



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster Universitario en
Investigación Química e Química Industrial

Antía Sar Raño

**Estudo de complexos de vanadio (IV e V) con
ligandos hidrazona derivados de piridoxal e da
súa potencial aplicación como axentes
antitumorais**

**Study of vanadium (IV and V) complexes with
hydrazone ligands derived from pyridoxal and their
possible applications as antitumor agents**

Directores: Fernando AVECILLA Porto
Vanessa VALDIGLESIAS García

Traballo realizado nos grupos XENOMAR (CICA) e DICOMOSA (ESCI)

Xullo de 2019

ÍNDICE DE CONTIDO

| | |
|---|-----|
| LISTAXE DE ABREVIATURAS | i |
| RESUMO | iii |
| ABSTRACT | iv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. A química Bioinorgánica | 1 |
| 1.2. Terapias antitumorais que empregan elementos inorgánicos | 2 |
| 1.2.1. Cisplatino e derivados | 2 |
| 1.2.2. Metalofármacos de metais de transición. | 5 |
| 1.3. A química do vanadio. | 7 |
| 1.3.1. Características xerais | 7 |
| 1.3.2. Importancia do vanadio na química médica | 8 |
| 2. OBXECTIVOS | 11 |
| 3. MATERIAL E EQUIPAMENTO | 13 |
| 3.1. Reactivos e disolventes | 13 |
| 3.2. Material empregado no cultivo celular..... | 13 |
| 3.3. Equipamento e programas | 14 |
| 3.3.1. Análise elemental | 14 |
| 3.3.2. Espectrometría de masas | 14 |
| 3.3.3. Espectroscopia de infravermello | 14 |
| 3.3.4. Espectroscopia de RMN ¹ H..... | 14 |
| 3.3.5. Difracción de raios X de monocristal..... | 15 |
| 3.3.6. Espectroscopia UV-Vis..... | 15 |
| 3.3.7. Molecular docking..... | 15 |
| 3.3.8. Análise estatístico..... | 16 |
| 4. PROCEDEMENTO EXPERIMENTAL | 17 |
| 4.1. Síntese | 17 |
| 4.1.1. Ligandos | 17 |
| 4.1.2. Complexos..... | 18 |
| 4.2. Ensaio <i>in vitro</i> : determinación da citotoxicidade | 20 |
| 4.2.1. Descrición da técnica | 20 |
| 4.2.2. Procedemento | 21 |
| 4.3. Interacción co ADN: Espectroscopia UV-Vis..... | 24 |
| 4.3.1. Preparación das disolucións | 24 |
| 4.3.2. Descrición do experimento..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 5. RESULTADOS E DISCUSIÓN | 27 |
| 5.1. Caracterización estrutural..... | 27 |
| 5.1.1. Análise elemental..... | 27 |
| 5.1.2. Espectrometría de masas..... | 28 |
| 5.1.3. Espectroscopia de infravermello..... | 30 |
| 5.1.4. Espectroscopia de RMN ¹ H..... | 31 |
| 5.1.5. Difracción de raios X de monocristal..... | 34 |
| 5.2. Determinación da citotoxicidade..... | 37 |
| 5.3. Estudo da interacción co ADN..... | 40 |
| 5.3.1. Estudo experimental da interacción co ADN: Espectroscopia UV-Vis..... | 40 |
| 5.3.2. Estudo computacional da interacción co ADN: <i>Molecular docking</i> | 41 |
| 6. CONCLUSIÓNS | 45 |
| CONCLUSIONS | 46 |
| 7. ANEXOS | 47 |
| 7.1. Espectrometría de Masas..... | 47 |
| 7.1.1. Ligando L ₁ | 47 |
| 7.1.2. Ligando L ₂ | 47 |
| 7.1.3. Ligando L ₃ | 48 |
| 7.1.4. Complexo 1..... | 49 |
| 7.1.5. Complexo 2..... | 50 |
| 7.1.6. Complexo 3..... | 51 |
| 7.1.7. Complexo 4..... | 52 |
| 7.1.8. Complexo 5..... | 54 |
| 7.2. Espectroscopia de infravermello..... | 55 |
| 7.2.1. Ligando L ₁ | 55 |
| 7.2.2. Ligando L ₂ | 55 |
| 7.2.3. Ligando L ₃ | 55 |
| 7.2.4. Complexo 1..... | 56 |
| 7.2.5. Complexo 2..... | 56 |
| 7.2.6. Complexo 3..... | 56 |
| 7.2.7. Complexo 4..... | 57 |
| 7.2.8. Complexo 5..... | 57 |
| 7.3. Espectroscopia RMN de ¹ H..... | 58 |
| 7.3.1. Ligando L ₂ | 58 |
| 7.3.2. Ligando L ₃ | 58 |
| 7.3.3. Complexo 1..... | 59 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 7.3.4. | Complejo 2 | 59 |
| 7.3.5. | Complejo 5 | 60 |
| 7.3.6. | Complejo 3 | 60 |
| 7.4. | Difracción de rayos X de monocristal..... | 61 |
| 7.4.1. | Ligando L ₃ | 61 |
| 7.4.2. | Complejo 1 | 62 |
| 7.4.3. | Complejo 4 | 63 |
| 7.2. | Interacción ADN-complexos: Espectroscopia UV-vis..... | 65 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA..... | 67 |

LISTAXE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CN e CP: Control negativo e control positivo

Cp: Ciclopentadienilo

Dis.: Disolución

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio de cultivo)

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures

ESI: Electrospray Ionization (Ionización por electrosprai)

Exp.: Experimental

FAB: Fast Atom Bombardment (Bombardeo de átomos rápidos)

FBS: Fetal Bovine Serum (Soro bobino fetal)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia)

Im: Imidazol

Ind: Indazol

IR: Infravermello

MeOH: Metanol

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazolio)

m/z: Relación masa/carga

OMS: Organización Mundial da Saúde

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

ppm: Partes por millón

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNS: Especies de Nitróxeno Reactivas

ROS: Especies de Osíxeno Reactivas

rpm: Revolucións por minuto

TOF: Time of flight (Tempo de voo)

UV-vis: Ultravioleta-visible

RESUMO

Este Traballo de Fin de Máster recolle os primeiros pasos dunha investigación na procura de novos axentes antitumorais baseados en complexos de vanadio con ligandos hidrazona.

Na primeira parte do traballo móstrase a ruta sintética levada a cabo para a obtención dos ligandos e dos complexos de vanadio (IV e V), así como a caracterización de todos os produtos obtidos. Este estudo realízase aplicando técnicas de caracterización tanto en estado sólido – espectroscopia de IR, análise elemental e difracción de raios X de monocristal –, como en disolución – espectrometría de masas e espectroscopia de RMN ^1H .

A segunda parte recolle un estudo *in vitro* para a determinación da citotoxicidade de tres dos complexos sintetizados e o estudo mediante espectroscopia UV-vis da interacción destes mesmos complexos co ADN. Inclúese ademais o cálculo da interacción co ADN máis probable para algún dos compostos, empregando a técnica de *molecular docking*.

Palabras clave: Compostos de Vanadio, Axentes Antitumorais, Citotoxicidade, Interacción co ADN

ABSTRACT

This end-of-Master's project contains the first steps of an investigation on finding new antitumoral agents based on vanadium complexes with hidrazone ligands.

The first part of the project shows the synthetic route carried out for the obtention of the ligands and the vanadium (IV and V) complexes, just as the characterization of the products obtained. This study was carried out by the application of characterization techniques, both in solid state – IR spectroscopy, elemental analysis and X-RAY monocystal diffraction –, and in solution – mass spectrometry and RMN ¹H spectroscopy.

The second part presents an *in-vitro* study to determinate the cytotoxicity of three of the synthesized complexes and the UV-vis spectroscopy study of that complexes' interaction with DNA. The calculation of the most probable interaction for some of the compounds with DNA applying the molecular docking technique is also included.

Key words: Vanadium Compounds, Antitumoral Agents, Cytotoxicity, Interaction with DNA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. A química Bioinorgánica

No último terzo do século XX xurdiu unha nova disciplina, a Química Bioinorgánica. Esta rama da ciencia nace grazas ao esforzos de varios grupos de investigación da época para poñer de manifesto a utilidade da Química Inorgánica á hora de comprender os procesos biolóxicos. A materia viva está formada na súa maioría por compostos carbonados (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc.) polo que é comprensible que nun primeiro momento se considerase a Bioquímica como unha parte da Química Orgánica. Hoxe en día sábese que existen polo menos 27 elementos esenciais para a vida que participan en numerosos procesos biolóxicos. Deste xeito, a Bioquímica abrangue tanto a Química Orgánica como a Inorgánica.

Considéranse esenciais para a vida aqueles elementos que sexan necesarios para o desenvolvemento das funcións vitais de un gran número e variedade de organismos. Aínda que todos os elementos esenciais teñen a mesma importancia, cuantitativamente existen diferenzas, podendo distinguir os elementos entre masivos e traza (**táboa 1**).

| | |
|---|--|
| Elementos masivos esenciais | C, H, O, N, P, S, Cl, Na, K, Mg e Ca. |
| Elementos traza esenciais | B, F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo e I. |
| Elementos traza posiblemente esenciais | As, Br, W e Sn. |

Táboa 1: Clasificación dos elementos esenciais.

Existen elementos que, ademais de non ser esenciais, son tóxicos para os seres vivos podendo causar enfermidades ou incluso a morte. Este é o caso do Be, Al, Tl, Pb e Hg. Aínda así, esencialidade e toxicidade non son características opostas, pois os efectos tóxicos dependen da cantidade na que os elementos están presentes no organismo. Cada un dos elementos esenciais precisa atoparse entre un intervalo de concentracións axeitado para que permita o desenvolvemento das funcións biolóxicas. Se a dose se atopa por arriba ou por abaixo deste intervalo poden aparecer efectos patolóxicos, síntomas de deficiencia ou exceso, que cheguen a ser letais.^{[1][2]}

1.2. Terapias antitumorais que empregan elementos inorgánicos

Segundo as estimacións da Organización Mundial da Saúde (OMS) en 2015, o cancro é unha das principais causas de morte a nivel mundial para individuos menores de 70 anos. Sitúase no primeiro ou segundo posto en 91 dos 172 países, e no terceiro ou cuarto lugar en outros 22. A nivel xeral, o cancro máis diagnosticado e o que xera maior mortalidade é o cancro de pulmón. Este cancro continúa a ser o máis habitual nos homes, seguido no cancro de próstata, mentres que nas mulleres é o cancro de mama o máis diagnosticado.^[3]

En termos xerais, podemos definir o cancro como una enfermidade provocada pola proliferación rápida e anormal das células. Na maioría dos casos débese a unha mutación dos xenes que controlan o crecemento e a división celular. Hoxe en día emprégase cirurxía local, radioterapia e quimioterapia para o seu tratamento. Aínda que a cura contra o cancro se atopa lonxe do ideal buscado, os novos avances para a súa prevención e detección temperá son moi prometedores.

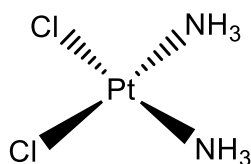
Todas as células conteñen nos xenes a información necesaria para a replicación e supervivencia. De tal forma que, se se interrompe o fluxo de información xenética, pódese evitar a división celular. Entre as estratexias principais para paliar o cancro, a quimioterapia y a radioterapia buscan evitar a replicación celular e o crecemento do tumor actuando sobre o ADN mediante a rotura, dano, modificación da súa estrutura cuaternaria, etc.^[4]

A radioterapia é un tratamento focalizado baseado na destrución das células cancerosas dunha zona concreta, mediante o emprego de radiación ionizante de alta enerxía. A quimioterapia, en cambio, emprega compostos químicos coñecidos como axentes antitumorais. Ao ser un tratamento non localizado é útil no caso dos tumores malignos, aqueles que provocan a metástase (dispersión das células cancerixenas a outras partes do corpo a través da sangue ou da linfa).

1.2.1. Cisplatino e derivados

Moitos dos complexos inorgánicos empregados en quimioterapia interaccionan co ADN mediante unha unión entre o metal e os heteroátomos das nucleobases. Deste xeito actúa o platino(II), catión central dos principais compostos empregados no tratamento do cancro. A actividade antitumoral deste elemento foi descuberta por Barnett

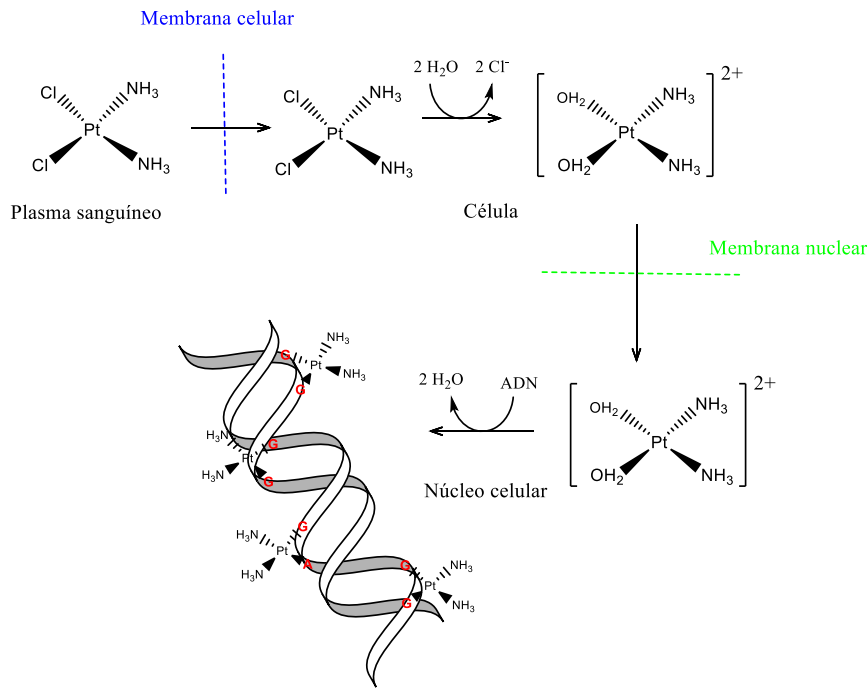
Rosenberg, cando en 1965 investigaba como podía afectar a aplicación de un campo eléctrico na división celular da bacteria *Escherichia coli*. Durante o experimento produciuse unha reacción entre os electrodos de platino e o medio (disolución de NH_4Cl) dando lugar á formación de cis-diamminodicloruroplatino(II), que freou a división das bacterias mediante a perda da habilidade de replicación do ADN (continuaban sintetizando ARN e proteínas). Este composto, comunmente coñecido como cis-platino, xa fora descrito en 1845, pero ate o momento non se coñecían as súas propiedades biolóxicas. Tras este descubrimento realizáronse probas en tumores para investigar a súa actividade como anticancerixeno, e finalmente foi aprobado para tratamento de distintos tipos de cancro, presentando unha elevada actividade fronte aos cancros de ovario, testículo, cabeza e pescozo, vexiga e pulmón.



Esquema 1: Estrutura do cis-diaminodicloruroplatino(II).

A subministración do cis-platino realízase por vía intravenosa, difundíndose a través do plasma sanguíneo como molécula neutra debido á elevada concentración de cloruros. Unha vez entra nas células, onde a concentración de cloruros é menor, prodúcese a substitución nucleófila dos cloruros por moléculas de auga. Esta substitución fai que o complexo presente carga positiva, podendo atravesar así a membrana nuclear e favorecendo a reacción coas bases púricas do ADN. Existen distintos modos de unión entre o platino e o ADN, pero preferentemente prodúcese a reacción co nitróxeno máis reactivo das guaninas (N7). A formación de pontes entre guaninas adxacentes xera unha deformación na dobre hélice do ADN que impide a replicación.^{[5][6]}

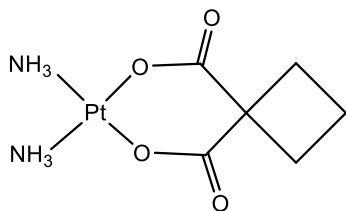
É posible comprobar a deformación do ADN por electroforese en xel, pois o ADN dobrado migra de forma máis lenta que o linear, podendo incluso estimar o grado de curvatura mediante unha gráfica de calibración.^[7]



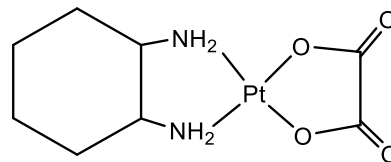
Esquema 2: Transformacións químicas que sofre o cis-platino dende a entrada no corpo ata que alcanza o ADN.

O cis-platino subministrase xunto con “axentes de rescate”; compostos que reaccionan co platino que non alcanza as células cancerixenas coordinándose con el e permitindo a súa excreción a través da urina, reduciendo así a súa toxicidade. A pesar diso, a toxicidade continúa a ser elevada, o que conduciu á busca de novos compostos que, cumprindo o mesmo obxectivo, sexan menos tóxicos. Xorden entón os compostos de platino de “segunda xeración”.^{[5][6]}

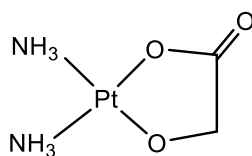
Hoxe en día, ademais do cisplatino empréganse outros tres compostos: o carboplatino, utilizado mundialmente; o oxaliplatino, dispoñible en varios países, entre eles Francia; e o nedaplatino, que só se administra en Xapón.^[8]



Esquema 3: Estrutura do carboplatino.



Esquema 4: Estrutura do oxaliplatino.



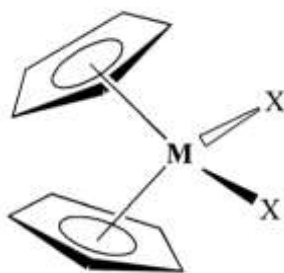
Esquema 5: Estrutura do nedaplatino.

1.2.2. Metalofármacos de metais de transición.

A resistencia xerada ante os compostos platino, sumada aos efectos secundarios que estes provocan e a dificultade de cura para algúns tipos de cancro, xerou a necesidade de investigar complexos con outros metais de transición que puidesen presentar actividade antitumoral.

Dihaluros de metaloceno

Podemos destacar os dihaluros de metaloceno de algúns metais de transición, que presentan actividade anticanceríxena fronte ao cancro de pulmón, colon e leucemia linfoide. Denomínanse Cp_2MX_2 , onde Cp se corresponde co ligando ciclopentadienilo (C_5H_5), X representa o halóxeno e M o catión metálico central. Observáronse actividades antitumorais elevadas para os compostos de Ti, V, Nb e Mo.



Esquema 6: Estrutura xeral dos dihaluros de metaloceno. M= Ti, V, Nb, Mo, Hf, Ta, W ou Zr; X= F, Cl, Br ou I.

Como ocorría co cis-platino, o complexo Cp_2MCl_2 mantense neutro ata a entrada na célula, onde a concentración de ións cloruros descende facilitando a hidrólise (substitución dos ligandos cloruro por moléculas de auga). A formación dun complexo catiónico favorece a coordinación cos heteroátomos da dobre cadea de ADN; o nitróxeno das bases e os osíxenos dos grupos fosfato que conforman os nucleótidos.^[5]

Nos últimos anos realizáronse ensaios clínicos de fase I e II co dicloruro de titanoceno. Ademais, varios grupos de investigación andan na procura de derivados deste composto (mediante a incorporación de substituintes e grupos funcionais polares nos aneis de ciclopentadienilo) que presenten unha mellor actividade citotóxica.^[9]

Metalofármacos de Rutenio

A cinética para a substitución de ligandos dos complexos de rutenio(II e III) é similar á do platino(II). Isto levou á avaliación da súa actividade como antitumorais. Algúns dos complexos de rutenio(III) entraron en ensaios clínicos: o trans-

$\text{ImH}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$ (onde Im se corresponde cun anel de imidazol) presenta unha elevada actividade fronte a metástase, mentres que o *trans*- $\text{IndH}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]$ (onde Ind se corresponde cun anel de indazol) é máis activo fronte a tumores primarios.

Entre os complexos de rutenio(II) con propiedades antitumorais interesantes podemos destacar os complexos de areno de tipo semi-sandwich. Presentan unha estrutura do tipo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{YZ})(\text{X})]$ onde YZ é un ligando bidentado quelante e X é un ligando lábil como por exemplo Cl. Estes compostos poden interaccionar co ADN mediante coordinación ao N7 das guaninas do ADN, mediante enlaces de hidróxeno ou inclusive intercalar o areno entre os pares de bases.^{[10][11]}

Metalofármacos de ouro

As analogías entre os complexos planocadrados de platino(II) e os de ouro(III), ambos ión d^8 , foi un dos motivos que abriu a liña de investigación do emprego de complexos de ouro como antitumorais. Durante as últimas décadas investigáronse, obtendo resultados interesantes, complexos de ouro con ligandos fosfina, carbeno, ditiocarbamato e porfirinato.^{[10][12][13]}

1.3. A química do vanadio.

1.3.1. Características xerais

Co número atómico 23, o vanadio é o metal de transición que encabeza o grupo 5 na táboa periódica. Presenta dous isótopos (^{50}V e ^{51}V) e a súa configuración electrónica é $[\text{Ar}]3d^34s^2$. O vanadio pode acadar estados de oxidación entre -I e +V, sendo estables en disolución os estados III, IV e V. A súa química de coordinación é moi versátil, pois forma complexos con números de coordinación que abarcan dende 4 ata 8, e con gran variedade de xeometrías; presentando o vanadio(V), d^0 , máis variedade que o vanadio(IV), d^1 .^{[6][14]}

Este metal é moi abundante na codia terrestre (0,02%) e na auga de mar (35nM). Ademais a concentración intracelular de vanadio no ser humano ascende a 0,3 μM , tratándose dun micronutriente esencial cuxa carencia pode provocar, entre outros síntomas, alteracións na degradación e absorción de carbohidratos e lípidos, deterioro óseo ou problemas psicolóxicos.

Nos seres vivos o vanadio acostuma a atoparse como vanadio(IV) en forma de catión vanadilo (VO^{2+}) ou como vanadio(V) en forma de vanadato (VO_4^{3-}). Cando o V^{V} acada o organismo pode verse reducido a V^{IV} pola acción de diversas sustancias reductoras do plasmata como o glutatión, o ácido ascórbico ou as catecolaminas. Do transporte deste elemento a través do plasma sanguíneo encárgase a albúmina e a transferrina, coexistindo no plasma tanto o anión vanadato como o vanadilo, sendo este último máis abundante. Para entrar nas células o V^{V} atravesa a membrana celular mediante transporte aniónico, principalmente a través dos canais do fosfato. Unha vez na célula o vanadio pode verse reducido a V^{IV} polos axentes reductores citados anteriormente.^{[15][16][17]}

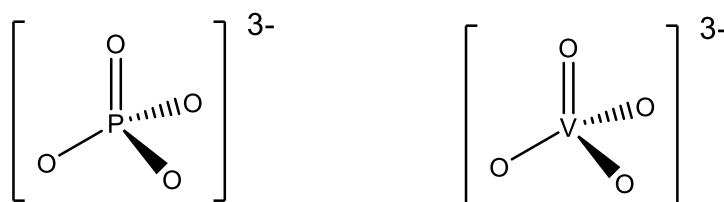
Cando se atopa no interior celular o vanadio presenta unha elevada afinidade polo material xenético. Estudos realizados en ratas mostran unha acumulación de vanadio no núcleo, nas mitocondrias e nos microsomas, tras a subministración de V^{IV} e V^{V} por vía intratraqueal e intraperitoneal.^[18] Ademais, diversas probas bioquímicas demostran a interacción entre o vanadio(IV e V) e diversas moléculas orgánicas situadas no medio intracelular como proteínas, aminoácidos, nucleótidos e azúcares.^[14]

1.3.2. Importancia do vanadio na química médica

Nas últimas décadas investigáronse as propiedades de distintos compostos de vanadio, xa que este pode presentar actividades con interese farmacolóxico. Unha das aplicacións máis coñecidas é o tratamento da diabetes^{[19][20][21][22][23][24]}, pero tamén se empregan compostos de vanadio como axente antimicrobial^{[24][25][26][27]}, antiobesidade ou como anticonceptivo vaxinal.^[6]

A actividade presente en compostos de vanadio na que nos centramos neste estudo é a antitumoral. O interesante da aplicación de compostos de vanadio para o tratamento contra o cancro reside, entre outras cousas, na posibilidade de que o composto presente algunha actividade adicional como as anteriormente mencionadas, xa que en moitos casos os tratamentos de quimioterapia provocan a aparición de outras enfermidades (víricas ou bacterianas), ao afectar ao sistema inmunolóxico.^[4] Deste xeito, a busca dun composto que sexa a vez antitumoral e antimicrobial podería reducir os efectos secundarios do tratamento.

Estas propiedades farmacolóxicas do vanadio están relacionadas, entre outras cousas, coa similitude estrutural entre os anións vanadato e fosfato. O vanadato ten un tamaño algo maior e presenta máis flexibilidade na súa xeometría de coordinación. Os dous compostos participan en reaccións similares nos procesos metabólicos, debido a que algunhas enzimas, como a ATP-sintasa, recoñecen o vanadato como fosfato.^{[28][29][30][31]}



Esquema 7: Estrutura dos anións fosfato e vanadato.

Outras características interesantes do vanadio, para ser aplicado como fármaco, son as mencionadas no apartado anterior: a versátil química de coordinación e os variables estados de oxidación que lle confiren propiedades redox.

O vanadio como axente antitumoral

Un dos principais efectos dos compostos de vanadio a nivel celular é a formación de especies reactivas de osíxeno (ROS) ou incluso de nitróxeno (RNS). As especies reactivas de osíxenos provocan a oxidación de biomoléculas como os ácidos nucleicos, as proteínas ou os lípidos. Elevados niveis de ROS provocan alteracións a nivel celular que poden desencadear na morte celular programada ou apoptose.^[32]

No organismo, o vanadio tamén pode provocar a alteración de orgánulos como os lisosomas e as mitocondrias ou proteínas do citoesqueleto como a actina e a tubulina, que deriven na interrupción do ciclo celular ou en apoptose. Este composto pode provocar inclusive efectos xenotóxicos cando acada o núcleo celular e dana o ADN.^[29]

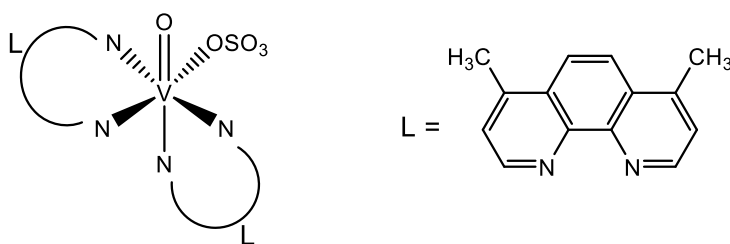
Un aspecto importante dos compostos de vanadio é que causan máis efecto ao ADN das células tumorais que das non tumorais. Isto permite que o dano do ADN das células cancerosas provoque a apoptose, mentres que nas células sans se estimule a síntese e activación de enzimas reparadoras que as protexan.^[33] Estudos realizados *in vivo* con animais mostran efectos selectivos do vanadio sobre células tumorais, mostrándose maiores niveis de apoptose en células de carcinoma de mama que en células epiteliais mamarias sans.^[34]

É posible clasificar os compostos de vanadio con posible aplicación antitumoral en compostos organometálicos e compostos non organometálicos. Dentro dos compostos organometálicos destaca o vanadoceno e os seus derivados que presentan unha elevada citotoxicidade fronte ao cancro testicular. Un destes derivados é o dicloruro de vanadoceno mencionado no apartado 1.2.2.^[32]

Entre os compostos non organometálicos atópanse polioxovanadatos como os $[V_4O_{12}]^{4-}$, $[V_5O_{14}]^{3-}$ ou $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ e complexos de vanadio. En este último grupo, onde se clasifican os compostos centrais deste traballo, inclúense principalmente óxidos e peróxidos de vanadio(IV e V) nos que o átomo central tamén se coordina a ligandos de natureza orgánica.^[32] Entre os ligandos empregados en este tipo de complexos atopamos entre outros, quinolinas^[35], piridonas^[36], flavonoides^[29], biperidinas e fenantrolinas^[37]. Todos os ligandos mencionados, ao igual que os deseñados neste traballo, poden coordinarse de maneira multidentada ao átomo de vanadio, e estabilizar o complexo mediante efecto quelato. Ademais en todos os casos as estruturas presentan aneis

aromáticos que lle outorgan unha certa planaridade e os átomos dadores son osíxenos e/ou nitróxenos.

