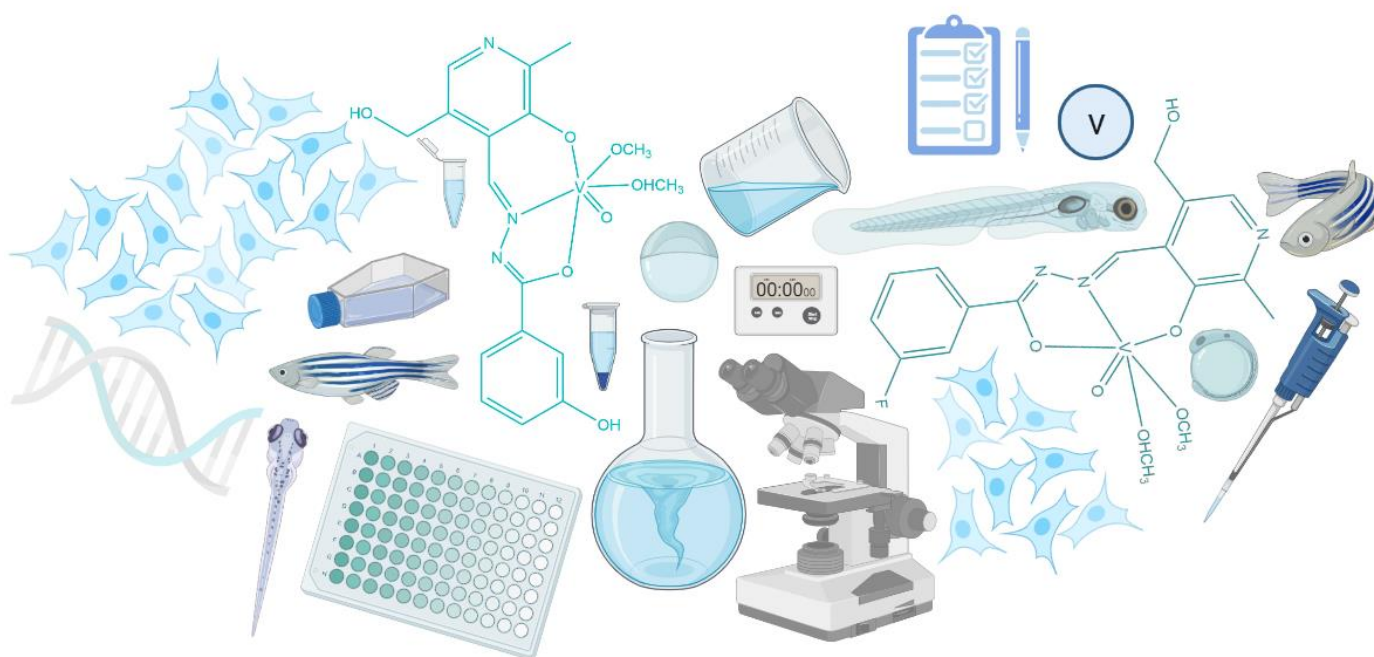


# Síntesis, caracterización y comportamiento biológico de hidrazonas derivadas de piridoxal y de sus complejos de vanadio.

Autora: Lucía Mato López

Tesis doctoral UDC/2021



Directores: Dr. Fernando Francisco Avecilla Porto

Dra. Vanessa Valdiglesias García

Programa de doctorado en ciencia y tecnología ambiental.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Síntesis, caracterización y comportamiento biológico de  
hidrazonas derivadas de piridoxal y de sus complejos de  
vanadio.

Autor: Lucía Mato López

---

Directores: Dr. Fernando Francisco Avecilla Porto

Dra. Vanessa Valdiglesias García



UNIVERSIDADE DA CORUÑA





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dr. FERNANDO FRANCISCO AVECILLA PORTO

Dra. VANESSA VALDIGLESIAS GARCÍA

Fdo.:.....

Fdo.:.....

LUCÍA MATO LÓPEZ

Fdo.:.....



## AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento son como no para el Dr. Fernando Francisco Avecilla Porto y la Dra. Vanessa Valdiglesias García, gracias por abrirme las puertas para llevar a cabo este proyecto, por vuestro apoyo, paciencia, consejos, y por dejarme admirar y aprender de todo lo que sabéis.

A mi pareja Andrés, que me acompañó día tras día a lo largo de estos años, gracias por no dejarme tirar la toalla, por escucharme, aconsejarme y ayudarme en los momentos en los que me vine abajo.

En tercer lugar, pero no menos importante a mis padres, siempre preocupados, los cuales a pesar de no entender mucho de química y biología me preguntaban todos los días por mis avances. Soy un trozo vuestro, un cúmulo de cariño y amor, gracias por inculcarme vuestros valores, sois y siempre seréis insuperables, mis héroes. Gracias por hacer que me sienta orgullosa de mí y deseo que vosotros también.

A mi hermana Cristina y mis abuelos, vuestras dosis de chocolate, cariño, apoyo y preocupación también forma parte de este proyecto, gracias por estar conmigo.

Mi tía Carmen M., que decir de todo el tiempo de escucha activa que me regalaste, estaré eternamente agradecida de tú paciencia y consejos antiestrés.

Todo laboratorio tiene sus anécdotas, cotilleos y risas, en mi caso los protagonistas y compañeros que tuve la suerte de conocer: Antía S., Antía M., Miguel R. y Anabel A., gracias por vuestra compañía y apoyo desde el primer día, me llevo muchas historias y un enorme lazo de amistad.

Por último, la Dra. Natalia F. y la Dra. M<sup>a</sup> Luz D. dos pilares fundamentales en este trabajo, gracias por vuestro enorme apoyo en la parte experimental y por dejarme trabajar en vuestros rincones del laboratorio de dónde me llevo un montón de trucos en el bolsillo.

¡Gracias de todo corazón!





Índice

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1. Química bioinorgánica y farmacología. ....</b>	<b>26</b>
<b>1.2. El cáncer: desarrollo y tipología. ....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.1. Causas y factores en el desarrollo del cáncer. ....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.2. El cáncer en la población española. El cáncer de pulmón. ....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.3. Tratamientos frente al cáncer. ....</b>	<b>33</b>
<b>1.3. Antecedentes metalofármacos en terapias antitumorales.....</b>	<b>35</b>
<b>1.3.1. Cis-platino.....</b>	<b>35</b>
<b>1.3.2. Otros metalofármacos con propiedades antitumorales. ....</b>	<b>36</b>
<b>1.4. La química del vanadio.....</b>	<b>47</b>
<b>1.4.1. Características generales y aplicaciones farmacológicas.....</b>	<b>47</b>
<b>1.4.2. Características específicas para su estudio como antitumoral. ....</b>	<b>50</b>
<b>1.4.3. Compuestos de vanadio como antitumorales. ....</b>	<b>51</b>
<b>1.5. Hidrazonas.....</b>	<b>54</b>
<b>1.5.1. Compuestos de hidrazonas y sus propiedades biológicas. ....</b>	<b>54</b>
<b>1.6. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad: MTT.....</b>	<b>59</b>
<b>1.7. El pez cebra como modelo de ensayos <i>in vivo</i>. ....</b>	<b>60</b>
<b>2. Objetivos. ....</b>	<b>68</b>
<b>3. Material y métodos. ....</b>	<b>70</b>
<b>3.1 Estudios químicos.....</b>	<b>70</b>
<b>3.1.1 Síntesis. ....</b>	<b>70</b>
<b>3.1.2 Caracterización.....</b>	<b>73</b>

3.1.2.1	Análisis elemental. ....	73
3.1.2.2	Espectrometría de masas. ....	73
3.1.2.3	Espectroscopia RMN <sup>1</sup> H. ....	74
3.1.2.4	Espectroscopia IR ....	74
3.1.2.5	Difracción de rayos X de monocristal.....	74
3.2	Estudios <i>in vitro</i> : determinación de la citotoxicidad. ....	75
3.2.1	Cultivo celular y tratamientos. ....	75
3.2.2	Ensayo de citotoxicidad MTT. ....	76
3.2.4	Análisis estadístico de los datos ....	78
3.3	Evaluación toxicológica <i>in vivo</i> : ensayo FET en pez cebra ....	79
3.3.1	Mantenimiento de ejemplares adultos ....	79
3.3.2	Obtención de huevos fecundados ....	79
3.3.3	Ensayo FET ....	80
4.	Resultados y Discusión ....	84
4.1	Resultados de la caracterización estructural.....	84
4.1.1	Análisis elemental.....	84
4.1.2	Espectrometría de masas. ....	86
4.1.3	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H.....	90
4.1.4	Espectroscopia de IR.....	92
4.1.5	Difracción de rayos X de monocristal ....	94
4.2	Discusión de resultados de los experimentos de caracterización estructural 102	
4.3	Estudios de toxicidad <i>in vitro</i> .....	108
4.4	Estudio de toxicidad y efectos teratogénicos en pez cebra. ....	114
5.	Conclusiones ....	122
6.	Anexos.....	126
7.	Bibliografía ....	154

**ABREVIATURAS**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ADP:** adenosín difosfato.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ATP:** adenosín trifosfato.

**ANOVA:** análisis de varianza.

**CN:** control negativo.

**CP:** control positivo.

**CS:** control solvente.

**DMEN:** Dulbecco's modified Eagle medium (medio de cultivo).

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**ESI-TOF:** ionización con electrospray con analizador tiempo de vuelo.

**FET:** *Fish Embryo Acute Toxicity Test*.

**HEPES:** tampón de ácido sulfónico de ion híbrido.

**Hpf:** horas post fecundación.

**INE:** Instituto Nacional de Estadística.

**IR:** infrarrojo.

**LC<sub>50</sub>:** concentración letal media.

**LDH:** encima lactato deshidrogenasa.

**MeOH:** metanol.

**MTT:** bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.

**MS-222:** metanosulfonato de tricaína.

**PBS:** tampón fosfato salino.

**p-valor:** valor de la probabilidad.

**RMN <sup>1</sup>H:** resonancia magnética nuclear de protón.

**RN:** rojo neutro.

**ROS:** especies reactivas de oxígeno.

**uma:** unidades de masa atómica.

**UV:** ultravioleta visible.

**VIH:** virus de inmunodeficiencia humana.

**WST:** 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio.

**XTT:** 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2Htetrazolio-5-carboxianilida.

### **Compuestos**

**L<sup>1</sup>:** Cloruro de (E)-4-((2-(3-fluorobenzoil)hidraziniliden)metil)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-1-ium.

**L<sup>2</sup>:** Cloruro de (E)-4-((2-(3-hidroxibenzoil)hidraziniliden)metil)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-1-ium.

**L<sup>3</sup>:** Cloruro de (E)-4-((2-(4-clorobenzoil)hidraziniliden)metil)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-1-ium.

**L<sup>4</sup>:** Cloruro de (E)-4-((2-(3-metoxibenzoil)hidraziniliden)metil)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-1-ium.

**L<sup>1c</sup>:** Complejo de vanadio(V) de L<sup>1</sup>.

**L<sup>2c</sup>:** Complejo de vanadio(V) de L<sup>2</sup>.

**L<sup>3c</sup>:** Complejo de vanadio(V) de L<sup>3</sup>.

**L<sup>4c</sup>:** Complejo de vanadio(V) de L<sup>4</sup>.

### ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.-** Representación esquemática del ciclo celular. Creada con BIOREDER.

**Figura 2.-** Porcentaje de agentes infecciosos que producen cáncer. Fuente OMS.

**Figura 3.-** Gráfica de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en Europa. Fuente OMS.

**Figura 4.-** Gráfica de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. Fuente OMS.

**Figura 5.-** Ligando de polipiridilo que se utiliza para complejar al Ru.

**Figura 6.-** Complejo de cobalto con dos ligandos fenantrolina.

**Figura 7.-** Complejo de cobre con fenantrolina como ligandos.

**Figura 8.-** Complejo de iridio con un ligando derivado de fenantrolina.

**Figura 9.-** Esquema de base Schiff.

**Figura 10.-** Complejos metálicos con un ligando derivado de base Schiff.

**Figura 11.-** Complejo con Zn y una base de Schiff.

**Figura 12.-** Complejo de hierro con diferentes ligandos derivados de bases de Schiff.

**Figura 13.-** Complejo de rutenio con ligando derivado de benzohidrazona.

**Figura 14.-** Bencimidazol.

**Figura 15.-** Quinolina.

**Figura 16.-** Complejos de cobre con ligandos derivados de quinoleína.

**Figura 17.-** Complejo de hierro con ligandos fotoactivos.

**Figura 18.-** Complejo de oro con ligando derivado del grupo alquinilo.

**Figura 19.-** Complejos de renio con ligandos indol-pirazolina.

**Figura 20.-** Complejo de vanadio con ligandos derivados de aronylhidrazones.

**Figura 21.-** Complejo de vanadio con un ligando derivado de base Schiff.

**Figura 22.-** Complejo de oxidovanadio con el flavonoide crisina.

**Figura 23.-** Complejo de vanadio con ligando derivado de base Schiff.

**Figura 24.-** Esquema de las propiedades más destacadas de las hidrazonas.

**Figura 25.-** Hidrazonas con diferentes grupos funcionales. R= *o*-NO<sub>2</sub>, *o*-Cl, *p*-F, *p*-OH, *p*-CH<sub>3</sub>, *o*-OH, *m*-OH, H, *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o *m*-Br.

**Figura 26.-** Complejos metálicos con ligandos hidrazona.

**Figura 27.-** Derivados de arilhidrazonas de naproxeno.

**Figura 28.-** Hidrazonas derivadas de 1,3-benzotiazol-2-il-sulfanil con X = F, Cl y Br.

**Figura 29.-** Hidrazonas derivadas de ferroceno que contienen grupos quinoleína.

**Figura 30.-** Familia de hidrazonas derivadas de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído.

**Figura 31.-** Reducción de MTT a formazán.

**Figura 32.-** Representación gráfica simplificada del desarrollo embrionario del pez cebra. Modificada de Kimmel et al. (1995).

**Figura 33.-** Esquema de la ruta de síntesis llevada a cabo para la obtención de los ligandos hidrazona, donde R es: L<sup>1</sup>, R=F; L<sup>2</sup>, R=OH; L<sup>3</sup>, R=Cl y L<sup>4</sup>, R= OCH<sub>3</sub>.

**Figura 34.-** Esquema del proceso de síntesis y filtrado. Creado con BioRender.

**Figura 35.-** Esquema de la ruta sintética utilizada para la obtención de los complejos. L<sup>1</sup>, R=F; L<sup>2</sup>, R=OH; L<sup>3</sup>, R=Cl y L<sup>4</sup>, R= OCH<sub>3</sub>.

**Figura 36.-** Representación gráfica de la placa de 96 pocillos. En ella representamos la distribución de los CN (control negativo), CP (control positivo) y las diferentes concentraciones testadas en μM. Con las tonalidades en violeta se representa la posible variación de cristales de formazán. Creado con BioRender.

**Figura 37.-** Esquema resumen del proceso a seguir para la realización del ensayo de MTT. Creado con BioRender.

**Figura 38.-** Esquema explicativo del proceso de obtención de embriones para la prueba FET. Creado con BioRender.

**Figura 39.-** Distribución de las diferentes concentraciones de los compuestos a testar y de los controles en placas. PC (control positivo) CS (control solvente) y NC (control negativo).

**Figura 40.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando L<sup>1</sup> y las estructuras correspondientes a los cationes: [L<sup>1</sup>+H]<sup>+</sup> m/z=304,11 uma, [NaL<sup>1</sup>]<sup>+</sup> m/z=326,09 uma y para [K(L<sup>1</sup>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> m/z=645,17 uma.

**Figura 41.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando L<sup>1</sup> y estructuras correspondientes a los aniones, [L<sup>1</sup>-H]<sup>-</sup> m/z=302,09 uma, [L<sup>1</sup>Cl]<sup>-</sup> m/z = 338,07 uma y para la especie [(L<sup>1</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup> m/z= 641,17 uma.

**Figura 42.-** Espectro de RMN<sup>-1</sup>H en dmsó-d<sub>6</sub> para el ligando L<sup>1</sup>.

**Figura 43.-** Espectro de RMN<sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el complejo L<sup>1</sup>c.

**Figura 44.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>1</sup> con las bandas más intensas:  $\nu(\text{NH})$  a 3317 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=O})$  a 1682 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=C})$  a 1471-1622 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=N})$  a 1540 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 45.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>1</sup>c con las bandas más intensas:  $\nu(\text{NH})$  a 3172 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=O})$  a 1594 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=C})$  a 1582 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C=N})$  a 1504 cm<sup>-1</sup>,  $\nu(\text{C-O})$  a 1223 cm<sup>-1</sup> y  $\nu(\text{V=O})$  a 975 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 46.-** ORTEP de las unidades asimétricas de los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>. Todos los átomos que no son hidrógenos se presentan con elipsoides al 50 %. En la unidad asimétrica del compuesto L<sup>3</sup> se pueden observar dos moléculas, las cuales interactúan a través de sus nubes  $\pi$  y entre los pares de no enlace de los átomos de cloro con estos anillos.

**Figura 47.-** ORTEP del catión complejo  $[\text{VO}(\text{L}^2\text{-H})(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3\text{OH})]^+$  en L<sup>2</sup>c (arriba) y del complejo neutro  $[\text{VO}_2(\text{L}^3\text{-H})]$  en L<sup>3</sup>c (abajo). Los elipsoides de probabilidad son al 50%. Los átomos de hidrógeno se han suprimido para mayor simplicidad.

**Figura 48.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> y L<sup>4</sup> evaluada mediante ensayo MTT a 24h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (control negativo). CP: control positivo.

**Figura 49.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los complejos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c evaluada mediante ensayo MTT a 24h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (control negativo). CP: control positivo.

**Figura 50.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup> evaluada mediante ensayo MTT a 48h. Los valores con \*\* $P < 0,01$  \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (control negativo). CP: control positivo.

**Figura 51.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c evaluada mediante ensayo MTT a 48h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (control negativo). CP: control positivo.

**Figura 52.-** Foto de un embrión de pez cebra a las 28h post-fecundación donde se observa la cristalización del compuesto L<sup>3</sup>c. Foto tomada con Iphone 6 en esteromicroscopio Nikon SMZ1500 a 112,5x aumentos.

**Figura 53.-** A. Embrión con presencia de Edema pericárdico (ED) a las 96 hpf con el compuesto L<sup>3</sup>c a 300  $\mu\text{M}$ . B. Embrión con presencia de leve lordosis (L) a las 96 hpf

con el compuesto L<sup>4c</sup> a 300 µM. C. Embrión con presencia de leve lordiosis (L), Edema en el saco vitelino (ESV) y hipertrofia en la aleta caudal (H) a las 96 hpf con el compuesto L<sup>3c</sup> a 300 µM. D. Embrión con desarrollo normal (control negativo). Fotografías tomadas con Nikon EC-8CF E950 a 100X.

**Figura 54.-** Toxicidad del compuesto L<sup>3</sup>, muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

**Figura 55.-** Toxicidad del compuesto L<sup>4</sup>, muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

**Figura 56.-** Toxicidad del compuesto L<sup>3c</sup>, muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

**Figura 57.-** Toxicidad del compuesto L<sup>4c</sup>, en la que se representa el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

**Figura 58.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando L<sup>2</sup> y estructuras correspondientes a los cationes, [L<sup>2</sup>+H]<sup>+</sup> m/z=302,11 uma, [NaL<sup>2</sup>]<sup>+</sup> m/z= 324,10 uma y para la especie [K(L<sup>1</sup>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> m/z=641,17 uma.

**Figura 59.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando L<sup>2</sup> y estructuras correspondientes a los aniones, [L<sup>2</sup>-H]<sup>-</sup> m/z= 300,10, [L<sup>2</sup>Cl]<sup>-</sup> m/z= 336,08 uma y para la especie [(L<sup>2</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup> m/z=637.19 uma.



**Figura 60.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^3$  y las estructuras correspondientes a los cationes,  $[L^3]^+$   $m/z=320,08$  uma,  $[NaL^3]^+$   $m/z= 342,06$  uma y para la especie  $[K(L^3)_2]^+$   $m/z= 677,10$  uma.

**Figura 61.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando  $L^3$  y las estructuras correspondientes a los aniones,  $[L^3-H]^-$   $m/z=318.07$  uma,  $[L^3Cl]^-$   $m/z=354,04$  y para la especie  $[(L^3)_2Cl]^-$   $m/z=677,11$  uma.

**Figura 62.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^4$  y las estructuras correspondientes a los cationes,  $[L^4+H]^+$   $m/z=316,14$  uma,  $[NaL^4]^+$   $m/z= 338,11$  uma y para la especie  $[K(L^4)_2]^+$   $m/z = 669,20$  uma.

**Figura 63.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando  $L^4$  y las estructuras correspondientes a los aniones,  $[L^4-H]^-$   $m/z=314,11$  uma,  $[L^4Cl]^-$   $m/z=350,09$  uma y para la especie  $[(L^4)_2Cl]^-$   $m/z=665,21$  uma.

**Figura 64.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo  $L^1c$  y estructura correspondiente a los cationes,  $[VOL^1(CH_3OH)]^+$   $m/z=400,06$  uma,  $\{Na[VOL^1(CH_3OH)]\}^+$   $m/z=422,02$  uma y para la especie  $\{Na[(VOL^1(CH_3OH))_2]\}^+$   $m/z=821,08$  uma.

**Figura 65.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo  $L^1c$  y estructura correspondiente a los aniones,  $[VO_2L^1]^-$  es  $m/z=384,03$  uma,  $[VOL^1(CH_3O)]^-$  es  $m/z=398,06$  uma y para la especie  $\{[VOL^1(OCH_3)][VO_2L^1]\}^-$   $m/z=783,06$  uma.

**Figura 66.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo  $L^2c$  y estructuras correspondiente a los cationes  $[VOL^2(CH_3OH)]^+$   $m/z=398,06$  uma, la especie  $\{Na[VOL^2(CH_3OH)]\}^+$   $m/z=420,04$  uma y la especie  $\{Na[VOL^2(CH_3OH)]_2\}^+$   $m/z=817,09$  uma.

**Figura 67.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo  $L^2c$  y las estructuras correspondientes a los aniones,  $[VOL^2(CH_3O)]^-$   $m/z=396,04$  uma,  $\{[VOL^2(CH_3OH)]Cl\}^-$   $m/z=432,02$  uma y para la especie  $\{[VOL^2(CH_3OH)]_2Cl\}^-$   $m/z=829,06$  uma.

**Figura 68.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo  $L^3c$  y las estructuras correspondientes a los cationes,  $[VOL^3(CH_3OH)]^+$   $m/z=416,02$  uma,  $\{Na[VOL^3(CH_3OH)]\}^+$   $m/z= 438,00$  y para la especie  $\{Na[VOL^3(CH_3OH)]_2\}^+$   $m/z=853,02$  uma.

**Figura 69.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo L<sup>3c</sup> y las estructuras correspondientes a los aniones, [VO<sub>2</sub>L<sup>3</sup>]<sup>-</sup> m/z=399,99 uma y para la especie {[VOL<sup>3</sup>(CH<sub>3</sub>O)]Cl}<sup>-</sup> m/z=414,01 uma.

**Figura 70.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo L<sup>4c</sup> y estructuras correspondientes a los cationes, [VOL<sup>4</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sup>+</sup> m/z=412,07 uma, {Na[VOL<sup>4</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]}<sup>+</sup> m/z=420,04 uma y para la especie {Na[VOL<sup>4</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>}<sup>+</sup> m/z=845,12 uma.

**Figura 71.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo L<sup>4c</sup> y estructuras correspondientes a los aniones, [VO<sub>2</sub>L<sup>4</sup>]<sup>-</sup> m/z=396,04 uma y para [VOL<sup>4</sup>(CH<sub>3</sub>O)]<sup>-</sup> m/z=410,05 uma.

**Figura 72.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el compuesto L<sup>2</sup>.

**Figura 73.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el compuesto L<sup>3</sup>.

**Figura 74.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el compuesto L<sup>4</sup>.

**Figura 75.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el complejo L<sup>2c</sup>.

**Figura 76.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el complejo L<sup>3c</sup>.

**Figura 77.-** Espectro de RMN <sup>1</sup>H en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub> para el complejo L<sup>4c</sup>.

**Figura 78.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>2</sup> con las bandas más intensas: ν(NH) a 3163 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1682 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) a 1621 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) a 1544 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 79.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>3</sup>: ν(NH) a 3040 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1686 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) entre 1401-1587 cm<sup>-1</sup> y ν(C=N) a 1539 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 80.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>4</sup>: ν(NH) a 3360 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1695 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) a 1547 cm<sup>-1</sup> y ν(C=C) entre 1433-1623 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 81.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>2c</sup>: ν(NH) a 3564 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) a 1595 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) entre 1391-1581 cm<sup>-1</sup>, ν(C-O)<sub>coord</sub> a 1359 cm<sup>-1</sup> y ν(V=O) a 933 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 82.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>3c</sup>: ν(NH) a 3272 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) a 1598 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) a 1336-1490 cm<sup>-1</sup>, ν(C-O)<sub>coord</sub> a 1214 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>sym</sub>(V=O) a 912 cm<sup>-1</sup> y ν<sub>asym</sub>(V=O) a 929 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 83.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>4c</sup>: ν(NH) a 3301 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1597 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) a 1597 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) entre 1343-1578 cm<sup>-1</sup>, ν(C-O)<sub>coord</sub> a 1229 cm<sup>-1</sup> y ν(V=O) a 925 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 84.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>1</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  se muestran en la figura de abajo. Las moléculas del compuesto interactúan en posición antiparalela, formando una estructura en capas en forma de reja. Las distancias entre centroides de las nubes  $\pi$  de los anillos y entre éstas y los dobles enlaces C=N son: 3,596 Å, 3,612 Å, 3,612 Å y 3,596 Å; y 3,713 Å en las interacciones dibujadas abajo.

**Figura 85.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>2</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  son más escasas en este compuesto y son mostradas abajo. Las moléculas interactúan preferentemente a través de enlaces de hidrógeno. Las distancias entre los centroides que indican una interacción lateral es 3,386 Å.

**Figura 86.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>3</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las moléculas interactúan en posición antiparalela formando capas. La interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en este compuesto frente a otro tipo de interacciones. Las distancias entre centroides son de izquierda a derecha: 3,287 Å, 3,379 Å, 3,717 Å and 3,572 Å.

**Figura 87.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>4</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y los enlaces de hidrógeno se muestran abajo. Las moléculas interactúan a través de las nubes  $\pi$  de los anillos de piridoxal, los cuales se alternan de un lado a otro. Las interacciones por enlace de hidrógeno se producen entre los iones de cloro, los átomos de oxígeno desordenados y los átomos de nitrógeno de los grupos hidrazona. Las distancias entre los centroides dibujados son: 3,768 Å (arriba) and 3,727 Å (abajo).

**Figure 88.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>2c</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Los complejos interactúan en posición antiparalela formando dímeros. Estos a su vez interactúan por apilamiento  $\pi$  con otros dímeros a través del anillo del grupo

piridoxal de un complejo y el anillo fenílico de otro. Las distancias entre las nubes  $\pi$  son de arriba abajo: 3,667 Å y 3,591 Å.

**Figura 89.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>3</sup>c (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Los complejos interactúan en posición antiparalela formando capas. La interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en este compuesto frente a otro tipo de interacciones. También se observan interacciones entre las nubes  $\pi$  de los anillos y las nubes  $\pi$  de los enlaces imínicos. Las distancias entre centroides son de izquierda a derecha: 3,316 Å, 3,370 Å, 3,386 Å, 3,254 Å, 3,397 Å y 3,290 Å.

**Figura 90.-** Polihedro de coordinación en el complejo L<sup>2</sup>c.

**Figura 91.-** Polihedro de coordinación en el complejo L<sup>3</sup>c.

**INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.-** Reactivos y disolventes empleados para la síntesis de los compuestos objeto de estudio.

**Tabla 2.-** Reactivos empleados para la síntesis de los ligandos.

**Tabla 3.-** Reactivos para la síntesis de los complejos de vanadio, rendimiento y características.

**Tabla 4.-** Resultados de la técnica de análisis elemental para los ligandos y complejos sintetizados.

**Tabla 5.-** Señales más intensas de los espectros de masas ESI-TOF<sup>+</sup> y ESI-TOF<sup>-</sup>, para los ligandos y los complejos.

**Tabla 6.-** Desplazamientos químicos que aparecen en los espectros de RMN <sup>1</sup>H, en dms<sub>o</sub>-d<sub>6</sub>, para los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, L<sup>4</sup> y los complejos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c, L<sup>4</sup>c, en ppm.

**Tabla 7.-** Bandas más intensas obtenidas en la espectroscopia de IR de los compuestos, en cm<sup>-1</sup>.

**Tabla 8.-** Datos de la estructura cristalina y del refinamiento en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

**Tabla 9.-** Datos de los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

Tabla 10.- Selección de longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

**Tabla 11.-** Datos de la estructura cristalina y del refinamiento en los compuestos L<sup>2</sup>c y L<sup>3</sup>c.

**Tabla 12.-** Datos de los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en los compuestos L<sup>2</sup>c y L<sup>3</sup>c.

**Tabla 13.-** Selección de longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] en los compuestos L<sup>2</sup>c y L<sup>3</sup>c.



RESUMEN

El vanadio como metal es micronutriente esencial con una concentración de 0,3 $\mu$ M en el cuerpo humano. La similitud que presenta el vanadato con el fosfato lleva a estudiar el vanadio frente a dolencias como el cáncer. En este trabajo se buscó conseguir metalofármacos de vanadio con baja toxicidad y estables. Para ello se han sintetizado cuatro compuestos de vanadio con ligandos hidrazona derivados de piridoxal.

Se estudiaron los ligandos hidrazona (L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>) y los compuestos de oxidovanadio (L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c) por diferentes técnicas de caracterización: análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia RMN <sup>1</sup>H y espectroscopia IR con el fin de confirmar la coordinación del metal a los ligandos y la variada especiación química del vanadio en disolución. Además, se realizaron estudios de difracción de rayos X de monocristal para todos los ligandos y los complejos L<sup>2</sup>c y L<sup>3</sup>c. Destacamos la interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en el compuesto L<sup>3</sup>c frente a otro tipo de interacciones menos fuertes.

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* de los compuestos se llevaron a cabo en la línea celular A549 (cáncer de pulmón) mediante un ensayo de MTT. Los resultados obtenidos se correlacionan con los obtenidos en rayos X, siendo el compuesto L<sup>3</sup>c el que mayor citotoxicidad presenta en general a las diferentes concentraciones en 48h.

Finalmente, se usó el modelo animal pez cebra para la realización de los estudios *in vivo*. La toxicidad detectada en los compuestos estudiados no nos permitió calcular el LC<sub>50</sub>.

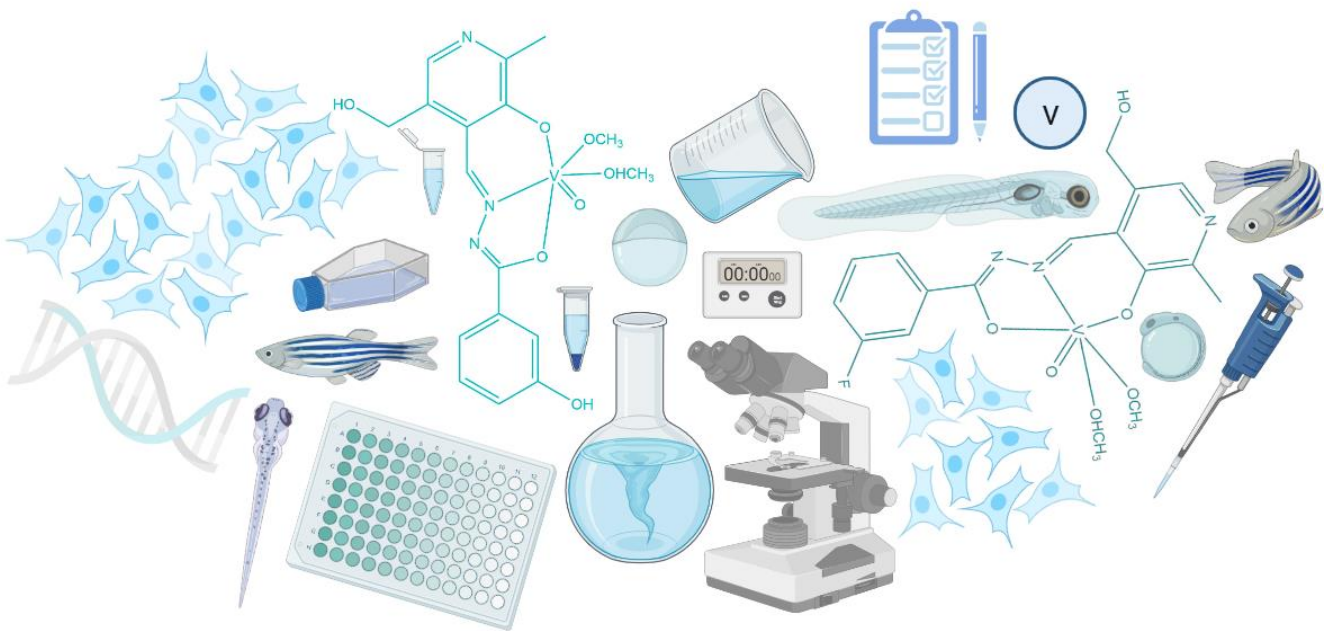
Sería necesario profundizar en los estudios *in vitro* e *in vivo* para poder concluir si pueden llegar a ser o no unos buenos candidatos como posibles metalofármacos antitumorales.





# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Introducción.

### 1.1. Química bioinorgánica y farmacología.

La química bioinorgánica aparece en el último tercio del siglo XX. Surge con el fin de aunar la química inorgánica y los procesos biológicos, estudiando el papel biológico que desempeñan los elementos y compuestos inorgánicos.

Hoy en día se conocen por lo menos 27 elementos esenciales, entre ellos están muchos inorgánicos, que participan en los procesos biológicos. Estos elementos podemos clasificarlos respecto a su abundancia en:

- Bioelementos principales: C, H, O y N.
- Bioelementos secundarios: S, P, Mg, Ca, Na, K y Cl.
- Oligoelementos: elementos presentes en el organismo en escasa proporción, pero esenciales para la vida, Fe, Mn, Cu, Zn, F, I, B, Si, V, Cr, Co, Se, Mo y Sn.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac*	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts	Og

Bioelementos principales	Bioelementos secundarios	Oligoelementos
--------------------------	--------------------------	----------------

Es preciso que los elementos esenciales se encuentren en un intervalo de concentraciones adecuado, dado que de otro modo pueden ser tóxicos (Vallet, 2003).

Dentro de estos elementos esenciales se encuentran muchos metales que son partícipes de procesos fisiológicos fundamentales, por lo que un conocimiento más profundo de sus funciones puede ayudar al descubrimiento de nuevos fármacos que los contengan. Los fármacos que contienen metales como base fundamental de principio

activo son los conocidos como metalofármacos. El desarrollo de este campo de investigación despertó con el gran éxito alcanzado por el cis-platino, metalofármaco del que hablaremos en el apartado 1.3.1., y como consecuencia de ello, otros compuestos que contienen metales comenzaron a investigarse (Baran, 2014).

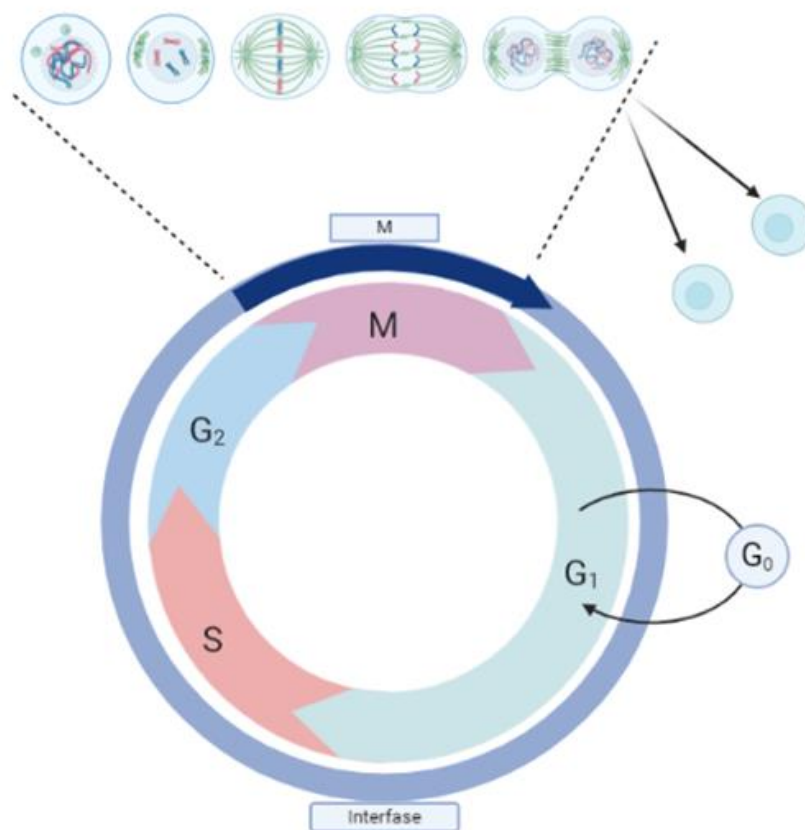
Es necesario por tanto profundizar en diversos aspectos de la química y la bioquímica de estos compuestos metálicos, como por ejemplo, en factores termodinámicos, procesos redox, interacción con dianas biológicas como ADN, proteínas y enzimas, su capacidad para atravesar las biomembranas, así como las especies químicas que puedan originarse en reacciones secundarias, que pueden causar efectos tóxicos en los procesos biológicos estudiados (Baran, 2014; Fuertes y Pérez, 2000).

## **1.2. El cáncer: desarrollo y tipología.**

Una célula se reproduce siguiendo una secuencia de acontecimientos ordenados en los que duplica su contenido y luego se divide en dos. Este proceso, conocido como *ciclo celular*, tiene como fin principal reproducir de forma exacta el ADN cromosómico y segregarlo en dos células, de este modo cada una debe recibir una copia exacta de todo el genoma.

El ciclo celular (Figura 1) se divide en dos fases principales: interfase, donde la célula crece y duplica su ADN, y fase mitótica, donde se separa el ADN y se produce la citocinesis. La interfase consta a su vez de tres etapas: fase G<sub>1</sub>, fase S y fase G<sub>2</sub>. En la primera etapa la célula crece y duplica los orgánulos citoplasmáticos, sintetiza el ARN y las proteínas necesarias para la síntesis de ADN para la duplicación de los cromosomas. En esta etapa algunas células pueden entrar en una nueva fase llamada G<sub>0</sub> donde permanecen en reposo, es decir, no continúan su proceso de división. En la fase S se produce la replicación del ADN y en la última etapa de la interfase, la fase G<sub>2</sub>, la célula se prepara para la mitosis. La interfase termina en el momento que la célula entra en mitosis, donde se siguen una serie de etapas: profase, metafase, anafase y telofase, que darán lugar a dos células hijas iguales. Estas células hijas entrarían en interfase donde vuelve a iniciarse el ciclo.

Las células eucariotas tienen un *sistema de control del ciclo celular* lo que les permite detectar errores y repararlos o en caso de no ser posible la reparación, activar la muerte celular, lo que se conoce como apoptosis (Abreu y Howard, 2015; Collins, 1997; Xu y McArthur, 2016) . En caso de las células cancerosas los mecanismos de control se alteran, lo que provoca una división incontrolada que desembocan en una neoplasia. Una neoplasia es una masa de tejido anormal que crece de manera incontrolada nutriéndose de las células huésped, lo que provoca una competición metabólica con las células de los tejidos normales. Se diferencia entre neoplasias benignas y malignas según se comportamiento clínico. Las neoplasias malignas son aquellas con capacidad de infiltrarse en estructuras adyacentes, esta capacidad de migrar algunas células es otra característica común de varios tumores que daría lugar a una metástasis (Kroemer y Pouyssegur, 2008).



**Figura 1.-** Representación esquemática del ciclo celular. Creada con BIOREDER.

El cáncer se puede definir como una enfermedad provocada por una proliferación rápida, descontrolada y anormal de células. En muchos casos el inicio viene derivado de una mutación en uno de los genes que controla la división celular o crecimiento. Las células cancerosas no siguen las reglas básicas del comportamiento celular para organismos pluricelulares (NIH, Instituto Nacional del Cáncer). Existe una gran variabilidad en el tipo de tumores a pesar de poseer unos rasgos comunes como son, la capacidad de evitar la apoptosis y el potencial ilimitado de crecimiento (Stucchi *et al.*, 2016). La mayoría de ellos se caracterizan por reproducirse sin restricciones e invadir o desplazar tejidos circundantes.

En función del tipo de tejido dónde tiene origen el cáncer, podríamos clasificar la mayoría de los tipos de cáncer en cuatro grupos:

- Carcinomas: tumores con origen en el tejido epitelial, representan la mayoría de los casos de cáncer, dentro de este tipo podemos diferenciar dos grupos:
  - Carcinoma espinocelular o espinalioma: se produce en células epiteliales escamosas, como sería el cáncer de próstata, ovario, colón, estómago, esófago y pulmón entre otros.
  - Adenocarcinoma: se produce en células que revisten las glándulas secretoras como sería el caso del carcinoma de células renales.
- Leucemias y linfomas: se presentan en tejido linfático y hematopoyético.
- Sarcomas: tumores malignos con origen en el tejido conectivo. Osteosarcoma y fibrosarcoma serían dos ejemplos de cáncer óseo con origen en diferente tipo de células mesenquimales, osteoblastos y fibroblastos respectivamente.
- Cáncer originarios del tejido nervioso como el glioma o la retinoblastoma como ejemplos.

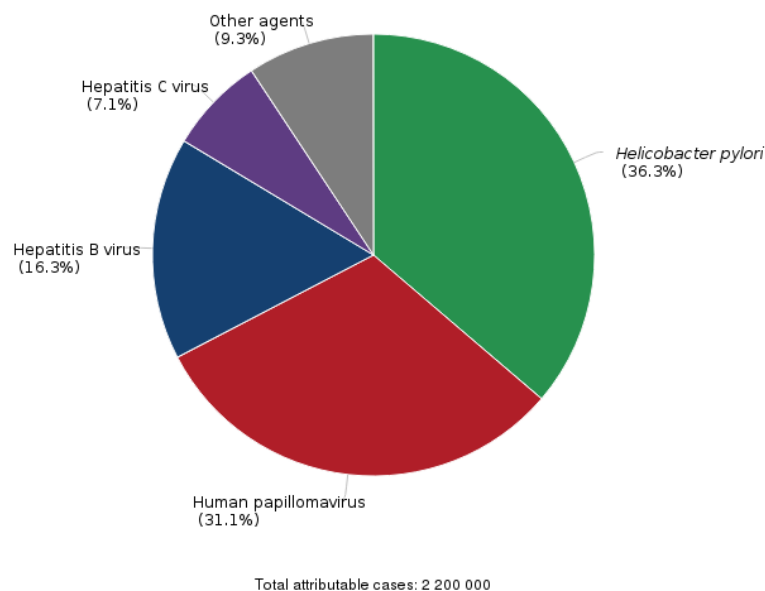
### **1.2.1. Causas y factores en el desarrollo del cáncer.**

El cáncer se produce por un cambio en células normales que se vuelven tumorales. Esto puede ser resultado de uno o un conjunto de factores. Se trata, fundamentalmente, de una interacción entre factores genéticos y agentes externos. Solamente entre

un 5-10% de los cánceres se heredan, y lo hacen mayoritariamente de manera autosómica dominante con penetrancia incompleta (Nagy *et al.*, 2004). Los factores pueden ser extrínsecos o intrínsecos. Los factores de riesgo intrínsecos son aquellos en que resultan de errores en el proceso de replicación del ADN, estos representan entre un 10-30 % de los factores que contribuyen al desarrollo de un cáncer (Wu *et al.*, 2016). Respecto a los factores extrínsecos podemos encontrar tres categorías: agentes carcinógenos biológicos, físicos o químicos.

Dentro de los agentes biológicos que pueden dar lugar a un cáncer encontramos determinados virus, bacterias y parásitos. Estos agentes infecciosos podríamos considerarlos fácilmente una causa modificable ya que hoy en día se conocen muchos mecanismos de prevención frente a muchos de ellos. En la Figura 2 se muestran los agentes infecciosos a los que más muertes se les atribuyen por cáncer en Europa en el año 2018. Por ejemplo, la bacteria *Helicobacter pylori* causa infecciones a partir de las cuales, entorno a un 40% desarrollan un cáncer, seguida del virus del papiloma humano y de la hepatitis B y C (Martel *et al.*, 2020).

Cancer cases (all infectious agents) among both sexes in 2018 attributable to infections, in the world, shown by infectious agents



Data source: de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM (2020)  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)  
© International Agency for Research on Cancer 2021

International Agency for Research on Cancer  
World Health Organization

**Figura 2.-** Porcentaje de agentes infecciosos que producen cáncer. Fuente OMS.

Los agentes carcinógenos físicos son considerados aquellos que pueden provocar alteraciones en el organismo por sus propiedades físicas, sin intervenir una reacción química directa o indirecta. Entre los agentes físicos podemos destacar las radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas, traumatismos mecánicos y temperaturas extremas entre otros. Mayoritariamente la exposición a estos carcinógenos físicos es principalmente ambiental o en el ámbito laboral.

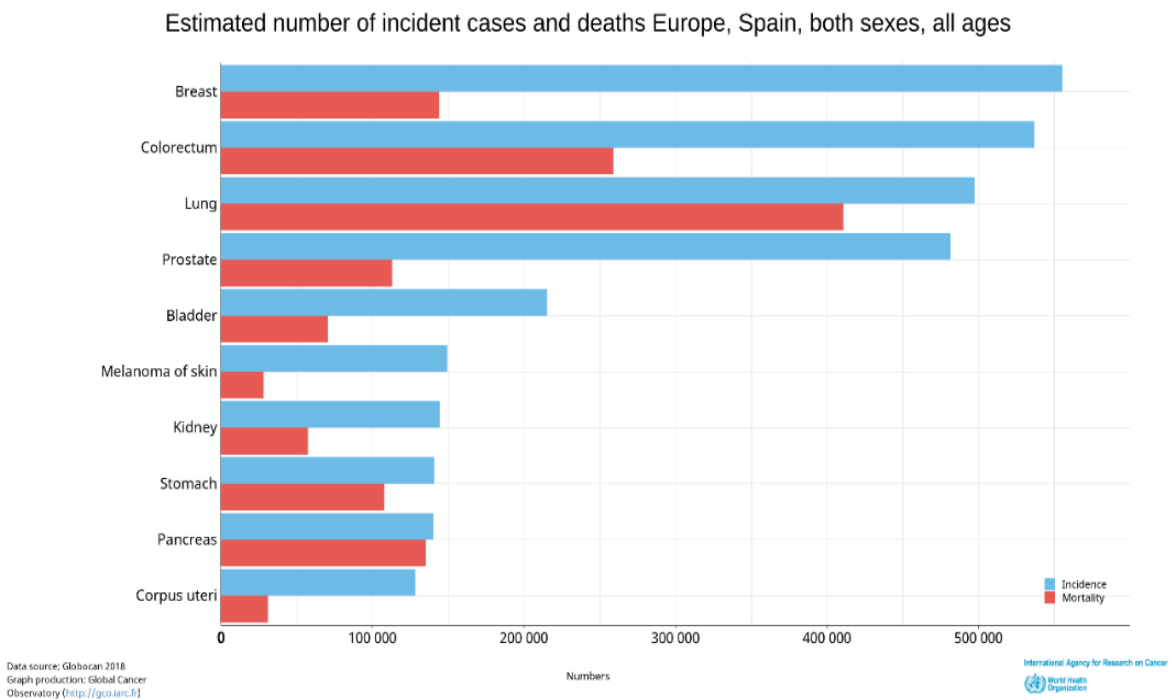
Finalmente, los agentes carcinógenos químicos constituyen el grupo más amplio y diverso. Pueden producir mutaciones dada su capacidad para interactuar con las dianas biológicas, como por ejemplo el ADN, ARN o proteínas, a las que pueden unirse covalentemente o no covalentemente. Algunos ejemplos pueden ser: hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas y compuestos que contengan grupos nitro. Algunos de estos agentes químicos pueden tener su origen en animales y plantas, como ocurre en algunos microorganismos del reino Fungi. Por ejemplo, la aflatoxina es un compuesto tóxico generado por hongos del género *Aspergillus* que infesta a cultivos de maíz o trigo y tienen efectos cancerígenos. Otras micotoxinas son la ocratoxinas; podemos encontrarla en alimentos derivados de cereales (Ravelo *et al.*, 2011). Otros productos que contienen sustancias químicas actúan como agentes sensibilizantes, no llegan a considerarse carcinógenos, pero pueden producir enfermedades como asma, alveolitis o eczemas de contacto, que en algunos casos pueden evolucionar y provocar enfermedades más graves como el cáncer.

La edad es uno de los factores de riesgo a tener en cuenta en el desarrollo de un cáncer, uno de los motivos principales es el deterioro del sistema inmunológico. Aunque en 2018 los tumores fueron la primera causa de muerte en menores de 14 años (29.2%), la edad crítica a la hora de desarrollar un cáncer se considera a partir de los 60 años (INE, 2020).

### **1.2.2. El cáncer en la población española. El cáncer de pulmón.**

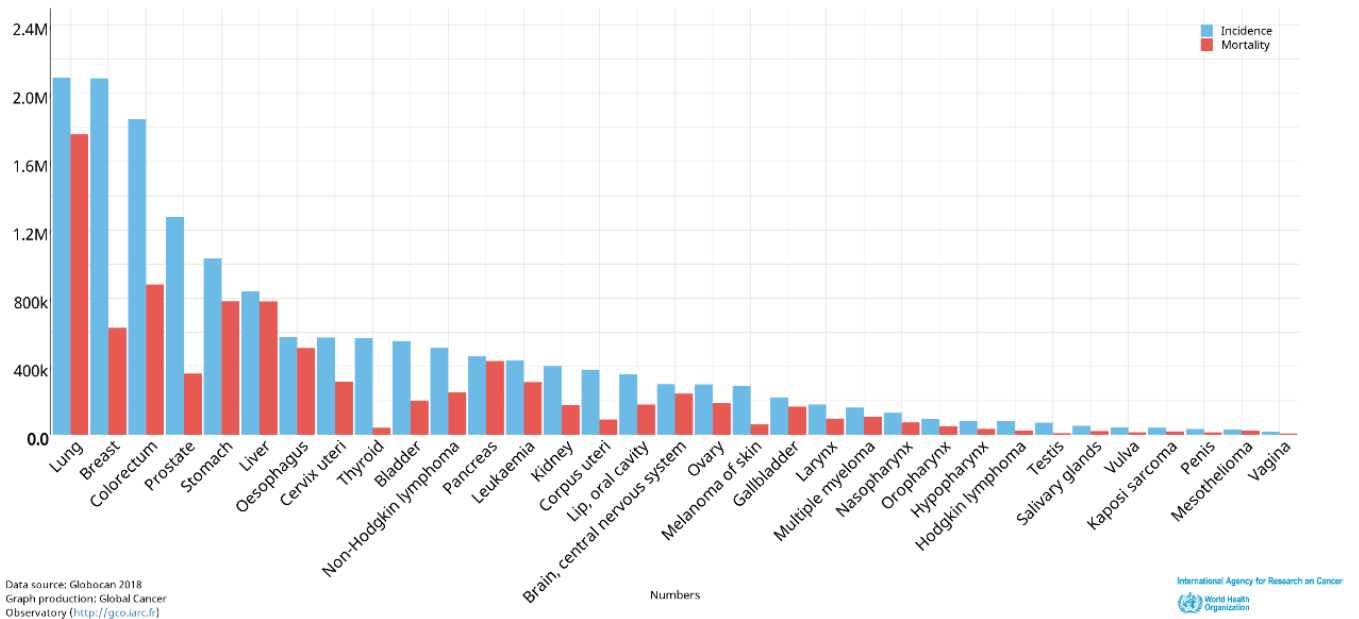
De acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística (INE), en España las enfermedades del sistema circulatorio representaron la primera causa de muerte en 2018 con una tasa del 28,3%, siendo los tumores la segunda causa de mortalidad, con el 26,4% del total. Si tenemos en cuenta el sexo, los tumores serían la primera

causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres (INE, 2019). En la Figura 3 podemos observar los datos estimados de incidencia de los diferentes tipos de cáncer en Europa en 2018. El cáncer de pulmón es uno de los tumores más frecuentes, 29.638 casos fueron estimados en España en el año 2020 (INE, 2020). En España según datos de la OMS, el cáncer de pulmón se presenta como el que mayor tasa de mortalidad produce frente a los restantes. El principal factor desencadenante de este tipo de cáncer se atribuye al humo de tabaco, tanto en fumadores activos como pasivos. El humo de tabaco contiene muchas sustancias entre ellas más de 40 clasificadas como carcinógenos (Gallardo *et al.*, 2004). A nivel mundial el cáncer de pulmón junto con el de mama son los que mayor incidencia (Figura 4).



