



Facultade de Ciencias
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Química

Trabajo de fin de grado

***Complejos de Molibdeno susceptibles de interaccionar con
el ADN con potenciales aplicaciones antitumorales***

***Complexos de Molibdeno susceptibles de interaccionar co
ADN con potenciales aplicacións antitumorais***

***Molybdenum complexes capable of interacting with DNA
with potential antitumoral applications***

Directores: Fernando Avecilla Porto

Vanessa Valdiglesias García

Miguel Riopedre Fernández

Año académico: 2018-2019 - Convocatoria: Junio

Agradecimientos.

A mis directores Fernando Avecilla y Vanessa Valdiglesias, por haber estado pendiente y por haberme dejado la libertad para investigar y aprender.

A las chicas del laboratorio, Antía y Lucía, por haber hecho de este TFG un trabajo en grupo.

A Manuel Sánchez y a Natalia Fernández, por su ayuda desinteresada con la fluorescencia y el cultivo de células respectivamente.

A Ana María Fernández, porque aparte de ser mi madre, ha sido una fantástica correctora ortográfica de palabras que ni siquiera conoce.

A Juan Carlos Riopedre, porque aparte de ser mi padre, ha evitado con sus conocimientos de informática que mi ordenador saliese volando por la ventana en más de una ocasión a lo largo de la carrera, y que ha sido una parte importante en que pudiese aprender a utilizar los programas de *molecular docking*.

A mis amigos, en especial a Charlene María Harriswangler, por ser la arquitecta del formato de este trabajo, y haber sido parte importante en cubrir mis carencias artísticas, a Ignacio Gonzalo Delgado por haberme acompañado quejándonos de casi todo, y a Blanca María Astray porque aunque ella no me pusiese en sus agradecimientos cuando le corregí el trabajo entero, igualmente se lo merece.

Lista de abreviaturas.

- Uv-Vis: Ultravioleta visible.
- DMSO: Dimetil sulfóxido.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- RedOx: Reducción oxidación.
- MeOH: Metanol.
- MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
- RX: Rayos X.
- DRX: Difracción de rayos X.
- Hepes: Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico).
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo).
- FBS: Suero bovino fetal.
- UV: Ultra violeta.
- *p* Valor: Probabilidad de que un dato aceptado como significativo realmente no lo sea.
- A549: Línea celular de cáncer de pulmón.
- IR: Infrarrojo.
- AE: Análisis elemental.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.
- MS: Espectrometría de masas.
- ESI: Ionización con electrospray.
- FAB: Bombardeo con átomos a alta velocidad.
- m/z: Relación masa / carga.
- I%: Porcentaje de intensidad.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	5
1.1. La química bioinorgánica.....	5
1.2. Metalofármacos en terapia antitumoral.....	6
1.3. El Molibdeno en sistemas biológicos.....	8
1.4. Posible papel del molibdeno en terapia.....	12
1.5. Información sobre los compuestos analizados.....	13
1.5.1. Ligando hidrazona. L1.....	13
1.5.2. Complejo de Mo(VI) con ligando hidrazona. L1C.....	14
1.5.3. Complejo de Mo(0). C2.....	15
1.6. Objetivos.....	16
2. Material y métodos.....	17
2.1. Síntesis.....	17
2.1.1. L1.....	17
2.1.2. L1C.....	17
2.2. Caracterización.....	18
2.2.1. Análisis elemental.....	18
2.2.2. Espectrometría de masas.....	18
2.2.3. Espectroscopia infrarroja.....	18
2.2.4. Espectroscopia RMN ¹ H.....	18
2.2.5. Difracción de rayos X.....	18
2.3. Espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis.....	19
2.4. Espectroscopia de fluorescencia.....	21
2.5. <i>Molecular docking</i>	23
2.6. Estudio de citotoxicidad por MTT.....	24
3. Resultados y discusión.....	28
3.1. Síntesis y caracterización.....	28
3.1.1. L1.....	28

3.1.2.	L1C.....	30
3.1.3.	C2.....	30
3.2.	Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis	32
3.2.1.	L1.....	32
3.2.2.	L1C.....	35
3.2.3.	C2.....	37
3.3.	Espectroscopia de fluorescencia.....	39
3.4.	<i>Molecular docking</i>	41
3.4.1.	L1.....	41
3.4.2.	L1C.....	43
3.4.3.	C2.....	44
3.5.	Estudio de citotoxicidad por MTT.....	45
3.5.1.	L1.....	46
3.5.2.	L1C.....	47
3.5.3.	C2.....	48
4.	Conclusiones.....	49
5.	Bibliografía.....	52
6.	Anexos.....	I
6.1.	Caracterización.....	I
6.2.	Cristalografía.....	VIII
6.3.	<i>Molecular Docking</i>	XI
6.4.	Cronograma.....	XIV

Resumen.

La investigación en busca de compuestos metálicos con utilidad farmacológica ha crecido enormemente en los últimos años, debido al gran espectro de nuevas posibilidades que aportan para su uso en medicina. En este contexto, uno de los metales en los que recientemente ha comenzado a centrarse el desarrollo de nuevos fármacos es el Mo, debido a sus ya demostradas capacidades en el tratamiento de algunas enfermedades, principalmente el cáncer.

En el presente trabajo, las capacidades de interactuar con el ADN y de producir citotoxicidad en células cancerosas serán testadas para un compuesto orgánico con un grupo hidrazona (L1), un complejo de Mo(VI) coordinado al compuesto anterior (L1C) y un complejo de Mo(0) con ligandos acetilacetato y benzimidazol (C2).

Los compuestos serán sintetizados y caracterizados, utilizando para ello las técnicas de AE, IR, MS, RMN y DRX de monocristal. Posteriormente, su capacidad de interactuar con el ADN será medida cuantitativa y cualitativamente mediante espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis y de fluorescencia, su modo de unión teórico más probable será calculado *in silico* mediante técnicas de *molecular docking*, y su potencial citotóxico será testado *in vitro* en células cancerosas pulmonares de la línea A549 mediante ensayos de MTT.

Palabras clave: Química bioinorgánica, complejos de molibdeno, química de coordinación, interacción con el ADN, química biológica, toxicidad, metalofármacos antitumorales.

Resumo.

A investigación en busca de compostos metálicos con utilidade farmacolóxica medrou enormemente nos últimos anos, debido ó gran espectro de novas posibilidades que aportan para o seu uso en medicina. Neste contexto, un dos metais nos que recentemente comezou a centrarse o desenvolvemento de novos fármacos é o Mo, debido as súas xa demostradas capacidades no tratamento dalgunhas enfermidades, principalmente o cancro.

No presente traballo, as capacidades de interaccionar có ADN e de producir citotoxicidade en células de cancro serán testadas para un composto orgánico con un grupo hidrazona (L1), un complexo de Mo(VI) coordinado ó composto anterior (L1C) e un complexo de Mo(0) con ligandos acetilacetionato e benzimidazol (C2).

Os compostos serán sintetizados e caracterizados, utilizando para iso as técnicas de AE, IR, MS, RMN e DRX de monocristal. Posteriormente, a súa capacidade de interaccionar có ADN será medida cuantitativa e cualitativamente mediante espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis e de fluorescencia, o seu modo de unión teórico mais probable será calculado *in silico* mediante técnicas de *molecular docking*, e o seu potencial citotóxico será testado *in vitro* en células de cancro de pulmón de la línea A549 mediante ensaios de MTT.

Palabras clave: Química bioinorgánica, complexos de molibdeno, química de coordinación, interacción có ADN, química biolóxica, toxicidade, metalofármacos antitumorais.

Abstract.

Research for metal compounds with pharmacological application has grown enormously in recent years, due to the wide spectrum of new possibilities that contribute to their use in medicine. In this context, one of the metals in which the development of new drugs has recently begun to focus is the Mo, due to its already proven abilities for the treatment of some diseases, mainly cancer.

In the present work, the ability to interact with DNA and produce cytotoxicity in cancer cells will be tested for an organic compound with a hydrazone group (L1), a Mo(VI) complex coordinated to the previous compound (L1C) and a Mo(0) complex with acetylacetonate and benzimidazole ligands (C2).

The compounds will be synthesized and characterized using the AE, IR, MS, RMN and single crystal DRX techniques. Subsequently, its ability to interact with DNA will be measured quantitatively and qualitatively by UV-Vis electron absorption and fluorescence spectroscopy, its most likely theoretical binding mode will be calculated *in silico* using *molecular docking* techniques, and its cytotoxic potential will be tested *in vitro* in lung cancer cells of line A549 by MTT assays.

Key words: Bioinorganic chemistry, molybdenum complexes, coordination chemistry, DNA interaction, biological chemistry, toxicity, antitumoral metalodrugs.

1. Introducción.

1.1. La química bioinorgánica.

A finales del último siglo nace una nueva rama de investigación que se situará en la tradicional frontera entre la química inorgánica y la biología, denominándose química bioinorgánica. Esta puede definirse como “ciencia que trata del estudio de la reactividad química de los elementos y compuestos inorgánicos en los sistemas biológicos”.¹

Hoy en día se sabe que existen, como mínimo, 26 elementos químicos esenciales para la vida, siendo muchos de ellos tradicionalmente considerados inorgánicos. Por esta razón, el estudio de la bioinorgánica se ha convertido en parte crucial de las investigaciones bioquímicas, junto a la ya tradicional química orgánica.²

Las funciones de los elementos inorgánicos en organismos vivos son extremadamente variadas, pudiendo ser importantes en la estructura de proteínas y otras moléculas, en centros catalíticos de algunas enzimas, como intercambiadores de electrones en procesos RedOx, intercambiadores o fijadores de moléculas de alta importancia biológica como el O₂ o el N₂, o en la regulación y activación de procesos fisiológicos.¹

Tabla 1 - Funciones biológicas de algunos metales.

Elemento	Función Biológica
Sodio	Transporte de cargas, balance osmótico
Potasio	Transporte de cargas, balance osmótico
Magnesio	Estructura, fotosíntesis, hidrolasas, isomerasas
Calcio	Estructura, transporte de cargas, inductor de procesos celulares.
Manganeso	Fotosíntesis, estructura, oxidasas
Hierro	Oxidasas, transporte y almacenamiento de oxígeno, transferencia de electrones
Vanadio	Fijación de nitrógeno, oxidasas
Molibdeno	Fijación de nitrógeno, oxidasas, transferencia de oxígeno

1.2. Metalofármacos en terapia antitumoral.

Las enfermedades del espectro del cáncer constituyen una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos en el año 2012 (últimos datos disponibles, estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN de la OMS) y con estimaciones poblacionales que indican que posiblemente aumente en torno al 70% en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de nuevos casos en el año 2035.³ Esto, sumado a la gran mortalidad que supone, de en torno a 9,6 millones de muertes a nivel mundial en 2018 ⁴ hace que las investigaciones alrededor de su tratamiento sean de vital importancia en la actualidad.

Actualmente el tratamiento del cáncer se aborda desde diversas perspectivas, siendo las principales la cirugía, la radioterapia, la hormonoterapia y la quimioterapia.⁵ Esta última consiste en el tratamiento de la enfermedad mediante la administración de agentes químicos cuyo objetivo final es inducir la muerte celular para controlar o eliminar los tumores.

La actuación de los fármacos suele basarse en la interrupción del correcto funcionamiento del flujo genético de las células mediante la unión de estos al ADN, forzando así la apoptosis de las mismas. Esta interacción ADN-fármaco solo es posible cuando las células se encuentran en división, ya que es el momento en que los ácidos nucleicos se encuentran más accesibles. Teniendo en cuenta que las enfermedades del espectro del cáncer se caracterizan por una rápida y anormal proliferación celular, este mecanismo es idóneo para su tratamiento, y podría llegar a considerarse selectivo para las células malignas.

Recientemente, se ha incrementado notablemente la investigación en busca de nuevos fármacos que consistan en compuestos organometálicos o de coordinación, ya que si bien la mayor parte de los medicamentos comerciales son estructuras orgánicas sin centros metálicos, estos han demostrado una gran utilidad en el tratamiento y diagnóstico de algunas enfermedades. Esto es debido al amplio espectro de números de coordinación y geometrías que presentan, así como a sus propiedades cinéticas y RedOx, ofreciendo posibilidades que no se pueden conseguir con agentes puramente orgánicos.⁶

Una gran parte de los medicamentos utilizados en el tratamiento antitumoral son metalofármacos basados en Pt. Uno de los principales agentes quimioterapéuticos es el cis-diamminodichloruroplatino (II), comúnmente conocido como cisplatino. Este es un

compuesto de coordinación de geometría planocuadrada que fue originalmente descubierto por M. Peyrone en 1844.⁷ Sin embargo, no gozó de importancia en la investigación biomédica hasta las observaciones realizadas B. Rosenberg en la década de 1960, cuando se descubrió que este complejo era capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*.⁷

El cis-platino se administra al paciente por vía intravenosa, y viaja por el plasma sanguíneo hasta el interior de las células. Una vez llega al interior de las mismas, la baja concentración de iones cloruro provoca la sustitución de los ligandos cloro por ligandos aquo, quedando la molécula positivamente cargada y facilitando su acceso al interior del núcleo. Este producto de hidrólisis es un potente electrófilo capaz de interactuar con varios nucleófilos celulares, tales como los grupos tiol de algunas proteínas o los grupos con nitrógenos dadores de los ácidos nucleicos (Figura 1). El cis-platino se une preferentemente a los N-7 de bases púricas (adenina y guanina) del ADN, provocando una deformación en la molécula, y con ella la muerte celular. Otros efectos celulares del cis-platino incluyen la inducción de estrés oxidativo o la modulación de las señales mediadas por Ca^{2+} , entre otras.⁷

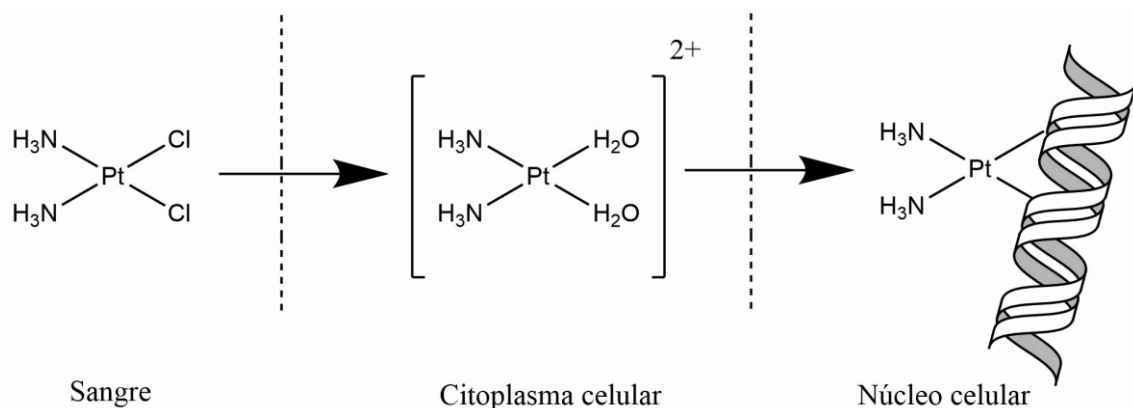


Figura 1 - Mecanismo de acción del cis-platino.

La alta actividad del cisplatinato, y su utilidad en el tratamiento de algunos cánceres, llevó a la investigación y desarrollo de fármacos de nueva generación basados en Pt, como el carbaplatino, nedaplatino y oxaliplatino (Figura 2). Estos medicamentos mejoraron en algunos aspectos el funcionamiento del cisplatinato,⁵ y son también ampliamente utilizados en terapia antineoplásica.

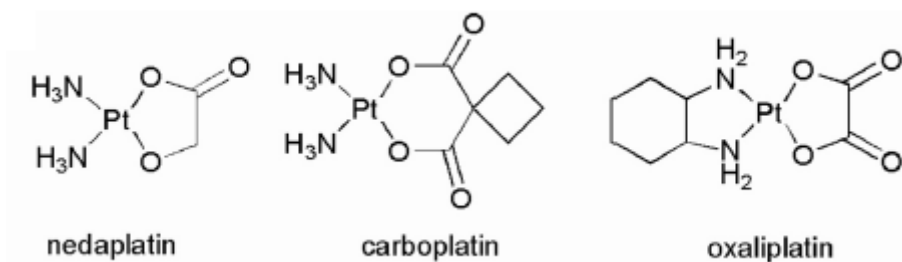


Figura 2 - Diferentes complejos de Pt con actividad antineoplásica.

Sin embargo, el espectro de cánceres que pueden ser tratados con complejos derivados del platino es relativamente pequeño, y su utilización genera efectos secundarios no deseables y fenómenos de resistencia.

Estos problemas han impulsado la investigación de nuevos compuestos citotóxicos basados en otros metales con mecanismos de acción diferentes al del cisplatino. De esta manera, complejos con Fe, Co o Au como átomos centrales ya han demostrado utilidad en estudios preclínicos, y otros centrados en Ti, Ru o Ga ya han sido evaluados en pruebas clínicas.⁶

A pesar del gran número de resultados prometedores que se han obtenido en el estudio de nuevos metalofármacos antineoplásicos en pruebas en laboratorio, tan solo unos pocos compuestos han llegado a ser testados en fase clínica I y II (comprobación de riesgos y eficacia del tratamiento en humanos). Sin embargo, dado el creciente interés en su investigación, es muy probable que en el futuro próximo nuevos complejos metálicos sean testados en pruebas clínicas y en terapia.⁶

1.3. El Molibdeno en sistemas biológicos.

El actual interés que existe alrededor del molibdeno y sus funciones biológicas es debido a la importancia que tiene este metal como elemento esencial, participando como cofactor en un gran número de reacciones enzimáticas de elevada importancia para la vida.⁸

De número atómico 42, el Mo es un elemento de la segunda serie de transición que se encuentra en el grupo 6 de la tabla periódica y que no aparece en la naturaleza en forma de metal puro.⁹ Su configuración electrónica es $[\text{Kr}]4d^55s^1$ y presenta 6 isótopos estables

y más de dos docenas de radioisótopos con periodos de desintegración del orden de segundos. Siete isótopos de masas atómicas 92, 94, 95, 96, 97, 98 y 100 se encuentran en la naturaleza, siendo el ^{98}Mo el más abundante, y representando en torno al 24,14% del total.¹⁰ Se conocen estados de oxidación que varían desde -II hasta +VI, siendo los más importantes en bioquímica el IV, V y VI.¹¹

El Mo es el único metal de la segunda serie de transición requerido para la vida de la mayor parte de los organismos, estando prácticamente distribuido de forma universal entre los seres vivos.¹²

Este hecho se debe a la elevada biodisponibilidad de este metal, ya que a pesar de no ser uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, su concentración en las aguas de mar es notablemente mayor que la de otros metales. (Figura 3)

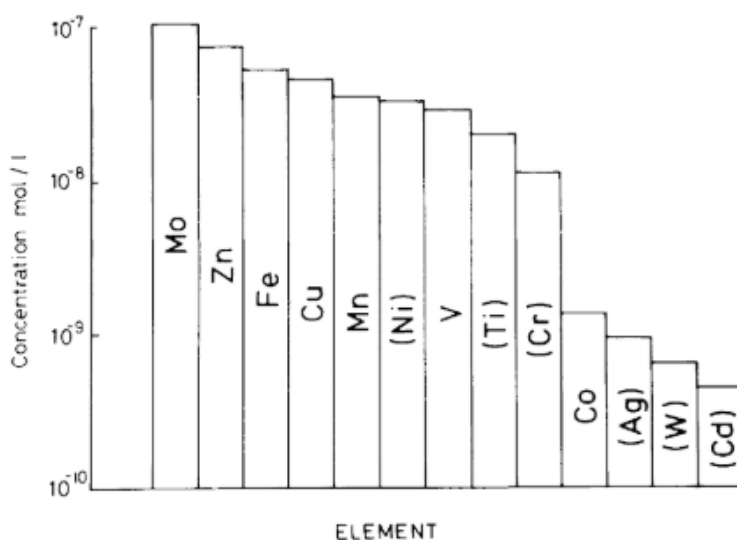


Figura 3- Abundancia de algunos metales en el agua de mar.⁸

Esto es así porque a pH 7 se encuentra en forma de anión molibdato (MoO_4^{2-}) (Figura 4), siendo soluble en agua y fácil de absorber para muchos seres vivos, debido a su similitud estructural con el anión fosfato (PO_4^{2-}).^{11,13}

El principal papel biológico del molibdeno consiste en su presencia como cofactor en diversas enzimas. En la actualidad, se conocen más de 50 enzimas con Mo en sus centros catalíticos, estando la mayoría de ellas correctamente caracterizadas bioquímicamente.¹²

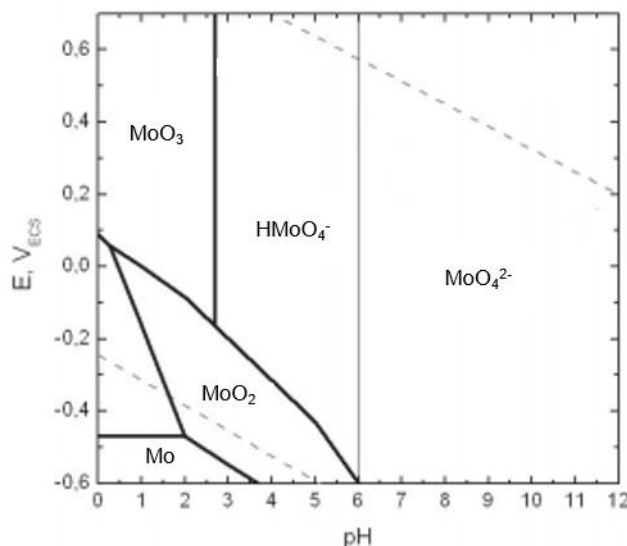


Figura 4 - Diagrama de Pourbaix del molibdeno.¹⁴

La mayoría de las enzimas basadas en Mo son bastante complejas, y prácticamente todas, a excepción de la DMSO reductasa, requieren de la intervención conjunta de diversos cofactores RedOx.