Dentro deste tipo de complexos de vanadio, un dos máis prometedores é o “Metvan”, bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxidovanadio(IV), pois resulta efectivo contra o cancro de mama, de próstata, de ovario e contra a leucemia, sen apenas efectos secundarios tóxicos. A indución da apoptose que provoca este composto débese, entre outros efectos, á xeración de ROS.^{[38][39]}



Esquema 8: Estrutura do Metvan (e da fenantrolina).

2. OBXECTIVOS

A continuación recóllense os obxectivos propostos para a investigación realizada no Traballo de Fin de Máster:

- Síntese de ligandos hidrazona derivados do piridoxal, e dos correspondentes complexos de vanadio.
- Caracterización estrutural de todos os produtos obtidos mediante a combinación de diferentes técnicas.
- Determinación da citotoxicidade dos compostos mediante ensaios *in vitro*.
- Estudo computacional da interacción de varios dos produtos obtidos co ADN.
- Estudo experimental da interacción con ADN de algúns dos compostos sintetizados mediante espectroscopia UV-vis, así como determinación da constante de interacción.

3. MATERIAL E EQUIPAMENTO

3.1. Reativos e disolventes

REACTIVOS

Hidrocloruro de piridoxal (99%, Sigma Aldrich).

4-nitrobenzilhidrazida (98%, Sigma Aldrich).

3-metil-4-nitrobenzilhidracida (97%, Sigma Aldrich).

2-furanohidracida (98%, Sigma Aldrich).

Acetilacetato de vanadilo (98%, Sigma Aldrich).

Ct-ADN: sal de sodio de ácido desoxirribonucleico de timo de tenreiro (Tipo I; fibras, Sigma Aldrich).

HEPES, sal de sodio (99%, Sigma Aldrich).

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazolio), MTT (≥97,5%, Sigma Aldrich).

Ácido clorhídrico (37%, Fisher Chemical).

Peróxido de hidróxeno (30%, Panreac).

Táboa 2: Listaxe de reactivos empregados.

DISOLVENTES

Metanol (>99,5%, Fisher Chemical).

Metanol (>99,9%, Panreac).

Dietil éter (99%, Fisher Chemical).

Dimetilsulfóxido (≥99,9%, Sigma Aldrich).

Dimetilsulfóxido-d₆ (99,96%, Merck).

Etanol absoluto (99,5%, Panreac).

Táboa 3: Listaxe de disolventes empregados.

3.2. Material empregado no cultivo celular

Para determinar a citotoxicidade dos compostos seleccionouse a liña celular A549 correspondente a carcinoma pulmonar humano, que foi obtida da European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).

O cultivo celular realizouse en frascos de 25cm² (Corning) empregando o medio de cultivo DMEM con glucosa e L-glutamina (Lonza), suplementado con un 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Invitrogen), 1% de unha disolución de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 1% de aminoácidos non esenciais (Invitrogen). As células foron incubadas nun incubador (SANYO) a 37°C en atmosfera húmida con un 5% de CO₂.

Ademais, durante os pases celulares realizados empregouse unha disolución de tripsina ao 0,05% (Gibco) e unha disolución acuosa de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma Aldrich).

3.3. Equipamento e programas

3.3.1. Análise elemental

Determinouse a porcentaxe de nitróxeno, carbono e hidróxeno elemental mediante combustión nun analizador elemental FlashEA 1112 (ThermoFinnigan).

3.3.2. Espectrometría de masas

Empregouse un espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para rexistrar os espectros (en modo positivo e negativo) mediante ionización con electrosprai (ESI) acoplado a HPLC Agilent 1200, empregando metanol/agua como disolvente.

Empregouse tamén a ionización por bombardeo de átomos pesados en matriz viscosa (FAB). O equipo utilizado foi un espectrómetro de masas de sector magnético Thermo MAT95XP que estaba acoplado a un cromatógrafo de gases Thermo TRACEGC.

3.3.3. Espectroscopia de infravermello

Para rexistrar os espectros de IR utilizouse un espectrómetro Ft-IR Nicolet iS 10 da marca Thermo Scientific.

3.3.4. Espectroscopia de RMN ¹H

Na obtención dos espectros de RMN de ¹H foron empregados dous espectrómetros de resonancia Magnética Nuclear de modelos diferentes: Bruker AVANCE 300 e Bruker AVANCE 500. Empregouse como disolvente DMSO deuterado.

3.3.5. Difracción de raios X de monocristal

Para obter os datos das estruturas cristalinas empregouse un difractómetro X8 APEX KAPPA BRUKER-NONIUS de raios X de monocristal, con tubo de molibdeno.

3.3.6. Espectroscopia UV-Vis

Ensaio de citotoxicidade

A determinación da viabilidade celular realizouse mediante un ensaio colorimétrico para o cal se empregou un lector de microplacas SPECTROSTAR Nano (BMG Labtech), realizando as medidas a unha lonxitude de onda de 570nm.

Estudo da interacción co ADN

Para a obtención da constante de interacción entre os compostos e o ADN empregouse un espectrofotómetro de dobre haz, JASCO V-650 con cubetas de 10mm de lonxitude.

3.3.7. Molecular docking

O estudo computacional da interacción entre os compostos sintetizados e o ADN realizouse empregando os programas Autodock Vina^[40] e Autodock 4.2^[41], respectivamente para ligandos e complexos.^[42] Para determinar o tipo de interacción empregáronse dous tipos de estruturas cristalinas de ADN obtidas na *Protein Data Base*: unha das estruturas correspóndese con ADN estándar (PDB ID: 1BNA)^[43], mentres que a outra presenta un maior tamaño nun dos ocos entre os pares de bases, o que permite a intercalación dos compostos. Esta última macromolécula (PDB ID: 2N4M)^[44] procede dun cristal de ADN con un fármaco intercalado que se elimina co obxectivo de deixar o oco dispoñible para os compostos de estudo, xa que o programa non permite a distorsión do ADN común para permitir a intercalación.

Para os compostos de estudo partiuse dos datos obtidos de difracción de raios X de monocristal ou da estrutura simulada mediante o programa Chem3D. Estudouse a interacción dos compostos cos dous tipos de ADN en distintas *poses*, é dicir, probáronse varias posicións combinadas con distintas conformacións. Comparáronse os valores de estabilidade debido a consideración das enerxías de desolvatación, repulsión, electrostráticas e de enlaces de hidróxeno, seleccionando como máis probable a *pose* de interacción con unha enerxía libre de Gibbs máis negativa.

Para o posterior estudo das interaccións presentes na *pose* escollida, empregouse o software UCSF Chimera^[44], que permite determinar enlaces de hidróxeno e distancias interatómicas.

3.3.8. Análise estatístico

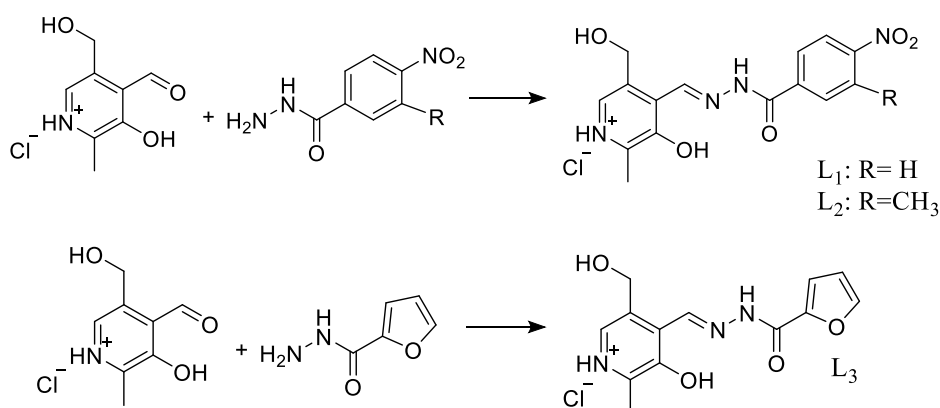
Os resultados obtidos nos catro experimentos de MTT foron analizados estatisticamente empregando o software IBM SPSS, tendo en conta as medias das tres réplicas de cada experimento e o seu erro. Aplicáronse os seguintes tests: proba de Kolmogorov-Smirnov, análise ANOVA, test de Bonferroni e test de correlación de Pearson.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Síntese

4.1.1. Ligandos

Para a obtención dos ligandos realízase unha reacción de condensación entre hidrocloreto de piridoxal e distintas hidrazidas: 4-nitrobencilhidrazida, 3-metil-4-nitrobencilhidracida e 2-furano hidrazida.^[45]



Esquema 9: Esquema da ruta de síntese levada a cabo para a obtención dos ligandos hidrazona.

Cantidades equivalentes dos reactivos disólvense na mínima cantidade de metanol (as táboas 4-6 recollen as cantidades). Nun matraz de fondo redondo (50mL) mestúranse e sométense a refluxo durante 2h. A formación do produto de reacción é case instantánea, e unha vez se acada temperatura ambiente o po branco-amarelado obtido fíltrase a baleiro e lávase con cun unha porción de metanol e outra de dietil éter.

Ligando L_1

| Reactivos | | Rendimento | Aspecto |
|------------------------|---------------------|------------|---------------------|
| Piridoxal | 1,80mmol/ 10mL MeOH | 78% | Po branco amarelado |
| 4-nitrobencilhidracida | 1,80mmol/ 25mL MeOH | | |

Táboa 4: Condicións da síntese do ligando L_1 .

Ligando L_2

| Reactivos | | Rendimento | Aspecto |
|--------------------------------|---------------------|------------|---------------------|
| Piridoxal | 1,50mmol/ 10mL MeOH | 82% | Po branco amarelado |
| 3-metil-4-nitrobencilhidracida | 1,50mmol/ 10mL MeOH | | |

Táboa 5: Condicións da síntese do ligando L_2 .

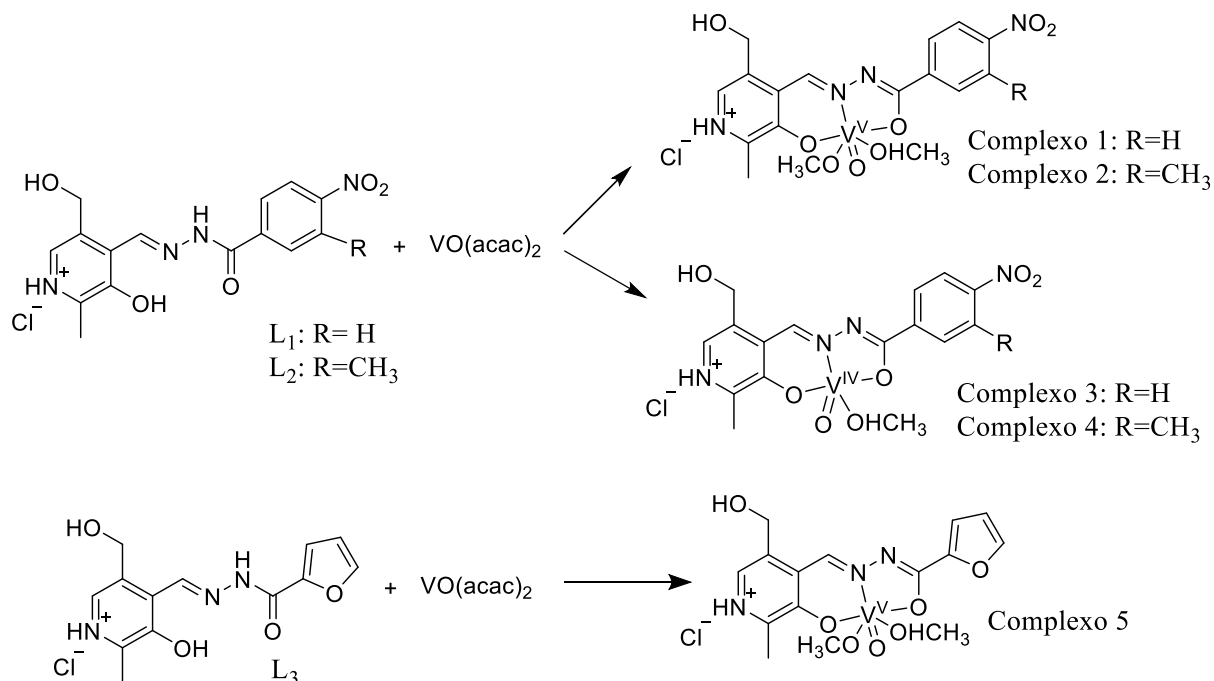
Ligando L₃

| Reactivos | | Rendimento | Aspecto |
|--------------------|---------------------|------------|-----------|
| Piridoxal | 1,82mmol/ 10mL MeOH | 85% | Po branco |
| 2-furano hidracida | 1,82mmol/ 12mL MeOH | | amarelado |

Táboa 6: Condicións da síntese do ligando L₃.

4.1.2. Complexos

Para a síntese dos complexos empréganse como reactivos os ligandos previamente sintetizados e acetilacetonato de vanadilo.^[45] Cantidades equivalentes dos compostos de partida son disoltas na mínima cantidade de metanol e mesturadas nun matraz de fondo redondo (100mL). A disolución resultante sométese a refluxo durante 5h e posteriormente déixase 48h en axitación a temperatura ambiente. Co paso do tempo podemos ver como a disolución pasa dunha tonalidade negra a vermella. Pasadas as 48h a disolución déixase cristalizar.



Esquema 10: Esquema da ruta de síntese levada a cabo para a obtención dos complexos de vanadio.

A pureza do metanol empregado para a obtención dos complexos 1, 2 e 5, de vanadio(V) foi máis do 99,5%; mentres que para os complexos 3 e 4, de vanadio(IV) se empregou un metanol dunha pureza maior do 99,9%. Ademais, os compostos de vanadio(V) deixáronse cristalizar en contacto co aire, mentres que para o complexos de vanadio(IV) se empregou un desecador coa finalidade de non expoñer o vanadio á humidade ambiente.

O tempo de cristalización variou para cada composto, e en todos os caso foi da orde de 2-3 semanas.

Nas táboas 7-11 recóllense os datos do proceso de síntese.

Complexo 1

| Reactivos | | Cristalización | Rendemento | Aspecto |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|------------|-----------------------|
| Ligando L ₁ | 0,55mmol/ 50mL MeOH (99,5%) | En contacto co aire | 41% | Cristais vermellos |
| Acetilacetonato de vanadilo | 0,55mmol/ 5mL MeOH (99,5%) | | | |

Táboa 7: Condicións da síntese do complexo 1.

Complexo 2

| Reactivos | | Cristalización | Rendemento | Aspecto |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|------------|--------------------------------------|
| Ligando L ₂ | 0,50mmol/ 30mL MeOH (99,5%) | En contacto co aire | 15% | Cristais vermellos moi escuros |
| Acetilacetonato de vanadilo | 0,50mmol/ 5mL MeOH (99,5%) | | | |

Táboa 8: Condicións da síntese do complexo 2.

Complexo 3

| Reactivos | | Cristalización | Rendemento | Aspecto |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|-----------------------|
| Ligando L ₁ | 0,60mmol/ 50mL MeOH (>99,9%) | En desecador, atmósfera seca | 71% | Cristais vermellos |
| Acetilacetonato de vanadilo | 0,60mmol/ 5mL MeOH (>99,9%) | | | |

Táboa 9: Condicións da síntese do complexo 3.

Complexo 4

| Reactivos | | Cristalización | Rendemento | Aspecto |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|--------------------------|
| Ligando L ₂ | 0,50mmol/ 30mL MeOH (>99,9%) | En desecador, atmósfera seca | 45% | Po cristalino laranja |
| Acetilacetonato de vanadilo | 0,50mmol/ 5mL MeOH (>99,9%) | | | |

Táboa 10: Condicións da síntese do complexo 4.

Complexo 5

| Reactivos | | Cristalización | Rendemento | Aspecto |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|------------|----------|
| Ligando L ₃ | 0,89mmol/ 10mL MeOH (99,5%) | En contacto co aire | 44% | Pó verde |
| Acetilacetonato de vanadilo | 0,89mmol/ 5mL MeOH (99,5%) | | | |

Táboa 11: Condicións da síntese do complexo 5.

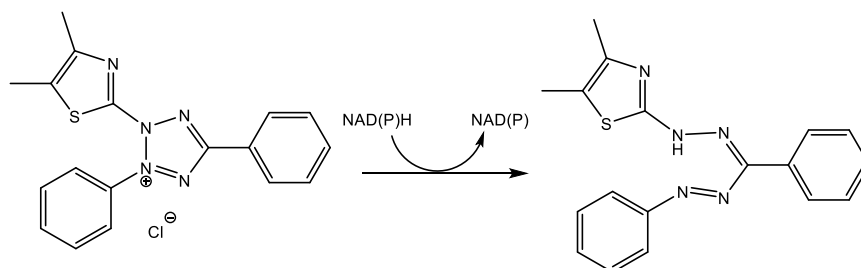
4.2. Ensaíos *in vitro*: determinación da citotoxicidade

4.2.1. Descrición da técnica

O obxectivo desta proba é ver a influencia que teñen algúns dos complexos sintetizados sobre células pulmonares canceríxenas humanas, e así poder avaliar a súa posible actividade antitumoral.

O experimento realízase en placas de cultivo de 96 cuncas, introducindo o mesmo número de células en cada unha (10.000 células). As células sométense a un tratamento a diferentes concentracións, correspondéndose o tratamento co 1% do volume e a parte restante ao medio de cultivo. Realízanse ademais dous puntos experimentais correspondentes ao control negativo, no que o 1% se corresponde co disolvente dos tratamentos, e un control positivo, o 1% correspóndese a unha disolución de tritón (tensoactivo que degrada a membrana celular provocando a morte).

Tras o tempo de tratamento escollido, en este caso 48h, retírase o tratamento e engádense unha disolución de sal de tetrazoilio (MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazoilio) de 5µg/mL en medio de cultivo. As células incúbanse durante 4h, durante este tempo as enzimas presentes nas mitocondrias das células provocan a redución do MTT a formazán.^[46] Fórmase así uns cristais de cor violeta insolubles en auga, que se disolven en DMSO para poder ser determinados por unha medida espectrofotométrica a 570nm.



Esquema 11: Esquema da redución do MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazoilio] a formazán [(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano].

Debido a que a medida de absorbancia é proporcional á concentración de formazán, e esta á súa vez é proporcional ao número de células que sobreviven ao tratamento, pódese determinar a viabilidade por comparación co control negativo.^[47]

4.2.2. Procedemento

Preparación dos tratamentos

Para realizar o tratamento foron escollidas sete concentracións que abarcan un gran intervalo (0,1-500 μ M). Testáronse os complexos 1, 3 e 4.

Preparáronse as disolucións de maior concentración e a partir destas as dilucións, segundo se mostra nas seguintes táboas.

| Disolución A | Masa medida (mg) | Volumen de DMSO (μ L) | Concentración da disolución (M) | Concentración do punto experimental (μ M) |
|--------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|--|
| Complexo 1 | 6,5 | 262,8 | $5 \cdot 10^{-2}$ | 500 |
| Complexo 3 | 13,7 | 589,6 | $5 \cdot 10^{-2}$ | 500 |
| Complexo 4 | 10,7 | 477,75 | $5 \cdot 10^{-2}$ | 500 |

Táboa 12: Preparación da disolución de stock para os tratamentos.

| Dilucións | Volumen da disolución nai (μ L) | Volumen de DMSO (μ L) | Concentración da disolución (M) | Concentración do punto experimental (μ M) |
|-----------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|--|
| B | 20 dis. A | 20 | $2,5 \cdot 10^{-2}$ | 250 |
| C | 8 dis. A | 32 | $1 \cdot 10^{-2}$ | 100 |
| D | 2 dis. A | 38 | $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 25 |
| E | 1 dis. A | 99 | $5 \cdot 10^{-4}$ | 5 |
| F | 8 dis. E | 32 | $1 \cdot 10^{-4}$ | 1 |
| G | 1 dis. E | 49 | $1 \cdot 10^{-5}$ | 0,1 |

Táboa 13: Preparación das disolucións para os tratamentos.

Preparación da placa

O primeiro paso consiste en introducir 10.000 células en cada cunha da placa. Toda a manipulación é realizada nunha cámara de fluxo laminar, que se limpa previamente cunha disolución de etanol ao 70% e se somete a radiación UV durante 20min. Ademais, o material empregado no proceso esterilízase previamente e as disolucións son atemperadas para evitar que as células se vexan afectadas por un cambio térmico.

As células medran adheridas ao frasco de cultivo, polo que é necesario levantalas, é dicir, despegalas. Primeiramente eliminase o medio de cultivo por volcado, e lávanse as paredes do frasco con 1mL de PBS para eliminar restos de medio. Este lavado debe facerse con coidado facendo movementos circulares co frasco para evitar que as células se despeguen. Tras retirar o PBS engádense 1,5 mL de tripsina e lévase a incubadora durante 3-4 minutos. Durante este tempo a tripsina degrada as proteínas que manteñen as

células adheridas ao frasco facilitando o seu levantamento. Pasado o tempo de incubación golpéase o canto do frasco con golpes secos e obsérvase ao microscopio invertido se as células están levantadas, deberían ter unha forma circular e verse en movemento.

Cunha pipeta Pasteur pásase o contido do frasco a un tubo estéril con tapa de 12mL, e lávase o frasco con 3 mL de PBS. En este caso o lavado faise coa axuda dunha pipeta Pasteur e arrastrando con enerxía as células que puidesen quedar adheridas. Seguidamente pásase o PBS ao tubo anteriormente mencionado, para desactivar a tripsina, e centrifúgase durante 5 minutos a 800rpm e 21°C.

Retírase o sobrenadante e resuspéndese o pellet celular en 1mL de medio completo. O seguinte paso será realizar o reconto celular, para o que se emprega unha cámara de Neubauer. Tras colocar o cubreobxectos sobre a cámara, introdúcese 10 μ L da suspensión celular na zona de conteo, de tal forma que a disolución se reparte por capilaridade ao longo da cuadrícula. Unha vez introducida a suspensión procédese ao reconto baixo o microscopio. Existen distintas formas de contar en función dos cadrados escollidos. Neste caso o reconto realizase no cadrado central (de 1mm de lado dividido en 5x5, estando á súa vez estes cadrados divididos en 4x4), de tal xeito que a determinación das células por mililitro de suspensión se obtén multiplicando o número obtido polo factor 10⁴.

Sabendo a cantidade de células/mL da suspensión celular e a cantidade de células e medio requirido en cada cunca (10.000 células en 100 μ L de medio completo), prepárase unha nova suspensión celular a partir da anterior, que nos permita encher as cuncas necesarias (en cada experimento realízanse 3 réplicas por composto de cada concentración de tratamento). Unha vez preparada a placa, lévase a incubadora durante 24h.

Subministración do tratamento

Tras un día de incubación, cunha micropipeta automática retírase o medio de cultivo, evitando tocar o fondo das cuncas para non despegar as células. A continuación engádense 198 μ L de medio completo e 2 μ L do tratamento correspondente a cada cunca. A placa introdúcese na incubadora durante outras 48h (tempo de tratamento escollido).

Determinación da viabilidade: espectroscopia visible

Tras o tempo de tratamento (48h), retiramos este da mesma forma que no paso anterior, e engadimos 100µL de disolución de MTT de 5µg/mL. Esta disolución prepárase en medio completo a partir dunha disolución de MTT de 5mg/mL en PBS. Esta etapa do procedemento, e a posterior incubación a 37° durante 4h para permitir a metabolización do MTT, realízase en escuridade para evitar que o composto se degrade.

Como se explicaba anteriormente, este tempo é suficiente para que se formen os cristais de formazán no fondo das cuncas. Tras a retirada da disolución de MTT o formazán disólvese en 200µL de DMSO e a placa incúbase en escuridade durante 10 minutos. Finalmente realízase á lectura da absorbancia a 570nm nun lector de microplatos.

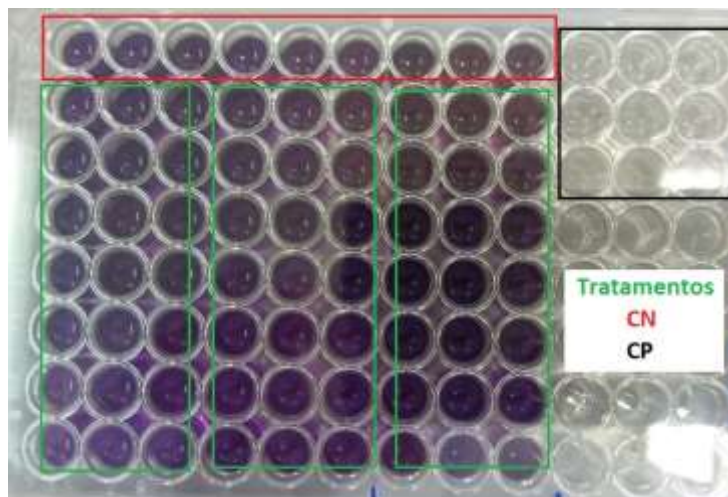


Figura 1: Fotografía dunha placa tras a finalización do procedemento. Na imaxe móstrase a correspondencia entre as cuncas e os puntos experimentais

4.3. Interacción co ADN: Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis permite obter información acerca da interacción entre un composto e o ADN. Para iso recóllense os espectros de absorción mantendo constante a concentración do composto de estudo, e adicionando cantidades crecentes de ct-ADN. Realizouse o estudo para os complexos 1, 3 e 4.

Todas as disolucións son preparadas en un tampón HEPES, de tal forma que aproximemos as condicións de pH ao valor fisiolóxico. Ademais, para cada punto experimental requírese un branco que elimine a contribución da absorbancia dependente do ADN.

4.3.1. Preparación das disolucións

Disolución HEPES

Como tampón emprégase unha disolución 10mM de sal de sodio do ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico, para o que se pesan 0,65g e se disolven en 250mL de auga ultrapura. Tras determinar o pH da disolución resultante, este axústase a 7,4 con HCl 3M.