**Figura 3.-** Gráfica de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en Europa. OMS.





**Figura 4.-** Gráfica de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. Fuente OMS.

### 1.2.3. Tratamientos frente al cáncer.

El tratamiento más antiguo frente al cáncer es la cirugía. Suele emplearse en tumores sólidos y normalmente se combina con otras técnicas. Después de la cirugía destacan la quimioterapia y la radioterapia como principales tratamientos para paliar el cáncer, ambos se centran en evitar el crecimiento del tumor actuando sobre el ADN mediante ruptura, daño o modificación de su estructura. La radioterapia se centra en actuar sobre una zona concreta empleando radiación ionizante de alta energía. La quimioterapia emplea medicamentos conocidos como agentes antitumorales, en este caso no actúa de manera localizada, por lo que es más común en el caso de metástasis.

La radioterapia se fundamenta en el efecto biológico que producen las radiaciones ionizantes. Con elevadas dosis de radiación se puede hacer más lento el crecimiento de células cancerígenas o destruirlas por daño en su ADN, con lo que paran de duplicarse, mueren y el cuerpo las desecha. El efecto de la radioterapia no es inmediato, se requieren varias dosis de tratamiento para al fin poder afectar al ADN de las células, las cuales siguen muriendo después de terminar con las dosis. La radioterapia puede ser externa, por medio de un haz externo, o interna, por administración por vía oral. Se

utiliza en aproximadamente el 30% de los tumores, junto con otras terapias. Su finalidad puede ser paliativa, curativa o complementaria. Su uso más frecuente al igual que la cirugía es en tumores localizados sin diseminar (Residentes, 2019).

La quimioterapia principalmente está enfocada a los tumores diseminados donde la radioterapia y la cirugía tienen un papel limitado. La quimioterapia es un tratamiento a base de fármacos que tienen como fin destruir las células cancerosas. Se usa tanto para frenar el desarrollo de un cáncer, reduciéndolo o produciendo un crecimiento más lento, lo que puede aliviar los síntomas. La quimioterapia se administra a través de diferentes vías como: oral, intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intrapleural o tópica. Este tratamiento suele presentar efectos secundarios (caída de pelo, náuseas, llagas en la boca...) dado el daño, debido a su toxicidad, que también produce en las células sanas (Residentes, 2019).

La inmunoterapia es un tratamiento en el que se pretende aprovechar el sistema inmune del propio paciente frente a la lucha contra el tumor. La vacunación tiene por objetivo estimular el propio sistema inmune para desarrollar una respuesta. Este tratamiento destaca por su especificidad, dado que el daño a los tejidos sanos será mínimo. La memoria que desarrolla nuestro sistema inmunológico permitirá seguir reconociendo y destruyendo al tumor en el futuro. Sin embargo, la respuesta a pesar de ser eficaz es tardía para la cinética del cáncer. Se tarda un tiempo en preparar al sistema inmune para hacer frente al tumor, pero aumenta la supervivencia en ciertos tipos de cáncer (Infantes, 2016).

La terapia dirigida es otro tratamiento de tipo farmacológico frente al cáncer, en este caso actúa sobre partes específicas de las células cancerosas, como las proteínas que envían señales a las células, o sobre los tejidos circundantes al tumor. La clave de estas terapias está en diferenciar las células cancerígenas de las células normales, para así atacar a ciertos biomarcadores cancerígenos, bloqueando genes, proteínas o moléculas para frenar el crecimiento de los tumores. Normalmente las terapias dirigidas actúan sobre blancos específicos (OncoLink Team, 2021).

La terapia hormonal es otro tipo de tratamiento en este caso muy enfocado a algunos tipos de cáncer como son el de mama, próstata, suprarrenal o de endometrio que usan hormonas para crecer. Suele acarrear algún efecto secundario como sería la

inapetencia sexual, sofocos, náuseas y cambios de humor (American Cancer Society, 2006).

Finalmente, otro tratamiento que se usa es el trasplante de células madre o también llamado trasplante de médula ósea, la función de este tratamiento es restituir el proceso de generación de los glóbulos rojos, blancos y las plaquetas. Estas células madre que se usan pueden proceder del propio paciente, de un gemelo o de una persona externa compatible. Este tipo de tratamiento va dirigido a algunos tumores que se originan en la médula ósea como leucemias, mielomas múltiples y linfomas. Además, es un tratamiento que ayuda a los pacientes que recibieron altas dosis de quimioterapia o radioterapia a recuperarse (American Cancer Society, 2020).

### **1.3. Antecedentes metalofármacos en terapias antitumorales.**

#### **1.3.1. Cis-platino**

La actividad antitumoral del cis-platino fue descubierta por casualidad por Barnett Rosenberg mientras investigaba como podría afectar la aplicación de un campo eléctrico en la división celular bacteriana de *Escherichia coli*. La división bacteriana se frenó por acción de cis-platino y también la pérdida de replicación bacteriana. De este modo se descubrió las propiedades de este compuesto a pesar de ya estar descrito con anterioridad. Derivada de esta investigación surge una cascada de investigaciones relacionadas con este compuesto y su efecto contra el cáncer.

El principal mecanismo de acción en el que participan los compuestos químicos en los tratamientos de quimioterapia va enfocado sobre el ADN. Los compuestos de cis-platino destacan, en sus efectos antineoplásicos, por la capacidad de producir daños irreparables en el ADN (Shaloam y Tchounwou, 2014). El cis-platino se convirtió en un compuesto de referencia que permitió la búsqueda de otros complejos de platino, la mayoría plano-cuadrados, así como de otros metales con mejores propiedades. La búsqueda de compuestos que reduzcan los efectos secundarios, y que presenten una función selectiva hacia las células tumorales es la clave de estos estudios. Entre los efectos secundarios del cis-platino podríamos destacar los vómitos y la alopecia. Además el cis-platino produce otros efectos tóxicos como, por ejemplo, nefrotoxicidad acumulativa

(Aladrén, 1993; Lee *et al.*, 2009), y la pérdida de la sensibilidad en la función auditiva en menores de edad (Toral-Martiñón *et al.*, 2003).

Normalmente, el cis-platino genera respuestas clínicas positivas. A pesar de esto muchas células se adaptan a la presencia del fármaco y reanudan su proliferación. Así, ciertos cánceres, como el de cuello uterino, terminan desarrollando resistencia al cis-platino (Zhu *et al.*, 2016). Para ciertos tipos de cáncer, como es el cáncer de estómago avanzado, la quimioterapia no surte su efecto cuando este tipo de células cancerígenas presentan resistencia a múltiples fármacos. Esto se correlacionó con un aumento de la expresión de glicoproteínas como la LAMA4 (Peng *et al.*, 2020).

El cis-platino es suministrado de forma intravenosa y se difunde a través del plasma como una molécula neutra, debido a la elevada concentración de cloruros en plasma. Al entrar en las células, cuya concentración de cloruros es menor se produce una sustitución nucleofílica de cloros por moléculas de agua. Una vez cargado el compuesto puede atravesar la membrana nuclear, acceder a las bases purínicas del ADN y deformar la doble hélice. Dada la toxicidad que presenta este compuesto para las células en general, es necesario el uso de agentes que neutralicen sus efectos para reducir la toxicidad (Bakhtiar y Ochiai, 1999; Cuevas *et al.*, 2012). Otros estudios centrados en cáncer testicular muestran como gracias al uso de antioxidantes, que acompañan al tratamiento con el cis-platino, éste reduce los efectos perjudiciales en el epitelio tubular seminífero (Santana *et al.*, 2010). A pesar de presentar una citotoxicidad elevada, en la actualidad se emplea como tratamiento para el cáncer, concretamente de pulmón, vejiga, colorrectal, testicular, de ovario y de cabeza (Dilruba y Kalayda, 2016). El cis-platino sigue empleándose en forma de compuestos parecidos con modificaciones en su estructura, con aminas y fosfinas como ligandos, que parecen inducir la apoptosis en células tumorales resistentes al cis-platino (Ramos-Lima *et al.*, 2007).

### **1.3.2. Otros metalofármacos con propiedades antitumorales.**

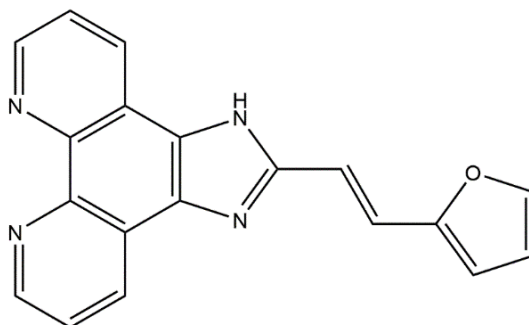
- **Complejos con ligandos derivados de fenantrolina**

La fenantrolina es uno de los ligandos más comunes a la hora de preparar compuestos que puedan utilizarse como metalofármacos. El uso de este tipo de ligandos

está relacionado con la capacidad de la fenantrolina, con estructura plana, de intercalarse en dianas biológicas tan importantes como el ADN.

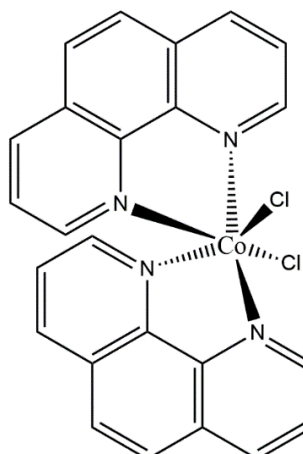
Entre los compuestos de este tipo destacan complejos mononucleares de cobre (II), que presentan actividad inhibidora del crecimiento frente a la línea celular A549 (Valdez-Camacho *et al.*, 2020). Diferentes complejos de níquel con derivados de fenantrolina también muestran actividad citotóxica frente a la misma línea tumoral. En este caso se ha estudiado la inducción de apoptosis mediante la generación de ROS por medio de una serie de ensayos que utilizan la excitación electrónica con luz visible, pero estos compuestos no son citotóxicos a elevadas concentraciones en ausencia de luz, y no presentan casi toxicidad frente a células normales (Banaspati *et al.*, 2020). También se conocen complejos de oro con ligandos fenantrolina, de geometría plano-cuadrada, que han demostrado capacidad de inducir apoptosis y pérdida de potencial de la membrana mitocondrial en la misma línea celular de cáncer de pulmón (Dey *et al.*, 2020).

La afinidad de un fármaco por el ADN podría considerarse uno de los objetivos más importantes en la búsqueda de potenciales compuestos antitumorales. En el caso de complejos de polipiridilo de rutenio (Figura 5), que contienen otros ligandos derivados de la fenantrolina, este ligando se intercala en el ADN y sirven para detener el ciclo celular en la fase S, también producen apoptosis en células A549 mediante la vía mitocondrial, por medio de la interacción con las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jiang *et al.*, 2020).



**Figura 5.-** Ligando de polipiridilo que se utiliza para complejar al Ru.

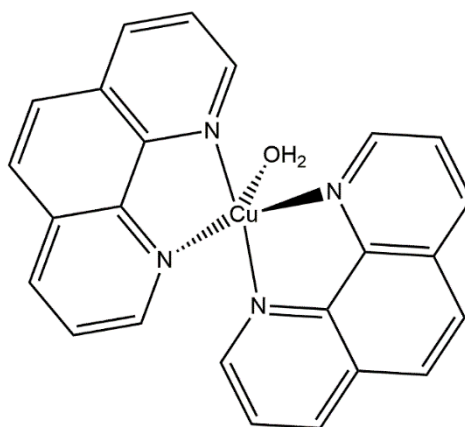
El complejo de cobalto(II) que contiene fenantrolina (Figura 6), presenta una citotoxicidad moderada frente a células de carcinoma hepatocelular (HEPG-2), glándula mamaria (MCF-7) y carcinoma colorrectal (HCT-116) (Al-Omair, 2019).



**Figura 6.-** Complejo de cobalto con dos ligandos fenantrolina.

Esta lista de complejos con derivados de fenantrolina también se incluyen complejos de zinc (II), los cuales han sido probados en líneas cancerígenas de ovario (A2780), de mama (MCF7) y cáncer cervical (HeLa), así como fibroblastos V79 no tumorales con muy buenos resultados (Matos *et al.*, 2019(A)).

Los complejos de cobre de que se muestran en la Figura 7 con ligandos de fenantrolina, fueron estudiados en la línea A2780 y presentan una importante capacidad citotóxica (Nunes *et al.*, 2020(A)).

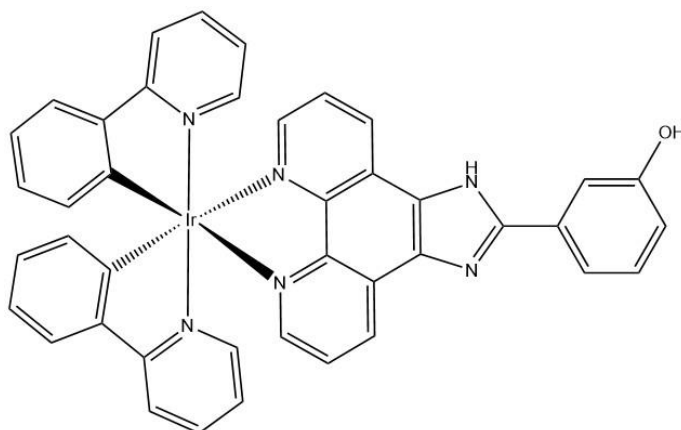


**Figura 7.-** Complejo de cobre con fenantrolina como ligandos.

Otras investigaciones realizadas con complejos de hierro, con ligandos derivados de fenantrolina, presentan actividad citotóxica en líneas celulares de HeLa, H1299, MDA-MB-231 y células escamosas de cáncer de esófago. En estos estudios destacamos que la mayoría de ellos interactúan principalmente con el surco del ADN e inducen daño al ADN

plasmídico, proceso en el que se observó un aumento de agentes ROS. En complejos como éstos, el ciclo celular se detiene en la fase  $G_0$  y  $G_1$  (Matos *et al.*, 2019(B); Ye *et al.*, 2019).

El iridio también fue objeto de estudio con ligandos derivados del compuesto fenantrolina. En la Figura 8 se muestra un ejemplo. Destacamos este complejo de iridio por su capacidad citotóxica del orden de 10 veces mayor que el cis-platino frente a la línea celular A549-CD R (resistente al cis-platino). Ejerce su actividad anticancerígena induciendo ROS y alterando así el potencial de membrana mitocondrial (Xiao *et al.*, 2018). Hay también otros complejos de iridio con el mismo ligando que presentan una tasa de inhibición del crecimiento celular, en la línea celular A549, del 76,34% (Du *et al.*, 2019).



**Figura 8.-** Complejo de iridio con un ligando derivado de fenantrolina.

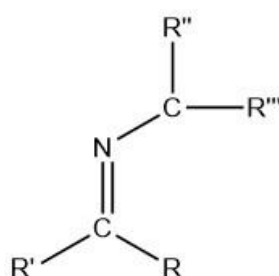
Algunos complejos con ligandos derivados de polipiridilo unido a un grupo fenantrolina con Ru(II), presentan mayor selectividad en células tumorales A549 y células normales en comparación con el cis-platino. Estos compuestos detienen el ciclo celular en  $G_2/M$  provocando apoptosis a través de la vía mitocondrial mediada por ROS (Chen *et al.*, 2016).

Como últimos ejemplos de metalofármacos que contienen en su estructura fenantrolina, podemos destacar los complejos de plata y paladio. Los compuestos de plata presentan efectos citotóxicos frente a células de hepatocarcinoma humano (HepG2) y carcinoma de riñón (A498). Los complejos de paladio presentan capacidad para unirse

al ADN plasmídico y actividad citotóxica frente a células MCF-7, SKBR-3 y MDA-MB-231 (Fatahian-Nezhad *et al.*, 2021; Mujahid *et al.*, 2015).

- **Complejos con ligandos derivados de bases de Schiff.**

La base Schiff (Figura 9) es un grupo funcional común en la complejación de muchos metalofármacos. Complejos de cobre con este grupo funcional, y que también contienen fenantrolina, presentan actividad citotóxica frente a las líneas celulares A2780 y MCF-7, de cáncer de ovario y de mama respectivamente. Este tipo de complejos muestran unos valores de inhibición del crecimiento mucho mayores que el cis-platino (Nunes *et al.*, 2020 (B)).

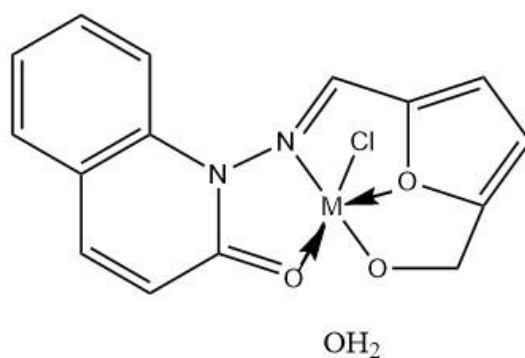


**Figura 9.-** Esquema de base Schiff.

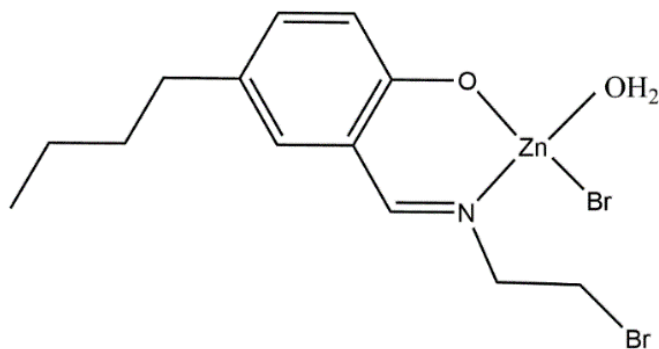
Complejos de oro que presentan ligandos, que contienen el grupo funcional base Schiff, con una geometría plano-cuadrada, interaccionan con el ADN a través de intercalación. Éstos complejos y el ligando se estudiaron en ensayos *in vitro* mediante la técnica de MTT frente a la línea celular A549, donde se demostró que el ligando presenta mayor actividad citotóxica (Sankarganesh *et al.*, 2019).

En la Figura 10 podemos ver la estructura de algunos complejos de metales de Cr(III), Ru(III), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) y Zn(II) con ligandos que presentan el grupo base Schiff. Todos muestran actividad citotóxica frente a células A549 y MFC-7 (Alturiqi *et al.*, 2018). Otros ejemplos diferentes con Cu(II), Zn(II) y Ni(II) y base Schiff (Figura 11), muestran citotoxicidad elevada superando al metalofármaco de referencia (cis-platino) frente a la línea A549 (Lee *et al.*, 2016). Es de destacar que en algunos ligandos tipo base Schiff muestran mayor actividad anticancerígena por sí solos que complejados (Hussain *et al.*, 2019).



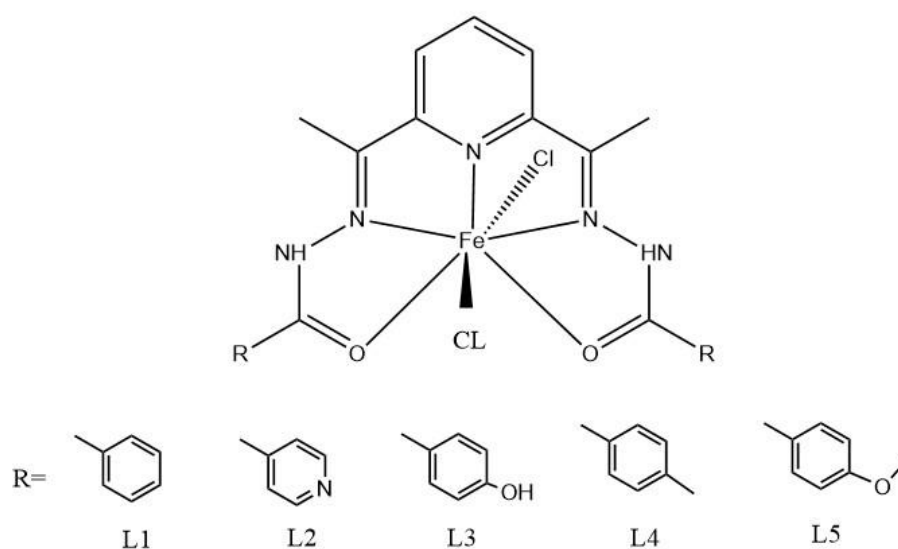


**Figura 10.-** Complejos metálicos con un ligando derivado de base Schiff.



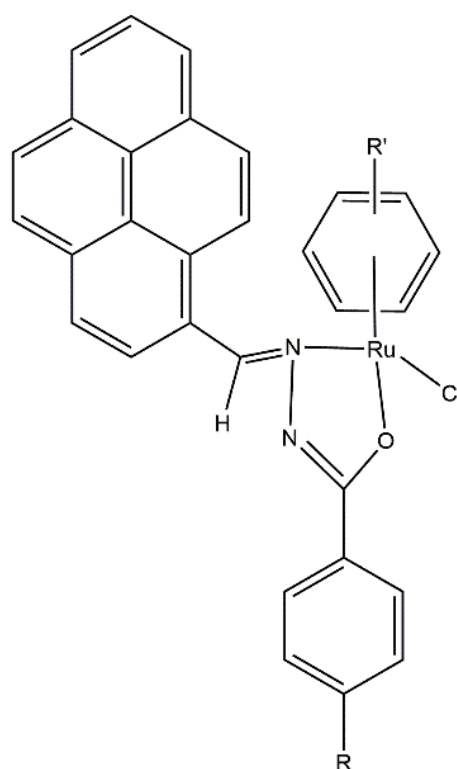
**Figura 11.-** Complejo de Zn y una base de Schiff.

Éste no es el único ejemplo de ligandos que pueden presentar más citotoxicidad por sí solos que formando complejos. Los complejos con Fe, que podemos ver en la Figura 12, muestran una actividad anticancerígena reducida en comparación con los ligandos libres. Los estudios para estos ligandos demostraron que inhiben la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa. Tanto los ligandos como los complejos no promueven significativamente la apoptosis. Los efectos citotóxicos de los compuestos L2 y L4 son los más importantes. Esto indica que modificaciones en los sustituyentes de la acilhidrazona pueden alterar su citotoxicidad (Yao *et al.*, 2019).



**Figura 12.-** Complejo de hierro con diferentes ligandos derivados de bases de Schiff.

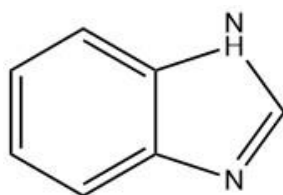
Los complejos de rutenio (II) con ligandos benzohidrazona aromáticos y planos, los cuales se enlazan al rutenio de manera bidentada, forman una estructura con geometría pseudo-octahedrica típica (Figura 13). Estos potenciales fármacos se han probado *in vitro* frente a la línea de cáncer de pulmón A549, provocan apoptosis en la fase  $G_0/G_1$  e inhiben el crecimiento dependiendo de la dosis (Raj *et al.*, 2018).



**Figura 13.-** Complejo de rutenio con ligando derivado de benzohidrazona.

- **Complejos con ligandos derivados del grupo imidazol.**

El bencimidazol (Figura 14) destaca también entre uno de los ligandos más comunes a la hora de diseñar metalofármacos antitumorales. Ejemplos de complejos de cobalto, manganeso, hierro, níquel y cobre con bencilimidazol piridina como ligando, presentan una potente actividad citotóxica frente a la línea A549 y son prácticamente inactivos frente a células normales. El complejo de manganeso el que más actividad citotóxica presentó (Icse *et al.*, 2020).



**Figura 14.-** Bencimidazol.

Otro ejemplo es el complejo carbeno de plata con ligando benzimidazol. Este complejo muestra mejores resultados que el cis-platino en la línea A549 (Guarra *et al.*, 2020).

Los compuestos de hierro, cobre y cromo, en los que el ligando, derivado del grupo imidazol, se une de forma bidentada, presentan actividad citotóxica en células MCF-7 y HepG-2, los cuales interactúan con el ADN mediante intercalación (Abdel-Rahman *et al.*, 2020).

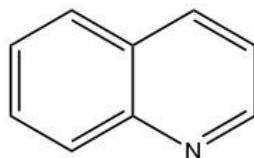
Los complejos de oro también presentan capacidad para reducir la proliferación celular de la línea A549, concretamente interactúan con el ADN en la región principal del surco menor, rica en las bases nitrogenadas G-C (Kanthecha *et al.*, 2019).

Otros ejemplos serían los compuestos de rutenio (II) con metilimidazol. En ensayos MTT, estos complejos muestran una gran actividad antiproliferativa en células cancerígenas de pulmón A549, mediante vías apoptóticas mitocondriales (Yang *et al.*, 2012).

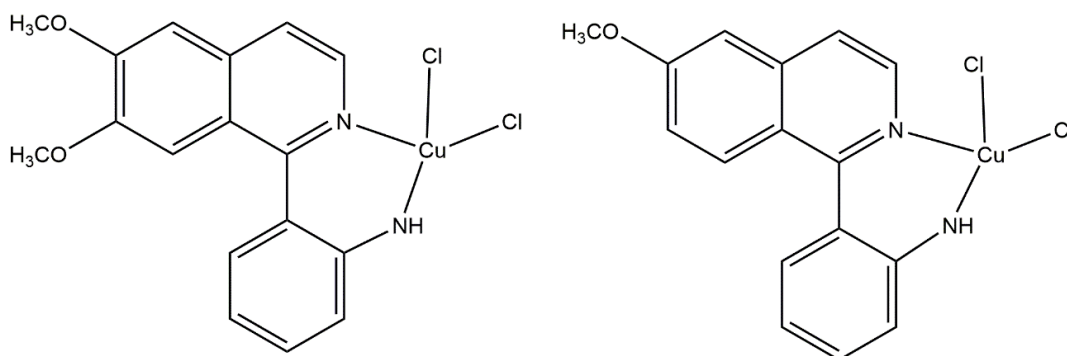
- **Complejos derivados de quinoleínas.**

En la Figura 15 podemos ver la estructura de una quinolina. Una serie de complejos con cobre, con quinoleínas como ligandos, exhibieron gran actividad citotóxica frente a la línea celular A549, e indujeron la muerte celular a través de la activación de

las vías apoptóticas y autofágicas (Figura 16) exhibieron un perfil de seguridad más elevado en comparación con el control cis-platino e inhibieron eficazmente el crecimiento tumoral (Gul *et al.*, 2019). Otros complejos similares con otros metales como el plomo también ejercen efectos citotóxicos en la línea celular A549 (Lüköová *et al.*, 2020).



**Figura 15.-** Quinolina.



**Figura 16.-** Complejos de cobre con ligandos derivados de quinoleína.

- **Complejos con ligandos derivados de semicarbazonas.**

Otros ligandos que se suelen utilizar serían los derivados de tiosemicarbazonas. Los complejos de cobre (II) con tiosemicarbazonas, presentan un comportamiento redox flexible. Rompen la cromatina nuclear mediante vías hidrolíticas y oxidativas, activan la proteína p53, e inducen la formación de especies reactivas de oxígeno ROS. La actividad antiproliferativa de la tiosemicarbazona aumenta al quelatarse con metales como el cobre, y se reducen los efectos secundarios como la alopecia y la inmunodepresión (Singh *et al.*, 2020).

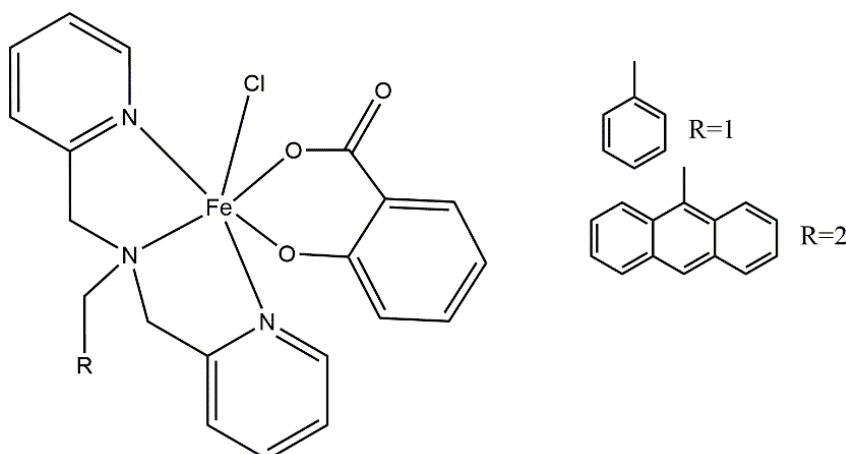
Los complejos de Cu(II), Ni(II), Zn(II), Fe(III) y Mn(III) con tiosemicarbazonas muestran citotoxicidad significativa en las líneas celulares de leucemia mielógena cró-

nica humana K562 y sobre el carcinoma de mama humano MCF-7. Estos estudios muestran que el ciclo celular se detiene en la fase  $G_0/G_1$  y que depende del tiempo. En cambio, el ligando muestra baja efectividad por sí solo (Sardroud *et al.*, 2020).

Los complejos plano-cuadrados de Ni(II) con ligandos resultantes de la condensación de 2-(difenilfosfino)-benzaldehído y 4-fenil-semicarbazida y como coligandos, pseudohaluros que actúan como monodentados, presentan actividad antitumoral *in vitro* y ésta no se ve afectada por la presencia del centro metálico. Los ligandos y complejos muestran la misma actividad respecto a varias líneas celulares entre las que se encuentra la A549. Estos complejos detienen el ciclo celular en la fase S, y su citotoxicidad es dependiente de la concentración. Se unen al ADN de forma covalente y tienen capacidad para escindir al ADN de manera similar a la topoisomerasa I (Milenkovic *et al.*, 2014).

- **Complejos con ligandos fotoactivos derivados de antraceno.**

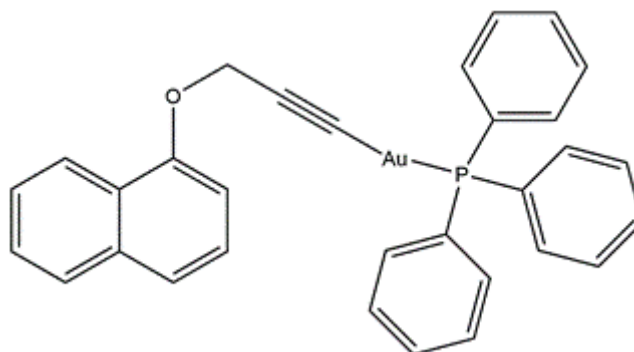
En la Figura 17 se muestra un complejo de hierro (III) con un grupo salicilato, una base de dipicolilamina y un grupo antracénilo fotoactivo. Este complejo se intercala entre los pares de bases del ADN provocando la fotoescisión de ADN plasmídico. Muestra actividad anticancerígena frente a HeLa mediante un proceso de fotoactivación. Por tanto, complejos que contengan ligandos fotoactivos pueden ser interesantes en fototerapia (Garai *et al.*, 2015).



**Figura 17.-** Complejo de hierro con ligandos fotoactivos.

- **Complejos que presentan grupos alquino**

La gran cantidad de complejos derivados de alquiniil oro está muy documentada. Un ejemplo de uno de ellos es el de la Figura 18. Son muy interesantes como antiproliferativos y normalmente son estables *in vitro*. Variando los grupos que se unen al grupo alquino se observan una gran diversidad de propiedades biológicas. Entre ellas podemos destacar la inhibición de la tiorredoxinas, destrucción del ADN, detención del ciclo celular y la inducción a apoptosis (Yang *et al.*, 2020).



**Figura 18.-** Complejo de oro con ligando derivado del grupo alquino.

- **Complejos derivados de indol-pirazolinas**

Los complejos de renio con ligandos indol-pirazolina, como se muestran en la Figura 19, interactúan con el ADN en el surco como modo de interacción más probable. Estos complejos y sus ligandos se ensayaron *in vitro*, por medio del ensayo MTT, en células A549 y se observó que a medida que aumenta la concentración, la proliferación celular disminuye. Los complejos que presentan grupos carbonilo, CO, y ligandos heterocíclicos son los más prometedores. Es interesante destacar su capacidad para actuar sobre diferentes dianas biológicas. También fueron probados como antibacterianos (Varma *et al.*, 2020).

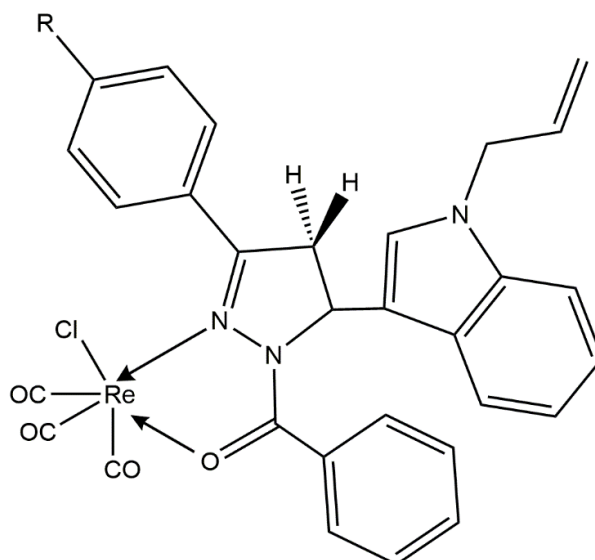


Figura 19.- Complejos de renio con ligados indol-pirazolina.

#### 1.4. La química del vanadio.

##### 1.4.1. Características generales y aplicaciones farmacológicas.

El vanadio es un metal grisáceo cuya densidad es 6,11 g/cm<sup>3</sup>. Se trata de un metal de transición del grupo 5 cuyo número atómico es 23. El vanadio tiene veintiséis isótopos conocidos (entre <sup>40</sup>V y <sup>65</sup>V) y su configuración electrónica es [Ar]3d<sup>3</sup>4s<sup>2</sup>. Presenta un intervalo de estados de oxidación entre el -I y el +V. Las formas más estables en disolución son: III, IV y V. Pasa de un estado a otro mediante procesos de oxidación-reducción y transfiere un electrón de cada vez. El anión vanadato, VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, y el catión vanadilo, VO<sup>2+</sup>, son las especies predominantes de los estados de oxidación IV y V en condiciones fisiológicas, aunque pueden presentarse otras especies de aniones, resultado de reacciones de polimerización, V<sub>4</sub>O<sub>12</sub><sup>4-</sup> y V<sub>10</sub>O<sub>28</sub><sup>6-</sup>, y otros cationes, como VO<sub>2</sub><sup>+</sup> y V<sup>3+</sup> ( Contreras-Cadena *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2012; Guevara, 2018).

La abundancia del vanadio es del 0,02% en la corteza terrestre. Después del molibdeno es el metal más abundante en el mar, con 35nM de concentración. Se trata de un micronutriente esencial para muchas especies marinas y terrestres, participa en la síntesis de clorofila de organismos fotosintéticos, puede actuar como aceptor de electrones en la respiración bacteriana, componente activo de haloperoxidasas en algas y hongos y a nivel humano su carencia puede provocar alteraciones en la absorción y degradación de carbohidratos y lípidos, además de problemas óseos y psicológicos entre otros. Principalmente son los tunicados y el hongo *Amanita muscaria* los organismos

que presentan mayores acumulaciones de vanadio en el organismo (Cuevas *et al.*, 2012; Contreras-Cadena *et al.*, 2014; Rehder, 2012).

La concentración intracelular promedio del vanadio en humanos es 0,3  $\mu\text{M}$ , la cual se puede mantener mediante la ingesta de alimentos y agua que nos lo proporcionan (Rehder, 2012). La cantidad consumida diariamente a través de los alimentos es de 0,01-0,03 mg V/día. A nivel interno la mayor parte del vanadio se excreta a través de las heces y no sigue un proceso de absorción eficaz. El vanadio también presenta unos máximos de exposición por encima de los cuales puede ser tóxico y perjudicial para la salud humana. Los valores de peligro inmediato para la salud serían: 7mg (por vía intravenosa) y 35mg (por vía inhalatoria) (Costa *et al.*, 2015).

En los fluidos corporales y extracelularmente el vanadio predomina como anión vanadato. Al contrario en el interior celular predomina como un catión vanadilo (Ścibior *et al.*, 2020).

El anión vanadato y anión fosfato presentan una estructura similar. Éste es el motivo por el que diversas enzimas lo reconocen como tal, incorporándolo a los procesos metabólicos como, por ejemplo, la ATP-sintasa, que incorpora el vanadio al ADP formando ADP-V (Goodno, 1979).

Son diversas las potenciales aplicaciones farmacológicas del vanadio. A nivel celular los compuestos de vanadio activan numerosas vías de señalización y factores de transcripción lo que potencia sus aplicaciones (Costa *et al.*, 2015). El potencial de los compuestos de vanadio está creciendo y abarca desde propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antivirales, anticancerígenas, antiheperesterolémicas, cardioprotectoras, actividad neuroprotectora..., incluso participa en mecanismo de acción frente a la actividad del apetito para regular los tratamientos de obesidad (Ścibior *et al.*, 2020).

Los compuestos de vanadio son unos buenos candidatos para usar como meta-fármacos en muchas enfermedades que afectan a la población mundial. Sin embargo, su potencial se ve frenado debido a la toxicidad que provoca su acumulación en el organismo.

Una de las potenciales aplicaciones más comunes es como fármaco frente a la diabetes. Los compuestos de vanadio muestran efectos similares a la insulina *in vitro* e



*in vivo*. La terapia con vanadio induce normoglucemia, de este modo mejora la homeostasis de la glucosa en experimentos realizados en roedores diabéticos deficientes y resistentes a la insulina. También se observó un aumento del nivel de insulina en el hígado y los tejidos musculares de pacientes diabéticos de tipo II, después de la terapia con vanadio (Costa *et al.*, 2015; Rehder, 2012; Rehder, 2020; Shechter *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2014; Zorzano *et al.*, 2009).

En la búsqueda de mejorar el tratamiento de la diabetes de tipo I se ha aislado el compuesto bis(alixinato) oxidovanadio(IV), obtenido de alixinas, compuestos presentes en el ajo. Su relevancia ha sido comprobada *in vitro* e *in vivo* y su alta actividad insulino-mimética se comprobó al observar la liberación y mejora de la absorción de la glucosa en adipocitos libres (Adachi *et al.*, 2006). Enfocado a la diabetes tipo II, destacamos el uso de derivados de óxido-vanadio que actúan mimetizando la labor de la insulina (Meister y Butler, 1996). Por ejemplo, el bis-maltolato-oxidovanadio(IV) incrementa la absorción de glucosa en un 60%, produciendo una mejora de la actividad de la insulina (Sánchez-Lara *et al.*, 2018). Estudios de bis-(maltolato) oxidovanadio(IV) demostraron eficacia en experimentos *in vivo* con ratas, frenando el apetito y disminuyendo el peso corporal, efecto que se debe a la expresión de neuropéptidos hipotalámicos. El potencial antiobesidad de este fármaco se contrarresta con los efectos secundarios que provoca la administración de elevadas dosis, lo cual baja la absorción de selenio (lo que puede provocar envejecimiento prematuro, pérdida de elasticidad,..) y aumenta la propensión a infecciones (Contreras-Cadena *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001).

El papel del vanadio en enfermedades parasitaria juega un rol importante destacando sus aplicaciones en el tratamiento de las tripanosomiasis. La enfermedad del sueño y la enfermedad de las Chagas, causadas por *Tripanosomas brucei* y *Tripanosomas cruzi* respectivamente, son dos ejemplos de este tipo de tratamientos (Gambino, 2011).

La multifuncionalidad de los compuestos con vanadio también se puede observar en su actividad antibacteriana. Compuestos de vanadio con ligandos derivados de tiosemicarbazona, han demostrado, en estudios recientes, actividades antibacterianas incluso para bacterias muy resistentes a fármacos y un enorme potencial en la curación de heridas (Bueloni *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020).

Otra de las aplicaciones de compuestos de vanadio que podemos destacar es

como anticonceptivo, ya que provoca la inmovilización de los espermatozoides (D’Cruz y Uckun, 2005).

Por último, pero no menos importante cabe destacar también la aplicación de compuestos de vanadio en enfermedades tropicales causadas por virus y parásitos (Rehder, 2020). El papel de los compuestos de vanadio frente a virus, no está todavía perfectamente esclarecido, pero se ha demostrado que muchos complejos de vanadio inhiben la transcriptasa inversa viral, con esto se bloquea la reproducción del virus (Costa *et al.*, 2015).

#### **1.4.2. Características específicas para su estudio como antitumoral.**

Los compuestos de vanadio también juegan un papel importante en los tratamientos contra el cáncer. La capacidad de los compuestos de vanadio para actuar como miméticos de peroxidasas, catalasas y nitrogenasas es muy relevante, y como tal, la posibilidad de actuar en muchos procesos redox (Crans *et al.*, 2004). Principalmente el mecanismo de acción de estos compuestos es la interrupción del metabolismo celular a través de la generación de especies ROS, alteración de mitocondrias y lisosomas que impiden mantener la homeostasis celular y provocan la apoptosis. Debido a la toxicidad de estos compuestos y/o al daño que producen en el ADN también se puede alterar la proliferación celular (Costa *et al.*, 2015; Kioseoglou *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2019) .

Los compuestos de vanadio, parecen ejercer una acción quimiopreventiva contra la tumorigénesis en varios tipos de cáncer, encontrando en algunos compuestos diferentes mecanismos de acción para la inducción a apoptosis (Bishayee *et al.*, 2010; Contreras-Cadena *et al.*, 2014).

Diferentes estudios han demostrado la capacidad de compuestos de vanadio para reducir o frenar el desarrollo de tumores inducidos químicamente en órganos diana. Un ejemplo de esto es la aplicación de sulfato de vanadio suministrado en la dieta de ratas con cáncer mamario inducido, donde se observó que en etapas posteriores al inicio de la carcinogénesis disminuyó la proliferación celular, en parte mediante mecanismos como la peroxidación lipídica. Otro ejemplo lo encontramos en el uso de metavanadato de amonio, gracias al cual no se manifestaron tumores en intestino, después

de su administración en agua potable durante 30 semanas, en ratones que estaban siendo tratados con 1,2-dimetilhidrazina (Bishayee *et al.*, 2010).

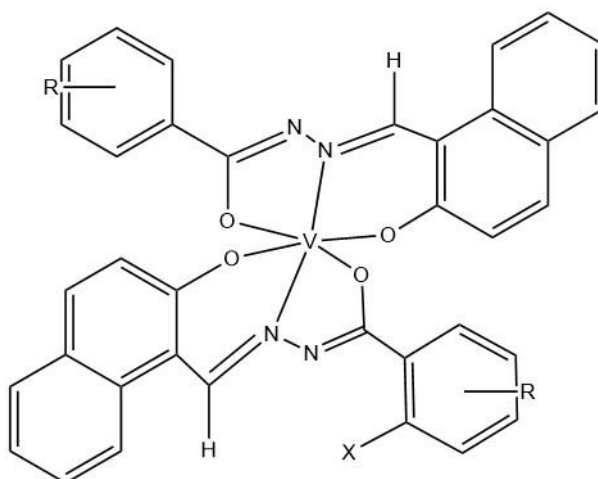
Es muy interesante buscar un equilibrio entre la toxicidad que presentan algunos compuestos de vanadio y sus efectos terapéuticos, o en su caso una selectividad específica frente a células dañadas, al margen de poder añadirle a los compuestos otras cualidades terapéuticas como podría ser la antibacteriana (Kaplánek *et al.*, 2015).

#### **1.4.3. Compuestos de vanadio como antitumorales.**

Un espectro diverso de compuestos de vanadio ha surgido en los últimos años en busca de un tratamiento para neoplasias malignas. Todos estos compuestos, que se han sintetizado y ensayado en el tratamiento del cáncer, podríamos clasificarlos en diversas “familias”: organometálicos de vanadoceno, compuestos que contienen oxidovanadio, peroxidovanadatos binarios y ternarios, complejos de peróxido-betaina y especies de polioxovanadato. La presencia de intercaladores aromáticos en la esfera de coordinación del vanadio es importante, además de aumentar la rigidez de la estructura del compuesto, influyen en los mecanismos de acción (Kioseoglou *et al.*, 2015).

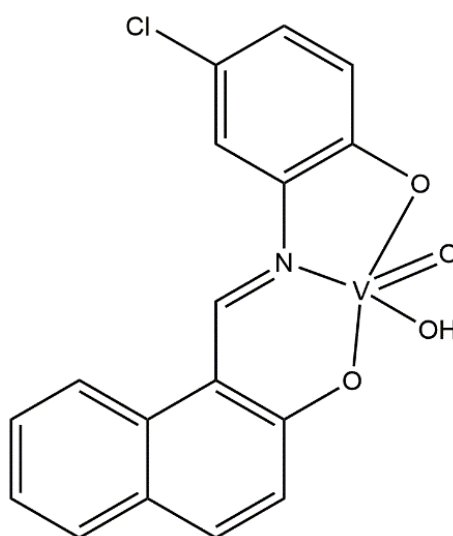
El tipo de ligando va a determinar la estructura y las propiedades del complejo, entre la inmensa variedad de ligandos las hidrazonas (que desarrollamos a fondo en el siguiente apartado) son unas de las más comunes. Se muestran a continuación una serie de complejos de vanadio como anticancerígenos.

En la Figura 20 podemos observar un complejo de vanadio en este caso con ligandos derivados de aroilhidrazonas que contienen grupos base de Schiff, el cual constituye el grupo hidrazona. Éste y otros compuestos similares fueron estudiados *in vitro* para explorar su actividad como anticancerígenos frente a las líneas de cáncer de ovario A2780 y próstata PC3, donde demostraron su actividad citotóxica. En el caso de estos ligandos no presentan citotoxicidad en solitario, pero si muestra muy buena actividad los complejos con V(IV) (Banerjee *et al.*, 2020).



**Figura 20.-** Complejo de vanadio con ligandos derivados de aroilhidrazonas.

En la Figura 21 se muestran complejos de mono- y dióxido-vanadio(V) que contienen la forma desprotonada de un ligando base de Schiff, el cual actúa como tridentado. Estos compuestos fueron investigados como anticancerígenos en la línea de cáncer de mama MCF-7. Todos los complejos mostraron muy buenas actividades anticancerígenas, especialmente en dosis bajas, dato relevante dado que las dosis altas pueden producir efectos secundarios más graves. Las principales líneas de investigación en este campo se centran en estudiar las dosis más bajas que produzcan el efecto clínico deseado. Los complejos de vanadio deben su actividad antiproliferativa a la capacidad para producir especies reactivas ROS, situación que altera la estabilidad de las células tumorales e induce la apoptosis (Ebrahimipour *et al.*, 2015).

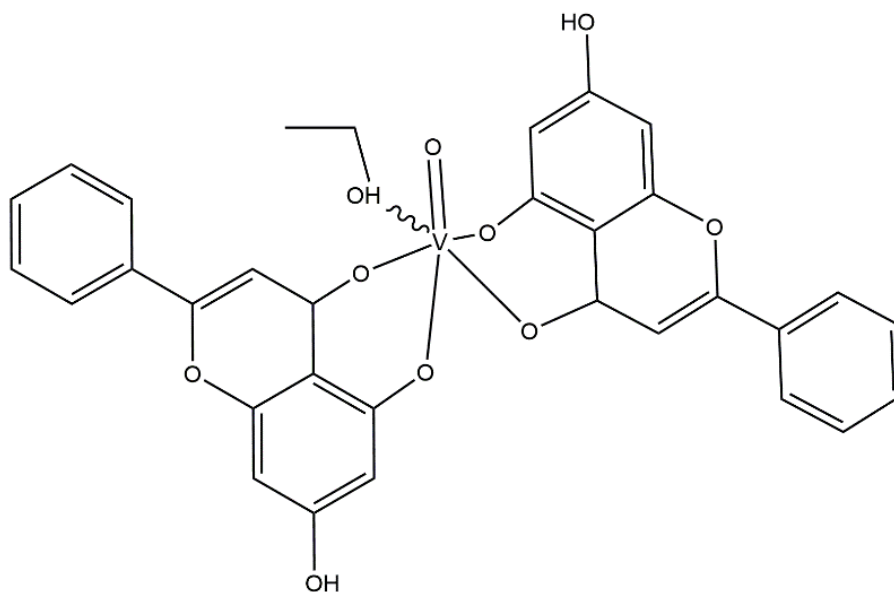


**Figura 21.-** Complejo de vanadio con un ligando derivado de base Schiff.

El complejo de vanadio con ligandos derivados de benzimidazol, interactúa con el ADN y muestra una muy buena capacidad antiproliferativa frente a línea de cáncer de pulmón A549, cáncer de mama humano y la línea de queratinocitos humanos (Mal *et al.*, 2017).

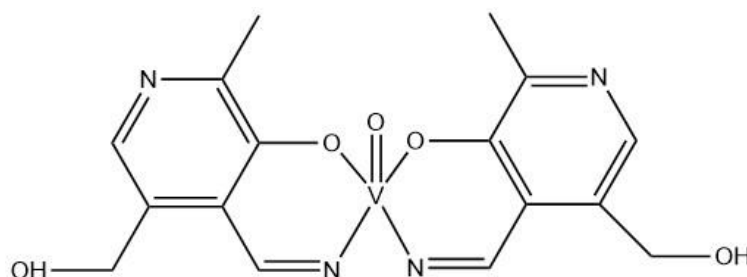
La especie ternaria de preóxido-betaina de vanadio muestra propiedades anticancerígenas frente a la línea tumoral A549. Los heteroligandos químicamente activos como es el caso, pueden mejorar la actividad antitumoral del vanadio, así como, la especificidad de la diana biológica (Petanidis *et al.*, 2013).

En la Figura 22 se muestra un complejo de oxidovanadio con el flavonoide crisina. Este complejo se estudió frente al osteosarcoma humano y se demostró como el complejo con el vanadio mejoró la actividad antitumoral del ligando y los efectos antiproliferativos de estos tumores. Se estudió también como este compuesto interactúa con lisosomas y mitocondrias además de con el ADN celular. En estos estudios el principal mecanismo de acción considerado es el aumento de especies ROS (Leon *et al.*, 2013).



**Figura 22.-** Complejo de oxidovanadio con el flavonoide crisina.

Otro ejemplo de inducción de apoptosis mediada por especies ROS, seguido de la despolarización de la membrana mitocondrial, sería el compuesto de la Figura 23, un complejo de vanadio con ligando tipo base de Schiff que contiene grupos piridoxal. En un estudio se observó un 57% de mortalidad celular en la línea A549 de cáncer de pulmón (Strianese *et al.*, 2013). El piridoxal es un grupo funcional interesante para formar complejos con metales como el vanadio, dada la estabilidad que les confiere (Jakusch *et al.*, 2018).



**Figura 23.-** Complejo de vanadio con ligando derivado de base Schiff.

Debido a la actividad biológica multifuncional y la amplia gama de efectos que presentan los compuestos de vanadio (Ścibior *et al.*, 2020) se pueden considerar una potente herramienta frente a la lucha contra varias enfermedades, el cáncer entre ellas. Por este motivo a continuación desarrollamos nuestra investigación siguiendo los pasos de otras investigaciones, pero innovando con una serie de compuestos.

### 1.5. Hidrazonas.

En la actualidad las hidrazonas despiertan mucho interés, son compuestos heterocíclicos bioactivos que presentan una amplia diversidad de aplicaciones biológicas y clínicas.