Actualmente se sabe que todas las proteínas que contienen Mo se pueden dividir en dos categorías en función de las características del centro metálico. De esta forma, se distinguen por un lado las enzimas basadas en la apoenzima piranopterina (o molibdopterina), y por otro las nitrogenasas de Mo, basadas en un cofactor que consiste en un cluster de $[\text{MoFe}_7\text{S}_9]$.^{11,14}

Dado que el modelo de cluster Mo/Fe solo se encuentra en las nitrogenasas de organismos procariontas, las principales enzimas humanas que necesitan de la presencia de Mo pertenecerán al grupo de aquellas que dependen de la piranopterina para su correcto funcionamiento. Esta apoenzima es un ligando orgánico que se compleja al metal activo, coordinándose mediante un grupo ditiolato, ubicados en las posiciones *cis* de un doble enlace C=C. La unión de la piranopterina al Mo da lugar al llamado cofactor molibdeno. Además, actualmente se sabe que todas las enzimas basadas en este cofactor pueden clasificarse en tres grandes familias, ejemplificadas por la xantina oxidasa, sulfito oxidasa y DMSO reductasa, diferenciándose entre sí por la estructura del centro activo (Figura 5).^{12,15}

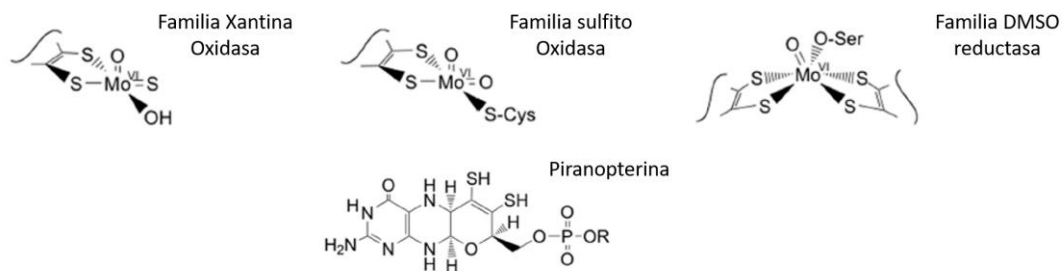


Figura 5 - Estructuras del apoenzima piranopterina y centros catalíticos de las distintas familias de enzimas basadas en Mo.¹²

En la siguiente tabla se muestran algunas enzimas dependientes de Mo, junto con la reacción que catalizan y mencionando, en caso de ser necesarios, los otros cofactores que actúan conjuntamente con ellas (Tabla 2). Tal como se puede observar, el Mo participa fundamentalmente en procesos de intercambio de oxígeno y de fijación de nitrógeno, lo que revela una gran especificidad en sus funciones.

Varios grupos de investigadores han abordado la pregunta de qué características de este metal lo hacen tan adecuado para participar en las reacciones que cataliza.^{16,17} Las razones que explican su elevada especificidad se basa principalmente en tres motivos. Por un lado, está el hecho de que todas estas reacciones consisten en un intercambio de dos electrones, favorecido en el Mo debido a la elevada estabilidad de estados de oxidación que difieren entre sí en dos unidades (III y V, y principalmente IV y VI). Por otro lado, está la tendencia del Mo(IV) a formar complejos octahédricos con ligandos orgánicos en medio acuoso, lo que estabiliza al metal y facilita la formación de centros catalíticos en donde los enlaces de coordinación no tienen por qué estar restringidos únicamente a los formados entre el Mo y la propia proteína, permitiendo la interacción directa entre el metal y el sustrato. Además, muchos de estos procesos consisten en la transferencia de grupos oxo, sencilla debido a que los enlaces Mo-O se forman y rompen con mayor facilidad que en el caso de los de metales de la primera serie de transición.

Tabla 2 - Enzimas de Mo, reacción catalizada y cofactores asociados.

Enzima	Reacción	Cofactor
Sulfito oxidasa	$\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Fe/S, FAD
Xantina oxidasa	Xantina \rightarrow ácido úrico	Fe/S, FAD
Dimetilsulfóxido reductasa	$\text{DMSO} \rightarrow \text{Me}_2\text{S}$	
Nitrato reductasa	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	Citocromo, FAD
Aldehído oxidasa	Aldehídos \rightarrow ácidos	Fe/S, FAD
Nitrogenasa	$\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$	Fe/S, ATP

1.4. Posible papel del molibdeno en terapia.

Las características expuestas en apartados anteriores, sumadas a la baja toxicidad que presenta en humanos ^{18,19} han elevado el interés del Mo en la búsqueda de nuevos metalofármacos con funciones diversas. Sin embargo, los estudios relacionados con este metal en farmacología son todavía novedosos y relativamente recientes.

Los complejos de Mo han demostrado efectividad en el tratamiento de algunas enfermedades parasitarias como la amebiasis,²⁰ como biomiméticos de la insulina en el tratamiento de la diabetes,²¹ o en el tratamiento de algunos cánceres.

La actividad antitumoral de complejos de Mo fue registrada por primera vez en 1979 por Köpf-Maier en sus estudios en ratas con dicloruro de molibdoceno.²² Posteriormente, más estudios con moléculas que contienen Mo han sido llevados a cabo, siendo descrita actividad antineoplásica en muchas de ellas. Algunos de los resultados expuestos incluyen el efecto inhibitorio del molibdato sobre el cáncer de mama ²³, del Mo puro sobre el esofágico,²⁴ o de varios compuestos organometálicos sobre diversos tipos de cánceres tales como la leucemia,²⁵ el renal,²⁶ o el hepático.²⁷ En 2005, se concluyó que una gran cantidad de compuestos de Mo(II) eran muy eficientes como agentes citotóxicos sobre 6 líneas celulares, llegando a ser presentada una patente.¹³

El mecanismo de acción de la mayoría de los complejos antitumorales de Mo está lejos de ser comprendido. Sin embargo, dado que el crecimiento celular es frenado por la

presencia de estos compuestos, parece lógico asumir que su actividad inhibitoria debe estar relacionada de alguna manera con daño sobre el ADN. Este puede producirse por varios motivos, ya sea por la unión directa del fármaco a la molécula de ADN (mediante intercalación entre las bases nitrogenadas, mediante interacción electrostática con los surcos de la doble hélice o mediante formación de enlaces covalentes o de coordinación con ciertos átomos del ácido nucleico), o por la reacción oxidativa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por los agentes químicos.²⁸

1.5. Información sobre los compuestos analizados.

En el presente trabajo, se realizará la síntesis, caracterización y estudio de citotoxicidad e interacción con el ADN de dos complejos de Mo con posible actividad antitumoral, y de un ligando orgánico utilizado en la síntesis de uno de ellos. A continuación, se presentan sus estructuras, así como los motivos que llevaron a su estudio.

1.5.1. Ligando hidrazona. L1.

Uno de los objetos de estudio de este trabajo es el de la caracterización de la función biológica de los ligandos hidrazona complejados al Mo, dado que ya se han encontrado resultados concluyentes de su utilidad citotóxica cuando aparecen en compuestos con otros metales como Cu, Pt o V.²⁹⁻³³

Para ello, y dado que los ligandos hidrazona han demostrado tener diversas utilidades farmacológicas actuando por sí solos,³⁴ se realizarán también experimentos para el compuesto orgánico sin complejar, buscando poder comparar los resultados obtenidos antes y después de añadir el metal.

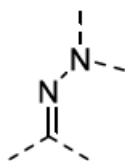


Figura 6 - Grupo funcional hidrazona.

El grupo funcional hidrazona consiste en un doble enlace C=N, que a su vez se une a otro átomo de N (Figura 6). Este segundo átomo de N puede llevar unidos diferentes sustituyentes que le otorgarán distintas propiedades.³⁴

Se cree que la principal característica que otorga actividad citotóxica a los ligandos hidrazona utilizados en este experimento es la coplanaridad de su estructura, provocada por la deslocalización de carga de los grupos aromáticos por todo el sistema conjugado. Esta coplanaridad podría permitir a los compuestos intercalar entre los pares de bases del ADN, interrumpiendo la actividad celular.³⁵ Además, la presencia de electrones π deslocalizados podría facilitar interacciones mediante apilamiento π (π - π stacking) entre los grupos aromáticos del compuesto y de la molécula de ADN, fortaleciendo su interacción.³⁶

En concreto, la hidrazona L1 presenta un Cl en su estructura (figura 7). Estos heteroátomos son añadidos buscando modificar algunas propiedades del compuesto, tales como la citotoxicidad o la solubilidad.

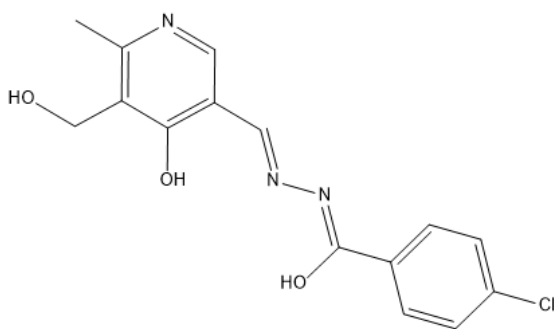


Figura 7 - Estructura del compuesto L1.

Por otra parte, esta molécula ha demostrado ser capaz de emitir fluorescencia cuando es irradiada con una longitud de onda de 400 nanómetros, lo que no es una propiedad común a todas las hidrazonas y puede aportar datos interesantes, como su mecanismo de acción en el interior de la célula o su forma de unión al ADN.

1.5.2. Complejo de Mo(VI) con ligando hidrazona. L1C.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, uno de los intereses de este proyecto es la comparación del potencial citotóxico y de los datos de interacción el ADN entre el ligando libre y complejado con Mo. Este tipo de compuestos de coordinación Mo-hidrazona ya han sido descritos en la bibliografía, pero no existen muchos datos sobre

sus características en química biológica, habiendo sido principalmente utilizados en catálisis.³⁷

Dado que parece claro que el Mo desarrolla la mayor parte de su actividad biológica en su estado de oxidación VI, se ha buscado que el metal mantenga este mismo estado en el complejo de estudio.

La química de coordinación del Mo(VI) se compone prácticamente en su totalidad de oxo complejos de geometría octahédrica conteniendo la unidad MoO_2^{2+} , con los oxígenos terminales ocupando posiciones cis.^{8,16,37} Esta información fue utilizada a la hora de prever la isomería de la molécula.

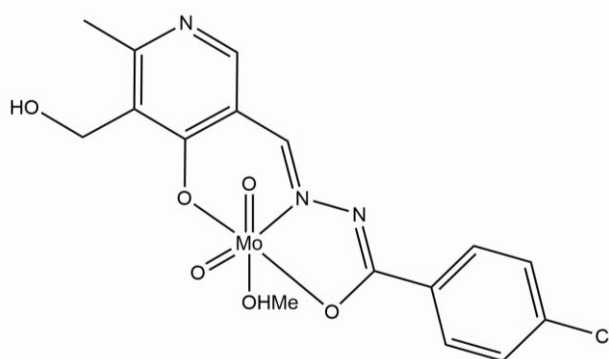


Figura 8 - Estructura del compuesto L1C.

Como se puede observar (Figura 8), el compuesto L1 actúa uniéndose al Mo como un ligando tridentado a través de dos O y un N. Se espera que este modo de coordinación aporte una elevada estabilidad al complejo por efecto quelato, evitando así posibles equilibrios de especiación del Mo y permitiendo un alto control sobre qué especies químicas serán introducidas en la célula. La esfera de coordinación se completa con la presencia de un ligando MeOH.

1.5.3. Complejo de Mo(0). C2.

Otro de los objetivos de estudio de este proyecto será el análisis de la citotoxicidad e interacción con el ADN del complejo de Mo(0) C2. Este complejo fue sintetizado por el grupo de investigación del Dr. Mannar R. Maurya del departamento de química de la Universidad de Roorkee, en la India, y enviado a la Universidad de La Coruña para su estudio cristalográfico.

Las características, síntesis y reactividad de este compuesto ya han sido publicadas en 2013,³⁸ pero todavía no existen datos de su posible función biológica.

Dada su relativa coplanaridad y la posibilidad de que sea capaz de interactuar mediante apilamiento π debido a la presencia de los ligandos benzimidazol y acetilacetionato (Figura 9), es probable que este compuesto sea capaz de interactuar intercalando con el ADN, lo que hace muy interesante la ampliación de su estudio con datos de su actividad biológica en sistemas donde esta molécula está presente.

La esfera de coordinación del compuesto se completa con la presencia de dos ligandos nitrosilo.

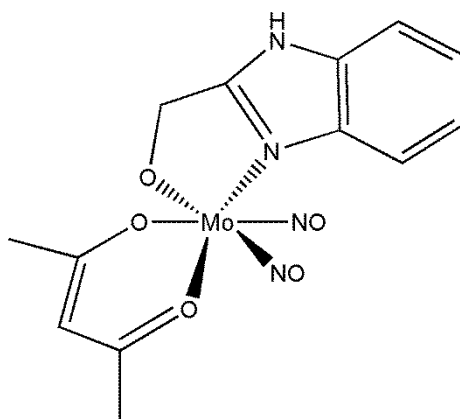


Figura 9 - Estructura del compuesto C2.

1.6. Objetivos.

- Síntesis de los compuestos L1 y L1C.
- Caracterización mediante diferentes técnicas experimentales de L1, L1C y C2.
- Estudio de la interacción de los compuestos con el ADN mediante espectroscopia de absorción electrónica.
- Estudio de la interacción del ligando con el ADN mediante espectrofluorimetría.
- Estudio *in silico* de la interacción de los compuestos con el ADN mediante técnicas de *molecular docking*.
- Estudio *in vitro* del potencial citotóxico de los tres compuestos mediante ensayos de MTT en líneas celulares humanas de cáncer pulmón.

2. Material y métodos.

2.1. Síntesis.

2.1.1. L1.

La síntesis del compuesto L1 consiste en hacer reaccionar 4-clorobenzohidracida (Sigma Aldrich; 98%) e hidroclicuro de piridoxal (Sigma Aldrich; >99%). Cantidades equivalentes de estos compuestos fueron disueltas en metanol (Panreac; ≥99.9%) y calentadas a reflujo durante 3 horas con agitación. El ligando se forma inmediatamente como un polvo blanco/amarillo. El resultado se filtra a vacío, se lava con pequeñas porciones de metanol y dietiléter y se guarda en un desecador durante una semana para eliminar restos de humedad.

Esta síntesis consiste en la condensación de una hidracida y un aldehído (Figura 10).

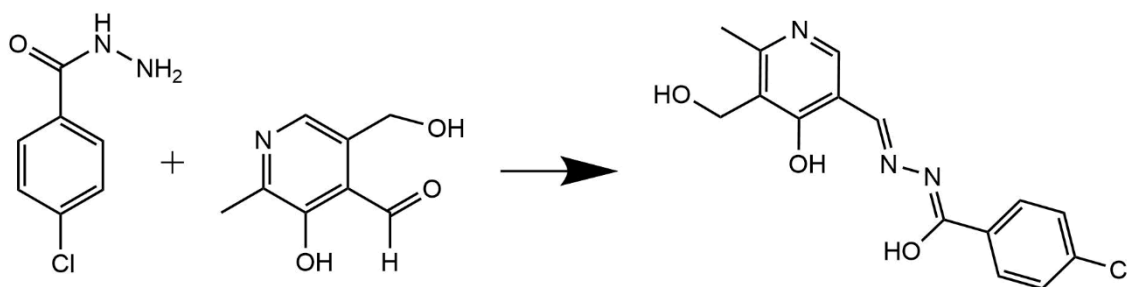


Figura 10 - Síntesis del compuesto L1.

2.1.2. L1C.

Para la síntesis del complejo L1C, se disuelven cantidades equivalentes del ligando L1 y bis(acetilacetonato)dioxidomolibdeno(VI) (Sigma Aldrich) en metanol, y se mezclan en un montaje de reflujo durante 3 horas con calentamiento y agitación, y otras 3 horas solo con agitación. La disolución resultante se guarda en un desecador sin contacto directo con el aire hasta su precipitación (Figura 11). Este paso se hace en el desecador para evitar la formación de polioxomolibdatos. Una vez precipitado, se filtra a vacío, se lava con pequeñas porciones de metanol y dietil éter y se deja secar durante una semana en desecador. Además, las aguas madre se conservan en un cristalizador, con el objetivo de que se produzca la cristalización de más producto. El compuesto precipita en forma de pequeños cristales amarillos, que se envían para su medida en difracción de RX.

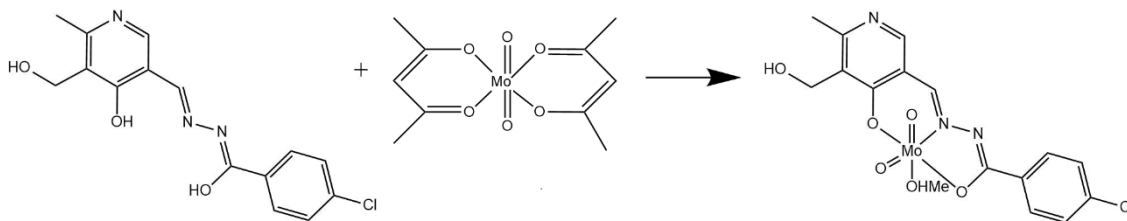


Figura 11 - Síntesis de L1C.

2.2. Caracterización.

2.2.1. Análisis elemental.

Se determinan los porcentajes de N, O, C y H mediante la combustión en un analizador elemental FlashEA 1112 (ThermoFinnigan).

2.2.2. Espectrometría de masas.

Se utiliza un espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para obtener los espectros (positivos y negativos) mediante ionización con electrospray (ESI) acoplado a HPLC Agilent 1200, utilizando metanol como disolvente.

También se utiliza un espectrómetro de masas de sector magnético Thermo MAT95XP equipado con cromatógrafo de gases Thermo TRACEGC, con ionización mediante FAB en tioglicerol.

2.2.3. Espectroscopia infrarroja.

Para los espectros de IR se utiliza un espectrómetro Ft-IR Nicolet iS 10 de Thermo Scientific.

2.2.4. Espectroscopia RMN ¹H.

Para los espectros de RMN se utiliza el espectrómetro de resonancia Magnética Nuclear Bruker AVANCE 500 y Bruker AVANCE 300. El disolvente utilizado fue DMSO deuterado (Merck, 99,96%).

2.2.5. Difracción de rayos X.

Para las estructuras cristalinas tridimensionales se utiliza un difractor X8 APEX KAPPA BRUKER-NONIUS de difracción de rayos X de monocristal, con tubo de Mo.

Los datos son recogidos a baja temperatura mediante el método de escaneo $\phi-\omega$. Las reflexiones fueron medidas de un hemisferio de planos y coleccionando los datos por marcos, cada uno de $0,3^\circ$ en ω . Todas las reflexiones medidas fueron corregidas para los efectos Lorentz y de polarización, y por absorción basado en el método *multi-scans* de reflexiones simétricamente equivalentes y repetitivas. La resolución y el refinado de la estructura se lleva a cabo con el programa SHELXTL.^{39,40}

2.3. Espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis.

Para estudiar la interacción de las moléculas de interés con el ADN, se lleva a cabo un estudio mediante espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis.

Previamente a la realización de las medidas, se prepara una disolución tampón en agua ultrapura a pH = 7,4 con sal sódica de HEPES (Sigma Aldrich; >95%) 10 mM para mantener la estabilidad del ADN. A continuación, se disuelve cada uno de los compuestos en DMSO con una concentración de 500 μM . A partir de estas disoluciones, se preparan una de concentración 25 μM y una de 50 μM en HEPES, teniendo en cuenta que el volumen de DMSO no debe superar el 2% del total para no comprometer la viabilidad del ADN.

Por último, se prepara una disolución de sal sódica de ADN de timo de becerro (CT DNA) (Sigma Aldrich) en HEPES de aproximadamente 1 mg/mL y se deja toda la noche en el frigorífico para su correcta disolución. La absorbancia de esta disolución se mide a 260 nm, y utilizando el dato del coeficiente de absortividad molar de $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁴¹ se obtiene una concentración exacta, que será la que se tenga en cuenta para realizar las medidas. También se mide la absorbancia a 280 nm para conocer la pureza de la disolución, ya que un cociente A_{260} / A_{280} de entre 1,8 / 1,9 informa de la presencia de un ADN suficientemente libre de proteínas.⁴²

El experimento se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Jasco V650 manteniendo constante la concentración del compuesto a medir (25 μM) y añadiendo concentraciones crecientes de ADN, de tal modo que la relación [compuesto] / [ADN] fuese de 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 y 10 (0; 12,5; 50; 100; 150; 200 y 250 μM de ADN respectivamente) sobre la propia cubeta de medida. La misma cantidad de disolución de compuesto 50 μM que de ADN debe ser añadida en cada paso para mantener la concentración de fármaco constante. Con la intención de eliminar el impacto de los cambios de absorbancia debidos al ADN libre, el blanco se realiza siguiendo el mismo

procedimiento de adiciones, pero añadiendo disolvente en lugar de compuesto.⁴³ La absorción fue registrada en el intervalo de 200 a 500 nm.

Adicionalmente, para medir la estabilidad del receptor-sustrato (ADN-compuesto), se guarda la disolución más concentrada y se vuelve a medir al día siguiente, tras pasar toda la noche en incubación en una estufa de 37 °C.

El fundamento de la técnica se encuentra en la presencia en el ADN de una banda de absorción en la zona de entre 200 y 350 nm, con un máximo en 260nm. Esta banda es consecuencia de la presencia de grupos cromóforos en las bases nitrogenadas del ácido nucleico. Como resultado de la unión de una molécula al ADN, la situación de las bases puede verse modificada, variando con ella la intensidad y la posición de los máximos del espectro de absorción.⁴²

Los compuestos que se unen al ADN mediante enlace no covalente suelen provocar una disminución de la intensidad de absorción (efecto hipocrómico) y un desplazamiento de la posición de los máximos hacia la zona del rojo (efecto batocrómico), como resultado de la interacción por apilamiento π entre el fármaco y las bases nitrogenadas. La intensidad del hipocromismo es habitualmente consistente con la fuerza de la interacción de apilamiento,⁴⁴ que a su vez depende de la distancia entre el compuesto y las bases nitrogenadas del ADN, disminuyendo con el cubo de la distancia entre estos. La reducción de la distancia provoca la combinación de los electrones π^* del compuesto con los π^* de las bases del ácido nucleico. Esta combinación da lugar a la disminución de la energía de estos orbitales, reduciéndose con ella la energía necesaria para provocar la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del compuesto. Debido a esto, la población del orbital π^* aumenta, reduciéndose la probabilidad de la transición. Como resultado, se producen los efectos batocrómico e hipocrómico respectivamente.⁴⁵ También es posible la aparición de un espectro sin efecto batocrómico y reducido efecto hipocrómico en caso de que la interacción ocurra mediante la unión del fármaco a alguno de los surcos del ADN.⁴⁶

En el caso de una interacción consistente en la formación de enlaces covalentes o coordinados entre el fármaco y la molécula de ADN, se producirá una desnaturalización de la doble hélice. Cuando esto ocurre, las fuerzas que mantienen unidas las cadenas de ADN (principalmente enlaces de H) disminuyen, reduciéndose con ellas el efecto que tienen como limitadores de la resonancia del anillo aromático de las bases nitrogenadas, y con ello de la intensidad de absorción. Esto produce un efecto hiperocrómico.⁴²

Con la intención de evaluar cuantitativamente la interacción del compuesto con el ADN, los datos registrados para cada concentración a la longitud de onda de máxima absorbancia del ADN (260 nm) se ajustan a una línea recta mediante la ecuación de Wolfe-Shimmer (1).⁴⁷

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (1)$$

Dónde [DNA] es la concentración del ADN en molaridad, ϵ_a , ϵ_f y ϵ_b se corresponden con los coeficientes de extinción molar aparentes ($A_{\text{obs}} / [\text{Compuesto}]$) del compuesto libre, unido (para cada concentración) y completamente unido. La constante de interacción K_b se obtiene como resultado de la división de la pendiente entre la ordenada en el origen de la recta resultante de la representación de $[ADN] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ frente $[ADN]$.⁴³

Por otro lado, la variación en la energía libre de Gibbs estándar (ΔG) para la interacción es calculada mediante el uso de la ecuación de Van't Hoff (2).⁴⁸

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (2)$$

Donde R es la constante de los gases ideales (8,31 J/(K·mol)), y T es la temperatura en grados kelvin (considerada 298 K).

