

Universidad Rey Juan Carlos

Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología



INGENIERO QUÍMICO
Curso académico 2010/11
Trabajo de Fin de Carrera

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE COMPLEJOS METÁLICOS CON ACTIVIDAD ANTICANCEROSA CON MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Autor: Victoria Clause
Directores: Dra. Isabel del Hierro Morales
Dr. Santiago Gómez Ruiz

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a todas las personas del Departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos que me han ayudado tanto dentro como fuera del laboratorio durante la realización de este Proyecto Fin de Carrera.

En especial quiero agradecer a los directores de este proyecto, el Dr. Santiago Gómez Ruiz y la Dra. Isabel del Hierro Morales toda la ayuda que me han brindado a lo largo de todos estos meses. La realización de este proyecto no habría sido posible sin su ayuda y quiero agradecerles también todo lo que me han enseñado, tanto durante la síntesis de los compuestos como durante los ensayos electroquímicos.

También me gustaría agradecer a mis padres, Armando y Cristina y a mis hermanos, Agustín, Sofía y Santiago, a los que dedico este proyecto. Si no fuera por su ayuda y su apoyo durante todos estos años, ahora mismo no podría estar aquí.

Por último, me gustaría agradecer al resto de mi familia que me apoya aunque esté lejos y mencionar a mis abuelos, Pepe y Alejandro que fallecieron de cáncer hace mucho tiempo. Probablemente la cura contra esta enfermedad esté lejos todavía pero sé que no será imposible encontrarla.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN.....	7
2.1	EL CÁNCER.....	7
2.1.1	CAUSAS DEL CÁNCER	8
2.1.2	EL CÁNCER EN CIFRAS	9
2.2	TRATAMIENTO DEL CÁNCER	11
2.2.1	QUIMIOTERAPIA	12
2.2.1.1	COMPLEJOS METÁLICOS DE PLATINO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	13
2.2.1.2	COMPLEJOS ANTI-CÁNCER DE TITANIO	15
2.3	ELECTROQUÍMICA EN PROCESOS BIOLÓGICOS	18
3.	OBJETIVOS.....	19
4.	METODOLOGÍA	20
4.1	CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS	20
4.1.1	CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO.....	20
4.1.2	REACTIVOS UTILIZADOS	23
4.2	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	24
4.2.1	ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	24
4.2.2	ANÁLISIS ELEMENTAL DE CARBONO E HIDRÓGENO.....	25
4.3	SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS	26
4.3.1	RESUMEN GENERAL DE LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS TITANOCENO	26
4.3.2	SÍNTESIS DEL FULVENO DE PARTIDA (C ₅ H ₄)=CMe(CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂) (1).....	29
4.3.3	SÍNTESIS DEL DERIVADO LITIADO Li{C ₅ H ₄ (CMe ₂ (CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂))} (2)	29
4.3.4	SÍNTESIS DE C ₅ H ₄ (CMe ₂ (CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂))(SiMe ₃) (3)	30
4.3.5	SÍNTESIS DEL DERIVADO LITIADO Li{C ₅ H ₃ (CMe ₂ (CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂))(SiMe ₃)} (4)	31
4.3.6	SÍNTESIS DE [Ti(η ⁵ -C ₅ H ₅){η ⁵ -C ₅ H ₄ (CMe ₂ (CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂))}Cl ₂] (5)	31
4.3.7	SÍNTESIS DE [Ti(η ⁵ -C ₅ H ₅){η ⁵ -C ₅ H ₃ (CMe ₂ (CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂))(SiMe ₃)}] (6).....	32
4.3.8	SÍNTESIS DE [Ti(η ⁵ -C ₅ H ₄ {CMe ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂ }) ₂ Cl ₂] (7).....	33
4.4	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA	34
4.4.1	FUNDAMENTOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA	34

4.4.2	METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA LOS ESTUDIOS DE INTERACCIÓN MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	37
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS TITANOCENO	41
5.2	ESTUDIO COMPARATIVO DE CITOTOXICIDAD DE LOS DERIVADOS TITANOCENO.....	45
5.3	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE LOS DERIVADOS TITANOCENO CON MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA	47
5.3.1	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$	47
5.3.1.1	CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$	47
5.3.1.2	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ CON BASES NITROGENADAS Y NUCLEÓTIDOS.....	50
5.3.1.3	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ CON ADN.....	52
5.3.2	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5	53
5.3.2.1	CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL COMPUESTO 5	53
5.3.2.2	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5 CON BASES NITROGENADAS Y NUCLEÓTIDOS.....	54
5.3.2.3	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5 CON ADN	56
5.3.3	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS 6 Y 7	57
6.	CONCLUSIONES.....	58
7.	TÉRMINOS ESPECÍFICOS DE BIOLOGÍA Y MEDICINA	60
8.	BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	63
9.	APÉNDICE	

1. RESUMEN

En este Proyecto de Fin de Carrera se ha estudiado la síntesis y caracterización de tres compuestos titanoceno (Figura 1) con sustituyentes alquenilo que han sido sintetizados mediante técnicas de Schlenk para asegurar la atmósfera inerte durante todo el proceso de síntesis. Estos compuestos han sido caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$) y análisis elemental de carbono e hidrógeno.

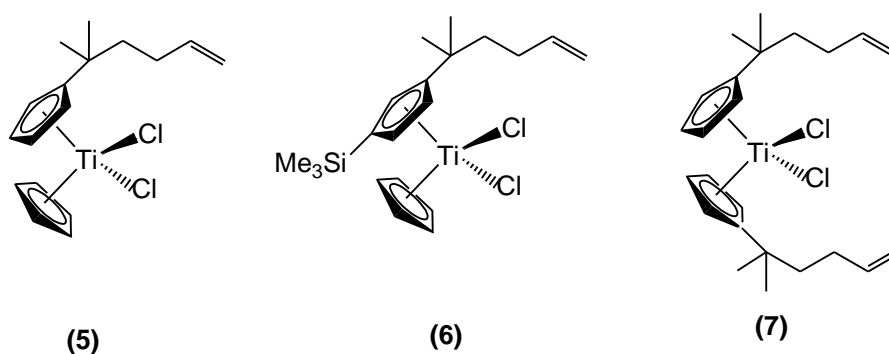


Figura 1. Compuestos titanoceno sintetizados en este Proyecto Fin de Carrera

Todos los compuestos titanoceno tienen un sustituyente alquenilo $\text{CMe}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ que ha demostrado en trabajos anteriores dotar al complejo de mayor citotoxicidad.

Se estudió la actividad citotóxica de estos tres compuestos titanoceno mediante la evaluación de los datos de IC_{50} obtenidos en ensayos previos y se compararon con los datos de actividad citotóxica del compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y cisplatino. En general los compuestos titanoceno presentados en este Proyecto de Fin de Carrera muestran menor citotoxicidad que cisplatino y mayor que $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ en las líneas celulares cancerosas estudiadas.

Por último, se analizó la interacción de los compuestos titanoceno **5**, **6** y **7** y el compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ con moléculas de interés biológico tales como las bases nitrogenadas citosina y timina, los nucleótidos adenosina y guanosina y ADN de esperma de pez de cadena sencilla mediante la técnica electroquímica de voltametría cíclica. Los ensayos electroquímicos se llevaron a cabo bajo un pH fisiológico de 7.4 a concentraciones de compuesto titanoceno entre 0.1 y 10 mM. La concentración de las moléculas de interés biológico se fue variando de 10 a 50 mM para cada ensayo así también como la velocidad de barrido que se mantuvo entre 100 y 1000 mV/s. Con el software

del equipo electroquímico (Autolab GPES) se analizaron los voltamogramas obtenidos y se recogieron los valores de intensidad de pico (I_p) y potencial de pico (E_p) que se utilizaron para obtener, mediante análisis matemático, el coeficiente de difusión, D .

Los resultados obtenidos muestran que el compuesto **5** es aquél en el que se observan interacciones más fuertes con estas moléculas. Con el compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ también se observan interacciones con las distintas moléculas estudiadas, aunque al poseer éste una citotoxicidad menor que el resto de compuestos, parece tener también una aplicabilidad biológica menor.

Teniendo en cuenta que el ADN es la molécula objetivo biológico de los derivados titanoceno, las técnicas de voltametría cíclica para el estudio de las interacciones de los derivados titanoceno con distintos fragmentos moleculares de ADN parecen un método sencillo y rápido y que nos puede dar una idea general de la citotoxicidad final de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EL CÁNCER

El cáncer se puede definir como una enfermedad en la que un grupo de células anómalas crecen sin control ignorando las reglas normales de división celular. Las células normales constantemente reciben señales biológicas que dictan si la célula debe dividirse o morir. Las células cancerosas, por el contrario, desarrollan cierta autonomía frente a estas señales, lo que resulta en un crecimiento descontrolado y proliferación anómala. Si se permite que continúe esta proliferación, puede resultar fatal. De hecho, casi un 90% de las muertes relacionadas con el cáncer se deben a la propagación de tumores –un proceso conocido como metástasis. El cáncer es una familia compleja de enfermedades y la carcinogénesis, que son los eventos que transforman una célula normal del cuerpo en una célula cancerosa, son procesos bastante complicados. Desde el punto de vista clínico, el cáncer es un grupo de enfermedades, que pueden ser hasta 100 o más, que varían dependiendo de cuándo comienzan, de su velocidad de crecimiento, de su estado de la diferenciación celular, de su detección, de su invasión, de su potencial metastático y de su respuesta al tratamiento. A la larga, el cáncer es una enfermedad de expresión genética anómala, ya sea mediante mutación, translocación, amplificación, supresión o mediante un mecanismo que resulte en una transcripción o traslación de genes anómalos. El resultado general es un desequilibrio en la réplica de células y muerte celular que da lugar a una expansión del tejido tumoral. (Hejmadi, 2010)

En los últimos 50 años ha habido grandes avances en la investigación del cáncer que han dado lugar al conocimiento de cómo las células cancerígenas desarrollan esta autonomía. Ahora el cáncer se define como una enfermedad que supone cambios o mutaciones en el genoma celular. Estos cambios (mutaciones del ADN) producen proteínas que trastornan el delicado balance celular entre división celular y quietud, que resulta en células que continúan dividiéndose para formar tumores cancerígenos. (Hejmadi, 2010, Ruddon, 2007)

Las características que diferencian un tumor maligno de uno benigno son la habilidad para invadir localmente, propagarse hacia las glándulas linfáticas y producir metástasis a órganos distantes del cuerpo humano. Clínicamente, el cáncer parece ser una mezcla de varias enfermedades con varias características fenotípicas. A nivel molecular, todos los cánceres tienen varias cosas en común, lo que sugiere que las lesiones bioquímicas que conducen a transformaciones malignas pueden producirse, como se ha comentado anteriormente, por un patrón común pero no idéntico

de alteraciones genéticas. En general, los cánceres malignos causan enfermedad y suelen ser letales hacia el huésped si no se tratan. Existen algunas excepciones que no llevan a la muerte del paciente como son los cánceres latentes e indolentes que pueden permanecer indetectables clínicamente (o *in situ*), permitiendo así que el huésped tenga una esperanza de vida estándar. (Ruddon, 2007)

El cáncer no solo ocurre en los seres humanos o en mamíferos, sino que también ocurre en algunos filos tan antiguos como los equinodermos que aparecieron hace más de 500 millones de años, cefalópodos (500 millones de años), anfibios (300 millones de años) y aves (150 millones de años). Curiosamente, el cáncer no se ha visto nunca en filos tales como los nematodos, *tardigradas* (osos de agua) y rotíferos. Es interesante considerar que estos organismos pueden tener algunos mecanismos protectores que impiden la formación de tumores. Si es así, la biología celular y genética de estos organismos sería muy interesante de estudiar. (Ruddon, 2007)

2.1.1 CAUSAS DEL CÁNCER

La pregunta más importante respecto a la biología del cáncer es probablemente cuál es la causa de las alteraciones celulares que producen un cáncer. Si se supieran exactamente estas causas, lo que se haría es eliminar los factores que producen cáncer y se desarrollarían mejores modalidades de tratamiento. De esta forma, la prevención del cáncer podría llegar a ser una realidad. (Ruddon, 2007)

Una pregunta importante que se tiene en cuenta al analizar las causas del cáncer es cuál de los dos factores principales causantes del cáncer, como son los genes o los factores ambientales, tiene un papel más importante en el desarrollo del mismo. Los genes se distribuyen de manera desigual en las poblaciones y esto no explica las diferencias en las tasas de incidencia de cáncer en el mundo. Esto se demuestra en el siguiente ejemplo. Las incidencias de cáncer estomacal son de 6 a 8 veces mayor en japoneses que en estadounidenses. Sin embargo, se han visto incidencias de cáncer en niños hijos de inmigrantes japoneses establecidos en Estados Unidos semejantes a las incidencias de la población estadounidense. Por lo tanto, el riesgo de desarrollar cáncer parece deberse en gran parte a factores ambientales. (Ruddon, 2007)

Se sabe que la radiación (ionizante y ultravioleta) y los productos químicos cancerígenos afectan al ADN y son mutagénicos bajo ciertas condiciones. Por eso, una de las teorías más antiguas

de la carcinogénesis dice que la causa del cáncer es una mutación genética. Sin embargo, no se sabe si también están involucrados los mecanismos epigenéticos. (Ruddon, 2007)