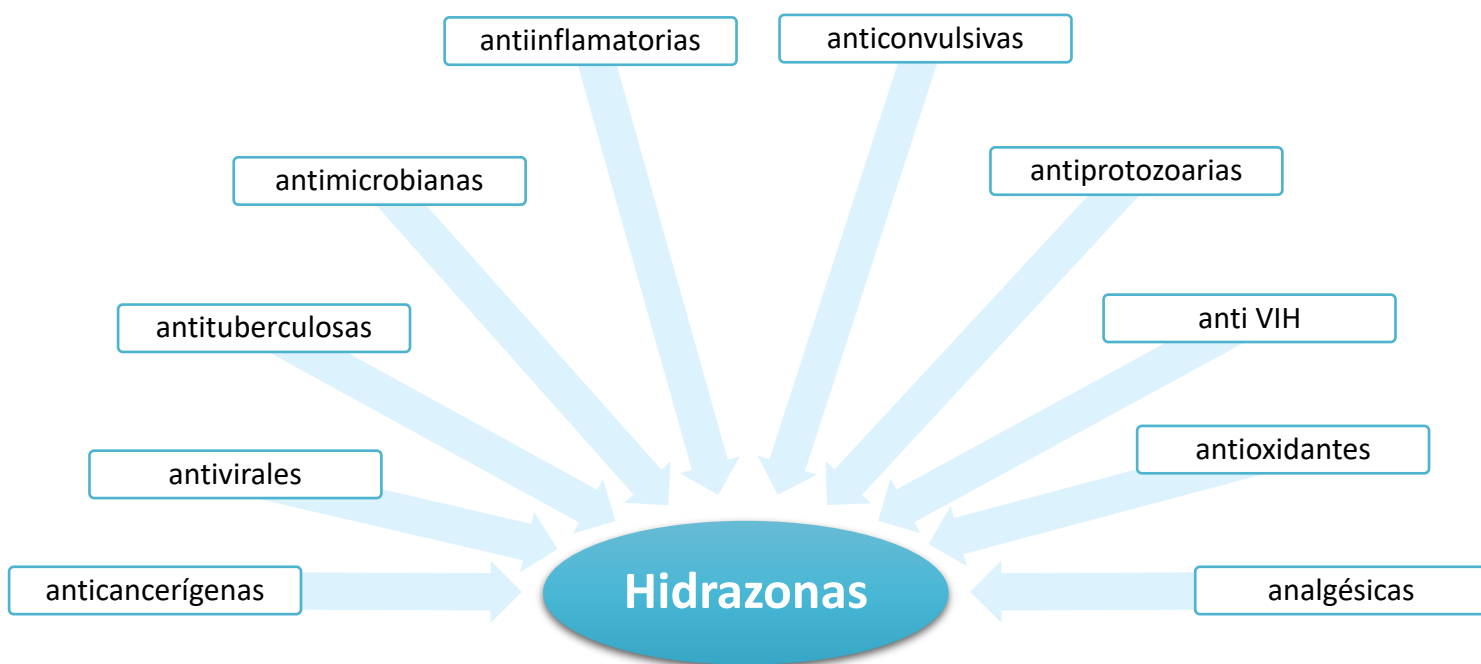
#### 1.5.1. Compuestos de hidrazonas y sus propiedades biológicas.

Los ligandos hidrazona han despertado la atención a lo largo de los años debido a sus propiedades, la diversa gama de aplicaciones, su variabilidad en la estructura y su capacidad quelante. La relación entre la química estructural y la actividad biológica está cada vez más clara. Las hidrazonas son compuestos heterocíclicos que contienen en sus estructuras nitrógeno, oxígeno u otros heteroátomos lo que le confiere una gran versa-

tilidad frente a esta actividad. Los grupos base Schiff que hemos mencionado anteriormente, que se caracterizan por contener un enlace  $-C=N-$  en su estructura, podrían considerarse importantes en estos procesos.

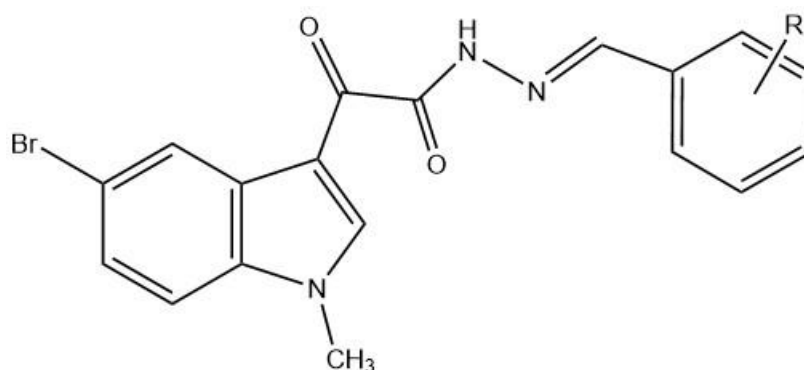
Entre las propiedades farmacológicas de las hidrazonas (ver Figura 24) podemos destacar:

- anticancerígenas (Bhaskar *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2010),
- antivirales (Khattab *et al.*, 2019),
- antituberculosas (Mahajan *et al.*, 2011; Patole *et al.*, 2003),
- antimicrobianas (Oniga *et al.*, 2012),
- antiinflamatorias (Kajal *et al.*, 2014),
- anticonvulsivas (Zhao *et al.*, 2010),
- antiprotozoarias (Coa *et al.*, 2015; Inam *et al.*, 2014),
- anti VIH (Shah *et al.*, 2018),
- antioxidantes (Belkheiri *et al.*, 2010)
- y analgésicas (Sondhi *et al.*, 2006).



**Figura 24.-** Esquema de las propiedades más destacadas de las hidrazonas.

Como ejemplo podemos destacar los compuestos de hidrazonas, como los representados en la Figura 25, que han demostrado poseer actividad antitumoral frente a diferentes líneas tumorales con resultados prometedores (Rudavath *et al.*, 2018).



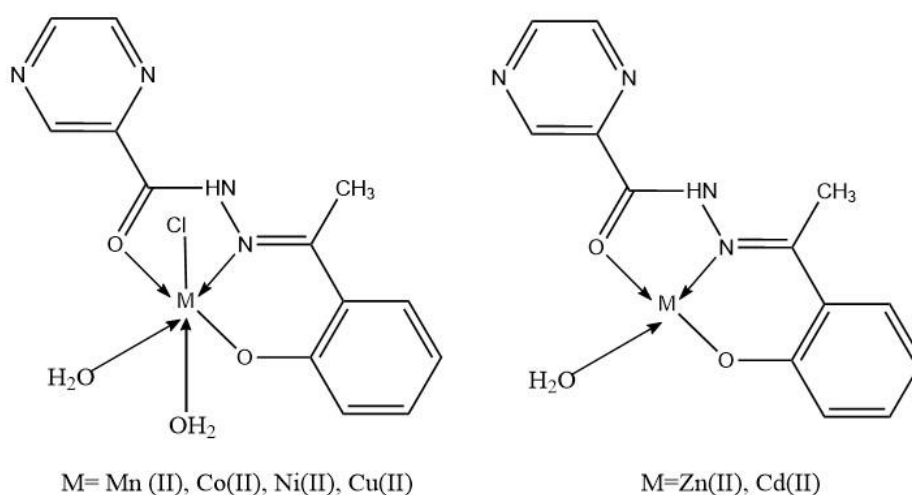
**Figura 25.-** Hidrazonas con diferentes grupos funcionales. R= *o*-NO<sub>2</sub>, *o*-Cl, *p*-F, *p*-OH, *p*-CH<sub>3</sub>, *o*-OH, *m*-OH, H, *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o *m*-Br.

La actividad antitumoral parece deberse a la estructura plana que presentan, lo que determina su interacción con el ADN. Respecto a los estudios de intercalación de ADN de este tipo de compuestos existen numerosos ejemplos en la bibliografía que señalan la capacidad tanto de los ligandos hidrazona como de sus metalocomplejos para interactuar, probablemente mediante intercalación en el ADN (Kaplánek *et al.*, 2015). Las cumarinas, que contienen restos de hidrazonas, se estudiaron frente a células de cáncer resistentes a fármacos con buenos resultados (Nasr *et al.*, 2014).

La actividad antibacteriana de compuestos con bases Schiff e hidrazonas y de N-Mannich se probaron en bacterias gram(+) y gram(-) estándar y patológicas. En este estudio se observó una mayor capacidad antibacteriana para las bases N-Mannich (Sridhar *et al.*, 2001). Compuestos de cobre, cobalto y níquel con bases Schiff derivadas de hidrazona también presentan actividad antibacteriana frente a las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Fekri *et al.*, 2019).



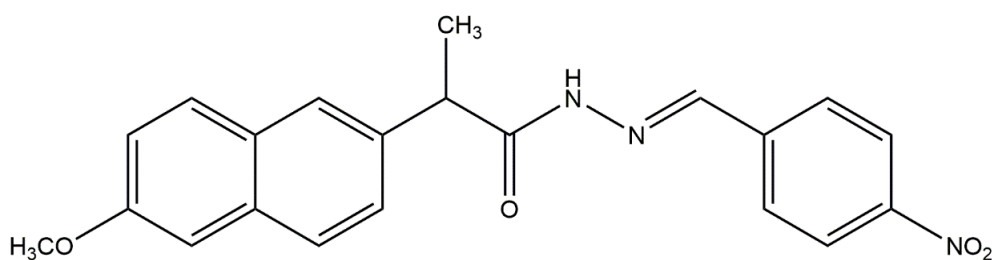
En la Figura 26 observamos las estructuras de una serie de compuestos de metales de transición con ligandos hidrazona. Los ligandos se comportan como un donador tridentado -ONO-. En estos complejos se estudió la actividad antibacteriana y antifúngica frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia faecalis*, *Candida albicans*, entre otras, dando como resultado una alta capacidad en todos los complejos frente a las cepas estudiadas, siendo los complejos de Mn(II), Co(II), Ni(II) y Cu(II) los que mayor capacidad antifúngica y antibacteriana presentan (Bhaskar *et al.*, 2015).



**Figura 26.-** Complejos metálicos con ligandos hidrazona.

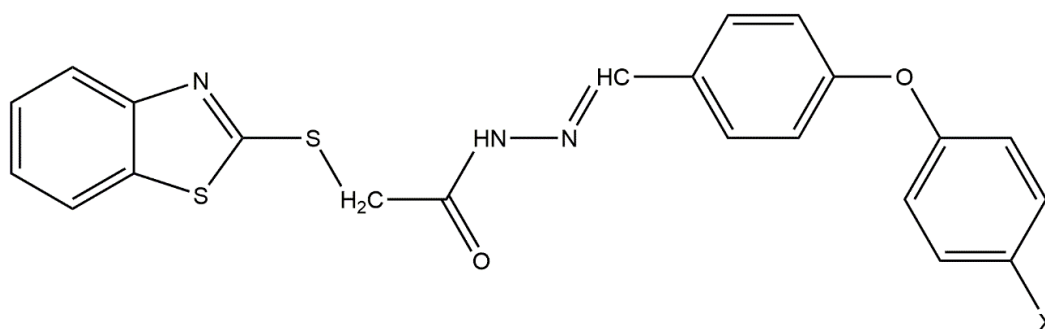
Análogos de benzo[*d*]isotiazolhidrazonas muestran actividad frente a cepas de VIH salvaje (Vicini *et al.*, 2009).

En la Figura 27 podemos observar otro compuesto derivado de hidrazonas. En este caso se trata de derivados de arilhidrazonas de naproxeno. Tanto este compuesto como otros similares muestran propiedades analgésicas (Azizian *et al.*, 2016).



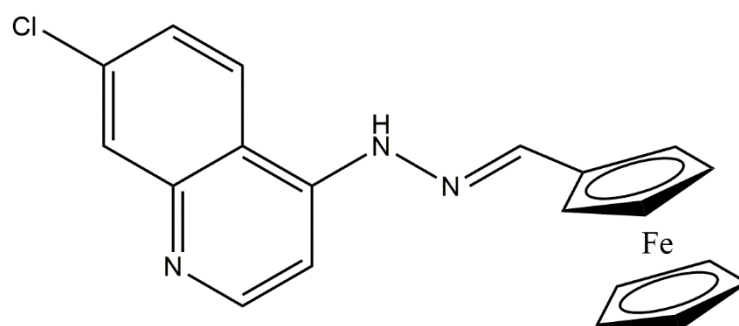
**Figura 27.-** derivados de arilhidrazonas de naproxeno.

Por otro lado, también tenemos hidrazonas derivadas de 1,3-benzotiazol-2-il-sulfanilo; con Cl, F y Br como halógenos, que presentan propiedades anticonvulsivas. Además, para la que presenta Cl en su estructura, se han observado propiedades antiepilépticas, mediante un mecanismo de unión a las células diana moleculares de la epilepsia. Uno de estos compuestos lo vemos en la Figura 28 (Kumar *et al.*, 2012).



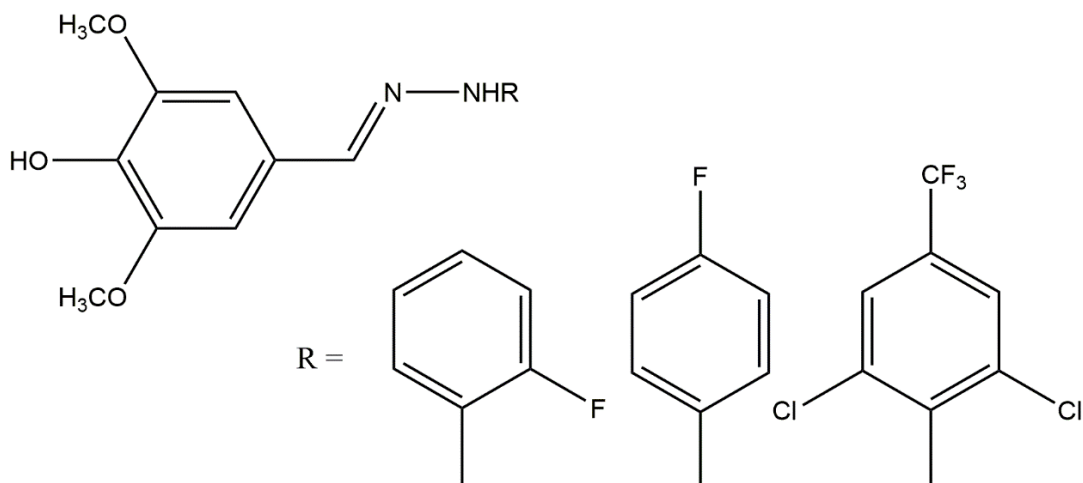
**Figura 28.-** Hidrazonas derivadas de 1,3-benzotiazol-2-il-sulfanilo con X = F, Cl y Br.

Otra propiedad que presentan algunos compuestos hidrazona es la capacidad antituberculosa. Esta propiedad la encontramos en hidrazonas que forman parte de compuestos con ferroceno, que contienen además grupos quinoleína (Mahajan *et al.*, 2011) ver Figura 29.



**Figura 29.-** Hidrazonas derivadas de ferroceno que contienen grupos quinoleína.

Finalmente mencionar un ejemplo de hidrazonas derivadas de la condensación de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído e hidrazidas, que presentan propiedades antioxidantes que observamos en la Figura 30 (Belkheiri *et al.*, 2010).



**Figura 30.-** Familia de hidrazonas derivadas de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído.

### 1.6. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad: MTT.

La citotoxicidad se puede definir como una alteración de las funciones celulares básicas a causa del daño producido por una sustancia química (Acevedo *et al.*, 2013). A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes ensayos citogenéticos para descartar el efecto tóxico de compuestos químicos que tengan potencial aplicación como medicamentos. Estos ensayos nos sirven para poder avanzar en la investigación de posibles fármacos, en el caso de que éste presente unos efectos tóxicos bajos en células sanas y relativamente altos en células tumorales. El descenso de la viabilidad celular tras el tratamiento con un determinado compuesto es uno de los primeros efectos citotóxicos detectables. Es por ello que los ensayos de testado de viabilidad celular *in vitro* constituyen habitualmente el primer paso a la hora de testar un potencial fármaco. Entre los tipos de ensayos empleados con esta finalidad encontramos el ensayo MTT (basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difentetrazol, conocida como sal de tetrazolio), el XTT, el MTS, el WST, el ensayo de captación de rojo neutro (RN), el ensayo de la actividad de la encima lactato deshidrogenada (LDH), el de azul de kenacid, y el de azul de tripano (Gallegos-Hernandez, 2018).

Por su sencillez, rapidez y reducido coste, el ensayo MTT es uno de los ensayos de viabilidad celular más comúnmente empleados en todo el mundo. Se trata de un

ensayo cuantitativo cuyos resultados se leen con un espectrofotómetro para placas multipocillo. Con esta técnica se puede determinar la supervivencia y proliferación celular en base la actividad mitocondrial de las células. La señal generada detectada por el espectrofotómetro depende del formazán formado por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Figura 31). Las mitocondrias transforman reduciendo la sal de tetrazolio (MTT) de color amarillo y soluble en agua en formazán de color púrpura azulado que es insoluble. Es presumible que solo las células vivas van a hacer esta transformación, con lo cual se puede decir que la cantidad de formazán es predecible y directamente proporcional a la cantidad de células vivas (Riss *et al.*, 2004).

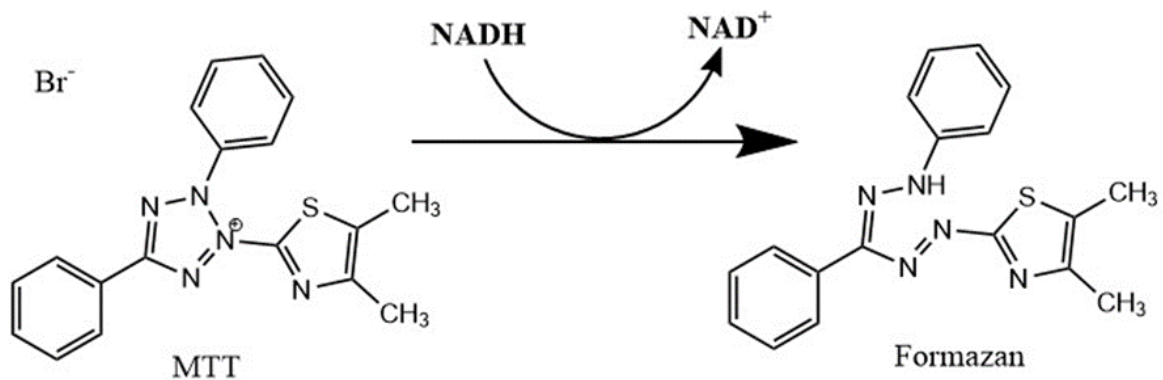


Figura 31.- Reducción de MTT a formazán.

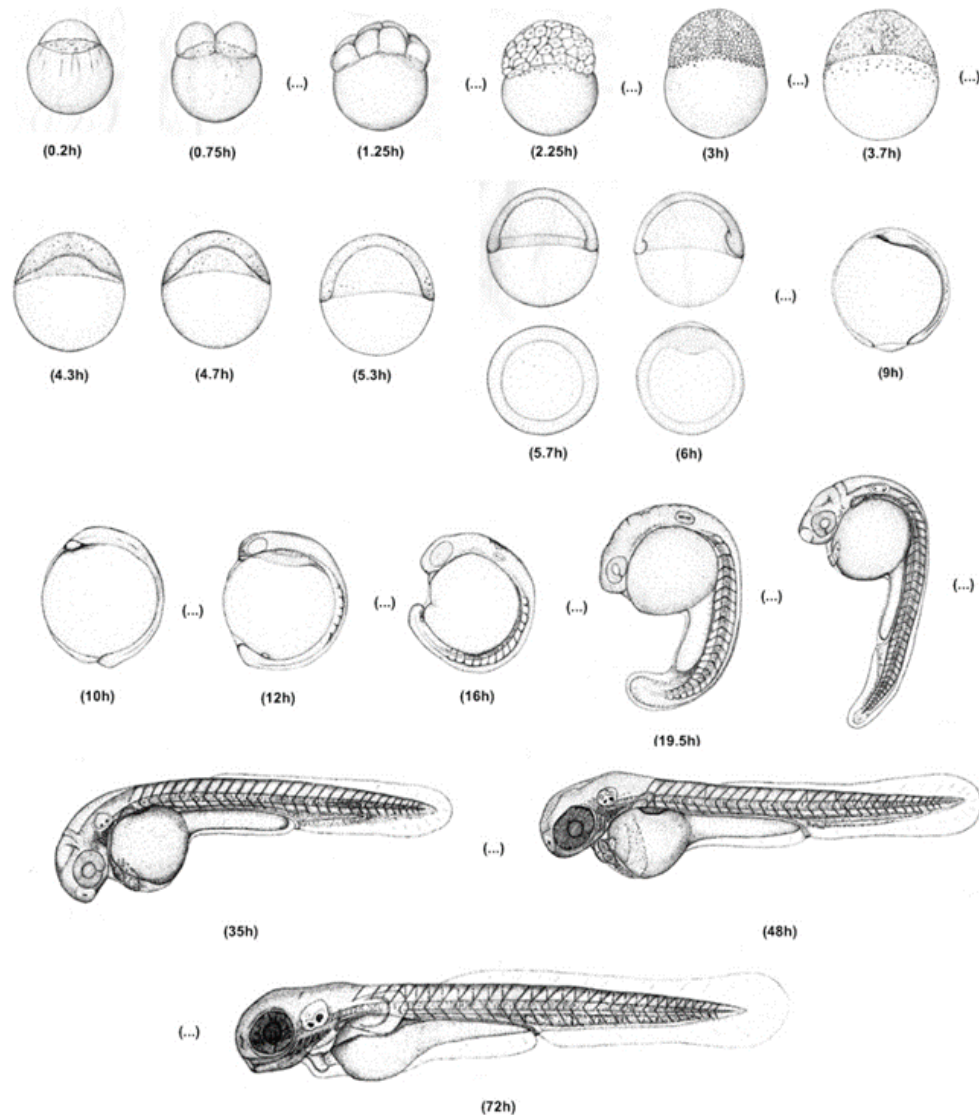
### 1.7. El pez cebra como modelo de ensayos *in vivo*.

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie ampliamente utilizada en estudios biológicos, tanto ambientales como médicos. Perteneciente al filo *Chordata*, clase *Actinopterygii*, división *Teleostei*, orden *Cypriniformes*, familia *Cyprinidae* y género *Danio* (Nelson, 2016). Es un pez tropical de agua dulce, originario del sur de Asia (Menon, 1999). Esta especie prefiere aguas poco profundas, de flujo lento, ligeramente alcalinas y con alta transparencia (McClure *et al.*, 2006). Su tamaño varía entre 4 y 6 cm de longitud y entre 2 y 3 gramos su peso. Su cuerpo es de color plateado y dorado posee de 5 a 7 franjas longitudinales en tono negro que comienzan detrás del opérculo y se extienden hasta la aleta caudal incluida. Al igual que otros ciprínidos, presenta dimorfismo sexual,

siendo la hembra más robusta que el macho y, en la edad fértil de la hembra, esta apreciación se hace más evidente aumentando el tamaño de su vientre y destacando su color plateado. El macho es más delgado y tiene el vientre más dorado (Nelson, 2016).

El pez cebra presenta una reproducción ovípara, con fecundación externa. La hembra pone los huevos en el agua y el macho por su parte libera el esperma. Esta especie presenta rápido desarrollo embrionario, ya que a las 24h post fecundación (hpf) los principales órganos están formados. A los tres días se produce la eclosión, debido a la una enzima (ZHE1) localizada en el vitelo de los embriones (Sano *et al.*, 2008), que produce la digestión del corion (Okada *et al.*, 2009), durante cinco días las larvas se nutren del vitelo, pasado este tiempo requieren alimento.

El desarrollo temprano del pez cebra consta de varias etapas descritas por Kimmel *et al.* (1995): cigoto (0 - 0,75 hpf), período de división (0,75-2,25 hpf), estadio de blástula (2,25-5,25 hpf), estadio de gástrula (5,25-10 hpf), período de segmentación (10-24 hpf), estadio de farínula (24-48 hpf) y finalmente período de eclosión (48-72 hpf). El periodo embrionario abarca desde la fecundación hasta las 72 hpf. Transcurridas las 72 hpf ya se ha formado la larva temprana, y a las 96 hpf la larva presenta un desarrollo completo. Las diferentes etapas se muestran en la Figura 32.



**Figura 32.-** Representación gráfica simplificada del desarrollo embrionario del pez cebra. Modificada de (Kimmel *et al.*, 1995).

Esta especie se ha convertido en los últimos años en un organismo modelo para realizar estudios en campos tan diferentes como la biología del desarrollo o la biomedicina (Losada *et al.*, 2012), destacando su utilidad en la neurociencia debido a su homología genética, fisiológica y morfológica con el sistema nervioso central de los seres humanos (Kalueff *et al.*, 2013). A pesar de ello el pez cebra también presenta algunas desventajas como modelo debido a las diferencias con humanos, entre ellas podríamos destacar la duplicación del genoma, falta de hueso esponjoso, pulmones y articulaciones sinoviales (Ali *et al.*, 2011).

Numerosos estudios avalan la utilización del pez cebra para testar la posible toxicidad que diferentes fármacos pueden ejercer, siendo pues un organismo muy útil en

estudios preclínicos para descartar fármacos potencialmente peligrosos (McGrath y Li, 2008).

Así, el pez cebra, aunque con ciertas limitaciones, constituye un modelo alternativo al uso de mamíferos en estudios de toxicidad. Los resultados obtenidos con *Danio rerio* se relacionan con los efectos presentes en roedores, un ejemplo podría ser el estudio de toxicidad de metilxantinas, donde se observaron los defectos morfológicos en pez cebra (desprendimiento de cola, alteración ocular, latido cardiaco...) los cuales se correlacionaron fuertemente con los obtenidos en ratas y ratones (Basnet *et al.*, 2017). Incluso algunos estudios han demostrado que los embriones de pez cebra son más sensibles a los efectos de determinados fármacos (Truong y Tanguay, 2017; Winter *et al.*, 2008).

La amplia versatilidad del pez cebra permite hacer ensayos de cardiotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y toxicidad del desarrollo entre otros (McGrath y Li, 2008). El pez cebra juega también un papel muy importante en estudios de cardiotoxicidad ya que exhibe un patrón muy similar a mamíferos, además el corazón empieza a latir a las 22 hpf, un ejemplo sería un estudio sobre las analogías entre las taquicardias en humanos y los efectos en pez cebra, en este caso encontrando similitudes para 22 de 23 fármacos testados (Sedmera *et al.*, 2003). Otro papel importante lo tenemos en estudios de hepatotoxicidad donde se encontraron homólogos a las enzimas metabolizadoras de lípidos en mamíferos, esto es posible estudiarlo dado que el hígado se forma en las 48 hpf y a las 72 hpf estaría en total funcionamiento (Ibabe *et al.*, 2002). Una amplia variedad de estudios en pez cebra se centran en evaluar la posible contaminación ambiental que causan algunos pesticidas y fármacos, es decir biomarcadores de la calidad del agua ya que son capaces de absorber moléculas disueltas en el agua a través de la piel y las branquias, también en estudios de biomonitorización (Dubińska-Magiera *et al.*, 2016; García *et al.*, 2018; Goldsmith, 2004; Severo *et al.*, 2020). Un estudio sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo(a)pireno empleado en la eliminación de desechos plásticos mostraron efectos teratogénicos a concentraciones muy bajas (0.5µM) (Elfawy *et al.*, 2021). Otro ejemplo sería el estudio de desechos de humo negro solubles en agua, que dieron como resultado en los estudios de pez cebra cámaras cardiacas malformadas, edemas pericárdicos, retraso en el desarrollo del saco vitelino y

aumento de la mortalidad, además en este estudio se confirmó que la presencia de níquel y vanadio juntos provocan una disminución de la frecuencia cardiaca (Kim *et al.*, 2019). También en el estudio de cómo afectan los fungicidas al medio ambiente; la tifluzamida afectó en gran medida a los peces cebras sometidos a este estudio, provocando movimientos anormales y espontáneos, latidos cardiacos lentos, deformaciones y edemas, además de la inhibición de la eclosión lo que se traduce en una elevada mortalidad (Yang *et al.*, 2016). Además añadir estudios de residuos que dejan los fármacos en productos alimenticios, como ejemplo un estudio reciente sobre contaminantes emergentes que provocan un impacto en la salud pública, como el estudio de residuos de amoxicilina que se emplea en tratamientos de mastitis en vacas, donde se demostró que la presencia de residuos de antibióticos persiste incluso tras la pasteurización de la leche (Chowdhury *et al.*, 2020). En contextos como la actual pandemia juega un papel clave este organismo para poder ver los efectos que provocan la gran cantidad de desechos de azitromicina e hidroxiclороquina observando que provoca diversas alteraciones fisiológicas en pez cebra adulto, con lo que conlleva una alteración de los ecosistemas de agua dulce (Mendonça-Gomes *et al.*, 2021). Hay que destacar la conservación de las vías de señalización con los mamíferos y la convergencia genética al ser humano, lo que permite estudiar en este el comportamiento mitocondrial y las modificaciones de este orgánulo a factores microambientales jugando un importante papel a nivel inmunológico (Ibabe *et al.*, 2002).

El pez cebra también se emplea en estudios relacionados con procesos inflamatorios y de cicatrización (Martin y Feng, 2009), análisis de transferencia de inmunidad materna que protege a los embriones en estadios previos al desarrollo del sistema inmunitario (Mulero *et al.*, 2007), ensayos antibióticos para evaluar cómo afectan a la microbiota intestinal en pez cebra con enterocolitis inducida (Brugman *et al.*, 2009) y experimentos sobre el desarrollo de cartílago entre otros (Chen *et al.*, 2009).

Respecto a la investigación del cáncer, el pez cebra permite realizar un seguimiento tanto de la migración de las células cancerígenas en su sangre, como de la formación de micrometástasis, ello se consigue mediante el marcaje fluorescente de los tumores, previo a la implantación en esta especie, y posterior observación, favorecida



por el hecho de que los embriones son transparentes (Marques *et al.*, 2009). Concretamente podemos destacar un estudio sobre el melanoma, gracias a las características de desarrollo y la piel del pez cebra que permiten observar imágenes de células vivas y la diseminación de estas células tumorales previamente marcadas con fluorescencia en un xenotransplante (Bootorabi *et al.*, 2017).

La embriotoxicidad, o capacidad de que una sustancia pueda producir efectos, antes y durante la gestación o el periodo fetal, es otro parámetro estudiado en el pez cebra. Como ejemplo podemos destacar un estudio sobre el metilparabeno, un producto de uso frecuente en la conservación de productos alimenticios, farmacéuticos o de cuidado personal, las pruebas en pez cebra desvelaron una serie de efectos teratogénicos que se producen tras la exposición de los animales a este compuesto (Merola *et al.*, 2020).

La aplicación del pez cebra a los estudios antes descritos se debe a sus particulares características: de fácil cría y mantenimiento en laboratorio, ciclo vital corto, desarrollo embrionario rápido, puestas muy numerosas (entre 100 y 200 huevos) y embriones ópticamente transparentes (Spence *et al.*, 2008). Al margen de estas propiedades anatómicas y fisiológicas otro detalle a tener en cuenta en la aplicación de ellos es el bajo coste experimental y que los volúmenes de compuestos que se requieren para la evaluación son mínimos (McGrath y Li, 2008; Truong y Tanguay, 2017).

El modelo pez cebra, como ya se ha mencionado, es ideal para los ensayos de embriotoxicidad, ya que las primeras etapas embrionarias, son muy susceptibles a los efectos adversos de las sustancias químicas; además, la respuesta a éstas es comparable en muchas ocasiones a la esperada en humanos (Yang *et al.*, 2009). Actualmente, existe una guía internacional de la OECD con directrices precisas para el testado de efectos embriotóxicos en pez cebra (OECD, 2013). En esta guía se describe la prueba TG 236 sobre toxicidad aguda en embriones de pez cebra: el ensayo FET. Este ensayo sirve para determinar la toxicidad aguda de sustancias químicas en embriones de *Danio rerio*, para lo que se observan determinados parámetros como la falta de latidos del corazón, la coagulación de huevos ya fertilizados, la no formación de somitas y desprendimiento de cola o saco vitelino. Pasado el periodo de exposición al producto a testar se calcula el LC<sub>50</sub> (concentración letal media).





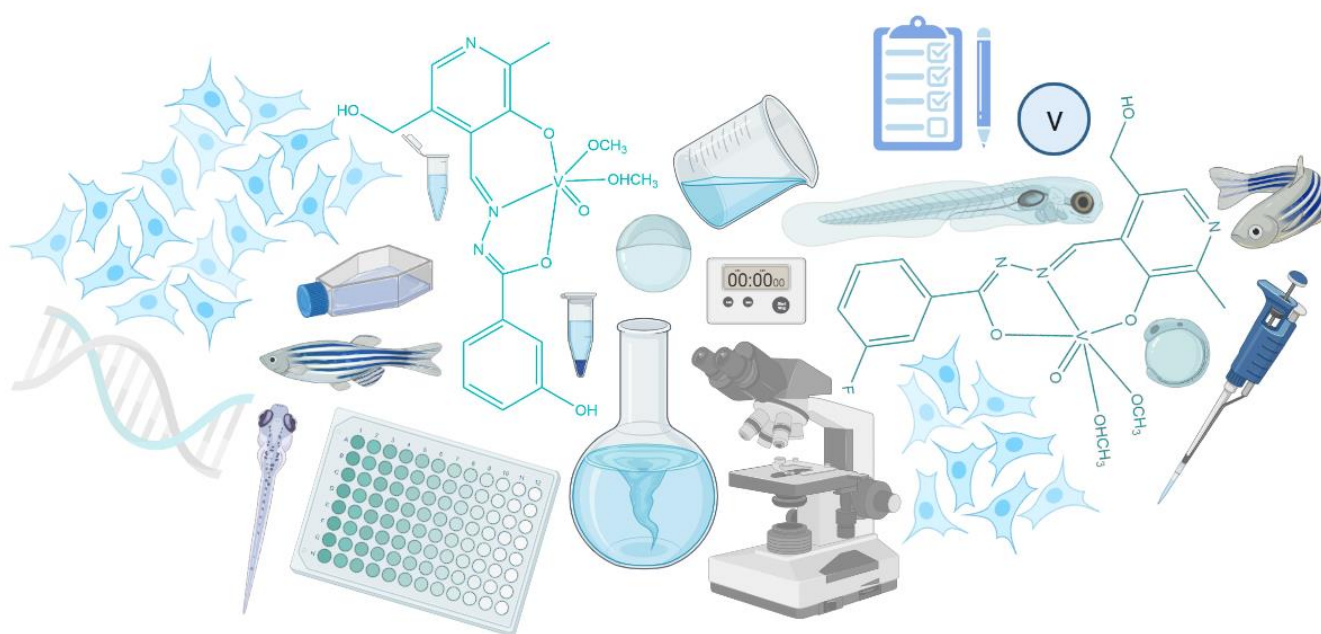
## 2. Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es la obtención y estudio de posibles fármacos antitumorales para lo que se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de cuatro compuestos orgánicos con grupos funcionales tipo hidrazona que pueden utilizarse como ligandos para preparar los complejos de oxidovanadio.
2. Caracterización de los ligandos y los complejos de oxidovanadio obtenidos mediante:
  - caracterización estructural
  - análisis elemental
  - espectrometría de masas
  - espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$
  - espectroscopia de IR
  - difracción de rayos X de monocristal
3. Estudio de los principales tipos de interacciones intermoleculares en las especies químicas estudiadas.
4. Estudio del potencial citotóxico de los ligandos hidrazona y los complejos de oxidovanadio mediante ensayos *in vitro*, por medio del ensayo de viabilidad MTT, en la línea celular A549.
5. Determinación *in vivo* de los efectos tóxicos y teratogénicos de los compuestos derivados de hidrazona y de los complejos de oxidovanadio (con mejores resultados en el estudio de MTT), mediante el test para embriones de pez cebra (FET).

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



### 3. Material y métodos.

#### 3.1 Estudios químicos.

##### 3.1.1 Síntesis.

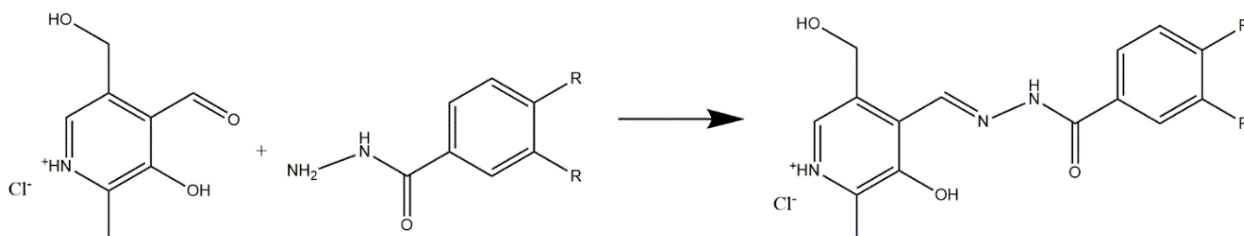
Los compuestos a estudio se han sintetizado siguiendo la misma ruta de reacción (Maurya *et al.*, 2005). En la Tabla 1 se describen los reactivos y disolventes empleados.

**Tabla 1.-** Reactivos y disolventes empleados para la síntesis de los compuestos a estudio.

Reactivos
3-fluorobenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)
3-hidroxibenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)
4-clorobenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)
3-metoxibenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)
Hidrocloruro de piridoxal (Sigma Aldrich, 99%)
Acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich, 98%)
Disolventes
Metanol (Fisher Chemical, >99,5%)
Metanol (Panreac, >99,9%)
Dietiléter (Fisher Chemical, 99%)
Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, ≥99,9%)
Dimetilsulfóxido-d <sub>6</sub> (Merck, 99,96%)
Etanol absoluto (Panreac, 99,5%)

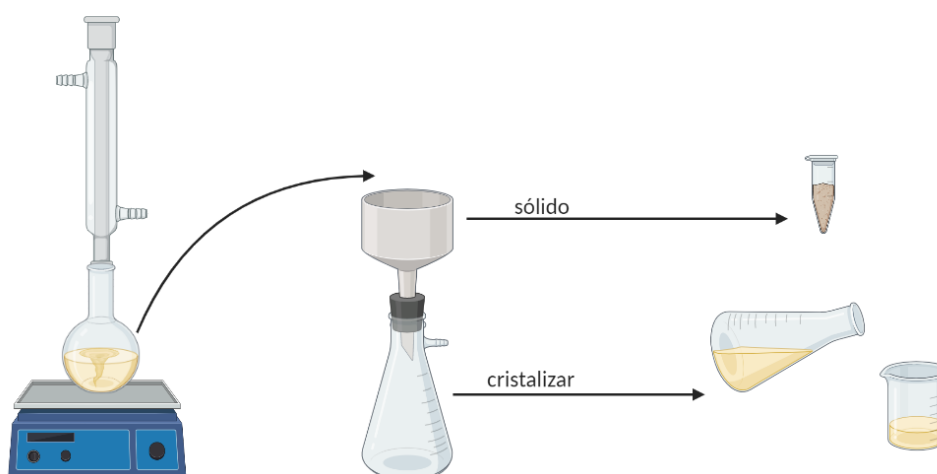
### Síntesis de Ligandos

La síntesis de los ligandos se llevó a cabo por medio de una reacción de condensación en metanol del monoaldehído, hidrocloreto de piridoxal, con las diferentes hidrazidas según el esquema de la Figura 33.



**Figura 33.-** Esquema de la ruta de síntesis llevada a cabo para la obtención de los ligandos hidrazona, donde R es: L<sup>1</sup>, R=F; L<sup>2</sup>, R=OH; L<sup>3</sup>, R=Cl y L<sup>4</sup>, R= OCH<sub>3</sub>.

Cantidades equivalentes de los reactivos se disolvieron en la mínima cantidad de metanol en cada caso. En un matraz de fondo redondo (50mL) se mezclaron y sometieron a refluxo durante 2 horas. El sólido obtenido se filtró al vacío y se lavó con una porción de metanol y otra de dietiléter. Las aguas madres resultantes de la filtración cristalizaron obteniéndose cristales aptos para su estudio por difracción de Rayos X de monocristal. En la Figura 34 se puede ver un esquema del proceso.



**Figura 34.-** Esquema del proceso de síntesis y filtrado. Creado con BioRender.

La Tabla 2 muestra los reactivos empleados para la síntesis de los ligandos, así como la descripción de la morfología que presentan cada uno de ellos.

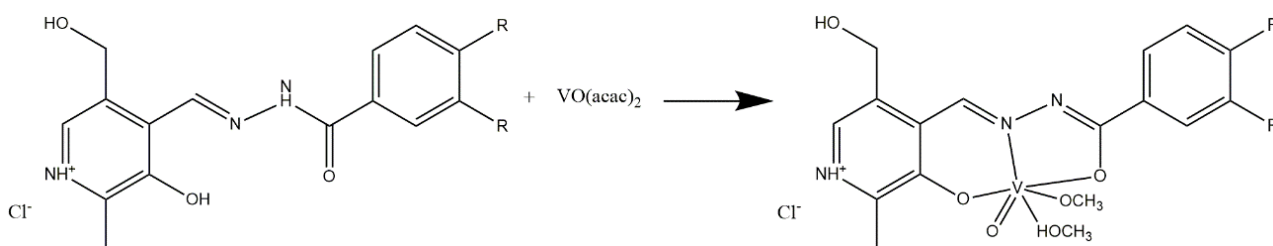
**Tabla 2.-** Reactivos empleados para la síntesis de los ligandos y aspecto.

Compuesto	Reactivos	Descripción del compuesto
L <sup>1</sup>	3-fluorobenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)	Sólido de color blanco amarillento
	Hidrocloruro de piridoxal (Sigma Aldrich, 99%)	
L <sup>2</sup>	3-hidroxibenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)	Sólido de color blanco amarillento
	Hidrocloruro de piridoxal (Sigma Aldrich, 99%)	
L <sup>3</sup>	4-clorobenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)	Sólido de color amarillo
	Hidrocloruro de piridoxal (Sigma Aldrich, 99%)	
L <sup>4</sup>	3-metoxibenzohidrazida (Sigma Aldrich, 98%)	Sólido de color blanco amarillento
	Hidrocloruro de piridoxal (Sigma Aldrich, 99%)	

### Síntesis de los complejos

La síntesis de los complejos se llevó a cabo de acuerdo con el esquema de la Figura 35. Se emplearon como reactivos los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>, sintetizados previamente, y acetilacetato de vanadilo (ver la Tabla 3). En este caso cantidades equivalentes de los compuestos de partida fueron disueltas en la mínima cantidad de metanol y se mezclaron en un matraz de fondo redondo de 100mL. La disolución resultante se sometió a reflujo y agitación durante 4-5 horas, después se dejó solamente en agitación durante 48h a temperatura ambiente. La disolución inicial suele tener un tono negro-verdoso que con el paso del tiempo se va volviendo rojiza. Después de las 48h se dejó cristalizar el líquido, con el fin de obtener cristales aptos para su estudio por difracción de Rayos X de monocristal y purificar los compuestos obtenidos por cristalización.





**Figura 35.-** Esquema de la ruta sintética utilizada para la obtención de los complejos.

L<sup>1</sup>: R=F, L<sup>2</sup>; R=OH, L<sup>3</sup>: R=Cl y L<sup>4</sup>: R= OCH<sub>3</sub>.

**Tabla 3.-** Reactivos para la síntesis de los complejos de vanadio, rendimiento y características.

Complejos de vanadio	Reactivos	Descripción de los complejos
L <sup>1</sup> c	Ligando L <sup>1</sup>	Sólido de color naranja
	Acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich, 98%)	
L <sup>2</sup> c	Ligando L <sup>2</sup>	Sólido de color naranja amarillento
	Acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich, 98%)	
L <sup>3</sup> c	Ligando L <sup>3</sup>	Sólido de color marrón
	Acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich, 98%)	
L <sup>4</sup> c	Ligando L <sup>4</sup>	Sólido de color marrón.
	Acetilacetato de vanadilo (Sigma Aldrich, 98%)	

### 3.1.2 Caracterización.

#### 3.1.2.1 Análisis elemental.

El análisis elemental se realizó en el analizador elemental FlashEA 1112 (Thermo-Finnigan), mediante combustión con flujo de helio se realizó la determinación de los porcentajes de oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno.

#### 3.1.2.2 Espectrometría de masas.

Se empleó el espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite con el fin de obtener los espectros (positivos y negativos) mediante ionización con electrospray (ESI) acoplado con un analizador de tiempo de vuelo (TOF). El disolvente empleado fue metanol.

### 3.1.2.3 Espectroscopia RMN $^1\text{H}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se llevaron a cabo en disolución en DMSO deuterado (Merck, 99,9%) y se registraron en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker AVANCE 400.

### 3.1.2.4 Espectroscopia IR

Los espectros de IR se registraron en un equipo de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) Thermo Scientific NICOLET IS10.

### 3.1.2.5 Difracción de rayos X de monocristal

La estructura cristalina de los compuestos  $\text{L}^1$ ,  $\text{L}^2$ ,  $\text{L}^3$ ,  $\text{L}^4$ ,  $\text{L}^{2\text{c}}$  y  $\text{L}^{3\text{c}}$  fue estudiada por difracción de Rayos X de monocristal. Estos cristales fueron medidos en un difractómetro BRUKER-NONIUS X8 APEX KAPPA de fuente de radiación de Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) por el método de escaneo  $\varphi$ - $\omega$  a baja temperatura. Las reflexiones fueron tomadas en un hemisferio de datos y se coleccionaron "frames" en intervalos de  $0.3^\circ$  en  $\omega$ . Se midieron un total de 26691 reflexiones para el compuesto  $\text{L}^1$ , 9584 para el compuesto  $\text{L}^2$ , 49620 para  $\text{L}^3$ , 50893 para  $\text{L}^4$ , 48863 para  $\text{L}^{2\text{c}}$  y 22749 para  $\text{L}^{3\text{c}}$  se corrigieron por los efectos de Lorentz y polarización. También se corrigieron por absorción y para ello se utilizó un método semi-empírico basado en las equivalencias simétricas observadas en las reflexiones repetitivas. De todas las reflexiones medidas se seleccionaron las siguientes reflexiones independientes que excedieron del nivel significativo  $|F|/\sigma(|F|) > 4.0$ : 2148 para  $\text{L}^1$ ; 2656 para  $\text{L}^2$ ; 5436 para  $\text{L}^3$ ; 3151 para  $\text{L}^4$ ; 3655 para  $\text{L}^{2\text{c}}$  y 3087 para  $\text{L}^{3\text{c}}$ . En cada cristal, una vez se terminó con la colección de datos, se llevó a cabo una corrección por absorción de multi-escaneo (SADABS) y la estructura fue resuelta por métodos directos y refinada por el método de mínimos cuadrados de matriz directa sobre  $F^2$ , utilizando los programas de los paquetes informáticos SHELXL y Olex2-1.3. Los átomos que no son hidrógenos se refinaron con los parámetros de anisotropía correspondientes en todos los casos. Los átomos de hidrógeno fueron localizados en el mapa diferencial de Fourier y se dejaron refinar libremente, excepto para los átomos C(7) en el compuesto  $\text{L}^1$ , O(4), C(7) y C(12) en el compuesto  $\text{L}^2$ , O(1M), C(1M), C(6), C(7), C(21) y C(22) en el compuesto  $\text{L}^3$ , y O(3A), O(3B), C(10), C(12), C(13), C(15) y C(16) en el compuesto  $\text{L}^4$ , C(1M), C(2M), C(3M) y C(7) en el compuesto  $\text{L}^{2\text{c}}$ , y O(3A), O(3B), C(6), C(7), C(11), C(12),

C(14) y C(15) en el compuesto L<sup>3c</sup>, los cuales se colocaron en posiciones calculadas y se refinaron con el método de laceo. En el mapa de Fourier residual no se observaron densidades electrónicas significativas, excepto en L<sup>3c</sup> debido al desorden observado: 0,263/-0,301 e·Å<sup>-3</sup> para el compuesto L<sup>1</sup>, 0,331/-0,267 e·Å<sup>-3</sup> para el compuesto L<sup>2</sup>, 0,268/-0,316 e·Å<sup>-3</sup> para L<sup>3</sup>, 0,404/-0,463 e·Å<sup>-3</sup> para el compuesto L<sup>4</sup>, 0,522/-0,520 e·Å<sup>-3</sup> para el compuesto L<sup>2c</sup> y 1,47/-0,64 e·Å<sup>-3</sup> para el compuesto L<sup>3c</sup>. El esquema de peso final resultó ser:  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,055200 P)^2 + 0,173300 P]$  para L<sup>1</sup>,  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,046400 P)^2 + 0,000000 P]$  para L<sup>2</sup>,  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,041000 P)^2 + 0,364000 P]$  para L<sup>3</sup>,  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,000000 P)^2 + 11,116900 P]$  para L<sup>4</sup>,  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,058700 P)^2 + 0,951400 P]$  para L<sup>2c</sup> y  $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,077926 P)^2 + 1,889029 P]$  para L<sup>3c</sup>, donde  $P = (|F_o|^2 + 2|F_c|^2)/3$ . Un importante desorden fue localizado en el hidroxilo del grupo piridoxal, tanto en la molécula L<sup>4</sup> como en el complejo L<sup>3c</sup>. Este desorden se refinó y dos posiciones atómicas fueron determinadas en cada caso para ese átomo de oxígeno, O(3), en esos compuestos. El factor de ocupación para la primera de estas posiciones fue de 0,58732 para L<sup>4</sup> y de 0,47871 para L<sup>3c</sup>. En el compuesto L<sup>3c</sup> también el átomo de cloro del grupo fenilo estaba desordenado, Cl(1). El factor de ocupación para la primera de estas posiciones fue de 0,59316. Se establecieron una serie de restricciones para este desorden, en total 15 para L<sup>4</sup>, y 40 para L<sup>3c</sup> (se aplicaron SADI, SIMU y DELU), mediante las instrucciones del programa de refinamiento para mejorar los resultados finales.

### 3.2 Estudios *in vitro*: determinación de la citotoxicidad.

Para el estudio de la citotoxicidad de los compuestos de hidrazonas derivadas de piridoxal y de sus complejos de vanadio sintetizados se llevó a cabo el ensayo de viabilidad MTT *in vitro* según el protocolo descrito originalmente por (Mosmann, 1983), con modificaciones posteriores (Maenetje *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2007) en células A549 de pulmón.

#### 3.2.1 Cultivo celular y tratamientos.

La línea celular seleccionada para este trabajo fue A549, células humanas de cáncer de pulmón, obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, ECACC).

Para el cultivo se empleó medio base DMEN (Lonza) con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina, suplementado con 10% de FBS (Invitrogen), 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y un 1% de mezcla de penicilina/estractomicina (Gibco). Las células fueron cultivadas en frascos de 25cm<sup>2</sup> en una cámara con atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, realizando pases cada 2-4 días (cuando la confluencia de los frascos era aproximadamente de 80-90%). Para realizar los pases o preparar las placas para los tratamientos, las células debieron ser previamente despegadas retirando el medio y añadiendo 1-2ml de tripsina 0.5g/l (Invitrogen), al tratarse de un cultivo con crecimiento adherente.

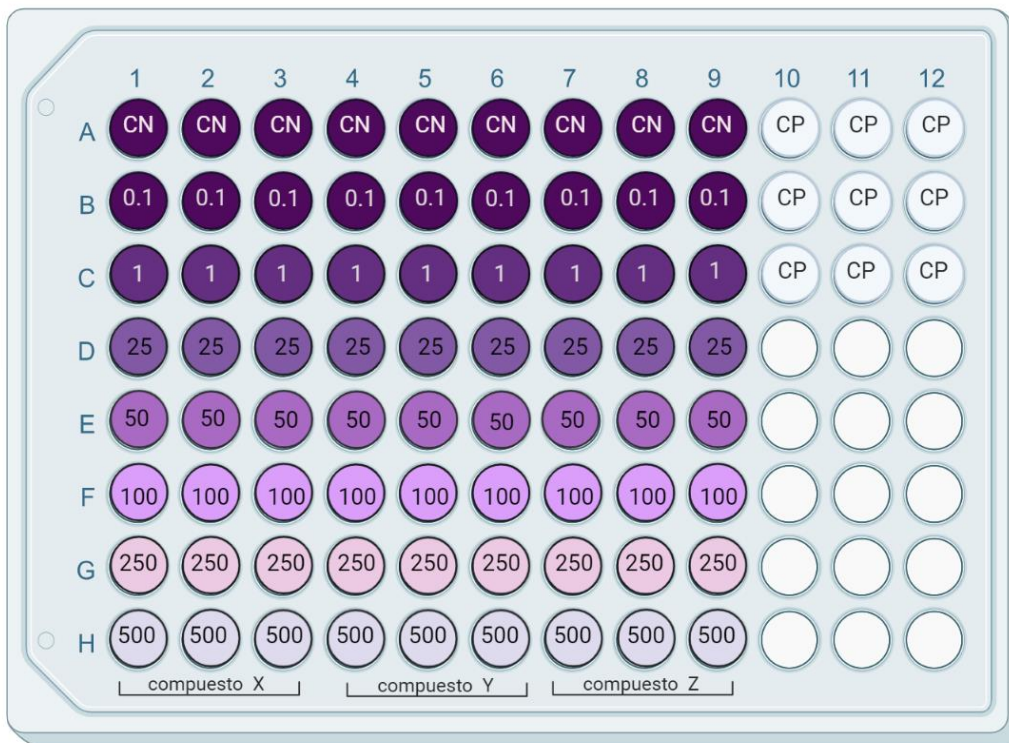
Para llevar a cabo los tratamientos, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y cultivadas durante 24 horas a 37°C para permitir la adhesión de las células a la superficie del pocillo. La densidad celular en los pocillos fue distinta según tiempo de tratamiento, empleándose 20,000 células por pocillo para los tratamientos de 24h y 10,000 células por pocillo para los de 48 horas.