2.4. Espectroscopia de fluorescencia.

Una técnica ampliamente utilizada para conocer el modo de unión de un compuesto al ADN es la espectroscopia de fluorescencia. Existen diversas metodologías para estudiar la interacción mediante esta técnica, dependiendo del tipo de compuesto que se vaya a medir, y de si este es capaz de emitir fluorescencia o no.⁴⁹

Para este estudio, aprovecharemos la ya mencionada capacidad del compuesto L1 para emitir fluorescencia, y realizaremos con él medidas siguiendo la misma metodología utilizada en espectroscopia de absorción.

Se preparan 2 disoluciones de compuesto, de 25 μM y 50 μM , y una disolución de ADN cuya concentración exacta se conoce gracias a su absorbancia a 260 nm. Todas estas mezclas se disuelven en HEPES.

Las medidas se realizan en un espectrofluorímetro Horiba Scientific Fluoromax Plus.

En primer lugar, se introducen 2 mL de la disolución de muestra 25 μM en una cubeta de fluorescencia, y se realiza un espectro de emisión seleccionando como longitud de onda de excitación la del alguno de los máximos de absorción obtenidos en espectroscopia UV-Vis. Se recoge la emisión de fluorescencia a un amplio abanico de longitudes de onda y se selecciona aquella en que la intensidad es máxima.

A continuación se realiza un espectro de excitación. Se lleva a cabo un barrido a varias longitudes de onda de excitación fijando la longitud de onda en que se recoge la emisión a la del máximo detectado en el paso anterior. De esta forma se logra localizar que longitud de onda de excitación genera una mayor señal de fluorescencia en el máximo de emisión.

A partir de aquí, comienzan a realizarse espectros de emisión fijando como longitud de onda de excitación la obtenida en el paso anterior, y se recoge la emisión en un rango de longitudes de onda que incluya la de interés.

Las medidas se realizan manteniendo constante la concentración del compuesto (25 μM) y añadiendo sobre la propia cubeta volúmenes crecientes de ADN, de tal modo que la concentración de éste sea 0 μM , 12,5 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM y 230 μM . La misma cantidad de disolución de compuesto 50 μM que de ADN debe ser añadida en cada paso para mantener la concentración de fármaco constante.

El fundamento de la técnica consiste en que la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia será ascendente o descendente según el modo de unión compuesto/ADN.

Para una especie química con fluorescencia propia como es el caso de L1, esta variación puede ser medida de forma directa.

En el caso de aquellas moléculas que interaccionan mediante intercalación, se espera un aumento de la intensidad de emisión a medida que la concentración de ADN en el medio aumenta. Esto se debe a que la rotación de las moléculas libres favorece la relajación de los estados excitados mediante mecanismos no radiantes, mientras que en aquellas que se encuentran unidas al ADN, la relajación con emisión de fluorescencia se ve favorecida.⁴²

Para aquellas moléculas que interaccionan con los surcos de la doble hélice, la presencia de interacciones electrostáticas, por enlaces de H o hidrofóbicas puede causar una disminución en la intensidad de fluorescencia.⁴²

2.5. **Molecular docking.**

Con el objetivo de conocer teóricamente la forma de interacción más probable para cada compuesto con el ADN y complementar la información obtenida mediante espectroscopia, se llevan a cabo estudios *in silico* mediante *molecular docking*.

Los ensayos se realizan desde la interfaz de usuario Autodock Tools,⁵⁰ utilizando los programas Autodock vina⁵¹ para el ligando y Autodock 4.2⁵² para los complejos. Esto se hace de este modo porque el segundo incluye un *Force Field* más extenso (parámetro que define los tamaños y cargas considerados para cada átomo), necesario para realizar *Docking* con metales

Como macromoléculas de ADN, se utiliza una estructura de rayos X de una doble hélice de ADN estándar (PDB ID: 1BNA),⁴⁶ y una estructura de una hélice con un fármaco intercalado (PDB ID: 2N4M), que es eliminado en Autodock Tools para dejar un espacio libre entre las bases que permita el análisis de una posible pose (nombre utilizado para la combinación entre localización de la molécula y conformación adoptada por la misma) intercalada.⁵³ Los archivos PDB del ligando y el complejo C2 fueron obtenidos mediante difracción de rayos X de monocristal, mientras que el de L1C fue generado utilizando Chem3D, al no estar el difractómetro disponible durante el periodo de medida.

Los cálculos se realizan con cada complejo para cada una de las dos estructuras cristalinas de ADN, obteniendo para cada prueba un valor estimado de energía libre de Gibbs producida en la interacción. Aquellas poses con energías de interacción más negativas son consideradas como más probables.

Las estructuras en 3D son presentadas mediante el software UCSF Chimera,⁵⁴ que también es usado para el cálculo de las distancias interatómicas. Las estructuras en 2D se realizan con el software Maestro, de Schrödinger.⁵⁵

2.6. Estudio de citotoxicidad por MTT.

Con la intención de conocer el potencial citotóxico de los compuestos en células cancerígenas, se realiza un ensayo de viabilidad *in vitro* siguiendo la metodología MTT⁵⁶ en un cultivo de la línea celular humana A549, de cáncer de pulmón. Esta prueba consiste en un test colorimétrico que evalúa la viabilidad de las células que han sido sometidas a tratamiento en base a su capacidad para metabolizar la sal de MTT.

El MTT es un compuesto de la familia de las sales de tetrazolio. Este tipo de sales son útiles como indicadores de actividad biológica, ya que son metabolizadas por varias enzimas deshidrogenasas presentes en células vivas.⁵⁶ En la mayoría de los casos, cuando estas sales de tetrazolio son reducidas por la actividad enzimática celular, se transforman en productos intensamente coloreados e insolubles en agua, denominados formazán. (Figura 12)⁵⁷ La presencia en el medio de este producto será el que se utilice para evaluar el grado de viabilidad de las células sometidas al tratamiento, mediante una medida en un espectrofotómetro UV-Vis.

Antes de poder realizar el ensayo toxicológico, es necesario conseguir y mantener un cultivo celular durante el tiempo necesario para que alcancen su máxima actividad metabólica tras su descongelación. La línea celular seleccionada para este trabajo es A549, correspondiente a células humanas de cáncer de pulmón. Esta línea fue comprada a la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).

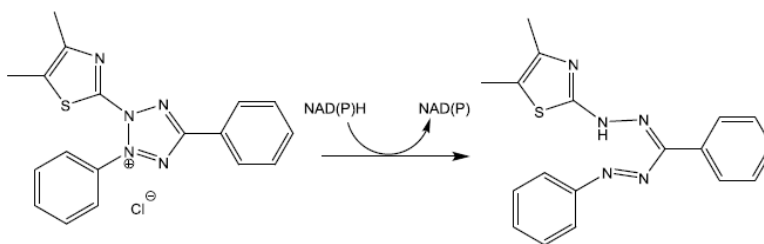


Figura 12 - Proceso de transformación de MTT de formazán.

Las células se hacen crecer adheridas a la superficie de frascos (Flasks) (Figura 13). El medio de cultivo se basa en el medio general DMEM (Lonza), uno de los más ampliamente utilizados para células con crecimiento adherente, modificado con la adición de 10% de FBS(Invitrogen), 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y un 1% de mezcla de penicilina y estreptomycin (Gibco).



Figura 13 - Flasks para cultivo celular.

Todos los tratamientos deben hacerse en una cámara de flujo laminar previamente tratada con radiación UV, y utilizando material estéril para mantener libre de contaminación el medio de crecimiento. Además, todas las soluciones utilizadas deben ser previamente atemperadas a 37 °C. Las células se mantienen en una cámara de atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C para asegurar su correcto desarrollo.

Para el ensayo, se tratan las células con 7 disoluciones a diferentes concentraciones (500 µM; 250 µM; 100 µM; 25 µM; 5 µM; 1 µM y 0,1 µM) de cada uno de los tres compuestos. Como disolvente se utiliza DMSO, por ser capaz de disolver los compuestos mejor que el agua.



Figura 14 - Imagen a microscopio óptico con aumento 10X de células sanas de la línea A549

La prueba se realiza en placas de 96 pocillos en donde se cultivan 10000 células por pocillo, que fueron tratadas con las diferentes disoluciones de los compuestos a analizar, de forma que los tratamientos constituyesen el 1% del volumen final del cultivo. Como control negativo se empleó DMSO, y como control positivo Tritón X-100, ambos representando también el 1% del volumen final. Las células se incuban en estufa durante 48h a 37°C y 5% de CO₂. Se realizan un mínimo de tres réplicas independientes del tratamiento, partiendo en cada una de un flask de cultivo distinto. En cada una de ellas se incluirán 3 réplicas experimentales para cada compuesto medido.

Para el ensayo MTT, se retira el medio y se añaden 100 µL de disolución de MTT 5 µg/mL. A continuación se incuba la placa durante 4 horas en oscuridad para evitar la fotodegradación del MTT. En este periodo de tiempo es donde se produce la reducción de la sal de MTT a formazán, que se acumula en el fondo de los pocillos en forma de cristales de color violeta.

Una vez pasadas las 4 horas, se elimina el medio y se resuspende el formazán en 200 µL de DMSO. Se deja incubar 10 minutos para facilitar la correcta disolución de los cristales.

Finalmente se realiza la medida de las absorbancias a 570 nm en un espectrofotómetro para microplacas SPECTROSTAR Nano (BMG Labtech). Valores más altos de absorbancia indican mayores grados de viabilidad celular. Los datos son recogidos en formato Excell y guardados para su posterior análisis estadístico.

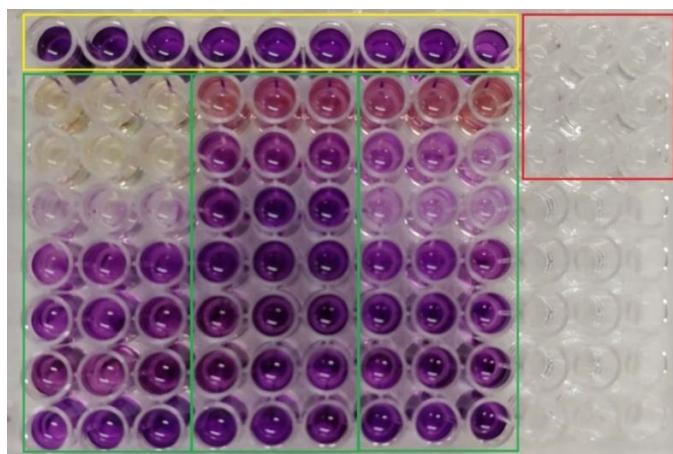


Figura 15 - Placa tras el ensayo de MTT. Enmarcados en amarillo los controles negativos, en rojo controles positivos, y en verde pocillos donde fue aplicado el tratamiento con los compuestos de interés.

El análisis se realiza con el paquete estadístico SPSS de IBM. Como ya se ha comentado, se realizan un mínimo de 3 experimentos independientes, siendo cada uno de ellos realizado por triplicado. Los datos experimentales son presentados como la media de los porcentajes de viabilidad \pm el error estándar. La viabilidad es calculada según la ecuación (3).

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(\text{Abs muestra})}{(\text{Abs control negativo})} \times 100.$$

(3)

Para comprobar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos, se utilizan los test paramétricos de ANOVA y Bonferroni. El primero se utiliza para determinar si existen una o más medias que difieran significativamente entre sí, mientras que el segundo compara la media de cada concentración con la del valor del control negativo. Se considera significación en aquellos puntos que presenten un p valor menor de 0,05. La existencia de relación dosis / respuesta se comprueba mediante un test de correlación de Pearson. De nuevo, se considera significativo un p valor menor de 0,05.⁵⁸

3. Resultados y discusión.

3.1. Síntesis y caracterización.

La caracterización de los compuestos se realizó mediante análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia IR, espectroscopia RMN y difracción de RX.

Los espectros y los datos obtenidos mediante difracción de rayos X de monocristal se muestran en la sección de anexo. En este apartado se discuten los resultados de los espectros (ver anexos) de cada compuesto.

3.1.1. L1.

Los datos obtenidos mediante las distintas técnicas de caracterización confirman que el sólido obtenido se corresponde con el compuesto esperado. El rendimiento de la síntesis resulta ser del 72%. A continuación se muestran los resultados de cada técnica.

Tabla 3 - Análisis elemental del compuesto L1.

L1	C	H	N
Experimental	49,90%	3,86%	11,01%
Calculado L1·HCl·0,5MeOH	50,02%	4,60%	11,29%

MS-ESI- (MeOH): Pico a m/z (I%) 318,06(100) correspondiente al ion pseudomolecular $[C_{15}H_{13}ClN_3O_3]^-$.

MS-ESI+ (MeOH): Pico a m/z (I%) 320,06(100) correspondiente al ion pseudomolecular $[C_{15}H_{15}ClN_3O_3]^+$.

RMN: 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,26 (s, 1H); 13,13 (s, 1H); 9,09 (s, 1H); 8,23 (d, 1H); 8,08 (d, 1H); 4,78 (s, 1H); 3,17 (s, 2H); 2,64 (s, 3H).

IR: $\nu = 3288,54$ (N-H); $\nu = 2022,05$ (O-H); $\nu = 1689,77$ (C=O carbonilo); $\nu = 1048,19$ (N-N).⁵⁹

RX:

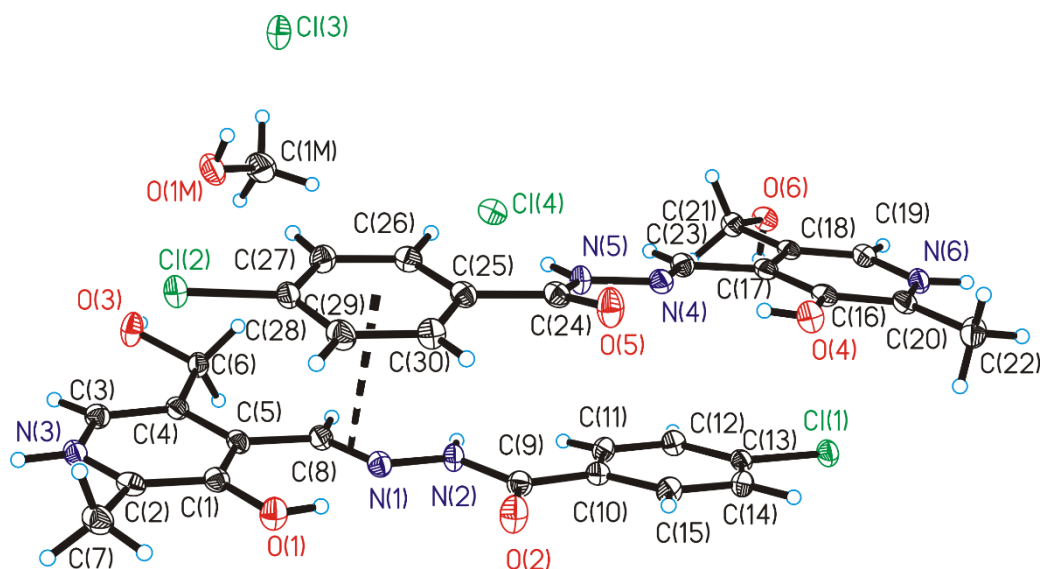


Figura 16 – Imagen de la unidad asimétrica del compuesto L1 obtenido mediante el programa SHELXTL.⁴⁰ Los elipsoides se representan al 50% de probabilidad

Las moléculas de L1 presentan torsiones alrededor del eje coplanar de la propia estructura. Estas torsiones pueden ser hacia ambos lados, generando moléculas orientadas de dos formas posibles que aparecen en la unidad asimétrica. Este tipo de isomería se llama atropisomería.

Las interacciones que mantienen unido el empaquetamiento son apilamientos π entre los anillos aromáticos de una molécula y el doble enlace C=N de la contigua (línea negra discontinua en la figura). Estas distancias son de 3,77 Å, coincidente con las aportadas por la bibliografía para este tipo de compuestos.^{60,61}

Se observa la presencia de aniones Cl⁻ como contraiones, los átomos de N de los grupos aromáticos protonados y moléculas de metanol.

3.1.2. L1C.

Los datos obtenidos mediante las distintas técnicas de caracterización confirman que los cristales obtenidos se corresponden con el compuesto esperado. El rendimiento de la síntesis resulta ser del 23%. Para este compuesto no se obtienen resultados de difracción de rayos X. A continuación se muestran los resultados de cada técnica.

Tabla 4 - Análisis elemental del compuesto L1C.

L1C	C	H	N
Experimental	37,37%	2,94%	7,97%
Calculado L1C·HCl	37,30%	3,52%	8,16%

MS-ESI- (MeOH): Picos a m/z (I%) 318,06(100) y 445,94(80) correspondiente a los iones pseudomoleculares $[C_{15}H_{13}ClN_3O_3]^-$ y $[C_{15}H_{13}ClMoN_3O_5]^-$.

MS-ESI+ (MeOH): Picos a m/z (I%) 320,06(100) y 447,96(94) correspondiente a los iones pseudomoleculares $[C_{15}H_{15}ClN_3O_3]^+$ y $[C_{15}H_{15}ClMoN_3O_5]^+$

MS-FAB (Tioglicerol): Picos a m/z (I%) 320,07(100) y 447,96(94) correspondiente al ion pseudomolecular $[C_{15}H_{15}ClN_3O_3]^+$.

RMN: 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,14 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 4,80 (s, 1H), 3,18 (s, 3H), 2,45 (s, 2H).

IR: ν = 2158,63 (O-H); ν = 1602,78 (C=N); ν = 1214,74 (C=O enol); ν = 1087,74 (N-N); ν = 924,19 (Mo=O).^{37,38}

3.1.3. C2.

Los datos obtenidos mediante las distintas técnicas de caracterización confirmaron que el compuesto recibido se corresponde con el esperado. Para este compuesto, no se obtienen resultados de análisis elemental. A continuación se muestran los resultados de cada técnica.

MS-ESI- (MeOH): Picos a m/z (I%) 403(35) y 445,94(38) correspondiente a los iones pseudomoleculares $[C_{13}H_{13}MoN_4O_5]^-$ y $([C_{13}H_{13}MoN_4O_5]^- + 2H_2O + MeOH)$.

MS-ESI+ (MeOH): Pico a m/z (I%) 413,27(21) correspondiente al ion pseudomolecular $[C_{13}H_{15}MoN_4O_5]^+$

RMN: 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (s,1H) 7,4 (s, 1H) 5,84 (s, 1H), 2,18 (s, 1H), 1,94 (s, 1H).

IR: ν = 3002,83 (N-H); ν =2296,28 (O-H); ν =1761,08 (Mo=NO $_2$); ν = 1634,69 (C=N); ν = 1514,99 (C=C); ν = 1276,66 (C=O enol); ν = 1015,90 (N-N).³⁸

RX:

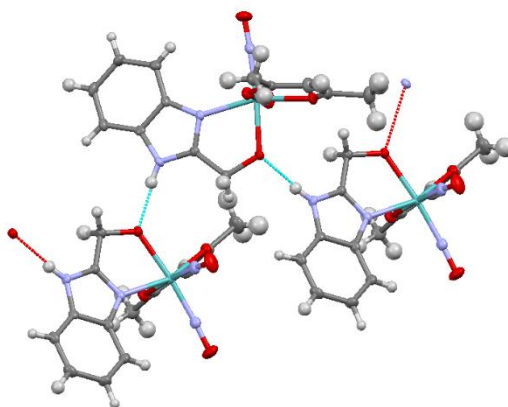


Figura 17 – Parte del empaquetamiento cristalino del compuesto C2 representado con el programa Mercury 3.7.

Los complejos de C2 se mantienen unidas mediante enlaces de H entre los átomos de O del grupo benzimidazol que se encuentran coordinados al Mo y los protones de los grupos imidazol de moléculas contiguas en el empaquetamiento cristalino.

3.2. Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis

Como se detalla en el apartado de material y métodos, los espectros de absorción de los compuestos son recogidos en presencia de cantidades crecientes de ADN, y los resultados son ajustados a una línea recta siguiendo la ecuación de Wolfe-Shimmer (1), con el objetivo de calcular la constante de interacción K_b y el valor de la ΔG liberada en el proceso. Además, se comprueba la estabilidad del complejo fármaco-ADN mediante el registro del espectro tras una noche de incubación a 37 °C.

A continuación se presentan los datos para cada compuesto.

3.2.1. L1.

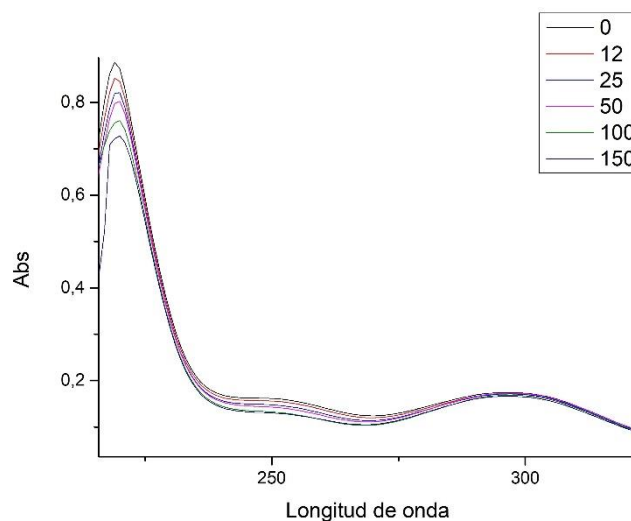


Figura 18 - Espectro de absorción del compuesto L1 en presencia de concentraciones de ADN entre 0 μM y 150 μM.

El espectro de absorción del complejo L1 (Figura 18) presenta dos máximos de absorción situados a 219 y 297 nm y un hombro a 251 nm. Las concentraciones de 200 μM y 250 μM no están representadas, por ser consideradas anómalas.