Disolución ct-ADN

Para as disolucións de ADN pártese dunha disolución de stock de 1mg/mL. As fibras de ct-ADN pésanse e hidrátanse coa disolución de HEPES durante un tempo mínimo de 24h a 4°C. Unha vez o ADN está totalmente disolto determínase a concentración da disolución de stock mediante unha medida de absorbancia a 260nm, coñecendo que a absorvidade molar a esta lonxitude de onda é de $6600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e aplicando a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Tamén se procede a avaliar a pureza do ADN determinando o contido proteico da disolución. Para isto calcúlase a relación das absorbancias medidas a 260nm e 280nm, correspondentes cos máximos de absorción do ADN e das proteínas respectivamente. Para valores de A_{260}/A_{280} de entre 1,8 e 1,9 considérase que a disolución de stock de ADN se atopa razoablemente libre de proteínas.^[48]

Unha vez coñecida a concentración de ADN da disolución de stock, e que esta presenta unha concentración proteica asumible, prepárase unha dilución de concentración $1500\mu\text{M}$, que será disolución de traballo.

Disolución dos compostos de estudo

Debido a escasa solubilidade en auga (en este caso en tampón HEPES 10mM), os compostos disólvense inicialmente en DMSO e posteriormente dilúense coa disolución tampón de tal xeito que a porcentaxe de DMSO nas disolucións de stock dos compostos non supere o 2% en volume.

A partir da disolución de stock prepáranse outras dúas dilucións, unha 1x e outra 2x de concentracións 25 e 50 μ M.

4.3.2. Descrición do experimento

Realízanse 7 puntos experimentais mediante adicións na cubeta de medida. Os espectros recóllense no rango 200-550nm, zona na que aparecen as bandas de absorción para os compostos de estudo.

Para o primeiro punto experimental tómase un volume de 2mL da disolución do composto de concentración 25 μ M e como referencia emprégase o mesmo volume da disolución de HEPES. Nos puntos sucesivos adiciónanse volumes crecentes da disolución de ADN tanto na cubeta da mostra como na de referencia. Engádesse ademais o mesmo volume que o de ADN, da disolución 50 μ M do composto na cubeta da mostra e de HEPES na referencia, de tal forma que poidamos manter constante a concentración do composto de interese.

A continuación recóllense os volumes empregados e as concentracións resultantes para cada un dos puntos experimentais. Para a preparación das referencias só é necesario substituír os volumes das disolucións do composto pola disolución tampón.

| Punto exp. | Volume dis. 25 μ M (μ L) | Volume dis. 50 μ M engadido (μ L) | Volume dis. ADN engadido (μ L) | [Composto] (μ M) | [ADN] (μ M) |
|------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 2000 | - | - | 25 | 0 |
| 2 | - | 35 | 35 | 25 | 25 |
| 3 | - | 35 | 35 | 25 | 50 |
| 4 | - | 40 | 40 | 25 | 75 |
| 5 | - | 80 | 80 | 25 | 120 |
| 6 | - | 100 | 100 | 25 | 170 |
| 7 | - | 110 | 110 | 25 | 215 |

Táboa 14: Preparación dos puntos experimentais para o estudo da interacción composto-ADN.

A variación da intensidade dos espectros de absorbancia dun composto, cando se mantén constante a súa concentración e se adicionan cantidades crecentes de ADN, permite determinar a constante de interacción mediante a aplicación da ecuación de Wolfe–Shimmer^{[49][50]}:

$$\frac{[\text{ADN}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{ADN}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Onde ϵ_f é absortividade molar para o composto libre, ϵ_b a da interacción co ADN e ϵ_A a absortividade molar aparente, é dicir, a observada en cada punto. Os valores de ϵ_f e ϵ_A calcúlanse coa ecuación de Lambert-Beer, onde c se corresponde coa concentración do composto de estudo. A representación de $[\text{ADN}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ vs. $[\text{ADN}]$, e o axuste liñar permiten calcular K_b como o cociente da pendente entre a ordenada na orixe.

O patrón de variación pode aportar información a cerca do tipo de interacción que se está a producir. Estes patróns correspóndese coa presenza dos efectos hiperocrómico, hipocrómico e batocrómico. O efecto hiperocrómico, é dicir, o aumento da absorbancia ligado á adición de ADN, indica unha interacción de tipo covalente. Mentres que o efecto hipocrómico, diminución da absorbancia, indica un modo non covalente.^[43]

A suma de hipocromismo e batocromismo (desprazamento das bandas cara lonxitudes de onda maiores) é indicativa da intercalación do composto de estudo entre os pares de bases do ADN. Este modo de unión vese estabilizado polas interacción π - π stacking producidas entre os aneis das bases nitroxenadas e a especie intercalada.^{[48][51][52][53]}

Por outra parte, a única presenza do efecto hipocrómico indica unha posible interacción nun dos surcos do ADN. Esta interacción pode deberse a forzas electrostáticas e enlaces de hidróxeno.^{[43][49][54][53]}

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. Caracterización estrutural

5.1.1. Análise elemental

Mediante a determinación das porcentaxes relativas de carbono, hidróxeno e nitróxeno das mostras sólidas, é posible determinar se a mostra analizada se corresponde coa estrutura buscada. No caso dos complexos pódese determinar a relación ligando/metal así como a posible solvatación por moléculas de auga ou disolvente.

Nas seguintes táboas recóllense os datos obtidos para os compostos sintetizados e os valores calculados para unha posible estrutura.

| Ligando L ₁ | C | N | H |
|---|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 48,71% | 14,58% | 3,97% |
| Cálculo para C ₁₅ H ₁₅ N ₄ O ₅ Cl | 49,12% | 15,28% | 4,12% |

Táboa 15: Resultados da técnica de análise elemental para o ligando L₁ e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Ligando L ₂ | C | N | H |
|---|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 51,05% | 14,63% | 4,27% |
| Cálculo para C ₁₆ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl | 50,47% | 14,71% | 4,50% |

Táboa 16: Resultados da técnica de análise elemental para o ligando L₂ e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Ligando L ₃ | C | N | H |
|---|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 50,50% | 13,37% | 4,19% |
| Cálculo para C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₄ Cl | 50,09% | 13,48% | 4,53% |

Táboa 17: Resultados da técnica de análise elemental para o ligando L₃ e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Complexo 1 | C | N | H |
|--|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 41,53% | 10,86% | 3,88% |
| Cálculo para C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₈ VCl | 41,19% | 11,30% | 4,27% |

Táboa 18: Resultados da técnica de análise elemental para o complexo 1 e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Complexo 2 | C | N | H |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 42,33% | 10,86% | 3,96% |
| Cálculo para $C_{18}H_{23}N_4O_8VCl$ | 42,41% | 10,99% | 4,55% |

Táboa 19: Resultados da técnica de análise elemental para o complexo 2 e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Complexo 3 | C | N | H |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 41,40% | 11,00% | 3,49% |
| Cálculo para $C_{16}H_{18}N_4O_7VCl$ | 41,35% | 12,06% | 3,90% |

Táboa 20: Resultados da técnica de análise elemental para o complexo 3 e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Complexo 4 | C | N | H |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 43,50% | 12,30% | 3,74% |
| Cálculo para $C_{17}H_{20}N_4O_7VCl$ | 42,65% | 11,70% | 4,21% |

Táboa 21: Resultados da técnica de análise elemental para o complexo 4 e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

| Complexo 5 | C | N | H |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Análise elemental | 41,64% | 10,66% | 3,64% |
| Cálculo para $C_{14}H_{15}N_3O_6VCl$ | 40,09% | 10,42 | 3,71% |

Táboa 22: Resultados da técnica de análise elemental para o complexo 5 e porcentaxes calculadas para a especie proposta da sección de síntese.

As porcentaxes obtidas para os produtos aproxímanse aos valores calculados para as estruturas propostas no apartado de síntese (4.1).

5.1.2. Espectrometría de masas

A espectrometría de masas permite determinar os ións moleculares en función da relación masa/carga, así como outros fragmentos moleculares. Deste xeito é posible identificar en disolución a estrutura proposta na mostra analizada.

A continuación analízanse os espectros obtidos para cada composto. Os espectros xunto coas posibles estruturas atópanse na sección de **Anexos**.

Ligandos L_1 e L_2

Os espectros dos dous ligandos foron realizados empregando FAB como modo de ionización. En ambos casos o pico de maior intensidade correspóndese co ligando protonado: $[C_{15}H_{15}N_4O_5]^+$ (L_1 , $m/z = 331,10$) e $[C_{16}H_{17}N_4O_5]^+$ (L_2 , $m/z = 345,13$).

Ligando L₃

O espectro de masas do ligando L₃ recolleuse en modo positivo e negativo, empregando ESI como forma de ionización. É posible identificar o aniión do ligando debido á perda de un hidróxeno, correspondente á fórmula [C₁₃H₁₂N₃O₄]⁻ (m/z = 274,08) e o catión derivado da protonación do ligando, [C₁₃H₁₄N₃O₄]⁺ (m/z = 276,10). No espectro en modo positivo a sinal máis intensa correspóndese cun dímero formado por dous catións moleculares e un aniión cloruro unidos mediante enlaces de hidróxeno: [LH-Cl-LH]⁺ (m/z = 589,13).^[55]

Complexo 1

O complexo 1 foi analizado mediante espectrometría de masas con ionización por electrosprai nos modos positivo e negativo. O espectro recollido para o primeiro modo mostra o ión molecular xerado pola protonación do ligando para un complexo de vanadio(V), [C₁₆H₁₆N₄O₇V]⁺ (m/z = 427,05). No espectro en modo negativo poden identificarse dous aniións, un correspondente a un complexo de vanadio(V), [C₁₆H₁₄N₄O₇V]⁻ (m/z = 425,05); e o outro a un complexo de vanadio(IV), [C₁₅H₁₂N₄O₆V]⁻ (m/z = 395,02). A intensidade da especie máis oxidada correspóndese co 100%, mentres que o ión do complexo de vanadio(IV) presenta unha intensidade do 40%. Isto pode indicar que durante proceso de síntese e cristalización o vanadio non se oxidase na súa totalidade.

Complexo 2

Os espectros de masas realizados mediante ESI en modo positivo e negativo mostran as sinais correspondentes aos ións moleculares da estrutura buscada tras a perda dunha molécula de metanol: [C₁₇H₁₈N₄O₇V]⁺ (m/z = 441,06) e [C₁₇H₁₆N₄O₇V]⁻ (m/z = 339,04).

Complexo 3

O complexo 3 foi analizado mediante espectrometría de masas empregando as modalidades de ionización ESI e FAB. O espectro obtido por este último método mostra unha sinal correspondente co complexo de vanadio(IV) protonado e sen a molécula de metanol coordinada: [C₁₅H₁₃N₄O₆V]⁺ (m/z = 396,01).

Os resultados obtidos para o ESI en metanol son similares ao obtidos para o complexo 1, coa diferenza de que a intensidade da sinal da especie de vanadio(IV) no

espectro en modo negativo é maior, acadando o 75%. Existe a posibilidade de que unha pequena parte do vanadio se oxidase no proceso de síntese e cristalización, pero a maior parte da oxidación seguramente se produza durante a ionización da mostra durante a caracterización, xa que esta transformación se ve favorecida pola presenza de metanol/auga e a enerxía subministrada.

Complexo 4

Debido a posibilidade de oxidación do complexo 4, de vanadio(IV), durante a ionización por electrosprai, ademais de recoller os espectros de masas mediante esta técnica tamén se obtiveron empregando a ionización FAB en tioglicerol. En este último espectro podemos observar que a sinal de maior intensidade se corresponde coa especie de vanadio(IV): $[C_{16}H_{15}N_4O_6V]^+$ ($m/z = 410,03$).

Nos espectros obtidos mediante a ionización ESI en metanol/auga tanto en modo positivo como en modo negativo, os ións moleculares correspóndense con especies oxidadas de vanadio(V): $[C_{17}H_{18}N_4O_7V]^+$ ($m/z = 441,06$) e $[C_{16}H_{14}N_4O_7V]^-$ ($m/z = 425,03$).

Complexo 5

O complexo 5 caracterizouse mediante ESI-MS nos modos positivo e negativo. O espectro en modo positivo recolle o ión molecular $[C_{14}H_{15}N_3O_6V]^+$ ($m/z = 272,04$). Mentres que no espectro en modo negativo aparecen as sinais correspondentes a unha especie monomérica, $[C_{14}H_{13}N_3O_6V]^-$ ($m/z = 270,02$) e a unha especie dimérica, $[C_{28}H_{27}N_6O_{12}V_2]^-$ ($m/z = 741,05$), que posiblemente se trate dun complexo no que os átomos de vanadio se enlazan mediante dous osíxenos ponte.

5.1.3. Espectroscopia de infravermello

Esta técnica basease na diferenza das frecuencias de vibración dos enlaces das moléculas en función da súa enerxía, e do peso dos átomos que participan no enlace. A existencia de bandas en unhas zonas características do espectro evidencia a presenza de grupos funcionais concretos.^[45] Os espectros obtidos recóllense na sección de **Anexos**.

Os ligandos presentan dúas bandas características a 1693 e 3254 (L_1), 1693 e 3242 (L_2) e 1682 e 3260 cm^{-1} (L_3) correspondentes a $\nu(C=O)$ e $\nu(N-H)$ respectivamente. Isto indica que en estado sólido os ligandos se atopan na súa forma cetónica. A ausencia destas bandas nos espectros dos complexos, así como a aparición das sinais na rexión de 1207-

1253 cm^{-1} , correspondentes a $\nu(\text{C-O}_{\text{enólico}})$, indican a coordinación do ligando mediante este osíxeno como átomo dador.

Nos ligandos libres a $\nu(\text{C=N}_{\text{azometina}})$ móstrase como unha banda pouco intensa a 1634 (L_1), 1611 (L_2) e 1617 cm^{-1} (L_3), zona na que se atopa tamén a $\nu(\text{C=N})$ do anel do piridoxal. A coordinación dos ligandos co centro metálico a través do nitróxeno da azometina móstrase como unha sinal de intensidade media a 1586 (complexo 1), 1581 (complexo 2), 1588 (complexo 3), 1594 (complexo 4) e 1608 cm^{-1} (complexo 5).

A banda correspondente á $\nu(\text{N-N})$ sofre un desprazamento cara números de onda maiores cando se forma o complexo. Este desprazamento da sinal da orde de 7-41 cm^{-1} prodúcese pola diminución da repulsión entre os pares de electróns de non enlace de ambos nitróxenos, debido a coordinación co vanadio a través dun destes átomos. Deste xeito, a sinal que no ligando L_1 aparece a 1023 cm^{-1} , localízase a 1030 e 1064 cm^{-1} nos complexos 1 e 3; a do ligando L_2 a 1037 desprázase a 1045 e a 1061 cm^{-1} nos complexos 2 e 4; e a do ligando L_3 situada a 1051 cm^{-1} , transfórmase na sinal a 1073 cm^{-1} no complexo 5.

Ademais, en todos os complexos se pode observar unha banda intensa a 928-985 cm^{-1} correspondente á $\nu(\text{V=O})$.

5.1.4. Espectroscopia de RMN ^1H

A espectroscopia de RMN de ^1H permite coñecer o comportamento dos compostos en disolución. Os espectros, recollidos no apartado de **Anexos**, foron rexistrados en DMSO deuterado, pois é o disolvente empregado nos tratamentos realizados nas probas de citotoxicidade.

A presenza de vanadio(IV) nas mostras dificulta a análise dos espectros, pois ao tratarse dunha especie paramagnética prodúcese unha interacción co electrón desapareado que deriva nun ancheamento das sinais.

Por outra parte a escasa solubilidade do ligando L_1 en DMSO, así como en outros disolventes deuterados como metanol, diclorometano, cloroformo ou auga, non permitiu obter un espectro de RMN que puidese ser identificado.

A continuación móstranse as asignacións das sinais obtidas para os ligandos L_2 e L_3 e os complexos 1, 2 e 5 de vanadio(V). Coméntase ademais a variación do espectro do

complejo 3 de vanadio(IV) tras a adición de peróxido de hidróxeno para forzar a oxidación.

Ligando L₂

O espectro de RMN de ¹H do ligando L₂, realizado en DMSO deuterado mostra nove sinais. A 2,47 e 2,60 ppm localízanse os singuletes correspondentes cos metilos do piridoxal e da benzohidracida respectivamente. Os hidróxenos do grupo -CH₂- do piridoxal móstranse como un singulete a 4,66 ppm, e o hidroxéno do alcol enlazado a este grupo correspóndese coa sinal ancha a 5,49 ppm.

Na zona de 8,03-8,16 ppm aparecen os cinco hidróxenos aromáticos, a 9,01 ppm o segundo alcol do piridoxal e a 12,32 e 12,88 ppm os dous hidróxenos -NH do piridoxal protonado e do grupo hidrazona respectivamente.

Ligando L₃

O ligando L₃ presenta nove sinais no espectro de RMN de ¹H en DMSO. A 2,63 e a 4,77 ppm sitúanse, respectivamente, o grupo metilo e o -CH₂- pertencentes ao piridoxal. As sinais localizadas a 6,78, 7,54 e 8,07 ppm correspóndense cos tres hidróxenos aromáticos do furano, mentres que os picos a 8,23 e 9,02 ppm pertencen aos -CH=N- da hidrazona e do anel de piridina respectivamente. Finalmente, as sinais con maior desprazamento (13,07 e 13,20 ppm) correspóndense aos -NH da hidrazona e da piridina protonada.

Complexo 1

Na análise dos espectros de masas do complexo 1 observábase a presenza de especies de vanadio(IV) na mostra, que como se comentou anteriormente interfíren na obtención do espectro de RMN de ¹H. Aínda así, e posible distinguir varias sinais no espectro obtido para este composto.

A 4,86 ppm sitúanse os dous hidróxenos do grupo -CH₂-OH procedente do piridoxal, mentres que o alcol deste grupo se mostra como unha sinal ancha a 5,71 ppm. No zona situada entorno a 8,19-8,32 ppm pódense localizar os catro hidróxenos aromáticos do benceno; e a 7,98 e 9,37 ppm obsérvanse respectivamente os hidróxenos do tipo -CH=N- da hidrazona e da piridina.

Ademais, é posible identificar a 3,18 ppm un singulete que integra por seis hidróxenos correspondente cos dous metilos dos grupos metanol e metóxido coordinados

ao vanadio, quedándose o grupo metilo pertencente ao piridoxal baixo a sinal do DMSO na zona de 2,50 ppm.

Complexo 2

Para o complexo 2 é posible identificar seis sinais no seu espectro de RMN de ^1H en DMSO. O pico de elevada intensidade situado a 3,18 ppm e que integra por doce hidróxenos correspóndese cos dous metilos do ligando e cos grupos metanol e metóxido coordinados ao vanadio. O $-\text{CH}_2-$ do piridoxal móstrase como un singulete a 4,86 ppm e os hidróxenos aromáticos do benceno, así como o $-\text{CH}=\text{N}-$ da hidrazona, localízanse na zona de 7,97-8,16 ppm. Finalmente, a sinal situada a 9,36 ppm pertence ao hidróxeno $-\text{CH}=\text{N}-$ da piridina.

Complexo 5

O complexo 5 mostra seis sinais no espectro de RMN de ^1H , quedándose a sétima sinal, correspondente ao metilo do piridoxal baixo o pico do DMSO na zona de 2,50 ppm. A 4,85 e 5,71 ppm sitúase os dous hidróxenos e o protón o grupo $-\text{CH}_2-\text{OH}$ respectivamente. Os hidróxenos aromáticos do furano e o hidróxeno do tipo $-\text{CH}=\text{N}-$ da hidrazona localízanse na zona 6,70-7,92 ppm; mentres que a sinal a maior desprazamento (9,23 ppm) pertence ao $-\text{CH}=\text{N}-$ da piridina.

Complexo 3

Os complexos 3 e 4 son especies de vanadio(IV), polo que nos espectros de RMN de ^1H obtidos non é posible identificar correctamente as sinais. A adición de peróxido de hidróxeno sobre o complexo 3 provoca a oxidación a vanadio(V) xerando un estreitamento das sinais de tal forma que se pode realizar a asignación.

Tras a adición do oxidante, no espectro aparecen dúas sinais correspondentes ao grupo $-\text{CH}_2-$ (4,83 e 4,91 ppm); e outras dúas debidas ao grupo metilo (2,60 e 2,62 ppm) o que evidencia un equilibrio entre dúas especies. Na zona aromática, ademais de estreitarse a sinal ancha a 8,2-8,5 ppm observada no espectro inicial, xorden outras catro sinais a 7,82; 8,03; 9,00 e 9,34 ppm. As dúas primeiras correspóndese ao $-\text{CH}=\text{N}-$ da hidrazona e as outras ao da piridina, para as dúas especies en equilibrio.

A oxidación do complexo 3 posiblemente xere un complexo de vanadio(V) análogo (tras a transformación do metanol coordinado a un grupo metóxido) e un peroxidoderivado tamén de vanadio(V), onde o osíxeno terminal é substituído polo

peróxido. A análise do espectro recollido 24h despois da adición do peróxido de hidróxeno, mostra un cambio nas intensidades das sinais correspondentes ao equilibrio. Pode observarse a intensificación das sinais que máis se asemellan ás obtidas para o complexo 1, o que indica que o equilibrio se despraza cara a especie análoga ao complexo 3 e non cara o peroxidoderivado.

5.1.5. Difracción de raios X de monocristal

Grazas a técnica de difracción de raios X de monocristal podemos coñecer con exactitude a estrutura en estado sólido do composto analizado. Para iso é preciso obter un cristal apto para o seu estudo por esta técnica de unhas dimensións axeitadas.

Puideron obterse as estruturas do ligando L₃ e dos complexos 1 e 4. Os parámetros recollidos nas medicións figuran no apartado de **Anexos**.

Estrutura de raios X do ligando L₃

Ademais da obtención do ligando L₃ en forma de po branco-amarelo, nas augas nai formáronse uns cristais amarelos con forma de agulla que permitiron obter a estrutura en estado sólido deste composto.

O ligando presenta unha estrutura practicamente plana situando o osíxeno carbonílico e o alcol piridínico cara o mesmo lado. A especie atópase protonada no nitróxeno do anel piridina, sendo esta carga contrarrestada por un anión cloruro.

O composto vese estabilizado por enlaces de hidróxeno entre o cloruro e os grupos O(2)-H, N(2)-H e N(3)-H. Ademais o ligando presenta un enlace intramolecular entre o O(1)-H e o N(1). As distancias e ángulos dos enlaces móstranse na sección de **Anexos**.

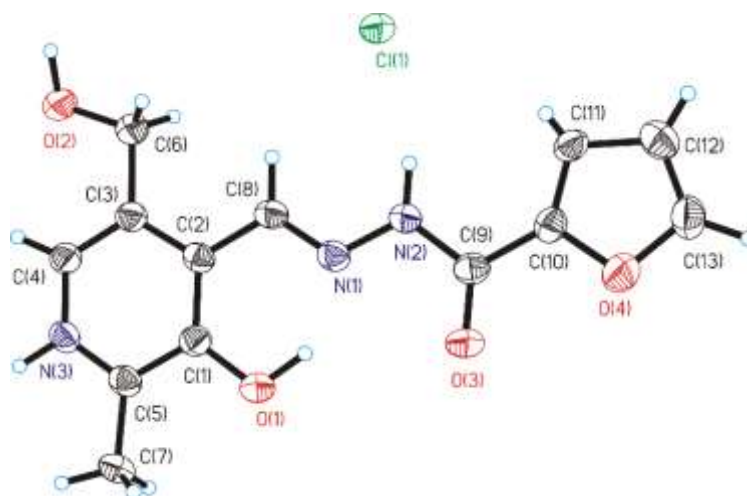


Figura 2: Estrutura do ligando L₃ obtida mediante difracción de raios X de monocristal.

Estrutura de raios X do complexo 1

Das augas nai da reacción entre o ligando L₁ e acetilacetionato de vanadilo obtívose unha fracción cristalina inicial. Os cristais presentan unha cor vermella escura e foron aptos para a medida por difracción e raios X.

Tras a resolución da estrutura pódese determinar que a especie cristalina se corresponde cun complexo de vanadio onde o átomo metálico se atopa no seu maior estado de oxidación, V^V. O vanadio presenta un poliedro de coordinación octaédrico lixeiramente distorsionado, onde as posicións do plano ecuatorial son ocupadas por un anión metóxido e polo ligando L₁ que se coordina de maneira tridentada a través dos átomos ONO. Nas posicións axiais do octaedro sitúase un átomo de osíxeno terminal e unha molécula de metanol.

O ligando atópase protonado no nitróxeno do grupo piridoxal, de tal forma que o complexo resultante presenta unha carga positiva contrarrestada por un cloruro. Este anión interactúa mediante enlaces de hidróxeno coa molécula de metanol a través do O(2M)-H e co grupo piridoxal mediante o O(4)-H e o N(3)-H.

Na sección de **Anexos** recóllense os datos de distancias e ángulos de enlace tanto para os enlaces de hidróxeno formados, como para a coordinación do vanadio.

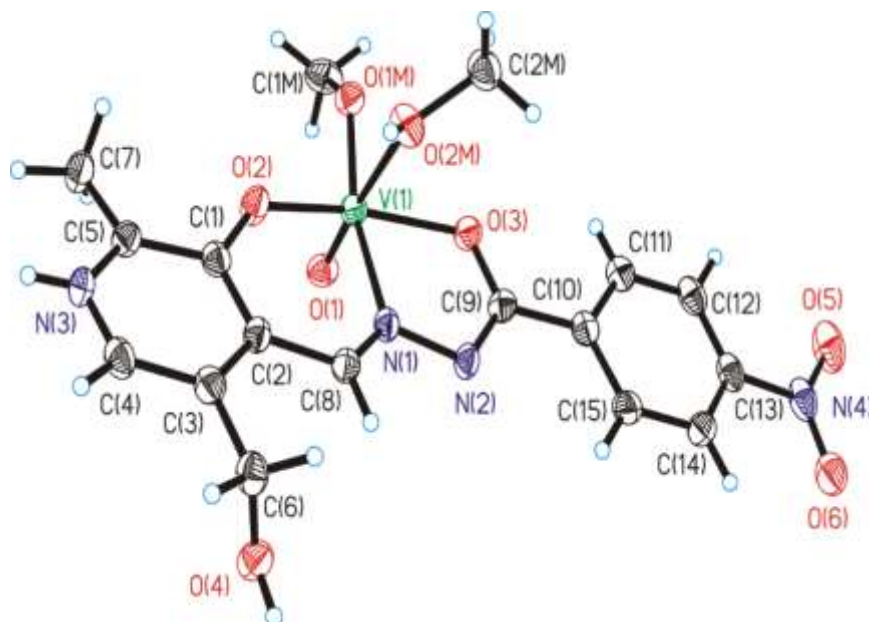


Figura 3: Estrutura do complexo 1 obtida mediante difracción de raios X de monocristal.

Estrutura de raios X do complexo 4

Do complexo 4 púidose obter un cristal con un tamaño axeitado, apto para ser medido por difracción de raios X de monocristal. O cristal medido presenta unha cor laranxa escuro – vermella.

A resolución da estrutura cristalina mostra unha especie polimérica en cadeas de vanadio(IV). Ao igual que no complexo 1, a distribución a redor do vanadio constitúe un poliedro octaédrico cunha lixeira distorsión. No plano ecuatorial sitúase un ligando L_2 coordinado de maneira tridentada a través dos átomos ONO e unha molécula de metanol, mentres que as posicións axiais son ocupadas por un osíxeno terminal e o alcóxido piridínico doutro ligando L_2 . A coordinación de cada un dos ligandos a dous centros metálicos, a un deles de maneira tridentada a través dos ONO centrais e ao outro de forma monodentada mediante o alcóxido piridínico do tipo $-CH_2O^-$, permite a formación das cadeas.