Las células fueron expuestas en los pocillos a concentraciones diferentes de los distintos compuestos (0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 25 µM, 100 µM, 250 µM y 500 µM) a testar o a los controles, negativo y positivo, a una concentración final de 1%, durante 24 o 48h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Puesto que como disolvente para los compuestos se utilizó DMSO, debido a su mejor solubilidad en este disolvente, el control negativo fue DMSO en todos los casos. Como control positivo, se empleó Tritón X-100. Se hicieron 3 réplicas por compuesto y experimento para aumentar la robustez de los resultados.

### 3.2.2 Ensayo de citotoxicidad MTT.

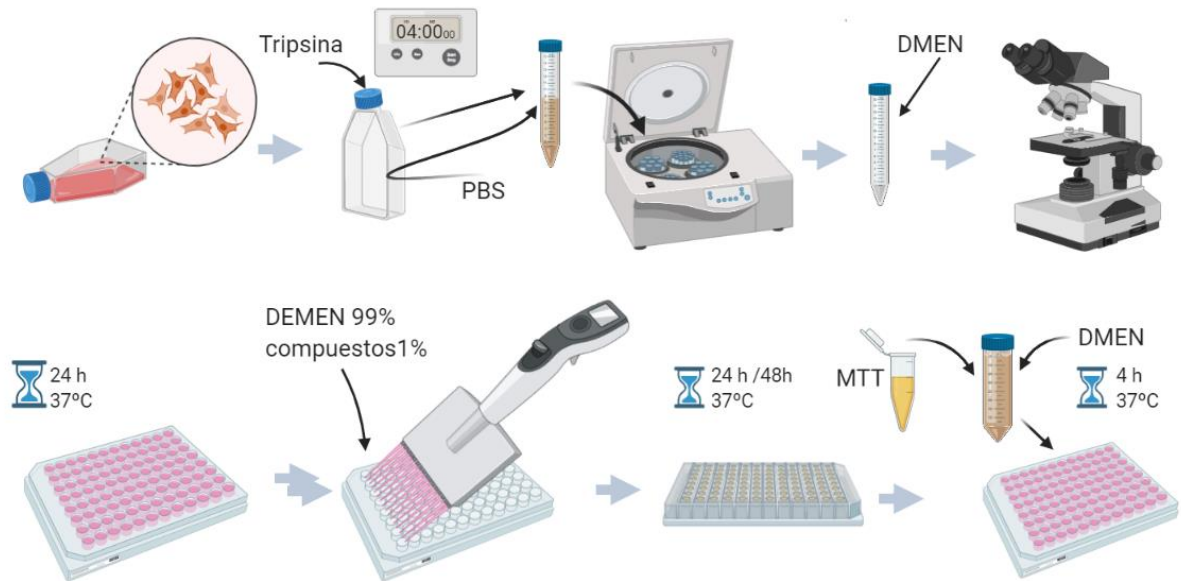
Tras los tratamientos con los distintos compuestos, se descartó el medio de cultivo y se añadieron a cada pocillo 100µl de compuesto MTT (0.5 mg/mL preparado en PBS). Las células fueron entonces incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 4h más. Después de este tiempo, se retiró el medio y se resuspendieron las células de cada pocillo en 200µl de DMSO. Transcurridos 10min (a temperatura ambiente y oscuridad), se midió la absorbancia a 510nm utilizando un espectrofotómetro de placas (SPECTROSTAR Nano, BMG Labtech). Como parámetro de citotoxicidad se empleó el porcentaje de viabilidad celular determinado en cada caso según la siguiente fórmula:

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



**Figura 36.-** Representación gráfica de la placa de 96 pocillos. En ella representamos la distribución de los CN (control negativo), CP (control positivo) y las diferentes concentraciones testadas en  $\mu\text{M}$ . Con las tonalidades en violeta, se representa la variación de cristales de formazán que en principio se espera observar. Creado con BloRender.

Valores más altos de absorbancia indicaron mayores grados de viabilidad celular. Los datos fueron recogidos en formato Excel y guardados para su posterior análisis estadístico. Se realizaron un mínimo de tres réplicas independientes del tratamiento, partiendo en cada una de un flask de cultivo distinto. En la Figura 37 se puede observar un esquema resumen de todo el proceso para la realización de este experimento.



**Figura 37.-** Esquema resumen del proceso a seguir para la realización del ensayo de MTT. Creado con BioRender.

### 3.2.4 Análisis estadístico de los datos

Como se comentó se hicieron experimentos independientes por réplica y compuesto, con lo que se usó los test paramétricos de ANOVA y Mann-Whitney para comprobar si se presenciaban diferencias significativas entre las medidas de los grupos. El test de ANOVA determina si existen una o más medidas que difieren significativamente entre sí y Mann-Whitney es una prueba no paramétrica que nos compara la media de cada concentración con el valor del control negativo para determinar si los datos son significativos. Se considera significación aquellos puntos que presentan un  $P$ -valor inferior 0,05.

Para cada condición experimental testada se llevaron a cabo un mínimo de tres experimentos independientes y cada situación experimental fue realizada por triplicado dentro del mismo experimento. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar. La distribución de las variables respuesta no se ajustó a la normalidad según el test de Kolmogorov-Smirnov, por lo que se utilizaron los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para evaluar la existencia de diferencias entre grupos. La existencia de posibles relaciones dosis-respuesta fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Un  $p$ -valor inferior a 0,05 fue considerado como significativo. Todos los

análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 21.0.

### **3.3 Evaluación toxicológica *in vivo*: ensayo FET en pez cebra**

Para la realización de los experimentos *in vivo* de este trabajo se han seguido las directrices dadas por la Organización internacional para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) para la evaluación de compuestos químicos, recogidas específicamente en la Guía (TG) 236, que describe la prueba de toxicidad aguda en embriones de pez (FET) (OECD, 2013).

Se realizan un total de 5 experimentos independientes, con sus respectivas réplicas para evaluar los posibles efectos tóxicos y teratógenos que causan los ligandos L<sup>3</sup>, L<sup>4</sup> y los compuestos L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c sobre los embriones.

Para la realización del experimento se parte de los peces adultos de los cuales se obtienen los huevos fecundados que son tratados con los compuestos químicos mediante la prueba FET, a continuación, se describen las diferentes etapas.

#### **3.3.1 Mantenimiento de ejemplares adultos**

Los peces cebra adultos se mantuvieron en tanques de agua dulce previamente desclorados, a una temperatura de 28°C, y se preestableció de forma artificial un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

Para poder obtener una puesta adecuada es necesario una correcta alimentación de los individuos (Matthews *et al.*, 2002). Para ello fueron alimentados con comida seca en escamas (TetraMin®) dos veces al día y con Artemia salina (Artemia spp.; Artemio Fluid®) una vez al día.

#### **3.3.2 Obtención de huevos fecundados**

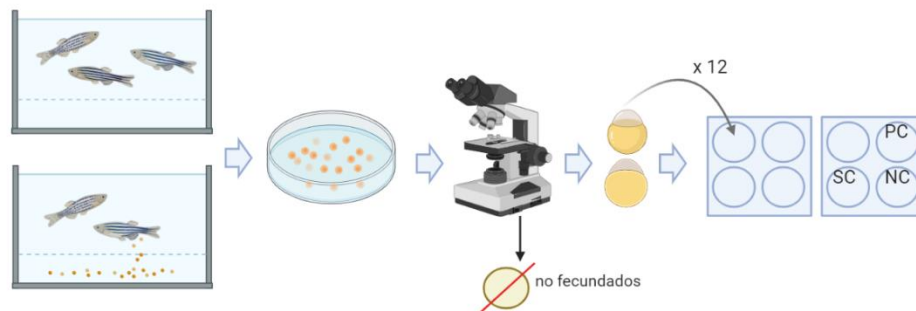
El día previo a la realización de cada experimento, se procedió a la separación de los peces desde los tanques de mantenimiento a los tanques de cría o “multi-breeder”.

En cada tanque de cría se introdujeron dos hembras y un macho para aumentar las posibilidades de obtención de huevos fecundados. Al día siguiente, la luz indujo el desove de las hembras y la fecundación por parte de los machos. En la Figura 38 se



muestran los tanques de cría, en los cuales se introdujo una malla a fin de evitar que los adultos decoren sus propios huevos.

Tras la puesta, los adultos son devueltos a los tanques de mantenimiento correspondientes. Cuando no se produjo la puesta, se esperó una semana para repetir el proceso. De producirse con éxito la puesta, se filtró el agua de los tanques de cría con una red de malla inferior al tamaño de los huevos, con lo que se obtienen los huevos. Posteriormente los huevos fueron lavados con agua desclorada autoclavada para eliminar los restos de materia orgánica u otra posible contaminación por *Artemia* (procedente de la alimentación). Finalmente, los huevos se mantuvieron en placas Petri con agua desclorada autoclavada durante 4 horas en un incubador a 26 °C. Posteriormente, como se aprecia vemos en la Figura 39 se seleccionaron los embriones en buen estado con la ayuda de un estereomicroscopio Nikon SMZ1500 y se descartan los huevos no fecundados.



**Figura 38.-** Esquema explicativo del proceso de obtención de embriones para la prueba FET. Creado con BioRender.

### 3.3.3 Ensayo FET

Siguiendo las recomendaciones dadas por OECD (guía TG 236), para evaluar la posible toxicidad de los compuestos del presente trabajo en los embriones de pez cebra, se seleccionaron un intervalo creciente de 5 concentraciones de cada uno de los compuestos; donde la concentración más alta probada debe producir un 100% de letalidad, y la más baja una que no inducir ningún efecto adverso observable. Sin embargo, en el presente estudio, ninguna de las concentraciones testadas para cada uno de los compuestos provocó un 100% de mortalidad. No se pudo aumentar las concentraciones,



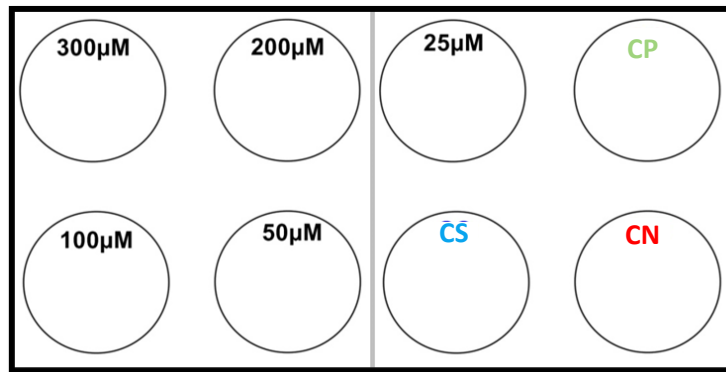
debido a la pérdida de solubilidad por cristalización de los compuestos. Por este motivo tampoco se ha podido calcular la concentración letal media.

Es necesario saber que se considera letalidad, de acuerdo con los criterios establecidos por la OECD (2019) la presencia de alguno de los efectos secundarios agudos como: a) coagulación de los embriones en las primeras 24 horas del desarrollo embrionario, b) muerte de los embriones, c) formación de edemas, d) ausencia de somitas, e) no separación de la cola del saco vitelínico y f) ausencia de latido cardíaco tras las 48 horas post fecundación.

Una vez seleccionado el intervalo, se dispusieron las concentraciones y los controles en placas de 4 pocillos (se emplean 2 placas por compuesto y experimento) ver Figura 39, depositando 12 embriones en cada uno de ellos. En las placas se evalúa el efecto de los compuestos sobre la supervivencia de los embriones. Se depositaron 500  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones en cada pocillo siguiendo el esquema de la Figura 28, cada pocillo contiene los 12 embriones. Además, se utilizaron tres pocillos también con 12 embriones por pocillo, para realizar un control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3,4-dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

Las concentraciones testadas en nuestro caso fueron: 25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  en una solución al 0.5% de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO se empleó para aumentar la solubilidad de los compuestos en agua. La concentración de DMSO no debe exceder el 0,5% puesto que, concentraciones superiores, producen letalidad en el pez cebra (Beekhuijzen *et al.*, 2015).

Siguiendo las directrices de la OECD (2019), los embriones se mantuvieron en un incubador a 26 °C y se monitorizó la supervivencia de los individuos en períodos de 24 horas durante las 96 horas posteriores a la fecundación (hpf). La observación de los resultados se realizó bajo el estereomicroscopio, realizando fotografías de los individuos con una cámara fotográfica Nikon EC-8CF E950.



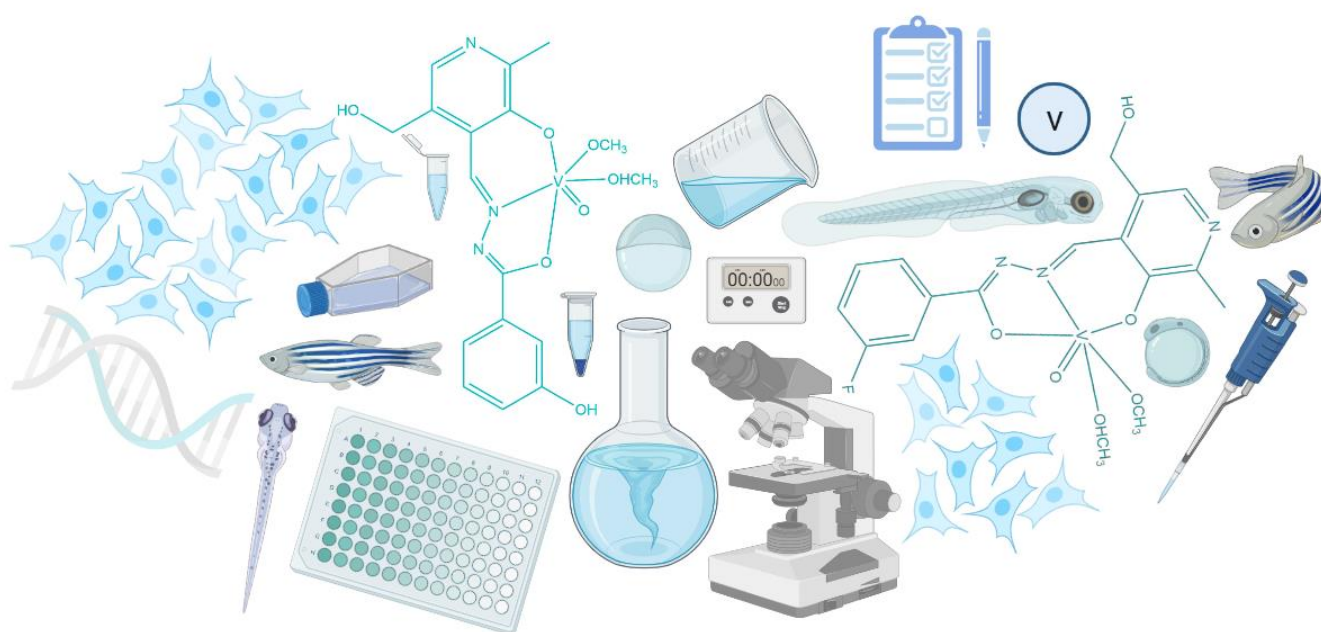
**Figura 39.-** Distribución de las diferentes concentraciones de los compuestos a testar y de los controles en placas. CP (control positivo), CS (control solvente) y CN (control negativo).

Para establecer el intervalo de concentración se repite el proceso anterior 3 veces. Una vez que se establece el intervalo de concentraciones, se utilizan placas de 24 pocillos donde se introduce un único embrión por pocillo, realizando un total de 12 réplicas por concentración en un volumen final de 500 µL/pocillo. Estos datos nos sirven para calcular la  $LC_{50}$  (concentración letal media). En el presente estudio, debido a los resultados obtenidos al buscar el intervalo de concentraciones, no se ha podido realizar esta parte del experimento por consiguiente no se ha podido calcular la  $LC_{50}$ .

Finalizados los experimentos se eutanasian todas las larvas siguiendo las recomendaciones de la normativa nacional (Rd 53/2013, 2013) y europea (Directiva 2010/63/UE, 2010). El procedimiento se realizó en dos etapas. En una primera etapa, las larvas se sometieron a una sobredosis de anestésico al transferirlas a una solución de MS-222 (metanosulfonato de triclaína) a una concentración de 32 mg/L en agua corriente desclorada. En la segunda etapa, de confirmación de la muerte, las larvas se mantuvieron a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante, al menos, 24 horas para asegurar la eutanasia por destrucción del encéfalo.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Resultados de la caracterización estructural

#### 4.1.1 Análisis elemental

Se obtuvieron los análisis de hidrógeno, carbono y nitrógeno de las muestras sólidas. En la siguiente tabla se observan los datos teóricos y los obtenidos experimentalmente:

**Tabla 4.-** Resultados de la técnica de análisis elemental para los ligandos y complejos sintetizados.

Compuesto		Porcentaje (%)		
		C	N	H
L <sup>1</sup>	Análisis elemental	51,97	11,67	4,67
	Cálculo para C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	51,69	11,30	5,15
L <sup>2</sup>	Análisis elemental	51,82	11,95	4,93
	Cálculo para C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	51,97	11,36	5,45
L <sup>3</sup>	Análisis elemental	49,92	11,03	4,29
	Cálculo para C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	50,58	11,80	4,24
L <sup>4</sup>	Análisis elemental	54,55	11,83	4,88
	Cálculo para C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	54,63	11,94	5,16
L <sup>1c</sup>	Análisis elemental	43,18	9,18	4,10
	Cálculo para C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> V	43,75	8,98	4,31
L <sup>2c</sup>	Análisis elemental	44,63	9,74	3,69
	Cálculo para C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> V	44,90	10,47	4,02
L <sup>3c</sup>	Análisis elemental	43,54	9,12	3,39
	Cálculo para C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> V	42,93	10,01	3,60
L <sup>4c</sup>	Análisis elemental	45,48	8,86	4,35
	Cálculo para C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>7</sub> V	45,06	8,76	4,83

Los análisis elementales nos permiten observar si la muestra analizada corresponde con la estructura buscada. Podemos saber si se trata de especies mononucleares o dinucleares, y también si hay solvatación con disolventes como el agua o metanol. Cabe destacar que dada la variada especiación química del vanadio puede haber mezclas

de compuestos y es complicado aislar las especies de forma individual. Sin embargo, los resultados obtenidos se ajustan bastante bien a las fórmulas propuestas y en todos los casos se tratan de especies mononucleares.

- Los resultados para la muestra de L<sup>1</sup> son: C (51,97%), N (11,67%) y H (4,67%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del ligando protonado, un anión Cl<sup>-</sup> y una molécula de MeOH.
- Los resultados para la muestra de L<sup>2</sup> son: C (51,82%), N (11,95%) y H (4,93%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del ligando protonado, un anión Cl<sup>-</sup> y una molécula de MeOH.
- Los resultados para la muestra de L<sup>3</sup> son: C (49,92%), N (11,03%) y H (4,29%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del ligando protonado y un anión Cl<sup>-</sup>.
- Los resultados para la muestra de L<sup>4</sup> son: C (54,55%), N (11,83%) y H (4,88%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del ligando protonado y un anión Cl<sup>-</sup>.
- Los resultados para la muestra de L<sup>1c</sup> son: C (43,18%), N (9,18%) y H (4,10%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del complejo [VOL<sup>1</sup>(OCH<sub>3</sub>)] protonado, un anión Cl<sup>-</sup> y una molécula de metanol ocupando la sexta posición de coordinación.
- Los resultados para la muestra de L<sup>2c</sup> son: C (44,63%), N (9,74%) y H (3,69%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del complejo [VO<sub>2</sub>L<sup>2</sup>] protonado y una molécula de agua.
- Los resultados para la muestra de L<sup>3c</sup> son: C (43,54%), N (9,12%) y H (3,39%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del complejo [VO<sub>2</sub>L<sup>3</sup>] protonado y una molécula de agua.
- Los resultados para la muestra de L<sup>4c</sup> son: C (45,48%), N (8,86%) y H (3,95%). Estos resultados concuerdan con los teóricos si consideramos la estructura del complejo [VOL<sup>4</sup>(OCH<sub>3</sub>)] protonado, un anión Cl<sup>-</sup> y una molécula de metanol ocupando la sexta posición de coordinación.

#### 4.1.2 Espectrometría de masas.

Mediante esta técnica se conoce la estructura, composición y las relaciones isotópicas de los átomos que forman parte de los ligandos y complejos. Estos espectros se han obtenido mediante la técnica de ionización con electrospray (ESI). Ésta técnica, al ser menos agresiva, no destruye tanto la muestra y permite observar los fragmentos de las moléculas de mayor peso, que llegan a un analizador de tiempo de vuelo o “time of fly” (TOF)(Cech y Enke, 2001)

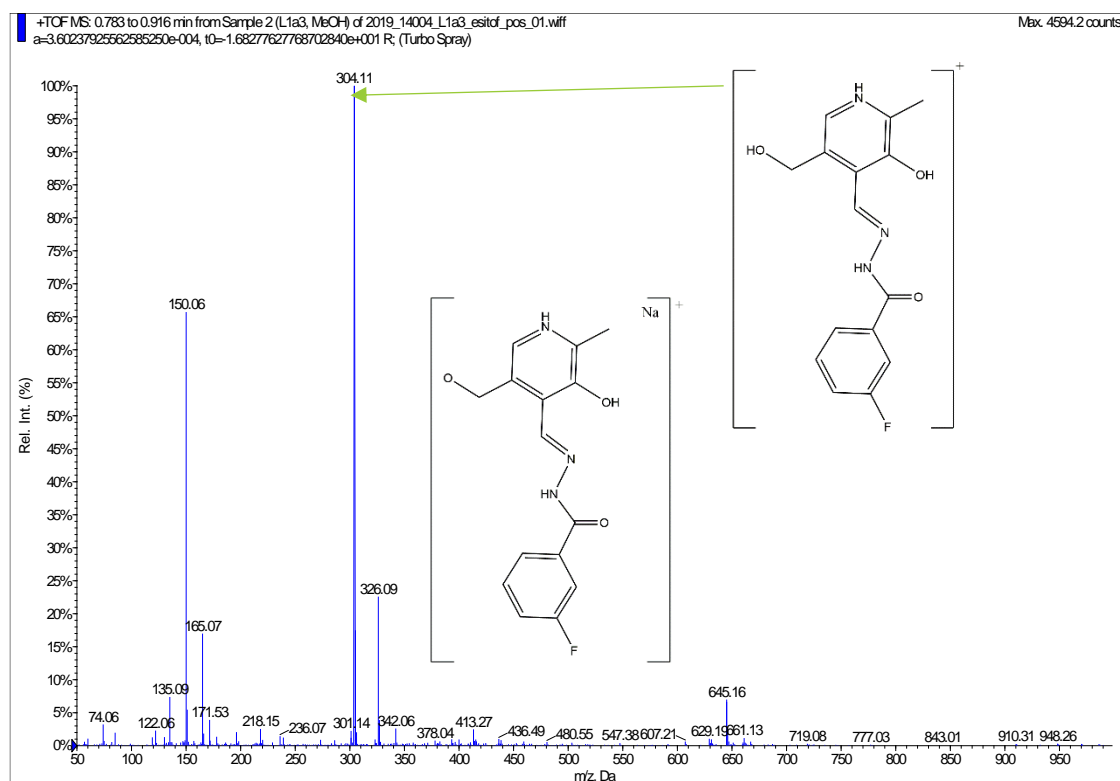
La determinación de las estructuras se ha analizado observando fragmentos característicos de los espectros. Esto nos permite conocer la composición y especiación de los compuestos de vanadio, que en función de los disolventes que se hayan utilizado para la síntesis de estos pueden aparecer solvatados, o bien para ver si hay especies mononucleares y/o dinucleares que aparecen en forma de dímeros.

En los espectros de masas se han registrado tanto la presencia de iones positivos como negativos. Debido a la presencia de diferentes especies en disolución, es difícil asignar el ión molecular  $[M^+]$ , por lo que se analizó la relación  $m/z$  de diferentes picos que aparecen en los espectros con el fin de estudiar las posibles estructuras que pueden alcanzar los compuestos. Se observa en todos los casos que la estructura base de estos siempre está presente.

En la Figura 40 se muestra el espectro de masas ESI-TOF<sup>+</sup> del ligando L<sup>1</sup>. Las señales más intensas que se observan en este espectro corresponden a los cationes moleculares:  $[L^1+H]^+$ ,  $[C_{15}H_{15}FN_3O_3]^+$ , que aparece a  $m/z= 304,11$  uma, (ver las estructuras en la Figura 40),  $[NaL^1]^+$ , a 326,09 uma y  $[K(L^1)_2]^+$  a 645,17 uma. En la Figura 41 se muestra el espectro de masas ESI-TOF<sup>-</sup> del mismo compuesto. Las señales más intensas corresponden a los aniones moleculares:  $[L^1-H]^-$ ,  $[C_{15}H_{13}FN_3O_3]^-$ , a  $m/z= 302,09$  uma,  $[L^1Cl]^-$ ,  $m/z = 338,07$  uma y para la especie  $[(L^1)_2Cl]^-$ ,  $m/z= 641,17$  uma (ver las estructuras en la Figura 41). En la Tabla 5 siguiente se muestran las señales para todos los demás compuestos. En ANEXOS se pueden ver los restantes espectros para los complejos y ligandos: L<sup>2</sup> (ver Figura 58 y 59), L<sup>3</sup> (ver figura 66 y 61), L<sup>4</sup> (ver Figuras 62 y 63), L<sup>1c</sup> (ver Figuras 64 y 65), L<sup>2c</sup> ( ver Figuras 66 y 67), L<sup>3c</sup> ( ver Figuras 68 y 69) y L<sup>4c</sup> ( ver Figuras 70 y 71).

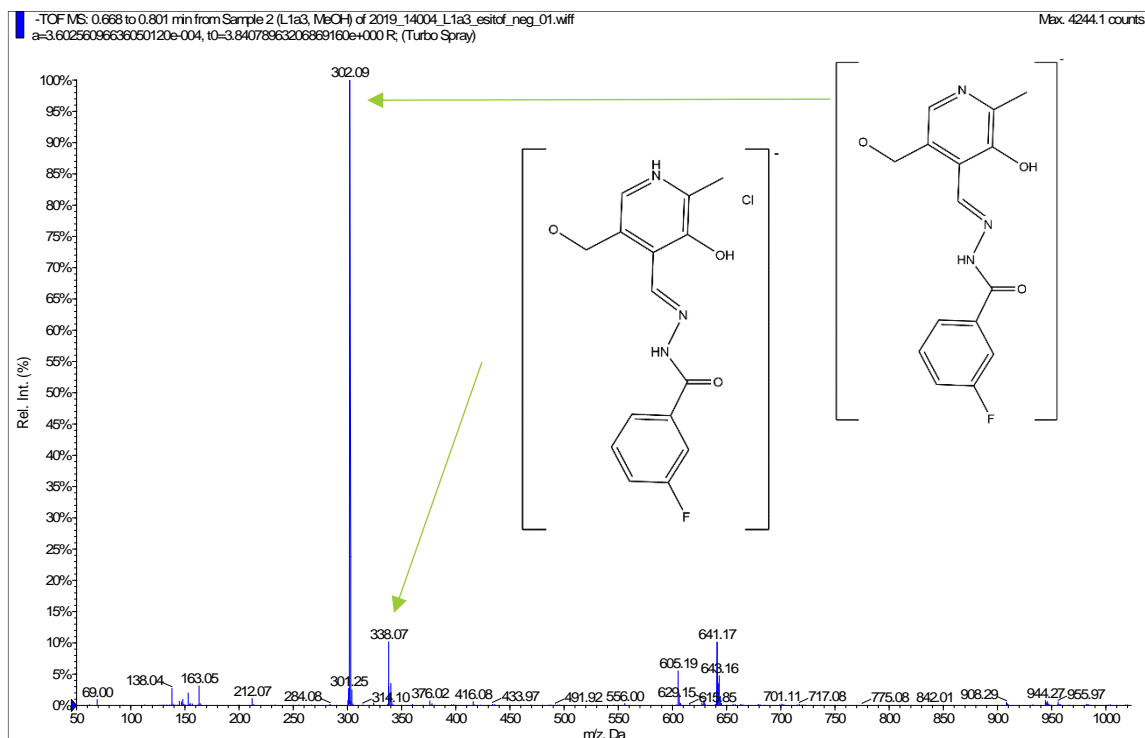
**Tabla 5.-** Señales más intensas de ESI-TOF<sup>+</sup> y ESI-TOF<sup>-</sup>, para los ligandos y los complejos.

		ESI-TOF <sup>+</sup>		ESI-TOF <sup>-</sup>
L <sup>1</sup>	[L <sup>1</sup> +H] <sup>+</sup>	304,11	[L <sup>1</sup> -H] <sup>-</sup>	302,09
	[C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>		[C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
	[NaL <sup>1</sup> ] <sup>+</sup>	326,09	[L <sup>1</sup> Cl] <sup>-</sup>	338,07
	[K(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	645,17	[(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Cl] <sup>-</sup>	641,17
L <sup>2</sup>	[L <sup>2</sup> +H] <sup>+</sup>	302,11	[L <sup>2</sup> -H] <sup>-</sup>	300,10
	[C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		[C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	
	[NaL <sup>2</sup> ] <sup>+</sup>	324,10	[L <sup>2</sup> Cl] <sup>-</sup>	336,08
	[K(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	641,17	[(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> Cl] <sup>-</sup>	637,19
L <sup>3</sup>	[L <sup>3</sup> +H] <sup>+</sup>	320,08	[L <sup>3</sup> -H] <sup>-</sup>	318,07
	[C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>		[C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
	[NaL <sup>3</sup> ] <sup>+</sup>	342,06	[L <sup>3</sup> Cl] <sup>-</sup>	354,04
	[K(L <sup>3</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	677,10	[(L <sup>3</sup> ) <sub>2</sub> Cl] <sup>-</sup>	675,12
L <sup>4</sup>	[L <sup>4</sup> +H] <sup>+</sup>	316,14	[L <sup>4</sup> -H] <sup>-</sup>	314,11
	[C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		[C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	
	[NaL <sup>4</sup> ] <sup>+</sup>	338,11	[L <sup>4</sup> Cl] <sup>-</sup>	350,09
	[K(L <sup>4</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	669,20	[(L <sup>4</sup> ) <sub>2</sub> Cl] <sup>-</sup>	665,21
L <sup>1c</sup>	[L <sup>1c</sup> +H] <sup>+</sup>	400,06	[VO <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ] <sup>-</sup>	384,03
	[VO(L <sup>1</sup> +H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>			
	[NaL <sup>1c</sup> ] <sup>+</sup>	422,02	[VO(L <sup>1</sup> -H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>-</sup>	398,06
	[Na(L <sup>1c</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	821,08	{[VOL <sup>1</sup> (OCH <sub>3</sub> )] [VO <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ]} <sup>-</sup>	783,06
L <sup>2c</sup>	[L <sup>2c</sup> +H] <sup>+</sup>	398,06	[VO(L <sup>2</sup> -H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>-</sup>	396,04
	[VO(L <sup>2</sup> +H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>			
	{Na[VOL <sup>2</sup> (OCH <sub>3</sub> )]} <sup>+</sup>	420,04	{[VOL <sup>2</sup> (OCH <sub>3</sub> )]Cl} <sup>-</sup>	432,02
	{Na[VOL <sup>2</sup> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]} <sup>+</sup>	817,09	{[VOL <sup>2</sup> (CH <sub>3</sub> OH)] <sub>2</sub> Cl} <sup>-</sup>	829,06
L <sup>3c</sup>	[L <sup>3c</sup> +H] <sup>+</sup>	416,02	[VO <sub>2</sub> L <sup>3</sup> ] <sup>-</sup>	399,99
	[VO(L <sup>3</sup> +H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>			
	{Na[VOL <sup>3</sup> (OCH <sub>3</sub> )]} <sup>+</sup>	438,00	{[VOL <sup>3</sup> (OCH <sub>3</sub> )]Cl} <sup>-</sup>	414,01
	{Na[VOL <sup>3</sup> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]} <sup>+</sup>	853,02	-	-
L <sup>4c</sup>	[L <sup>4c</sup> +H] <sup>+</sup>	412,07	[VO <sub>2</sub> L <sup>4</sup> ] <sup>-</sup>	396,04
	[VO(L <sup>4</sup> +H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>			
	{Na[VOL <sup>4</sup> (OCH <sub>3</sub> )]} <sup>+</sup>	420,04	[VO(L <sup>4</sup> -H)(OCH <sub>3</sub> )] <sup>-</sup>	410,05
	{Na[VOL <sup>4</sup> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]} <sup>+</sup>	845,12	-	-



**Figura 40.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^1$  y las estructuras correspondientes a los cationes:  $[L^1+H]^+$  m/z = 304,11 uma,  $[NaL^1]^+$  m/z = 326,09 uma y para  $[K(L^1)_2]^+$  m/z = 645,17 uma.





**Figura 41.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando L<sup>1</sup> y estructuras correspondientes a los aniones, [L<sup>1</sup>-H]<sup>-</sup> m/z = 302,09 uma, [L<sup>1</sup>Cl]<sup>-</sup> m/z = 338,07 uma y para la especie [(L<sup>1</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup> m/z = 641,17 uma.

### 4.1.3 Espectroscopia de RMN $^1\text{H}$

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se llevaron a cabo en DMSO deuterado, dms $o$ -d $_6$ . Para el análisis de los espectros se emplea una integración conjunta de los hidrógenos correspondientes a los diferentes grupos funcionales de las moléculas.

En la siguiente tabla (Tabla 6) se presentan los desplazamientos químicos de los hidrógenos de los distintos grupos funcionales de los compuestos objeto del estudio.

**Tabla 6.-** Desplazamientos químicos que aparecen en los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , en dms $o$ -d $_6$ , para los ligandos L $^1$ , L $^2$ , L $^3$ , L $^4$  y los complejos L $^1\text{c}$ , L $^2\text{c}$ , L $^3\text{c}$ , L $^4\text{c}$  en ppm.

	-NH- unido al en- lace imínico	-OH <sub>piridoxal</sub>	-OH fenólico	-CH=N-	H piridoxal	H <sub>Aromáticos</sub> fenólicos	-OH alcohol	-CH $_2$ -	-OCH $_3$	-CH $_3$
L $^1$	13,25	13,10 ancha		9,10	8,23	7,93-7,52	No se observa	4,79		2,61
L $^2$	12,90	No se observa	9,93	9,04	8,15	7,48-7,05	5,69 ancha	4,73		2,58
L $^3$	13,14	13,07 ancha		9,04	8,22	8,08-7,68	No se observa	4,77		2,61
L $^4$	13,30	No se observa		9,16	8,22	7,66-7,22	5,77 ancha	4,79	3,87	2,65
L $^1\text{c}$		-		9,31	8,08-7,42		5,74 ancha	4,87		2,54
L $^2\text{c}$		-	9,66	9,26	7,98	7,53-6,93	5,74 ancha	4,87		2,54
L $^3\text{c}$		-		9,29	8,06-7,46		5,67 ancha	4,83		No se observa
L $^4\text{c}$		-		9,28	7,98	7,69-7,14	5,75 ancha	4,89	3,85	2,55

En la figura 42 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto L $^1$  y en la Figura 43 para el complejo de vanadio(V), L $^1\text{c}$ . La señal correspondiente al hidrógeno fenólico del grupo piridoxal y la correspondiente al hidrógeno de grupo -NH- enlazado al grupo imínico, en el entorno de 13 ppm, desaparecen como consecuencia de la complejación con el centro metálico de vanadio. Los espectros de los demás compuestos se pueden ver en el ANEXOS (Figuras: 72, 73, 74, 75, 76 y 77).

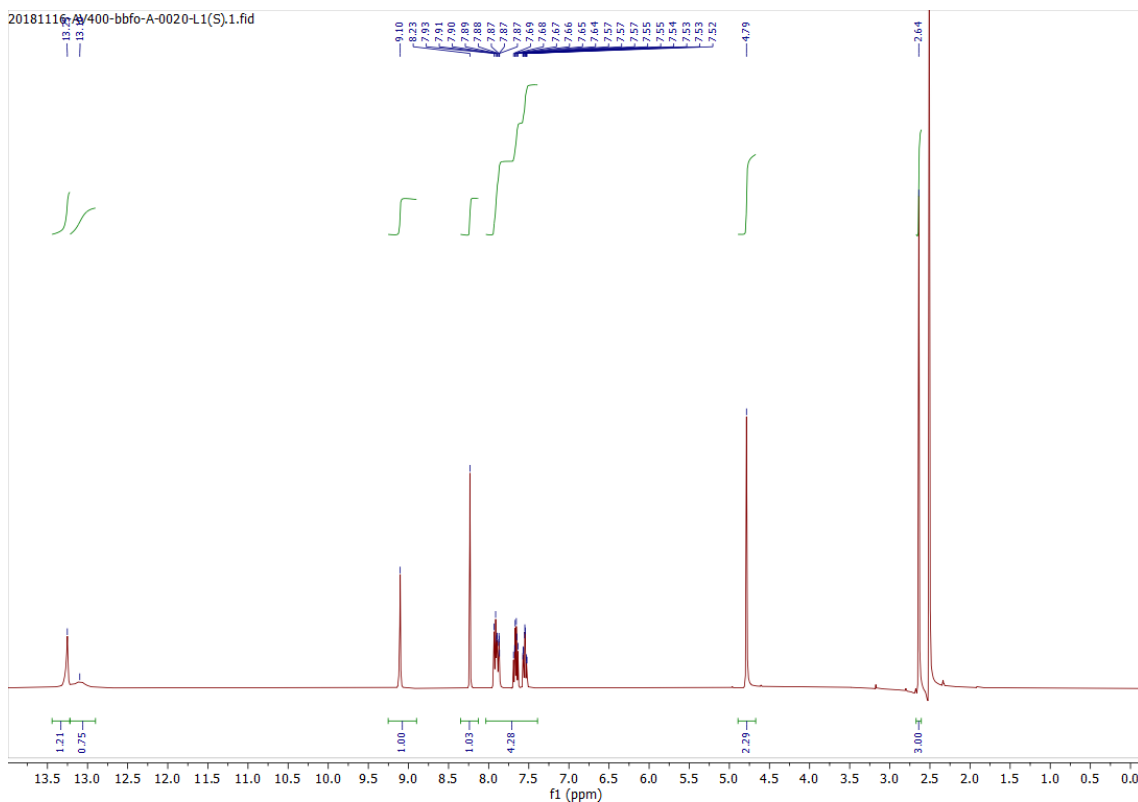


Figura 42.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H en dms0-d<sub>6</sub> para el ligando L<sup>1</sup>.

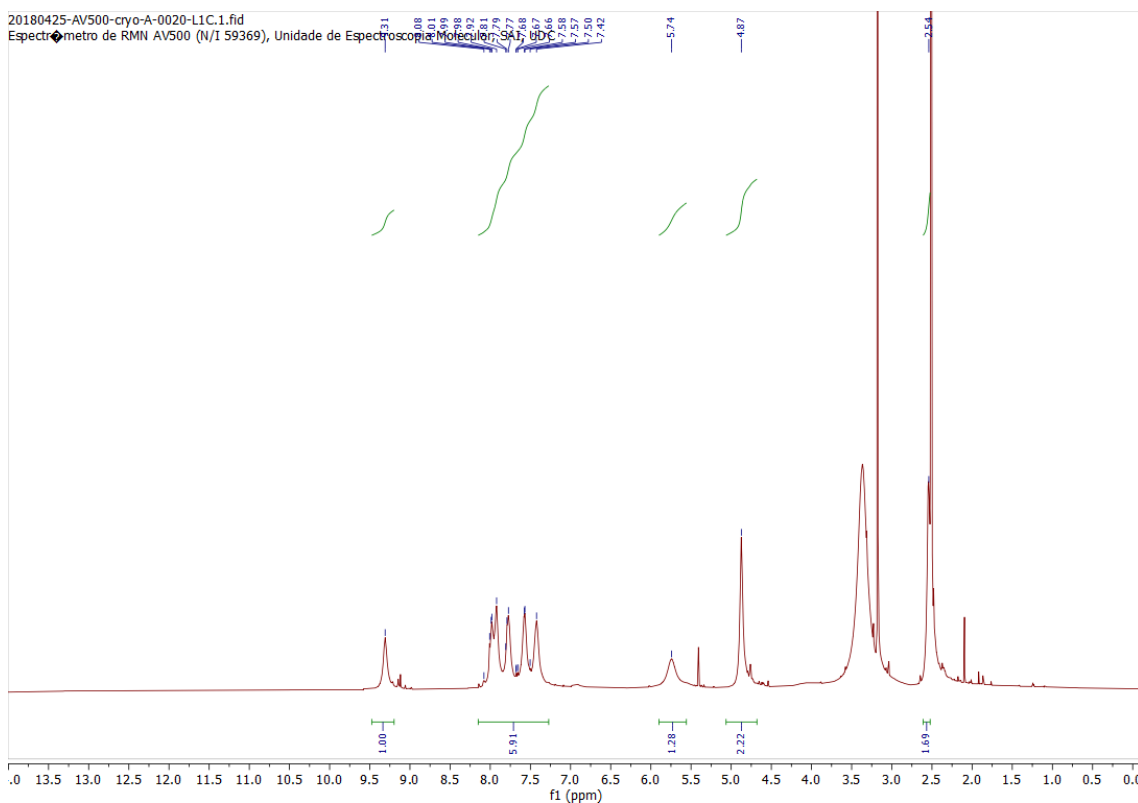


Figura 43.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H en dms0-d<sub>6</sub> para el complejo L<sup>1</sup>c.

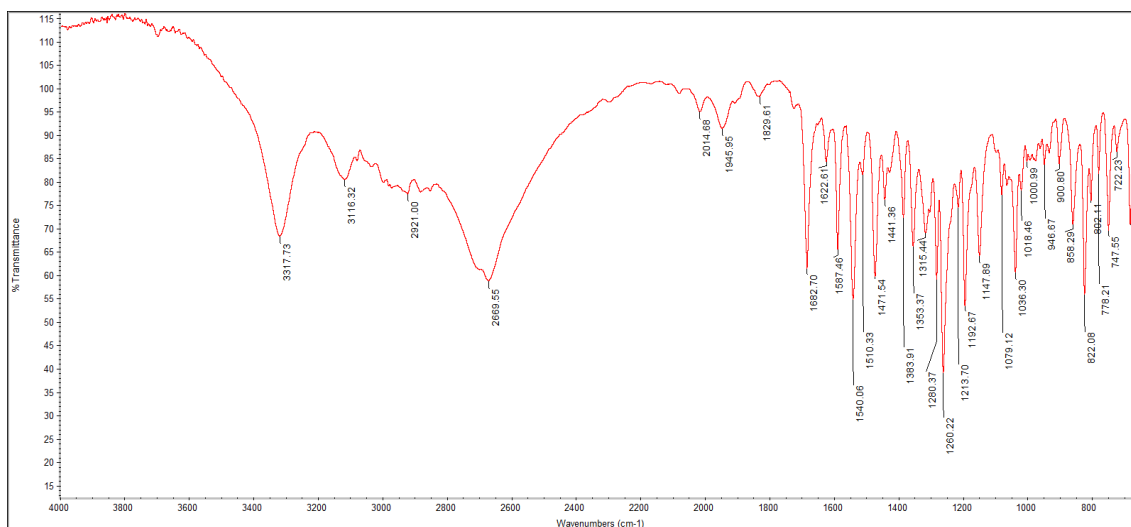
#### 4.1.4 Espectroscopia de IR

Esta técnica permite estudiar la presencia de grupos funcionales característicos de los compuestos, así como para confirmar la coordinación del vanadio. La técnica se basa en las diferencias en la frecuencia de vibración de los diferentes enlaces entre las moléculas respecto a su energía. Se analizó el desplazamiento de las bandas mediante comparación con compuestos similares. Las principales bandas obtenidas en compuestos similares ya caracterizados en la bibliografía son:  $\nu(\text{NH})$  entre  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  entre  $1630\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  entre  $1350\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  entre  $1520\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{V}-\text{O})_{\text{coord}}$  entre  $1230\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ , y  $\nu(\text{V}=\text{O})$  entre  $900\text{-}994\text{ cm}^{-1}$  (Maurya *et al.*, 2014).

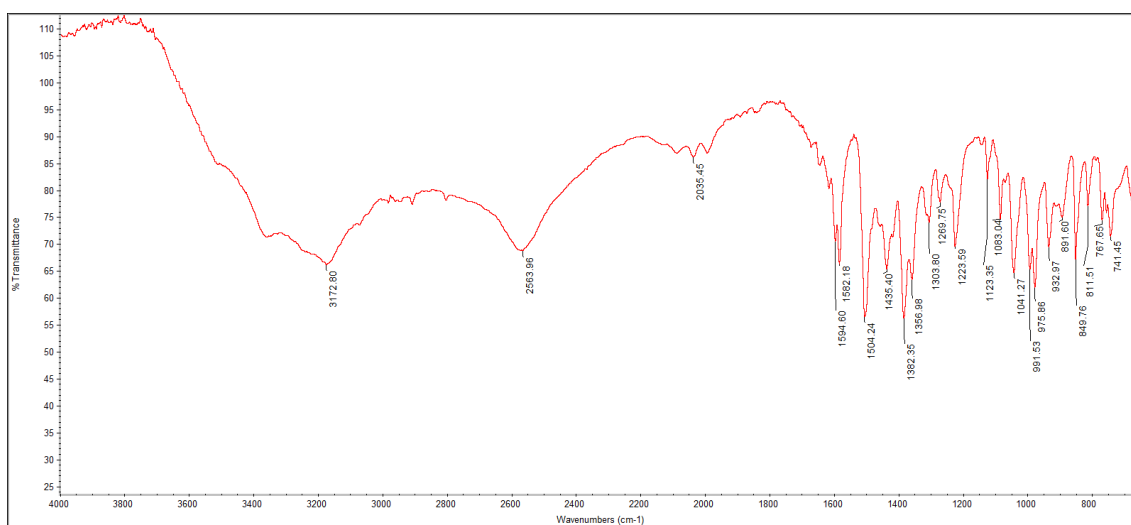
Los resultados obtenidos para nuestros compuestos son:  $\nu(\text{NH})$  entre  $3040\text{-}3564\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  entre  $1682\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  entre  $1336\text{-}1623\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  entre  $1497\text{-}1598\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{coord}}$  entre  $1214\text{-}1359\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{V}=\text{O})$  entre  $912\text{-}933\text{ cm}^{-1}$ . En la tabla 7 se pueden observar los datos para cada uno de los ligandos y los complejos. En la figura 44 se puede ver un espectro de infrarrojo del ligando  $\text{L}^1$  y en la Figura 45 el correspondiente complejo  $\text{L}^1\text{c}$ . En los ANEXOS se muestran los restantes espectros de los ligandos  $\text{L}^2$  (Figura 78),  $\text{L}^3$  (Figura 79),  $\text{L}^4$  (Figura 80) y los complejos  $\text{L}^2\text{c}$  (Figura 81),  $\text{L}^3\text{c}$  (Figura 82),  $\text{L}^4\text{c}$  (Figura 83).

**Tabla 7.-** Bandas más intensas y representativas obtenidas en espectroscopia de IR de los compuestos objeto de estudio en  $\text{cm}^{-1}$ .

Compuesto	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{coord}}$	$\nu(\text{V}=\text{O})$ [ $\nu_{\text{sym}}(\text{V}=\text{O})$ - $\nu_{\text{asym}}(\text{V}=\text{O})$ ]
$\text{L}^1$	3317	1682	1471-1622	1540	-	-
$\text{L}^2$	3163	1682	1446-1621	1544	-	-
$\text{L}^3$	3040	1686	1401-1587	1539	-	-
$\text{L}^4$	3360	1695	1433-1623	1547	-	-
$\text{L}^1\text{c}$	3172		1356-1582	1504	1223	933
$\text{L}^2\text{c}$	3564		1391-1581	1505	1359	933
$\text{L}^3\text{c}$	3272		1336-1490	1598	1214	912-929
$\text{L}^4\text{c}$	3301		1343-1578	1497	1229	924



**Figura 44.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>1</sup> con las bandas más intensas:  $\nu(\text{NH})$  a  $3317\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1682\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  a  $1471\text{-}1622\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a  $1540\text{ cm}^{-1}$ .