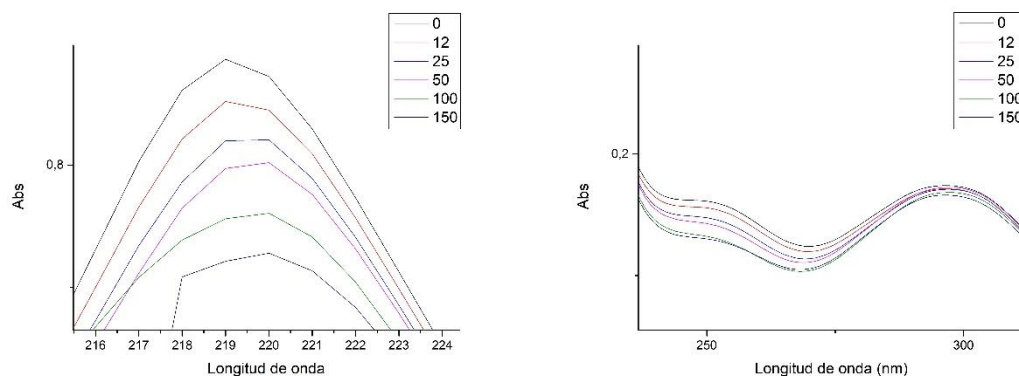


Figura 19 – Espectro de absorción del compuesto L1 y del complejo ADN / L1 en las zonas donde hay máximos.

En la zona del máximo de 219 se observa una disminución de la absorbancia a medida que aumenta la concentración de ADN en la cubeta (Efecto hipocrómico), así como un ligero desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda más altas (Efecto batocrómico). El hipocromismo también es notable en el hombro de 251 nm, pero se encuentra ausente en el máximo de 297 nm (Figura 19).

El perfil descrito es indicativo de una interacción ADN / fármaco mediante intercalación. Sin embargo, la presencia de un efecto batocrómico tan sutil puede generar dudas sobre la posible interacción mediante unión a los surcos del ADN. Esta posibilidad se comprobará aprovechando la capacidad del compuesto L1 de emitir fluorescencia, mediante un estudio espectrofluorimétrico.⁴²

Los datos recogidos a la longitud de onda de máxima absorbancia del ADN (260 nm) son utilizados para la representación gráfica de $[ADN] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ frente a $[ADN]$ siguiendo la ecuación de Wolfe-Shimmer (1) (Figura 20).

La división de la pendiente entre la ordenada en el origen da como resultado el valor de la constante de interacción K_b . En este caso esta se estima en $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, comparable con las descritos en la bibliografía.^{33,46}

Este valor se utiliza para el cálculo de la ΔG liberada mediante la ecuación de Van't Hoff (2). Esta da como resultado un valor de $-5,70 \text{ kcal/mol}$.

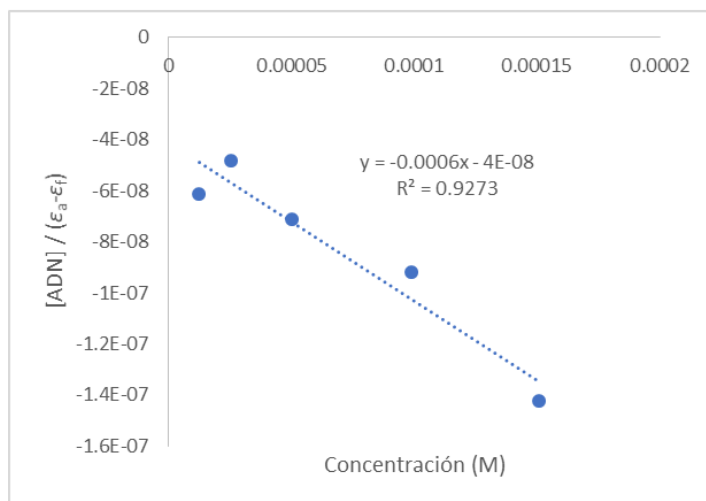


Figura 20 - Ajuste lineal de los datos de absorbancia a 260 nm de L1 a la ecuación de Wolfe-Shimmer.

El espectro de la disolución más concentrada (250 μM) se compara con el obtenido para la misma mezcla tras 24 horas de incubación en estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$. En este caso se observa una variación tanto en la posición de algunas bandas como en la intensidad de las mismas. Sin embargo, parece que se debe a un error experimental o a una baja estabilidad del complejo formado, ya que algunas zonas crecen en intensidad mientras que otras bajan, sin ningún patrón aparente (Figura 21).

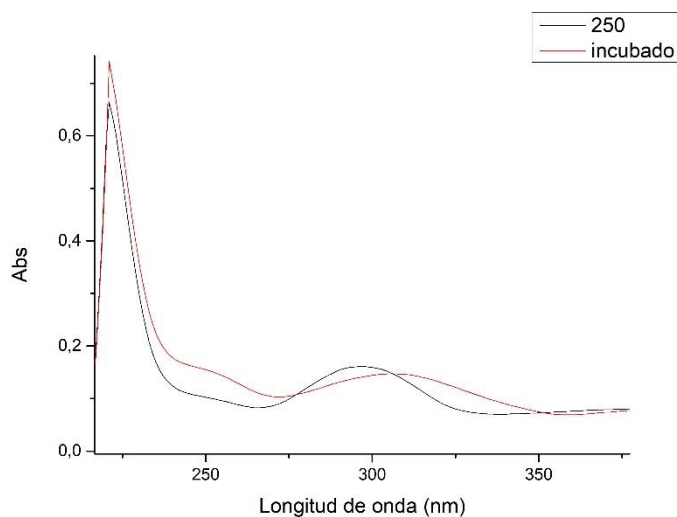


Figura 21 - Comparación de espectros de absorción de L1 tras 24h de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. L1C.

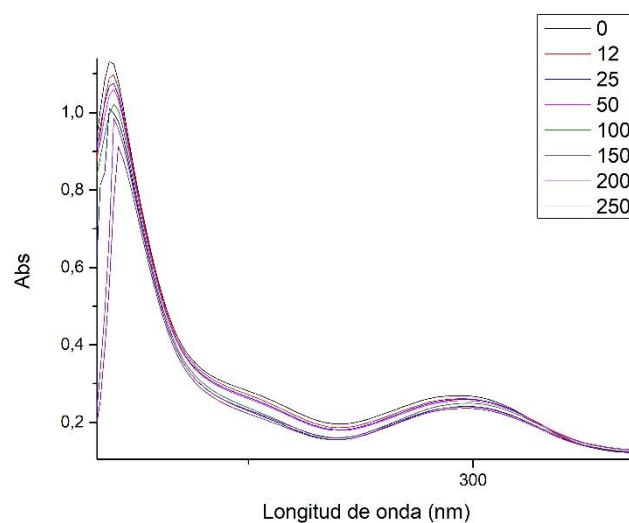


Figura 22 - Espectro de absorción del compuesto L1C y del complejo ADN / L1C en presencia de concentraciones de ADN entre 0 μM y 250 μM .

El espectro de absorción del complejo L1C (Figura 22) presenta dos máximos de absorción situados a 220 nm y 297 nm y un hombro en torno a 250 nm.

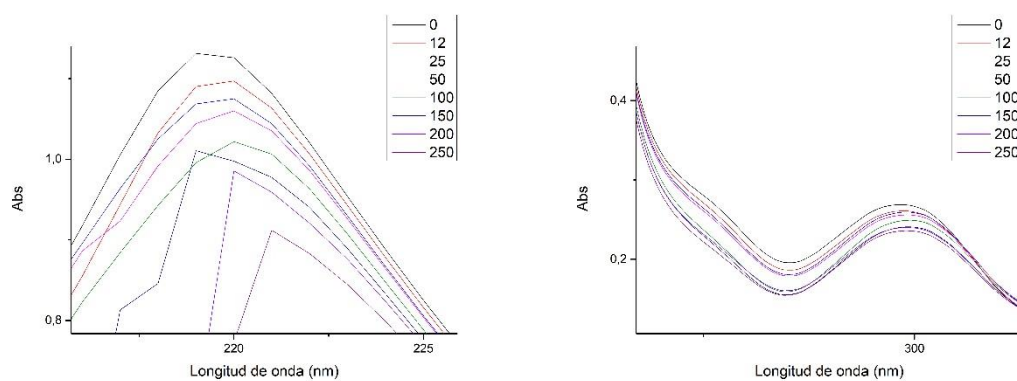


Figura 23 – Espectro de absorción del compuesto L1C en las zonas de los máximos.

En la zona del máximo de 219 se observa efecto hipocrómico y un marcado efecto batocrómico. El hipocromismo también es notable en los otros máximos (Figura 23).

El perfil descrito es indicativo de una interacción mediante intercalación. La presencia de un efecto batocrómico tan fuerte es un claro indicativo de este hecho.⁴²

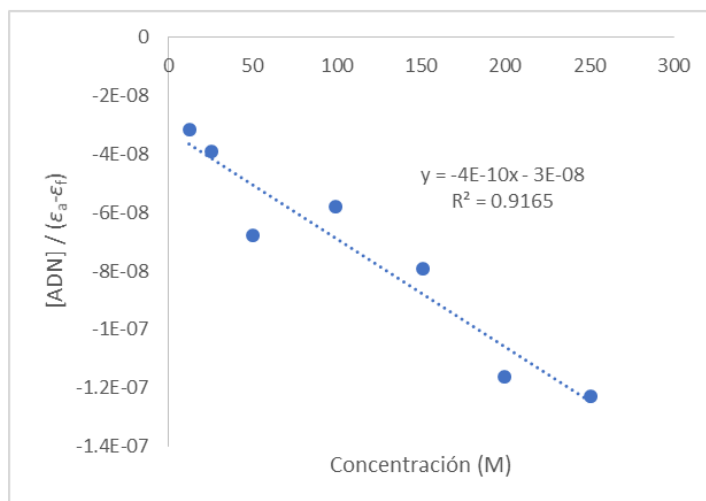


Figura 24 - Ajuste lineal de los datos de absorbancia a 260 nm de L1C a la ecuación de Wolfe-Shimmer.

La constante de interacción K_b se estima en $1,17 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Figura 24), comparable con las descritas en la bibliografía para complejos metálicos con modo de unión no covalente.^{42,46}

La ΔG liberada da como resultado $-5,46 \text{ kcal/mol}$.

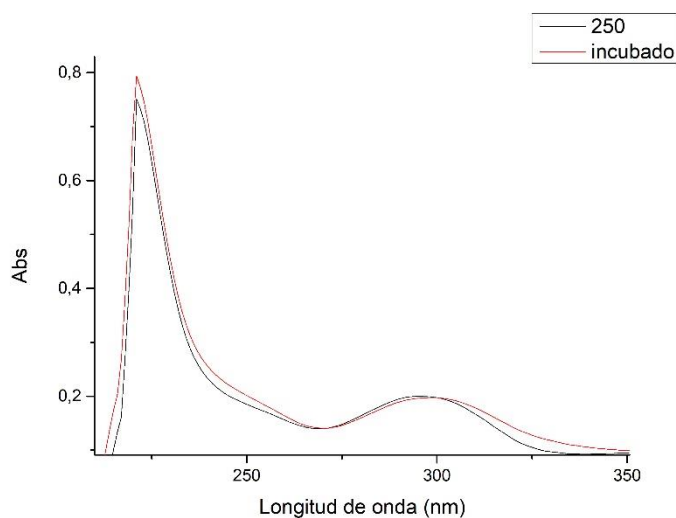


Figura 25 – Comparación de espectros de absorción de L1C tras 24h de incubación a 37°C.

En este caso, no se observa una variación significativa en el espectro de absorción de un día al siguiente (Figura 25). Esto indica que el modo de unión es lo suficientemente estables como para mantener su interacción tras 24 horas a 37 °C.

3.2.3. C2

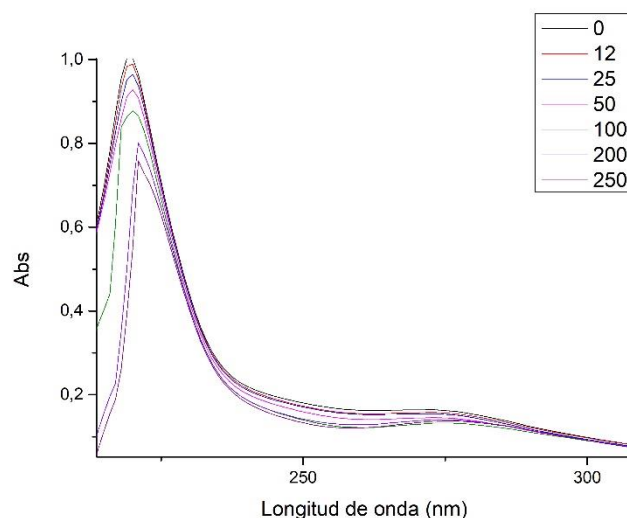


Figura 26 - Espectro de absorción del compuesto C2 y del complejo ADN / C2 en presencia de concentraciones de ADN entre 0 μM y 250 μM .

El espectro de absorción del complejo C2 (Figura 26) presenta un máximo de absorción situado 220 nm y un hombro en torno a 270 nm. La concentración de 150 μM no está representada, por ser considerada un anómalo.

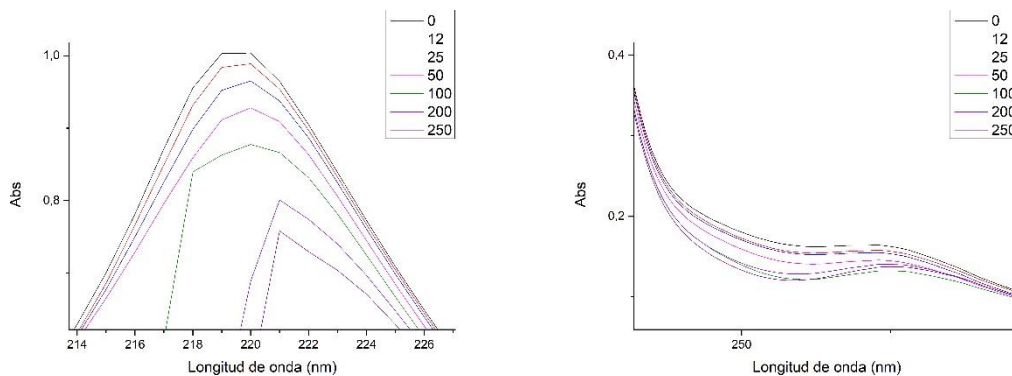


Figura 27 - Absorción del compuesto C2 en las zonas de los máximos.

En la zona del máximo de 219 se observan efecto hipocrómico y un fuerte efecto batocrómico. El hipocromismo también es notable en los otros máximos (Figura 27).

El perfil descrito es indicativo de una interacción mediante intercalación. La presencia de un efecto batocrómico tan fuerte es un claro indicativo de este hecho.⁴²

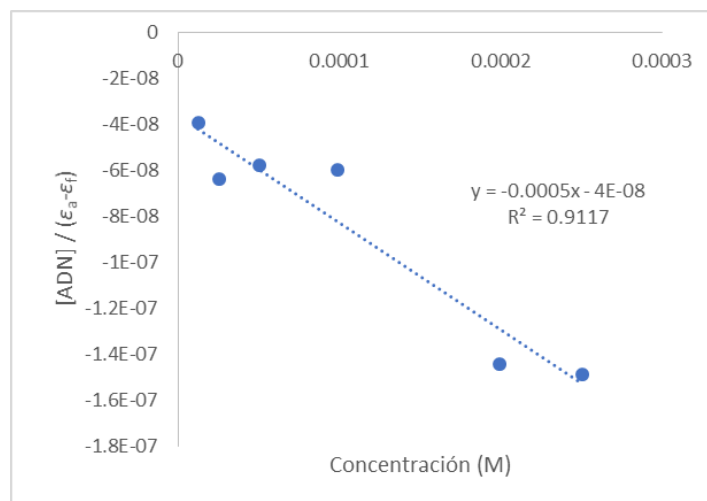


Figura 28 - Ajuste lineal de los datos de absorbancia a 260 nm de C2 a la ecuación de Wolfe-Shimmer.

La constante de interacción K_b se estima en $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Figura 28), comparable con las descritas en la bibliografía para complejos metálicos con modo de unión no covalente.^{42,46}

La ΔG liberada da como resultado $-5,52 \text{ kcal/mol}$.

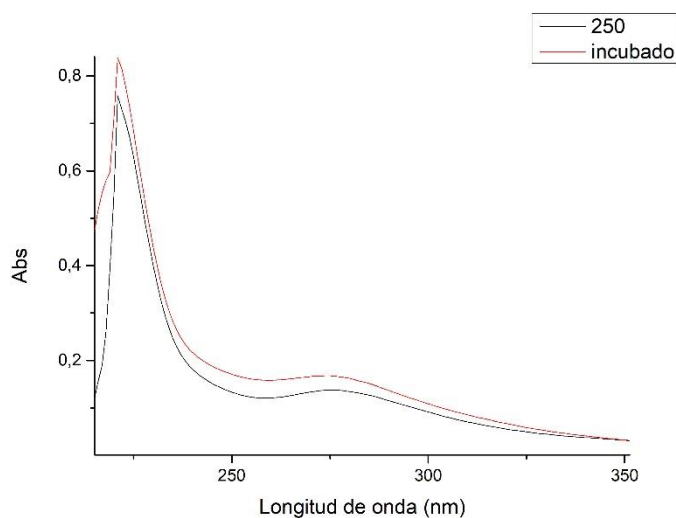


Figura 29 - Comparación de espectros de absorción de C2 tras 24h de incubación a 37 °C.

En este compuesto sí se observa una tendencia al aumento de la absorbancia a aquellas longitudes de onda que podrían significar un cambio en el modo de unión del complejo (Figura 29). Sin embargo, no es posible saber si esta variación es significativa o se debe

a un simple fallo experimental. Para ello se realizó una segunda réplica siguiendo el mismo método que arrojó resultados claramente insatisfactorios. Más estudios deberán ser realizados para comprobar la estabilidad del modo de enlace del compuesto.

3.3. Espectroscopia de fluorescencia.

La variación de la fluorescencia emitida por el compuesto L1 es medida cuando se añaden distintos volúmenes de ADN, con el objetivo de determinar el modo de unión de este compuesto.

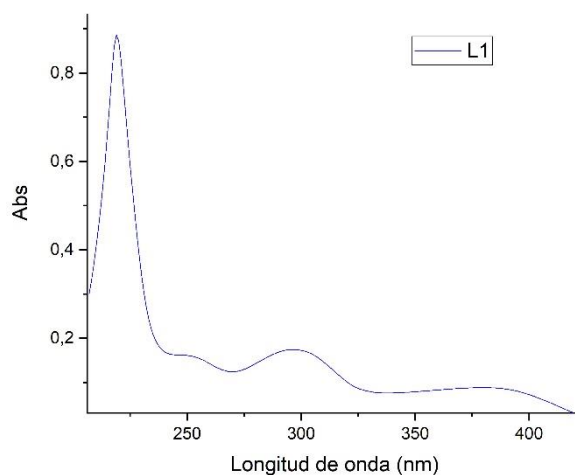


Figura 30 - Espectro de absorción del compuesto L1.

Para ello, se realiza un espectro de emisión seleccionando como longitud de onda de excitación 300 nm, por corresponderse con uno de los máximos de absorción (Figura 30) (No se selecciona el máximo de 219 porque la intensidad de la lámpara del aparato utilizado es baja a esas longitudes de onda y puede generar error experimental).

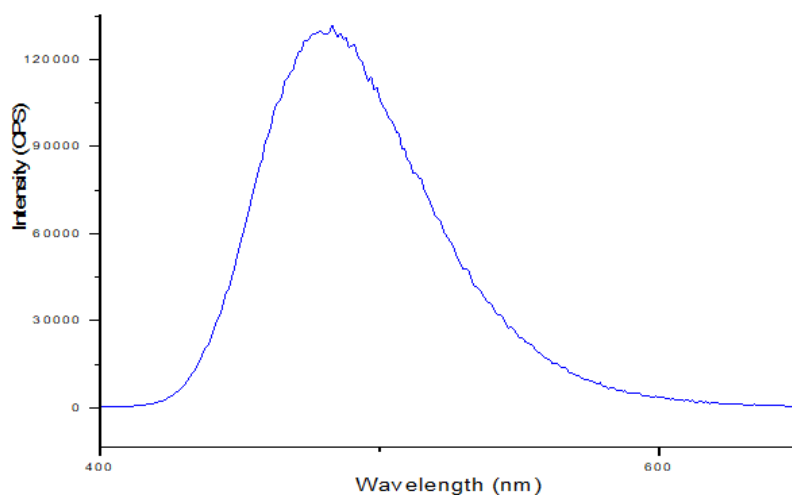


Figura 31 - Espectro de fluorescencia de L1 con excitación a 300 nm.

Tras ver este espectro (Figura 31), se considera que la longitud de onda de interés de emisión son 480 nm. Por ello se realiza un espectro de excitación fijando esta como la longitud de onda de recogida (Figura 32).

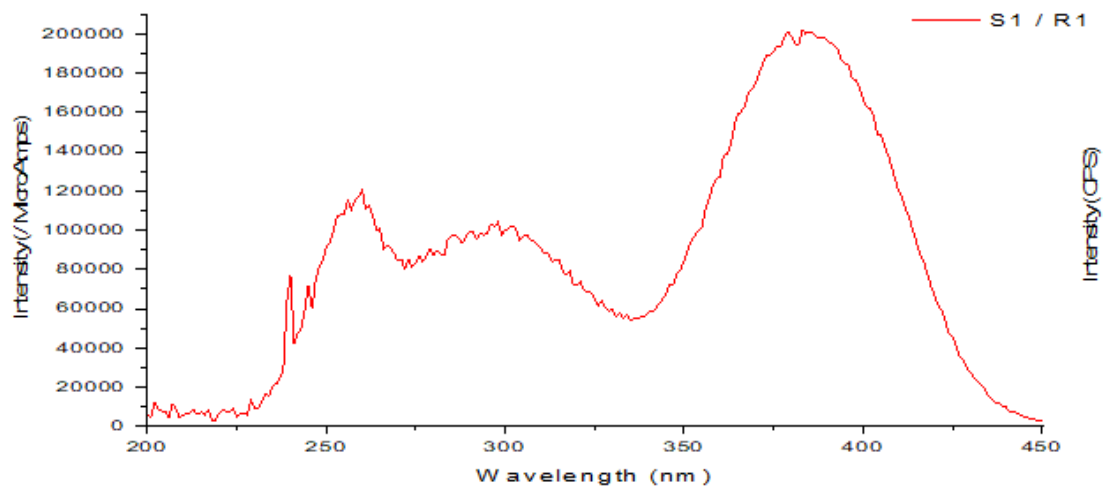


Figura 32 - Espectro de excitación de L1 recogiendo la emisión a 480 nm.

Se determina que la longitud de onda más adecuada para excitar la muestra son 380 nm. A partir de aquí se realizan espectros de emisión para cada concentración de ADN, fijando 380 nm como longitud de onda de emisión y un rango de recogida de 400 nm a 650 nm.