Os ligandos atópanse protonados no nitróxeno do grupo piridoxal e nun dos nitróxenos da hidrazona, e desprotonado nos alcoles procedentes do piridoxal mediante os que se produce a coordinación. Cada un dos complexos resultantes que forman a cadea presentan unha carga positiva que se contrarresta con un anión cloruro, que interactúa mediante enlace de hidróxeno co N(3)-H do ligando L_2 .

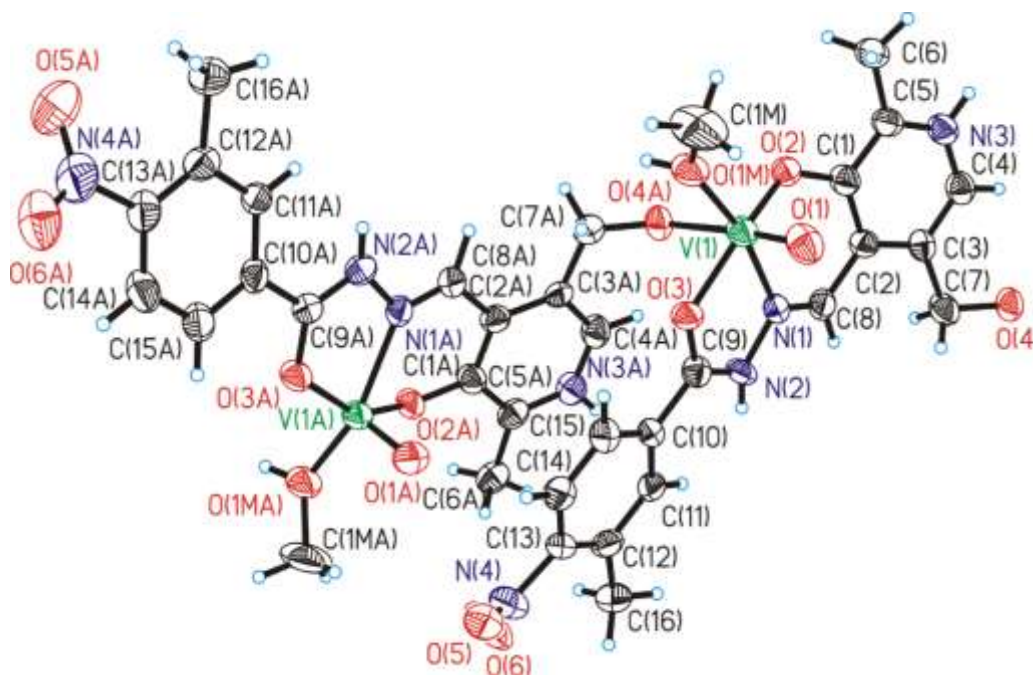


Figura 4: Estrutura do complexo 5 obtida mediante difracción de raios X de monocristal.

5.2. Determinación da citotoxicidade

A determinación colorimétrica da cantidade de formazán xerada en cada punto experimental permite a determinación da viabilidade por comparación co control negativo correspondente. A viabilidade é proporcional a absorbancia podendo calcularse mediante a seguinte fórmula:

$$Viabilidade(\%) = \frac{A_{tratamento}}{A_{control\ negativo}} \cdot 100$$

Calcúlanse as medias de cada un dos catro experimentos (cada un consta de tres réplicas) e realízase un test estatístico paramétrico para analizar os resultados. Para o tratamento dos datos empregouse o software estatístico SPSS comentado na sección de **Material e Equipamento**.

Realízase a proba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar a bondade de axuste dos datos. Para os tres compostos a proba indica que os datos se axustan a unha distribución normal, o que nos permite aplicar a análise ANOVA para rexeitar a hipótese nula de que as medias sexan iguais. Compáranse as medias da poboación, observándose en todos os casos que existen dúas ou máis medias estatisticamente diferentes.

A aplicación do test de Bonferroni permite determinar que medias son significativamente diferentes ao control negativo. A continuación móstrase a gráfica dos resultados obtidos indicando as medias estatisticamente distintas: $P < 0.01$ (**).

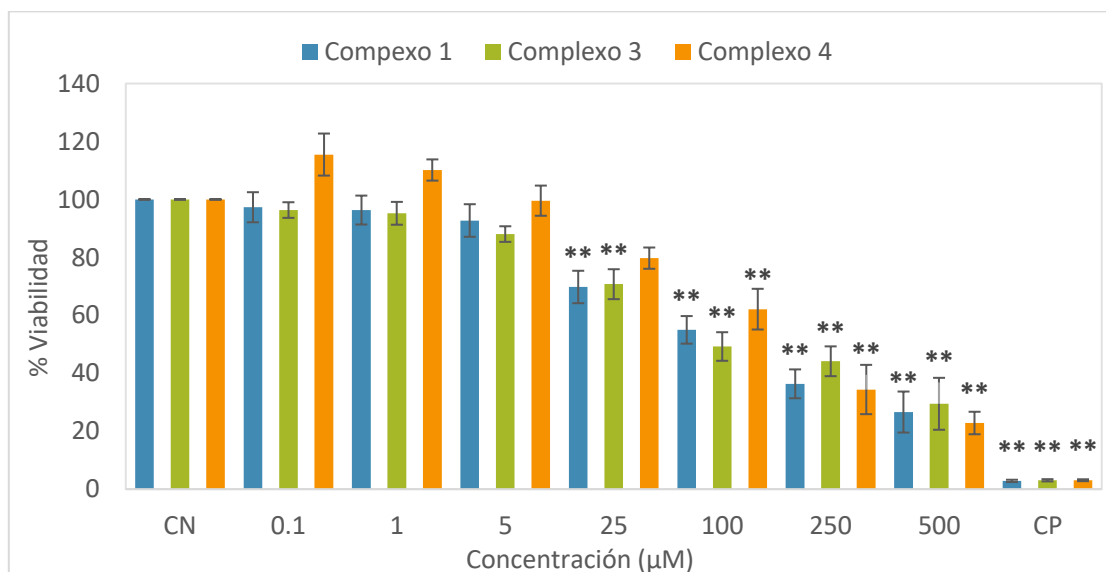


Figura 5: Gráfica dos valores de viabilidade obtidos para cada tratamento. Indícase con (**) as medias significativamente diferentes ao control negativo ($P < 0.01$; CP: Control Positivo).

Para determinar a correlación entre as dúas variables, concentración e viabilidade, emprégase o test de Pearson, que nos indica que a relación é liñar cando o grao de relación é significativo. Os tres compostos presentan unha relación significativa ($P < 0,001$), e polo tanto liñar, con valores de coeficiente de Pearson de -0.909; -0,919 e -0,878 para os complexos 1, 3 e 4 respectivamente. Os coeficientes de Pearson indícanos ademais unha correlación inversa, é dicir, aumentos de concentración de tratamentos provocan descensos da viabilidade.

Segundo os datos obtidos, os compostos son citotóxicos para células cancerixenas de pulmón (A549) cando se subministran concentracións de entre 25 e 500 μM dos complexos 1 e 3, e entre 100 e 500 μM no caso do complexo 4. Para os complexos 1 e 3 a DL_{50} (dose letal 50%) aproxímase a unha concentración de 100 μM , mentres que para o complexo 4 se atopa entre 100 e 250 μM .

Os datos analizados mostran un perfil de citotoxicidade similar para os complexos 1 e 3, que presentan estruturas similares con estados de oxidación diferentes. Isto pode indicar que a nivel celular a especie que está interaccionando sexa a mesma. Como se comentada no apartado 1.3.1 o complexo 1 de V^V pode verse reducido a V^{IV} cando entra na célula^{[15][16][17][56]}, de tal forma que poida existir un equilibrio entre as especies oxidada e reducida en ambos casos.

A citotoxicidade destes compostos posiblemente se deba a un descenso da proliferación celular unido a activación de procesos de apoptose, un dos modos de morte celular máis comúns para compostos de vanadio.^{[29][32][34]} Este ensaio non nos permite coñecer que factores inflúen na citotoxicidade, polo que será necesario realizar máis estudos que determinen se a citotoxicidade se debe principalmente á xeración de ROS, a unha interacción co material xenético, ou a unha suma destes dou factores.

A observación das células ao microscopio ao longo do ensaio, permitiu apreciar cambios na morfoloxía das células tras a subministración dos tratamentos de maior concentración. Na figura 6 (a) pode observarse que a aparencia das células do control negativo se corresponde co aspecto típico das células da liña A549. En cambio, cando as células son sometidas aos complexos de vanadio testados a concentracións de 250 μM , pode verse unha perda de adherencia e un redondeamento das células (ver Figura 6). Este cambio na morfoloxía pode deberse a interaccións coas proteínas do citoesqueleto, observadas para outros compostos de vanadio.^{[57][58]}

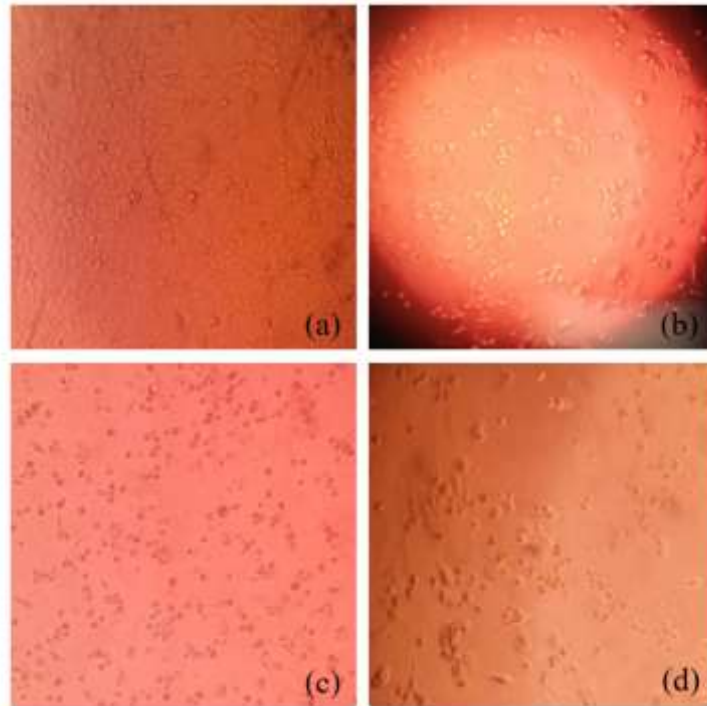


Figura 6: Fotografía das células tomada ao microscopio (a) no control negativo, (b) concentración 250μM do complexo 1, (c) concentración 250μM do complexo 3 e (d) concentración 250μM do complexo 4.

5.3. Estudo da interacción co ADN

Como se comentaba na sección de Introducción, o ADN é unha das principais dianas biolóxicas para os axentes antitumorais. A unión entre o ADN e o axente citotóxico pode desencadear a apoptose. O tipo de unión que se produza vai vir determinada pola estrutura da especie a estudar, é dicir, tanto da disposición espacial como dos grupos funcionais que presente.^[48]

5.3.1. Estudo experimental da interacción co ADN: Espectroscopia UV-Vis

A continuación recóllese a análise da variación da absorbancia dos complexo 1, 3 e 4 ao subministrar cantidade crecentes de ADN. Como se mostra nas figuras 7-9 os tres complexos estudados mostran perfíles similares. Nos tres casos, na banda de maior intensidade situada a 220-222 nm pode apreciarse o efecto hipocrómico e un sutil efecto batocrómico, cun desprazamento do máximo de 2 nm.

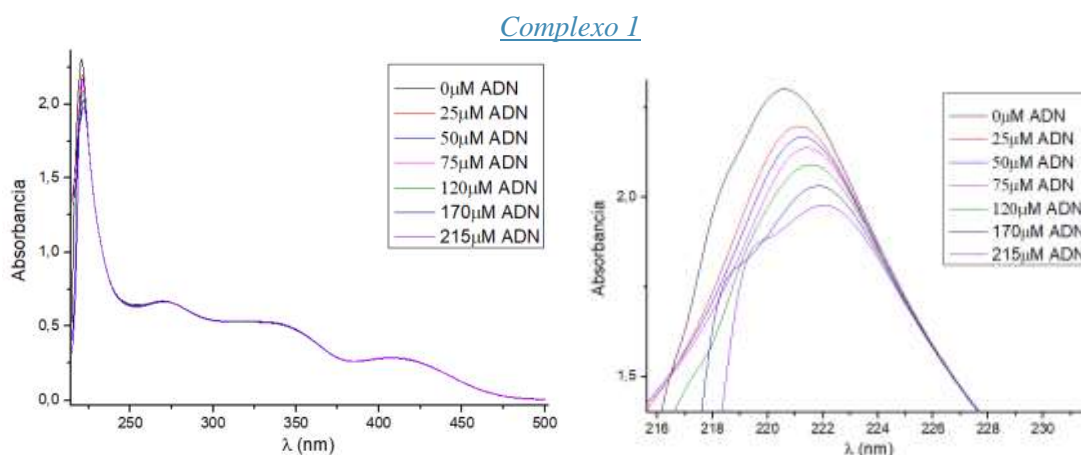


Figura 7: Variación do espectro de absorbancia do complexo 1 (25 μ M) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

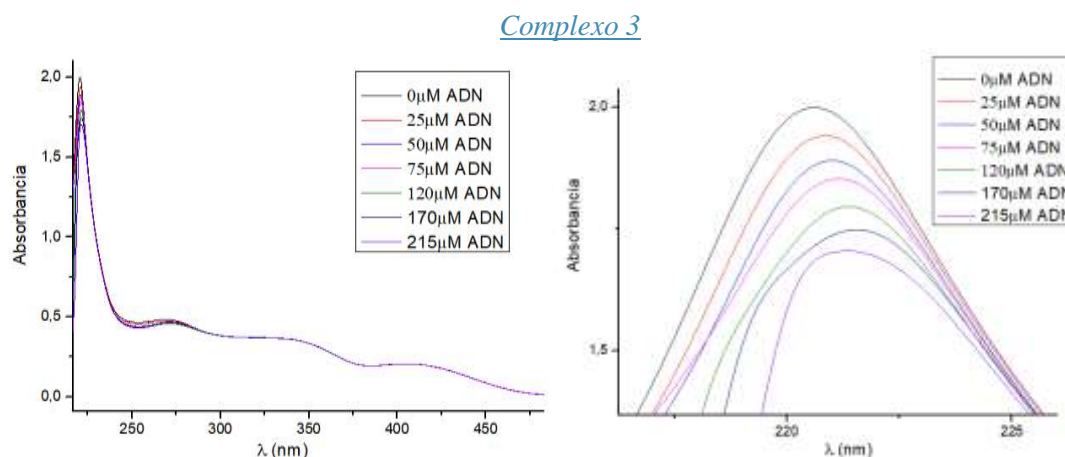


Figura 8: Variación do espectro de absorbancia do complexo 3 (25 μ M) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

Complexo 4

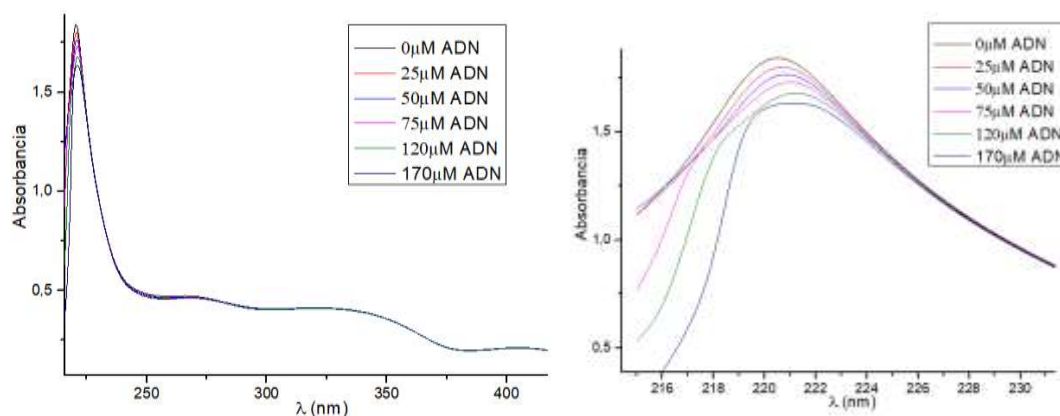


Figura 9: Variación do espectro de absorbancia do complexo 4 ($25\mu\text{M}$) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

Como se comentou anteriormente, a presenza dos efectos batocrómico e hipocrómico normalmente indican intercalación entre os pares de bases e interaccións $\pi-\pi$ stacking. Aínda así, o efecto batocrómico é tan lixeiro que é posible que o que se produza sexa unha interacción no surco, ou o conxunto dos dous tipos de interacción.^{[43][49][53]}

As gráficas suxiren o mesmo tipo de interacción para os tres compostos, pero a intensidade desta interacción, determinada pola constante de enlace complexo-ADN, é diferente. Deste xeito o axuste dos valores de absorción do máximo de entorno a 220 nm á ecuación de Wolfe–Shimmer, permítenos determinar que a maior interacción co ADN é a que presenta o complexo 4 ($K_b = 4,71 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$), seguido co complexo 3 ($K_b = 2,27 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) e finalmente, a menor interacción é a do complexo 1 ($K_b = 1,42 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$).

As constantes obtidas son comparables observadas na bibliografía para compostos que interaccionan no surco (10^3-10^4 M^{-1}). Este feito contribúe á hipótese de que a interacción destes compostos se produza no surco, xa que as constantes de interacción observadas para compostos intercalantes ascenden a valores de 10^5-10^7 M^{-1} .^{[49][53]}

As gráficas de axuste atópanse na sección de **Anexos**, onde se inclúen tamén as gráficas de absorbancia ampliadas.

5.3.2. Estudo computacional da interacción co ADN: *Molecular docking*

O coñecemento da estrutura tridimensional do ADN permite estudar a interacción con distintos compostos mediante métodos computacionais. Denomínase Docking molecular ao proceso de busca do acoplamento entre ligando (axente antitumoral neste

caso) e diana terapéutica (ADN) que sexa máis favorable tanto xeométrica como enerxéticamente.

A continuación móstranse os resultados dos estudos realizados mediante esta técnica empregando dúas estruturas de ADN como diana terapéutica e como ligando algúns dos compostos sintetizados. Partíronse dos datos obtidos mediante difracción de raios X de monocristal para o ligando L₃ e o complexo 1, e decidiuse simular mediante o programa Chem3D as estruturas do ligando L₁ e o complexo 5 para comparar os resultados entre os complexos e os seus ligandos.

Ligando L₁

O ligando L₁ presenta unha estrutura plana que lle podería permitir a intercalación entre os pares de bases do ADN. Aínda así, o estudo computacional mostra que a interacción máis favorable se produce no surco menor do ADN. É posible que o grupo nitro sexa o responsable deste tipo de interacción, xa que é un grupo voluminoso con liberdade de xiro o que pode dificultar a intercalación.

A interacción que se mostra na figura 10 vese estabilizada pola formación enlaces de hidróxeno entre os grupos OH e NH do ligando e os grupos fosfato e átomos dadores das desoxirribosas. A interacción mediante estes enlaces xunto coas demais forzas de interacción derivan nunha enerxía libre de Gibbs de -9,2 kcal/mol.

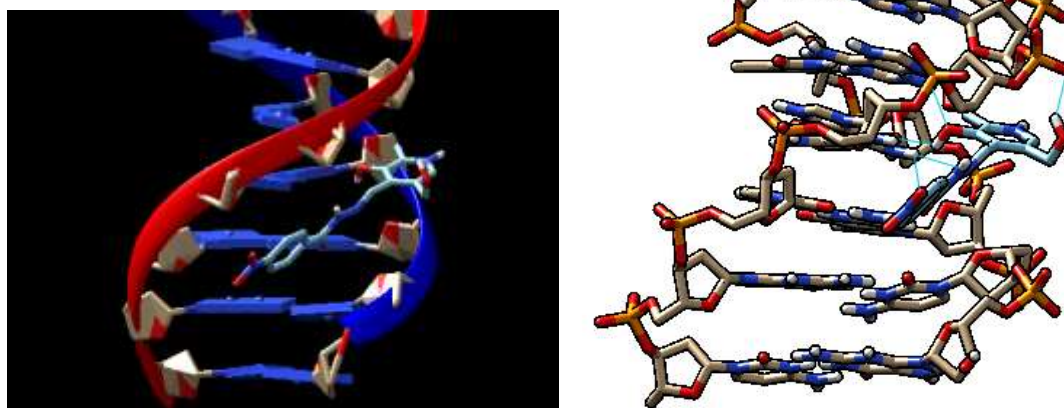


Figura 10: Interacción entre o ligando L₁ e o ADN obtida co programa Autodock.

Ligando L₃

O ligando presenta unha estrutura plana como se comprobou mediante difracción de raios X de monocristal. Esta xeometría permítelle intercalarse entre os pares de bases nitrogenadas que conforman o ADN, como se ve na figura 11.

As interaccións que se producen entre o ligando e os pares de bases dos nucleótidos, son maioritariamente π - π staking, mesmas interaccións que manteñen apilados os pares de bases nitrogenadas. Sendo de 3,8-4,0 Å as distancias entre os centros dos aneis que interactúan. Aínda así, é a suma destas interaccións coas forzas de Van de Waals e enlaces de hidróxeno, o que fai que a enerxía libre de Gibbs acade o valor de -8,0 kcal/mol.

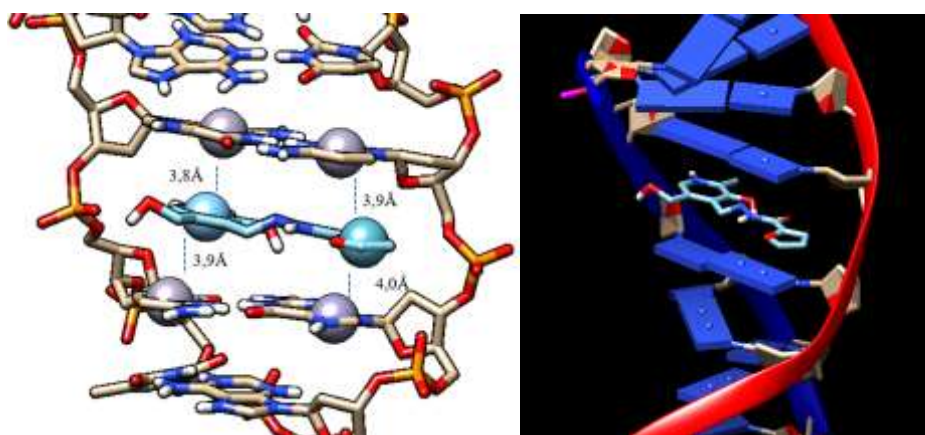


Figura 11: Interacción entre o ligando L3 e o ADN obtida co programa Autodock.

Complexo 1

A interacción que presenta o complexo 1 é similar ao do ligando que o conforma (L₁). O ligando complexado ao vanadio introdúcese no surco menor e interacciona a través do -CH₂OH co osíxeno dunha das desoxiribosas mediante enlaces de hidróxeno. Ademais a presenza do vanadio xera outro tipo de enlaces de hidróxeno non presentes no ligando libre, enlaces entre o V=O e os grupos fosfato.

O cómputo da enerxías de estabilización (electrostáticas, enlaces de hidróxeno...) derivan nunha enerxía libre de Gibbs de -12,05 kcal/mol. Estes datos apoian a interpretación realizada para os resultados experimentais.

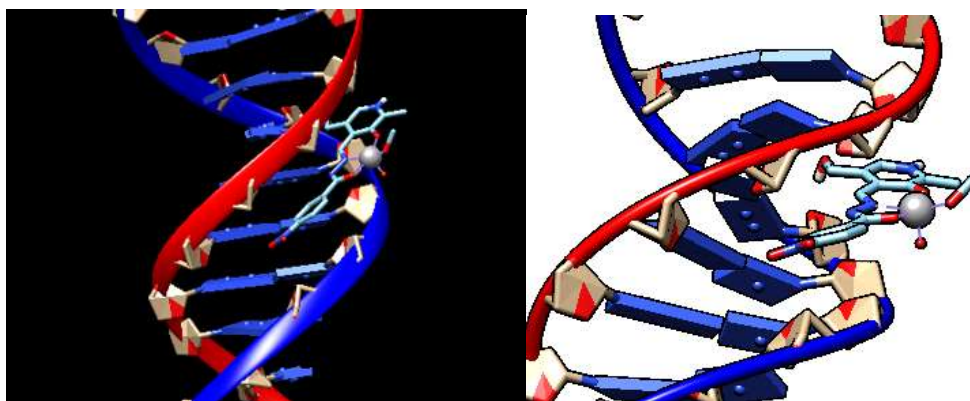


Figura 12: Interacción entre o complexo 1 e o ADN obtida co programa Autodock.

Complexo 5

Para realizar estudio da interacción deste composto coa diana terapéutica foi preciso realizar unha simulación da especie mediante o programa Chem3D. O tipo interacción que se produce entre este complexo e o ADN é a mesma que ocorre co ligando que o conforma (L_3). O composto intercala entre os pares de bases, interactuando con elas a través do ligando orgánico mediante π - π staking. A eficacia de interacción entre o complexo mononuclear e o ADN diminúe con respecto a do ligando libre. Reducindo a enerxía libre de Gibbs ata -6,53 kcal/mol.

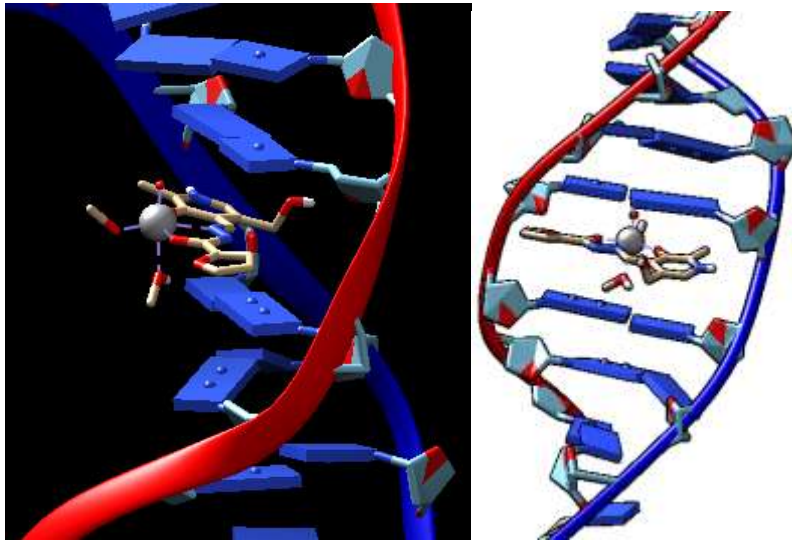


Figura 13: Interacción entre o complexo 5 e o ADN obtida co programa Autodock.

6. CONCLUSIÓNS

Os resultados das diversas técnicas de caracterización permiten afirmar que a ruta sintética escollida é axeitada para sintetizar ligandos hidrazona derivados de piridoxal, e os seus correspondentes complexos de vanadio(IV e V).

