



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudo da interacción de especies de vanadio(V) mononucleares e polinucleares con ADN e a súa posible aplicación como axentes antitumorais.

Estudio de la interacción de especies de vanadio(V) mononucleares y polinucleares con ADN y su posible aplicación como agentes antitumorales.

Study of the interaction of mononuclear and polynuclear vanadium(V) species with DNA and their possible application as antitumor agents.

Directores:

Fernando AVECILLA Porto

Vanessa VALDIGLESIAS García

Antía Sar Rañó

Curso: 2017/2018 - Convocatoria: Xullo

Abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **BLM :** Bleomicinas
- **CN e CP:** Control negativo e control positivo
- **Cp:** Ciclopentadienilo
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio de cultivo)
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **ESI:** Ionización con electrospray
- **FBS:** Suero Bobino Fetal
- **hdmpp:** 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridona
- **HPLC:** Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
- **IR:** Infravermello
- **Metvan:** bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxidovanadio(IV)
- **m/z:** Relación masa/carga
- **MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- **PBS:** Tampón Fosfato Salino
- **RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- **ROS:** Especies de Osíxeno Reactivas
- **rpm:** Revoluciones por Minuto
- **TOF:** Tempo de Voo
- **uma:** Unidades de Masa Atómica
- **UV:** Ultravioleta

Índice

Resumo	1
Resumen	2
Abstract	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. A química Bioinorgánica	5
1.2. Terapias antitumorais que empregan elementos inorgánicos	6
1.2.1. Cisplatino e derivados	6
1.2.2. Dihaluros de metalloceno	9
1.2.3. Outros axentes antitumorais orgánicos	10
1.3. A química do vanadio: xeneralidades e importancia na química médica	11
1.4. Información sobre os compostos analizados	13
1.4.1. Complexo mononuclear de vanadio(V):	13
1.4.2. Trímero de vanadio(V): $[V_2O_3(\mu-O)_3(dmpp)_3(H_2O)](H_2O)_2$	14
1.4.3. Decavanadatos : $[V_{10}O_{28}]^{6-}$	15
2. PARTE EXPERIMENTAL	17
2.1. Síntese das especies a estudar	17
2.1.1. Especie mononuclear	17
2.1.2. Especie trinuclear	18
2.2. Técnicas de caracterización	19
2.2.1. Análise elemental	19
2.2.2. Espectrometría de masas	19
2.2.3. Espectroscopia de infravermello	19
2.2.4. Espectroscopia de RMN 1H	19
2.2.5. Difracción de raios X de monocristal	19
2.3. Ensaio in vitro: determinación de citotoxicidade	20
2.3.1. Descrición da técnica	20
2.3.2. Procedemento	21

3. RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	25
3.1. Análise estrutural dos compostos sintetizados.....	25
3.1.1. Análise elemental.....	25
3.1.2. Espectrometría de masas.....	26
3.1.3. Espectroscopia de infravermello.....	29
3.1.4. Espectroscopia de RMN ¹ H.....	30
3.1.5. Difracción de raios X de monocristal.....	32
3.2. Ensaio de citotoxicidade.....	33
3.3. Estudos de interacción co ADN: Molecular docking.....	35
3.3.1. Ligando do complexo mononuclear.....	35
3.3.2. Complexo mononuclear.....	36
3.3.3. Complexo trinuclear.....	36
Conclusións.....	37
Conclusiones.....	38
Conclusions.....	39
Anexos.....	41
Bibliografía.....	51

Índice de figuras

Figura 1: Estructura do cis-diaminodicloroplatino(II)	7
Figura 2: Esquema das reaccións sufridas polo cisplatino dende a entrada no corpo ata que alcanza o ADN.	7
Figura 3: Estructura do carboplatino.	8
Figura 4: Estructura do oxaliplatino.....	8
Figura 5: Estructura do nedaplatino.	8
Figura 6: Estructura xeral dos dihaluros de metaloceno. M= Ti, V, Nb, Mo, Hf, Ta, W ou Zr;	9
Figura 7: Estructura da isofosfamida (esquerda) e da ciclofosfamida (dereita).	10
Figura 8: Estructura dos anións fosfato e vanadato.	11
Figura 9: Estructura do Metvan (e da fenantrolina).	12
Figura 10: Estructura do ligando quelatante.	13
Figura 11: Estructura do complexo mononuclear.	13
Figura 12: Estructura da 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridona (hmpp).	14
Figura 13: Estructura do complexo trinuclear obtida co Mercury 3.3.....	14
Figura 14: Estructura do decavanadato.	15
Figura 15: Estructura dun dímero vertical (a esquerda) e dunha estrutura 1D de (H ₂ en) ₃ (en)[H ₃ V ₁₀ O ₂₈]·7H ₂ O (a dereita) obtidas co Mercury 3.3.	16
Figura 16: Estructura do ligando do complexo molecular.	17
Figura 17: Estructura da especie mononuclear de vanadio(V) estudada.	18
Figura 18: Estructura da especie de vanadio(V) trinuclear estudada.....	18
Figura 19: Fotografía das células A549 vistas ao microscopio invertido.	20
Figura 20: Placa de cultivo de 96 pocillos.	20
Figura 21: Esquema da redución do MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio] a formazán [(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano].....	21
Figura 22: Frasco de cultivo.....	22
Figura 23: Esquema da cuadrícula presente na cámara de Neubauer.	23
Figura 24: Fotografía dunha placa tras a finalización do procedemento. Na imaxe móstrase a correspondencia entre os pocillos e os puntos experimentais.....	24
Figura 25: Estructura correspondente a m/z=276 uma.....	26
Figura 26: Estructura correspondente a m/z = 274 uma.	26
Figura 27: Estructura correspondente a m/z= 372 uma.....	27
Figura 28: Estructura correspondente a m/z= 370 uma.....	27
Figura 29: Estructura correspondente a m/z = 741 uma.	27
Figura 30: Estructura correspondente a m/z= 343 uma.....	28
Figura 31: Estructura correspondente a m/z = 397 uma.	28
Figura 32: Estructura correspondente a m/z= 771 uma.....	29
Figura 33: Estructura correspondente a m/z= 462,6 uma.	29
Figura 34: Estructura do ligando coa asignación dos hidróxenos.....	30
Figura 35: Estructura da especie trinuclear coa asignación dos hidróxenos.....	31
Figura 36: Estructuras do ligando (a), do complexo trinuclear (b) e do composto decanuclear (c) obtidas mediante difracción de raios X de monocristal.....	32

Figura 37: Gráfica de citotoxicidade onde se recollen os resultados de viabilidade obtidos para cada concentración de tratamento.....	33
Figura38: Esquema da interacción ADN-Ligando.....	35
Figura 39: Esquema da interacción ADN-Complexo mononuclear.....	36
Figura 40: Esquema da interacción ADN-Complexo trinuclear.....	36
Figura 41: Espectro de masas de ións positivos do ligando.....	41
Figura 42: Espectro de masas de ións negativos do ligando.....	41
Figura 43: Espectro de masas de ións positivos do complexo mononuclear.....	42
Figura 44: Espectro de masas de ións negativos do complexo mononuclear.	42
Figura 45: Espectro de masas de ións positivos do complexo trinuclear.	43
Figura 46: Espectro de masas de ións negativos do complexo trinuclear.	43
Figura 47: Espectro IR do ligando.....	44
Figura 48: Espectro IR do complexo mononuclear.	44
Figura 49: Espectro IR do complexo trinuclear.	44
Figura 50: Espectro RMN ¹ H do ligando.....	45
Figura 51: Espectro RMN ¹ H do complexo mononuclear.....	45
Figura 52: Espectro de RMN ¹ H da especie trinuclear.	46

Índice de táboas

Táboa 1: Elementos esenciais para os ser humano adulto.....	5
Táboa 2: Esquema das cantidades requeridas para a preparación da disolución nai.	21
Táboa 3: Esquema das cantidades requeridas para a elaboración dos tratamentos.	22
Táboa 4: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o ligando na figura 16.	25
Táboa 5: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o complexo mononuclear na figura 17.....	25
Táboa 6: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o complexo trinuclear na figura 18, xunto con dúas moléculas de auga.....	25
Táboa 7: Datos cristalográficos do ligando.	47
Táboa 8 : Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do ligando.	47
Táboa 9: Datos cristalográficos do complexo trinuclear.....	48
Táboa 10 : Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do complexo trinuclear.....	48
Táboa 11: Ángulos V-O-V correspondentes a especie trinuclear.	48
Táboa 12: Distancias V-O correspondentes a especie trinuclear.....	49
Táboa 13 : Datos cristalográficos do composto decanuclear.	49
Táboa 14: Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do composto decanuclear.	50
Táboa 15: Distancias V-O do composto decanuclear.....	50

Resumo

Este Traballo de Fin de Grao recolle o estudo de distintos compostos de vanadio (V), tanto mononucleares como polinucleares, a súa interacción co ADN e a posibilidade de que sexan aplicados como axentes antitumorais.

O traballo estrutúrase en tres partes. A primeira correspóndese coa síntese e caracterización dos distintos compostos de vanadio: unha especie mononuclear, unha trinuclear e outra decanuclear; así como dun ligando orgánico que constitúe o complexo mononuclear. A análise estrutural lévase a cabo mediante técnicas en estado sólido, espectroscopia de IR e difracción de raios X de monocristal, e en disolución, espectrometría de masas e espectroscopia de RMN ^1H .

A segunda parte está constituída por un estudo in vitro, onde se determinará a citotoxicidade de dous dos compostos (o ligando e a especie trinuclear), determinando a viabilidade celular mediante unha técnica colorimétrica. Finalmente, a última parte consta dun estudo computacional, empregando a técnica de molecular docking, da interacción dos compostos co ADN, sabendo que esta é a principal diana terapéutica na busca da cura contra o cancro.

Palabras clave: Química Bioinorgánica, Química de Coordinación, Compostos de Vanadio, Axentes Antitumorais, Toxicidade.

Resumen

Este Trabajo de Fin de Grado recoge el estudio de distintos compuestos de vanadio (V), tanto mononucleares como polinucleares, su interacción con el ADN y la posibilidad de que sean aplicados como agentes antitumorales.

El trabajo se estructura en tres partes. La primera se corresponde con la síntesis y caracterización de los distintos compuestos de vanadio: una especie mononuclear, una trinuclear y otra decanuclear; así como de un ligando orgánico que constituye el complejo mononuclear. El análisis estructural se lleva a cabo mediante técnicas en estado sólido, espectroscopia de IR y difracción de rayos X de monocristal, y en disolución, espectrometría de masas y espectroscopia de RMN ^1H .

La segunda parte está constituida por un estudio in vitro, donde se determinará la citotoxicidad de dos de los compuestos (el ligando y la especie trinuclear), determinando la viabilidad celular mediante una técnica colorimétrica. Finalmente, la última parte consta de un estudio computacional, empleando la técnica de molecular docking, de la interacción de los compuestos con el ADN, sabiendo que esta es la principal diana terapéutica en la búsqueda de la cura contra el cáncer.

Palabras clave: Química Bioinorgánica, Química de Coordinación, Compuestos de Vanadio, Agentes Antitumorales, Toxicidad.

Abstract

This End-of-Degree Project is a study of different vanadium(V) compounds, mononuclear and polynuclear, their interaction with DNA and their possible application as antitumor agents.

The project consists of three parts. The first one is the synthesis and characterization of the different vanadium compounds: a mononuclear specie, a trinuclear specie and a decanuclear one; as well as of an organic ligand that constitutes the mononuclear complex. The structural analysis is carried out by solid state techniques, IR spectroscopy and X-ray diffraction, and in dissolution, mass spectrometry and RMN ^1H spectroscopy.

The second part is an in vitro study where will be determinate the cytotoxicity of two compounds, the ligand and the trinuclear specie, determining the cellular viability by a colorimetric technique. Finally, the last part is a computational study by molecular docking about compound's interaction with DNA, the main therapeutic target in the search for a cure against cancer.

Keywords: Bioinorganic Chemistry, Coordination Chemistry, Vanadium Compounds, Antitumor Agents, Toxicity.

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 un gran número e variedade de organismos. Aínda que todos os elementos esenciais teñen a mesma importancia, cuantitativamente existen diferenzas, podendo distinguir entre elementos masivos e elementos traza (**táboa 1**).

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, non todos os elementos tóxicos son non esenciais, pois a toxicidade depende da cantidade dos elementos no organismo. Cada un dos elementos esenciais precisan 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]

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: Elementos esenciais para os ser humano adulto. ^{[1][2]}

1.2. Terapias antitumorais que empregan elementos inorgánicos

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. Aínda que a cura contra o cancro se atopa lonxe do ideal buscado, os novos avances para a súa detección temperán e prevención son moi prometedores.

Todas as células conteñen nos xenes información para a replicación e supervivencia. De tal forma que, se se interrompe o fluxo de información xenética, podemos evitar a división celular. As dúas 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, etc. 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 medicamentos coñecidos como axentes antitumorais. Ao ser un tratamento non localizado é útil no tratamento 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 bases nucleótidas. Deste xeito interactúa o platino(II), catión central dos principais compostos empregados no tratamento do cancro. A actividade antitumoral do Pt(II) foi descuberta por casualidade en 1965, cando Barnett Rosenberg investigaba como podía afectar a aplicación de un campo eléctrico na división celular da bacteria *Escherichia coli*. Durante o experimento tivo lugar unha reacción entre os electrodos de platino e o medio de solución (NH_4Cl) dando lugar á formación de cis-diaminodicloroplatino(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, sendo moi útil na cura do cancro de ovario, testículo, cabeza e pescozo, vexiga e pulmón.

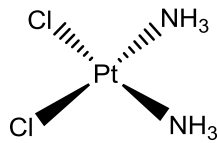


Figura 1: Estructura do cis-diaminodichloroplatino(II)

O cis-platino susministrase por vía intravenosa e difúndese a través do plasma sanguíneo como molécula neutra, debido á elevada concentración de cloruros no plasma. Unha vez entra nas células, onde a concentración de cloruros é menor, prodúcese a substitución nucleófila dos cloruros por moléculas de auga. O complexo queda cargado podendo atravesar a membrana nuclear e favorecendo a reacción coas bases púricas do ADN. O platino reacciona preferentemente co nitróxeno máis reactivo de guaninas adxacentes (N-7) formando pontes entre elas de tal xeito que a dobre hélice se deforma, impedíndose así a replicación do ADN.^{[3][4]}

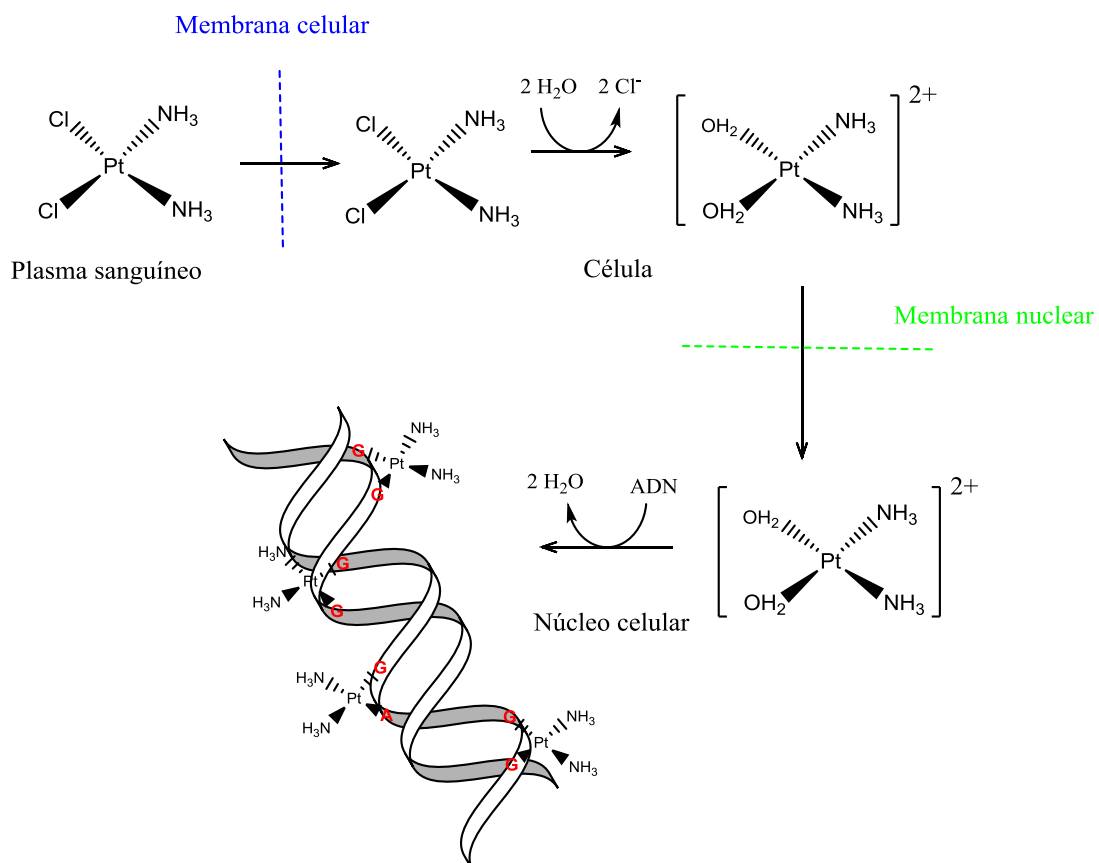


Figura 2: Esquema das reaccións sufridas polo cisplatino dende a entrada no corpo ata que alcanza o ADN.