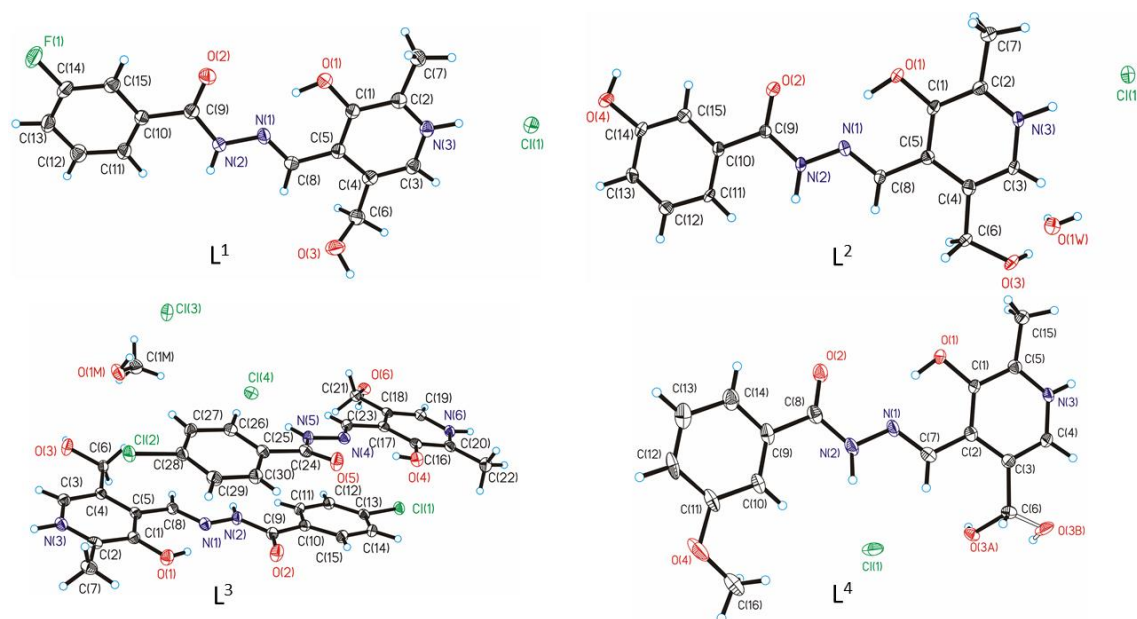
**Figura 45.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>1c</sup> con las bandas más intensas:  $\nu(\text{NH})$  a  $3172\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1594\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  a  $1356\text{-}1582\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a  $1504\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})$  a  $1223\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{V}=\text{O})$  a  $933\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.5 Difracción de rayos X de monocristal

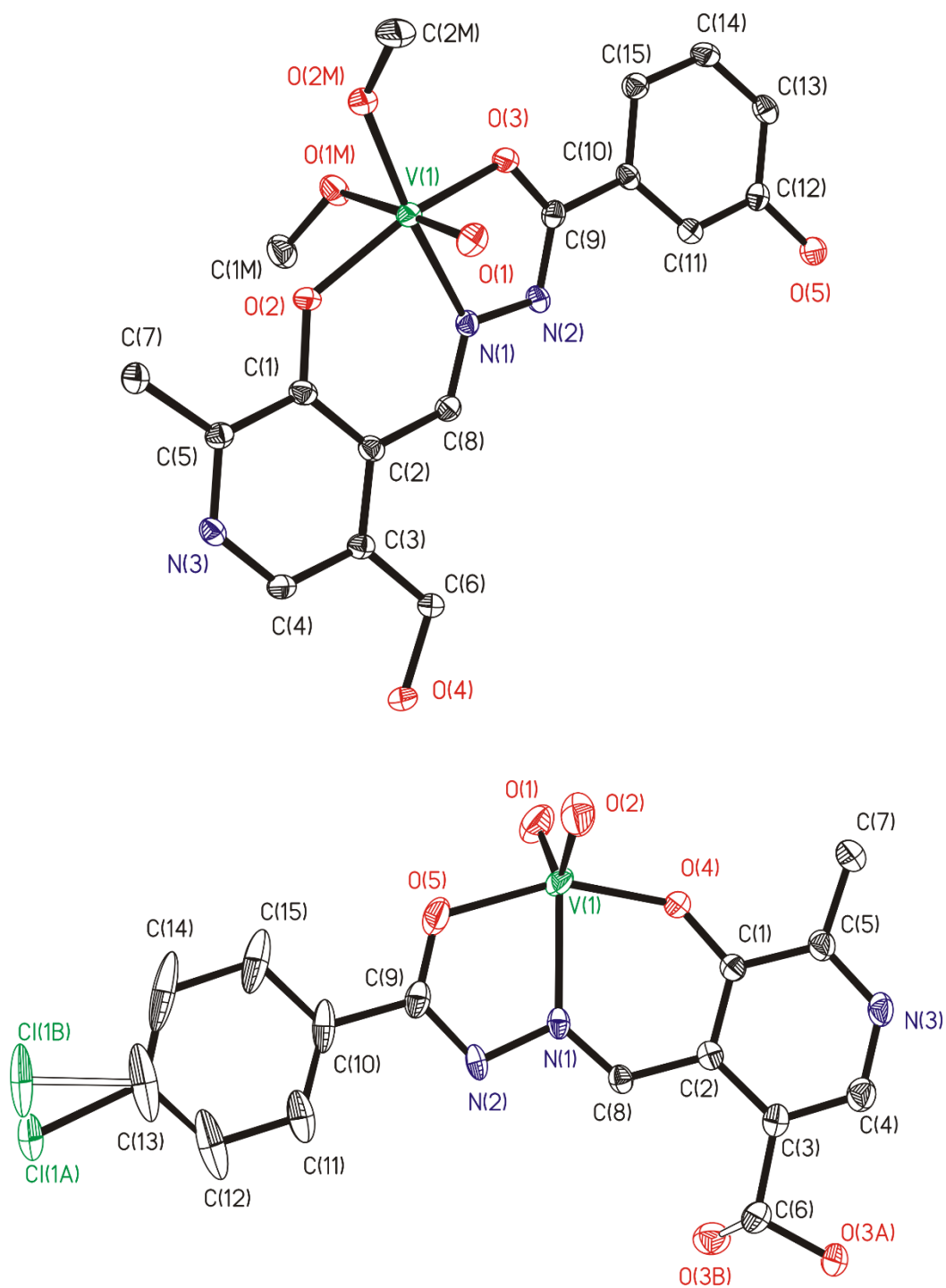
Se han obtenido cristales aptos para su estudio por difracción de rayos X de monocristal de los compuestos  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^2c$  y  $L^3c$ . Los resultados obtenidos se encuentran disponibles en las Tablas 8, 9, y 10 para los ligandos y en las Tablas 11, 12 y 13 para los complejos.

Se han estudiado las diferentes disposiciones de las moléculas y complejos en el empaquetamiento cristalino. En el caso de los compuestos  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  y  $L^4$ , se observan diferencias significativas, especialmente en el compuesto  $L^3$ . En la Figura 46 se observan estas diferencias en las unidades asimétricas.

En los complejos se han aislado dos especies químicas diferentes. En el compuesto  $L^2c$  la especie,  $[VO(L^2-H)(OCH_3)(CH_3OH)]Cl \cdot CH_3OH$  y en el compuesto  $L^3c$  la especie  $[VO_2(L^3-H)]$  (ver la Figura 47).



**Figura 46.-** ORTEP de las unidades asimétricas de los compuestos  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  y  $L^4$ . Todos los átomos que no son hidrógenos se presentan con elipsoides al 50 %. En la unidad asimétrica del compuesto  $L^3$  se pueden observar dos moléculas, las cuales interactúan a través de sus nubes  $\pi$  y entre los pares de no enlace de los átomos de cloro con estos anillos.



**Figura 47.-** ORTEP del catión complejo  $[VO(L^2-H)(OCH_3)(CH_3OH)]^+$  en  $L^2c$  (arriba) y del complejo neutro  $[VO_2(L^3-H)]$  en  $L^3c$  (abajo). Los elipsoides de probabilidad son al 50%. Los átomos de hidrógeno se han suprimido para mayor simplicidad.

## TABLAS DE CRISTALOGRAFÍA

**Tabla 8.-** Datos de la estructura cristalina y del refinamiento en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

	L <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	L <sup>3</sup>	L <sup>4</sup>
<b>Formula</b>	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClFN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15.5</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3.5</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	339.75	355.77	372.22	351.78
<b>T, K</b>	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)
<b>Longitud de onda, Å</b>	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
<b>Sistema cristalino</b>	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> /n	C/c	P $\bar{1}$	P2 <sub>1</sub> /n
<b>a/Å</b>	8.0030(4)	15.7785(14)	7.9828(8)	7.4408(6)
<b>b/Å</b>	12.0652(5)	13.6157(13)	13.6339(14)	13.0062(11)
<b>c/Å</b>	15.9614(7)	7.7543(7)	15.4881(15)	16.5680(14)
<b>α/°</b>			86.131(3)	
<b>β/°</b>	100.305(3)	102.232(5)	86.588(3)	91.354(3)
<b>γ/°</b>			89.024(3)	
<b>V/Å<sup>3</sup></b>	1516.34(12)	1628.1(3)	1678.7(3)	1602.9(2)
<b>Z</b>	4	4	4	4
<b>F<sub>000</sub></b>	704	744	772	736
<b>D<sub>calc</sub>/g cm<sup>-3</sup></b>	1.488	1.451	1.473	1.458
<b>μ/mm<sup>-1</sup></b>	0.282	0.266	0.409	0.265
<b>θ/ (°)</b>	3.09 a 26.38	2.99 a 26.41	1.32 a 26.42	1.99 a 26.42
<b>R<sub>int</sub></b>	0.0766	0.0441	0.0513	0.0478
<b>Goodness-of-fit on F<sup>2</sup></b>	1.058	1.007	1.064	1.300
<b>R<sub>1</sub>[I&gt;2σ(I)]<sup>a</sup></b>	0.0448	0.0412	0.0349	0.0945
<b>wR<sub>2</sub> (para todos los datos)<sup>b</sup></b>	0.1165	0.0938	0.0890	0.2070
<b>Densidades electrónicas residuales (eÅ<sup>-3</sup>)</b>	0.263/-0.301	0.331/-0.267	0.268/-0.316	0.404/-0.463

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



**Tabla 9.-** Datos de los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

D-H...A	Compuesto	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(10)...N(1)	L <sup>1</sup>	0.92(3)	1.71(3)	2.535(2)	148(3)
O(1)-H(10)...O(2)		0.92(3)	2.65(3)	3.428(2)	143(3)
O(1)-H(10)...N(2)		0.92(3)	2.82(3)	3.727(2)	168(3)
N(2)-H(2N)...Cl(1)#1		0.87(3)	2.35(3)	3.205(2)	165(2)
N(3)-H(3N)...Cl(1)		0.97(3)	2.12(3)	3.068(2)	166(2)
O(3)-H(3O)...Cl(1)#2		0.95(3)	2.15(3)	3.0909(19)	172(2)
O(1)-H(10)...N(1)	L <sup>2</sup>	0.98(4)	1.66(4)	2.537(3)	147(3)
O(1W)-H(1WA)...Cl(1)#3		0.79(4)	2.36(4)	3.148(3)	176(4)
O(1W)-H(1WB)...Cl(1)#4		0.94(5)	2.21(5)	3.143(3)	174(4)
N(2)-H(2N)...Cl(1)#5		0.99(4)	2.35(4)	3.304(3)	162(3)
O(3)-H(3O)...O(1W)		0.92(5)	1.79(5)	2.693(3)	167(4)
N(3)-H(3N)...Cl(1)		0.98(4)	2.15(4)	3.136(2)	177(3)
O(4)-H(4)...O(3)#6		0.84	1.89	2.672(3)	155.5
O(1)-H(10)...N(1)	L <sup>3</sup>	0.85(3)	1.85(3)	2.609(2)	148(2)
O(1M)-H(1M)...Cl(3)		0.82	2.33	3.1498(15)	175.1
N(2)-H(2N)...O(6)#7		0.90(2)	2.14(2)	2.979(2)	155(2)
O(3)-H(3O)...Cl(3)#8		0.90(3)	2.21(3)	3.1021(15)	171(2)
N(3)-H(3N)...O(1M)#9		0.91(2)	1.86(2)	2.751(2)	166.2(19)
O(4)-H(4O)...N(4)		0.83(3)	1.81(3)	2.564(2)	152(3)
N(5)-H(5N)...Cl(4)		0.90(2)	2.30(2)	3.1783(17)	165.7(19)
O(6)-H(6O)...Cl(4)#7		0.84(3)	2.18(3)	2.9764(15)	158(3)
N(6)-H(6N)...Cl(3)#10		0.87(2)	2.18(2)	3.0491(17)	174.3(19)
O(1)-H(10)...N(1)	L <sup>4</sup>	0.93(6)	1.69(6)	2.539(5)	150(6)
N(2)-H(2N)...Cl(1)		0.99(7)	2.18(7)	3.139(5)	164(6)
N(3)-H(3N)...Cl(1)#11		0.81(7)	2.26(7)	3.062(4)	177(6)
O(3A)-H(3A)...O(2)#12		0.82	2.01	2.781(7)	157.5

Transformaciones de simetría para generar átomos equivalentes:

#1  $x-1/2, -y+5/2, z-1/2$  #2  $-x, -y+2, -z$  #3  $x, -y+2, z-1/2$  #4  $x, y, z-1$  #5  $x+1/2, -y+3/2, z-1/2$  #6  $x, y-1, z$   
 #7  $-x+1, -y, -z-1$  #8  $x+1, y, z$  #9  $-x+1, -y-1, -z$  #10  $-x, -y, -z-1$  #11  $x-1/2, -y+1/2, z+1/2$  #12  $-x+5/2, y+1/2, -z+3/2$

**Tabla 10.-** Selección de longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>.

Longitudes de enlace	L <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	L <sup>3</sup>	L <sup>4</sup>
O(1)-C(1)	1.345(3)	1.348(3)	1.341(2)	1.348(5)
N(1)-C(8)	1.282(3)	1.283(4)	1.286(2)	1.285(7)
N(1)-N(2)	1.360(2)	1.359(3)	1.357(2)	1.367(5)
N(2)-C(9)	1.373(3)	1.379(4)	1.374(2)	1.382(7)
O(2)-C(9)	1.221(3)	1.227(3)	1.217(2)	1.222(6)
F(1)-C(14)	1.365(3)			
O(4)-C(14)		1.356(4)		
Cl(2)-C(28)			1.7357(18)	
O(4)-C(12)				1.368(7)
O(4)-C(16)				1.421(7)
Ángulos	L <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	L <sup>3</sup>	L <sup>4</sup>
C(8)-N(1)-N(2)	121.30(19)	119.7(3)	117.18(16)	119.1(4)
N(1)-N(2)-C(9)	115.28(18)	116.3(2)	117.92(16)	115.4(4)
C(2)-N(3)-C(3)	123.6(2)	124.3(3)	124.36(17)	124.7(4)
O(2)-C(9)-N(2)	120.8(2)	121.0(3)	121.52(17)	121.3(5)

**Tabla 11.-** Datos de la estructura cristalina y del refinamiento en los compuestos L<sup>2</sup>c y L<sup>3</sup>c.

	L <sup>2</sup> c	L <sup>3</sup> c
Fórmula	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>8</sub> V	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> V
Peso molecular	497.80	401.682
T, K	100(2)	108(2)
Longitud de onda, Å	0.71073	0.71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Ortorrómbico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a/Å	12.0651(5)	14.8915(19)
b/Å	14.7773(5)	15.971(2)
c/Å	12.8585(5)	6.5890(9)
β/°	111.460(2)	
V/Å <sup>3</sup>	2133.60(14)	1567.1(4)
Z	4	4
F <sub>000</sub>	704	818.3
D <sub>calc</sub> /g cm <sup>-3</sup>	1.550	1.703
μ/mm <sup>-1</sup>	0.641	0.837
θ/ (°)	1.81 a 26.44	2.55 a 27.59
R <sub>int</sub>	0.0551	0.0593
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.146	1.030
R <sub>1</sub> [I>2σ(I)] <sup>a</sup>	0.0360	0.0531
wR <sub>2</sub> (para todos los datos) <sup>b</sup>	0.1108	0.1446
Parámetro de Flack		0.44(4)
Densidades electrónicas residuales (eÅ <sup>-3</sup> )	0.522/-0.520	1.47/-0.64

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

**Tabla 12.-** Datos de los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en los compuestos L<sup>2c</sup> y L<sup>3c</sup>.

D-H...A	Compuesto	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1M)-H(1M)...Cl(1)	L <sup>2c</sup>	0.88(3)	2.25(3)	3.1125(18)	167(3)
O(3M)-H(3M)...Cl(1)#1		0.83(3)	2.28(4)	3.090(2)	166(3)
N(3)-H(3N)...Cl(1)#2		0.87(3)	2.26(3)	3.1230(19)	172(3)
O(4)-H(4O)...Cl(1)#3		0.75(3)	2.44(3)	3.1578(18)	163(3)
O(5)-H(5O)...O(3M)#4		0.83(3)	1.82(3)	2.647(2)	174(3)
O(3B)-H(3B)...O(2)#5	L <sup>3c</sup>	0.84	2.11	2.904(6)	156.9
N(3)-H(3N)...O(2)#6		1.01(5)	1.78(5)	2.724(4)	153(4)

Transformaciones de energía utilizadas para generar átomos equivalentes:

#1 -x+2,-y,-z+3 #2 -x+2,y+1/2,-z+5/2 #3 x+1,y,z #4 -x+2,y-1/2,-z+5/2 #5 -x+1,y-1/2,-z+1/2 #6 x+1/2,-y+3/2,-z+1

**Tabla 13.-** Selección de longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] en los compuestos L<sup>2c</sup> y L<sup>3c</sup>.

Longitudes de enlace	L <sup>2c</sup>	L <sup>3c</sup>
V(1)-O(1)	1.5917(16)	1.613(3)
V(1)-O(2)	1.8785(15)	1.631(3)
V(1)-O(3)	1.9470(15)	
V(1)-O(4)		1.926(2)
V(1)-O(5)		1.965(3)
V(1)-N(1)	2.1318(18)	2.161(3)
N(1)-N(2)	1.308(3)	1.398(3)
N(1)-C(8)	1.288(3)	1.288(4)
N(2)-C(9)	1.308(3)	1.305(4)
O(3)-C(9)	1.308(3)	
O(5)-C(9)		1.295(4)
C(1)-O(2)	1.324(2)	
C(1)-O(4)		1.298(4)
Ángulos	L <sup>2c</sup>	L <sup>3c</sup>
O(1)-V(1)-O(2M)	100.23(8)	
O(1)-V(1)-O(2)	100.81(8)	108.56(17)
O(2M)-V(1)-O(2)	105.08(7)	
O(1)-V(1)-O(3)	97.94(7)	
O(2M)-V(1)-O(3)	92.18(7)	
O(2)-V(1)-O(3)	151.66(7)	
O(1)-V(1)-N(1)	92.50(7)	129.83(17)
O(2M)-V(1)-N(1)	162.74(7)	
O(2)-V(1)-N(1)	83.67(7)	121.39(18)
O(3)-V(1)-N(1)	74.43(6)	
O(1)-V(1)-O(1M)	174.99(7)	
O(2M)-V(1)-O(1M)	84.34(7)	
O(2)-V(1)-O(1M)	79.81(6)	
O(3)-V(1)-O(1M)	79.74(6)	
N(1)-V(1)-O(1M)	82.61(6)	
O(4)-V(1)-N(1)		80.93(10)
O(4)-V(1)-O(1)		96.64(16)
O(4)-V(1)-O(2)		98.89(16)
O(5)-V(1)-O(1)		95.71(16)
O(5)-V(1)-O(2)		98.55(16)
O(5)-V(1)-O(4)		154.15(11)
O(5)-V(1)-N(1)		73.73(10)

#### 4.2 Discusión de resultados de los experimentos de caracterización estructural

El vanadio se caracteriza por presentar una elevada especiación, siendo muy difícil aislar una sola especie. En la caracterización de nuestros compuestos identificamos la presencia de varias especies en los resultados obtenidos por las diferentes técnicas utilizadas.

El análisis elemental ya nos proporciona información de la presencia de diferentes especies en los compuestos aislados. En estos análisis, las hidrazonas L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup> están protonadas y presentan un anión cloruro como contraión, y los compuestos L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> contienen además una molécula de MeOH. Los análisis elementales de los complejos muestran la presencia de dos tipos de especies: la especie de fórmula [VOL(OCH<sub>3</sub>)] en los compuestos L<sup>1c</sup> y L<sup>4c</sup>, que están protonados en el nitrógeno de la piridina del grupo piridoxal y un anión Cl<sup>-</sup>. Además, una molécula de metanol coordinado ocupa la sexta posición de coordinación. Los compuestos L<sup>2c</sup> y L<sup>3c</sup> analizados, presentan dos oxígenos terminales, de fórmula [VO<sub>2</sub>L], el nitrógeno de la piridina del grupo piridoxal protonado y una molécula de agua de cristalización.

En los resultados de espectros de masas se confirma la presencia de estas especies. En los espectros de masas de los ligandos, además de las especies monoméricas, también se observa la presencia de dímeros en algunos de estos compuestos. Son menos abundantes que las especies monoméricas, pero están presentes estas estructuras en los compuestos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup>, tanto en los ESI-TOF positivos, con la fórmula [K(L)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, como en los ESI-TOF negativos, con la fórmula [(L)<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup>. Los complejos presentan fórmulas con uno o dos grupos óxido terminales. En el espectro de masas de iones negativos de L<sup>1c</sup> aparece un pico que corresponde a la mezcla entre los dos tipos de especies, con fórmula {[VOL<sup>1</sup>(OCH<sub>3</sub>)] [VO<sub>2</sub>L<sup>1</sup>]}<sup>-</sup>, y una abundancia relativa del 37%. En el espectro de iones positivos de L<sup>2c</sup>, sólo aparece el pico correspondiente al complejo dimérico con un grupo óxido terminal de fórmula {Na[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>}<sup>+</sup> y en el negativo ocurre lo mismo y se forma el dímero que aparece en el pico que corresponde a la fórmula {[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>Cl}<sup>-</sup>, en ambos casos con una abundancia relativa inferior al 15%. En los espectros de masas de L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup> aparecen picos similares a L<sup>2c</sup> con menor abundancia relativa.

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , en  $\text{dmsO-d}_6$ , observamos la presencia del hidrógeno del grupo -NH- que se enlaza al carbono imínico en todos los ligandos (ver la Tabla 6).

Los espectros de  $\text{L}^1$  y  $\text{L}^3$  presentan las señales correspondientes al hidrógeno -OH del grupo piridoxal. En  $\text{L}^2$  y  $\text{L}^4$  no se observa esta señal, lo cual puede ser indicativo de una fuerte interacción por enlace de hidrógeno con moléculas del disolvente que provoca que este pico sea más ancho y en estos dos espectros no puede ser observada. La señal del hidrógeno del grupo -OH fenílico solo la encontramos en  $\text{L}^2$  y  $\text{L}^2\text{c}$ .

La señal correspondiente al protón del grupo imínico se desplaza al complejarse los ligandos. En los espectros de los ligandos aparece entre 9,04 y 9,16 ppm. En los espectros de los complejos se ha desplazado hasta el entorno de 9,30 ppm. Esto indica un desapantallamiento de ese protón al complejarse debido a un desplazamiento de la nube  $\pi$  del enlace imínico hacia el enlace N-V al formar los complejos.

La señal correspondiente al protón aromático del grupo piridoxal aparece a 8,20 ppm en los espectros de los ligandos. Esta señal se desplaza a campo fuerte en los complejos, y en la mayoría de ellos queda entremezclada con las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos del grupo bencénico. Esto indica que estos protones están más apantallados en los complejos y que se ha producido un aumento de la densidad electrónica en la nube  $\pi$  en el anillo del grupo piridoxal.

Las señales correspondientes a los protones aromáticos del grupo fenílico de las diferentes hidrazidas condensadas con el monoaldehído de piridoxal aparecen en la región entre 7 y 8 ppm, aproximadamente.

La señal correspondiente al protón del grupo alcohol, unido al -CH<sub>2</sub>- del grupo piridoxal, aparece próxima a 5,7 ppm en todos los compuestos. No se observa ninguna pauta en el desplazamiento químico, pero en los ligandos  $\text{L}^1$  y  $\text{L}^3$  no aparece. Esta señal, que en todos los demás espectros es ancha, indica que existe un equilibrio a través de interacciones por enlace de hidrógeno con las moléculas del disolvente.

Cuando se forman los complejos las señales del -NH- imínico y -OH piridoxal desaparecen en el espectro, ya que estos dos átomos se desprotonan cuando enlazan con el centro metálico, lo cual confirma que se formaron los complejos.

En los espectros de RMN de los ligandos las señales de los espectros son estrechas. En cambio, se ven unas señales más anchas en los espectros de los complejos. Esto

puede indicar que podemos tener equilibrios en disolución entre diferentes especies de complejos de vanadio, las cuales han sido identificadas y aisladas por otras técnicas.

Los resultados de IR muestran variaciones en las señales correspondientes a los modos de vibración de los enlaces que son modificados cuando se forman los complejos. Estos cambios afectan especialmente al enlace del grupo carbonilo C=O que cambia de posición en los espectros, cuando se forman los complejos y pasa a su forma coordinada. La señal correspondiente al enlace carbonilo, C=O, aparece en los ligandos entre 1680 y 1695  $\text{cm}^{-1}$ , y esta señal desaparece al formarse los complejos (ver la tabla 7). En los espectros de IR de los complejos aparecen las señales correspondientes a la forma coordinada del enlace C-O a 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$ .

En los espectros de IR también se puede observar la formación de los dos tipos de especies de complejos descritas. La banda correspondiente a la tensión,  $\nu(\text{V}=\text{O})$ , tiene dos modos activos, simétrico y asimétrico, en los complejos con dos grupos óxido terminales,  $\text{VO}_2$ , como se puede observar en el espectro de  $\text{L}^3\text{c}$ . Los espectros de los otros complejos sólo tienen un modo de vibración activo,  $\nu(\text{V}=\text{O})$ , que corresponde al único grupo óxido terminal,  $\text{V}=\text{O}$ .

En los estudios por difracción de rayos X de monocristal hemos aislado cristales de todos los ligandos (ver la tabla 8) y de los complejos  $\text{L}^2\text{cy}$   $\text{L}^3\text{c}$  (ver la Tabla 9). En las unidades asimétricas de las estructuras de los ligandos, observamos sólo una molécula en los ligandos  $\text{L}^1$   $\text{L}^2$  y  $\text{L}^4$  y dos moléculas en el caso del ligando  $\text{L}^3$ , las cuales forman un dímero por interacciones no covalentes (ver la figura 46). En el empaquetamiento cristalino de la estructura del ligando  $\text{L}^1$  se observa que las moléculas del compuesto interactúan en posición antiparalela, formando una estructura en capas en forma de reja. Las distancias entre centroides de las nubes  $\pi$  de los anillos y entre éstas y los dobles enlaces  $-\text{C}=\text{N}-$  están entre 3,50 y 3,72 Å (ver la figura 84). En el empaquetamiento cristalino de la estructura del ligando  $\text{L}^2$  se observa que las interacciones  $\pi-\pi$  son más escasas y las moléculas interactúan preferentemente a través de enlaces de hidrógeno (ver la figura 85). En el empaquetamiento cristalino de la estructura de  $\text{L}^3$  se observa que las moléculas interactúan en posición antiparalela formando capas. La interacción entre el par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en este com-



puesto frente a otro tipo de interacciones, aunque también son importantes las interacciones entre las nubes  $\pi$  de los anillos y las nubes  $\pi$  de los grupos  $-C=N-$ . Las distancias entre centroides son cortas y varían entre 3,28 y 3,72 Å (ver la figura 86). En el empaquetamiento cristalino de la estructura de  $L^4$ , las moléculas interactúan a través de las nubes  $\pi$  de los anillos de piridoxal, los cuales se alternan de un lado a otro. Las interacciones por enlace de hidrógeno se producen entre los iones de cloro, los átomos de oxígeno, los cuales están desordenados en esta estructura, y los átomos de nitrógeno de los grupos hidrazona. Las distancias entre los centroides están entre 3,77 y 3,73 Å, por tanto, más débiles en este caso (ver la figura 87).

En las estructuras cristalinas de los ligandos se observan muchas interacciones por enlace de hidrógeno, intramoleculares e intermoleculares (ver la tabla 9). En el compuesto  $L^1$  se observan enlaces de hidrógeno intramoleculares muy fuertes entre el grupo  $-OH$  del grupo piridoxal y el átomo de nitrógeno del grupo imínico próximo. También se observan enlaces de hidrógeno intramoleculares más débiles con el otro nitrógeno del grupo hidrazona y con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. También están presentes enlaces de hidrógeno intramoleculares en los que participa el anión cloruro. En el compuesto  $L^2$  se observan enlaces de hidrógeno intramoleculares fuertes entre el grupo  $-OH$  del grupo piridoxal y el átomo de nitrógeno del grupo imínico próximo. También tenemos una molécula de agua de cristalización que participa en enlaces de hidrógeno intramoleculares fuertes. El grupo  $-OH$  fenílico también interactúa por enlace de hidrógeno intramolecular con el grupo alcohol  $-CH_2OH$  del anillo piridoxal de otra molécula. En el compuesto  $L^3$  los enlaces de hidrógeno son importantes en la formación de los dímeros observados. Se observa el enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo  $-OH$  del grupo piridoxal y el átomo de nitrógeno del grupo imínico próximo. Los demás enlaces de hidrógeno son intermoleculares y participan los iones cloruro y la molécula de metanol presente en el empaquetamiento cristalino. En el compuesto  $L^4$ , está presente el mismo enlace de hidrógeno intramolecular fuerte y también enlaces de hidrógeno intermoleculares en los que participa el ion cloruro.

En las estructuras cristalina de los complejos  $L^2c$  y  $L^3c$  también se observan enlaces de hidrógeno, pero ahora todos son intermoleculares. El compuesto  $L^2c$  tiene enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las moléculas de metanol que forman parte de

la red cristalina y con los iones cloruro presentes también en el empaquetamiento cristalino. En el complejo de  $L^2c$  observamos más enlaces de hidrógeno que en el compuesto  $L^3c$  que solamente presenta dos enlaces de hidrogeno (ver la tabla 12). Esto se puede explicar por la no presencia del contraión cloruro en el compuesto  $L^3c$ .

Si observamos las distancias de enlace en el grupo carbonilo en los ligandos (ver la Tabla 10), que en todos ellos se sitúa en torno a 1,34 Å y la comparamos con la distancia de enlace para C=O en los complejos (ver la Tabla 13) observamos que ha disminuido. La distancia en los complejos es 1.308(3) Å en  $L^2c$  y 1.295(4) Å en  $L^3c$ , lo cual indica que se ha producido una deslocalización de la nube  $\pi$  y que se ha incrementado la participación  $\pi$  en este enlace al formarse los complejos. También se observa que el enlace C=N próximo al grupo carbonilo anterior se acorta y pasa de una distancia de 1,38 Å en los ligandos, a 1,31 Å en los complejos. Esto se puede explicar por el efecto quelato de ese fragmento cíclico -O-C-N-N-V-. La distancia de enlace N-N es menor en  $L^2c$ , 1,31 Å, que en el ligando  $L^2$ , 1,36 Å y en cambio en el complejo  $L^3c$  es 1,40 Å, mayor que en el ligando  $L^3$ , 1,36 Å. Por tanto, el complejo  $L^2c$  tiene una mayor contribución  $\pi$  en este anillo quelato que en el complejo  $L^3c$ , el cual tiene dos grupos óxido terminales que atraen con más fuerza esta densidad electrónica.

El otro fragmento quelato cíclico -N-C-C-O-V no tiene el mismo efecto y las distancias de enlace cambian de distinta forma en los dos complejos debido al diferente entorno de coordinación. El enlace C=N mantiene las distancias de enlace al formarse los complejos en los dos casos, aproximadamente 1,29 Å, pero el enlace C-O se mantiene en el complejo  $L^2c$ , cerca de 1,34 Å, en concreto 1,33 Å, pero cambia ligeramente en el complejo  $L^3c$ , en el cual disminuye a 1,30 Å. En este fragmento los cambios son menos substanciales.

En el empaquetamiento cristalino de los complejos se puede también observar la formación de dímeros. En el complejo  $L^2c$  (ver la Figura 89), los fragmentos interactúan en posición antiparalela. Estos a su vez interactúan por apilamiento  $\pi$  con otros dímeros a través del anillo del grupo piridoxal de un complejo y el anillo fenílico de otro. Las distancias entre las nubes  $\pi$  son: 3,667 Å y 3,591 Å. Estas interacciones, también en posición antiparalela, son más fuertes en el complejo  $L^3c$  (ver la Figura 90). La interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en

este compuesto frente a otro tipo de interacciones. También se observan interacciones entre las nubes  $\pi$  de los anillos y las nubes  $\pi$  de los enlaces imínicos. Las distancias entre centroides son: 3,316 Å, 3,370 Å, 3,386 Å, 3,254 Å, 3,397 Å y 3,290 Å. Estas distancias son menores que en el caso del complejo L<sup>2c</sup>.

Las estructuras cristalinas de los dos complejos aislados y caracterizados, L<sup>2c</sup> y L<sup>3c</sup>, presentan diferentes entornos de coordinación alrededor del centro metálico. En el complejo L<sup>2c</sup>, el polihedro de coordinación es un octaedro, algo distorsionado (ver la Figura 90). El plano ecuatorial está formado por el átomo de nitrógeno imínico, el grupo carbonilo, el átomo de oxígeno del grupo -OH fenólico del grupo piridoxal y el átomo de oxígeno del grupo metóxido. Las posiciones apicales están ocupadas por el grupo óxido terminal y el átomo de oxígeno de la molécula de metanol. El polihedro de coordinación del complejo L<sup>3c</sup> corresponde con una bipirámide trigonal distorsionada (ver la Figura 91). Las posiciones apicales son ocupadas por los dos grupos óxido terminales y el átomo de nitrógeno imínico y las dos posiciones axiales están ocupadas por el oxígeno carbonílico y el oxígeno del grupo piridoxal coordinado.

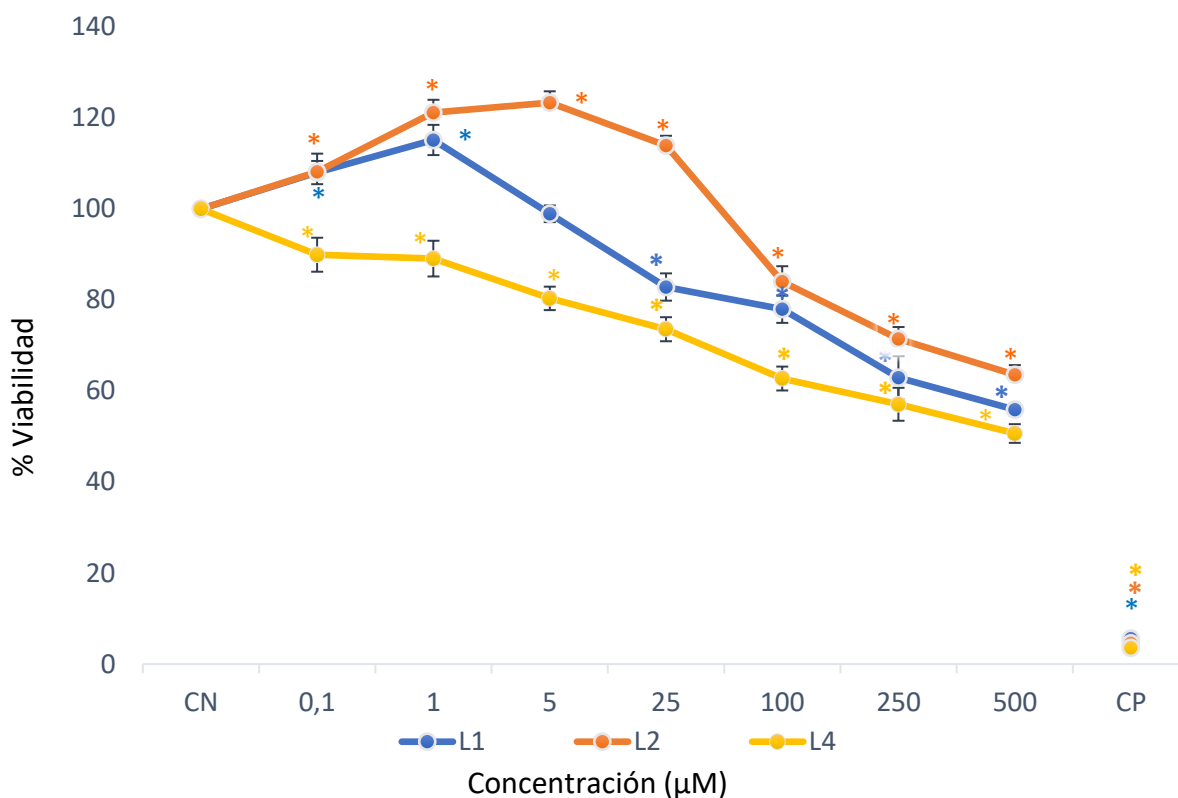
### 4.3 Estudios de toxicidad *in vitro*

En el estudio de toxicidad *in vitro* se realizó en ensayo colorimétrico de MTT para estudiar la citotoxicidad o capacidad de los compuestos para afectar a la viabilidad de las células cancerosas de la línea A549.

El ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es uno de los más comunes a la hora de detectar la capacidad antiproliferativa en cultivos celulares (Mosmann, 1983). La base de este ensayo recae en la reducción del MTT a cristales de formazán principalmente por la enzima succínica deshidrogenada mitocondrial (Berridge *et al.*, 1996), además esta reducción también está asociada al citoplasma y al comportamiento endosoma/lisosoma de la membrana plasmática (Berridge *et al.*, 2005). Los cristales de formazán insolubles en agua, se solubilizan con DMSO para ser leídos mediante un espectrómetro UV-Vis a 570 nm. Las absorbancias cambian en función del número de células viables presentes en la muestra. Los resultados de estos experimentos hicieron por tanto posible el estudio del potencial tóxico de los compuestos frente a células tumorales. Para ello, se hizo un primer cribado con los compuestos para ver si alguno de ellos podría tener posibles efectos contra células cancerígenas A549.

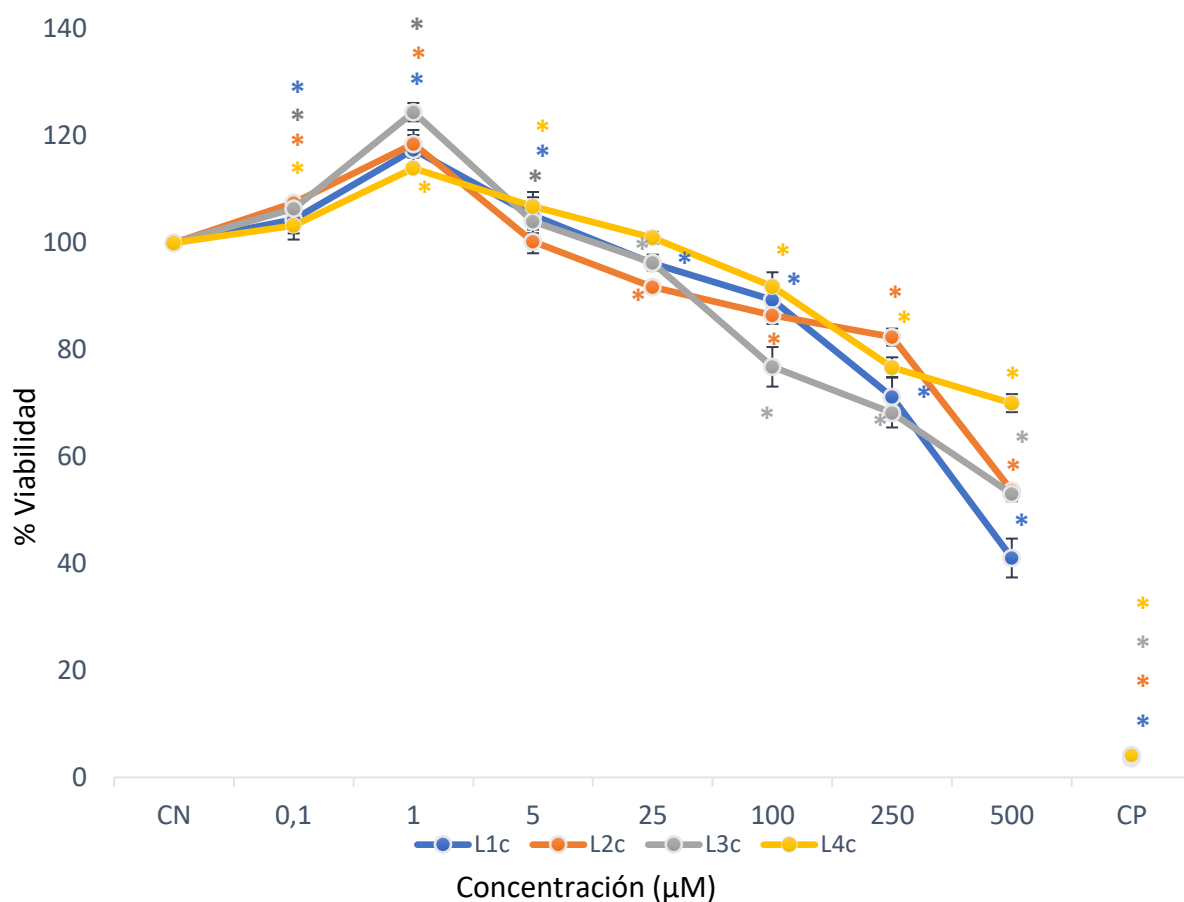
Se aplicaron un total de siete concentraciones y el ensayo se realizó a 24 y a 48 horas para todos los compuestos.

En la Figura 48 se muestran los resultados de viabilidad de A549 a 24h para los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> y L<sup>4</sup>. El compuesto L<sup>3</sup> se descartó finalmente del análisis final debido a un problema en la solución preparada. En los restantes compuestos, la bajada de viabilidad aumentó conforme aumentábamos la concentración, llegando a descender hasta un 40% para el ligando L<sup>4</sup> a 500  $\mu$ M. Se observó como los ligandos L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> aumentaron la proliferación celular a las concentraciones más bajas (entre 0.1 y 25  $\mu$ M) con valores superiores al 100% de viabilidad, especialmente en el caso del compuesto L<sup>2</sup>. Todos los valores excepto la concentración 5  $\mu$ M mostraron significación respecto al control positivo.



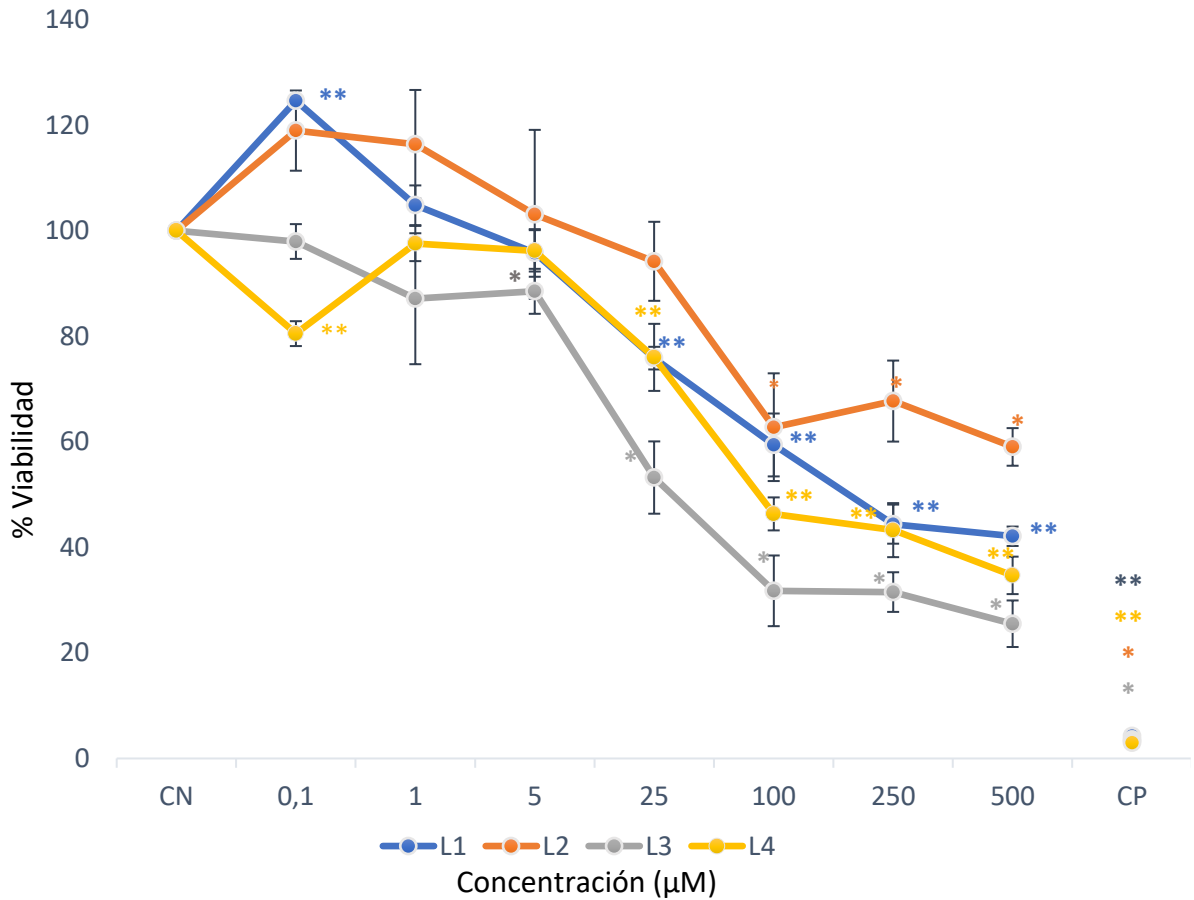
**Figura 48.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> y L<sup>4</sup> evaluados mediante ensayo MTT a 24h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (Control Negativo). CP: control positivo.

A continuación, se muestra la gráfica con todos los complejos L<sup>1c</sup>, L<sup>2c</sup>, L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup> para 24 h (Figura 49). En este caso observó que el complejo L<sup>1c</sup> fue el que mayor descenso de la viabilidad presentó, llegando a bajar entorno a un 60%. Todos los valores fueron significativos respecto al control. De forma similar a lo observado para los ligandos, los complejos también experimentaron una subida de la viabilidad en las concentraciones más bajas, con valores por encima del 100% particularmente a la concentración de 1 μM.



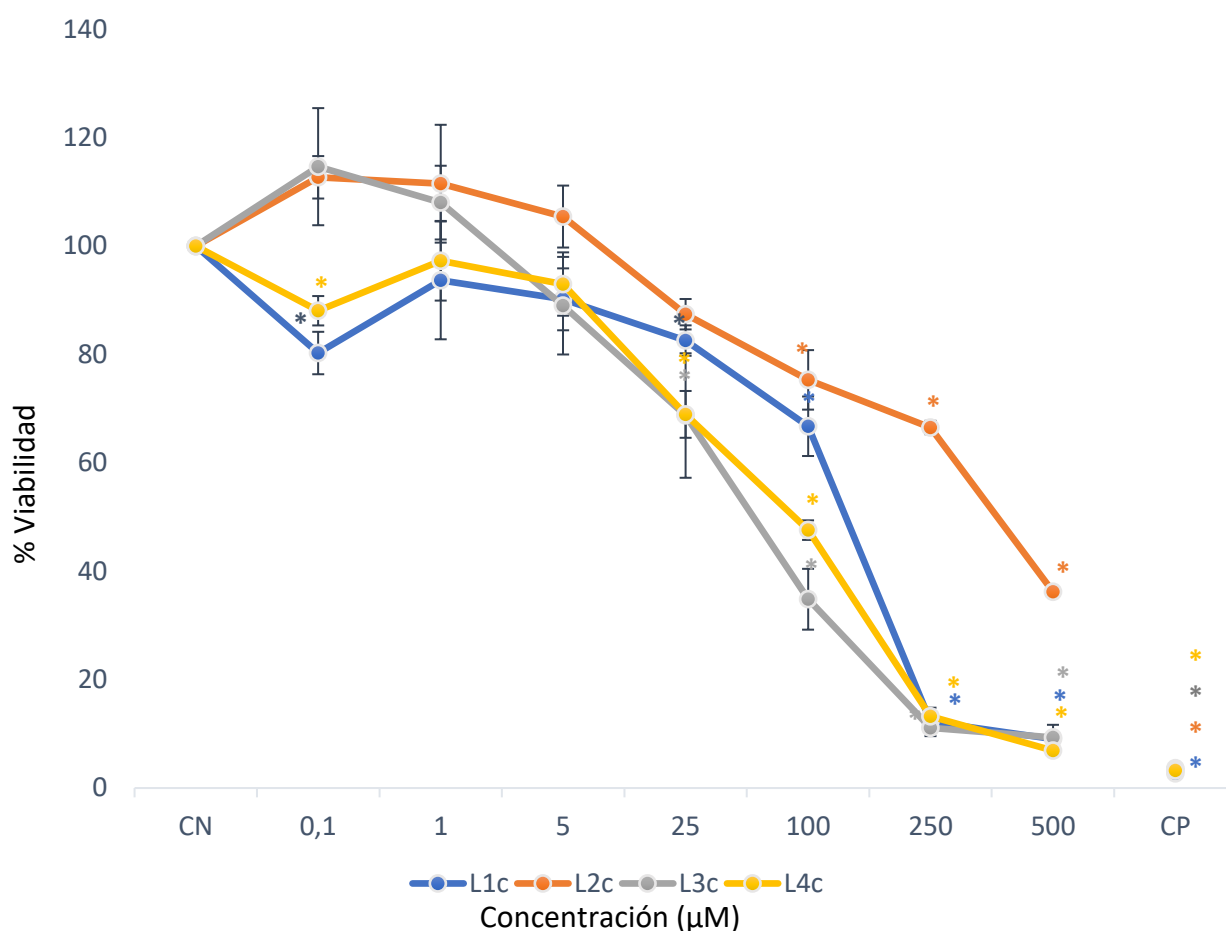
**Figura 49.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los complejos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c evaluados mediante ensayo MTT a 24h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (Control Negativo). CP: control positivo.

Tras las 48 h de exposición de las células pulmonares a los ligandos se observó una bajada dosis-dependiente de la viabilidad similar para todos ellos a todas las concentraciones testadas (Figura 50). El descenso más pronunciado, hasta un 68.24%, se observó en el ligando L<sup>3</sup> a la concentración de 100 μM. Una vez más se observó un aumento de la viabilidad en las concentraciones más bajas, limitada en este caso a los ligandos L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup>. Todos los datos fueron significativos respecto al control.



**Figura 50.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup> evaluados mediante ensayo MTT a 48h. Los valores con \*\* $P < 0,01$  \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (Control Negativo). CP: control positivo.

En la Figura 51 se muestran los resultados del ensayo MTT a 48h para los complejos. La respuesta de las células pulmonares a todos ellos fue similar y acorde también con lo observado a las 24h, con descensos pronunciados de la viabilidad dependientes de la dosis. Se detectó además un descenso muy acusado en el porcentaje de células vivas para los complejos L<sup>1c</sup>, L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup> a las concentraciones más altas testadas de 250 μM y 500 μM, en donde apenas se alcanzó el 10% en todos los casos.



**Figura 51.-** Viabilidad de células pulmonares A549 humanas tratadas con los ligandos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c evaluada mediante ensayo MTT a 48h. Los valores con \* $P < 0,05$  son significativamente diferentes del CN (control negativo). CP: control positivo.

Analizando en conjunto todos los resultados obtenidos para el estudio de la citotoxicidad de todos los compuestos, observamos que es el compuesto L<sup>3</sup>c y el ligando L<sup>3</sup> son los que más descenso de la viabilidad celular provocan, mientras que el complejo L<sup>2</sup>c y el ligando L<sup>2</sup> son los que, por el contrario, menos citotoxicidad inducen. En general los complejos presentan mayor citotoxicidad que sus respectivos ligandos; considerando los resultados obtenidos de empaquetamiento cristalino, podríamos decir que el ligando modula en cierto modo esa citotoxicidad, mediante la interacción que provoca éste con el ADN. Además, como se vio en el apartado anterior, el compuesto L<sup>3</sup>c presenta más interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking lo que nos repercute en una mayor interacción con el ADN,



motivo que podría explicar la mayor citotoxicidad vista en este caso. Esta idea se reafirma más con los datos de empaquetamiento cristalino del compuesto L<sup>2</sup>c dónde la mayoría de las interacciones se producen por enlaces de hidrógeno, las cuales interactúan menos con el ADN.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa los efectos citotóxicos de los ligandos L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup> y sus complejos L<sup>1</sup>c, L<sup>2</sup>c, L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c analizados en el presente trabajo. Sin embargo, muchos compuestos similares a los empleados presentan resultados comparables a los obtenidos en la misma línea celular. Así, se observaron descensos en la viabilidad de las células pulmonares en cultivo tratadas con complejos de oro con ligandos que contienen el grupo funcional base Schiff (Sankarganesh *et al.*, 2019), complejos con ligandos fenantrolina y como metal central el iridio, presentan una tasa de inhibición del 76,34% (Du *et al.*, 2019), complejos de rutenio (II) con ligandos benzohidrazona aromáticos (Raj *et al.*, 2018), compuestos de rutenio (II) con metilimidazol (Yang *et al.*, 2012), complejos ligandos quinolinas y metal plomo (Lüköová *et al.*, 2020), complejos plano-cuadrados de Ni(II) con ligandos 2-(difenilfosfino)-benzaldehído y 4-fenil-semicarbazida (Milenkovic *et al.*, 2014) y complejos de renio con ligandos indolpirazolina (Varma *et al.*, 2020).

También en complejos de vanadio se estudió la citotoxicidad para la línea A549, sería el caso de complejos de vanadio con ligandos de benzimidazol, que muestra una muy buena capacidad antiproliferativa frente a línea de cáncer de pulmón A549 y también frente a otras líneas que se estudiaron como cáncer de mama humano y la línea de queratinocitos humanos (Mal *et al.*, 2017). Otros estudios de la especie ternaria de preóxido-betaina de vanadio muestra propiedades anticancerígenas frente a la línea tumoral A549 (Petanidis *et al.*, 2013). Cabe mencionar complejos de vanadio con ligando tipo base de Schiff que contiene grupos piridoxal muy similares a los nuestros en los que se observó un 57% de mortalidad celular en la línea A549 de cáncer de pulmón para una concentración de 100 μM en ensayos a 72h, para la misma concentración en ensayos a 48h obtienen entre un 10%-20% de bajada de la viabilidad (Strianese *et al.*, 2013), resultados similares obtenemos en L<sup>1</sup>c y L<sup>2</sup>c a 48h con la misma concentración, sin embargo L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c provocan una bajada de la viabilidad mucho más acusada en esa concentración.