El inicio y el progreso del cáncer también se debe a la exposición a agentes que lo causan (agentes carcinógenos y mutagénicos). Éstos están presentes en alimentos, en el agua, en el aire, en productos químicos y en los rayos del sol a los que las personas se exponen. Ya que las células epiteliales cubren la piel, forran el tracto alimenticio y respiratorio y metabolizan los carcinogénicos ingeridos, no es sorprendente que más del 90% de los cánceres se originen a partir de epitelios. En menos del 10% de los casos, una predisposición genética puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo algunos casos de leucemia infantil, cáncer de retina, etc. (Ruddon, 2007)

A pesar de que el cáncer puede ocurrir en personas de cualquier edad, es más común entre la población de mayor edad. El 60% de nuevos casos de cáncer y dos tercios de las muertes debidas al cáncer se dan en personas mayores de 65 años. La incidencia de cánceres comunes como cáncer de mama, colo-rectal, de próstata y de pulmón aumenta con la edad. Hay muchas teorías que explican por qué la incidencia del cáncer aumenta en las personas mayores. Algunas de estas son: las alteraciones en el sistema inmunológico debido a la edad, la acumulación de mutaciones genéticas aleatorias debido a la exposición carcinogénica durante la vida (especialmente para cánceres de pulmón y colo-rectal), alteraciones hormonales y largos períodos de vida. (Ruddon, 2007)

2.1.2 EL CÁNCER EN CIFRAS

El cáncer es la segunda causa de muerte en países europeos después de enfermedades del aparato circulatorio y ha sido el responsable del 26% de las muertes en el año 2008. Las tasas de mortalidad de cáncer son menores en Chipre, Finlandia, Suiza y Suecia: tan solo 150 muertes por cada 100.000 habitantes. En los países de Europa central y Europa del este tal como Hungría, Polonia, República Checa, Eslovaquia, Eslovenia y Dinamarca, la tasa de mortalidad es mayor: 200 muertes por cada 100.000 habitantes. (OECD, 2010)

En todos los países europeos, la tasa de mortalidad debido al cáncer es mayor en hombres que en mujeres. En 2008, la diferencia de mortalidad entre hombres y mujeres ha sido mayor en Letonia, Estonia, Lituania, Francia, España y Portugal. En estos países, la tasa de mortalidad de cáncer en los hombres es casi el doble que en las mujeres. Esto puede deberse a que predominan los

factores de riesgo entre los hombres y también a que hay menos disponibilidad de aparatos de revisión médica para distintos tipos de cáncer que afectan a los hombres, lo que produce una tasa de supervivencia menor después del diagnóstico. (OECD, 2010)

El cáncer de pulmón sigue siendo el tipo de cáncer más letal en los hombres de todos los países europeos, excepto Suecia. Este tipo de cáncer es también el que más muertes produce entre mujeres. El factor de riesgo más importante de este tipo de cáncer es el tabaco. En 2008, las muertes debido al cáncer de pulmón en los hombres fueron más altas en países como Hungría, Polonia, Estonia, Letonia y Lituania, donde la cantidad de hombres que fuman es relativamente alta. Por otro lado, la tasa de mortalidad debido al cáncer de pulmón en los hombres es baja en países nórdicos tal como Suecia, Islandia, Finlandia y Noruega, donde los hombres fuman mucho menos. (OECD, 2010)

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en las mujeres de los países europeos y ha sido el responsable del 31% de las incidencias de cáncer en las mujeres y del 17% de las muertes por cáncer en 2008. En la última década ha aumentado la incidencia de cáncer de mama aunque la tasa de mortalidad ha disminuido o permanecido estable. El aumento de las tasas de supervivencia se debe al diagnóstico precoz y/o a mejores tratamientos. Las tasas de mortalidad por cáncer de mama más bajas pertenecen a España, Noruega, Finlandia y Portugal: menos de 20 muertes por cada 100.000 mujeres, mientras que las tasas de mortalidad más altas pertenecen a Irlanda y Dinamarca. (OECD, 2010)

El cáncer de próstata se ha convertido en el tipo de cáncer más común en los hombres de países europeos, particularmente en los hombres mayores de 65, aunque las muertes debido a este tipo de cáncer siguen siendo más bajas que las muertes debido al cáncer de pulmón. El aumento en la incidencia de cáncer de próstata en muchos países durante los últimos 30 años se debe al mayor uso de pruebas de diagnóstico de cáncer de próstata y las tasas de mortalidad en 2008 debido a este tipo de cáncer han variado desde 15 por cada 100.000 habitantes en Malta hasta más de 30 por cada 100.000 habitantes en varios países de Europa del este y países nórdicos. (OECD, 2010)

La tasa de mortalidad para todos los tipos de cáncer tanto para hombres como para mujeres ha disminuido en la mayoría de los países europeos desde 1994, aunque no tan drásticamente como es el caso de las muertes por enfermedades cardiovasculares. Esto explica la razón por la que el cáncer es el responsable de la mayoría de las muertes. (OECD, 2010)

2.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Para tratar el cáncer existen diversas técnicas. Las más conocidas son la radioterapia y la quimioterapia. La radioterapia usa radiación de alta energía para disminuir el tamaño de los tumores y matar células cancerígenas. Los tipos de radiación que se utilizan contra el cáncer son rayos-X, rayos- γ y partículas cargadas.

La *radioterapia* mata a las células cancerígenas dañando su ADN de forma directa o creando radicales libres dentro de las células que a su vez pueden dañar el ADN. Las células cancerígenas cuyo ADN se daña y no se puede volver a reparar, dejan de dividirse o mueren. Cuando estas células se mueren, son eliminadas por los procesos naturales del cuerpo humano. La radioterapia puede dañar a las células sanas, dando lugar a los conocidos efectos secundarios de este tratamiento y a veces se da con propósitos curativos, es decir, con la esperanza de que el tratamiento cure un cáncer, ya sea eliminando un tumor, previniendo la reaparición del cáncer, o ambas opciones. En estos casos, la radioterapia puede ser utilizada sola o en combinación con cirugía, quimioterapia o ambas. Este tratamiento también se puede dar con propósitos paliativos, sin intención de curar y únicamente para aliviar síntomas y reducir el sufrimiento de un paciente con cáncer. Casi la mitad de los pacientes con cáncer recibe algún tipo de radioterapia durante el curso de su tratamiento. (OECD, 2010)

Otro ejemplo de tratamiento contra el cáncer es la *cirugía*, que es el tratamiento más antiguo. También sirve para diagnosticar el cáncer y para ver cuánto se ha extendido. Los avances en las técnicas quirúrgicas permiten a los cirujanos operar con éxito a muchos pacientes. Hoy en día, hay operaciones que se pueden llevar a cabo con menor daño a los órganos y a los tejidos (cirugía menos invasiva) y pueden servir para extraer tumores sin destruir los tejidos. La cirugía es la mejor opción para curar muchos tipos de cáncer, especialmente aquellos que no se hayan extendido a otras partes del cuerpo. La mayoría de los pacientes con cáncer se someten a algún tipo de cirugía durante su tratamiento. (OECD, 2010)

Otro tipo de tratamiento contra el cáncer es la *terapia biológica* o *bioterapia*, a veces conocida como inmunoterapia en la que se utiliza el sistema inmunológico del cuerpo humano, ya sea de manera directa o indirecta, para combatir el cáncer o para disminuir los efectos secundarios de algunos tratamientos anti-cáncer. Algunas sustancias del sistema inmunológico tal como los anticuerpos y las citoquinas se pueden preparar en el laboratorio y son las que se utilizan en este

tipo de tratamiento. Estas sustancias se llaman modificadores de la respuesta biológica (MRBs) y alteran la interacción entre las defensas del sistema inmunológico y las células cancerígenas para estimular, dirigir o restaurar la habilidad del cuerpo humano para combatir enfermedades. Algunas MRBs son los interferones, interleuquinas, anticuerpos monoclonales y vacunas. (OECD, 2010)

2.2.1 QUIMIOTERAPIA

La *quimioterapia* (también llamada quimio) es un tipo de tratamiento anti-cáncer en el que se utilizan fármacos para destruir las células cancerígenas. La quimioterapia funciona disminuyendo o parando completamente el crecimiento de células cancerígenas. Este tratamiento también puede dañar a las células saludables que se dividen rápido, tal como las que cubren la boca y los intestinos o las que hacen que el pelo crezca. El daño a las células saludables puede causar efectos secundarios que muchas veces mejoran o desaparecen completamente una vez que se acaba la quimioterapia. Dependiendo del tipo de cáncer y de su estado, con quimioterapia se puede:

- **Curar el cáncer por completo.** Cuando la quimioterapia destruye las células cancerígenas hasta el punto en el que el médico no puede detectarlas en el cuerpo y no existe posibilidad alguna de que vuelvan a crecer.
- **Controlar el cáncer.** Cuando la quimioterapia interrumpe el crecimiento de las células cancerígenas o destruye las que se hayan extendido a otras partes del cuerpo.
- **Aliviar síntomas** (cuidados paliativos). Cuando la quimioterapia se utiliza para disminuir la acción y volumen de tumores que causan dolor o presión. (OECD, 2010)

Algunas veces la quimioterapia se utiliza como único tratamiento anti-cáncer, pero más a menudo se utiliza junto con cirugía, radioterapia o terapia biológica. La quimioterapia puede reducir el tamaño de un tumor antes de someterse a una cirugía o a radioterapia (quimioterapia neoadyuvante). También puede utilizarse para destruir las células que permanecen en el cuerpo después de una cirugía (quimioterapia adyuvante). Algunas veces se utiliza para mejorar el tratamiento con radioterapia y/o bioterapia. Por último, la quimioterapia suele utilizarse para destruir células cancerígenas que hayan vuelto (cáncer recurrente) o que se hayan extendido a otras partes del cuerpo (cáncer metastático). (OECD, 2010)

2.2.1.1 COMPLEJOS METÁLICOS DE PLATINO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El compuesto cisplatino (Figura 2) cuya fórmula es $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ es un compuesto muy simple derivado del platino que revolucionó el tratamiento de algunos tipos de cáncer y que presenta en algunos casos una probabilidad de éxito del 100%. Este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1844 por Michel Peyrone, que lo llamó Cloruro de Peyrone o Sal de Peyrone. Es un sólido amarillo y produce una disolución transparente e incolora cuando se disuelve en agua. (Gielen y col., 2005)

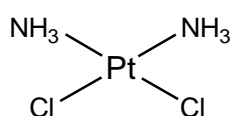


Figura 2. Cisplatino

A principios de la década de los 60, Barnett Rosenberg, físico y biólogo de la universidad de Michigan State, estudió por curiosidad el crecimiento de bacterias cuando se aplicaba un campo eléctrico; quería ver el efecto en la división celular al poner dos electrodos en un ambiente de crecimiento celular. Un primer experimento utilizando la bacteria *Escherichia coli* provocó que las células crecieran hasta 300 veces más. En condiciones normales, la *E. coli* crece como un hilo pequeño y después de alcanzar una longitud dada, se divide en dos células hijas pero el experimento de Rosenberg bloqueaba el mecanismo crucial que permitía que las células se dividieran, por lo que seguían creciendo únicamente longitudinalmente. (Rosenberg y col., 1965; Rosenberg y col., 1969)

Un método común para aplicar un campo eléctrico a una disolución es el uso de electrodos de platino. El platino es un metal estable e inerte, por lo que los electrodos de este metal no perturban a la disolución. Sin embargo, Rosenberg y sus colaboradores Loretta Van Camp y Thomas Krigas, se dieron cuenta que debido al montaje experimental y a la aplicación del campo eléctrico, se atacaba al platino del electrodo utilizado y éste se disolvía en iones en la disolución, reaccionando con el medio bacteriano produciendo cisplatino que era el verdadero causante de la acción en las células de las bacterias. (Rosenberg y col., 1965; Rosenberg y col., 1969)

Numerosos estudios posteriores han mostrado que el cisplatino funciona atravesando la pared celular y luego el núcleo, una vez dentro, la concentración de cloruros disminuye y los dos iones cloruro se reemplazan por un enlace muy débil con agua que facilita el enlace entre el platino y

dos átomos de nitrógeno consecutivos de adenina o guanina presentes en el ADN. Una vez enlazados, el ADN se deforma y no puede volver a su conformación original debido al enlace con el platino y a la acción de una proteína de alta movilidad (proteína GAM) que está involucrada en la transcripción, reparación y duplicación del ADN. La proteína GAM se enlaza fuertemente al bloque de cisplatino/ADN impidiendo que se desencadene el mecanismo de reparación que podría restaurar el ADN. Con este bloqueo, la célula no puede duplicar el ADN para producir una célula hija, por lo que la célula crece indefinidamente y muere por apoptosis impidiendo así su crecimiento incontrolado. (Hadjiliadis y *col.*, 2009)

Continuando con estas observaciones, Rosenberg comenzó a experimentar con ratones y los resultados que obtuvo fomentaron un estudio con seres humanos en 1971. Estos estudios produjeron resultados positivos aunque se observaron varios efectos secundarios tóxicos, tal como dolor en las articulaciones, zumbido de oídos, dificultad para oír y fatiga. Una vez que los efectos secundarios se hicieron llevaderos a través del uso de terapias auxiliares, se aprobó la efectividad de este medicamento y su uso por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food & Drug Administration, FDA) en 1978. Se comercializó con el nombre de Platinol® y actualmente se usa para tratar varios tipos de cáncer, aunque se receta mayormente para el tratamiento de cáncer testicular, de ovarios, de vejiga, pulmón y estómago. (Gielen y *col.*, 2005)