É posible comprobar a deformación do ADN por electroforese en xel, pois o ADN dobrado migra de forma máis lenta que o linear. Pódese inclusive estimar o grado de curvatura mediante unha gráfica de calibración.^[5]

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, reducindo 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”.^{[3][4]}

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.^[6]

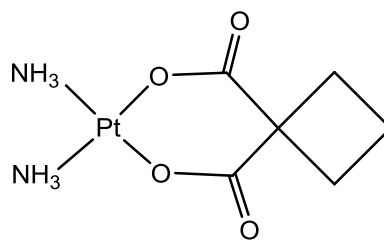


Figura 3: Estrutura do carboplatino.

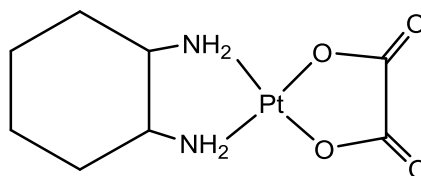


Figura 4: Estrutura do oxaliplatino.

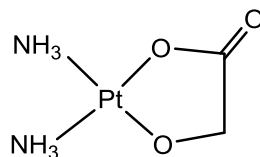


Figura 5: Estrutura do nedaplatino.

1.2.2. Dihaluros de metaloceno

Outro tipo de complexos con propiedades antitumorais (cancro de pulmón, colon e leucemia linfoide) son os dihaluros de metaloceno de algúns metais de transición. 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.

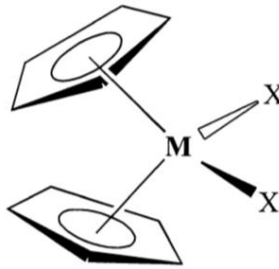


Figura 6: Estrutura xeral dos dihaluros de metaloceno. M= Ti, V, Nb, Mo, Hf, Ta, W ou Zr; X= F, Cl, Br ou I.

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.^[3]

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 substituíntes e grupos funcionais polares nos aneis de ciclopentadienilo) que presenten mellor actividade citotóxica.^[7]

1.2.3. Outros axentes antitumorais orgánicos

Entre os fármacos empregados para o tratamento do cancro atopamos tamén compostos orgánicos como os axentes alquilantes: mostazas nitroxenadas, etileniminas, alquilsulfonatos, nitrosoreas e triazenos. Estes compostos reaccionan con grupos nucleófilos como os grupos fosfato, tiol, carboxilo, hidroxilo, amino ou imidazol; formando un enlace covalente. No ADN as posicións máis susceptibles de formar un enlace covalente cos axentes alquilantes (mono ou bifuncionais) son os nitróxenos-7 das guaninas, que provocan a formación dun amonio cuaternario.

Foi o descubrimento da ifosfamida e da ciclofosfamida, derivados das mostazas nitroxenadas, o que levou a investigar sobre a posibilidade de empregar como fármacos antitumorais compostos baseados no fósforo. Hoxe en día empréganse no tratamento contra o cancro de mama e ovario; e en leucemias linfocíticas, entre outras enfermidades.

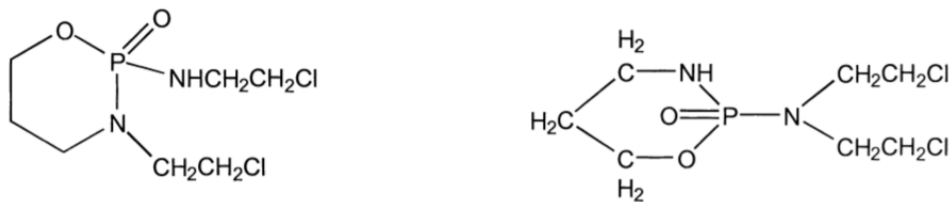


Figura 7: Estructura da ifosfamida (esquerda) e da ciclofosfamida (dereita).

Por outro lado existen uns fármacos, as bleomicinas, que provocan a fragmentación do ADN como mecanismo para evitar a replicación deste. Trátase de glicopéptidos básicos que se empregan para tratar o cancro testicular, de pescozo e cabeza, e o linfoma de Hodgkin. Os péptidos BLM precisan o ión Fe(II) como cofactor e osíxeno molecular para conseguir romper o ADN. O osíxeno molecular redúcese para formar o radical superóxido ou hidroxilo, iniciando así a degradación do ADN mediante un mecanismo de radicais libres.^[3]

1.3. A química do vanadio: xeneralidades e importancia na química médica

Co número atómico 23, o vanadio é o metal de transición que encabeza o grupo 5 na táboa periódica. A súa configuración electrónica é $[Ar]3d^34s^2$, presenta dous isótopos (^{50}V e ^{51}V) e os seus estados de oxidación atópanse entre -III e +V. Trátase dun elemento 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 μ M, tratándose dun micronutriente esencial cuxa carencia pode provocar, entre outros síntomas, alteracións na degradación 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-}). Pero a química de coordinación deste elemento é moi ampla. O vanadio forma complexos con números de coordinación que abarcan dende 4 ata 8, e con gran variedade de xeometrías; sendo o vanadio(V), d^0 , o que presenta máis liberdade estérica que o vanadio(IV), d^1 .^{[4][8]}

Nas últimas décadas investigáronse as propiedades de distintos compostos de vanadio^[9], pois estes poden presentar actividade anticanceríxena^[10], antiobesidade, antimicrobial^{[11][12][13]} e incluso insulinomimética^{[14][15][16][17]}. Estas propiedades do vanadio están relacionadas coa similitude estrutural entre os anións vanadato e fosfato. O vanadato é un pouco máis grande e presenta unha maior flexibilidade na súa xeometría de coordinación. Os dous compostos participan en reaccións similares nos procesos metabólicos, debido a que algunhas enzimas^[18], como a ATP-sintasa, recoñecen o vanadato como fosfato. Aínda así, os mecanismos da acción do compostos de vanadio non se coñecen ben polo momento.^{[8][19][20]}

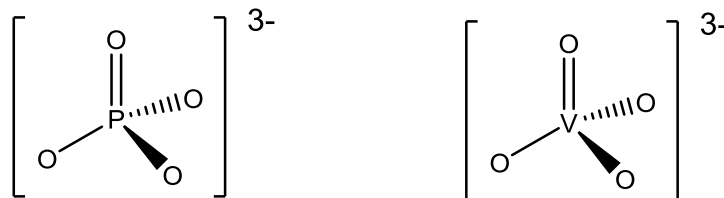


Figura 8: Estrutura dos anións fosfato e vanadato.

Neste traballo centrarémonos na posible aplicación de distintos compostos de vanadio como axentes antitumorais. O interesante destes compostos é a posibilidade de que ademais presenten algunha das actividades anteriormente mencionadas, pois en moitos casos os tratamentos de quimioterapia provocan a aparición de outras

enfermidades (víricas ou bacterianas) debido a baixada de defensas no corpo, e con este tipo de compostos sería posible reducir os efectos secundarios do tratamento.

Os principais efectos dos compostos de vanadio con aplicación como antitumorais son debidos a alteración do metabolismo mediante a formación de ROS (Especies de Osíxeno Reactivas)^[21], a alteración de orgánulos como as mitocondrias que participan na interrupción do ciclo celular e na apoptose, ou por efectos tóxicos que provoquen o dano do ADN.

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 que as protexan.^[19]

Un dos compostos de vanadio máis prometedores é o “Metvan”^[22], bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovadio(IV), pois resulta efectivo contra o cancro de mama, de próstata, de ovario e contra a leucemia; sen apenas efectos tóxicos. A indución da apoptose débese, entre outros efectos, á xeración de ROS.

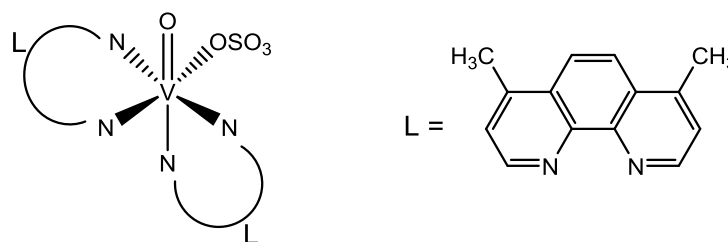


Figura 9: Estrutura do Metvan (e da fenantrolina).

Outros compostos de vanadio con actividade antitumoral son complexos con ligandos de quinolina e piridinona; derivados do vanadoceno; complexos de óxidovanadio(IV) con ligandos que conteñan varios átomos donores, ou un complexo de vanadio(III) e cisteína.^{[19][20]} Tamén se realizaron experimentos satisfactorios con complexos de vanadio(V)^[23], polo que neste traballo se investigarán as propiedades de varios compostos de vanadio con estado de oxidación V, e se estudará a súa interacción co ADN.

1.4. Información sobre os compostos analizados

Neste traballo realízase un estudo de varias especies de vanadio(V) con distinto número de núcleos metálicos: un, tres e dez. Para entender como interaccionan co ADN é preciso coñecer primeiramente as estruturas e como interactúan estes compostos consigo mesmo.

1.4.1. Complexo mononuclear de vanadio(V):

A primeira especie a estudar é un complexo de vanadio mononuclear, onde átomo central se enlaza a un ligando quelatante, un osíxeno terminal, un metóxido e unha molécula de metanol. A labilidade da molécula de metanol fai que entre e salga da esfera de coordinación con bastante facilidade, podendo non ser detectada por algunhas das técnicas de caracterización.

O ligando quelatante está formado por dous aneis aromáticos que presentan heteroátomos, un piridoxal e un furano, unidos a través dun grupo hidrazona. Este ligando enlázase ao vanadio por tres puntos: por un nitróxeno do grupo hidrazona, un osíxeno carbonílico e ademais por outro osíxeno correspondente a un substituínte do piridoxal.

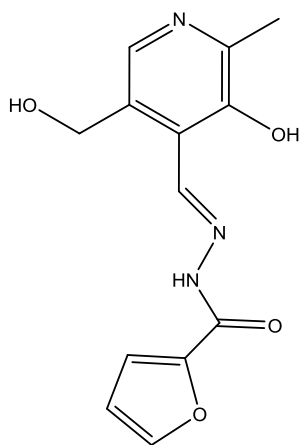


Figura 10: Estrutura do ligando quelatante.

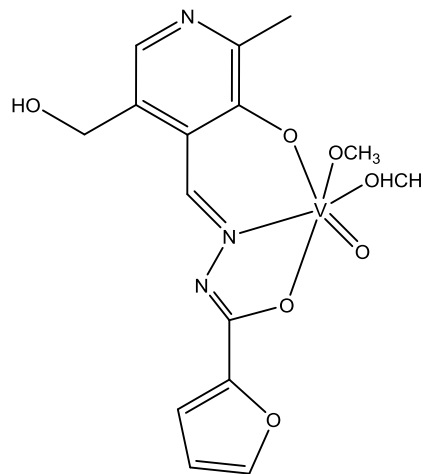


Figura 11: Estrutura do complexo mononuclear.

1.4.2. Trímero de vanadio(V): $[V_2O_3(\mu-O)_3(dmpp)_3(H_2O)](H_2O)_2$

A especie trinuclear que se estuda neste traballo é un trímero de oxovanadio(V) con ligandos 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridona (dmpp) enlazados a través dos osíxenos carbolínicos e hidroxílicos.

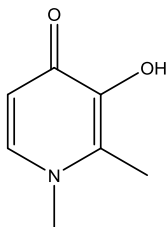


Figura 12: Estrutura da 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridona (hmp).

No composto poden distinguirse os tres átomos de vanadio ao posuír distinto entorno químico. Dous deles (V1 e V3) coordínanse por 6 posicións dando lugar a unha xeometría octaédrica distorsionada. O V2, en cambio, ten un número de coordinación menor, 5, que fai que presente unha xeometría distorsionada de pirámide de base cadrada.

Todos os núcleos metálicos se enlazan a un grupo óxido terminal, dous osíxenos que actúan de ponte entre cada vanadio, e un ligando aniónico dmpp. O átomo V3 enlázase ademais a unha molécula de auga, e o V1 forma outra ponte co V3 mediante o osíxeno carbonílico (O12) do dmpp deste último vanadio. A distancia entre O12 e V1 é maior que a distancia entre os demais átomos de vanadio e os demais osíxenos cetónicos (V1-O8, V2-O10 e V3-O12). Por outra parte, a distancia entre os átomos de vanadio e estes osíxenos é maior que para os osíxenos dos enolatos (V1-O7, V2-O9 e V3-O11). O centro da estrutura está formado por un ciclo de fórmula $[V_3O_4]$, sendo similares os tres ángulos V-O-V formados mediante os osíxenos ponte O4, O5 e O6. O ángulo formado por V1-O12-V3 é diferente.^[24] (Táboas 11 e 12 do Anexo).

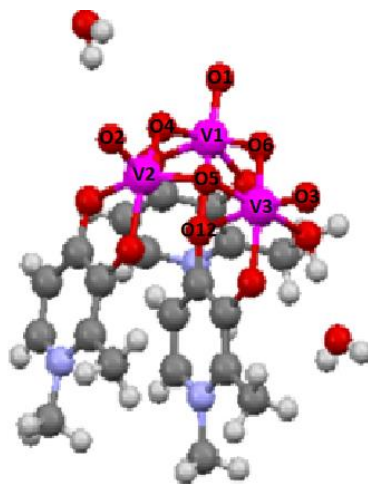


Figura 13: Estrutura do complexo trinuclear obtida co Mercury 3.3.

1.4.3. Decavanadatos : $[V_{10}O_{28}]^{6-}$

O vanadio forma unha gran variedade de óxido vanadatos en medio acuoso, entre eles os decavanadatos, unhas especies polinucleares de vanadio(V). Trátase de polioxoanións que se poden atopar totalmente desprotonados $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ ou mono, di, tri e incluso tetraprotonados (o osíxenos que acostuman a protonarse son os Ob e Oc).

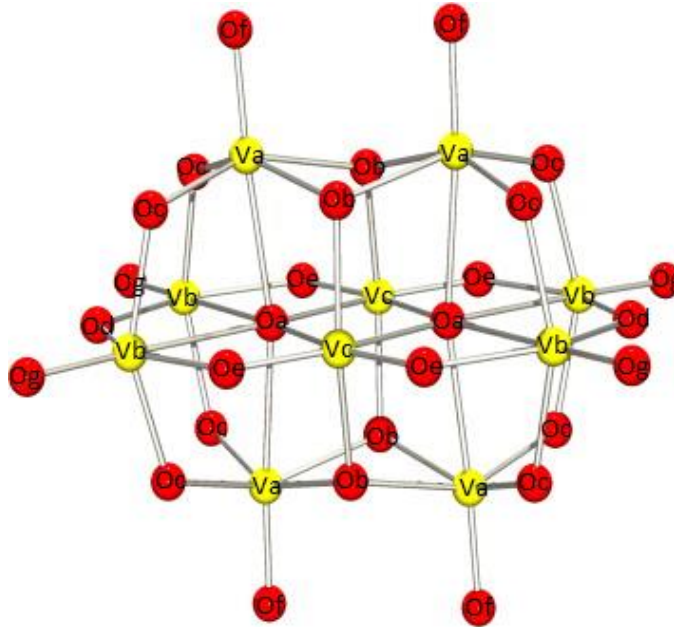


Figura 14: Estructura do decavanadato.

Na súa estrutura é posible diferenciar tres tipos de átomos de vanadio de coordinación octaédrica distorsionada: por un lado os catro vanadios que se atopan fóra do plano central (Va), e por outro dous tipos de vanadio (Vb e Vc), que atopándose no plano central están unidos a distintos tipos de osíxenos, terminais (Ot) ou ponte (Op). Entre os osíxenos ponte distinguimos: catro átomos Oa que se atopan no plano central formando un octaedro distorsionado ao unirse a seis vanadios; catro osíxenos Ob unidos a tres átomos de vanadio (dous Va e un Vc); oito osíxenos Oc que se atopan fóra do plano central e que actúan de ponte entre dous átomos de vanadio (Va e Vb); dous osíxenos Od que enlazan os vanadios Vb no plano central; e finalmente oito osíxenos Oe unidos a dous átomos de vanadio (Vb e Vc). Entre os osíxenos terminais só diferenciamos dous tipos, os catro osíxenos planares Og e os outros catro osíxenos Of que se atopan fora do plano central.

Estes decavanadatos interaccionan entre si mediante enlaces de hidróxeno, interaccións electrostáticas e forzas de Van der Waals, podendo presentarse en forma de monómeros de decavanadato, dímeros ou estruturas 1D e 2D. No caso dos

monómeros as interaccións prodúcense entre os decavanadatos e as moléculas de disolvente ou distintos catións tanto orgánicos como inorgánicos, evitando a unión dos polioxoanións. Nas demais estruturas tamén se producen interaccións entre as moléculas disolvente e os catións coas especies aniónicas (dímeros e estruturas mono e bidimensionais).

Dous monómeros di ou triprotonados poden unirse mediante enlaces de hidróxeno formando dímeros, que poden ser verticais ou horizontais. Nos dímeros horizontais os osíxenos protonados correspóndense cos do plano central (Od, Oe ou Og) e interaccionan cos osíxenos non planares (Ob e Oc) do outro oligómero. En cambio, nos dímeros verticais as interaccións prodúcense entre Of e Oc, e entre Of e Ob; é dicir entre os átomos de osíxeno que se atopan fóra do plano central dos dous monómeros que reaccionan.

Nas estruturas monodimensionais os oligómeros dispóñense nunha cadea que pode ser vertical, horizontal ou en zig-zag. As interaccións por enlace de hidróxeno entre os monómeros que constitúen cadeas verticais e horizontais son similares as producidas nos dímeros homónimos. Nas cadeas en zig-zag as interaccións prodúcense entre os osíxenos Ob-Oe, Oc-Oe e Oc-Og.

