nuevo, y se elimina el diclorometano a presión reducida, obteniéndose un líquido a partir del cual precipita un sólido blanco al secar a vacío (0,945 g, 54 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3078 (d, tensión C–H aromático); 2965, 2921 (d, tensión C–H alifático); 1709 (f, tensión C=O de cetona); 1660 (f, tensión C=O de selenoéster).

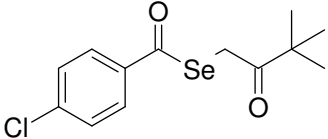
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,37 (s, 3H, COCH₃); 3,94 (s, 2H, SeCH₂); 7,48 (d, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 7,87 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 2,28 (s, 3H, COCH₃); 4,05 (s, 2H, SeCH₂); 7,66 (d, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 7,91 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 29,1 (SeCH₂); 35,0 (COCH₃); 129,1 (2C₂); 129,7 (2C₃); 136,7 (C₄); 141,1 (C₁); 192,0 (COSe); 203,7 (COCH₃).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 274 (M⁺-2, 1), **139/141** (100/33, Cl), **111/113** (46/15, Cl), 94 (2), **85/87** (4/1, Cl), 75 (34), 50 (15).

CHN - C ₁₀ H ₉ ClO ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	43,58	3,29
<i>Hallado</i>	43,30	3,27

4-Clorobenzoselenoato de 3,3-dimetil-2-oxobutilo

Referencia	V.B1	
Peso Mol.	317,68	
Fórmula Mol.	C ₁₃ H ₁₅ ClO ₂ Se	
Punto Fusión	119 - 120 °C	
Aspecto	Sólido blanco	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,11 g (0,81 mL) de cloruro de 4-clorobenzoílo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 0,85 g (0,83 mL) de 1-cloropinacolona (6,33 mmol), dejándola reaccionar a 50 °C durante 1 hora. Se forma un precipitado que por filtración rinde un sólido esponjoso que se purifica tratándolo con 50 mL de diclorometano para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (2×40 mL), se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra de nuevo, y se elimina el diclorometano a presión reducida, obteniéndose un líquido amarillo a partir del cual precipita un sólido blanco al secar a vacío (1,184 g, 59 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$) 3092 (d, tensión C–H aromático); 2969, 2928, 2871 (f, tensión C–H alifático); 1718 (f, tensión C=O de cetona); 1665 (f, tensión C=O de selenoéster); 1583, 1482 (m, tensión C–C aromático).

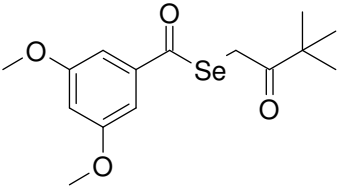
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,29 (s, 9H, C(CH₃)₃); 4,19 (s, 2H, SeCH₂); 7,46 (d, $J_{3-2} = 8,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,86 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 1,20 (s, 9H, C(CH₃)₃); 4,31 (s, 2H, SeCH₂); 7,65 (d, $J_{3-2} = 8,4$ Hz, 2H, 2H₃); 7,91 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,1 (SeCH₂); 32,0 (C(CH₃)₃); 45,2 (C(CH₃)₃); 128,9 (2C₂); 129,6 (2C₃); 137,2 (C₄); 140,7 (C₁); 192,8 (COSe); 210,4 (COC(CH₃)₃).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 195 (4), 151 (11), **139/141 (100/31, Cl)**, **111/113 (40/13, Cl)**, 105 (20), 99 (4), 91 (6), 85 (12), 77 (21), 75 (29), 57 (73), 51 (17).

CHN - C ₁₃ H ₁₅ ClO ₂ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	49,15	4,76
<i>Hallado</i>	49,08	4,82

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de 3,3-dimetil-2-oxobutilo

Referencia	V.B2	
Peso Mol.	343,28	
Fórmula Mol.	C ₁₅ H ₂₀ O ₄ Se	
Punto Fusión	67 - 70 °C	
Aspecto	Sólido blanco pulverulento	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,50 g de borohidruro sódico (13,21 mmol) sobre una suspensión de 0,50 g de selenio gris (6,33 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,27 gramos de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 0,85 g (0,83 mL) de 1-cloropinacolona (6,33 mmol), dejándola reaccionar a 50 °C durante 1 hora. Se forma un precipitado que por filtración rinde un sólido esponjoso que se purifica tratándolo con 50 mL de cloruro de metileno para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (2×40 mL), se seca y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, obteniéndose un líquido amarillo a partir del cual precipita un sólido blanco pulverulento al secar a vacío (1,239 g, 57 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$) 3091, 3006 (d, tensión C–H aromático); 2972, 2938, 2870, 2838 (f, tensión C–H alifático); 1713 (f, tensión C=O de cetona); 1668 (f, tensión C=O de selenoéster); 1591, 1473, 1457 (f, tensión C–C aromático).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 1,29 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,85 (s, 6H, OCH₃); 4,16 (s, 2H, SeCH₂); 6,70 (t, $J_{4-2} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 7,05 (d, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 1,20 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,82 (s, 6H, OCH₃); 4,27 (s, 2H, SeCH₂); 6,86 (s, 1H, H₄); 6,95 (s, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 27,7 (SeCH₂); 31,8 (C(CH₃)₃); 45,2 (C(CH₃)₃); 56,6 (OCH₃); 104,5 (2C₂); 106,0 (C₄); 140,7 (C₁); 161,4 (2C₃); 193,9 (COSe); 210,7 (COC(CH₃)₃).

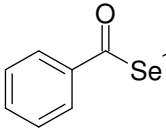
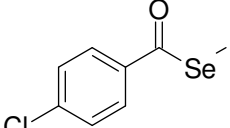
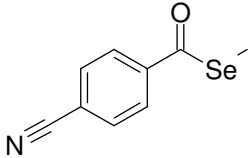
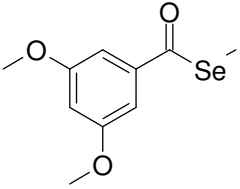
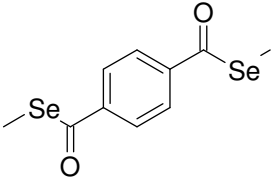
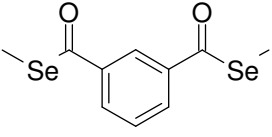
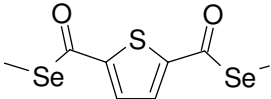
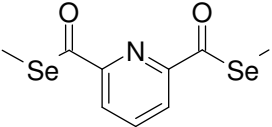
EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 342 (M⁺-2, 1), 165 (100), 137 (16), 122 (20), 107 (8), 94 (3), 92 (4), 79 (6), 77 (9), 63 (8), 57 (20), 51 (4).

CHN - C ₁₅ H ₂₀ O ₄ Se	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	52,48	5,87
Hallado	52,37	5,92

Serie VI: Selenoésteres de metilo

En este trabajo de investigación se han sintetizado cuatro derivados arílicos mono y cuatro disustituidos con un resto CO-SeCH₃, debido al interés que presenta el grupo selenometilo al ser biológicamente activos muchos compuestos organoselénicos que lo contienen. Dentro de esta serie agrupamos las estructuras sintetizadas en función de si están mono (*Subserie VI.A*) o difuncionalizados (*Subserie VI.B*); mostrándose las estructuras de los compuestos aislados en la *Tabla 6.8*.

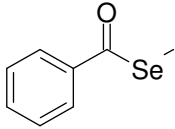
Tabla 6.8: Estructuras de los selenoésteres de metilo obtenidos.

VI.A Selenoésteres de metilo			
Ref.	Estructura	Ref.	Estructura
VI.A1		VI.A2	
VI.A3		VI.A4	
VI.B Diselenodiésteres de dimetilo			
Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
VI.B1		VI.B2	
VI.B3		VI.B4	

Procesos sintéticos

A continuación se exponen los compuestos englobados en la *Serie VI*:

Benzoselenoato de metilo

Referencia	VI.A1	
Peso Mol.	199,11	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₈ OSe	
Punto Fusión	Líquido a T.A.	
Aspecto	Líquido amarillo anaranjado brillante	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,78 gramos (1,46 mL) de cloruro de benzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 1 hora, hasta que se decolora la disolución y aparece el producto como un líquido inmiscible en el medio de reacción acuoso. La mezcla de reacción se decanta para separar de la fracción acuosa un aceite dorado, el cual se suspende en 50 mL de diclorometano para ser lavado con agua (3×30 mL). Se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro, se filtra y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, obteniéndose un líquido amarillo que se purifica suspendiéndolo en 100 mL de éter y manteniéndolo 48 h en agitación con adsorbentes (silica gel, carbón activo). Al filtrar, secar y eliminar el éter a presión reducida se obtiene un líquido amarillo brillante (1,316 g, 52 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3060, 3029 (d, tensión C-H aromáticos); 2932 (d, tensión C-H alifáticos); 1673 (f, tensión C=O de selenoéster); 1596, 1581, 1447 (d, tensión C-C aromático).

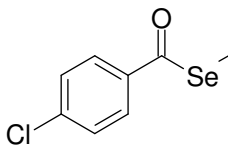
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,42 (s, 3H, SeCH₃); 7,48 (tt, $J_{3-4} = 7,7$ Hz, $J_{3-2} = 7,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,61 (tt, $J_{4-2} = 1,2$ Hz, 1H, H₄); 7,93 (dd, 2H, 2H₂). DMSO-*d*₆, δ : 2,35 (s, 3H, SeCH₃); 7,57 (t, $J_{3-2} = 7,6$ Hz, $J_{3-4} = 7,5$ Hz, 2H, 2H₃); 7,72 (t, 1H, H₄); 7,89 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 5,5 (SeCH₃); 127,5 (2C₂); 129,2 (2C₃); 133,9 (C₄); 139,4 (C₁); 195,3 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 196/197/198/200 (M⁺, 1/1/1/3, Se), 105 (100), 77 (58), 51 (17).

CHN: No ha sido posible la realización de un Análisis Elemental de este compuesto líquido debido a sus propiedades fisicoquímicas.

4-Clorobenzoselenoato de metilo

Referencia	VI.A2	
Peso Mol.	233,56	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₇ ClOSe	
Punto Fusión	46 - 47 °C	
Aspecto	Sólido grumoso amarillo pálido	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,22 g (1,63 mL) de cloruro de 4-clorobenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 1 hora, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, aislándose un sólido anaranjado que se purifica tratándolo con 150 mL de éter/diclorometano (1:1) para solubilizar el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (3×50 mL), se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra de nuevo y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, obteniéndose un sólido grumoso amarillo pálido (2,341 g, 79 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3093 (d, tensión C-H aromáticos); 2963, 2928 (d, tensión C-H alifáticos); 1668 (f, tensión C=O de selenoéster); 1585, 1572, 1483 (m tensión C-C aromático).

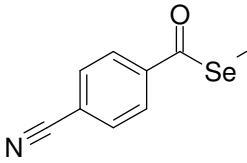
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,42 (s, 3H, SeCH₃); 7,45 (d, $J_{3-2} = 8,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,87 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 2,36 (s, 3H, SeCH₃); 7,64 (d, $J_{3-2} = 8,6$ Hz, 2H, 2H₃); 7,90 (d, 2H, 2H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 5,8 (SeCH₃); 128,8 (2C₂); 129,5 (2C₃); 137,7 (C₄); 140,3 (C₁); 194,1 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 232/234/236 (M⁺, 1/2/1, Se, Cl), 139/141 (100/34, Cl), 111/113 (39/13, Cl), 85 (7), 75 (12), 50 (6).

CHN - C ₈ H ₇ ClOSe	% Carbono	% Hidrógeno
Calculado	41,14	3,02
Hallado	40,98	2,92

4-Cianobenzoselenoato de metilo

Referencia	VI.3	
Peso Mol.	224,12	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₇ NOSe	
Punto Fusión	104 - 108 °C	
Aspecto	Sólido rojizo	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,06 gramos de cloruro de 4-cianobenzóilo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 1 hora, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, aislándose un sólido anaranjado que se purifica tratándolo con 50 mL de diclorometano para disolver el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (3×50 mL), se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra de nuevo y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, obteniéndose un sólido rojizo (2,020 g, 71 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3091, 3063 (m, tensión C-H aromáticos); 2938 (d, tensión C-H alifáticos); 2229 (f, tensión C≡N de nitrilo); 1665 (f, tensión C=O de selenoéster).

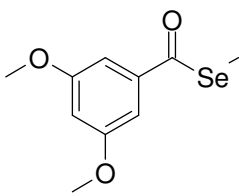
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,47 (s, 3H, SeCH₃); 7,79 (d, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, 2H, 2H₃); 8,01 (d, 2H, 2H₂). **DMSO-*d*₆**, δ : 2,41 (s, 3H, SeCH₃); 8,04 (d, $J_{2-3} = 2,6$ Hz, 4H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 6,2 (SeCH₃); 117,1 (CN); 118,2 (C₄); 127,8 (2C₂); 133,1 (2C₃); 142,3 (C₁); 194,4 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 221/222/223/225/227 (M⁺, 1/1/1/2/1, Se), 210 (1), 130 (100), 102 (42), 76 (9), 75 (12), 50 (6).

CHN - C ₉ H ₇ NOSe	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	48,23	3,15	6,25
Hallado	47,90	3,18	6,15

3,5-Dimetoxibenzoselenoato de metilo

Referencia	VI.A4	
Peso Mol.	259,17	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₂ O ₃ Se	
Punto Fusión	54 - 55 °C	
Aspecto	Sólido grumoso blanco	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 2,54 g de cloruro de 3,5-dimetoxibenzoílo (12,66 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante una hora. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 1 hora, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, aislándose un sólido anaranjado que se purifica tratándolo con 50 mL de diclorometano para disolver el derivado y retirar las impurezas sólidas por filtración. La disolución filtrada se lava con agua (3×50 mL), se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra de nuevo y se elimina el disolvente orgánico a presión reducida, obteniéndose un sólido grumoso blanco (2,374 g, 72 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3105, 3034, 3001 (d, tensión C-H aromáticos); 2963, 2937, 2836 (m, tensión C-H alifáticos); 1672 (f, tensión C=O de selenoéster).

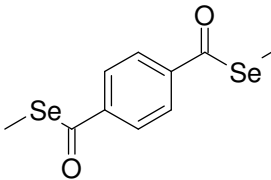
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,40 (s, 3H, SeCH₃); 3,86 (s, 6H, OCH₃); 6,69 (t, $J_{4-3} = 2,3$ Hz, 1H, H₄); 7,07 (d, 2H, 2H₃). DMSO-*d*₆, δ : 2,34 (s, 3H, SeCH₃); 3,81 (s, 6H, OCH₃), 6,84 (t, $J_{4-3} = 2,2$ Hz, 1H, H₄); 6,95 (d, 2H, 2H₃).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 5,7 (SeCH₃); 56,0 (OCH₃); 105,2 (2C₂); 106,2 (C₄); 141,4 (C₁); 161,3 (2C₃); 195,3 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 260 (M⁺, 2), 217 (1), 165 (100), 137 (35), 122 (28), 107 (15), 94 (5), 92 (5), 79 (9), 77 (13), 69 (7), 63 (13), 51 (9).

CHN - C ₁₀ H ₁₂ O ₃ Se	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	46,35	4,67
<i>Hallado</i>	46,32	4,67

Benceno-1,4-dicarbosenolato de dimetilo

Referencia	VI.B1	
Peso Mol.	320,11	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₀ O ₂ Se ₂	
Punto Fusión	111 - 112 °C	
Aspecto	Sólido pulverulento amarillo	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,29 g de cloruro de tereftaloilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante 90 minutos. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 4 horas, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, obteniéndose un sólido pulverulento amarillo (1,511 g, 75 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3297 (d, armónico tensión C=O de selenoéster); 3085 (d, tensión C-H aromáticos); 2928 (d, tensión C-H alifáticos); 1493 (d, tensión C-C aromático); 1655 (f, tensión C=O de selenoéster); 1198 (f, tensión C-Se); 867, 838 (f, vibración C-H aromáticos fuera del plano).

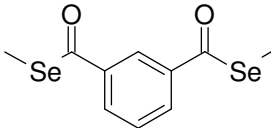
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,45 (s, 6H, SeCH₃); 7,99 (s, 4H, H_{Ar}). DMSO-d₆, δ : 2,40 (s, 6H, SeCH₃); 8,04 (s, 4H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 6,0 (SeCH₃); 127,8 (4C₂); 142,8 (2C₁); 194,8 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 318/319/320/**322**/324 (M⁺, 1/1/2/2/1, 2Se), 221/223/224/225/**227**/229 (2/20/19/52/**100**/18, Se), 213 (1), 193/195/196/197/**199**/201 (1/4/4/10/**21**/4, Se), 184 (3), 132 (46), 104 (90), 91 (7), 76 (42), 50 (14).

CHN - C ₁₀ H ₁₀ O ₂ Se ₂	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	37,52	3,15
<i>Hallado</i>	37,36	2,95

Benceno-1,3-dicarboselenolato de dimetilo

Referencia	VI.B2	
Peso Mol.	320,11	
Fórmula Mol.	C ₁₀ H ₁₀ O ₂ Se ₂	
Punto Fusión	59 - 61 °C	
Aspecto	Sólido grumoso blanco anaranjado.	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,29 g de cloruro de isoftaloílo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante 90 minutos. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 4 horas, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, obteniéndose un sólido grumoso blanco anaranjado (1,710 g, 84 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3059 (d, tensión C-H aromáticos); 2932 (d, tensión C-H alifáticos); 1653 (f, tensión C=O de selenoéster).

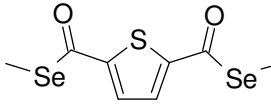
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,45 (s, 6H, SeCH₃); 7,59 (t, $J_{5-4} = 7,8$ Hz, 1H, H₅); 8,12 (ddt, $J_{4-2} = 1,8$ Hz, 2H, H₄+H₆); 8,42 (t, 1H, H₂).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 6,0 (SeCH₃); 125,9 (C₅); 129,8 (C₂); 131,9 (C₄+C₆); 140,0 (C₁+C₃); 194,5 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 318/319/320/**322**/324 (M⁺, 1/1/1/2/1, Se), 221/223/224/225/**227**/229 (2/19/18/50/**100**/18, Se), 213 (1), 197/**199** (1/2, Se), 135 (2), 132 (2), 119 (2), 104 (56), 91 (7), 76 (35), 50 (9).

CHN - C ₁₀ H ₁₀ O ₂ Se ₂	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	37,52	3,15
<i>Hallado</i>	37,16	3,15

Tiofen-2,5-dicarboselenolato de dimetilo

Referencia	VI.B3	
Peso Mol.	326,14	
Fórmula Mol.	C ₈ H ₈ O ₂ SSe ₂	
Punto Fusión	99 - 101 °C	
Aspecto	Sólido amarillo brillante	

Procedimiento Experimental

Se adicionan lentamente y con agitación 0,73 g de borohidruro sódico (19,30 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (9,28 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 0,97 g de dicloruro de 2,5-tiofendicarbonilo (4,64 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante 90 minutos. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 4 horas, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, obteniéndose un sólido amarillo brillante (1,042 g, 69 % de rendimiento).

IR (KBr, $\tilde{\nu}$): 3076 (d, tensión C-H aromáticos); 2928 (d, tensión C-H alifáticos); 1654 (f, tensión C=O de selenoéster), 1510, 1418 (d, tensión C-C aromático); 1168 (f, tensión C-Se); 813, 778 (f, vibración C-C aromático).

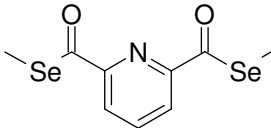
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,46 (s, 6H, SeCH₃); 7,75 (s, 2H, H₃+H₄).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 6,2 (SeCH₃); 130,9 (C₃+C₄); 148,9 (C₂+C₅); 186,2 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (ab. rel.): 322/323/324/325/326/**328**/330 (M⁺, 1/1/2/1/3/4/1, 2Se), 227/229/230/231/**233**/235 (3/19/17/48/**100**/22, Se), 199/201/202/203/**205**/207 (7/6/17/**36**/8, Se), 186/187/188/**190**/192 (1/1/3/7/2, Se), 165 (36), 138 (30), 110 (63), 82 (22), 122 (4), 92 (10), 105 (60), 77 (26), 51 (10).

CHN - C ₈ H ₈ O ₂ SSe ₂	% Carbono	% Hidrógeno
<i>Calculado</i>	29,46	2,47
<i>Hallado</i>	29,55	2,79

Piridin-2,6-dicarboselenolato de dimetilo

Referencia	VI.B4	
Peso Mol.	321,10	
Fórmula Mol.	C ₉ H ₉ NO ₂ Se ₂	
Punto Fusión	135 - 136 °C	
Aspecto	Sólido amarillo	

Procedimiento Experimental

Se adiciona lentamente y con agitación 1,00 g de borohidruro sódico (26,43 mmol) sobre una suspensión de 1,00 g de selenio gris (12,66 mmol) en 20 mL de agua, dejándolos reaccionar a temperatura ambiente hasta que concluya el desprendimiento de gases; entonces se añaden 1,29 g de dicloruro de 2,6-piridindicarbonilo (6,33 mmol), manteniendo la disolución a 50 °C con agitación durante 90 minutos. Después se filtra y sobre el líquido filtrado se añaden 1,5 mL de yoduro de metilo (exceso), dejándolo reaccionar a 50 °C durante 4 horas, hasta que se produce la formación de precipitado y se decolora totalmente la disolución. El precipitado anterior se filtra y se seca, aislándose un sólido amarillo que se recrystaliza de cloroformo para obtener un sólido amarillo (0,894 g, 44 % de rendimiento).

IR (*KBr*, $\tilde{\nu}$): 3102 (d, tensión C-H aromáticos); 2926 (d, tensión C-H alifáticos); 1655 (f, tensión C=O de selenoéster); 1679 (f, tensión asimétrica C-Se).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 2,38 (s, 6H, SeCH₃); 8,03 (ddd, $J_{4-3} = 8,4$ Hz, 1H, H₄); 2,09 (dd, 2H, H₃+H₅). **DMSO-*d*₆**, δ : 2,30 (s, 6H, SeCH₃); 8,15 (d, $J_{3-4} = 7,8$ Hz, 2H, H₃+H₅); 2,09 (t, 1H, H₄).

¹³C-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 5,6 (SeCH₃); 122,8 (C₃+C₅); 139,6 (C₄); 152,5 (C₂+C₆); 197,9 (COSe).

EM (70 eV) *m/z* (abundancia relativa): 319/321/**323**/325 (M⁺+1, 2/4/4/1, Se), 255/256/257/**259**/261 (1/1/3/5/1, Se), 224/225/226/**228**/230 (2/2/4/8/2, Se), 196/197/198/**200**/202 (2/2/4/8/2, Se), 164 (30), 137 (100), 92 (10), 77 (26), 51 (10).

CHN - C ₉ H ₉ NO ₂ Se ₂	% Carbono	% Hidrógeno	% Nitrógeno
Calculado	33,67	2,83	4,36
Hallado	33,29	2,74	4,27

VII. Análisis Orgánico

VII. ANÁLISIS ORGÁNICO

1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

En la determinación estructural de los grupos funcionales presentes en un compuesto orgánico la espectroscopía de infrarrojo es una herramienta de gran valor en vías sintéticas en cuyo desarrollo se van modificando grupos funcionales fácilmente observables en un espectro infrarrojo, al permitir verificar si se produce la reacción y en qué grado lo hace. En consecuencia, es una técnica muy útil en la síntesis de los selenoésteres presentados en este trabajo, al permitir determinar si el cloruro de ácido empleado como reactivo se ha convertido en el selenoderivado deseado.

A continuación se efectuará un análisis general del espectro tipo de un selenoéster para continuar con un estudio de la banda asociada a la tensión C=O del carbonilo de selenoéster en los espectros de los diferentes compuestos sintetizados en este trabajo. Finalmente, se analizará un espectro representativo de cada serie para estudiar las bandas asociadas a los grupos funcionales presentes en los derivados de cada serie. Para la asignación de las diferentes bandas, se han empleado las tablas espectroscópicas de Pretsch y colaboradores²³⁰.

Espectro infrarrojo de un selenoéster

La banda más característica del espectro infrarrojo de un selenoéster es la del carbonilo de selenoéster, observada en el intervalo de 1.715 a 1.640 cm^{-1} . Asimismo, es importante destacar que la mayoría de los selenoésteres presentan un segundo carbonilo en el sustituyente *R*, con lo cual tendrán una segunda banda de carbonilo, de intensidad comparable con la del selenoéster; siendo el intervalo de la misma dependiente del grupo funcional presente en la molécula estudiada (ácido, amida, éster o cetona).

Otras bandas características observables y diferentes de las bandas anteriores son las tensiones C-H de los hidrógenos aromáticos y alifáticos presentes en la molécula, en los intervalos de 3.150 a 3.000 y de 3.000 a 2.700 cm^{-1} , respectivamente. En la mayoría de los espectros, por último, son visibles las bandas asociadas a las tensiones C-C del esqueleto carbonado de los anillos aromáticos y heteroaromáticos (intervalo de 1.600 a 1.400 cm^{-1}).

Finalmente, en función de otros grupos presentes en cada serie o derivado, según corresponda, se encuentran bandas adicionales. En la descripción de los espectros infrarrojos se detallarán las bandas de los carbonilos y las bandas diferenciadoras de las distintas series.

Tensión C=O de carbonilo de selenoéster

Como se ha comentado en el apartado anterior, las bandas más características del espectro infrarrojo de los selenoésteres son las asociadas a los carbonilos presentes en el mismo, y, en especial, al carbonilo de selenoéster, presente en todos los derivados.

Las bandas de carbonilo de los selenoésteres enlazados al anillo aromático o heteroaromático a través de un espaciador alifático aparecen normalmente dentro del intervalo de 1.713 a 1.682 cm^{-1} . Cuando el selenoéster está directamente unido al anillo aromático o heteroaromático la banda aparece a un menor número de ondas, en el intervalo 1.695-1.643 cm^{-1} . Experimentalmente se observa que los carbonilos de los selenoésteres aromáticos aparecen a menor número de ondas que los correspondientes oxoésteres aromáticos²³⁰, posiblemente debido a que la menor electronegatividad del selenio respecto al oxígeno hace que la polarización inducida por el átomo de selenio sobre el enlace C=O sea menor; y, por lo tanto, también sea menor la fuerza de enlace.

Al no estar tabulados los valores de frecuencia del carbonilo de selenoéster, y aprovechando el elevado número de carboximetilselenoésteres ($R = \text{CH}_2\text{COOH}$), se ha realizado un estudio de la frecuencia a la que cada derivado muestra la banda de absorción relacionada con dicho carbonilo. En este estudio, con el fin de abarcar un mayor número de compuestos, se consideran las frecuencias tanto de los selenoésteres presentados en este trabajo como de algunos previamente sintetizados por el grupo de investigación (derivados *DP-I.IT*).

Debido a la variedad estructural de los derivados incluidos, en la *Tabla 7.1* se han dividido en cuatro grupos. Así, en un primer grupo se analizan las variaciones de la frecuencia observadas al tener diferentes anillos aromáticos y heteroaromáticos sin sustituir. A continuación se estudia la influencia tanto de la presencia o no de un espaciador alifático entre el anillo y el carbonilo, como de la longitud del mismo. Finalmente, se valora por separado como afecta a la tensión infrarroja del carbonilo la inclusión sobre el anillo de un sustituyente donador o aceptor de electrones. En la tabla se marcan con un asterisco los derivados heteroaromáticos con sustituyentes, al no ser directamente comparables por no compartir el mismo anillo heterocíclico. A partir de los datos se pueden extraer algunas conclusiones, aunque el reducido número de compuestos no permite comprobar la generalidad de las mismas:

- Los selenoésteres unidos a heterociclos absorben a frecuencias menores que los unidos a grupos fenilo (salvo en el caso de la quinolina), posiblemente por la influencia de los heteroátomos. Se observa que los heterociclos π -excedentes (tiofeno, *I.B1*) disminuyen en mayor medida el número de ondas del carbonilo que los π -deficientes (pirazina, piridina, quinolina - restantes derivados *I.B*). Asimismo, al no ser equivalentes entre sí las distintas posiciones en los heterociclos, dentro de un mismo heterociclo se encuentran variaciones del número de ondas observado en función de la posición relativa con respecto al heteroátomo (quinolina - *I.B6 / I.B7*, piridina - *I.B2 / I.B3*).

- En los carbociclos, el aumento de la conjugación al pasar de benceno a naftaleno se traduce en una disminución de la frecuencia de la tensión del carbonilo.
- Los carbonilos que absorben a mayores números de ondas son los correspondientes a los compuestos que tienen un espaciador alifático entre el carbonilo de selenoéster y el anillo aromático.
- Aunque no todos los selenoésteres lo cumplan, puede afirmarse que en general los derivados con sustituyentes donadores unidos a los anillos aromáticos (metilendioxi, *terc*-butilo, tiopropilo, trimetoxilo) presentan estos carbonilos a menor números de onda que aquellos que contienen sustituyentes electroatrayentes (bromo, cloro, yodo). Las excepciones, más comunes en el caso de los sustituyentes electrodonantes, pueden deberse a la influencia de otros factores como la posición de los sustituyentes sobre el anillo.

Tabla 7.1: Número de ondas (en cm^{-1}) de la tensión C-O de carbonilo de selenoéster, en función de su entorno químico. Derivados con $R = \text{CH}_2\text{COOH}$.

Anillos en R'			Espaciadores en R'		
Ref	R'	$\bar{\nu}$ CO	Ref	R'	$\bar{\nu}$ CO
I.B1	2-tienilo	1.643	DP-I.IT2	Fenilo	1.679
I.B2	4-piridilo	1.659			
DP-I.IT9	Naftilo	1.671	I.A1	Feniletilo	1.686
I.B3	3-piridilo	1.673			
I.B5	2-pirazinilo	1.674	DP-I.IT8	Fenilmetilo	1.689
I.B7	3-quinolilo	1.675			
DP-I.IT2	Fenilo	1.679	I.A2	Difenilmetilo	1.693
I.B6	2-quinolilo	1.690			
R' con sustituyentes electrodonadores			R' con sustituyentes electroatrayentes		
Ref	R'	$\bar{\nu}$ CO	Ref	R'	$\bar{\nu}$ CO
I.A7	4- <i>terc</i> -butilfenilo	1.666	I.A5	2-yodofenilo	1.677
I.B4*	3-(2-tiopropilpiridilo)	1.668	DP-I.IT2	Fenilo	1.679
I.A10	3,4-metilendioxifenilo	1.675	I.A3	2-clorofenilo	1.681
I.A9	3,4,5-trimetoxifenilo	1.675	DP-I.IT6	4-cianofenilo	1.681
DP-I.IT2	Fenilo	1.679	I.A4	2-bromofenilo	1.684
DP-I.IT7	4-metilfenilo	1.691	I.A6	4-clorofenilo	1.686
I.A8	4-metoxifenilo	1.692	DP-I.IT1*	3-(2-cloropiridilo)	1.690
DP-I.IT3	3,5-dimetoxifenilo	1.695	DP-I.IT5	4-trifluorometilfenilo	1.694

A la vista de las observaciones anteriores una posible justificación puede encontrarse en que la cesión de carga por cualquier mecanismo (aumento de la conjugación, heterociclos π -excedentes, sustituyentes electrodonantes) desde el sistema

aromático al carbonilo conjugado reduce la carga parcial positiva portada por el carbono carbonílico, haciendo el enlace C=O más débil al no contribuir tanto la polarización a la unión, lo que se traduce en una disminución de la energía necesaria para hacer vibrar el enlace entre el carbono y el oxígeno.

En el otro extremo, la retirada de carga mediante la inclusión de un sustituyente electroatrayente o de un heterociclo π -deficiente acentúa la carga positiva parcial del carbono carbonílico aumentando la energía necesaria para tensionar el enlace, y, por ende, el número de ondas de la absorción correspondiente.

Cuando el resto R unido al selenio es diferente del grupo carboximetilo la variación estructural no es tan grande al sintetizarse únicamente derivados con restos R' seleccionados; con lo cual no se puede, con los datos disponibles, realizar un estudio similar en las restantes series.

Espectros IR de los derivados de las diferentes series

Serie I: Selenoésteres de carboxialquilo

Los selenoésteres de la *Serie I* incluyen un ácido carboxílico en el resto R , con lo cual presentan dos tensiones de carbonilo; apareciendo la banda de carbonilo de selenoéster en el intervalo de 1.713 a 1.643 cm^{-1} , y la del carbonilo de ácido, entre 1.720 y 1.697 cm^{-1} .

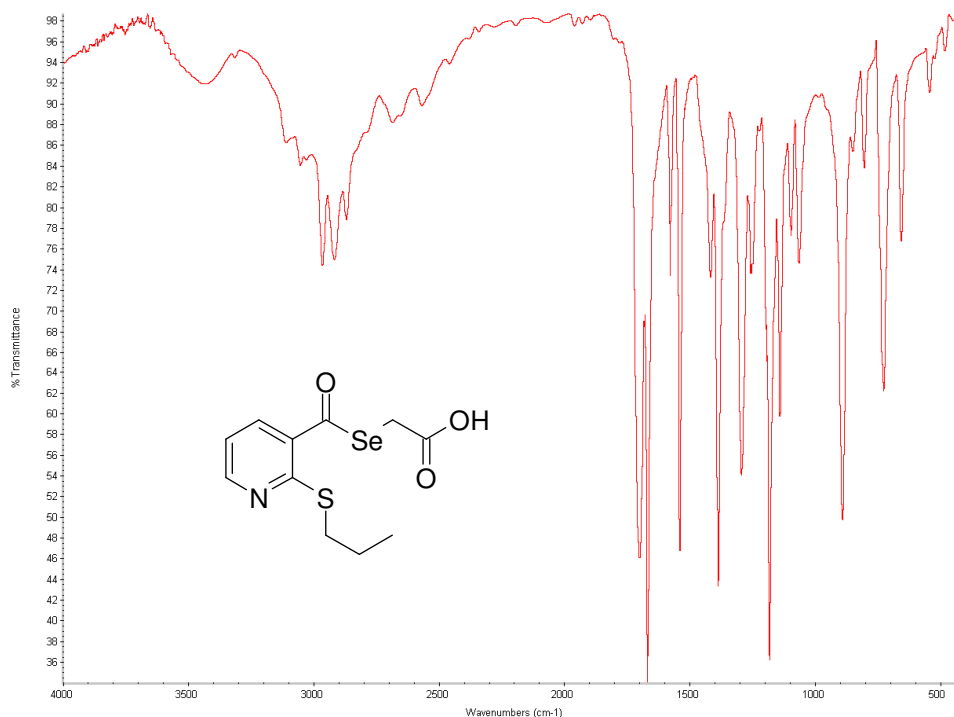


Figura 7.1: Espectro infrarrojo del derivado 1.B4.

Generalmente, la tensión COO-H de hidrógeno asociado es visible en los ácidos orgánicos como una banda ancha (intervalo de 3.500 a 2.500 cm^{-1}) y generalmente intensa. En los selenoésteres, sólo se observa una banda medianamente intensa de tensión O-H de ácido en los derivados de ácidos halobenzoicos y en el derivado del ácido 2-tiofencarboxílico. En los compuestos restantes esta tensión es apreciable, pero es menos intensa. Asimismo, se observa en la mayoría de los espectros una banda muy poco intensa de O-H libre a 3.400 cm^{-1} , con lo cual es posible que por influencia del selenio la banda O-H de ácido recuerde más a un alcohol que a un ácido carboxílico.

Se ha seleccionado como espectro infrarrojo representativo de la *Serie I* el espectro del 2-tiopropil-3-piridincarboselenolato de carboximetilo (*I.B4*, *Figura 7.1*). Las principales bandas de absorción observadas en dicho espectro son:

- 3.430 y 3.100-2.400 cm^{-1} : Tensión COO-H libre y asociado.
- 1.700 cm^{-1} : Tensión C=O de carbonilo de ácido carboxílico alifático.
- 1.668 cm^{-1} : Tensión C=O de carbonilo de selenoéster.

Serie II: Selenoésteres de carbamoilmetilo

La amida primaria es el grupo funcional característico de los derivados de la *Serie II*, observándose dos bandas intensas en la región del infrarrojo más energético (número de ondas > 3.100 cm^{-1} : 3.385-3.345 y 3.195-3.170 cm^{-1}), debida a las tensiones N-H. Las bandas restantes aparecen en la región del carbonilo, siendo la más destacada por su intensidad la del carbonilo de amida, la cual es observable en el intervalo de 1.660 a 1.625 cm^{-1} . La cuarta banda es la asociada a las vibraciones N-H, mostrada en el intervalo 1.636-1.580 con una intensidad media-alta.

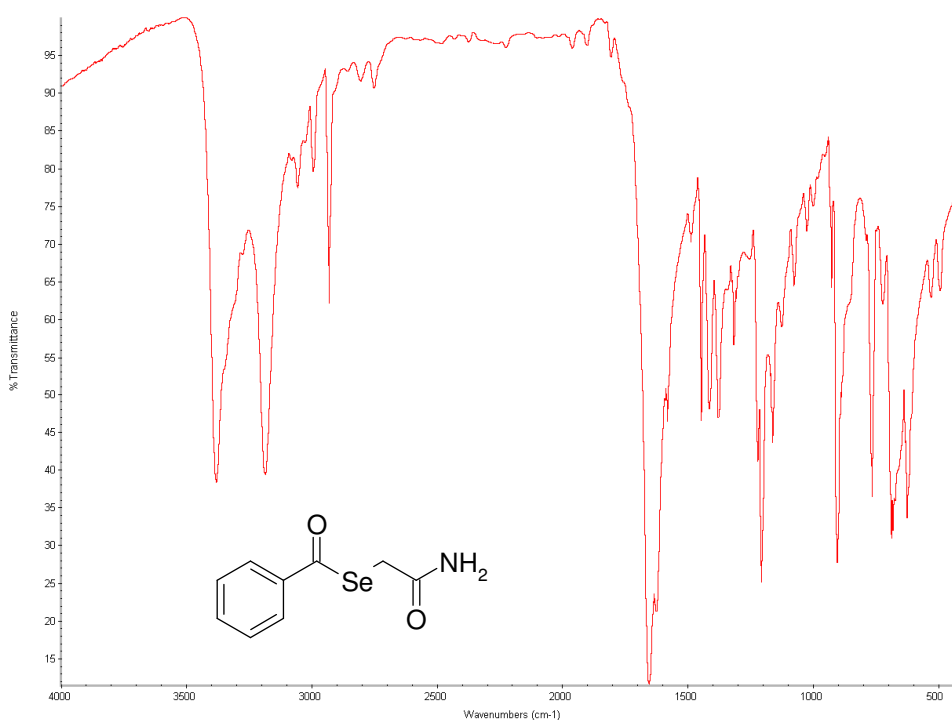


Figura 7.2: Espectro infrarrojo del derivado II.2.

En la región de carbonilo aparece también la banda del carbonilo de selenoéster, en el intervalo $1.697\text{-}1.654\text{ cm}^{-1}$.

Un espectro infrarrojo que puede considerarse representativo de la *Serie II* sería el del compuesto *II.2*, mostrado en la *Figura 7.2*. Las principales bandas observadas en el mismo son:

- 3.382 y 3.187 cm^{-1} : Tensiones N-H de amida primaria.
- 1.654 cm^{-1} : Tensión C=O de carbonilo de selenoéster.
- 1.625 cm^{-1} : Tensión C=O de carbonilo de amida.
- 1.636 cm^{-1} : Vibración N-H.

Serie III: Selenoanhídridos

El espectro infrarrojo del selenoanhídrido presenta diferencias significativas con respecto a otros selenoésteres, debido a la simetría molecular de este derivado. La señal de carbonilo de selenoéster se desdobra en una banda antisimétrica y en otra simétrica, a frecuencias de 1.749 y 1.685 cm^{-1} . Por otro lado, tal y como puede observarse en la *Figura 7.3*, la región de la huella dactilar (números de ondas inferiores a 1.500 cm^{-1}) se simplifica notablemente al anularse todas aquellas vibraciones y tensiones simétricas con respecto al plano de simetría presente en el derivado. Una consecuencia de esta simplificación debida a la simetría es la posibilidad de identificar en este espectro la tensión C-Se como una banda de intensidad media-alta a 1.210 cm^{-1} .

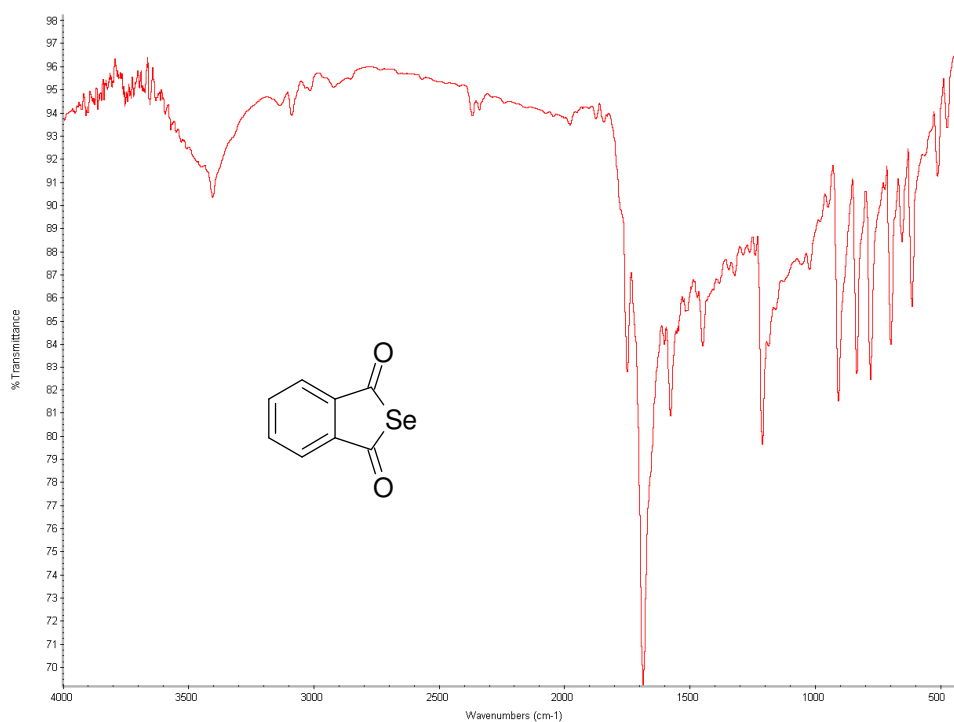


Figura 7.3: Espectro infrarrojo del derivado III.1.

Series IV-V: Selenoésteres de R''-oxicarbonilalquilo y de acilalquilo.

Los grupos funcionales presentes en los restos *R* de los derivados de las Series IV y V son los ésteres y las cetonas. Ambos se caracterizan por mostrar como única absorción típica identificable en infrarrojo la banda de carbonilo, con lo cual se estudian conjuntamente, señalando las diferencias de frecuencia observadas.

Los intervalos de números de ondas observados en estas series para las bandas de carbonilo son los siguientes:

- 1.752 - 1.728 cm^{-1} : Tensión C-O de carbonilo de éster alifático (*Serie IV*).
- 1.718 - 1.709 cm^{-1} : Tensión C-O de carbonilo de cetona alifático (*Serie V*).
- 1.714 - 1.697 cm^{-1} : Tensión C-O de carbonilo de selenoéster alifático (*Serie IV*).
- 1.692 - 1.671 cm^{-1} : Tensión C-O de carbonilo de selenoéster aromático (*Serie IV*).
- 1.668 - 1.660 cm^{-1} : Tensión C-O de carbonilo de selenoéster aromático (*Serie V*).

A partir de los datos anteriores se aprecia que las frecuencias de los dos carbonilos son menores en la *Serie V*. En cualquier caso, en todos los derivados la separación entre ambas bandas es significativa (30-75 cm^{-1}), encontrándose siempre, en consecuencia, claramente diferenciadas, al contrario que en las Series I y II.

Para mostrar la mayor complejidad de los espectros infrarrojos que contienen un sustituyente *terc*-butílico se ha seleccionado el espectro infrarrojo del derivado IV.B4 (3,5-dimetoxibenzoselenoato de *terc*-butiloxicarbonilmetilo) como representativo de las Series IV-V y de los derivados mencionados. En dicho espectro (*Figura 7.4*) destacan las bandas de carbonilo de éster carboxílico (1.735 cm^{-1}) y de carbonilo de selenoéster (1.671 cm^{-1}).

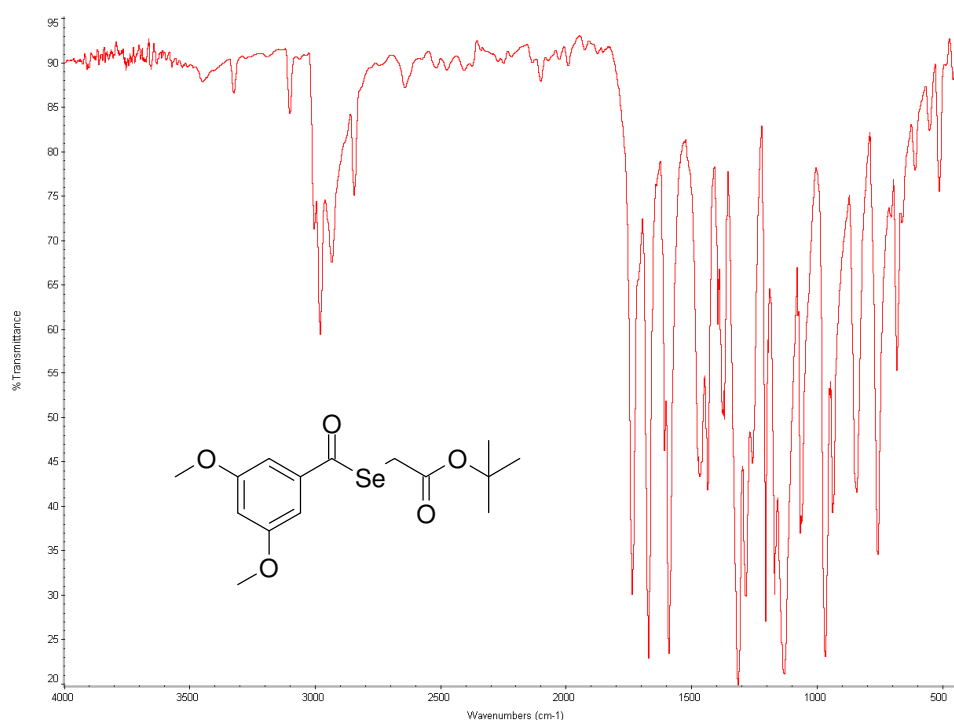


Figura 7.4: Espectro infrarrojo del derivado IV.B4.

Serie VI: Selenoésteres de metilo

Los derivados de esta última serie, al no tener grupos funcionales carbonílicos en el resto *R* unido a selenio, muestran únicamente la banda de carbonilo de selenoéster, en el intervalo de 1.673 a 1.665 cm^{-1} en los derivados con un grupo COSe y de 1.655 a 1.653 cm^{-1} en aquellos difuncionalizados con dos selenoésteres.

Entre las restantes bandas observables destacan por su intensidad o por su fácil identificación las tensiones C-H aromático y alifático, así como las tensiones C-C del esqueleto del anillo en todos los derivados, más la tensión C-N de nitrilo a 2.229 cm^{-1} en el compuesto VI.A3. Teniendo en cuenta que la complejidad de la región de frecuencia inferior a 1.600 cm^{-1} aumenta al incluir sustituyentes sobre el anillo, se toma como ejemplo de los derivados monosustituídos el espectro del benzoselenoato de metilo (VI.A1, Figura 7.5), cuyas bandas de absorción de carbonilo de selenoéster se muestra a 1.673 cm^{-1} .



Figura 7.5: Espectro infrarrojo del derivado VI.A1.

Al ganar simetría la molécula por la introducción de un segundo grupo COSeCH₃ el espectro infrarrojo se simplifica al anularse un elevado número de señales debido a la existencia de planos de simetría molecular. Como ejemplo ilustrativo la Figura 7.6 muestra el espectro infrarrojo del benceno-1,4-dicarbosenolato de dimetilo (VI.B1), en el cual destacan las siguientes bandas de absorción:

- 1.655 cm^{-1} : Tensión C=O de carbonilo de selenoéster.
- 1.198 cm^{-1} : Tensión C-Se.
- 867 y 838 cm^{-1} : Vibración C-H aromáticos fuera del plano.

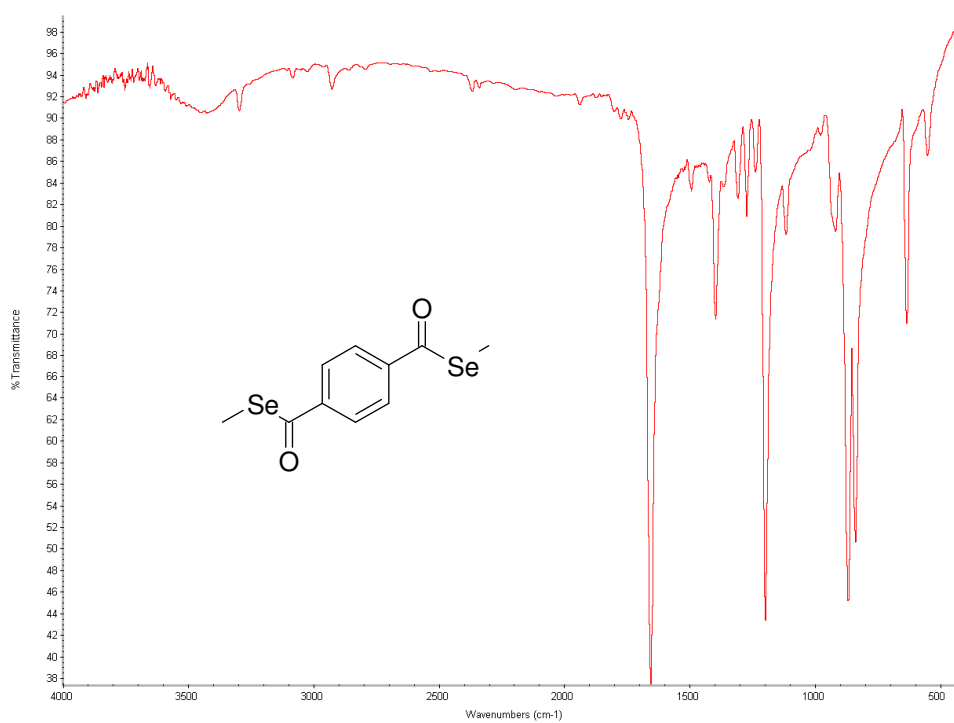


Figura 7.6: Espectro infrarrojo del derivado VI.B1.

2. ESPECTROSCOPIA DE RMN

La resonancia magnética nuclear ha sido en este trabajo de investigación la herramienta más potente en la determinación estructural de los selenoésteres obtenidos al permitir identificar inequívocamente cada compuesto. Aunque en la mayoría de los casos, gracias a la escasa complejidad estructural de los derivados, los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN permiten la identificación inequívoca, cuando han sido necesarios se han realizado experimentos bidimensionales que estudian las interacciones protón-protón (COSY) y protón-carbono (HMQC y HMBC) a corta y larga distancia. Por último, la técnica de la ^1H -RMN se ha empleado también para monitorizar la degradación de los compuestos en los ensayos de estabilidad.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtienen utilizando como disolvente cloroformo (CDCl_3) o dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) deuterados. El criterio es emplear preferentemente CDCl_3 , salvo que el derivado sea insoluble en cloroformo, al permitir dicho disolvente obtener espectros con señales más definidas, proporcionando, por ende, más información. En $\text{DMSO}-d_6$ las señales no aparecen bien definidas por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los grupos funcionales del derivado y el disolvente. No obstante, en la mayoría de los derivados se dispone de los desplazamientos (δ) en los dos disolventes al analizarse rutinariamente en cloroformo y luego, por la realización de los ensayos de estabilidad en $\text{DMSO}-d_6$, determinarse también los desplazamientos en este segundo disolvente. Como aclaración, los espectros de RMN citados de ahora en adelante se han obtenido en CDCl_3 , a menos que se indique expresamente lo contrario.

Espectroscopía de ^1H -RMN

Los selenoésteres no poseen un espectro de resonancia magnética nuclear de protón típico al variar el espectro obtenido en función de los sustituyentes R y R' presentes en la molécula. No obstante, tienen una señal característica: los hidrógenos del grupo metilo o metileno (dependiendo de la serie) directamente enlazado al selenio.

Cuando el grupo metileno se sitúa entre el selenio y un carbono carbonílico la señal es visible en el intervalo de desplazamiento químico (δ) de 3,45 a 4,19 ppm. Dependiendo del derivado carbonílico o carboxílico unido al metileno, la señal saldrá a δ menor o mayor dentro de dicho intervalo. Así, los mayores desplazamientos se observan en los selenoésteres de acilalquilo de la *Serie V* (3,94 - 4,19 ppm); mientras que los menores se observan en los carbamoilselenoésteres de la *Serie II* (3,45 - 3,73 ppm). En el caso de tener un metil selenoéster (*Serie VI*), y, en consecuencia, un grupo metilo en vez de metileno; la señal se observa a un δ químico menor, en el intervalo 2,38 - 2,47 ppm.

En ciertos derivados los intervalos de desplazamiento químico cambian al presentar el selenoéster cambios estructurales en R que afectan al metileno al modificar su entorno químico. Así, en *I.C2* y *IV.D1*, se incluye un metileno adicional entre el estudiado y el carbonilo de ácido y éster metílico, disminuyendo el δ a 3,07 y 3,08 ppm, respectivamente. Otras excepciones son *I.C1* y *I.D1*, en los cuales un hidrógeno del metileno se ha reemplazado por un grupo metilo o fenilo, respectivamente; hecho que aumenta el δ del hidrógeno restante a 4,41 y 5,20 ppm, respectivamente. Finalmente, *III.1* no tiene protones alifáticos al presentar un selenoanhídrido como grupo funcional.

La señal de los hidrógenos del metileno en la posición α con respecto al selenio suele aparecer flanqueada por dos señales satélites de menor intensidad (ver *Figura 7.7*) por el hecho de estar en un carbono contiguo al átomo de selenio, ya que es un núcleo activo en RMN, debido a la alta abundancia relativa del isótopo $^{77}\text{Se}^{230}$.

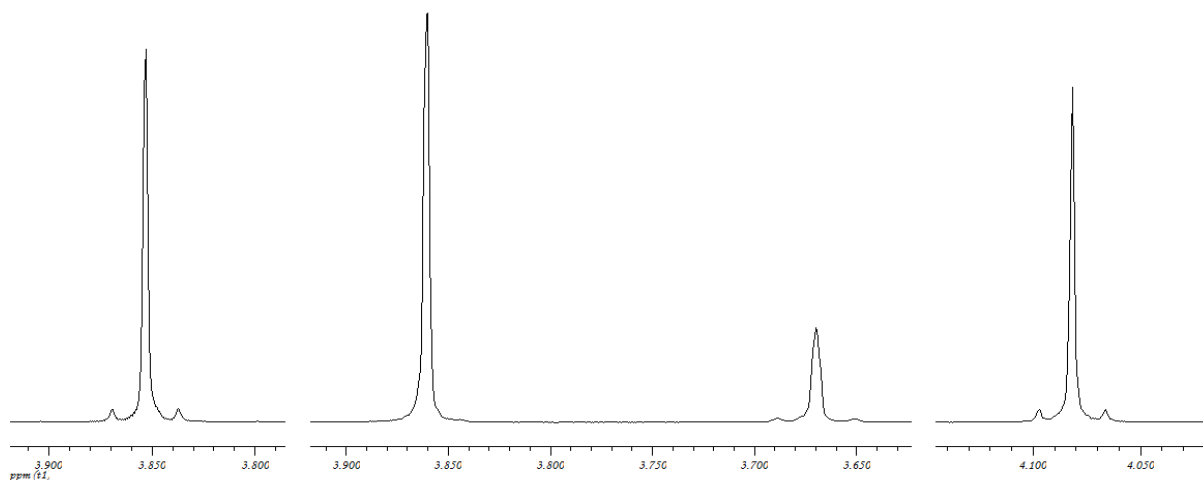


Figura 7.7. Señales satélites de la señal de hidrógenos de metileno con Selenio en α . CDCl_3 , selenoésteres I.A7 (izquierda), II.4 (centro) y IV.B3 (derecha).

En cuanto a las restantes señales, como ya se ha comentado, son dependientes de los R' y R presentes en cada selenoéster. A continuación se estudiarán brevemente las señales características encontradas en los R' más importantes y en los distintos R .

Señales de los principales R'

Salvo la excepción de los derivados con los restos R más complejos, como los de la Serie *IV.C*, la mayor parte de las señales observadas en los espectros varían en función del resto R' presente, el cual a su vez presenta una gran variabilidad entre los diferentes compuestos. En consecuencia, no es posible hablar en términos generales. No obstante, se observa que en los cuatro restos R' utilizados con mayor frecuencia a lo largo de las diferentes series, al encontrarse la parte variable de R a una distancia considerable respecto a dichos protones, las variaciones en los desplazamientos químicos son mínimas. Así, los intervalos de desplazamiento δ encontrados para estos R' seleccionados, en unidades de ppm, son:

- $R' = \text{bencilo}$. ArCH_2CO : 3,86 - 3,91; H_2 (2): 7,28 - 7,33; $\text{H}_4 + \text{H}_3$ (2): 7,33 - 7,40.
- $R' = \text{fenilo}$. H_3 (2): 7,48 - 7,52; H_4 : 7,55 - 7,66; H_2 (2): 7,90 - 7,95.

- $R' = 4\text{-clorofenilo}$. $H_3(2)$: 7,45 - 7,50; $H_2(2)$: 7,85 - 7,89.
- $R' = 3,5\text{-dimetoxifenilo}$. $ArOCH_3$: 3,85 - 3,87; H_4 : 6,69 - 6,73; $H_2(2)$: 6,95 - 6,99.

En la *Figura 7.8* se muestran las regiones aromáticas en $CDCl_3$ de derivados seleccionados con los cuatro restos R' más representativos: *IV.A1* ($R' = \text{bencilo}$), *I.C1* ($R' = \text{fenilo}$), *V.A1* ($R' = 4\text{-clorofenilo}$) y *VI.A4* ($R' = 3,5\text{-dimetoxifenilo}$),

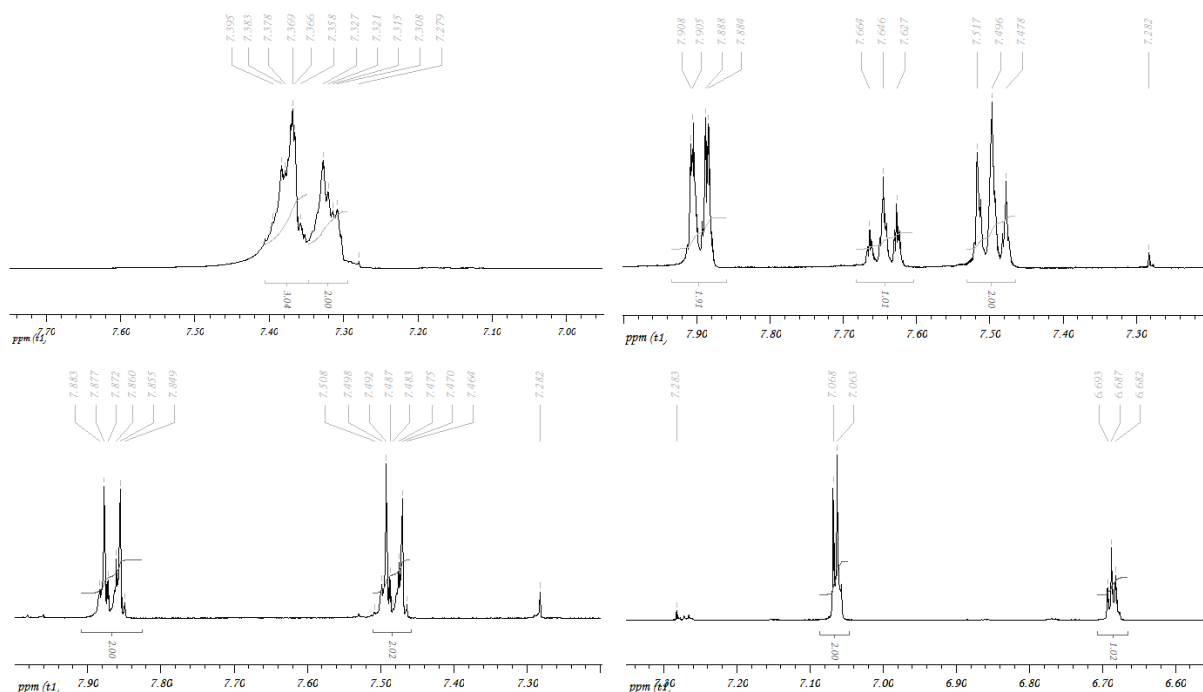


Figura 7.8. Región aromática de los espectros de $^1H\text{-RMN}$ de *IV.A1* (arriba, izquierda), *I.C1* (arriba, derecha), *V.A1* (abajo, izquierda) y *VI.A4* (abajo, derecha).

Espectros de $^1H\text{-RMN}$ de los derivados de las diferentes series

Serie I: Selenoésteres de carboxialquilo

El hidrógeno ácido del grupo carboxilo característico de esta serie no siempre es visible en RMN: el que genere o no una señal en el espectro de resonancia depende del disolvente deuterado empleado. Si se utiliza cloroformo raras veces es visible; y en caso de utilizar DMSO, la señal es muy débil y se observa en el intervalo de desplazamiento químico de 12,31 a 13,00 ppm. El protón ácido desaparece al tratar la muestra con D_2O . Se muestra como ejemplo representativo de la serie el espectro del derivado *I.A9* en DMSO (*Figura 7.9*).

Serie II: Selenoésteres de carbamoilmetilo

Los dos protones de amida aparecen desdoblados cuantitativamente a distintos desplazamientos, a pesar de estar enlazados al mismo átomo de nitrógeno. Una posible explicación a este comportamiento puede residir en la formación de un puente de

hidrógeno intramolecular entre uno de dichos hidrógenos y el oxígeno del carbonilo del selenoéster, generando un anillo de 7 eslabones, tal y como se muestra para el derivado *II.2* en la *Figura 7.10* superpuesta sobre los espectros ^1H -RMN en CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$ de dicho derivado. El segundo protón, al no establecer un puente de hidrógeno, aparece entonces a un desplazamiento menor por encontrarse más apantallado.

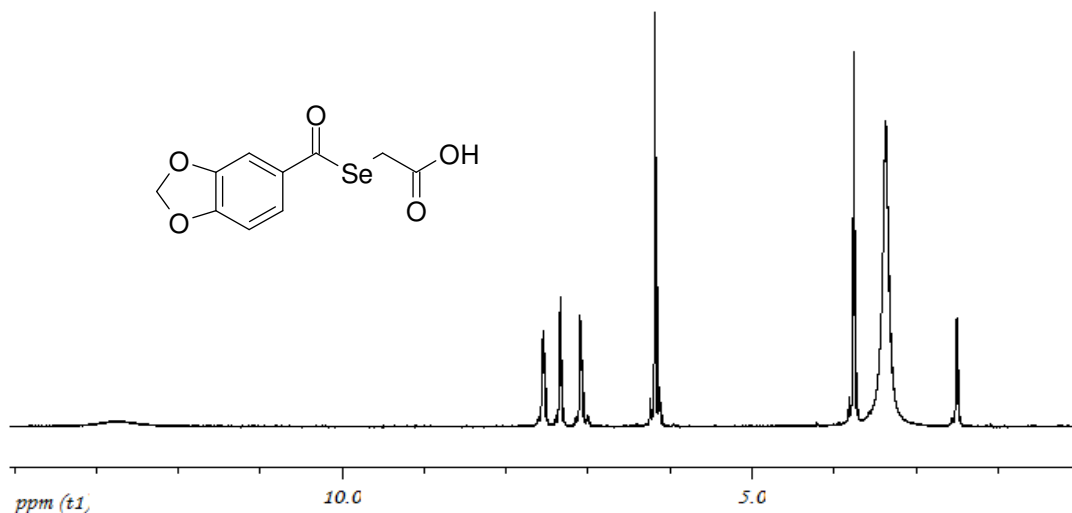


Figura 7.9. Espectro de ^1H -RMN del carboxiselenoéster I.A10.

Los δ observados para los protones de amida en los dos disolventes confirman experimentalmente la teoría propuesta: intervalos 5,35-5,92 y 6,15-6,40 ppm en CDCl_3 ; 7,03-7,15 y 7,49-7,65 ppm en $\text{DMSO}-d_6$. Así, los protones de amida se observan a un δ mayor (es decir, se encuentran más desapantallados) en DMSO, el disolvente más polar, que en cloroformo; hecho que se explica por el establecimiento de puentes de hidrógeno intermoleculares entre los protones de amida y las moléculas del disolvente polar; produciéndose en consecuencia un menor apantallamiento de los hidrógenos de amida que cuando se emplea cloroformo como disolvente.

Podría establecerse otro posible puente de hidrógeno entre el selenio y un protón de amida, por formación de un ciclo de cinco eslabones. No obstante, se considera, a falta de un estudio de modelización, que se encuentra más favorecido el ciclo de siete eslabones que el de cinco tanto por la mayor capacidad para formar puentes de hidrógeno del oxígeno con respecto al selenio como por el tamaño del selenio, el cual es lo suficientemente voluminoso como para tensionar e inestabilizar un ciclo de cinco miembros.

Al igual que el hidrógeno de ácido, los hidrógenos de amida son intercambiables con D_2O , aunque dicho intercambio se produce más lentamente.

Serie III: Selenoanhídridos

El selenoanhídrido *III.1* carece de señales alifáticas en ^1H -RMN al no presentar el grupo metileno propio de los restantes derivados. Su simetría simplifica el espectro de ^1H -RMN al verse únicamente dos señales aromáticas diferentes por ser equivalentes los hidrógenos situados en posiciones opuestas respecto al plano de simetría central.

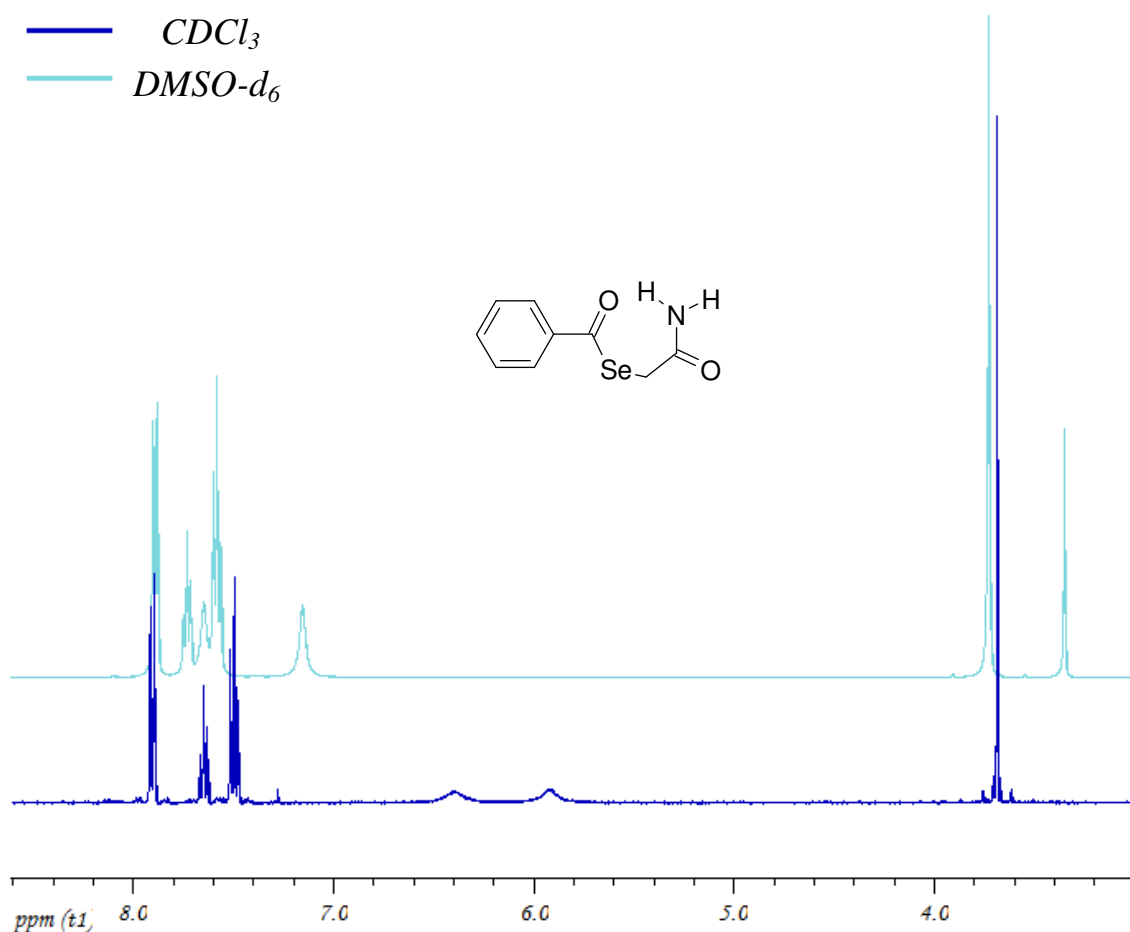


Figura 7.10. Espectros de ^1H -RMN en DMSO (arriba) y CDCl_3 (abajo) de II.2. Puente de hidrógeno intramolecular que justifica el desdoblamiento de la señal de amida.