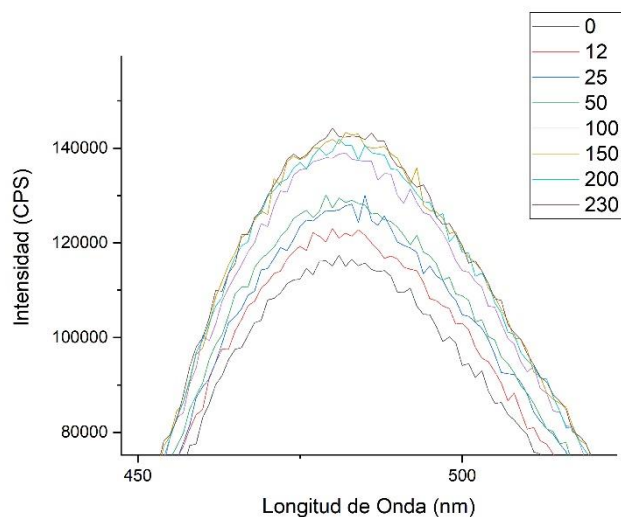


Figura 33 - Superposición de espectros de fluorescencia de L1 con concentraciones de ADN desde 0 μM a 230 μM .

Se observa que la intensidad de emisión aumenta a medida que aumenta la concentración de ADN (Figura 33). Esto confirma la hipótesis de que el compuesto L1 se une al ADN mediante intercalación. La banda de concentración de ADN 150 μM no se presenta por ser considerada un anómalo.

3.4. *Molecular docking.*

Para conocer la pose más probable de interacción con el ADN de cada uno de los compuestos estudiados se realizaron cálculos de *molecular docking*. Las poses más probables son presentadas a continuación, junto con un análisis de las posibles interacciones presentes entre el compuesto y el ADN.

Las representaciones en 2D del mismo modelo de interacción, junto con imágenes mostrando la convergencia del resto de poses se muestran en la sección de anexos.

3.4.1. L1.

El estudio de *molecular docking* para el compuesto L1 se lleva a cabo utilizando el archivo PDB obtenido mediante difracción de rayos X de monocristal, y el programa Autodock Vina.⁵¹

Se obtiene como resultado la siguiente pose (Figura 34), con una ΔG de interacción estimada de -7,8 kcal/mol, comparable a la de -5,70 kcal/mol obtenida experimentalmente.

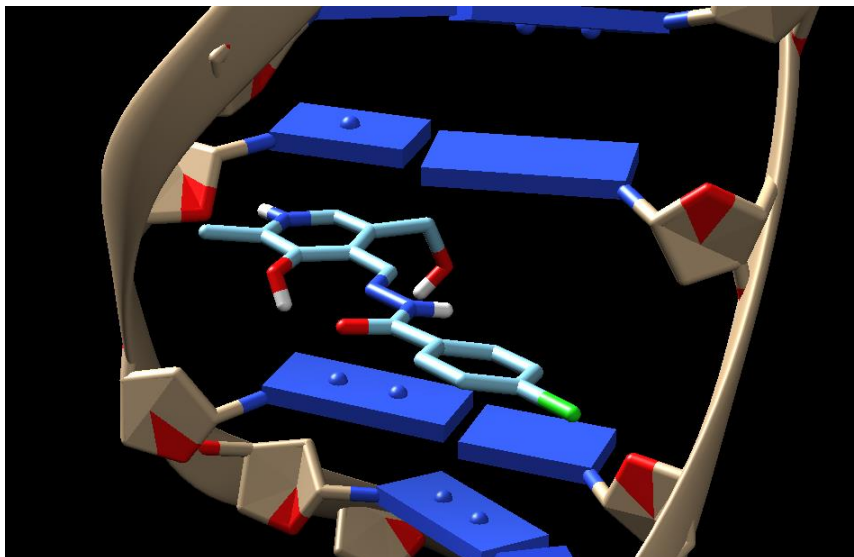


Figura 34 - Pose más probable de intercalación de L1 con una molécula de ADN.

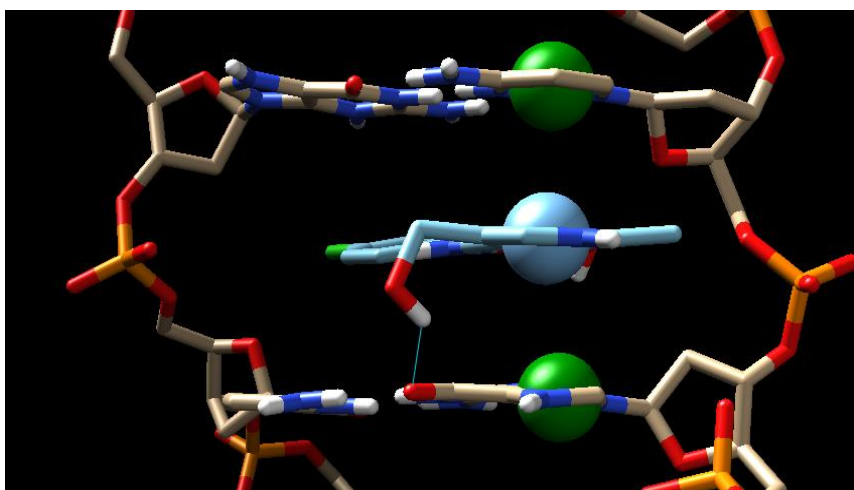


Figura 35 - Interacciones del compuesto L1 con el ADN. La línea azul representa un enlace de H. Los centroides están representados en aquellos anillos con probable π - π stacking, en azul para los del compuesto y en verde para los del ADN.

Para conocer cuáles son las interacciones que mantienen unido el complejo fármaco / ADN, se realiza una búsqueda de enlaces de H y una medida de las distancias entre

centroides de los anillos aromáticos del compuesto y de las bases nitrogenadas, con la intención de saber si estas son adecuadas para una posible interacción mediante π - π stacking.

Se observa un enlace de H y dos interacciones mediante π - π stacking (Figura 35). Las distancias calculadas entre los centroides representados de los anillos de las bases y del compuesto son de 3,8 Å y 3,9 Å. Estas coinciden con las consideradas por la bibliografía para interacciones de tipo π - π stacking.^{60,61} Aquellos centroides cuyas distancias no son indicativas de la presencia de interacciones, no han sido representados para simplificar la imagen.

3.4.2. L1C.

Para el complejo L1C se utiliza un archivo PDB obtenido mediante difracción de rayos X de monocristal. Los cálculos se realizaron con el programa Autodock 4.2.⁵³

Se obtiene como resultado la siguiente pose (Figura 36), con una ΔG de interacción estimada de -6,28 kcal/mol, comparable a la de -5,46 kcal/mol obtenida experimentalmente.

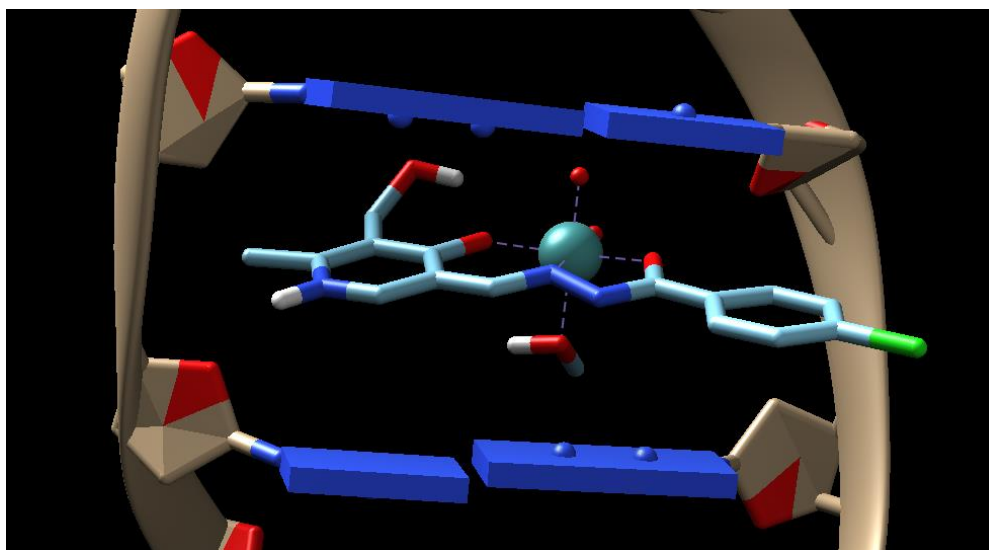


Figura 36 - Pose más probable de intercalación de L1C con una molécula de ADN.

Tras el análisis de su interacción, se observan dos enlaces de H y dos contactos mediante π stacking (Figura 37). Las distancias calculadas entre los centroides son de 3,6 Å y 3,8 Å. Estas coinciden con las consideradas por la bibliografía para interacciones de tipo π - π stacking.^{60,61}

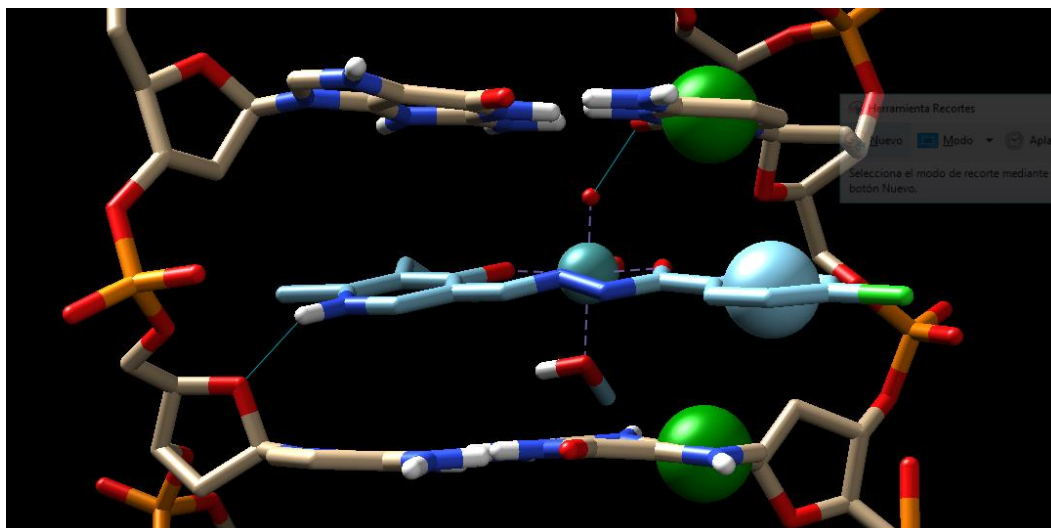


Figura 37- Interacciones del compuesto L1 con el ADN. La línea azul representa un enlace de H. Los centroides están representados en aquellos anillos con probable π - π stacking, en azul para los del compuesto y en verde para los del ADN.

El hecho de que el cálculo para este complejo se haya realizado utilizando una imagen modelada en 2D en lugar de una obtenida mediante cristalografía puede hacer variar el resultado final.

3.4.3. C2.

Para C2 se utiliza un archivo PDB generado con Chem3D, ya que a pesar de haber obtenido cristales, el difractor de rayos X de monocristal se encontraba fuera de servicio en el momento en que se podría haber hecho la medida. Los cálculos se realizaron con el programa Autodock 4.2.⁵³

Se obtiene como resultado la siguiente pose, con una ΔG de interacción estimada de -6,97 kcal/mol, comparable a la de -5,52 kcal/mol obtenida experimentalmente.

Se observa un enlace de H y dos interacciones mediante π - π stacking. Las distancias calculadas entre los centroides son de 3,6 Å y 3,8 Å. Estas coinciden con las consideradas por la bibliografía para interacciones de tipo π - π stacking.^{60,61}

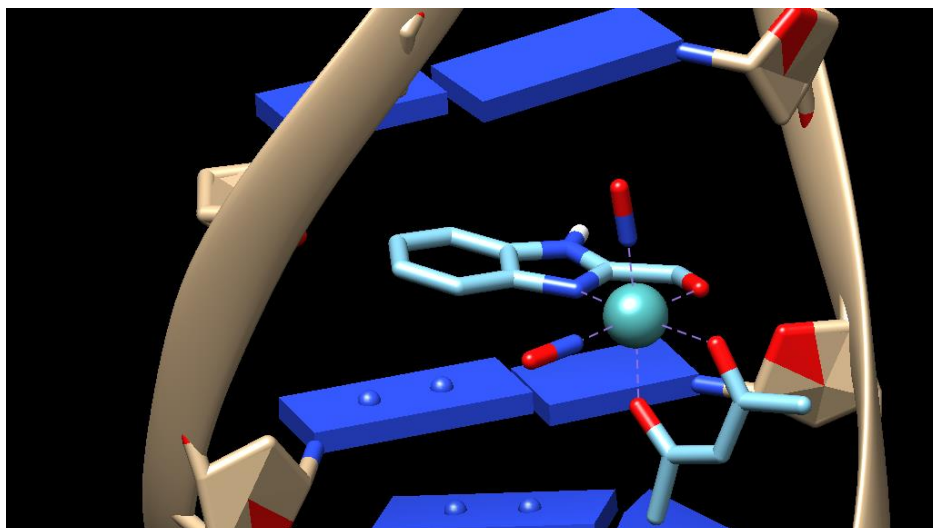


Figura 38 - Pose más probable de intercalación de C2 con una molécula de ADN.

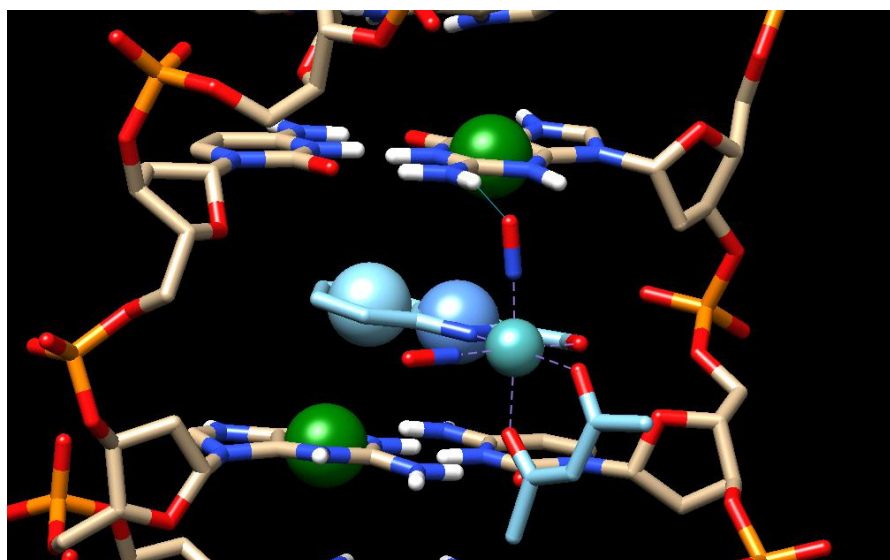


Figura 39 - Interacciones del compuesto C2 con el ADN. La línea azul representa un enlace de H. Los centroides están representados en aquellos anillos con probable π - π stacking, en azul para los del compuesto y en verde para los del ADN.

3.5. Estudio de citotoxicidad por MTT.

A continuación, se presentan los resultados del ensayo de MTT realizado tras el tratamiento de células tumorales con los compuestos L1, L1C y C2 durante 48 horas.

Una vez obtenidos los datos, las medias de cada experimento independiente para cada concentración se comparan mediante una ANOVA, que resultó significativa en todos los

casos. Esto indica la existencia de, como mínimo, un dato significativamente diferente al resto. Para detectar donde se encontraban estas diferencias específicamente se realizó un test de Bonferroni, comparando cada media con el control. Las Figura 40-42 muestran los resultados obtenidos de estos análisis para los compuestos L1 (Figura 40), L1C (Figura 41) y C2 (Figura 42). Por ello, se realiza un test de Bonferroni, comparando cada media con el control. Aquellos puntos donde se encuentra significación con una $p < 0,05$ son marcados con un asterisco. Aquellos donde la $p < 0,01$, se marcan con dos asteriscos.

Posteriormente se aplica un test de correlación de Pearson para estimar el grado de relación entre la dosis aplicada y el porcentaje de viabilidad.

3.5.1. L1.

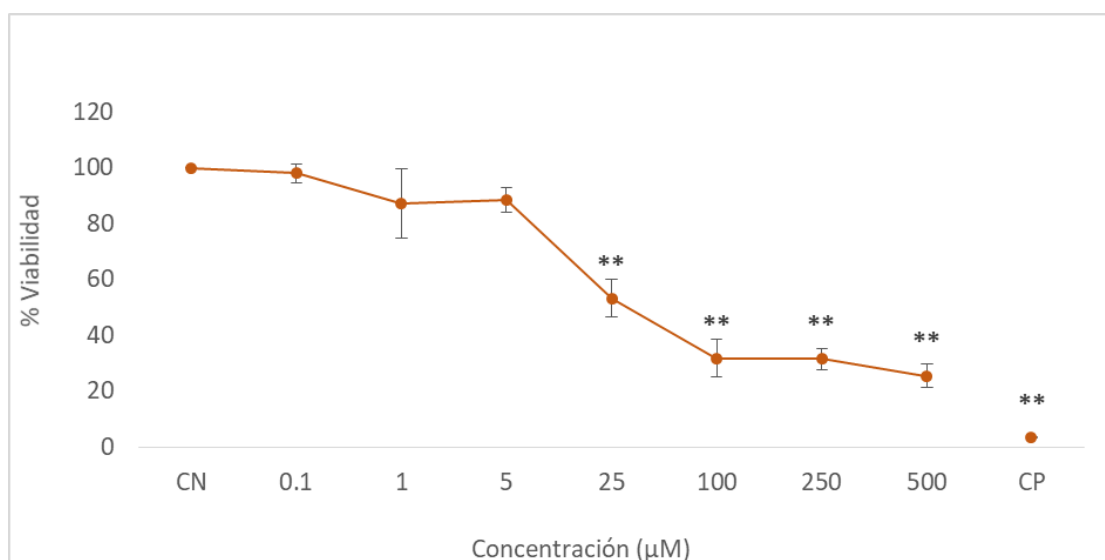


Figura 40 - Porcentaje de viabilidad frente a la concentración de compuesto añadida para L1.

Se representan barras de error estándar y se marcan aquellos puntos que se consideran estadísticamente significativos.

Se observa que a partir de una concentración de compuesto en el pocillo de 25 µM, los descensos de viabilidad comienzan a ser significativos, también con una $p < 0,01$. También es a partir de esta concentración cuando la viabilidad comienza a bajar de 60%, punto a partir del cual se considera que existe toxicidad celular (Figura 40).

A medida que la concentración de compuesto L1 en el medio aumenta, la viabilidad celular disminuye. Esto está confirmado por el test de correlación de Pearson ($r = -0,925$, $p < 0,01$), demostrando una fuerte relación dosis / respuesta.

Este compuesto es el que presenta valores de error estándar más altos de todos los que se han medido. Esto probablemente se deba a su baja solubilidad en DMSO, que hace necesario resuspender la mezcla siempre antes de ser utilizada, y que puede provocar diferencias en el reparto homogéneo del tóxico en los pocillos.

3.5.2. L1C.

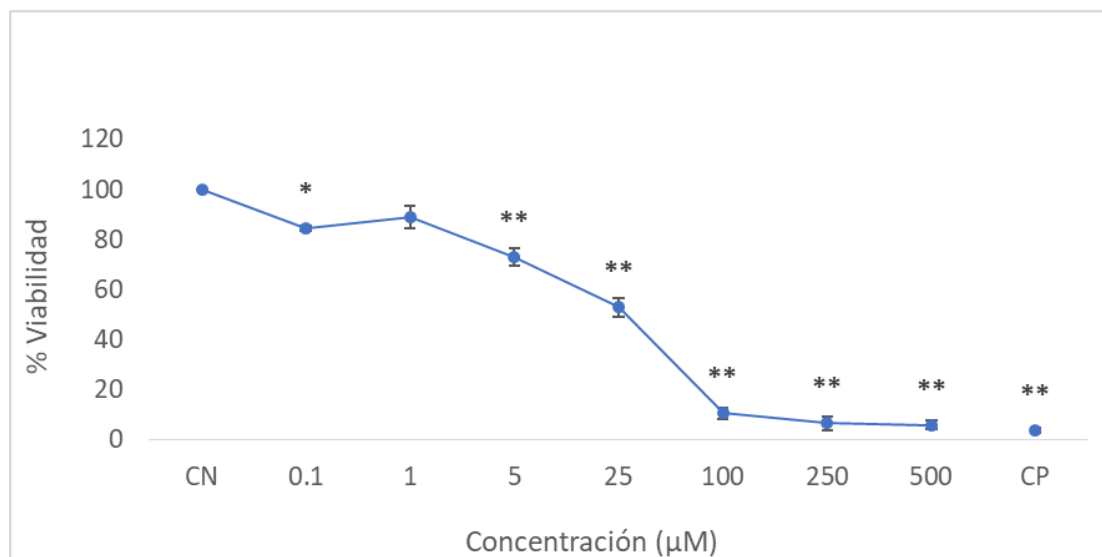


Figura 41 - Porcentaje de viabilidad frente a la concentración de compuesto añadida para L1C. Se representan barras de error estándar y se marcan aquellos puntos que se consideran estadísticamente significativos.

A partir de una concentración de compuesto en el pocillo de 5 µM, los descensos de viabilidad comienzan a ser significativos, también con una $p < 0,01$. (Probablemente, la presencia de significación a 0,1 µM se deba al bajo error estándar, y puede considerarse un artefacto del test estadístico utilizado). La viabilidad aparece por debajo del 60% a una concentración de complejo de 25 µM. La toxicidad es casi del 100% cuando la concentración aumenta de 100 µM, evidenciando un fuerte efecto citotóxico (Figura 41).

A medida que la concentración de complejo aumenta, la viabilidad celular disminuye. . Esto está confirmado por el test de correlación de Pearson ($r = -0,948$, $p < 0,01$), evidenciando la relación dosis / respuesta más fuerte de las testadas.

La toxicidad de este compuesto es más elevada y presenta mucho menor error que la del mismo compuesto orgánico sin Mo. Esto indica que el metal juega un claro papel a la hora de provocar la muerte celular.