As interaccións entre os polioxoanións que forman estruturas bidimensionais prodúcense entre diferentes osíxenos en función do contraíón que conforma o composto. Pero sempre interacciona un polioxoanión con outros catro.^[25]

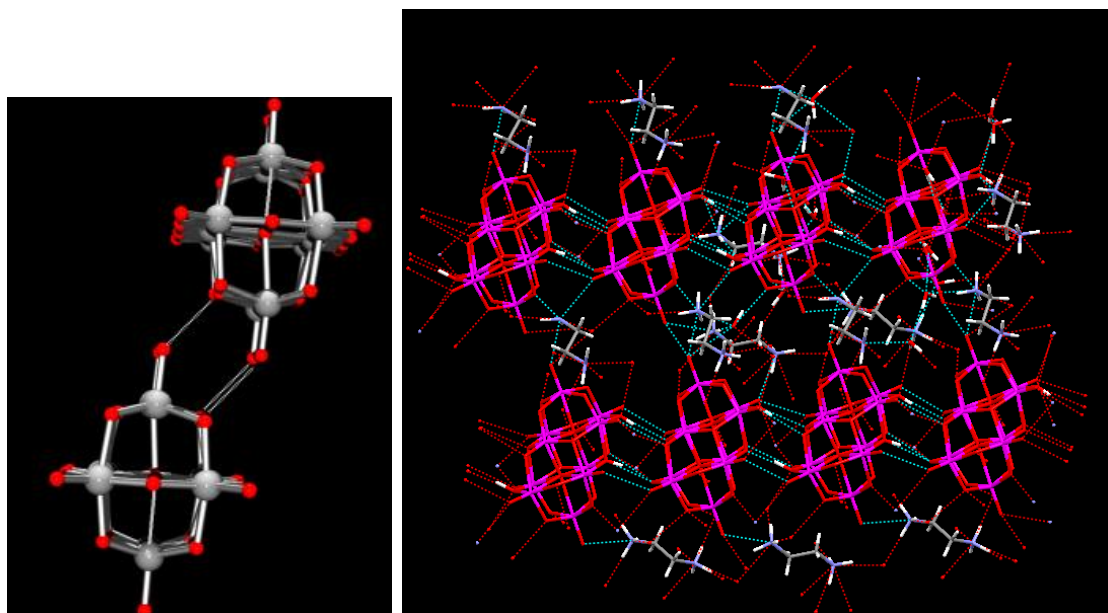


Figura 15: Estrutura dun dímero vertical (a esquerda) e dunha estrutura 1D de $(H_2en)_3(en)[H_3V_{10}O_{28}] \cdot 7H_2O$ (a dereita) obtidas co Mercury 3.3.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Síntese das especies a estudar

2.1.1. Especie mononuclear

Para realizar a síntese do complexo mononuclear, foi necesario sintetizar primeiramente o ligando. Como reactivos de partida empregáronse 2-furanohidracida (Sigma Aldrich; 98%) e hidrocloreuro de piridoxal (Sigma Aldrich; >99%). Cantidades equivalentes destes dous compostos foron disoltas en metanol, e tras a súa disolución completa mesturadas e levadas a refluxo durante 2h. O precipitado branco formado foi filtrado a baleiro e lavado con pequenas porcións de metanol e dietil éter unha vez alcanzou temperatura ambiente.

Ademais, as augas nai obtidas previamente ao lavado, foron separadas co obxectivo de que se producise a cristalización de máis produto.

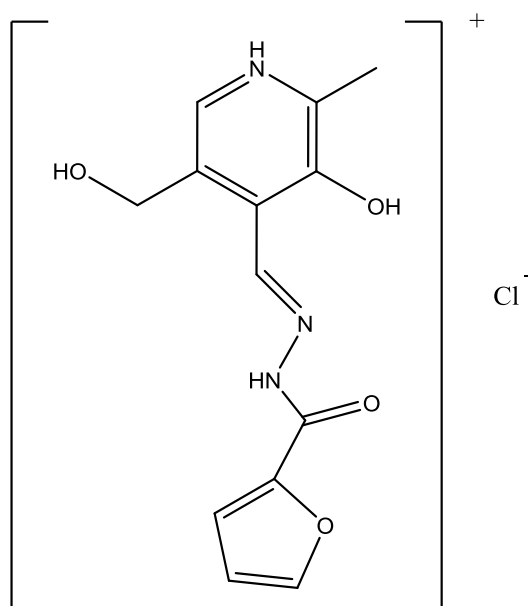


Figura 16: Estrutura do ligando do complexo molecular.

O procedemento seguido para a obtención do complexo mononuclear de vanadio foi similar ao anteriormente explicado. Neste caso, cantidades equivalentes do ligando previamente sintetizado e de acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich; 98%) foron disoltas completamente en metanol e posteriormente sometidas a refluxo. Tras 3h retirouse a calor e deixouse a axitación ate o día seguinte. A disolución foi filtrada a gravidade para eliminar os restos de reactivo que quedasen sen reaccionar e deixouse nun cristalizador ata a súa precipitación. Unha vez formado, o sólido foi filtrado a baleiro e lavado con pequenas porcións de metanol e dietil éter.

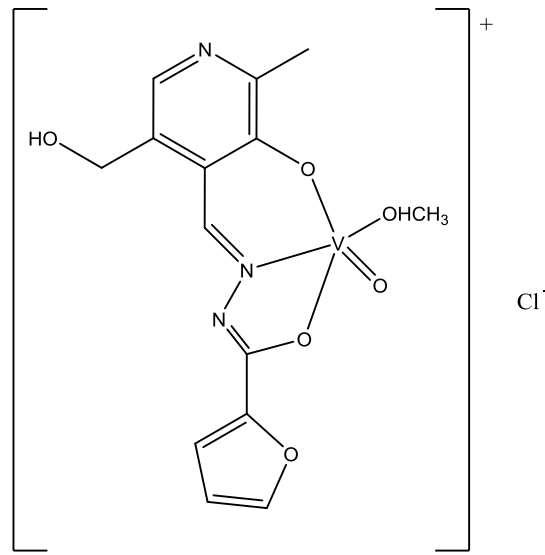


Figura 17: Estrutura da especie mononuclear de vanadio(V) estudada.

2.1.2. Especie trinuclear

Para a obtención deste composto partiuse de cantidade equivalentes de 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridona (Sigma Aldrich; 99%) e metavanadato de sodio (Sigma Aldrich; 90%). Os dous reactivos foron disoltos en auga, aínda que no caso da piridona foi preciso adicionar hidróxido potásico para xerar medio básico. Tras a disolución total, os reactivos foron mesturados e á disolución resultante baixóuselle o pH ate 3,8 por adición de ácido clorhídrico 2M. Neste punto formáronse uns cristais negros que posteriormente foron filtrados a gravidade.

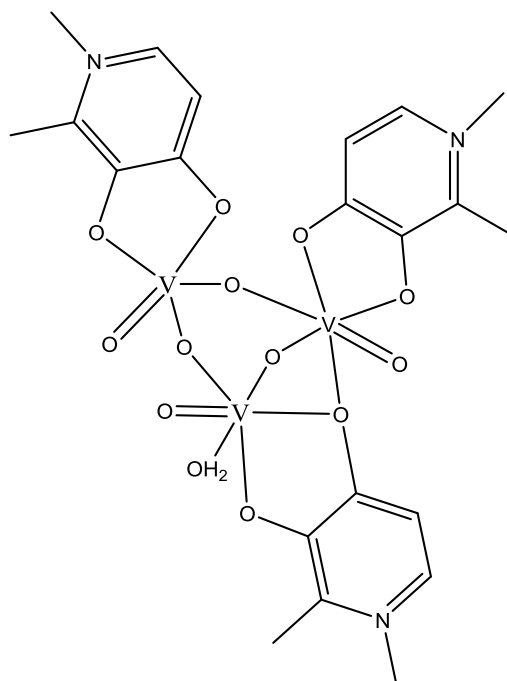


Figura 18: Estrutura da especie de vanadio(V) trinuclear estudada

2.2. Técnicas de caracterización

A caracterización dos compostos sintetizados levouse a cabo mediante as seguintes técnicas:

2.2.1. Análise elemental

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

2.2.2. 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 electrospray (ESI) acoplado a HPLC Agilent 1200, empregando metanol como disolvente.

2.2.3. Espectroscopia de infravermello

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

2.2.4. 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. En todos os casos se seleccionou DMSO deuterado como disolvente (Merck, 99,96%).

2.2.5. Difracción de raios X de monocristal

Para obter os datos da estrutura cristalina empregouse un difractómetro X8 APEX KAPPA BRUKER-NONIUS de raios X de monocristal, con tubo de molibdeno.

2.3. Ensaio in vitro: determinación de citotoxicidade

2.3.1. Descrición da técnica

O obxectivo desta proba é ver a influencia que teñen os compostos mencionados en células pulmonares cancerixenas humanas, para o que se contou cun cultivo celular da liña A549. As células mantéñense en frascos de cultivo nunha incubadora a 37°C con atmosfera húmida e un 5% de CO₂.



Figura 19: Fotografía das células A549 vistas ao microscopio invertido.

As células son introducidas nunha placa de cultivo de 96 pocillos, de tal forma que haxa o mesmo número de células en cada pocillo, e son sometidas a un tratamento a diferentes concentracións, correspondéndose o volume de tratamento co 1% e a parte restante ao medio de cultivo (DMEM con 4,5g/L de glucosa suplementado con 10% de FBS, 1% de aminoácidos non esenciais e 1% de mestura de penicilina/estreptomicina). Engádense 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).



Figura 20: Placa de cultivo de 96 pocillos.

Tras o tempo de tratamento escollido, retírase o medio e engádesse unha disolución de sal de tetrazoilio (MTT) de 5µg/ml e incúbase durante 4h nas condicións anteriormente citadas. Durante este tempo, as enzimas presentes nas mitocondrias das células provocan a redución do MTT a formazán. Fórmanse así uns cristais de cor azul insolubles en auga, que se disolven en DMSO para poder ser determinados por unha medida espectrofotométrica de absorbancia.

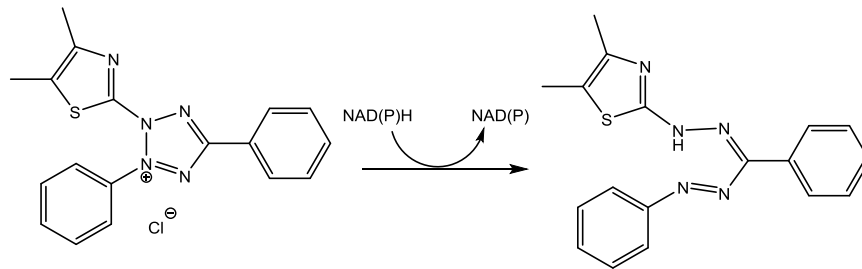


Figura 21: Esquema da redución do MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilio] a formazán [(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano].

Como 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.

2.3.2. Procedemento

Preparación dos tratamentos

Para realizar o tratamento foron escollidas sete concentracións que abarcan un gran intervalo (0,1-500µM). Só se puideron testar o ligando e o complexo trinuclear posto que nin o complexo mononuclear nin o decanuclear son solubles en auga ou DMSO.

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

Disolución A	Masa	Volume de disolvente	Concentración da disolución	Concentración no pocillo
Ligando	13,8 mg	1000 µL	$5 \cdot 10^{-2}$ M	500 µM
Complexo trinuclear	34 mg	1000 µL	$5 \cdot 10^{-2}$ M	500 µM

Táboa 2: Esquema das cantidades requiridas para a preparación da disolución nai.

Disolucións	Volume disolución nai	Volume de disolvente	Concentración da disolución	Concentración no pocillo
B	10 μ L disolución A	10 μ L	$2,5 \cdot 10^{-2}$ M	250 μ M
C	5 μ L disolución A	20 μ L	10^{-2} M	100 μ M
D	2 μ L disolución A	38 μ L	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M	25 μ M
E	5 μ L disolución D	20 μ L	$5 \cdot 10^{-4}$ M	5 μ M
F	1 μ L disolución D	24 μ L	10^{-4} M	1 μ M
G	2 μ L disolución F	18 μ L	10^{-5} M	0,1 μ M

Táboa 3: Esquema das cantidades requiridas para a elaboración dos tratamentos.

Preparación da placa

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. Aclarar que, para evitar a contaminación das células, toda a manipulación se leva a cabo con material esterilizado, nunha cámara de fluxo laminar previamente limpada cunha disolución de etanol ao 70% e sometida a radiación UV durante 20 minutos. Ademais todas as disolución empregadas son previamente temperadas para evitar que as células se vexan afectadas por un cambio térmico.



Figura 22: Frasco de cultivo.

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 mírase no 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 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.

Retírase o sobrenadante e resuspéndese o pellet celular en 1mL de medio completo. O seguinte paso será realizar o recuento celular, para o que se emprega unha cámara de Neubauer. A grandes trazos, a cámara de Neubauer é un portaobxectos que presenta unha cuadrícula na súa superficie. Tras colocar o cubreobxectos, 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.

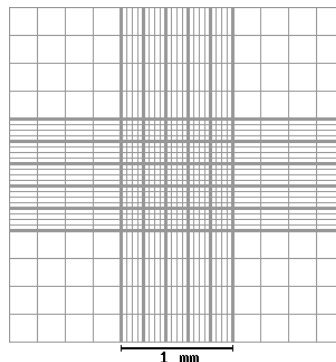


Figura 23: Esquema da cuadrícula presente na cámara de Neubauer.

Unha vez introducida a suspensión procédese ao recuento baixo o microscopio. Existen distintas formas de contar en función dos cadrados escollidos. Neste caso o recuento realizouse no cadrado central (de 1mm de lado dividido en 5x5, estando á súa vez estes cadrados divididos en 4X4), e para determinar as células por mililitro da suspensión só foi necesario multiplicar 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 pocillo (20.000 células en 100 μ L de medio completo), prepárase unha nova suspensión celular a partir da anterior, que nos permita encher os pocillos necesarios (en cada experimento realízanse 3 réplicas de

cada concentración de tratamento e composto). 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 do pocillo para non despegar as células. A continuación engádense 99 μ L de medio completo e 1 μ L do tratamento correspondente a cada pocillo. A placa introdúcese na incubadora durante outras 24h (tempo de tratamento escollido).

Determinación da viabilidade por medida de absorbancia

Tras o tempo de tratamento (24h), retiramos este da mesma forma que no paso anterior, e engadimos 100 μ L de disolución de MTT de 5 μ g/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 $^{\circ}$ 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 do pocillo. Tras a retirada da disolución de MTT o formazán disólvese en 200 μ L de DMSO e a placa incúbase en escuridade durante 10 minutos. Finalmente realízase á lectura da absorbancia a 570nm nun lector de microplatos SPECTROSTAR Nano (BMG Labtech).

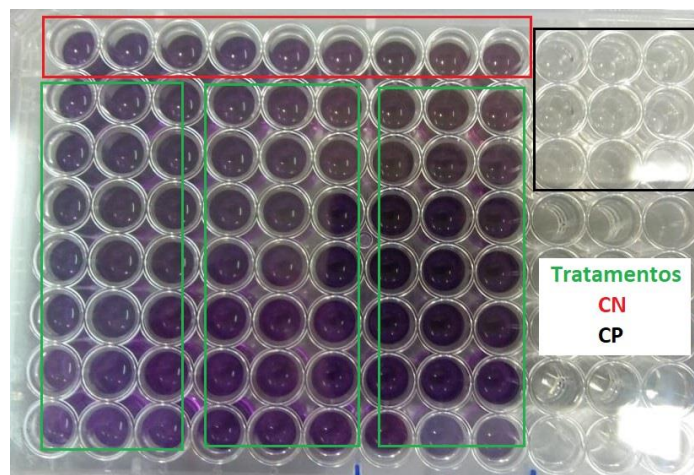


Figura 24: Fotografía dunha placa tras a finalización do procedemento. Na imaxe móstrase a correspondencia entre os pocillos e os puntos experimentais.

3. RESULTADOS E DISCUSIÓN

3.1. Análise estrutural dos compostos sintetizados

3.1.1. Análise elemental

Mediante a determinación das porcentaxes relativas de carbono, hidróxeno e nitróxeno das mostras sólidas, é posible determinar si a mostra analizada se corresponde coa estrutura buscada, e no caso dos complexos pódese determinar se existe solvatación por moléculas de auga ou disolvente.

Nas seguintes táboas recóllense os datos obtidos para os tres compostos analizados, e os valores calculados para unha posible estrutura. A posibilidade de que coexistan varias estruturas dificulta o cálculo das porcentaxes relativas, atopando as maiores variacións no determinación do hidróxeno.

Ligando	C	H	N
Análise elemental	50,50%	3,89%	13,37 %
Calculada para $C_{13}H_{14}N_3O_4Cl$	50,09%	4,53%	13,48%

Táboa 4: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o ligando na figura 16.

C. mononuclear	C	H	N
Análise elemental	40,09%	3,17%	10,42%
Calculada para $C_{14}H_{15}N_3O_6ClV$	41,25%	3,71%	10,31%

Táboa 5: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o complexo mononuclear na figura 17.