Aunque el cisplatino es un medicamento efectivo, algunos investigadores buscaron compuestos de segunda generación que necesitaran una menor dosis terapéutica y que tuvieran menos efectos secundarios. El más común es el carboplatino (Figura 3), que se introdujo en el mercado estadounidense en 1989 como Paraplatin® para el tratamiento contra el cáncer de ovario avanzado y hoy en día sobrepasa al cisplatino en ventas. El Paraplatin® debe su baja toxicidad al ligando dicarboxilato que desacelera la degradación de carboplatino en derivados potencialmente tóxicos. (Gielen y *col.*, 2005)

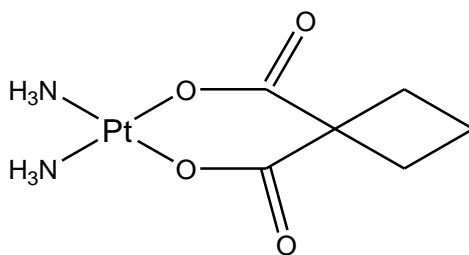


Figura 3. Carboplatino

Hoy en día, después del descubrimiento de las propiedades del cisplatino, no hay otro metal cuya reactividad hacia el ADN se entienda mejor que la del platino. Sin embargo, pese a la gran cantidad de complejos de otros metales que han sido estudiados, la quimioterapia del cáncer mediante el uso de metalo-fármacos sigue estando dominada por los compuestos de platino. La investigación de complejos de metales distintos al platino como agentes anti-cáncer se ha iniciado para intentar encontrar medicamentos menos tóxicos y más específicos. (Ott y *col.*, 2007)

2.2.1.2 COMPLEJOS ANTI-CÁNCER DE TITANIO

El trabajo pionero de Köpf y Köpf-Maier identificó por primera vez el potencial antitumoral de los dihaluros de metallocenos como la primera clase de complejos organometálicos con potencial actividad anti-cáncer. (Köpf-Maier y *col.*, 1977; Köpf-Maier y *col.*, 1980 (A); Köpf-Maier y *col.*, 1984). La importancia de este trabajo no puede ser subestimada dado que el dicloruro titanoceno (Figura 4) fue el primer complejo con metales distintos al platino que se inició en ensayos clínicos en 1993. A pesar del fracaso de este compuesto en los ensayos clínicos en fase II, se han hecho muchos estudios que han desvelado el misterio de su mecanismo de acción y que es la base para el diseño de derivados titanoceno altamente estables. (Abeyasinghe y *col.*, 2007)

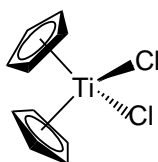


Figura 4. Dicloruro titanoceno

El dicloruro titanoceno, $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$, entró en la fase I de los ensayos clínicos en 1993. (Christodolou y *col.*, 1998; Korfel y *col.*, 1998) La ausencia de cualquier efecto en la actividad proliferativa de la médula espinal, que suele ser el efecto secundario que limita la dosis de medicamentos basados en compuestos orgánicos, fue un resultado muy prometedor que sugirió que el dicloruro titanoceno podría tener un potencial significativo en el posible uso en terapia de combinación. Se hicieron ensayos clínicos de fase II con pacientes con carcinoma renal avanzado y carcinoma de mama metastático. Sin embargo, los resultados utilizando dicloruro titanoceno como único agente en quimioterapia no fueron lo suficientemente prometedores frente a otros tratamientos para garantizar más estudios y por lo tanto el dicloruro titanoceno se dejó de estudiar en ensayos clínicos. (Abeyasinghe y *col.*, 2007)

Aun así se siguieron estudiando las propiedades biológicas del titanoceno observando que el titanio derivado del $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ administrado en pacientes se acumula en las regiones ricas en ácido nucleico de las células tumorales. Además, este compuesto inhibe la síntesis de ácido nucleico, llevando a la muerte celular. Estos dos resultados involucran al ADN como el objetivo biológico del dicloruro titanoceno relacionado con la actividad antitumoral. Para facilitar el transporte celular, la absorción y el transporte de las especies de Ti al núcleo, debe de haber una estabilización del metaloceno con biomoléculas. Esta hipótesis se ha confirmado en estudios de la interacción de dicloruro titanoceno con sustituyentes de ácido nucleico, ADN en masa, aminoácidos y proteínas. (Sun y col., 2007; Guo y col., 2000 (A); Guo y col., 2000 (B); Guo y col., 2001; Tinoco y col., 2008; Tinoco y col., 2007)

Se han hecho varios estudios en los cuales se ha observado que los compuestos titanoceno cuyos enlaces metal-ciclopentadienilo se estabilizan mediante sustitución de los anillos ciclopentadienilo y que liberan Ti(IV) en un periodo de tiempo que permite la absorción de Ti(IV) en transferrina, tienen perfiles biológicos similares a los del dicloruro titanoceno. Por otro lado, derivados titanoceno en los que el enlace ciclopentadienilo-Ti es estable bajo condiciones de pH fisiológico tienen mecanismos de acción diferentes. La presencia de diferentes sustituyentes en los anillos ciclopentadienilo, que alteran la polaridad y solubilidad de los metalocenos, afecta a la farmacología y al mecanismo de transporte celular y estas propiedades llegan a dar perfiles de actividad inesperados en diferentes tipos de tumores. (Allen y col., 2004; Causey y col., 2004; Potter y col., 2006; Strohfeltdt y col., 2008)

La mayoría de los derivados dicloruro titanoceno incorporan sustituyentes que donan electrones, sin embargo se ha investigado la incorporación de grupos polares en los ligandos Cp que atraen electrones para incrementar la acidez de Lewis en los átomos de titanio y por lo tanto aumentar la interacción con las zonas del ADN que presenten basicidad de Lewis. También se ha visto que los titanocenos iónicos muestran una actividad significativamente mayor que los titanocenos no funcionalizados. La labilidad de los ligandos cloruro se ha establecido también como un requerimiento para la actividad anti-tumoral. Aun así, varios estudios han evaluado el efecto que tiene reemplazar uno o ambos ligandos cloruro en compuestos dicloruro titanoceno en la actividad biológica del compuesto. (Abeyasinghe y col., 2007; Hogan y col., 2010)

Además de los derivados titanoceno, también se han hecho estudios con compuestos molibdoceno, vanadoceno, nioboceno y complejos de renio en estados de oxidación altos. Algunos

ejemplos son el dicloruro molibdoceno $[\text{Mo}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$, dicloruro vanadoceno $[\text{V}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y dicloruro nioboceno $[\text{Nb}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$. El dicloruro vanadoceno se ha sometido a ensayos preclínicos extensivos en líneas celulares animales y humanas en paralelo con el $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ observando que el $[\text{V}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ es más activo que el dicloruro titanoceno *in vitro*, aunque no ha habido muchos estudios sobre la acción biológica de este metaloceno. (Abeyasinghe y col., 2007; Idainés y col., 2009; Köpf-Maier y col., 1980 (B); Köpf-Maier y col., 1981)

Finalmente, aunque el $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ se haya dejado de utilizar en ensayos clínicos, el espectro de actividad que exhiben los titanocenos estudiados desde el año 2000 demuestra que las modificaciones estructurales del titanoceno pueden tener efectos significativos en la actividad biológica de diferentes líneas celulares del cáncer que han reactivado su uso en estudios preclínicos y clínicos. (Abeyasinghe y col., 2007)

Otros compuestos similares en estructura a los derivados titanoceno estudiados en terapia anti-cáncer son los ferrocifenos (Figura 5) que son derivados de ferrocenilo de moduladores selectivos receptores de estrógeno, tamoxifeno e hidrotamoxifeno, que son los agentes más importantes en el tratamiento del cáncer de mama. (Gómez-Ruiz, 2011)

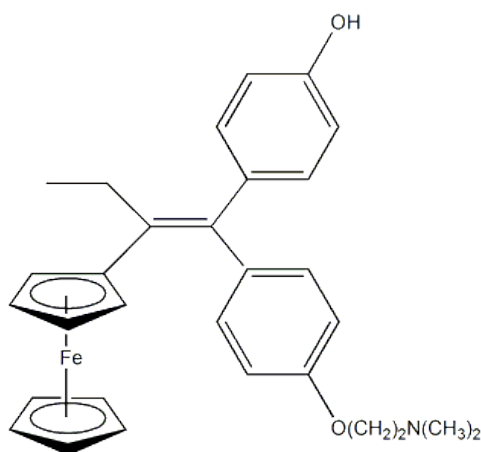


Figura 5. Estructura del ferrocifeno

2.3 ELECTROQUÍMICA EN PROCESOS BIOLÓGICOS

Uno de los aspectos más importantes de los estudios biológicos para el descubrimiento y desarrollo de fármacos es la interacción de los fármacos con el ADN. Recientemente ha aumentado bastante el interés en la investigación de la interacción entre fármacos y ADN mediante técnicas electroquímicas. La observación de las señales electroquímicas antes y después de la interacción entre las moléculas proporciona una buena evidencia del mecanismo de interacción. Además, esta interacción se puede usar para cuantificar el grado de interacción de estos compuestos y determinar nuevos fármacos que se queden fijados en el ADN. El enfoque electroquímico puede proporcionar una mejor comprensión del diseño de fármacos y del mecanismo de interacción entre fármacos anti-cáncer y ADN. (Zhang y *col.*, 2011; Muhammad y *col.*, 2009; Rauf y *col.*, 2005; Tabassum y *col.*, 2009; Wang y *col.*, 2003)

La caracterización de los aductos de ADN requiere generalmente una combinación de técnicas químicas y biológicas para obtener información estructural y para evaluar la naturaleza de los enlaces con el ADN, en términos de constante de disociación, estequiometría y constante cinética. Los métodos que se pueden utilizar para evaluar la presencia de algún tipo de interacción se clasifican en métodos basados en la mezcla y métodos basados en la separación. Los métodos basados en la mezcla incluyen la absorción UV y la fluorescencia, la resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía Raman, espectroscopía de masas (MS) y calorimetría. Los métodos basados en la separación incluyen la diálisis, ultrafiltración, ultracentrifugación, cromatografía de líquidos y en capa fina y electroforesis capilar. (Chauhan y *col.*, 2005)

Dentro de las técnicas físico-químicas, ha habido un gran interés en la investigación de las técnicas electroquímicas. Comparadas con otros métodos, estas técnicas se caracterizan por ser simples, fiables y requerir muy poca cantidad de muestra, por lo que ofrecen ventajas frente a los ensayos químicos y biológicos. Ya que muchas moléculas pequeñas tienen actividad redox, los métodos electroquímicos proporcionan un complemento útil a los métodos de investigación previamente mencionados. Las técnicas electroquímicas se basan principalmente en las diferencias del comportamiento redox de las moléculas que se enlazan con ácido nucleico en presencia y en ausencia de ADN, incluyendo el desplazamiento del potencial redox y la disminución de la intensidad de pico que resulta de la disminución dramática en el coeficiente de difusión una vez que las moléculas se enlazan con el ADN. (Zhang y *col.*, 2011)

3. OBJETIVOS

Los objetivos del presente proyecto fin de carrera fueron los siguientes:

- Síntesis de ligandos ciclopentadienilo con sustituyentes alqueno.
- Síntesis mediante técnicas de Schlenk y caracterización mediante ^1H -RMN y análisis elemental de carbono e hidrógeno de complejos titanoceno con sustituyentes alqueno en uno y los dos anillos de ciclopentadienilo.
- Estudio comparativo de las propiedades citotóxicas de los compuestos titanoceno con sustituyentes alqueno sintetizados.
- Estudio de la interacción de los compuestos titanoceno con bases nitrogenadas como la citosina y timina y nucleótidos como la adenosina y guanosina mediante voltametría cíclica.
- Estudio de la interacción de los compuestos sintetizados con ADN de espermatozoos de pez de cadena sencilla mediante voltametría cíclica.

4. METODOLOGÍA

4.1 CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS

4.1.1 CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO

Debido a que algunos de los compuestos con los que se trabajó en este Proyecto Fin de Carrera son inestables frente al oxígeno y a la humedad del aire, se llevó a cabo la síntesis bajo atmósfera inerte mediante el uso de una línea de vacío, también llamada línea de Schlenk o línea múltiple de gas. Esta línea es un aparato que consta de una tubería doble de vidrio con varios puertos. Uno de los tubos está conectado a una bomba de vacío y el otro a una fuente de gas inerte, que en este caso es nitrógeno tipo N-50 suministrado por *Air Liquide* ($O_2 < 2$ ppm, $H_2O < 2$ ppm, $CO/CO_2 < 0.5$ ppm).