Os estudos de citotoxicidade realizados par aos complexos 1, 3 e 4, mostran unha forte correlación dose-resposta. Para o complexo 4 obsérvanse efectos tóxicos a partir da concentración 100 μ M, mentres que para os complexos 1 e 3 estes efectos prodúcense a partir da concentración 25 μ M, presentando un valor de DL₅₀ próximo a 100 μ M. A similitude dos perfíles de viabilidade obtidos para os complexos 1 e 3, unida á posible transformación de un composto en outro mediante unha reacción redox, indican a posibilidade de que a especie citotóxica sexa a mesma en ambos casos. Por outra parte, unha modificación da morfoloxía das células tras a aplicación dos tratamentos fai pensar que existe unha interacción entre estess complexos e as proteínas do citoesqueleto.

Os estudos experimentais de interacción co ADN presentan hipocromismo e un lixeiro efecto batocrómico para os complexos 1, 3 e 4, o que pode indicar intercalación ou interacción no surco. As constantes de interacción dos tres complexos son da mesma orde (10³ M⁻¹), sendo o complexo 4 o que presenta un interacción máis forte. Estas constantes son comparables para as descritas na bibliografía para interaccións no surco, quedándose lonxe das rexistradas para especies intercalantes, o que fai pensar que a interacción máis favorable é a producida no surco. Ademais, os estudos de *molecular docking* realizados para un destes compostos (complexo 1), mostran que é a interacción no surco menor a enerxeticamente máis favorable.

Mediante os estudos de *molecular docking* observamos que o tipo de interacción producida entre os complexos e o ADN é a mesma que a que presentan os ligandos libres, polo que é posible dicir que o tipo de interacción depende en gran medida da parte orgánica do complexo.

CONCLUSIONS

The results of the characterization techniques shows that the synthetic route chosen is appropriate for the synthesis of hidrazone ligands derived from pyridoxal, and their corresponding vanadium(IV and V) complexes.

The cytotoxicity studies realized for the complexes 1, 3 and 4 show a strong correlation dose-answer. In the complex 4, toxic effects are observed starting at 100 μ M concentration, whereas in the complexes 1 and 3 these effects are produced starting at 25 μ M concentration, showing a DL_{50} value near to 100 μ M. The similarity of the viability profiles obtained for the complexes 1 and 3, and the possible transformation of a compound to another one through a redox reaction, indicate the possibility of the cytotoxic specie to be the same in both cases. Additionally, a modification of cells' morphology after the application of the treatments suggests that there is an interaction between these complexes and the cytoskeleton's proteins.

The experimental interaction with DNA studies shows hypochromism and a moderate bathochromic effect for the complexes 1, 3 and 4, which may suggest intercalation mode or a groove binding. The interaction constants of the three complexes are similar (10^3 M^{-1}), with complex 4 having a stronger interaction. These constants are comparable to the ones described in the bibliography for the groove binding, and so different for the intercalating species, what suggests that the most favorable interaction is the groove binding. In addition, the molecular docking studies realized for one of these compounds (complex 1), show that the interaction in the minor groove is the most energetically favorable.

Through the molecular docking studies we observe that the type of interaction produced between the DNA and the complexes is the same than the one that the free ligands present, so that is possible to say that the type of interaction depends mostly of the organic part of the complex.

7. ANEXOS

7.1. Espectrometría de Masas

7.1.1. Ligando L₁

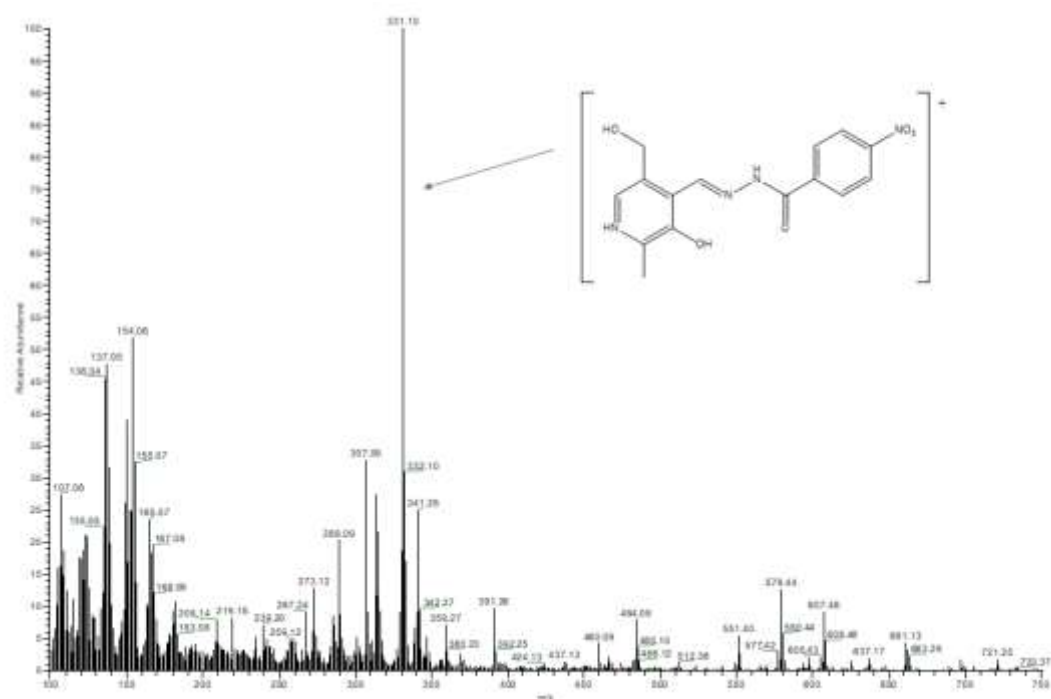


Figura 14: Espectro de masas do ligando L₁ realizado con ionización tipo FAB.

7.1.2. Ligando L₂

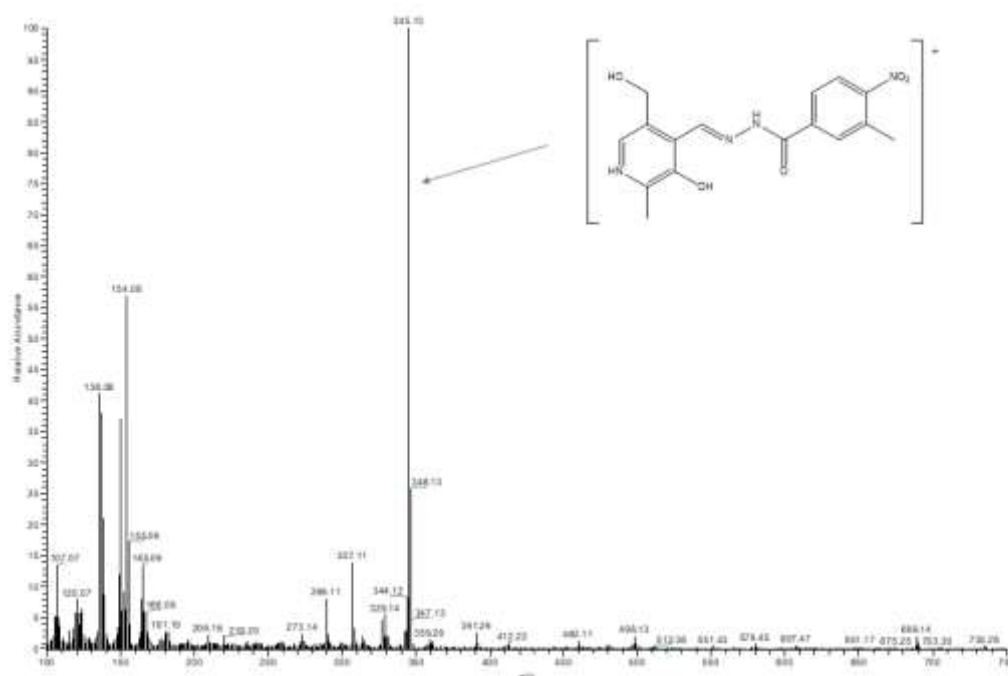


Figura 15: Espectro de masas do ligando L₂ realizado con ionización tipo FAB.

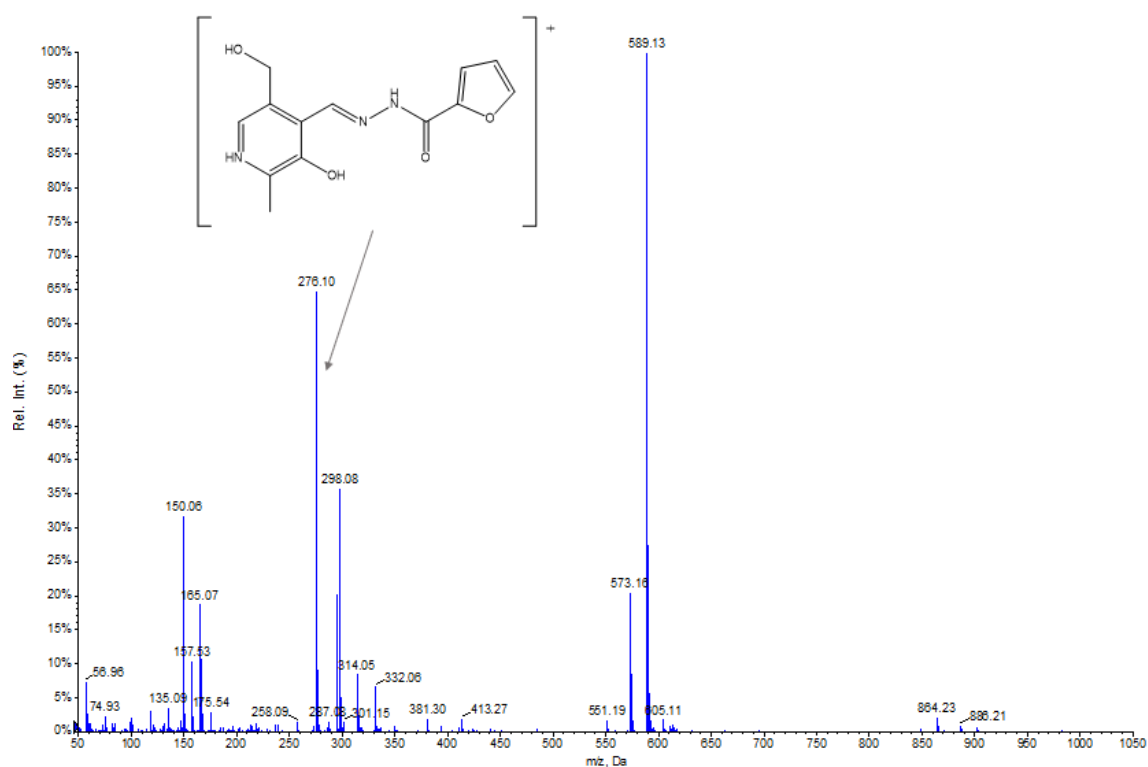
7.1.3. Ligando L₃

Figura 16: Espectro de masas do ligando L₃ realizado con ionización tipo ESI en modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

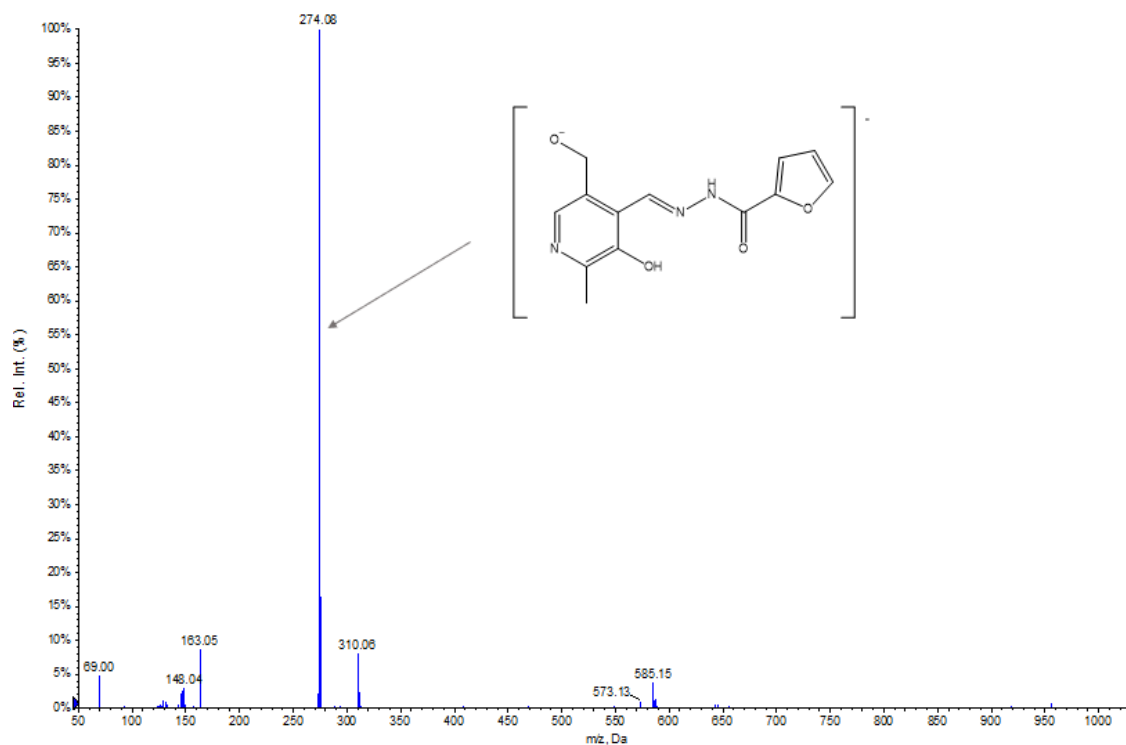


Figura 17: Espectro de masas do ligando L₃ realizado con ionización tipo ESI en modo negativo. Disolvente: metanol/auga.

7.1.4. Complejo 1

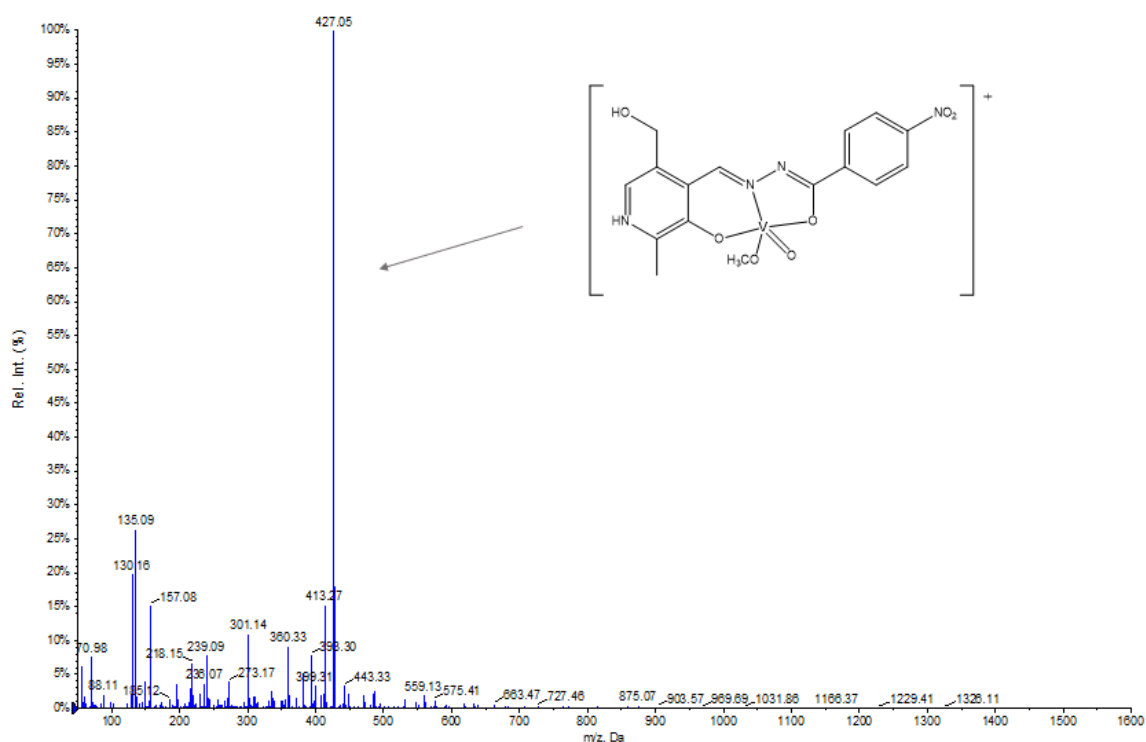


Figura 18: Espectro de masas do complexo 1 realizado con ionización tipo ESI en modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

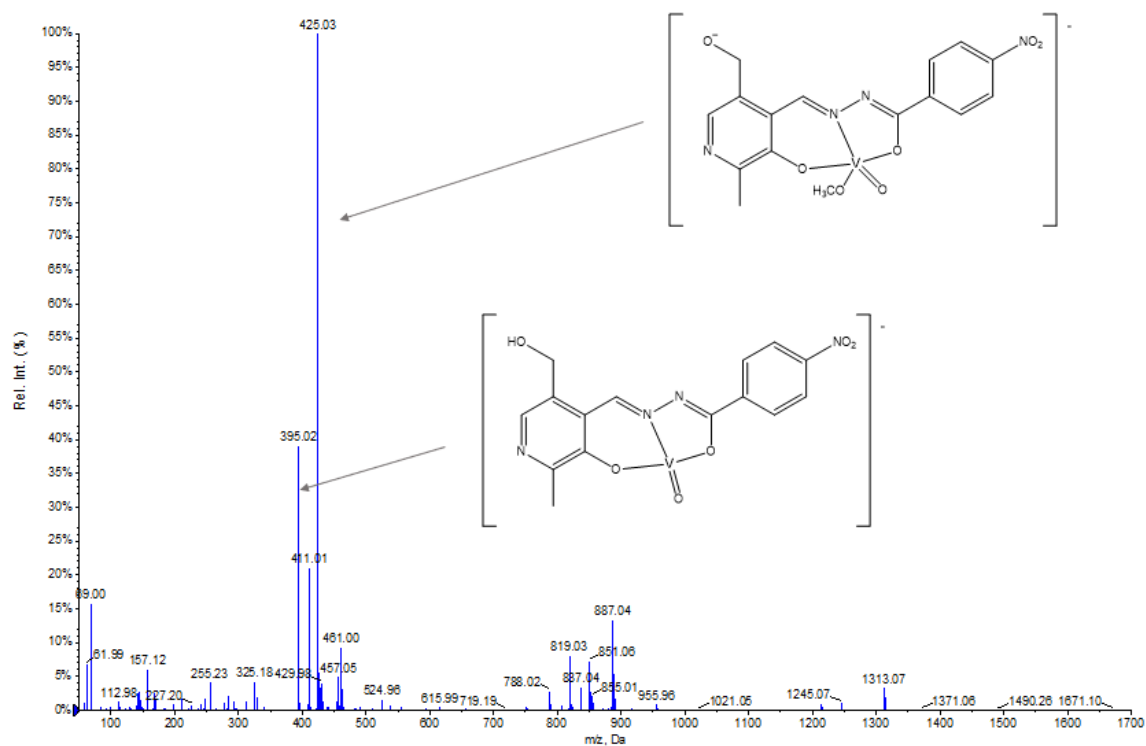


Figura 19: Espectro de masas do complexo 1 realizado con ionización tipo ESI en modo negativo. Disolvente: metanol/auga.

7.1.5. Complejo 2

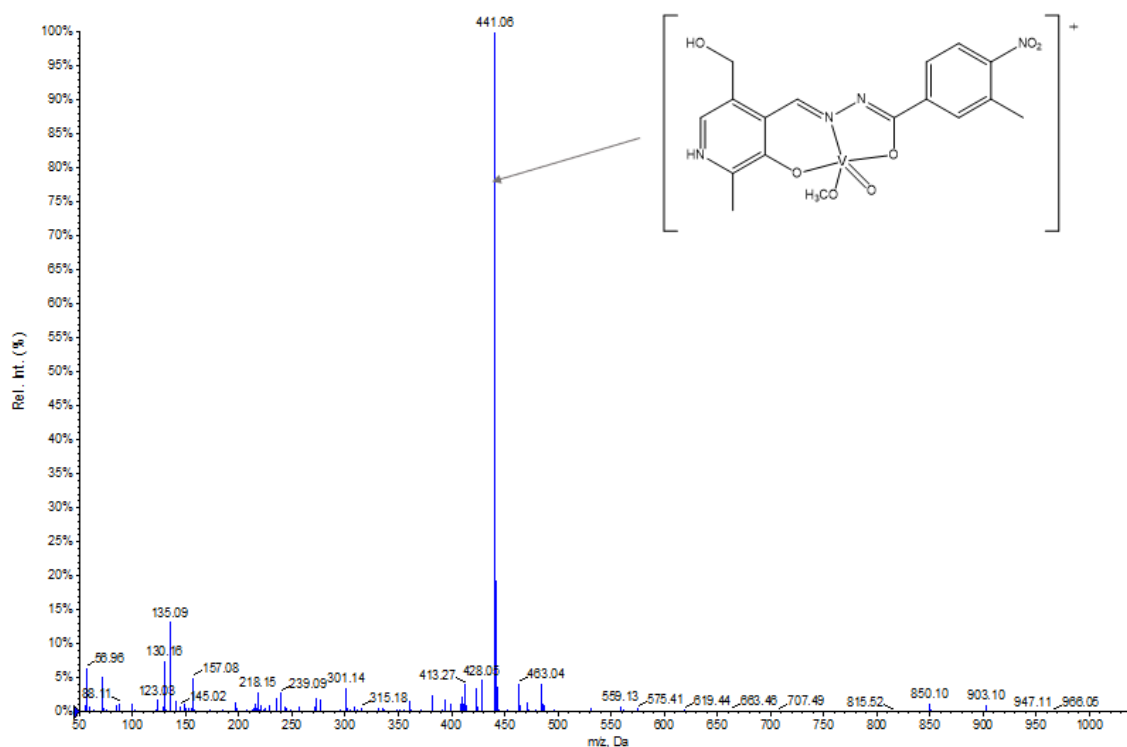


Figura 20: Espectro de masas do complexo 2 realizado com ionização tipo ESI em modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

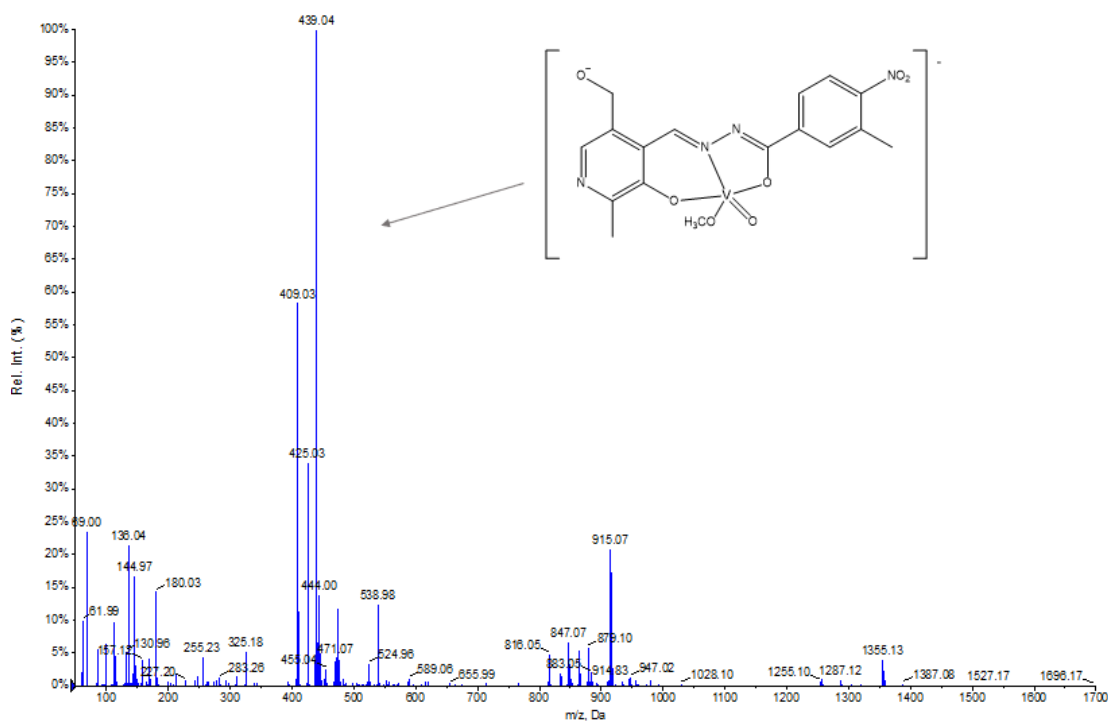


Figura 21: Espectro de masas do complexo 1 realizado com ionização tipo ESI em modo negativo. Disolvente: metanol/auga.

7.1.6. Complejo 3

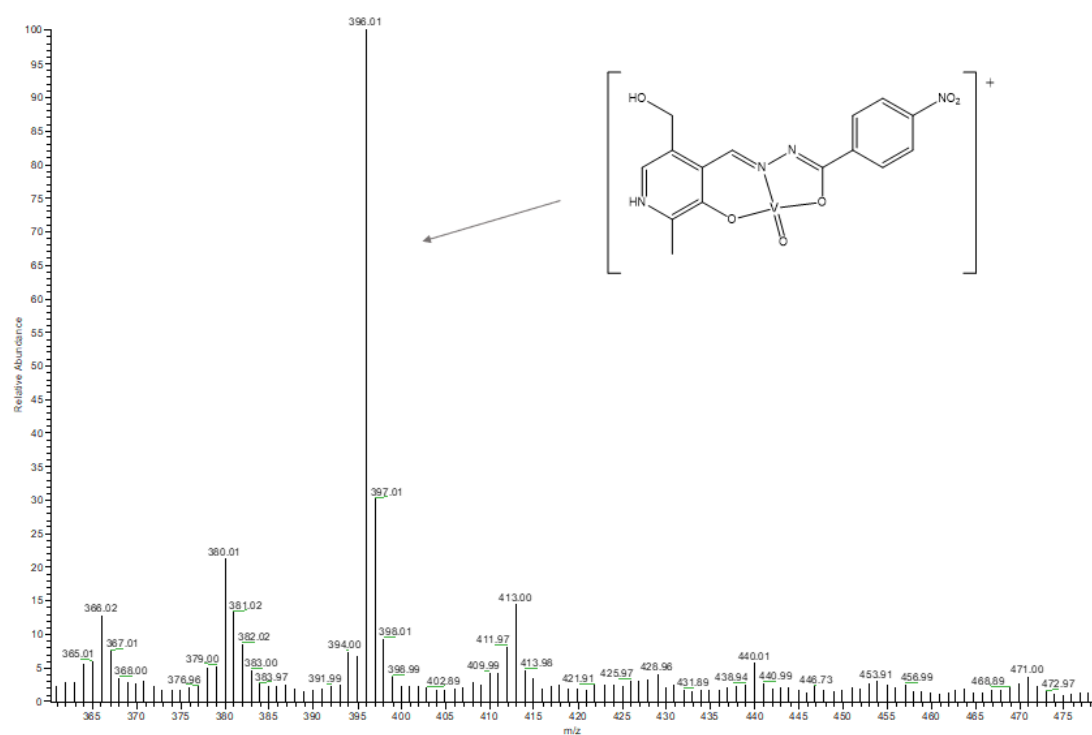


Figura 22: Espectro de masas do complexo 3 realizado com ionização tipo FAB. Matriz: tioglicerol.