C. trinuclear	C	H	N
Análise elemental	34,92%	3,61%	5,67%
Calculada para $C_{21}H_{30}N_3O_{15}V_3$	35,16%	4,22%	5,86%

Táboa 6: Porcentaxes de carbono, hidróxeno e nitróxeno obtidos mediante análise elemental e calculados para a estrutura proposta para o complexo trinuclear na figura 18, xunto con dúas moléculas de auga.

3.1.2. Espectrometría de masas

A espectrometría de masas permite determinar os ións moleculares (tanto positivos como negativos) en función da relación masa/carga, así como outros fragmentos moleculares, facilitando así a obtención da estrutura en disolución da mostra analizada. A continuación móstranse as estruturas dos picos característicos e a relación m/z correspondente. (Os espectros atópanse na sección de anexos).

Ligando

Foi posible detectar, tanto o catión molecular como o aniión molecular do ligando preparado. O catión molecular correspóndese coa sinal que aparece a $m/z=276$ uma, coa fórmula molecular $[C_{13}H_{14}N_3O_4]^+$ (**figura 25**); mentres que o aniión presenta unha m/z igual a 274 uma, cuxa fórmula molecular é $[C_{13}H_{12}N_3O_4]^-$ (**figura 26**). No espectro de masas en modo positivo é posible identificar unha sinal moi intensa a $m/z=589$ uma que se corresponde cun dímero formado por dous catións moleculares e un aniión cloruro enlazados por enlaces de hidróxeno: $[LH-Cl-LH]^+$.^[26]

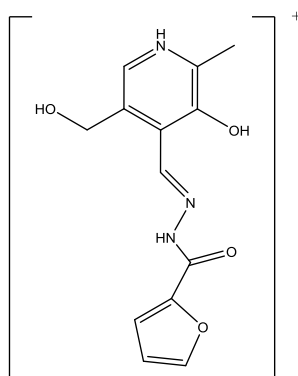


Figura 25: Estrutura correspondente a $m/z=276$ uma.

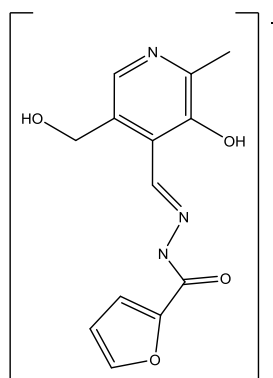


Figura 26: Estrutura correspondente a $m/z = 274$ uma.

Especie mononuclear

Para a composto mononuclear detectouse unha sinal intensa para o ión molecular positivo, correspondente coa fórmula $[C_{14}H_{15}N_3O_6V]^+$ cuxa relación m/z é 372 uma (**figura 27**).

No espectro de masas de ións negativos aparecen varias sinais, sendo a de m/z igual 370 uma a correspondente co anión molecular de fórmula $[C_{14}H_{13}N_3O_6V]^-$ (**figura 28**). Foi identificada tamén a sinal de m/z igual a 741 uma correspondéndose cun complexo dinuclear onde a unión dos vanadios se produce mediante osíxenos ponte^[27] (**figura 29**).

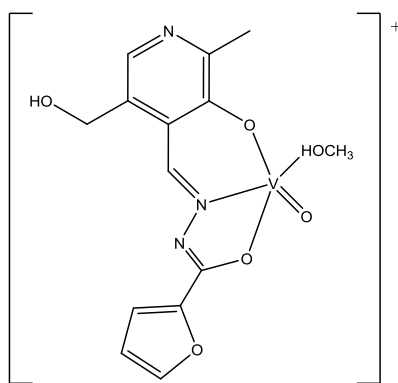


Figura 27: Estrutura correspondente a $m/z= 372$ uma.

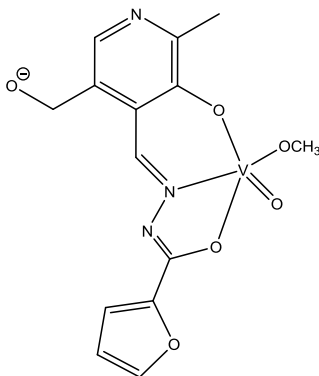


Figura 28: Estrutura correspondente a $m/z= 370$ uma.

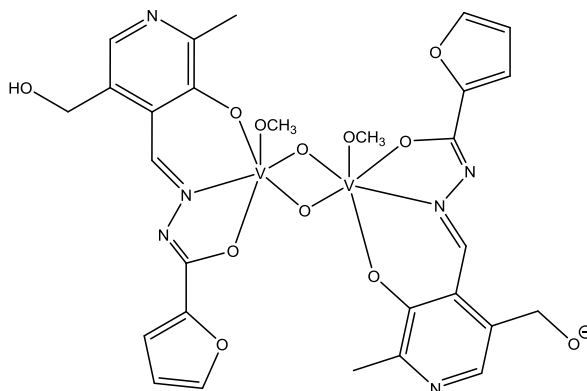


Figura 29: Estrutura correspondente a $m/z = 741$ uma.

Especie trinuclear

A química en disolución do complexo trinuclear é moi variada^[28]. No espectro de masas de ións positivos existen dúas sinais que evidencian a presenza do complexo buscado: a m/z igual a 343 uma aparece o complexo diprotonado, cunha fórmula de $[C_{21}H_{31}N_3O_{13}V_3]^{2+}$ (**figura 30**), e a 771 uma aparece o complexo solvatado con moléculas de metanol, a fórmula correspóndese con $[C_{26}H_{40}N_3O_{14}V_3]^+$ (**figura 32**). É posible identificar tamén a sinal que aparece a 397 uma como un complexo mononuclear de vanadio que presenta dous ligando piridona e se solvata con auga e metanol (**figura 31**).

Entre os ións negativos só se identificou o pico máis intenso, que se corresponde cun complexo trinuclear de fórmula $[C_{32}H_{58}N_3O_{18}V_3]^{2-}$ (**figura 33**). Pódese observar que as moléculas de metanol substituíron tanto os osíxenos terminais con parte dos osíxenos ponte, dando lugar a unha relación masa/carga de 462,6 uma.

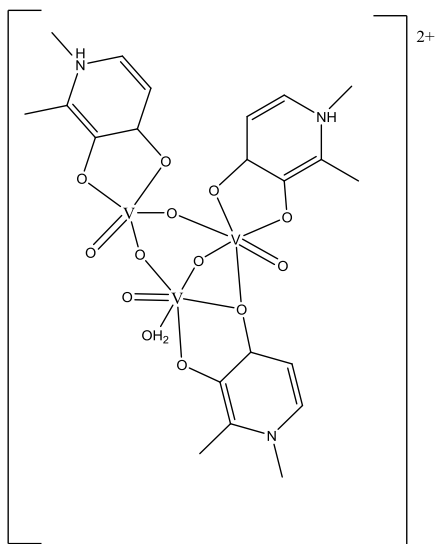


Figura 30: Estrutura correspondente a $m/z = 343$ uma.

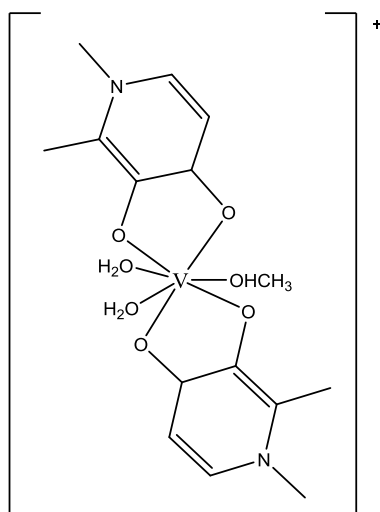


Figura 31: Estrutura correspondente a $m/z = 397$ uma.

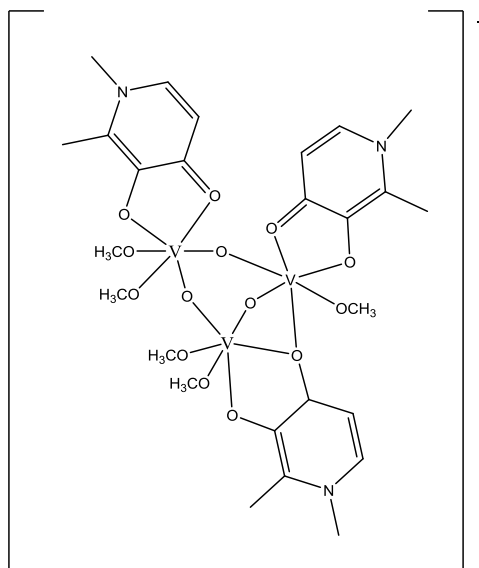


Figura 32: Estrutura correspondente a $m/z= 771$ uma.

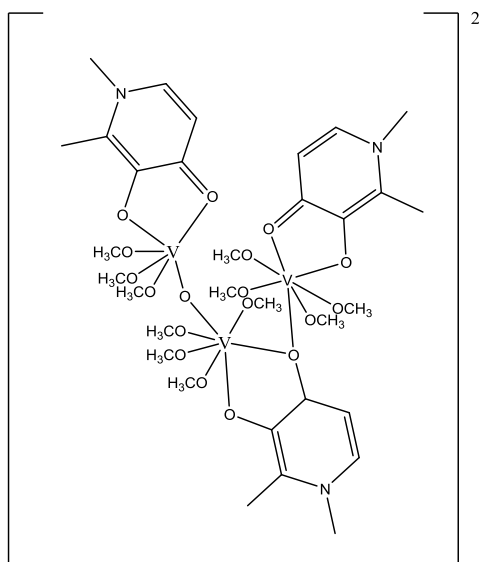


Figura 33: Estrutura correspondente a $m/z= 462,6$ uma.

3.1.3. Espectroscopia de infravermello

Esta técnica basease na diferenza das frecuencias de vibración dos enlaces das moléculas en función da súa enerxía. A existencia de bandas e unhas zonas características do espectro evidencia a presenza de grupos funcionais concretos. Os espectros obtidos recóllense na sección de anexos.

No espectro de IR do ligando aparecen dúas bandas a 1212 e 1249 cm^{-1} asignadas a vibración $\text{C-O}_{\text{enólico}}$, ademais hai unha banda na zona de 3293 cm^{-1} e outra a 1014 cm^{-1} correspondéndose respectivamente a vibración N-H e N-N.

É posible identificar a banda correspondente a vibración C=O do carbonilo do ligando a $\nu = 1692,34\text{ cm}^{-1}$, sendo esta ausente no complexo mononuclear, o que

proba que a unión co vanadio se produce a través deste osíxeno. A coordinación tamén se manifesta no desprazamento da banda de vibración C=N que aparecía no espectro do ligando a $\nu = 1622,79 \text{ cm}^{-1}$, ata $\nu = 1608,39 \text{ cm}^{-1}$. No espectro do complexo mononuclear tamén se aprecia a banda de vibración V=O a $\nu = 911,80 \text{ cm}^{-1}$.^{[29][30]}

No espectro correspondente ao complexo trinuclear aparecen as bandas características das piridonas entre $1608,50$ e $1456,35 \text{ cm}^{-1}$, a banda de vibración V=O a $\nu = 957,59 \text{ cm}^{-1}$ e a tensión V-O-V a $637,06 \text{ cm}^{-1}$.^[24]

3.1.4. 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 reactividade dos compostos en disolución dificulta a análise das sinais obtidas posto que se poden dar equilibrios entre varias especies, facendo que aparezan máis sinais das esperadas, ou que a integración destas non se corresponda con un composto concreto.

Ligando

O espectro de RMN ^1H deste composto presenta nove sinais. A sinal con menor desprazamento, $\delta = 2,63 \text{ ppm}$, correspóndese cos tres hidróxenos do metilo da piridina (Ha) e a $\delta = 4,78 \text{ ppm}$ sitúanse os dous hidróxenos correspondentes ao fragmento py-CH₂-O⁻ (Hb). As demais sinais correspóndense a un só hidróxeno: aparecendo os hidróxenos do furano a $\delta = 6,78 \text{ ppm}$ (Hc), $\delta = 7,55 \text{ ppm}$ (Hd) e $\delta = 8,08 \text{ ppm}$ (He); e en entre $\delta = 8,23 \text{ ppm}$ e $\delta = 9,03 \text{ ppm}$ os hidróxenos dos carbonos enlazados ao nitróxeno, é dicir, do fragmento -CH=N-. Finalmente distínguense dúas sinais en torno aos 13ppm, unha delas integra por menos de un, que se corresponden cos hidróxenos máis ácidos e que polo tanto poden ser arrancados en disolución. Trátase dos hidróxenos dos grupos alcol e do grupo hidrazona.^[29]

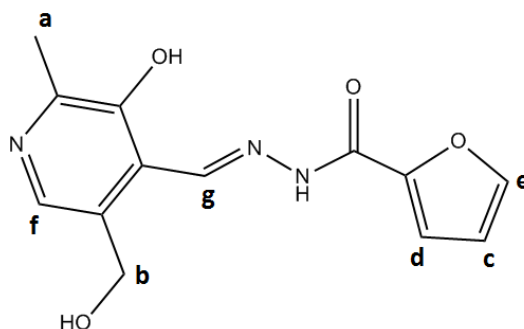


Figura 34: Estrutura do ligando coa asignación dos hidróxenos.

Especie mononuclear

A escasa solubilidade desta especie en DMSO, e en outros disolventes, dificultou a análise do espectro de RMN ^1H posto que as sinais recollidas son tan pouco intensas que é posible que algunha permaneza solapada baixo as sinais correspondentes co disolvente. Este é o caso da sinal dos hidróxenos do metilo enlazado ao piridoxal, que no espectro do ligando aparecían a 2,63ppm e que neste caso posiblemente se atope entre 2,4 e 2,6 ppm, zona na que aparece a sinal do DMSO.

A evidencia da coordinación entre o ligando e o vanadio é o desprazamento da sinal do grupo $-\text{CH}=\text{N}$ da hidracida de $\delta=9,03\text{ppm}$ a $\delta=9,25\text{ppm}$. Ademais a ausencia de bandas na zona de 13 ppm indica que a coordinación se produce polo alcohol do piridoxal. As sinais dos hidróxenos aromáticos continúa a aparecer entre 6,70 e 7,93 ppm; e a $\delta=5,72\text{ppm}$ existe un pico que se corresponde co alcohol do grupo CH_2-OH , que non salia no espectro do ligando debido a formación dun enlace de hidróxeno co grupo NH da hidracida. ^[29]

Especie trinuclear

O espectro recollido para este composto mostra catro tipos de hidróxeno. Como se trata dun trímero, todas as integracións hai que multiplicalas por tres. A $\delta=2,40\text{ppm}$ aparece un dobrete que integra por tres hidróxenos correspondente $\text{CH}_3-\text{C}-$ (Ha) e a $\delta=3,85\text{ppm}$ sitúase un singlete que tamén integra por tres hidróxenos correspondente co $\text{CH}_3-\text{N}-$ (Hb). Os dous hidróxenos aromáticos aparecen a $\delta=6,50\text{ppm}$ (Hc) e a $\delta=7,79\text{ppm}$ (Hd), sendo a sinal máis desapantallada a que se corresponde co hidróxeno máis próximo ao nitróxeno. ^[24]

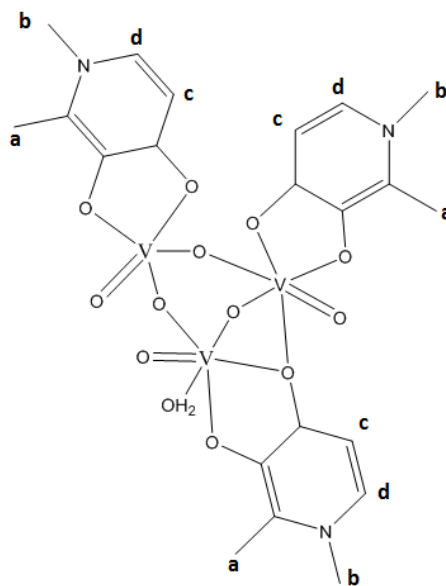


Figura 35: Estrutura da especie trinuclear coa asignación dos hidróxenos.

3.1.5. 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 difracción de raios X de unhas dimensións axeitadas que non presente fracturas.

Mediante esta técnica puideron obterse as estruturas do ligando e das especies trinuclear e decanuclear; así como distintos parámetros recollidos no apartado de anexos.