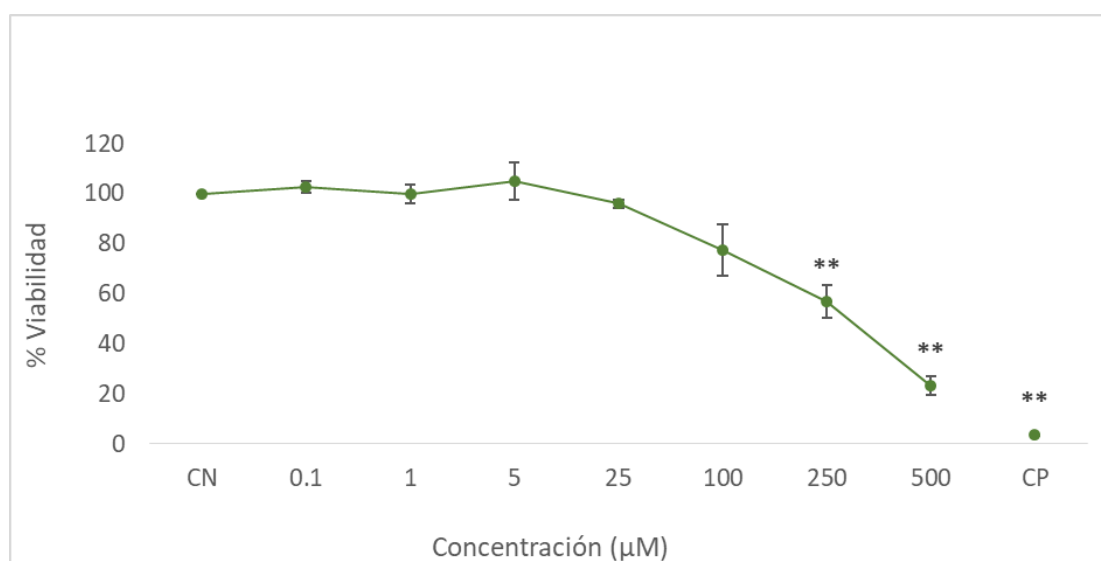
3.5.3. C2.

Figura 42 - Porcentaje de viabilidad frente a la concentración de compuesto añadida para C2. Se representan barras de error estándar y se marcan aquellos puntos que se consideran estadísticamente significativos.

No se observa significación hasta la concentración de 100 μM, y no se baja del 60% de viabilidad hasta la de 250 μM (Figura 42). No obstante, el coeficiente de correlación de Pearson de nuevo mostró un descenso significativo, aunque menos acusado que en los compuestos anteriores, de la viabilidad a medida que aumenta la dosis ($r = -0,84$; $p < 0,01$). Esto indica el efecto citotóxico menos intenso de los compuestos probados.

Este hecho puede deberse a que el Mo(0) no tiene los mismos efectos de inhibición del crecimiento celular que el Mo(VI). Otra opción es que los ligandos de este complejo, al actuar como bidentados en lugar de tridentados, sean menos estables y puedan salirse de la esfera de coordinación, y el complejo metálico no pueda unirse al ADN mediante intercalación.

4. Conclusiones.

La ruta de síntesis seleccionada permite aislar los compuestos de forma satisfactoria, como se confirma posteriormente mediante todas las técnicas de caracterización empleadas.

Todos los compuestos analizados presentan comportamientos similares frente al ADN, con constantes de interacción parecidas, de en torno a $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, y ΔG cercanas a $-5,5 \text{ kJ}$. La evolución de los espectros de absorción también sigue un patrón, apareciendo los efectos hipocrómico y batocrómico en todos ellos, lo que sugiere modos de unión no covalente mediante intercalación. Esto se confirma mediante espectrofluorimetría para el caso del compuesto L1, observándose un aumento de su intensidad de fluorescencia a medida que crece la cantidad de ADN en el medio.

Las ΔG de interacción calculadas mediante *molecular docking* son comparables a las obtenidas experimentalmente. Además, el compuesto con mayor energía teórica también resulta ser el de mayor energía estimada de forma empírica, manteniéndose el orden también para las otras dos especies estudiadas. Esto confirma que la mayor energía de interacción corresponde a L1, seguido de C2 y por último, de L1C.

Con respecto a su citotoxicidad tras un tratamiento de 48 horas, se observan diversos patrones de comportamiento. La baja solubilidad en DMSO de L1 puede ser la causa de la presencia de un gran error en la medida, y la toxicidad de C2 es muy baja hasta concentraciones muy altas. Por otro lado, L1C presenta una alta solubilidad y un perfil de citotoxicidad interesante, con bajo error estándar, fuerte correlación dosis/respuesta y efecto significativo desde concentraciones bajas. El estudio de los tres compuestos con tiempos de tratamiento diferentes, como 24 o 72 horas, así como de su efecto en células sanas e incluso organismos vivos podría arrojar más luz sobre su posible efecto como antitumorales.

Los resultados del estudio toxicológico no presentan relación con los obtenidos de los ensayos de interacción mediante espectroscopia. De este modo, el compuesto que más potencial citotóxico parece tener, también resulta ser el que presenta un menor valor de K_b y de ΔG de interacción, tanto experimental como calculada computacionalmente (L1C). Este hecho sugiere que, como se comentaba en la introducción, la presencia de metales en fármacos tiene más efectos sobre la viabilidad de las células tumorales que aquellos únicamente debidos a la unión compuesto / ADN, y que los complejos de Mo(VI) son moléculas de interés para la investigación biomédica.

Conclusiones.

A ruta de síntese seleccionada permite illar os compostos de forma satisfactoria, como é confirmado posteriormente mediante todas as técnicas de caracterización empregadas.

Todos os compostos analizados presentan comportamentos similares fronte ó ADN, con constantes de interacción semellantes, de en torno a $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$, y ΔG próximas a -5,5 kJ. A evolución dos espectros de absorción tamén segue un patrón, aparecendo os efectos hipocrómico e batocrómico en todos eles, o que suxire modos de unión non covalente mediante intercalación. Isto confírmase mediante espectrofluorimetría para o caso do composto L1, observándose un aumento da súa intensidade de fluorescencia a medida que medra a cantidade de ADN no medio.

As ΔG de interacción calculadas mediante *molecular docking* son comparables ás obtidas experimentalmente. Ademais, o composto con maior enerxía teórica tamén resulta ser o de maior enerxía estimada de forma empírica, manténdose a orde tamén para as outras dúas especies estudadas. Isto confirma que a maior enerxía de interacción corresponde a L1, seguido de C2 e por último, de L1C.

Con respecto a súa citotoxicidade tras un tratamento de 48 horas, se observan diversos patróns de comportamento. A baixa solubilidade en DMSO de L1 pode ser a causa da presenza dun gran error na medida, e a toxicidade de C2 é moi baixa hasta concentracións moi altas. Por outro lado, L1C presenta unha alta solubilidade e un perfil de citotoxicidade interesante, con baixo error estándar, forte correlación doses / resposta e efecto significativo desde concentración baixas. O estudio dos tres compostos con tempos de tratamento diferentes, como 24 ou 72 horas, así como do seu efecto en células sans e incluso en organismos vivos podería arrojar mais luz sobre o seu posible efecto como antitumorais.

Os resultados do estudio toxicolóxico non presentan relación cos obtidos dos ensaios de interacción mediante espectroscopia. Deste modo, o composto que mais potencial citotóxico parece ter, tamén resulta ser o que presenta un menor valor de K_b e de ΔG de interacción, tanto experimental como calculada computacionalmente (L1C). Este feito suxire que, como se comentaba na introdución, a presenza de metais en fármacos ten mais efectos sobre a viabilidade das células tumorais que aqueles unicamente debidos á unión composto / ADN, e que os complexos de Mo(VI) son moléculas de interese para a investigación biomédica.

Conclusions.

The selected synthetic route allows the satisfactory isolation of the compounds, as confirmed later by all the characterization techniques used.

All the compounds analyzed show similar behaviors against DNA, with similar binding constants, of around $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, and a ΔG close to -5.5 kJ . The evolution of the absorption spectra also follows a pattern, with the hypochromic and bathochromic effects appearing in all of them, suggesting non-covalent binding modes through intercalation. This is confirmed by spectrofluorimetry for the case of compound L1, observing an increase in its fluorescence intensity as the amount of DNA in the medium increases.

The binding ΔG calculated by molecular docking are comparable to those obtained experimentally. In addition, the compound with the highest theoretical energy also turns out to be the one with the highest estimated energy by empirical calculations, maintaining the order also for the other two studied species. This confirms that the greatest interaction energy corresponds to L1, followed by C2 and finally, L1C.

Regarding its cytotoxicity after a 48 hour treatment, different patterns are observed. The low solubility in DMSO of L1 may be the cause of the presence of a large error in the measurement, and the toxicity of C2 is very low up to very high concentrations. On the other hand, L1C shows a high solubility and an interesting cytotoxicity profile, with low standard error, strong dose / response correlation and a significant effect from low concentrations. The study of the three compounds with different treatment times, such as 24 or 72 hours, as well as their effect on healthy cells and even on living organisms could shed more light on their possible effect as antitumoral agents.

The results of the toxicological study are not directly related to those obtained from the interaction tests by spectroscopy. Thus, the compound with the highest cytotoxic potential seems to be the one with the lowest value of binding K_b and ΔG , both experimentally and computationally calculated (L1C). This fact suggests that, as discussed in the introduction, the presence of metals in drugs has more effects on the viability of tumor cells than those solely due to the compound / DNA binding, and that the Mo (VI) complexes are molecules of interest for biomedical research.

5. Bibliografía.

- (1) Fuertes, M.; Pérez, J. Química Bioinorgánica. Una Ciencia Interdisciplinar En Desarrollo. *ChemBioChem* **2014**, No. January 2000, 1–5.
- (2) Vallet, M. *Introducción a La Química Bioinorgánica*. Madrid: Síntesis.; Síntesis: Madrid, 2010.
- (3) Sociedad española de oncología médica (SEOM). *Las Cifras Del Cáncer En España 2018*; 2018.
- (4) UK, C. research. Worldwide cancer mortality statistics <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading=Zero> (accessed May 29, 2019).
- (5) Gómez-Ruiz, S. Investigación Química Evolución y Desarrollo de Complejos Metálicos Con Aplicación Potencial Como Agentes Antitumorales. *Anales* **2010**, 106 (1), 13–21.
- (6) Ott, I.; Gust, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-Cancer Drugs. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2007**, 340 (3), 117–126. <https://doi.org/10.1002/ardp.200600151>.
- (7) Shaloam, D.; Tchounwou, P. B. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740 (1), 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. Cisplatin.
- (8) Coughlan, M. P. *Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes*; Pergamon, Ed.; Oxford, 1980.
- (9) Barceloux, D. G. Molybdenum. *Clin. Toxicol.* **1999**, 37 (2), 231–237.
- (10) Audi, G.; Bersillon, O.; Blachot, J.; Wapstra, A. H. The NUBASE Evaluation of Nuclear and Decay Properties. *Nucl. Phys. A* **2003**, 729 (1), 3–128. <https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2003.11.001>.
- (11) Casas, J. S.; Moreno, V.; Sordo, J. *Química Bioinorgánica*, 1st ed.; Síntesis, Ed.; 2002.
- (12) Hille, R. The Mononuclear Molybdenum Enzymes †. *Chem. Rev.* **2002**, 96 (7), 2757–2816. <https://doi.org/10.1021/cr950061t>.

- (13) M.R.P.N. MatRos, C.C. Romao, C.C. Lage Pereira, S.S. Rodrigues, M. Mora, M. J. P.; Silva, P.M. Alves, C. A. E. Compositions Comprising Organometallic Molybdenum Compounds For Treating Cancer. Patent WO 2005/087783, 2005.
- (14) Fenton, D. E. *Biocoordination Chemistry*; Oxford university Press Inc.: New York, 1995.
- (15) Coughlan, M. P. The Role of Molybdenum in Human Biology. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1983**, 6 (1 Supplement), 70–77. <https://doi.org/10.1007/BF01811327>.
- (16) Stiefel, E. The Coordination and Bioinorganic Chemistry of Molybdenum. *Prog. Inorg. Chem.* **1977**, 22.
- (17) Stiefel, E. Proposed Molecular Mechanism for the Action of Molybdenum in Enzymes: Coupled Proton and Electron Transfer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1973**, 70 (4), 988–992.
- (18) Vyskočil, A.; Viau, C. Assessment of Molybdenum Toxicity in Humans. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, 19 (3), 185–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199905/06\)19:3<185::AID-JAT555>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<185::AID-JAT555>3.0.CO;2-Z).
- (19) Pitt, M. A. Molybdenum Toxicity: Interactions between Copper, Molybdenum and Sulphate. *Agents Actions* **1976**, 6 (6), 758–769. <https://doi.org/10.1007/BF02026100>.
- (20) Neelam Bharti, Shailendra, M. T. Gonzalez Garza, Delia E. Cruz-Vega, J. Castro-Garza, Kishwar Saleem, Fehmida Naqvi, M. R. M. and A. A. Synthesis, Characterization and Antiamoebic Activity of Benzimidazole Derivatives and Their Vanadium and Molybdenum Complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 869–871.
- (21) Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. *Chem. Rev.* **1999**, 99 (9), 2561–2572. <https://doi.org/10.1021/cr980427c>.
- (22) Köpf-Maier P, et al. Molybdocene Dichloride as an Antitumor Agent. *Z Naturforsch C* **1979**, 12.
- (23) Wei, H.; Luo, X.; Yang, S. P. Effects of Molybdenum and Tungsten on Mammary Carcinogenesis in SD Rats. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1985**, 74 (2), 469–473. <https://doi.org/10.1093/jnci/74.2.469>.

- (24) Xian-Mao Luo, Hui-Juan Wei, and S. P. Y. Inhibitory Effects of Molybdenum on Esophageal and Forestomach Carcinogenesis in Rats. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, 71 (1). <https://doi.org/10.1093/jnci/71.1.75>.
- (25) Šebestová, L.; Havelek, R.; Řezáčová, M.; Honzíček, J.; Kročová, Z.; Vinklárek, J. Study of Antitumor Effect of Selected Vanadium and Molybdenum Organometallic Complexes in Human Leukemic T-Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, 242, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.017>.
- (26) Brendan Gleeson et al. Novel Benzyl-Substituted Molybdocene Anticancer Drugs. *Inorganica Chim. Acta* **2010**, 363, 1831–1836.
- (27) Köpf-Maier, P.; Köpf, H. *Organometallic Titanium, Vanadium, Niobium, Molybdenum and Rhenium Complexes — Early Transition Metal Antitumour Drugs*; Springer: Dordrecht, 1994. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1252-9_6.
- (28) Bandarra, D.; Lopes, M.; Lopes, T.; Almeida, J.; Saraiva, M. S.; Vasconcellos-Dias, M.; Nunes, C. D.; Félix, V.; Brandão, P.; Vaz, P. D.; et al. Mo(II) Complexes: A New Family of Cytotoxic Agents? *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104 (11), 1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.07.006>.
- (29) Strianese, M.; Basile, A.; Mazzone, A.; Morello, S.; Turco, M. C.; Pellicchia, C. Therapeutic Potential of a Pyridoxal-Based Vanadium(IV) Complex Showing Selective Cytotoxicity for Cancer versus Healthy Cells. *J. Cell. Physiol.* **2013**, 228 (11), 2202–2209. <https://doi.org/10.1002/jcp.24385>.
- (30) Reytman, L.; Braitbard, O.; Tshuva, E. Y. Highly Cytotoxic Vanadium(v) Complexes of Salan Ligands; Insights on the Role of Hydrolysis. *Dalt. Trans.* **2012**, 41 (17), 5241–5247. <https://doi.org/10.1039/c2dt11514j>.
- (31) Evangelou, A. M. Vanadium in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42 (3), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00221-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00221-9).
- (32) Zhang, Y.; Zhang, L.; Liu, L.; Guo, J.; Wu, D.; Xu, G.; Wang, X.; Jia, D. Anticancer Activity, Structure, and Theoretical Calculation of N-(1-Phenyl-3-Methyl-4-Propyl-Pyrazolone-5)-Salicylidene Hydrazone and Its Copper(II) Complex. *Inorganica Chim. Acta* **2010**. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.08.017>.

- (33) Mukherjee, S.; Chowdhury, S.; Chattapadhyay, A. P.; Bhattacharya, A. Spectroscopic, Cytotoxic and DFT Studies of a Luminescent Palladium(II) Complex of a Hydrazone Ligand That Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Inorganica Chim. Acta* **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.03.048>.
- (34) Neha, S.; Ritu, R.; Manju, K.; Birendra, K. A Review on Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* **2016**, *8* (3), 162–166.
- (35) Kaplánek, R.; Havlík, M.; Dolenský, B.; Rak, J.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Králová, J.; Král, V. Synthesis and Biological Activity Evaluation of Hydrazone Derivatives Based on a Tröger's Base Skeleton. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (7), 1651–1659. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.029>.
- (36) McGaughey, G. B.; Gagné, M.; Rappé, A. K. π -Stacking Interactions. Alive and Well in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (25), 15458–15463. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15458>.
- (37) Ebrahimipour, S. Y.; Khabazadeh, H.; Castro, J.; Sheikhshoae, I.; Crochet, A.; Fromm, K. M. Cis-Dioxido-Molybdenum(VI) Complexes of Tridentate ONO Hydrazone Schiff Base: Synthesis, Characterization, X-Ray Crystal Structure, DFT Calculation and Catalytic Activity. *Inorganica Chim. Acta* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2014.11.023>.
- (38) Maurya, M. R.; Dhaka, S.; Kumar, N.; Avecilla, F. Synthesis, Characterization, Reactivity, Identification of Isomeric Species and Crystal Structure of Dinitrosylmolybdenum(0) Complexes of 2-(α -Hydroxyalkyl/Aryl)Benzimidazole. *Transit. Met. Chem.* **2013**, *38* (5), 535–542. <https://doi.org/10.1007/s11243-013-9721-9>.
- (39) Sheldrick, G. M. SHELXL-97: An Integrated System for Solving and Refining Crystal Structures from Diffraction Data (Revision 5.1); *University of Göttingen, Germany*. 1997.
- (40) Maurya, M. R.; Chaudhary, N.; Avecilla, F.; Adão, P.; Costa Pessoa, J. Oxidovanadium(IV) and Dioxidovanadium(V) Complexes of Hydrazones of 2-Benzoylpyridine and Their Catalytic Applications. *Dalt. Trans.* **2014**, *44* (3), 1211–1232. <https://doi.org/10.1039/c4dt02474e>.

- (41) Nguyen, B.; Hamelberg, D.; Bailly, C.; Colson, P.; Stanek, J.; Brun, R.; Neidle, S.; Wilson, W. D. Characterization of a Novel DNA Minor-Groove Complex. *Biophys. J.* **2004**, *86* (2), 1028–1041. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74178-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74178-8).
- (42) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. DNA Interactions and Their Study by UV – Visible , Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol.* **2013**, *124*, 1–19.
- (43) 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. <https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1078897>.
- (44) Liu, J.; Zhang, T.; Lu, T.; Qu, L.; Zhou, H.; Zhang, Q.; Ji, L. DNA-Binding and Cleavage Studies of Macrocyclic Copper(II) Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91* (1), 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00441-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00441-5).
- (45) 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). <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000214>.
- (46) Mushtaque, M.; Avcilla, 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. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.101>.
- (47) Wolfe, A.; Jr, G. H. S.; Meehan, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA? *Society* **2002**, *26* (May), 6392–6396. <https://doi.org/10.1021/bi00394a013>.
- (48) 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. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2118-y>.

- (49) Li, W. Y.; Xu, J. G.; Guo, X. Q.; Zhu, Q. Z.; Zhao, Y. B. Study on the Interaction between Rivanol and DNA and Its Application to DNA Assay. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1997**, *53* (5), 781–787. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(97\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(97)00015-2).
- (50) 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.
- (51) Trott, O.; Olson, J. A. 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.
- (52) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (53) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Pique, M. E.; Lindstrom, W. L.; Huey, R.; Hart, W. E.; Halliday, S.; Belew, R.; Olson, A. J. *AutoDock Version 4.2*; 2014.
- (54) EF, P.; TD, G.; CC, H.; GS, C.; DM, G.; EC, M.; Ferrin TE. UCSF Chimera: A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612.
- (55) Schrödinger Release 2019-2. Maestro, Schrödinger, LLC. New York, NY 2019.
- (56) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (57) Clark, J.; Greenbaum, A.; Slater, T. Effects of Tetrazolium Salts on Oxidative Phosphorylation in Rat-Liver Mitochondria. *Biochem. J.* **2015**, *94* (3), 651–654. <https://doi.org/10.1042/bj0940651>.
- (58) Laffon, B.; Fernández-Bertólez, N.; Costa, C.; Pásaro, E.; Valdíglesias, V. Comparative Study of Human Neuronal and Glial Cell Sensitivity for in Vitro Neurogenotoxicity Testing. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *102*, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.005>.

- (59) 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. <https://doi.org/10.1002/ejic.200400211>.
- (60) Janiak, C. A Critical Account on N- π Stacking in Metal Complexes with Aromatic Nitrogen-Containing Ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, No. 21, 3885–3896. <https://doi.org/10.1039/b003010o>.
- (61) Avasthi, K.; Shukla, L.; Kant, R.; Ravikumar, K. Folded Conformations Due to Arene Interactions in Dissymmetric and Symmetric Butylidene-Linker Models Based on Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine, Purine and 7-Deazapurine. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2014**, 70 (6), 555–561. <https://doi.org/10.1107/S2053229614009449>.

6. Anexos.

6.1. Caracterización.

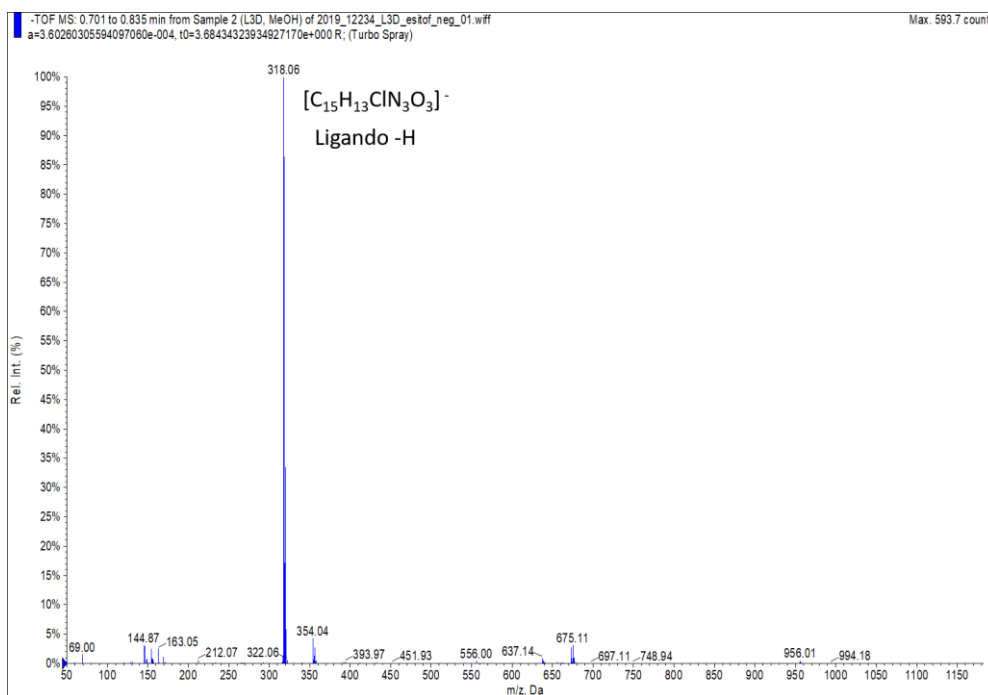


Figura 43 - Espectro de masas ESI- del compuesto L1.