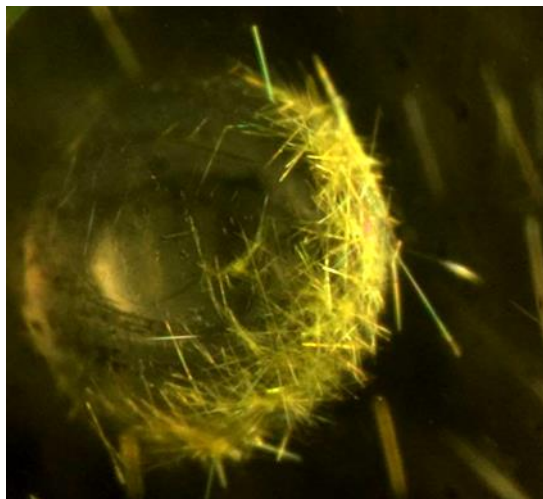
Por otra parte, junto con el descenso pronunciado y dosis-dependiente de la viabilidad celular, en la mayoría de los compuestos se observó un aumento inicial en el número de células a las concentraciones más bajas testadas. Este efecto también se observó en estudios previos empleando las mismas células pulmonares A549 tratadas con compuestos de vanadio similares (Habala *et al.*, 2015) y en estudios con hidrazonas en este caso en concentraciones mayores (Puskullu *et al.*, 2020).

#### 4.4 Estudio de toxicidad y efectos teratogénicos en pez cebra.

Para la evaluación de la toxicidad *in vivo* de los compuestos a estudio, se llevó a cabo el análisis morfológico de alteraciones teratogénicas y ensayo FET de toxicidad aguda utilizando embriones de pez cebra como modelo vertebrado, siguiendo las recomendaciones internacionales dadas por la OECD para el testado de compuestos químicos (OECD, 2013). Dado que para este estudio la metodología conlleva el manejo y uso de organismos vivos y es por tanto más compleja y costosa se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados previos de los estudios anteriores dos ligandos y dos complejos: L<sup>3</sup>, L<sup>4</sup>, L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup>.

En este ensayo, un compuesto es considerado tóxico cuando los valores de viabilidad de los individuos expuestos a él son inferiores al 75% (Veciana *et al.*, 2014). En nuestro estudio, los experimentos realizados no nos permitieron calcular el valor LC<sub>50</sub> puesto que, no se pudieron testar concentraciones superiores a 300 µM en ningún caso al producirse una pérdida de la solubilidad por cristalización de los compuestos como tal y como se observa en la Figura 52. Como ya se mencionó anteriormente, se empleó DMSO para aumentar la solubilidad de nuestros compuestos a la hora de realizar los estudios. Algunos estudios resaltan la toxicidad combinada del DMSO con el vanadio. Concretamente se estudió en pez cebra la toxicidad combinada de 0,1% y 0,5% de DMSO con vanadio (VOSO<sub>4</sub>), dando como resultado un efecto sinérgico entre ambos, a causa de la reducción de pH y la actividad del citocromo oxidasa (Kim y Lee, 2021).

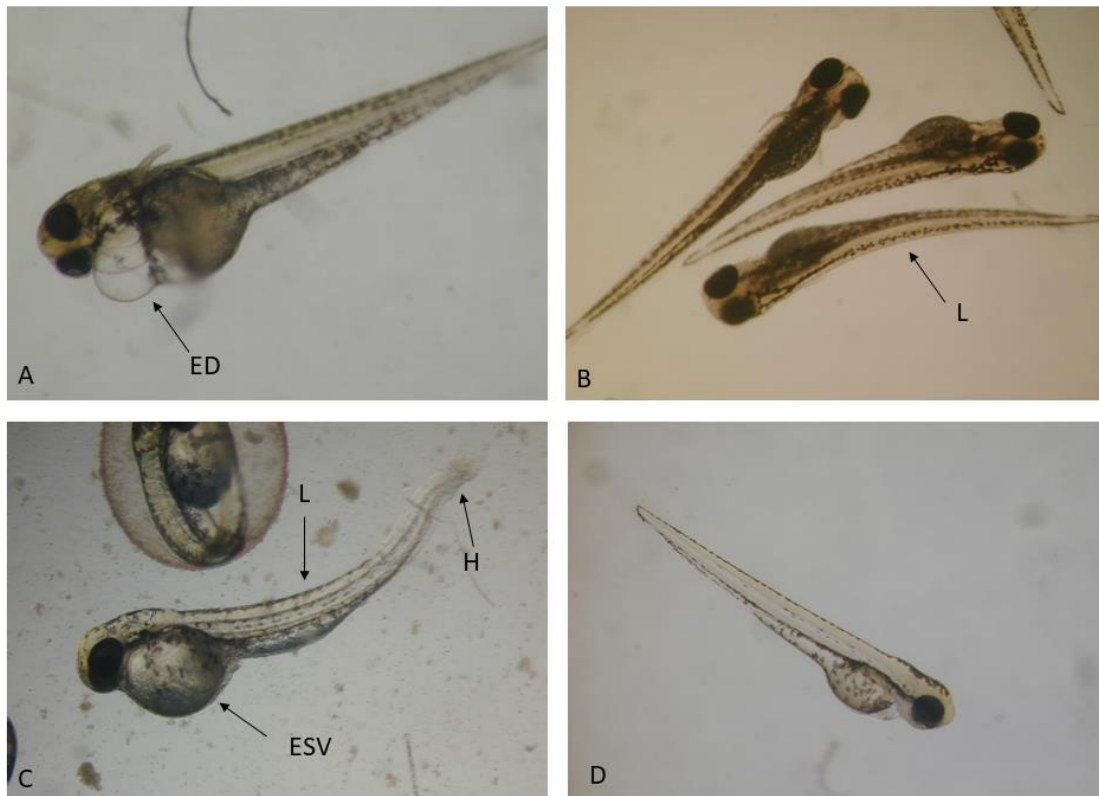
Existen otros trabajos en los que, al igual que en el nuestro, no se pudo calcular el LC<sub>50</sub> por no provocar el compuesto la suficiente bajada de viabilidad de los embriones. Un ejemplo de ello sería en el caso de un estudio con cisplatino y compuestos organometálicos de platino con ligandos alquinil, los cuales mostraron menos de 80% de la bajada de viabilidad a una concentración de 10  $\mu$ M (Schur *et al.*, 2019).



**Figura 52.-** Foto de un embrión de pez cebra a las 28h post-fecundación donde se observa la cristalización del compuesto L<sup>3</sup>c. Foto tomada con Iphone 6 en esteromicroscopio Nikon SMZ1500 a 112,5x aumentos.

En el análisis morfológico, los efectos teratogénicos observados en los embriones eclosionados fueron, principalmente, la aparición de edemas pericárdicos y edemas del saco vitelino. Se considera que estos pueden ser causados por una superhidratación del órgano afectado (García *et al.*, 2018; Hallare *et al.*, 2005). Estos edemas o acumulaciones de líquido pueden ser debidos a problemas de regulación osmótica por la concentración del compuesto, y se observaron principalmente en las concentraciones de 300  $\mu$ M para L<sup>3</sup>c y L<sup>4</sup>c, este último en menor medida a las 96 hpf. En las primeras 48 horas, los embriones de pez cebra son capaces de mantener el equilibrio osmótico debido a una barrera de permeabilidad en la superficie, antes del desarrollo del riñón (Hill *et al.*, 2004). El vanadio tiene efecto inhibidor de la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa (Bittencourt *et al.*, 2018) lo que podría explicar la acumulación de líquidos y la consiguiente formación de edemas observada en nuestro estudio.

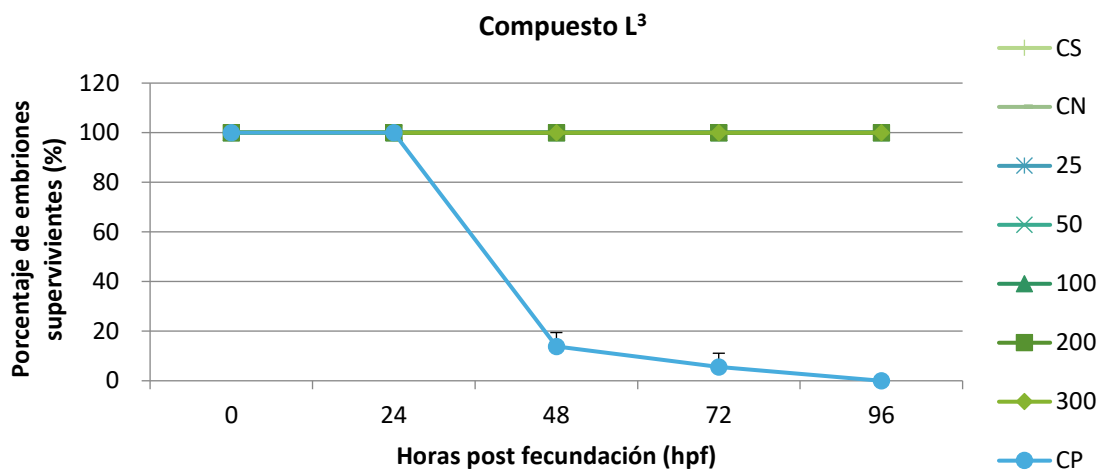
La lordiosis leve, curvatura de la espina dorsal entre un ángulo de  $90^\circ$  a  $145^\circ$  (García *et al.*, 2018), se observó principalmente en las concentraciones de 200-300  $\mu\text{M}$  para  $\text{L}^3\text{c}$  a las 96 hpf. Finalmente, en muy pocos casos, se observó una la hipertrofia de la aleta caudal en la concentración de 300  $\mu\text{M}$  para  $\text{L}^3\text{c}$  a las 96 hpf. En la Figura 53 se muestran todas estas alteraciones observadas en los individuos tratados con los compuestos  $\text{L}^3$ ,  $\text{L}^4$ ,  $\text{L}^3\text{c}$  y  $\text{L}^4\text{c}$ .



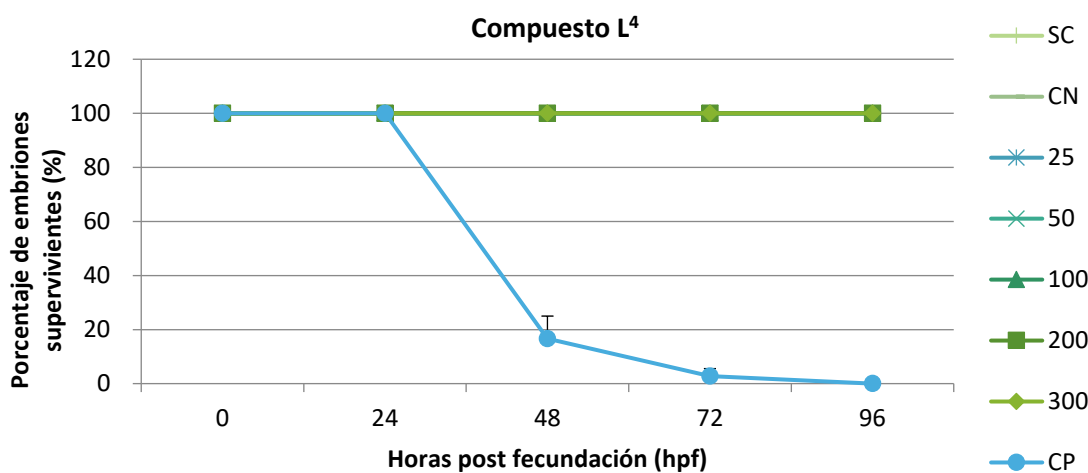
**Figura 53.-** A. Embrión con presencia de Edema pericárdico (ED) a las 96 hpf con el compuesto  $\text{L}^3\text{c}$  a 300  $\mu\text{M}$ . B. Embrión con presencia de leve lordosis (L) a las 96 hpf con el compuesto  $\text{L}^4\text{c}$  a 300  $\mu\text{M}$ . C. Embrión con presencia de leve lordosis (L), Edema en el saco vitelino (ESV) y hipertrofia en la aleta caudal (H) a las 96 hpf con el compuesto  $\text{L}^3\text{c}$  a 300  $\mu\text{M}$ . D. Embrión con desarrollo normal (control negativo). Fotografías tomadas con Nikon EC-8CF E950 a 100X.

Los resultados obtenidos del ensayo FET llevado a cabo en nuestro estudio se muestran a continuación representados en gráficas para cada uno de los compuestos y de las concentraciones testadas.

El ligando  $\text{L}^3$ , como se aprecia en la Figura 54, y  $\text{L}^4$  (Figura 55) no manifiestan efectos tóxicos en los embriones de pez cebra en ninguna de las concentraciones testadas, estos cuales se desarrollaron con plena normalidad.

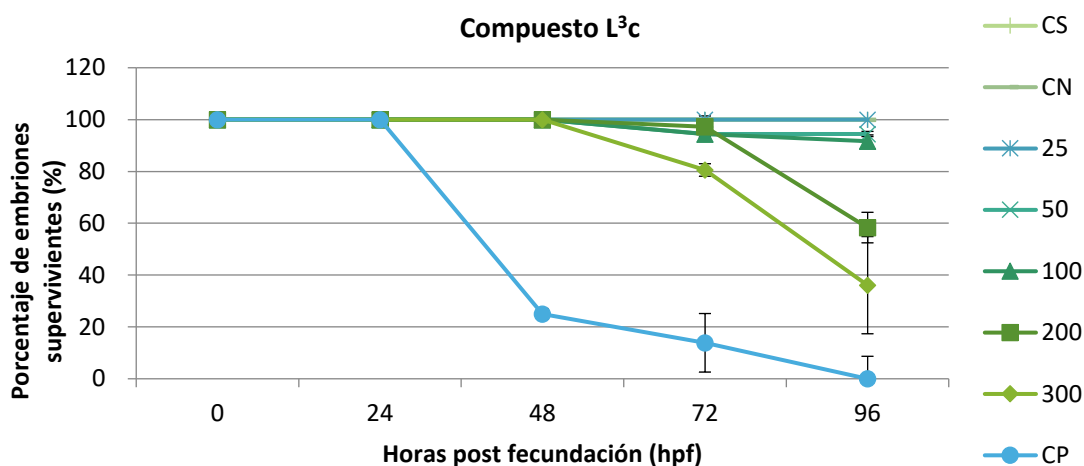


**Figura 54.-** Toxicidad en el compuesto L<sup>3</sup>, muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.



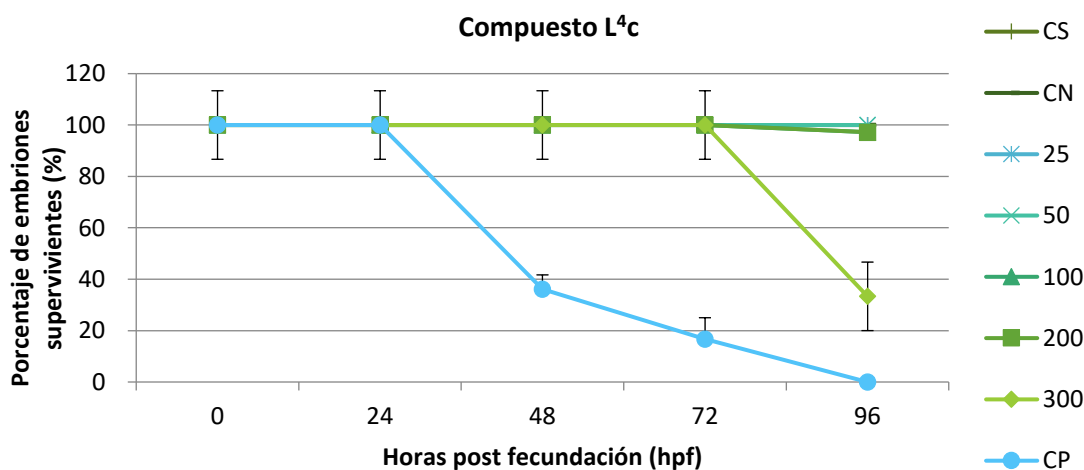
**Figura 55.-** Toxicidad en el compuesto L<sup>4</sup>, muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

En el caso del compuesto L<sup>3c</sup> (Figura 56), se ha observado una bajada de supervivencia de embriones de pez cebra del 63,9% y 41,67% para las concentraciones más altas testadas, de 200  $\mu$ M y 300  $\mu$ M respectivamente, a las 96 hpf.



**Figura 56.-** Toxicidad en el compuesto L<sup>3</sup>c , muestra el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

En el caso del complejo L<sup>4</sup>c (Figura 57) solo se observaron efectos tóxicos a la concentración de 300  $\mu$ M, en la que se obtuvo una disminución del 66.67% a las 96 hpf. Al igual que ocurría con el complejo L<sup>3</sup>c, la mayoría de las muertes detectadas para ambos compuestos se correspondieron con embriones que no habían eclosionado.



**Figura 57.-** Toxicidad en el compuesto L<sup>4</sup>c ,en la que se representa el porcentaje de embriones supervivientes desde el inicio del experimento hasta las 96 horas post fecundación. Control negativo con agua desclorada autoclavada (CN), un control positivo con 3'4 – dicloroanilina (CP) con una concentración de 4,00 mg/L y un control solvente (CS) con agua autoclavada desclorada y dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5%.

Otros compuestos que contienen vanadio también emplearon como modelo animal para estudios *in vivo* el pez cebra. Podemos mencionar un estudio con metavanadato de sodio, pentóxido de vanadio y sulfato de oxovanadio estudiados como fármacos antidiabéticos, en este caso, los embriones fueron expuestos a concentraciones de 10-1000 $\mu$ M. Hasta la concentración de 200  $\mu$ M se observaron efectos teratogénicos independientemente del grado de oxidación, incluyendo edema de saco vitelino o pericárdico y alteraciones en la frecuencia cardíaca. No obstante, a pesar de estos efectos, no se alcanzó en este caso el 100% de mortalidad hasta superar la concentración de 400 $\mu$ M (Bittencourt *et al.*, 2018). Sin embargo, otros compuestos de oxidovanadio con hidroxilamido/amino mostraron unos efectos mucho más marcados, inhibiendo la viabilidad tanto *in vitro* en una línea tumoral de osteosarcoma como *in vivo* usando el pez cebra, llegando a causar en este último caso una letalidad del 100% a concentraciones en torno a 50  $\mu$ M (León *et al.*, 2012).

Para el cribado de fármacos en lo que respecta al cáncer y el estudio de células madre el pez cebra es un modelo animal clave (Binder y Zon, 2013), motivado por la gran similitud genómica entre el pez cebra y el ser humano, ya que al menos 70% de los genes humanos presentan en pez cebra un ortólogo (Howe *et al.*, 2013), la similitud anatómica y fisiológica (Cassar *et al.*, 2020) y la presencia de modelos sensoriales similares (vista, olfato, tacto, audición entre otros) y comportamientos de estímulo-respuesta, sueño o interacciones sociales (Orger y De Polavieja, 2017).

El pez cebra en sus etapas tempranas de desarrollo es un modelo para predecir la toxicidad en humanos considerado similar e incluso superior a los roedores, un estudio de 31 compuestos (teratogénicos y no teratogénicos en mamíferos) demostró observando 16 parámetros fenotípicos (entre los que podemos destacar edema cardíaco y/o de saco vitelino, tamaño del ojo o escoliosis) una sensibilidad del 87.50%, una especificidad del 81.82% y una precisión del 79.19% (Jarque *et al.*, 2020).

Los efectos teratogénicos observados en pez cebra son por lo tanto una especie de espejo a los que un determinado fármaco u tóxico podría causar en la especie humana. Un estudio sobre el síndrome de alcoholismo fetal demuestra efectos teratogé-

nicos como la disminución de la distancia intraocular en los embriones de pez cebra dependiente de la dosis (Loucks y Ahlgren, 2012), efecto que podemos observar en niños afectados por este síndrome (Wattendorf y Muenke, 2005).

Al no encontrar toxicidad en ningún caso en los resultados obtenidos del testado de los ligandos y solo a las concentraciones más elevadas en el caso de los complejos, los compuestos empleados en el presente trabajo parecen ser *a priori* seguros, aunque se requiere más investigación en esta línea para confirmar esta observación.





## 5. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron complejos de oxidovanadio con ligandos hidrazona derivados de piridoxal y su comportamiento biológico, *in vitro* e *in vivo*, de cara a evaluar su posible idoneidad como potenciales metalofármacos antitumorales.

1. Se diseñaron y sintetizaron cuatro ligandos ( $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  y  $L^4$ ) con diferentes grupos hidrazona y sus complejos de oxidovanadio ( $L^1c$ ,  $L^2c$ ,  $L^3c$  y  $L^4c$ ).
2. Los ligandos hidrazona y los compuestos de oxidovanadio fueron caracterizados por diferentes técnicas:
  - El análisis elemental confirma que los compuestos analizados se correspondían con las estructuras buscadas.
  - Mediante la técnica de espectrometría de masas se pudo demostrar la variada especiación química del vanadio en disolución.
  - La técnica de espectroscopia de RMN  $^1H$  confirma que hemos aislado los compuestos hidrazona propuestos y que se ha producido la complejación al sintetizar los diferentes compuestos de vanadio.
  - La espectroscopia de IR se realizó para observar la presencia de diferentes grupos funcionales en los complejos y corroborar la coordinación con el vanadio en los complejos.
  - Se obtuvieron cristales aptos para su estudio por difracción de rayos X de monocristal de los compuestos  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^2c$  y  $L^3c$ .
3. Obtenido el empaquetamiento cristalino, se estudiaron las interacciones químicas entre las especies, se observó que el ligando  $L^3$  presentaba una disposición diferente a los demás ligandos, ya que las moléculas interactúan a través de las nubes  $\pi$  de sistema  $\pi$ -conjugado, en posición antiparalela formando capas. Este tipo de interacciones se mantienen en el complejo  $L^3c$ . Además, la interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en este complejo frente a otro tipo de interacciones.
4. La citotoxicidad *in vitro* fue estudiada mediante el ensayo de MTT, realizado a 24 y 48h en células de la línea A549 de cáncer de pulmón. De entre los complejos analizados, el compuesto que más citotoxicidad presentó fue el complejo  $L^3c$ , de

igual forma que el compuesto L<sup>3</sup> resultó el más citotóxico entre los ligandos. L<sup>1c</sup>, L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup> alcanzaron un descenso de la viabilidad entorno al 88%, confirmando la especial toxicidad de los complejos para esta línea celular.

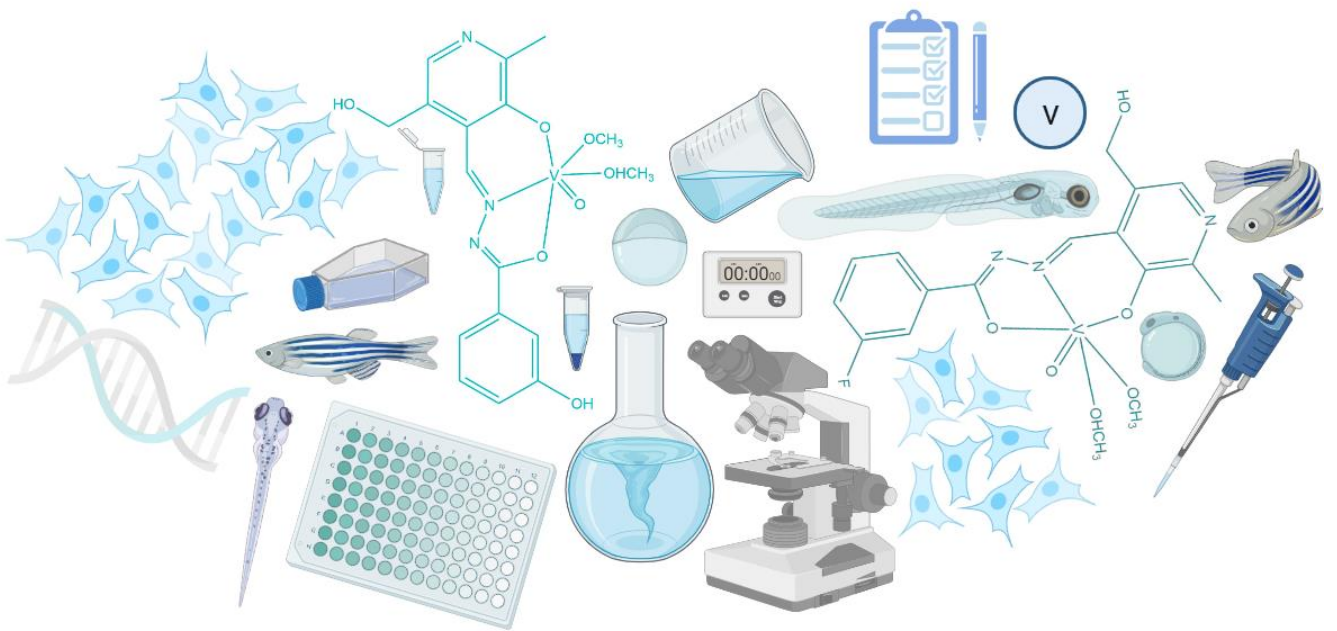
5. Los ensayos en pez cebra permiten observar si estos compuestos son tóxicos para organismos vivos y los efectos teratogénicos que pueden causar. En este caso se seleccionaron los compuestos L<sup>3</sup>, L<sup>4</sup>, L<sup>3c</sup> y L<sup>4c</sup>. Los ligandos L<sup>3</sup> y L<sup>4</sup> no resultaron tóxicos en ningún caso, mientras que los complejos L<sup>4c</sup> y, especialmente L<sup>3c</sup>, mostraron descenso de la viabilidad a las concentraciones más altas testadas indicando la necesidad de confirmar su inocuidad con futuras investigaciones en esta línea.

Los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* e *in vivo* de este trabajo y, en particular, la capacidad de los compuestos analizados, especialmente los ligandos, de inducir un importante efecto citotóxico en células cancerígenas, pero no en organismos vivos, indicaría la posible idoneidad de estos compuestos para ser evaluados como posibles agentes antineoplásicos. No obstante, serían necesarios estudios adicionales para poder afirmar que los compuestos tienen efectos anticancerígenos, y posibles fines terapéuticos. Entre estos estudios estaría descartar la toxicidad que puedan producir los compuestos en células sanas. Asimismo, sería necesarios estudios computacionales, como el *molecular docking* y ultravioleta visible para poder afirmar de modo computacional y experimental la interacción que se produce con el ADN. Estos estudios ya se iniciaron, pero por el momento solo tenemos datos preliminares, de los que se podría adelantar que en principio parecen estar correlacionados con los aquí presentes.



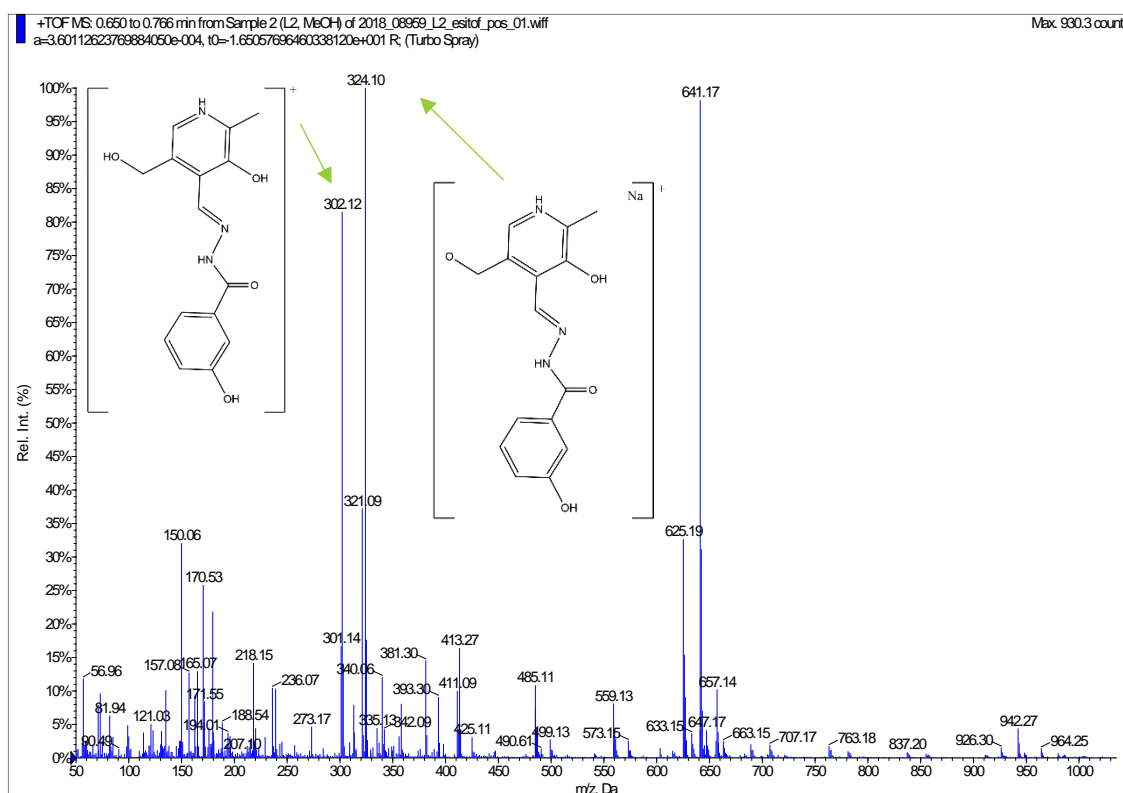
# ANEXOS

---

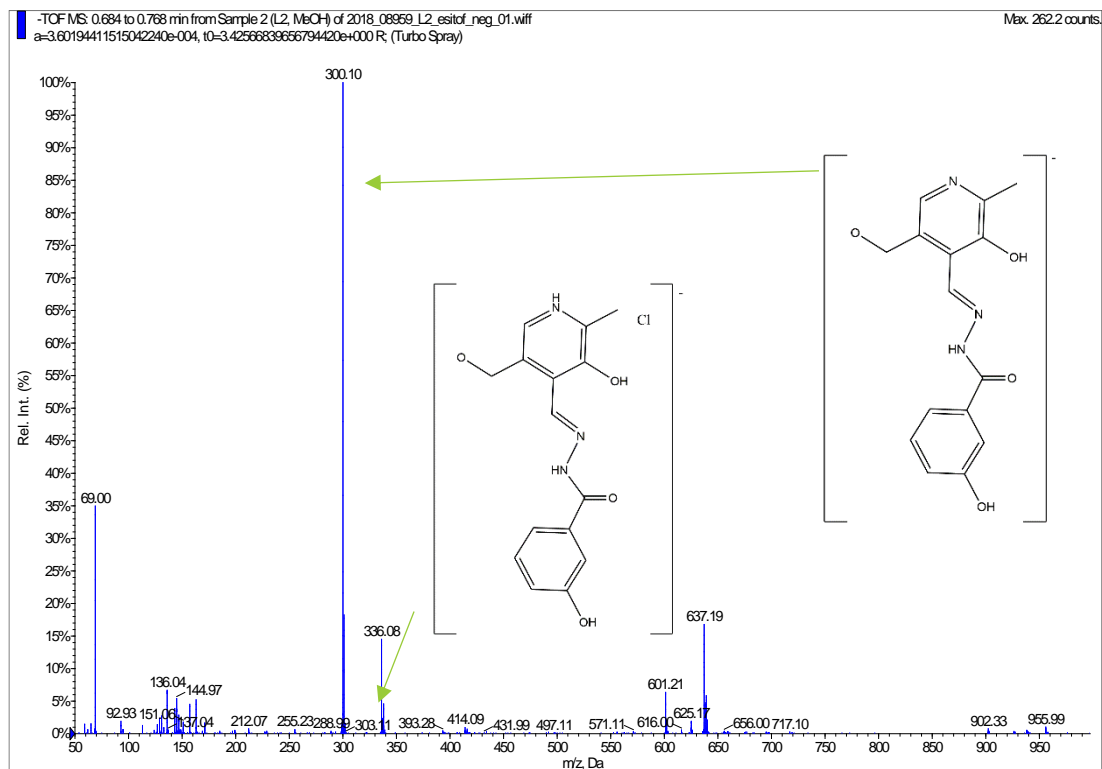


## 6. Anexos

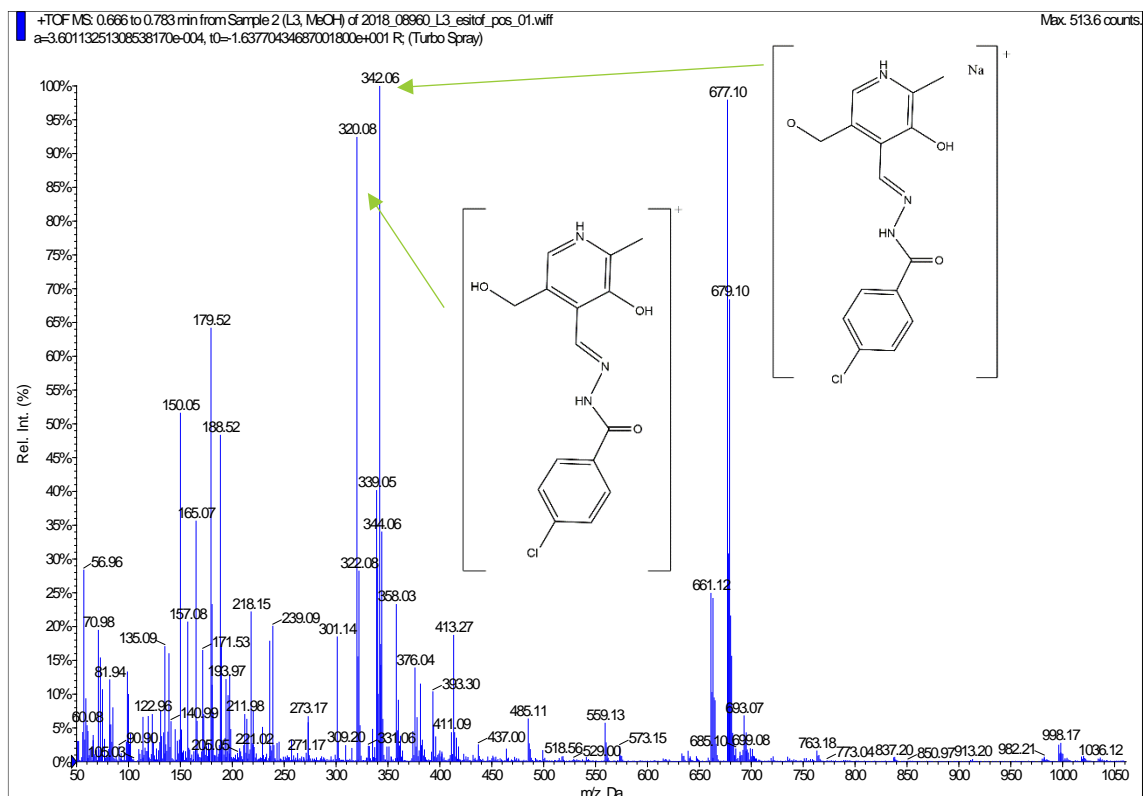
## Espectros de masas



**Figura 58.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^2$  y estructuras correspondientes a los cationes,  $[L^2+H]^+$   $m/z = 302,11$  uma,  $[NaL^2]^+$   $m/z = 324,10$  uma y para la especie  $[K(L^1)_2]^+$   $m/z = 641,17$  uma.

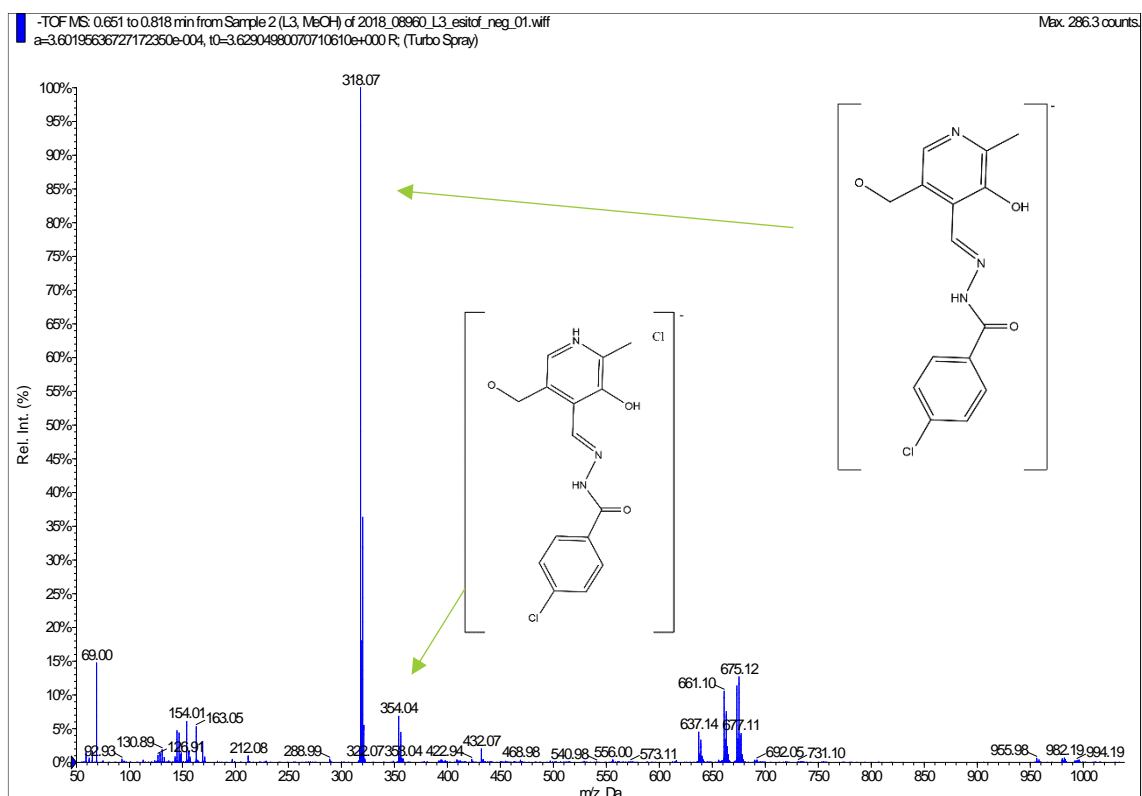


**Figura 59.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando L<sup>2</sup> y estructuras correspondientes a los aniones, [L<sup>2</sup>-H]<sup>-</sup> m/z = 300,10 uma, [L<sup>2</sup>Cl]<sup>-</sup> m/z = 336,08 uma y para la especie [(L<sup>2</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sup>-</sup> m/z = 637,19 uma.

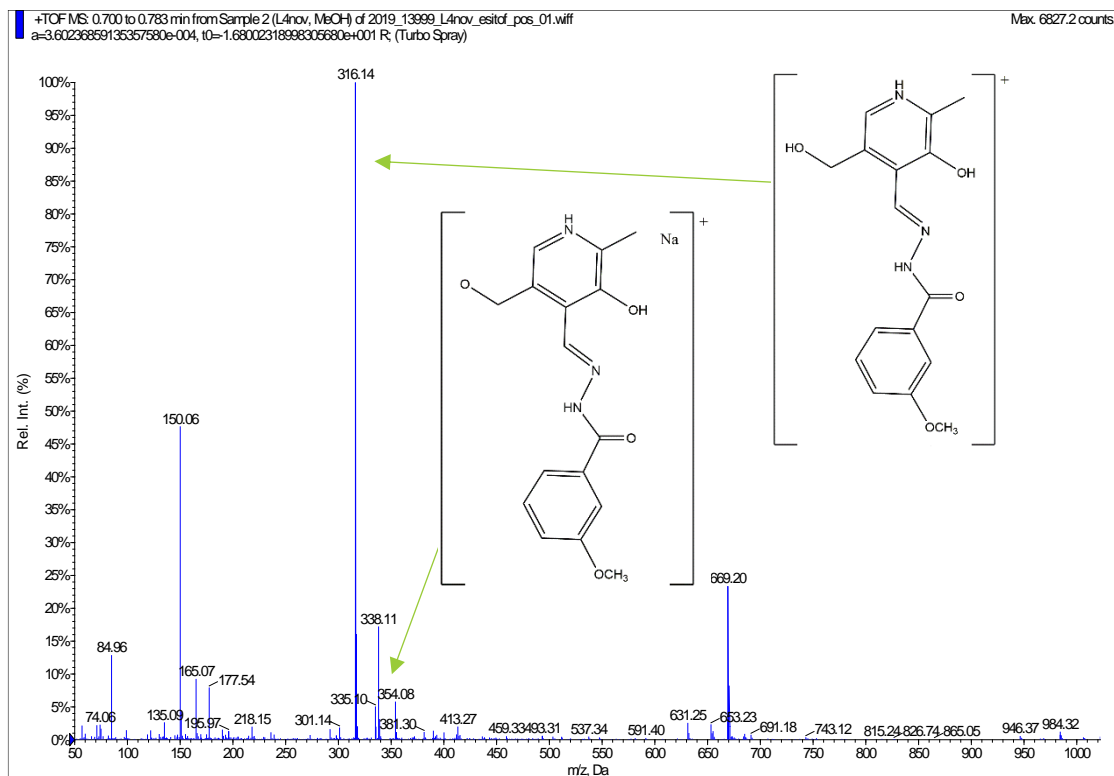


**Figura 60.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^3$  y las estructuras correspondientes a los cationes,  $[L^3]^+$   $m/z = 320,08$  uma,  $[NaL^3]^+$   $m/z = 342,06$  uma y para la especie  $[K(L^3)_2]^+$   $m/z = 677,10$  uma.

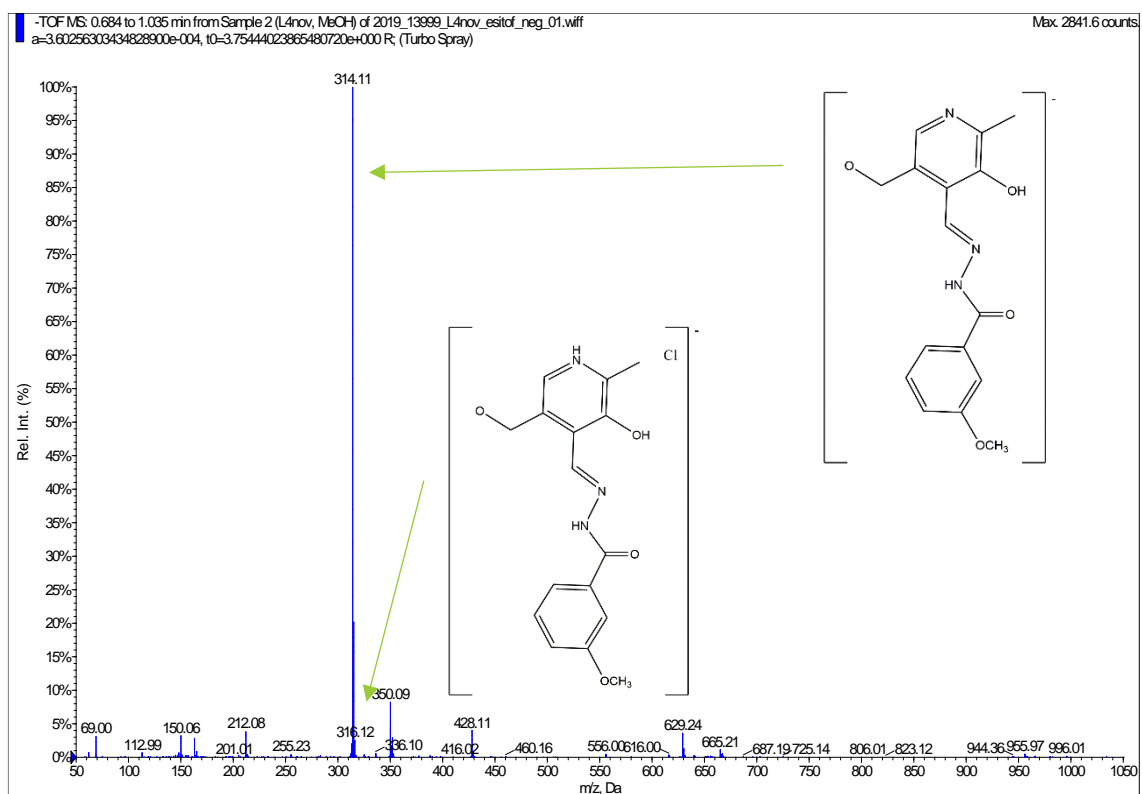




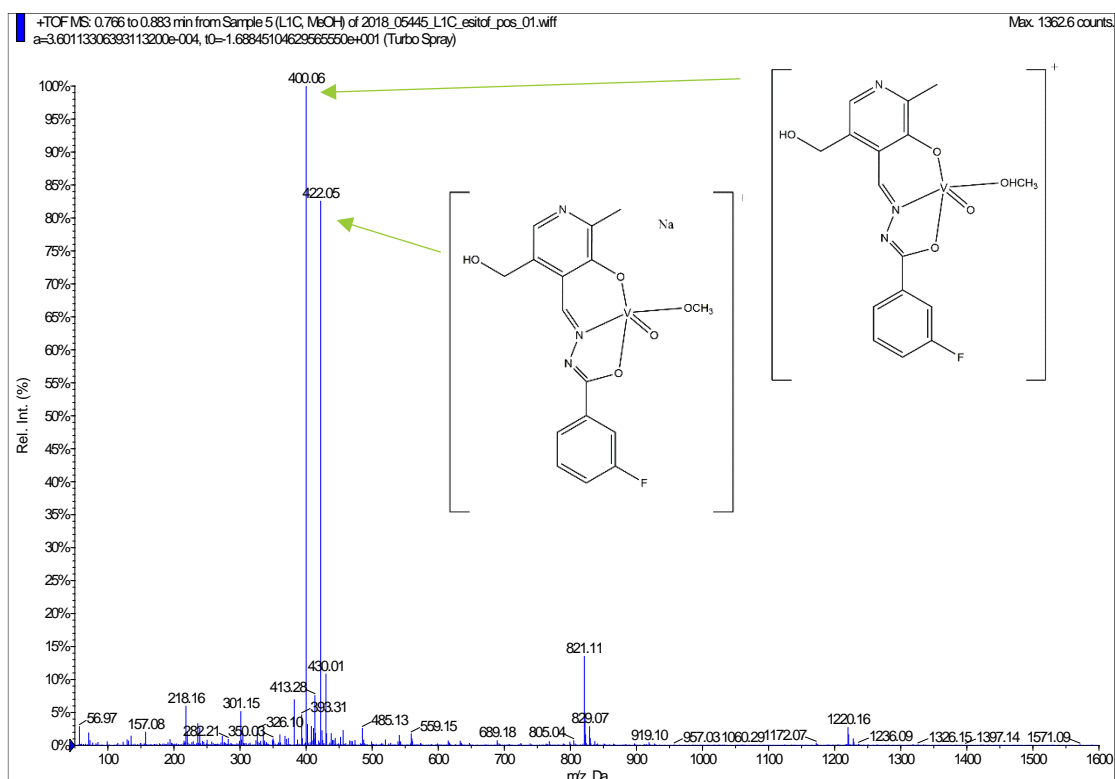
**Figura 61.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligando  $L^3$  y las estructuras correspondientes a los aniones,  $[L^3-H]^-$   $m/z = 318,07$  uma,  $[L^3Cl]^-$   $m/z = 354,04$  y para la especie  $[(L^3)_2Cl]^-$   $m/z = 677,11$  uma.



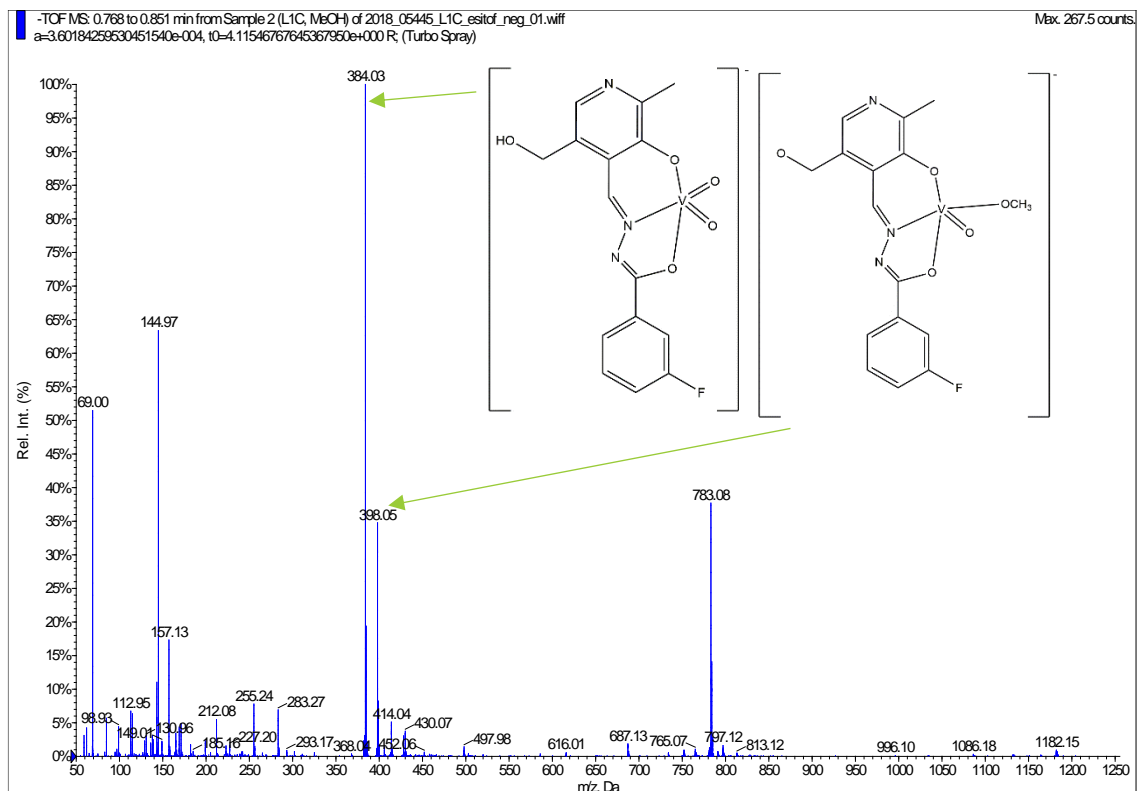
**Figura 62.-** Espectro de masas de iones positivos para el ligando  $L^4$  y las estructuras correspondientes a los cationes,  $[L^4+H]^+$  m/z = 316,14 uma,  $[NaL^4]^+$  m/z = 338,11 uma y para la especie  $[K(L^4)_2]^+$  m/z = 669,20 uma.



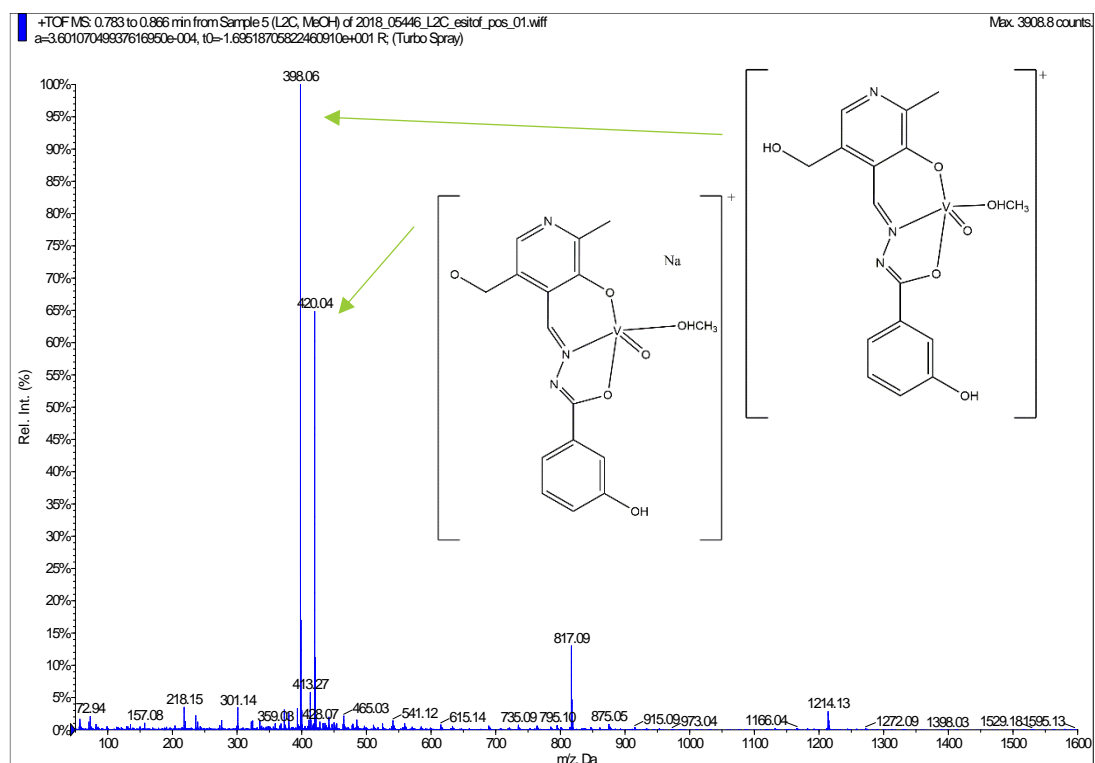
**Figura 63.-** Espectro de masas de iones negativos para el ligandos  $L^4$  las estructuras correspondientes a los aniones,  $[L^4-H]^-$   $m/z = 314,11$  uma,  $[L^4Cl]^-$   $m/z = 350,09$  uma y para la especie  $[(L^4)_2Cl]^-$   $m/z = 665,21$  uma.