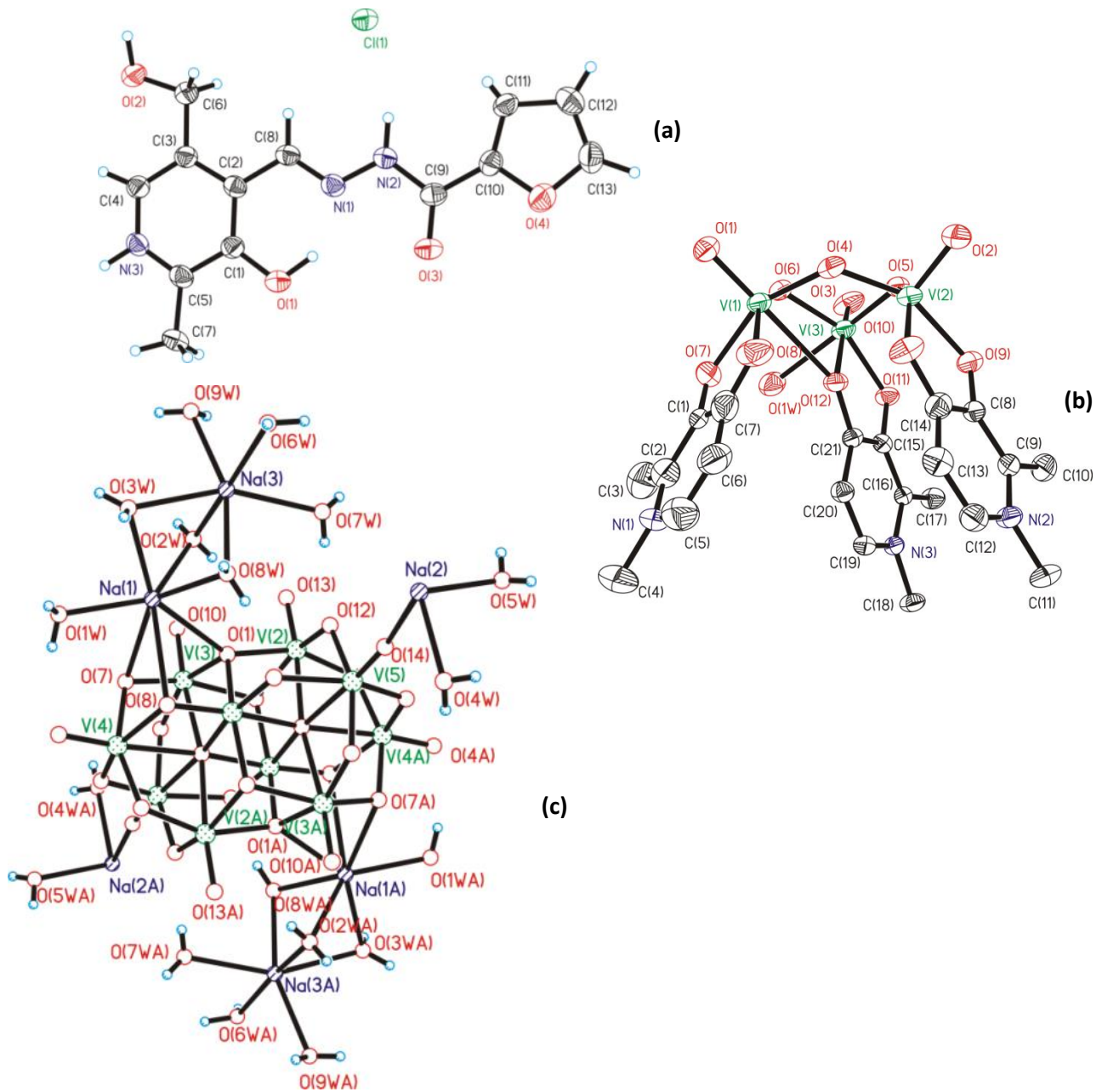


Figura 36: Estruturas do ligando (a), do complexo trinuclear (b) e do composto decanuclear (c) obtidas mediante difracción de raios X de monocristal.

3.2. Ensaio de citotoxicidade

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

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

Calcúlanse as medias de cada experimento (cada un consta de tres réplicas) e realízase un test estatístico paramétrico para analizar os resultados. O tratamento dos datos realízase mediante un software de análise estatístico, o SPSS, e o test paramétrico de comparación de medias aplicado é o de Bonferroni. Previamente foi realizado o test ANOVA para rexeitar a hipótese nula de que as medias a comparar eran iguais.

A continuación móstrase unha gráfica cos resultados obtidos.

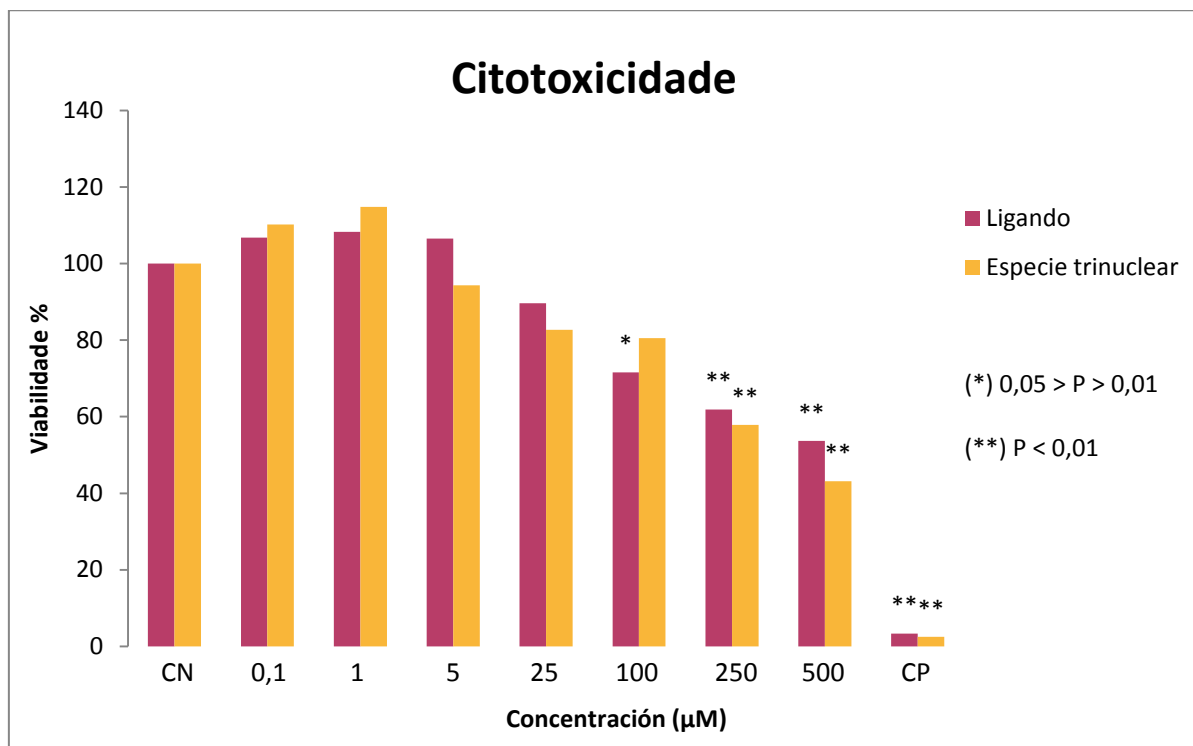


Figura 37: Gráfica de citotoxicidade onde se recollen os resultados de viabilidade obtidos para cada concentración de tratamento.

A viabilidade obtida para concentracións máis altas (250 e 500 μ M) dos dous compostos é estatisticamente diferente ao control negativo, para unha probabilidade do 99% ($P < 0,01$). Ademais a correlación dose resposta calculada mediante o test de Pearson é bastante boa para os dous compostos, indicando que a medida que a concentración do tratamento aumenta, a viabilidade das células diminúe.

- Correlación para o ligando: - 0,837
- Correlación para a especie trinuclear: - 0,858

Os compostos testados evitan a proliferación das células canceríxenas de pulmón (A549) cando se aplican concentracións elevadas. Serían necesarias máis probas para ver se afectan na mesma medida a células sans e así comprobar se sería interesante o emprego destes compostos para o tratamento do cancro de pulmón.

3.3. Estudos de interacción co ADN: Molecular docking

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 a e o axente citotóxico pode desencadear a apoptose celular. 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.

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 o ADN como diana terapéutica e como ligando cada un dos compostos de estudo. Para especie decanuclear, polo momento, non se atopou ningunha interacción favorable (tanto xeométrica como enerxéticamente). Ademais, é posible que o composto apenas acade o núcleo celular, pois algunhas investigacións indican que este composto se dirixe maioritariamente ao retículo endoplasmático e ás mitocondrias. Como estes orgánulos participan en mecanismos de morte celular como a apoptose, non se descarta a súa posible aplicación como axentes antitumorais.^[31]

3.3.1. Ligando do complexo mononuclear

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 nitroxenadas que conforman o ADN (**figura 38**).

As interaccións que se producen entre o ligando e os pares de bases nitroxenadas dos nucleótidos, son maioritariamente π - π staking, mesmas interaccións que manteñen apilados os pares de bases nitroxenadas^[32]. Aínda así, é a suma destas interaccións coas forzas de Van de Waals e enlaces de hidróxeno, os que fan que a enerxía de estabilización acade o valor de -152,188 kcal/mol.

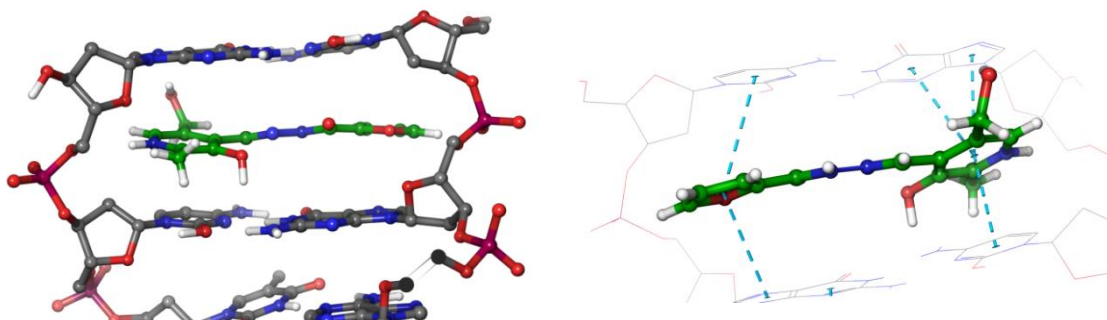


Figura38: Esquema da interacción ADN-Ligando.

3.3.2. Complexo mononuclear

Para realizar estudo da interacción deste composto coa diana terapéutica foi preciso realizar unha simulación da especie mediante o programa Chem3D. A interacción que se produce entre o complexo molecular e o ADN é a mesma que no caso anterior. O composto intercala entre os pares de bases, interactuando con elas a través do ligando orgánico mediante π - π staking. Ao non tratarse dunha molécula totalmente plana, pois a coordinación do ligando ao átomo de vanadio provoca unha torsión no enlace N-N, a eficacia de interacción entre o complexo mononuclear e o ADN diminúe con respecto a do ligando libre. Reducindo a enerxía de estabilización ata -135,435 kcal/mol.

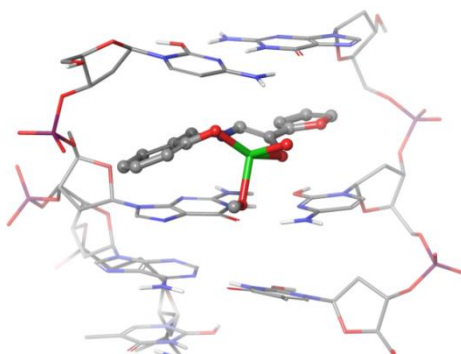


Figura 39: Esquema da interacción ADN-Complexo mononuclear.

3.3.3. Complexo trinuclear

A especie trinuclear presenta dúas zonas diferenciadas: unha parte hidrofílica que se corresponde co anel central $[V_3O_4]$, e outra hidrofóbica, correspondente cos aneis aromáticos e os grupos metilo enlazados a estes. A zona deste composto que interaccúa co ADN é a hidrofílica (**figura 40**). A forma relativamente esférica deste composto dificulta a intercalación.

As interaccións que teñen lugar entre as dúas especies son maioritariamente enlaces de hidróxeno que se producen na zona do surco do ADN. A enerxía de estabilización que deriva destas interaccións ademais de outras como as forzas de Van der Waals, é -157,402 kcal/mol.

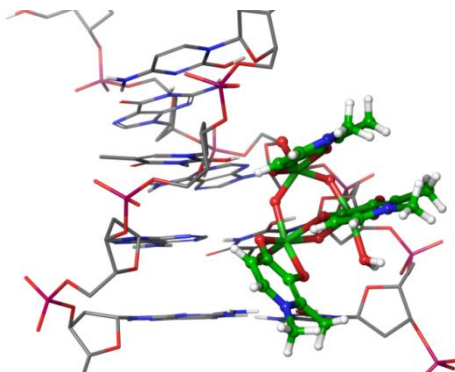


Figura 40: Esquema da interacción ADN-Complexo trinuclear.

Conclusións

A aparición da Química Bioinorgánica e con ela o emprego de compostos de coordinación para o tratamento de diversas enfermidades resultou ser un gran avance na Química Medicinal. No que abrangue ao cancro, onde os compostos derivados do cis-diaminodicloroplatino(II) eran os metalofármacos por excelencia, foron descubertas propiedades antitumorais de varios complexos de metais da serie de transición.

A similitude entre os anións vanadato e fosfato, así como a diversidade da química en disolución do vanadio(V) e a liberdade estérica que presenta á hora de formar complexos, fai que sexa un elemento interesante para a busca de novos medicamentos contra o cancro.

Os estudos in vitro realizados en células pulmonares canceríxenas, revelaron que os dous compostos testados, o ligando orgánico e a especie trinuclear de vanadio(V), posúen actividade citotóxica para as concentracións máis elevadas testadas (250 e 500 μ M). Ademais a correlación dose-resposta obtida en ambos casos é bastante boa, indicando que canto maior é a concentración dos compostos máis descende a viabilidade celular.

Cabe destacar que as dúas especies testadas presentan estruturas moi diferentes e a súa interacción co ADN prodúcese en zonas distintas: o ligando intercálase entre as bases nitroxenadas interaccionando con elas mediante π - π staking, mentres que a especie trinuclear interacciona a través dos enlaces V-O co surco do ADN, mediante enlaces de hidróxeno. A pesar disto, os resultados obtidos nos ensaios in vitro son bastante similares, observándose a maior actividade citotóxica para a especie trinuclear, que ademais presenta unha enerxía de estabilización para a interacción co ADN lixeiramente máis favorable.

Se nos centramos nos resultados obtidos mediante molecular docking para o complexo mononuclear e para o seu ligando libre, poderíase crer que, debido a que a interacción co ADN é máis favorable no caso do ligando libre, e sabendo que este composto si presenta actividade citotóxica, non é precisa a coordinación co vanadio. A razón pola cal se realiza a coordinación co metal é buscar que o axente antitumoral sexa específico para as células cancerosas, pois o ligando posiblemente presente unha elevada actividade citotóxica en todas as células, non só nas canceríxenas. Por este motivo sería interesante realizar nun futuro experimentos in vitro empregando células sans.

O estudo de molecular docking entre o decavanadato e o ADN, polo momento, non mostrou ningunha interacción favorable. De todas formas continuamos na busca dun acoplamento satisfactorio. Por outra banda, existen estudos que indican que as dianas principais deste composto son o retículo endoplasmático e as mitocondrias. Trátase de dous orgánulos celulares que participan nos procesos de morte celular, polo que a actividade antitumoral que poidan presentar os decavanadatos pode deberse a indución da apoptose ao xerar cambios nestes orgánulos, e non por interatuar co ADN.

Conclusiones

La aparición de la Química Bioinorgánica y con ella el empleo de compuestos de coordinación para el tratamiento de diversas enfermedades resultó ser un gran avance en la Química Medicinal. En lo que se refiere al cáncer, donde los compuestos derivados del cis-diaminodicloroplatino(II) eran los metalofármacos por excelencia, fueron descubiertas propiedades antitumorales de varios complejos de metales de la serie de transición.

La similitud entre los aniones vanadato y fosfato, así como la diversidad de la química en disolución del vanadio(V) y la libertad estérica que presenta a la hora de formar complejos, hace que sea un elemento interesante para la búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer.

Los estudios in vitro realizados en células pulmonares cancerígenas, revelaron que los dos compuestos testados, el ligando orgánico y la especie trinuclear de vanadio(V), poseen actividad citotóxica para las concentraciones más elevadas testadas (250 e 500 μ M). Además la correlación dosis-respuesta obtenida en ambos casos es bastante buena, indicando que cuanto mayor es la concentración de los compuestos más desciende la viabilidad celular.

Cabe destacar que las dos especies testadas presentan estructuras muy diferentes y su interacción con el ADN se produce en zonas distintas: el ligando se intercala entre las bases nitrogenadas interaccionando con ellas mediante π - π staking, mientras que la especie trinuclear interacciona a través de los enlaces V-O con el surco del ADN, mediante enlaces de hidrógeno. A pesar de ello, los resultados obtenidos en los ensayos in vitro son bastante similares, observándose la mayor actividad citotóxica para la especie trinuclear, que además presenta una energía de estabilización para a interacción con el ADN ligeramente más favorable.

Si nos centramos en los resultados obtenidos mediante molecular docking para el complejo mononuclear y para su ligando libre, se podría creer que, debido a que la interacción con el ADN es más favorable en el caso del ligando libre, y sabiendo que este compuesto sí presenta actividad citotóxica, no es necesaria la coordinación con el vanadio. La razón por la cual se realiza la coordinación con el metal es buscar que el agente antitumoral sea específico para las células cancerosas, pues el ligando posiblemente presente una elevada actividad citotóxica en todas las células, no sólo en las cancerígenas. Por este motivo sería interesante realizar en un futuro experimentos in vitro empleando células sanas.

El estudio de molecular docking entre el decavanadato y el ADN, por el momento, no mostró ninguna interacción favorable. De todas formas continuamos buscando de un acoplamiento satisfactorio. Por otra parte, existen estudios que indican que las dianas principales de este compuesto son el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Se trata de dos orgánulos celulares que participan en procesos de muerte celular, por lo que la actividad antitumoral que puedan presentar los decavanadatos puede deberse a inducción de la apoptosis al generar cambios en estos orgánulos, y no por interactuar con el ADN.

Conclusions

The appearance of Bioinorganic Chemistry and the use of coordination compounds for the treatment of various diseases turned out to be a great advance in Medicinal Chemistry. As regards the cancer, where the compounds derived from cis-diaminodichloroplatinum(II) were the main metallo-drugs, it were discovered antitumor properties of several metal complexes of the transition series.

The similarity between vanadate and phosphate anions, as well as the diversity of vanadium(V) solution chemistry and the steric freedom that it presents when it forms complexes, makes it an interesting element for the search for new drugs against cancer.