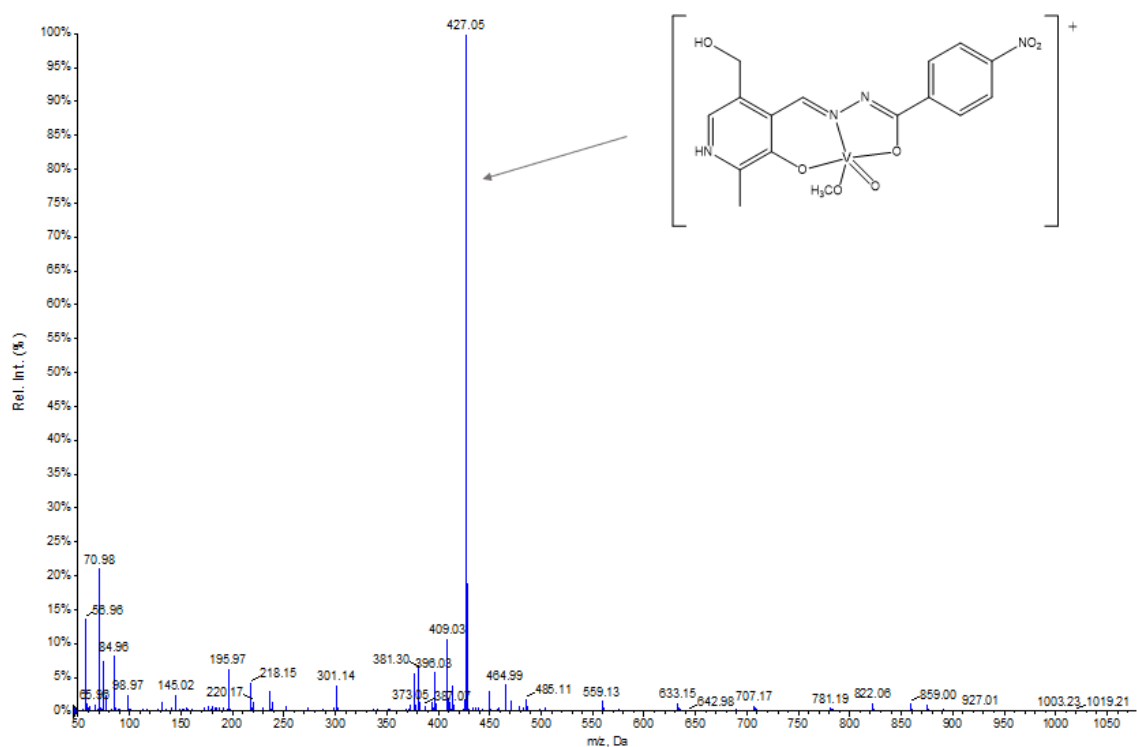


Figura 23: Espectro de masas do complexo 3 realizado com ionização tipo ESI em modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

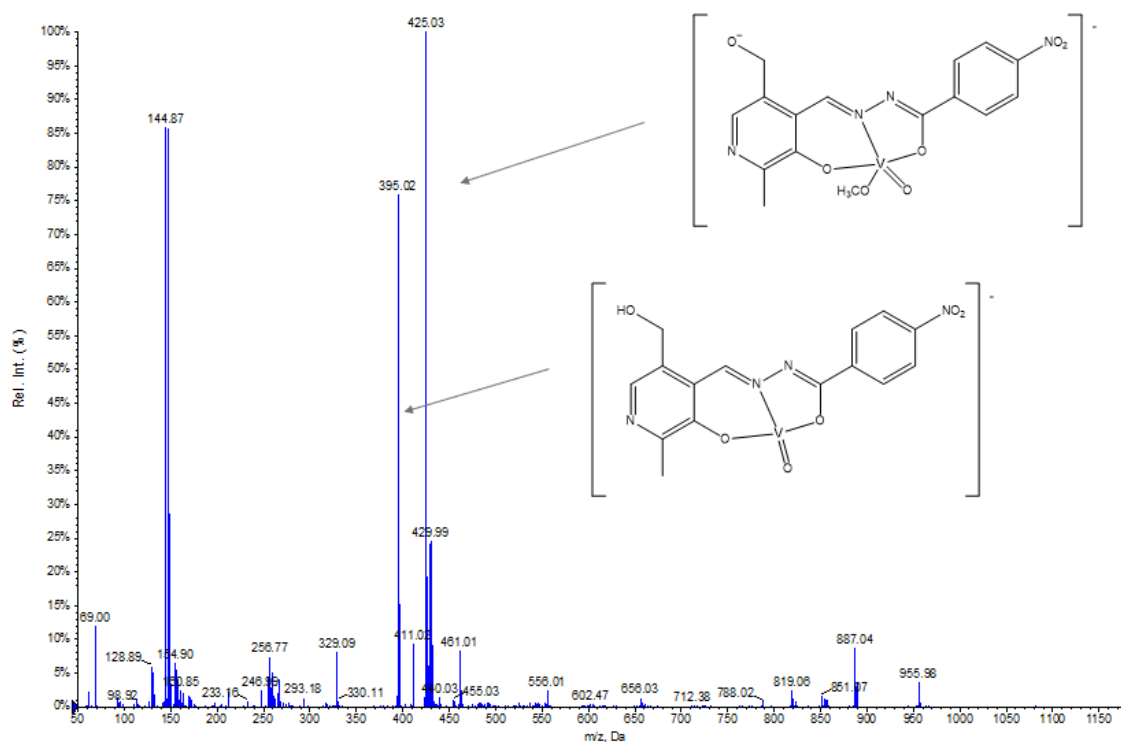


Figura 24: Espectro de masas do complexo 3 realizado com ionização tipo ESI em modo negativo. Disolvente: metanol/auga.

7.1.7. Complexo 4

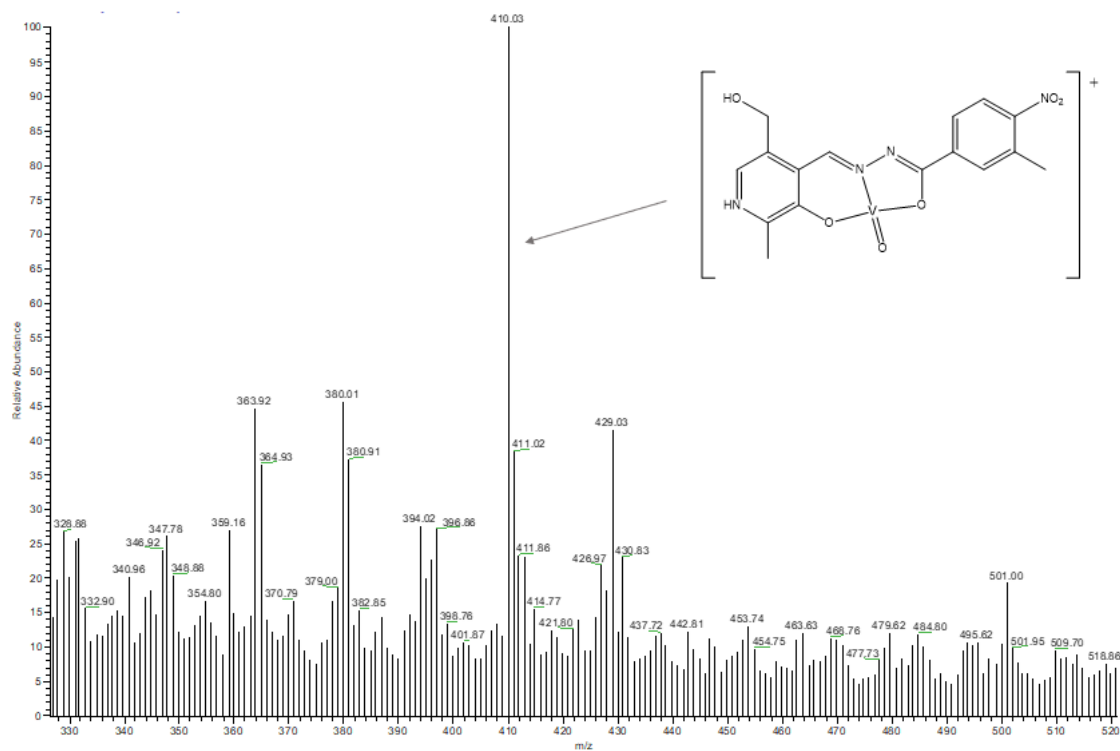


Figura 25: Espectro de masas do complexo 4 realizado com ionização tipo FAB. Matriz: tioglicerol.

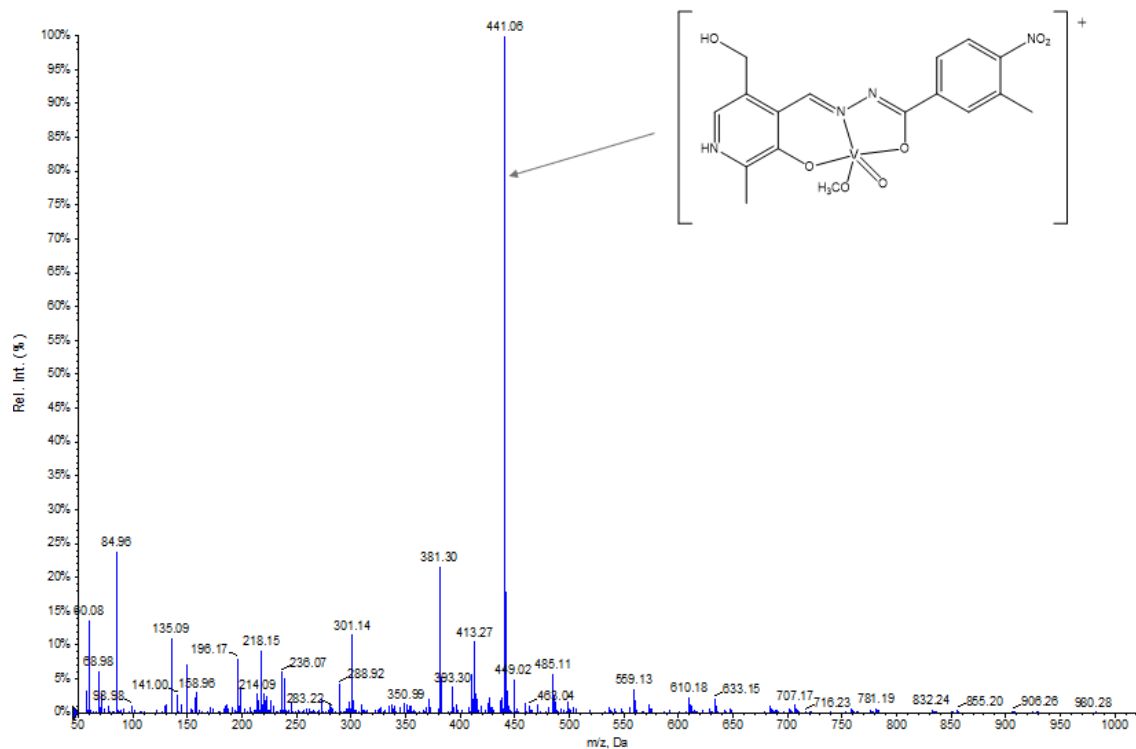


Figura 26: Espectro de masas do complexo 4 realizado com ionização tipo ESI em modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

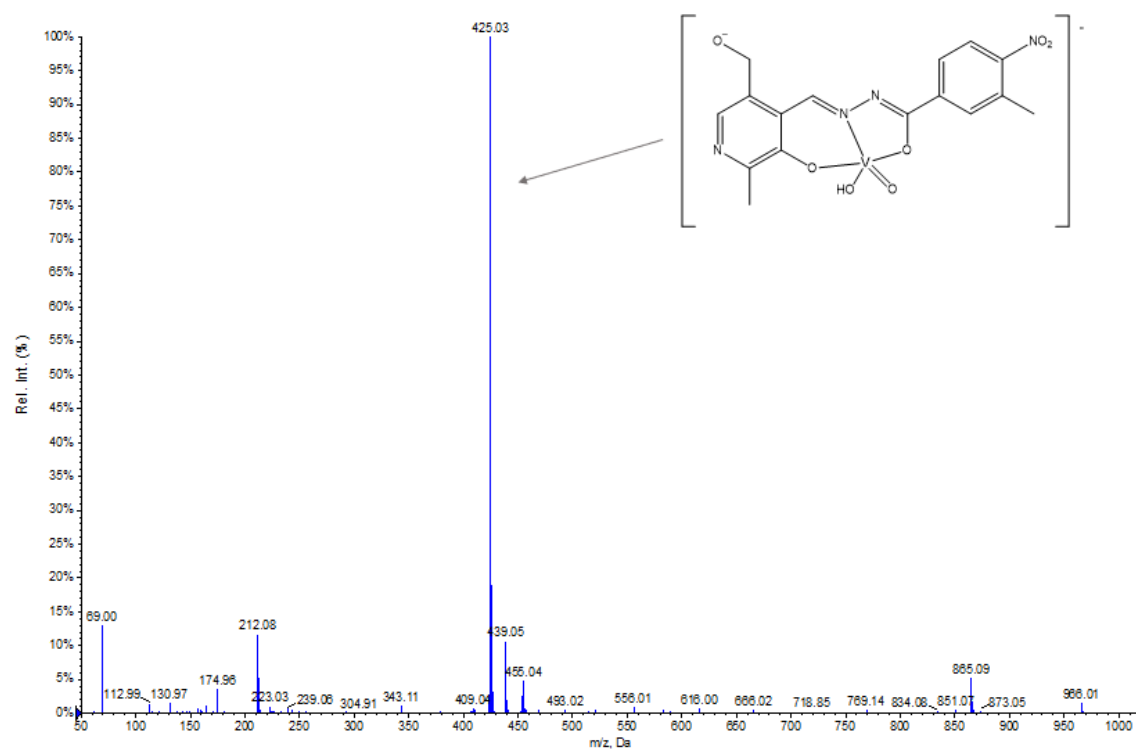


Figura 27: Espectro de masas do complexo 4 realizado com ionização tipo ESI em modo negativo. Disolvente: metanol/auga.

7.1.8. Complejo 5

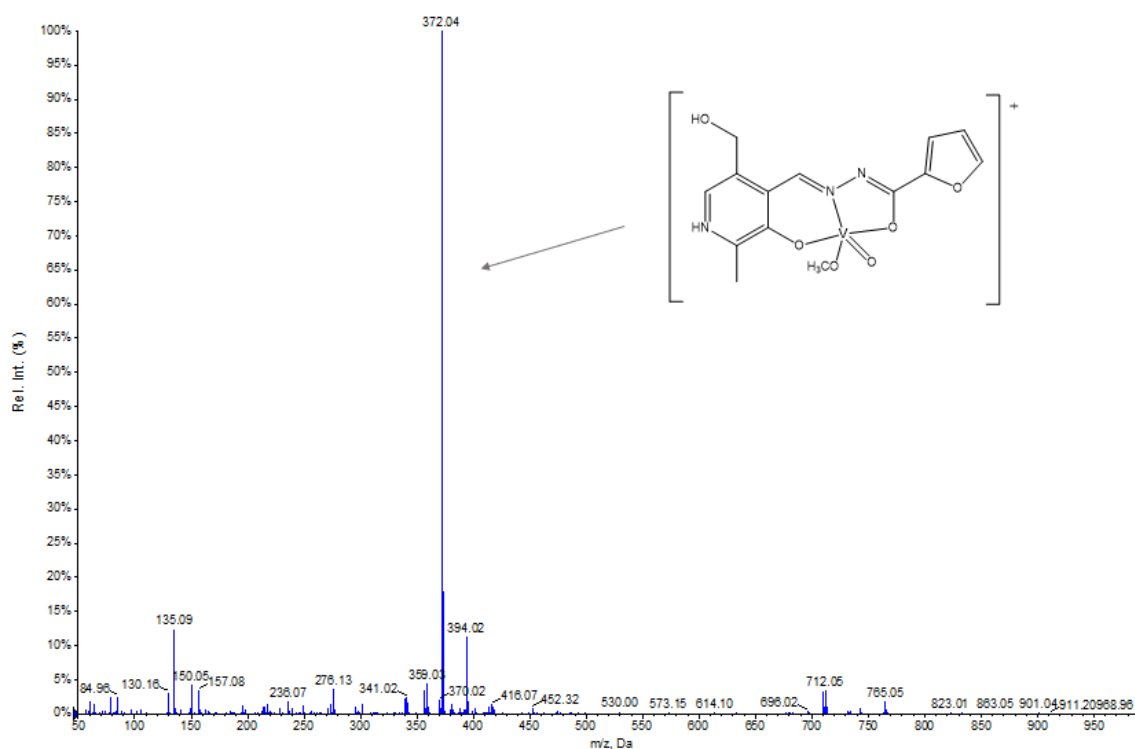


Figura 28: Espectro de masas do complexo 5 realizado com ionização tipo ESI em modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

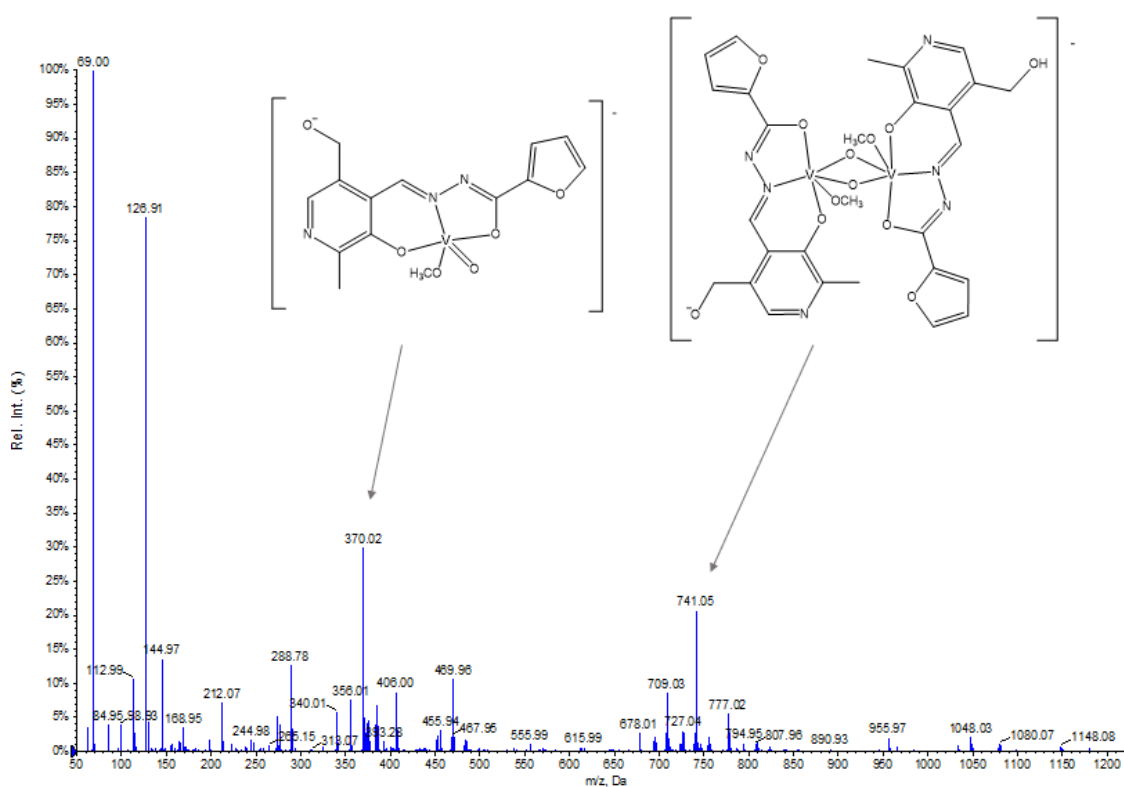


Figura 29: Espectro de masas do complexo 1 realizado com ionização tipo ESI em modo positivo. Disolvente: metanol/auga.

7.2. Espectroscopia de infravermello

7.2.1. Ligando L₁

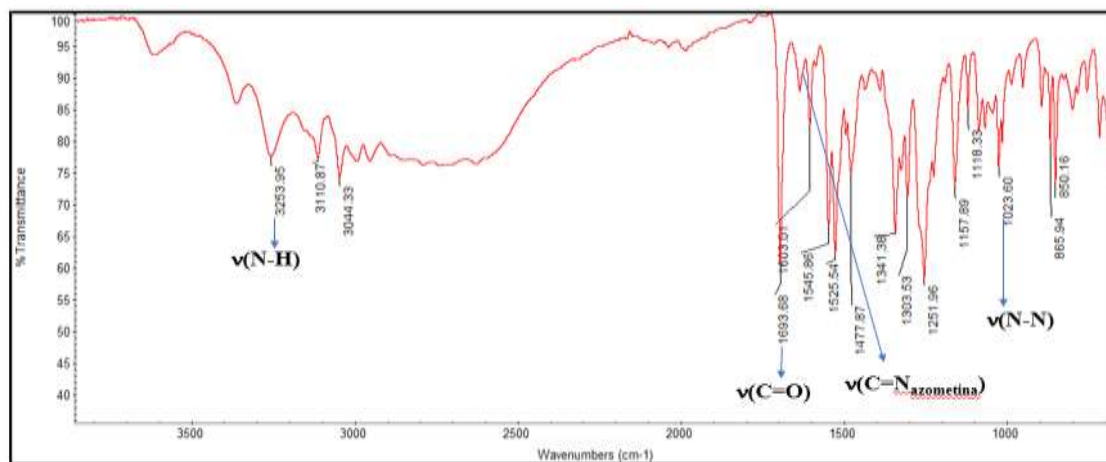


Figura 30: Espectro de infravermello do ligando L₁.

7.2.2. Ligando L₂

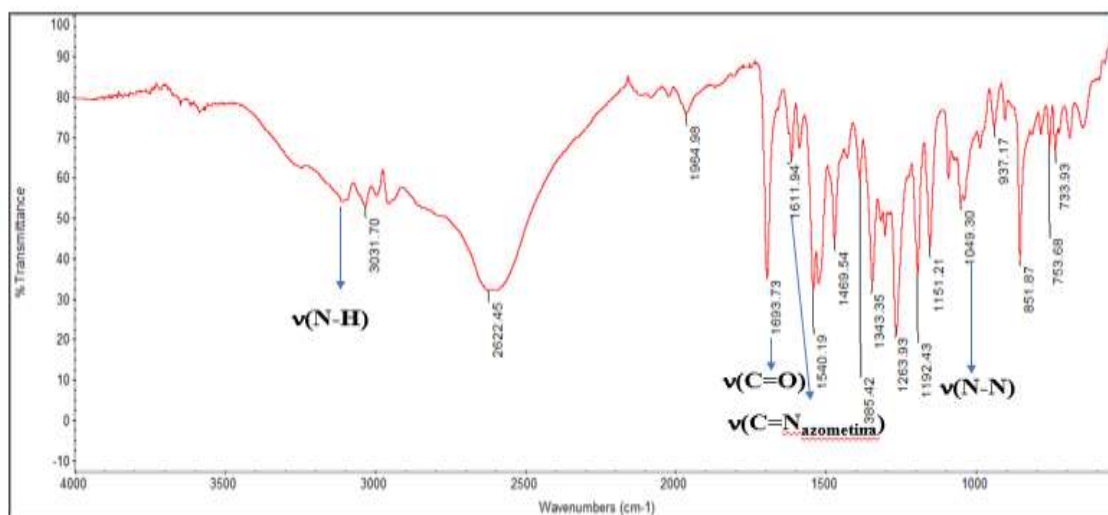


Figura 31: Espectro de infravermello do ligando L₂.

7.2.3. Ligando L₃

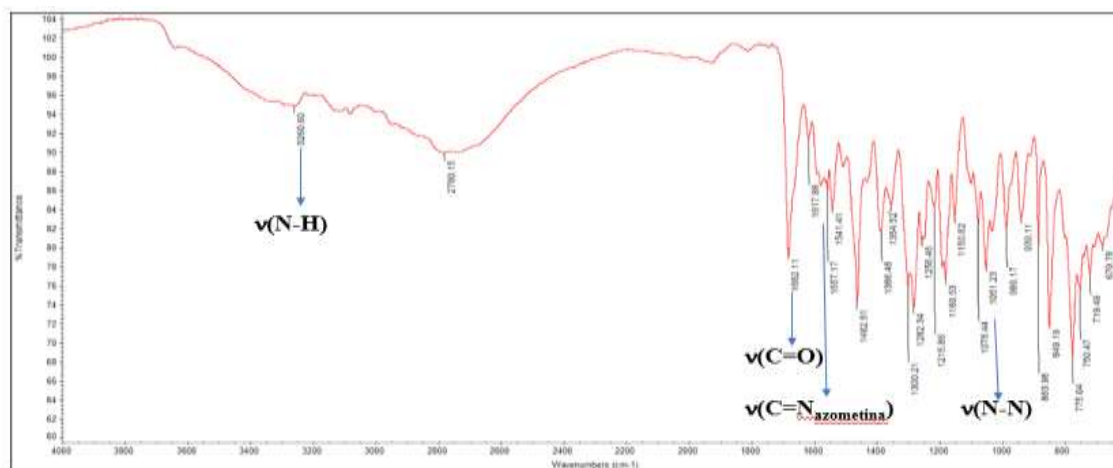


Figura 32: Espectro de infravermello do ligando L₃.

7.2.4. Complexo 1

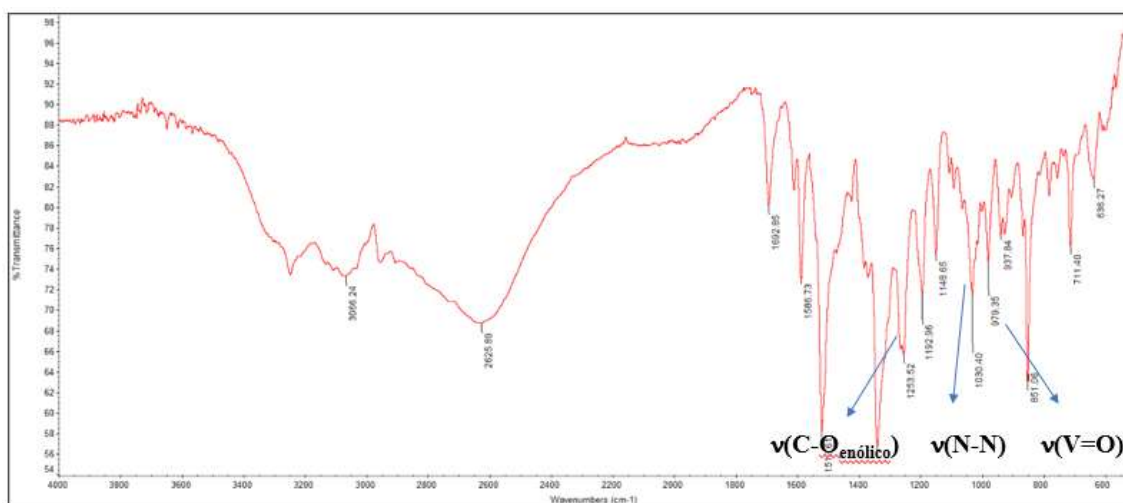


Figura 33: Espectro de infravermelho do complexo 1.