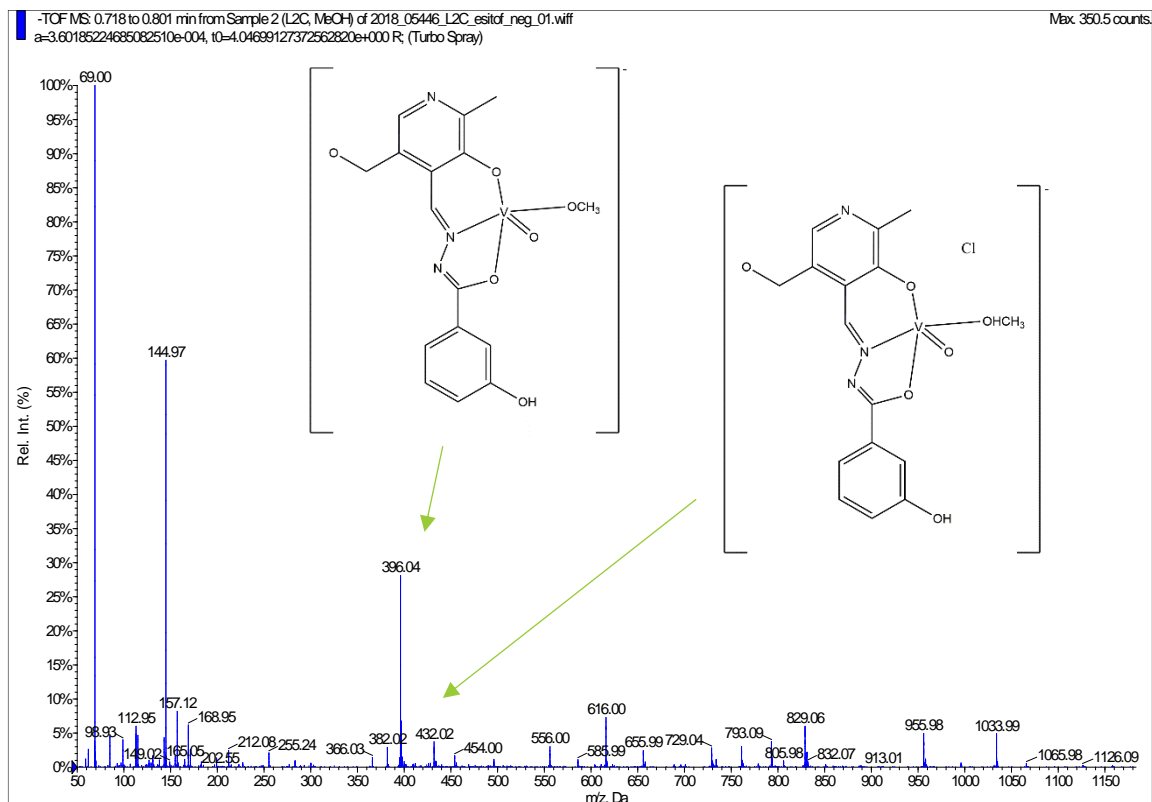
**Figura 64.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo L<sup>1c</sup> y estructura correspondiente a los cationes, [VOL<sup>1</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sup>+</sup> es m/z = 400,06 uma, la especie {Na[VOL<sup>1</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sup>+</sup> es m/z = 422,02 uma y para la especie {Na[(VOL<sup>1</sup>(CH<sub>3</sub>OH)<sub>2</sub>]}<sup>+</sup> es m/z = 821,08 uma.



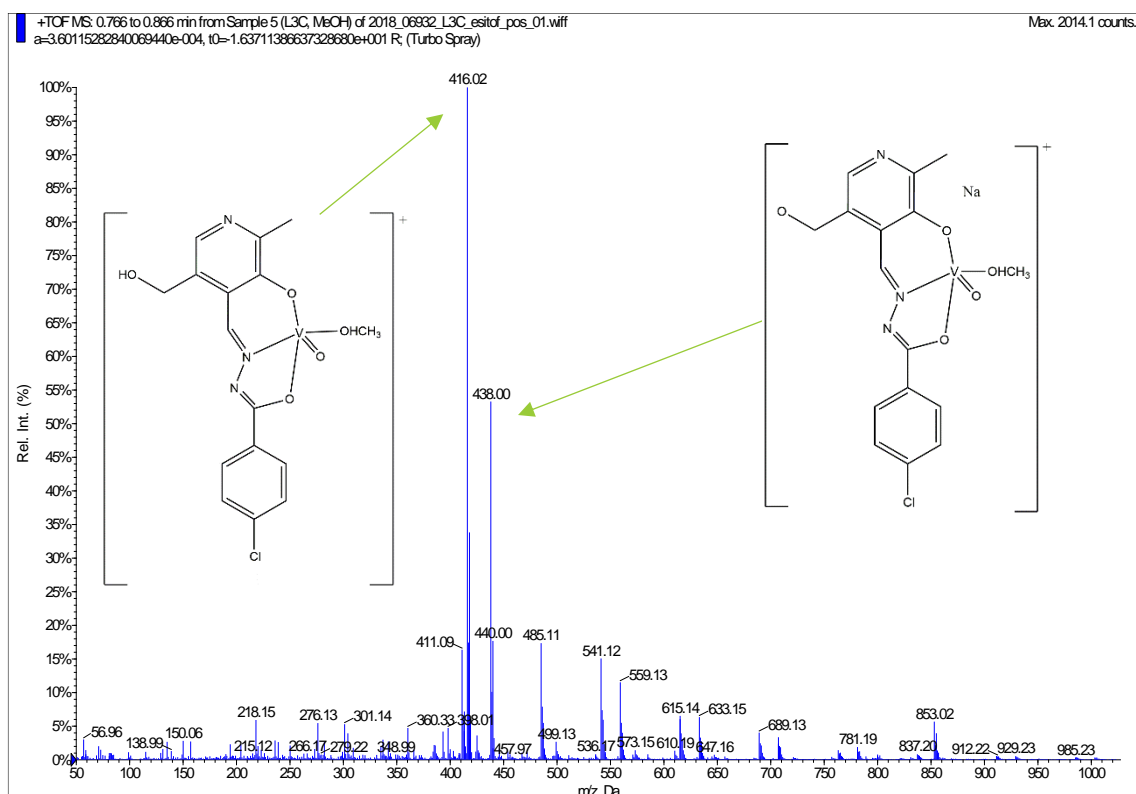
**Figura 65.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo L<sup>1c</sup> y estructura correspondiente a los aniones, [VO<sub>2</sub>L<sup>1</sup>]<sup>-</sup> es m/z = 384,03 uma, [VOL<sup>1</sup>(CH<sub>3</sub>O)]<sup>-</sup> es m/z = 398,06 uma y para la especie {[VOL<sup>1</sup>(OCH<sub>3</sub>)] [VO<sub>2</sub>L<sup>1</sup>]}<sup>-</sup> es m/z = 783,06 uma.



**Figura 66.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo L<sup>2c</sup> y estructuras correspondiente a los cationes [VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sup>+</sup> m/z = 398,06 uma, {Na[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]}<sup>+</sup> m/z = 420,04 uma y la especie {Na[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>}<sup>+</sup> m/z = 817,09 uma.

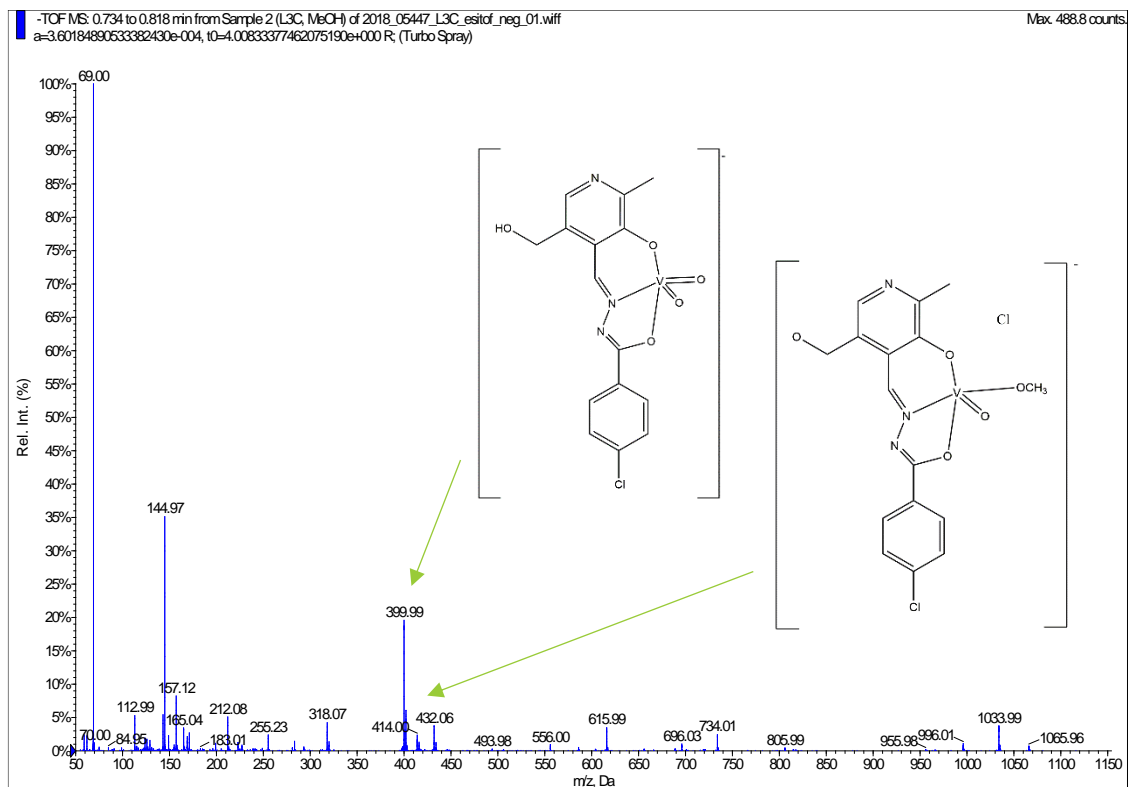


**Figura 67.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo L<sup>2c</sup> y las estructuras correspondientes a los aniones, [VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>O)]<sup>-</sup> m/z = 396,04 uma, {[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]Cl}<sup>-</sup> m/z = 432,02 uma y para la especie {[VOL<sup>2</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>Cl}<sup>-</sup> m/z = 829,06 uma.

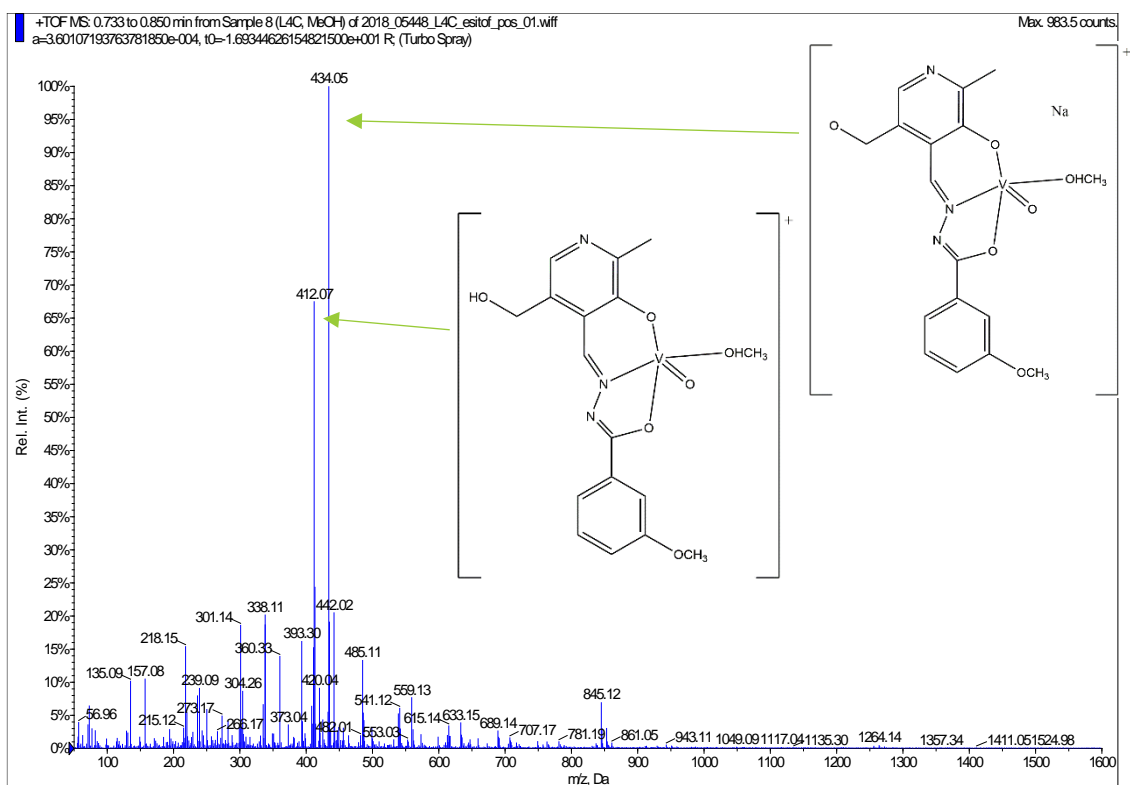


**Figura 68.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo L<sup>3</sup>c y las estructuras correspondientes a los cationes, [VOL<sup>3</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sup>+</sup> m/z = 416,02 uma, {Na[VOL<sup>3</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]}<sup>+</sup> m/z = 438,00 y para la especie {Na[VOL<sup>3</sup>(CH<sub>3</sub>OH)]<sub>2</sub>}<sup>+</sup> es m/z = 853,02 uma.

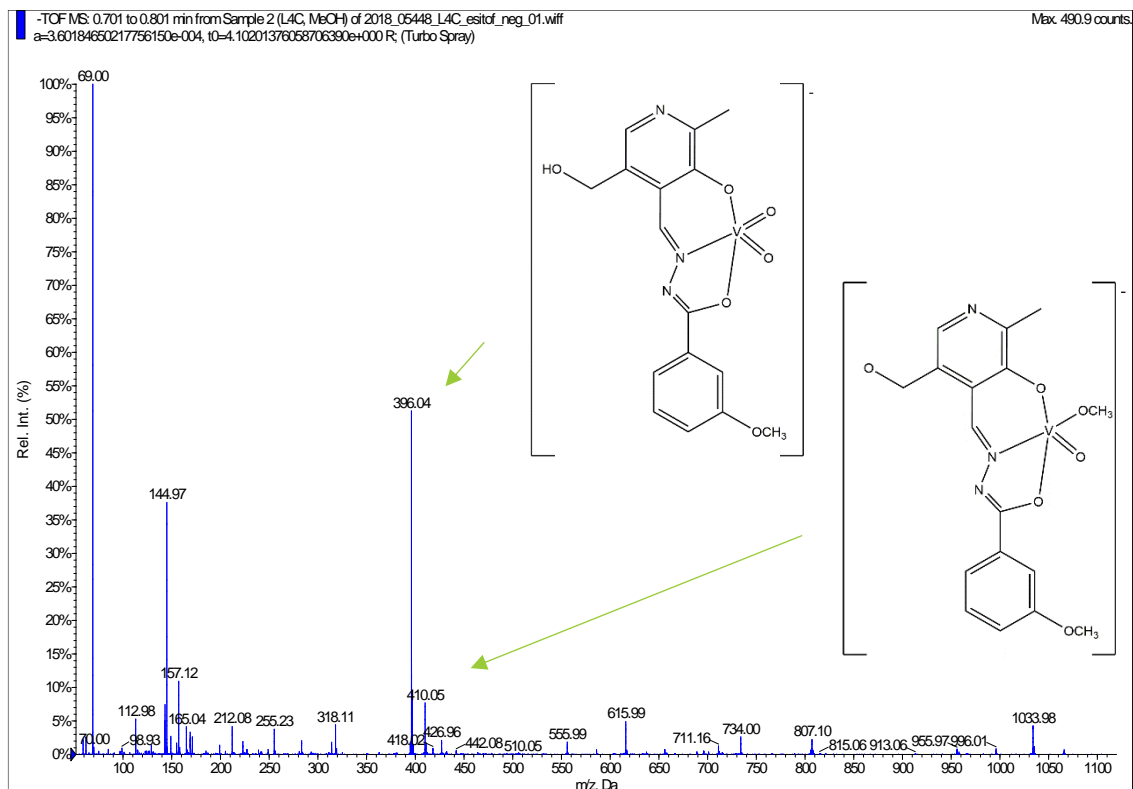




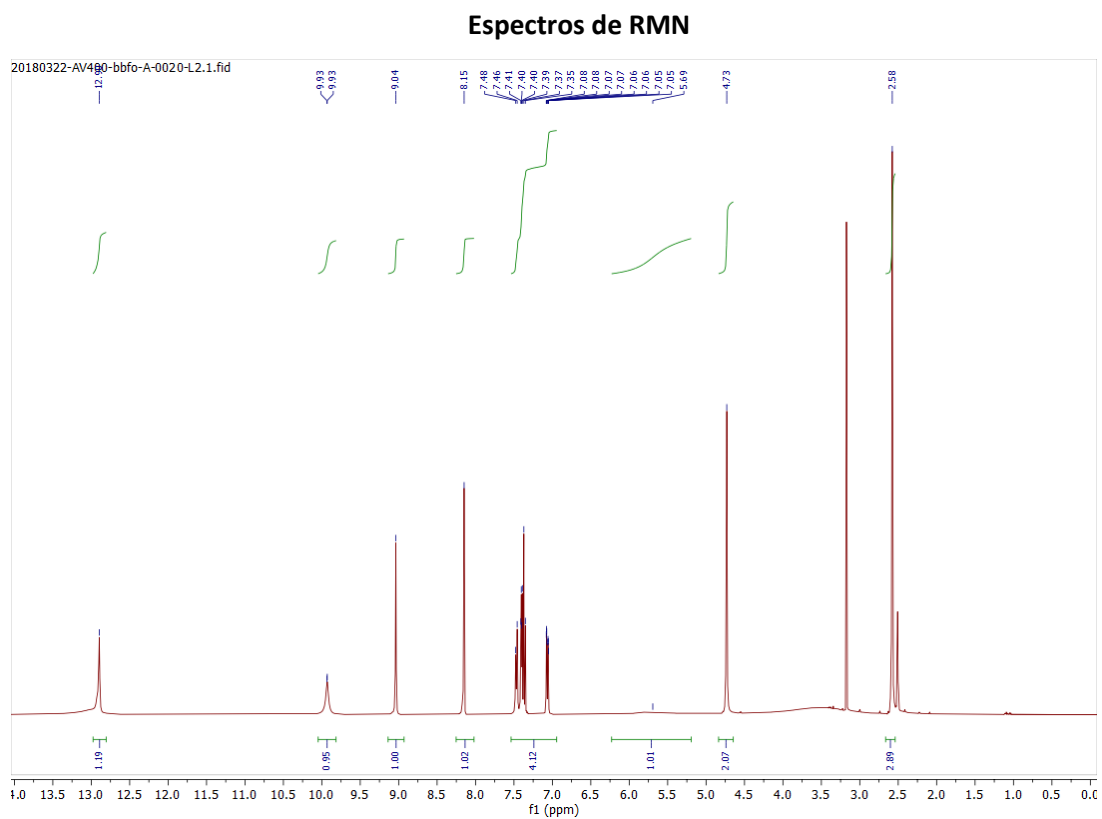
**Figura 69.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo  $L^3c$  y las estructuras correspondientes a los aniones,  $[VO_2L^3]^-$   $m/z=399,99$  uma y para la especie  $\{[VOL^3(CH_3O)]Cl\}^-$   $m/z=414,01$  uma.



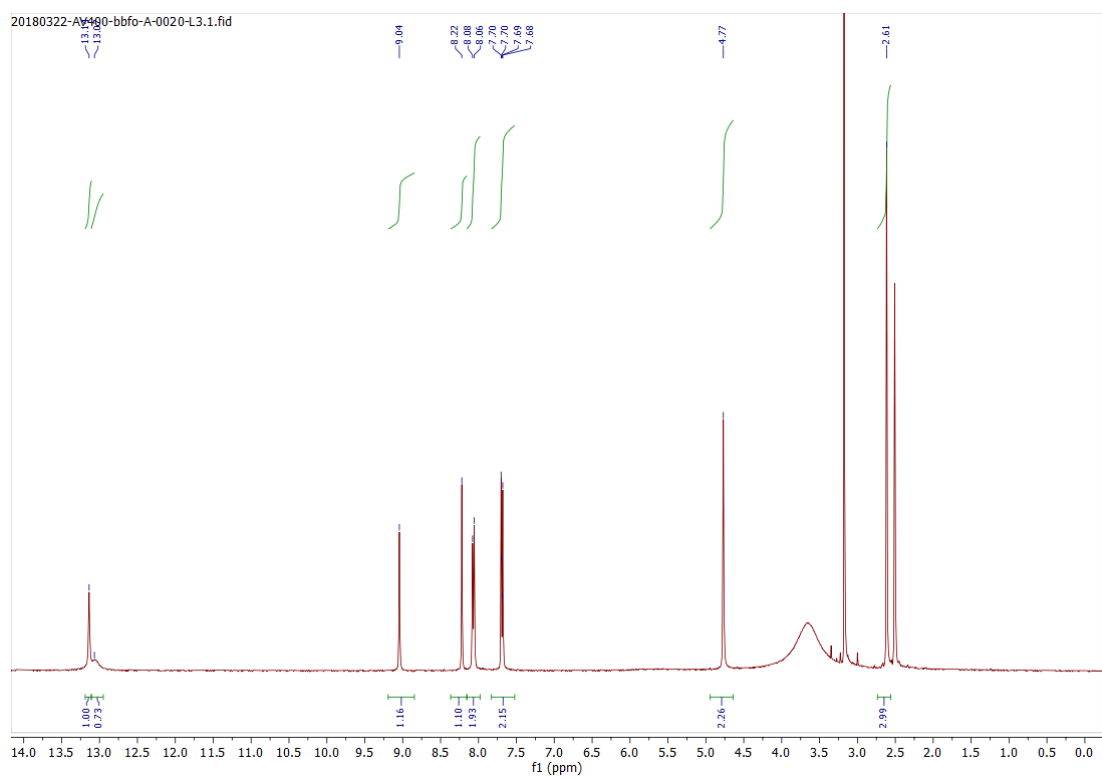
**Figura 70.-** Espectro de masas de iones positivos para el complejo L<sup>4</sup>c y estructuras correspondientes a los cationes,  $[\text{VOL}^4(\text{CH}_3\text{OH})]^+$   $m/z=412,07$  uma,  $\{\text{Na}[\text{VOL}^4(\text{CH}_3\text{OH})]\}^+$   $m/z=420,04$  uma y para la especie  $\{\text{Na}[\text{VOL}^4(\text{CH}_3\text{OH})]_2\}^+$   $m/z=845,12$  uma.



**Figura 71.-** Espectro de masas de iones negativos para el complejo L<sup>4c</sup> y estructura correspondiente al anión, para la especie [VO<sub>2</sub>L<sup>4</sup>]<sup>-</sup> m/z=396,04 uma, para la especie y para [VOL<sup>4</sup>(CH<sub>3</sub>O)]<sup>-</sup> m/z= 410,05 uma.



**Figura 72.-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto  $\text{L}^2$ .



**Figura 73.-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto  $\text{L}^3$ .

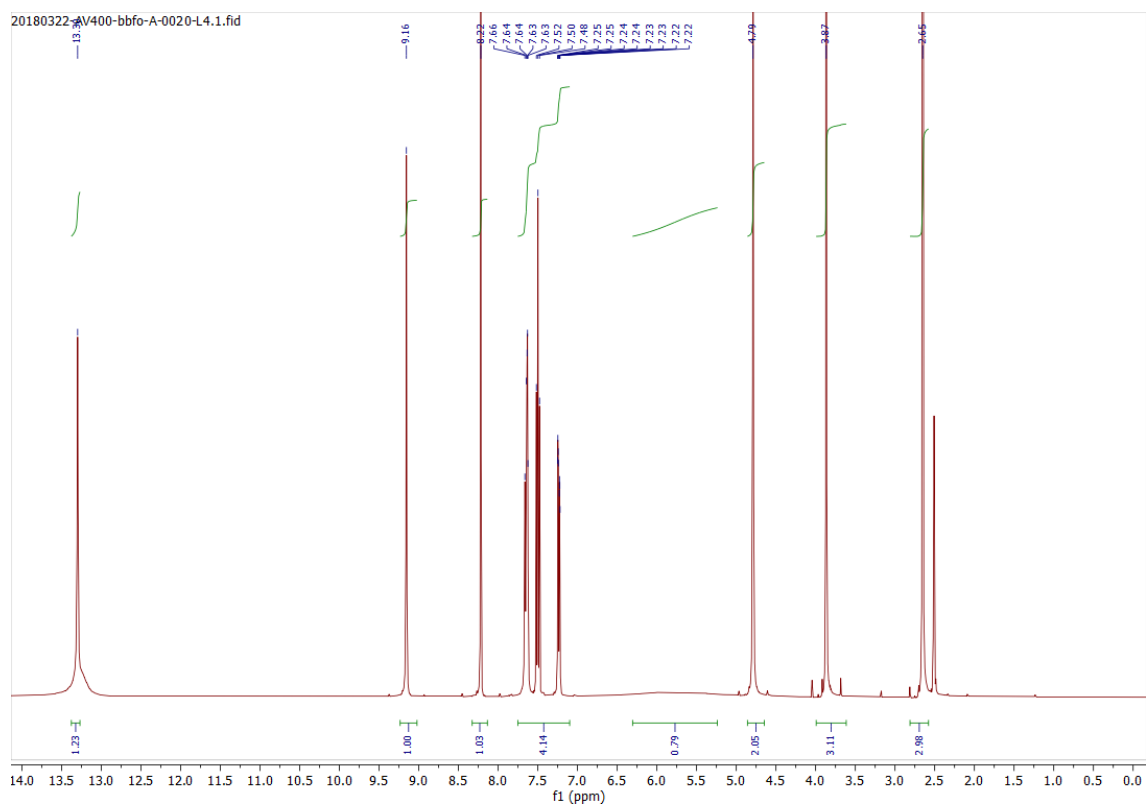


Figura 74.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto  $\text{L}^4$

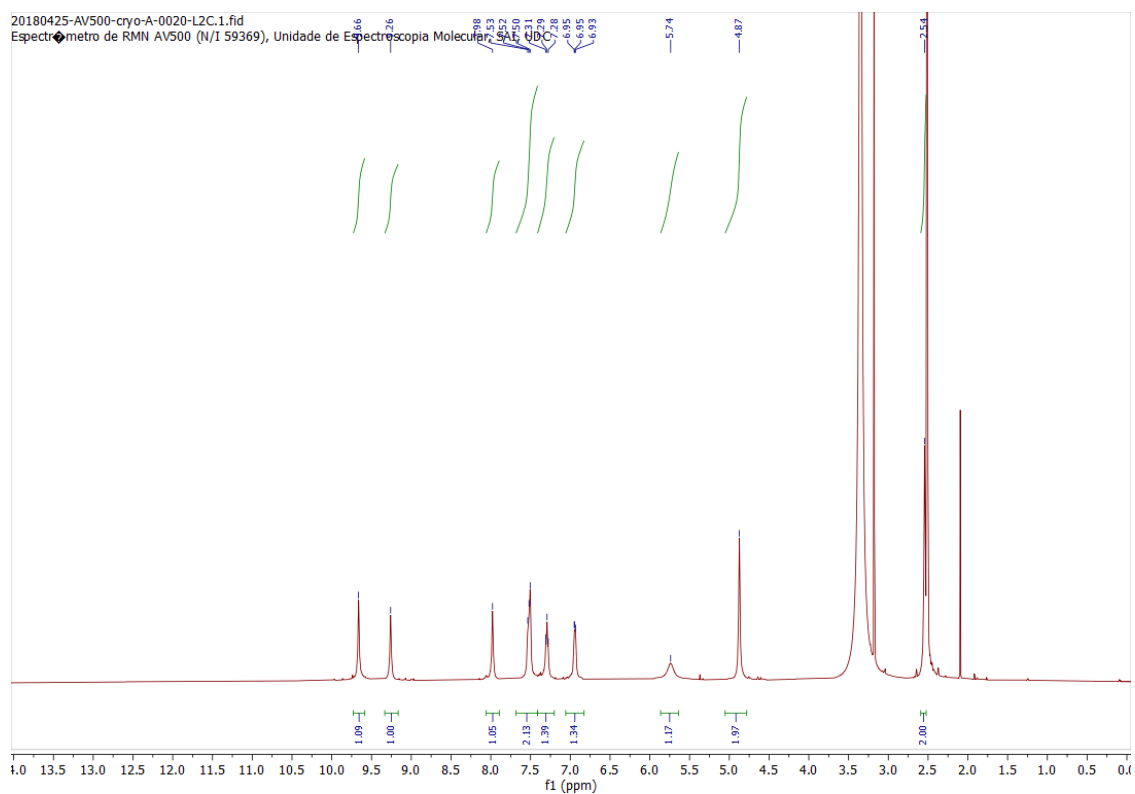


Figura 75.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el complejo  $\text{L}^2\text{c}$ .

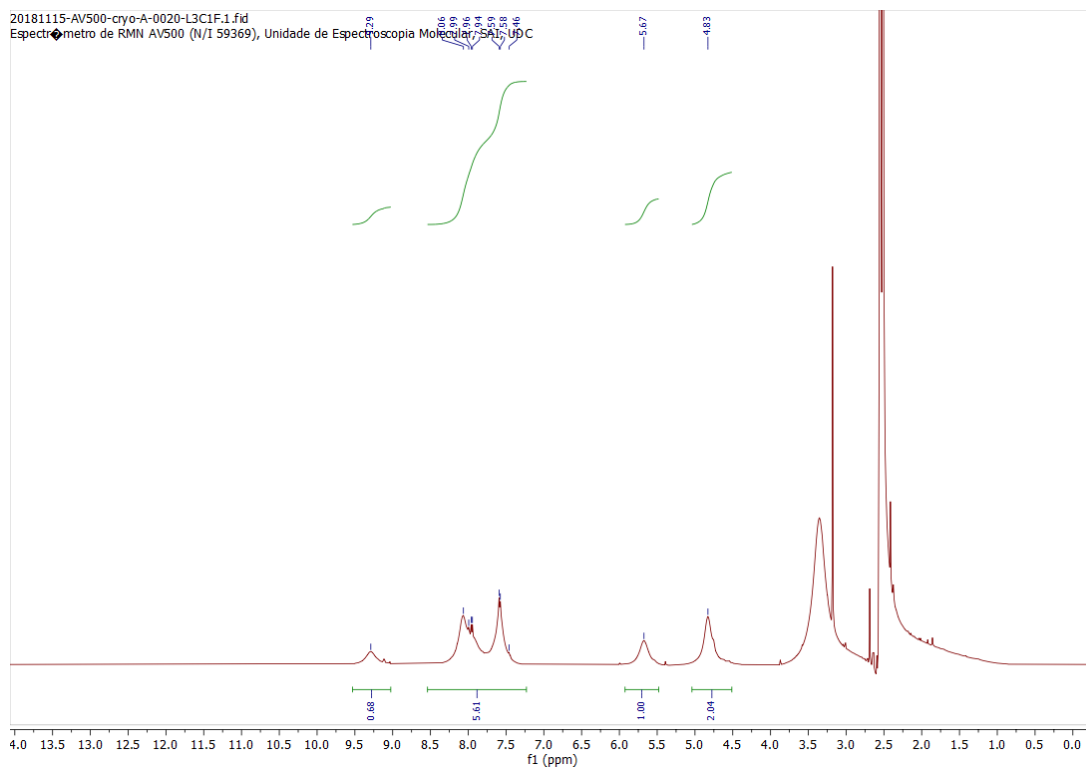


Figura 76.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H del complejo L<sup>3</sup>c.

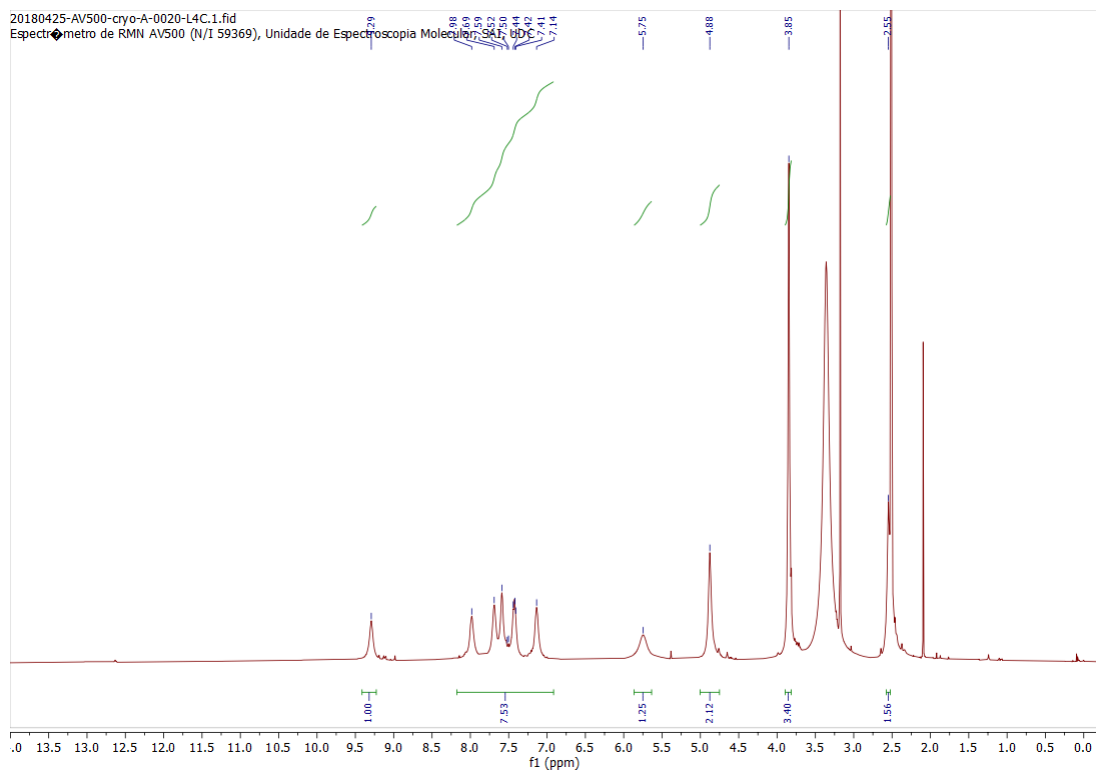
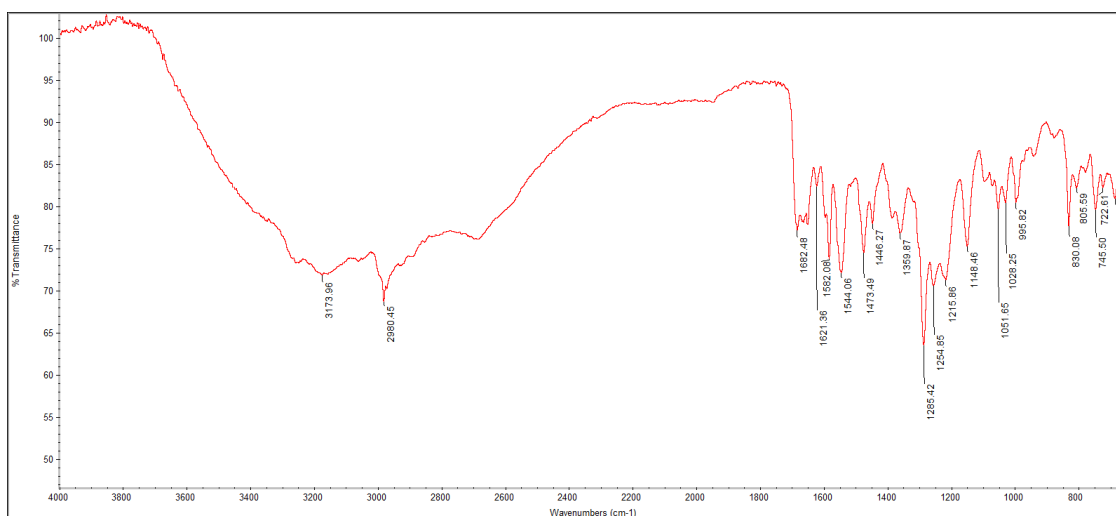
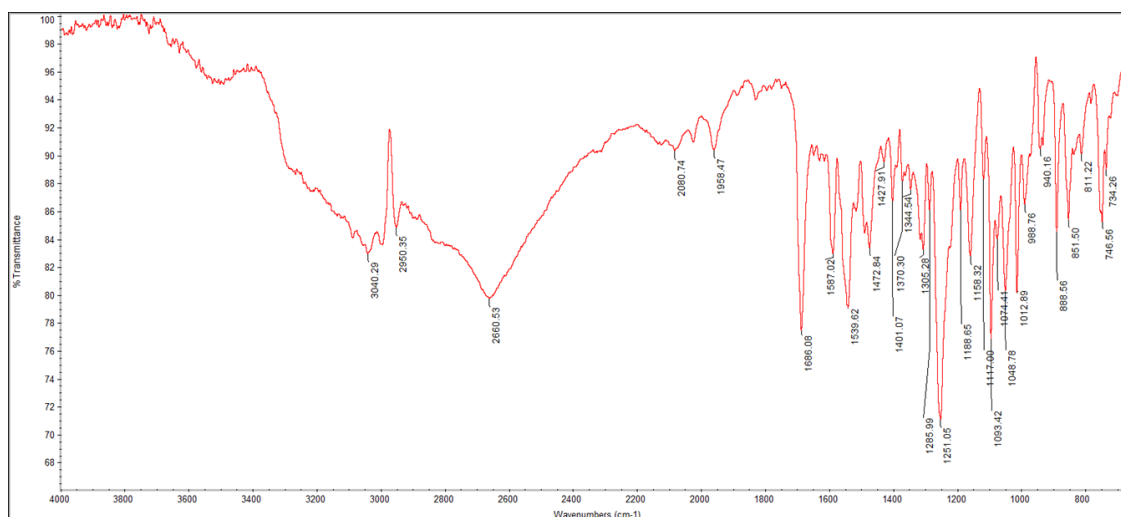


Figura 77.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H del complejo L<sup>4</sup>c.

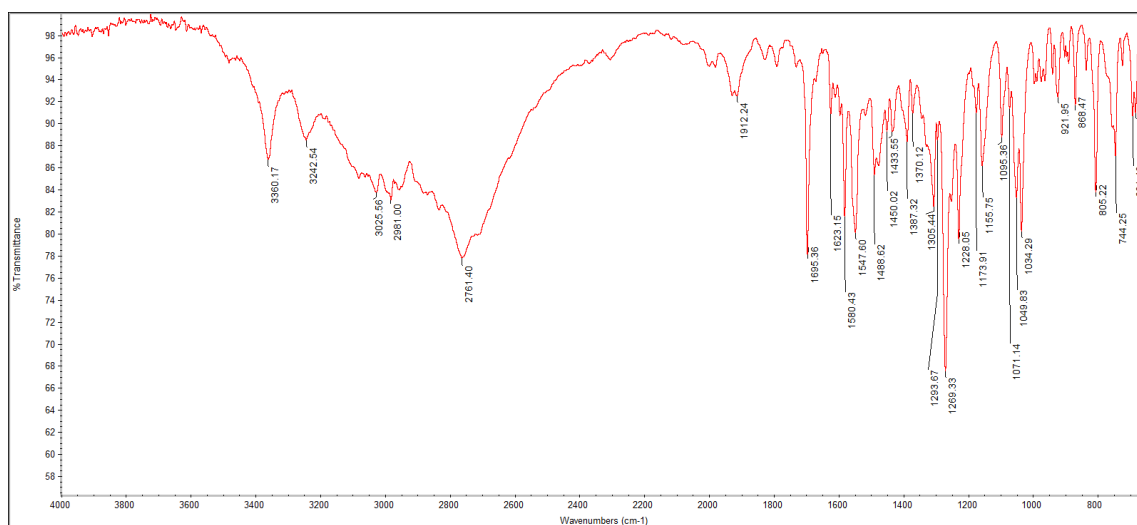
### Espectros de IR



**Figura 78.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>2</sup>: ν(NH) a 3173 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1682 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) entre 1446-1621 cm<sup>-1</sup> y ν(C=N) a 1544 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 79.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>3</sup>: ν(NH) a 3040 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O) a 1686 cm<sup>-1</sup>, ν(C=C) entre 1401-1587 cm<sup>-1</sup> y ν(C=N) a 1539 cm<sup>-1</sup>.

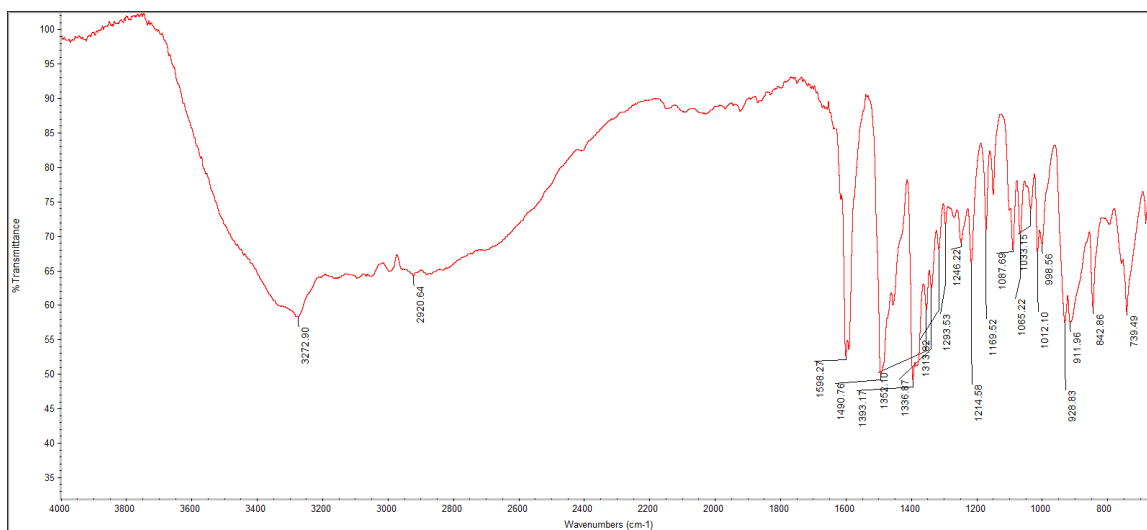


**Figura 80.-** Espectro de infrarrojo para el ligando L<sup>4</sup>:  $\nu(\text{NH})$  a  $3360\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1695\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a  $1547\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{C}=\text{C})$  entre  $1433\text{--}1623\text{ cm}^{-1}$ .

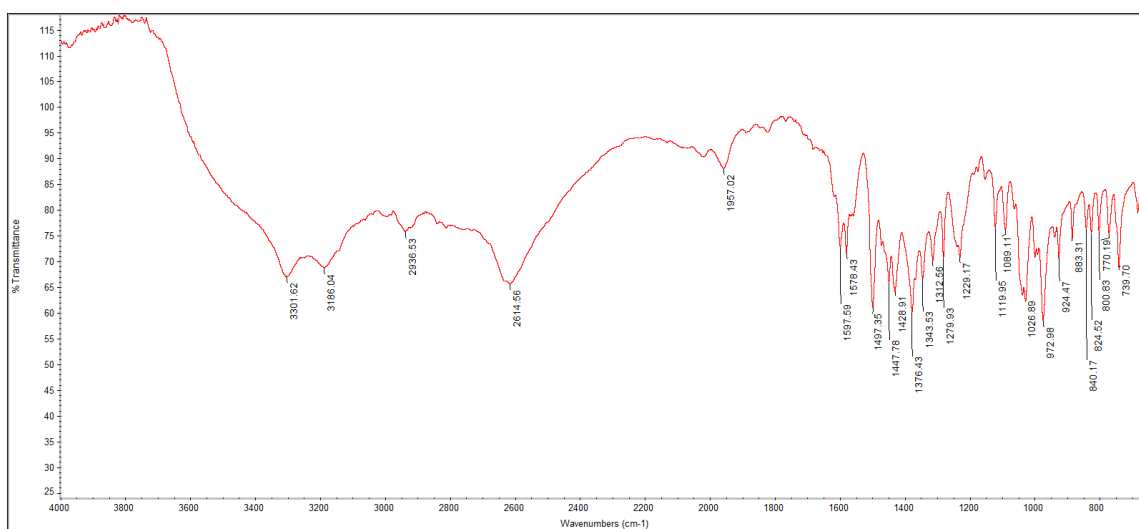


**Figura 81.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>2c</sup>:  $\nu(\text{NH})$  a  $3564\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a  $1595\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  entre  $1391\text{--}1581\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{coord}}$  a  $1359\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{V}=\text{O})$  a  $933\text{ cm}^{-1}$ .



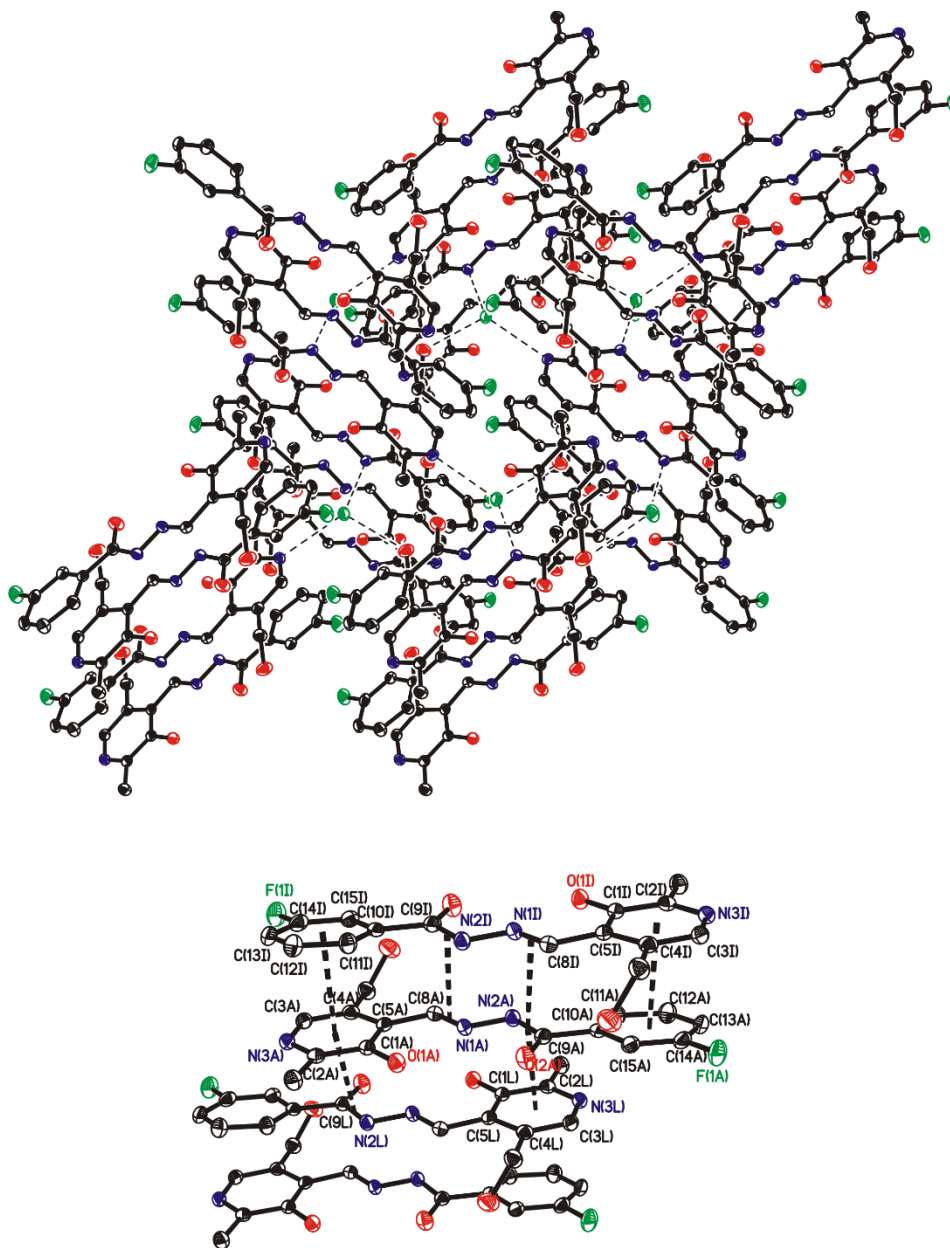


**Figura 82.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>3</sup>c:  $\nu(\text{NH})$  a 3272  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a 1598  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  a 1336-1490  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{coord}}$  a 1214  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{sym}}(\text{V}=\text{O})$  a 912  $\text{cm}^{-1}$  y  $\nu_{\text{asym}}(\text{V}=\text{O})$  a 929  $\text{cm}^{-1}$ .

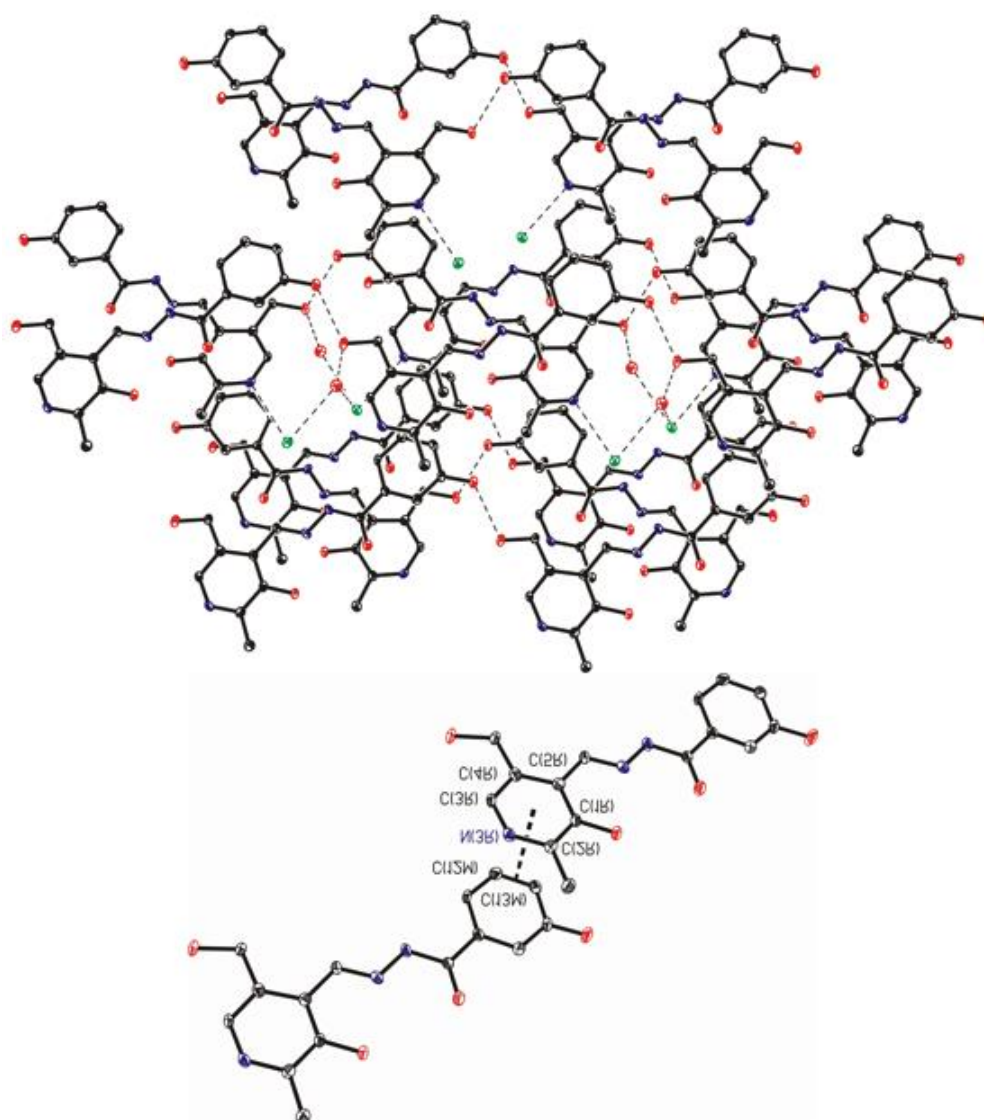


**Figura 83.-** Espectro de infrarrojo para el complejo L<sup>4</sup>c:  $\nu(\text{NH})$  a 3301  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a 1957  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  a 1597  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  entre 1343-1578  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{coord}}$  a 1229  $\text{cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{V}=\text{O})$  a 925  $\text{cm}^{-1}$ .