The in vitro studies carried out on cancerous lung cells revealed that the two compounds tested, the organic ligand and the trinuclear vanadium(V) specie, have cytotoxic activity for the highest concentrations tested (250 and 500 μM). Furthermore, the dose-response correlation obtained in both cases is quite good, indicating that the higher the concentration of the compounds, the lower the cell viability.

It should be noted that the two species tested have very different structures and their interaction with DNA occurs in different areas: the ligand is intercalated between the nitrogenous bases interacting with them by π - π staking, while the trinuclear specie interacts through the V-O links with the DNA groove, through hydrogen bonds. Despite this, the results obtained in the in vitro tests are quite similar, observing the highest cytotoxic activity for the trinuclear specie, which also presents a stabilization energy a slightly more favorable for DNA interaction.

If we focus on the results obtained by molecular docking for the mononuclear complex and for its free ligand, it could be believed that, because the interaction with DNA is more favorable in the case of the free ligand, and knowing that this compound does cytotoxic activity, coordination with vanadium is not precise. The reason why the coordination with the metal is sought is to look for the antitumor agent to be specific for the cancer cells, since the ligand possibly presents a high cytotoxic activity in all the cells, not only in the carcinogens. For this reason it would be interesting to carry out in vitro experiments using healthy cells.

The molecular docking study between decavanadate and DNA, for the moment, did not show any favorable interaction. In any case we continue looking for a satisfactory link. On the other hand, there are studies that indicate that the main targets of this compound are the endoplasmic reticulum and the mitochondria. These are two cellular organelles that participate in processes of cell death, so the possible antitumor activity of decavanadates may be due to induction of apoptosis to generate changes in these organelles, and not by interacting with DNA.

Anexos

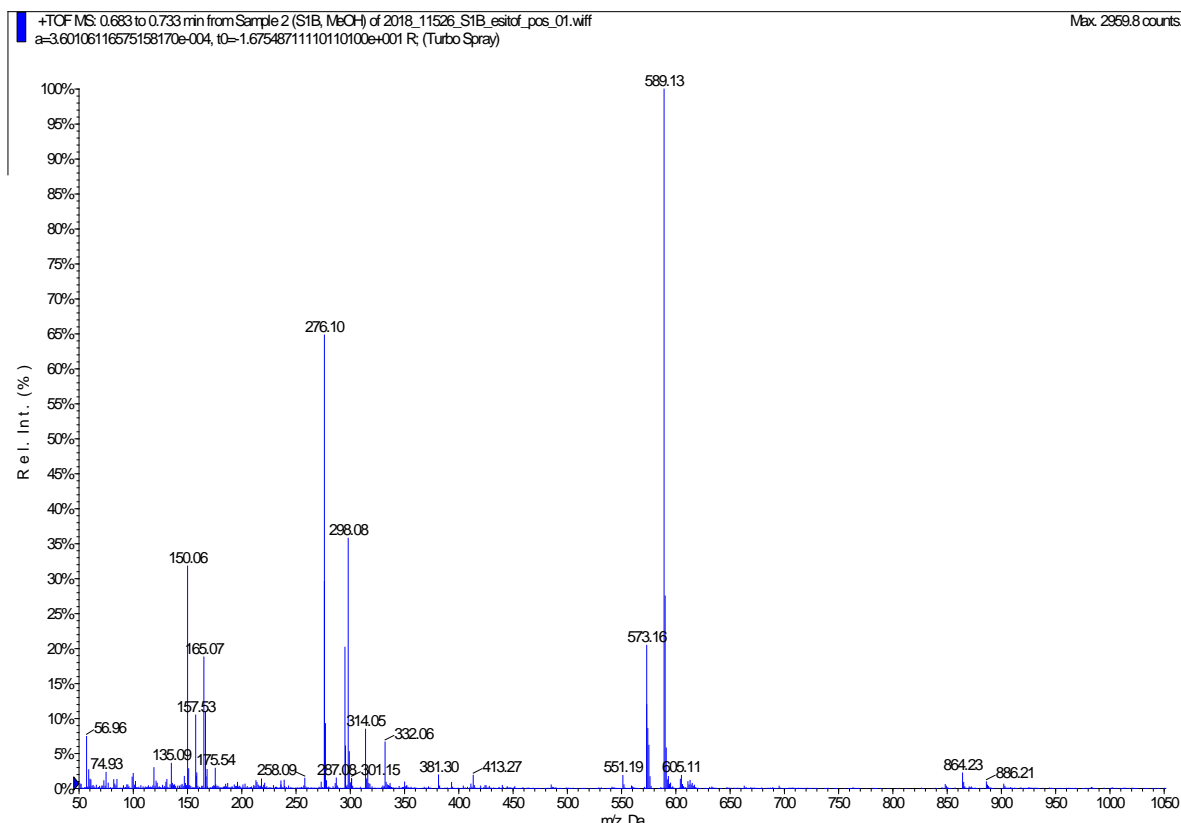


Figura 41: Espectro de masas de ións positivos do ligando.

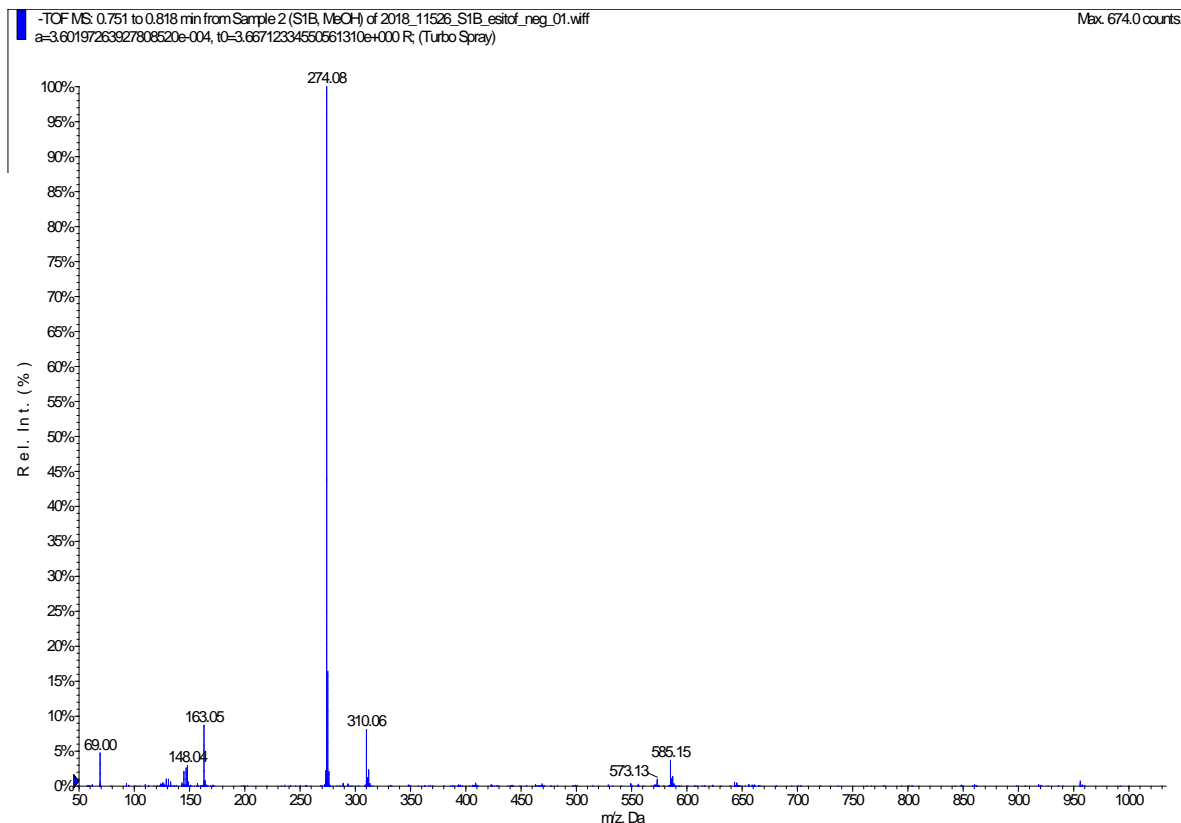


Figura 42: Espectro de masas de ións negativos do ligando.

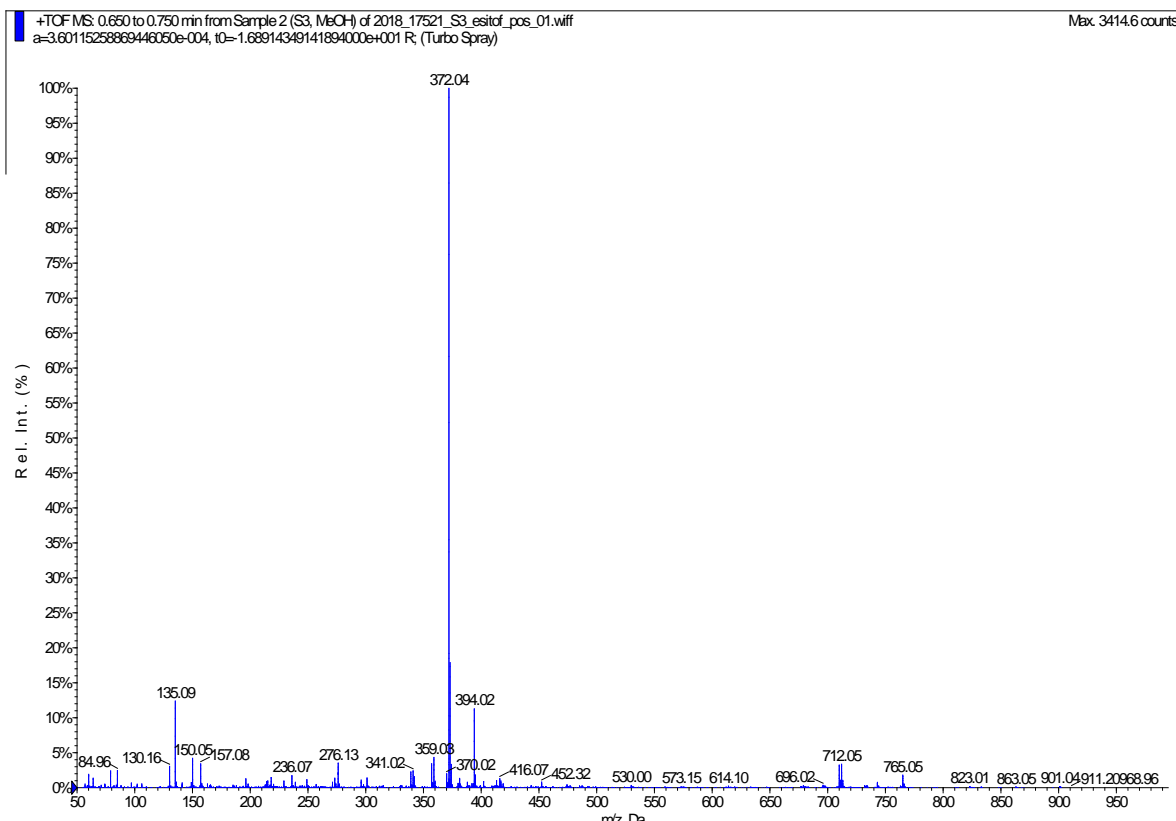


Figura 43: Espectro de masas de ións positivos do complexo mononuclear.

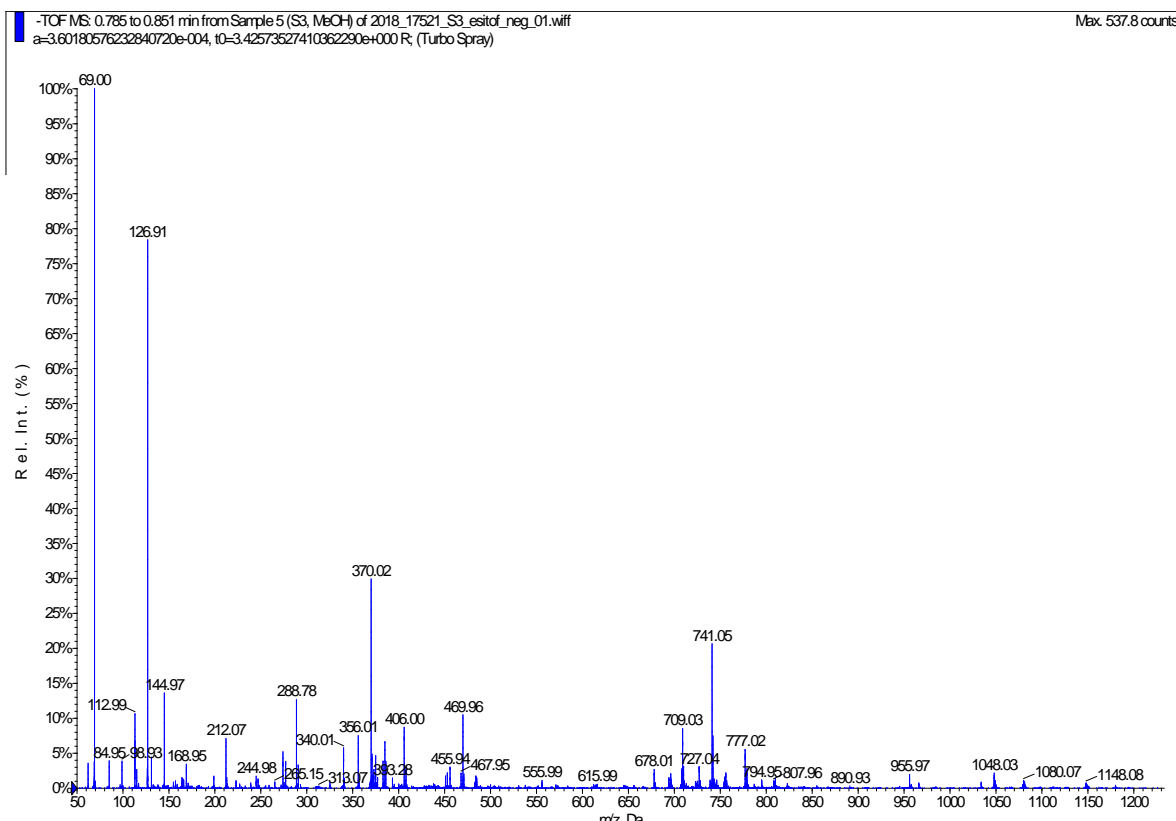


Figura 44: Espectro de masas de ións negativos do complexo mononuclear.

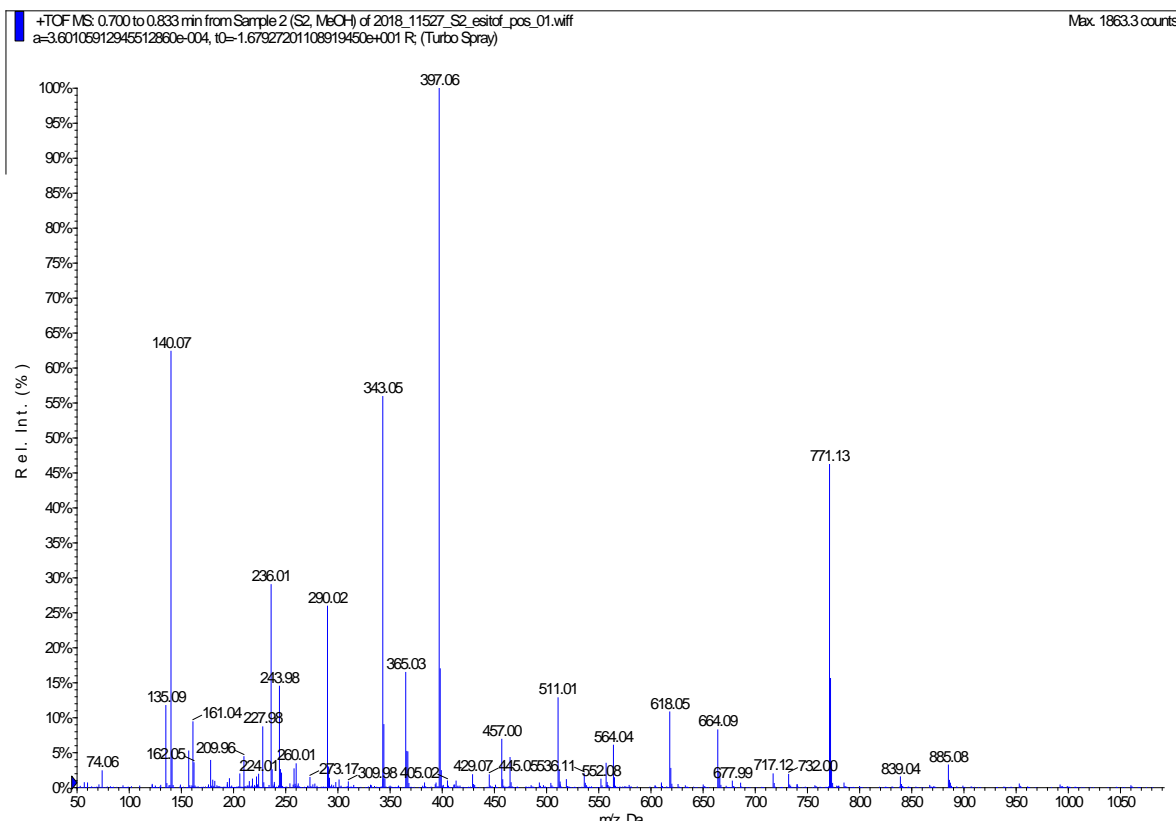


Figura 45: Espectro de masas de ións positivos do complexo trinuclear.