Serie IV: Selenoésteres de R''-oxicarbonilalquilo

Los derivados de la *Serie IV* están funcionalizados con un éster carboxílico, en el cual varía el grupo enlazado al oxígeno, y, en consecuencia, las señales encontradas.

Así, en los ésteres metílicos (*Serie IV.A*) se observa un singlete correspondiente al grupo metilo en el intervalo de 3,70 a 3,77 ppm, superpuesto al intervalo 3,62 - 3,89 ppm en cual se observa la señal referida a los protones del grupo metileno directamente unido al selenio. No obstante, son fácilmente diferenciables tanto por la integración como por las señales satélites que acompañan a la señal del grupo CH_2 .

La señal de los nueve hidrógenos de los ésteres *terc*-butílicos (*Serie IV.B*) se muestra como un singlete observable en el intervalo de 1,43 a 1,49 ppm; mientras que las señales correspondientes con el anillo bencénico de los ésteres fenílicos (*Serie IV.C*) se muestran en los siguientes intervalos: 7,14 - 7,15 ppm (H_2 , 2H), 7,25 - 7,26 ppm (H_4) y 7,40 ppm (H_3 , 2H); siendo dichos intervalos diferentes de los determinados si tenemos un grupo fenilo en el resto R' : 7,48 - 7,52 ppm (H_3 , 2H); 7,55 - 7,66 ppm (H_4) y 7,90 - 7,95 ppm (H_2 , 2H). No obstante, se han efectuado experimentos bidimensionales de RMN (COSY, HMQC y HMBC) de estos compuestos con el fin de confirmar inequívocamente esta asignación de forma independiente.

De este modo, de la interpretación del espectro COSY ^1H - ^1H obtenido para el selenoéster *IV.C1* (Figura 7.11) se concluye que las señales de los hidrógenos correspondientes a cada uno de los anillos aromáticos están perfectamente separadas.

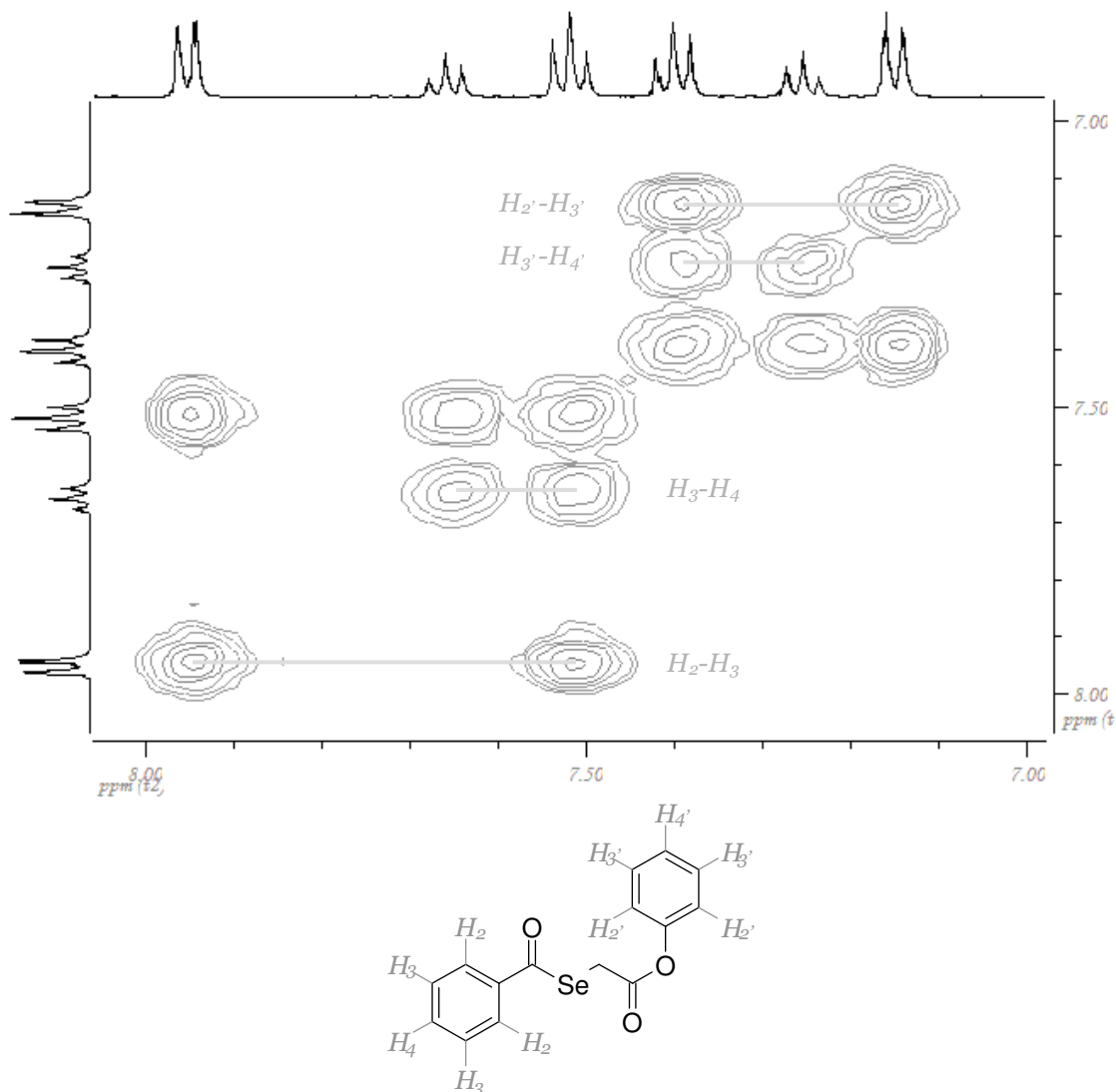


Figura 7.11. Fórmula molecular y espectro COSY ^1H - ^1H RMN en CDCl_3 de *IV.C1*.

Considerando en conjunto las multiplicidades, integraciones y acoplamientos protón-protón de la Figura 7.11, se deduce que para el anillo mostrado en el intervalo de δ de 7,10 a 7,45 ppm las señales observables de los hidrógenos son (de menor a mayor) $H_{2'}$, $H_{4'}$ y $H_{3'}$; y para el anillo del intervalo 7,50 - 8,00 ppm; H_3 , H_4 y H_2 ; siendo ambas coincidentes con lo asignado inicialmente.

Por otro lado, el acoplamiento a larga distancia observado en el espectro HMBC ^1H - ^{13}C entre los protones H_2 del anillo contenido en *R'* con el carbono carbonílico del selenoéster confirma, de forma independiente y unívoca, que el anillo bencénico observable a 7,50 - 8,00 ppm es el unido al carbono carbonílico del selenoéster, siendo el otro anillo (7,10 - 7,50 ppm) el unido al oxígeno del éster carboxílico. Dicho espectro será estudiado más adelante con mayor profundidad en la discusión de la espectroscopía de RMN de carbono-13.

Serie V: Selenoésteres de acilalquilo

Las señales de RMN características de los derivados de la *Serie V* son las referidas a los hidrógenos alifáticos del grupo alquilo unido a la cetona. De este modo, el grupo metilo de la metilcetona *V.A1* se muestra como un singlete a 2,37 ppm; y los 9 protones *terc*-butílicos de los derivados *V.B1* y *V.B2*, a $\delta = 1,29$ ppm.

Serie VI: Selenoésteres de metilo

Los hidrógenos del grupo metilo enlazado al átomo de selenio propio de los derivados de la *Serie VI* son observables como un singlete en el intervalo de δ de 2,38 a 2,47 ppm. Dicha señal se muestra siempre acompañada por señales satélites, tal y como se ha mostrado en la *Figura 7.7*, por la influencia del selenio vecinal.

Espectroscopía de ^{13}C -RMN

Al igual que en el caso de la ^1H -RMN, los selenoésteres no poseen un espectro de resonancia magnética nuclear de carbono típico debido a la variabilidad de las señales encontradas en función de los sustituyentes R y R' presentes en el selenoéster. Sin embargo, en los espectros de ^{13}C -RMN se observan dos señales características de estos derivados, al ser visibles en esta técnica tanto el carbono carbonílico del selenoéster como el carbono del metileno directamente unido al átomo de selenio. A continuación se analizan brevemente dichas señales, y se realizará un estudio de las restantes señales similar al efectuado en la RMN de protón.

Metileno en α al átomo de selenio

El carbono del grupo metileno puente entre el selenoéster y el carbonilo presente en R es observable en el intervalo de δ de 25,1 a 29,3 ppm; siendo los desplazamientos sensiblemente mayores en los derivados de las *Series II, IV.B-C* y *V* que en los de las *Series I* y *IV.A*. Al igual que la correspondiente señal en ^1H -RMN, la señal del carbono alifático en α a selenio presenta señales satélites, de menor intensidad, por la actividad en RMN del isótopo ^{79}Se . Los δ son 4-7 ppm menores que los calculados en base a las tablas de la bibliografía²³⁰, considerando la presencia en la posición α de un grupo funcional -SCO- en vez del -SeCO- real ante la falta de datos teóricos con selenio.

En los selenoésteres de metilo de la *Serie VI*, al no presentar un carbonilo en α , el desplazamiento del grupo metilo se reduce a valores realmente bajos (5,5 - 6,2 ppm). En base a las tablas anteriores el δ , considerando de nuevo la presencia de azufre en vez de selenio, sería de 12,1 ppm.

Finalmente, la modificación el entorno químico cambia notablemente el desplazamiento de este carbono, siendo mayores las variaciones observadas cuando se reemplaza uno de los hidrógenos por un grupo metilo o fenilo (18,4 ppm, *I.C1*, CH_3 ; 46,9 ppm, *I.D1*, fenilo) que cuando se inserta un metileno adicional entre el selenio y el segundo carbonilo (19,6 y 20,1 ppm; *I.C2* y *IV.D1*, respectivamente).

Carbonos carbonílicos

Carbonilo de Selenoéster

Los desplazamientos químicos observados para los carbonos carbonílicos de los selenoésteres son anormalmente elevados en todos los derivados, si se comparan con los valores tabulados en la bibliografía para los carbonos carbonílicos de los ésteres carboxílicos equivalentes²³⁰. Adicionalmente, los valores de δ observados dependen de si el carbonilo está unido al anillo directamente o a través de un espaciador; y también,

en el caso de los anillos heteroaromáticos, de su carácter π -excedente o π -deficiente. De este modo, se observan los siguientes intervalos de desplazamiento químico δ :

- *Selenoésteres alifáticos*: 198,8 - 201,9 ppm.
- *Selenoésteres aromáticos*: 190,5 - 195,3 ppm.
- *Selenoésteres heteroaromáticos π -excedentes*: 182,8 - 182,6 ppm.
- *Selenoésteres heteroaromáticos π -deficientes*: 197,5 - 197,9 ppm.

Los resultados anteriores concuerdan con los observados en el estudio realizado anteriormente con los datos proporcionados por la espectroscopía infrarroja en lo que respecta a la presencia o ausencia del espaciador y al anillo aromático o heteroaromático presente. No obstante, se observa que en ^{13}C -RMN es más importante la influencia ejercida por R sobre el desplazamiento que la efectuada por los sustituyentes sobre el anillo R' , al contrario que en la espectroscopía infrarroja. De hecho, al mantener el resto R' y modificar R se observa que, por lo general, los desplazamientos del carbono de selenoéster son menores en las *Series I* y *IV* que en las series *II*, *III*, *V* y *VI*. A igual resto R' , los selenoésteres de metilo de la *Serie VI* tienen los mayores desplazamientos.

Carbonilos en R

Las variaciones encontradas en los desplazamientos químicos del carbonilo presente en R dependen únicamente del tipo de carbonilo al tener prácticamente el mismo entorno en la mayoría de los derivados: el grupo CO-Se-CH_2 . Los elementos variables de R' , responsables de las variaciones en los desplazamientos del carbonilo de selenoéster, ejercen una influencia mínima sobre el segundo carbonilo debido a la gran separación espacial entre ambos.

En consecuencia, los intervalos de desplazamiento determinados para el segundo carbonilo son los siguientes:

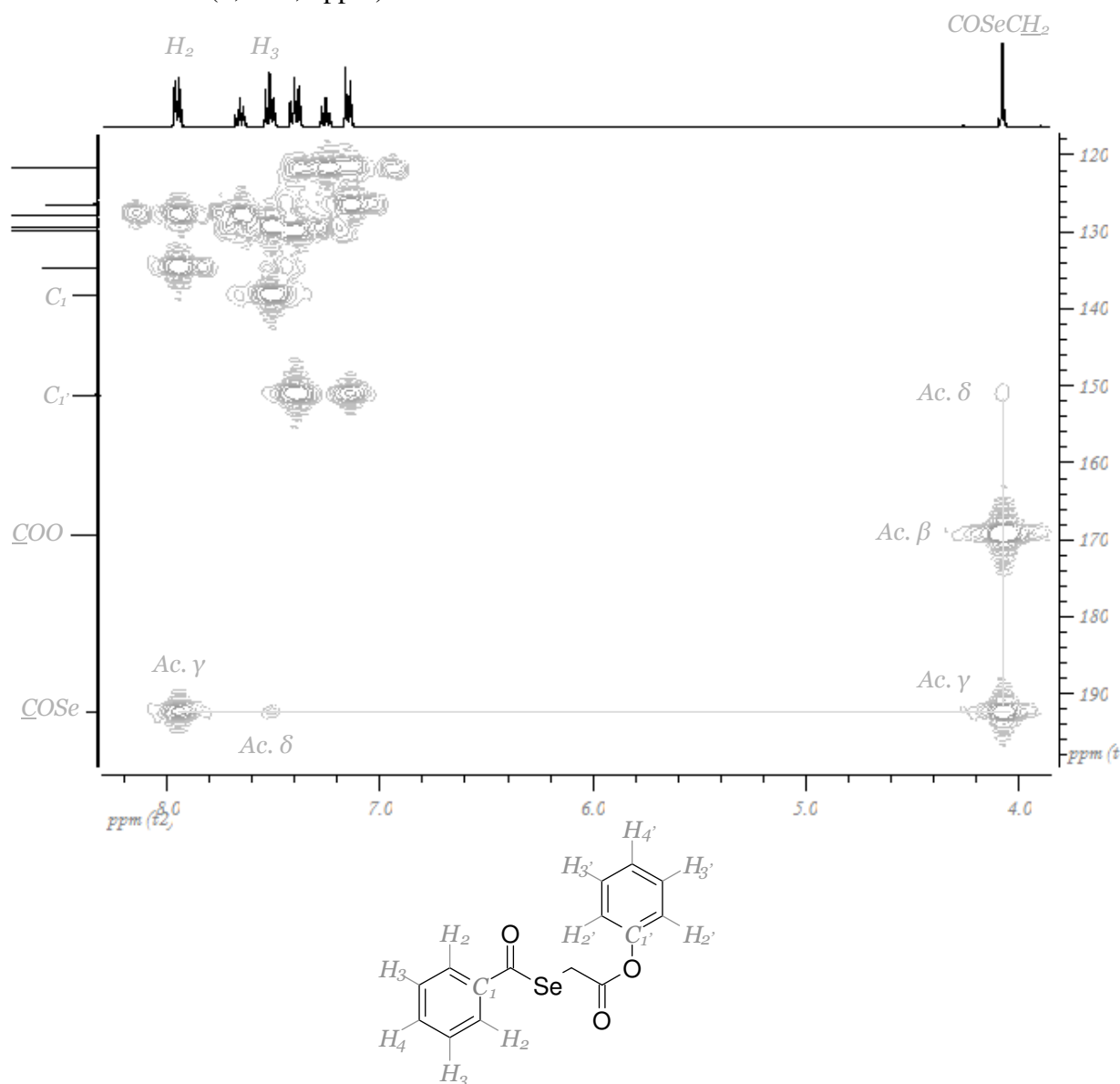
- $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{O}}\text{OH}$ (*Serie I*): 176,2 - 176,9 ppm.
- $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{O}}\text{NH}_2$ (*Serie II*): 170,7 - 172,8 ppm.
- $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{O}}\text{OR}''$ (*Serie IV*): 169,1 - 171,1 ppm.
- $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{O}}\text{R}''$ (*Serie V*): 203,7 ($R'' = -\text{CH}_3$) - 210,7 ppm ($R'' = -\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

Al modificar el metileno puente entre los dos carbonilos por sustitución (*I.C1*, *I.D1*) o por inserción de un segundo metileno (*I.C2*, *IV.D1*), los δ varían, aunque se mantienen en valores próximos (177,3-179,4 ppm en la *Serie I*; 173,2 ppm en *IV.D1*).

Verificación de la asignación por RMN de ^1H - ^{13}C HMBC.

Se han obtenido espectros bidimensionales protón-carbono con interacciones a larga distancia (HMBC) de algunos compuestos representativos, con el doble objetivo de ayudar a la elucidación estructural al confirmar las asignaciones propuestas y verificar de forma independiente la presencia de la estructura $-\text{COSeCH}_2\text{CO}(\text{Y})-$, encontrada en la mayoría de los derivados. La coincidencia de los desplazamientos del carbono carbonílico de selenoéster a lo largo de los compuestos de las diferentes series es en sí una prueba, pero es deseable una confirmación inequívoca.

En la *Figura 7.12* se muestra el espectro HMBC del selenoéster *IV.C1* (benzoselenoato de feniloxycarbonilmetilo). Con análisis previos (*vid* pág. 175-176) se ha determinado que en la espectroscopía de ^1H -RMN los hidrógenos del grupo metileno se muestran a un desplazamiento próximo a 4 ppm y que las señales del anillo bencénico unido al selenoéster (*R'*) son observables a un mayor intervalo de desplazamiento químico (7,5 - 8,0 ppm) que las asignadas al anillo del éster carboxílico contenido en *R* (7,1 - 7,5 ppm).



*Figura 7.12. Espectro HMBC ^1H - ^{13}C RMN en CDCl_3 de *IV.C1*.*

Los dos carbonos carbonílicos, observables a 169,3 y 192,4 ppm, establecen acoplamiento a larga distancia con los protones del metileno en posición α con respecto al selenio, al igual que el C_1' del anillo bencénico contenido en *R'*; siendo de mayor intensidad el acoplamiento con el carbonilo mostrado a 169,3 ppm que con el de mayor δ . A su vez, el acoplamiento $\text{CH}_2 - \text{C}_1'$ es el de menor intensidad. Esto concuerda con la distancia intramolecular: el carbonilo a menor desplazamiento es el del éster carboxílico y se encuentra en posición β con respecto a los protones del grupo metileno. El carbonilo de selenoéster, en la posición γ ; mientras que el C_1' se aleja a una posición δ .

Por otro lado, el supuesto carbonilo de selenoéster ($\delta = 192,4$ ppm) interacciona, aparte de con los hidrógenos del grupo metileno, con los hidrógenos H_2 y H_3 , del anillo contenido en R' , siendo la intensidad menor en el caso de H_3 (acoplamiento δ) que en la de H_2 (acoplamiento γ), siendo a su vez la intensidad de este último comparable con la observada en el γ -acoplamiento $\underline{\text{CO}}(\text{Se}) - \underline{\text{CH}}_2$. Ante la vista de estos acoplamientos y de la intensidad de los mismos; y ante la obtención de resultados comparables en los restantes experimentos de HMBC realizados, se demuestra inequívocamente que la disposición molecular deducida concuerda con la estructura molecular propuesta.

Señales de los principales R'

Al igual que en la ^1H -RMN la mayoría de las señales observables en los espectros corresponden a los carbonos presentes en el resto R' . Es más, dejando aparte el carbonilo presente en R y el grupo metileno en α al átomo de selenio, anteriormente estudiados, únicamente se verían señales de carbonos de grupos funcionales contenidos en R en los derivados de las *Series IV* y *V*.

Por la gran variabilidad del sustituyente R' entre los distintos derivados, no se puede realizar un estudio general. Sin embargo, al igual que en el caso de la ^1H -RMN, en aquellos selenoésteres que comparten el mismo resto R' las variaciones observadas en los desplazamientos son mínimas (en algunos casos inferiores al 0,2 %) debido a la gran distancia a la que se encuentra la parte variable de R . En la *Figura 7.13* se muestran las regiones aromáticas en CDCl_3 de derivados seleccionados con los restos R' más representativos: *IV.B1* ($R' =$ bencilo), *II.2* ($R' =$ fenilo), *V.B1* ($R' =$ 4-clorofenilo) y *VI.A4* ($R' =$ 3,5-dimetoxifenilo),

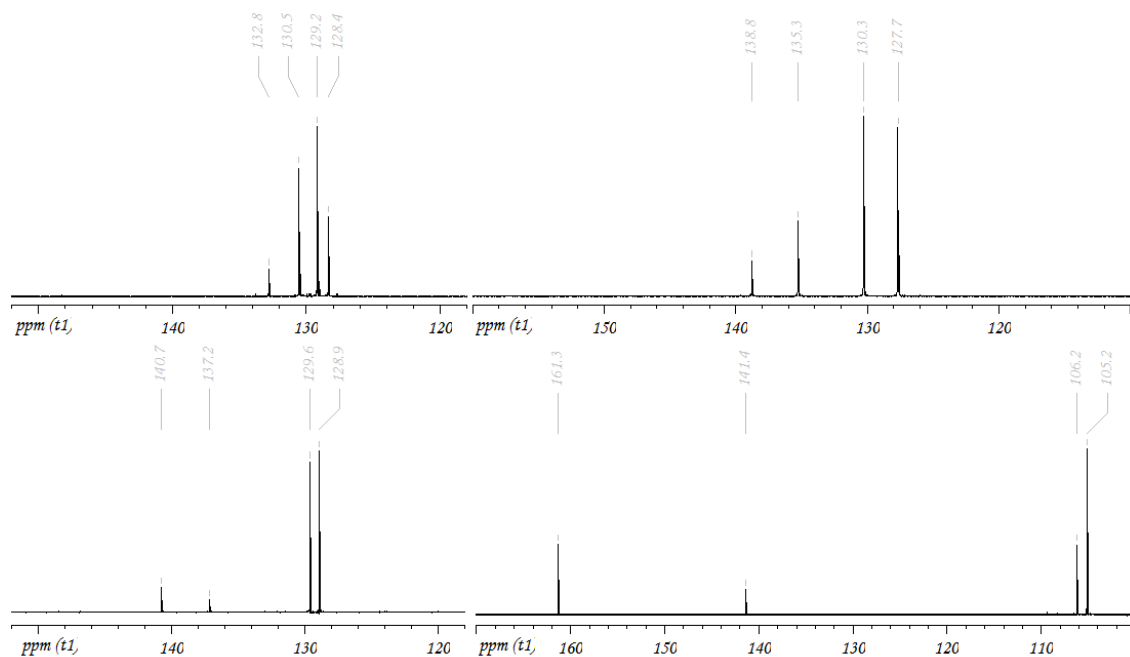


Figura 7.13. Región aromática de los espectros de ^{13}C -RMN de IV.B1 (arriba, izquierda), II.2 (arriba, derecha), V.B1 (abajo, izquierda) y VI.A4 (abajo, derecha).

Los desplazamientos δ encontrados para estos R' seleccionados, en unidades de ppm, son:

- $R' = \text{bencilo}$. $\text{Ar}\underline{\text{C}}\text{H}_2$: 52,2-54,5; C_4 : 128,2-128,7; C_3 : 129,0-129,2; C_2 : 130,5-130,8; C_1 : 132,2-133,7.
- $R' = \text{fenilo}$. C_2 : 127,5-127,8; C_3 : 129,2-130,3; C_4 : 133,9-135,3; C_1 : 138,3-139,4.
- $R' = 4\text{-clorofenilo}$. C_2 : 128,8-129,1; C_3 : 129,6-130,5; C_4 : 136,5-137,7; C_1 : 140,0-141,1.
- $R' = 3,5\text{-dimetoxifenilo}$. $\text{ArO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$: 56,0-56,8; C_2 : 104,5-105,5; C_4 : 106,0-106,8; C_1 : 140,2-141,4; C_3 : 161,3-161,7.

Señales adicionales en R

Únicamente los restos R de los derivados de las *Serie IV* y *V* presentan señales adicionales en ^{13}C -RMN diferentes de las ya estudiadas:

Serie IV

En función del éster carboxílico metílico, *terc*-butílico o fenílico presente en R se observan diferentes señales. Los intervalos de δ , en ppm, encontrados para las señales adicionales de estos derivados son los siguientes:

- *Ésteres metílicos (IV.A, IV.D)*: OCH_3 : 53,1-53,2.
- *Ésteres terc-butílicos (IV.B)*: $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$: 28,3-29,2; $\text{OC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$: 82,2-82,5.
- *Ésteres fenílicos (IV.C)*: C_2 : 121,7-121,8; C_4 : 126,4-126,5; C_3 : 129,8-129,9; C_1 : 151,1-151,2.

En el caso de los derivados *IV.C1* y *IV.C2* (ésteres fenílicos) ha sido necesaria la obtención e interpretación de espectros bidimensionales de ^1H - ^{13}C HMQC y HMBC para confirmar la asignación de las señales del espectro de RMN de ^{13}C por la escasa diferencia entre los desplazamientos de ciertas señales de ambos anillos.

Serie V

Los espectros de carbono-13 de los selenoésteres de la *Serie V* que contienen una cetona en R presentan señales adicionales diferentes en función de si dicha cetona es metílica o *terc*-butílica, a los siguientes desplazamientos (en ppm):

- *Metilcetonas*: $\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$: 35,0.
- *Terc-butilcetonas*: $\text{COC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$: 31,8-32,0; $\text{COC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$: 45,2.

3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (EM) se ha empleado para confirmar las estructuras determinadas previamente empleando otras técnicas de determinación estructural como la espectroscopía de infrarrojo, el análisis elemental y las espectroscopías de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, completando así la información aportada sobre los nuevos compuestos descritos.

Recordando lo expuesto en apartados previos de este trabajo de investigación, el diseño de los selenoésteres se ha dividido en dos fases. Primero se han estudiado qué anillos, espaciadores y sustituyentes del anillo potencian la citotoxicidad, formando el conjunto de los tres elementos anteriores para cada molécula el resto R' . Después, en una segunda fase se ha buscado modular el resto unido al selenio (R), empleando los restos R' que dieron un mejor resultado en la primera fase; siendo la ruptura del enlace entre el carbono carbonílico y el selenio, con la consiguiente liberación de especies iónicas activas de selenio, el mecanismo que explica la actividad dual quimioterapéutica y quimiopreventiva de los compuestos organoselénicos presentados.

Enlazando la espectrometría de masas con el diseño y acción de los derivados, se observa en los espectros de masas que la rotura del selenoéster es la más favorecida en la mayoría de los casos. De este hecho se deduce que en las condiciones experimentales existentes dentro de la cámara de ionización del espectrómetro de masas el enlace más lábil presente en los selenocompuestos es el enlace CO-Se del selenoéster, hecho en consonancia con la hipótesis planteada. Evidentemente, que sea el enlace más lábil no es, de cara al mecanismo, una prueba concluyente; porque un enlace lábil en masas no significa que efectivamente se rompa en el medio biológico.

Por otro lado, el predominio de la rotura del selenoéster tiene como principal consecuencia un hecho experimental observable: el espectro de masas resultante es dependiente del resto R' presente en la molécula. Por lo general, cuando se mantiene R' constante, al variar el sustituyente R entre las distintas series de selenoésteres se observan los mismos fragmentos mayoritarios al producirse el mismo patrón de ruptura.

Debido a este hecho experimental, el estudio de los resultados proporcionados por esta técnica se centrará en demostrar el paralelismo de los espectros de compuestos de diferentes series y subseries con restos R' comunes; aunque sin perder de vista las peculiaridades relevantes de espectros individuales, como la observación del efecto isotópico del selenio. No obstante, en primer lugar se analizará un espectro de masas general de los diferentes productos.

Espectro de Masas tipo

Para un compuesto tipo $R'-CO-Se-R$, el ión molecular M^+ es por general poco abundante o inexistente, y las fragmentaciones características son aquellas que afectan al carbonilo de selenoéster. La primera rotura sería la ruptura del enlace entre el selenio y el carbono carbonílico, generando un catión acilo (a).

A continuación, el catión acilo perdería monóxido de carbono, resultando un catión arílico o alquílico (b), dependiendo del producto y del espaciador presente en el mismo; catión que asimismo puede generarse directamente desde el ión molecular por rotura (c) en β desde el carbonilo. Por último, el catión resultante evolucionaría en función del anillo y de los sustituyentes presentes en R' . En la *Figura 7.14* se muestra un esquema simplificado del espectro descrito.

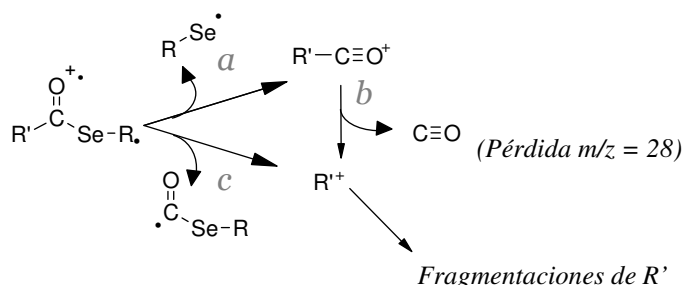


Figura 7.14: Principales fragmentaciones en EM de los selenoésteres.

En los selenoderivados disustituídos de la *Serie VI.B* se genera un fragmento que conserva todavía un átomo de selenio tras la fragmentación inicial del enlace CO-Se del ión molecular. Los fragmentos selenados se reconocen con facilidad gracias a los isótopos de este elemento.

Derivados del ácido *p*-clorobenzoico

El resto R' con mayor presencia en los selenoésteres de las diferentes series es un anillo bencénico sustituido por un átomo de cloro en posición para con respecto al grupo COSe. Los 8 selenoderivados mostrados en la *Tabla 7.2* tienen un patrón de fragmentación común, descrito en la *Figura 7.15*.

Los fragmentos mayoritarios son el catión acilo y el ión 4-clorobenzenilio resultante de la eliminación de dióxido de carbono a partir del anterior. La especie iónica aromática puede sufrir dos reacciones de degradación sucesivas: la pérdida de acetileno y la de cloruro de hidrógeno. Adicionalmente, se observa un marcado efecto isotópico del cloro en los iones mayoritarios y en el resultante de la eliminación de acetileno a partir del ión benzenilio.

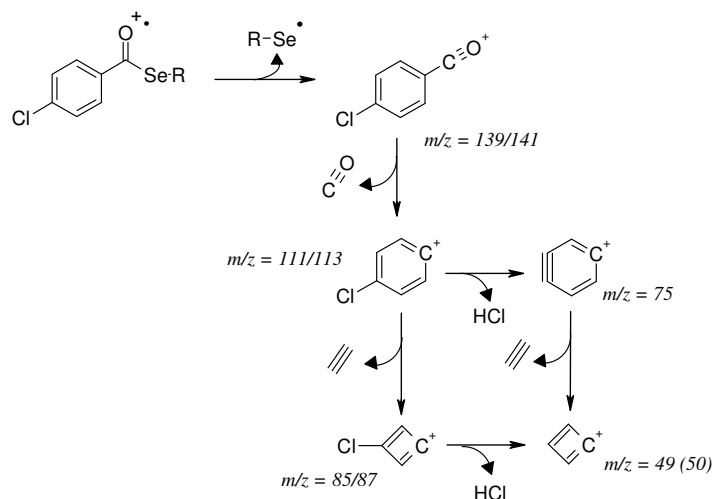


Figura 7.15: Principales fragmentaciones en EM de los selenoésteres cuyo R' es el resto 4-clorofenilo.

Para todos los compuestos el pico base es el catión acilo resultante tras la rotura del enlace CO-Se del selenoéster, a excepción del derivado *IV.B3*, cuyo pico base corresponde al carbocatión terciario resultante de la rotura del enlace $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$, siendo también significativo dicho fragmento en el derivado *V.B1*, con una abundancia relativa del 73 %.

Tabla 7.2: Espectros de masas de los selenoésteres con $R' = 4\text{-clorofenilo}$. Abundancias de los principales fragmentos (%).

Serie	Ión m/z	$M^{+\bullet}$	ArCO	Ar	$\text{Ar-HC}\equiv\text{CH}$	Ar-HCl	$\text{Ar-HCl-HC}\equiv\text{CH}$
		$M^{+\bullet}$	139/141	111/113	85/87	75	49 (50)
I	<i>I.A6</i>	-	100/37	30/10	2/1	19	6
II	<i>II.3</i>	-	100/34	31/10	4/1	15	5
IV	<i>IV.A4</i>	-	100/34	46/15	4/1	28	12
	<i>IV.B3</i>	-	20/7	13/4	3/0	10	10
	<i>IV.C2</i>	-	100/34	28/10	9/1	14	3
V	<i>V.A1</i>	-	100/33	46/15	4/1	34	15
	<i>V.B1</i>	-	100/31	40/13	12	29	17
VI	<i>VI.A2</i>	-	100/34	39/13	7/0	12	6

En la Figura 7.16 se muestra el espectro de masas del selenoéster *I.A6* como ejemplo representativo de este grupo de compuestos. En él se aprecian los iones característicos (m/z 139, 111, 75 y 50), junto con el $m/z = 261$ ($M^{+\bullet} - \text{OH}$), el cual muestra picos isotópicos debidos a la presencia de selenio y cloro. Las abundancias relativas determinadas para dichos isótopos son 3/3/8/1/14/7/1 para los fragmentos de

m/z 257/258/259/260/**261**/263/265, respectivamente. La comparación con los valores teóricos calculados a partir de las abundancias relativas de los isótopos de selenio y cloro, normalizados a la abundancia del ión de m/z 261 confirma la presencia de ambos átomos (2/2/7/1/14/6/1).

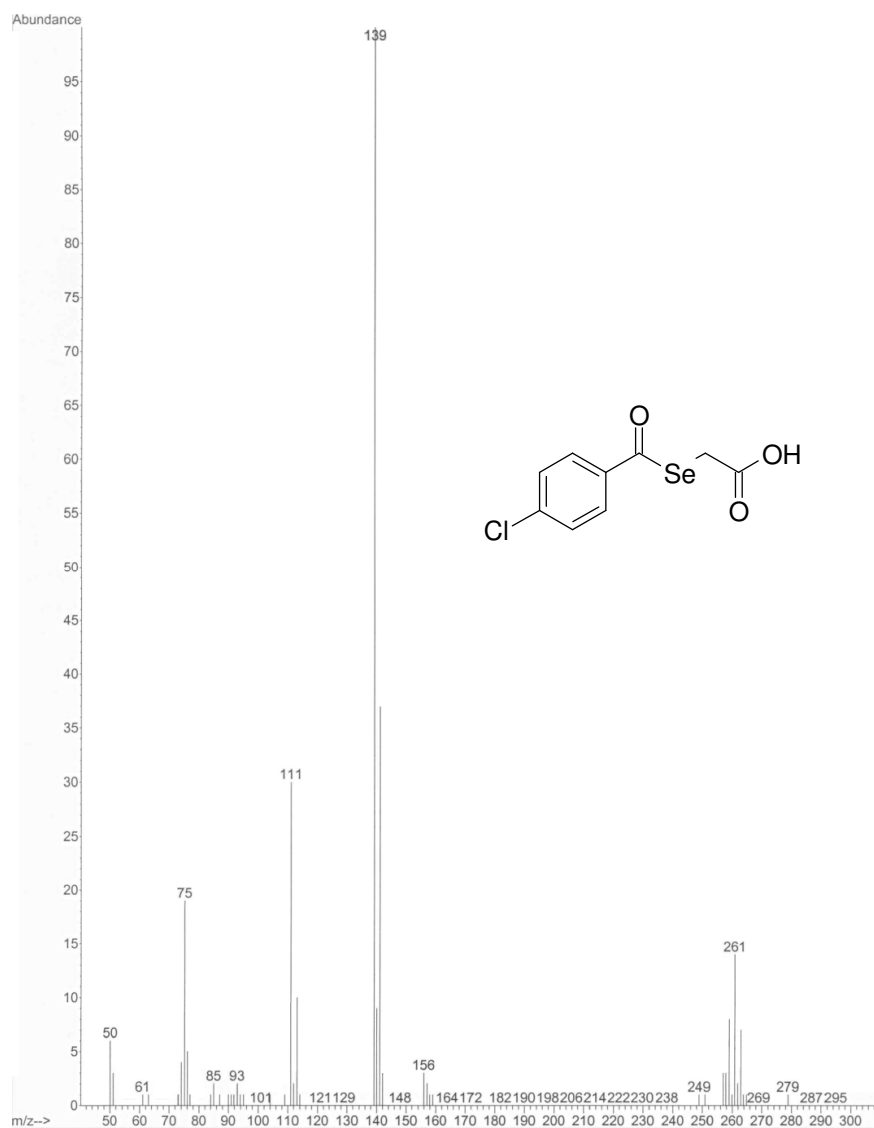


Figura 7.16: Espectro de masas del selenoéster I.A6.

Derivados del ácido benzoico

El patrón de fragmentación de aquellos compuestos cuyo R' es el resto fenilo se esquematiza en la Figura 7.17.

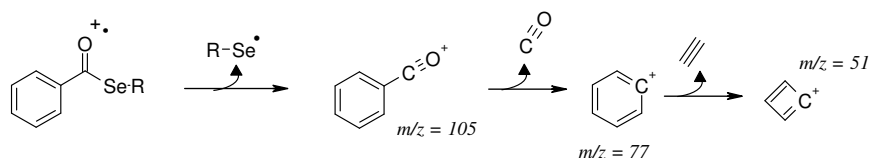


Figura 7.17: Principales fragmentaciones en EM de los selenoésteres cuyo R' es el resto fenilo.

En estos derivados, el pico base es siempre el catión acilo, sin excepciones (Tabla 7.3). Aparte de los fragmentos señalados en la tabla, en los espectros de masas aparecen otros iones característicos de la serie en la que se engloba cada compuesto, como por ejemplo el ya mencionado $m/z = 57$ característico de la serie de los selenoésteres *terc*-butílicos. La Figura 7.18 recoge el espectro de masas del derivado II.2, que puede tomarse como representativo de estos derivados al mostrar los cationes de m/z 122, 105, 77 y 51.

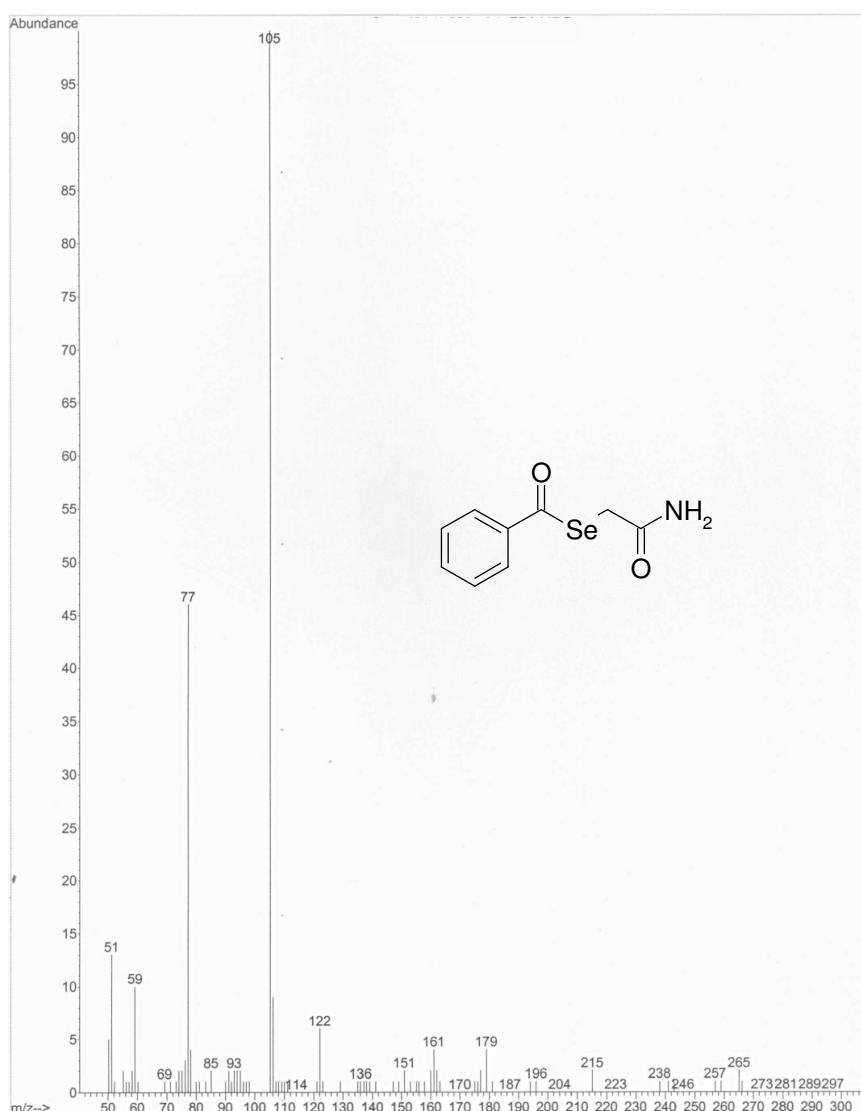


Figura 7.18: Espectro de masas del selenoéster II.2.

Tabla 7.3: Espectros de masas de los selenoésteres con $R' = \text{fenilo}$.
Abundancias de los principales fragmentos (%).

Fragmento	Serie m/z	I	II	IV			VI
		I.C1	II.2	IV.A2	IV.B2	IV.C1	VI.A1
$M^{+\bullet}$	$M^{+\bullet}$	1	-	1	-	-	3
$ArCO$	105	100	100	100	100	100	100
Ar	77	37	46	56	46	33	58
$Ar - HC\equiv CH$	51	11	13	19	16	8	17

Derivados del ácido fenilacético

A la vista de los datos experimentales, cuando el sustituyente R' presente en el selenoéster es el resto bencilo la fragmentación bencílica (a) o bien la fragmentación en α con respecto al carbonilo (b) y el desprendimiento posterior de monóxido de carbono están tremendamente favorecidas por la estabilidad del catión tropilio generado tras dichas rupturas, tal y como se muestra en la Tabla 7.4 y en la Figura 7.19.

Tabla 7.4: Espectros de masas de los selenoésteres con $R' = \text{fenilo}$.
Abundancias de los principales fragmentos (%).

Fragmento	Serie m/z	I		II	IV		
		I.C2	I.D12	II.1	IV.A1	IV.B1	IV.D1
$M^{+\bullet}$	$M^{+\bullet}$	4	-	4	1	-	-
$ArCH_2CO$	119	23	14	38	10	10	14
Tropilio (Tr)	91	100	100	100	100	100	100
Serie Iónica Ar	77	1	3	1	4	2	5
$Tr - HC\equiv CH$	65	12	11	12	17	13	15

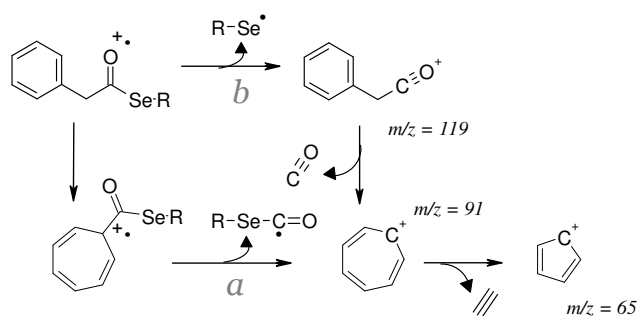


Figura 7.19: Principales fragmentaciones en EM de los selenoésteres con bencilo en R' .

Así, el ión tropilio es el fragmento claramente mayoritario. De hecho, ninguno de los restantes fragmentos tiene una abundancia relativa superior al 50%, siendo los únicos cationes observables con una abundancia superior al 25% el carbocatión terciario de la *Serie IV.B* ($m/z = 57$, 50 % ab. rel) y el catión acilo del derivado *II.1* ($m/z = 119$, 38 % ab. rel.). Un espectro representativo de esta serie es el del compuesto *IV.A1*, mostrado en la *Figura 7.20*.

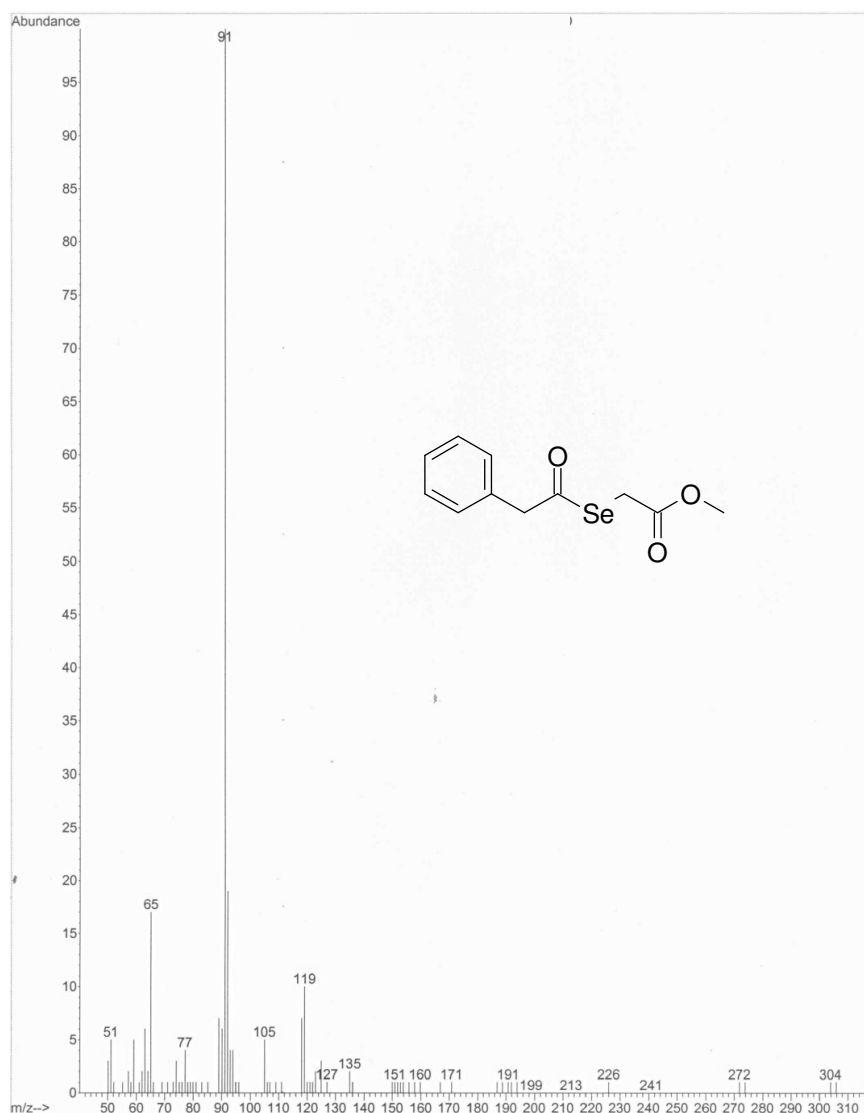


Figura 7.20: Espectro de masas del selenoéster IV.A1.

Derivados del ácido 3,5-dimetoxibenzoico

La última familia de selenoderivados en función de *R'* es aquella en la cual dicho sustituyente es el grupo 3,5-dimetoxifenilo, y está constituida por seis derivados, cuyo patrón de fragmentación común se muestra en la *Tabla 7.5* y en la *Figura 7.22*. Se observa de nuevo el fragmento de m/z 57 referido al grupo *terc*-butilo en los

compuestos *IV.B4* y *V.B2*; siendo en el primero de ellos el ión mayoritario. En la *Figura 7.21* se muestra el espectro de masas de *V.B2*, en el que pueden observarse tanto los fragmentos característicos de los derivados que presentan un grupo *terc*-butilo y un resto 3,5-dimetoxifenilo.

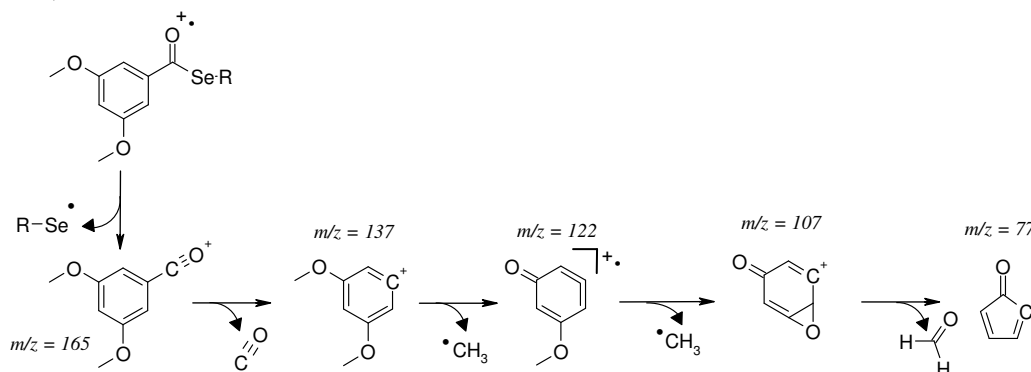
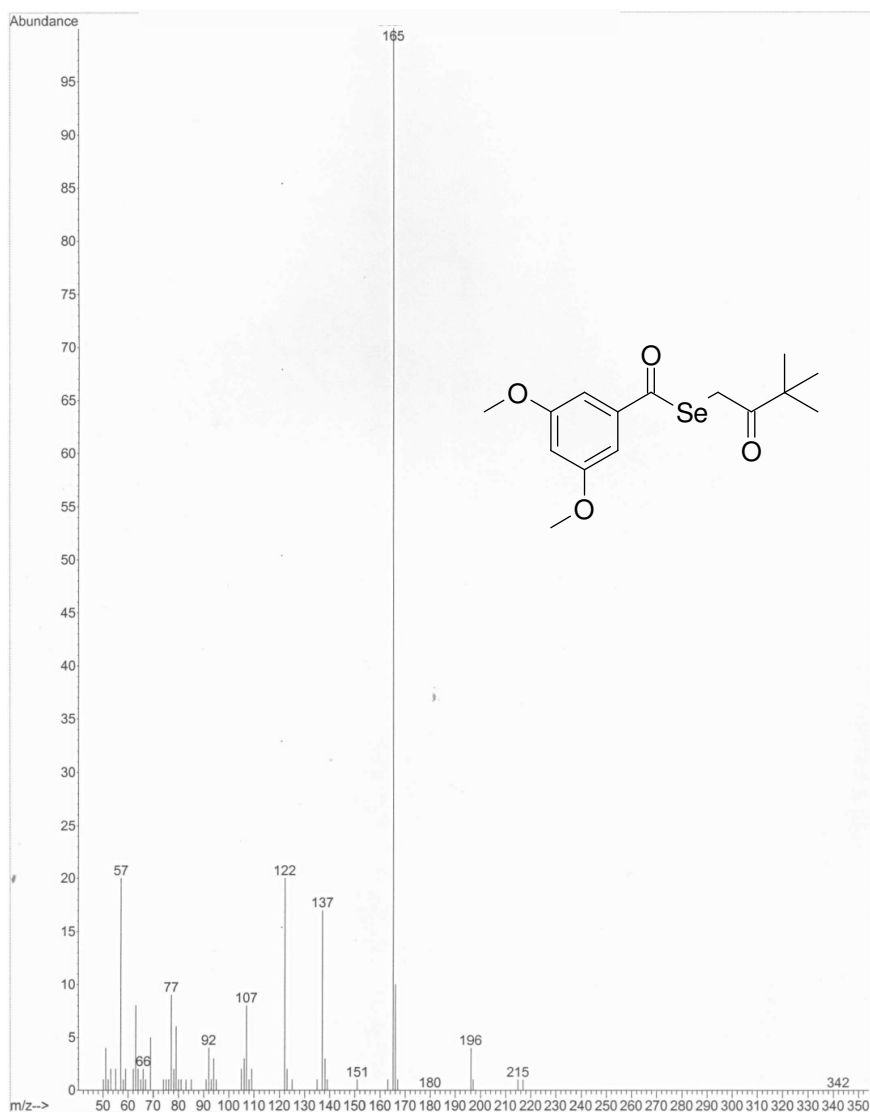


Figura 7.22: Principales fragmentaciones en EM de los selenoésteres cuando R' contiene un grupo 3,5-dimetoxifenilo.



*Figura 7.21: Espectro de masas del selenoéster *V.B2*.*

Tabla 7.5: Espectros de masas de los selenoésteres con $R' = 3,5$ -dimetoxifenilo.
Abundancias de los principales fragmentos.

Fragmento	Serie m/z	I	IV			V	VI
		II.4	IV.A5	IV.B4	IV.C3	V.B2	VI.A4
$M^{+\bullet}$	$M^{+\bullet}$	2	-	-	-	-	2
$ArCO$	165	100	100	98	100	100	100
Ar	137	50	25	27	25	16	35
$Ar - CH_3$	122	36	31	36	35	20	28
$Ar - 2 CH_3$	107	16	15	18	18	8	15
$Ar - 2 CH_3 - CH_2O$	77	13	16	22	32	9	13

Diselenodiósteres (Serie VI.B)

Los cuatro selenoderivados de la Serie VI.B constan de un anillo aromático o heteroaromático sustituido por dos selenoésteres de metilo. Sus espectros de masas muestran la ruptura secuencial de dichos grupos. Esto permite observar fragmentos mayoritarios que contienen selenio, fragmentos que son fácilmente identificables al mostrar un marcado efecto isotópico debido al selenio.

En tres de estos compuestos el pico base contiene selenio, y es el referido al catión $H_3C-Se-CO-(Ar/Hetar)-CO^+$ (A en la Figura 7.23). Al comparar las abundancias relativas de los iones isotópicos del fragmento anterior con las de los isótopos del selenio en la naturaleza (Tabla 7.6), la concordancia encontrada con los valores determinados, teniendo en cuenta el error experimental, permite confirmar la presencia de selenio en dichos fragmentos.

El análisis del espectro del selenoéster VI.B1 (Figura 7.24), representativo de esta serie, nos permite deducir el patrón de fragmentación mostrado en la Figura 7.23.

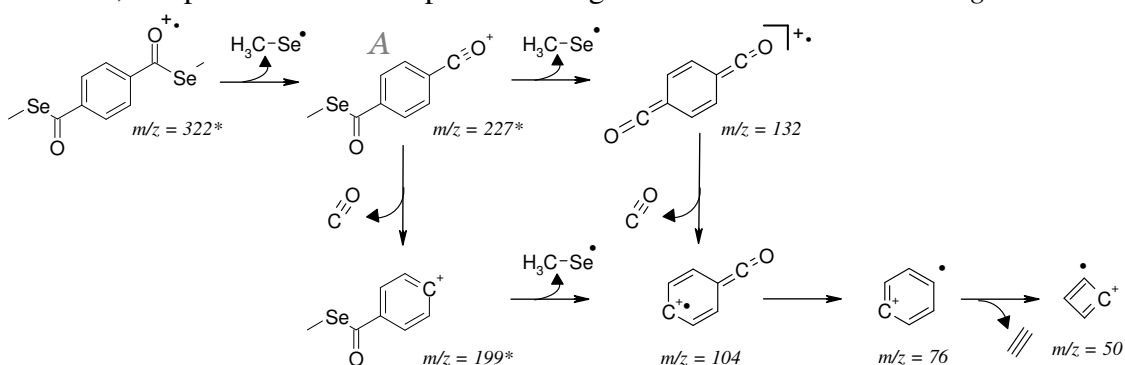


Figura 7.23: Principales fragmentaciones en EM del selenoéster VI.B1.
Se indican con un asterisco los fragmentos que muestran efecto isotópico del selenio.

Tabla 7.6: Comparación de la abundancia relativa de los isótopos de selenio con la determinada para los iones isotópicos del ión principal de derivados de la Serie VI.B.

Compuesto	m/z	⁷⁴ Se	⁷⁶ Se	⁷⁷ Se	⁷⁸ Se	⁸⁰ Se	⁸² Se
Selenio ²³⁰	74 - 82	1,8 %	18,9 %	15,4 %	47,9 %	100 %	17,6 %
IV.B1	221 - 229	2 %	20 %	19 %	52 %	100 %	18 %
IV.B2	221 - 229	2 %	19 %	18 %	50 %	100 %	18 %
IV.B3	227 - 235	3 %	19 %	17 %	48 %	100 %	22 %

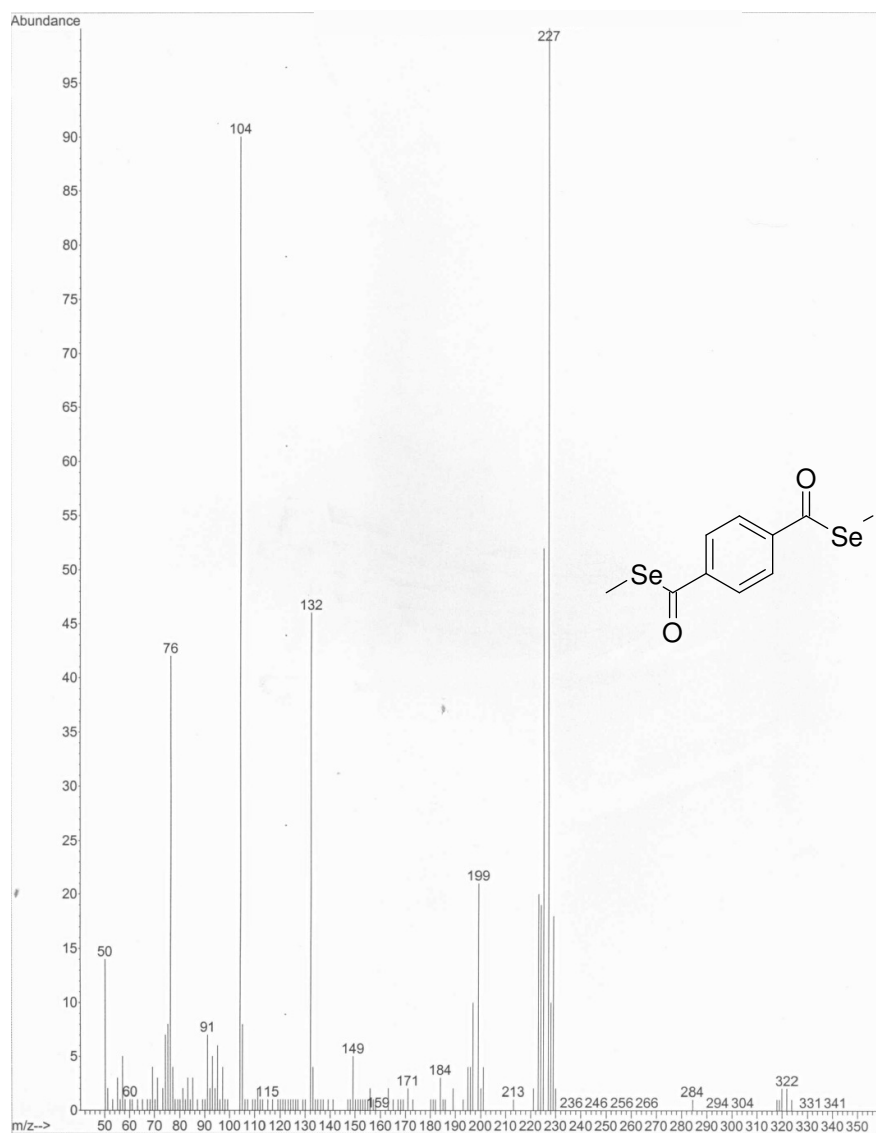


Figura 7.24: Espectro de masas del 1,4-benzenodicarboxoselenolato de dimetilo (VI.B1).

4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD

Se han realizado ensayos de estabilidad con el objeto de confirmar tanto la estabilidad de los compuestos como la no alteración de la estructura de los mismos durante la realización de los ensayos biológicos. Con este fin, se han disuelto 4-5 mg de cada compuesto a evaluar en dimetilsulfóxido deuterado, manteniéndose las muestras a continuación en baño de agua a 37 °C. Se verifica la estabilidad del compuesto a través del registro de espectros de resonancia magnética nuclear de protón a diferentes tiempos y mediante el análisis de las variaciones que puedan producirse a lo largo del tiempo en las señales correspondientes a los hidrógenos del derivado estudiado.

Se evalúa la estabilidad a corto y a largo plazo. El experimento se inicia obteniendo espectros a 0,1 y 2 horas para evaluar la estabilidad en disolución a corto plazo; tomándose espectros de RMN a las 24 y 48 horas con el fin de tener datos a largo plazo. Las muestras se mantienen congeladas en hielo para disminuir la probabilidad de una descomposición inicial durante el intervalo de tiempo comprendido entre la preparación de la disolución y la toma del primer espectro.

En el caso de que descomponga el compuesto, se determina el porcentaje del mismo que permanece sin romperse a partir de las integraciones de la misma señal en el selenoéster y en los productos de descomposición. Siguiendo este procedimiento, se han obtenido los porcentajes de compuesto observado a cada tiempo para todos los derivados analizados; reuniéndose dichos porcentajes en la *Tabla 7.7*. Como ejemplo representativo, en la *Figura 7.25* se muestra la región aromática de los cinco espectros obtenidos, a los tiempos marcados, en el ensayo de estabilidad del derivado *I.B6*.

Por motivos de simplificación a la hora de analizar el comportamiento de los diferentes compuestos, a menos que no se especifique expresamente lo contrario, los comentarios se refieren a los datos tras 48 horas. Asimismo, en algunos compuestos se mencionará el porcentaje de descomposición ($\%_D$) en lugar de del porcentaje de selenoéster sin descomponer ($\%_S$), calculándose el primero a partir de la ecuación (1):

$$\%_D = 100 - \%_S. \quad (1)$$

Los datos mostrados en las *Tablas 7.7* indican que la gran mayoría de los selenoésteres sufren procesos de descomposición en las condiciones del ensayo. Los compuestos más inestables entre todos los selenoésteres estudiados son los derivados de la *Serie I*, los cuales, salvo la excepción de los compuestos *I.B6* y *I.C2*, descomponen totalmente a las 24 horas. La descomposición no es sólo visible en RMN, sino también a simple vista por la aparición de precipitados y por el cambio de color. Además, se observa que algunos compuestos (*I.A7* y *I.D1*) descomponen en su totalidad antes de finalizar la primera hora de tratamiento térmico a 37 °C. En el extremo opuesto, los más estables son los selenoésteres de las *Series IV.D*, *V.B* y *VI*. En esta última serie se encuentran los dos únicos derivados que no sufren descomposición a las 48 horas: los compuestos *VI.A4* y *VI.B1*.

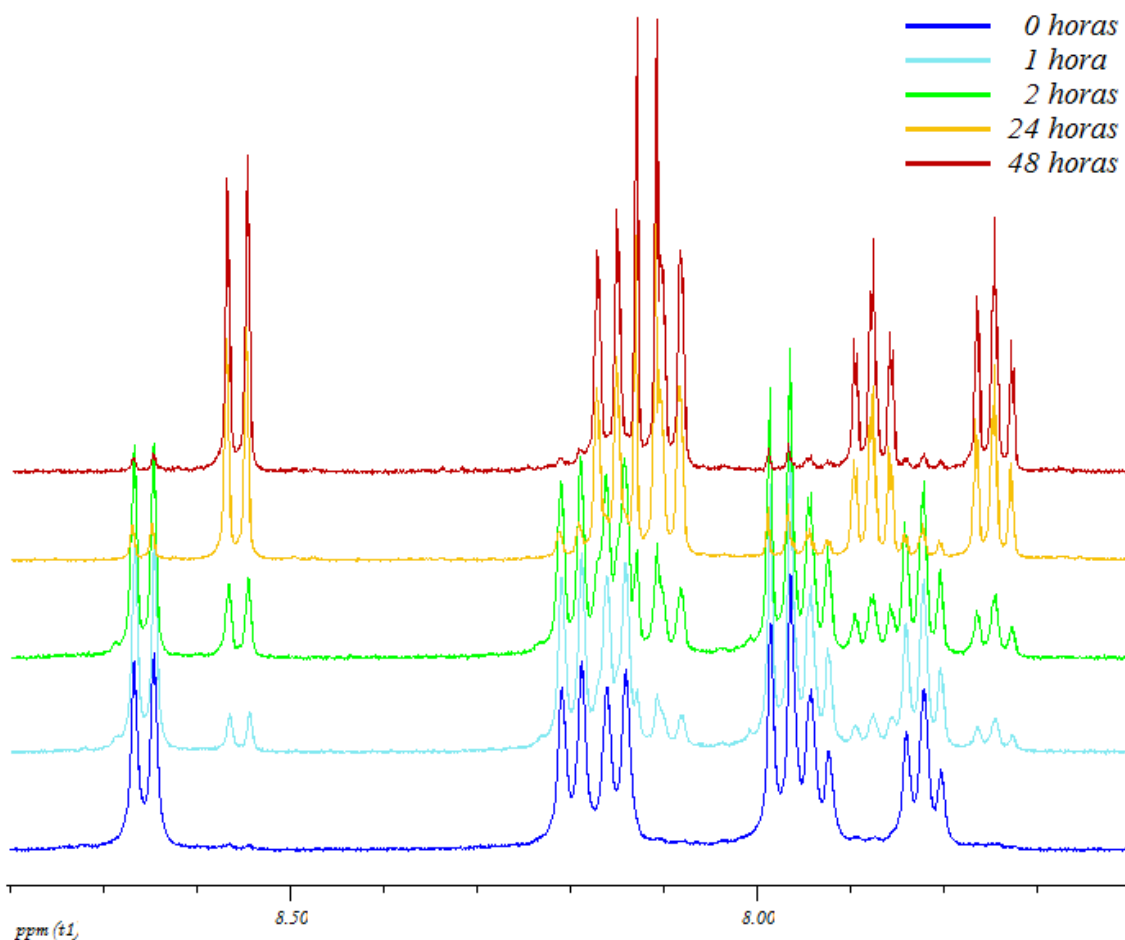


Figura 7.25: Región aromática de los espectros de ^1H -RMN obtenidos a los correspondientes tiempos en la realización del ensayo de estabilidad de I.B6.

En la *Serie IV* se aprecian notables diferencias de estabilidad entre los selenoderivados de las diferentes subseries: mientras que el selenoéster de carboxietilo (IV.DI) apenas sufre descomposición, aquellos derivados que contienen un éster carboxílico con un grupo fenilo enlazado al oxígeno (IV.C) descomponen en tasas comprendidas entre el 40 y el 90 %. Los selenoésteres de las subseries IV.A y IV.B tienen un comportamiento intermedio, al descomponer en tasas que varían del 15 al 40 % y del 10 al 30 %, respectivamente.

Finalmente, el derivado III.1 muestra un bajo porcentaje de hidrólisis a la vista de los espectros de RMN obtenidos, pero en la muestra analizada se aprecian cambios significativos (precipitados, cambio de color) que, por ser similares a los observados en los derivados de la *Serie I*, hacen sospechar que sea factible el que parte de los productos de descomposición precipiten y no sean visibles en RMN.

Resumiendo, considerando todas las series, el orden de estabilidad aproximado, a la vista de los resultados, podría ser el siguiente:

$$I < II, V.A, IV.C < III, IV.A < IV.B < IV.D, VI.A < VI.B.$$

Tabla 7.7: Estabilidad de los selenoésteres de las Series I y II.
Porcentaje de compuesto tras el tratamiento con DMSO-d₆ a 37 °C a distintos tiempos.