La línea de nitrógeno se puede ventilar utilizando un borbotador de aceite, mientras que los vapores de disolvente y productos gaseosos de las reacciones se almacenan en una trampa de disolvente mediante el uso de una trampa fría con nitrógeno líquido también suministrado por *Air Liquide*, para asegurarse que estos productos no entran a la bomba de vacío ya que podrían dañarla. Para seleccionar trabajar a vacío o en atmósfera de nitrógeno se utilizan unas llaves de doble paso sin necesidad de colocar la muestra en una línea independiente. (Figura 6)



Figura 6. Línea de vacío

La síntesis de los compuestos se llevó a cabo en tubos Schlenk que permiten la manipulación de los compuestos en atmósfera inerte. Estos tubos se conectan a la línea de vacío mediante una goma y una llave para permitir la entrada del gas inerte o la aplicación de vacío. (Figura 7)



Figura 7. Tubo Schlenk

Durante la síntesis de los compuestos hubo ocasiones en las que fue necesario pesar alguno de los compuestos obtenidos y debido a la inestabilidad de los mismos en el aire, se utilizó una caja seca modelo MBRAUN cuyas características del gas dentro de la misma eran: $O_2 < 1$ ppm y $H_2O < 1$ ppm. (Figura 8)



Figura 8. Caja seca modelo MBRAUN

Los disolventes utilizados a lo largo de la síntesis fueron desecados y destilados previamente a su uso y almacenados en tubos Schlenk con tamices moleculares de 4 Å. En la Tabla 1 se muestran los disolventes utilizados y sus correspondientes desecantes.

Tabla 1. Disolventes utilizados

DISOLVENTE	DESECANTE
Tolueno	Na
Hexano	Na/K
THF	Na hilado/Benzonfenona

Al finalizar la síntesis, los compuestos titanoceno, que son estables al aire, se utilizaron en disolución en el equipo de voltametría cíclica sin ningún cuidado adicional. Para los ensayos electroquímicos se utilizó un equipo Modelo Autolab con software GPES (general purpose electrochemical system) con una celda electrolítica de 10 mL y tres electrodos: un electrodo de referencia de Ag/AgCl, un electrodo de trabajo de *Glassy Carbon* (GC) de 2 mm de diámetro y un contra-electrodo de Pt. (Figura 9)

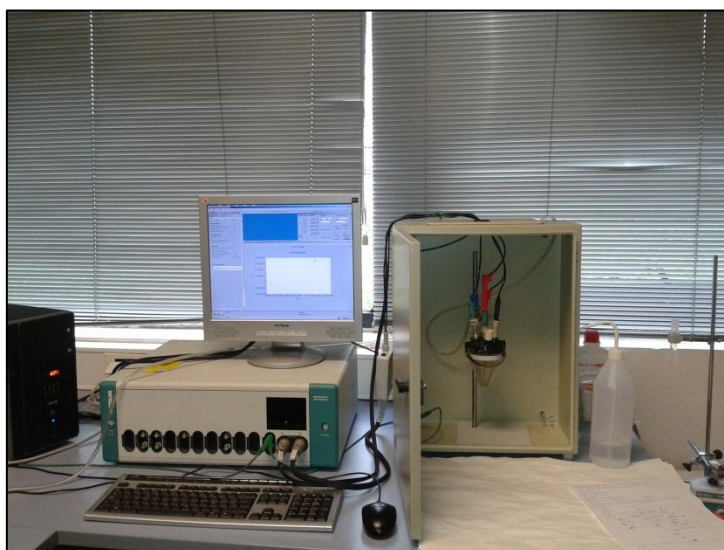


Figura 9. Equipo de voltametría cíclica

4.1.2 REACTIVOS UTILIZADOS

Para sintetizar los compuestos descritos en este Proyecto Fin de Carrera se parte del fulveno **1** previamente sintetizado a partir de su correspondiente cetona y ciclopentadieno. Los reactivos de los que se dispone para las reacciones son LiMe , $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$, SiMe_3Cl , LiBu^n , $\text{TiCl}_4(\text{THF})_2$ suministrados por Acros Organics, Alfa Aesar y Aldrich. Durante la caracterización de los compuestos mediante RMN se utilizó cloroformo deuterado suministrado por Alfa Aesar para disolver completamente una muestra de los compuestos y poder obtener los espectros de RMN de líquidos.

Para los ensayos electroquímicos se utilizaron DMSO de calidad HPLC y agua MilliQ como disolventes y una disolución tampón de Tris-HCl o tris(hidroximetil)aminometano-HCl preparada a partir de Tris-HCl y NaCl, ambos suministrados por Acros. Para el estudio de las interacciones de estos compuestos con moléculas de interés biológico se han utilizado las bases nitrogenadas citosina y timina, los nucleótidos adenosina y guanosina y ADN de esperma de pez suministrados por Aldrich y Acros Organics (Figura 10). También se ha utilizado el reactivo $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ para estudiar las interacciones con las moléculas de interés biológico, el cual fue sintetizado mediante la reacción de $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ y $\text{Na}(\text{C}_5\text{H}_5)$.



Figura 10. Algunos de los reactivos utilizados

4.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La espectroscopía de RMN es una de las principales técnicas empleadas para obtener información física, química, electrónica y estructural de una molécula. En la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN o NMR de *nuclear magnetic resonance*), la absorción característica de energía por núcleos que giran dentro de un potente campo magnético, después de irradiarlos con otro campo secundario más débil y perpendicular al primero, permite identificar las configuraciones atómicas en las moléculas. La absorción ocurre cuando esos núcleos participan en transiciones desde un estado alineado al campo aplicado hasta otro estado diferente. La cantidad de energía requerida para producir la realineación de un núcleo particular depende de factores como: intensidad del campo, configuración electrónica que rodea a ese núcleo particular, anisotropía, tipo de molécula e interacciones moleculares. El resultado, a menudo, permite delinear la secuencia completa de los grupos o los arreglos atómicos en las moléculas. (Willard, y col., 1991)

La RMN, junto con la espectrometría de masas y la espectrometría de infrarrojo, es la de mayor importancia en la determinación de la estructura molecular de compuestos orgánicos y macromoléculas tanto bioquímicas como sintéticas. La espectrometría de RMN consiste en medir la absorción de radiación de radiofrecuencia que experimenta una muestra situada en un campo magnético fuerte. Como en otras espectroscopías, la fracción de potencia absorbida es proporcional a la concentración de las especies absorbentes mientras que la energía de la transición se determina a partir de propiedades moleculares y atómicas. (Willard y col., 1991)

Un instrumento de espectrometría de RMN mide el espectro de una especie atómica cada vez. Los núcleos atómicos más comúnmente medidos son ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . El núcleo más comúnmente medido es, con diferencia, ^1H -RMN, denominada RMN de protón. La RMN de protón no solo es la más medida sino que también es la más sensible por dos razones. En primer lugar, el protón presenta el mayor núcleo magnético y, en segundo lugar, casi el 100% de la abundancia isotópica natural del hidrógeno es ^1H . En ^1H -RMN se utilizan generalmente disolventes que no contienen hidrógeno (por ejemplo cloroformo deuterado, CDCl_3) ya que si no, la absorción de RMN de protón del disolvente podría superponerse a la de la muestra. (Willard y col., 1991)

Todos los espectros de RMN que se incluyen en este Proyecto Fin de Carrera se llevaron a cabo en el Centro de Apoyo Tecnológico de la Universidad Rey Juan Carlos mediante RMN de protón (^1H -RMN). Para ello se ha utilizado un espectrómetro modelo *Varian-Mercury FT-400 (400 MHz)* (Figura 11). Todas las muestras se han preparado a temperatura ambiente utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos se dan en ppm (δ) respecto al tetrametilsilano, tomando como referencia interna la señal correspondiente a los protones residuales del disolvente deuterado empleado en cada caso.



Figura 11. Equipo de RMN del CAT de la Universidad Rey Juan Carlos

4.2.2 ANÁLISIS ELEMENTAL DE CARBONO E HIDRÓGENO

La técnica de análisis elemental de carbono e hidrógeno es una técnica destructiva en la que se somete a la muestra a una oxidación térmica entre 1600-1800 °C. De esta forma, se consigue la conversión total de los elementos en sus correspondientes óxidos, los cuales son arrastrados a un módulo de separación, donde se produce la adsorción selectiva de cada uno, y son medidos mediante un detector de conductividad térmica. Esta técnica es útil para confirmar la fórmula molecular de un compuesto, y por tanto, imprescindible en la determinación de la pureza de la muestra. Los análisis cuantitativos de carbono e hidrógeno descritos en este Proyecto Fin de Carrera se han realizado en un microanalizador Perkin Elmer 2400 de la Universidad de Leipzig (Alemania).

4.3 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS

4.3.1 RESUMEN GENERAL DE LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS TITANOCENO

Para sintetizar un complejo es necesario preparar los ligandos que se enlazan al centro metálico mediante enlace covalente, que en este caso son los correspondientes ligandos ciclopentadienilo. A continuación se muestra un resumen general de la síntesis de los compuestos titanoceno utilizados en este Proyecto Fin de Carrera.

En primer lugar se sintetiza el fulveno correspondiente a partir de ciclopentadieno (previamente obtenido mediante craqueo del dímero comercial dicitlopentadieno estabilizado con BHT), del compuesto carbonílico de interés y utilizando pirrolidina como base para generar en el medio de reacción el anión ciclopentadienilo mediante reacción ácido/base típica (Figura 12). La reacción de síntesis del fulveno es un ataque nucleofílico del anión ciclopentadienilo al compuesto carbonílico, seguido de la deshidratación del producto. El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de fulveno (hacia la derecha) debido a la pérdida de una molécula de agua por deshidratación y a la conjugación del sistema π en el producto.

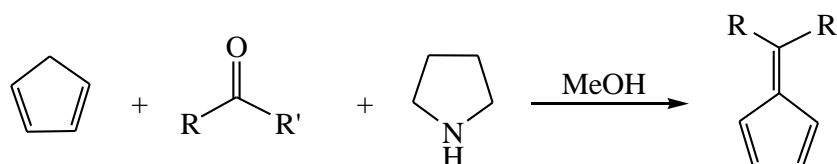


Figura 12. Esquema general de la síntesis de fulvenos.

Una vez obtenido el fulveno se procede con la litiación de éste utilizando el correspondiente derivado alquil-litio (Figura 13). El ataque nucleofílico del fragmento (R'') del alquil-litio se da en el átomo de carbono con exceso de carga positiva del fulveno, dando lugar al compuesto litiado.

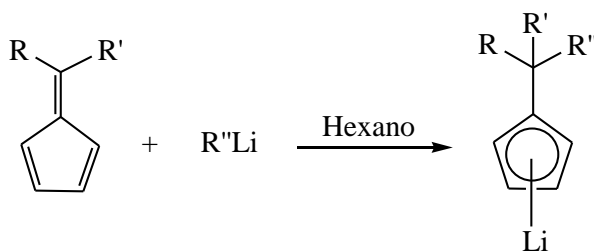


Figura 13. Esquema general del ataque nucleofílico del alquil-litio sobre el fulveno.

Una vez que se obtienen los derivados litiados correspondientes pueden seguirse dos caminos sintéticos:

1. Hacer reaccionar el derivado litiado con $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ para dar lugar al titanoceno correspondiente (Figura 14). La reacción es un ataque nucleofílico del anión ciclopentadienilo al centro metálico de Ti(IV) que presenta exceso de carga positiva. La hapticidad del ligando ciclopentadieno es η^5 (pentahapto), lo que genera una especie de 16 electrones bastante estable.

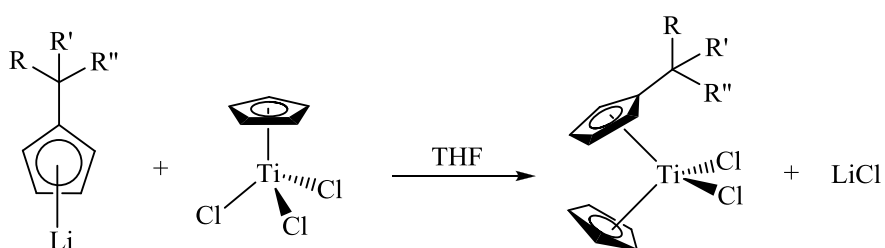


Figura 14. Esquema general de la preparación de los derivados titanoceno

2. Hacer reaccionar el compuesto litiado con SiMe_3Cl dando lugar al derivado con el grupo trimetilsililo ($-\text{SiMe}_3$) a través de una reacción de ataque nucleofílico del anión ciclopentadienilo sobre el centro de Si(IV) (Figura 15).

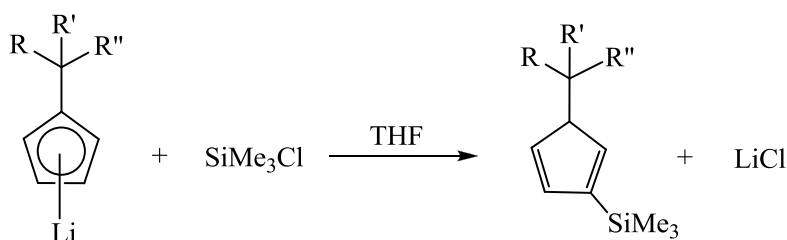


Figura 15. Esquema general de la síntesis de derivados trimetilsililo.

Siguiendo las mismas etapas de litiación y reacción con $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ se consigue el correspondiente titanoceno con el grupo $-\text{SiMe}_3$ en el anillo de ciclopentadienilo (Figuras 16 y 17).

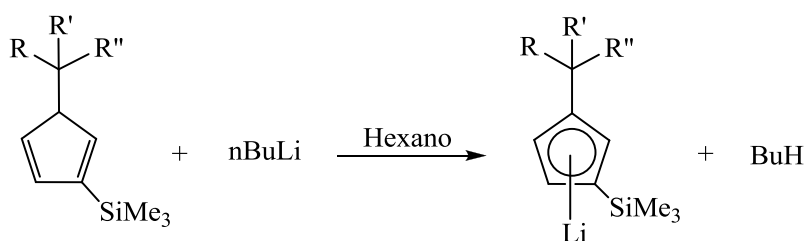


Figura 16. Esquema general de los derivados litiados con grupos trimetilsililo.