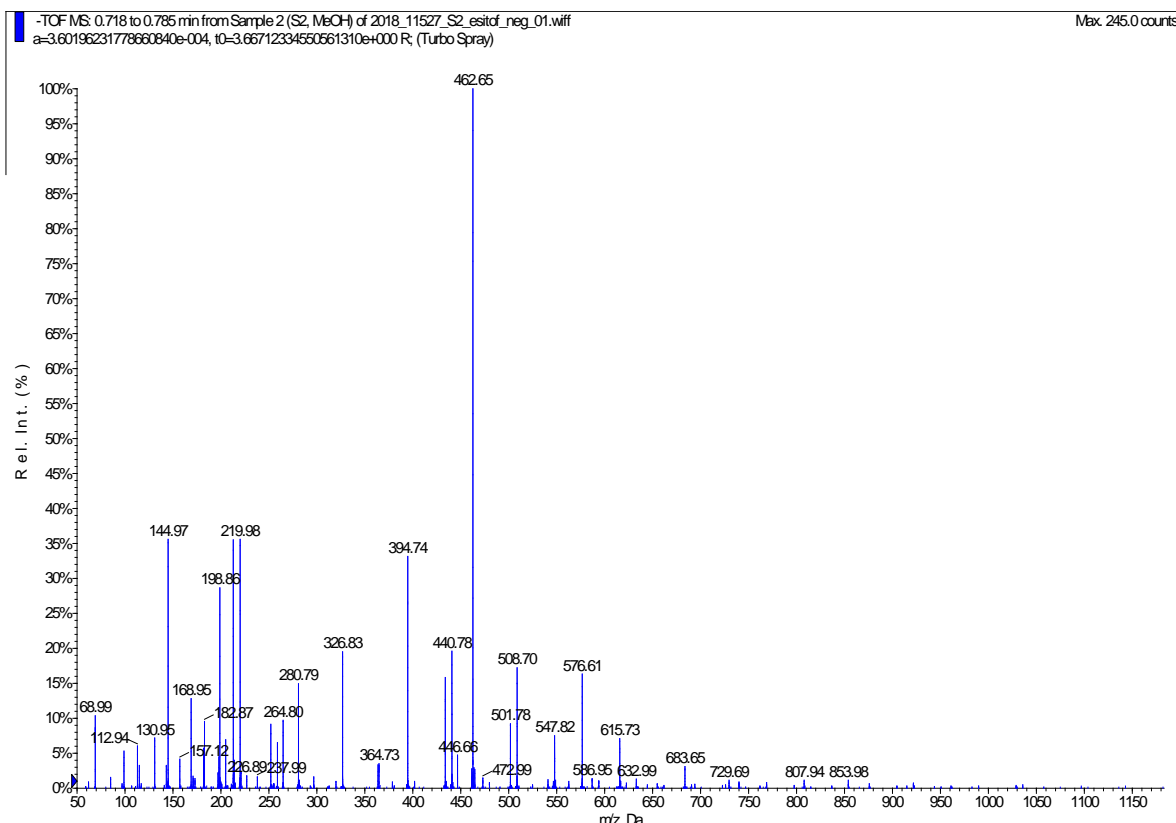


Figura 46: Espectro de masas de ións negativos do complexo trinuclear.

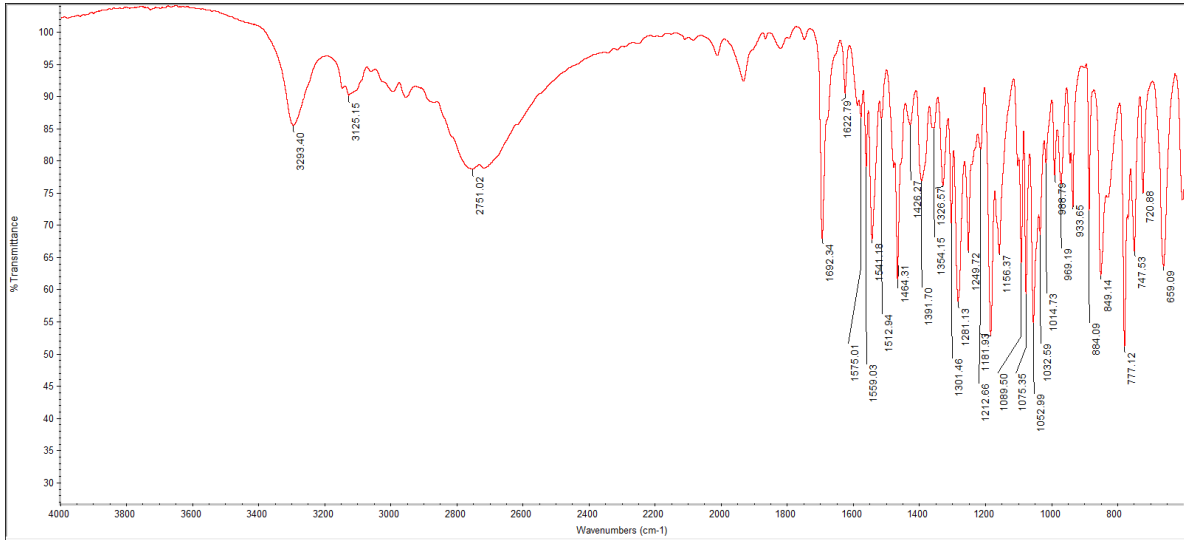


Figura 47: Espectro IR do ligando

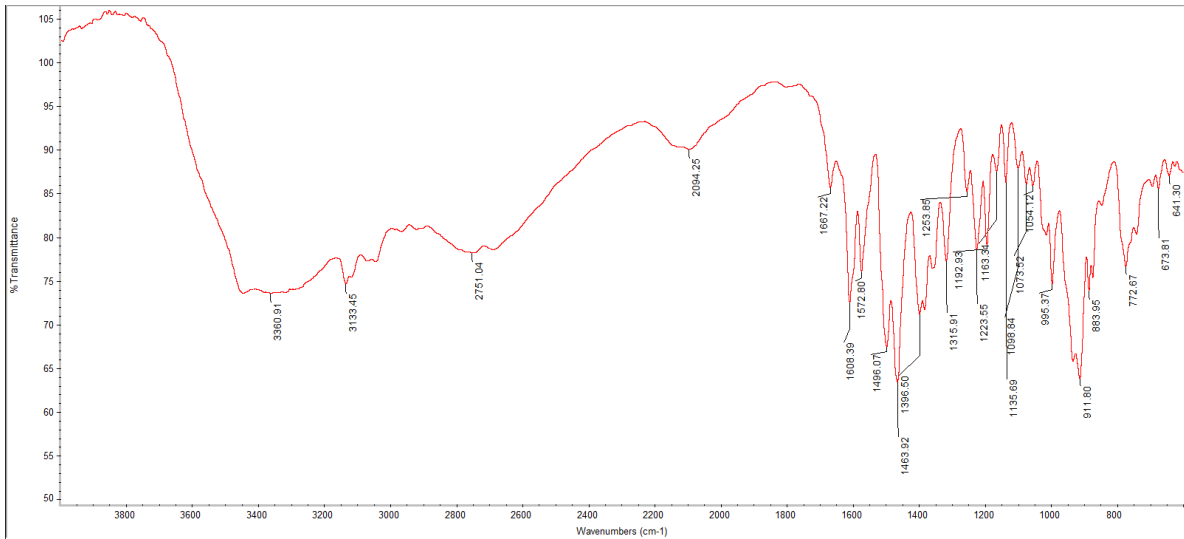


Figura 48: Espectro IR do complexo mononuclear.



Figura 49: Espectro IR do complexo trinuclear.

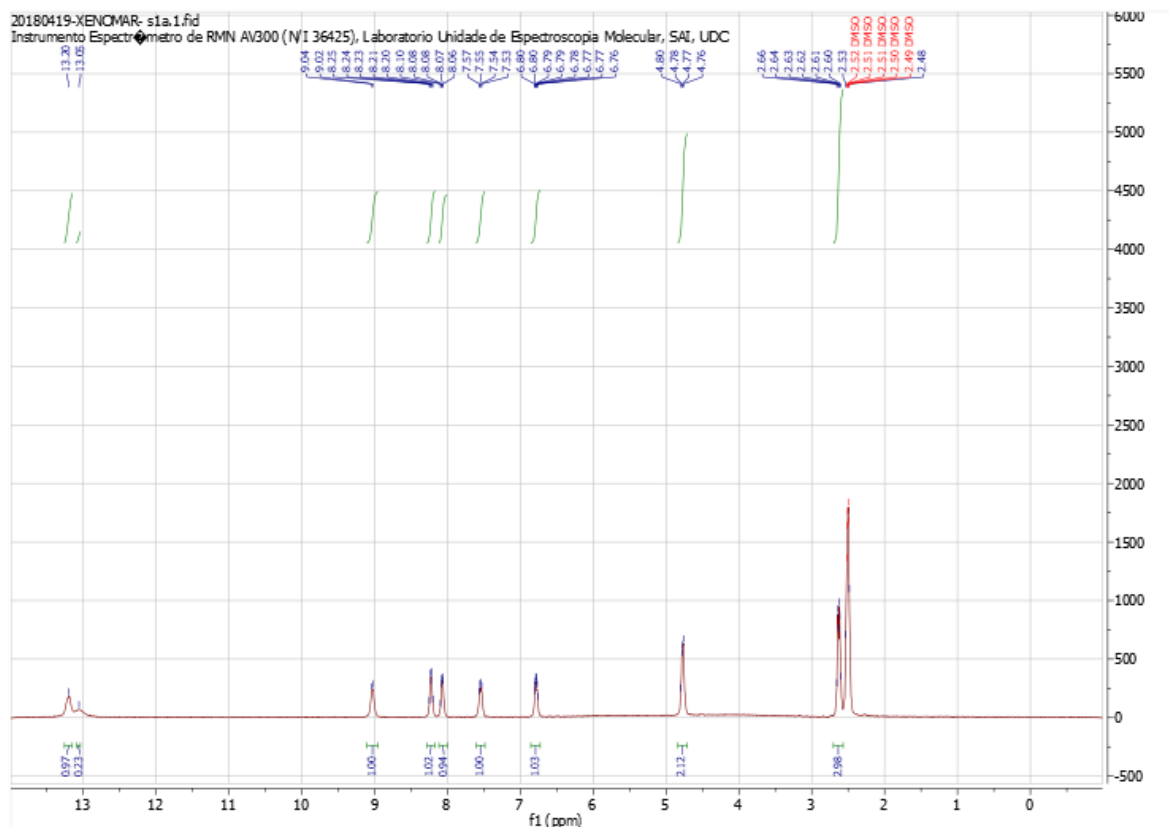


Figura 50: Espectro RMN ¹H do ligando.

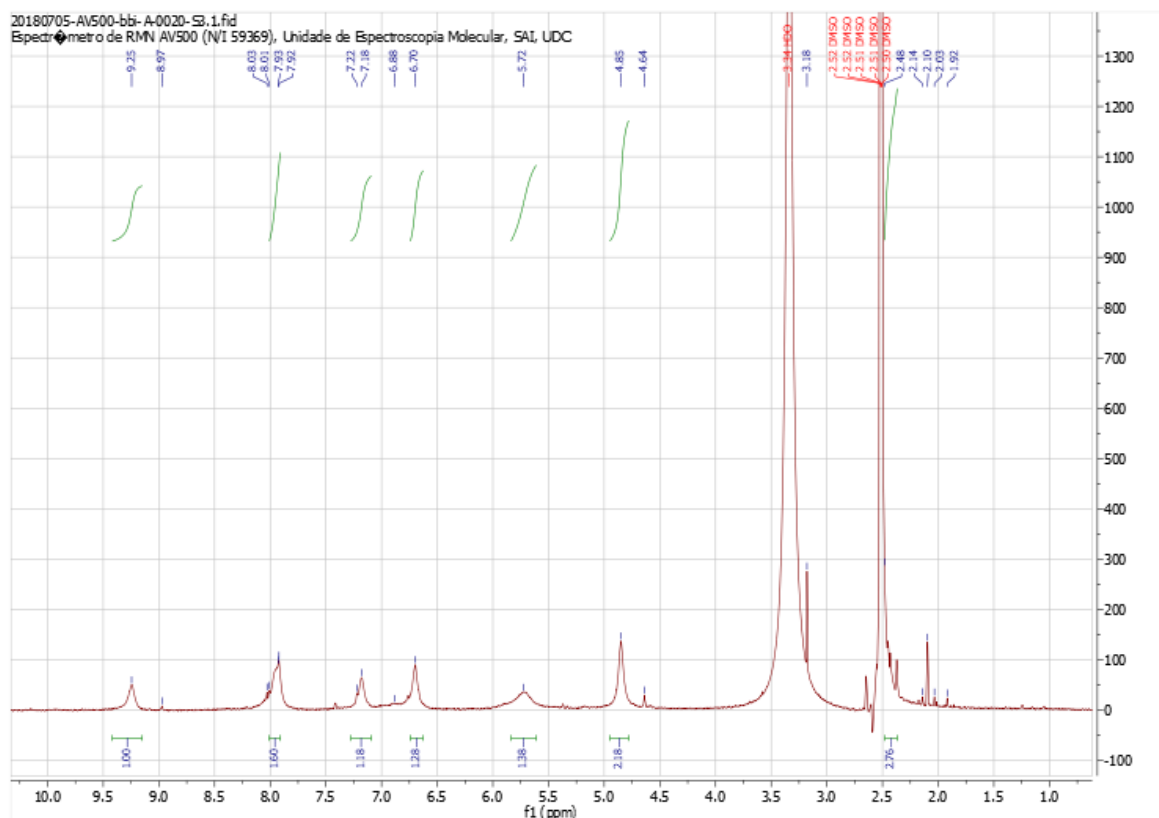


Figura 51: Espectro RMN ¹H do complexo mononuclear.

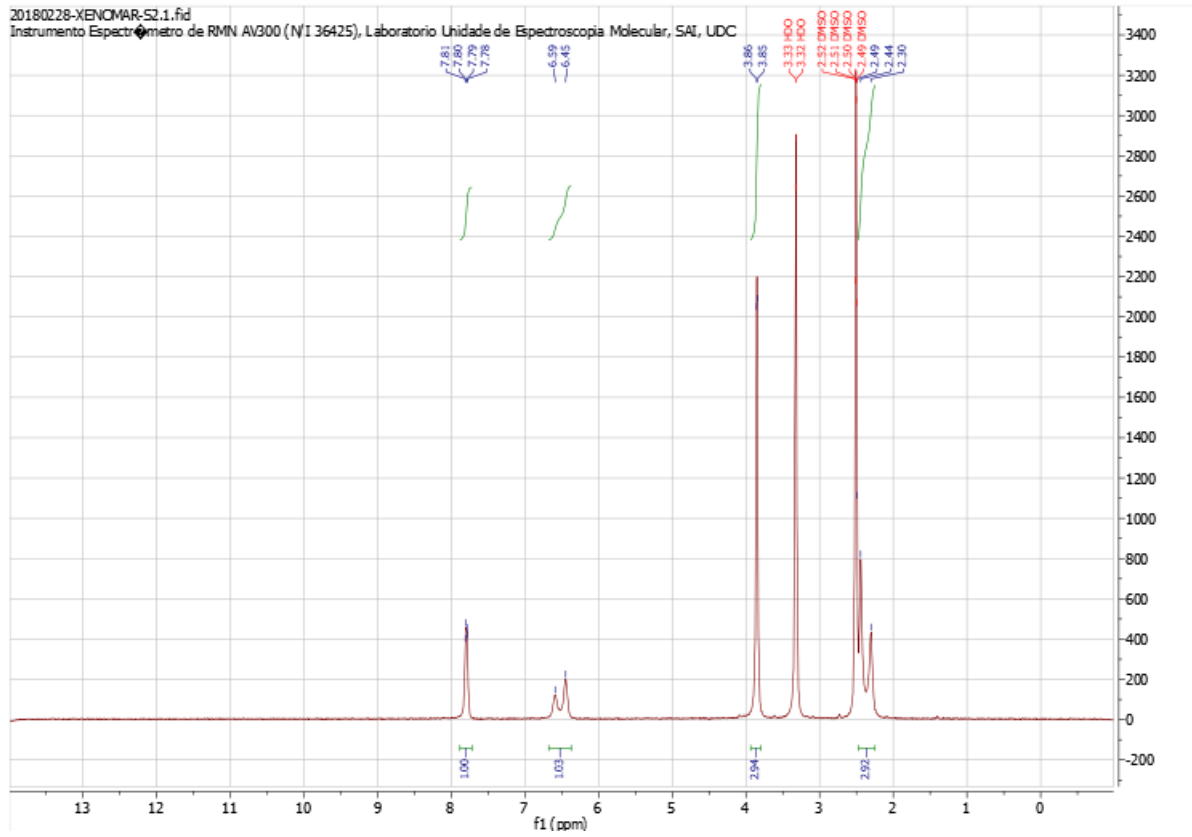


Figura 52: Espectro de RMN ¹H da especie trinuclear.

Información cristalográfica do Ligando	
Fórmula empírica	C ₁₃ H ₁₄ Cl N 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
Dimensións ceda 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
Coeficiente 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
Coeficiente de extinción	0.024(3)
Densidade residual	0.355 e -0,332 Å ⁻³

Táboa 7: Datos cristalográficos do ligando.

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 8 : Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do ligando.