Ref.	% Selenoéster					Ref.	% Selenoéster				
	0 h	1 h	2 h	24 h	48 h		0 h	1 h	2 h	24 h	48 h
I.A1	89	7	0	0	0	IV.A2	100	98	96	79	62
I.A3	100	79	0	0	0	IV.A3	100	97	96	81	70
I.A4	100	94	88	0	0	IV.A4	100	100	100	83	70
I.A6	100	44	0	0	0	IV.A5	100	97	96	79	64
I.A7	75	0	0	0	0	IV.A6	100	100	100	92	86
I.A9	88	20	5	0	0	IV.A7	96	94	94	90	83
I.A10	100	71	42	0	0	IV.B1	93,5	92	91	87	85
I.B1	97	83	5	0	0	IV.B2	100	100	100	95	91
I.B4	100	93	89	0	0	IV.B3	100	99	97	80	71
I.B6	100	85	74	14	6	IV.B4	100	100	100	92	84
I.C1	100	79	62	0	0	IV.C1	100	97	95	72	59
I.C2	100	94	92	71	48	IV.C2	100	96	93	48	32
I.D1	58	0	0	0	0	IV.C3	100	95,5	91	46	12
II.1	100	97	94	69	54	IV.D1	100	100	100	97	96
II.2	100	100	99	94	88	VI.A1	100	100	100	96	N.D.
II.3	100	100	97	79	37	VI.A2	100	100	100	85	N.D.
III.1	100	100	100	94	78	VI.A3	100	100	100	75	N.D.
V.A1	100	96	91	57	33	VI.A4	100	100	100	100	100
V.B1	100	100	100	83	69	VI.B1	100	100	100	100	100
V.B2	95	95	95	95	95	VI.B4	100	98	97	95	91

No obstante, hay que recordar que las condiciones en las que se han realizado estas pruebas de estabilidad son extremas, y, por lo tanto, claramente más agresivas que las encontradas en las células. Aunque la temperatura de trabajo sea la misma, se alejan mucho de las presentes en los sistemas celulares, por emplear como disolvente dimetilsulfóxido puro; el cual es un potente oxidante que puede interactuar con el selenio. Es cierto que el DMSO se emplea para disolver los compuestos en la preparación de las muestras, pero también es importante recordar que su concentración en las disoluciones finales es siempre inferior al 1 %.

Con el fin de estudiar la estabilidad de los compuestos en unas condiciones más próximas a las encontradas en las células, en un experimento paralelo se ha adicionado agua deuterada al derivado IV.A2 en una proporción 2:1 DMSO- d_6 :D₂O; manteniendo por lo demás las mismas condiciones experimentales que en el ensayo con DMSO puro. Con dicha adición se redujo de forma claramente significativa la descomposición observada, aunque sin anularla. Los porcentajes de selenoéster encontrados empleando dimetilsulfóxido mezclado con D₂O fueron del 100%, 98 %, 97 %, 95 % y 93 % a 0, 1, 2, 24 y 48 h, respectivamente; notablemente superiores a los previamente determinados en ausencia de agua deuterada (100 %, 98 %, 96 %, 79 % y 62 % a 0, 1, 2, 24 y 48 h, respectivamente).

Al no ser los datos de estabilidad de un único selenoéster extrapolables al conjunto de los compuestos presentados en este trabajo, sería deseable la realización de pruebas de estabilidad en mezclas DMSO-D₂O en un número significativo de derivados con el fin de estudiar el comportamiento de los selenoésteres en unas condiciones más cercanas a los sistemas biológicos, aunque en dicha situación determinados compuestos podrían precipitar por su baja solubilidad, impidiendo que sea posible estudiar todos los derivados en las mismas condiciones. De hecho, el riesgo de precipitación fue uno de los principales motivos considerados en la elección del DMSO- d_6 puro como disolvente en la realización de estos ensayos, al existir la posibilidad de que la aparición de precipitado generara señales adicionales que dificultaran la interpretación de los datos, o que artefactos tales como precipitaciones selectivas de un compuesto y/o producto de degradación falseen los mismos.

Las pruebas de estabilidad, aunque no reproduzcan fielmente las condiciones celulares por la complejidad que supondría determinar qué señales en RMN pertenecen al compuesto en caso de que se disolviera en un medio de cultivo, permiten sacar algunas conclusiones interesantes de los resultados obtenidos.

Al comparar el orden de estabilidad determinado entre las distintas series con la polaridad del sustituyente *R* directamente enlazado al átomo de selenio del selenoéster, se puede extraer la siguiente conclusión. En líneas generales, cuanto más apolares sean los grupos funcionales presentes en dicho sustituyente, mayor es la estabilidad del derivado resultante. Si se consideran en las series que tienen variantes estructurales de diferente complejidad las subseries con la estructura menos compleja, el orden de estabilidad sería:

$$I < II, V.A < III, IV.A < VI.A < VI.B.$$

La relación anterior, con la excepción de los oxoselenoésteres de la *Serie V*, es comparable con el orden de polaridad entre las series, las cuales están ordenadas por polaridad decreciente. Desde el punto de vista químico este orden experimental puede justificarse con una hipótesis plausible: el mayor o menor carácter electroatrayente del grupo funcional situado en el extremo del sustituyente *R*.

La idea anterior se explica teniendo en cuenta que cuanto mayor sea el carácter electroatrayente del resto *R* en su conjunto, mayor será la retirada de carga de la nube electrónica del selenio. Al retirar carga del selenio se disminuye la polarización que estabiliza el enlace C-Se al anular en parte la carga parcial negativa del selenio.

De este modo, los ácidos y las amidas son, de entre los grupos introducidos, los más electroatrayentes. En dicha escala, a continuación están los ésteres y las cetonas. La presencia de un grupo metilo en lugar del puente metilénico (*Serie VI*) confiere un factor añadido de electrodonación. Este orden es, con la excepción de las cetonas, el mismo que el encontrado experimentalmente en los ensayos de estabilidad realizados. La menor estabilidad de las cetonas puede deberse a que en las cetonas no hay tantos electrones en orbitales π como en las amidas, ácidos y ésteres, con lo que tensión desestabilizadora debida al efecto inductivo no se compensa parcialmente por la cesión de carga a través de orbitales π .

VIII. Valoraciones de Actividad

A. Evaluación de Citotoxicidad

VIII. VALORACIONES DE ACTIVIDAD

A. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Método del MTT

Fundamento

Para evaluar la actividad citotóxica de los selenocompuestos sintetizados en líneas celulares se ha empleado el método de la reducción del MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

Con esta metodología es factible detectar las células vivas, debido a que dichas células, al contrario que las muertas, pueden reducir el MTT para dar una sal de formazán, según se muestra en la *Figura 8.1*. La reacción de reducción es cuantificable espectrofotométricamente al variar el color del medio de amarillo a azul-violeta.

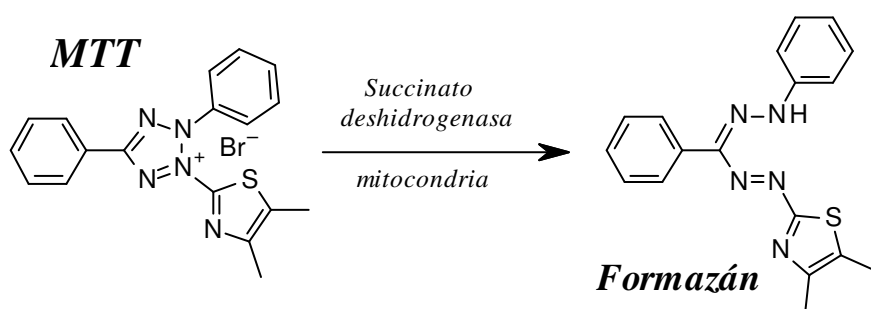


Figura 8.1: Reacción de reducción del MTT.

Este hecho, al calcular de forma aproximada el porcentaje de células vivas y muertas con respecto al control realizado en ausencia del producto químico, permite valorar en qué grado la adición de un compuesto es citotóxico para las líneas celulares con las cuales se trabaja en cada caso. Los ensayos de citotoxicidad siguiendo el método del MTT han sido efectuados por un centro colaborador de acuerdo con su metodología.

Metodología

En base al hecho experimental encontrado en la bibliografía de que los selenoderivados presentan una mayor actividad contra el cáncer de próstata, al realizar el screening de la actividad citostática y citotóxica de los selenoésteres presentados en este trabajo se ha seleccionado la línea tumoral PC-3 (adenocarcinoma de próstata). En una segunda fase se determinará la selectividad entre la línea tumoral prostática PC-3 y la línea RWPE-1, de células no tumorales de próstata, de los derivados más activos. Finalmente, en una última fase se testarán los selenoésteres más potentes en líneas tumorales de otros tejidos, como colon (HT-29), mama (MCF-7) y pulmón (A549).

Tal y como se ha mencionado en el Plan de Trabajo, estos ensayos han sido realizados en el laboratorio de Nuevas Dianas Terapéuticas del Área de Oncología del CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada) de la Universidad de Navarra por la Dra. Celia Prior bajo la supervisión del Dr. Alfonso Calvo.

Líneas Celulares empleadas

Criterios de Selección

Según la bibliografía previamente revisada en Antecedentes, la mayoría de los estudios de citotoxicidad de selenoderivados han sido llevados a cabo en líneas tumorales prostáticas^{217,220,223,224}. Por otro lado, los ensayos quimiopreventivos de la influencia de la suplementación alimentaria con selenio (NPC, SELECT^{120,175-182}) se han centrado principalmente el cáncer de próstata.

Consecuentemente, conociendo la relación demostrada entre los selenoderivados y el cáncer de próstata, se ha seleccionado una línea tumoral de adenocarcinoma de próstata (PC-3) para la realización del screening de todos los selenoésteres presentados en este trabajo de investigación. En línea con lo anterior, la línea celular no tumoral seleccionada para la determinación de la selectividad de la acción citostática y citotóxica de los compuestos es de epitelio de próstata (RWPE-1).

En la elección de las restantes líneas tumorales empleadas en los ensayos de citotoxicidad se ha tenido en cuenta la incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer para estudiar la actividad de los selenoésteres en los cánceres más extendidos. De acuerdo con la IARC⁷ y la American Cancer Society¹¹, los cánceres de próstata o mama (dependiendo del sexo), pulmón y colon son los cánceres con mayor incidencia y mortalidad en la población mundial y estadounidense, respectivamente. Al haberse estudiado el cáncer de próstata en el screening preliminar, se ha seleccionado la línea tumoral más representativa de cada uno de los restantes cánceres citados: HT-29 (colon), MCF-7 (mama) y A549 (pulmón).

En la elección de las líneas celulares también se consideran los resultados del estudio del NPC por Clark y colaboradores, quienes señalan que los cánceres cuya incidencia disminuye de forma más significativa con la ingesta de suplementos de selenio son los cánceres de próstata, pulmón y colon. Por el contrario, el cáncer de mama presenta el comportamiento opuesto según el mismo estudio al aumentar su incidencia en el grupo que recibe un suplemento de selenio con respecto al que recibe un placebo¹⁷⁵. Así, con las líneas tumorales seleccionadas en este trabajo se busca cubrir aquellos tipos de cáncer que se ven más afectados por la ingesta de selenio, tanto en el sentido en el que la ingesta favorece la reducción del cáncer como en el opuesto.

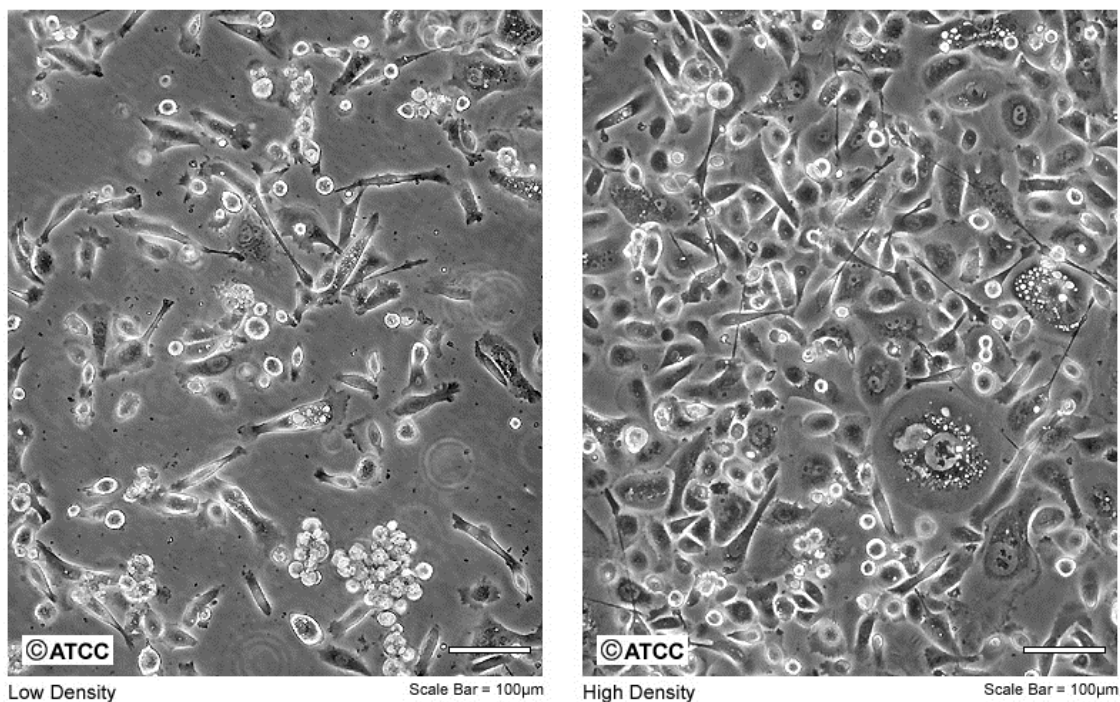
Líneas Celulares:

A continuación se estudian brevemente las líneas celulares empleadas:

- **PC-3:** Línea tumoral muy agresiva de adenocarcinoma de próstata, aislada de un tumor metastático en médula ósea de un varón de etnia caucásica. Las células tumorales derivan del epitelio de próstata, son adherentes, presentan aberraciones cromosómicas, son andrógeno-independientes y expresan PSA (Prostate Specific Antigen)^{231,232}. No expresa la proteína p53²³³. La *Figura 8.2* muestra fotografías de células PC-3 en cultivo, a densidades celulares bajas y elevadas²³¹. En el *Anexo 2.A.1* (*vid.* págs. 285-287) se recogen las imágenes de las restantes líneas.

ATCC Number: **CRL-1435**

Designation: **PC-3**



*Figura 8.2: Células de la línea celular PC-3 en cultivo*²³¹.

- **RWPE-1:** Línea celular no tumoral derivada del epitelio de próstata de un adulto de raza caucásica sano e inmortalizada por transfección con el papiloma virus

humano 18. Estas células son adherentes y expresan la proteína p53 y receptores de andrógenos, pudiendo expresar PSA al activarse estos receptores^{231,234}.

- **HT-29:** Línea celular adherente de adenocarcinoma colorrectal derivada del epitelio intestinal y aislada a partir de un tumor de una mujer de raza caucásica. Su morfología es similar a la de las células epiteliales intestinales: al igual que ellas tiene microvellosidades y microfilamentos. Expresa una proteína p53 mutada inactiva y varios oncogenes (c-myc, k-ras, H-ras...) ^{231,233}.

- **MCF-7:** Línea celular de adenocarcinoma de mama derivada del epitelio de glándula mamaria y aislada a partir de una neoplasia de una mujer de raza caucásica. Las células MCF-7 presentan aberraciones cromosómicas (tienen de 67 a 89 cromosomas), expresan la proteína p53 y el oncogen WNT7B; son adherentes, y precisan de estrógenos para su correcto desarrollo ^{231,233,235}.

- **A549:** Línea de carcinoma de pulmón, aislada a partir de una neoplasia de un hombre de raza caucásica. Es adherente, deriva del epitelio alveolar y presenta aberraciones cromosómicas ^{231,233,236}. Expresa la proteína p53 ²³³.

Procedimiento

Protocolo general

Para la realización de un ensayo genérico de citotoxicidad, en el laboratorio del CIMA se siembra, en los diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos de Millipore (Eschborn, Hessen, Alemania), un número mayor o menor de células, dependiendo de la línea celular a ensayar.

Las células se incuban durante 8 horas para que puedan adherirse y estar en unas condiciones de crecimiento adecuadas a la hora de adicionar las diluciones del correspondiente selenoéster a analizar. Tras la incubación, se añaden 10 µL de MTT a cada pocillo sembrado en la placa de tiempo cero, para determinar el número de células a dicho tiempo. Con este fin, se incuba a 37 °C durante 4 horas, cuando se añade el agente solubilizante y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. De forma paralela, a cada pocillo de las placas donde se testan los selenoésteres se le añaden 50 µL de producto disuelto en medio de cultivo, a la correspondiente concentración (0 µM en el blanco, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM ó 100 µM). Las diferentes concentraciones del compuesto se preparan a partir de una disolución madre 1 mM, obtenida por dilución de una disolución 10 mM en DMSO en el medio de cultivo correspondiente. Los primeros selenoésteres analizados (*Serie I*) se estudiaron a concentraciones diferentes: 0 µM en el blanco, 2 µM, 5 µM, 7 µM y 10 µM. Los datos limitados proporcionados por esta metodología sugirieron la revisión del procedimiento con el fin de ampliar el intervalo de concentraciones.

A las 72 horas se pipetea 10 µL de una disolución de MTT en PBS de concentración 5 mg/mL (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)*, M2128 Sigma, Madrid, España). Se incuba durante 4 horas con el fin de que las células vivas conviertan el MTT en formazán, generando cristales de este último compuesto. A las 4

horas se trata el pocillo con un agente solubilizante o buffer de extracción, para disolver los cristales. La absorbancia de la solución resultante se determina con un lector-espectrofotómetro Polarstar Galaxy de BMG LabTechnologies.

Los parámetros citostáticos y citotóxicos se calculan siguiendo la metodología del NCI²³⁷. Las fórmulas aplicadas para el cálculo de la viabilidad en base a dicha metodología se exponen más adelante en *Cálculos y Expresión de Resultados*.

Modificaciones del protocolo en función de la línea celular ensayada

Las concentraciones de células sembradas por pocillo en función de la línea celular estudiada son las siguientes:

- **PC-3:** $1,5 \times 10^3$ células/pocillo.
- **HT-29, MCF-7, A549:** $2,0 \times 10^3$ células/pocillo.
- **RWPE-1:** $2,5 \times 10^3$ células/pocillo.

Los medios de cultivo, a menos que en una línea concreta se indique lo contrario, se suplementan con antibióticos (penicilina-estreptomicina al 1%) y suero fetal de ternera (SH30109.03, Hyclone, al 10 %). Cada línea celular se cultiva en el medio más conveniente:

- **PC-3, HT-29, A549:** RPMI 1640 GlutamaxTM (Gibco)
- **MCF-7:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
- **RWPE-1:** Kit Keratinocyte Serum Free Medium K-SFM (Gibco). Este medio, al incluir EGF (factor de crecimiento epidérmico) y BPE (extracto de pituitaria bovina) como factores de crecimiento, sólo se suplementa con antibióticos.

Cálculos y Expresión de resultados

Una vez medidos los valores de absorbancia en los distintos pocillos, se calcula la absorbancia media en la placa a tiempo cero ($\overline{Abs_{T_0}}$), en cada concentración de cada producto ($\overline{Abs_p}$) y en el control negativo o ensayo en ausencia de producto ($\overline{Abs_c}$), junto con las desviaciones típica y media respecto de la media.

Para el cálculo de la IC₅₀ o concentración inhibitoria 50% la viabilidad a cada concentración se estima aplicando la fórmula (1):

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\overline{Abs_p}}{\overline{Abs_c}} \times 100 \quad (1)$$

Siendo $\overline{Abs_p}$ y $\overline{Abs_c}$ la media de las absorbancias de la concentración ensayada y del control negativo, respectivamente. Conocidas las viabilidades a las diferentes concentraciones, se dibuja la curva dosis-respuesta y se determinan los valores por encima y por debajo del corte de la curva con el 50% de viabilidad y se determina la IC₅₀ por interpolación en la recta que une dichos puntos.

Con el fin de calcular el intervalo de confianza a partir de la desviación media respecto de la media (\overline{D}) se realiza una propagación de errores para determinar en qué medida dicho error afecta a las viabilidades calculadas, empleando la fórmula (2).

$$\overline{D_{Viab}} = \sqrt{(\overline{Viab})^2} \cdot \sqrt{\left(\frac{\overline{D_P}}{\overline{Abs_P}}\right)^2 + \left(\frac{\overline{D_C}}{\overline{Abs_C}}\right)^2} \quad (2)$$

Conocida $\overline{D_{Viab}}$, se suma y resta a las diferentes viabilidades para calcular los intervalos de variación de las mismas. Con las viabilidades máximas y mínimas se obtienen dos curvas dosis-respuesta adicionales que limitan el área en la cual puede encontrarse la curva real. Dichas curvas se emplearán para interpolar las IC₅₀ máxima y mínima; determinando de este modo el intervalo de confianza asociado al valor inicial calculado para este parámetro.

Se obtendrá, asimismo, el valor de otros parámetros biológicos de interés como la IG₅₀, TGI y LC₅₀ en la mayoría de los selenoésteres, especialmente de la *Serie II* en adelante, por su mejor comportamiento biológico, en comparación con los productos de la *Serie I*. Los dos primeros valores evalúan el potencial citostático o inhibidor del crecimiento celular por los productos testados, al ser las concentraciones a las cuales los derivados inhiben la mitad (IG₅₀) o la totalidad del crecimiento celular (TGI). La LC₅₀, por su parte, indica la citotoxicidad de los compuestos al ser la concentración a la cual la población celular puesta inicialmente se reduce a la mitad.

En el cálculo de las viabilidades utilizadas para determinar estos parámetros se utiliza la media de las absorbancias a tiempo cero ($\overline{Abs_{T0}}$) tal y como se indica en las fórmulas (3) y (4). Se aplica (3) cuando la viabilidad es positiva y (4) cuando es negativa, tal y como se explica en las comunicaciones del NCI²⁵⁰.

$$\% Viabilidad = \frac{\overline{Abs_P} - \overline{Abs_{T0}}}{\overline{Abs_C} - \overline{Abs_{T0}}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% Viabilidad = \frac{\overline{Abs_P} - \overline{Abs_{T0}}}{\overline{Abs_{T0}}} \times 100 \quad (4)$$

Conocidas las viabilidades, en la curva dosis-respuesta definida por ellas se interpola el valor que proceda en cada caso. La IG₅₀ es la concentración a la cual la viabilidad es del 50 %; la TGI, del 0 %; y la LC₅₀, del -50 %.

Al emplear fórmulas diferentes que en el caso de la IC₅₀ el cálculo del error a sumar o restar a cada viabilidad ($\overline{D_{Viab}}$) con el fin de interpolar los intervalos de confianza para cada parámetro es también diferente. De este modo, en el caso de tener una viabilidad positiva o negativa, se aplicarían las ecuaciones (5) o (6), según corresponda en cada caso concreto.

$$\overline{D_{Viab}} = \sqrt{(Viab)^2} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\overline{D_P}^2 + \overline{D_{T0}}^2}}{\overline{Abs_P} + \overline{Abs_{T0}}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{\overline{D_C}^2 + \overline{D_{T0}}^2}}{\overline{Abs_C} + \overline{Abs_{T0}}}\right)^2} \quad (5)$$

$$\overline{D_{Viab}} = \sqrt{(Viab)^2} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\overline{D_P}^2 + \overline{D_{T0}}^2}}{\overline{Abs_P} + \overline{Abs_{T0}}}\right)^2 + \left(\frac{\overline{D_{T0}}}{\overline{Abs_{T0}}}\right)^2} \quad (6)$$

Los valores obtenidos para cada parámetro se mostrarán en el apartado de Resultados y Discusión de este mismo capítulo (*vid.* págs. 218-225). Por su parte, los intervalos de confianza calculados se recogen en el *Anexo 2.A.1* (*vid.* págs. 293-298).

Método del Cristal Violeta

Fundamento

El método del cristal violeta tiene un fundamento similar al del MTT: se basa en la absorción de un colorante, en este caso el cristal violeta o violeta de genciana, por las células vivas. Tras conocer cuánto colorante han captado dichas células, y comparar el valor con los determinados en los controles se puede calcular la viabilidad celular. La estructura química del cristal violeta se muestra en la *Figura 8.3*.

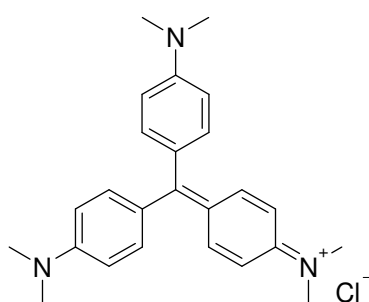


Figura 8.3: Estructura del cristal violeta o violeta de genciana.

El cristal violeta, si bien no se emplea asiduamente en ensayos de citotoxicidad, es muy utilizado en otros campos científicos por ser uno de los dos colorantes empleados en la conocida tinción de Gram, la cual permite diferenciar las bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas²³⁸.

En cuanto a los controles, el positivo es con células muertas, al estar lisadas previamente con el detergente NP40²³⁹ o nonilfenoxipolietoxietanol. El control negativo se realiza en ausencia del selenoderivado cuya citotoxicidad se pretende evaluar. Para calcular las viabilidades se resta la absorbancia media de los pocillos tratados con NP40 a la obtenida en los pocillos con células, tal y como se explicará más adelante.

Metodología

La actividad citotóxica y antiproliferativa de una selección de dieciséis selenoésteres frente a un panel de 8 líneas celulares se ha evaluado en el Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine de la Université Paris-Descartes (Francia) por los Drs. Vincent Jamier y Christianne Chereau, bajo la supervisión del Prof. Dr. Frédéric Batteux.

El objetivo de estos ensayos es múltiple. Conocida la capacidad tanto del selenio como del MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio para participar en reacciones de oxidación-reducción, existe un riesgo de que la actividad encontrada en MTT pueda deberse a una reacción secundaria indeseada. De este modo, la repetición de algunas líneas celulares con un método de evaluación de la citotoxicidad independiente de los procesos redox descartaría así un falso positivo en el ensayo del MTT, siempre y cuando los derivados muestren actividad en los ensayos realizados con la metodología independiente. No obstante, es importante señalar que los resultados de actividad recogidos por las dos metodologías no son comparables entre sí al haber estado las células en contacto con los compuestos durante diferentes intervalos de tiempo (MTT - 72 horas, CV - 48 horas), a causa de los protocolos estandarizados de trabajo de los respectivos centros colaboradores

Por otro lado, se pretende testar los selenoésteres en líneas celulares adicionales, con el objeto de conocer mejor sus posibles aplicaciones antitumorales en otras líneas celulares. Entre las líneas humanas adicionales se incluirá una línea celular embrionaria no tumoral, HUVEC, para evaluar así la selectividad de los selenoésteres. Finalmente, se evaluarán los compuestos en dos líneas murinas, una tumoral y otra no tumoral, para ver la susceptibilidad de las mismas a los compuestos sintetizados, y estudiar, en consecuencia, si sería viable la realización de ensayos *in vivo* en ratones.

El criterio principal de selección es la actividad citostática y citotóxica de los compuestos en los ensayos preliminares realizados en la línea celular PC-3 en el CIMA siguiendo la metodología del MTT. Se busca además incluir derivados representativos de todas aquellas series de selenoésteres que tengan derivados activos.

Líneas Celulares empleadas

Criterios de Selección

Para dar mayor fiabilidad al descarte de posibles interferencias en los resultados obtenidos mediante el método del MTT se decide evaluar los selenoésteres en tres líneas celulares testadas en MTT: HT-29 (colon), MCF-7 (mama) y A549 (pulmón). Con dichas líneas se cubren los tres cánceres de mayor incidencia y mortalidad en mujeres, y dos de las tres neoplasias más comunes en hombres, según los datos de la IARC⁷ y de la American Cancer Society¹¹.

En la selección de las dos líneas tumorales adicionales restantes se han elegido las líneas HepG2 (hígado) y OVCAR-3 (ovarios), por representar a cánceres que, de acuerdo con la IARC⁷, son, de entre los más extendidos, los que tienen las tasas de mortalidad más altas junto con los cánceres de pulmón y de estómago. El cáncer de pulmón queda cubierto con la línea A549, y el de estómago es prevenible con un tratamiento adecuado contra la bacteria *Helicobacter pylorii*, responsable de gran parte de estos casos. Adicionalmente, su incidencia en los países desarrollados es inferior.

Como línea no tumoral se selecciona la línea HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), una línea embrionaria representativa de todo el organismo en vez de

líneas no tumorales de los mismos tejidos que las líneas malignas testadas para poder evaluar un mayor número de líneas tumorales y hacer así un screening de citotoxicidad más completo. Aparte, al tener las células embrionarias una tasa de división elevada, representan a todas aquellas células sanas (médula ósea, piel...) que con frecuencia se ven afectadas por los tratamientos quimioterapéuticos que atacan a las células en división, como es el caso de los antimetabolitos. Por esta razón, la exigencia de este screening es mayor que la que se hubiera tenido en el caso de haber seleccionado líneas no tumorales del mismo tejido, como en los ensayos del CIMA (PC-3 / RWPE-1).

Por último, se han seleccionado las líneas murinas CT26 (carcinoma de colon), y NIH-3T3 (fibroblasto embrionario) para estudiar la susceptibilidad de las células de ratón a los selenoésteres y poder valorar la viabilidad de hacer ensayos *in vivo* de los selenoésteres más prometedores, preparando así el terreno para los mismos. Se elige una línea celular murina para una localización ya estudiada (colon), y una segunda línea embrionaria no tumoral para determinar la selectividad de la acción de los selenoésteres en ratones, al derivar la línea tumoral de fibroblastos. Aunque los ensayos *in vivo* se plantean como continuación del trabajo en esta Tesis Doctoral, su realización, en caso de resultados satisfactorios, queda pendiente para trabajos posteriores.

Líneas Celulares:

Resumiendo, las líneas celulares empleadas en los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo mediante esta metodología son las siguientes:

- **Tumorales humanas:** HT-29 (colon), MCF-7 (mama), A549 (pulmón), HepG2 (hígado) y OVCAR-3 (ovarios).
- **No tumorales humanas:** HUVEC (embrionaria no tumoral).
- **Murinas:** CT26 (tumoral, fibroblasto de colon), NIH-3T3 (embrionaria no tumoral, fibroblasto).

A continuación se estudiarán brevemente aquellas líneas celulares que no hayan sido testadas en los ensayos realizados siguiendo la metodología del MTT:

- **HepG2:** Línea tumoral de carcinoma hepático, aislada de un tumor poco maligno de un adolescente de raza caucásica. Posee aberraciones cromosómicas y secreta en abundancia proteínas al medio (albúmina, transferrina, plasminógeno...), como un hepatocito normal. Es una línea celular adherente y libre de infección por virus de la hepatitis B^{231,240}. Expresa la proteína p53 en su estado nativo²³³.
- **OVCAR-3:** Línea de adenocarcinoma ovárico, aislada a partir de un tumor de una mujer de raza caucásica y derivada de células epiteliales. Las células OVCAR son adherentes, y tienen una elevada inestabilidad cromosómica. Su capacidad metastática es elevada, presentan resistencia a fármacos quimioterapéuticos conocidos^{231,241} y expresan una variante mutante de la proteína p53²³³. La *Figura 8.4* muestra imágenes de células OVCAR-3 en cultivo²³¹. En el *Anexo 2.A.2* (*vid.* págs. 299-301) se recogen imágenes de las restantes líneas celulares en las cuales se han testado selenoésteres siguiendo la metodología del cristal violeta.

ATCC Number: **HTB-161**
 Designation: **NIH:OVCAR-3**

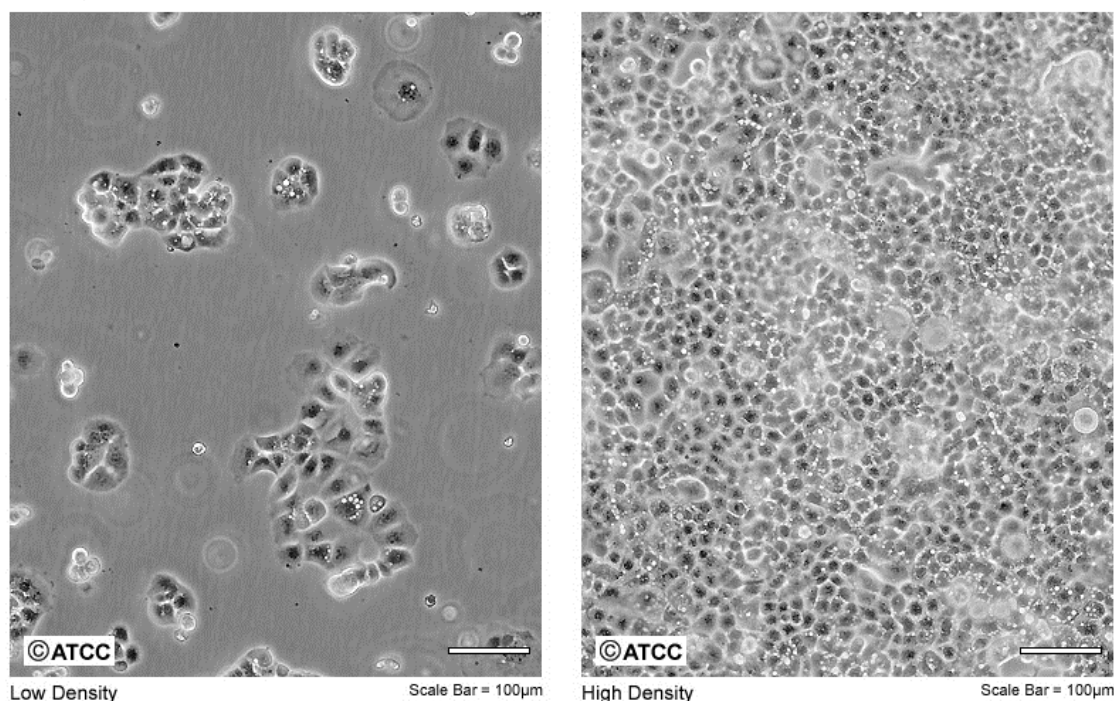


Figura 8.4: Células de la línea celular OVCAR-3 en cultivo ²³¹.

- **HUVEC:** Línea embrionaria no tumoral de células epiteliales del endotelio vascular del cordón umbilical. Las células son adherentes y se dividen a gran velocidad (aproximadamente cada 36 horas), comportándose casi como si fueran células madre ²³¹.
- **NIH-3T3:** Línea celular no tumoral de fibroblasto embrionario de ratón (*Mus musculus*) inmortalizada por infección con el poliomavirus SV40. Presenta aberraciones cromosómicas y es una línea celular adherente que crece en recipientes de plástico; nunca lo hace en superficies de vidrio. Se divide con rapidez y fue una de las primeras líneas aisladas. De hecho, su nombre 3T3 deriva de “3-day transfer, inoculum of 3×10^5 cells” ^{231,242}.
- **CT26:** Línea celular de carcinoma de colon murino (*Mus musculus*) inducido con un agente químico (N-Nitroso-N-metiluretano). Las células son adherentes y muy similares a los fibroblastos de los que deriva esta línea tumoral ²³¹.

Procedimiento

Los reactivos químicos necesarios para la preparación de los medios y para la realización de los ensayos biológicos fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia). Las líneas celulares se adquirieron en ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos).

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- **NIH 3T3, CT26, MCF-7, A549, HepG2:** DMEM/Glutamax-I.

- **HUVEC:** Endothelial Cell Basal Medium-2.
- **HT-29:** McCoy/Glutamax-I.
- **OVCAR:** RPMI1640/Glutamax-I.

Todos los medios de cultivo se suplementan con antibióticos (Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia) y con un 10% de suero fetal de ternera (FCS) inactivado por calor, a excepción del medio de cultivo utilizado en la línea OVCAR, en cuyo cultivo la suplementación con FCS es del 20%. Adicionalmente, todas las líneas celulares se testan para descartar posible infecciones con micoplasmas.

Las distintas líneas celulares se siembran en placas de 96 pocillos, con el medio de cultivo necesario en cada caso y se incuban 48 horas en presencia de las concentraciones ensayadas de los selenoésteres objeto de estudio. El número de células añadido por pocillo varía en función de la línea celular, al tener cada una de ellas diferentes requerimientos. Las concentraciones celulares empleadas son:

- **NIH 3T3, CT26, HUVEC, OVCAR:** 10^4 células/pocillo.
- **MCF-7, A549, HepG2:** 2×10^4 células/pocillo.
- **HT-29:** 3×10^4 células/pocillo.

La viabilidad celular se evalúa a través del método del cristal violeta, siguiendo el procedimiento descrito por Alexandre *et al*²²⁵. Con este fin, las células, tanto las expuestas al compuesto como las de los controles negativos con y sin detergente se tiñen durante ½ h con una solución de colorante al 0,5 % y etanol al 30% en PBS. Tras lavar la placa dos veces con PBS, el colorante fijado a las células es disuelto en etanol al 50 %. La absorbancia de la disolución resultante es determinada a 560 nm en un lector para placas de 96 pocillos.

Cálculos y expresión de resultados

Conocidos los valores de absorbancia, se calcula la absorbancia media del control positivo con el detergente NP40, en ausencia de producto y a cada una de las concentraciones evaluadas del mismo (\overline{Abs}_{NP40} , \overline{Abs}_C y \overline{Abs}_P , respectivamente).

Cada concentración se ha evaluado por triplicado, a excepción del control negativo, el cual se ha testado en seis pocillos. Para calcular las viabilidades se resta previamente la fracción de la absorbancia leída en el control positivo con nonilfenoxipolietoxietanol (NP40), aplicando la fórmula (7):

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\overline{Abs}_P - \overline{Abs}_{NP40}}{\overline{Abs}_C - \overline{Abs}_{NP40}} \times 100 \quad (7)$$

Calculadas las viabilidades a las diferentes concentraciones por aplicación de la fórmula anterior, se dibuja la curva dosis-respuesta y se determinan los valores por encima y por debajo del corte de la curva con el 50% de viabilidad para calcular la IC₅₀ por interpolación en la recta definida por dichos puntos.

El intervalo de confianza de las IC_{50} determinadas se halla calculando a cada concentración la desviación media respecto de la media (\bar{D}) de las absorbancias, utilizando la fórmula (8).

$$\overline{D_{Viab}} = \frac{\sigma_P}{\sqrt{n} \cdot (Abs_C - Abs_{NP40})} \quad (8)$$

Siendo σ_P la desviación típica de las absorbancias a la concentración referida. Las diferentes $\overline{D_{Viab}}$ obtenidas se suman y restan a las correspondientes viabilidades para calcular los intervalos de variación de las mismas. Así, con las viabilidades máximas y mínimas se obtienen dos curvas dosis-respuesta adicionales que limitan el área en la cual puede encontrarse la curva real, y que se emplearán en la interpolación de las IC_{50} máxima y mínima; las cuales determinan el intervalo de confianza asociado al valor inicial calculado para este parámetro.

Los valores de IC_{50} determinados se muestran en el apartado de Resultados y Discusión de este mismo capítulo. Por su parte, los intervalos de confianza calculados se recogen en el *Anexo 2.A.2* (vid. págs. 322-324).

Tanto en este método como en el anterior, para facilitar la visualización de los valores determinados para los diferentes parámetros, se seguirá el siguiente criterio a la hora de mostrar dichos valores en las tablas de resultados:

- Se resaltan en rojo aquellos parámetros de los derivados que mejoran la actividad (de acuerdo con la bibliografía) de los cinco controles quimioterapéuticos considerados.
- Se marcan en azul aquellos parámetros que superan al menos a tres de los cinco fármacos de referencia.
- Por último, se señalan en negrita los parámetros que mejoran la acción de al menos uno de los cinco controles.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método del MTT

Todos los selenoésteres presentados en este trabajo de investigación han sido evaluados en la línea celular PC-3 (carcinoma de próstata humano) siguiendo la metodología del MTT en el Laboratorio de Nuevas Dianas Terapéuticas del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra.

Con este fin se han determinado colorimétricamente los valores de viabilidad celular a distintas concentraciones de producto, para obtener las curvas dosis-respuesta a partir de la cual se han interpolado los valores de IC_{50} , IG_{50} , TGI y LC_{50} , (*vid. Anexo 2.A.1*) aplicando las fórmulas previamente descritas en las páginas 197-199. Las concentraciones iniciales estudiadas en los diferentes productos son 2, 5, 7 y 10 μM . Las limitadas conclusiones extraíbles a partir de un intervalo de concentraciones tan estrecho han sugerido la ampliación del mismo y la subsiguiente evaluación de los productos finales a las concentraciones 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μM .

En una segunda fase, se ha determinado la selectividad de la acción de los selenoésteres más potentes, a través de la determinación de la citostaticidad y de la citotoxicidad de dichos derivados en la línea celular RWPE-1, una línea de células no tumorales de próstata. Por último, para conocer la actividad de los derivados en otras líneas tumorales, se han evaluado los selenoésteres más activos en las líneas HT-29 (adenocarcinoma colorrectal) MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y A549 (carcinoma del epitelio alveolar de pulmón).

En todos los casos, se comparan los valores experimentales de los parámetros de citostaticidad y citotoxicidad de los selenoésteres con los parámetros de una selección de fármacos (cisplatino, doxorubicina, etopósido, taxol y vincristina) en las mismas líneas celulares, encontrados tras una búsqueda bibliográfica. En la selección de los derivados más activos se han aplicado criterios de corte exigentes al requerir que tengan valores destacados de actividad en PC-3.

De este modo, resumiendo, los ensayos realizados, junto con los criterios de selección correspondientes aplicados son los siguientes:

- **Ensayo de citotoxicidad preliminar (PC-3):** Se ha evaluado la citostaticidad y la citotoxicidad de todos los selenoésteres sintetizados, sin excepción.
- **Ensayo de selectividad (RWPE-1):** Se ha realizado en los selenoésteres que tuvieran en el ensayo preliminar en PC-3 al menos uno de los cuatro parámetros (IC_{50} , IG_{50} , TGI y LC_{50}) por debajo de 10,0 μM .
- **Ensayos de citotoxicidad en líneas tumorales (HT-29, MCF-7, A549):** Se han efectuado en aquellos selenoésteres que en el ensayo preliminar en PC-3 tuvieran al menos uno de los cuatro parámetros (IC_{50} , IG_{50} , TGI y LC_{50}) por debajo de 5,0 μM .

Evaluación preliminar de citotoxicidad (PC-3).

Serie I: Selenoésteres de carboxialquilo

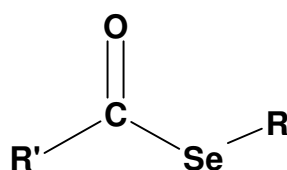
En la *Tabla 8.1* se muestran los valores de IC_{50} calculados tanto para los selenoésteres de la *Serie I* como para los selenoésteres de carboximetilo (compuestos *DP.I.IT*) previamente sintetizados en el grupo de investigación^{197,217}. Asimismo, los valores se comparan con valores de IC_{50} publicados en bibliografía de fármacos de uso habitual en terapia clínica (cisplatino, doxorubicina, etopósido, taxol y vincristina).

Tabla 8.1: Valores de IC_{50} determinados para los selenoésteres de carboximetilo de la Serie I y de la quimioteca del grupo de investigación en células PC-3.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Ref.	IC_{50} (μ M)	Ref.	IC_{50} (μ M)
I.A1	> 10	I.B1	> 10	DP.I.IT1	10,0
I.A2	> 10	I.B2	> 10	DP.I.IT2	6,80
I.A3	> 10	I.B3	> 10	DP.I.IT3	4,00
I.A4	> 10	I.B4	> 10	DP.I.IT5	> 10
I.A5	> 10	I.B5	> 10	DP.I.IT6	10,0
I.A6	> 10	I.B6	> 10	DP.I.IT7	> 10
I.A7	> 10	I.B7	> 10	DP.I.IT8	2,90
I.A8	> 10	I.C1	46,5	DP.I.IT9	> 10
I.A9	> 10	I.C2	> 100	Cisplatino	2,94 ²⁴³
I.A10	> 10	I.D1	55,9	Doxorrubicina	0,575 ²⁴³
Etopósido	13,6 ²⁴⁴	Taxol	10,4 ²⁴⁵	Vincristina	0,0036 ²⁴⁴

A la vista de los datos se concluye todos los selenoésteres de la *Serie I* tienen una IC_{50} por encima de la concentración más elevada ensayada (10 μ M), con lo cual ninguno de ellos mejora la actividad de al menos uno de los cinco controles quimioterapéuticos evaluados. De entre los compuestos *DP.I.IT*, solamente cinco de los nueve compuestos tienen una IC_{50} por debajo de la del taxol y la del etopósido.

Los resultados anteriores indican que el screening realizado variando *R'* ha sido ineficaz en la búsqueda de selenoésteres con actividad citotóxica en células PC-3.



En consecuencia, se abandona el estudio de las variaciones del resto R' y se inician las variaciones en R . En la elección de los sustituyentes R' presentes en los derivados a sintetizar se decide, tras analizar los datos de la *Tabla 8.1*, emplear los tres restos de los derivados *DP.I.IT* más activos. Como resto representativo de los selenoésteres presentados en este trabajo se selecciona el presente en *IA6*, por producir un mayor efecto sobre las células PC-3 al mostrar uno de los menores porcentajes de supervivencia celular a la concentración de 10 μM , según se muestra en la *Tabla 8.2*.

Se ha seleccionado dicho selenoéster frente a los productos *IB6* y *IB7* por ser la síntesis de derivados de quinolina mucho más compleja. El compuesto *LD1*, el cual tiene una viabilidad similar a *IA6* a 10 μM , no se ha elegido al ser un selenoéster de carboxifenilmetilo, con lo que no es representativo del conjunto de la *Serie I*.

Tabla 8.2: Porcentaje de viabilidad de las células PC-3 con respecto al control negativo a la concentración 10 μM de compuesto.

Ref.	% Viab.	Ref.	% Viab.	Ref.	% Viab.
IA1	104,8	IA7	92,6	IB3	95,3
IA2	100,3	IA8	91,9	IB4	94,7
IA3	112,1	IA9	95,4	IB5	104,7
IA4	103,8	IA10	100,5	IB6	65,7
IA5	105,7	I. B1	92,2	IB7	79,9
IA6	81,7	IB2	97,9	LD1	81,9

Por lo tanto, los restos R' seleccionados para orientar la síntesis de los derivados de las restantes series, con restos R diferentes del resto carboximetilo, se enumeran a continuación, indicando entre paréntesis el compuesto de la *Serie I* o de la quimioteca del grupo de investigación que lo contiene: fenilmetilo (*DP.I.IT8*), fenilo (*DP.I.IT.2*), 4-clorofenilo (*IA6*) y 3,5-dimetoxifenilo (*DP.I.IT3*). En algunas series, no obstante, se planteará la síntesis de selenoésteres adicionales con otros R' .

La citostaticidad y citotoxicidad de los selenoésteres de carboxifenilmetilo y de carboxietilo, que completan la *Serie I* aportando diferentes R que contengan el grupo $-\text{COOH}$, no mejora la de los restantes derivados de la *Serie I*.

Series II-III: Selenoésteres de carbamoilmetilo y selenoanhídridos

En la *Tabla 8.3* se recogen de forma conjunta los parámetros citotóxicos y citostáticos de los selenoésteres de las *Series II* y *III*, por el reducido número de compuestos incluidos en las mismas. Los derivados de la *Serie II* tienen un bajo potencial antiproliferativo, al tener valores de IC_{50} e IG_{50} entre 20 y 90 μM . El único compuesto reseñable es el derivado *II.4*, que tiene una IG_{50} por debajo de 10 μM y una TGI por debajo de 100 μM .

Tabla 8.3: Parámetros citotóxicos y citostáticos en células PC-3 (en μM) determinados para los selenoésteres de las Series II y III.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	IG ₅₀ (μM)	TGI (μM)	LC ₅₀ (μM)
II.1	55,4	35,7	> 100	> 100
II.2	66,0	46,3	97,6	> 100
II.3	82,3	41,0	≈ 100	> 100
II.4	20,9	6,36	70,6	> 100
III.1	13,0	7,91	79,7	> 100
Cisplatino	2,49 ²⁴³	5,01 ²⁴⁶	50,1 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶
Doxorrubicina	0,575 ²⁴³	0,251	3,16	20,0
Etopósido	13,6 ²⁴⁴	0,63	3,98	79,4
Taxol	10,4 ²⁴⁵	0,004	> 100	> 100
Vincristina	0,0036 ²⁴⁴	0,002	15,9	> 100

El selenoanhídrido de la *Serie III* es más activo que la media de los derivados de la *Serie II*, aunque sus parámetros, con la excepción de la IC₅₀, son ligeramente peores que los de *II.4*. Estos dos selenoésteres tienen una actividad antiproliferativa interesante, pero no alcanzan la potencia de los derivados de las *Series IV, V* y *VI*.

Serie IV: Selenoésteres R''-oxicarbonilalquilo

La *Tabla 8.4* recoge los valores citostáticos y citotóxicos de los alquil/fenoxicarbonilalquilselenoésteres de la *Serie IV*. Dicha serie, con una estructura general $R'\text{COSeR}_2\text{COOR}_1$, se divide en cuatro subseries, en función del resto R_1 (que determina el tipo de éster presente) y del grupo alquilo R_2 , que actúa como un separador entre el selenio y el éster carboxílico.

En la *Serie IV.A*, donde $R_1 = -\text{CH}_3$ y $R_2 = -\text{CH}_2-$, se observa una mejora de la actividad biológica de los compuestos con respecto a sus equivalentes en las *Series I* y *II*. De hecho, los siete derivados de la *Serie IV.A* tienen la IG₅₀ por debajo de 10 μM , y cinco de ellos, por debajo de 5 μM , mejorando la actividad del cisplatino. En cuanto a la TGI, cuatro de ellos poseen valores de TGI inferiores a 10 μM , y por lo tanto, mejores que los de tres de los cinco fármacos de referencia. Ningún derivado tiene valores de LC₅₀ por debajo de 100 μM .

Las variaciones en R_1 para transformar los metoxycarbonilselenoésteres (*IV.A*) en otros ésteres carboxílicos modifican la actividad del compuesto resultante. Al pasar de un éster metílico a otro *terc*-butílico se reduce la potencia citostática del selenoéster en un orden de magnitud (*vid Tabla 8.4*). En la variación a un éster fenílico la tendencia no es tan clara: en dos casos disminuye la actividad en todos los parámetros y en un tercero mejora ligeramente en términos de IC₅₀ e IG₅₀ y empeora en el caso de la TGI.

Al alargar el espaciador R_2 y pasar de un selenoéster de metiloxicarbonilmetilo ($R_2 = CH_2$) a un selenoéster de metiloxicarboniletilo ($R_2 = -CH_2CH_2-$, paso de IV.A1 a IV.D1) se reducen los valores determinados de IC_{50} e IG_{50} , aumentando al mismo tiempo la concentración necesaria para inhibir la totalidad del crecimiento celular.

De entre los siete derivados IV.B y IV.C, dos tienen una IG_{50} inferior a $10 \mu M$ y cuatro, una TGI por debajo de $100 \mu M$. Considerando la Serie IV en conjunto, IV.A2 tendría los menores valores de IC_{50} y TGI y IV.D1, la IG_{50} más potente.

Tabla 8.4: Parámetros citotóxicos y citostáticos en células PC-3 (en μM) determinados para los alquil/fenoxicarbonilalquilselenoésteres de la Serie IV.

Ref.	IC_{50} (μM)	IG_{50} (μM)	TGI (μM)	LC_{50} (μM)
IV.A1	6,59	4,81	10,0	> 10
IV.A2	4,33	2,94	8,76	> 100
IV.A3	5,46	4,18	9,06	> 100
IV.A4	18,0	9,10	74,0	> 100
IV.A5	5,61	4,29	9,07	> 100
IV.A6	7,11	5,61	57,3	> 100
IV.A7	5,79	4,87	18,4	> 100
IV.B1	69,4	43,6	> 100	> 100
IV.B2	74,4	45,2	> 100	> 100
IV.B3	91,9	63,7	> 100	> 100
IV.B4	45,3	27,0	77,7	> 100
IV.C1	8,10	6,38	79,4	> 100
IV.C2	8,48	6,86	82,7	> 100
IV.C3	49,1	36,6	99,2	> 100
IV.D1	5,40	2,22	19,7	> 100
Cisplatino	2,49 ²⁴³	5,01 ²⁴⁶	50,1 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶
Doxorrubicina	0,575 ²⁴³	0,251	3,16	20,0
Etopósido	13,6 ²⁴⁴	0,63	3,98	79,4
Taxol	10,4 ²⁴⁵	0,004	> 100	> 100
Vincristina	0,0036 ²⁴⁴	0,002	15,9	> 100

Serie V: Selenoésteres de acilalquilo

Los selenoésteres de acilalquilo de la Serie V (Tabla 8.5) destacan por su actividad. El selenoéster V.A1 presenta valores de TGI y LC_{50} por debajo de $5 \mu M$ y claramente más activos que los cinco fármacos utilizados como referencia. Así, este

derivado es, en términos de citotoxicidad, el selenoéster más potente en esta línea celular de los presentados en este trabajo de investigación al ser el único que tiene una dosis letal 50 % inferior a 100 μM . Los restantes parámetros siguen siendo reseñables al estar la IG_{50} por debajo de 2 μM y ser menor que la de los selenoésteres previamente analizados, aunque queda por debajo de la potencia de los compuestos de la *Serie VI.B*.

El aumento del volumen del sustituyente *R* que supone el transformar el grupo 2-oxopropilo en 2-oxo-3,3-dimetilbutilo redundará en una ligera pérdida de la actividad en esta línea celular. No obstante, ésta sigue siendo destacable al mejorar los dos derivados *V.B* los parámetros de IC_{50} , IG_{50} y TGI de algunos de los fármacos tomados como referencia.

Tabla 8.5: Parámetros citotóxicos y citostáticos en células PC-3 (en μM) determinados para los selenoésteres de acilalquilo de la Serie V.

Ref.	IC_{50} (μM)	IG_{50} (μM)	TGI (μM)	LC_{50} (μM)
V.A1	2,27	1,58	3,14	4,71
V.B1	4,68	2,19	28,3	> 100
V.B2	5,02	2,66	6,91	> 100
Cisplatino	2,49 ²⁴³	5,01 ²⁴⁶	50,1 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶
Doxorrubicina	0,575 ²⁴³	0,251	3,16	20,0
Etopósido	13,6 ²⁴⁴	0,63	3,98	79,4
Taxol	10,4 ²⁴⁵	0,004	> 100	> 100
Vincristina	0,0036 ²⁴⁴	0,002	15,9	> 100

Serie VI: Selenoésteres de metilo

La *Serie VI* (Tabla 8.6) ilustra la importancia del número de átomos de selenio y de la simetría sobre la actividad: el paso de un anillo bencénico monosustituido con un grupo COSeCH_3 (*VI.A1*) a un anillo disustituido en posiciones 1-4 ó 1-3 por dicho grupo (*VI.B1* / *VI.B2*), con la subsiguiente ganancia de simetría, se traduce en un aumento muy significativo de la actividad, hecho en línea con trabajos previos del grupo de investigación que señalan la simetría como un aspecto destacable en el diseño de estructuras con actividad citotóxica y antiproliferativa en células tumorales²¹³⁻²¹⁶.

Los cuatro diselenodiésteres de dimetilo aislados son, de entre los compuestos diseñados en este trabajo, los que presentan una mayor actividad citostática. El derivado menos activo de los cuatro, *VI.B1*, tiene valores de IC_{50} e IG_{50} por debajo de 1 μM e inferiores a los de todos los compuestos de las series anteriores, y a varios controles quimioterapéuticos tomados como referencia. Su TGI, inferior a 20 μM , si bien no es de las más bajas, sigue siendo destacable.

Los restantes derivados *VI.B* multiplican la actividad de *VI.B1* en factores de entre 10 y 100. *VI.B4* sería el compuesto líder al ser el selenoéster más potente en términos de IC_{50} e IG_{50} en esta línea celular, no sólo de la serie *VI.B* sino de todo el

trabajo, por tener valores para estos parámetros en el rango nanomolar, siendo únicamente superado entre los controles por la vincristina en ambos parámetros y por el paclitaxel en la IG_{50} . La TGI de *VI.B4* sigue siendo muy destacada al ser inferior a las encontradas en la bibliografía para los cinco fármacos de referencia, aunque no es la más potente al ser superada por la TGI de *VI.B3*, la menor en esta línea celular de entre todos los selenoésteres presentados, siendo dicha TGI la única en el orden nanomolar. Los parámetros de IC_{50} e IG_{50} determinados para *VI.B3* son similares a los de *VI.B4*.

Los diselenodíésteres de dimetilo son, en consecuencia, unos agentes citostáticos muy potentes, con posibles aplicaciones en base a su actividad. Sin embargo, no ejercen una acción citotóxica: ninguno tiene una dosis letal 50% inferior a 100 μM .

Tabla 8.6: Parámetros citotóxicos y citostáticos en células PC-3 (en μM) determinados para los mono y diselenoésteres de metilo y dimetilo de la Serie VI.

Ref.	IC_{50} (μM)	IG_{50} (μM)	TGI (μM)	LC_{50} (μM)
VI.A1	46,4	13,0	> 100	> 100
VI.A2	9,81	8,58	71,3	> 100
VI.A3	30,1	14,4	71,3	> 100
VI.A4	53,2	36,3	77,4	> 100
VI.B1	0,968	0,822	18,4	> 100
VI.B2	0,0884	0,0567	23,7	> 100
VI.B3	0,0847	0,0089	0,810	> 100
VI.B4	0,0383	0,0084	1,69	> 100
Cisplatino	2,49 ²⁴³	5,01 ²⁴⁶	50,1 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶
Doxorrubicina	0,575 ²⁴³	0,251	3,16	20,0
Etopósido	13,6 ²⁴⁴	0,63	3,98	79,4
Taxol	10,4 ²⁴⁵	0,004	> 100	> 100
Vincristina	0,0036 ²⁴⁴	0,002	15,9	> 100

Resumen final

En los apartados anteriores se han ido revisando los resultados de citostacidad y citotoxicidad de los selenoésteres en la línea celular PC-3, agrupándolos por series. A la vista de los resultados obtenidos puede decirse que el orden aproximado de actividad, de mayor a menor, es el siguiente:

$$VI.B > V.A > V.B / IV.D > IV.A > III, VI.A, IV.C > I, II, IV.B$$

En líneas generales, si en cada serie tomamos como referencia los derivados con las estructuras más simples, para descartar efectos que puedan deberse a otros factores como el impedimento estérico, el orden encontrado es el siguiente:

$$VI.B > V.A > IV.A > III, VI.A > I, II$$

Es decir, con la excepción de los selenoésteres de metilo, el orden concuerda de forma aproximada con el inverso de la numeración de las series. Como dicha numeración es, aproximadamente, en orden decreciente de polaridad del grupo presente en el resto R unido al átomo de selenio (ácidos *-I-*, amidas *-II-*, anhídridos *-III-*, ésteres *-IV-*, cetonas *-V-*, alquilo *-VI-*), puede decirse que se observa la tendencia aproximada de que cuanto más apolar sea dicho grupo para un derivado determinado, más activo será dicho selenoéster.

Para integrar los resultados de las diferentes series, en la *Figura 8.5* se comparan los valores de IG_{50} determinados para los derivados de distintas series que tienen los mismos restos *R'* unidos al carbonilo del selenoéster; representándose los cuatro sustituyentes más comunes (fenilmetilo, fenilo, 4-clorofenilo y 3,5-dimetoxifenilo), junto con los fármacos empleados como referencia. Al tener una actividad inferior en conjunto y no disponer de los datos de IG_{50} , TGI y LC_{50} de los derivados de la *Serie I* por su menor potencia, dichos selenoésteres no se incluyen dicha figura. La escala del eje vertical es logarítmica para facilitar la visualización de los datos.

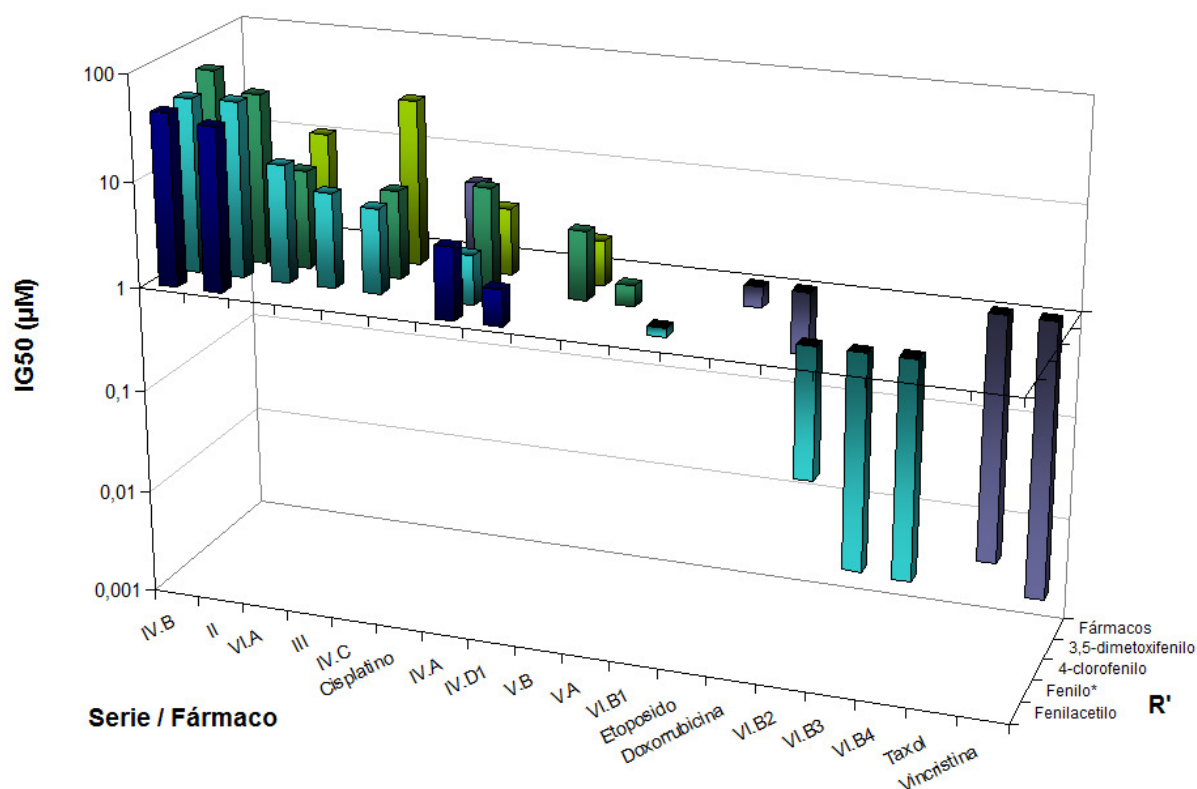


Figura 8.5: IG_{50} de los selenoésteres en PC-3, agrupadas en función de la serie y del resto R' ; datos experimentales. IG_{50} de los fármacos de referencia, datos del NCI ²⁴⁶.

Como salvedades, para mostrar gráficamente el aumento de la actividad observado dentro de la *Serie VI* al pasar del selenoéster de metilo (*VI.A1*) a los diselenodiésteres (*VI.B1* y *VI.B2*) y al cambiar en éstos el anillo bencénico por un anillo tienílico o piridínico (*VI.B3* ó *VI.B4*); se han incluido estos últimos derivados al final de la serie en la cual *R'* es el grupo fenilo.

Pasando a los resultados concretos y planteando los siguientes ensayos, se ha encontrado que los selenoésteres que cumplen los criterios considerados para la realización de ensayos adicionales son los siguientes:

- **Ensayos de Citotoxicidad (< 5 µM).** 13 selenoésteres de 51: *IV.A1, IV.A2, IV.A3, IV.A5, IV.A7, IV.D1, V.A1, V.B1, V.B2, VI.B1, VI.B2, VI.B3* y *VI.B4*.
- **Ensayos de Selectividad (< 10 µM).** 20 selenoésteres de 51: los trece anteriores más *II.4, III.1, IV.A4, IV.A6, IV.C1, IV.C2* y *VI.A2*.

Ensayos de Selectividad (RWPE-1 / PC-3).

En estos ensayos se ha evaluado la citostaticidad y la citotoxicidad en la línea celular no tumoral RWPE-1 de los 20 selenoésteres que superaron el corte establecido de tener al menos un parámetro citostático o citotóxico por debajo de 10 µM en PC-3. La comparación de los valores obtenidos en la línea no tumoral con los determinados en las tumorales permitirá determinar la selectividad de los compuestos, en base al índice de selectividad (SI), que viene dado, para un parámetro genérico *P* (sustituible por el parámetro que corresponda - IC₅₀, IG₅₀, TGI, LC₅₀-), por la fórmula (7):

$$SI = \frac{P_{RWPE-1}}{P_{PC-3}} \quad (7)$$

En base a la bibliografía ²⁴⁷, se considera que un compuesto es moderadamente selectivo si el valor determinado para el índice de selectividad se encuentra entre 3 y 6. Cuando es mayor que seis, se dice entonces que el derivado es fuertemente selectivo.

Considerando lo anterior, en la *Tabla 8.7* se recogen los valores determinados para los cuatro parámetros citostáticos y citotóxicos en PC-3 y RWPE-1 en los veinte selenoésteres evaluados, así como los índices de selectividad para cada parámetro. Para una mejor identificación de los valores de interés, en la tabla se marcan en azul los compuestos fuertemente selectivos, en negrita los moderadamente selectivos y en rojo los no selectivos. Los no marcados presentan una baja selectividad.

Analizando los resultados se observa que pocos selenoésteres son selectivos entre la línea prostática no tumoral y la tumoral. Solamente seis derivados (*III.1, IV.6, IV.C2, V.A1, VI.A2, y VI.B1*) tienen todos sus valores en RWPE-1 por encima de los determinados en PC-3, teniendo cuatro de ellos al menos un parámetro para el cual dicho selenoéster es moderada o fuertemente selectivo. Dejando de lado los derivados citados, otros cuatro compuestos tienen al menos un parámetro para el cual sean moderada o fuertemente selectivos, y al menos otro en el cual no sean selectivos.

Se observa que la selectividad es mayor en las *Serie III* y *VI*. El selenoanhídrido de la *Serie III* es selectivo en todos los parámetros, y los derivados de la *Serie VI* estudiados tienen al menos un parámetro moderadamente selectivo, teniendo dos de ellos índices de selectividad superiores a la unidad en todos los parámetros; y otros dos, al menos un parámetro con el SI por encima de 6 (fuertemente selectivo).

Entre las restantes series de compuestos, *V.A1* presenta una baja selectividad en todos parámetros citostáticos y citotóxicos, aunque ninguno llega a ser moderadamente selectivo. Y en las *subseries IV.A* y *IV.C* cuatro derivados son selectivos para los parámetros citostáticos, siendo dos de ellos además selectivos en la LC₅₀; y teniendo los cinco selenoésteres no selectivos de estas subseries valores de SI próximos a la unidad.

Tabla 8.7: Selectividad de los compuestos entre las líneas prostáticas RWPE-1 (no tumoral) y PC-3 (tumoral).

Ref.	PC-3				RWPE-1				Índice Selectividad RWPE-1 / PC-3			
	IC ₅₀ (μM)	IG ₅₀ (μM)	TGI (μM)	LC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IG ₅₀ (μM)	TGI (μM)	LC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IG ₅₀ (μM)	TGI (μM)	LC ₅₀ (μM)
II.4	20,9	6,36	70,6	> 100	6,78	5,76	36,0	> 100	0,3	0,9	0,5	-
III.1	13,0	7,91	79,7	> 100	50,6	28,9	> 100	> 100	3,9	3,7	> 1,25	-
IV.A1	6,59	4,81	10,0	> 10	6,13	3,06	35,7	99,2	0,9	0,6	3,6	-
IV.A2	4,33	2,94	8,76	> 100	6,21	4,97	16,3	88,3	1,4	1,7	1,9	< 0,88
IV.A3	5,46	4,18	9,06	> 100	5,34	3,84	15,8	91,2	1,0	0,9	1,7	< 0,91
IV.A4	18,0	9,10	74,0	> 100	15,4	8,60	55,8	> 100	0,9	0,9	0,8	-
IV.A5	5,61	4,29	9,07	> 100	7,13	6,10	16,3	89,4	1,3	1,4	1,8	< 0,89
IV.A6	7,11	5,61	57,3	> 100	30,4	10,4	57,1	> 100	4,3	1,9	1,0	-
IV.A7	5,79	4,87	18,4	> 100	6,74	5,62	14,1	76,6	1,2	1,2	0,8	< 0,77
IV.C1	8,10	6,38	79,4	> 100	8,47	7,16	46,3	> 100	1,0	1,1	0,6	-
IV.C2	8,48	6,86	82,7	> 100	8,83	7,54	≈ 100	> 100	1,0	1,1	> 1,2	-
IV.D1	5,40	2,22	19,7	> 100	1,53	0,881	4,85	9,55	0,3	0,4	0,2	< 0,10
V.A1	2,27	1,58	3,14	4,71	3,92	2,03	5,32	8,60	1,7	1,3	1,7	1,8
V.B1	4,68	2,19	28,3	> 100	4,29	2,29	5,60	8,91	0,9	1,0	0,2	< 0,09
V.B2	5,02	2,66	6,91	> 100	5,42	3,34	6,30	9,25	1,1	1,3	0,9	< 0,09
VI.A2	9,81	8,58	71,3	> 100	46,5	27,8	≈ 100	> 100	4,7	3,2	> 1,4	-
VI.B1	0,968	0,822	18,4	> 100	7,91	5,24	39,4	> 100	8,2	6,4	2,1	-
VI.B2	0,0884	0,0567	23,7	> 100	0,740	0,0244	0,975	65,0	8,4	0,4	0,04	< 0,65
VI.B3	0,0847	0,00887	0,810	> 100	0,425	0,00913	0,729	> 100	5,0	1,0	0,9	-
VI.B4	0,0383	0,00839	1,69	> 100	0,0952	0,0264	3,01	67,2	2,5	3,1	1,8	< 0,67

En el lado opuesto se encuentran las *Series II, IV.D y V.B*. Los selenoésteres estudiados en este ensayo y encuadrados en las mismas han presentado una actividad significativamente mayor en la línea no tumoral que en la tumoral.