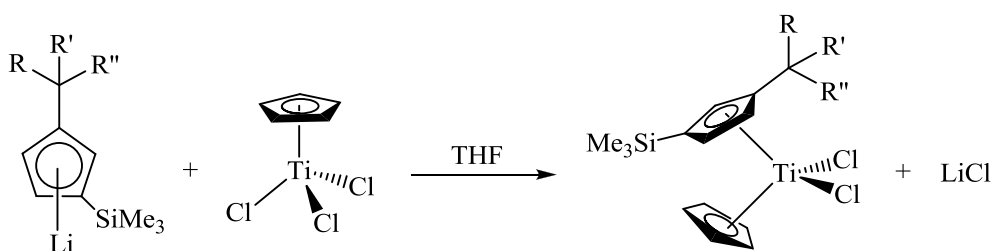


Figura 17. Síntesis de los derivados titanoceno con sustituyentes trimetilsililo.

En la Figura 18 se muestra el esquema específico de síntesis de los tres compuestos titanoceno estudiados a lo largo de este Proyecto Fin de Carrera.

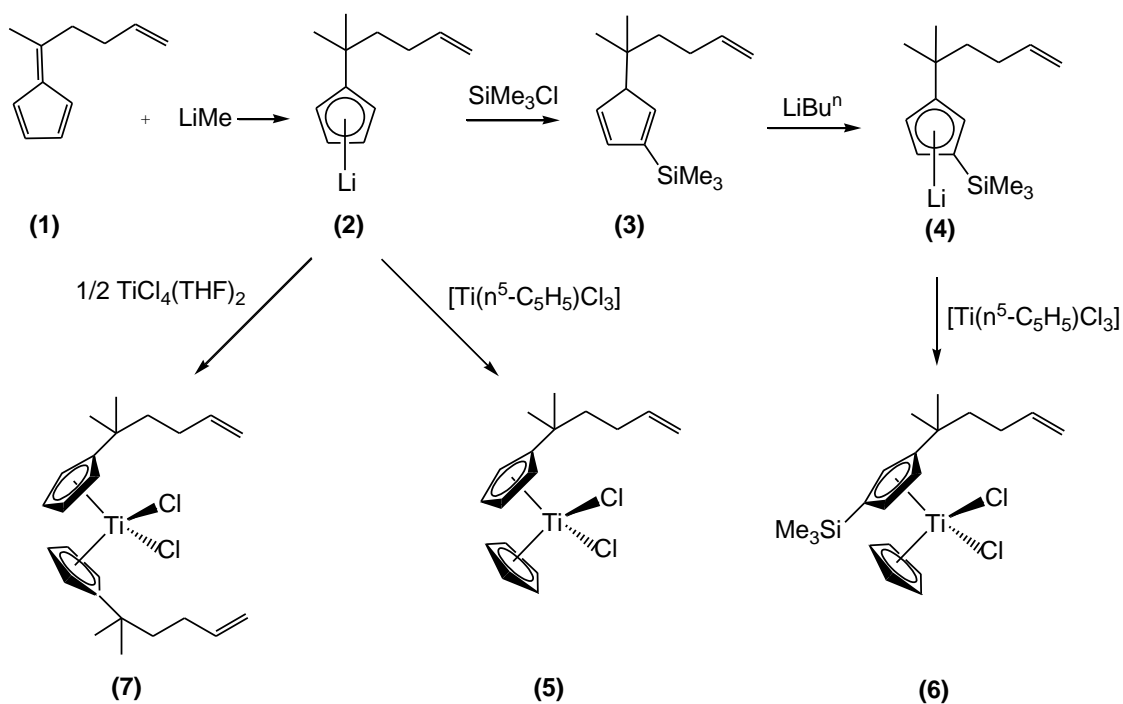


Figura 18. Esquema específico de síntesis de los compuestos titanoceno estudiados

4.3.2 SÍNTESIS DEL FULVENO DE PARTIDA (C₅H₄)=CMe(CH₂CH₂CH=CH₂) (1)

En 200 mL de metanol se añaden 11.22 g (0.17 mol) de ciclopentadieno, previamente obtenido mediante craqueo por destilación de dicitopentadieno en BHT. A la mezcla se añade 7.9 mL (6.64 g, 0.07 mol) de 5-hexen-2-ona y 8.62 mL (7.34 g, 0.10 mol) de pirrolidina (Figura 19). La mezcla se mantiene en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la reacción se detiene con la adición de 6.53 mL (6.85 g, 0.12 mol) de ácido acético.

El compuesto se separa de la mezcla de reacción mediante el siguiente esquema de separación:

Se introduce la mezcla en un embudo de decantación y se añaden 300 mL de éter y 300 mL de agua destilada, se agita y se deja separar la fase orgánica de la acuosa. La fase acuosa se lava con éter (2 × 500 mL). Las tres fases orgánicas resultantes se lavan con agua (200 mL) y con una disolución saturada de cloruro sódico (200 mL). La fase orgánica resultante se seca añadiendo sulfato de magnesio anhidro y, finalmente, se elimina el disolvente a vacío en un rotavapor. A continuación se purifica el compuesto mediante cromatografía en columna usando hexano como eluyente. Rendimiento: 4.80 g, 48%. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ 2.22 (s, 3H, C=CMe), 2.34 (m, 2H, CH₂CH₂CH=CH₂), 2.63 (t, 2H, CH₂CH₂CH=CH₂), 4.99-5.10 (m, 2H, CH₂CH₂CH=CH₂), 5.84 (m, 1H, CH₂CH₂CH=CH₂), 6.52 (m, 4H, C₅H₄) ppm.

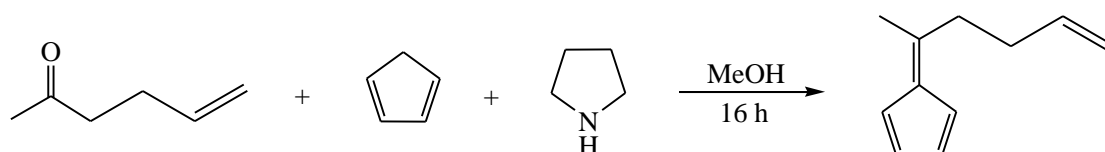


Figura 19. Síntesis del fulveno de partida 1

4.3.3 SÍNTESIS DEL DERIVADO LITIADO Li{C₅H₄(CMe₂(CH₂CH₂CH=CH₂))} (2)

En un matraz Schlenk, y bajo condiciones estrictas de atmósfera inerte, se adiciona hexano (aproximadamente 100 mL) y 1.17 g (7.89 mmol) de (C₅H₄)=CMe(CH₂CH₂CH=CH₂). A continuación se añade gota a gota a la mezcla 5.1 mL (8.16 mmol, 1.60 M en dietiléter) de LiMe a una temperatura de 0°C mediante el uso de un baño frío de acetona y nitrógeno líquido y se mantiene bajo agitación

durante toda la noche a temperatura ambiente (Figura 20). Una vez terminada la reacción, se elimina el disolvente con un filtro de cánula y se vuelve a añadir hexano (100 mL) y se filtra nuevamente. El sólido blanquecino resultante se seca a vacío durante una hora. Rendimiento: 1.05 g, 78%. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, THF, 25°C): δ 1.19 (s, 6H, CMe_2), 1.50, 1.91 (m, 2H cada uno, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.74, 4.87 (m, 1H cada uno, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.46, 5.48 (m, 2H cada uno, C_5H_4), 5.73 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) ppm.

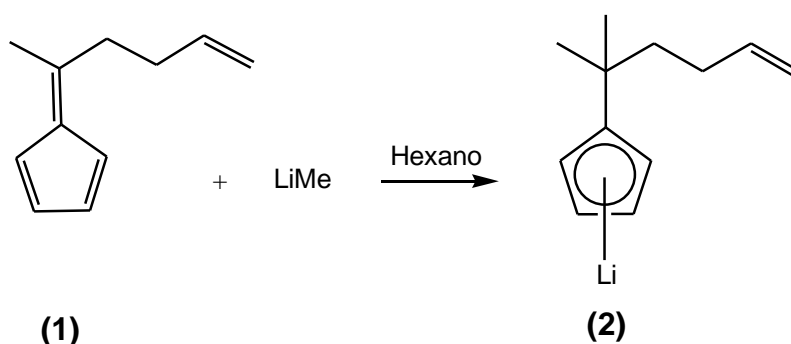


Figura 20. Síntesis del derivado litiado 2

4.3.4 SÍNTESIS DE $\text{C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)$ (3)

Sobre una suspensión de $\text{Li}\{\text{C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))\}$ (1.40 g, 8.34 mmol) en THF se añade SiMe_3Cl (1.30 mL, 10.26 mmol) durante 5 minutos a 0°C. Se deja que la reacción alcance temperatura ambiente y se deja en agitación durante un periodo de 4 a 6 horas (Figura 21). Transcurrido este tiempo, se elimina el THF a vacío y el sólido aceitoso resultante se extrae con hexano. Se filtra entonces la sal insoluble de LiCl y el hexano del filtrado se evapora, obteniendo un sólido aceitoso de color amarillo. Rendimiento: 1.73 g, 89%. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, para el isómero predominante): δ -0.03 (s, 9H, SiMe_3), 1.18 (s, 6H, CMe_2), 1.59 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.94 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.24 (s, 1H, $\text{C}_5\text{H}_3\text{H}$), 4.80-5.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.82 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.06, 6.45, 6.59, (m, 1H cada uno, $\text{C}_5\text{H}_3\text{H}$) ppm.

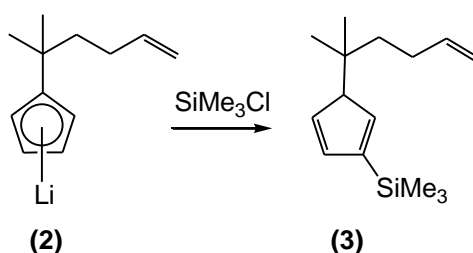


Figura 21. Síntesis del derivado 3

4.3.5 SÍNTESIS DEL DERIVADO LITIADO $\text{Li}\{\text{C}_5\text{H}_3(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)\}$ (4)

A una disolución de $\text{C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)$ (1.73 g, 7.42 mmol) en hexano se le adiciona gota a gota, con agitación y a -78°C , 5.10 mL (8.16 mmol, 1.60 M en hexano) de LiBu^n . La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente (Figura 22). Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a vacío, quedando en el matraz Schlenk el derivado litiado correspondiente, que se lava con hexano (2×50 mL) y se seca a vacío. Rendimiento: 1.59 g, 89%. ^1H -RMN (400 MHz, THF, 25°C): δ 0.10 (s, 9H, SiMe_3), 1.21 (s, 6H, CMe_2), 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.92 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.75-4.90 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.77-5.84 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ y C_5H_3) ppm.

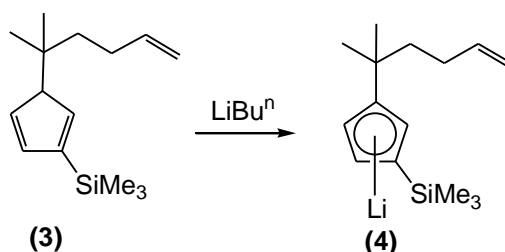


Figura 22. Síntesis del derivado 4

4.3.6 SÍNTESIS DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))\}\text{Cl}_2]$ (5)

Se pesan 1.05 g (6.24 mmol) del derivado litiado $\text{Li}\{\text{C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))\}$ (2) en la caja seca para asegurarse de que el compuesto se manipula en todo momento bajo condiciones de atmósfera inerte. Se añaden 100 mL de THF al derivado litiado y se adiciona esta disolución gota a gota durante 15 minutos a una disolución de $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ (1.40 g, 6.43 mmol) en THF (150 mL) a 0°C . La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente (Figura 23). Transcurrido este tiempo se elimina el disolvente (THF) a vacío y el sólido aceitoso resultante se extrae con una mezcla tolueno-hexano (9:1). La mezcla se filtra para eliminar la sal insoluble de LiCl y el filtrado se concentra hasta un pequeño volumen (aproximadamente 10 mL). La disolución se enfría a unos -28°C para obtener el producto por cristalización a baja temperatura. Rendimiento: 1.02 g, 84%. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ 1.36 (s, 6H, CMe_2), 1.54, 1.75 (m, 2H cada uno, CH_2CH_2), 4.90, 4.94 (dd, 1H cada uno, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.70 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.50, 6.61 (m, 2H cada uno, C_5H_4), 6.57 (s, 5 H, C_5H_5). Análisis elemental ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{Ti}$) = calculado (C: 59.16, H: 6.43 %); experimental (C: 59.02, H: 6.14 %).