7.2.5. Complexo 2

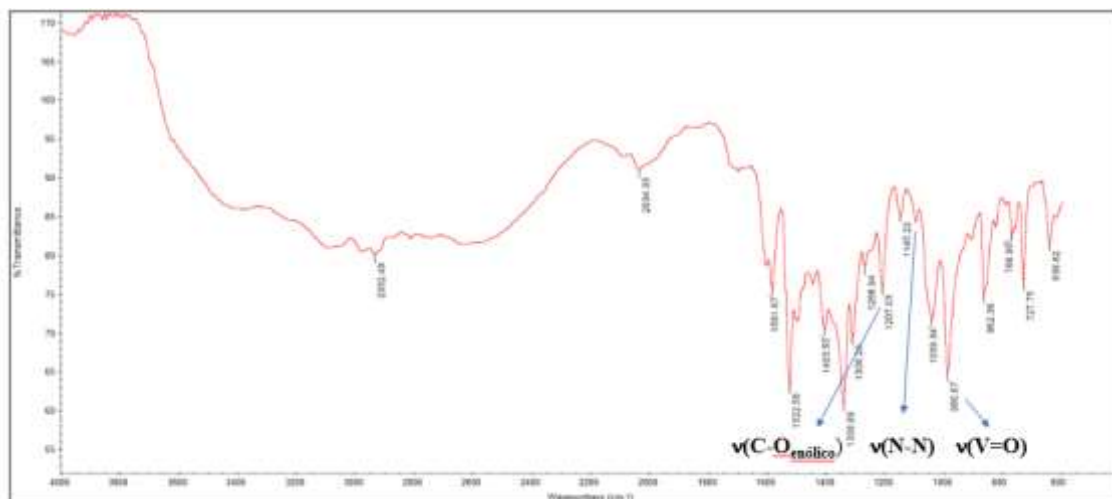


Figura 34: Espectro de infravermelho do complexo 2.

7.2.6. Complexo 3

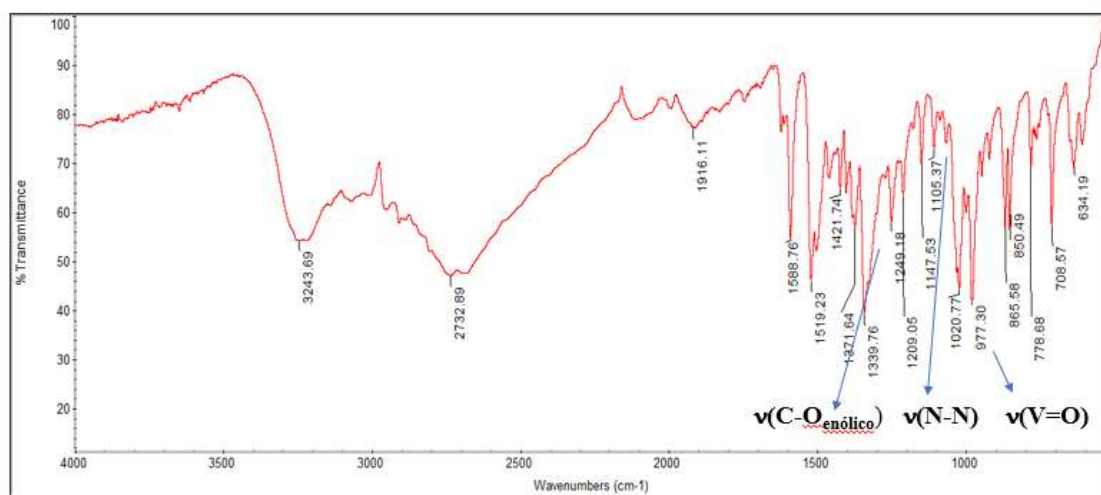


Figura 35: Espectro de infravermelho do complexo 3.

7.2.7. Complexo 4

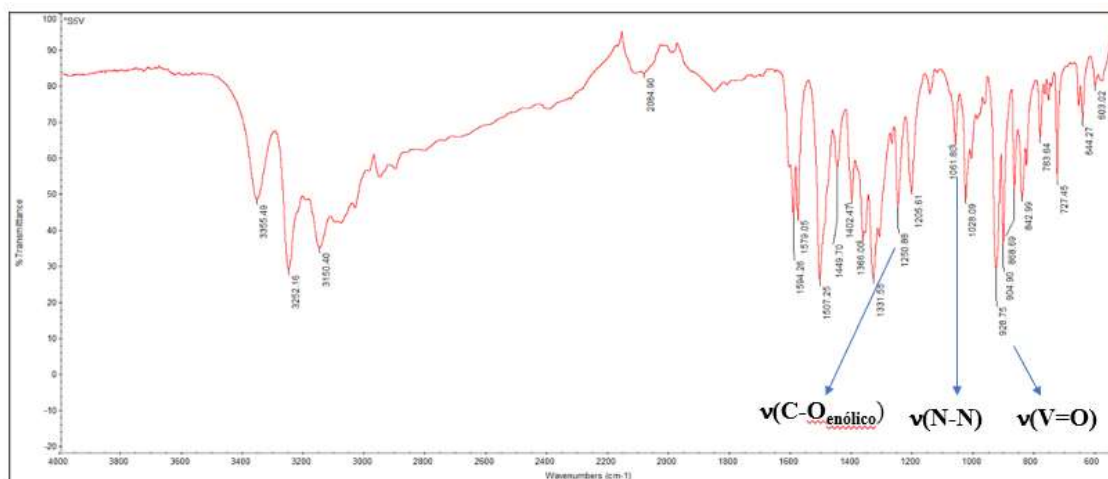


Figura 36: Espectro de infravermelho do complexo 4.

7.2.8. Complexo 5

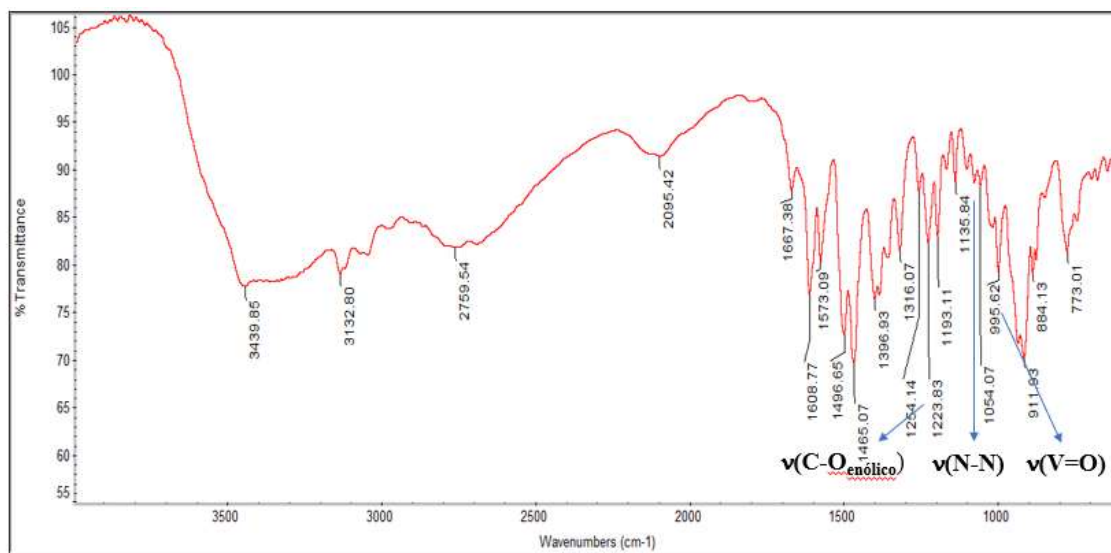
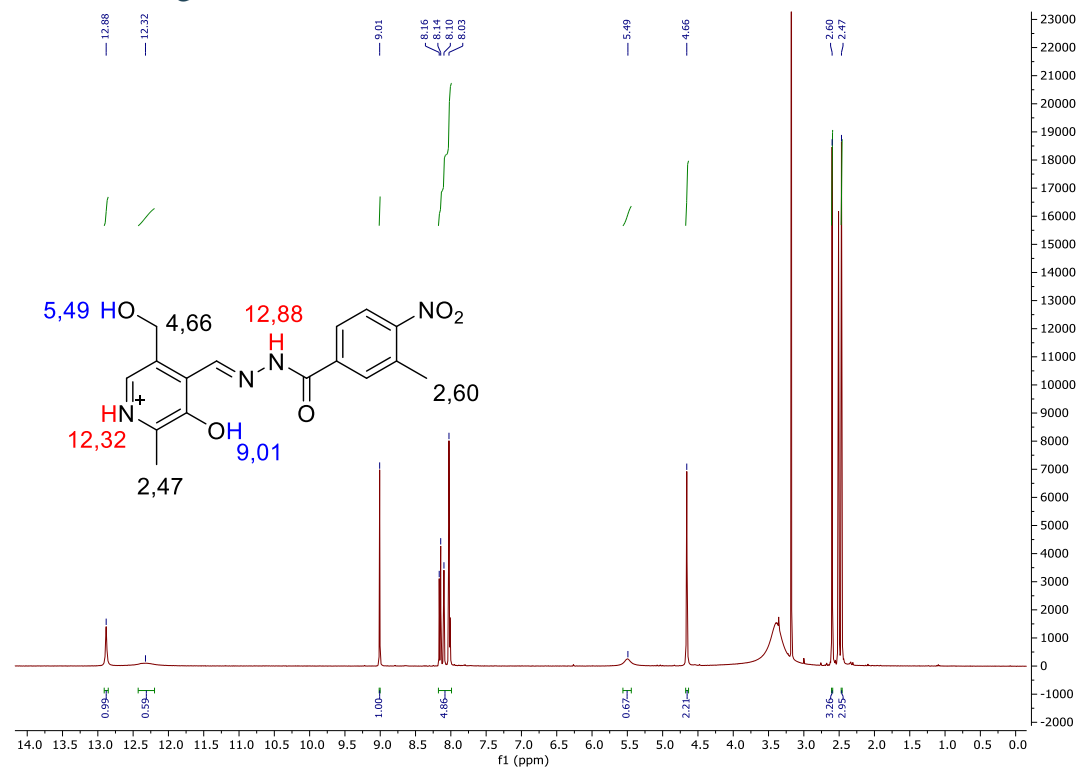
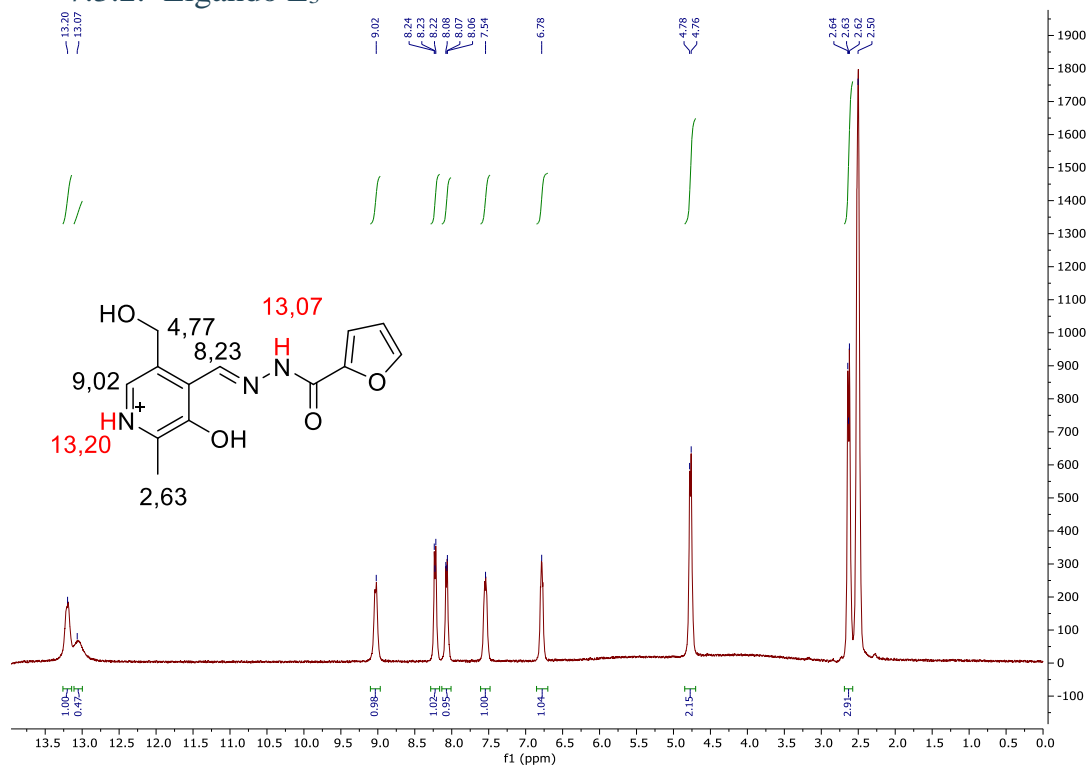
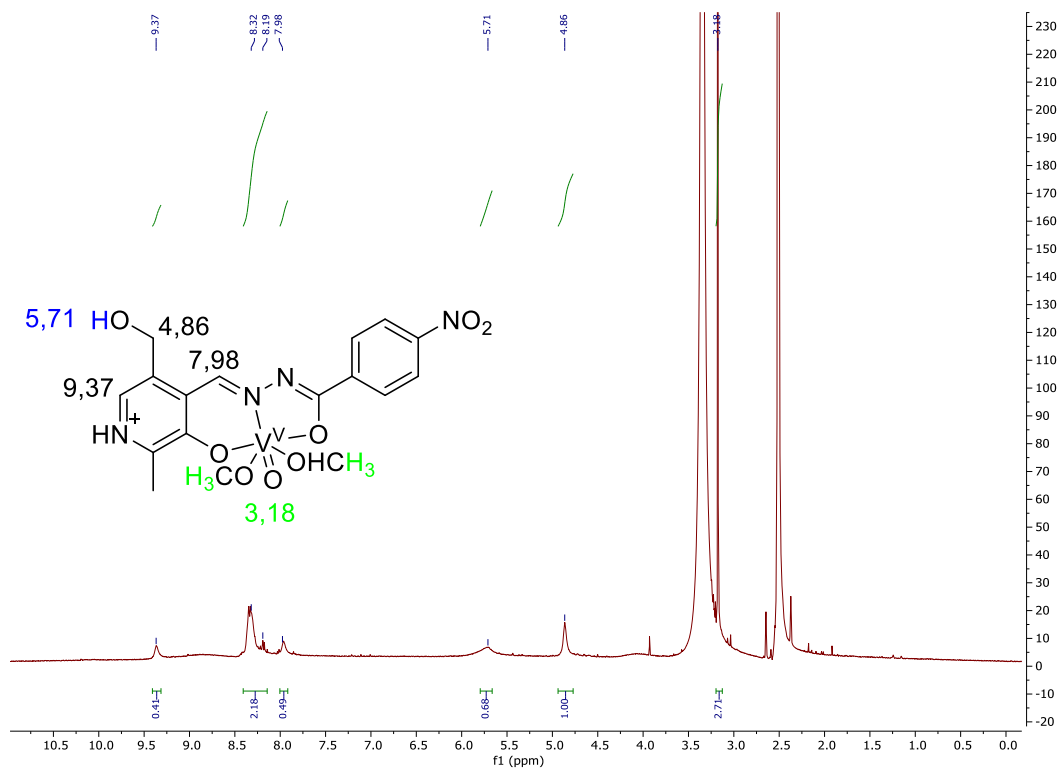


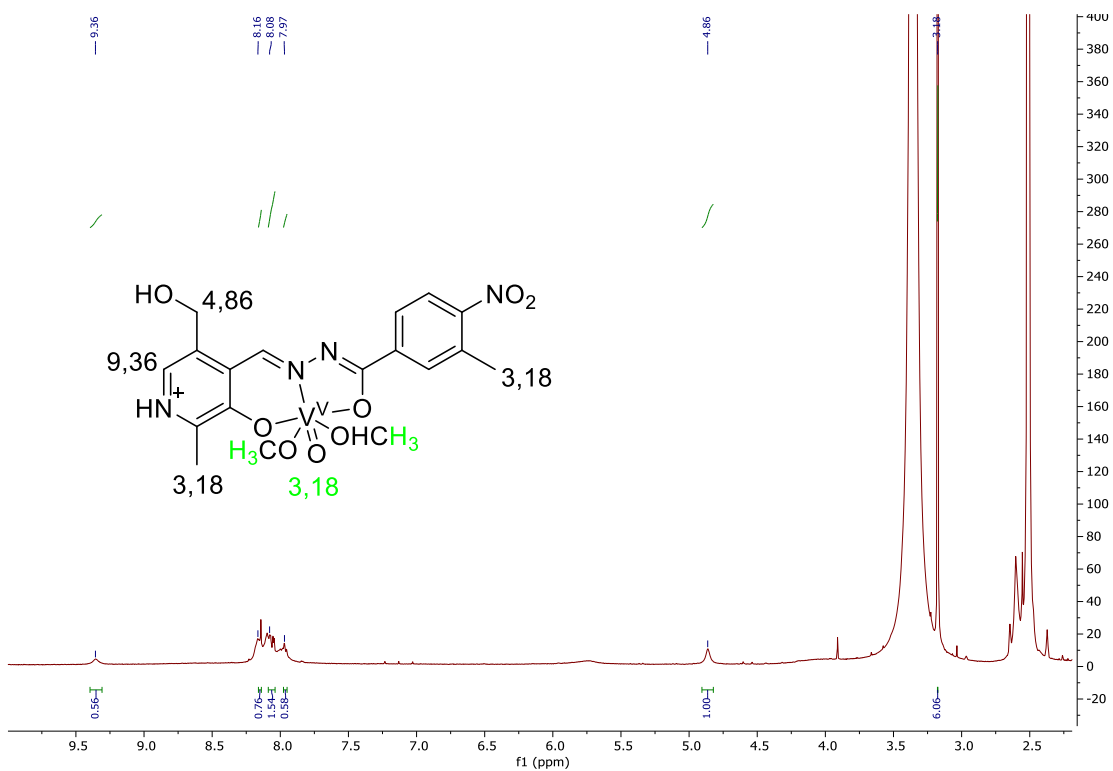
Figura 37: Espectro de infravermelho do complexo 5.

7.3. Espectroscopia RMN de ^1H 7.3.1. Ligando L_2 Figura 38: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do ligando L_2 .7.3.2. Ligando L_3 Figura 39: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do ligando L_3 .

7.3.3. Complexo 1

Figura 40: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do complexo 1.

7.3.4. Complexo 2

Figura 41: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do complexo 2.

7.3.5. Complexo 5

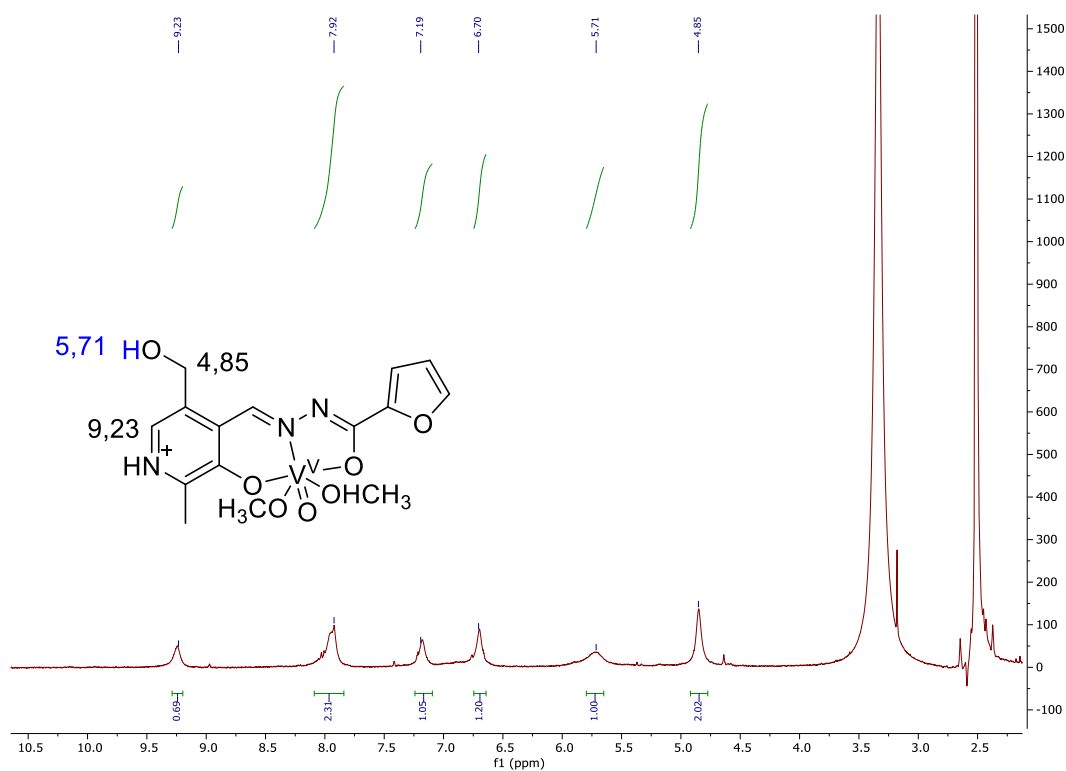


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do complexo 5.

7.3.6. Complexo 3

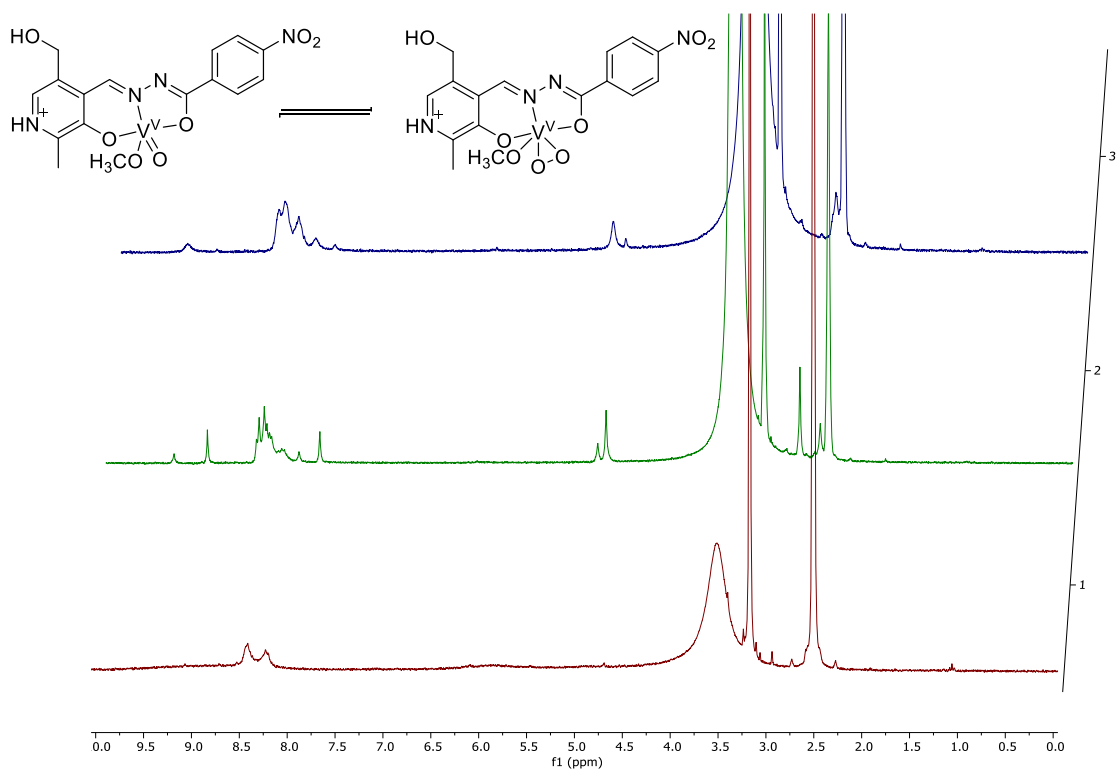


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do complexo 4: (1) estado inicial, (2) tras a adición e H_2O_2 e (3) 24h depois da adición do oxidante.