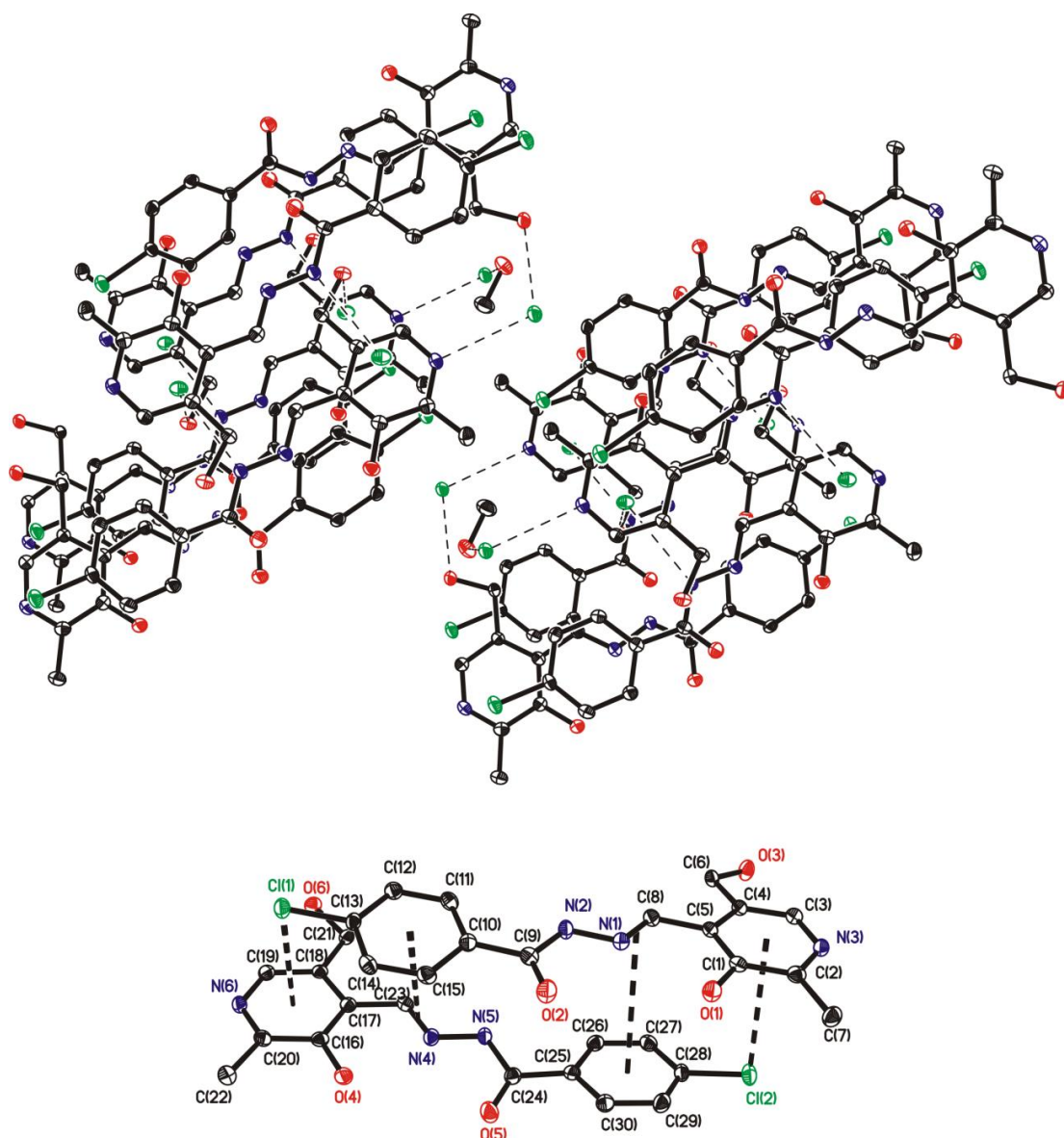
## Empaquetamientos cristalinos de las estructuras de monocristal



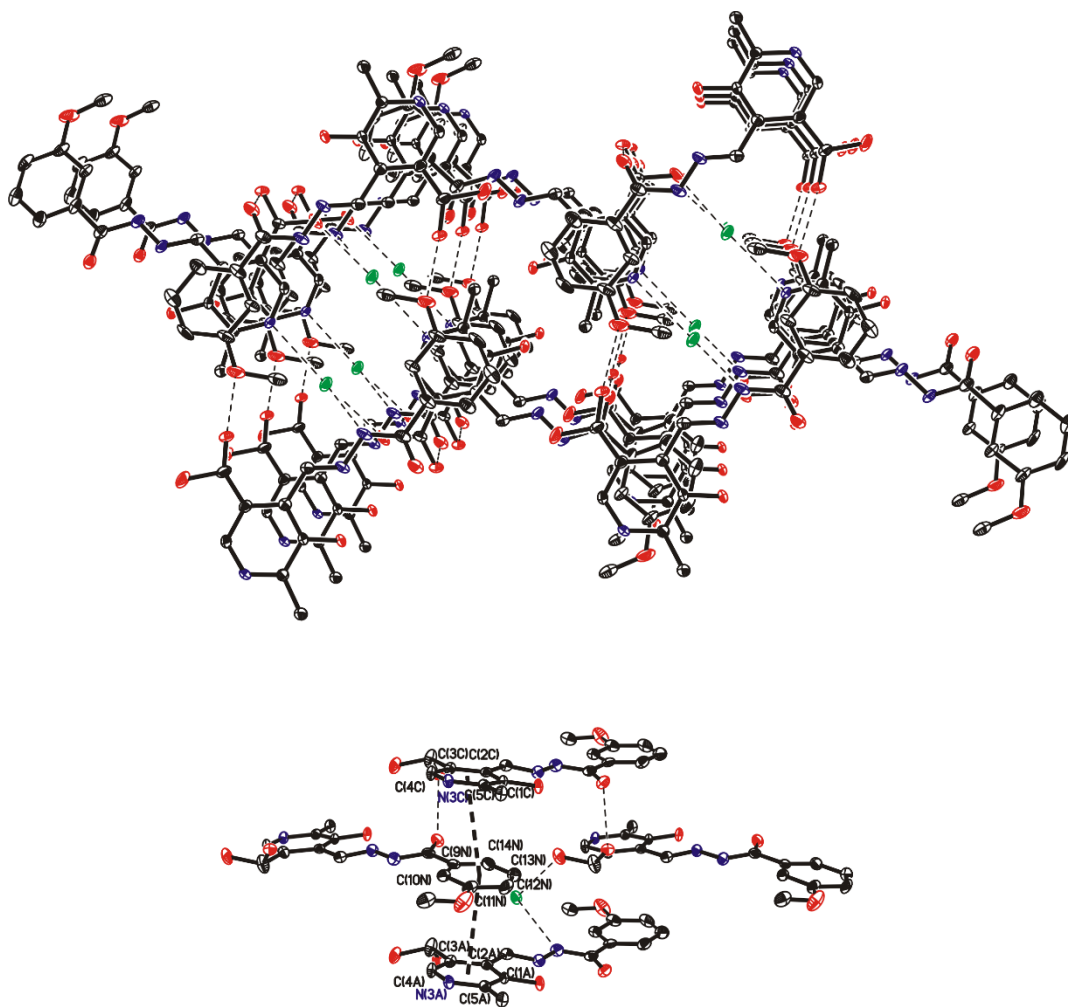
**Figura 84.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto  $L^1$  (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  se muestran en la figura de abajo. Las moléculas del compuesto interactúan en posición antiparalela, formando una estructura en capas en forma de reja. Las distancias entre centroides de las nubes  $\pi$  de los anillos y entre éstas y los dobles enlaces C=N son: 3,596 Å, 3,612 Å, 3,612 Å y 3,596 Å; y 3,713 Å en las dos interacciones dibujadas abajo.



**Figura 85.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto  $L^2$  (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  son más escasas en este compuesto y son mostradas abajo. Las moléculas interactúan preferentemente a través de enlaces de hidrógeno. Las distancias entre los centros que indican una interacción lateral es 3,386 Å.



**Figura 86.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>3</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las moléculas interactúan en posición antiparalela formando capas. La interacción de par de no enlace del átomo de cloro con la nube  $\pi$  del grupo piridoxal predomina en este compuesto frente a otro tipo de interacciones. Las distancias entre centroides son de izquierda a derecha: 3,287 Å, 3,379 Å, 3,717 Å and 3,572 Å.



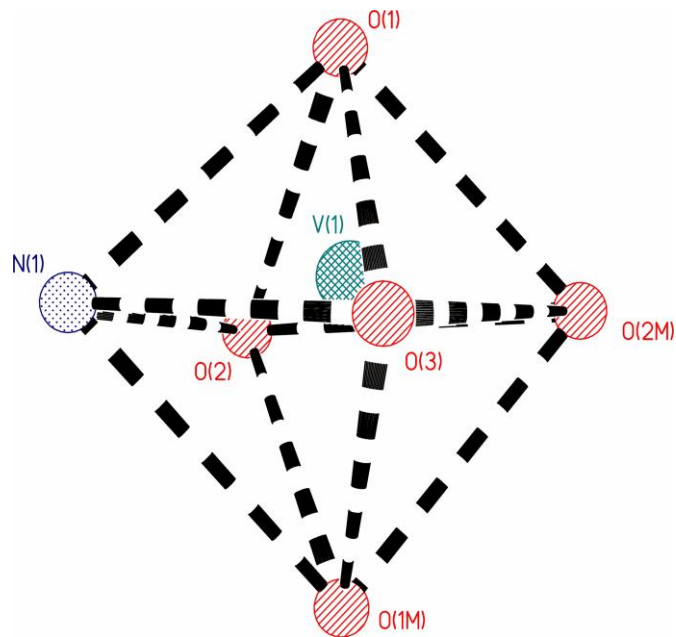
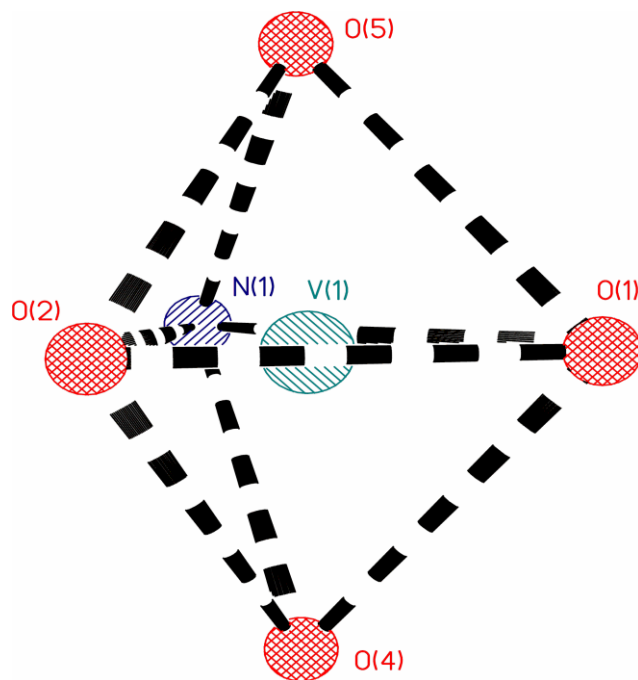
**Figura 87.-** ORTEP del empaquetamiento cristalino en el compuesto L<sup>4</sup> (arriba). Todos los átomos que no son hidrógenos están dibujados con elipsoides de un 50 % de probabilidad. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y los enlaces de hidrógeno se muestran abajo. Las moléculas interactúan a través de las nubes  $\pi$  de los anillos de piridoxal, los cuales se alternan de un lado a otro. Las interacciones por enlace de hidrógeno se producen entre los iones de cloro, los átomos de oxígeno desordenados y los átomos de nitrógeno de los grupos hidrazona. Las distancias entre los centroides dibujados son: 3,768 Å (arriba) y 3,727 Å (abajo).







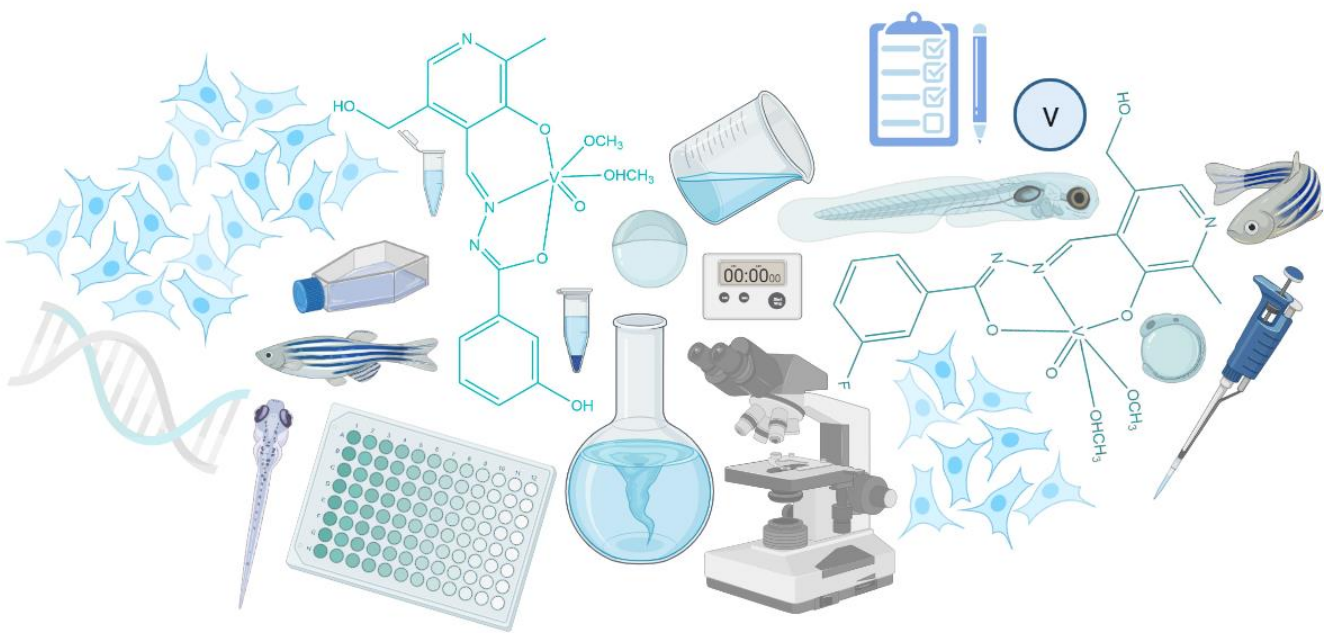
## Polihedros de coordinación

Figura 90.- Polihedro de coordinación en el complejo  $L^2c$ .Figura 91.- Polihedro de coordinación en el complejo  $L^3c$ .



# BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. Bibliografía

- Abdel-Rahman, L. H., Abdelhamid, A. A., Abu-Dief, A. M., Shehata, M. R., y Bakheet, M. A. (2020). Facile synthesis, X-Ray structure of new multi-substituted aryl imidazole ligand, biological screening and DNA binding of its Cr(III), Fe(III) and Cu(II) coordination compounds as potential antibiotic and anticancer drugs. *Journal of Molecular Structure*, 1200, 127034.
- Abreu Velez, A. M., y Howard, M. S. (2015). Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. *North American Journal of Medical Sciences*, 7(5), 176–188.
- Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. y Santa-Olalla Tapia, J. (2013). *Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos*. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 29- 82). Omnia Science Monographs.
- Adachi, Y., Yoshida, J., Kodera, Y., Katoh, A., Takada, J., y Sakurai, H. (2006). Bis(allixinato)oxovanadium(IV) complex is a potent antidiabetic agent: Studies on structure-activity relationship for a series of hydroxypyrrone- vanadium complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3251–3256.
- Al-Omair, M. A. (2019). Biochemical activities and electronic spectra of different cobalt phenanthroline complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1061–1069.
- Aladrén, M. J. (1993). Cisplatino: mecanismos de afectación renal. *Nefrología* (13)3, 183-193.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., y Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115–133.

- Alturiqi, A. S., Alaghaz, A. N. M. A., Ammar, R. A., y Zayed, M. E. (2018). Synthesis, Spectral Characterization, and Thermal and Cytotoxicity Studies of Cr(III), Ru(III), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Complexes of Schiff Base Derived from 5-Hydroxymethylfuran-2-carbaldehyde. *Journal of Chemistry*, 2018, 5816906.
- American Cancer Society. (2006). Terapia hormonal. *Revista Da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, 8(2), 30. cancer.org 1.800.227.2345
- American Cancer Society . (2020). Cómo se utilizan los trasplantes de células madre y médula ósea para tratar el cáncer. 1–50. cancer.org 1.800.227.2345
- Azizian, H., Mousavi, Z., Faraji, H., Tajik, M., Bagherzadeh, K., Bayat, P., Shafiee, A., y Almasirad, A. (2016). Arylhydrazone derivatives of naproxen as new analgesic and anti-inflammatory agents: Design, synthesis and molecular docking studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 67, 127–136.
- Bakhtiar, R., y Ochiai, E. I. (1999). Pharmacological applications of inorganic complexes. *General Pharmacology: The Vascular System* 32(5), 525–540.
- Banaspati, A., Raza, M. K., y Goswami, T. K. (2020). Ni(II) curcumin complexes for cellular imaging and photo-triggered in vitro anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112632.
- Banerjee, A., Dash, S. P., Mohanty, M., Sahu, G., Sciortino, G., Garribba, E., Carvalho, M. F. N. N., Marques, F., Costa Pessoa, J., Kaminsky, W., Brzezinski, K., y Dinda, R. (2020). New  $V^{IV}$ ,  $V^{IV}O$ ,  $V^V O$ , and  $V^V O_2$  Systems: Exploring their Interconversion in Solution, Protein Interactions, and Cytotoxicity . *Inorganic Chemistry* 59(19), 14042-14057.
- Baran, E. J. (2014). Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina. *Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 66, 5–21.

- Basnet, R. M., Guarienti, M., y Memo, M. (2017). Zebrafish embryo as an *in vivo* model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3), 156.
- Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M. E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., y Emmen, H. (2015). From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, *56*, 64–76.
- Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., y Baltas, M. (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(7), 3019–3026.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., y Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, *11*, 127–152.
- Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., y Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* *4*, 14-19
- Bhaskar, R., Salunkhe, N., Yaul, A., y Aswar, A. (2015). Bivalent transition metal complexes of ONO donor hydrazone ligand: Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* *151*, 621–627.
- Binder, V., y Zon, L. I. (2013). High throughput *in vivo* phenotyping: The zebrafish as tool for drug discovery for hematopoietic stem cells and cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *10*(1), e17–e22.
- Bishayee, A., Waghray, A., Patel, M. A., y Chatterjee, M. (2010). Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The *in vivo* evidence. *Cancer Letters*, *294*(1), 1–12.

- Bittencourt, T. Q. M., Santos, A. R., Silva, M. C. G., Silva, J. F., Silva, N. P. C., Silva, W. E., Cadena, P. G., y Amorim, M. J. A. A. L. (2018). Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(6), 1877–1886.
- Bootorabi, F., Manouchehri, H., Changizi, R., Barker, H., Palazzo, E., Saltari, A., Parikka, M., Pincelli, C., y Aspatwar, A. (2017). Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–15.
- Brugman, S., Liu, K. Y., Lindenbergh-Kortleve, D., Samsom, J. N., Furuta, G. T., Renshaw, S. A., Willemsen, R., y Nieuwenhuis, E. E. S. (2009). Oxazolone-Induced Enterocolitis in Zebrafish Depends on the Composition of the Intestinal Microbiota. *Gastroenterology*, 137(5), 1757-1767.
- Bueloni, B., Sanna, D., Garribba, E., Castro, G. R., León, I. E., y Islan, G. A. (2020). Design of naldixic acid-vanadium complex loaded into chitosan hybrid nanoparticles as smart strategy to inhibit bacterial growth and quorum sensing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1568–1580.
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., y Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95–118.
- Cech, N. B., y Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362–387.
- Chen, J. C., Li, G. D., Peng, F., Jie, X. M., Dongye, G. Z., Zhong, Y., Feng, R. B., Li, B. J., Qu, J. Y., Ding, Y., y Chen, L. M. (2016). Investigation of inducing apoptosis in human lung cancer A549 cells and related mechanism of a ruthenium(II) polypyridyl complex. *Inorganic Chemistry Communications*, 69, 35–39.

- Chen, Y. H., Lin, Y. T., y Lee, G. H. (2009). Novel and unexpected functions of zebrafish CCAAT box binding transcription factor (NF-Y) B subunit during cartilages development. *Bone*, *44*(5), 777–784.
- Chowdhury, J., Mandal, T. K., y Mondal, S. (2020). Genotoxic impact of emerging contaminant amoxicillin residue on zebra fish (*Danio rerio*) embryos. *Heliyon*, *6*(11), e05379.
- Coa, J. C., Castrillón, W., Cardona, W., Carda, M., Ospina, V., Muñoz, J. A., Vélez, I. D., y Robledo, S. M. (2015). Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *101*, 746–753.
- Collins, K., Jacks, T., y Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(7), 2776–2778.
- Contreras-Cadena, D. A., Gómez-Pech, C., Rangel-García, M., Ruiz-Hernández, A., Martínez-Bullit, P., y Barba-Behrens, N. (2014). La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*, *25*(E1), 245–253.
- Costa, J., Etcheverry, S., y Gambino, D. (2015). Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, *301*, 24–48.
- Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., y Yang, L. (2004). The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chemical Reviews*, *104*(2), 849–902.
- Cuevas, O. A., Ramírez, R. C., García, J. J. S., López-Sandoval, H., y Barba-Behrens, N. (2012). Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro. *Educación química*, *23*(1), 33-40.
- D’Cruz, O. J., y Uckun, F. M. (2005). Vaginal contraceptive activity of a chelated vanadocene. *Contraception*, *72*(2), 146–156.

- Dey, D., Al-Hunaiti, A., Gopal, V., Perumalsamy, B., Balakrishnan, G., Ramasamy, T., Dharumadurai, D., y Biswas, B. (2020). C–H functionalization of alkanes, bactericidal and antiproliferative studies of a gold(III)-phenanthroline complex. *Journal of Molecular Structure*, 1222, 128919.
- Dilruba, S., y Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103–1124.
- Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 22-10-2010, 47, 33-79.
- Du, F., Bai, L., He, M., Zhang, W. Y., Gu, Y. Y., Yin, H., y Liu, Y. J. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of iridium (III) complexes as potential antitumor agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 201, 110822.
- Dubińska-Magiera, M., Daczewska, M., Lewicka, A., Migocka-Patrzałek, M., Niedbalska-Tarnowska, J., y Jagl, K. (2016). Zebrafish: A model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1941.
- Ebrahimipour, S. Y., Sheikshoaie, I., Kautz, A. C., Ameri, M., Pasban-Aliabadi, H., Amiri Rudbari, H., Bruno, G., y Janiak, C. (2015). Mono- and dioxido-vanadium(V) complexes of a tridentate ONO Schiff base ligand: Synthesis, spectral characterization, X-ray crystal structure, and anticancer activity. *Polyhedron*, 93, 99–105.
- Elfawy, H. A., Anupriya, S., Mohanty, S., Patel, P., Ghosal, S., Panda, P. K., Das, B., Verma, S. K., y Patnaik, S. (2021). Molecular toxicity of Benzo(a)pyrene mediated by elicited oxidative stress infer skeletal deformities and apoptosis in embryonic zebrafish. *Science of the Total Environment*, 789, 147989.

- Fatahian-Nezhad, M., Alizadeh, R., Sadeghi Mohammadi, S., Tohidlou, M., Naderi-Manesh, H., y Amani, V. (2021). Synthesis, characterization, structural studies, DNA interaction, and cytotoxic studies of palladium(II) mixed-ligand complexes containing 2,2'-bipyridine, 5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline and tetrazole-5-thiol ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 514, 119953.
- Fekri, R., Salehi, M., Asadi, A., y Kubicki, M. (2019). Synthesis, characterization, anticancer and antibacterial evaluation of Schiff base ligands derived from hydrazone and their transition metal complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 484, 245–254.
- Fuertes Villadangos, M. A., y Pérez Martín, J. (2000). Química Bioinorgánica. Una ciencia interdisciplinaria en desarrollo. *Encuentros Multidisciplinares*, 2(5), 1-4.
- Gallardo, J., Sánchez, I., y Almonacid, C. (2004). Planta del Tabaco. Composición físico-química del humo del tabaco. Patología asociada a su consumo. Tabaquismo. *Monografía de Neumomadrid*, 7, 27–40.
- Gallegos-Hernandez, G. F. (2018). Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad. In *Vidsupra*, 10, 1.
- Gambino, D. (2011). Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19–20), 2193–2203.
- Garai, A., Pant, I., Kondaiah, P., y Chakravarty, A. R. (2015). Iron(III) salicylates of dipicolylamine bases showing photo-induced anticancer activity and cytosolic localization. *Polyhedron*, 102, 668–676.
- García, K. Y., Salazar, M., y García, J. E. (2018). Efecto del neonicotinoide-tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). *Rev. Toxicol*, 35, 22–27.



- Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5), 504–512.
- Goodno, C. C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6), 2620–2624.
- Guarra, F., Busto, N., Guerri, A., Marchetti, L., Marzo, T., García, B., Biver, T., y Gabbiani, C. (2020). Cytotoxic Ag(I) and Au(I) NHC-carbenes bind DNA and show TrxR inhibition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 205, 110998.
- Guevara García, J. A. (2018). Una semblanza de la Química bioinorgánica del vanadio. *Educación Química*, 7(4), 185.
- Gul, N. S., Khan, T.-M., Chen, M., Huang, K.-B., Hou, C., Choudhary, M. I., Liang, H., y Chen, Z.-F. (2019). New copper complexes inducing bimodal death through apoptosis and autophagy in A549 cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 213, 111260.
- Habala, L., Bartel, C., Giester, G., Jakupec, M. A., Keppler, B. K., y Rompel, A. (2015). Complexes of N-hydroxyethyl-N-benzimidazolylmethylethylenediaminediacetic acid with group 12 metals and vanadium - Synthesis, structure and bioactivity of the vanadium complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147, 147–152.
- Hallare, A. V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Köhler, H. R., y Triebkorn, R. (2005). Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, 347(1–3), 254–271.
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Hill, A. J., Bello, S. M., Prasch, A. L., Peterson, R. E., y Heideman, W. (2004). Water permeability and TCDD-induced edema in Zebrafish early-life stages. *Toxicological Sciences*, *78*(1), 78–87.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503.
- Hussain, A., AlAjmi, M. F., Rehman, M. T., Amir, S., Husain, F. M., Alsahme, A., Siddiqui, M. A., AlKhedhairi, A. A., y Khan, R. A. (2019). Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–17.
- Ibabe, A., Grabenbauer, M., Baumgart, E., Fahimi, D. H., y Cajaraville, M. P. (2002). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Histochemistry and Cell Biology*, *118*(3), 231–239.
- Icşel, C., Yılmaz, V. T., Aydinlik, Ş., y Aygun, M. (2020). New manganese(II), iron(II), cobalt(II), nickel(II) and copper(II) saccharinate complexes of 2,6-bis (2-benzimidazolyl) pyridine as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *202*, 112535.
- Inam, A., Siddiqui, S. M., Macedo, T. S., Moreira, D. R. M., Leite, A. C. L., Soares, M. B. P., y Azam, A. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of 3-[4-(7-chloro-quinolin-4-yl)-piperazin-1-yl]-propionic acid hydrazones as antiprotozoal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *75*, 67–76.
- INE. (2019). Defunciones según la Causa de Muerte 2018. Instituto Nacional de Estadística, CIE-10, 1–8. Notas de prensa, 9 de diciembre de 2019.

- INE. (2020). Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres. Sociedad Española de Oncología Médica, 1. 02/02/2021. <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=31304#ltabs-mapa>
- Infantes Esteban, S. (2016). Una de las mejores terapias contra el cáncer: la Inmunoterapia. *Revista de Derecho, Empresa y Sociedad*, 9(2), 93–106.
- Jakusch, T., Kozma, K., Enyedy, É. A., May, N. V., Roller, A., Kowol, C. R., Keppler, B. K., y Kiss, T. (2018). Complexes of pyridoxal thiosemicarbazones formed with vanadium(IV/V) and copper(II): Solution equilibrium and structure. *Inorganica Chimica Acta*, 472, 243–253.
- Jarque, S., Rubio-Brotons, M., Ibarra, J., Ordoñez, V., Dyballa, S., Miñana, R., y Terriente, J. (2020). Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. *Reproductive Toxicology*, 96, 337–348.
- Jiang, G. Bin, Zhang, W. Y., He, M., Gu, Y. Y., Bai, L., Wang, Y. J., Yi, Q. Y., y Du, F. (2020). New ruthenium polypyridyl complexes functionalized with fluorine atom or furan: Synthesis, DNA-binding, cytotoxicity and antitumor mechanism studies. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 227, 117534.
- Kajal, A., Bala, S., Sharma, N., Kamboj, S., y Saini, V. (2014). Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 1–11.
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman C., Pittman, J., Rosemberg, D., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S., Weng, W., Bally-Cuif, L., y Schneider, H. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86.

- Kanthecha, D. A., Bhatt, B. S., y Patel, M. N. (2019). Synthesis, characterization and biological activities of imidazo[1,2-a]pyridine based gold(III) metal complexes. *Heliyon*, 5(6), e01968.
- Kaplánek, R., Havlík, M., Dolenský, B., Rak, J., Džubák, P., Konečný, P., Hajdúch, M., Králová, J., y Král, V. (2015). Synthesis and biological activity evaluation of hydrazone derivatives based on a Tröger's base skeleton. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(7), 1651–1659.
- Khattab, R. R., Hassan, A. A., Kutkat, O. M., Abuzeid, K. M., y Hassan, N. A. (2019). Synthesis and Antiviral Activity of Novel Thieno[2,3-d]pyrimidine Hydrazones and Their C-Nucleosides. *Russian Journal of General Chemistry*, 89(8), 1707–1717.
- Kim, K., y Lee, S. (2021). Chemosphere Combined toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) and vanadium towards zebrafish embryos (*Danio rerio*): Unexpected synergistic effect by DMSO. *Chemosphere*, 270, 129405.
- Kim, K., Wang, C. H., Ok, Y. S., y Lee, S. E. (2019). Heart developmental toxicity by carbon black waste generated from oil refinery on zebrafish embryos (*Danio rerio*): Combined toxicity on heart function by nickel and vanadium. *Journal of Hazardous Materials*, 363, 127–137.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., y Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kioseoglou, E., Petanidis, S., Gabriel, C., y Salifoglou, A. (2015). The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302, 87–105.
- Kroemer, G., y Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472–482.

- Kumar, P., Shrivastava, B., Pandeya, S. N., Tripathi, L., y Stables, J. P. (2012). Design, synthesis, and anticonvulsant evaluation of some novel 1, 3 benzothiazol-2-yl hydrazones/acetohydrazones. *Medicinal Chemistry Research*, 21(9), 2428–2442.
- Lee, K. H., Hyun, M. S., Kim, H.-K., Jin, H. M., Yang, J., Song, H. S., Do, Y. R., Ryoo, H. M., Chung, J. S., Zang, D. Y., Lim, H.-Y., Jin, J. Y., Yim, C. Y., Park, H. S., Kim, J. S., Sohn, C. H., y Lee, S. N. (2009). Randomized, Multicenter, Phase III Trial of Heptaplatin 1-hour Infusion and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy Comparing with Cisplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cancer Research and Treatment*, 41(1), 12-18.
- Lee, S. K., Tan, K. W., y Ng, S. W. (2016). Topoisomerase i inhibition and DNA cleavage by zinc, copper, and nickel derivatives of 2-[2-bromoethyliminomethyl]-4-[ethoxymethyl]phenol complexes exhibiting anti-proliferation and anti-metastasis activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 159, 14–21.
- León, I. E., Di Virgilio, A. L., Barrio, D. A., Arrambide, G., Gambino, D., y Etcheverry, S. B. (2012). Hydroxylamido–amino acid complexes of oxovanadium (V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model. *Metallomics*, 4(12), 1287-1296.
- Leon, I. E., Di Virgilio, A. L., Porro, V., Muglia, C. I., Naso, L. G., Williams, P. A. M., Bollati-Fogolin, M., y Etcheverry, S. B. (2013). Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin [VO(chrysin)<sub>2</sub>EtOH]<sub>2</sub> in a human osteosarcoma model: The role of oxidative stress and apoptosis. *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions*, 42(33), 11868–11880.
- Losada, J.A ,Palmeros, B.S, Ramírez, M.B, y Fernández, M. S. (2012). Revista De Divulgación Científica Y Tecnológica De La Universidad Veracruzana. El Pez Cebra: Una Especie Modelo. *La Ciencia y El Hombre*, 25, 1.

- Loucks, E., y Ahlgren, S. (2012). Assessing teratogenic changes in a zebrafish model of fetal alcohol exposure. *Journal of Visualized Experiments*, (61), e3704.
- Lüköová, A., Drweesh, E. A., Volarevic, V., Miloradovic, D., Simovic Markovic, B., Smolková, R., Samořová, E., Kuchár, J., Vilková, M., y Potočňák, I. (2020). Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIII: Square planar anti-cancer Pd(II) complexes with halogenderivatives of 8-quinolinol and dimethylamine. *Polyhedron*, 184, 114535.
- Ma, W., Zhang, T., Li, R., Niu, Y., Yang, X., Liu, J., Xu, Y., y Li, C. M. (2020). Bienzymatic synergism of vanadium oxide nanodots to efficiently eradicate drug-resistant bacteria during wound healing in vivo. *Journal of Colloid and Interface Science*, 559, 313–323.
- Maenetje, P. W., De Villiers, N., y Dutton, M. F. (2008). The use of isolated human lymphocytes in mycotoxin cytotoxicity testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), 1515–1526.
- Mahajan, A., Kremer, L., Louw, S., Guéradel, Y., Chibale, K., y Biot, C. (2011). Synthesis and in vitro antitubercular activity of ferrocene-based hydrazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(10), 2866–2868.
- Mal, S. K., Chattopadhyay, T., Fathima, A., Purohit, C. S., Kiran, M. S., Nair, B. U., y Ghosh, R. (2017). Synthesis and structural characterization of a vanadium(V)-pyridylbenzimidazole complex: DNA binding and anticancer activity. *Polyhedron*, 126, 23–27.
- Marques, I. J., Weiss, F. U., Vlecken, D. H., Nitsche, C., Bakkers, J., Lagendijk, A. K., Partecke, L. I., Heidecke, C. D., Lerch, M. M., y Bagowski, C. P. (2009). Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*, 9(1), 1–14.

- Martel, C. De, Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., y Clifford, G. M. (2020). Articles Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e180–e190.
- Martin, P., y Feng, Y. (2009). Wound healing in zebrafish. *Nature*, 459(7249), 921–923.
- Matos, C. P., Addis, Y., Nunes, P., Barroso, S., Alho, I., Martins, M., Matos, A. P. A., Marques, F., Cavaco, I., Costa Pessoa, J., y Correia, I. (2019)(A). Exploring the cytotoxic activity of new phenanthroline salicylaldimine Zn(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 198, 110727.
- Matos, C. P., Adiguzel, Z., Yildizhan, Y., Cevatemre, B., Onder, T. B., Cevik, O., Nunes, P., Ferreira, L. P., Carvalho, M. D., Campos, D. L., Pavan, F. R., Pessoa, J. C., Garcia, M. H., Tomaz, A. I., Correia, I., y Acilan, C. (2019)(B). May iron(III) complexes containing phenanthroline derivatives as ligands be prospective anticancer agents?. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 176, 492–512.
- Matthews, M., Trevarrow, B., y Matthews, J. (2002). A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *In Lab Animal*, 31, 34-40.
- Maurya, M. R., Agarwal, S., Bader, C., y Rehder, D. (2005). Dioxovanadium(V) complexes of ONO donor ligands derived from pyridoxal and hydrazides: Models of vanadate-dependent haloperoxidases. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1, 147–157.
- Maurya, M. R., Chaudhary, N., Avecilla, F., Adão, P., y Costa Pessoa, J. (2014). Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of hydrazones of 2-benzoylpyridine and their catalytic applications. *Dalton Transactions*, 44(3), 1211–1232.
- McClure, M. M., McIntyre, P. B., y McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69(2), 553–570.

- McGrath, P., y Li, C. Q. (2008). Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(9–10), 394–401.
- Meister Winter, G. E., y Butler, A. (1996). Inactivation of vanadium bromoperoxidase: Formation of 2-oxohistidine. *Biochemistry*, 35(36), 11805–11811.
- Mendonça-Gomes, J. M., da Costa Araújo, A. P., da Luz, T. M., Charlie-Silva, I., Braz, H. L. B., Jorge, R. J. B., Ahmed, M. A. I., Nóbrega, R. H., Vogel, C. F. A., y Malafaia, G. (2021). Environmental impacts of COVID-19 treatment: Toxicological evaluation of azithromycin and hydroxychloroquine in adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 790, 148129.
- Menon, A. G. K. (1999). Freshwater Fishes of India. *Records of the Zoological Survey of India* 175, 45-46.
- Merola, C., Perugini, M., Conte, A., Angelozzi, G., Bozzelli, M., y Amorena, M. (2020). Embryo-toxicity of methylparaben to zebrafish (*Danio rerio*) early-life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 236, 108792.
- Milenkovic, M., Pevec, A., Turel, I., Vujcic, M., Milenkovic, M., Jovanovic, K., Gligorijevic, N., Radulovic, S., Swart, M., Gruden-Pavlovic, M., Adaila, K., Cobeljic, B., y AnCelkovic, K. (2014). Synthesis, characterization, DFT calculation and biological activity of square-planar Ni(II) complexes with tridentate PNO ligands and monodentate pseudohalides. Part II. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 284–297.
- Mosmann, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.



- Mujahid, M., Kia, A. F. A., Duff, B., Egan, D. A., Devereux, M., McClean, S., Walsh, M., Trendafilova, N., Georgieva, I., y Creaven, B. S. (2015). Spectroscopic studies, DFT calculations, and cytotoxic activity of novel silver(I) complexes of hydroxy ortho-substituted-nitro-2 H-chromen-2-one ligands and a phenanthroline adduct. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153, 103–113.
- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., y Chatterjee, M. (2004). Vanadium - An element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2), 135–143.
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J., y Mulero, V. (2007). Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*, 268(1-4), 244–250.
- Nagy, R., Sweet, K., y Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38), 6445–6470.
- Nasr, T., Bondock, S., y Youns, M. (2014). Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 539–548.
- Nelson, J. S. (2016). *Fishes of the World, 5th Edition*. Wiley
- NIH. Instituto Nacional del Cáncer. 28/09/2020. <https://www.cancer.gov/espanol>
- Nunes, P., Correia, I., Marques, F., Matos, A. P., Dos Santos, M. M. C., Azevedo, C. G., Capelo, J. L., Santos, H. M., Gama, S., Pinheiro, T., Cavaco, I., y Pessoa, J. C. (2020) (A). Copper Complexes with 1,10-Phenanthroline Derivatives: Underlying Factors Affecting Their Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry*, 59(13), 9116–9134.

- Nunes, P., Marques, F., Cavaco, I., Costa Pessoa, J., y Correia, I. (2020) (B). Exploring the therapeutic potential of Cu(II)-complexes with ligands derived from pyridoxal. *Inorganica Chimica Acta*, 507, 119558.
- OECD (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals. Section 2: Effects of Biotic Systems. OECD Publishing, París.
- Okada, A., Nagata, K., Sano, K., Yasumasu, S., Kubota, K., Ohtsuka, J., Iuchi, I., y Tanokura, M. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of ZHE1, a hatching enzyme from the zebrafish *Danio rerio*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(10), 1018–1020.
- Oncolink Team. (2021). Todo sobre la terapia dirigida. Oncolink. 17/11/2020 <https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/terapias-dirigidas/todo-sobre-la-terapia-dirigida>
- Oniga, O., Ndongu, J. T., Moldovan, C., Tiperciuc, B., Oniga, S., Pîrnău, A., Vlase, L., y Verité, P. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of some new 2-hydrazone-thiazoline-4-ones. *Farmacia*, 60(6), 785–797.
- Orger, M. B., y De Polavieja, G. G. (2017). Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 125–147.
- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A. K., Parmar, D., y Dhawan, A. (2007). In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1409–1418.
- Patole, J., Sandbhor, U., Padhye, S., Deobagkar, D. N., Anson, C. E., y Powell, A. (2003). Structural chemistry and in vitro antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(1), 51–55.

- Peng, L., Li, Y., Wei, S., Li, X., Dang, Y., Zhang, W., y Zhang, G. (2020). LAMA4 activated by Androgen receptor induces the cisplatin resistance in gastric cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 124, 109667.
- Petanidis, S., Kioseoglou, E., Hadzopoulou-Cladaras, M., y Salifoglou, A. (2013). Novel ternary vanadium-betaine-peroxido species suppresses H-ras and matrix metalloproteinase-2 expression by increasing reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, 335(2), 387–396.
- Puskullu, M. O., Celik, I., Erol, M., Fatullayev, H., Uzunhisarcikli, E., y Kuyucuklu, G. (2020). Antimicrobial and antiproliferative activity studies of some new quinoline-3-carbaldehyde hydrazone derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 101, 104014.
- Raj Kumar, R., Ramesh, R., y Małeckı, J. G. (2018). Synthesis and structure of arene ruthenium(II) benzhydrazone complexes: Antiproliferative activity, apoptosis induction and cell cycle analysis. *Journal of Organometallic Chemistry*, 862, 95–104.
- Ramos-Lima, F. J., Quiroga, A. G., García-Serrelde, B., Blanco, F., Carnero, A., y Navarro-Ranninger, C. (2007). New trans-platinum drugs with phosphines and amines as carrier ligands induce apoptosis in tumor cells resistant to cisplatin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(9), 2194–2199.
- Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., y Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina a en alimentos de consumo humano: Revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215–1226.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 08-02-2013, 52, 11370 -11421.

- Rehder, D. (2012). The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*, 4(14), 1823–1827.
- Rehder, D. (2020). The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Inorganica Chimica Acta*, 504, 119445.
- Residentes, R. (2019). Oncología. Resúmenes del XXV Congreso Colombiano de Medicina Interna. *Acta Médica Colombiana*, 43(25), 232–239.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., y Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 1–25.
- Rocha, A., Ruiz, S., y Coll, J. M. (2002). Metodo sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. *Investigaciones Agrarias*, 17, 93–102.
- Rudavath, D., Sreenivasulu, R., Pinapati, S. R., y Raju, R. R. (2018). Synthesis and antitumor evaluation of novel 5-bromo indole-aryl keto hydrazide-hydrazone analogues. *Asian Journal of Chemistry*, 30(6), 1201–1204.
- Sánchez-Lara, E., Treviño, S., Sánchez-Gaytán, B. L., Sánchez-Mora, E., Castro, M. E., Meléndez-Bustamante, F. J., Méndez-Rojas, M. A., y González-Vergara, E. (2018). Decavanadate salts of Cytosine and Metformin: A combined experimental-theoretical study of potential metallodrugs against Diabetes and cancer. *Frontiers in Chemistry*, 6, 1–18.
- Sankarganesh, M., Raja, J. D., Revathi, N., Solomon, R. V., y Kumar, R. S. (2019). Gold(III) complex from pyrimidine and morpholine analogue Schiff base ligand: Synthesis, characterization, DFT, TDDFT, catalytic, anticancer, molecular modeling with DNA and BSA and DNA binding studies. *Journal of Molecular Liquids*, 294, 111655.

- Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., y Yasumasu, S. (2008). Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - An evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS Journal*, 275(23), 5934–5946.
- Santana Castro, M. A., Ferreira, U., Glina, S., Santana Castro, A. C., Matheus, W. E., y Reis, L. O. (2010). Alteración de la densidad del volumen de los componentes testiculares asociada con el cisplatino: ¿pueden los antioxidantes ofrecer protección? *Actas Urológicas Españolas*, 34(3), 282–287.
- Sardroud, S. J., Hosseini-Yazdi, S. A., Mahdavi, M., Poupon, M., y Skorepova, E. (2020). Synthesis, characterization and in vitro evaluation of anticancer activity of a new water-soluble thiosemicarbazone ligand and its complexes. *Polyhedron*, 175, 114218.
- Schur, J., Lüning, A., Klein, A., Köster, R. W., y Ott, I. (2019). Platinum alkynyl complexes: Cellular uptake, inhibition of thioredoxin reductase and toxicity in zebrafish embryos. *Inorganica Chimica Acta*, 495, 118982.
- Ścibior, A., Pietrzyk, Ł., Plewa, Z., y Skiba, A. (2020). Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61, 126508.
- Sedmera, D., Reckova, M., DeAlmeida, A., Sedmerova, M., Biermann, M., Volejnik, J., Sarre, A., Raddatz, E., McCarthy, R. A., Gourdie, R. G., y Thompson, R. P. (2003). Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(4 53-4), 1152–1160.

- Severo, E. S., Marins, A. T., Cerezer, C., Costa, D., Nunes, M., Prestes, O. D., Zanella, R., y Loro, V. L. (2020). Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*, 110071.
- Shah, P., Abadi, L. F., Gaikwad, S., Chaudhari, D., Kushwah, V., Jain, S., Bhutani, K. K., Kulkarni, S., y Singh, I. P. (2018). Synthesis and Biological Evaluation of 8-Hydroxyquinoline-hydrazones for Anti-HIV-1 and Anticancer Potential. *ChemistrySelect*, *3*(38), 10727–10731.
- Shaloam, D., y Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364–378.
- Shechter, Y., Goldwasser, I., Mironchik, M., Fridkin, M., y Gefel, D. (2003). Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, *237*(1–2), 3–11.
- Singh, N. K., Kumbhar, A. A., Pokharel, Y. R., y Yadav, P. N. (2020). Anticancer potency of copper(II) complexes of thiosemicarbazones. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *210*, 111134.
- Sondhi, S. M., Dinodia, M., y Kumar, A. (2006). Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *14*(13), 4657–4663.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., y Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, *83*(1), 13–34.
- Sridhar, S. K., Saravanan, M., y Ramesh, A. (2001). Synthesis and antibacterial screening of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *36*(7–8), 615–625.

- Strianese, M., Basile, A., Mazzone, A., Morello, S., Turco, M. C., y Pellecchia, C. (2013). Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(11), 2202–2209.
- Stucchi, G., Battevi, N., Cairoli, S., y Consonni, D. (2016). The prevalence of musculoskeletal disorders in the retail sector: an Italian cross sectional study on 3380 workers. *La Medicina Del Lavoro*, 107(4), 251–262.
- Toral-Martiñón, R., Poblano, A., Collado-Corona, M. A., y González, R. (2003). Efectos del Cisplatino en la Función Auditiva en niños con Cáncer. Evaluación por Emisiones Otoacústicas. *Gaceta Medica de México*, 139(6), 529–534.
- Truong, L., y Tanguay, R. L. (2017). Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Methods in Molecular Biology*, 1641(8), 325–333.
- Valdez-Camacho, J. R., Pérez-Salgado, Y., Espinoza-Guillén, A., Gómez-Vidales, V., Alberto Tavira-Montalvan, C., Meneses-Acosta, A., Leyva, M. A., Vázquez-Ríos, M. G., Juaristi, E., Höpfl, H., Ruiz-Azuara, L., y Escalante, J. (2020). Synthesis, structural characterization and antiproliferative activity on MCF-7 and A549 tumor cell lines of [Cu(N-N)( $\beta^3$ -aminoacidate)]NO<sub>3</sub> complexes (Casiopeínas®). *Inorganica Chimica Acta*, 506, 119542.
- Vallet Regí, M. (2003). *Introducción a la química bioinorgánica*. Síntesis.
- Varma, R. R., Pandya, J. G., Vaidya, F. U., Pathak, C., Bhatt, B. S., y Patel, M. N. (2020). Biological activities of pyrazoline-indole based Re(I) carbonyls: DNA interaction, antibacterial, anticancer, ROS production, lipid peroxidation, *in vivo* and *in vitro* cytotoxicity studies. *Chemico-Biological Interactions*, 330, 109231.
- Veciana Galindo, C., Cortés Castell, E., Torro Montell, L., Sirvent Segura, E., Rizo Baeza, M. M., y Gil Guillén, V. (2014). Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutricion Hospitalaria*, 29(6), 1388–1393.

- Vicini, P., Incerti, M., La Colla, P., y Loddo, R. (2009). Anti-HIV evaluation of benzo[d]isothiazole hydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1801–1807.
- Wang, J., Yuen, V. G., y McNeill, J. H. (2001). Effect of vanadium on insulin sensitivity and appetite. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 50(6), 667–673.
- Wattendorf, D. J., y Muenke, M. (2005). Fetal alcohol spectrum disorders. *American Family Physician*, 72(2), 279-285.
- Winter, M. J., Redfern, W. S., Hayfield, A. J., Owen, S. F., Valentin, J. P., y Hutchinson, T. H. (2008). Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 57(3), 176–187.
- Wong, Y. C., Kim, S., Peng, W., y Krainc, D. (2019). Regulation and Function of Mitochondria–Lysosome Membrane Contact Sites in Cellular Homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 29(6), 500–513.
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., y Hannun, Y. A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584), 43–47.
- Xiao, Q., Zhao, Z., Lin, K., y Wang, J. (2018). A phosphorescent cyclometalated iridium(III) complex as mitochondria-targeted theranostic anticancer agent. *Inorganic Chemistry Communications*, 94, 75–79.
- Xie, M., Chen, D., Zhang, F., Willsky, G. R., Crans, D. C., y Ding, W. (2014). Effects of vanadium (III, IV, V)-chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 136, 47–56.
- Xu, W., y McArthur, G. (2016). Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Current Oncology Reports*, 18(6), 34.



- Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., y Strähle, U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *In Reproductive Toxicology* 28, 245-253.
- Yang, X., Chen, L., Liu, Y., Yang, Y., Chen, T., Zheng, W., Liu, J., y He, Q. Y. (2012). Ruthenium methylimidazole complexes induced apoptosis in lung cancer A549 cells through intrinsic mitochondrial pathway. *Biochimie*, 94(2), 345–353.
- Yang, Y., Qi, S., Wang, D., Wang, K., Zhu, L., Chai, T., y Wang, C. (2016). Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials*, 307, 127–136.
- Yang, Z., Jiang, G., Xu, Z., Zhao, S., y Liu, W. (2020). Advances in alkynyl gold complexes for use as potential anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 423, 213492.
- Yao, Q., Qi, J., Zheng, Y., Qian, K., Wei, L., Maimaitiyiming, M., Cheng, Z., y Wang, Y. (2019). Synthesis, anticancer activity and mechanism of iron chelator derived from 2,6-diacetylpyridine bis(acylhydrazones). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, 1–8.
- Ye, J., Ma, J., Liu, C., Huang, J., Wang, L., y Zhong, X. (2019). A novel iron(II) phenanthroline complex exhibits anticancer activity against TFR1-overexpressing esophageal squamous cell carcinoma cells through ROS accumulation and DNA damage. *Biochemical Pharmacology*, 166(601), 93–107.
- Zhao, Y., Hui, J., Wang, D., Zhu, L., Fang, J. H., y Zhao, X. D. (2010). Synthesis, cytotoxicity and pro-apoptosis of novel benzoisindolin hydrazones as anticancer agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(10), 1324–1327.
- Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X., y Zhu, X. (2016). Drug Design, Development and Therapy Dovepress Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug design, development and therapy*, 10–1885.

Zorzano, A., Palacín, M., Marti, L., y García-Vicente, S. (2009). Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), 559–566.