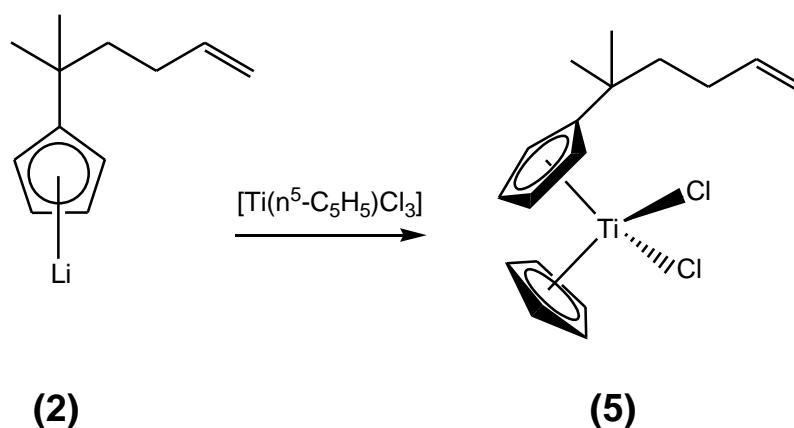


Figura 23. Síntesis del compuesto 5

4.3.7 SÍNTESIS DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_3(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)\}]$ (6)

Para sintetizar $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_3(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)\}]$ se procede de la misma manera que para la síntesis del compuesto **5**, utilizando las siguientes cantidades: 0.41 g (3.78 mmol) de $\text{Li}\{\text{C}_5\text{H}_3(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))(\text{SiMe}_3)\}$ y 0.38 g (1.74 mmol) de $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ (Figura 24). Rendimiento: 0.71 g, 72%. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25°C , para el isómero predominante): δ 0.27 (s, 9H, SiMe_3), 1.32, 1.34 (s, 3H cada uno, CMe_2), 1.50-1.85 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.87-4.92 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.65 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.58 (s, 5H, C_5H_5), 6.69, 6.81, 7.05 (m, 1H cada uno, C_5H_3) ppm. Análisis elemental ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{SiTi}$) = calculado (C: 57.56; H: 7.25 %); experimental (C: 57.39; H: 7.11 %).

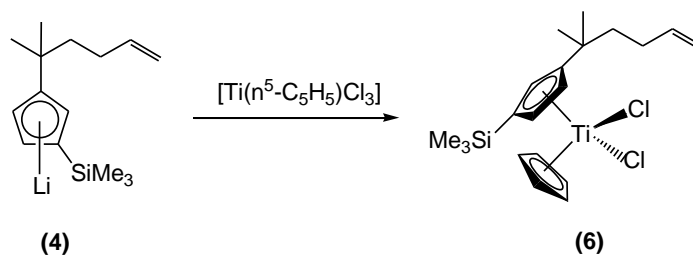


Figura 24. Síntesis del compuesto 6

4.3.8 SÍNTESIS DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\{\text{CMe}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2\})_2\text{Cl}_2]$ (7)

Una disolución del derivado litiado $\text{Li}\{\text{C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2))\}$ (0.76 g, 4.52 mmol) en THF (20 mL), se adiciona gota a gota durante 15 minutos sobre una disolución de $[\text{TiCl}_4(\text{THF})_2]$ (0.77 g, 2.31 mmol) en THF (50 mL) a 0°C (Figura 25). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas y posteriormente se elimina el disolvente a vacío. Al aceite resultante se le añade tolueno (120 mL) y se filtra (para eliminar el LiCl). La mezcla final obtenida (20 mL) se concentra y se deja a -30°C , obteniendo cristales rojos del complejo que se separan por filtración. Rendimiento: 0.69 g, 40%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ 1.39 (s, 12H, CMe_2), 1.56, 1.76 (m, 8H, CH_2CH_2), 4.89 (*cis*), 4.94 (*trans*) (dd, $^3J_{\text{cis}} = 10.2$ Hz, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 5.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$), 6.55, 6.72 (m, 8H, C_5H_4). Análisis elemental ($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{Ti}$) = calculado (C: 65.32; H: 7.77 5); experimental (C: 65.00; H: 7.69 %).

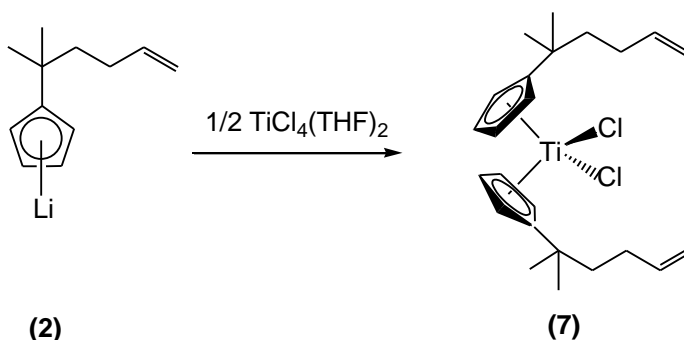


Figura 25. Síntesis del compuesto 7

4.4 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

4.4.1 FUNDAMENTOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

La voltametría cíclica es una técnica electroanalítica muy usada e importante. Aunque no está muy extendida en el análisis cuantitativo, es de considerable aplicación en el estudio de reacciones de oxidación/reducción, detección de productos intermedios de reacción y la observación de reacciones de seguimiento de productos formados en los electrodos. En la voltametría cíclica, el potencial aplicado se barre primero en una dirección y luego en la otra, mientras se mide la corriente. Un experimento de voltametría cíclica puede abarcar un ciclo completo, un ciclo parcial o varios ciclos. Durante un experimento de voltametría cíclica, la respuesta de corriente de un pequeño electrodo fijo en una disolución no agitada se excita mediante una onda triangular de potencial, como se ilustra en la Figura 26. La forma de onda triangular produce el barrido directo e inverso. En el ejemplo de la Figura 26, el potencial se varía primero de forma lineal, de +0.8 V a -0.15 V frente a un electrodo de calomelanos saturado, punto en el cual se invierte la dirección del barrido y el potencial regresa a su valor original, de +0.8 V. La velocidad de barrido en ambas direcciones es de 50 mV/s en el ejemplo. El ciclo suele repetirse varias veces. Los potenciales a los que se realiza la inversión (-0.15 V y +0.8 V en este caso) se llaman potenciales de cambio. En un experimento dado, estos potenciales se seleccionan de modo que se pueda observar la oxidación o reducción controladas por difusión de una o más especies. Según la composición de la muestra, la dirección del barrido inicial puede ser negativa, como la mostrada en la figura 26, o positiva. Un barrido en la dirección de potenciales más negativos se llama barrido directo, y en la dirección opuesta, barrido inverso. En general, la duración del ciclo varía desde 1 ms o menos hasta 100 s o más. En el ejemplo, es de 40 s. (Skoog y col., 2005)

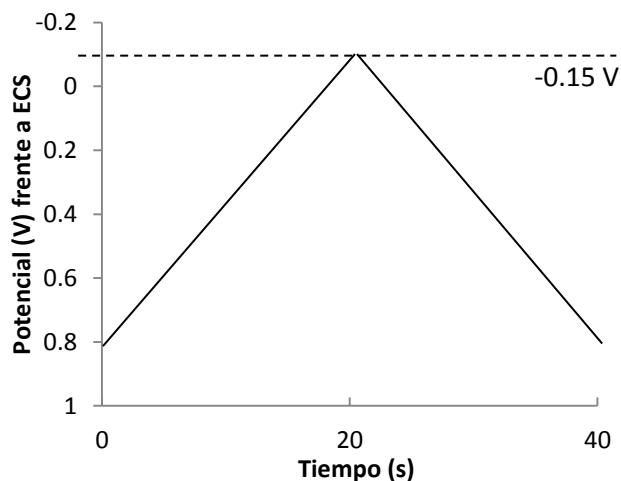


Figura 26. Señal de excitación de voltametría cíclica

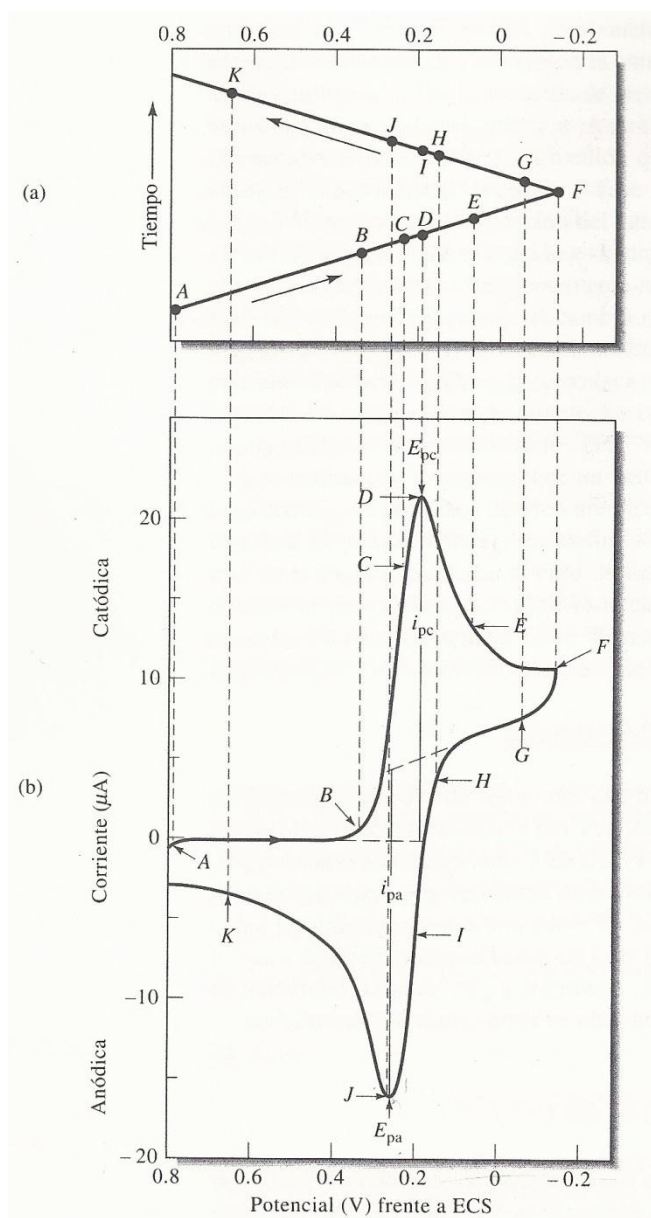
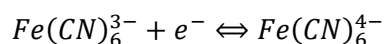


Figura 27. (a) Forma de onda de potencial frente a tiempo y (b) voltamograma cíclico para una disolución de 6.0 mM en $K_3Fe(CN)_6$ y 1.0 M en KNO_3

En la Figura 27 se muestra la respuesta de corriente al someter una disolución 6 mM en $K_3Fe(CN)_6$ y 1 M en KNO_3 a la señal de excitación cíclica que se ilustra en la Figura 27. El electrodo de trabajo es un electrodo de platino fijo, cuidadosamente pulido, y el electrodo de referencia es un electrodo saturado de calomelanos. Al potencial inicial de +0.8 V, se observa una pequeña corriente anódica que disminuye de inmediato hasta cero al continuar el barrido. Esta corriente negativa inicial se debe a la oxidación del agua para dar oxígeno. (Con potenciales más positivos, la corriente aumenta con rapidez y se vuelve considerable a +0.9 V aproximadamente). No se aprecia corriente a

los potenciales de +0.7 V a +0.4 V ya que en este intervalo de potenciales no hay especies oxidables o reducibles. Cuando el potencial se hace menos positivo que +0.4 V, comienza a desarrollarse una corriente catódica (punto B) que es debida a la reducción del ion ferricianuro a ion ferrocianuro. Entonces, la reacción catódica es:



En la región de B a D, y a medida que la concentración de superficie de $Fe(CN)_6^{3-}$ va siendo cada vez más pequeña, se produce un aumento rápido de la corriente. La corriente en el pico tiene dos componentes. Una corresponde al aumento de corriente inicial necesario para ajustar la concentración superficial del reactivo a su valor de equilibrio, según la ecuación de Nernst. La segunda componente es la corriente normal controlada por difusión. A continuación, la primera corriente disminuye rápidamente (puntos D a F), a medida que la capa de difusión se va extendiendo desde la superficie del electrodo. En el punto F (-0.15 V) se invierte la dirección del barrido. Sin embargo, la corriente sigue siendo catódica, pese a que el barrido es hacia potenciales más positivos, ya que los potenciales todavía son lo suficientemente negativos para provocar la reducción de los $Fe(CN)_6^{3-}$. Cuando el potencial cambia en dirección positiva, se interrumpe la reducción de los $Fe(CN)_6^{3-}$ y la corriente baja a cero y se hace entonces anódica. Esta corriente anódica se debe a la reoxidación de los $Fe(CN)_6^{4-}$ acumulados en la reacción anódica. Los parámetros importantes en un voltamograma cíclico son el potencial de pico catódico E_{pc} , el potencial de pico anódico E_{pa} , la corriente de pico catódica i_{pc} y la corriente de pico anódica i_{pa} . Las definiciones y medidas de estos parámetros se ilustran en la Figura 27. En el caso de una reacción de electrodo reversible, las corrientes de pico anódica y catódica son casi iguales en valor absoluto, pero de signo opuesto. En cuanto a una reacción de electrodo reversible a 25°C, se espera que la diferencia en los potenciales pico ΔE_p sea:

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = \frac{0.059}{n}$$

Donde n es el número de electrones que participan en la semirreacción. La irreversibilidad a consecuencia de una cinética lenta de transferencia de electrones hace que ΔE_p exceda el valor esperado. Una reacción de transferencia de electrones puede parecer reversible a una velocidad de barrido lenta, mientras que al aumentar la velocidad se obtienen valores crecientes de ΔE_p , signo claro de irreversibilidad. Por tanto, para detectar cinéticas lentas de transferencia de electrones y

obtener constantes de velocidad, se mide ΔE_p a diferentes velocidades de barrido. La información cuantitativa se obtiene de la ecuación de Randles-Sevcik, que a 25°C es:

$$i_p = 2.686 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot c \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2}$$

Donde i_p es la corriente de pico (en A), A es el área del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s), c es la concentración (mol/cm^3) y ν es la velocidad de barrido (V/s). Si se conocen la concentración, el área del electrodo y la velocidad de barrido, la voltametría cíclica es una forma de determinar los coeficientes de difusión.