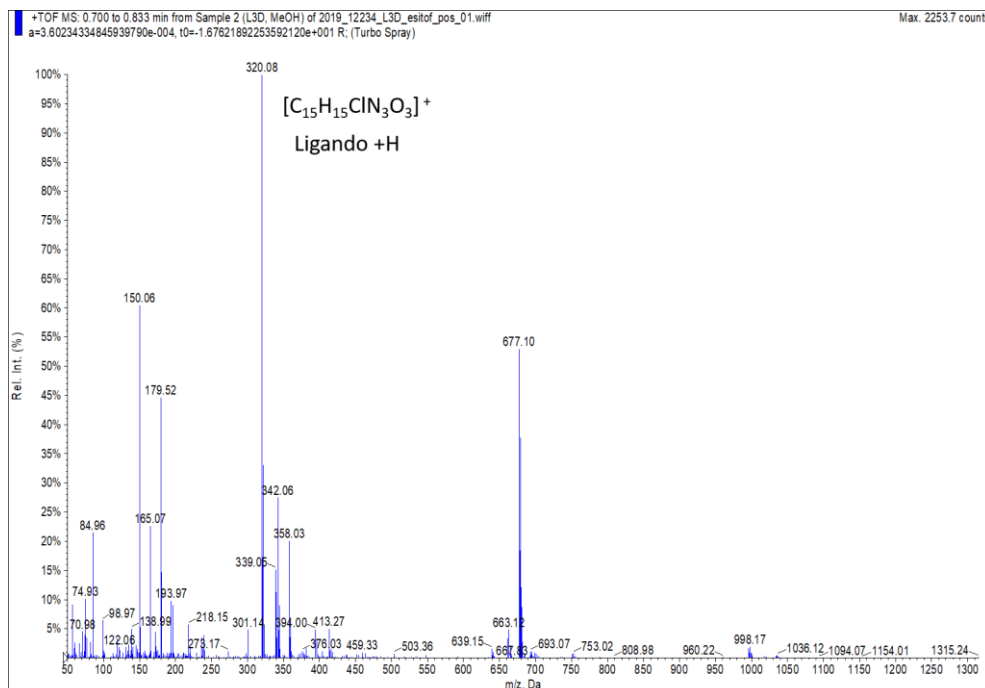


Figura 44 - Espectro de masas ESI+ del compuesto L1.

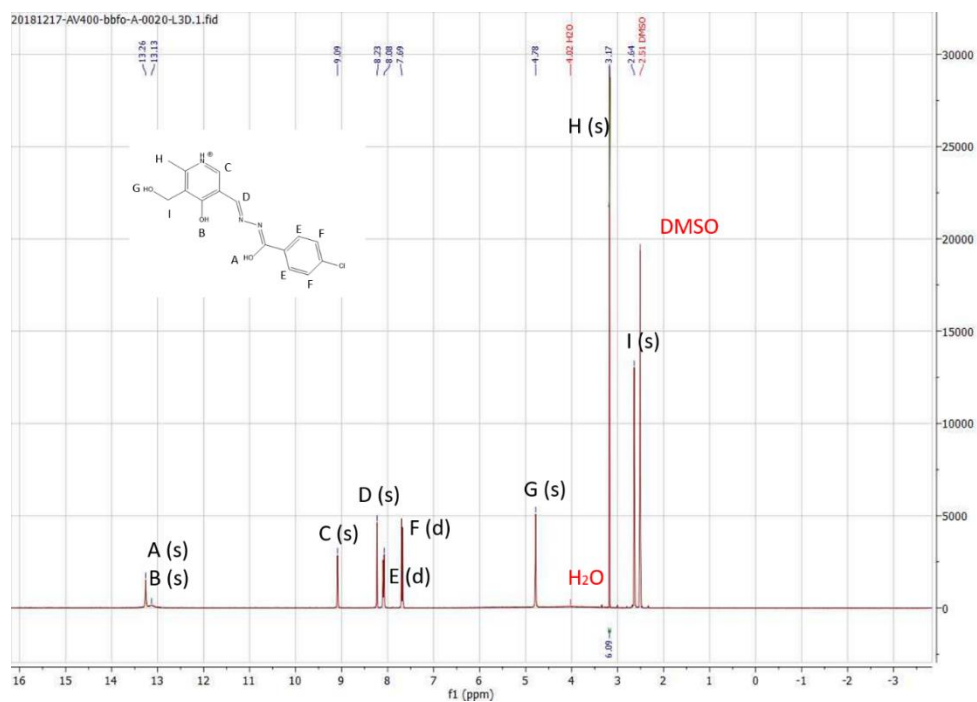


Figura 45 - Espectro de RMN del compuesto L1.

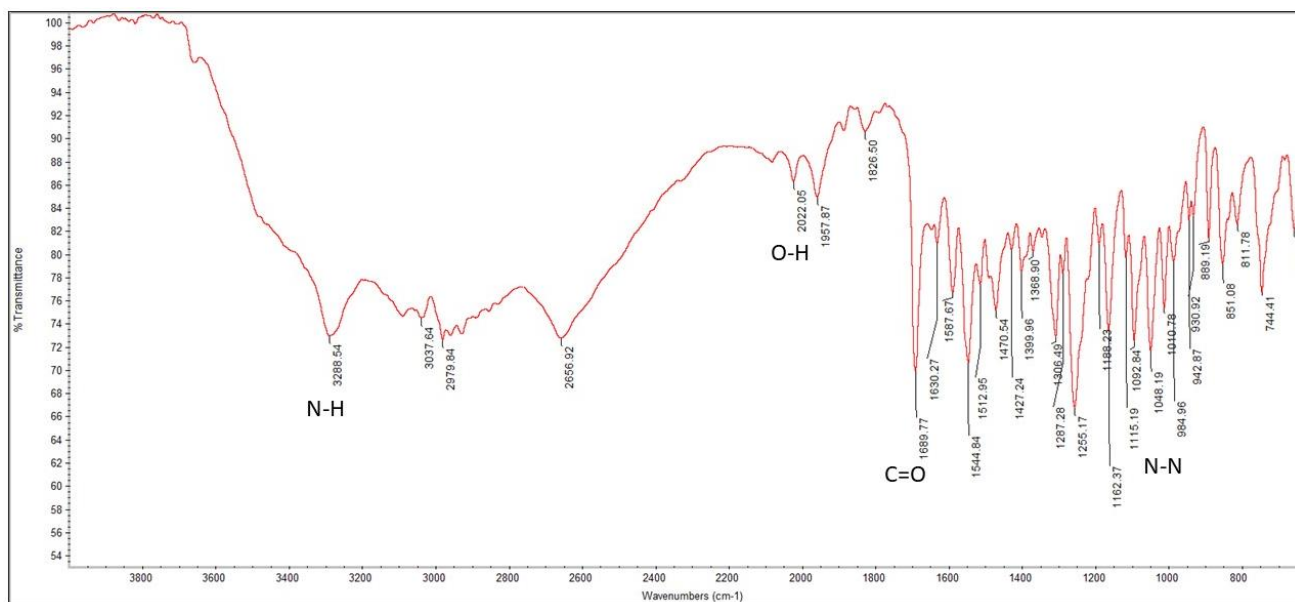


Figura 46 - Espectro de IR del compuesto L1.

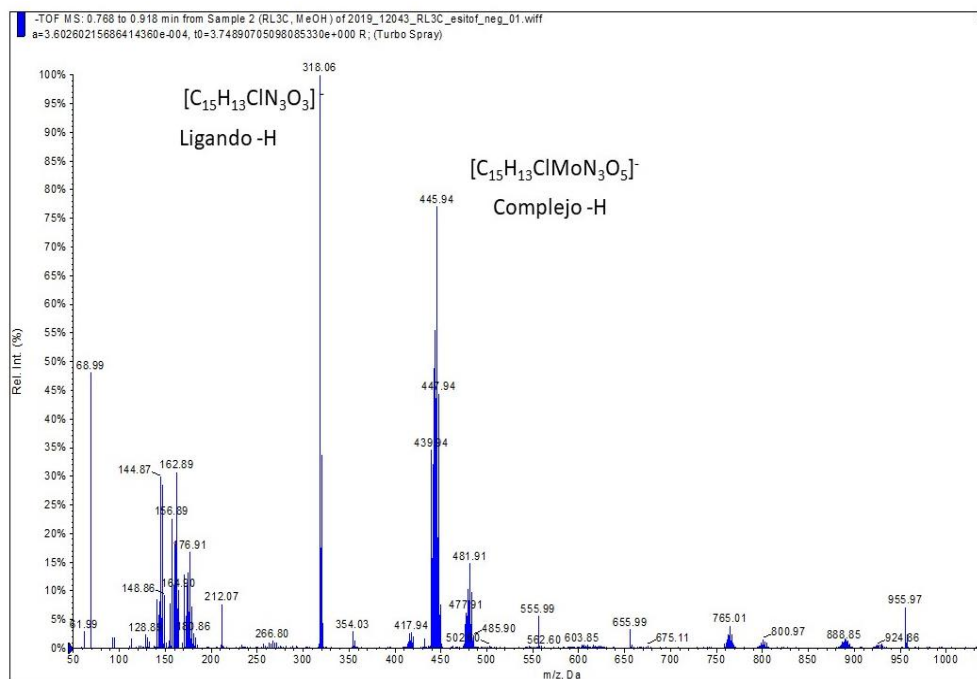


Figura 47 - Espectro de masas ESI- del compuesto L1C.

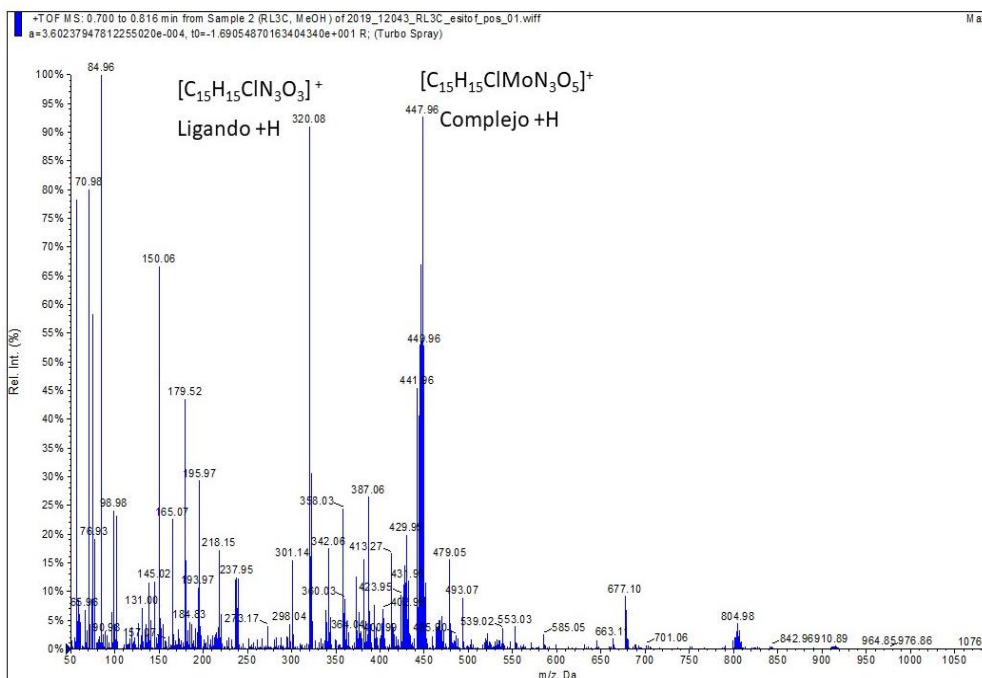


Figura 48 - Espectro de masas ESI+ del compuesto L1C.

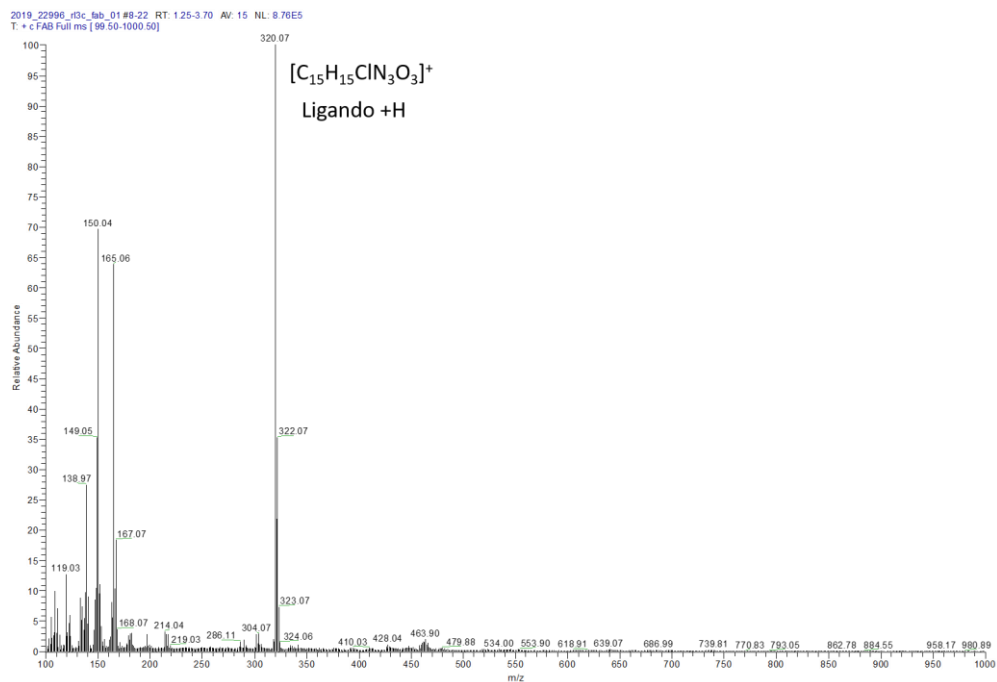


Figura 49 - - Espectro de masas FAB en tioglicerol del compuesto L1C.

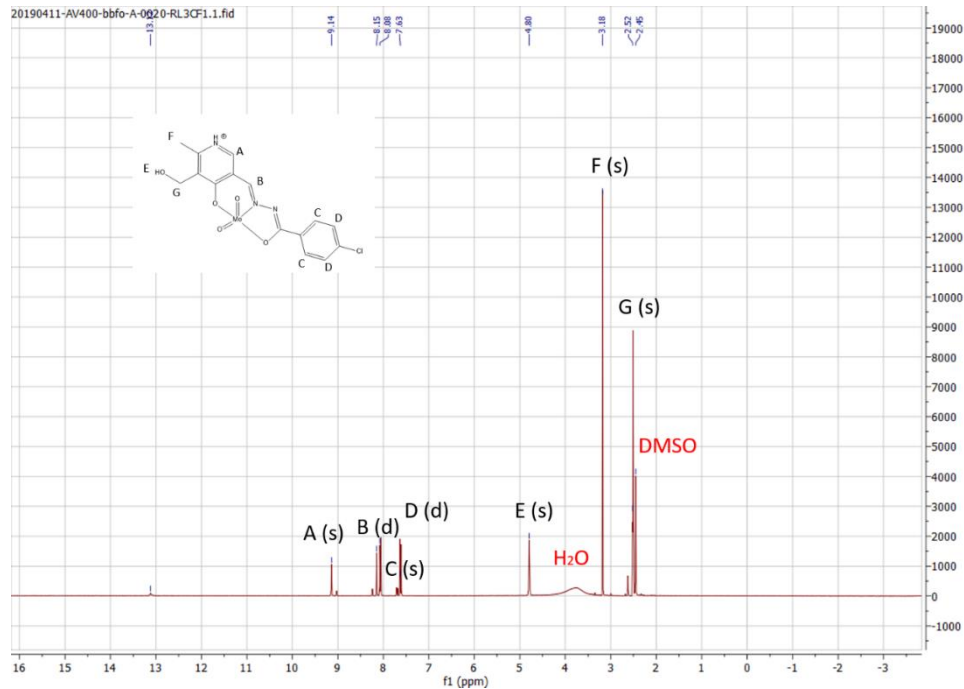


Figura 50 - Espectro de RMN del compuesto L1C.

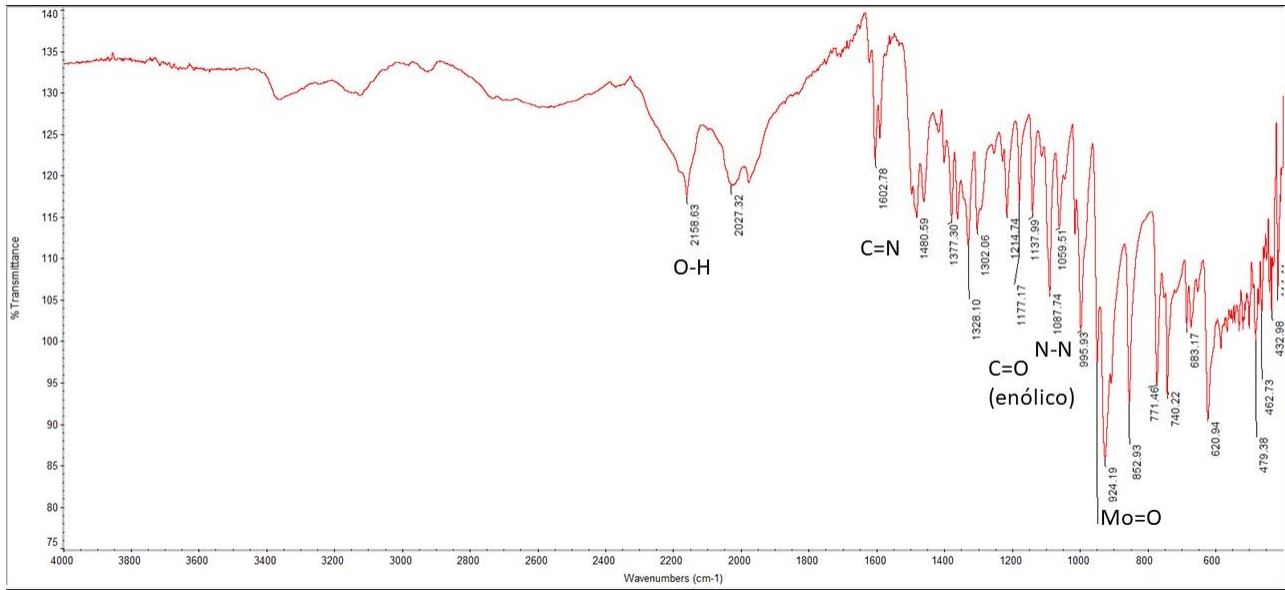


Figura 51 - Espectro de IR del compuesto L1C.

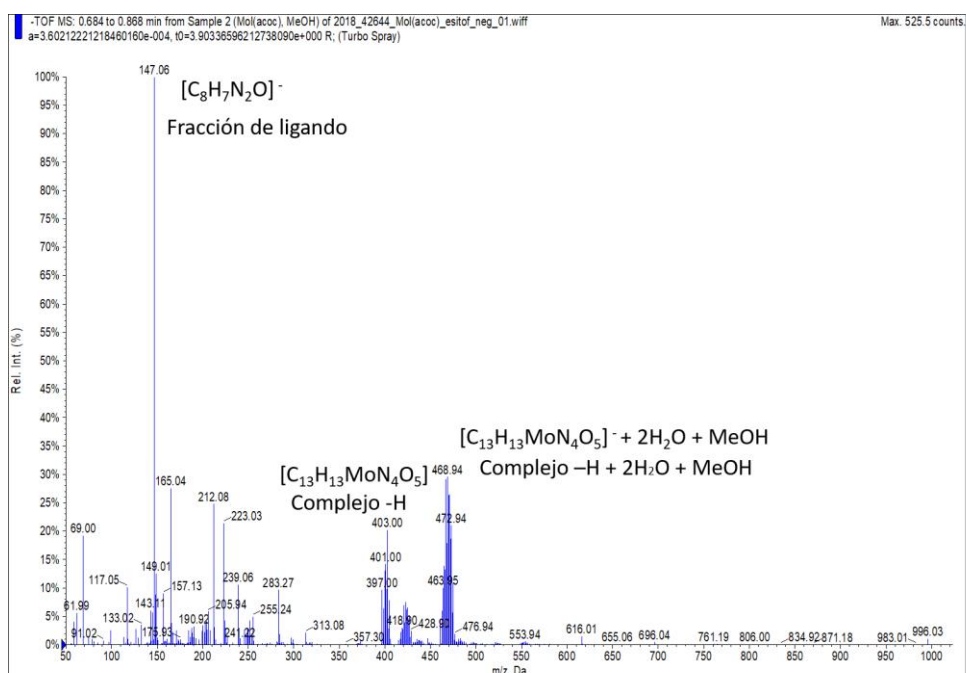


Figura 52 - Espectro de masas ESI- del compuesto C2.

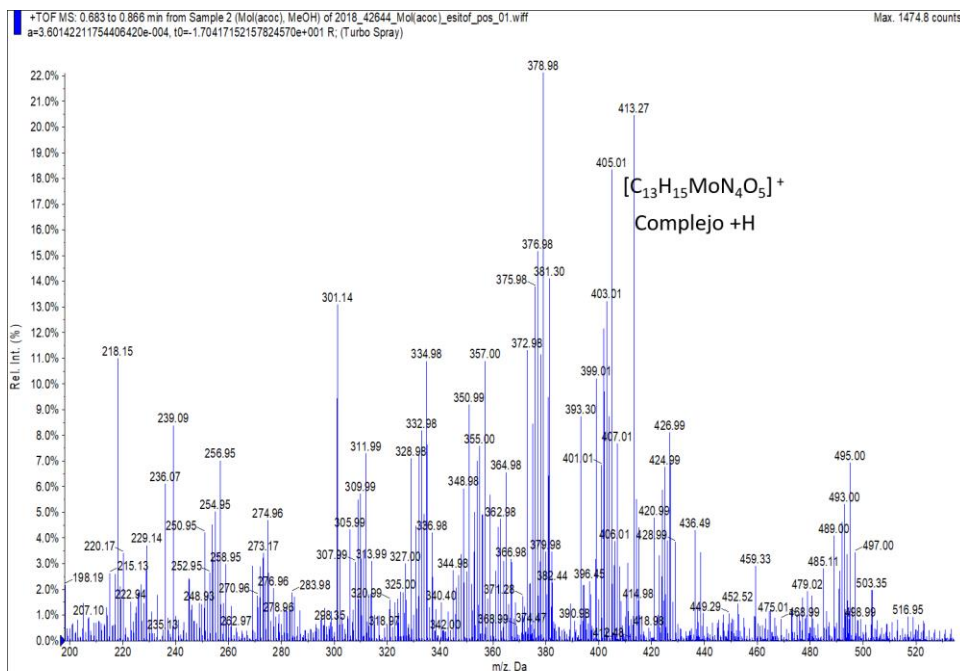


Figura 53 - Espectro de masas ESI+ del compuesto C2.