Ensayos de citotoxicidad en otras líneas tumorales

En los ensayos de citotoxicidad en tres líneas celulares adicionales se ha determinado la citostaticidad y la citotoxicidad en dichas líneas (HT-29, MCF-7 y A549) de los trece selenoésteres cuyas IG_{50} se encuentran por debajo de 5 μM en las células PC-3. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 8.8*, donde se recogen los valores calculados para los parámetros citostáticos y citotóxicos en las líneas HT-29, MCF-7 y A549 para los trece derivados analizados en estos ensayos.

Se observa que la línea pulmonar A549 es la más sensible de las tres a la acción de los selenoésteres, siendo sus valores de IG_{50} y TGI comparables a los determinados en PC-3. En cuanto a las concentraciones letales 50% (LC_{50}), muchos compuestos que en las células tumorales de próstata carecían de LC_{50} por debajo de 100 μM , en A549 presentan valores en un intervalo de 20-100 μM , mejorando así su potencia citotóxica en comparación con la línea prostática. La excepción a este comportamiento general es *V.A1*, cuyos valores de LC_{50} indica que es más potente en próstata que en pulmón.

En el otro extremo se encuentra la línea celular MCF-7 (mama), que a la vista de los valores calculados resulta ser la menos sensible a la acción de los selenoderivados. Los valores de IG_{50} en esta línea son entre 2 y 100 veces mayores que los determinados en PC-3. Luego, de entre los 13 selenoésteres evaluados únicamente dos derivados tienen en MCF-7 valores de TGI por debajo de 100 μM ; cuando en las restantes líneas todos presentan una TGI inferior a 100 μM , y la mayoría de ellos, inferior a 10 μM .

Por último, hablando en términos generales, los derivados no tienen tanta potencia en la línea tumoral de colon (HT-29) como en las de próstata y pulmón; aunque la acción de los mismos en esta línea celular mejora la observada en las células de cáncer de mama. En HT-29 destaca la LC_{50} de *V.A1*, por debajo de 10 μM y claramente inferior a las citadas en bibliografía para los fármacos quimioterapéuticos.

Resulta cuanto menos llamativo el observar que la actividad de los derivados en las distintas líneas celulares guarda un cierto paralelismo, salvando las distancias, con los resultados del estudio "*Nutritional Prevention of Cancer*" de Clark y colaboradores. De acuerdo con este artículo de referencia en prevención del cáncer mediante el uso de suplementos dietéticos de selenio, las mayores reducciones de la incidencia del cáncer se observan en los cánceres de próstata, pulmón y colon; mientras que en el cáncer de mama se detecta el mayor aumento de la incidencia¹⁷⁵. Este resultado experimental recogido en la bibliografía puede relacionarse con la observación realizada de que los selenoésteres presentan una menor actividad en la línea celular tumoral mamaria MCF-7 que en las líneas tumorales prostática, pulmonar y colorrectal estudiadas (PC-3, A549 y HT-29, respectivamente).

Tabla 8.8: Parámetros citotóxicos y citostáticos en las líneas celulares HT-29 (colon), MCF-7 (mama) y A549 (pulmón) de los selenoésteres más potentes en la línea celular PC-3 (próstata). Datos de concentración en unidades micromolares (μM).

Ref.	HT-29				MCF-7				A549			
	IC ₅₀	IG ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	IG ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	IG ₅₀	TGI	LC ₅₀
IV.A1	8,58	3,66	24,7	> 100	65,9	9,51	74,9	> 100	6,48	2,22	6,96	82,0
IV.A2	12,3	5,47	37,0	> 100	≈ 100	8,08	> 100	> 100	6,03	2,69	6,48	38,3
IV.A3	8,89	3,62	9,23	> 100	73,6	10,9	> 100	> 100	7,01	4,06	7,15	38,6
IV.A5	8,26	4,71	9,51	96,5	58,5	8,89	> 100	> 100	7,07	4,17	7,24	44,8
IV.A7	8,70	3,40	25,7	> 100	59,4	16,3	≈ 100	> 100	6,67	3,66	6,89	23,7
IV.D1	6,58	3,33	7,28	> 100	40,0	7,76	> 100	> 100	5,11	1,30	5,78	51,8
V.A1	5,55	2,60	5,85	9,09	8,53	4,49	9,32	> 100	6,55	1,67	7,06	87,0
V.B1	6,42	3,62	6,83	≈ 100	8,39	5,30	> 100	> 100	4,85	1,16	5,61	≈ 100
V.B2	7,98	5,00	8,92	94,2	9,73	6,33	> 100	> 100	15,4	6,01	27,5	92,5
VL.B1	10,6	5,52	60,8	> 100	77,8	8,88	> 100	> 100	20,0	2,94	42,7	> 100
VL.B2	78,0	0,331	7,89	> 100	80,8	0,517	> 100	> 100	4,75	0,061	0,682	≈ 100
VL.B3	9,18	0,295	7,99	> 100	> 100	0,317	> 100	> 100	1,00	0,079	0,712	≈ 100
VL.B4	28,0	0,047	3,51	> 100	75,48	0,294	> 100	> 100	9,22	0,062	4,23	> 100
Cisplatino	6,21 ²⁴³	7,95 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶	2,94 ²⁴³	3,16 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶	1,5 ²⁴⁸	3,63 ²⁴⁶	39,9 ²⁴⁶	> 100 ²⁴⁶
Doxorrubicina	0,413 ²⁴³	0,159	6,31	63,1	0,134 ²⁴³	0,016	5,01	20,0	0,057 ²⁴⁸	0,063	1,58	20,0
Etopósido	3,60 ²⁴⁹	31,6	> 100	> 100	1,3 ²⁴⁹	20,0	> 100	> 100	4,4 ²⁴⁹	4,46	> 100	> 100
Taxol	0,04 ²⁵⁰	0,003	50,1	> 100	0,009 ²⁵¹	0,003	50,1	79,4	2,47 ²⁵⁰	0,004	50,1	79,4
Vincristina	0,057 ²⁵⁰	0,001	25,2	> 100	0,004 ²⁵²	0,001	63,1	> 100	0,24 ²⁵⁰	0,013	> 100	> 100

En la *Figura 8.6* se muestran de forma gráfica los valores de IG_{50} determinados para los selenoésteres evaluados en las cuatro líneas celulares tumorales, con el fin observar de forma visual la sensibilidad de las mismas a los derivados presentados en este trabajo de investigación, reflejando lo expuesto anteriormente: los compuestos son más potentes en las líneas PC-3 y A549 que en las células HT-29; y son a su vez más activos en estas últimas que en la línea MCF-7.

La inclusión en la *Figura 8.6* de los datos del NCI²⁴⁶ de tres fármacos empleados en el tratamiento del cáncer permite la comparación gráfica de la actividad de los selenoésteres con la de dichos fármacos.

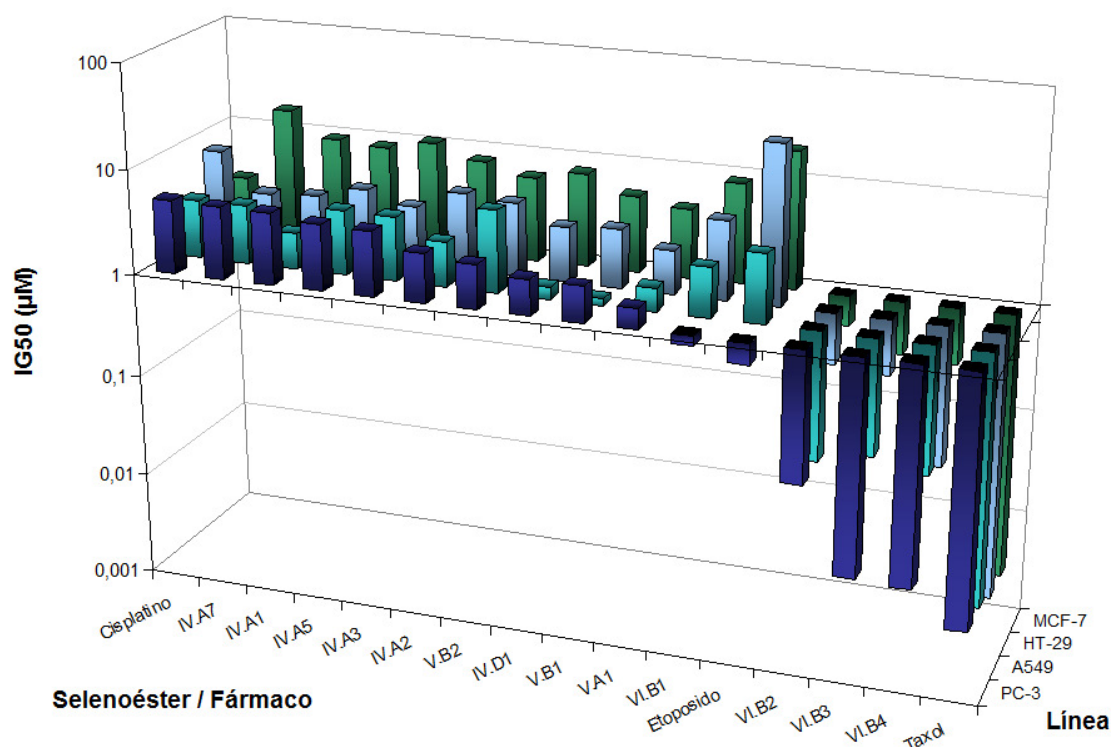


Figura 8.6: IG_{50} de los selenoésteres en las líneas tumorales PC-3, A549, HT-29 y MCF-7 (datos experimentales). IG_{50} de los fármacos de referencia, datos del NCI²⁴⁶.

La comparación de los valores obtenidos para los diferentes compuestos en las líneas HT-29, MCF-7 y A549 con los recogidos en la bibliografía²⁴⁶ para los fármacos de referencia permite afirmar lo siguiente:

- **Línea HT-29 (colon):**

Los selenoésteres tienen un gran potencial antiproliferativo en esta línea de cáncer de colon, al tener todos los compuestos evaluados una IG_{50} por debajo de $10 \mu\text{M}$, teniendo tres de ellos dicho parámetro en el rango nanomolar. En cuanto a la inhibición total del crecimiento, diez de los trece derivados poseen una TGI inferior a $10 \mu\text{M}$.

Tres selenoésteres ejercen una acción citotóxica en células HT-29 al mostrar valores de LC_{50} por debajo de $100 \mu\text{M}$. El derivado más potente, V.A1, tiene una citotoxicidad mayor que los cinco fármacos de referencia.

- **Línea MCF-7 (mama):**

Once de los trece derivados testados tienen una IG_{50} por debajo de $10\ \mu\text{M}$. Al igual que en HT-29, en tres selenodíésteres de dimetilo el valor del parámetro cae dentro del rango nanomolar. Los restantes parámetros muestran que la actividad de los selenoderivados en esta línea celular es menor: ningún compuesto presenta una LC_{50} por debajo de $100\ \mu\text{M}$, y únicamente las TGI de dos selenoésteres mejoran dicho corte.

- **Línea A549 (pulmón):**

De nuevo, los trece derivados evaluados presentan una concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular por debajo de $10\ \mu\text{M}$, superando además dicho baremo en el valor de la TGI once de ellos. De forma adicional, dos derivados tienen al mismo tiempo valores de IG_{50} y de TGI en el rango nanomolar.

En cuanto a la actividad citotóxica, ocho selenoésteres muestran una LC_{50} inferior a $100\ \mu\text{M}$, siendo destacable el hecho observado de que los seis derivados de la *Serie IV* analizados superan dicho corte.

Discusión final

Concluyendo, puede afirmarse que algunos selenoésteres son interesantes como agentes citostáticos y citotóxicos, e incluso mejoran la acción de fármacos empleados hoy día en la práctica clínica contra el cáncer. De hecho, cuatro derivados mejoran en al menos un parámetro y en al menos una línea celular a los cinco fármacos considerados como control:

- *V.A1*: TGI y LC_{50} en PC-3 y en HT-29.
- *VI.B3*: TGI en A549.
- *VI.B2*: TGI en A549.
- *VI.B4*: TGI en PC-3 y en HT-29.

Se han encontrado, por lo tanto, derivados tanto citostáticos como citotóxicos. Los primeros son potentes inhibidores del crecimiento celular en líneas tumorales, como los compuestos de la *Serie VI.B* en todas las líneas celulares, el selenoanhídrido de la *Serie III* en PC-3 y los derivados de la *Serie IV* en PC-3, HT-29 y MCF-7. Estos selenoésteres muestran bajos valores de IG_{50} y TGI, y al mismo tiempo, no tienen una LC_{50} por debajo de $100\ \mu\text{M}$, existiendo así una gran diferencia entre el intervalo de concentraciones en el cual el selenoéster inhibe el crecimiento celular y el rango a partir del cual ejerce un efecto citotóxico sobre dichas células.

En el lado opuesto se presentan aquellos selenoésteres que se comportan como agentes citotóxicos (*V.A1* en PC-3 y HT-29; y los derivados de la *Serie IV* en A549), en los cuales la LC_{50} se encuentra en un intervalo de concentraciones próximo al intervalo de acción citostática, no existiendo grandes diferencias entre los tres parámetros. *V.A1*, el compuesto con el perfil más citotóxico, presenta valores de IG_{50} , TGI y LC_{50} en PC-3 de 1,58, 3,14 y 4,71 μM , respectivamente. En el otro extremo, *VI.B3*, el derivado más citostático, no muestra una LC_{50} por debajo de $100\ \mu\text{M}$ cuando tiene en la misma línea celular valores de IG_{50} y TGI de 8,9 y 810 nM.

En líneas generales, puede decirse que en los ensayos en líneas tumorales adicionales se ha confirmado el orden de actividad observado en PC-3. Si consideramos en conjunto las tres líneas celulares, dicho orden de actividad (basado en la IG_{50}) sería el mostrado a continuación:

$$VI.B > V.A > V.B > IV.D > IV.A$$

Por último, la selectividad de los compuestos entre las células cancerosas y las no tumorales es por lo general baja o inexistente, aunque algunos de los derivados con mayor actividad antiproliferativa y citotóxica presentan valores interesantes, como es el caso de los selenoésteres citostáticos *VI.B4* y *VI.B1* y del derivado citotóxico *V.A1*. Aún así, algunos compuestos, como los dos selenoderivados antiproliferativos citados, son moderadamente o fuertemente selectivos según el criterio de Acton *et al*²⁴⁷, pudiendo, por lo tanto, ser un excelente punto de partida para un trabajo posterior que profundice en el conocimiento de la acción biológica de estos compuestos.

Método del Cristal Violeta

Se ha evaluado una selección de 16 compuestos siguiendo la metodología del cristal violeta en un panel de ocho líneas celulares en el Laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Médecine de la Université Paris-Descartes, en Francia. En la selección de los productos se tienen en cuenta los datos recogidos en la línea PC-3 para centrar la evaluación en las series más activas: *III*, *IV*, *V* y *VI*; dejando de lado las *Serie I* y *II*.

La citotoxicidad se ha determinado mediante la metodología del cristal violeta (CV); y los valores de IC_{50} se calculan interpolando en las correspondientes curvas de la supervivencia celular en función de la concentración. Dichas curvas se adjuntan en el *Anexo 2.A.2* (*vid.* págs. 302-308). La información sobre las líneas celulares empleadas se encuentra en la correspondiente sección de Material y Métodos (*vid.* págs. 201-203).

Los ensayos con la metodología del Cristal Violeta, tal y como se ha descrito en Material y Métodos, persiguen diferentes objetivos. Entre ellos destacan:

- Evaluar la actividad en diferentes líneas celulares, entre ellas algunas no testadas en el CIMA con la metodología del CV, para conocer mejor las aplicaciones de estos derivados.
- Evaluar la citotoxicidad en líneas murinas, de cara a futuros ensayos *in vivo*.
- Descartar la existencia de falsos positivos por interferencias redox entre el selenio y el MTT al detectar actividad citotóxica mediante el método del CV.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, poniendo de relieve cada uno de los objetivos expuestos anteriormente.

Evaluación de la citotoxicidad por el método del cristal violeta

Al evaluarse un mayor número de derivados de la *Serie IV* con respecto a los restantes grupos de compuestos, y al haber diferencias en el modo de actuación entre estos compuestos de la *Serie IV* y los de las otras series, se exponen primero los selenoésteres de alquil/fenoxicarbonilalquilo y a continuación los demás derivados.

En el *Anexo 2.A.2* se muestran datos adicionales como los intervalos de confianza hallados para los valores de IC_{50} (*vid.* págs. 310-312) y las curvas dosis-respuesta (*vid.* págs. 302-308) de los compuestos testados siguiendo esta metodología.

Serie IV

Los selenoésteres de R''-oxicarbonilalquilo (*Serie IV*) son los productos evaluados a través de este método con menor potencia (*vid. Tabla 8.9*). No obstante, a pesar de su baja actividad en comparación con los productos de las *Serie V* y *VI* (*vid. Tabla 8.10*), la mayoría de los derivados de la *Serie IV* evaluados son más citotóxicos en

las células HT-29 (colon) que el taxol y que la doxorubicina en MCF-7 (mama). El compuesto con mayor actividad de la serie, *IV.D1*, presenta valores de IC_{50} cercanos a 1 μM en las dos líneas tumorales anteriores y en HUVEC, la línea embrionaria no tumoral testada. En las células A549 (pulmón) tres derivados son más citotóxicos que la doxorubicina; y en la línea HepG2 (hígado), *IV.D1* mejora la acción del taxol. En células OVCAR (ovarios) ningún selenoéster de esta serie mejora la acción de los fármacos de referencia.

Tabla 8.9: Valores de IC_{50} (en μM) de los compuestos de la Serie IV y de los fármacos de referencia evaluados en varias líneas celulares.

Ref.	Líneas murinas		Líneas humanas					
	3T3	CT26	Huvec	HT29	MCF7	A549	HepG2	Ovcar
IV.A2	10,5	13,7	15,0	3,70	3,36	4,96	14,8	35,9
IV.A3	8,74	6,23	14,5	4,03	3,17	7,57	12,1	19,2
IV.A4	4,36	11,3	13,4	14,5	7,52	9,85	17,2	18,6
IV.A5	4,08	13,9	13,0	13,3	8,35	16,7	23,1	15,2
IV.A6	13,5	9,78	13,2	4,08	4,23	6,88	16,3	11,5
IV.A7	36,3	21,1	22,0	3,95	4,32	4,54	26,0	37,1
IV.B3	12,8	14,4	23,2	15,0	30,2	24,4	15,9	18,2
IV.C2	> 40	22,3	6,99	3,87	4,20	3,65	> 40	27,8
IV.D1	4,09	2,94	1,97	1,22	1,15	2,39	4,27	3,61
Taxol	1,23	3,22	> 5,00	4,81	0,378	2,70	> 5	1,39
Doxo.	4,69	6,60	2,39	3,82	5,82	4,91	3,96	2,35
Vinc.	0,545	1,30	0,346	0,977	2,67	3,54	3,44	2,86

Los compuestos de la *Serie IV* destacan por su selectividad más que por su citotoxicidad. Se aprecia que ejercen una acción selectiva sobre las líneas celulares tumorales HT-29, MCF-7 y A549 frente a HUVEC, la línea no tumoral control, en especial cuatro selenoésteres de metiloxicarbonilalquilo, en los cuales los índices de selectividad (IC_{50} HUVEC / IC_{50} línea tumoral) oscilan entre 3 y 6 en las células HT-29 y MCF-7 y entre 1,9 y 5 μM en la línea tumoral de pulmón A549. Para facilitar la consulta de los valores concretos, en el *Anexo 2.A.2* (*vid.* pág. 309) se incluye una tabla con los índices de selectividad de los selenoésteres en las diferentes líneas celulares evaluadas mediante esta metodología.

El derivado más selectivo es *IV.A7*, con índices de selectividad en torno a 5 en las tres líneas mencionadas, siendo, en consecuencia, moderadamente selectivo según el criterio de Acton y colaboradores²⁴⁷. *IV.A2* también sería, siguiendo el mismo criterio, moderadamente selectivo en las tres líneas celulares citadas, mientras que *IV.A3* y *IV.D1* lo serían en HT-29 y en MCF-7.

Para poner de relieve el interés de los índices de selectividad anteriores, entre los fármacos únicamente el taxol es moderadamente selectivo en la línea OVCAR, y fuertemente selectivo en MCF-7. En consecuencia, los selenoésteres citados presentan una selectividad mayor que los tres controles en HT-29 y A549; y en MCF-7, de entre los controles sólo el taxol tendría una acción más selectiva.

Otras series evaluadas:

Los valores de IC_{50} determinados para el resto de los selenoésteres evaluados a través del procedimiento del cristal violeta se muestran en la *Tabla 8.10*. Si bien cada una de las series presenta un comportamiento diferente, puede decirse que por lo general los derivados evaluados de las *Series V* y *VI* son más potentes que los de la *Serie IV*. El selenoanhídrido (*Serie III*), por su parte, presenta una citotoxicidad en el orden de la actividad de los productos de la *Serie IV*, pero sin mostrar la acción selectiva característica de los mismos. Al igual que en la *Serie IV*, los índices de selectividad de los derivados de las restantes series se muestran en el *Anexo 2.A.2* (pág. 309)

Tabla 8.10: Valores de IC_{50} de los compuestos de las Series III, V y VI, y de los fármacos de referencia evaluados en varias líneas celulares.

Ref.	Líneas murinas		Líneas humanas					
	3T3	CT26	Huvec	HT29	MCF7	A549	HepG2	OvcAR
III.1	3,24	8,53	2,97	3,22	8,13	2,99	8,11	4,17
V.A1	1,12	0,777	3,51	4,41	1,39	3,98	1,75	1,75
V.B1	1,52	1,25	3,38	4,40	0,580	2,83	4,11	1,45
V.B2	3,69	2,12	0,693	0,451	2,54	2,96	3,77	3,58
VI.A1	4,21	6,20	3,84	2,75	3,88	2,53	8,04	7,77
VI.B1	1,55	3,55	1,64	1,86	3,49	1,71	3,72	4,20
VI.B4	0,100	1,42	1,50	0,0973	2,31	0,0887	2,03	2,24
Taxol	1,23	3,22	> 5,00	4,81	0,378	2,70	> 5	1,39
Doxo.	4,69	6,60	2,39	3,82	5,82	4,91	3,96	2,35
Vinc.	0,545	1,30	0,346	0,977	2,67	3,54	3,44	2,86

A continuación se analizan por separado los resultados de cada serie:

- *Serie III:*

La potencia citotóxica del selenoanhídrido incluido en la *Serie III* es menor que la de los derivados de las *Series V* y *VI* y está al mismo nivel de los compuestos de la *Serie IV*. Sin embargo, si bien los productos de la *Serie IV* se caracterizaban por sus

interesantes valores de selectividad, el selenoanhídrido no es selectivo en ninguna célula tumoral humana ni murina evaluada. En cuanto a su potencia citotóxica, es interesante en las células HT-29 y MCF-7, en las cuales mejora la acción de dos de los tres controles quimioterapéuticos evaluados al tener valores de IC_{50} del orden de $3 \mu M$.

- *Serie V:*

Los selenoderivados de esta serie son, por lo general, muy activos. Todos los valores de IC_{50} son inferiores a $5 \mu M$ y todos los compuestos muestran al menos una IC_{50} por debajo de $1 \mu M$. Asimismo, los productos de esta serie tienen en cada línea celular evaluada más potencia citotóxica que al menos uno de los tres controles, a excepción del compuesto *V.B2* en la línea OVCAR. Sin embargo, en esta serie no se aprecia un patrón general de actividad ni tampoco una tendencia entre las dos subseries que la componen: cada selenoéster afecta a las diferentes líneas de distinta forma.

El selenoato de oxopropilo (*V.A1*) posee valores interesantes de actividad citotóxica por debajo de $2 \mu M$ en las líneas MCF-7, OVCAR y HepG2, superando a dos controles quimioterapéuticos en las dos primeras líneas y a los tres controles testados en la línea de cáncer hepático; mostrando además un SI superior a 2 en las tres líneas tumorales, pero sin llegar a ser moderadamente selectivo. Su potencia continúa siendo notable en las líneas neoplásicas intestinal y pulmonar, aunque la actividad no es selectiva en estas células.

El compuesto *V.B1* es el más potente de entre todos los selenoderivados evaluados en las líneas neoplásicas MCF-7 y OVCAR. En el tumor mamario tiene un valor de IC_{50} en el rango nanomolar, siendo además su acción moderadamente selectiva: su SI es próximo a 6. En el tumor ovárico la IC_{50} aumenta a $1,45 \mu M$ y el índice de selectividad baja a 2. En ambas líneas el derivado sólo es superado por el taxol.

Por último, por su potencia citotóxica en el rango nanomolar en HUVEC, el derivado *V.B2* sólo es selectivo en la línea HT-29, teniendo en esta línea una citotoxicidad mayor que los tres controles quimioterapéuticos ensayados. Este derivado es, asimismo, más potente que dos de los tres controles en otras tres líneas tumorales.

- *Serie VI:*

En esta serie se observa una marcada influencia en la actividad biológica tanto del número de átomos de selenio como del anillo presente en el resto aromático. De hecho, al incluir un segundo grupo funcional $-COSeCH_3$ los valores de IC_{50} se reducen, sin excepción, en todas las líneas evaluadas, con independencia de si son tumorales o no. El mismo efecto vuelve a observarse cuando en el derivado difuncionalizado se sustituye el anillo bencénico por un anillo piridínico.

De este modo, el selenoderivado *VI.B4* es el compuesto más potente de todos los evaluados siguiendo esta metodología, al mostrar en las líneas tumorales HT-29 y A549 valores de IC_{50} por debajo de $100 nM$, siendo además fuertemente selectivo por ser los índices de selectividad con respecto a HUVEC superiores a 15. El producto *VI.B4* es diez veces más citotóxico que la vincristina, el fármaco quimiopreventivo más potente de los controles testados en la línea neoplásica HT-29; y su potencia es treinta veces superior a la del taxol, el control más activo en la línea tumoral A549. En ambos casos

el índice de selectividad del selenoderivado es claramente superior al de los controles de referencia empleados, hecho que le convierte en un compuesto de gran interés.

El derivado piridínico también mejora la potencia de los tres controles en la línea HepG2, pero con una IC_{50} más elevada; y en las líneas MCF-7 y OVCAR, es más potente que dos de los tres fármacos; no obstante, sin ser selectivo en estos tres casos.

Los restantes derivados de esta serie tienen un menor efecto pero siguen siendo dignos de mención. *VI.B1* tiene valores de IC_{50} por debajo de 2 μ M en las líneas HT29 y A549, siendo en la última más potente que los tres controles. No obstante, no ejerce una acción selectiva con respecto a HUVEC en ninguna línea tumoral. Por su parte, *VI.A1* no es tan potente como los anteriores aunque tiene valores por debajo de 5 μ M en tres líneas celulares tumorales. A cambio de su menor citotoxicidad, *VI.B1* es algo selectivo en HT-29 y A549, con índices SI por debajo de 2.

Resultados en las líneas murinas

Dentro de los derivados de la *Serie IV*, en la línea murina tumoral (CT26), únicamente dos selenoésteres mejoran la acción de alguno de los tres fármacos empleados como referencia.

En cuanto a la selectividad de dichos derivados, no se observa una tendencia general tan clara como en las líneas humanas al ser algunos selenoésteres selectivos y otros no. Sólo dos compuestos presentan un índice de selectividad notable superior a 1,5, aunque no llega a ser moderadamente selectivo. No obstante, son índices muy superiores a los de los fármacos empleados, todos claramente por debajo de la unidad, y en el caso del taxol y de la vincristina, en torno a 0,4.

El selenoanhídrido presenta una IC_{50} elevada en la línea tumoral CT26 y baja en la embrionaria no tumoral 3T3, con lo que no es ni activo ni selectivo en ratones.

Los selenoésteres de la *Serie V*, en cambio, presentan una actividad notable en la línea tumoral de colon, con una cierta selectividad., aunque baja. *V.A1* y *V.B1* mejoran la acción de los tres controles quimioterapéuticos y *V.B2* es más potente que dos de ellos. El selenoéster de oxopropilo *V.A1* es el derivado más potente de todos los ensayados en CT26, con una IC_{50} de 777 nM.

El compuesto más citotóxico de la *Serie VI* es *VI.B4*, el cual presenta una mayor actividad que dos de los tres fármacos de referencia. Sin embargo, ninguno de los tres derivados de la *Serie VI* evaluados es selectivo, sino que destacan por lo contrario; hecho que contradice los buenos resultados de selectividad obtenidos entre PC-3 y RWPE-1 con la metodología del MTT.

Concluyendo, determinados selenoésteres tienen una actividad interesante en las líneas murinas, aunque por lo general poco selectiva. No obstante, los propios controles quimioterapéuticos utilizados como referencia presentan el mismo inconveniente. En consecuencia, a la vista de los resultados, y viendo el paralelismo, en términos de actividad, con los determinados en líneas humanas, es factible la evaluación *in vivo* de estos derivados en ratones.

Integración de los resultados

En términos generales, la mayoría de los selenoésteres tienen valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu M$ en varias líneas tumorales; destacando *VI.B4*, cuya IC_{50} se encuentra en el rango nanomolar en las líneas HT-29 y A549. Considerando los resultados en conjunto, los compuestos presentan una mayor actividad en las líneas HT-29, MCF-7 y A549; y menor en las líneas OVCAR y HepG2; quedando HUVEC y las dos líneas murinas en un término medio.

En las líneas tumorales CT26, HT29, A549 y HepG2 algunos derivados mejoran la actividad de los tres productos de uso frecuente en la terapia del cáncer empleados como controles de referencia. En las restantes líneas tumorales otros selenoésteres presentan valores de IC_{50} que superan al menos a dos de los tres fármacos de referencia.

Como apunte final, ningún selenoderivado es más potente que los tres controles en las líneas HUVEC y MCF-7. Al ser la primera una línea no tumoral, el dato es positivo, y más al observarse que la mitad de los derivados evaluados presentan valores de IC_{50} más elevados que los controles, indicando de este modo que son más selectivos. En el caso de la línea MCF-7 la razón reside en que el taxol es tan potente que no es superado por ninguno de los selenoésteres, aunque se observa que cinco son más activos que los otros dos controles, aproximándose uno de ellos a la potencia del taxol al tener una IC_{50} en el rango nanomolar.

Para integrar los resultados de las distintas series en las diferentes líneas humanas evaluadas, en las *Figuras 8.7a-b* se muestran de forma visual las IC_{50} de los derivados de distintas series que comparten el mismo resto R' .

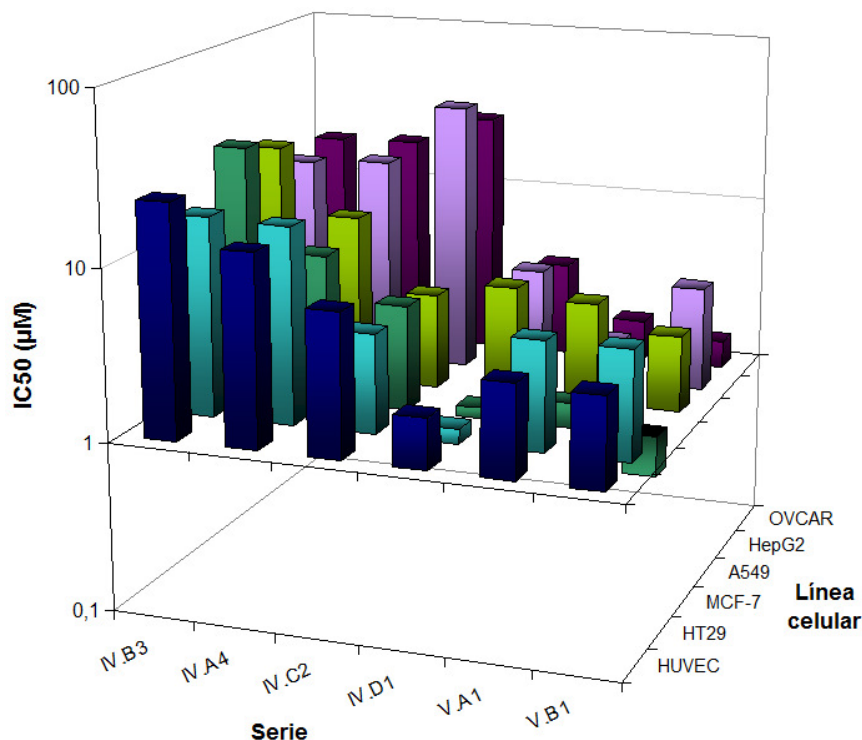


Figura 8.7a: IC_{50} de los selenoésteres calculadas con el método del cristal violeta en distintas líneas celulares, agrupadas por series. $R' = 4$ -clorofenilo.

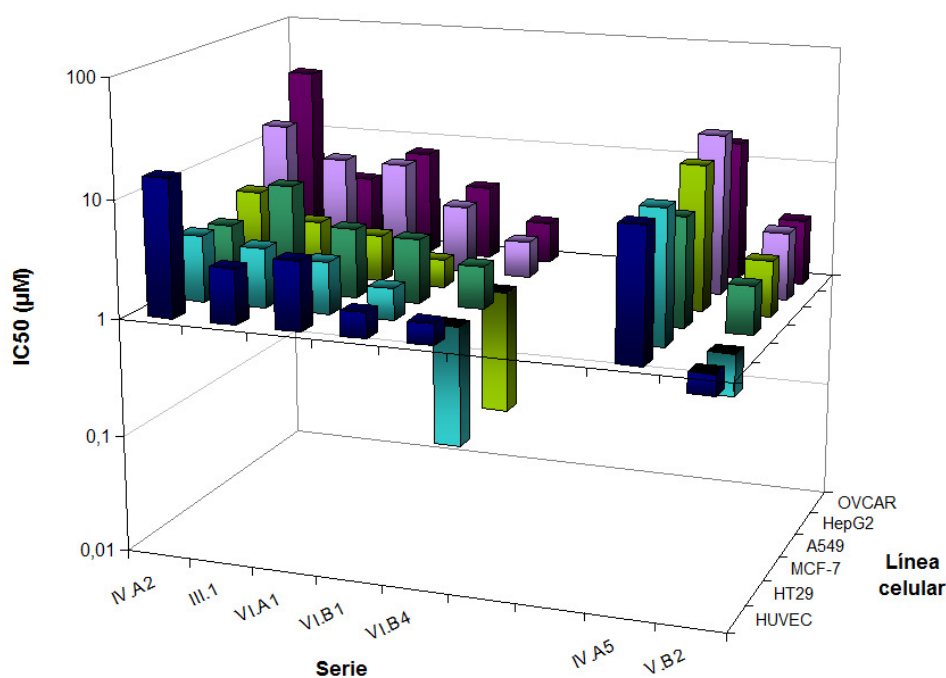


Figura 8.7b: IC_{50} de los selenoésteres (método del C.V.) en distintas líneas celulares, agrupadas por series. R' = fenilo (izquierda), 3,5-dimetoxifenilo (derecha).

Así, la Figura 8.7a engloba todos los derivados evaluados siguiendo esta metodología cuyo R' es el resto 4-clorofenilo. La Figura 8.7b agrupa aquellos productos que tienen como R' los sustituyentes fenilo (izquierda) y 3,5-dimetoxifenilo (derecha). En las figuras se emplea en el eje vertical (concentración) una escala logarítmica donde el plano basal es el orden micromolar, de modo que los derivados más activos (con IC_{50} del orden nanomolar) se representan en el sentido contrario para su mejor visualización.

Como excepción, se ha incluido el derivado VI.B4 en la serie de los compuestos que tienen un anillo bencénico como R' para mostrar gráficamente cómo mejora la actividad citotóxica dentro de la Serie VI al doblar primero el número de grupos funcionales $COSeCH_3$ y al sustituir después el anillo bencénico por un anillo piridínico.

Debido al elevado número de líneas celulares, hecho que lleva aparejada una lógica dispersión de los resultados, no se pueden extraer relaciones estructura actividad que se cumplan sin excepciones. No obstante, analizando las tablas y las gráficas se pueden extraer algunas relaciones que se verifican razonablemente, aunque no todos los valores de IC_{50} las sigan. Sin olvidar que no se han evaluado productos de las Series I y II siguiendo esta metodología, puede decirse que, a grandes rasgos, el orden de actividades entre las distintas series evaluadas podría ser:

$$VI.B4 > V.B > IV.D / V.A / VI.B1 > VI.A > IV.C > III > IV.A > IV.B$$

Descarte de falsos positivos en los ensayos del MTT

Los resultados de citotoxicidad determinados siguiendo la metodología del Cristal Violeta indican que los selenoésteres poseen una actividad citotóxica notable (en términos de IC_{50}) en las líneas celulares consideradas. Esta observación demuestra, con

una metodología independiente de los procesos redox, que los derivados poseen una actividad significativa frente a líneas celulares; hecho que permite descartar el riesgo mencionado de que los resultados obtenidos mediante la metodología del MTT puedan deberse a un falso positivo por una reacción de oxido-reducción indeseada entre el selenio y el MTT.

Los dos bloques de resultados, al obtenerse a diferentes tiempos de incubación a causa de los protocolos de trabajo de los centros colaboradores, no son comparables entre sí. No obstante, puede decirse que los resultados son en cierto modo paralelos en las líneas celulares HT-29 y A549. En cambio, en MCF-7, de acuerdo con los datos obtenidos con la metodología del CV los selenoderivados son muy activos, mientras que los datos recogidos en el ensayo del MTT indican lo contrario. Sería deseable que experimentos futuros resuelvan estas incógnitas.

B. Evaluación Quimiopreventiva

B. EVALUACIÓN QUIMIOPREVENTIVA

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis Electroquímico: Voltametría cíclica

Según la bibliografía (*vid.* págs. 36-38), el selenio y gran parte de sus derivados tienen potenciales aplicaciones en la prevención del cáncer; siendo incluso casi más frecuente el estudio de los efectos quimiopreventivos que el de los antitumorales.

Por esta razón, una vez verificada la citotoxicidad de los selenoésteres en líneas tumorales, se busca elucidar si dichos derivados poseen la actividad quimiopreventiva predicha en la hipótesis. Dicha acción se basaría en el hecho de que la hidrólisis de los derivados libera al medio especies iónicas de selenio que pueden así participar en la reducción del estrés oxidativo a través de la eliminación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) gracias a la capacidad del selenio y de sus especies iónicas para intervenir en reacciones de oxidación-reducción.

En consecuencia, se plantea la realización de una evaluación preliminar de las propiedades redox de los selenoésteres a través de una técnica electroquímica como la Voltametría Cíclica. El objetivo de los ensayos es comprobar si los átomos de selenio presentes en los selenoderivados participan en reacciones de oxidación-reducción, y en qué grado lo hacen.

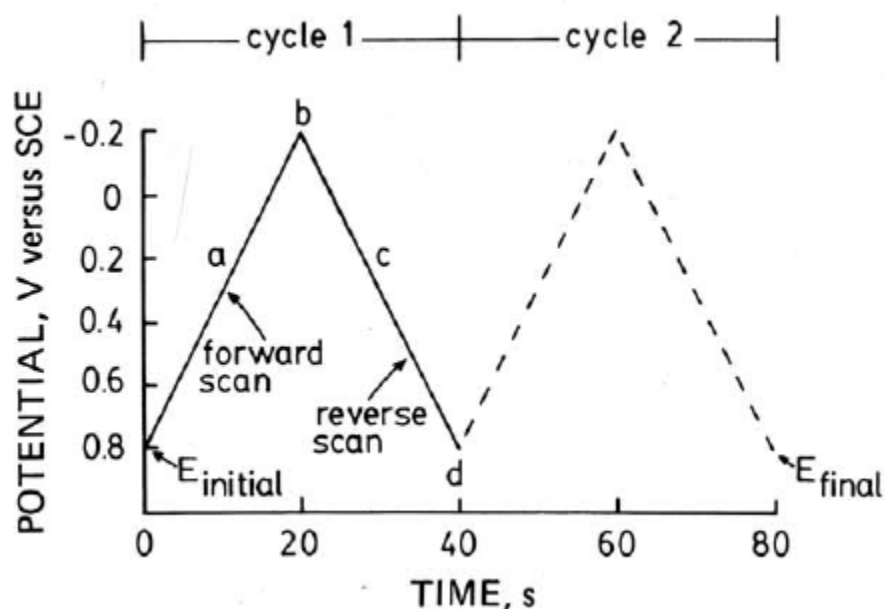
Se parte de la premisa de que el hecho de que un derivado tenga actividad redox no implica que dicho compuesto tenga actividad quimiopreventiva, sino que será un buen candidato para tenerla, siendo entonces necesaria la realización de otros experimentos, como los ensayos de la actividad peroxidasa y de eliminación del radical DPPH, para determinar sus propiedades antioxidantes.

Los ensayos electroquímicos cumplen así la función de ser un screening inicial de la capacidad de los derivados para prevenir el cáncer, siendo la actividad en los mismos una condición necesaria pero no suficiente para afirmar que un derivado presenta dichas propiedades quimiopreventivas.

Fundamentos de la Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica es una técnica electroanalítica muy útil para el estudio de especies electroactivas. Se basa en variar el potencial eléctrico de forma cíclica y a velocidad constante, registrando en todo momento la intensidad circulante por la celda electrolítica. La variación del potencial se produce en dos etapas.

En una etapa inicial, en el barrido anverso (*forward scan*) el potencial se reduce a velocidad constante entre el potencial inicial y el potencial de cambio. A continuación se vuelve al potencial inicial durante el barrido reverso (*reverse scan*), siendo el gradiente de potencial o velocidad de barrido (v) el mismo en ambos barridos. Este ciclo puede repetirse varias veces²⁵³⁻²⁵⁶, tal y como se muestra en la *Figura 8.8*²⁵³.



*Figura 8.8: Variación cíclica del potencial en Voltametría Cíclica*²⁵³.

De este modo, cuando en dicha celda hay componentes electroactivos que producen una reacción de oxidación o reducción (dependiendo si estamos en el barrido reverso o anverso, respectivamente) a un potencial concreto, el valor absoluto de la intensidad medida aumenta al ser más negativo en el caso de una reacción de reducción y positivo en el caso de una oxidación. En consecuencia, la técnica permite la detección de especies electroactivas, y la determinación del potencial de reducción o de oxidación de las mismas. El potencial de reducción es por convenio el potencial catódico (E_{pc}); y el potencial de oxidación, el anódico (E_{pa}).

También es posible determinar la intensidad, pero los valores obtenidos son menos reproducibles, al depender de factores experimentales como la temperatura, la presión atmosférica, la superficie del electrodo en contacto con la disolución, el pH, y la velocidad de barrido, entre otros. El potencial redox también depende de algunos de los factores anteriores (especialmente del pH y de la velocidad de barrido), pero sus variaciones son, por lo general y en términos porcentuales, menores que en el caso de la intensidad²⁵³⁻²⁵⁶.

Para definir un proceso de oxidación-reducción en Voltametría Cíclica se emplean los potenciales de reducción o catódico (E_{pc}), oxidación o anódico (E_{pa}), la diferencia de potenciales ($\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa}$) y el potencial formal de reducción (E°). Este último se define como el promedio de los potenciales catódico y anódico, dando así una idea del proceso en su conjunto²⁵³. En la *Figura 8.9* se muestran gráficamente los parámetros anteriores en un voltamograma de ácido cafeico²⁵⁷.

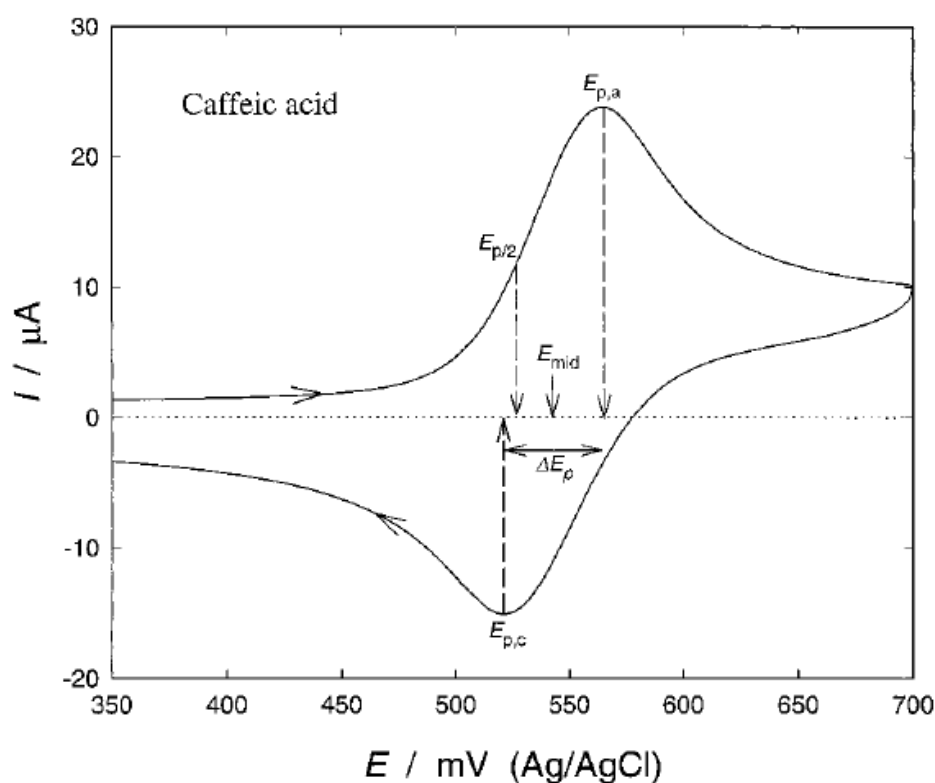


Figura 8.9: Voltamograma del ácido cafeico ²⁵⁷.

En la Figura 8.9 E_{mid} sería el potencial formal de reducción $E^{\circ'}$ y $E_{p/2}$ es el potencial al cual la intensidad es la mitad que en el máximo del pico. Las intensidades, que faltan en la figura, se calculan trazando la tangente a la línea base antes del pico correspondiente (la línea de la izquierda para la reacción anódica y la de la derecha para la catódica) y calculando, para el potencial E_{pc} o E_{pa} la diferencia entre la intensidad del pico y la extrapolada a dicho potencial en las líneas tangenciales. Sobre los signos y sentido del potencial y de la intensidad en las gráficas, la IUPAC recomienda seguir la disposición mostrada en la Figura 8.9. No obstante, es frecuente encontrar en publicaciones antiguas ^{253,254} el convenio anterior, según el cual se dispone el potencial en el sentido inverso y se asigna el signo positivo a los procesos catódicos.

Las reacciones redox susceptibles de ser detectadas mediante esta técnica pueden ser de tres tipos diferentes: reversibles, cuasireversibles e irreversibles. En función de la forma de la curva y de los valores de los potenciales anteriores es posible determinar el tipo de reacción involucrada. En cualquiera de los tres casos es posible hacer un tratamiento matemático más profundo y riguroso; pero la realización de dicho tratamiento se escapa del objetivo de este experimento y de esta Tesis Doctoral: el realizar un screening inicial de la actividad electroquímica para estudiar las posibles aplicaciones antioxidantes de los selenoésteres.

Procesos Reversibles

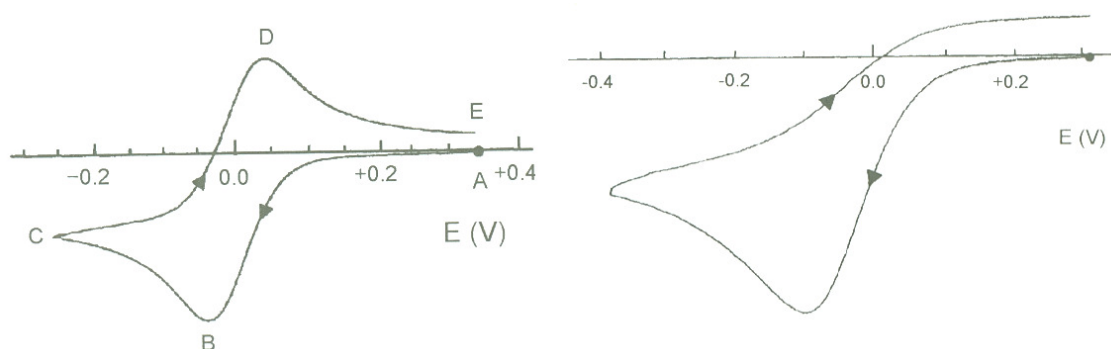
Son aquellos procesos redox en los cuales la reducción y la oxidación son completamente reversibles, de tal forma que todo lo que se reduce en el barrido anverso es oxidado de nuevo en el reverso, volviendo a la situación original; lo que implica que

en el proceso redox no se producen fragmentaciones de la molécula, sino simples cambios del estado de oxidación. Adicionalmente, en un proceso reversible la cinética de las reacciones de oxidación-reducción ha de desarrollarse a mayor velocidad que la difusión de materia hacia y desde el electrodo.

Estos procesos cumplen la ecuación de Nernst²⁵⁵, mostrada en (8) para una reacción $A - e^- \rightleftharpoons B$; y se reconocen por la forma de la curva, la cual es por lo general simétrica, tal y como puede observarse en el voltamograma tipo mostrado en la *Figura 8.10*. Un proceso reversible típico sería la reducción y posterior oxidación de cationes o sales metálicas en disolución.

$$E = E^{0'}(A/B) + \frac{RT}{F} \ln \frac{[B]_0}{[A]_0} \quad (8)$$

Siendo $E^{0'}$ el potencial estándar, R la constante de los gases, T la temperatura y F la constante de Faraday.



*Figura 8.10: Voltamogramas tipo de un proceso reversible (izquierda) e irreversible (derecha)*²⁵⁶.

Aparte, los potenciales e intensidades varían de formas definidas. De este modo, el potencial de reducción es independiente de la velocidad de barrido (v); y la diferencia de potenciales ΔE_p a 25 °C es igual, en milivoltios, a $59/n$, siendo n el número de electrones intercambiados por compuesto en el proceso redox.

En cuanto a las intensidades, las señales correspondientes con la oxidación y con la reducción tienen la misma intensidad, siendo su cociente igual a la unidad e invariable al modificar v . Asimismo, el cociente entre la intensidad del proceso reductivo (i_{pc}) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido es constante²⁵³⁻²⁵⁶.

Procesos Irreversibles

En un proceso irreversible se registran diferentes picos en el barrido anverso y en el reverso, siendo el voltamograma, en consecuencia, asimétrico, como puede deducirse de la observación de la curva tipo de la *Figura 8.10*. Esto hecho experimental se debe o bien a que en la reducción del barrido anverso se produce una fragmentación que impide el normal desarrollo del proceso oxidativo inverso en el barrido reverso; o bien a que la velocidad a la cual se producen los procesos redox es inferior a la difusión de las especies entre la disolución y el electrodo. También puede ser posible que un

proceso sea irreversible porque la forma reducida, aún no sufriendo una fragmentación, participa en una reacción química que la transforma en una especie inerte, no susceptible de ser oxidada en el barrido reverso.

El potencial de reducción (barrido anverso) varía en un proceso irreversible en función de la velocidad de barrido: se desplaza a potenciales más negativos al aumentar v . El cociente entre la intensidad del proceso catódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido sigue siendo constante; aunque en este caso ya no hay relación entre las intensidades anódicas y catódicas.

Existen ecuaciones que relacionan tanto la velocidad de barrido y el potencial como la intensidad y el potencial, pero requieren un tratamiento matemático profundo, involucrando variables como el coeficiente de transferencia de carga, los coeficientes de difusión de las especies electroactivas y la concentración de las mismas en el equilibrio; yendo dicho tratamiento más allá del objetivo de este trabajo²⁵³⁻²⁵⁶.

Procesos Cuasireversibles

Estos procesos son intermedios entre los dos casos previamente estudiados. Los procesos cuasireversibles son reversibles a bajas velocidades de barrido e irreversibles cuando dichas velocidades son elevadas. Tienen lugar cuando la velocidad de difusión es del mismo orden de magnitud que la del proceso redox.

En los procesos cuasireversibles la forma de la curva y la diferencia de potenciales depende de una función matemática compleja dependiente de la velocidad de barrido, del coeficiente de carga, de los coeficientes de difusión de las especies oxidada y reducida, y de las constantes de las reacciones de oxidación y reducción.

De dicha ecuación se deduce que el potencial se desplaza hacia valores más negativos cuando aumenta v , y que la diferencia de potenciales se aproxima a $59/n$ a bajas velocidades de barrido, aumentando con v . El cociente entre la intensidad del proceso reductivo y la velocidad de barrido puede no ser constante al variar v ; y la ratio entre las intensidades anódica y catódica sólo es igual a la unidad cuando el coeficiente de transferencia α es igual a 0,5. Coeficientes α entre 0 y 0,5 indican que predomina la oxidación, luego el cociente i_{pa}/i_{pc} es mayor que la unidad, es decir, la intensidad del proceso oxidativo es mayor que la del reductivo. En el caso contrario ($0,5 < \alpha < 1$), el cociente i_{pa}/i_{pc} es menor que la unidad y predomina la reducción²⁵³⁻²⁵⁶.

Aplicaciones de la Voltametría Cíclica

Las aplicaciones de la voltametría cíclica son muy variadas. Puede decirse que las más importantes son el estudio de los procesos de oxidación - reducción, de los procesos de adsorción a una superficie, de la difusión de especies electroactivas en disolución y del comportamiento de las mismas en disolución, así como la detección de especies electroactivas en una muestra concreta²⁵³⁻²⁵⁷.

En esta Tesis Doctoral, centrada en el desarrollo de nuevos selenoderivados que contienen el grupo funcional selenoéster como nuevos agentes quimiopreventivos, citotóxicos, y antiproliferativos, la aplicación de utilidad es la determinación de si un compuesto determinado puede dar lugar a reacciones redox, y en qué grado lo hace. Es decir, estudiar si es o no electroactivo.

Metodología

Ensayos a realizar

El plan de trabajo inicial es optimizar en primer lugar las condiciones más adecuadas para analizar los selenoésteres empleando la técnica de la voltametría cíclica, a través de la elección de un compuesto y la recogida de voltamogramas en diferentes condiciones experimentales. Los parámetros a optimizar son:

- *Electrodo de trabajo*: Electrodo de carbono o electrodo de gota de mercurio. El electrodo empleado determina el intervalo de potenciales a estudiar.
- *Velocidad de barrido*: Intervalo 20 - 1000 mV/s.
- *Concentración*: Intervalo 0,1 - 1 mM.
- *Disolvente*: Se trabaja con disoluciones acuosas o anhidras.
- *Tiempo*: Intervalo 5 - 30 min. Se considera desde que se disuelve la muestra.
- *Número de ciclos*: Se trabaja con 3 ciclos consecutivos, para observar si se repiten o no los comportamientos observados en sucesivos barridos.

Una vez optimizadas las condiciones, se plantea la realización de un screening preliminar de selenoésteres seleccionados, buscando cubrir de forma representativa las distintas series de compuestos presentados en este trabajo, y pretendiendo analizar si siguen un patrón más o menos homogéneo, o si, debido a la diversidad estructural entre los diferentes selenoésteres, se encuentran varios patrones diferenciados.

En función de los resultados obtenidos en el screening preliminar, se plantea la realización de experimentos adicionales para ahondar en el conocimiento de la actividad electroquímica de estos derivados.

Procedimiento

Para la realización de un ensayo tipo en condiciones acuosas se procede de la siguiente forma:

- *Preparación de buffers*: Como paso previo a la realización del experimento, se prepara un stock de buffer fosfato de pH 7,4. La presencia de sales es necesaria para que la conductividad del medio sea adecuada para la realización del experimento.
- *Preparación del equipo*: Se programa el equipo en las condiciones que se vayan a estudiar en cada caso concreto (velocidad de barrido, número de ciclos, rango de potenciales, etc). Cuando se trabaja con el electrodo de carbono, el rango de potenciales es de 1200 a -1200 mV; y de 0 a -1200 mV en el electrodo de gota de mercurio.

- *Montaje de la celda de análisis:* Para la realización del experimento se preparan los tres electrodos a utilizar. Se emplea un electrodo de plata y cloruro de plata como referencia; un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de trabajo, el cual variará en función del experimento a realizar. Los electrodos han de limpiarse minuciosamente tras cada experimento con agua y con metanol; y si el electrodo de trabajo es sólido (carbono) ha de ser pulido por frotado con una superficie abrasiva. Si se utiliza el electrodo de gota de mercurio, se introduce la gota justo antes de cada medición; y se retira al término de ella, empleándose tantas gotas como voltamogramas se recojan en cada experimento. Por la toxicidad del mercurio, a la finalización del experimento se desecha en recipientes especiales, con las medidas de seguridad pertinentes.

- *Preparación de la muestra:* Se pesa la cantidad de compuesto necesaria para preparar 20 mL de una disolución de trabajo con la concentración deseada (entre 0,1 y 1 mM). Se comienza adicionando 16 mL de buffer fosfato para hacer un blanco y asegurar así la correcta limpieza de la celda y de los electrodos. Acto seguido se añade el compuesto a analizar disuelto en 4 mL de metanol, y se mantiene con agitación y purga de nitrógeno gaseoso durante cuatro minutos; realizándose la primera medición en estado estacionario a los cinco minutos. La disolución final contiene así un 20% de metanol para evitar la precipitación de los selenoderivados en el medio acuoso.

En el caso de realizar experimentos en condiciones anhidras, se emplea diclorometano como disolvente, y una sal compleja para garantizar la conductancia del medio (tetrafluoroborato de tetrabutilamonio). En estos ensayos se extreman las precauciones en la limpieza de los electrodos y de la celda para evitar la hidratación.

Cálculos y Expresión de resultados

Conocidos los potenciales de reducción (E_{pc}) y de oxidación (E_{pa}), se calcula la diferencia de potenciales ΔE_p y el potencial formal de reducción ($E^{o'}$) aplicando las fórmulas (9) y (10):

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \quad (9)$$

$$E^{o'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (10)$$

No siempre se podrán calcular estos dos parámetros: cuando un compuesto carezca de uno de los picos (oxidación y reducción) las fórmulas anteriores no son de aplicación al no conocerse todas las variables. No se proporcionarán las intensidades, al ser valores en los cuales, por depender de muchos factores experimentales, se observan variaciones notables al modificar dichos factores.

Ensayos “In Vitro”

Ensayo del Tiofenol: Evaluación de la actividad peroxidasa

Fundamento

El ensayo del tiofenol o bencenotiol busca medir la actividad peroxidasa de los compuestos sintetizados; es decir, pretende evaluar su capacidad para destruir el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno presente en el medio, previniendo así la generación de especies derivadas más peligrosas como el radical hidroxilo. Con este fin, la prueba se basa en la reacción del tiofenol con el agua oxigenada para formar difenildisulfuro y eliminar el peróxido al convertirlo en agua, tal y como se muestra en la *Figura 8.11*.

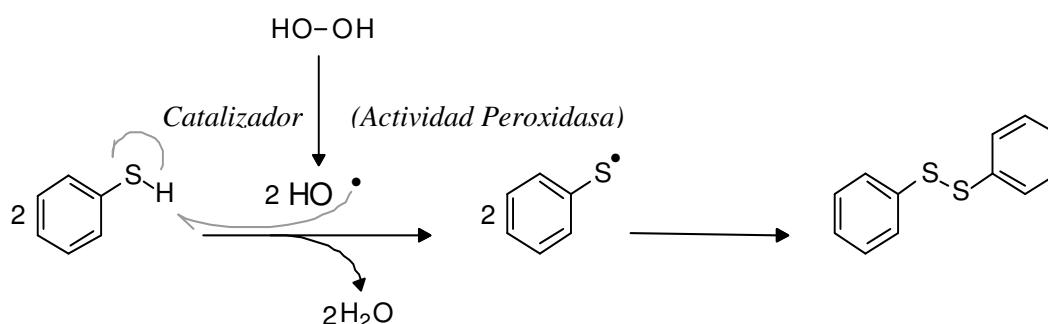


Figura 8.11: Reacción del tiofenol con agua oxigenada.

Esta reacción se da de forma espontánea, pero muy lentamente. En presencia de ciertos compuestos químicos que actúan como catalizadores la reacción se acelera, con lo cual se puede afirmar que dichas estructuras con propiedades catalíticas poseen actividad peroxidasa; siendo ésta mayor cuanto más elevada sea la ratio de velocidades observada entre la reacción catalizada y la espontánea.

La reacción puede seguirse espectrofotométricamente debido a que el producto final absorbe radiación ultravioleta, a una longitud de onda $\lambda = 305$ nm, gracias a la conjugación de los pares de electrones solitarios de los átomos de azufre con los anillos aromáticos. La absorbancia, de esta forma, aumentará más rápidamente cuanto mayor sea la capacidad catalítica del compuesto analizado.

Metodología

La metodología del ensayo consiste en hacer un estudio cinético de la formación de difenildisulfuro a través de medidas espectrofotométricas con el objeto de evaluar si el producto testado es capaz de catalizar la reacción del peróxido de hidrógeno con el tiofenol, y, en consecuencia, tiene actividad peroxidasa. Estos ensayos *in vitro* han sido

realizados en el laboratorio del Prof. Dr. Claus Jacob, en la Universität des Saarlandes (Saarbrücken, Saarland, Alemania), basándose en el procedimiento descrito en el artículo de Iwaoka y Tomoda²⁵⁸.

Disoluciones requeridas:

- *Tiofenol: Disolución madre*

Se disuelven 10 μL de tiofenol comercial en 9,79 mL de metanol de grado HPLC, obteniendo así 9,8 mL de disolución madre de concentración 10 mM.

- *Tiofenol: Solución de trabajo*

Se preparan 50 mL de tiofenol 1,123 mM diluyendo 5,62 mL de la disolución madre en 44,38 mL de metanol de grado HPLC.

- *Peróxido de Hidrógeno:*

Para realizar el ensayo es necesario preparar previamente una solución madre de agua oxigenada de concentración 20 mM. Con este fin se valoró volumétricamente el peróxido de hidrógeno comercial y se determinó que para diluir el peróxido 6,65 M a la concentración requerida es preciso disolver 15 μL del mismo en 4,985 mL de agua destilada.

- *Compuestos:*

Para cada estructura se prepara una disolución metanólica de 500-1000 μL de concentración 10 mM, pesando en balanza de precisión con este fin una cantidad de producto en torno a la centésima parte del peso molecular en miligramos, calculando después, conocida la masa pesada, el volumen de metanol-HPLC necesario para obtener la concentración deseada.

- *Control positivo: Difenildiseleniuro*

El difenildiseleniuro se emplea como control positivo y se prepara como si fuera un compuesto adicional. Antes de comenzar las mediciones de los compuestos se ensaya primero el difenildiseleniuro para verificar que todos los parámetros del equipo están bien introducidos y que éste funciona correctamente.

El control elegido, de acuerdo con artículo de Iwaoka²⁵⁸, presenta una actividad GPx media-baja. A pesar de su actividad relativamente baja, se ha considerado interesante el mantener el control por su inclusión en el artículo de referencia empleado y por preferir utilizar como referencia un compuesto selenado similar a los derivados presentados en este trabajo.

Procedimiento:

Para efectuar el experimento se trabaja con un espectrofotómetro multicanal Cary 50 Bio ultravioleta-visible, analizando al mismo tiempo 4 cubetas, de las cuales una contiene el blanco, y las restantes, el compuesto o control, según corresponda, que se desea analizar. Todas las medidas de absorbancia realizadas se llevan a cabo a una longitud de onda $\lambda = 305 \text{ nm}$.

El procedimiento a seguir es el siguiente.

1. Se pipetea 1 mL de la solución de trabajo de tiofenol (1,123 mM) en cada cubeta, haciéndose posteriormente una lectura de absorbancia de todas las cubetas para que el equipo la emplee como cero.

2. Se retiran 110 μL de cada cubeta y se adicionan 10 μL de metanol al blanco y 10 μL de la solución 10 mM del compuesto a las cubetas restantes.

3. Se adicionan rápidamente 100 μL de la solución de peróxido de hidrógeno (20 mM) con el fin de tomar el tiempo cero lo antes posible. El espectrofotómetro, utilizando el programa cinético “Cary Win UV Enzyme Kinetics”, se programa para tomar medidas cada 30 segundos y para proporcionar las velocidades iniciales.

4. Al término del experimento se lavan meticulosamente las cubetas con metanol, ácido sulfúrico al 33% y agua destilada para evitar que la permanencia del producto debida a una deficiente limpieza interfiera en mediciones posteriores.

Las concentraciones finales de cada reactivo en la cubeta de medida son las siguientes: tiofenol (1 mM), peróxido de hidrógeno (2 mM) y compuesto a ensayar (100 μM).

Cálculos y Expresión de resultados

El programa del espectrofotómetro facilita el dato de la velocidad inicial, en unidades de Abs/min. En consecuencia, se calculan tanto la media de las velocidades de las reacciones no catalizadas ($\overline{v_{nc}}$) como las catalizadas ($\overline{v_c}$), desechando aquellos datos que se alejan de la media de una forma estadísticamente significativa y empleando al menos 3 datos válidos.

Para cada estructura los resultados se expresan como la ratio entre la velocidad de la reacción catalizada por dicho producto y la reacción espontánea, empleando la fórmula (11):

$$r = \frac{\overline{v_c}}{\overline{v_{nc}}} \quad (11)$$

Determinación de la eliminación del radical DPPH

Fundamento

Para determinar la capacidad de los compuestos de secuestrar radicales libres con el fin de eliminarlos del medio, previniendo su acción nociva sobre las células, se ha empleado el ensayo del DPPH o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (*Figura 8.12*). Dicha especie radicalaria, gracias a su elevada conjugación, es capaz de estabilizar el electrón desapareado, dando así una especie química estable que puede almacenarse a 4 °C durante un tiempo prolongado sin que se observe destrucción del mismo.

La aromaticidad y la gran conjugación de la estructura del radical favorecen la formación de un sistema π deslocalizado a través de toda la molécula que permite a la especie radicalaria absorber en el espectro visible, por lo cual la estructura presenta un color violáceo en disolución.

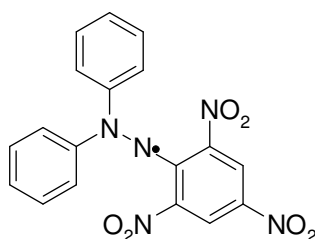


Figura 8.12: Estructura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Al destruirse el radical fijando el electrón deslocalizado en un enlace químico se rompe la conjugación electrónica y la especie resultante, en consecuencia, deja de absorber radiación electromagnética en el espectro visible al decolorarse la solución resultante. De este modo podemos evaluar la destrucción del radical DPPH a través de medidas espectrofotométricas.

Metodología

La metodología del ensayo, se basa en la descrita por Sharma y Bhat²⁵⁹ y consiste en exponer diferentes concentraciones del producto testado a una concentración conocida del radical. Este ensayo ha sido realizado en el laboratorio del Prof. Dr. Claus Jacob, en la Universität des Saarlandes (Saarbrücken, Saarland, Alemania).

Disoluciones requeridas:

- *DPPH: Disolución madre*

Se disuelven 4 mg de DPPH en 1014 μ L de metanol de grado HPLC para obtener una disolución de DPPH de concentración 10 mM, y se agita vigorosamente hasta total disolución. Esta solución madre puede almacenarse durante dos semanas en el congelador (a -20°C), siempre que se encuentre protegida de la luz.

- *DPPH: Disolución de trabajo*

La concentración de la disolución de trabajo es de 100 μM y se obtiene realizando una dilución 1:100 de la disolución madre. Se prepara disolviendo 100 μL de la disolución madre en 9,9 mL de metanol de grado HPLC.

- *Compuestos: Disolución madre*

Al igual que en el ensayo del tiofenol, para cada compuesto ensayado se prepara una disolución en metanol de 500-1000 μL de concentración 10 mM; pesando en balanza de precisión con este objeto en torno a la centésima parte del peso molecular del derivado testado en miligramos y calculando posteriormente, conocida la masa pesada, el volumen de metanol de grado HPLC requerido para obtener la concentración deseada.