El empleo principal de la voltametría cíclica consiste en obtener información cualitativa sobre procesos electroquímicos en condiciones diversas. Se usa mucho en química orgánica e inorgánica. Es frecuente que sea la técnica elegida en primera instancia para investigar un sistema con especies electroactivas. En muchos casos, el voltamograma cíclico revela la presencia de compuestos intermedios en reacciones de oxidación/reducción. En esta variante de la voltametría la utilización de electrodos de platino resulta habitual. Para potenciales negativos, pueden usarse electrodos de película de mercurio. Otros electrodos de trabajo muy usados son los de carbono vitrificado (glassy carbon, en inglés), oro, grafito y pasta de carbono. (Skoog y col., 2005)

4.4.2 METODOLOGÍA DE TRABAJO PARA LOS ESTUDIOS DE INTERACCIÓN MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Los estudios de interacción entre los compuestos titanoceno y las moléculas de interés biológico como ADN, bases nitrogenadas o nucleótidos se llevaron a cabo bajo condiciones de pH fisiológico (pH = 7.4). Para ello se preparó una disolución tampón de Tris-HCl y NaCl como electrolito pesando 2.92 g de NaCl y 0.79 g de Tris-HCl que se disolvieron en agua Milli-Q hasta 100 mL. El pH final se midió con un pHímetro, cuando el pH obtenido era más bajo del adecuado, se preparó una disolución de 100 mL de 50 mM de Tris elemental pesando 0.6 g de Tris elemental, disolviéndolo en agua Milli-Q y llevándolo a un matraz aforado de 100 mL y se añadió la disolución de Tris elemental gota a gota a la disolución tampón hasta llegar a un valor de pH de 7.4.

Se ha estudiado la interacción de los compuestos titanoceno **5**, **6** y **7** sintetizados en el laboratorio con las bases nitrogenadas citosina y timina, los nucleótidos adenosina y guanosina y

ADN de esperma de pez de cadena sencilla. También se ha estudiado la interacción del compuesto $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ con las mismas moléculas de interés biológico.

Para poder medir las disoluciones en el equipo y obtener el voltamograma correspondiente, es necesario preparar una disolución del derivado titanoceno que se quiera medir. Por razones de solubilidad, las disoluciones de los complejos metálicos se llevaron a cabo en 10% de DMSO y 90% de agua Milli-Q. El DMSO es necesario para disolver el complejo metálico ya que éste no se disuelve en agua. A la disolución también se le añadió NaCl 0.1 M como electrolito soporte. Todas las disoluciones fueron de 25 mL para lo cual se usaron las cantidades que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidades de reactivos utilizadas para la preparación de las disoluciones

	Volumen de la disolución (mL)	Concentración de la disolución (mM)	Cantidad de Compuesto (g)	Cantidad de NaCl (g)	Cantidad de DMSO (mL)	Cantidad de agua MilliQ (mL)
Disolución del compuesto 5	25	1	0.08	0.146	2.5	22.5
Disolución del compuesto 6	25	1	0.0104	0.146	2.5	22.5
Disolución del compuesto 7	25	1	0.011	0.146	2.5	22.5

Para trabajar con las moléculas de interés biológico se prepararon disoluciones madre de 50 mL de 0.05 M de guanosina, citosina, timina y adenosina pesando 0.71 g, 0.28 g, 0.32 g y 0.67 g respectivamente en disolución tampón (buffer) de Tris-HCl de pH = 7.4. A partir de la disolución madre se prepararon las disoluciones de 10, 20, 30 y 50 mM que se utilizaron durante los ensayos electroquímicos.

Para preparar la disolución de ADN de esperma de pez se tomaron 100 mg y se disolvieron en 100 mL de disolución tampón de pH = 7.4. Para conocer la concentración de la disolución de ADN se midió el espectro UV-Vis de la disolución y se utilizó la ley de Lambert-Beer donde A es la absorbancia medida en el equipo de UV-Vis, ϵ es la absorptividad molar que para el ADN es $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reichmann, y col., 1954) y b es el camino óptico de la cubeta (1 cm).

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

Se puede obtener la concentración de ADN al medir la absorbancia de la disolución madre, que se vio que estaba muy saturada, por lo que se diluyó 10 veces y se volvió a medir. Se obtuvo un valor de absorbancia de 2.382 a 260 nm. Este valor corresponde a una concentración de $3.6 \cdot 10^{-4}$ M por tanto la disolución madre tenía una concentración de $3.6 \cdot 10^{-3}$ M.

A partir de esta disolución se prepararon disoluciones de 25 mL de ADN de $5 \cdot 10^{-4}$ M, $7.5 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M y $2 \cdot 10^{-3}$ M que son las que se utilizaron para medir la interacción con los compuestos titanoceno.

Para estudiar las interacciones entre las moléculas de interés biológico y los complejos metálicos en el equipo de voltametría cíclica, en primer lugar se conectaron los electrodos en el equipo y se establecieron las condiciones de medida en el ordenador tal como se muestra en la Figura 28.

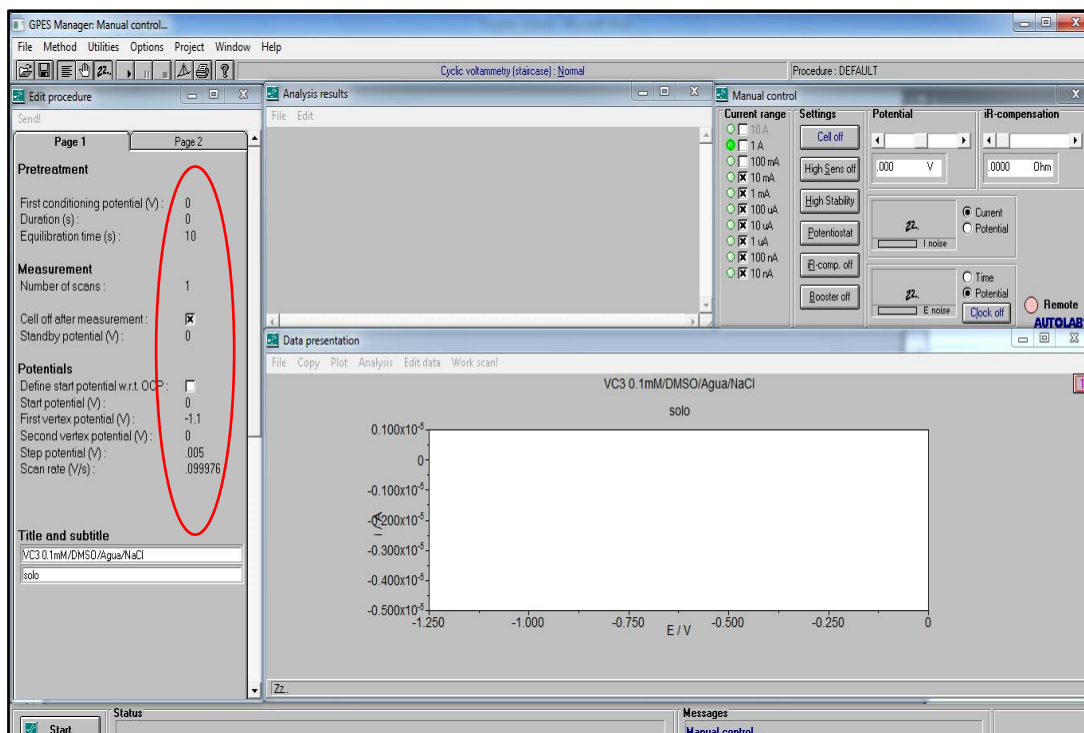


Figura 28. Condiciones de trabajo en el equipo electroquímico Autolab GPES

En primer lugar se obtuvo el voltamograma de la disolución del compuesto metálico en ausencia de moléculas de interés biológico. Para ello se añadieron 5 mL de la disolución del compuesto titanoceno previamente preparada y 5 mL de buffer. Se desoxigenaron las disoluciones mediante un burbujeo de gas nitrógeno durante 5 minutos y se procedió entonces a la medición obteniéndose así el voltamograma correspondiente utilizando cinco diferentes velocidades de barrido (100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mV/s). Al finalizar el ensayo, se han de pulir los electrodos de trabajo con una tela de pulido y alúmina proporcionados por el fabricante de los electrodos de trabajo (Metrohm). También se han de limpiar todos los electrodos y la celda con agua Milli-Q para proceder a la siguiente medida del compuesto metálico, esta vez en presencia de molécula de interés biológico. Se procede de la misma manera que en el caso anterior pero en vez de añadir 5 mL de buffer, se añadieron 5 mL de la disolución previamente preparada de la molécula de interés biológico que esté siendo estudiada (guanosina, citosina, timina, adenosina o ADN de esperma de pez).

La concentración de las disoluciones de molécula de interés biológico se fueron incrementando paulatinamente desde 10 mM a 50 mM.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS TITANOCENO

Los compuestos titanoceno **5**, **6** y **7** utilizados a lo largo de este Proyecto Fin de Carrera han sido sintetizados a partir del fulveno **1** que al reaccionar con LiMe forma el derivado litiado **2**. Este compuesto se utilizó para sintetizar los compuestos titanoceno **5** y **7** mediante reacción 2:1 y 1:1, con $\text{TiCl}_4(\text{THF})_2$ y $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ respectivamente. Para sintetizar el compuesto **6** que tiene un grupo trimetilsilil, fue necesaria la reacción del derivado litiado **2** con SiMe_3Cl para dar el ligando orgánico **3** y posteriormente con LiBu^n para formar el derivado litiado **4** correspondiente, que al reaccionar con $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_3]$ da lugar al compuesto titanoceno **6**. En la Figura 29 se puede ver el esquema específico de síntesis de los compuestos titanoceno estudiados.

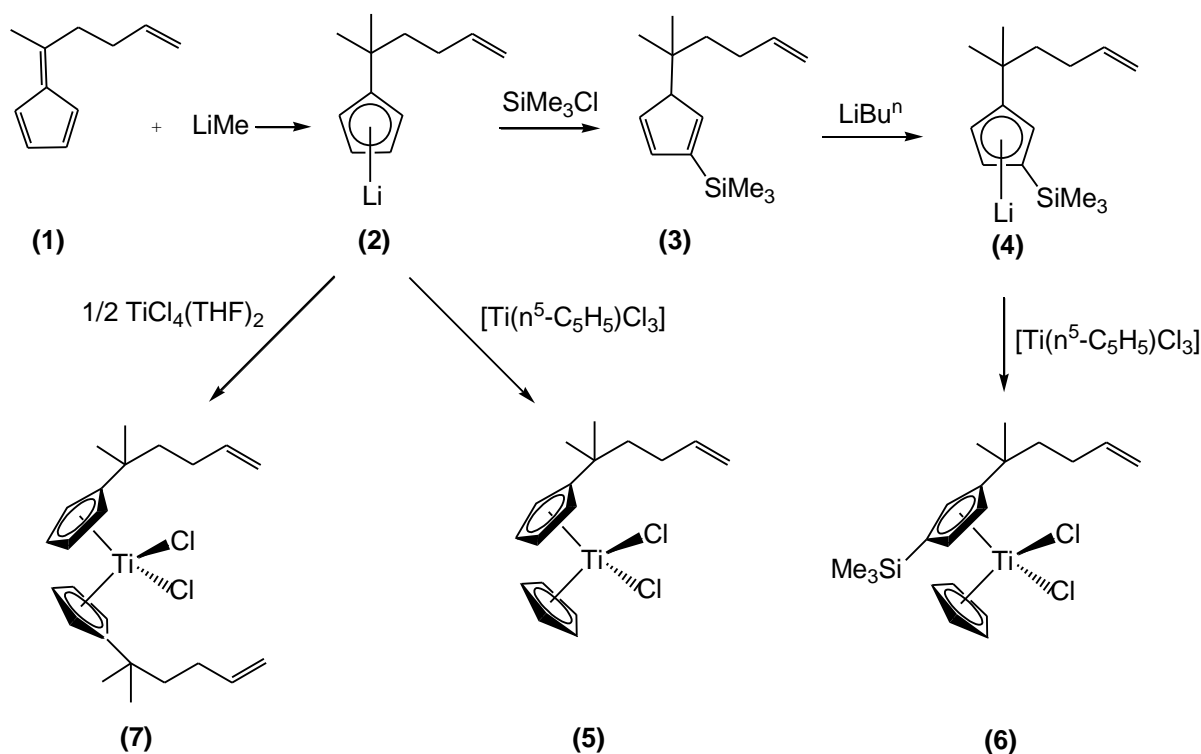


Figura 29. Esquema específico de síntesis de los compuestos titanoceno estudiados

Los compuestos titanoceno (**5-7**) se obtuvieron como sólidos cristalinos solubles en disolventes orgánicos como THF, tolueno y parcialmente en hexano. En algunos casos se hubo de utilizar la técnica de liofilización (congelación de aceites a temperatura de N_2 líquido) obteniéndose

finalmente un sólido de color rojo oscuro. Cada uno de los compuestos (5-7) se caracterizó mediante ^1H -RMN obteniéndose los espectros de las figuras 30, 31 y 32, respectivamente.