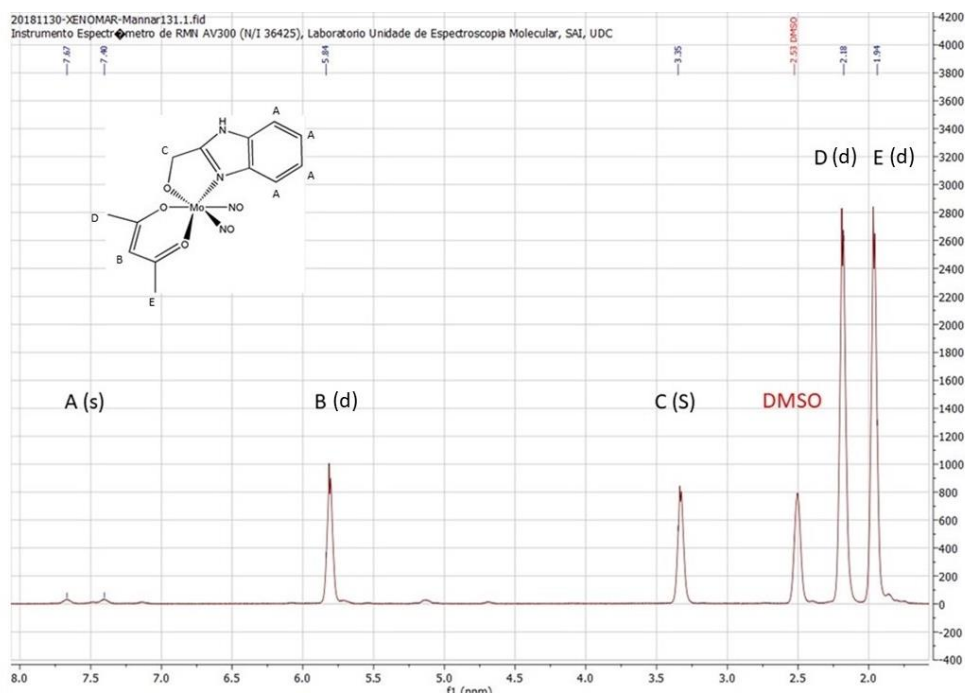


Figura 54 - Espectro de RMN del compuesto C2.

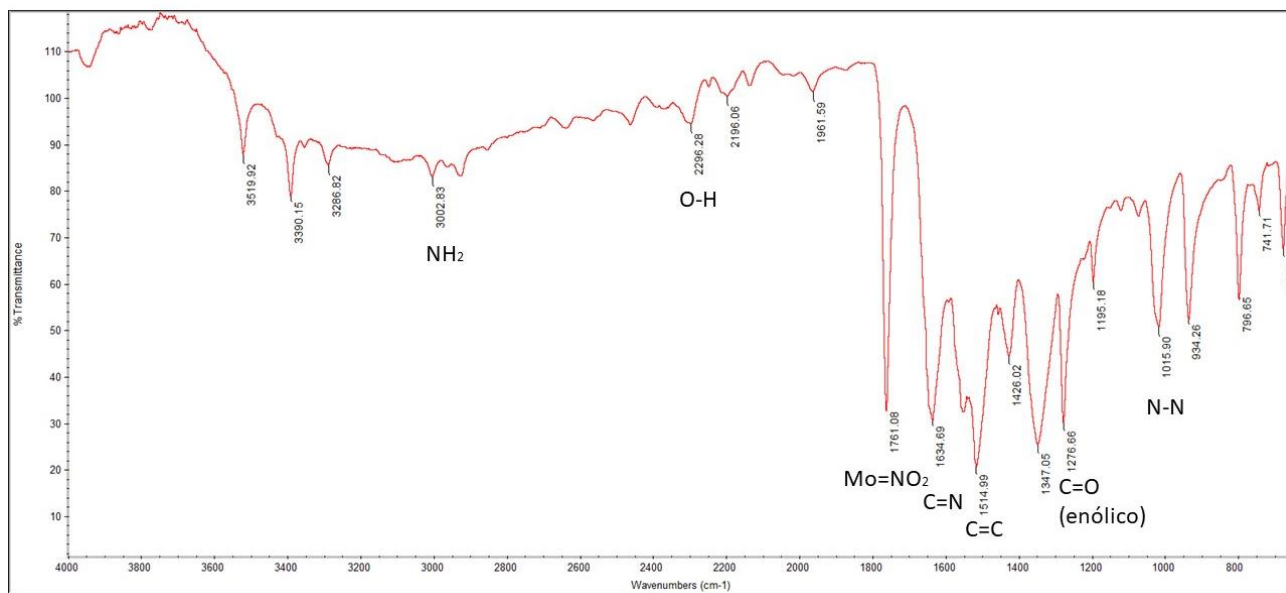


Figura 55 - Espectro de IR del compuesto C2.

6.2. Cristalografía.

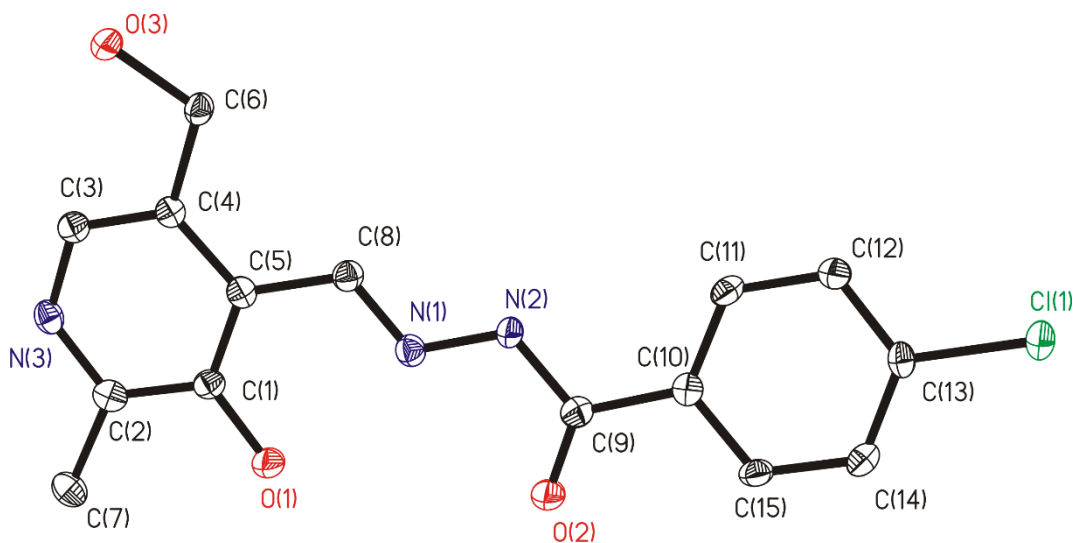


Figura 56 - Imagen del compuesto L1 obtenido mediante el programa SHELXTL.⁴⁰ Los elipsoides se representan al 50% de probabilidad

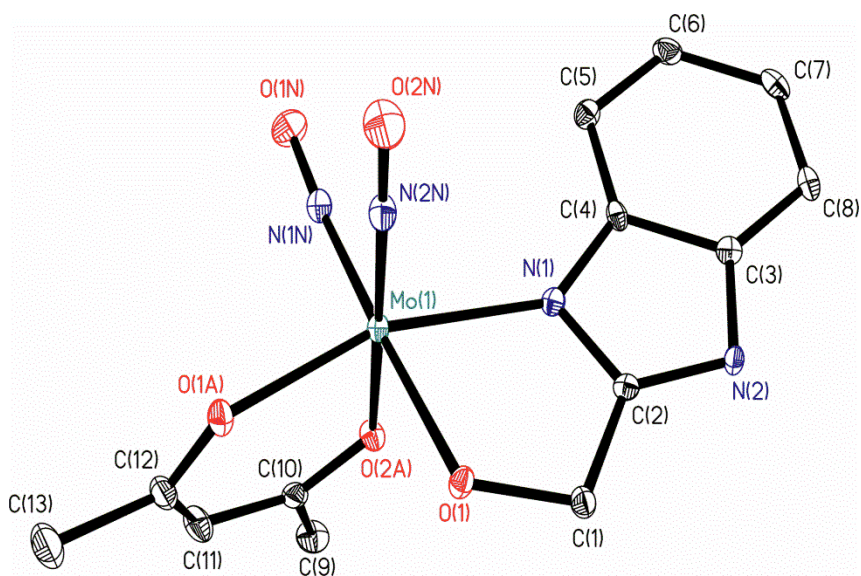


Figura 57 - Imagen del compuesto C2 obtenido mediante el programa SHELXTL.⁴⁰ Los elipsoides se representan al 50% de probabilidad

Tabla 5 - Datos cristalográficos de L1.

Código identificativo	L1	
Fórmula empírica	C ₃₁ H ₃₄ Cl ₄ N ₆ O ₇	
Peso de la fórmula	744,44	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P $\bar{1}$	
Dimensiones de la celda unidad	a = 7,9828(8) Å b = 13,6339(14) Å c = 15,4881(15) Å	$\alpha = 86,131(3)^\circ$. $\beta = 86,588(3)^\circ$. $\gamma = 89,024(3)^\circ$.
Volumen	1678,7(3) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1,473 Mg/m ³	
Coeficiente de absorción	0,409 mm ⁻¹	
F(000)	772	
Tamaño del cristal	0,15 x 0,13 x 0,09 mm ³	
Intervalo de theta	1,32 to 26,42°.	
Intervalos de indexación	-9<=h<=9, -17<=k<=17, -19<=l<=19	
Reflexiones recogidas	49669	
Reflexiones independientes	6847 [R(int) = 0,0513]	
Completitud	99,5 %	
Transmisión max. y min.	0,9641 and 0,9397	
Método de refinado	Mínimos cuadrados de matriz completa sobre F ²	
Datos / restricciones / parámetros	6847 / 0 / 517	
Bondad de ajuste a F ²	1,109	
índices finales de R [I>2sigma(I)]	R ₁ ^a = 0,0352, wR ₂ = 0,0913	
índices R	R ₁ = 0,0496, wR ₂ ^b = 0,1115	
Densidad electrónica residual	0,268 y -0,316 e.Å ⁻³	

$${}^a R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad {}^b wR_2 = \left\{ \frac{\sum [w(|F_o|^2 - |F_c|^2)]^2}{\sum [w(F_o^2)]} \right\}^{1/2}$$

Tabla 6 - Datos cristalográficos de C2.

Código identificativo	C2	
Fórmula empírica	C ₁₃ H ₁₄ Mo N ₄ O ₅	
Peso molecular	402,22	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /c	
Dimensiones de la celda unidad	a = 10,5910(4) Å	α = 90°
	b = 9,5446(4) Å	β = 92,826(3)°
	c = 15,7530(7) Å	γ = 90°
Volumen	1590,48(11) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1,680 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0,855 mm ⁻¹	
F(000)	808	
Tamaño del cristal	0,19 x 0,15 x 0,08 mm ³	
Intervalo de theta	1,93 to 25,13°.	
Intervalo de indexación	-12<=h<=12, -11<=k<=11, -18<=l<=18	
Reflexiones recogidas	16424	
Reflexiones independientes	2835 [R(int) = 0.0469]	
Compleitud	99,8 %	
Transmisión max. y min.	0,9387 and 0,8544	
Método de refinado	Mínimos cuadrados de matriz completa sobre F ²	
Datos / restricciones / parámetros	2835 / 0 / 264	
Bondad de ajuste a F ²	1,198	
índices finales de R [I>2sigma(I)]	R ₁ ^a = 0,0280, wR ₂ = 0,0751	
índices R	R ₁ = 0,0386, wR ₂ ^b = 0,1011	
Densidad electrónica residual	0,643 and -0,646 e.Å ⁻³	

$${}^a R_1 = \sum || F_o | - | F_c || / \sum | F_o | . \quad {}^b wR_2 = \{ \sum [w (| F_o|^2 - | F_c|^2)^2] / \sum [w (F_o^2)^2] \}^{1/2}$$

6.3. Molecular Docking.

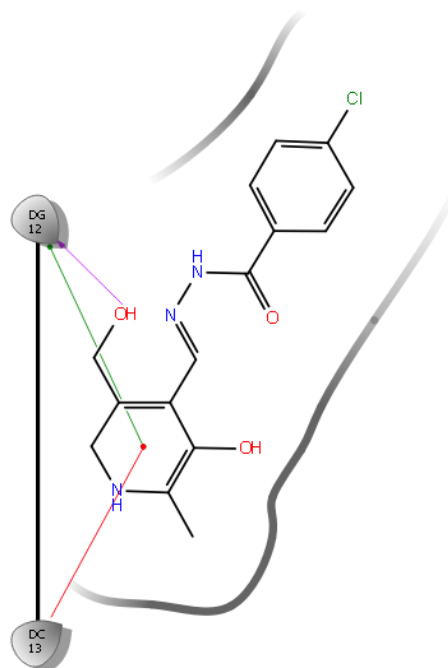


Figura 58- Interacciones del compuesto L1 con el ADN. La flecha morada representa un enlace de H. Las líneas verdes y rojas representan interacciones mediante π - π stacking entre el anillo aromático del compuesto y las bases nitrogenadas Guanina 12 y citosina 13.

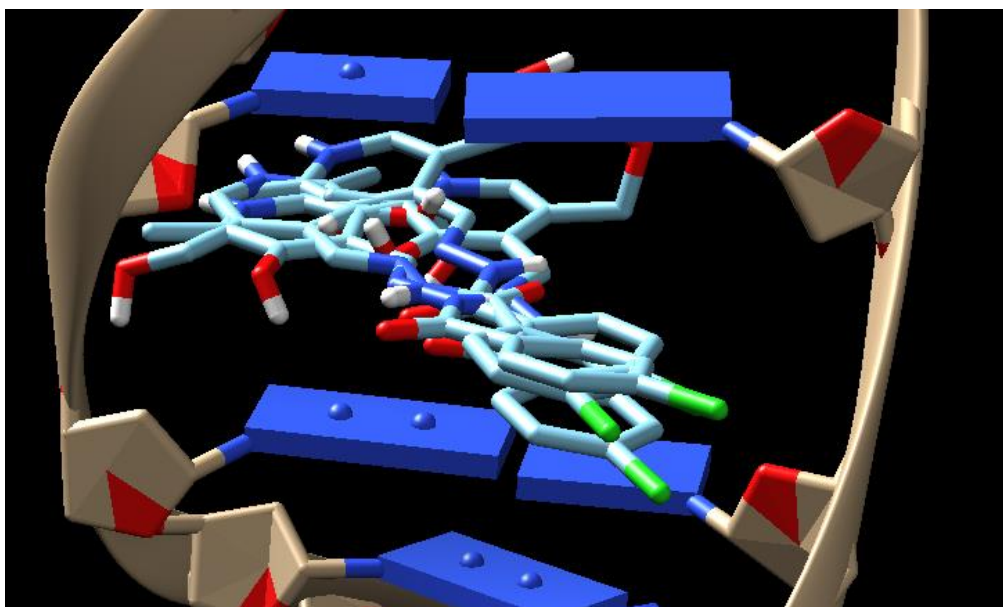


Figura 59 - Cuatro poses de interacción más favorables para la unión del compuesto L1 con el ADN. La elevada convergencia de estas indica un modo de unión probable.

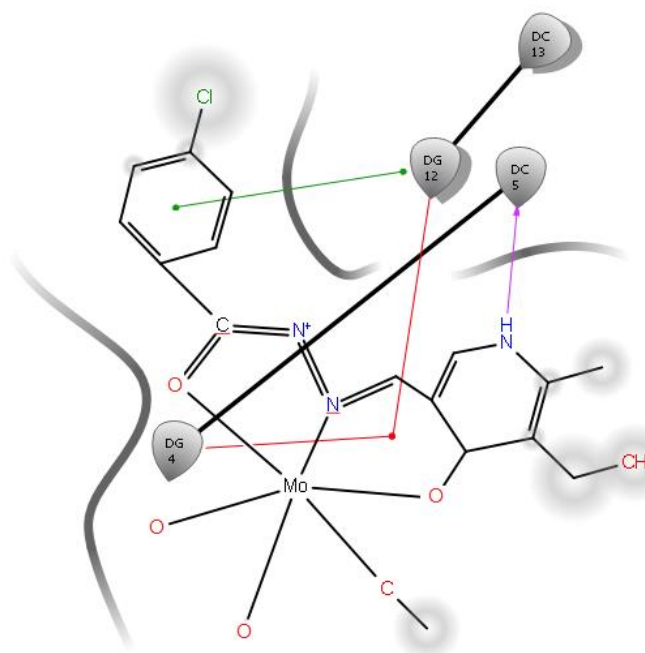


Figura 60- Interacciones del compuesto L1C con el ADN. La flecha morada representa un enlace de H. Las líneas verdes y rojas representan interacciones mediante π - π stacking entre las zonas de elevada carga π y las bases nitrogenadas Guanina 4 y 12.

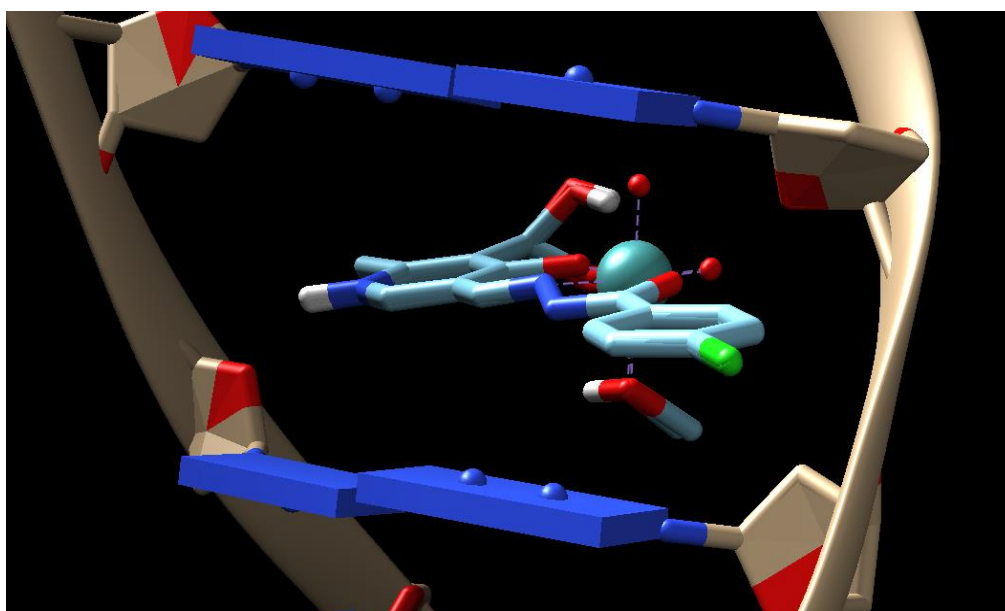


Figura 61 - Cinco poses de interacción más favorables para la unión del compuesto L1C con el ADN. La elevada convergencia de estas indica un modo de unión muy probable.

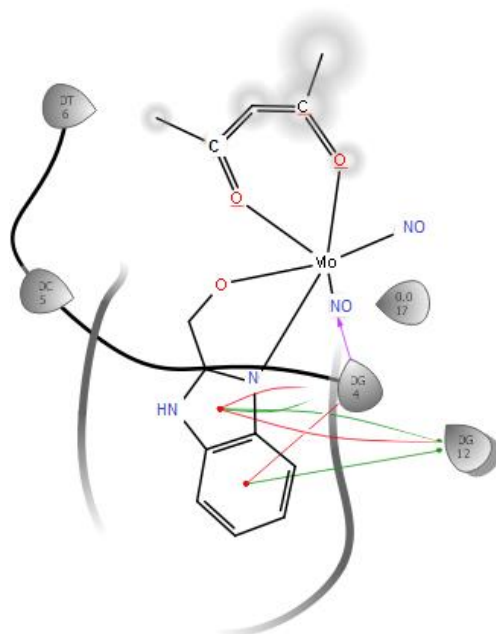


Figura 62- Interacciones del compuesto C2 con el ADN. La flecha morada representa un enlace de H. Las líneas verdes y rojas representan interacciones mediante π - π stacking entre las zonas de elevada carga π y las bases nitrogenadas Guanina 4 y 12.

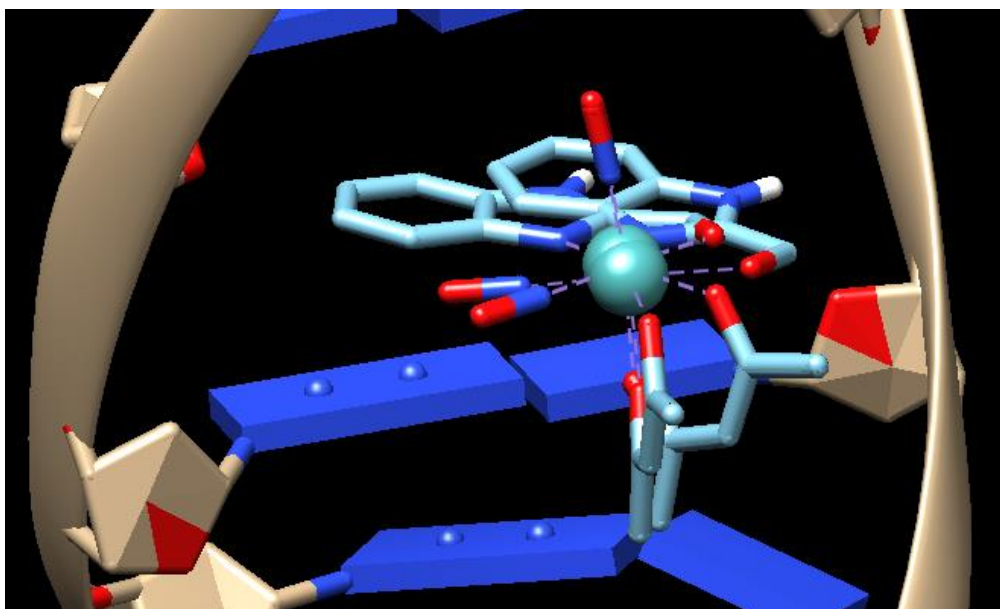


Figura 63 - Tres poses de interacción más favorables para la unión del compuesto C2 con el ADN. La alta convergencia indica un modo de unión probable.

6.4. Cronograma.