- *Compuestos: Diluciones finales*

A partir de la disolución madre se hacen diluciones sucesivas empleando metanol de grado HPLC como solvente para obtener 900-1000 μL de las diluciones finales, que tienen las siguientes concentraciones: 1000, 300, 100, 30 y 10 μM .

- *Control positivo: Ácido ascórbico*

En este ensayo de DPPH se utiliza como control positivo ácido ascórbico (vitamina C), el cual se prepara como si fuera un compuesto adicional.

Procedimiento:

En una placa de 96 pocillos se siembran cinco compuestos, el ácido ascórbico empleado como control positivo y un blanco o control negativo, siguiendo el esquema de siembra mostrado en la *Figura 8.13*.

Se comienza añadiendo a cada pocillo 100 μL de la dilución correspondiente (100 μL de metanol en los blancos) de acuerdo con el esquema mostrado. Una vez sembrados todos los pocillos se adicionan 100 μL de la solución final de DPPH a cada uno; teniendo así un volumen final de 200 μL y una concentración de DPPH de 50 μM . Es conveniente diluir el radical a este nivel para asegurar el trabajar dentro del intervalo lineal en el cual se aplica la ley de Beer-Lambert a la hora de medir la absorbancia en el lector de placas; siguiendo las recomendaciones recogidas en la publicación de Sharma y Bhat²⁵⁹. Las concentraciones finales tras diluir el compuesto son, por otro lado, 500, 150, 50, 15 y 5 μM ; tal y como se muestra en la *Figura 8.13*.

Tras completar la adición del radical se protege la placa con papel de aluminio y se deja incubar $\frac{1}{2}$ hora en la oscuridad, a temperatura ambiente. Al término de la media hora se procede a la medición de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro con lector para microplacas (Wallac, Victor, 1420 multilabel counter), a una λ de 550 nm; descontando el aparato a la absorbancia obtenida a dicha λ el valor registrado a una longitud de onda de referencia (690 nm) para evitar errores de cálculo achacables a la absorción de luz por parte de la placa y del disolvente.

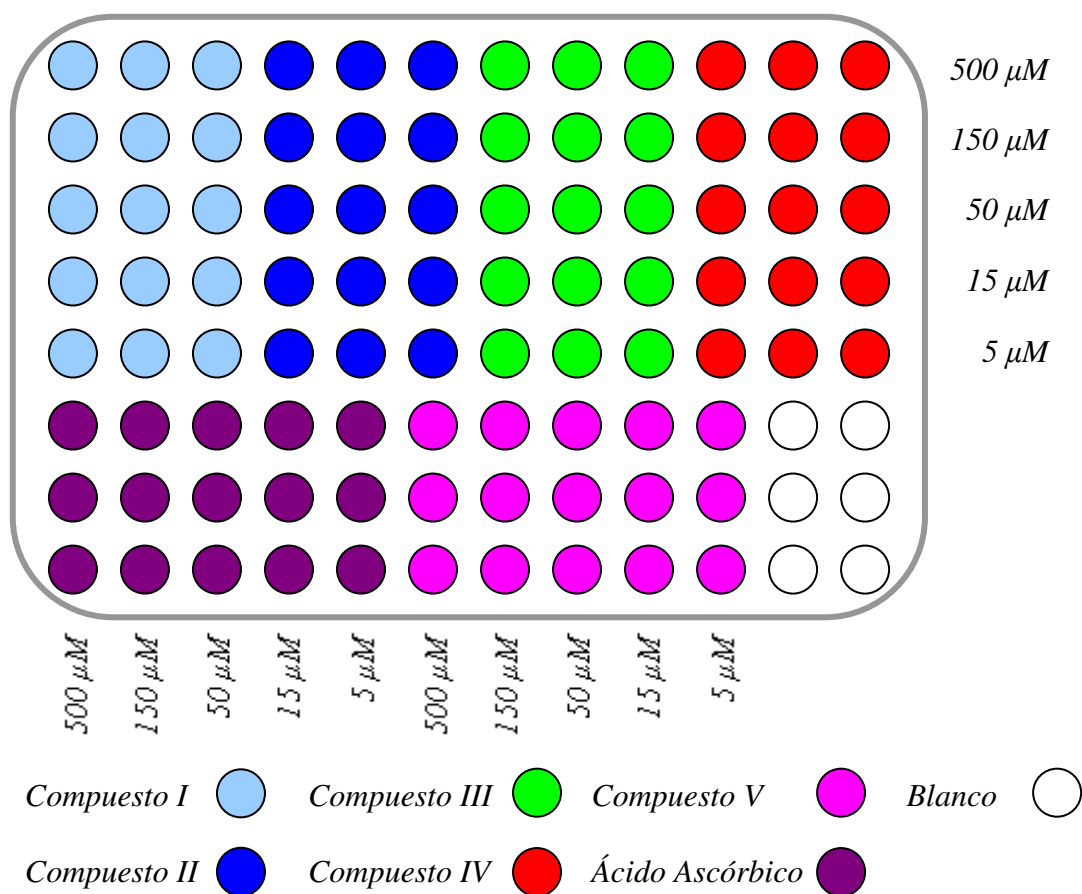


Figura 8.13: Esquema de siembra, ensayo del DPPH.

Cálculos y Expresión de resultados

La eficacia de cada compuesto ensayado como “*radical scavenger*” del DPPH se expresa como el porcentaje de radical eliminado o destruido por el derivado adicionado, calculándose dicho valor empleando la ecuación (12):

$$\% \text{ Eliminación DPPH} = \left(1 - \frac{\text{Muestra}_{550nm}}{\text{Blanco}_{550nm}}\right) \times 100 \quad (12)$$

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Electroquímico: Voltametría Cíclica

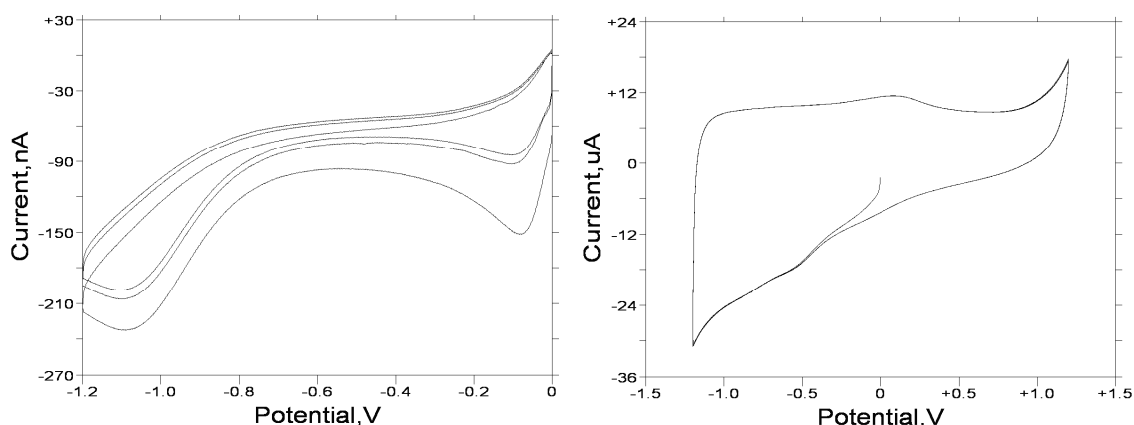
Ensayos preliminares

Para optimizar las condiciones experimentales se emplean dos selenoderivados: el selenoanhídrido *III.1* (benzo[b]selenofen-1,3-diona) y el selenoéster de metilo *VI.A1* (benzoselenoato de metilo).

En el caso del selenoato de metilo el criterio de selección es su simplicidad estructural: la ausencia de grupos funcionales en su estructura molecular diferentes del grupo selenoéster facilita la interpretación del espectro. El anhídrido, por su parte, se selecciona por su estructura molecular debido a que, a priori, por la mayor reactividad del grupo selenoanhídrido en comparación con el grupo selenoéster, puede ser más proclive a participar en procesos redox.

Blanco inicial

La *Figura 8.14* muestra voltamogramas recogidos en ausencia de compuesto al utilizar electrodos de gota de mercurio y de carbono, para permitir su comparación con los voltamogramas de los selenoésteres que se incluirán más adelante. Los experimentos se efectuaron a una velocidad de barrido de 200 mV/s y empleando metanol al 20% como disolvente, siendo la fase acuosa un buffer fosfato de pH 7,4. Los intervalos de potencial son de 0 a -1200 mV al utilizar el electrodo de gota de mercurio; y de 1200 a -1200 mV cuando el electrodo de trabajo es de carbono.



*Figura 8.14: Blancos en el electrodo de mercurio (izquierda) y de carbono (derecha).
 $v = 200 \text{ mV/s}$, disolvente MeOH:H₂O (buffer fosfato pH 7,4) 1:4*

Concentración y tiempo de ensayo

Se testan tres concentraciones diferentes de los dos compuestos citados (0,25; 0,5 y 0,75 mM), en las condiciones de los experimentos anteriores. Según los resultados los procesos de redox pueden detectarse empleando el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo. Al utilizar el electrodo de carbono, únicamente el selenoanhídrido registra señales de procesos redox.

Asimismo, se encuentra que la concentración más adecuada de las analizadas es la intermedia: 0,5 mM; al observarse que todos los picos tienen intensidades similares en la concentración más baja, que aparecen bien resueltos en la intermedia y que en la más alta la resolución de los mismos empeora, al no verse bien por la elevada intensidad del pico principal, el cual además presenta una morfología que indica que la reducción se ve afectada por procesos de histéresis. En el electrodo de carbono la tendencia es más marcada. El selenoéster de metilo *VI.A1* presenta un comportamiento similar, aunque menos acentuado.

En cuanto al tiempo de análisis, tras las pruebas preliminares se decide considerar como referencia para posteriores ensayos el voltamograma recogido a los 5 minutos tras la disolución de la muestra, para dar tiempo a homogeneizar y purgar la disolución; y al mismo tiempo, evitar la detección de picos correspondientes con los posibles productos de degradación. No se puede perder de vista que el compuesto a analizar se encuentra en disolución acuosa y que se emplea metanol como agente solubilizante, con lo cual, las condiciones de ensayo pueden facilitar la degradación de los selenoésteres; tal y como se ha estudiado previamente en condiciones asimilables (DMSO, 37°C) en los Ensayos de Estabilidad (*vid.* páginas 184-188). La *Figura 8.15* muestra el voltamograma de *III.1* en las condiciones optimizadas ($t = 5$ min y concentración = 0,5 mM).

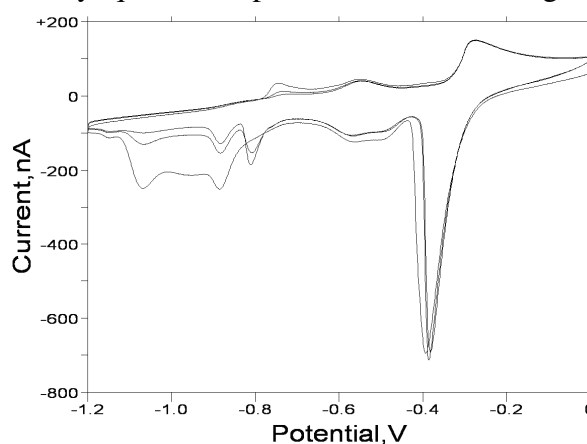


Figura 8.15: Voltamograma de III.1, $t = 5$ min, 0,5 mM, electrodo de mercurio, $v = 200$ mV/s, pH 7,4

Velocidad de barrido

Para determinar la velocidad de barrido óptima se toman voltamogramas de los dos selenoésteres anteriores a diferentes v , a una concentración 0,5 mM. Al ser la respuesta mayor en el electrodo de gota de mercurio, este ensayo se realiza sólo en dicho electrodo. Las velocidades analizadas son 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 mV/s.

Los resultados indican que no todos los picos aparecen bien resueltos a las velocidades de barrido más bajas; y que a las más altas las señales se ensanchan y el voltamograma es menos preciso, y al mismo tiempo, las curvas correspondientes a los diferentes ciclos son más dispares. En consecuencia, con los resultados puede afirmarse que la v considerada en los ensayos de concentración (200 mV/s) es adecuada al

proporcionar el mayor número de señales sin que el ensanchamiento de las mismas sea excesivo. En el caso del compuesto VI.A1 los resultados son similares.

Disolvente

Al ser más activo el selenoanhídrido que el selenoéster de metilo, se analiza en condiciones anhidras para estudiar si en ellas se registra actividad electroquímica. Con este fin se solubiliza el derivado en diclorometano seco, para obtener una disolución de concentración 0,5 mM y en presencia de tetrafluoroborato de tetrabutilamonio como sal conductora. En estas condiciones no se encuentran señales diferentes de las observadas en los blancos correspondientes ni en el electrodo de mercurio ni en el de carbono.

Condiciones optimizadas

Tras la revisión de los resultados anteriores, se encuentra que las condiciones optimizadas para el screening electroquímico de los selenoésteres son las siguientes:

- *Electrodo de trabajo*: El electrodo de elección es el de gota de mercurio, aunque se recogerán voltamogramas en el de carbono para detectar los selenoésteres con mayor actividad electroquímica.
- *Velocidad de barrido*: 200 mV/s.
- *Concentración*: 0,5 mM.
- *Disolvente*: Buffer fosfato, pH 7,4, con un 20% de metanol para facilitar la solubilización de los selenoésteres.
- *Tiempo*: 5 minutos, considerando como tiempo cero el instante en el cual se adiciona el compuesto a ensayar a la celda voltamétrica.

Screening electroquímico

Tras optimizar las condiciones experimentales en los ensayos preliminares, se procede a la realización de un screening electroquímico de selenoésteres seleccionados, aplicando dichas condiciones y buscando encontrar rasgos generales entre los derivados de las diferentes series. A continuación se exponen tanto los valores de potencial determinados como algunos voltamogramas representativos de las diferentes series de selenoésteres analizadas.

Parámetros electroquímicos

Electrodo de gota de mercurio:

La *Tabla 8.11* recoge los potenciales catódicos y anódicos de los procesos electroquímicos detectados en los voltamogramas de los selenoésteres en los que se considera probable, a falta de estudios de mayor profundidad, que puede estar

involucrado el átomo de selenio presente en la estructura molecular de los compuestos analizados con esta técnica voltamperométrica. En las dos últimas columnas de la tabla se incluyen la diferencia de potenciales ΔE_p y el potencial formal de reducción $E^{\circ'}$ calculados cuando se detectan simultáneamente los procesos reductivo y oxidativo.

Los resultados de la tabla indican que los potenciales a los cuales se reducen los selenoésteres de carboxialquilo de la *Serie I* se sitúan en torno a los -800 mV, siendo más negativos que los potenciales catódicos de los derivados de las otras series. En el otro extremo se sitúan los selenoésteres de acilalquilo de la *Serie V*, con potenciales del orden de los -570 mV y el selenoanhídrido, cuya diferente estructura podría explicar su potencial anormalmente elevado en comparación con los restantes (-393 mV). La mayoría de los selenoésteres presentan potenciales en torno a -600 mV, rango en el que suelen detectarse los seleniuros en voltametría cíclica.

Tabla 8.11: Parámetros electroquímicos de los selenoésteres. Electrodo de gota de mercurio. $v = 200$ mV/s, MeOH:H₂O (buffer fosfato pH 7,4) 1:4, $t = 5$ min.

	E_{pc}	E_{pa}	ΔE_p	$E^{\circ'}$
I.A6	-821 mV	-751 mV	70 mV	-786 mV
I.B1	-814 mV	-747 mV	67 mV	-781 mV
I.C1	-823 mV	-758 mV	65 mV	-791 mV
I.C2	-769 mV	-	-	-
I.D1	-884 mV	-762 mV	122 mV	-823 mV
II.2	-642 mV	-532 mV	110 mV	-587 mV
II.3	-610 mV	-560 mV	50 mV	-585 mV
III.1	-393 mV	-274 mV	119 mV	-334 mV
IV.A2	-630 mV	-552 mV	78 mV	-591 mV
IV.A4	-603 mV	-529 mV	74 mV	-566 mV
IV.A7	-625 mV	-	-	-
IV.B2	-618 mV	-	-	-
IV.C1	-551 mV	-	-	-
V.A1	-588 mV	-518 mV	70 mV	-553 mV
V.B1	-568 mV	-436 mV	132 mV	-502 mV
VI.A1	-692 mV	-608 mV	84 mV	-650 mV
VI.A2	-635 mV	-	-	-
VI.B1	-696 mV	-639 mV	57 mV	-668 mV

No se incluyen en la tabla anterior los valores de corriente detectados al ser más cualitativos que cuantitativos por depender de factores experimentales tales como la temperatura, presión atmosférica, superficie del electrodo, velocidad de barrido, pH... De forma cualitativa, se observa que los selenoésteres de carboxialquilo (*Serie I*) registran procesos reductivos cuyas intensidades se sitúan en el rango del microamperio,

junto con el selenoanhídrido. Por el contrario, las intensidades de las corrientes halladas en los restantes selenoésteres se mueven en el orden del nanoamperio.

Con frecuencia se encuentran en el voltamograma picos correspondientes a otros procesos, normalmente de menor intensidad. No obstante, en algunos derivados, tal y como se explica a continuación, el proceso más intenso no es el señalado en la *Tabla 8.11*, sino otro que posiblemente esté relacionado con los grupos funcionales presentes en dichos selenoésteres.

Así, los selenoésteres de acilalquilo de la *Serie V* analizados presentan un pico de una intensidad mayor que la del señalado en la tabla en torno a -1000 mV (*vid. Figura 8.21*). Se considera, por la mayor cercanía del potencial del pico señalado a los potenciales de los restantes compuestos y por la detección del proceso a -1000 mV de forma exclusiva en los derivados de esta serie, que dicho pico podría corresponder con la reducción de la cetona a aldehído o a alcohol, siendo necesaria la realización de experimentos más complejos para confirmar esta hipótesis. Por último, el proceso a -1000 mV es completamente irreversible, al no detectarse un pico oxidativo asociado. Los potenciales catódicos del supuesto proceso reductivo de la cetona son -1011 mV para *V.A1* y -1075 mV en *V.B1*.

Por otro lado, el selenodiestéer de dimetilo *VI.B1* presenta un pico más intenso que el indicado en la tabla a -1153 mV. Al igual que en el caso anterior, se ha optado por señalar el proceso con el potencial más próximo al de los selenoésteres de metilo, estructuralmente muy próximos. Se propone que el segundo proceso, al encontrarse únicamente en este derivado, pueda estar relacionado con la presencia de dos átomos de selenio en la estructura de este selenoéster. Este derivado, al igual que *IV.C1*, es muy poco soluble en el medio acuoso utilizado en el análisis y requiere un tiempo de agitación más prolongado que el necesario para disolver el resto de los compuestos.

Electrodo de carbono:

Solamente tres derivados muestran procesos redox detectables en el electrodo de carbono. Los potenciales determinados se muestran en la *Tabla 8.12*:

*Tabla 8.12: Parámetros electroquímicos de los selenoésteres. Electrodo de carbono.
 $v = 200$ mV/s, MeOH:H₂O (buffer fosfato pH 7,4) 1:4.*

	E_{pc}	E_{pa}	ΔE_p	$E^{o'}$
III.1	-554 mV	-	-	-
V.A1	-699 mV	-476 mV	223 mV	-588 mV
VI.B1	-1157 mV	-	-	-

El potencial de la reducción detectado en *VI.B1* es elevado en comparación con el de los restantes compuestos. Puede estar relacionado con algún proceso que involucre la presencia de dos átomos de selenio en la molécula, por ser el único derivado analizado con esta singularidad estructural.

Voltamogramas

Serie I:

Los derivados de la *Serie I*, que presentan un ácido carboxílico en el sustituyente alquílico enlazado al átomo de selenio, desarrollan voltamogramas que muestran un pico reductivo de una intensidad del orden del microamperio a un potencial en torno a los -800 mV.

Como peculiaridad propia de esta serie, la intensidad del pico disminuye a medida que aumenta el tiempo de análisis, al mismo tiempo que aparece un segundo pico a un potencial menos negativo. La intensidad de este segundo pico aumenta a lo largo del tiempo, al contrario que el pico base. A primera vista se podría sospechar que se produce una esterificación de Fischer del ácido presente en la estructura de estos derivados, debido a la presencia de metanol en la celda electrolítica; pero el potencial del pico emergente no concuerda con los determinados en los voltamogramas de los ésteres equivalentes de la *Serie IV*.

En la *Figura 8.16* se recogen los voltamogramas del compuesto *I.A4* a cinco y a treinta minutos empleando el electrodo de gota de mercurio, para mostrar los cambios anteriormente descritos. En ningún derivado de esta serie se detectan picos al utilizar el electrodo de carbono como electrodo de trabajo.

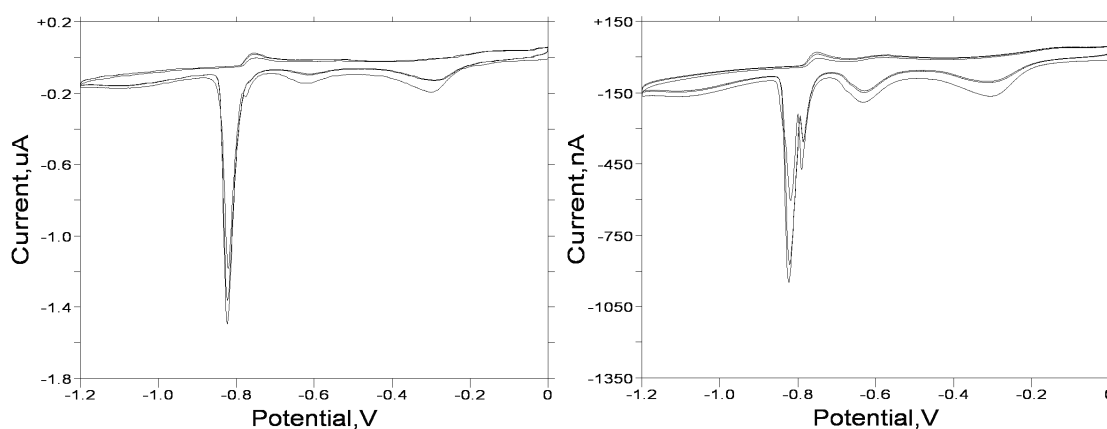


Figura 8.16: Voltamogramas de I.A4 a 5 min (izquierda) y a 30 min (derecha). Electrodo de mercurio, $v = 200 \text{ mV/s}$; $0,5 \text{ mM}$; $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (buffer fosfato pH 7,4) 1:4.

Serie II:

Los selenoésteres de carbamoilmetilo muestran voltamogramas con picos menos intensos que los derivados de la *Serie I*. En *II.3* se observa que el proceso oxidativo asociado al proceso reductivo principal, a pesar de su menor intensidad con respecto al pico catódico (debida a una $\alpha > 0,5$), guarda una cierta simetría con dicho pico. Es posible que el proceso sea cuasireversible, aunque se requerirían otros experimentos a diferentes velocidades de barrido para confirmar este extremo.

En la *Figura 8.17* se recogen los voltamogramas de los selenoésteres *II.2* y *II.3*. El potencial del proceso principal se encuentra en la región de los -600 mV; y se observa que el primero presenta picos reductivos adicionales.

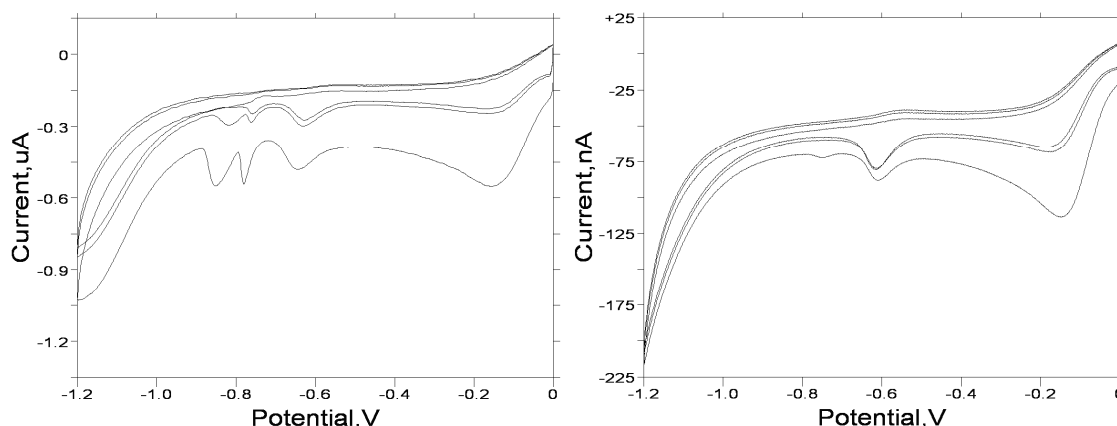


Figura 8.17: Voltamogramas de II.2 (izquierda) y II.3 (derecha) a $t = 5$ min. Electrodo de mercurio, $v = 200$ mV/s; $0,5$ mM; MeOH:H₂O (buffer fosfato pH 7,4) 1:4.

Serie III:

El potencial de reducción principal del selenoanhídrido es significativamente mayor que el de otros derivados: -393 mV frente al intervalo de -600 a -800 mV en el cual se encuentran los potenciales catódicos de los restantes selenoésteres analizados. La reducción tiene una cierta intensidad, al aproximarse la misma al rango del microamperio.

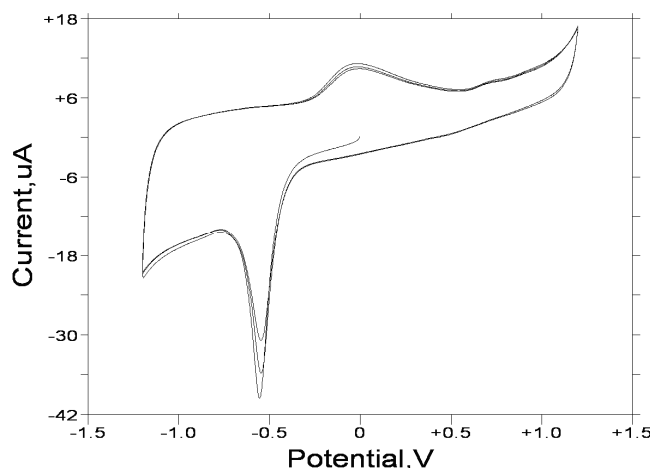


Figura 8.18: Voltamograma de III.1. Electrodo de carbono, $v = 200$ mV/s, pH 7,4

La *Figura 8.15* (vid. página 245) muestra un voltamograma del selenoanhídrido en el electrodo de mercurio. El voltamograma del mismo compuesto en el electrodo de carbono es mucho más simple y definido (*Figura 8.18*).

Serie IV:

El potencial reductivo principal de estos selenoésteres se encuentra en torno a los -600 mV, salvo *IV.C1* (-550 mV). Se observan diferencias significativas entre los voltamogramas de las diferentes subseries.

Así, los voltamogramas de los selenoésteres de metiloxicarbonilmetilo (*IV.A*) son simples y definidos, con un cierto grado de simetría. El proceso reductivo puede ser cuasirreversible, debiéndose entonces la asimetría de las intensidades a un valor del coeficiente de transferencia α mayor que $0,5$; aunque al igual que en los derivados de la *Serie II*, se precisarían experimentos adicionales para probar esta hipótesis.

En cambio, el selenoéster de *terc*-butiloxicarbonilmetilo testado presenta un voltamograma irreversible, al no presentar procesos oxidativos asociados a la reducción catódica observada. Por último, el selenoéster de feniloxicarbonilmetilo analizado desarrolla un voltamograma irreversible, pero más complejo al presentar otros procesos reductivos. En este derivado, por su insolubilidad, aparecen picos a -1100 mV, los cuales no se reproducen en otros barridos y en voltamogramas a diferentes tiempos. Para eliminar estos picos se limita el voltaje al intervalo de 0 a -1000 mV. La Figura 8.19 recoge los voltamogramas de los derivados *IV.A2*, *IV.A4*, *IV.B2* y *IV.C1*.

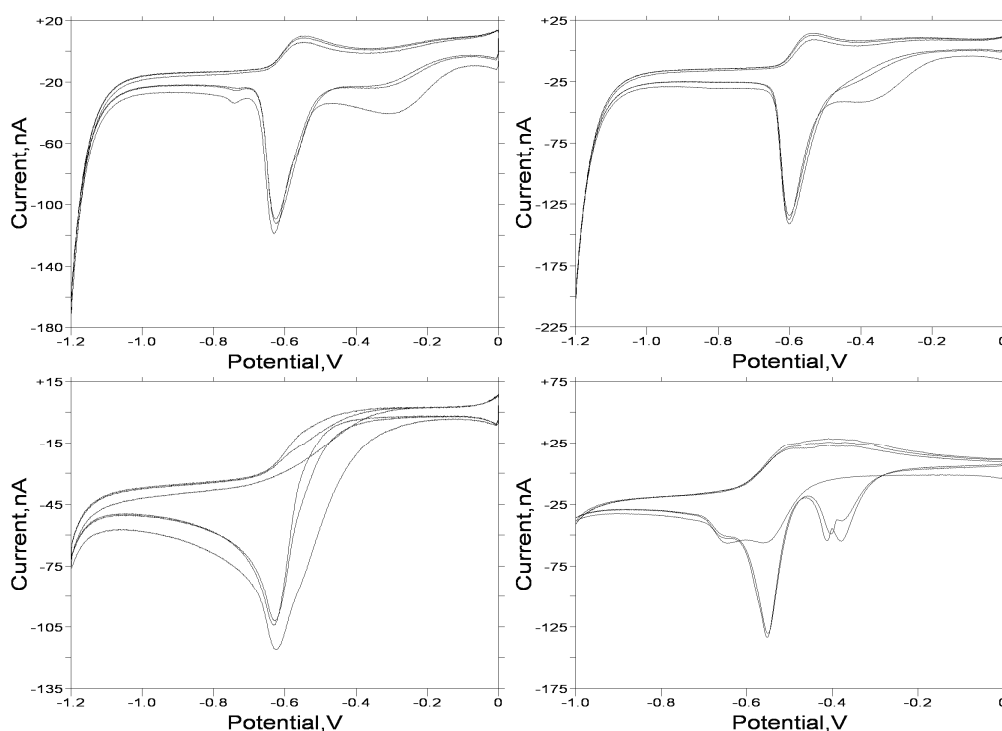


Figura 8.19: De izquierda a derecha, voltamogramas de *IV.A2* y *IV.A4*. Abajo, de *IV.B2* y *IV.C1*. Electrodo de mercurio, $v = 200 \text{ mV/s}$; $0,5 \text{ mM}$; $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ 1:4, y $t = 5 \text{ min}$.

Serie V:

Como se ha comentado con anterioridad estos derivados presentan un proceso reductivo adicional a -1000 mV, posiblemente relacionado con la reducción de la cetona presente en la estructura de los selenoésteres de esta serie. *V.A1*, por otro lado, desarrolla señales electroquímicas al trabajar con el electrodo de carbono. En la Figura 8.20 se muestran voltamogramas representativos de los derivados de esta serie.

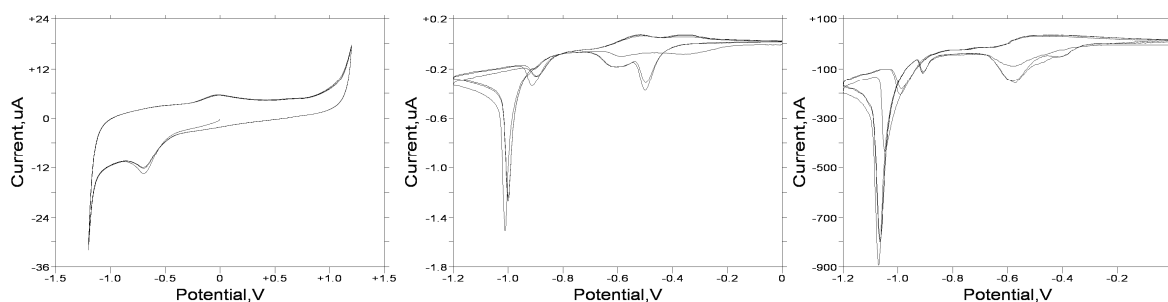


Figura 8.20: Voltamogramas de *V.A1* (izda, carbono; centro, mercurio) y *V.B1* (derecha, mercurio). $v = 200 \text{ mV/s}$; $0,5 \text{ mM}$; $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (buffer fosfato pH 7,4) 1:4.

Serie VI:

Los selenoésteres de metilo de la subserie *VI.A* desarrollan voltamogramas sencillos, con señales poco intensas, apareciendo el proceso principal en el intervalo de -600 a -700 mV y siendo irreversible en el derivado *VI.A2*, al no detectarse un pico oxidativo asociado.

Por último, el selenodíster de dimetilo analizado presenta un cierto grado de simetría en el proceso oxidativo a -700 mV, recordando a los derivados de las *Series II* y *IV.A*. Este compuesto muestra además un proceso a -1150 mV, que podría estar relacionado con la presencia de dos átomos de selenio en la molécula (*Figura 8.21*). Presenta además un proceso oxidativo a -1150 mV en el electrodo de carbono.

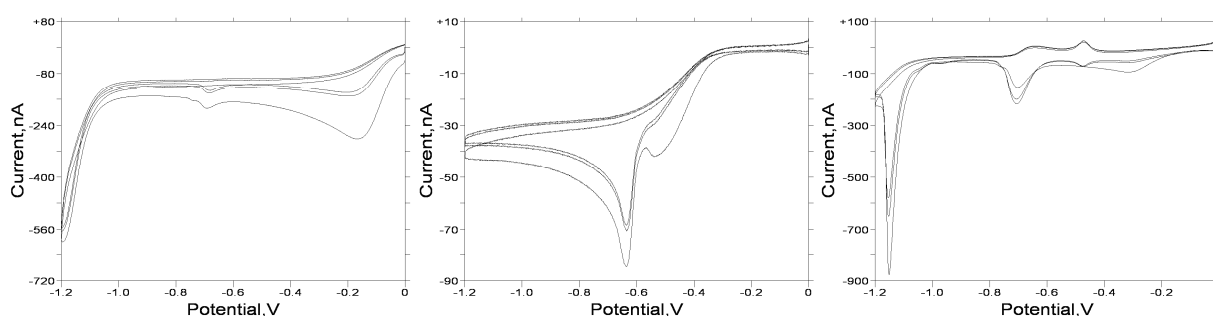


Figura 8.21: Voltamogramas de VI.A1 (izquierda), VI.A2 (centro) y VI.B1 (derecha). Electrodo de mercurio, $v = 200$ mV/s; 0,5 mM; MeOH:H₂O (buffer fosfato pH 7,4) 1:4.

Controles:

Se han tomado voltamogramas de compuestos relacionados con la estructura de los selenoésteres pero sin átomos de selenio, tales como el ácido ftálico, el ácido benzoico y el ácido *p*-clorobenzoico. El objetivo de estos experimentos adicionales es verificar que el átomo de selenio participa en los procesos electroquímicos observados en los voltamogramas de los selenoésteres.

En los casos del ácido ftálico y del ácido benzoico no se encontraron señales diferentes de las observadas en los blancos ni a la concentración normal a la cual se ensayaron los selenoderivados (0,5 mM) ni a concentraciones superiores (1 y 2 mM). Por el contrario, el ácido *p*-clorobenzoico muestra un pico irreversible a -554 mV de muy baja intensidad, probablemente relacionado con el átomo de cloro presente en la molécula. En cualquier caso, los potenciales a los cuales se observan los procesos reductivos de los selenoésteres son más negativos; y las señales registradas son de mayor intensidad.

Ensayos “*In Vitro*”

Actividad peroxidasa de los selenoésteres

Se ha evaluado espectrofotométricamente la actividad peroxidasa o capacidad de eliminación del peróxido de hidrógeno de trece derivados seleccionados empleando el ensayo del tiofenol previamente descrito, siendo la concentración de trabajo de 100 μM para todos los productos testados.

En la elección de los compuestos se ha pretendido seleccionar selenoésteres representativos de todas las series y subgrupos con el fin de realizar un screening entre las distintas estructuras presentadas en esta Memoria. Por otro lado se ha prestado especial atención a la inclusión de moléculas que contienen átomos de nitrógeno o ciclos nitrogenados en su estructura (*I.B6*, *VI.A4*, *VI.B4*, *II.2*) ante la presencia de nitrógeno en la mayoría de los derivados que, de acuerdo con la bibliografía, tienen actividad peroxidasa^{258,260-262}.

Los resultados, recogidos en la *Tabla 8.13*, se expresan como la ratio entre la velocidad de la reacción catalizada por el compuesto ensayado en cada caso (V_{cat}) y la espontánea no catalizada (V_{esp}).

Como control positivo se emplea difenildiseleniuro, el cual, según la bibliografía, presenta una actividad peroxidasa moderada-baja. Se ha optado por seleccionar un control positivo comercial que contenga selenio, siendo su estructura próxima a los productos, en lugar de uno con una mayor actividad, buscando una mejor comparación de los resultados de los mismos con los del control elegido.

Tabla 8.13: Actividad peroxidasa de los selenoésteres. Ratios V_{cat} / V_{esp} determinados

Producto	Ratio V_{cat} / V_{esp}	Producto	Ratio V_{cat} / V_{esp}
<i>Difenildiseleniuro (C)</i>	13,3	IV.A2	2,1
IA6	-5,8	IV.A7	1,9*
IB6	2,8	V.A1	2,4
IC1	1,4	VI.A1	1,0
ID1	-0,4	VI.A4	1,4*
II.2	2,1	VI.B1	4,9
III.1	4,0	VI.B4	11,5

Los resultados muestran que únicamente el derivado piridínico disustituido con el grupo metilselenocarbonilo (VI.B4) presenta una actividad significativamente próxima a la exhibida por el control positivo elegido; con lo cual dicho compuesto sería el único con una actividad significativamente apreciable.

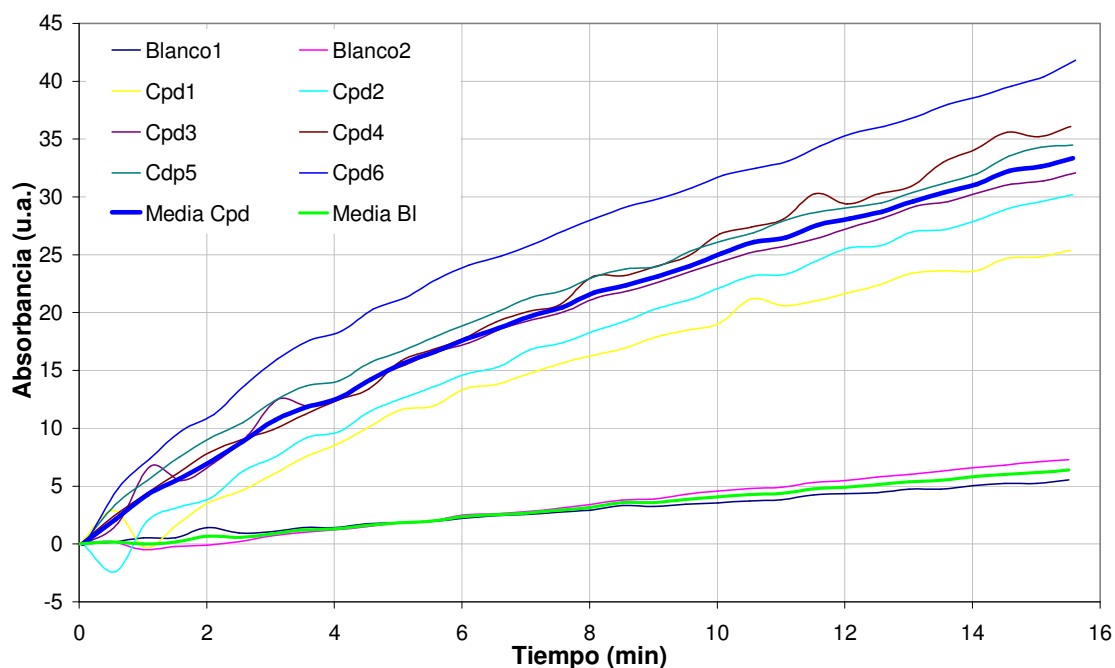


Figura 8.22a: Eliminación de H_2O_2 por la acción de los compuestos, seguida espectrofotométricamente a través de la formación de difenildisulfuro. Derivado VI.B4.

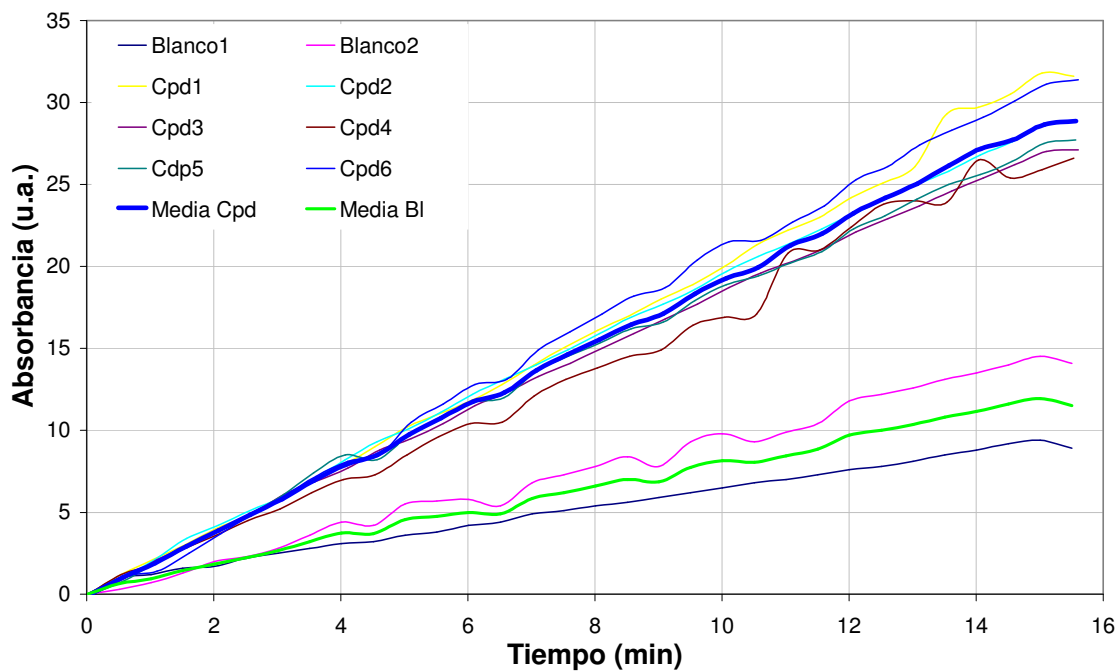


Figura 8.22b: Eliminación de H_2O_2 por la acción de los compuestos, seguida espectrofotométricamente a través de la formación de difenildisulfuro. Derivado I.B6.

Sabiendo que el control positivo tiene una actividad media-baja, podemos decir que los selenoésteres evaluados, con la excepción del diselenoéster *VI.B4*, apenas presentan actividad peroxidasa. Esto supone que la retirada de peróxido de hidrógeno no es el mecanismo que explica la acción biológica de estos derivados. Algunos selenoésteres, incluso, presentan valores negativos, como es el caso de los derivados *IA6* y *I.DI*; lo que significa que en vez de facilitar la reacción del tiofenol con el agua oxigenada catalizan la reacción inversa, produciendo una reducción de la absorbancia debida al difenildisulfuro resultante de dicha reacción.

Sin embargo, a pesar de la baja actividad peroxidasa de los selenoésteres, es importante destacar que los derivados que contienen nitrógeno mejoran la actividad de compuestos similares que no presentan átomos de dicho elemento; en línea con la bibliografía, la cual indica que la presencia de selenio y nitrógeno en una molécula potencia su actividad peroxidasa. Este aumento de la actividad se observa, por ejemplo al pasar de *VI.B1* a *VI.B4* (benceno-piridina) y de *I.C1* a *II.2* (ácido-amida)

En la *Figura 8.22* se muestran los datos en bruto recogidos para el derivado con la mayor actividad GPx (*VI.B4*), así como para un derivado menos activo, por mostrar gráficamente el mayor potencial del compuesto de la *Serie VI*, en comparación con los restantes derivados evaluados. En las gráficas se denotan cada una de las repeticiones del ensayo como Cpdx, y del blanco, como Blancox, variando *x* entre 1 y 6 en los ensayos de compuestos y entre 1 y 2 en los blancos.

Los valores de la *Tabla 8.14* son los cocientes de las velocidades medias iniciales de las reacciones catalizadas por los compuestos y la reacción espontánea, medida en el blanco. Dichas velocidades son proporcionadas en unidades de Abs/min por el programa cinético del espectrofotómetro, el cual las calcula a partir de las absorbancias en los tiempos iniciales: las velocidades son, básicamente, la pendiente de las curvas absorbancia/tiempo en los estadios iniciales (5 minutos).

Eliminación de DPPH por los selenoésteres

Se ha determinado a través de valoraciones espectrofotométricas en qué medida trece productos seleccionados entre los sintetizados en este trabajo retiran del medio los radicales libres a través del ensayo del DPPH o del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Se han elegido para este estudio los mismos compuestos testados en la prueba del tiofenol con el objeto de ahondar en el conocimiento de su comportamiento redox.

Aunque los derivados fueron analizados a diferentes concentraciones con el objetivo de obtener las correspondientes curvas de la eliminación del radical en función de la concentración para calcular las respectivas IC_{50} , únicamente el selenoanhídrido (derivado *III.1*) retiró más de la mitad del radical DPPH en al menos una de las concentraciones ensayadas. En consecuencia, ante la falta de datos de IC_{50} , en la *Tabla 8.14* se muestra el porcentaje de radical eliminado a la máxima concentración (500 μ M), a excepción del compuesto *III.1* por tener su máxima eliminación a 150 μ M.

Tabla 8.14: Porcentajes máximos de eliminación del radical DPPH por los compuestos

Producto	% Eliminación DPPH (500 μ M)	Producto	% Eliminación DPPH (500 μ M)
<i>Ácido Ascórbico (C)</i>	98,9	IV.A2	16,4
I.A6	34,5	IV.A7	15,0
I.B6	32,7	V.A1	8,84
I.C1	18,1	VI.A1	4,98
I.D1	32,7	VI.A4	20,4
II.2	14,0	VI.B1	43,1
III.1	56,6 (150 μM)	VI.B4	21,5

Los valores de IC_{50} calculados por interpolación para el ácido ascórbico (control positivo) y para *III.1* son 8,70 y 74,1 μ M, respectivamente; siendo la concentración de radical DPPH en el pocillo de medida de 50 μ M. No obstante, el valor obtenido para dicho compuesto es dudoso ante el descenso de la eliminación de radicales a la concentración más elevada, siendo la inhibición radicalaria inferior al 50% a 500 μ M. Dicho descenso puede deberse a un error experimental, a una posible saturación de la señal a altas concentraciones o a interferencias debidas a los productos de degradación del selenoanhídrido *III.1*, el cual es inestable en disolución acuosa, tal y como se indica en el apartado de los ensayos de estabilidad (*vid.* páginas 184-188).

En la *Figura 8.23* se muestran las curvas de la eliminación del radical en función de la concentración de los selenoésteres testados más activos de cada serie.

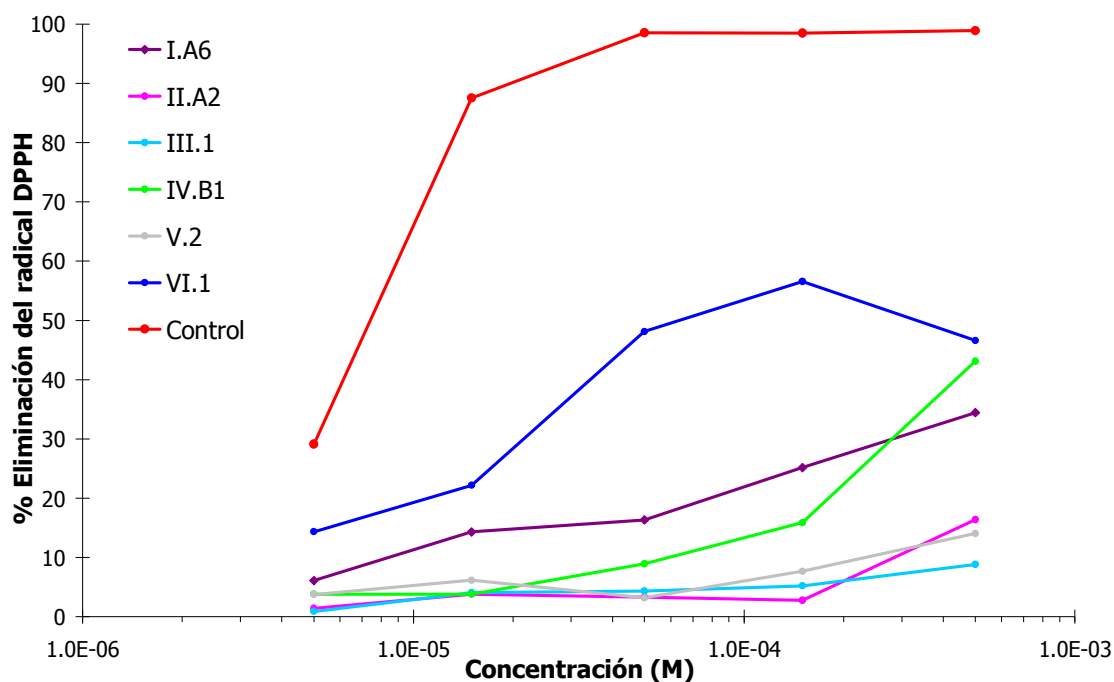


Figura 8.23: % eliminación DPPH vs concentración de compuestos seleccionados.

Los datos experimentales son, por desgracia, claramente insuficientes para extraer conclusiones generales más allá de la escasa capacidad de los compuestos estudiados para inhibir la especie radicalaria considerada. No obstante, el análisis de los datos de la *Tabla 8.14* y el estudio detallado de las curvas de todos los compuestos sugieren algunas ideas y reflexiones que deberían contrastarse con pruebas adicionales:

- Exceptuando el compuesto *III.1*, que presenta una actividad moderada al tener una IC_{50} a una concentración de sólo un orden de magnitud por encima de un antioxidante modelo como el ácido ascórbico, los compuestos analizados no destruyen específicamente el radical DPPH.
- Ahora bien, el gran volumen tanto del radical DPPH como de los sustituyentes unidos al selenio plantea que las repulsiones estéricas puedan estar detrás de la escasa reactividad entre las especies mencionadas. Por lo tanto, se plantea la duda de cómo se comportarían los derivados organoselénicos estudiados ante especies radicalarias de menor tamaño y de gran interés biológico como los radicales O_2^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^{\bullet}$, ó OH^{\bullet} ; los cuales no han podido emplearse en este ensayo en vez del DPPH al imposibilitarse o dificultarse enormemente la preparación de disoluciones en las cuales las especies radicalarias sean estables por la alta reactividad de las mismas.
- El orden de eficacia eliminando el radical DPPH del medio parece, de acuerdo con los datos disponibles, ser el siguiente: *Serie III* > *Serie I.A* > *Serie VI.A*, *Serie II*, *Serie I.C* > *Serie V*. No es posible incluir en la relación anterior los compuestos de las series *VI.A* y *VI.B* al obtenerse datos dispares dentro de ellas.

- La inclusión de un segundo grupo funcional $-COSeCH_3$ en el benzoselenoato de metilo (compuesto *VI.A1*) potencia significativamente la eliminación del radical DPPH al multiplicarla por un factor de 9 y elevarla por encima del 40%. De mantenerse esta tendencia, los derivados tri y tetrafuncionalizados podrían ser unos excelentes inhibidores de radicales libres. Es interesante la observación de que el perfil de actividad biológica de los diselenodiésteres de dimetilo no se restringe a la citotoxicidad y a las propiedades antiproliferativas: al menos uno de ellos muestra en los ensayos bioquímicos del tiofenol y del DPPH una actividad notable si se compara con la exhibida por los restantes compuestos.
- En las *Series I y IV* se han analizado derivados con sustituyentes diferentes sin encontrar diferencias significativas de actividad, al contrario que en la serie de los selenoésteres de metilo (*VI*); donde la sustitución con restos que contienen nitrógeno ($-CN$) parece potenciar la actividad al observarse un valor cuatro veces superior el determinado en ausencia del sustituyente.

Integración de los resultados

El análisis de los resultados de la actividad quimiopreventiva, antiproliferativa y citotóxica de los selenoésteres presentados en este trabajo permite sacar algunas ideas generales sobre su actividad global contra el cáncer.

En primer lugar se observa que los selenodíésteres de dimetilo (*Serie VI*) tienen una acción dual antiproliferativa y quimiopreventiva, al ser, de entre los selenoésteres sintetizados, los derivados con mayor acción antiproliferativa y al detectarse reacciones redox en sus ensayos de voltametría cíclica. En el otro extremo, los selenodíésteres *VI.B1* y *VI.B4* tienen una actividad peroxidasa y una eliminación de DPPH destacables; siendo así los compuestos más interesantes de entre los presentados al ser los derivados más citostáticos y al tener una actividad reseñable en los demás ensayos.

Se encuentra que los voltamogramas tomados a diferentes barridos (dentro del mismo ensayo) y tiempos son en cierto modo reproducibles. Este hecho supone que no se producen rupturas de la molécula, contraviniendo la hipótesis de esta Tesis. No obstante, en el electrodo de mercurio se trabaja con un intervalo de voltaje estrecho (sólo con potenciales negativos), con lo que únicamente se detectan los procesos reductivos, así como los oxidativos asociados a la reducción previa. Los procesos oxidativos, que serían los que producen las rupturas detectadas en otros ensayos (masas, estabilidad por RMN) no pueden detectarse en este electrodo al producirse normalmente a potenciales positivos. Podrían observarse en el electrodo de carbono (1,2 a -1,2 V), pero la detección de oxidaciones de selenoderivados es difícil en dicho electrodo.

En la voltametría cíclica se puede destacar la acción de los carboxiselenoésteres por tener un potencial atípicamente más negativo y por su mayor intensidad, del selenoanhídrido por su comportamiento en general, y de los carbonilmetilselenoésteres de la *Serie IV* por forma de sus voltamogramas. El tener potenciales de reducción más negativos favorece a priori las propiedades antioxidantes; al darse el proceso oxidativo a potenciales menores, más favorables. Sin embargo, dicha afirmación es relativa al referirse al proceso oxidativo asociado; con lo cual no se descarta la posibilidad de que la oxidación de interés en medios biológicos sea otra que se de a un potencial mayor.

Valorando los resultados obtenidos en los diferentes ensayos para los derivados citados, el selenoanhídrido es quizá el de mayor interés global al presentar una acción quimiopreventiva destacable, en base a su actividad redox, peroxidasa y de eliminación del DPPH; si bien su potencial antiproliferativo y citotóxico no es de los más elevados. En el extremo opuesto estarían los derivados de las *Series IV* y *V*, que destacan tanto por su potente acción antiproliferativa y citotóxica como por su baja actividad en los ensayos quimiopreventivos *in vitro*.

Por último, se encuentra que los ácidos, que tienen potenciales redox diferentes, son de entre los selenoésteres los derivados con menor acción antiproliferativa. Los resultados en los ensayos *in vitro* indican que su capacidad para destruir el radical DPPH es notable y que su actividad peroxidasa es baja.

C. Evaluación de Nemotoxicidad

C. EVALUACIÓN DE NEMOTOXICIDAD

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayos de Nemotoxicidad

Fundamento

Con los ensayos de nemotoxicidad se pretende determinar la toxicidad de los productos organoselenados sintetizados en nematodos de la especie *Steinernema feltiae*, exponiendo dichos nematodos a diferentes concentraciones del compuesto para calcular la DL₅₀ a las 24 horas, basándonos en las viabilidades observadas tras la exposición a las correspondientes diluciones.

Metodología

Estos ensayos biológicos han sido realizados en el laboratorio del Prof. Dr. Claus Jacob, en la Universität des Saarlandes (Saarbrücken, Saarland, Alemania).

Disoluciones requeridas:

✓ *Compuestos: Disolución inicial*

Se preparan en torno a 400 µL de una disolución 40 mM del correspondiente compuesto en dimetilsulfóxido. Para ello se pesa en balanza de precisión un valor cercano al resultado de multiplicar el peso molecular en miligramos por 0,016 y luego se calcula el volumen necesario de DMSO para obtener la concentración deseada.

✓ *Compuestos: Segunda disolución*

Se transfieren 77,7 µL de la disolución anterior a un falcon con 6,922 mL de agua destilada para obtener una disolución de concentración 444,44 µM. En los derivados más activos se hace una dilución 1:10 adicional, a 44,44 µM.

✓ *Compuestos: Diluciones finales*

Desde la dilución anterior se obtienen las concentraciones finales efectuando diluciones seriadas en agua destilada. Se preparan las siguientes concentraciones para los derivados menos activos: 444,44; 222,22; 111,11; 55,56; 27,78; 11,11; 5,556; 2,778 y 1,111 µM; siendo las concentraciones de los compuestos más activos las siguientes:

44,44; 22,22; 11,11; 5,556; 2,778; 1,111; 0,5556 y 0,2778 μM . Al diluir 900 μL de cada una de las diluciones anteriores en un eppendorf con 100 μL de solución de nematodos obtenemos las concentraciones finales de 400, 200, 100, 50, 25, 10 y 1 μM para los compuestos menos activos y 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 y 0,25 μM para los más activos.

✓ *Control negativo: Agua y Dimetilsulfóxido*

Para preparar el control negativo acuoso se pipetea 900 μL de agua destilada en un eppendorf. Con respecto al DMSO, se disuelven 77,7 μL en 6,922 mL de agua destilada y se pipetea una alícuota de 900 μL en un eppendorf. Así, la concentración final de DMSO en el ensayo es del 1%, al igual que en los productos.

Procedimiento:

El procedimiento del ensayo se basa en el descrito por Sarakbi²⁶³, aunque, al estar centrado dicho procedimiento en la realización de las pruebas en unos pocos compuestos, se han hecho las modificaciones necesarias tanto para hacer un screening de un número más elevado de productos como para optimizar el uso del material.

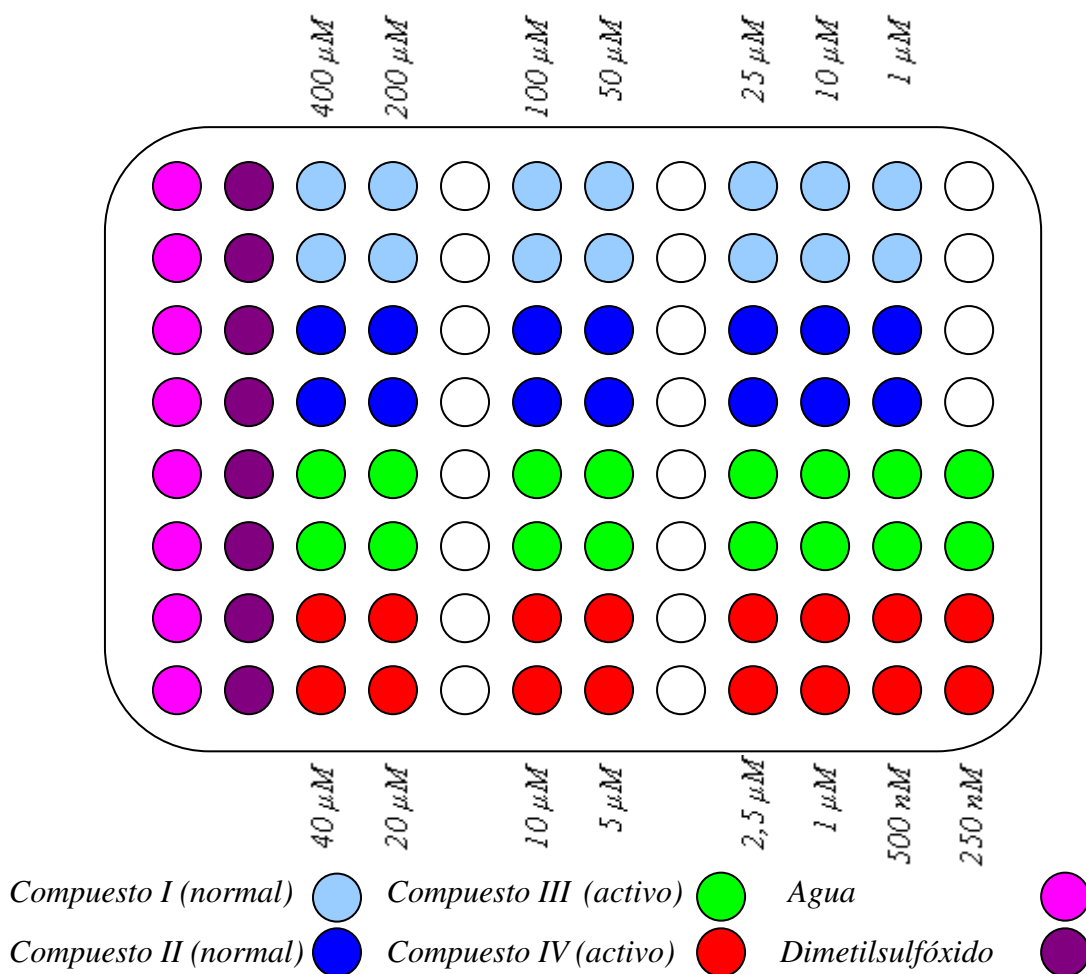


Figura 8.24: Esquema de siembra, ensayo de nemotoxicidad

Tras terminar la preparación de las correspondientes diluciones, se pesan 200 mg de nematodos de la especie *Steinernema feltiae* (Nematoden gegen Trauermücken, Sautter & Stepper GmbH, Baden-Württemberg, Alemania) y se suspenden en 50 mL de agua; para luego dejarlos atemperar durante media hora. Se trabaja con este nematodo parásito de insectos en lugar de con uno de interés clínico por motivos de seguridad. El stock de nematodos se almacena refrigerado a 4 °C, pudiendo conservarse óptimamente en estas condiciones hasta dos semanas.

Antes de iniciar el test es obligado comprobar la viabilidad de la muestra, la cual debe contener como mínimo un 80% de nematodos vivos, a través del examen microscópico de al menos dos alícuotas de 10 µL en una cámara de Neubauer. Una vez verificada la viabilidad de la muestra preparada, se procede a sembrar la placa de 96 pocillos añadiendo 100 µL de la muestra que corresponda, de acuerdo con el esquema de siembra mostrado en la *Figura 8.24*.

Cada concentración de producto se siembra por duplicado. Se siembran dos controles negativos: uno con agua y otro con dimetilsulfóxido, teniendo este último la misma cantidad del disolvente orgánico que se emplea para solubilizar los diferentes productos: un 1%, que es a su vez el porcentaje del solvente en la disolución más concentrada. En las restantes diluciones la cantidad de disolvente es menor porque las diluciones seriadas se preparan empleando agua destilada.



*Figura 8.25: Nematodo vivo de la especie Steinernema feltiae*²⁶⁴.

Después de sembrar 4 pocillos se observan al microscopio para contar y anotar los nematodos vivos y muertos en cada pocillo; registrando también la hora de lectura. Se cuentan entre 10 y 30 gusanos por pocillo. Al finalizar la siembra se guarda la placa a temperatura ambiente y protegida de la luz. Los nematodos vivos se distinguen, aparte de por la movilidad, por la forma enroscada que adoptan (*Figura 8.25*); comparada con la forma rígida y lineal o ligeramente curvada de los gusanos inertes.

Transcurridas 24 horas, se procede a la realización de una segunda observación al microscopio de cada pocillo, habiendo adicionado previamente agua templada (35°C) para estimular a los nematodos e impedir, de esta forma, el registro de una viabilidad errónea al contar los gusanos durmientes como nematodos muertos.

Inicialmente se realizaba un recuento adicional sin estimulación a las 4 horas, tal y como se describía en el procedimiento de Sarakbi²⁶³. No obstante, ante la continua observación en el tiempo intermedio de valores de mortalidad superiores a los hallados a las 24 horas debido a la ausencia de estimulación, se optó por eliminar dicho recuento debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos; al no ser viable la doble estimulación por poder ser también letal para los gusanos la estimulación a las 4 horas.

Cálculos y Expresión de resultados

La viabilidad “bruta” de los nematodos a cada concentración y a cada ensayo se expresa porcentualmente como el cociente entre los nematodos vivos a las 24 horas (N_{24h}) con respecto a los vivos al comienzo del experimento (N_{0h}); tal y como se muestra en la fórmula (13):

$$\% \text{ Viabilidad (Bruta, } V_P) = \frac{N_{24h}}{N_{0h}} \times 100 \quad (13)$$

En cada concentración testada tendríamos así 6 viabilidades. La media, sin embargo, no puede utilizarse tal cual porque es obligado considerar la mortalidad natural en el control negativo e introducir una corrección en la fórmula basada en los controles negativos. Con este fin se determina la media de las viabilidades en el control negativo con DMSO al 1% y dicho valor se aplica en (14) como factor de corrección:

$$\% \text{ Viabilidad (Ajustada)} = \overline{V_{P,A}} = \frac{\overline{V_P}}{\overline{V_C}} \times 100 \quad (14)$$

Las viabilidades ajustadas determinadas se utilizan para trazar la gráfica viabilidad versus concentración, junto con las correspondientes desviaciones, pudiendo así calcular a partir de ella la DL_{50} por interpolación. Para calcular el intervalo de confianza de las DL_{50} encontradas se determina para cada concentración \overline{D} , la desviación media respecto de la media de las viabilidades calculadas, empleando la fórmula (15):

$$\overline{D_{Viab}} = \frac{\sigma_P}{\sqrt{n}} \quad (15)$$

La desviación determinada sería la correspondiente a los valores “en bruto”. Como se divide por la viabilidad en el control negativo, el error se propagaría siguiendo la ecuación de la fórmula (16). Como salvedad, ante la imposibilidad de realizar la operación matemática cuando la viabilidad a la concentración P es cero, se considera que la desviación resultante también es nula.

$$\overline{D_P} = \left| \overline{V_{P,A}} \right| \cdot \sqrt{\left(\frac{\overline{D_{Viab,P}}}{\overline{V_P}} \right)^2 + \left(\frac{\overline{D_{Viab,C}}}{\overline{V_C}} \right)^2} \quad (16)$$

Las diferentes $\overline{D_P}$ determinadas se suman y restan a las correspondientes viabilidades para calcular los intervalos de variación de éstas. Así, con las viabilidades máximas y mínimas se obtienen dos curvas dosis-respuesta adicionales que limitan el área en la cual puede encontrarse la curva real, y que se emplearán en la interpolación de las dosis letales 50% máxima y mínima; las cuales determinan el intervalo de confianza asociado al valor inicial calculado para este parámetro.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de Nemotoxicidad

Se ha evaluado la toxicidad de dieciséis selenoésteres en nematodos de la especie *Steinernema feltiae*. Con este fin se han expuesto nematodos a diferentes concentraciones de cada derivado para determinar la respectiva DL_{50} a las 24 horas, en base a las viabilidades observadas tras exponer los nematodos a las correspondientes diluciones. Al seleccionar los selenoésteres se busca evaluar derivados representativos de las diferentes series y subseries, pretendiendo realizar un screening entre las distintas estructuras presentadas en este trabajo. Asimismo, ante los datos bibliográficos que atribuyen propiedades nematicidas a productos azufrados²⁰⁶⁻²¹², se ha prestado especial atención a los selenoésteres que contienen átomos de azufre en el resto de la estructura.

Los valores de DL_{50} obtenidos en el ensayo de nemotoxicidad para los distintos selenoderivados y controles evaluados se recogen en la *Tabla 8.15*, donde los productos están agrupados en función tanto por series como de la naturaleza del resto R' presente en el selenoéster. En la *Figura 8.26* pueden compararse dichos valores. Finalmente, en el Anexo 2.C (*vid.* pág. 315) se tabulan los valores de la DL_{50} obtenidos y los intervalos de confianza calculados para los mismos en base a las variaciones experimentales.

Tabla 8.15: Evaluación de nemotoxicidad de los selenoésteres en Steinernema feltiae. Valores de las DL_{50} determinados.