Simetrías: #1 -x+3/2, y-1/2, -z+1/2 #2 x-1/2, -y-3/2, z-1/2

Información cristalográfica do Complexo trinuclear		
Fórmula empírica	$C_{21} H_{30} N_3 O_{15.50} V_3$	
Peso molecular	725.30	
Temperatura	173(2) K	
Lonxitude de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	$P2_1/n$	
Dimensións cela unidade	$a=9.5324(7)$ Å $b = 16.4107(11)$ Å $c = 18.0638(12)$ Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 91.1010(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	2825.3(3) Å ³	
Z	4	
Densidade (calculada)	1.705 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	1.051 mm ⁻¹	
F(000)	1480	
Tamaño cristal	0.45 x 0.40 x 0.40 mm ³	
Rango theta para a colección de datos	1.68 a 28.32°	
Rangos indexación	$-12 \leq h \leq 12$ $-21 \leq k \leq 12$ $-24 \leq l \leq 24$	
Reflexións recollidas	19434	
Reflexións independentes	6989 [R(int)=0.0418]	
Completitude para theta =28.32°	99,2%	
Máximo e mínimo de transmisión	0.6786 e 0,6492	
Datos / restriccións / parámetros	6989 / 4 / 413	
Calidade de axuste en F²	1.042	
Índice final R [$l > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0672$, $wR_2 = 0.1708$	
Índices R (todos os datos)	$R_1 = 0.0933$, $wR_2 = 0.1880$	
Densidade residual	2.020 e -0,902 Å ⁻³	

Táboa 9: Datos cristalográficos do complexo trinuclear.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1W)-H(2W)...O(3W)	0.89(2)	1.80(2)	2.694(5)	175(6)
O(2W)-H(4W)...O(2)	0.89(5)	2.06(7)	2.910(6)	159(14)
O(3W)-H(5W)...O(2W)#1	0.73(4)	2.18(4)	2.912(7)	176(7)
O(3W)-H(6W)...O(8)#2	0.72(4)	2.49(6)	3.112(6)	145(7)
O(3W)-H(6W)...O(10)#2	0.72(4)	2.53(6)	3.113(6)	139(7)

Táboa 10 : Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do complexo trinuclear.

 Simetría: #1 $-x+3/2, y-1/2, -z+1/2$ #2 $x+1, y, z$

Ángulos V-O-V (°)	
V(2)-O(4)-V(1)	125.59(17)
V(3)-O(5)-V(2)	120.41(16)
V(1)-O(6)-V(3)	119.17(16)
V(3)-O(12)-V(1)	84.99(10)

Táboa 11: Ángulos V-O-V correspondentes a especie trinuclear.

Distancia V(1)-O (Å)		Distancia V(2)-O (Å)		Distancia V(3)-O (Å)	
V(1)-O(1)	1.599(3)	V(2)-O(2)	1.614(4)	V(3)-O(6)	1.858(3)
V(1)-O(6)	1.794(3)	V(2)-O(4)	1.795(3)	V(3)-O(11)	1.909(3)
V(1)-O(4)	1.817(3)	V(2)-O(5)	1.822(3)	V(3)-O(12)	2.204(3)
V(1)-O(7)	1.981(4)	V(2)-O(9)	1.964(3)	O(1W)-V(3)	2.181(4)
V(1)-O(8)	2.008(4)	V(2)-O(10)	2.005(3)	V(3)-O(3)	1.608(3)
V(1)-O(12)	2.451(3)			V(3)-O(5)	1.815(3)

Táboa 12: Distancias V-O correspondentes a especie trinuclear.

Información cristalográfica do Decavanadato		
Fórmula empírica	H ₃₆ Na ₆ O ₄₆ V ₁₀	
Peso molecular	1419.63	
Temperatura	100(2) K	
Lonxitude de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P $\bar{1}$	
Dimensión cela unidade	a = 8.4611(4) Å b = 10.7735(4) Å c = 11.5467(5) Å	α = 105.471(2)° β = 99.416(3)° γ = 101.352(2)°
Volume	968.20(7) Å ³	
Z	1	
Densidade (calculada)	2.435 Mg/m ³	
Coeficiente de absorción	2.501 mm ⁻¹	
F(000)	700	
Tamaño cristal	0.37 x 0.26 x 0.24 mm ³	
Rango theta para a colección de datos	2.03 a 28.37°	
Rangos indexación	-11<=h<=11 -14<=k<=14 -15<=l<=13	
Reflexións recollidas	16535	
Reflexións independentes	4721 [R(int)=0.0199]	
Compleitude para theta =28.37°	97,2%	
Máximo e mínimo de transmisión	0.5852 e 0,4580	
Datos / restriccións / parámetros	4721 / 0 / 352	
Calidade de axuste en F²	1.223	
Índice final R [I>2sigma(I)]	R ₁ = 0.0209, wR ₂ = 0.0646	
Índices R (todos os datos)	R ₁ = 0.0221, wR ₂ = 0.0652	
Densidade residual	0.398 e -0,777 eÅ ⁻³	

Táboa 13 : Datos cristalográficos do composto decanuclear.

D-H...A	d(D-H) Å	d(H...A) Å	d(D...A) Å	<(DHA) °
O(1W)-H(1B)...O(3)#2	0.82(3)	2.03(3)	2.8477(19)	169(3)
O(1W)-H(1A)...O(4)	0.81(3)	2.17(3)	2.9556(19)	164(3)
O(2W)-H(2B)...O(1W)#6	0.76(3)	2.11(3)	2.863(2)	174(3)
O(2W)-H(2A)...O(13)	0.74(4)	2.41(4)	3.138(2)	166(3)
O(2W)-H(2A)...O(1)	0.74(4)	2.58(3)	3.0413(19)	122(3)
O(2W)-H(2A)...O(10)	0.74(4)	2.62(3)	3.0610(19)	120(3)
O(3W)-H(3B)...O(6)#2	0.77(3)	2.17(3)	2.9305(19)	169(3)
O(3W)-H(3A)...O(10)#6	0.81(3)	2.13(3)	2.9347(19)	178(3)
O(4W)-H(4B)...O(5)#7	0.75(3)	1.97(3)	2.7151(19)	172(3)
O(4W)-H(4A)...O(5W)#7	0.84(3)	2.01(3)	2.8523(19)	177(3)
O(5W)-H(5B)...O(3)#8	0.72(3)	2.05(3)	2.7612(19)	170(3)
O(5W)-H(5A)...O(13)#3	0.71(3)	2.13(3)	2.799(2)	158(3)
O(6W)-H(6B)...O(7W)#9	0.71(4)	2.30(4)	2.955(2)	154(4)
O(6W)-H(6A)...O(2)#9	0.92(6)	2.56(6)	3.463(2)	171(5)
O(7W)-H(7B)...O(12)#5	0.77(3)	2.09(4)	2.851(2)	173(3)
O(7W)-H(7A)...O(12)#9	0.75(4)	2.44(4)	3.147(2)	157(3)
O(8W)-H(8B)...O(11)#5	0.79(3)	1.98(3)	2.7529(18)	166(3)
O(8W)-H(8A)...O(2)	0.78(3)	2.10(3)	2.8658(19)	166(3)
O(8W)-H(8A)...O(8)#1	0.78(3)	2.51(3)	3.0018(18)	123(2)
O(9W)-H(9B)...O(4W)#10	0.81(3)	1.97(3)	2.767(2)	172(3)
O(9W)-H(9A)...O(7)#11	0.80(3)	2.13(3)	2.9188(19)	170(3)

Táboa 14: Distancias e ángulos dos enlaces de hidróxeno do composto decanuclear.

Simetrías: #1 -x-1, -y+1, -z+2	#2 x+1, y, z	#3 -x-1, -y+1, -z+1	#4 -x, -y+1, -z+2
#5 x-1, y, z	#6 -x, -y+2, -z+2	#7 -x-1, -y, -z+1	#8 x, y-1, z-1
#9 -x-2, -y+1, -z+1	#10 x-1, y+1, z	#11 -x-1, -y+2, -z+2	

Distancia V(a)-O Å					
V(a)-O(b)	O(1)-V(2)	1.9745(13)	V(a)-O(b)	O(1)-V(3)	1.9875(12)
V(a)-O(f)	V(2)-O(13)	1.6144(13)	V(a)-O(f)	V(3)-O(10)	1.6081(13)
V(a)-O(c)	V(2)-O(12)	1.7965(13)	V(a)-O(c)	V(3)-O(7)	1.7978(13)
V(a)-O(c)	V(2)-O(2)	1.8511(13)	V(a)-O(c)	V(3)-O(3)	1.8446(13)
V(a)-O(b)	V(2)-O(6)	2.0184(12)	V(a)-O(b)	V(3)-O(6)	2.0159(13)
V(a)-O(a)	V(2)-O(9)#1	2.2266(12)	V(a)-O(a)	V(3)-O(9)	2.2513(12)
Distancia V(b)-O Å					
V(b)-O(g)	V(4)-O(4)	1.6114(13)	V(b)-O(g)	V(5)-O(14)	1.5979(13)
V(b)-O(d)	V(4)-O(5)#1	1.8175(13)	V(b)-O(d)	V(5)-O(5)	1.8316(13)
V(b)-O(c)	V(4)-O(2)#1	1.8377(13)	V(b)-O(c)	V(5)-O(3)#1	1.8613(13)
V(b)-O(c)	V(4)-O(7)	1.9070(13)	V(b)-O(c)	V(5)-O(12)	1.9011(13)
V(b)-O(e)	V(4)-O(8)	2.0489(13)	V(b)-O(e)	V(5)-O(11)	1.9988(13)
V(b)-O(a)	V(4)-O(9)	2.2944(13)	V(b)-O(a)	V(5)-O(9)#1	2.3158(12)
Distancia V(c)-O Å					
V(c)-O(e)	V(1)-O(8)	1.6826(13)	V(c)-O(b)	V(1)-O(1)	1.9523(12)
V(c)-O(e)	V(1)-O(11)	1.6992(12)	V(c)-O(a)	V(1)-O(9)	2.0995(12)
V(c)-O(b)	V(1)-O(6)#1	1.8884(12)	V(c)-O(a)	V(1)-O(9)#1	2.1083(12)

Táboa 15: Distancias V-O do composto decanuclear. Simetría: #1 -x-1, -y+1, -z+2.

Bibliografía

- [1] VALLET, M. (2003). *Introducción a la Química Bioinorgánica*. Madrid: Síntesis.
- [2] CRICHTON, R. (2012). *Biological Inorganic Chemistry*. Oxford: Elsevier
- [3] RAY BAKHTIAR, EI-ICHIRO OCHIAI (1998). "Pharmacological applications of inorganic complexes". *General Pharmacology*. 32, 525-540
- [4] AGUILAR CUEVAS, O.; CASTRO RAMÍREZ, R.; SÁNCHEZ GARCÍA, J.; LÓPEZ-SANDOVAL, H.; BARBA-BEHRENS, N. (2012). "Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro". *Educación Química*. 23(1), 33-40.
- [5] COWAN, J. A. (1997). *Inorganic Biochemistry. An Introduction*. Columbus: Wiley-vch.
- [6] DESOIZE B.; MADOULET C. (2002) "Particular aspects of platinum compounds used at present in cáncer treatment". *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 317-325.
- [7] CEBALLOS-TORRES, J.; DEL HIERRO, I.; PRASHAR, S.; FAJARDO M.; MIJATOVIC, S.; MAKSIMOVIC-IVANI, D.; KALUDEROVIC G. N.; GÓMEZ-RUIZ, S. (2014) "Alkenyl-substituted titanocene dichloride complexes: Stability studies, binding and cytotoxicity". *J. Organomet. Chem.* 769, 46-57.
- [8] CONTRERAS-CADENA, D. A.; GÓMEZ-PECH, C.; RANGEL-GARCÍA, M.; RUIZ-HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ-BULIT, P.; BARBA-BEHERENS, N. (2014) "La importancia del vanadio en los seres vivos". *Educación Química*. 25(E1), 245-253.
- [9] REHDER, D. (2017) "Implications of vanadium in technical applications and pharmaceutical issues". *Inorganica Chim. Acta*. 455, 378-389.
- [10] ROZZO, C.; SANNA, D.; GARRIBA, E.; SERRA, M.; CANTARA, A.; PALMIERI, G.; PISANO, M. (2017) "Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines". *J. Inorg. Biochem.* 174, 14-24.
- [11] SHAKER S. ADAM, M.; ELSAWY, H. (2018). "Biological potential of oxo-vanadium salicylediene amino-acid complexes as cytotoxic, antimicrobial, antioxidant and DNA interaction". *J. Photochem. Photobiol. B*. 184, 34-43.
- [12] GAMBINO, D. (2011) "Potentialy of vanadium compounds as anti-parasitic agents". *Coord. Chem. Rev.* 255, 2193-2203.
- [13] HEIDARI, F.; JAMIL A. FATEMI, S.; EBRAHIMPOUR, S. Y.; EBRAHIMNEJAD, H.; CASTRO, J.; DUSEK, M.; EIGNER, V. (2017) "Six-coordinate oxo-vanadium(v) dimer complex with methoxy bridging: Synthesis, cristal structure, biological activity and molecular docking". *Inorg. Chem. Commun.* 76, 1-4.

- [14] ZORZANO, A.; PALACÍN, M.; MARTÍ, L.; GARCÍA-VICENTE, S.(2009) "Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds". *J. Inorg. Biochem.* 103, 559-565.
- [15] LIU, J.; REULAND, D.J.; ROSENHEIN, L.; XIN CAO, Z.; FRANKLIN, L.A.; GANGULI, S. (1997) "Differential Acute Effects of Oxovanadiums and Insulin on Glucose and Lactate Metabolism Under In Vivo and In Vitro Conditions". *Metabolism*. 146, 562-572.
- [16] DOUCETTE, K. A.; N. HASSELL, K.; C. CRANS, D.(2016)"Selective speciation improves efficacy and lowers toxicity of platinum anticancer and vanadium antidiabetic drugs". *J. Inorg. Biochem.* 165, 56-70.
- [17] BRAND, R.M.; G. HAMEL,F.(1990)"Transdemally delivered peroxovanadium can lower blood glucose levels in diabetic rats". *Int. J. Pharm.* 183, 117-123.
- [18] BHATTACHARYYA, S.; S. TRACEY, A. (2001). "Vanadium(V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor desing". *J. Inorg. Biochem.* 85, 9-13.
- [19] COSTA PESSOA, J.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. (2015) "Vanadium compounds in medicine". *Coord. Chem. Rev.* 301-302, 24-48.
- [20] COSTA PESSOA, J. (2015) "Thirty years through vanadium chemistry". *J. Inorg. Biochem.* 147, 4-24.
- [21] KIOSEOGLU, E.; PETANIDIS, S.; GABRIEL, C.; SALIFOGLOU, A. (2015) "The chemistry and biology of vanadium compounds in cáncer therapeutics". *Coord. Chem. Rev.* 301-302, 87-105.
- [22] J. D'CRUZ, O.; M. UCKUN, F. (2002) "Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity". *Expert Opin. Investig. Drugs*. 11, 1829-1836.
- [23] CORREIRA, I.; ADAO, P.; ROY, S.; WAHBA, M.; AVECILLA, F. COSTA PESSOA, J. (2014). "Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents". *J. Inorg. Biochem.* 141, 83-93.
- [24] AVECILLA, F.; F. G. C. GERALDESES, C.; MARGARIDA C. A. CASTRO, M. (2001) "A New Trinuclear Oxovanadium(V) Complex with DMPP Ligands-Syntesis and Structural Characterization in the Solid State and in Aqueous Solution". *Eur. J. Inorg. Chem.* 3135-3142.
- [25] AVECILLA, F. (2007). "Decavanadates in supramolecular structures". *Vanadium Biochemistry*; Manuela Aureliano Alves. Kerala: Research Singpost.
- [26] HEFENG PAN (2008)"A non-covalent dimer formed in electrospray ionisation mass spectrometry behaving as a precursor for fragmentations". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3555-3560.
- [27] AVECILLA, F.; ADAO, P.; CORRELA, I.; COSTA PESSOA, J. (2009) "Influence of polydentate ligands in the structure of dinuclear vanadium compounds". *Pure Appl. Chem.* 81, 1297-1311.

-
- [28] AVECILLA, F.; F. G. C. GERALDESES, C.; L. MACEDO, A.; MARGARIDA C. A. CASTRO, M. (2006) "Crystal Structure of the V^V Dimer [V₂O₂(μ-O)(dmpp)₂(OCH₃)₂] and Its Equilibrium with the V^V Trimer [V₃O₃(μ-O)₃(dmpp)₃(H₂O)](H₂O)₂ in Methanol/Water Solutions". *Eur. J. Inorg. Chem.* 3586-3594.
- [29] R. MAURYA, M.; AGARWAL, S.; BADER, C.; REHDER, D. (2005) "Dioxovanadium(V) Complexes of ONO Donor Ligands Derived from Pyridoxal and Hydrazides: Models of Vanadate-Dependent Haloperoxidases". *Eur. J. Inorg. Chem.* 147-157.
- [30] PISK, J.; DARAN, J.C.; POLI, R.; AGUSTIN, D. (2015) "Pyridoxal based ONS and ONO vanadium (V) complexes: Structural analysis and catalytic application in organic solvent free epoxidation". *J. Mol. Catal. A Chem.* 403, 52-63.
- [31] AUREIANO, M. (2014) "Decavanadate contribution to vanadium biochemistry: In vitro and in vivo studies". *Inorganica Chimica Acta.* 420, 4-7.
- [32] A. HUNTER, C.; K. M. SANDERS, J.; (1990) "The Nature of π-π Interactions". *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5525-5534.