7.4. Difracción de raios X de monocristal

7.4.1. Ligando L₃

| Información cristalográfica | |
|--|---|
| Fórmula empírica | C ₁₃ H ₁₄ ClN ₃ O ₄ |
| Peso molecular | 311.72 |
| Temperatura | 100(2) K |
| Lonxitude de onda | 0.71073 Å |
| Sistema cristalino | Monoclínico |
| Grupo espacial | P2 ₁ /n |
| Dimensión cela unidade | a=7.3762(6) Å α = 90° b = 11.7478(10) Å β = 93.458(4)° c = 16.0256(14) Å γ = 90° |
| Volume | 1386.2(2) Å ³ |
| Z | 4 |
| Densidade (calculada) | 1.494 Mg/m ³ |
| Coefficiente de absorción | 0.296 mm ⁻¹ |
| F(000) | 648 |
| Tamaño cristal | 0.27 x 0.08 x 0.06 mm ³ |
| Rango theta para a colección de datos | 2.15 a 26.41° |
| Rangos indexación | -9<=h<=9 -14<=k<=14 -20<=l<=19 |
| Reflexións recollidas | 32637 |
| Reflexións independentes | 2848 [R(int)=0.0721] |
| Completitude para theta =26.41° | 99,9% |
| Máximo e mínimo de transmisión | 0.9819 e 0,9249 |
| Datos / restriccións / parámetros | 2848 / 0 / 228 |
| Calidade de axuste en F2 | 1.023 |
| Índice final R [I>2sigma(I)] | R ₁ = 0.0507, wR ₂ = 0.1298 |
| Índices R (todos os datos) | R ₁ = 0.0735, wR ₂ = 0.1441 |
| Coefficientes de extinción | 0.024(3) |
| Densidade residual | 0,355 e -0,332 eÅ ⁻³ |

Táboa 23: Información cristalográfica do ligando L₃.

| D-H...A | d(D-H) | D(H...A) | d(D...A) | <(DHA) |
|-----------------------|---------|----------|----------|--------|
| O(1)-H(1O)...N(1) | 1.00(3) | 1.68(3) | 2.541(3) | 141(3) |
| O(2)-H(2O)...Cl(1)#1 | 1.00(4) | 2.07(4) | 3.066(2) | 176(3) |
| N(2)-H(2N)...Cl(1) | 0.90(3) | 2.31(3) | 3.175(2) | 161(2) |
| N(3)-H(3N)...Cl(1) #2 | 0.96(3) | 2.15(3) | 3.103(2) | 169(3) |

Táboa 24: Distancias e ángulos nos enlaces de hidróxeno formados no ligando L₃.
Simetrías: #1: -x+3/2, y-1/2, -z+1/2 #2: x-1/2, -y-3/2, z-1/2

7.4.2. Complexo 1

| Información cristalográfica | |
|--|---|
| Fórmula empírica | C ₁₇ H ₂₀ ClN ₄ O ₈ V |
| Peso molecular | 494.76 |
| Temperatura | 100(2) K |
| Lonxitude de onda | 0.71073 Å |
| Sistema cristalino | Monoclínico |
| Grupo espacial | P2 ₁ /c |
| Dimensión cela unidade | a=15.0791(11) Å α = 90° b = 10.3832(8) Å β = 101.402(3)° c = 13.4243(10) Å γ = 90° |
| Volume | 2060.4(3) Å ³ |
| Z | 4 |
| Densidade (calculada) | 1.595 Mg/m ³ |
| Coefficiente de absorción | 0.665 mm ⁻¹ |
| F(000) | 1016 |
| Tamaño cristal | 0.18 x 0.07 x 0.03 mm ³ |
| Rango theta para a colección de datos | 1.38 a 26.46° |
| Rangos indexación | -18<=h<=18 -13<=k<=13 -16<=l<=15 |
| Reflexións recollidas | 46163 |
| Reflexións independentes | 4244 [R(int)=0.0761] |
| Compleitude para theta =26.46° | 99,8% |
| Máximo e mínimo de transmisión | 0.9797 e 0,8886 |
| Datos / restriccións / parámetros | 4244 / 0 / 327 |
| Calidade de axuste en F2 | 1.041 |
| Índice final R [I>2sigma(I)] | R ₁ = 0.0393, wR ₂ = 0.1070 |
| Índices R (todos os datos) | R ₁ = 0.0578, wR ₂ = 0.1240 |
| Densidade residual | 0,281 e -0,480 eÅ ⁻³ |

Táboa 25: Información cristalográfica do complexo 1.

| D-H...A | d(D-H) | D(H...A) | d(D...A) | <(DHA) |
|-----------------------|---------|----------|----------|--------|
| O(2M)-H(2M)...Cl(1) | 0.72(3) | 2.38(4) | 3.091(4) | 172(3) |
| N(3)-H(3N)...Cl(1) #1 | 0.79(3) | 2.36(3) | 3.147(2) | 173(2) |
| O(4)-H(4O)...Cl(1) #2 | 0.89(4) | 2.21(4) | 3.099(2) | 177(3) |

Táboa 26: Distancias e ángulos nos enlaces de hidróxeno formados no complexo 1. Simetrías: #1: -x+1, y-1/2, -z+1/2 #2: x, -y+1/2, z-1/2

| Distancia V-D (Å) | |
|-------------------|------------|
| V(1)-O(1) | 1.5871(19) |
| V(1)-O(1M) | 1.7790(18) |
| V(1)-O(2) | 1.8819(18) |
| V(1)-O(3) | 1.9443(18) |
| V(1)-N(1) | 2.143(2) |
| V(1)-O(2M) | 2.246(2) |

Táboa 27: Distancias de enlace entre o vanadio e os átomos coordinados no complexo 1.

| Ángulo D-V-D (°) | | | |
|------------------|-----------|------------------|-----------|
| O(1)-V(1)-O(1M) | 100.70(9) | O(1M)-V(1)-N(1) | 160.31(9) |
| O(1)-V(1)-O(2) | 98.95(9) | O(2)-V(1)-N(1) | 83.17(8) |
| O(1M)-V(1)-O(2) | 99.59(8) | O(3)-V(1)-N(1) | 74.87(8) |
| O(1)-V(1)-O(3) | 95.78(9) | O(1)-V(1)-O(2M) | 176.12(9) |
| O(1M)-V(1)-O(3) | 97.32(8) | O(1M)-V(1)-O(2M) | 82.58(8) |
| O(2)-V(1)-O(3) | 155.04(8) | O(3)-V(1)-O(2M) | 81.66(8) |
| O(1)-V(1)-N(1) | 98.09(9) | | |

Táboa 28: Ángulos de enlace da coordinación do vanadio no complexo 1.

7.4.3. Complexo 4

| Información cristalográfica | |
|--|--|
| Fórmula empírica | C ₁₇ H ₁₈ ClN ₄ O ₇ V |
| Peso molecular | 477.76 |
| Temperatura | 100.15 K |
| Lonxitude de onda | 0.71073 Å |
| Sistema cristalino | Monoclínico |
| Grupo espacial | P2 ₁ /n |
| Dimensión cela unidade | a=13.877(7) Å α = 90° b = 12.903(7) Å β = 116.660(7)° c = 14.645(8) Å γ = 90° |
| Volume | 2344(2) Å ³ |
| Z | 4 |
| Densidade (calculada) | 1.3540 g/cm ³ |
| Coefficiente de absorción | 0.579 mm ⁻¹ |
| F(000) | 982.4 |
| Tamaño cristal | 0.189 x 0.13 x 0.051 mm ³ |
| Rango 2theta para a colección de datos | 4.44 a 53.16° |
| Rangos indexación | -17<=h<=17 -16<=k<=16 -18<=l<=18 |
| Reflexións recollidas | 31375 |
| Reflexións independentes | 4821 [R(int)=0.1867] |
| Datos / restriccións / parámetros | 4821 / 0 / 275 |
| Calidade de axuste en F2 | 0.972 |
| Índice final R [I>2sigma(I)] | R ₁ = 0.0826, wR ₂ = 0.2027 |
| Índices R (todos os datos) | R ₁ = 0.1510, wR ₂ = 0.2499 |
| Densidade residual | 0,99 e -0,82 eÅ ⁻³ |

Táboa 29: Información cristalográfica do complexo 5.

| D-H...A | d(D-H) | D(H...A) | d(D...A) | <(DHA) |
|-----------------------|--------|----------|----------|--------|
| N(3)-H(3N)...Cl(1) #1 | 0.88 | 2.15 | 3.024(8) | 170.0 |

Táboa 30: Distancias entre os átomos no enlace de hidróxeno formado no complexo 4. Simetría: #1: -x+1/2, y+1/2, z+1/2

| Distancia V-D (Å) | |
|-------------------|----------|
| V(1)-O(1M) | 1.730(4) |
| V(1)-O(1) | 1.579(5) |
| V(1)-N(1) | 2.157(4) |
| V(1)-O(2) | 1.878(4) |
| V(1)-O(3) | 1.919(4) |
| V(1)-O(4)#1 | 2.307(4) |

Táboa 31: : Distancias de enlace entre o vanadio e os átomos coordinados no complexo 4. Simetría #1: x-1/2, -y+1/2, z-1/2

| Ángulo D-V-D (°) | | | |
|------------------|------------|-----------------|------------|
| O(1)-V(1)-O(1M) | 101.1(2) | O(3)-V(1)-N(1) | 74.68(15) |
| N(1)-V(1)-O(1M) | 162.75(19) | O(3)-V(1)-O(2) | 150.69(17) |
| N(1)-V(1)-O(1) | 95.36(19) | O(4)-V(1)-O(1M) | 83.46(18) |
| O(2)-V(1)-O(1M) | 100.63(18) | O(4)-V(1)-O(1) | 175.21(18) |
| O(2)-V(1)-O(1) | 99.5(2) | O(4)-V(1)-N(1) | 79.99(15) |
| O(2)-V(1)-N(1) | 81.60(16) | O(4)-V(1)-O(2) | 81.00(15) |
| O(3)-V(1)-O(1M) | 97.23(17) | O(4)-V(1)-O(3) | 78.16(15) |
| O(3)-V(1)-O(1) | 99.62(19) | | |

Táboa 32: Ángulos de enlace da coordinación do vanadio no complexo 4.

7.2. Interacción ADN-complexos: Espectroscopia UV-vis

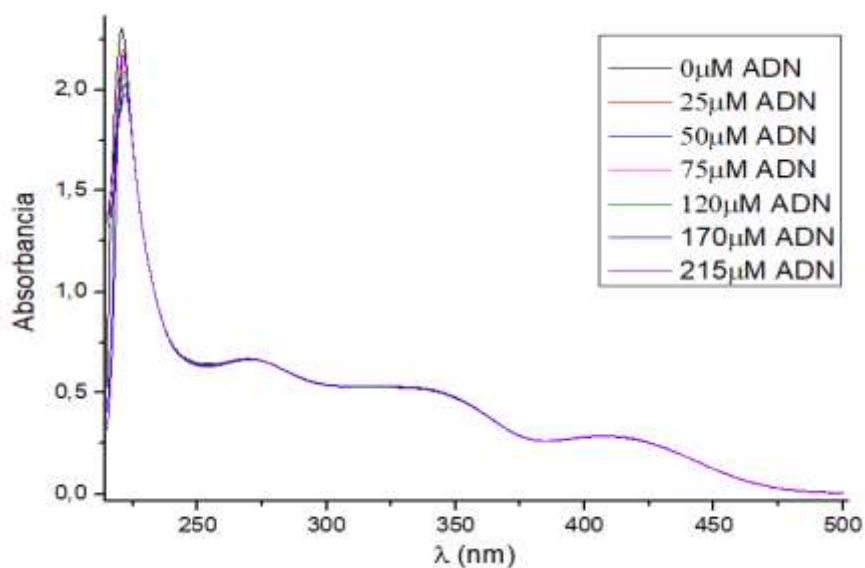


Figura 44: Variación do espectro de absorbancia do complexo 1 (25µM) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

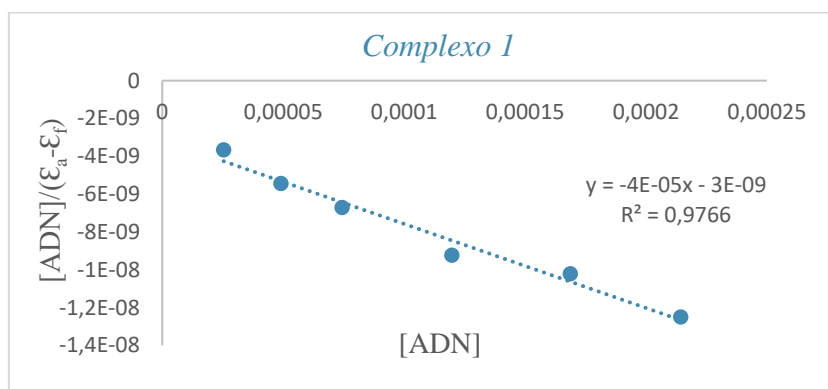


Figura 45: Axuste á ecuación de Wolfe-Shimmer dos valores de absorción do complexo 1 (222nm).

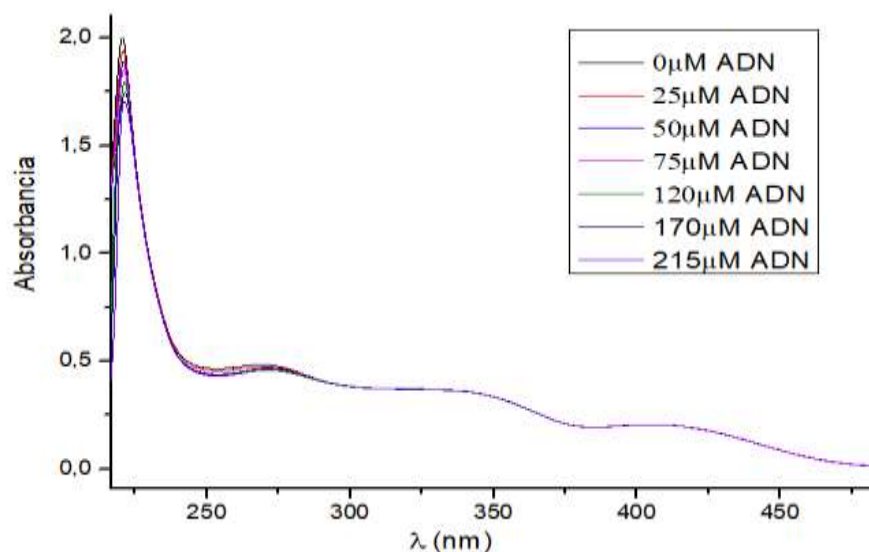


Figura 46: Variación do espectro de absorbancia do complexo 3 (25µM) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

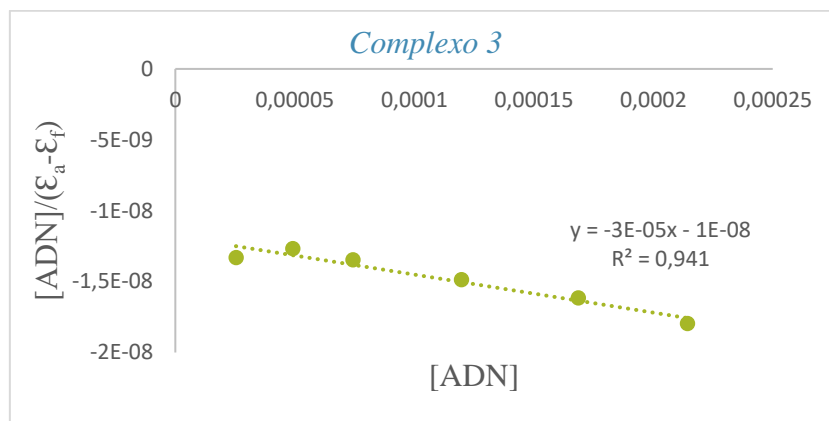


Figura 47: Axuste á ecuación de Wolfe–Shimmer dos valores de absorción do complexo 3 (221nm).

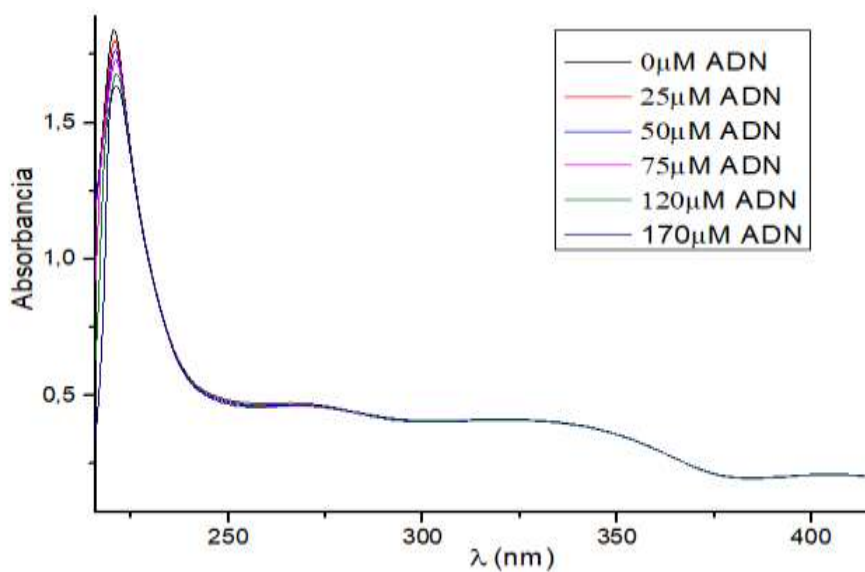


Figura 48: Variación do espectro de absorción do complexo 4 (25μM) ao engadir cantidades crecentes de ADN.

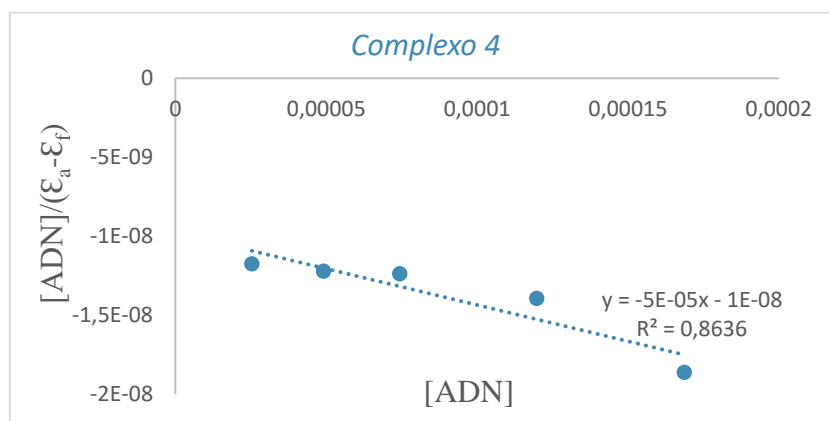


Figura 49: Axuste á ecuación de Wolfe–Shimmer dos valores de absorción do complexo 4 (221nm).

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Vallet, M. *Introducción a La Química Bioinorgánica.*; 2003.
- (2) Crichton, R. *Biological Inorganic Chemistry*, Elsevier.; Oxford, 2012.
- (3) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, 68 (6), 394–424.
- (4) Zitvogel, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Kroemer, G. Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8 (1), 59–73.
- (5) Bakhtiar, R.; Ochiai, E. I. Pharmacological Applications of Inorganic Complexes. *Gen. Pharmacol.* **1999**, 32 (5), 525–540.
- (6) Aguilar Cuevas, O.; Castro Ramírez, R.; Sánchez García, J. J.; López-Sandoval, H.; Barba-Behrens, N. Química Inorgánica Medicinal: Vanadio, Platino, Oro. *Educ. Química* **2018**, 23 (1), 33–40.
- (7) COWAN, J. A. *Inorganic Biochemistry. An Introduction*, Wileyvch.; Columbus, 1997.
- (8) Desoize, B.; Madoulet, C. Particular Aspects of Platinum Compounds Used at Present in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42 (3), 317–325.
- (9) Ceballos-Torres, J.; Del Hierro, I.; Prashar, S.; Fajardo, M.; Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Kalucrossed D Signerović, G. N.; Gómez-Ruiz, S. Alkenyl-Substituted Titanocene Dichloride Complexes: Stability Studies, Binding and Cytotoxicity. *J. Organomet. Chem.* **2014**, 769, 46–57.
- (10) van Rijt, S. H.; Sadler, P. J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. *Drug Discov. Today* **2009**, 14 (23–24), 1089–1097.
- (11) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. Metal-Based Drugs That Break the Rules. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (8), 3201–3209.
- (12) Muhammad, N.; Guo, Z. Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19 (1), 144–153.
- (13) Wang, Y.; Chiu, J.-F. Proteomic Approaches in Understanding Action

- Mechanisms of Metal-Based Anticancer Drugs. *Met. Based. Drugs* **2008**, *2008*, 1–9.
- (14) Alexander Contreras-Cadena, D.; Gómez-Pech, C.; Rangel-García, M.; Ruiz-Hernández, A.; Martínez-Bulit, P.; Barba-Behrens, N.; Día, P. AL. La Importancia Del Vanadio En Los Seres Vivos / The Importance of Vanadium in Living Organisms. *Educ. Química* **2014**, *25* (E1), 245–253.
- (15) J. J. RODRÍGUEZ-MERCADO, M. A. A.-L. Vanadio: Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2006**, *22* (4), 173–189.
- (16) Rehder, D. *Bioinorganic Vanadium Chemistry*, Wiley.; Hannover, 2007.
- (17) Bishayee, A.; Waghray, A.; Patel, M. A.; Chatterjee, M. Vanadium in the Detection, Prevention and Treatment of Cancer: The in Vivo Evidence. *Cancer Lett.* **2010**, *294* (1), 1–12.
- (18) Sakurai, H. Vanadium Distribution in Rats and DNA Cleavage by Vanadyl Complex: Implication for Vanadium Toxicity and Biological Effects. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102* (SUPPL. 3), 35–36.
- (19) Zorzano, A.; Palacín, M.; Marti, L.; García-Vicente, S. Arylalkylamine Vanadium Salts as New Anti-Diabetic Compounds. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103* (4), 559–566.
- (20) Liu, J.; Reuland, D. J.; Rosenhein, L.; Cao, Z. X.; Franklin, L. A.; Ganguli, S. Differential Acute Effects of Oxovanadiums and Insulin on Glucose and Lactate Metabolism under in Vivo and in Vitro Conditions. *Metabolism.* **1997**, *46* (5), 562–572.
- (21) Doucette, K. A.; Hassell, K. N.; Crans, D. C. Selective Speciation Improves Efficacy and Lowers Toxicity of Platinum Anticancer and Vanadium Antidiabetic Drugs. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *165*, 56–70.
- (22) Brand, R. M.; Hamel, F. G. Transdermally Delivered Peroxovanadium Can Lower Blood Glucose Levels in Diabetic Rats. *Int. J. Pharm.* **1999**, *183* (2), 117–123.
- (23) Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2561–2572.
- (24) Rehder, D. Implications of Vanadium in Technical Applications and

- Pharmaceutical Issues. *Inorganica Chim. Acta* **2017**, 455, 378–389.
- (25) Adam, M. S. S.; Elsayy, H. Biological Potential of Oxo-Vanadium Salicylediene Amino-Acid Complexes as Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant and DNA Interaction. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, 184 (January), 34–43.
- (26) Gambino, D. Potentiality of Vanadium Compounds as Anti-Parasitic Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255 (19–20), 2193–2203.
- (27) Heidari, F.; Fatemi, S. J. A.; Yousef Ebrahimipour, S.; Ebrahimnejad, H.; Castro, J.; Dušek, M.; Eigner, V. Six-Coordinate Oxo-Vanadium(V) Dimer Complex with Methoxy Bridging: Synthesis, Crystal Structure, Biological Activity and Molecular Docking. *Inorg. Chem. Commun.* **2017**, 76, 1–4.
- (28) Bhattacharyya, S.; Tracey, A. S. Vanadium(V) Complexes in Enzyme Systems: Aqueous Chemistry, Inhibition and Molecular Modeling in Inhibitor Design. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 85 (1), 9–13.
- (29) Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D. Vanadium Compounds in Medicine. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 301–302, 24–48.
- (30) Crans, D. C.; Smee, J. J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (2), 849–902.
- (31) Rehder, D. *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*; 2013; Vol. 13.
- (32) Kioseoglou, E.; Petanidis, S.; Gabriel, C.; Salifoglou, A. The Chemistry and Biology of Vanadium Compounds in Cancer Therapeutics. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 301–302, 87–105.
- (33) Korbecki, J.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Chlubek, D. Biochemical and Medical Importance of Vanadium Compounds. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, 59 (2), 195–200.
- (34) Ray, R. S.; Ghosh, B.; Rana, A.; Chatterjee, M. Suppression of Cell Proliferation, Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest: Chemopreventive Activity of Vanadium in Vivo and in Vitro. *Int. J. Cancer* **2007**, 120 (1), 13–23.
- (35) Correia, I.; Adão, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.;

- Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; et al. Hydroxyquinoline Derived Vanadium(IV and V) and Copper(II) Complexes as Potential Anti-Tuberculosis and Anti-Tumor Agents. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 83–93.
- (36) Rozzo, C.; Sanna, D.; Garribba, E.; Serra, M.; Cantara, A.; Palmieri, G.; Pisano, M. Antitumoral Effect of Vanadium Compounds in Malignant Melanoma Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *174* (May), 14–24.
- (37) Costa Pessoa, J. Thirty Years through Vanadium Chemistry. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *147*, 4–24.
- (38) Vo, M.; Me, S. O.; Narla, R. K.; Chen, C.; Dong, Y.; Iv, S.; Uckun, F. M. In Vivo Antitumor Activity of In Vivo Antitumor Activity of Bis (4 , 7-Dimethyl-1 , 10-Phenanthroline). *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7* (Iv), 2124–2133.
- (39) Sanna, D.; Ugone, V.; Micera, G.; Buglyó, P.; Bíró, L.; Garribba, E. Speciation in Human Blood of Metvan, a Vanadium Based Potential Anti-Tumor Drug. *Dalt. Trans.* **2017**, *46* (28), 8950–8967.
- (40) OLEG TROTT, A. J. O. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
- (41) MORRIS, GARRETT M. RUTH HUEY, WILLIAM LINDSTROM, MICHEL F. SANNER, RICHARD K. BELEW, DAVID S. GOODSSELL, A. J. O. Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- (42) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (43) Mushtaque, M.; Avecilla, F.; Haque, A.; Yab, Z.; Rizvi, M. M. A.; Khan, M. S. Synthesis, Structural and Biological Activity of N-Substituted 2-Methyl-4-/5-Nitroimidazole Derivatives. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1185*, 440–449.
- (44) Politica, D. A.; Malik, C. K.; Basu, A. K.; Stone, M. P. Base-Displaced Intercalated Structure of the N-(2'-Deoxyguanosin-8-Yl)-3-Aminobenzanthrone DNA Adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28* (12), 2253–2266.
- (45) Maurya, M. R.; Agarwal, S.; Bader, C.; Rehder, D. Dioxovanadium(V) Complexes

- of ONO Donor Ligands Derived from Pyridoxal and Hydrazides: Models of Vanadate-Dependent Haloperoxidases. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, No. 1, 147–157.
- (46) CLARK, J.; GREENBAUM, A.; SLATER, T. Effects of Tetrazolium Salts on Oxidative Phosphorylation in Rat-Liver Mitochondria. *Biochem. J.* **2015**, *94* (3), 651–654.
- (47) Johan van Meerloo, Gertjan J.L. Kaspers, and J. C.; Abstract. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245.
- (48) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1–19.
- (49) Shahabadi, N.; Moradi Fili, S.; Shahlaei, M. Synthesis, Characterization and Comparative DNA Interaction Studies of New Copper(II) and Nickel(II) Complexes Containing Mesalamine Drug Using Molecular Modeling and Multispectroscopic Methods. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (20), 3667–3684.
- (50) Reddy, K. L.; Kumar, K. A.; Satyanarayana, S. Synthesis, DNA Binding, and DNA Photocleavage of the Cobalt(III) Complexes [Co(Bpy) 2 MDPPZ] 3+ , [Co(Dmb) 2 MDPPZ] 3+ , and [Co(Phen) 2 MDPPZ] 3+ and Their Antimicrobial Activity. *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* **2011**, *41* (2), 182–192.
- (51) Liu, J.; Lu, T. B.; Deng, H.; Ji, L. N.; Qu, L. H.; Zhou, H. Synthesis, DNA-Binding and Cleavage Studies of Macrocyclic Copper(II) Complexes. *Transit. Met. Chem.* **2003**, *28* (1), 116–121.
- (52) M, K.; M, K. Spectroscopic Studies of the Binding Interactions of Phenothiazinium Dyes (Thionine Acetate, Azure A and Azure B) with Calf-Thymus DNA. *J. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *7* (3).
- (53) Rajesh, J.; Gubendran, A.; Rajagopal, G.; Athappan, P. Synthesis, Spectra and DNA Interactions of Certain Mononuclear Transition Metal(II) Complexes of Macrocyclic Tetraaza Diacetyl Curcumin Ligand. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1010* (February 2012), 169–178.
- (54) Revathi, N.; Sankarganesh, M.; Rajesh, J.; Raja, J. D. Biologically Active Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes of Pyrimidine Derivative Schiff Base: DNA Binding, Antioxidant, Antibacterial and In Vitro Anticancer Studies. *J. Fluoresc.*

- 2017**, 27 (5), 1801–1814.
- (55) Pan, H. A Non-Covalent Dimer Formed in Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Behaving as a Precursor for Fragmentations. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2008**, 22, 3555-3560.
- (56) Cantley Jr., Lewis ; Aisen, P. The Fate of Cytoplasmic Vanadium. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (6), 1781–1784.
- (57) Mussali-Galante, P.; Rodríguez-Lara, V.; Hernández-Tellez, B.; Ávila-Costa, M. R.; Colín-Barenque, L.; Bizarro-Nevarez, P.; Martínez-Levy, G.; Rojas-Lemus, M.; Piñón-Zarate, G.; Saldivar-Osorio, L.; et al. Inhaled Vanadium Pentoxide Decrease Gamma-Tubulin of Mouse Testes at Different Exposure Times. *Toxicol. Ind. Health* **2005**, 21 (8), 215–222.
- (58) Rodríguez-Lara, V.; Morales-Rivero, A.; Rivera-Cambas, A. M.; Fortoul, T. I. Vanadium Inhalation Induces Actin Changes in Mice Testicular Cells. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, 32 (2), 367–374.