Serie	Subserie	R' (DL_{50} en μM)			
		4-clorofenilo	Fenilo	Tienilo	Otros
I	I.A	53,75	-	144,4	-
	I.C	-	215,8	-	-
II	-	44,56	106,6	-	-
III	-	-	63,84	-	-
IV	IV.A	5,29	3,77	4,66	25,07
	IV.C	170,2	-	-	-
V	V.A	2,74	-	-	-
VI	VI.A	46,83	17,62	-	-
	VI.C	-	28,13	-	90,57
Control -	Ácido	389,8	> 1000	-	-
Control +	Tiabendazol	-	-	-	363,8

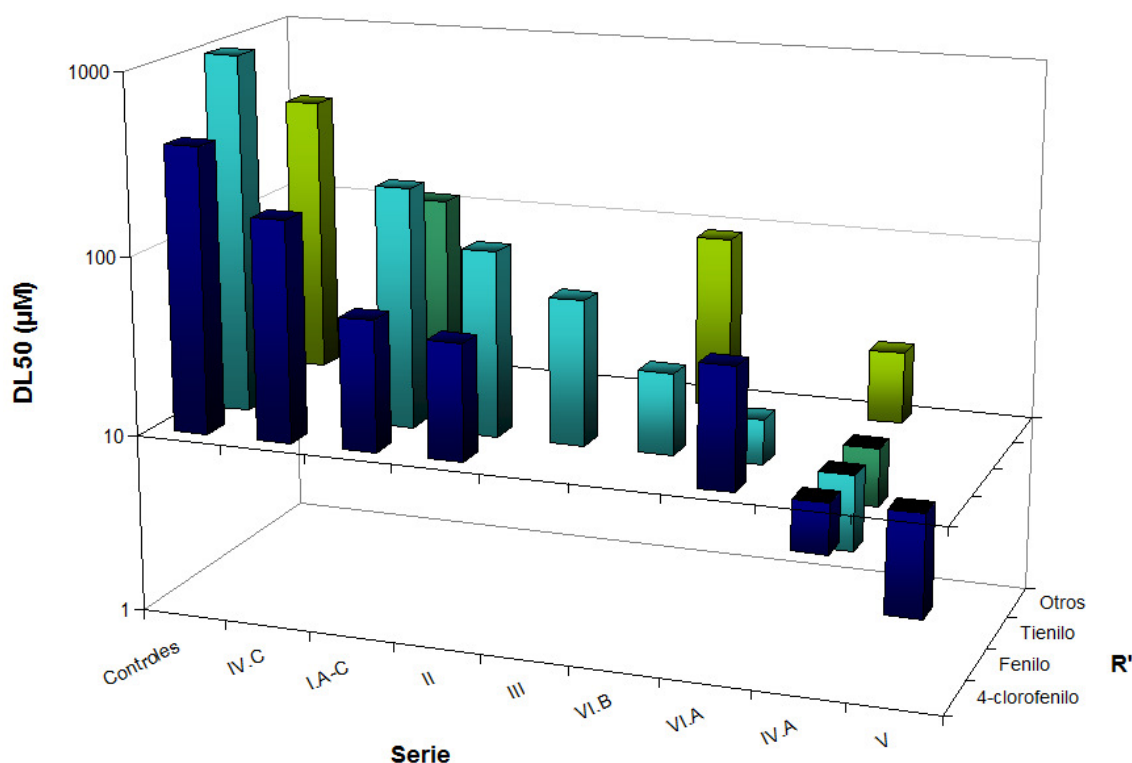


Figura 8.26: DL_{50} de los selenoésteres en *Steinernema feltiae*, agrupadas por series.

En la Figura 8.27 se muestran las curvas dosis-respuesta de selenoésteres de diferentes series, comparados con uno de los controles (ácido *p*-clorobenzoico). En ella se aprecia la variación de la actividad en función del tipo de selenoéster testado. En el Anexo 2.C (vid. págs. 325 y 326) pueden consultarse todas las curvas dosis-respuesta.

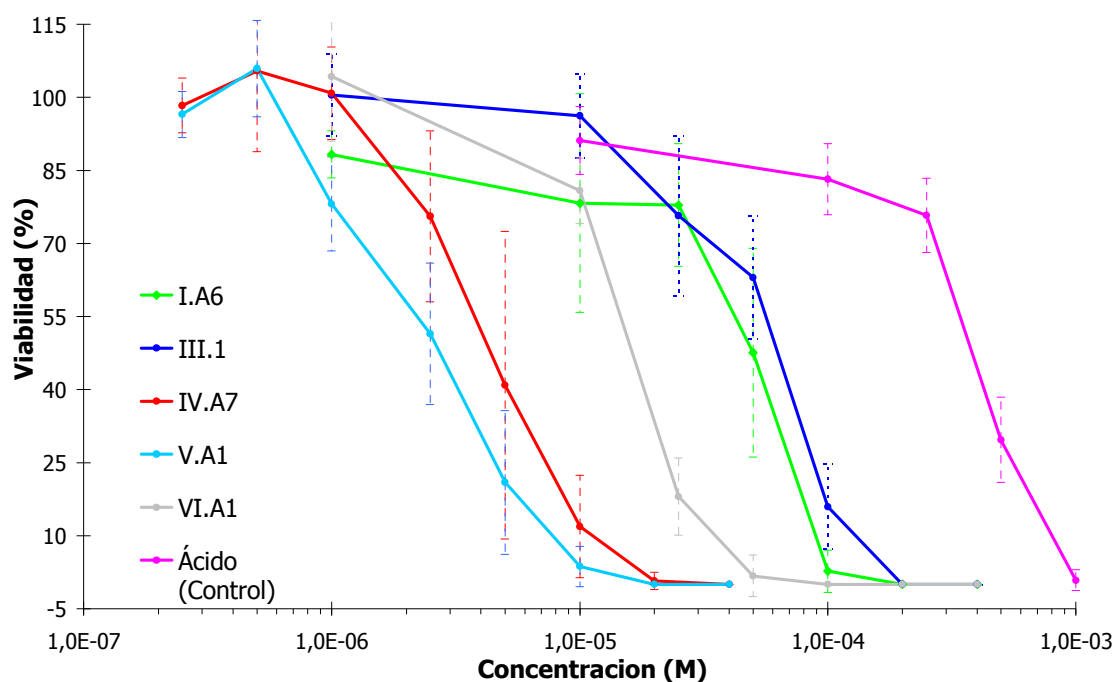


Figura 8.27: Curvas viabilidad-concentración de compuestos seleccionados.
Ensayos de nemotoxicidad

Debido al limitado número de selenoderivados evaluados, no se pueden extraer conclusiones generales. No obstante, analizando los datos se observa lo siguiente:

- Todos los selenoésteres evaluados, sin excepción, mejoran la actividad del tiabendazol, el compuesto testado como control positivo al tener, de acuerdo con la bibliografía, propiedades nematocidas²⁰⁶. Sin embargo, este resultado puede deberse a que dicho control actúa contra otros nematodos, como *Trichinella spiralis*, y no tiene el mismo efecto tóxico en la especie utilizada en este ensayo de nemotoxicidad (*Steinernema feltiae*).
- Los valores de DL₅₀ de los compuestos de las Series IV.A y V se encuentran en el rango micromolar de concentraciones, siendo el derivado V.A1 el más activo con un valor de DL₅₀ de 2,74 µM, lo que le convierte en un producto con una interesante actividad nematocida; aunque no es el único: los selenoésteres IV.A2, IV.A7 y IV.A4 presentan también valores de DL₅₀ notables. Los resultados de estos experimentos preliminares justificarían la realización de estudios más profundos de la acción de los selenoésteres líderes contra nematodos de interés clínico.
- Los selenoésteres evaluados tienen una nemotoxicidad significativamente mayor que los ácidos benzoico y *p*-clorobenzoico, los cuales contienen el mismo resto *R'* que la mayoría de los compuestos testados y carecen del átomo de selenio. Esta observación permite afirmar que la actividad de los selenoésteres reside en el fragmento que contiene selenio; hecho experimental que confirma la hipótesis que postula que los selenoderivados pueden tener actividad nematocida al igual que compuestos azufrados similares.
- El orden de actividad nemotóxica de los selenoésteres, a la vista de los resultados disponibles, sería: Serie V > Serie IV.A > Serie VI > Serie II / Serie III > Serie I > Serie IV.C. La inclusión de átomos de azufre dentro del resto *R'* no potencia la actividad nematocida de los selenoderivados, tal y como se deduce de la comparación de los valores obtenidos para los compuestos I.B1 y IV.A7 con los determinados para los restantes derivados de sus respectivas series.

IX. Conclusiones / Conclusions

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en lo referente al diseño, síntesis, caracterización fisicoquímica y evaluación de las actividades biológicas de los 51 nuevos selenoésteres presentados en este trabajo de investigación pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Puede afirmarse, de acuerdo con los datos proporcionados por las técnicas biológicas empleadas para evaluar la citotoxicidad y voltamétricas utilizadas para determinar las propiedades redox, que los selenoésteres muestran la actividad dual antiproliferativa y quimiopreventiva contra el cáncer predicha en la hipótesis.

2. La existencia de simetría molecular en las estructuras estudiadas conlleva en aquellos derivados que la poseen una mayor actividad antiproliferativa respecto a la determinada en sus equivalentes asimétricos.

3. Se encuentra que la actividad biológica tiende a aumentar cuanto menor sea la polaridad del resto alquílico unido al átomo de selenio del grupo de selenoéster.

4. El análisis de los compuestos mediante espectrometría de masas revela que el enlace más lábil presente en la molécula es el que une el átomo de selenio del selenoéster al carbono carbonílico.

5. Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad redox de los compuestos a través de la técnica de la voltametría cíclica muestran que los derivados analizados presentan una actividad redox destacada; siendo los potenciales de oxidación y reducción encontrados indicativos de la presencia de selenio aniónico. El mecanismo responsable de dicha actividad quimiopreventiva, según los datos proporcionados por los ensayos de la glutatión peroxidasa y del DPPH, no es ni la actividad peroxidasa ni la eliminación de radicales libres por parte de los selenoésteres; con lo cual sería necesaria la realización de experimentos adicionales para elucidar el mecanismo de la supuesta acción antioxidante de los derivados presentados en este trabajo.

6. Los selenoésteres, según los datos recogidos con la metodología del MTT, ejercen una acción citostática y/o citotóxica en función de la línea celular analizada y

del grupo funcional presente en el fragmento molecular enlazado al átomo de selenio. En términos generales se encuentra que la acción de los selenoderivados es predominantemente antiproliferativa; mostrando en cambio actividad citotóxica el *p*-clorobenzoselenoato de oxopropilo en las líneas celulares tumorales PC-3 (próstata) y HT-29 (colon), con valores de LC₅₀ por debajo de 10 μM; y los selenoésteres de metiloxicarbonilmetilo en células A549 (pulmón).

7. La actividad antiproliferativa de los tres compuestos con mayor potencia, siendo todos ellos diselenodiésteres de dimetilo, es de gran interés al caer los valores de IG₅₀ en el rango nanomolar para las cuatro líneas tumorales estudiadas con el procedimiento del MTT. De forma adicional, un cuarto diselenodiéster de dimetilo muestra una IG₅₀ en el rango nanomolar y otros dieciséis selenoésteres presentan valores de IG₅₀ por debajo de 10 μM en la línea celular PC-3, la estudiada con mayor profundidad al ser la seleccionada para los ensayos preliminares de citostaticidad y citotoxicidad.

8. Aunque la selectividad de los compuestos presentados en este trabajo es por lo general escasa o nula, se observa que dos de los cuatro diselenodiésteres de dimetilo que presentan valores de IG₅₀ por debajo de 1 μM en la línea tumoral PC-3 poseen valores para dicho parámetro entre 3 y 7 veces superiores en RWPE-1, la línea celular no tumoral de próstata utilizada en los ensayos de selectividad. La conjunción de actividad antiproliferativa y selectividad en estos derivados simétricos los convierten en un excelente punto de partida de posteriores investigaciones que profundicen en el estudio de la actividad antiproliferativa derivada de la variación estructural de los mismos.

9. En la evaluación de citotoxicidad de una selección de selenoésteres siguiendo la metodología del cristal violeta se encuentra que poseen una actividad notable al presentar la mayoría de los dieciséis derivados evaluados valores de IC₅₀ por debajo de 10 μM en las diferentes líneas testadas. Este hecho experimental permite descartar que los resultados determinados con la metodología del MTT puedan deberse a falsos positivos debidos a interacciones redox indeseadas entre el átomo de selenio y el reactivo del MTT.

10. Los derivados evaluados en los ensayos de nemotoxicidad presentan una actividad nemotóxica destacada al mejorar todos los compuestos evaluados la acción del tiabendazol, empleado como referencia positiva, y al mostrar cuatro de ellos valores de DL₅₀ por debajo de 10 μM. Estos resultados sugieren que los selenoésteres pueden tener potenciales aplicaciones nematicidas.

Por todo lo cual, consideramos elevada a Tesis la hipótesis de partida de este trabajo de investigación.

CONCLUSIONS

After a deep analysis of the results determined regarding the design, synthesis, physicochemical characterisation and evaluation of the biological activity of the fifty one novel selenoesters presented in this research study, the following conclusions can be drawn:

1. According to the data given by the biological and electrochemical techniques used to evaluate the cytotoxicity and to determine the redox properties, respectively, it can be stated that selenoesters show the dual antiproliferative and chemopreventive activity against cancer predicted in the Hypothesis.
2. The existence of symmetric elements in the molecular structures studied increases the antiproliferative activity of the derivatives that include these elements, in comparison with the one determined in the asymmetrical equivalent structures.
3. It is found that biological activity tends to increase when the polarity of the alkyl moiety bounded to the selenium atom of the selenoester group diminishes.
4. The analysis of the compounds through mass spectrometry points that the weakest bound present in the molecule is the one between the selenium atom of the selenoester and the carbonyl carbon atom.
5. Results available after the study of the redox activity of the selenoesters using the cyclic voltammetry technique indicate that the selenium derivatives are easily involved in reductive-oxidative reactions. Besides, the oxidation and reduction potentials determined point to the presence of anionic selenium species. Nevertheless, the mechanism of the aforesaid chemopreventive activity is neither the peroxidase activity nor the free radical scavenging properties of the selenoesters; according to the data obtained from the glutathione peroxidase and DPPH assays, respectively. Therefore, it is required the planning and performance of additional experiments to know the mechanism responsible of the supposed antioxidant properties of the selenocompounds presented in this research work.
6. Selenoesters show a cytostatic and/or cytotoxic activity dependent of the cell line analyzed and the functional group present in the molecular fragment bounded to

the selenium atom of the selenoester; according to the data given by the MTT assays. It is found that the biological activity of the compounds is predominantly antiproliferative, although certain selenoesters behave as cytotoxic compounds, as the oxopropyl 4-chlorobenzoselenoate, which have interesting LC_{50} values below $10\ \mu\text{M}$ in the PC-3 (prostate) and HT-29 (colon) cells; and the methyloxycarbonylmethyl selenoesters, less cytotoxic but with a noteworthy potency in A549 cells (lung).

7. The antiproliferative activity of the three most potent compounds, being all them dimethyl diselenodiester, is very promising for laying the IG_{50} values in nanomolar order in the four cancer cell lines studied through the MTT method. Furthermore, a fourth dimethyl diselenoester shows a IG_{50} value in nanomolar order and sixteen additional selenoesters present IG_{50} values below $10\ \mu\text{M}$ in PC-3 cancer cell line, the one more-in-depth studied for being selected as the working cell line in the preliminary determinations of cytostaticity and cytotoxicity of the selenoesters.

8. Despite the lower or null overall selectivity of the compounds presented in this work, it is observed that two of the four dimethyl diselenodiester that show IG_{50} values in nanomolar order in the PC-3 prostate cancer cell line have values for this parameter in RWPE-1, the non-tumoral prostate cell line utilized in selectivity assays, between 3 and 7 folds higher than in PC-3 cells. Consequently, the cytostatic potency and selectivity of these symmetrical derivatives is enough to justify their use as starting molecules in further researches that study more-in-depth the antiproliferative activity of the abovementioned selenoesters and structural variants of them.

9. It is found in the cytotoxicity evaluation of a selection of selenoesters following the crystal violet methodology that they possess a remarkable activity: most of the sixteen derivatives evaluated present IC_{50} values below $10\ \mu\text{M}$ in the different cell lines assayed. So, this experimental fact confirms the results determined through the MTT procedure in an independent way, making then less probable that the selenoesters activity might be a false positive caused by an undesired redox interaction between the MTT reagent and the selenium atom.

10. The derivatives evaluated in the nemotoxicity assays show an interesting nemotoxic activity for improving all the compounds evaluated the behaviour of thiabendazole, used as positive control. Moreover, four derivatives have DL_{50} values below $10\ \mu\text{M}$. Consequently, aforementioned results suggest that selenoesters may have potential nematocidal applications.

All these conclusions allow us to state that the hypothesis that inspires this research work can be considered a Thesis.

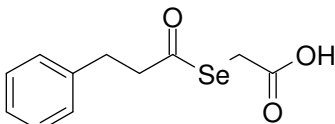
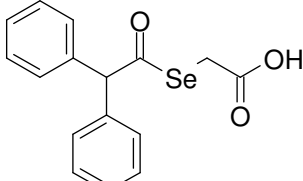
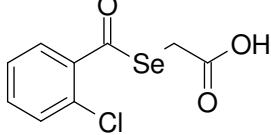
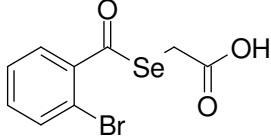
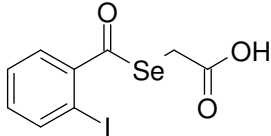
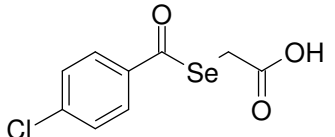
X. Anexos

X. ANEXOS

1. SÍNTESIS QUÍMICA

Relación de Productos Sintetizados

Tabla 10.1: Referencia, nombre químico y estructura de los selenoésteres sintetizados.

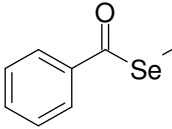
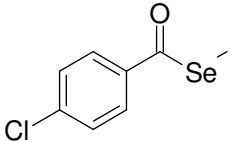
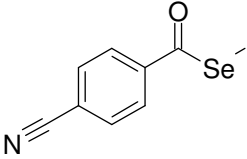
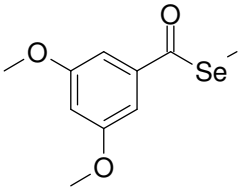
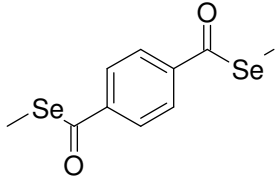
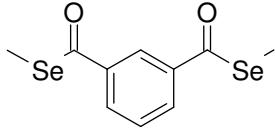
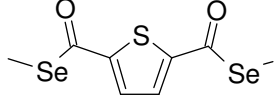
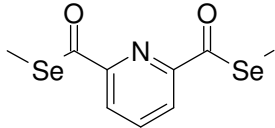
SERIE I		
<i>I.A Fenil/alquilselenoésteres de carboximetilo</i>		
IA1	3-Fenilpropanoselenoato de carboximetilo	
IA2	Difeniletanoselenoato de carboximetilo	
IA3	2-Clorobenzoselenoato de carboximetilo	
IA4	2-Bromobenzoselenoato de carboximetilo	
IA5	2-Yodobenzoselenoato de carboximetilo	
IA6	4-Clorobenzoselenoato de carboximetilo	

I.A7	4-Terc-butilbenzoselenoato de carboximetilo	
I.A8	4-Metoxibenzoselenoato de carboximetilo	
I.A9	3,4,5-Trimetoxibenzoselenoato de carboximetilo	
I.A10	3,4-Metilendioxibenzoselenoato de carboximetilo	
I.B Heteroarilselenoésteres de carboximetilo		
I.B1	2-Tiofencarbosenolato de carboximetilo	
I.B2	4-Piridincarbosenolato de carboximetilo	
I.B3	3- Piridincarbosenolato de carboximetilo	
I.B4	2-Tiopropil-3-piridincarbosenolato de carboximetilo	
I.B5	Pirazincarbosenolato de carboximetilo	
I.B6	2-Quinolincarbosenolato de carboximetilo	

I.B7	3-Quinolincarboselenolato de carboximetilo	
<i>I.C Selenoésteres de 1/2-carboxietilo</i>		
I.C1	Benzoselenoato de 1-carboxietilo	
I.C2	Feniletanoselenoato de 2-carboxietilo	
<i>I.D Selenoésteres de carboxifenilmetilo</i>		
I.A11	Feniletanoselenoato de carboxifenilmetilo	
SERIE II Selenoésteres de carbamoilmetilo		
II.1	Feniletanoselenoato de carbamoilmetilo	
II.2	Benzoselenoato de carbamoilmetilo	
II.3	4-Clorobenzoselenoato de carbamoilmetilo	
II.4	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de carbamoilmetilo	
SERIE III Selenoanhídridos		
III.1	Benzo-[b]-selenofen-1,3-diona	

SERIE IV		
<i>IV.A Selenoésteres de metiloxicarbonilalquilo</i>		
IV.A1	Feniletanoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A2	Benzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A3	2-Clorobenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A4	4-Clorobenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A5	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A6	3,4,5-Trimetoxibenzoselenoato de metiloxicarbonilmetilo	
IV.A7	2-Tiofencarboselenolato de metiloxicarbonilmetilo	
<i>IV.B Selenoésteres de terc-butiloxicarbonilmetilo</i>		
IV.B1	Feniletanoselenoato de <i>terc</i> -butiloxicarbonilmetilo	
IV.B2	Benzoselenoato de <i>terc</i> -butiloxicarbonilmetilo	

IV.B3	4-Clorobenzoselenoato de <i>tert</i> -butiloxicarbonilmetilo	
IV.B4	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de <i>tert</i> -butiloxicarbonilmetilo	
IV.C Selenoésteres de feniloxicarbonilmetilo		
IV.C1	Benzoselenoato de feniloxicarbonilmetilo	
IV.C2	4-Clorobenzoselenoato de feniloxicarbonilmetilo	
IV.C3	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de feniloxicarbonilmetilo	
IV.D Selenoésteres de carboxifenilmetilo		
IV.D1	Feniletanoselenoato de 2-metiloxicarboniletilo	
SERIE V Selenoésteres de acilalquilo		
V.A1	4-Clorobenzoselenoato de oxopropilo	
V.B1	4-Clorobenzoselenoato de 3,3-dimetil- -2-oxobutilo	
V.B2	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de 3,3-dimetil- -2-oxobutilo	

SERIE VI		
<i>VI.A Selenoésteres de metilo</i>		
VI.A1	Benzoselenoato de metilo	
VI.A2	4-Clorobenzoselenoato de metilo	
VI.A3	4-Cianobenzoselenoato de metilo	
VI.A4	3,5-Dimetoxibenzoselenoato de metilo	
<i>VI.B Diselenodiésteres de dimetilo</i>		
VI.B1	Benceno-1,4-dicarboselenolato de dimetilo	
VI.B2	Benceno-1,3-dicarboselenolato de dimetilo	
VI.B3	Tiofen-2,5-dicarboselenolato de dimetilo	
VI.B4	Piridin-2,6-dicarboselenolato de dimetilo	

2. VALORACIONES DE ACTIVIDAD

A. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD:

1. Método del MTT

Líneas celulares empleadas

Las Figuras 10.1-10.5 muestran imágenes de las líneas celulares empleadas en los ensayos realizados siguiendo la metodología del MTT. Las fotografías se han tomado de las fichas del catálogo de líneas celulares de la página web de la ATCC (American Type Culture Collection) ²³¹.

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**

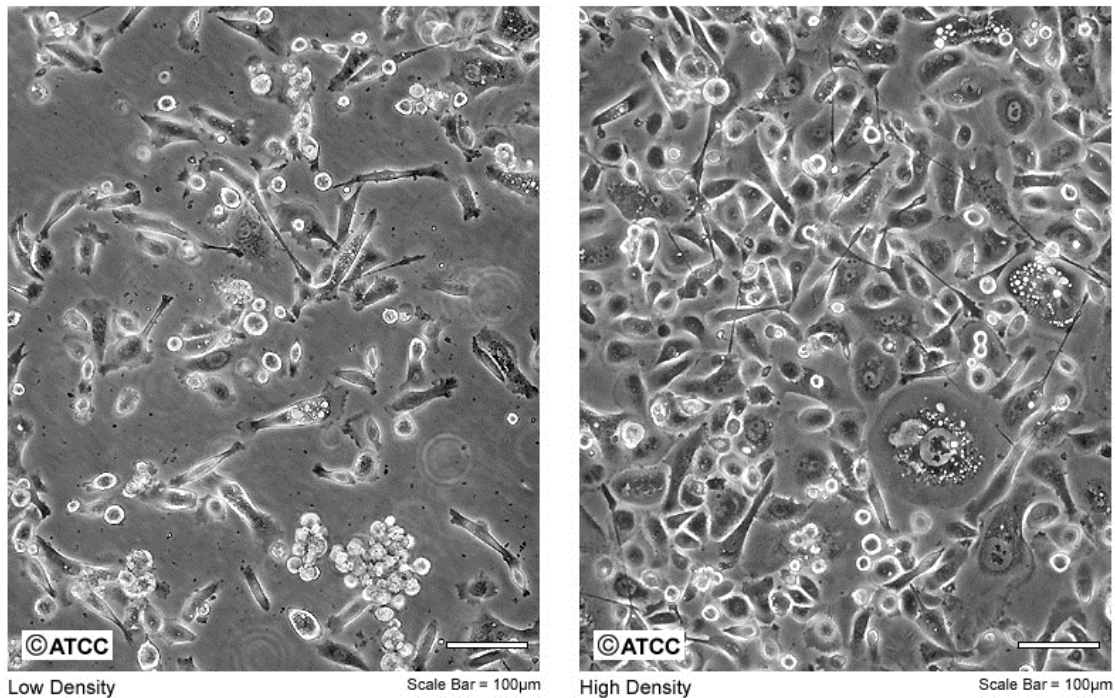


Figura 10.1: Células de la línea celular PC-3 en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **CRL-11609**
Designation: **RWPE-1**

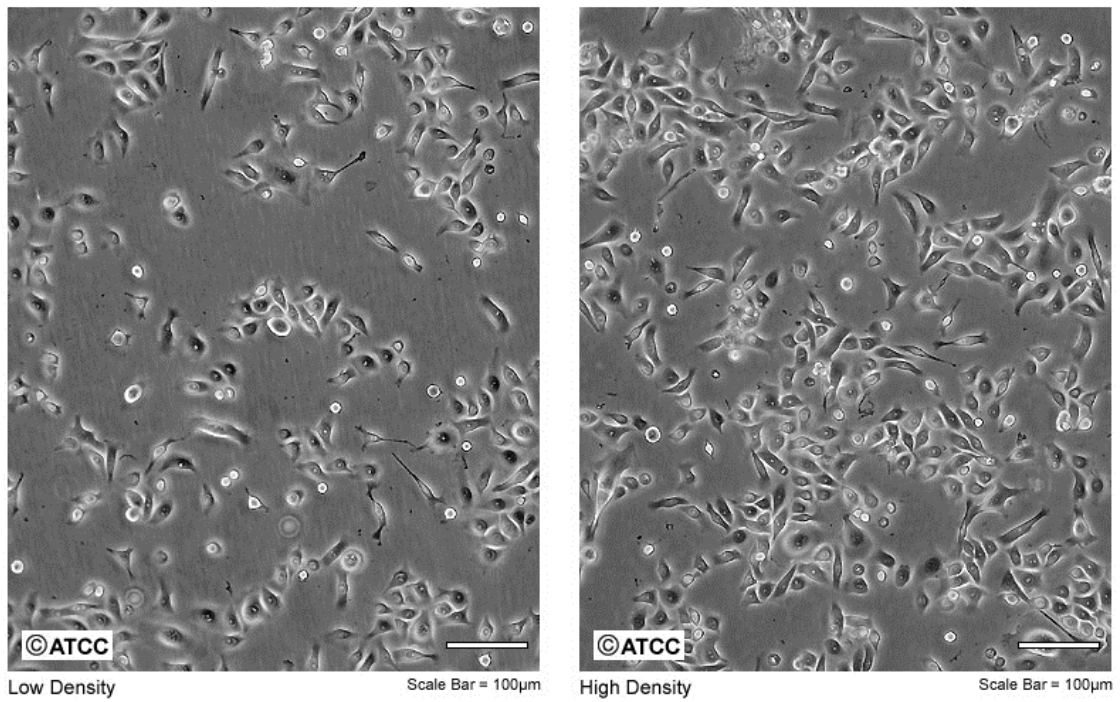


Figura 10.2: Células de la línea celular RWPE-1 en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**

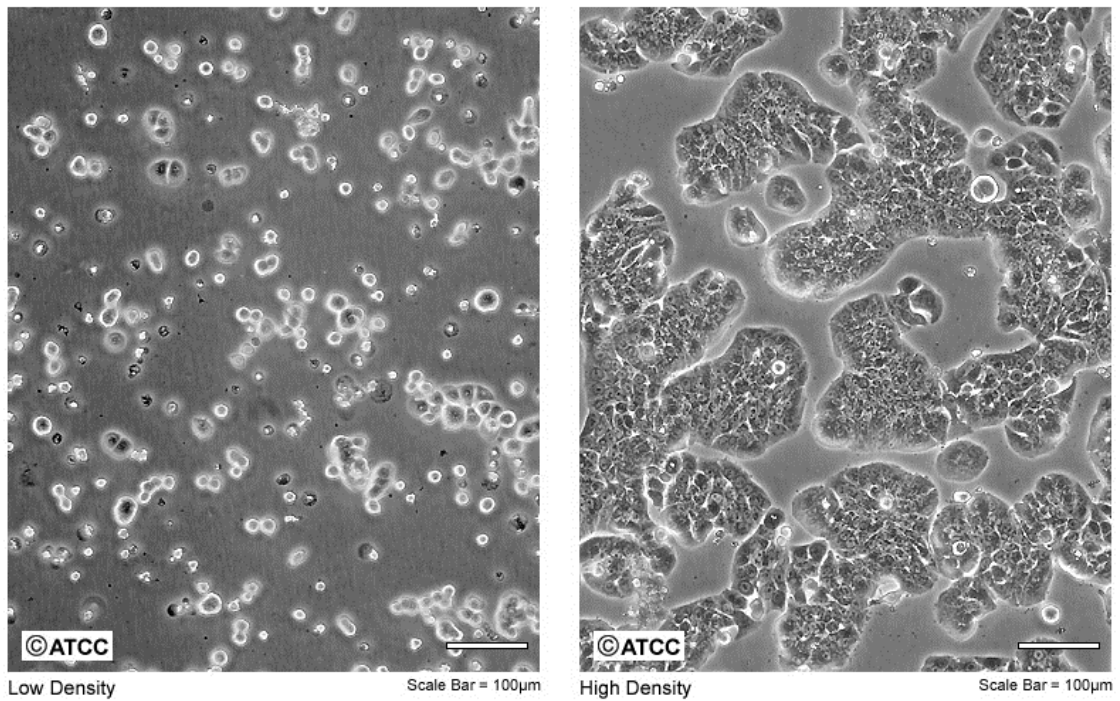


Figura 10.3: Células de la línea celular HT-29 en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**

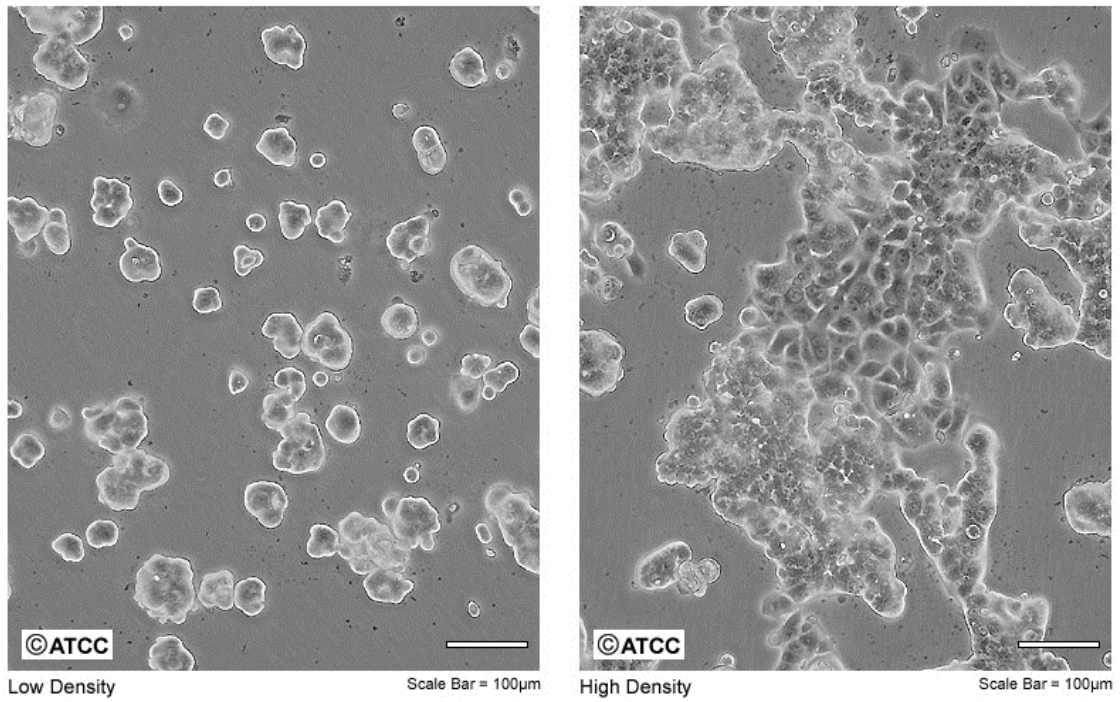


Figura 10.4: Células de la línea celular MCF-7 en cultivo²³¹.

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**

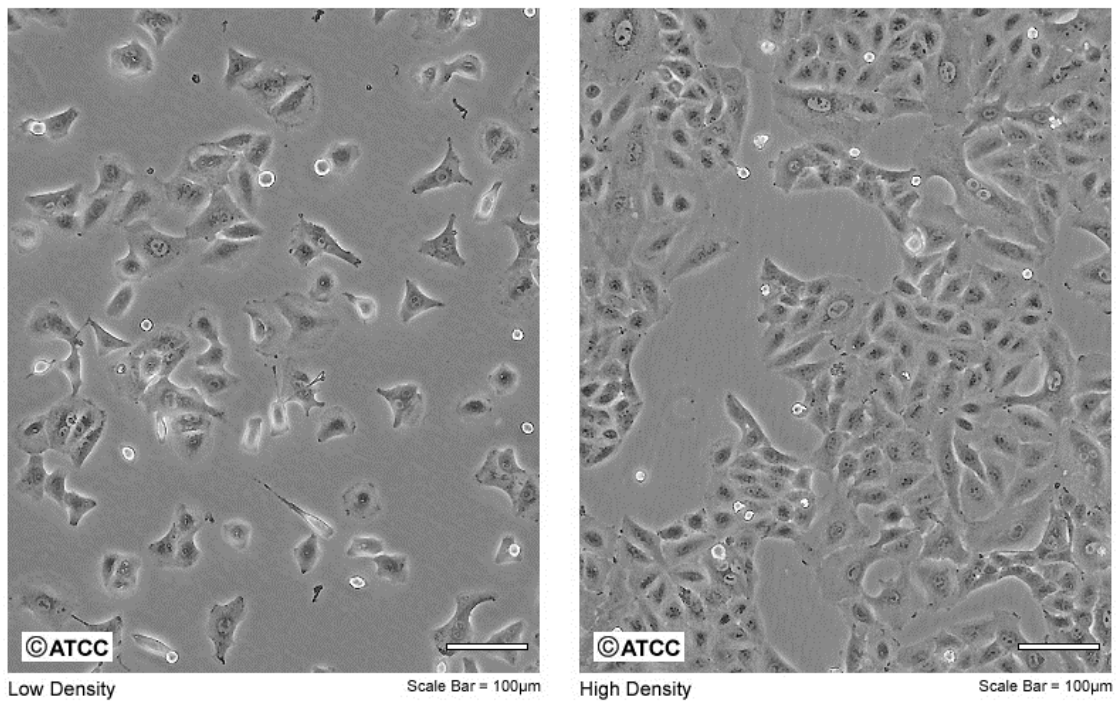


Figura 10.5: Células de la línea celular A549 en cultivo²³¹.

Curvas dosis-respuesta. Ensayos de citotoxicidad-selectividad

A continuación se adjuntan las curvas dosis-respuesta de los selenoésteres cuya actividad se ha evaluado en varias líneas celulares en el CIMA (Figuras 10.6-10.18).

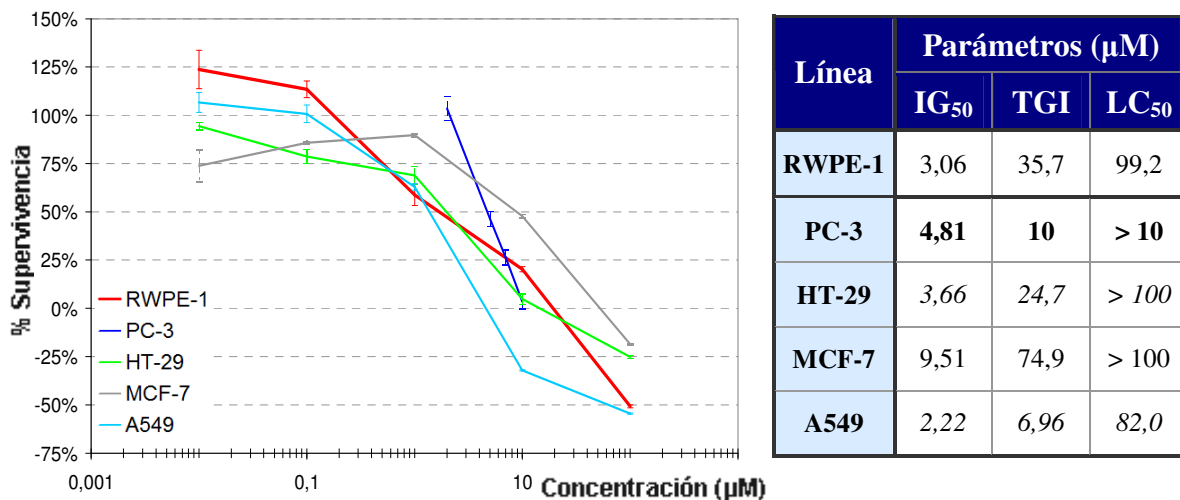


Figura 10.6: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A1

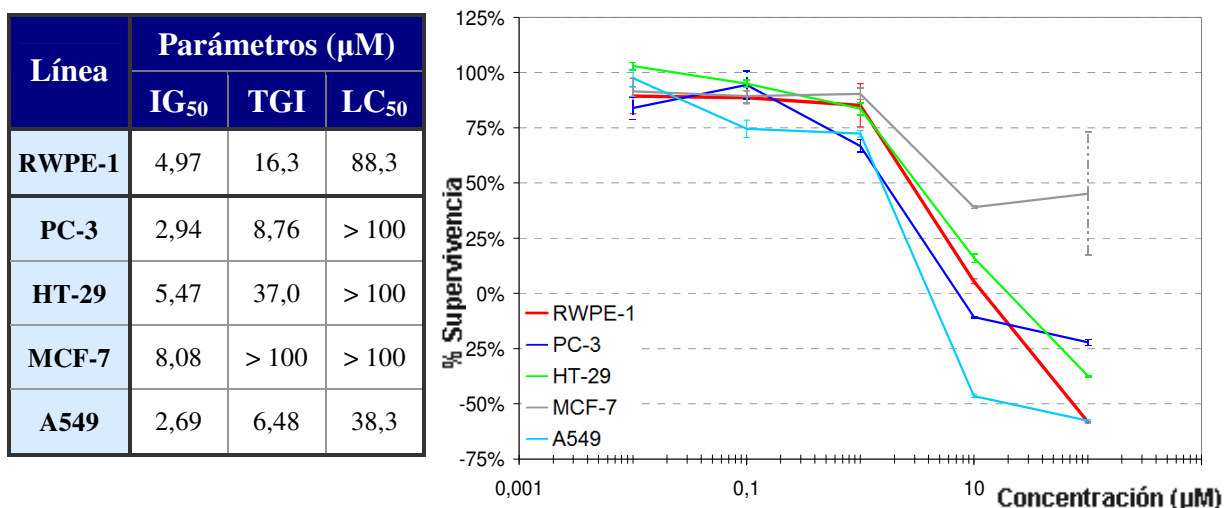


Figura 10.7: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A2

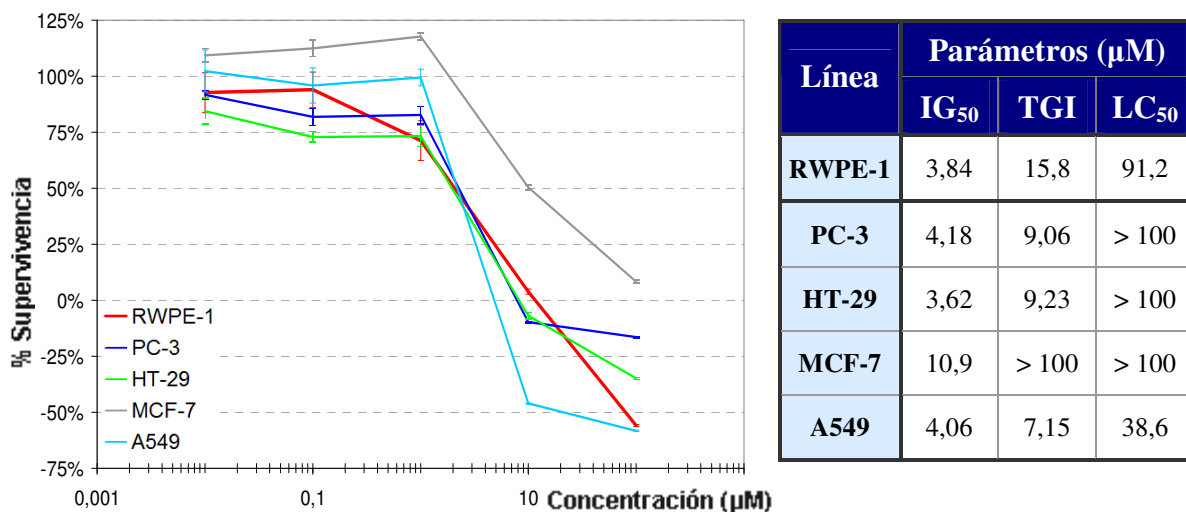


Figura 10.8: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A3

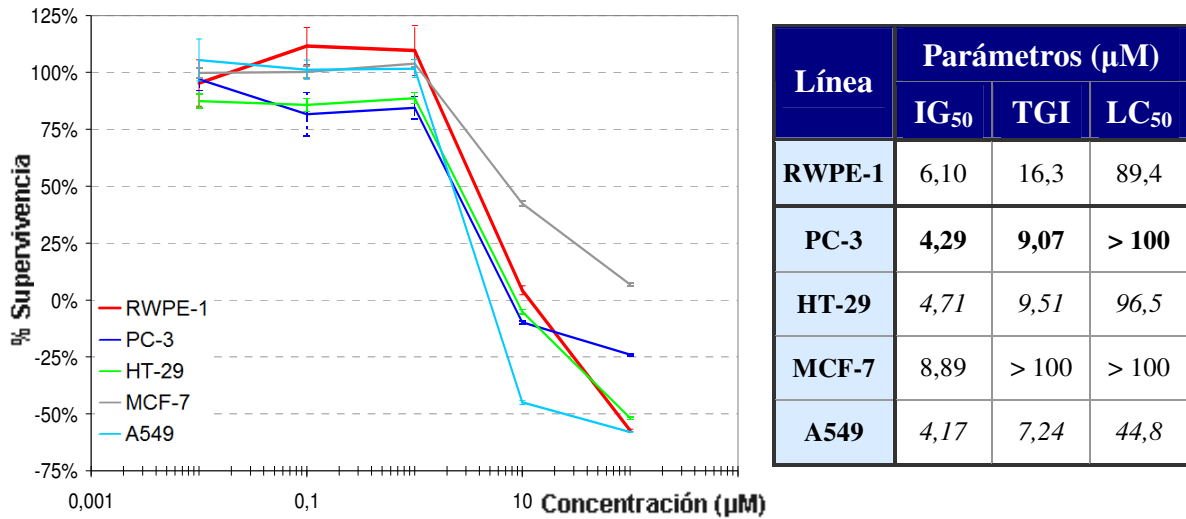


Figura 10.9: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A5

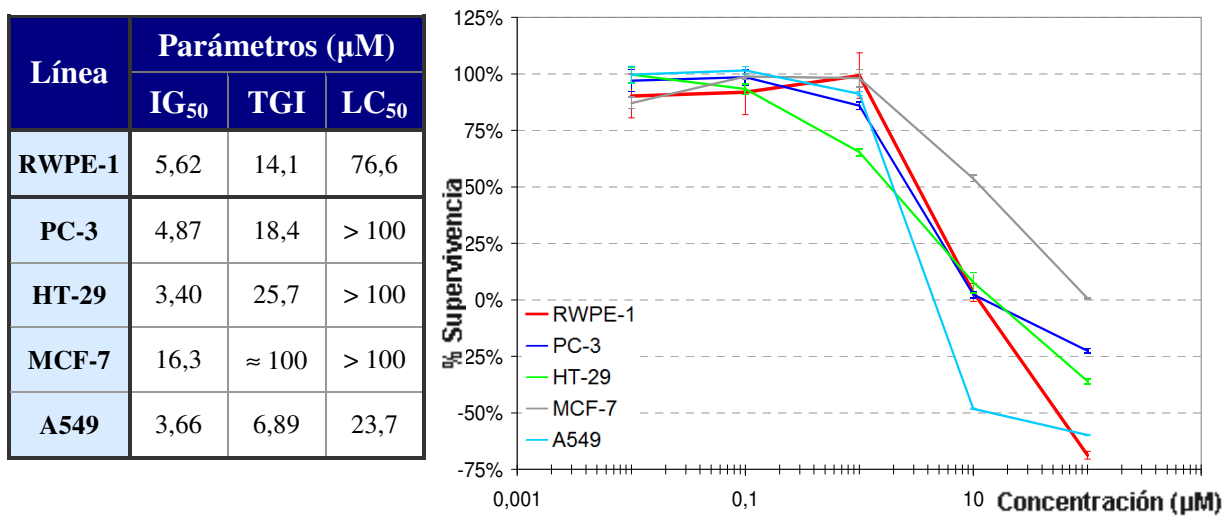


Figura 10.10: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A7

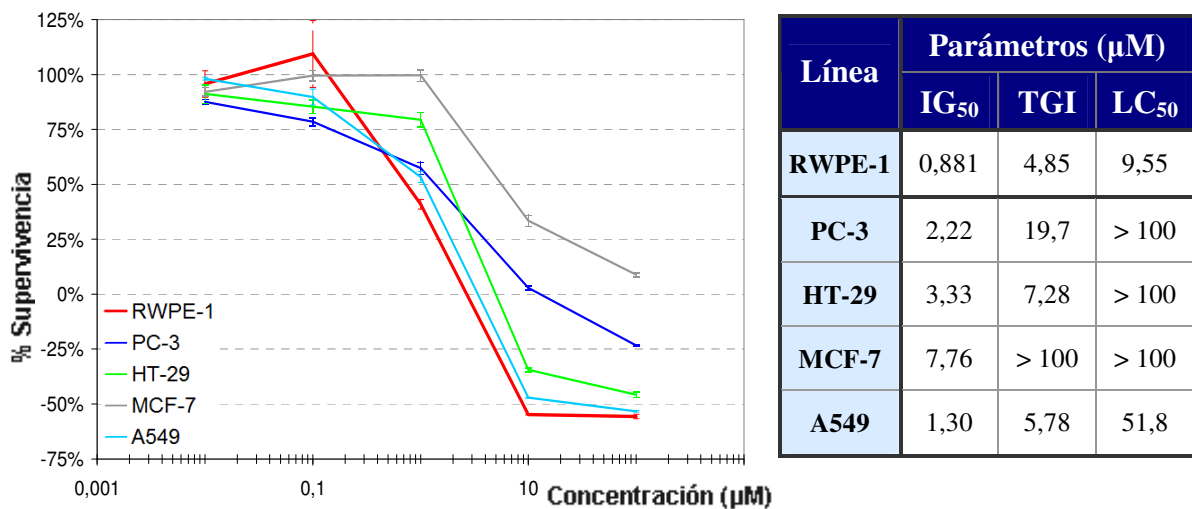


Figura 10.11: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.D1

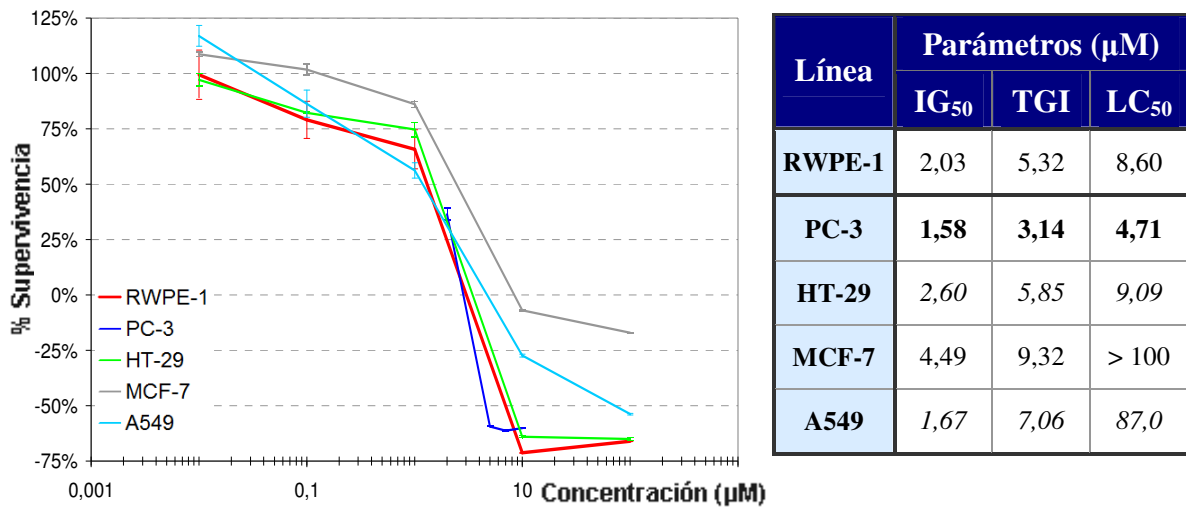


Figura 10.12: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.A1

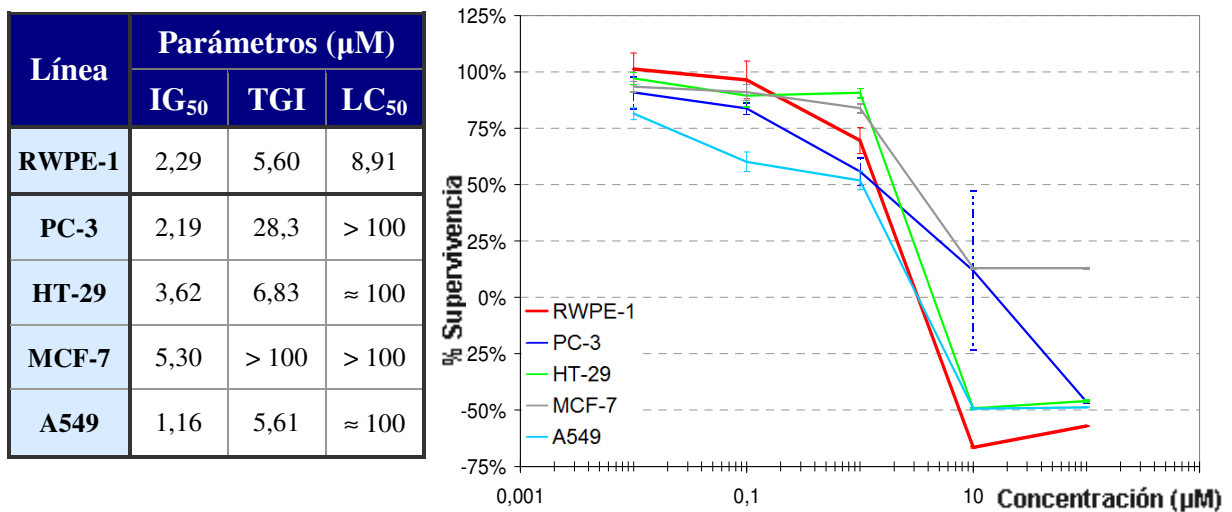


Figura 10.13: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.B1

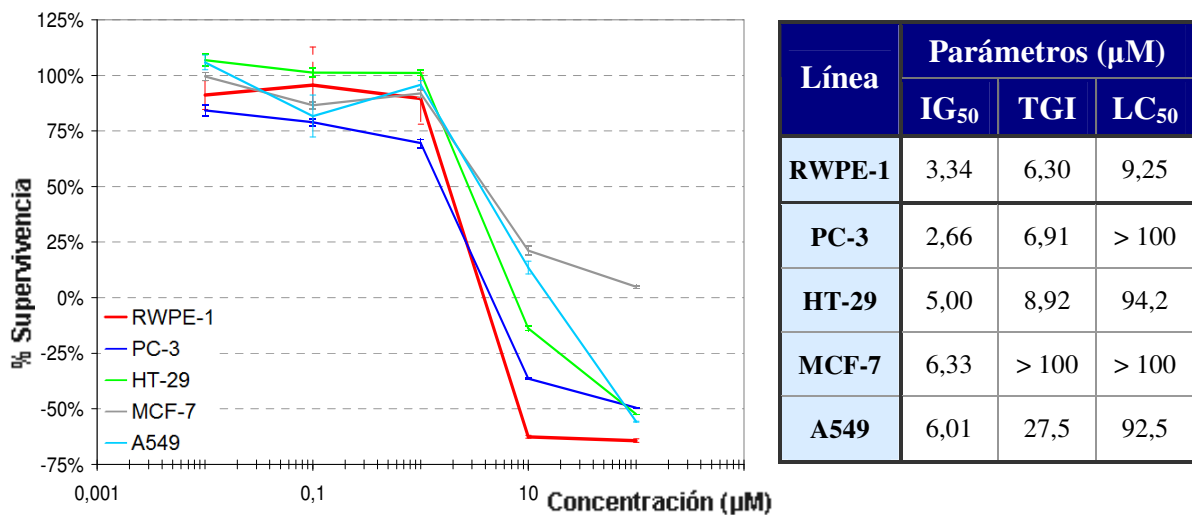


Figura 10.14: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.B2

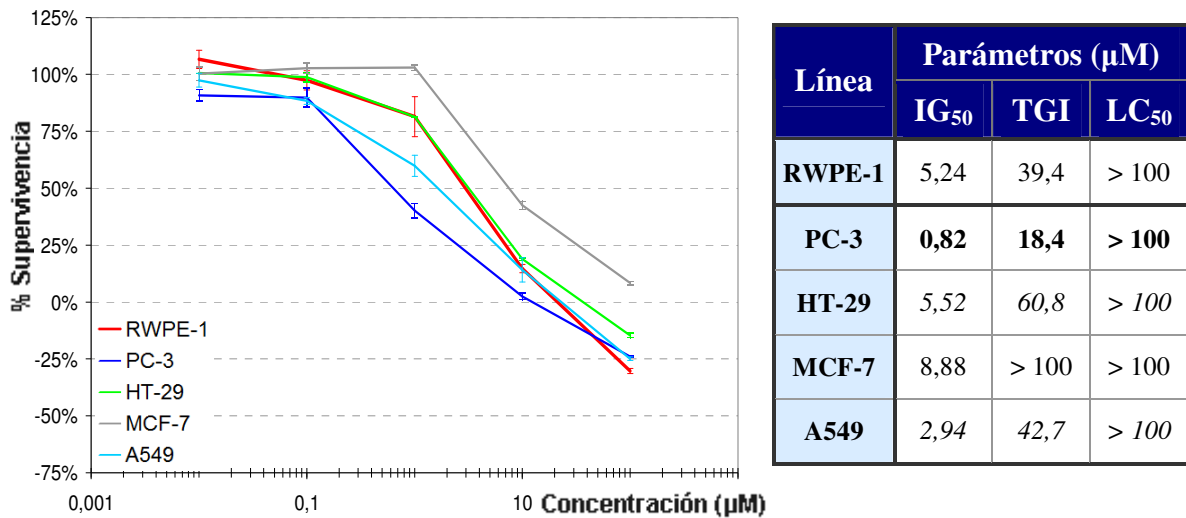


Figura 10.15: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.B1

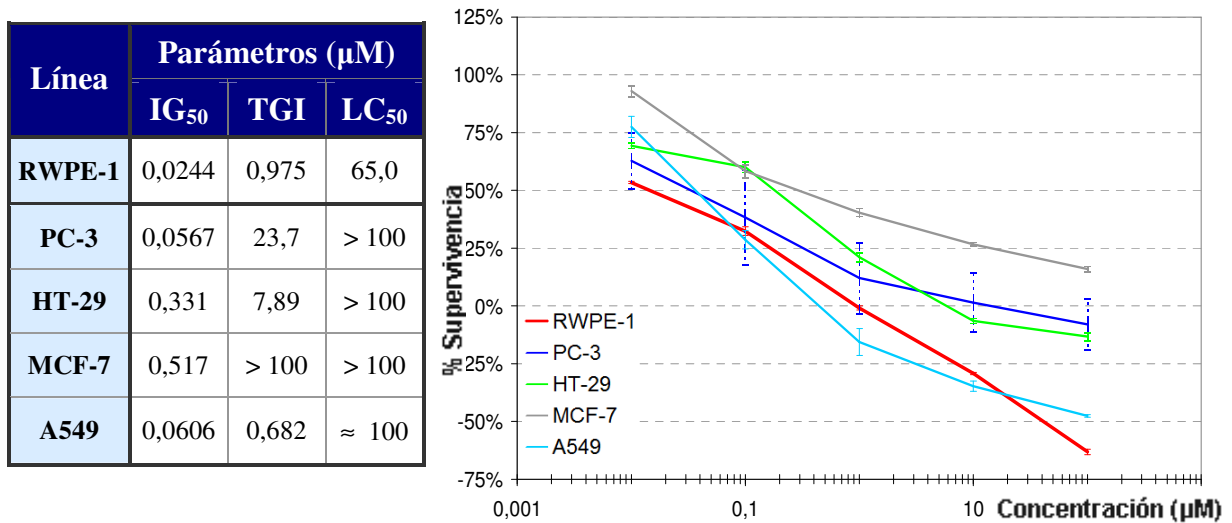


Figura 10.16: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.B2

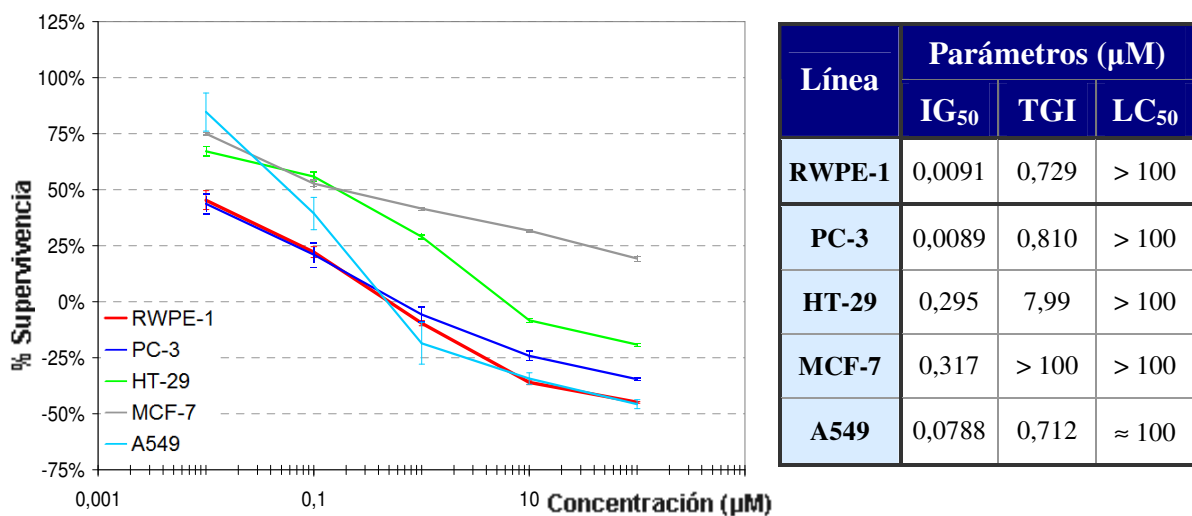


Figura 10.17: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.B3

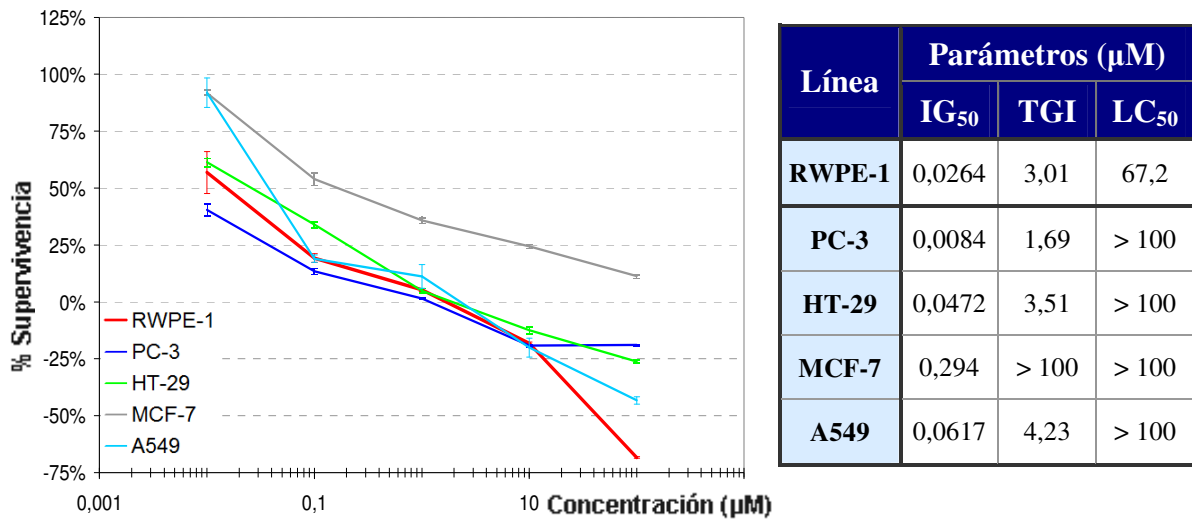


Figura 10.18: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.B4

Valores de confianza de los parámetros calculados

En los ensayos de citotoxicidad realizados en CIMA de la Universidad de Navarra se han obtenido para cada concentración ensayada las correspondientes desviaciones típica y media respecto de la media. Con ellas, a la hora de determinar por extrapolación cada uno de los correspondientes parámetros citostáticos y citotóxicos (IC_{50} , IG_{50} , TGI, DL_{50}) se ha calculado además el intervalo de confianza asociado al mismo, considerando las desviaciones de los valores empleados en la interpolación, tal y como se ha expuesto en la correspondiente sección de material y métodos en el capítulo de las Valoraciones de Actividad.

A continuación se muestran en las *Tablas 10.2-10.11* los intervalos de confianza para cada uno de los parámetros calculados, completando los datos mostrados en el apartado “Valoraciones de Actividad. A, Evaluación de Citotoxicidad, Método del MTT” (*vid.* págs. 206-220). Por motivos de organización, los datos se ordenan en dos tablas por cada línea celular: una primera para la IC_{50} y una segunda para los restantes parámetros. En las tablas correspondientes a la línea PC-3 se omiten los resultados de la *Serie I*, al realizarse dichos ensayos por la metodología antigua (concentraciones de 0, 2, 5, 7 y 10 μM) y sin placa a tiempo cero.

Tabla 10.2: Valores de las IC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular PC-3.

Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza
I.C1	> 100	-	IV.B3	91,9	85,3 - 98,8
I.C2	> 100	-	IV.B4	45,3	43,5 - 47,0
I.D1	55,9	49,1 - 64,0	IV.C1	8,10	7,21 - 9,09
II.1	55,4	50,3 - 60,4	IV.C2	8,48	7,97 - 8,99
II.2	66,0	63,7 - 68,3	IV.C3	49,1	43,8 - 53,8
II.3	82,3	75,2 - 89,0	IV.D1	5,40	4,63 - 6,14
II.4	20,9	18,6 - 23,1	V.A1	2,27	2,13 - 2,39
III.1	13,0	10,5 - 15,4	V.B1	4,68	3,41 - 6,95
IV.A1	6,59	6,18 - 7,06	V.B2	5,02	4,75 - 5,28
IV.A2	4,33	4,11 - 4,55	VI.A1	46,4	35,8 - 57,7
IV.A3	5,46	5,22 - 5,71	VI.A2	9,81	9,36 - 13,8
IV.A4	18,0	15,6 - 20,5	VI.A3	30,1	22,9 - 36,9
IV.A5	5,61	5,40 - 5,81	VI.A4	53,2	46,3 - 59,8
IV.A6	7,11	6,70 - 7,52	VI.B1	0,968	0,916 - 1,28
IV.A7	5,79	5,54 - 6,06	VI.B2	0,0884	0,0671 - 0,2092
IV.B1	69,4	64,1 - 74,8	VI.B3	0,0847	0,0615 - 0,1675
IV.B2	74,4	68,4 - 80,2	VI.B4	0,0383	0,0244 - 0,0515

Tabla 10.3: Valores de las IG_{50} , TGI y LC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular PC-3.

Ref.	IG_{50} (μ M)	Intervalo confianza	TGI (μ M)	Intervalo confianza	LC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
I.C1	46,5	35,4 - 57,0	> 100	-	> 100	-
I.C2	> 100	-	> 100	-	> 100	-
I.D1	32,4	29,1 - 35,8	76,5	72,1 - 81,0	> 100	-
II.1	35,7	32,4 - 38,8	> 100	-	> 100	-
II.2	46,3	44,0 - 48,5	97,6	96,0 - 99,1	> 100	-
II.3	41,0	34,7 - 46,6	\approx 100	98,4 - > 100	> 100	-
II.4	6,36	4,72 - 7,81	70,6	69,4 - 71,7	> 100	-
III.1	7,91	7,55 - 8,24	79,7	78,9 - 80,4	> 100	-
IV.A1	4,81	4,69 - 4,93	\approx 10	9,97 - > 10	> 100	-
IV.A2	2,94	2,82 - 3,06	8,76	8,71 - 8,80	> 100	-
IV.A3	4,18	4,04 - 4,32	9,06	9,01 - 9,10	> 100	-
IV.A4	9,10	9,02 - 9,18	74,0	73,2 - 74,7	> 100	-
IV.A5	4,29	4,15 - 4,42	9,07	9,02 - 9,11	> 100	-
IV.A6	7,11	5,61 - 5,39	57,3	56,2 - 58,7	> 100	-
IV.A7	4,87	4,77 - 4,96	18,4	16,4 - 20,3	> 100	-
IV.B1	43,6	40,6 - 46,3	> 100	-	> 100	-
IV.B2	45,2	40,6 - 49,4	> 100	-	> 100	-
IV.B3	63,7	60,0 - 67,3	> 100	-	> 100	-
IV.B4	27,0	25,0 - 28,9	77,7	76,7 - 78,7	> 100	-
IV.C1	6,38	5,94 - 6,82	79,4	77,5 - 81,2	> 100	-
IV.C2	6,86	6,59 - 7,13	82,7	81,6 - 83,7	> 100	-
IV.C3	36,6	32,5 - 40,3	99,2	98,8 - 99,6	> 100	-
IV.D1	2,22	1,72 - 2,68	19,7	16,3 - 23,4	> 100	-
V.A1	1,58	1,53 - 1,62	3,14	3,06 - 3,23	4,71	4,57 - 4,86
V.B1	2,19	1,47 - 3,49	28,3	9,45 - 43,5	> 100	-
V.B2	2,66	2,49 - 2,83	6,91	6,73 - 7,09	> 100	-
VI.A1	13,0	8,71 - 18,0	> 100	-	> 100	-
VI.A2	8,58	8,33 - 8,81	71,3	70,3 - 72,3	> 100	-
VI.A3	14,4	11,0 - 17,6	71,3	69,9 - 72,6	> 100	-
VI.A4	36,3	32,4 - 39,8	77,4	75,8 - 78,8	> 100	-
VI.B1	0,822	0,794 - 0,848	18,4	16,8 - 20,0	> 100	-
VI.B2	0,0567	0,0382 - 0,0787	23,7	7,71 - 58,5	> 100	-
VI.B3	0,00887	0,0078 - 0,0098	0,810	0,676 - 0,925	> 100	-
VI.B4	0,00839	0,0080 - 0,0088	1,69	1,45 - 1,93	> 100	-

Tabla 10.4: Valores de las IC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular RWPE-1.

Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza
II.4	6,78	5,55 - 8,04	IV.C2	8,83	7,95 - 9,61
III.1	50,6	26,1 - 74,5	IV.D1	1,53	0,883 - 3,45
IV.A1	6,13	4,18 - 7,87	V.A1	3,92	2,75 - 5,01
IV.A2	6,21	5,60 - 6,77	V.B1	4,29	2,80 - 5,77
IV.A3	5,34	4,46 - 6,12	V.B2	5,42	4,27 - 6,53
IV.A4	15,4	8,37 - 33,2	VI.A2	46,5	34,1 - 61,8
IV.A5	7,13	6,46 - 7,78	VI.B1	7,91	6,22 - 9,37
IV.A6	30,4	14,3 - 44,9	VI.B2	0,740	0,456 - 1,00
IV.A7	6,74	5,64 - 7,99	VI.B3	0,425	0,0452 - 2,45
IV.C1	8,47	7,26 - 9,81	VI.B4	0,952	0,0112 - 7,44

Tabla 10.5: Valores de las IG_{50} , TGI y LC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular RWPE-1.

Ref.	IG_{50} (μM)	Intervalo confianza	TGI (μM)	Intervalo confianza	LC_{50} (μM)	Intervalo confianza
II.4	5,76	5,01 - 6,37	36,0	26,5 - 48,0	> 100	-
III.1	28,9	14,5 - 40,0	> 100	-	> 100	-
IV.A1	3,06	1,78 - 4,08	35,7	32,6 - 39,2	99,2	93,3 - > 100
IV.A2	4,97	4,47 - 5,40	17,7	16,3 - 19,3	88,3	83,3 - 93,8
IV.A3	3,84	3,18 - 4,40	15,8	14,3 - 17,5	91,2	85,8 - 97,1
IV.A4	8,60	7,26 - 9,72	55,8	51,3 - 60,1	> 100	-
IV.A5	6,10	5,65 - 6,48	16,3	13,9 - 18,9	89,4	84,0 - 95,4
IV.A6	10,4	9,16 - 16,3	57,1	52,6 - 61,4	> 100	-
IV.A7	5,62	5,03 - 6,13	14,1	10,3 - 19,8	76,6	62,4 - 97,6
IV.C1	7,16	6,49 - 7,78	46,3	36,6 - 58,7	> 100	-
IV.C2	7,54	6,86 - 8,06	\approx 100	-	> 100	-
IV.D1	0,881	0,778 - 0,953	4,85	4,45 - 5,23	9,55	9,24 - 9,85
V.A1	2,03	1,55 - 2,50	5,32	4,90 - 5,71	8,60	8,26 - 8,93
V.B1	2,29	1,66 - 2,88	5,60	5,10 - 6,07	8,91	8,54 - 9,25
V.B2	3,34	2,68 - 3,95	6,30	5,76 - 6,79	9,25	8,85 - 9,62
VI.A2	27,8	21,3 - 33,9	\approx 100	99,2 - > 100	> 100	-
VI.B1	5,24	3,95 - 6,18	39,4	33,0 - 46,6	> 100	-
VI.B2	0,0244	0,0097 - 0,0453	0,975	0,877 - 1,74	65,0	48,9 - 90,7
VI.B3	0,0091	0,0052 - 0,0378	0,729	0,567 - 0,839	> 100	-
VI.B4	0,0264	0,0043 - 0,0590	3,01	2,25 - 3,81	67,2	60,2 - 74,9

Tabla 10.6: Valores de las IC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular HT-29.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
IV.A1	8,58	7,61 - 9,55	V.B1	6,42	6,20 - 6,64
IV.A2	12,3	9,58 - 20,5	V.B2	7,98	7,74 - 8,22
IV.A3	8,89	7,97 - 9,76	VI.B1	10,6	9,85 - 15,0
IV.A5	8,26	7,95 - 8,56	VI.B2	78,0	11,9 - > 100
IV.A7	8,70	7,36 - 15,3	VI.B3	9,18	8,21 - 14,4
IV.D1	6,58	6,13 - 7,02	VI.B4	28,0	8,73 - 55,9
V.A1	5,55	4,77 - 6,33			

Tabla 10.7: Valores de las IG_{50} , TGI y LC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular HT-29.

Ref.	IG_{50} (μ M)	Intervalo confianza	TGI (μ M)	Intervalo confianza	LC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
IV.A1	3,66	2,99 - 4,28	24,7	16,1 - 32,9	> 100	-
IV.A2	5,47	5,12 - 5,82	37,0	33,5 - 40,4	> 100	-
IV.A3	3,62	2,83 - 4,30	9,23	8,88 - 9,53	> 100	-
IV.A5	4,71	4,45 - 4,97	9,51	9,32 - 9,69	96,5	91,7 - > 100
IV.A7	3,40	2,90 - 3,93	25,7	16,7 - 34,1	> 100	-
IV.D1	3,33	3,01 - 3,64	7,28	7,03 - 7,53	> 100	-
V.A1	2,60	2,11 - 3,06	5,85	5,47 - 6,20	9,09	8,83 - 9,34
V.B1	3,62	3,44 - 3,79	6,83	6,67 - 6,99	\approx 100	9,90 - > 100
V.B2	5,00	4,84 - 5,17	8,92	8,74 - 9,09	94,2	89,4 - 98,9
VI.B1	5,52	5,41 - 5,64	60,8	56,5 - 65,6	> 100	-
VI.B2	0,331	0,209 - 0,443	7,89	7,00 - 8,67	> 100	-
VI.B3	0,295	0,158 - 0,415	7,99	7,52 - 8,44	> 100	-
VI.B4	0,0472	0,0324 - 0,0605	3,51	2,10 - 4,97	> 100	-

Tabla 10.8: Valores de las IC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular MCF-7.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
IV.A1	65,9	57,1 - 74,6	V.B1	8,39	7,95 - 8,82
IV.A2	\approx 100	31,2 - > 100	V.B2	9,73	9,03 - 27,6
IV.A3	73,6	61,8 - 85,3	VI.B1	77,8	69,0 - 86,1
IV.A5	58,5	50,3 - 66,8	VI.B2	80,8	35,6 - > 100
IV.A7	59,4	53,3 - 65,4	VI.B3	> 100	-
IV.D1	40,0	16,7 - 60,7	VI.B4	75,5	56,8 - 96,3
V.A1	8,53	8,11 - 8,95			

Tabla 10.9: Valores de las IG_{50} , TGI y LC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular MCF-7.

Ref.	IG_{50} (μM)	Intervalo confianza	TGI (μM)	Intervalo confianza	LC_{50} (μM)	Intervalo confianza
IV.A1	9,51	8,63 - 11,99	74,9	70,1 - 79,6	> 100	-
IV.A2	8,08	7,67 - 8,45	> 100	-	> 100	-
IV.A3	10,9	9,61 - 17,4	> 100	-	> 100	-
IV.A5	8,89	8,58 - 9,19	> 100	-	> 100	-
IV.A7	16,3	12,2 - 20,2	\approx 100	99,8 - > 100	> 100	-
IV.D1	7,76	7,24 - 8,24	> 100	-	> 100	-
V.A1	4,49	4,08 - 4,88	9,32	9,00 - 9,63	> 100	-
V.B1	5,30	4,99 - 5,58	> 100	-	> 100	-
V.B2	6,33	5,93 - 6,71	> 100	-	> 100	-
VI.B1	8,88	8,44 - 9,32	> 100	-	> 100	-
VI.B2	0,517	0,290 - 0,707	> 100	-	> 100	-
VI.B3	0,317	0,0967 - 0,556	> 100	-	> 100	-
VI.B4	0,294	0,0099 - 0,468	> 100	-	> 100	-

Tabla 10.10: Valores de las IC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular A549.

Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μM)	Intervalo confianza
IV.A1	6,48	5,85 - 7,10	V.B1	4,85	4,28 - 5,39
IV.A2	6,03	5,60 - 6,47	V.B2	15,4	9,17 - 32,1
IV.A3	7,01	6,27 - 7,73	VI.B1	20,0	8,65 - 42,6
IV.A5	7,07	6,69 - 7,45	VI.B2	4,75	0,796 - 9,77
IV.A7	6,67	6,39 - 6,95	VI.B3	1,00	0,544 - 9,26
IV.D1	5,11	4,69 - 5,51	VI.B4	9,22	4,49 - 51,4
V.A1	6,55	5,81 - 7,25			

Tabla 10.11: Valores de las IG_{50} , TGI y LC_{50} , con sus respectivos intervalos de confianza, de los selenoderivados evaluados en la línea celular A549.

Ref.	IG_{50} (μ M)	Intervalo confianza	TGI (μ M)	Intervalo confianza	LC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
IV.A1	2,22	1,81 - 2,62	6,96	6,64 - 7,28	82,0	67,9 - 97,5
IV.A2	2,69	2,40 - 2,98	6,48	6,19 - 6,77	38,3	9,97 - 72,1
IV.A3	4,06	3,46 - 4,59	7,15	6,75 - 7,50	38,6	13,3 - 67,7
IV.A5	4,17	3,82 - 4,51	7,24	6,94 - 7,52	44,8	17,5 - 73,0
IV.A7	3,66	3,41 - 3,91	6,89	6,65 - 7,12	23,7	9,88 - 54,1
IV.D1	1,30	1,01 - 1,60	5,78	5,48 - 6,08	51,8	9,95 - > 100
V.A1	1,67	1,11 - 2,20	7,06	6,65 - 7,44	87,0	74,7 - > 100
V.B1	1,16	0,706 - 1,55	5,61	5,24 - 5,97	\approx 100	9,71 - > 100
V.B2	6,01	5,28 - 6,64	27,5	22,8 - 32,3	92,5	87,4 - 97,7
VI.B1	2,94	1,86 - 4,04	42,7	30,64 - 53,1	> 100	-
VI.B2	0,0606	0,0323 - 0,0834	0,682	0,464 - 0,884	\approx 100	89,3 - > 100
VI.B3	0,0788	0,0366 - 0,196	0,712	0,455 - 0,960	\approx 100	86,0 - > 100
VI.B4	0,0617	0,0449 - 0,0731	4,23	1,01 - 6,74	> 100	-

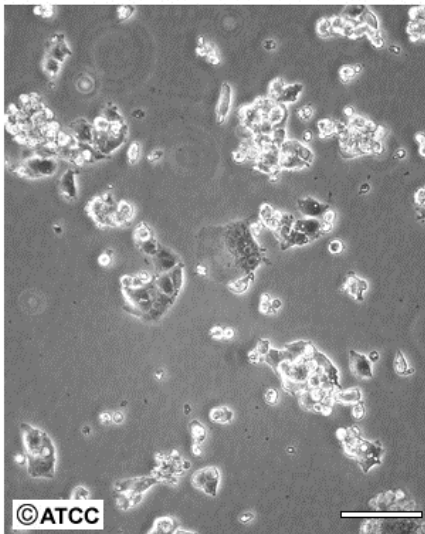
2. Método del Cristal Violeta

Líneas celulares empleadas

Las Figuras 10.19-10.22 muestran imágenes de las líneas celulares empleadas en los ensayos realizados siguiendo la metodología del Cristal Violeta. Las fotografías se han tomado de las fichas del catálogo de líneas celulares de la página web de la ATCC (American Type Culture Collection) ²³¹.

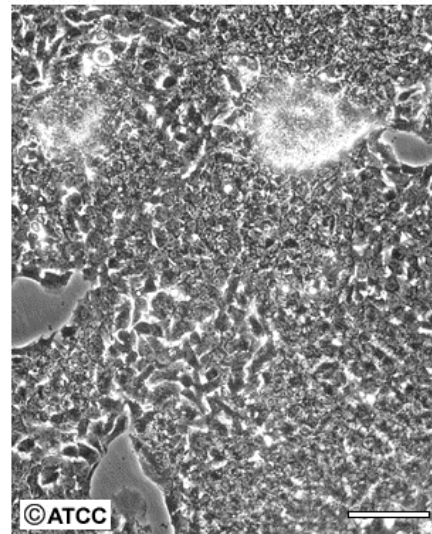
No se han encontrado imágenes de la línea murina CT26 (carcinoma de colon) en dicho catálogo.

ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Figura 10.19: Células de la línea celular HepG2 en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **HTB-161**
Designation: **NIH:OVCAR-3**

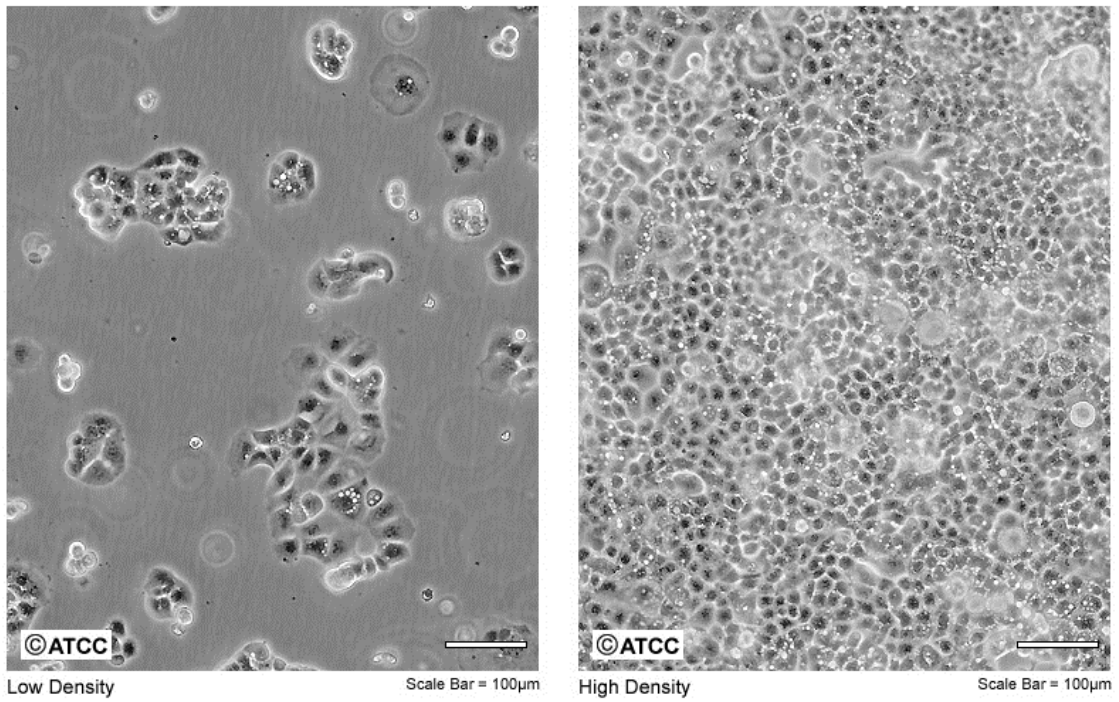


Figura 10.20: Células de la línea celular OVCAR-3 en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **CRL-2873™**
Designation: **HUVEC-CS**

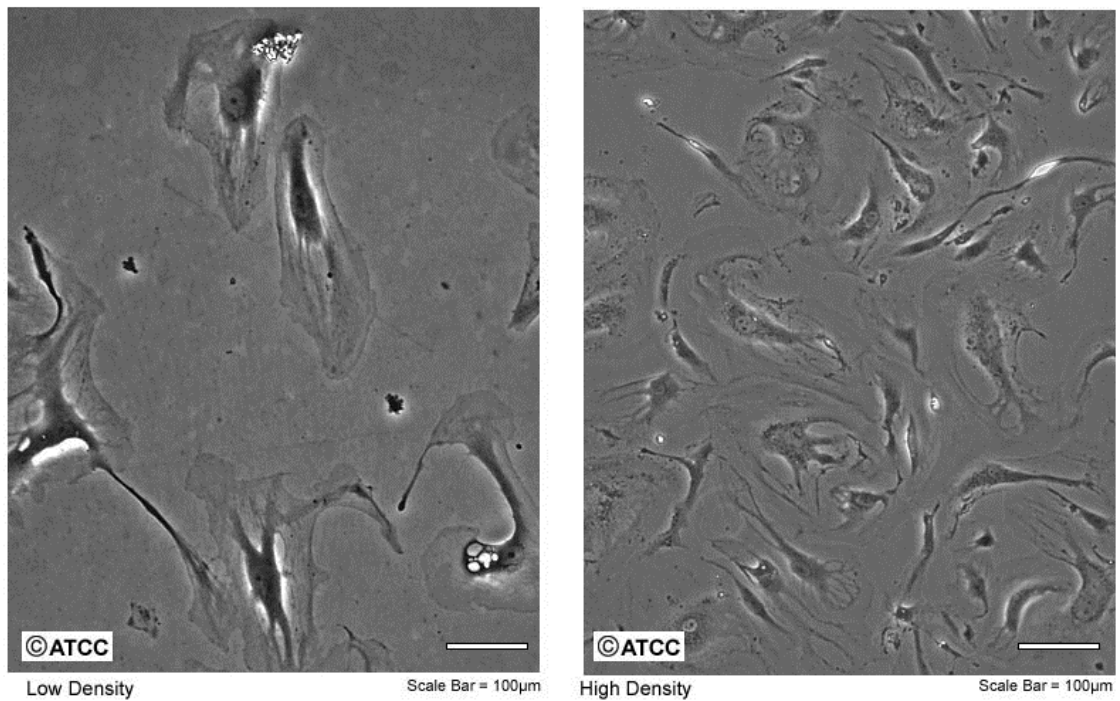


Figura 10.21: Células de la línea celular HUVEC en cultivo ²³¹.

ATCC Number: **CCL-92**
Designation: **3T3 Swiss Albino**

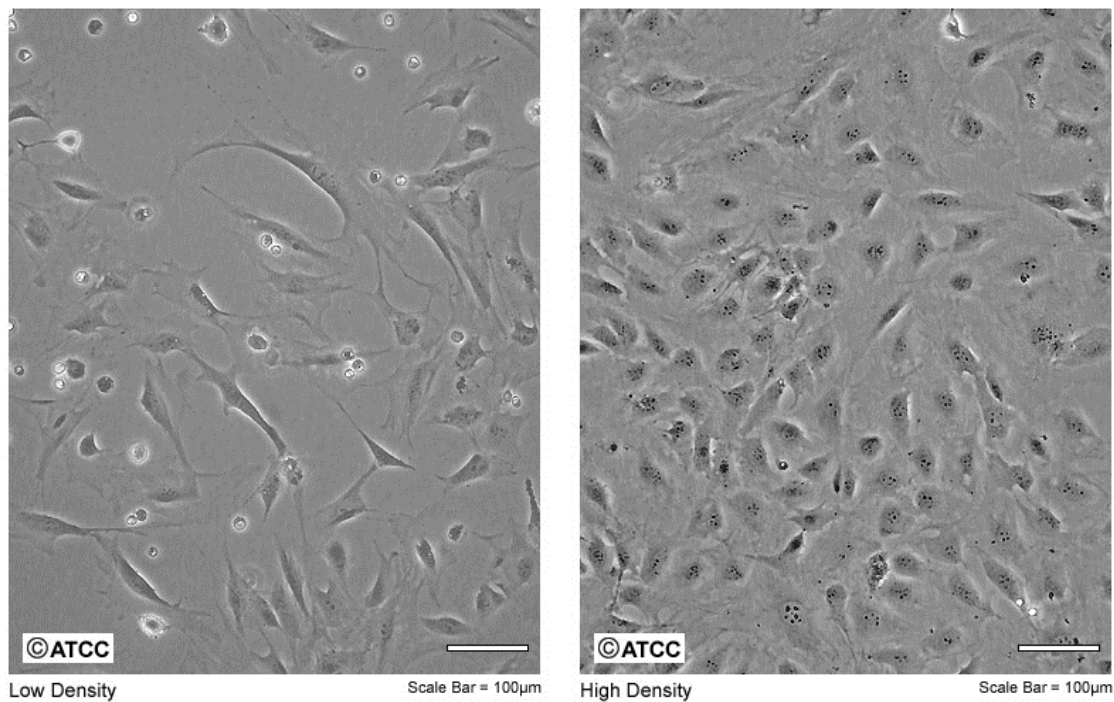


Figura 10.22: Células de la línea celular 3T3 en cultivo²³¹.

Curvas dosis-respuesta de los selenoésteres

A continuación se adjuntan las curvas dosis-respuesta de los compuestos en las líneas celulares humanas evaluadas en París (Figuras 10.23-10.38).

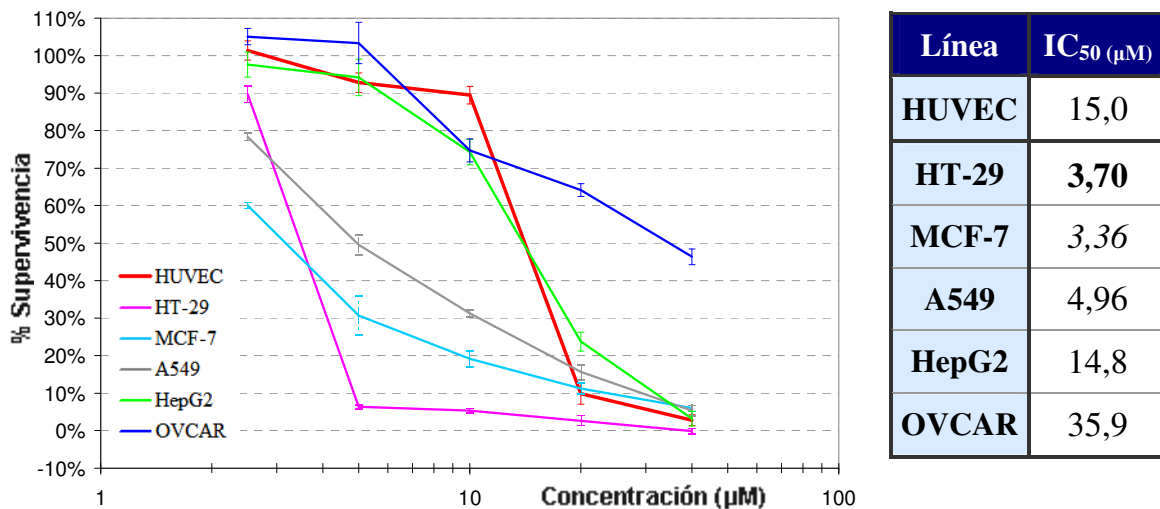


Figura 10.23: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A2

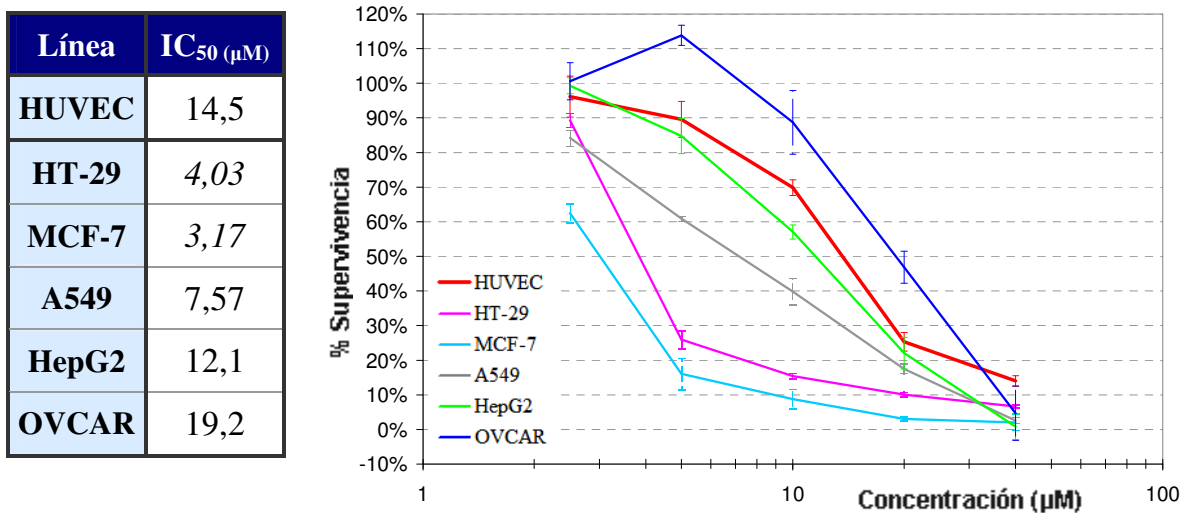


Figura 10.24: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A3

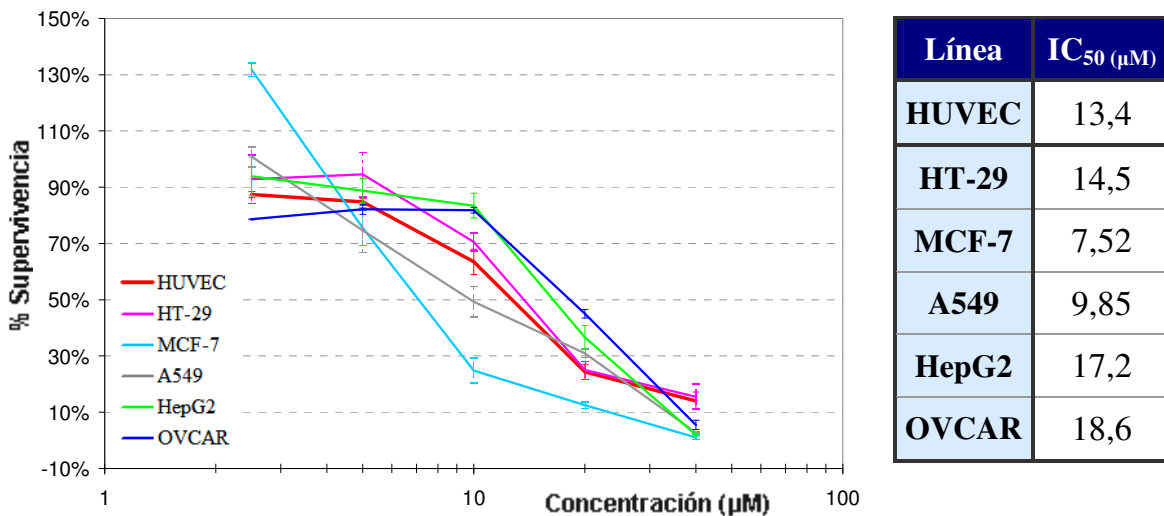


Figura 10.25: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A4

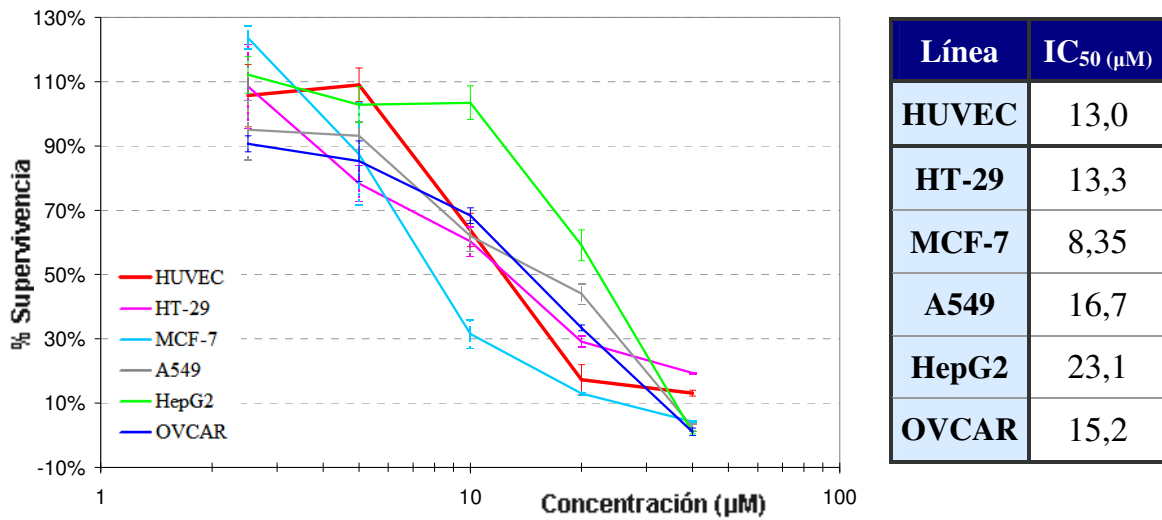


Figura 10.26: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A5

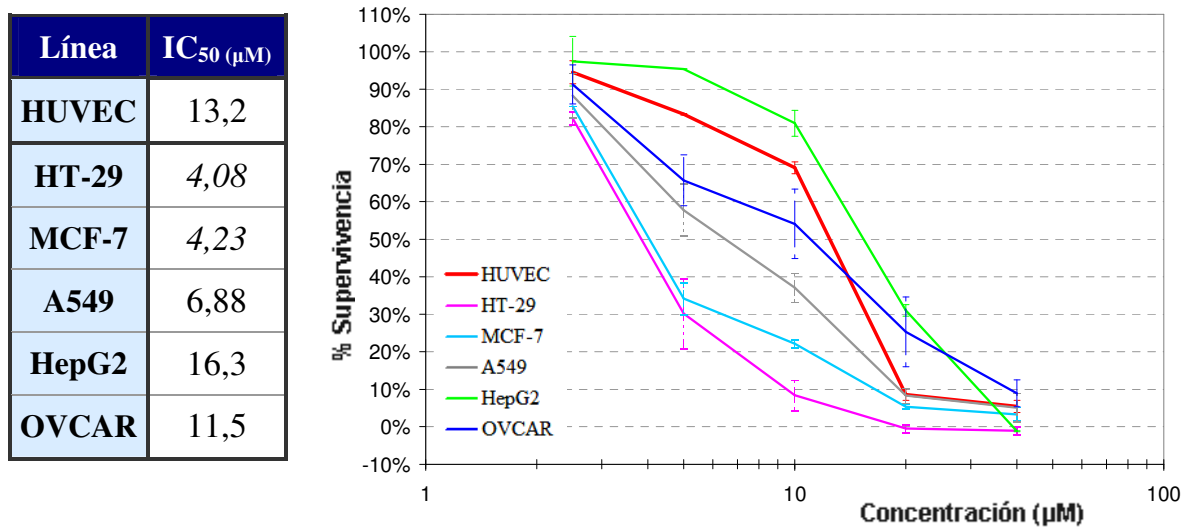


Figura 10.27: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A6

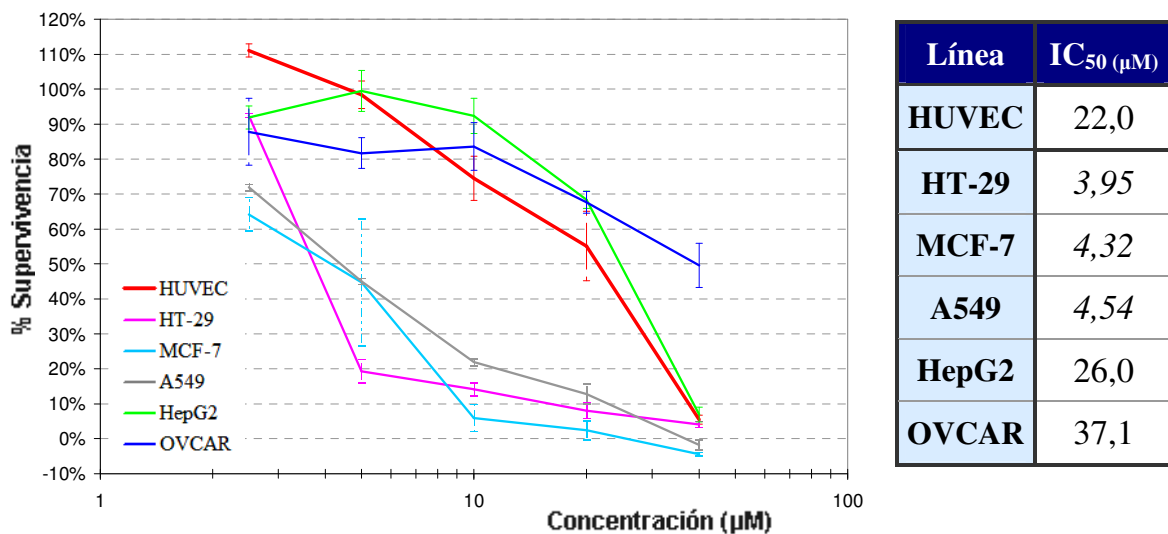


Figura 10.28: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A7

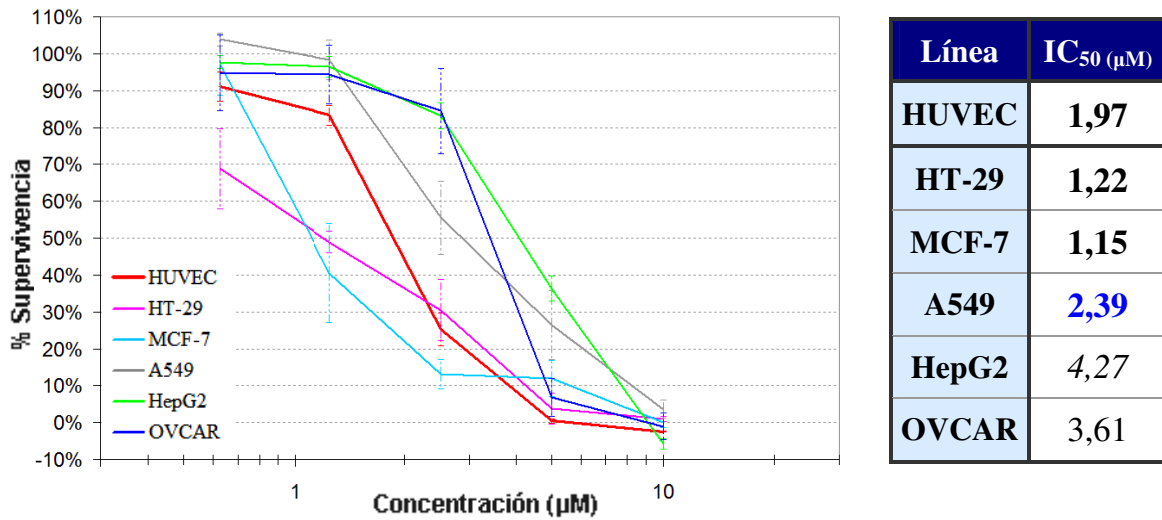


Figura 10.29: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.A8

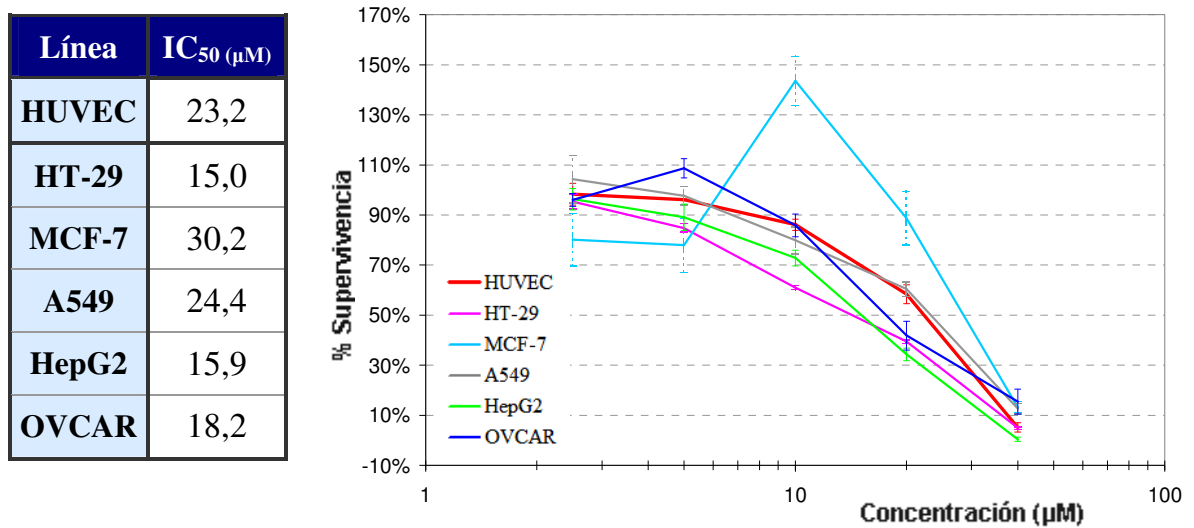


Figura 10.30: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.B3

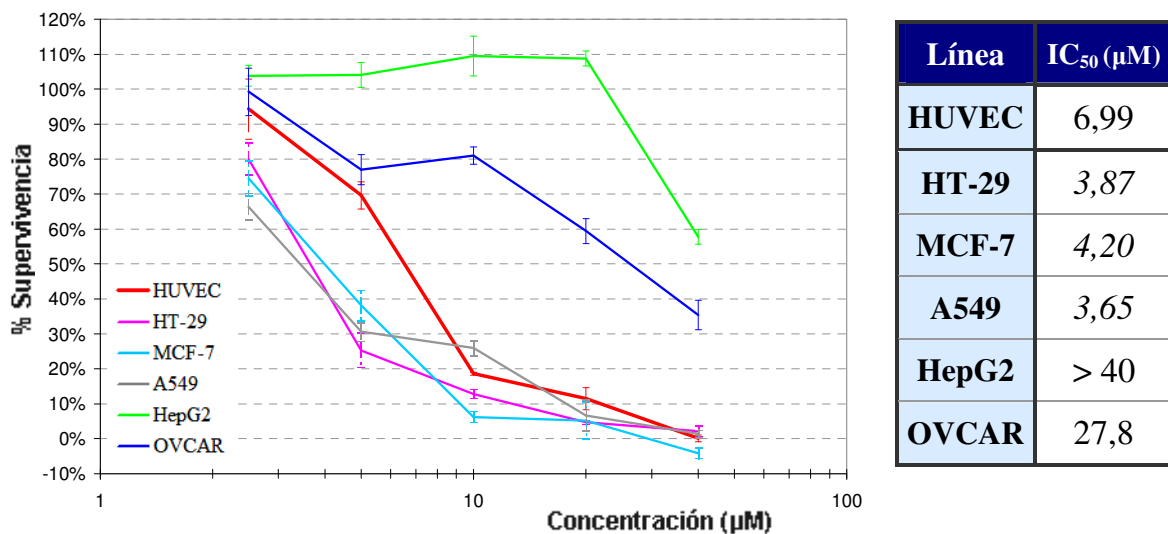


Figura 10.31: Curvas dosis-respuesta. Compuesto IV.C2

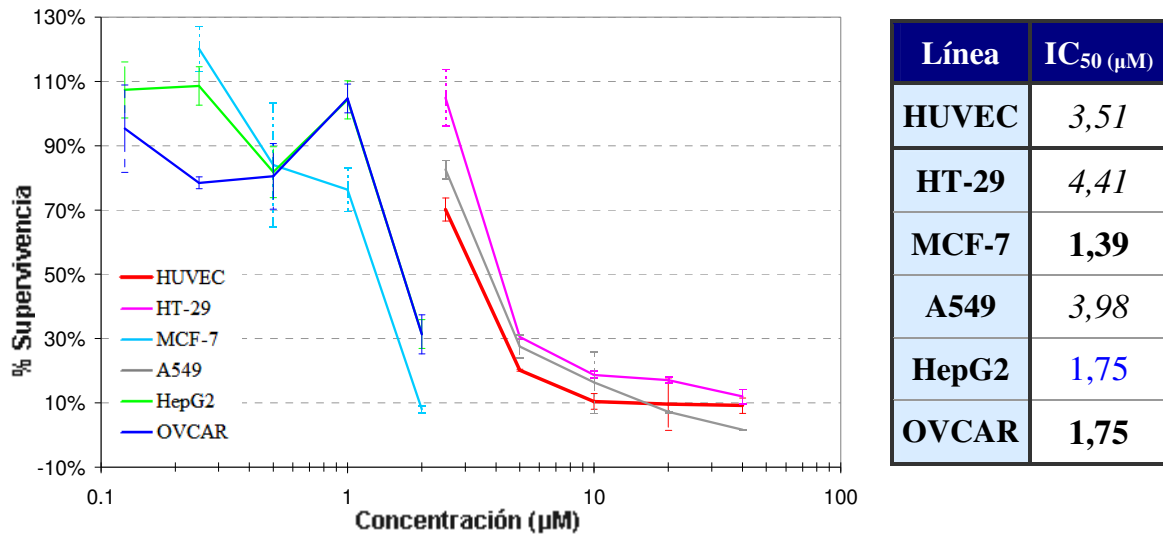


Figura 10.32: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.A1

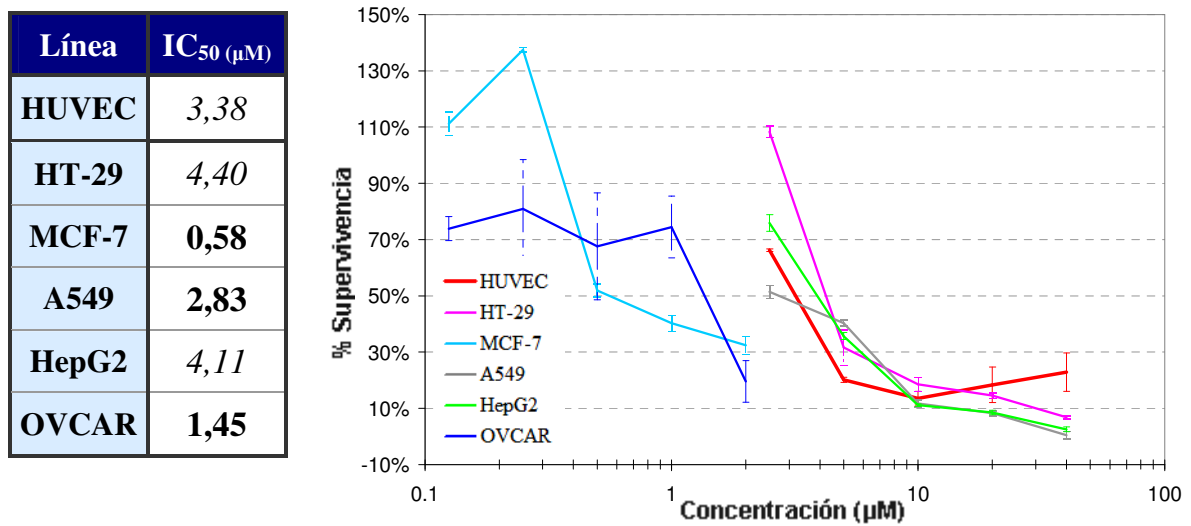


Figura 10.33: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.B1

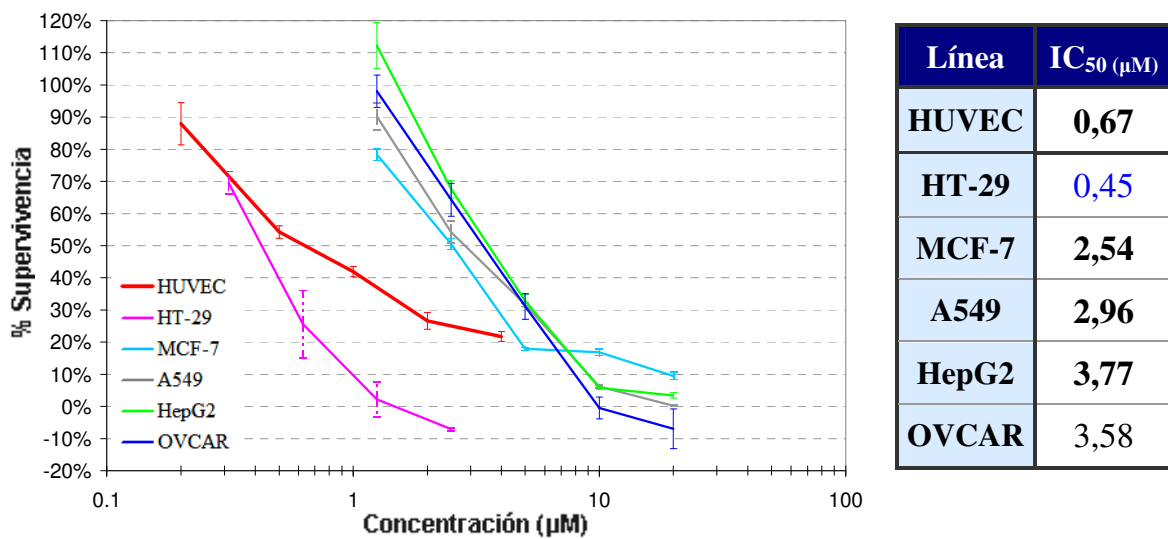


Figura 10.34: Curvas dosis-respuesta. Compuesto V.B2

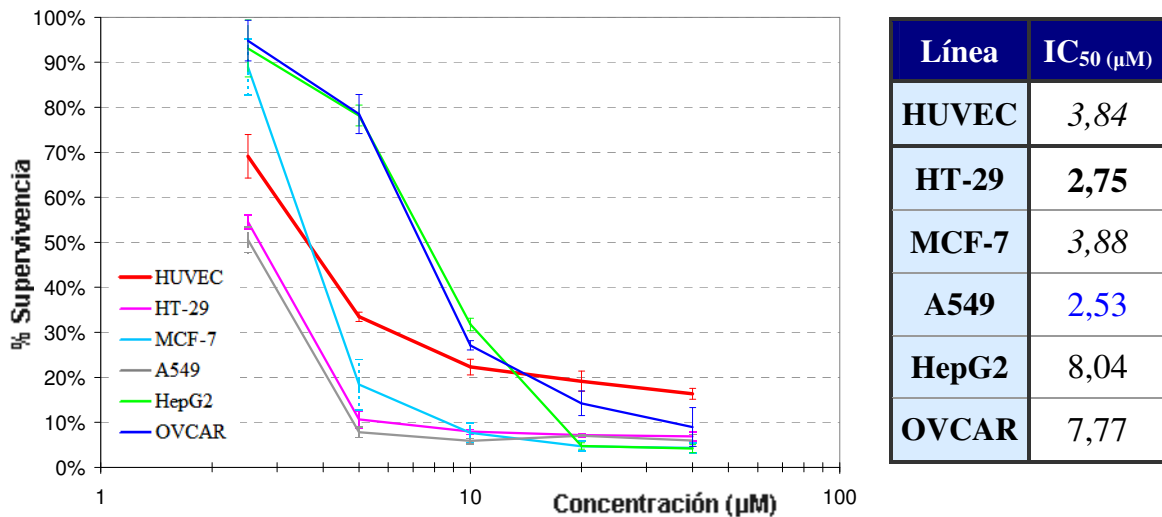


Figura 10.35: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.A1

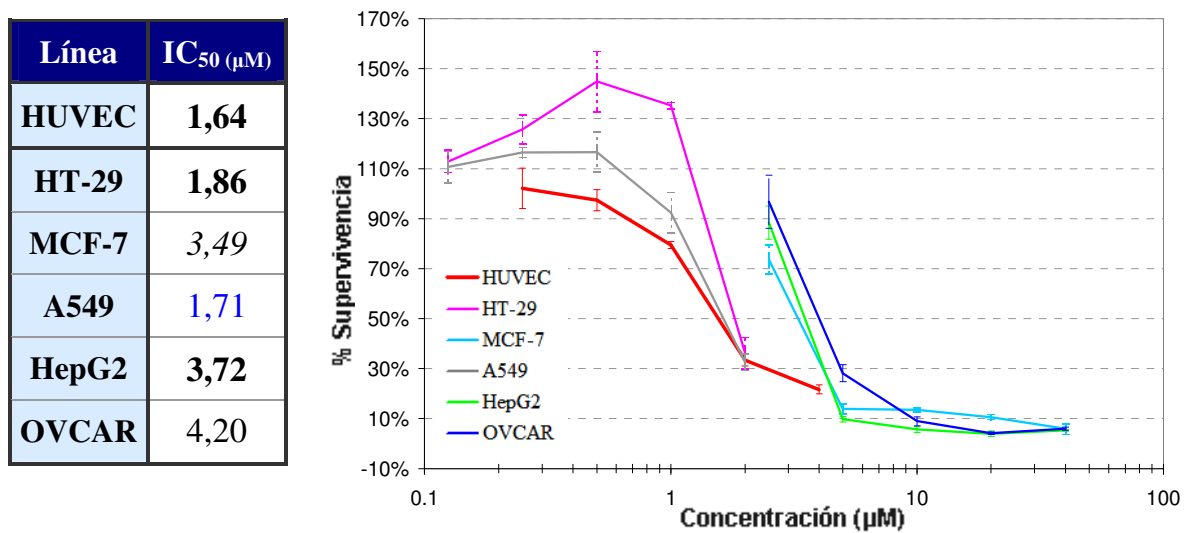


Figura 10.36: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.B1

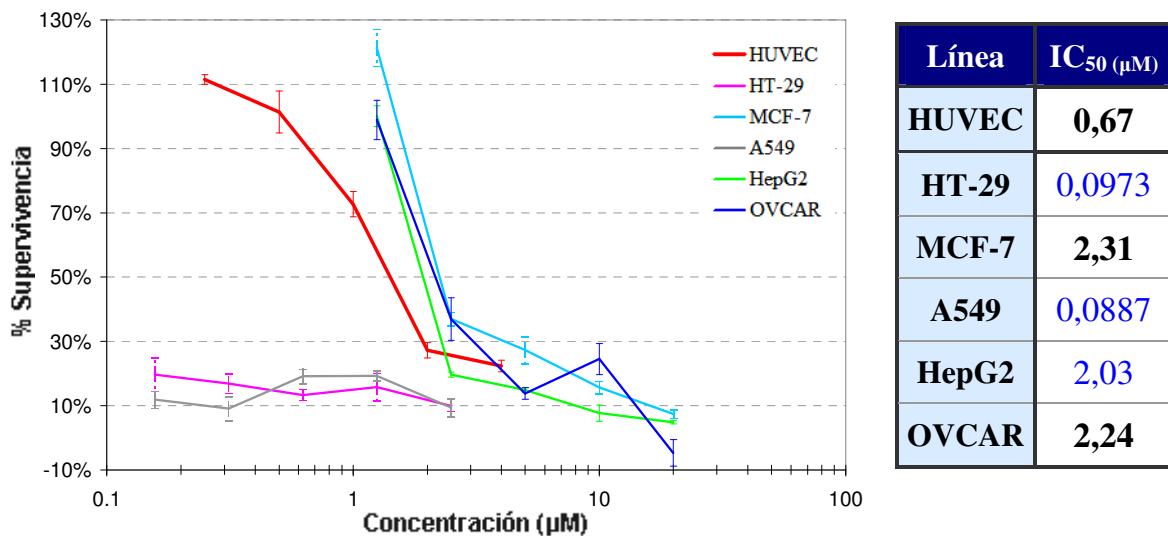


Figura 10.37: Curvas dosis-respuesta. Compuesto VI.B4

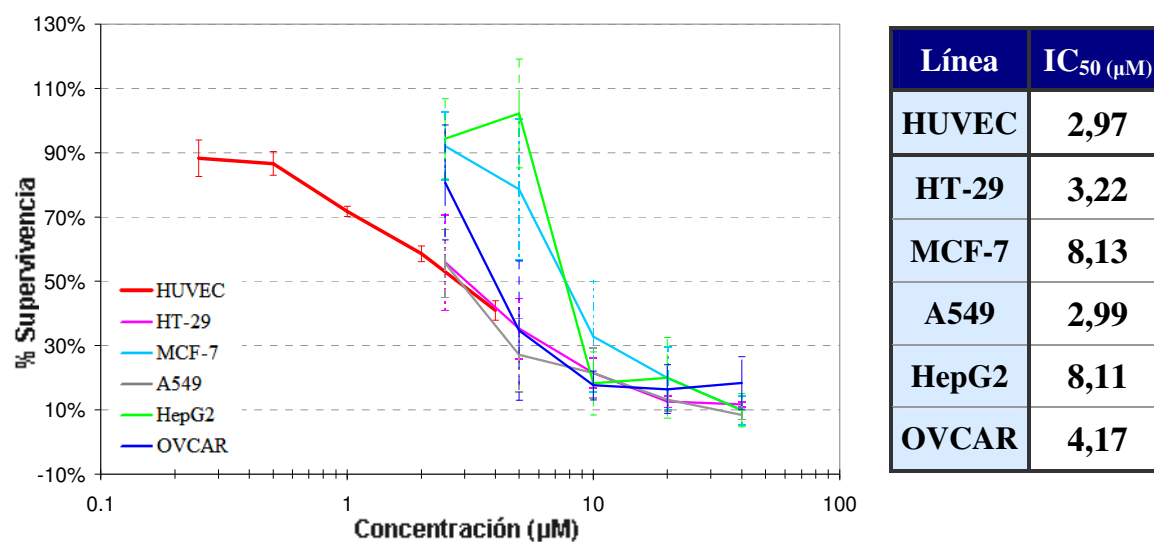


Figura 10.38: Curvas dosis-respuesta. Compuesto III.1

Curvas dosis-respuesta de fármacos quimioterapéuticos

A continuación se adjuntan las curvas dosis-respuesta obtenidas para los fármacos de uso habitual en quimioterapia evaluados como controles positivos en París en distintas líneas celulares humanas (Figuras 10.39-10.41).

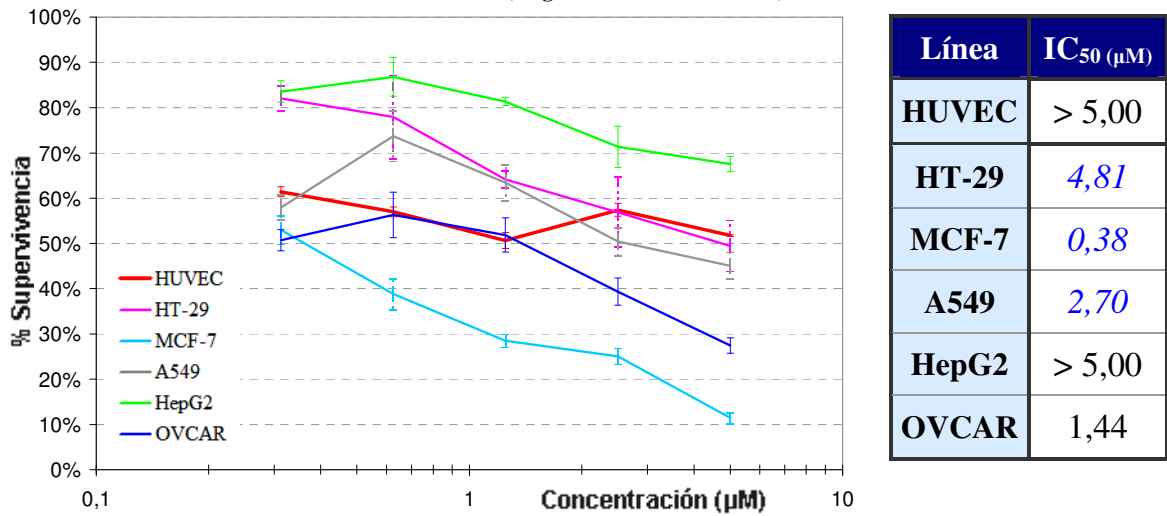


Figura 10.39: Curvas dosis-respuesta. Taxol

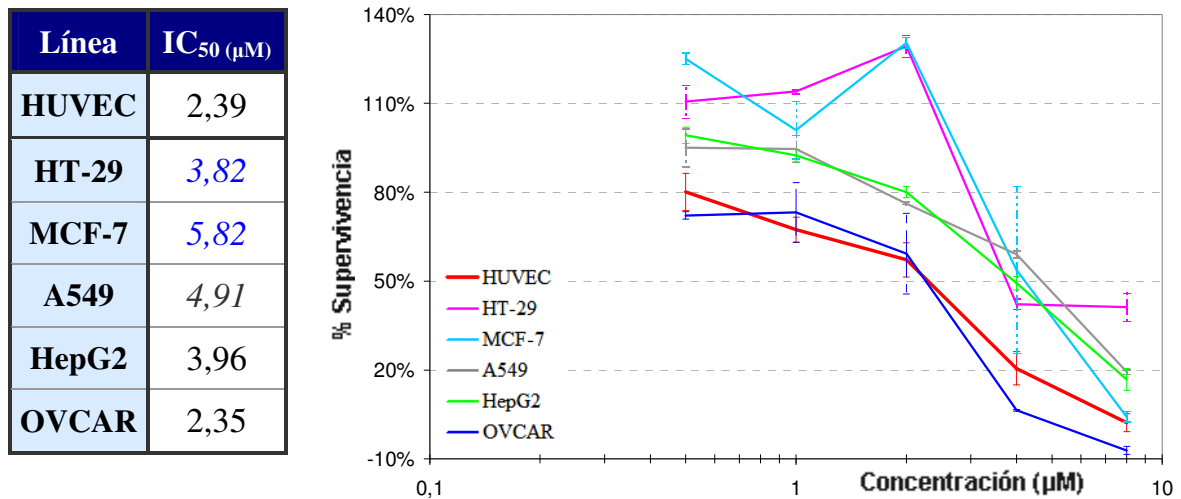


Figura 10.40: Curvas dosis-respuesta. Doxorrubicina

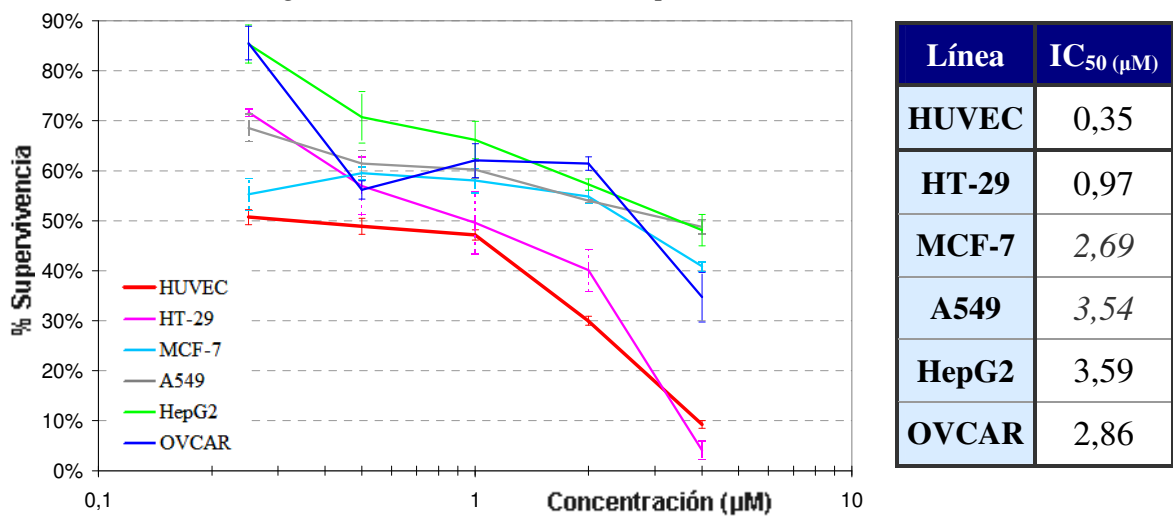


Figura 10.41: Curvas dosis-respuesta. Vincristina

Índices de selectividad de los selenoésteres

Se han calculado los índices de selectividad de los selenoésteres para todas las líneas celulares tumorales evaluadas en los ensayos de citotoxicidad realizados siguiendo la metodología del cristal violeta. Como referencia se toman las líneas celulares HUVEC (células embrionarias de endotelio del cordón umbilical) en el caso de las líneas humanas, y 3T3 (fibroblastos embrionarios) en las murinas. En la *Tabla 10.12* se recogen los índices determinados.

Tabla 10.12: Selectividad de los selenoésteres en las diferentes líneas tumorales.

Ref.	CT26 (ratón)	Líneas humanas				
		HT29	MCF7	A549	HepG2	Ovc3r-3
IV.A2	0,8	4,1	4,5	3,0	1,0	0,4
IV.A3	1,4	3,6	4,6	1,9	1,2	0,8
IV.A4	0,4	0,9	1,8	1,4	0,8	0,7
IV.A5	0,3	1,0	1,6	0,8	0,6	0,9
IV.A6	1,4	3,2	3,1	1,9	0,8	1,1
IV.A7	1,7	5,6	5,1	4,8	0,8	0,6
IV.B3	0,9	1,5	0,8	1,0	1,5	1,3
IV.C2	-	1,8	1,7	1,9	-	0,3
IV.D1	1,4	1,6	1,7	0,8	0,5	0,5
III.1	0,4	0,9	0,4	1,0	0,4	0,7
V.A1	1,4	0,8	2,5	0,9	2,0	2,0
V.B1	1,2	0,8	5,8	1,2	0,8	2,3
V.B2	1,7	1,5	0,3	0,2	0,2	0,2
VI.A1	0,7	1,4	1,0	1,5	0,5	0,5
VI.B1	0,4	0,9	0,5	1,0	0,4	0,4
VI.B4	0,1	15,4	0,6	16,9	0,7	0,7
Taxol	0,4	> 1,0	> 13,2	> 1,9	-	> 3,6
Doxo.	0,7	0,6	0,4	0,5	0,6	1,0
Vinc.	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1

Valores de confianza de las IC₅₀ calculadas

En los ensayos realizados en la Université Paris Descartes se han obtenido para cada concentración ensayada las correspondientes desviaciones típica y media respecto de la media. Con ellas, a la hora de determinar por extrapolación las correspondientes concentraciones inhibitorias 50% (IC₅₀) se ha calculado el intervalo de confianza asociado a dicho valor, considerando las desviaciones típicas de los valores empleados en la interpolación.

A continuación se muestran los intervalos de confianza de las IC₅₀ calculadas en las *Tablas 10.13-10.20*, ordenadas por líneas celulares. Estos datos completan los mostrados en el apartado “Valoraciones de Actividad. A. Evaluación de Citotoxicidad, Método del MTT” (*vid. págs. 221-228*).

Tabla 10.13: Intervalos de confianza calculados para las IC₅₀. Línea celular 3T3.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza
III.1	3,24	2,95 - 3,52	IV.C2	> 40,0	-
IV.A2	10,47	9,66 - 11,50	IV.D1	4,09	3,77 - 4,38
IV.A3	8,74	8,45 - 9,02	V.A1	1,12	1,00 - 1,23
IV.A4	4,36	4,17 - 4,52	V.B1	1,52	1,35 - 1,67
IV.A5	4,08	3,77 - 4,42	V.B2	3,69	3,34 - 3,94
IV.A6	13,46	11,01 - 15,75	VI.A1	4,21	4,09 - 4,33
IV.A7	36,25	25,83 - >40,0	VI.B1	1,55	1,46 - 1,64
IV.B3	12,76	10,42 - 14,72	VI.B2	0,100	0,077 - 0,117
Taxol	1,23	0,955 - 2,66	Vincristina	0,545	0,275 - 0,733
Doxorrubicina				4,69	4,13 - 5,21

Tabla 10.14: Intervalos de confianza calculados para las IC₅₀. Línea celular CT26.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza
III.1	8,53	5,99 - 14,31	IV.C2	22,32	19,00 - 25,76
IV.A2	13,65	12,80 - 14,43	IV.D1	2,94	2,70 - 3,18
IV.A3	6,23	5,77 - 6,66	V.A1	0,777	0,745 - 0,807
IV.A4	11,29	9,93 - 12,42	V.B1	1,25	1,16 - 1,33
IV.A5	13,92	12,07 - 15,10	V.B2	2,12	1,95 - 2,23
IV.A6	9,78	8,81 - 11,21	VI.A1	6,20	5,78 - 6,61
IV.A7	21,07	19,70 - 22,31	VI.B1	3,55	2,88 - 4,06
IV.B3	14,43	13,39 - 15,35	VI.B2	1,42	1,13 - 1,71
Taxol	3,22	2,54 - 3,67	Vincristina	1,30	1,17 - 1,41
Doxorrubicina				6,60	5,92 - 7,22

Tabla 10.15: Intervalos de confianza calculados para las IC_{50} . Línea celular HUVEC.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
III.1	2,97	2,58 - 3,36	IV.C2	6,99	6,60 - 7,32
IV.A2	14,96	14,62-15,30	IV.D1	1,97	1,87 - 2,07
IV.A3	14,45	13,60-15,26	V.A1	3,51	3,35 - 3,65
IV.A4	13,44	12,29-14,47	V.B1	3,38	3,20 - 3,55
IV.A5	12,97	11,76-14,12	V.B2	0,693	0,605 - 0,775
IV.A6	13,16	12,83-13,49	VI.A1	3,84	3,61 - 4,03
IV.A7	21,95	17,76-25,08	VI.B1	1,64	1,57 - 1,70
IV.B3	23,15	21,42-24,70	VI.B2	1,50	1,41 - 1,58
Taxol	> 5,00	-	Vincristina	0,346	0,236 - 0,988
Doxorrubicina				2,39	2,07 - 2,71

Tabla 10.16: Intervalos de confianza calculados para las IC_{50} . Línea celular HT-29.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
III.1	3,22	2,03 - 4,52	IV.C2	3,87	3,63 - 4,11
IV.A2	3,70	3,64 - 3,75	IV.D1	1,22	0,99 - 1,53
IV.A3	4,03	3,90 - 4,16	V.A1	4,41	4,28 - 4,51
IV.A4	14,51	13,43 - 15,50	V.B1	4,40	4,11 - 4,66
IV.A5	13,31	11,04 - 15,05	V.B2	0,451	0,115 - 0,527
IV.A6	4,08	3,77 - 4,47	VI.A1	2,75	2,64 - 2,85
IV.A7	3,95	3,81 - 4,09	VI.B1	1,86	1,80 - 1,92
IV.B3	14,98	14,30 - 15,62	VI.B2	0,0973	0,0864 - 0,1080
Taxol	4,81	2,39 - > 5,00	Vincristina	0,977	0,562 - 1,52
Doxorrubicina				3,82	3,72 - 3,91

Tabla 10.17: Intervalos de confianza calculados para las IC_{50} . Línea celular MCF-7.

Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza	Ref.	IC_{50} (μ M)	Intervalo confianza
III.1	8,13	5,77 - 10,08	IV.C2	4,20	3,87 - 4,51
IV.A2	3,36	3,13 - 3,64	IV.D1	1,15	0,99 - 1,41
IV.A3	3,17	2,78 - 3,52	V.A1	1,39	1,30 - 1,46
IV.A4	7,52	6,95 - 8,04	V.B1	0,580	0,498 - 0,690
IV.A5	8,35	7,40 - 8,97	V.B2	2,54	2,17 - 3,00
IV.A6	4,23	4,00 - 4,46	VI.A1	3,88	3,62 - 4,12
IV.A7	4,32	3,10 - 6,24	VI.B1	3,49	3,27 - 3,68
IV.B3	30,24	28,06 - 31,92	VI.B2	2,31	2,23 - 2,37
Taxol	0,378	0,309 - 0,455	Vincristina	2,67	0,239 - 3,38
Doxorrubicina				5,82	5,61 - 6,01

Tabla 10.18: Intervalos de confianza calculados para las IC₅₀. Línea celular A549.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza
III.1	2,99	2,23 - 3,98	IV.C2	3,65	3,40 - 3,87
IV.A2	4,96	4,69 - 5,68	IV.D1	2,39	2,25 - 2,69
IV.A3	7,57	6,96 - 8,34	V.A1	3,98	3,80 - 4,16
IV.A4	9,85	8,53 - 12,30	V.B1	2,83	2,43 - 3,37
IV.A5	16,67	14,12 - 18,77	V.B2	2,96	2,54 - 3,30
IV.A6	6,88	5,21 - 8,12	VI.A1	2,53	2,28 - 2,77
IV.A7	4,54	4,30 - 4,75	VI.B1	1,71	1,55 - 1,82
IV.B3	24,39	22,96 - 25,75	VI.B2	0,0887	0,0300 - 0,1318
Taxol	2,70	2,00 - 4,89	Vincristina	3,54	2,71 - > 4,00
Doxorrubicina				4,91	4,73 - 5,09

Tabla 10.19: Intervalos de confianza calculados para las IC₅₀. Línea celular HepG2.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza
III.1	8,11	7,29 - 8,80	IV.C2	> 40,00	-
IV.A2	14,80	14,11 - 15,46	IV.D1	4,27	4,07 - 4,47
IV.A3	12,10	11,28 - 13,02	V.A1	1,75	1,67 - 1,82
IV.A4	17,15	16,17 - 18,10	V.B1	4,11	3,90 - 4,29
IV.A5	23,12	21,34 - 24,62	V.B2	3,77	3,45 - 4,04
IV.A6	16,28	15,73 - 16,79	VI.A1	8,04	7,80 - 8,26
IV.A7	25,98	24,50 - 27,32	VI.B1	3,72	3,55 - 3,86
IV.B3	15,93	15,05-16,76	VI.B2	2,03	1,98 - 2,07
Taxol	> 5,00	-	Vincristina	3,44	2,75 - > 4,00
Doxorrubicina				3,96	3,79 - 4,24

Tabla 10.20: Intervalos de confianza calculados para las IC₅₀. Línea celular OVCAR-3.

Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (μM)	Intervalo confianza
III.1	4,17	3,11 - 5,94	IV.C2	27,84	24,54 - 31,26
IV.A2	35,91	33,04 - 36,75	IV.D1	3,61	3,21 - 3,91
IV.A3	19,24	17,86 - 20,83	V.A1	1,75	1,61 - 1,86
IV.A4	18,64	17,84 - 19,38	V.B1	1,45	0,475 - 1,61
IV.A5	15,24	14,08 - 16,23	V.B2	3,58	3,05 - 4,02
IV.A6	11,53	8,05 - 14,85	VI.A1	7,77	7,47 - 8,04
IV.A7	37,06	29,62 - >40,0	VI.B1	4,20	3,89 - 4,44
IV.B3	18,15	16,83-19,49	VI.B2	2,24	2,08 - 2,38
Taxol	1,39	0,293 - 1,79	Vincristina	2,86	2,55 - 3,21
Doxorrubicina				2,35	1,74 - 2,70

C. EVALUACIÓN DE NEMOTOXICIDAD

Curvas dosis-respuesta

A continuación se adjuntan las curvas dosis-respuesta de los selenoésteres cuya actividad nematocida ha sido determinada en nematodos de la especie *Steinernema feltiae* (Figuras 10.42-10.45). Los derivados se agrupan por series; con la salvedad de los compuestos de aquellas series con un número reducido de compuestos analizados (II, III y V), que se muestran en la misma gráfica. Finalmente, en la Figura 10.46 se recogen las curvas dosis respuesta del control positivo (tiabendazol) y de los controles negativos (ácidos benzoico y *p*-clorobenzoico).

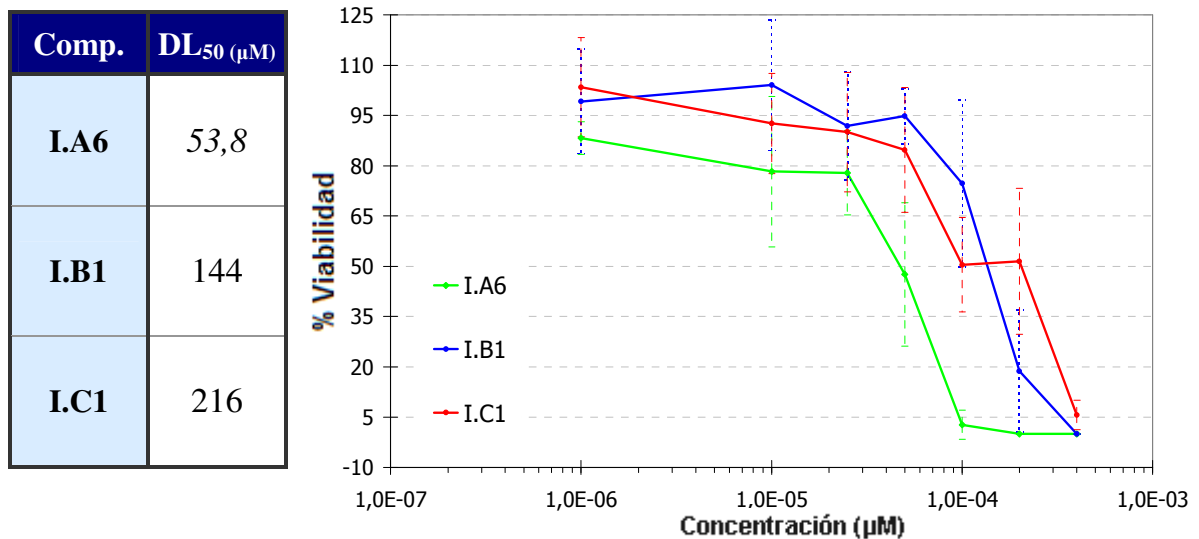


Figura 10.42: Curva dosis-respuesta. Compuestos Serie I

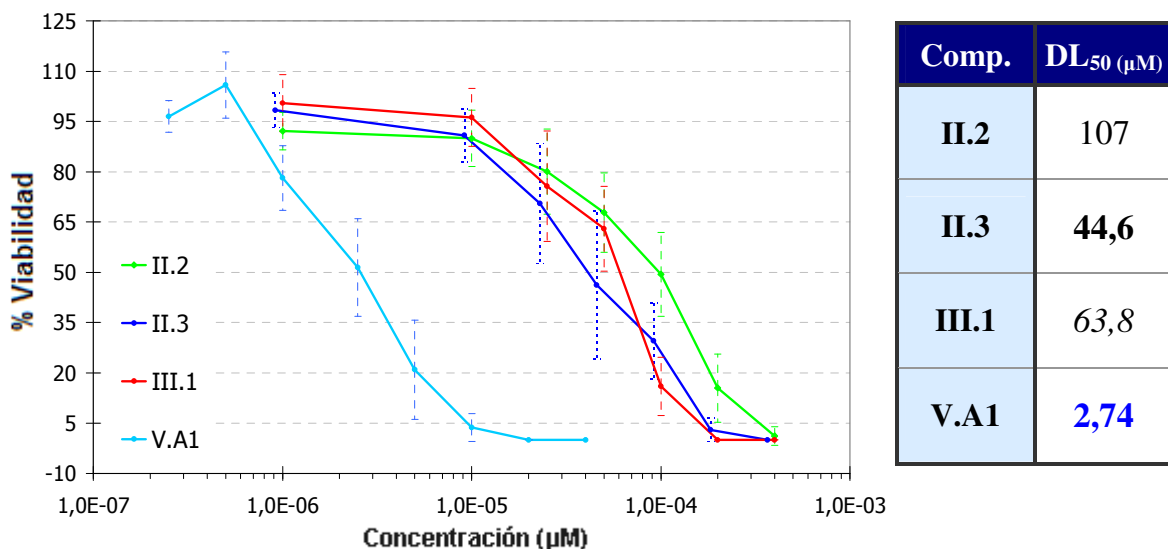


Figura 10.43: Curvas dosis-respuesta. Compuestos Series II, III y V

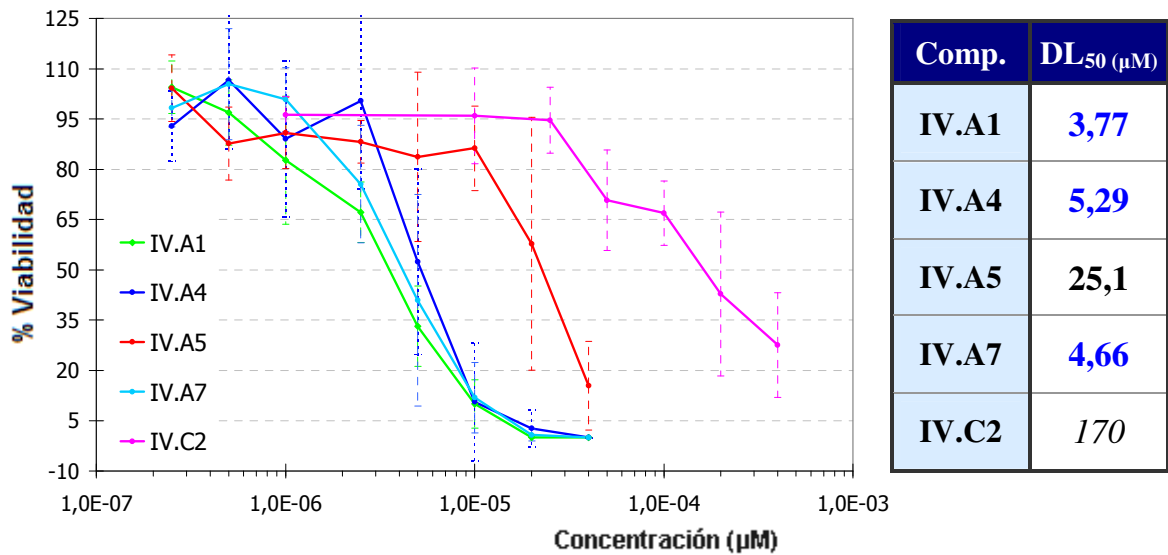


Figura 10.44: Curvas dosis-respuesta. Compuestos Serie IV

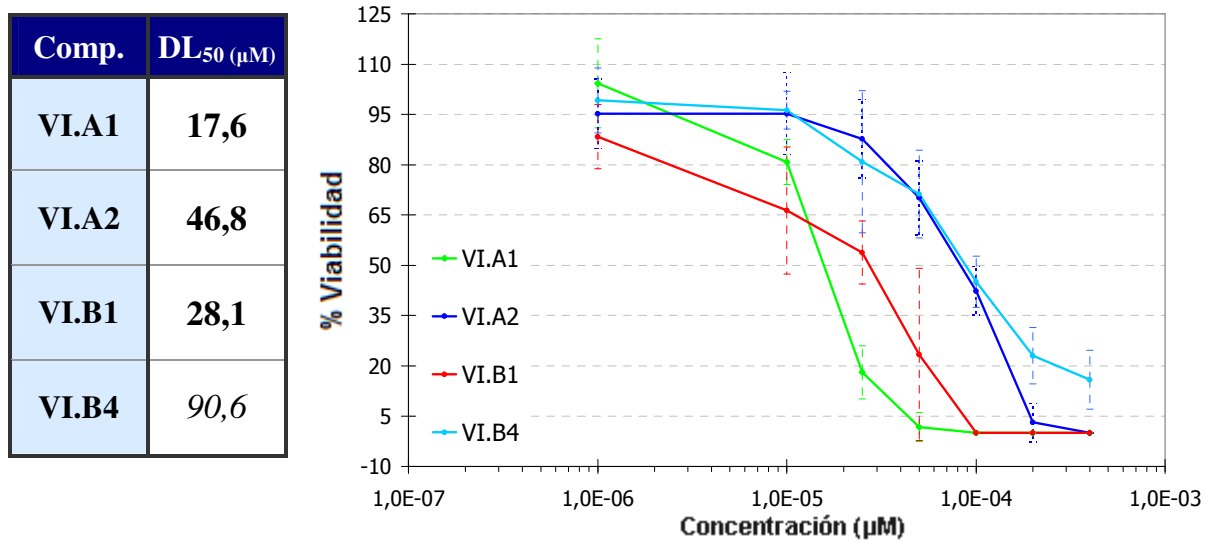


Figura 10.45: Curvas dosis-respuesta. Compuestos Serie VI

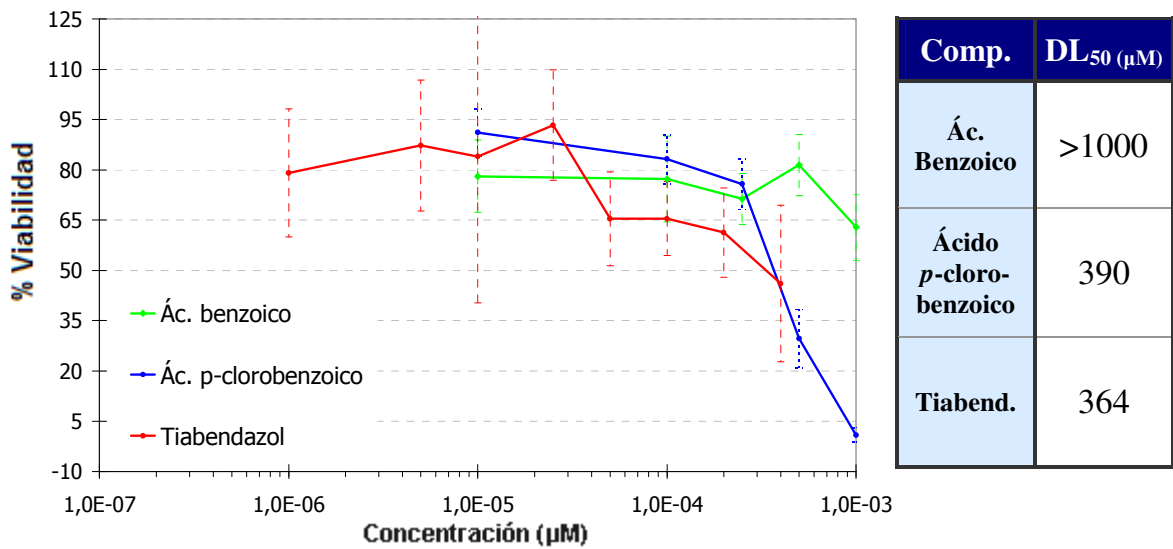


Figura 10.46: Curvas dosis-respuesta. Controles

Intervalos de confianza

En los ensayos de nemotoxicidad se han obtenido para cada concentración ensayada las correspondientes desviaciones típica y media respecto de la media. Con ellas, a la hora de determinar por extrapolación las correspondientes dosis letales 50% (DL₅₀) se ha calculado el intervalo de confianza asociado a dicho valor, considerando las desviaciones típicas de los valores empleados en la interpolación.

A continuación se muestran los intervalos de confianza de las DL₅₀ calculadas en la *Tabla 10.21*. Estos datos completan los mostrados en el apartado “Valoraciones de Actividad. C. Evaluación de Nemotoxicidad” (*vid.* págs. 267-269).

*Tabla 10.21: Evaluación de la nemotoxicidad de los selenoésteres en *Steinernema feltiae*. Valores de las DL₅₀ determinados con sus respectivos intervalos de confianza.*

Ref.	IC ₅₀ (µM)	Intervalo confianza	Ref.	IC ₅₀ (µM)	Intervalo confianza
I.A6	53,75	47,51 - 59,97	III.1	2,74	2,40 - 3,13
I.B1	144,4	130,1 - 157,4	IV.A1	17,62	16,89 - 18,34
I.C1	215,8	96,95 - 241,4	IV.A2	46,83	44,01 - 49,35
II.A2	3,77	3,47 - 4,07	IV.B1	28,13	24,70 - 32,75
II.A4	5,29	4,65 - 6,29	IV.B2	90,57	81,77 - 97,84
II.A5	25,07	19,48 - 29,24	V.2	106,6	94,8 - 118,5
II.A7	4,66	4,04 - 5,72	V.3	44,56	37,84 - 59,99
II.C2	170,2	143,8 - 218,8	VI.1	63,84	58,12 - 69,07
Ácido benzoico	> 1000	-	Ác. 4-cloro benzoico	389,8	370,7 - 408,9
Tiabendazol				363,8	282,5 - > 400

X. Bibliografía

X. BIBLIOGRAFÍA

I. Introducción

I.1 - Cáncer

1 - National Cancer Institute (NCI); United States National Institutes of Health. *What is Cancer?* <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer> Recurso electrónico, **2012**.

2 - Asociación Española contra el Cáncer (AECC). *Sobre el cáncer*. Recurso electrónico, **2012**. www.aecc.es/SobreElCancer/elcancer/Paginas/Elcancer.aspx

3 - D. Hanahan, R.A. Weinberg. *The hallmarks of cancer*. *Cell*, **2000**; *100*: 57-70.

4 - Datos estadísticos sobre defunciones. Aplicaciones de consulta del Sistema Nacional de Salud. Instituto de Información Sanitaria del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España. Recurso electrónico, **2012**. <http://pestadistico.msc.es/PEMSC25/>

5 - Zentrum für Krebsregisterdaten. Robert Koch Institut, Berlin. *Krebs in Deutschland 2007/2008*, **2012**.

6 - National Vital Statistics System, United States Department of Health and Human Services. *Deaths: Final Data for 2008*. National Vital Statistics Reports, **2011**; 59(10).

7 - International Agency for Research on Cancer (IARC). *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base N° 10. GLOBOCAN 2008 v1.2*. Recurso electrónico, **2010**. <http://globocan.iarc.fr>

8 - Regionaldatenbank Deutschland. *Statistische Ämter des Bundes und der Länder, Deutschland*. Recurso electrónico, **2012**. Datos en “*Tabellen: 173-01-4 Bevölkerungsbestand*” www.regionalstatistik.de/genesis/online/logon

9 - Instituto Nacional de Estadística del Gobierno de España. *Población por capitales de provincia*. Recurso electrónico, **2012**. www.ine.es/jaxi/tabla.do

10 - V.N. Anisimov. *Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon*. *Mechanisms of ageing and development*. **2009**, *130*: 105-121.

11 - American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. Recurso electrónico, **2012**). www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index

- 12 - E. Ardanaz, C. Moreno-Iribas, M.E. Gonzalez de Rada, C. Ezponda, Y. Floristán, N. Navaridas, J.M. Peñuela, A. Puras, M. Santamaría, I. Ezpeleta, J.J. Valerdi, F.J. Pardo, F.J. Monzón, J. Lizarraga, C. Ortigosa, J. Resano, A. Barricarte. *Incidencia y mortalidad por cáncer en Navarra, 1.998–2.002. Evolución en los últimos 30 años*. Anales del sistema sanitario de Navarra, **2007**; 30: 245-270.
- 13 - *Largest cities without surrounding suburban areas*. Geohive global population statistics. Recurso electrónico, **2010**. http://www.geohive.com/earth/cy_notagg.aspx
- 14 - R. Ruddon. *Cancer Biology*. Oxford University Press; **2007**, Fourth Edition.
- 15 - M. Jakóbsiak, W. Lasek, J. Golab. *Natural mechanisms protecting against cancer*. Immunology Letters, **2003**, 90: 103-122.
- 16 - J.E. Trosko, M-H. Tai. *Adult stem cell theory of the multi-stage, multi-mechanism theory of carcinogenesis: Role of inflammation on the promotion of initiated stem cells*. Infections and Inflammation: Impacts on Oncogenesis. Contributions to Microbiology. **2006**, 13: 45-65.
- 17 - M. Cascales Angosto. *Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad*. Instituto de España, **1999**.
- 18 - V.J. Coglianò, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, C.P. Wild. *Preventable exposures associated with human cancers*. Journal of National Cancer Institute. **2011**, 103(24): 1827-1839.
- 19 - E. Sage, P-M. Girard, S. Francesconi. *Unravelling UVA-induced mutagenesis*. Photochemical & Photobiological Sciences, **2012**, 11(1): 74-80.
- 20 - National Toxicology Programm. U.S. Department of Health and Human Services. *12th Report on Carcinogens*. **2011**.
- 21 - M. Yang. *A current global view of environmental and occupational cancers*. Journal of Environmental Science and Health, **2011**, 29: 223-249.
- 22 - D.G. Evans. *Genetic predisposition to cancer*. Medicine, **2012**, 40(1): 29-33.
- 23 - J. Flórez. *Farmacología humana*. Elsevier & Masson. **2008**, 5^a Edición.
- 24 - American Cancer Society. Types of treatments. Recurso electrónico, **2012**. <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/TreatmentTypes/index>
- 25 - R. Airley. *Cancer chemotherapy*. Wiley-Blackwell, **2009**, 1st Edition.
- 26 - B.A. Chabner, D.L. Longo. *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practices*. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins, **2006**, 4th Edition.
- 27 - W.T. Purcell, D.S. Ettinger. *Novel antifolate drugs*. Current Oncology Reports, **2003**, 5(2):114-125.

- 28 - M. Malet-Martino, R. Martino. *Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1)*. *The Oncologist*, **2002**, 7(4): 288-323.
- 29 - B.S. Chhikara, K. Parang. *Development of cytarabine prodrugs and delivery systems for leukaemia treatment*. *Expert Opinions in Drug Delivery*. **2010**, 7(12): 1399-1414.
- 30 - W.B. Parker, J.A. Secrist, W.R. Waud. *Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer*. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **2004**, 5(6): 592-596.
- 31 - P. Navarra. *Hydroxyurea: new insights on an old drug*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **1999**, 29(3): 249-255.
- 32 - L.F. Povirk, D.E. Shuker. *DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards*. *Mutation Research*, **1994**, 318(3): 205-226.
- 33 - C. Monneret. *Platinum anticancer drugs: from serendipity to rational design*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **2011**, 69(6): 286-295.
- 34 - S. Sertel, Y. Fu, Y. Zu, B. Rebacz, B. Konkimalla, P.K. Plinkert, A. Krämer, J. Gertsch, T. Efferth. *Molecular docking and pharmacogenomics of Vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharantine*. *Biochemical Pharmacology*, **2011**, 81(6): 723-735.
- 35 - I. Ojima, M. Das. *Recent advances in the chemistry and biology of new generation taxoids*. *Journal of Natural Products*, **2009**, 72(3): 554-565.
- 36 - B.A. Teicher. *Next generation topoisomerase I inhibitors: rationale and biomarker strategies*. *Biochemical Pharmacology*, **2008**, 75(6): 1262-1271.
- 37 - International Agency for Research on Cancer. *IARC Monograph DNA Topoisomerase II Etoposide*. *IARC Monographs*, **2000**, 76(10): 177-258.
- 38 - International Agency for Research on Cancer. *IARC Monograph DNA Topoisomerase II Teniposide*. *IARC Monographs*, **2000**, 76(11): 259-288.
- 39 - G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni. *Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. *Pharmacological Reviews*, 2004, 56(2): 185-229.
- 40 - International Agency for Research on Cancer. *IARC Monograph DNA Topoisomerase II Mitoxantrone*. *IARC Monographs*, **2000**, 76(12): 289-316.
- 41 - R.O. Dillman. *Cancer immunotherapy*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacology*, **2011**, 26(1): 1-64.
- 42 - J.N. Ingle. *Sequencing of hormonal therapy in breast cancer*. *The Breast Journal*, **2002**, 8(6): 332-337.

43 - L.N. Johnson. *Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds*. Quarterly Reviews of Biophysics, **2009**, 42(1): 1-40.

I.2 - Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

44 - J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer, **1972**, 26(4): 239-257.

45 - E. Ulukaya, C. Acilan, Y. Yilmaz. *Apoptosis: why and how does it occur in biology?* Cell Biochemistry and Function, **2011**, 29(6): 468-480.

46 - Z. Jin, W.S. El-Deiry. *Overview of cell death signalling pathways*. Cancer Biology and Therapy, **2005**, 4(2): 139-163.

47 - J.F. Curtin, T.G. Cotter. *Essays in Biochemistry*; Chapter 1: *Historical perspectives*. Edited by T.G. Cotter, Portland Press, **2003**.

48 - J.V. McCarthy. *Essays in Biochemistry*; Chapter 2: *Apoptosis and development*. Edited by T.G. Cotter, Portland Press, **2003**.

49 - Y. Sun, Z.L. Peng. *Programmed cell death and cancer*. Postgraduate Medical Journal, **2009**, 85(1001): 134-140.

50 - Genetic Home Reference. *The process of apoptosis*. United States National Library of Medicine, United States National Institutes of Health. ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosisprocess (*Recurso electrónico*, **2012**).

51 - Z. Zakeri, C. Penalzoa, S. Orlanski, Y. Ye, T. Entezari-Zaher, M. Javdan. *Cell death in mammalian development*. Current Pharmaceutical Design, **2008**; 14(2): 184-196.

52 - E.O. Gómez, A. Zentella. *Apoptosis y muerte celular programada*. BEB, **1997**; 7(3):105-114.

53 - L. Galluzi, T. Vanden Berghe, N. Vanlangenakker, S. Buettner, T. Eisenberg, P. Vandenabeele, F. Madeo, G. Kroemer. *Programmed necrosis from molecules to health and disease*. International Review of Cell and Molecular Biology, **2011**, 289: 1-35.

54 - J. Yuan, G. Kroemer. *Alternative cell death mechanisms in development and beyond*. Genes and Development, **2011**, 24(23): 2592-2602.

55 - G. Kung, K. Konstantinidis, R.N. Kitsis. *Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart*. Circulation Research, **2011**, 108(8): 1017-1036.

56 - M. Djavaheri-Mergny, J. Botti, P. Codogno. *Apoptosis, Senescence and Cancer*, Chapter 5: *Autophagy and autophagic cell death*. Edited by D.A. Gewirtz, S.E. Holt, S. Grant. Humana Press, **2007**.

57 - G. Häcker. *The morphology of apoptosis*. *Cell tissue research*, **2000**; *301*: 5-17.

58 - *Final stage of apoptosis*. *Genetic Home Reference* de la United States National Library of Medicine, United States National Institutes of Health. (*Recurso electrónico*, **2012**), ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage.

59 - M. Movassagh, R.S. Foo. *Simplified apoptotic cascades*. *Heart Failure Review*, **2008**; *13*: 111-119.

60 - M.S. Ricci, W.S El-Deiry. *Apoptosis, Senescence and Cancer*, Chapter 2: *The extrinsic pathway of apoptosis*. Edited by D.A. Gewirtz, S.E. Holt, S. Grant. Humana Press, **2007**.

61 - S.H. Kaufmann. *Apoptosis, Senescence and Cancer*, Chapter 2: *The intrinsic pathway of apoptosis*. Edited by D.A. Gewirtz, S.E. Holt, S. Grant. Humana Press, **2007**.

62 - D.J. Smith, H. Ng, R.M. Kluck, P. Nagley. *The mitochondrial gateway to cell death*. *IUBMB Life*, **2008**, *60*(6): 383-389.

63 - E.D. Crawford, J.A. Wells. *Caspase substrates and cellular remodelling*. *Annual Review of Biochemistry*, **2011** *80*: 1055-1087.

64 - I. Chowdury, B. Tharakan, G.K. Bhat. "Caspases - An update". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **2008**, *151*(1): 10-27.

1.3 Radicales libres y estrés oxidativo

65 - *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Editado por M. Konigsberg Fainstein. Editorial Manual Moderno, **2008**.

66 - D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, M.I. Panayiotidis. *Reactive oxygen species (ROS) induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis*. *Mutation Research*, **2011**, *711*(1-2): 167-173.

67 - L. Khandrika, B. Kumar, S. Koul, P. Maroni, H.K. Koul. *Oxidative stress in prostate cancer*. *Cancer Letters*, **2009**, *282*(2): 125-136.

68 - M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2007**, *39*(1): 44-84.

- 69 - M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-Biological Interactions, **2006**, 160(1): 1-40.
- 70 - J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, B.A. Hocevar. *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicologic Pathology, **2010**, 38: 96-109.
- 71 - J.K. Willcox, S.L.Ash, G.L. Catignani. *Antioxidants and prevention of chronic disease*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **2004**, 44(4): 275-295.
- 72 - Z. Durackova. *Some current insights into oxidative stress*. Physiological Research, **2010**, 59(4): 459-469.
- 73 - D.P. Jones. *Radical-free biology of oxidative stress*. American Journal of Physiology and Cell Physiology, **2008**, 295(4): C849-C868.
- 74 - R.A Roberts, D.L. Laskin, C.V. Smith, F.M. Robertson, E.M.G. Allen, J.A. Doorn, W. Slikker. *Nitrative and oxidative stress in toxicology and disease*. Toxicological Sciences, **2009**, 112(1): 4-16.
- 75 - J. Betteridge. *What is oxidative stress?* Metabolism, **2000**, 49(2): 3-8.
- 76 - C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, F. Lemaître, *Electrochemical monitoring of single cell secretion: vesicular exocytosis and oxidative stress*. Chemical Reviews, **2008**, 208(7): 2585-2621.
- 77 - J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell. *Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future*. Annals of the New York Academy of Sciences, **2000**, 899: 136-147.
- 78 - L. Chen, J.Y. Hu, S.Q. Wang. *The role of antioxidants in photoprotection: a critical review*. Journal of the American Academy of Dermatology, **2012**.
- 79 - M.P. Murphy. *How mitochondria produce reactive oxygen species*. The Biochemical Journal, **2009**, 417(1): 1-13.
- 80 - G.R. Buettner. *Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide*. Anticancer agents in medicinal chemistry, **2011**, 11(4): 341-346.
- 81 - D.R. Gough, T.G. Cotter. *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule*. Cell Death and Disease, **2011**, 2, 213.
- 82 - B. Lipinski. *Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, **2011**, 2011.
- 83 - C. Thomas, M.M. Mackey, A.A. Diaz, D.P. Cox. *Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation*. Redox Report: Communications in Free Radical Research, **2009**, 14(3): 102-108.

- 84 - T. Roszer. *The role of subcellular nitric oxide*. Editorial Springer, **2012**.
- 85 - G.L. Squadrito, W.A. Pryor. *Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide*. *Free Radical Biology and Medicine*, **1998** 25(4-5): 392-403.
- 86 - G. Ferrer-Sueta, R. Radi. *Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion and radicals*. *ACS Chemical Biology*, **2009**, 4(3): 161-177.
- 87 - E.C. Kennett, M.J. Davies. *Degradation of extracellular matrix by peroxynitrite/peroxynitrous acid*. *Free Radical Biology and Medicine*, **2008**, 45(5): 716-725.
- 88 - H. Rubbo, A. Trostchansky, V.B. O'Donnell. *Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2009**, 484(2): 167-172.

I.4 Selenio

- 89 - S. Dodig, I. Cepelak. *The facts and controverses about selenium*. *Acta Pharmaceutica*, **2004**, 54(4): 261-276.
- 90 - J.J. Berzelius. *Chemische Entdeckungen im Mineralreiche, gematch zu Fahlun in Schweden: Selenium ein neuer metallartiger Körper, Lithon ein neues Alkali, Thorina eine neue Erde*. *Annalen der Physik*, **1818**.
- 91 - N.N. Greenwood, A. Earnshaw. *Chemistry of the Elements*. Butterworth Heinemann. 2nd Edition. **1998**.
- 92 - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for Selenium*. United States Department of Health and Human Services, **2003**.
- 93 - George, M.W. 2010 Minerals Yearbook: Selenium and Tellurium. *United States Geological Survey; United States Department of Interior*. **2011**.
- 94 - George, M.W. 2011 Mineral Commodity Summaries: Selenium. *United States Geological Survey; United States Department of Interior*. **2011**.
- 95 - L. Fishbein. *Environmental selenium and its significance*. *Fundamental and Applied Toxicology*, **1983**, 3(5): 411-419.
- 96 - J.E. Spallholtz. *On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity*. *Free Radical Biology and Medicine*, **1994**, 17(1): 45-64.
- 97 - K. Schwarz, C.M. Foltz. *Selenium as an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration*. *Journal of the American Chemical Society*, **1957**, 79(12): 3292-3293.

98 - Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. United States National Institutes of Health. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Recurso electrónico, **2000**.

99 - S.J. Fairweather-Tait, Y. Bao, M.R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J.E. Hesketh, R. Hurst. *Selenium in human health and disease*. Antioxidants and Redox Signaling, **2011**, 14(7): 1337-1383.

100 - G.F. Combs, W. P. Gray. *Chemopreventive Agents: Selenium*. Pharmacology and Therapeutics, **1998**, 79(3): 179-192.

101 - Office of Dietary Supplements. United States National Institutes of Health. *Dietary Supplement Fact Sheet: Selenium*. Recurso electrónico, **2012** <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/#h6>

102 - O.A. Levander, M.A. Beck. *Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E*. Biological Trace Element Research, **1997**, 56(1): 5-21.

103 - M.A. Beck, O.A. Levander, J. Handy. *Selenium deficiency and viral infection*. The Journal of Nutrition, **2003**, 133(5, Suppl): 1463S-1467S.

104 - H.D. Foster. *Cretinism: The Iodine-Selenium Connection*. Journal of Orthomolecular Medicine, **1995**; 10(3-4): 139-144.

105 - Y. Yao, F. Pei, P. Kang. *Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease*. Nutrition, **2011**, 27(11-12): 1095-1100.

106 - M. Navarro-Alarcón, C. Cabrera-Vique. *Selenium in food and the human body: A review*. The Science of the Total Environment, **2008**, 400(1-3): 115-141.

107 - J.P. Díaz-Alarcón, M. Navarro-Alarcón, H. López-García de la Serrana, M.C. López-Martínez. *Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from south eastern Spain for calculation of daily dietary intake*. The Science of the Total Environment, **1996**, 184(3): 183-189.

108 - M.P. Rayman, H.G. Infante, M. Sargent. *Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation*. British Journal of Nutrition, **2008**, 100(2). 238-253.

109 - M.P. Rayman. *Selenium and human health*. Lancet, **2012**, 379(9822): 1256-1268.

110 - R.R. Ramoutar, J.L. Brumaghin. *Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur and oxo-selenium compounds*. Cell Biochemistry and Biophysics, **2010**, 58(1): 1-23.

111 - H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew. *The antioxidant role of selenium and selenocompounds*. Biomedicine & Pharmacotherapy, **2003**, 57: 134-144.

112 - R. Abdulah, K. Miyazaki, M. Nakazawa, H. Koyama. "Chemical forms of selenium for cancer prevention". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2005**, 19: 141-150.

113 - G.N. Schrauzer. *The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine*. *Advances in Food and Nutrition Research*, **2003**; 47: 73-112.

114 - G.N. Schrauzer. *Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity*. *Journal of Nutrition*, **2000**; 130: 1653-1656.

115 - A.A. Turanov, X.M. Xu, M.H. Yoo, V.N. Gladyshev, D.L. Haltfield. *Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis*. *Advances in Nutrition*, **2011**, 2(2): 122-128.

116 - M. Gupta, P.R. Copeland. *Functional analysis of the interplay between translation termination, selenocysteine codon context, and selenocysteine insertion sequence-binding protein-2*. *Journal of Biological Chemistry*, **2007**; 282(51): 36797-36807.

117 - J. Lu, A. Holmgren. *Selenoproteins*. *The Journal of Biological Chemistry*, **2009**, 284(2): 723-727.

118 - F.P. Bellinger, A.V. Raman, M.A. Reeves, M.J. Berry. *Regulation and function of selenoproteins in human disease*. *The Biochemical Journal*, **2009**, 422(1): 11-22.

119 - Y. Dong, D. Lisk, E. Block, C. Ip. *Characterization of the biological activity of γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic*. *Cancer Research*, **2001**, 61(7): 2923-2928.

120 - J.R. Marshall, C. Ip, K. Romano, G. Fetterly, M. Fakih, B. Jovanovic, M. Perloff, J. Crowell, W. Davis, R. French-Christy, A. Dew, M. Coomes, R. Bergan. *Methylselenocysteine: single dose pharmacokinetics in men*. *Cancer Prevention Research*, **2011**, 4(11): 1938-1944.

121 - H. Steinbrenner, H. Sies. *Protection against reactive oxygen species by selenoproteins*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 1790(11): 1478-1485.

122 - R.F. Burk, K.E. Hill. *Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis*. *Annual Review of Nutrition*, **2005**, 25: 215-235.

123 - P.D. Whanger. *Selenoprotein expression and function - selenoprotein W*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 1790(11): 1448-1452.

124 - L. Patrick. *Selenium and Cancer: A review of the literature*. *Alternative Medicine Review*, **2004**, 9(3): 239-258.

125 - K.A. Francesconi, F. Pannier. *Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status*. *Clinical Chemistry*, **2004**, 50(12): 2240-2253.

126 - R.F. Burk, K.E. Hill. *Selenoprotein P-expression, functions and roles in mammals*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 17905(11): 1441-1447.

127 - C. Sanmartín, D. Plano, J.A. Palop. *Selenium and clinical trials: new therapeutic evidence for multiple diseases*. *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18(30): 4635-4650.

128 - L. Kiremidjian-Schumacher, M. Roy. *Selenium and immune function*. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **1998**, 37(1): 50-56.

129 - M.P. Rayman. *The importance of selenium to human health*. *Lancet*, **2000**, 356(9225): 233-241.

130 - C.A. Stone, K. Kawai, R. Kupka, W.W. Fawzi. *Role of selenium in HIV infection*. *Nutrition Reviews*, **2010**, 68(11): 671-681.

131 - M. Loeff, G.N. Schrauzer, H. Walach. *Selenium and Alzheimer's disease: a systematic review*. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2011**, 26(1): 81-104.

132 - S. Zhang, C. Rocourt, W.H. Cheng. *Selenoproteins and the aging brain*. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2010**, 131(4): 253-260.

133 - J.A. Pasco, F. N. Jacka, L.J. Williams, M. Evans-Cleverdon, S.L. Brennan, M.A. Kotowicz, G.C. Nicholson, M.J. Ball, M. Berk. *Dietary selenium and major depression: a nested case-control study*. *Complementary Therapies in Medicine*, **2012**, 20(3): 119-123.

134 - M.G. Boosalis. *The role of selenium in chronic disease*. *Nutrition in Clinical Practice*, **2008**, 23(8): 152-160.

135 - G. Flores-Mateo, A. Navas-Acien, R. Pastor-Barriuso, E. Guallar. *Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2006**, 84(4): 762-773.

136 - M.P. Rayman, S. Stranges, B.A. Griffin, R. Pastor-Barriuso, E. Guallar. *Effect of supplementation with high-selenium yeast on plasma lipids: a randomized trial*. *Annals of Internal Medicine*, **2011**, 154(10): 656-665.

137 - R.L. Norton, P.R. Hoffman. *Selenium and asthma*. *Molecular Aspects of Medicine*, **2012**, 33(1): 98-106.

138 - P.H. Canter, B. Wider, E. Ernst. *The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials*. *Reumatology*, **2007**, 46(8): 1223-1233.

139 - H.D. Mistry, F. Broughton Pipkin, C.W. Redman, L. Poston. *Selenium in reproductive health*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **2012**, 206(1): 21-30.

140 - K.L. Morgan. *Genetic and pharmacologic analysis of the mechanisms of selenium toxicity in Caenorhabditis elegans*. Tesis Doctoral, University of Pittsburgh, **2001**.

141 - W.H. Li, F.L. Hsu, J.T. Liu, V.H. Liao. *The ameliorative and toxic effects of selenite on Caenorhabditis elegans*. Food and Chemical Toxicology, **2011**, 49(4): 812-819.

142 - Maggenti, A. *General Nematology*. Springer Verlag. 1st Edition, **1981**.

143 - B. Gottstein, E. Pozio, K. Nöckler. *Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis*. Clinical Microbiology Reviews, **2009**, 22(1): 127-145.

144 - K. Darwin Murrel, E. Pozio. *Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009*. Emerging Infectious Diseases, **2011**, 17(12): 2194-2202.

145 - N.S. Hochberg, D.H. Hamer. *Anisakidosis: perils of the deep*. Clinical Infectious Diseases, **2010**, 51(7): 806-812.

146 - A. Valls, C.Y. Pascual, M. Martín-Esteban. *Anisakis and anisakiosis*. Allergologia et immunopathologia, **2003**, 31(6): 348-355.

147 - A. Daschner, C.Y. Pascual. *Anisakis simplex: sensitization and clinical allergy*. Current Opinions in Allergy and Clinical Immunology, **2005**, 5(3): 281-285.

148 - S. Brooker, J. Bethony, P.J. Hotez. *Human hookworm infection in the 21st century*. Advances in Parasitology, **2004**, 58: 197-288.

149 - E. Ruiz-Tiben; D.R. Hopkins. *Dracunculiasis (Guinea worm disease) eradication*. Advances in Parasitology, **2006**, 61: 275-309.

150 - L.S. Stephenson, C.V. Holland, E.S. Cooper. *The public health significance of Trichuris trichiura*. Parasitology, **2000**, 121(Suppl.): S73-S95.

151 - A. Chandy, A.S. Thakur, M.P. Singh, A. Manigauha. *A review of neglected tropical diseases: filariasis*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, **2011**, 4(7): 581-586.

152 - D. Despommier. *Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects*. Clinical Microbiology Reviews, **2003**, 16(2): 265-272.

II. Antecedentes y Justificación

II.1 Selenio y cáncer

153 - S.A. Navarro Silvera, T.E. Rohan. *Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence*. *Cancer Causes Control*, **2007**, 18(1): 7-27.

154 - P.D. Whanger. *Selenium and its relationship to cancer: an update*. *British Journal of Nutrition*, **2004**, 91(1): 11-28.

155 - G.N. Schrauzer, D.A. White, C.J. Schneider. *Cancer mortality correlation studies III: statistical associations with dietary selenium intakes*. *Bioinorganic Chemistry*, **1977**; 7(1): 23-31.

156 - L.C. Clark, K.P. Cantor, W.H. Allaway. *Selenium in forage crops and cancer mortality in U.S. counties*. *Archives of Environmental Health*, **1991**, 46(1): 37-42.

157 - S.Y. Yu, Y.J. Chu, X.L. Gong, C. Hou, W.G. Li, H.M. Gong, J.R. Xie. *Regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China*. *Biological Trace Element Research*, **1985**, 7(1): 21-29.

158 - W.C. Willet. *Selenium, vitamin E, fiber, and the incidence of human cancer: an epidemiologic perspective*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1986**, 206: 27-34.

159 - M. Brinkman, R.C. Reulen, E. Kellen, F. Buntinx, M.P. Zeegers. *Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?* *European Journal of Cancer*, **2006**, 42(15): 2463-2471.

160 - C.M. López-Fontana, R.F. Pérez Elizalde, M.C. Vanrell, G.M. Recalde, A.L. Uvilla, J.D. López Laur. *Relation between selenium plasma levels and different prostatic pathologies*. *Actas Urológicas Españolas*, **2010**, 34(7): 625-629.

161 - L.C. Clark, L.J. Hixson, G.F. Combs Jr, B.W. Turnbull, R.E. Sampliner. *Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **1993**, 2(1): 41-46.

162 - A.F. Amaral, M. Porta, D.T. Silverman, R.L. Milne, M. Kogevinas, N. Rothman, K.P. Cantor, B.P. Jackson, J.A. Pumarega, T. López, A. Carrato, L. Guarner, F.X. Real, N. Malats. *Pancreatic cancer risk and levels of trace elements*. *Gut*, **2011**, Epub ahead of print.

163 - M.C. Camargo, R.F. Burk, L.E. Bravo, M.B. Piazuelo, K.E. Hill, E.T. Fontham, A.K. Motley, M.C. Yepez, Y. Mora, B.G. Schneider, P. Correa. *Plasma selenium measurements in subjects from areas with contrasting gastric cancer risks in Colombia*. *Archives of Medical Research*, **2008**, 39(4): 443-451.

164 - P.A. van den Brandt, R.A. Goldbohm, P. van't Veer, P. Bode, E. Dorant, R.J. Hermus, F. Sturmans. *A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer*. *Cancer Research*, **1993**, 53(20): 4860-4865.

165 - L. Björkhem-Bergman, U.B. Torndal, S. Eken, C. Nyström, A. Capitanio, E.H. Larsen, M. Björnsted, L.C. Eriksson. *Selenium prevents tumor development in a rat model for chemical carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, **2005**, 26(1): 125-131.

166 - N. Alwahaibi, J. Mohamed, A. Alhamadani. *Supplementation of selenium reduces chemical hepatocarcinogenesis in male Sprague-Dawley rats*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2010**, 24(2): 119-123.

167 - R.K. Das, S. K. Hossain, S. Bhattacharya. *Diphenylmethyl selenocyanate inhibits DMBA-croton oil induced two-stage mouse skin carcinogenesis by inducing apoptosis and inhibiting cutaneous cell proliferation*. *Cancer Letters*, **2005**, 230(1): 90-101.

168 - Y. Feng, J.W. Finley, C.D. Davis, W.K. Becker, A.J. Fretland, D.W. Hein. *Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1999**, 157(1): 36-42.

169 - H. Takada, T. Hirooka, T. Hatano, Y. Hamada, M. Yamamoto. *Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lipid peroxidation and mammary tumor development in rats by vitamin E in conjunction with selenium*. *Nutrition and Cancer*, **1992**, 17(2): 115-122.

170 - E.H. Lee, S.K. Myung, Y.J. Jeon, Y. Kim, Y.J. Chang, W. Ju, H.G. Seo, B.Y. Huh. *Effects of selenium supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials*. *Nutrition and Cancer*, **2011**, 63(8): 1185-1195.

171 - J.Y. Li, P.R. Taylor, B. Li, S. Dawsey, G.Q. Wang, A.G. Ershow, W. Guo, S.F. Liu, C.S. Yang, Q. Shen, W. Wang, S.D. Mark, X.N. Zou, P. Greenwald, Y.P. Wu, W.J. Blot. *Nutrition intervention trials in Linxian, China: multiple vitamin / mineral supplementation, cancer incidence, and disease-specific mortality among adults with esophageal dysplasia*. *Journal of the National Cancer Institute*, **1993**, 85(18): 1492-1498.

172 - W.J. Blot, J.Y. Li, P.R. Taylor, W. Guo, S. Dawsey, G.Q. Wang, C.S. Yang, S.F. Zheng, M. Gail, G.Y. Li, Y. Yu, B.Q. Liu, J. Tangrea, Y.H. Sun, F. Liu, J.F. Fraumeni, Y.H. Zhang, B. Li. *Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population*. *Journal of the National Cancer Institute*, **1993**, 85(18): 1483-1492.

173 - S.Y. Yu, Y.J. Zhu, W.G. Li. *Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong*. *Biological Trace Elements Research*, **1997**, 56(1): 117-124.

174 - S.Y. Yu, Y.J. Zhu, W.G. Li, Q.S. Huang, C.Z. Huang, Q.N. Zhang, C. Hou. *A preliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high risk populations with nutritional supplementation of selenium in China*. *Biological Trace Elements Research*, **1991**, 29(3): 289-294.

175 - L.C. Clarck, G.F. Combs Jr, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Krongrad, J.L. Leshner Jr, H.K. Park, B.B. Sanders Jr, C.L. Smith, J.R. Taylor. *Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer study group*. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, **1996**, 276(24): 1957-1963.

176 - L.C. Clarck, B. Dalkin, A. Krongrad, G.F. Combs Jr, B.W. Turnbull, E.H. Slate, R. Witherington, J.H. Herlong, E. Janosko, D. Carpenter, C. Borosso, S. Falk, J. Rounder. *Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial*. *British Journal of Urology*, **1998**, 81(5): 730-734.

177 - A.J. Duffield-Lillico, B.L. Dalkin, M.E. Reid, B.W. Turnbull, E.H. Slate, E.T. Jacobs, J.R. Marshall, L.C. Clark. *Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer trial*. *BJU International*, **2003**, 91(7): 608-612.

178 - E.A. Klein, I.M. Thompson, S.M. Lippman, P.J. Goodman, D. Albanes, P.R. Taylor, C. Coltman. *SELECT: the Selenium and Vitamin E cancer prevention trial: rationale and design*. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **2000**, 3(3): 145-151.

179 - S.M. Lippman, E.A. Klein, P.J. Goodman, M.S. Lucia, I.M. Thompson, L.G. Ford, H.L. Parnes, L.M. Minasian, J.M. Graziano, J.A. Hartline, J.K. Parsons, J.D. Bearden, E.D. Crawford, G.E. Goodman, J. Claudio, E. Winquist, E.D. Cook, D.D. Karp, P.J. Walther, M.M. Lieber, A.R. Kristal, A.K. Darke, K.B. Arnold, P.A. Ganz, R.M. Santella, D. Albanes, P.R. Taylor, J.L. Probstfield, T.J. Jagpal, J.J. Crowley, F.L. Meyskens, L.H. Baker, C.A. Coltman. *Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers. The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. *JAMA, the Journal of the American Medical Association*. **2009**, 301(1): 39-51.

180 - E.A. Klein, I.M. Thompson, C.M. Tangen, J.J. Crowley, M.S. Lucia, P.J. Goodman, L.M. Minasian, L.G. Ford, H.L. Parnes, J.M. Graziano, D.D. Karp, M.M. Lieber, P.J. Walther, L. Klotz, J.K. Parsons, J.L. Chin, A.K. Darke, S.M. Lippman, G.E. Goodman, F.L. Meyskens, L.H. Baker. *Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. *JAMA, the Journal of the American Medical Association*. **2011**, 306(14): 1549-1556.

181 - B.K. Dunn, E.S. Richmond, L.M. Minasian, A.M. Ryan, L.G. Ford. *A nutrient approach to prostate cancer prevention: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. *Nutrition and Cancer*, **2010**, 62(7): 896-918.

182 - K. El-Bayoumi. *The negative results of the SELECT study do not necessarily discredit the selenium-cancer prevention hypothesis.* Nutrition and Cancer, **2009**, 61(3): 285-286.

183 - Y. Wei, X. Cao, Y. Ou, J. Lu, C. Xing, R. Zheng. *SeO₂ induces apoptosis with downregulation of Bcl-2 and up-regulation of p53 expression in both immortal human hepatic cell line and hepatoma cell line.* Mutation Research, **2001**, 490(2): 113-121.

184 - V. Kralova, S. Benesova, M. Cervinka, R. Rudolf. *Selenite-induced apoptosis and autophagy in colon cancer cells.* Toxicology in vitro, **2012**, 26(2): 258-268.

185 - S.H. Park, J.H. Kim, G.Y. Chi, G.Y. Chang, S.K. Moon, S.W. Nam, W.J. Kim, Y.H. Yoo, Y.H. Choi. *Induction of apoptosis and autophagy by sodium selenite in A549 human lung carcinoma cells through generation of reactive oxygen species.* Toxicology Letters, **2012**, 212(3): 252-261.

186 - X.J. Chen, F.D. Duan, H.H. Zhang, Y. Xiong, J. Wang. *Sodium selenite-induced apoptosis mediated by ROS attack in human osteosarcoma U2OS cells.* Biological Trace Elements Research, **2012**, 145(1): 1-9.

187 - J. Brozmanová, D. Mániková, V. Vlcková, M. Chovanec. *Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer.* Archives of Toxicology, **2010**, 84(12): 919-938.

188 - G. Peyroche, C. Saveanu, M. Dauplais, M. Lazard, F. Beuneu, L. Decourty, C. Malabat, A. Jacquier, S. Blanquet, P. Plateau. *Sodium selenide toxicity is mediated by O₂-dependent DNA breaks.* PloS One, **2012**, 7(5): 1-11.

189 - H. Zeng, M. Briske-Anderson, M. Wu, M.P. Moyer. *Methylselenol, a selenium metabolite, plays common and different roles in cancerous colon HCT116 cells and noncancerous NCM460 colon cell proliferation.* **2012**, 6481): 128-135.

190 - H. Zeng, M. Wu, J.H. Botnen. *Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signalling genes.* The Journal of Nutrition, **2009**, 139(9): 1613-1618.

191 - I. Sinha, K. Null, W. Wolter, M.A. Suckow, T. King, J.T. Pinto, R. Sinha. *Methylseleninic acid downregulates hypoxia-inducible factor-1 α in invasive prostate cancer.* International Journal of Cancer, **2012**, 130(6): 1430-1439.

192 - S. Yin, Y. Dong, J. Li, L. Fan, L. Wang, J. Lu, O. Vang, H. Hu. *Methylseleninic acid potentiates multiple types of cancer cells to ABT-737-induced apoptosis by targeting Mcl-1 and Bad.* Apoptosis, **2012**, 17(4): 388-399.

193 - K. Lunøe, C. Gabel-Jensen, S. Stürup, L. Andresen, S. Skov, B. Gammelgaard. *Investigation of the selenium metabolism in cancer cell lines.* Metallomics, **2011**, 3(2): 162-168.

194 - T. Chen, Y.S. Wong. *Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells*. Biomedicine and Pharmacotherapy, **2009**, 63(2): 105-113.

195 - A. Bhattacharya. *Methylselenocysteine: a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer agents*. Expert Opinion and Drug Delivery, **2011**, 8(6): 749-763.

196 - Z. Li, L. Carrier, A. Belame, A. Thiagarajah, V.A. Salvo, M.E. Burow, B.G. Rowan. *Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis*. Breast Cancer Research Treatment, **2009**, 118: 33-43.

197 - D. Plano. *Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados organoselénicos con actividad citotóxica y apoptótica*. Tesis Doctoral, Universidad de Navarra. **2010**.

198 - T. Posser, M.T. de Paula, J.L. Franco, R.B. Leal, J.B. da Rocha. *Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Archives of Toxicology, **2011**, 85(6): 645-651.

199 - F. Nedel, V.F. Campos, D. Alves, A.J. McBride, O.A. Dellagostin, T. Collares, L. Savegnago, F.K. Seixas. *Substituted diaryl diselenides: Cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells*. Life Sciences, **2012**, 31(Epub ahead of print).

200 - C.F. Yang, H.M. Shen, C.N. Ong. *Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **2000**, 374(2): 142-152.

201 - V. Sharma, R. Tewari, U.H. Sk, C. Joseph, E. Sen. *Ebselen sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor (TNF- α)-induced apoptosis through two distinct pathways involving NF- κ B downregulation and Fas-mediated formation of death inducing signalling complex*. International Journal of Cancer, **2008**, 123(9): 2204-2212.

202 - Z.F. Peng, L.X. Lan, F. Zhao, J. Li, Q. Tan, H.W. Yin, H.H. Zeng. *A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells*.

203 - N.D. Facompre, K. El-Bayoumi, Y.W. Sun, J.T. Pinto, R. Sinha. *1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signalling in human cancer prostate cells*. Cancer Prevention Research, **2010**, 3(8): 975-984.

204 - M.I. Jackson, G.F. Combs. *Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms*. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, **2008**, 11(6): 718-726.

II.2 Azufre, selenio y nematodos

205 - A.O. Estevez, C.L. Mueller, K.L. Morgan, N.J. Szewczyk, L. Teece, A. Miranda-Vizuete, M. Estevez. *Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in Caenorhabditis elegans*. Neurotoxicology, **2012**, in press.

206 - W. Kociecka. *Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment*. Veterinary Parasitology, **2000**, 93(3-4): 365-383.

207 - A. Hoerauf, K. Pfarr, S. Mand, A. Y. Debrah, S. Spechts. *Filariasis in Africa: treatment, challenges and prospects*. Clinical Microbiology and Infection, **2011**, 17(7): 977-985.

208 - M. Albonico, Q. Bickle, M. Ramsan, A. Montresor, L. Savioli, M. Taylor. *Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections alter repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar*. Bulletin of the World Health Organization, **2003**, 81(5): 343-352.

209 - T. Schneider, A. Baldauf, L.A. Ba, V. Jamier, K. Khairan, M.B. Sarakbi, N. Reum, M. Schneider, A. Rösseler, K. Becker, T. Burkholz, P.G. Winyard, M. Kelkel, M. Diederich, C. Jacob. *Selective antimicrobial activity associated with sulphur nanoparticles*. Journal of Biomedical Nanotechnology, **2011**, 7(3): 395-405.

210 - A. A. Bah, F. Wang, Z. Huang, I. H. Shamsi, Q. Zhang, G. Julani, S. Hussain, N. Hussain, E. Ali. *Phyto-characteristics, cultivation and medicinal prospects of chinese jiaotou (Allium chinense)*. International Journal of Agriculture and Biology, **2012**, 14(4): 650-657.

211 - I. H. Choi, S. C. Shin, I.K. Park. *Nematicidal activity of onion (Allium cepa) oil and its components against the pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus)*. Nematology, **2007**, 9(2): 231-235.

212 - A. Anwar. *Natural polysulfides – reactive sulphur species from Allium with application in medicine and agriculture. Dissertattion zur erlagung des Grades der Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich*. Tesis Doctoral / PhD Tesis, Universität des Saarlandes, **2009**.

II.3 Antecedentes del grupo de investigación

213 - C. Sanmartin, M. Font, J.A. Palop. *Molecular symmetry: a structural property frequently present in new cytotoxic and proapoptotic drugs*. Minireviews in Medicinal Chemistry, **2006**, 6: 639-650.

214 - C. Sanmartín, M. Echeverría, B. Mendívil, L. Cordeu, E. Cubedo, J. García-Foncillas, M. Font, J. A. Palop. *Synthesis and evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers*. Bioorganic and Medicinal, **2005**, 13: 2031-2044.

215 - E. Cubedo, L. Cordeu, E. Bandres, A. Rebollo, R. Malumbres, C. Sanmartín, M. Font, J. A. Palop, J. García-Foncillas. *New symmetrical quinazoline derivatives selectively induce apoptosis in human cancer cells*. *Cancer Biology and Therapy*, **2006**, 5(7): 850-859.

216 - M. Font, E. Ardaiz, L. Cordeu, E. Cubedo, J. García-Foncillas, C. Sanmartín, J. A. Palop. *Structural characteristics of novel symmetrical diaryl derivatives with nitrogenated functions. Requirements for cytotoxic activity*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2006**, 14(6): 1942-1948.

217 - C. Sanmartín; D. Plano, E. Domínguez, M. Font, A. Calvo, C. Prior, I. Encío, J.A. Palop. *Synthesis and pharmacological screening of several aroyl and heteroaroil selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents*. *Molecules*, **2009**, 14: 3313-3338.

218 - D. Plano, Y. Baquedano, D. Moreno-Mateos, M. Font, A. Jiménez-Ruiz, J. A. Palop, C. Sanmartín. *Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46(8): 3315-3323.

219 - D. Plano, E. Moreno, M. Font, I. Encío, J. A. Palop, C. Sanmartín. *Synthesis and in vitro anticancer activities of some selenadiazole derivatives*. *Archiv der Pharmazie*, **2010**, 343(11-12): 680-691.

220 - E. Ibañez, D. Plano, M. Font, A. Calvo, C. Prior, J. A. Palop, C. Sanmartín. *Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio and alkylselenoimidocarbamates*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46(1): 265-274.

221 - E. Moreno, D. Plano, I. Lamberto, M. Font, I. Encío, J.A. Palop, C. Sanmartín. *Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: síntesis and study of their potential cytotoxic activity in vitro*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 47(1): 283-298.

222 - D. Moreno, D. Plano, Y. Baquedano, A. Jiménez-Ruiz, J. A. Palop, C. Sanmartín. *Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imidoselenocarbamates*. *Parasitology Research*, **2011**, 108(1): 233-239.

V. Plan de trabajo

223 - D. Plano, Y. Baquedano, E. Ibañez, I. Jiménez, J. A. Palop, J. E. Spallholtz, C. Sanmartín. *Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library*. *Molecules*, **2010**, 15(10): 7292-7312.

224 - J. Y. Kang, L. J. Costyn, T. Nagy, E. A. Cowan, C. D. Oldham, S. W. May, R. D. Arnold. *The antioxidant phenylaminoethyl selenide reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in a xenograft model of human prostate cancer*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2011**, 515(1-2): 112-119.

225 - Alexandre, J.; Nicco, C.; Chéreau, C.; Laurent, A.; Weill, B.; Goldwasser, F.; Batteux, F. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *Journal of the National Cancer Institute*, **2006**, 98 (4): 236-244

VI. Síntesis Química

226 - Sorrell, T.N. Organic Chemistry. *University Science Books*, **1999**.

227 - Klaymann, L.D.; Griffin, T.S. Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. A facile method for the introduction of selenium into organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **1973**; 95(1): 197-201.

228 - Filgueiras de Athayde-Filho, P.; de Souza, A.G.; de Morais, S.A.; Botelho, J.R.; Barbosa-Filho, J.M.; Miller, J.; Lira, B.F. Synthesis and characterization of three new organoselenium compounds. A convenient synthesis of aroylselenoglicolic acids. *Arkivoc*, **2004**; 2004(VI): 22-26.

229 - Fischer, E.; Speier, A. Darstellung der Ester. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1895**, 28 (3): 3252-3258.

VII. Análisis Orgánico

230 - E. Pretsch, P. Bühlmann, A. Affolter, A. Herrera, R. Martínez. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Editorial Masson, **2001**, quinta edición.

VIII. Valoraciones de Actividad

VIII.A Evaluación de citotoxicidad

231 - ATCC (American Type Culture Collection). *ATCC Advanced Catalog Search* <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx> Recurso electrónico, **2012**.

232 - M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, L. W. Jones. *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Investigative Urology*, **1979**, 17(1): 16-23.

233 - The p53 Web Site. *Cell lines p53 database*. Recurso electrónico, **2010**. http://p53.free.fr/Database/Cancer_cell_lines/p53_cell_lines.html

234 - D. Bello, M.M. Webber, H.K. Kleinman, D.D. Wartinger, J.S. Rhim. *Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18*. *Carcinogenesis*, **1997**, 18(6): 1215-1223.

235 - H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan. *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *Journal of the National Cancer Institute*, **1973**, 51(5): 1409-1416.

236 - D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks. *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *Journal of the National Cancer Institute*, **1973**, 51(5): 1417-1423.

237 - NCI/NIH. *Screening procedures*. National Cancer Institute, United States National Institutes of Health. United States Department of Health and Human Services. http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html Recurso electrónico, **2012**.

238 - Gram, H.C. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, **1884**, 2: 185-189.

239 - Laurila, P.; Virtanen, I.; Wartiovaara, J.; Stenman, S. Fluorescent antibodies and lectins stain intracellular structures in fixed cells treated with non-ionic detergent. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **1978**, 26 (4): 251-257

240 - B.B. Knowles, C.C. Howe, D.P. Aden. *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. *Science*, **1980**, 209(4455): 497-499.

241 - T.C. Hamilton, R.C. Young, W.M. McKoy, K.R. Grotzinger, J.A. Green, E.W. Chu, J. Whang-Peng, A.M. Rogan, W.R. Green, R.F. Ozols. *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and strogen receptors*. *Cancer Research*, **1983**, 43(11): 5379:5389.

242 - G.J. Todaro, H. Green. *Quantitative Studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. *Journal of Cell Biology*, **1963**, 17: 299-313.

243 - J.C. Hahm, I.K. Lee, W.K. Kang, S.U. Kim, Y.J. Ahn. *Cytotoxicity of neolignans identified in Saururus chinensis towards human cancer cell lines*. *Planta Medica*, **2005**, 71(5): 464-469.

244 - J.P. Van Brussel, M.A. Oomen, P.J.M. Vossebeld, E.A.C. Wiemer, P. Sonneveld, G.H.J. Mickisch. *Identification of multidrug resistance-associated protein 1 and glutathione as multidrug resistance mechanisms in human prostate cancer cells: chemosensitization with leukotriene D4 antagonists and buthionine sulfoximine*. *BJU International*, **2004**, 93(9): 1333-1338.

245 - C. Pérez-Stable. *2-Methoxyestradiol and paclitaxel have similar effects on the cell cycle and induction of apoptosis in prostate cancer cells*. *Cancer Letters*, **2006**, 231(1): 49-64.

246 - Developmental Therapeutics Program NCI/NIH. *DTP Human Tumor Cell Line Screen. The standard agents*. National Cancer Institute, United States National Institutes of Health. United States Department of Health and Human Services. http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/standard_agent_table.html Recurso electrónico, **2012**.

247 - E.M. Acton, V.L. Narayanan, P.A. Risbood, R.H. Shoemaker, D.T. Vistica, M.R. *Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1994**, 37(14): 2185-2189.

248 - J. Carmichael, J.B. Mitchell, W.G. DeGraff, J. Gamson, A.F. Gazdar, B.E. Johnson, E. Glatstein, J.D. Minna. *Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay*. *British Journal of Cancer*, **1988**, 57(6): 540-547.

249 - Y. Aoyagi, T. Kobunai, T. Utsugi, T. Oh-hara, Y. Yamada. *In vitro antitumor activity of TAS-103, a novel quinoline derivative that targets topoisomerases I and II*. *Japanese Journal of Cancer Research*, **1999**, 90(5): 578-587.

250 - S.Z. Chen, M. Jiang, Y.S. Zhen. *HERG K⁺ channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **2005**, 56(2): 212-220.

251 - C.M. Galmarini, N. Falette, E. Tabone, C. Levrat, R. Britten, N. Voorzanger-Rousselot, O. Roesch-Gateau, A. Vanier-Viorner, A. Puisieux, C. Dumontet. *Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity*. *British Journal of Cancer*, **2001**, 85(6): 902-908.

252 - J. Watanabe, T. Natsume, N. Fujio, K. Miyasaka, M. Kobayashi. *Induction of apoptosis in human cancer cells by TZT-1027, an antimicrotubule agent*. *Apoptosis*, **2000**, 5(4): 345-353.

VIII.B. Evaluación Quimiopreventiva

253 - P.T. Kissinger, W.R. Heineman. *Cyclic Voltammetry*. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60: 702-706.

254 - J. Heinze. *Cyclic Voltammetry - Electrochemical Spectroscopy*. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, **1984**, 23(11): 831-847.

255 - R.G. Compton, C.E. Banks. *Understanding Voltammetry*. World Scientific Publishing, University of Oxford. *Journal of Chemical Education*, **2007**, first edition.

256 - P. Zanello. *Inorganic Electrochemistry. Theory, practice and application*. The Royal Society of Chemistry, **2003**, first edition.

257 - P.A. Kilmartin. *Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols*. *Antioxidants and Redox Signaling*, **2001**, 3(6): 941-955.

258 - Iwaoka, M.; Tomoda, S. A model study of the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase. *Journal American Chemical Society*, **1994**, 116: 2557-2561.

259 - Sharma, O.P.; Bhat, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, **2009**, 113: 1202-1205.

260 - V. Galet, J. L. Bernier, J. P. Hènichart, D. Lesieur, C. Abadie, L. Rochette, A. Lindenbaum, J. Chalas, J. F. Renaud de la Faverie, B. Pfeiffer, P. Renard. *Benzoselenazolinone derivatives designed to be glutathione peroxidase mimetics feature inhibition of cyclooxygenase/5-lipoxygenase pathways and anti-inflammatory activity*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1994**, 37: 2903-2911.

261 - B.K. Sarma, G. Mugesh. *Glutathione peroxidase (GPx)-like antioxidant activity of the organoselenium drug ebselen: unexpected complications with thiol exchange reactions*. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127: 11477-11485.

262 - S. Kumar, L. Engman, L. Valgimigli, R. Amorati, M. G. Fumo, G. F. Pedulli. *Antioxidant profile of ethoxyquin and some of its S, Se and Te analogues*. *Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 72: 6046-6055.

VIII.C. Evaluación de nemotoxicidad

263 - Sarakbi, M. *Dissertation zur erlangung des Grades des Lizenziat der Naturwissenschaften*. Tesina, **2003**, Universität des Saarlandes.

264 - J. Cate. *Beneficial (entomopathogenic) Nematodes*. Recurso electrónico, **2012**. <http://www.bugladyconsulting.com/Beneficial%20Nematodes.htm> (imagen).

XII. Figuras Empleadas

XII. FIGURAS EMPLEADAS (FUENTES)

I. Introducción

I.1 Cáncer

1.1 - Elaboración propia a partir de la imagen tomada de D. Hanahan, R.A. Weinberg. "The hallmarks of cancer". *Cell*, **2000**; *100*: 57-70.

1.2 - Elaboración propia a partir de los datos estadísticos sobre defunciones recogidos en las aplicaciones de consulta interactiva del Sistema Nacional de Salud. <http://www.msps.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/aplicacionesConsulta/home.htm> (Instituto de Información Sanitaria del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad del Gobierno de España, *recurso electrónico*, **2012**).

1.3 - Adaptada de los mapas obtenidos en *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase N° 10. GLOBOCAN 2008 v1.2*. International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://globocan.iarc.fr> (*recurso electrónico*, **2010**).

1.4 - Adaptada de *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Zentrum für Krebsregisterdaten. Robert Koch Institut, Berlin, Deutschland, **2012**.

1.5 - Adaptada de los informes de *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase N° 10. GLOBOCAN 2008 v1.2*. International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://globocan.iarc.fr> (*recurso electrónico*, **2010**).

1.6 - Tomada del "Cancer Facts & Figures 2012", de la American Cancer Society [/www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index](http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index) (*recurso electrónico*, **2012**)

1.7 - Adaptada de *Natural mechanisms protecting against cancer*. M. Jakóbsiak, W. Lasek, J. Golab.. *Immunology Letters*, **2003**, *90*: 103-122

I.2 Muerte celular: Apoptosis y Necrosis

1.14 - Tomada de *The process of apoptosis*. *Genetic Home Reference* de la United States National Library of Medicine, United States National Institutes of Health. ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosisprocess (*Recurso electrónico*, **2012**).

1.15 - Tomada de *Final stage of apoptosis*. *Genetic Home Reference* de la United States National Library of Medicine, United States National Institutes of Health. ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage (*Recurso electrónico*, **2012**).

I.3 Estrés Oxidativo

1.16 - Tomada de *The role of antioxidants in photoprotection: a critical review*. L. Chen, J.Y. Hu, S.Q. Wang. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **2012**.

I.4 Selenio

1.17 - Tomada de G.F. Combs, W. P. Gray. *Chemopreventive Agents: Selenium*. *Pharmacology and Therapeutics*, **1998**, 79(3): 179-192.

1.18 - Tomada de F.P. Bellinger, A.V. Raman, M.A. Reeves, M.J. Berry. *Regulation and function of selenoproteins in human disease*. *The Biochemical Journal*, **2009**, 422(1): 11-22.

1.19 - Tomada de S.J. Fairweather-Tait, Y. Bao, M.R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J.E. Hesketh, R. Hurst. *Selenium in human health and disease*. *Antioxidants and Redox Signaling*, **2011**, 14(7): 1337-1383.

II. Antecedentes y Justificación

2.1 - Tomada de M.I. Jackson, G.F. Combs. *Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms*. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **2008**, 11(6): 718-726.

VIII. Valoraciones de actividad

8.2, 8.4, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.19, 10.20, 10.21, 10.22 - Tomadas de ATCC (American Type Culture Collection). *ATCC Advanced Catalog Search* <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx> Recurso electrónico, **2012**.

8.8 - Tomada de P.T. Kissinger, W.R. Heineman. *Cyclic Voltammetry*. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60: 702-706.

8.9 - Tomada de P.A. Kilmartin. *Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols*. *Antioxidants and Redox Signaling*, **2001**, 3(6): 941-955.

8.10- Tomada de P. Zanello. *Inorganic Electrochemistry. Theory, practice and application*. The Royal Society of Chemistry, **2003**, first edition.

8.25- Tomada de J. Cate. *Beneficial (entomopathogenic) Nematodes*. Recurso electrónico, **2012**. <http://www.bugladyconsulting.com/Beneficial%20Nematodes.htm>