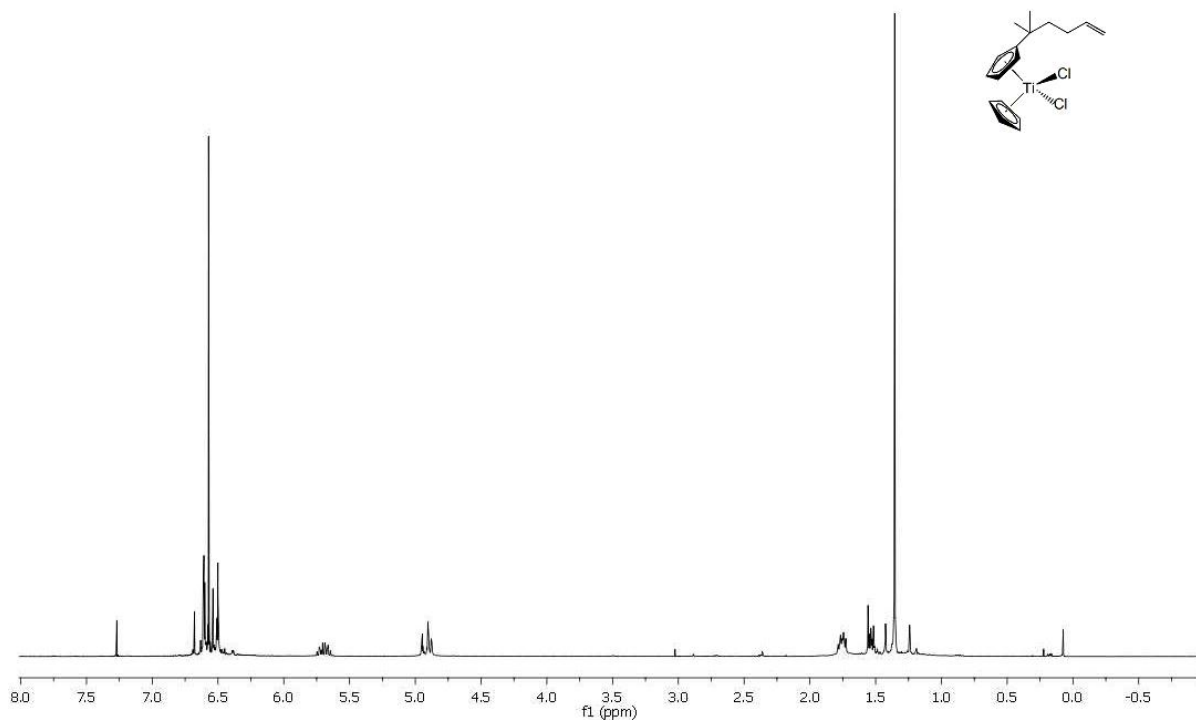


Figura 30. Espectro de ^1H -RMN del compuesto titanoceno 5

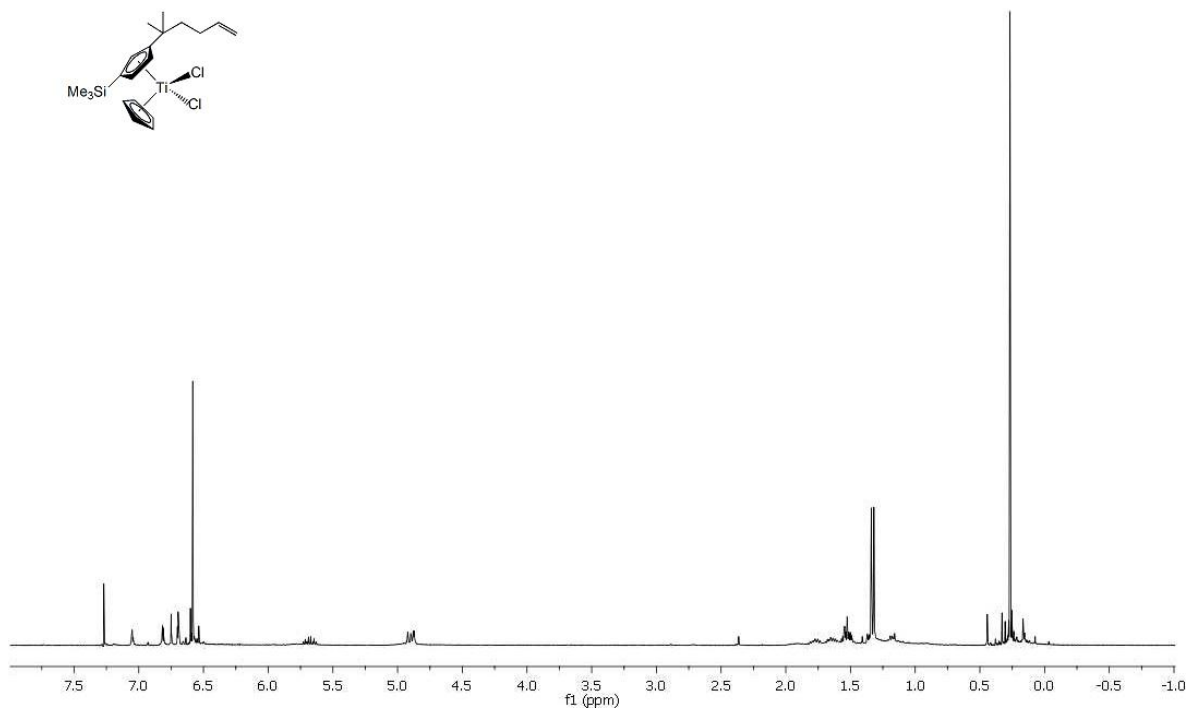


Figura 31. Espectro ^1H -RMN del compuesto titanoceno 6

En el espectro de ^1H -RMN de los compuestos titanoceno **5** y **6** se observa un singlete a aproximadamente 6.6 ppm correspondiente a los protones del anillo ciclopentadienilo sin sustituir. En el espectro del compuesto **5** se observan dos señales entre 6.4 y 6.6 ppm que corresponden a los dos tipos de protones magnéticamente equivalentes del anillo ciclopentadienilo monosustituido. En el caso del compuesto **6**, al tener un anillo ciclopentadienilo disustituido, se observan tres señales entre 6.6 y 7.2 ppm correspondientes a los protones de este anillo. Otra característica propia del compuesto **6** es la presencia del grupo SiMe_3 y los protones correspondientes a los metilos de este grupo son los que muestran un singlete a aproximadamente 0.25 ppm.

Además de estas señales, en los espectros se pueden ver otras señales correspondientes al sustituyente alqueno del anillo ciclopentadienilo. En el espectro del compuesto **5** se observa un singlete a aproximadamente 1.3 ppm correspondiente a los protones de los grupos metilo, dos multipletes entre aproximadamente 1.4 y 1.8 ppm correspondientes a los protones del grupo CH_2 y otros dos multipletes entre 4.8 y 5.8 ppm que corresponden a los protones olefínicos del sustituyente $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ del anillo ciclopentadienilo.

Para el compuesto **6**, al tener un sustituyente SiMe_3 en el anillo ciclopentadienilo, existen dos enantiómeros (R_{Cp} y S_{Cp}) debido a la quiralidad planar que presenta la molécula pero no se aprecian señales específicas en el espectro de ^1H -RMN ya que mediante esta técnica no se consigue diferenciar los enantiómeros, aunque el efecto de la quiralidad sí se observa en los grupos metilo del sustituyente alqueno, que debido a la quiralidad planar son diaesterotópicos y aparecen como dos señales singletes distintas. Ese desdoblamiento también se observa para los protones del C- β del sustituyente alqueno.

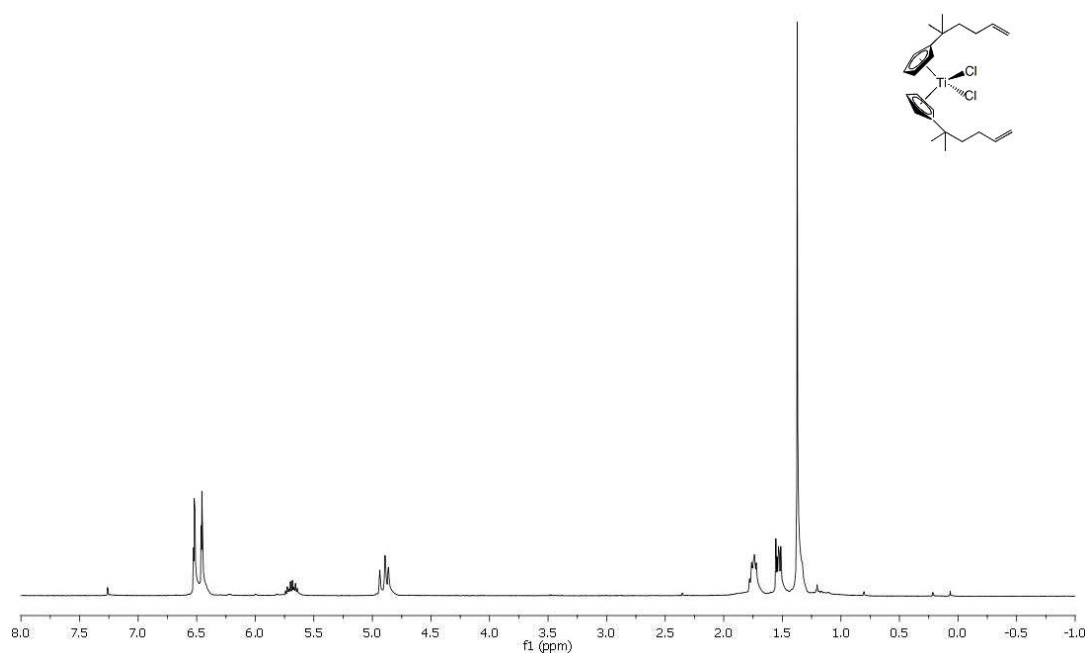


Figura 32. Espectro ^1H -RMN del compuesto titanoceno **7**

El compuesto **7**, $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\{\text{CMe}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2\})_2\text{Cl}_2]$, presenta un plano de simetría respecto al eje horizontal y en el espectro de ^1H -RMN de este compuesto se observa sólo un juego de señales para los dos anillos de ciclopentadienilo ya que son magnéticamente equivalentes. Se puede observar un singlete a 1.39 ppm correspondiente a los doce protones de los grupos CMe_2 de la molécula. También se observan dos multipletes a 1.56 y 1.76 ppm correspondientes a los ocho protones de los grupos CH_2CH_2 . Por otro lado, al haber un grupo olefínico en el sustituyente del anillo ciclopentadienilo, se observan dos dobletes a 4.89 y a 4.94 ppm correspondientes a los cuatro protones de los grupos $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$ en posición *cis* y *trans* respectivamente. También se puede ver un multiplete a 5.70 ppm correspondiente a los dos protones de los grupos $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$ y finalmente se observa un multiplete a 6.55 y 6.72 ppm correspondiente a los ocho protones de los dos anillos ciclopentadienilo de la molécula.

Con el fin de determinar la pureza de los compuestos titanoceno sintetizados se realizaron análisis elementales de carbono e hidrógeno, que mostraron que estos compuestos fueron obtenidos con un altísimo grado de pureza.

5.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE CITOTOXICIDAD DE LOS DERIVADOS TITANOCENO

En la Tabla 3 se muestran los datos de citotoxicidad de los compuestos titanoceno sintetizados y $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$. Todos estos datos se han obtenido de experimentos previamente realizados para estos compuestos en estudios publicados por el grupo de investigación del departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos. (Gómez-Ruiz y col., 2008; Gómez-Ruiz y col., 2009; Kaluđerović y col., 2010) Para estudiar la actividad citotóxica de estos compuestos se utiliza el parámetro IC_{50} que representa la concentración del compuesto necesaria (en μM) para matar un 50% de la población celular. Las líneas celulares que se han utilizado son tumorales de origen humano y son: 8505C (carcinoma anaplástico de tiroides), A549 (carcinoma de pulmón), DLD-1 (carcinoma de colon), HeLa (adenocarcinoma cervical) y K562 (leucemia mielógeno).

Tabla 3. Datos de citotoxicidad IC_{50} (μM) de los compuestos titanoceno, cisplatino y $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ frente a líneas celulares de origen humano.

Compuesto	$IC_{50} \pm SD$ [μM]				
	8505C	A549	DLD-1	HeLa	K562
5	103 ± 3	96 ± 3	71 ± 2	nd	nd
6	> 200	142 ± 5	131 ± 9	nd	nd
7	nd	nd	nd	86 ± 3	66 ± 4
$[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$	> 200	168 ± 3	> 200	> 200	> 200
Cisplatino	5.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4.4 ± 0.3	5.7 ± 0.3

nd = no disponible

Los resultados de estos ensayos muestran que el compuesto de referencia $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ es el menos citotóxico de todos al presentar mayores valores de IC_{50} para todas las líneas celulares estudiadas. Se puede ver que todos los otros compuestos (**5-7**) son activos frente a todas las líneas celulares estudiadas aunque el compuesto **6** para la línea celular 8505C presenta valores muy altos de IC_{50} indicando poca actividad en esa célula. Los compuestos más activos (citotóxicos) son los derivados **5** y **7**, que presentan citotoxicidades de $IC_{50} \leq 100 \mu M$, mientras que el compuesto **6** presenta valores de citotoxicidad mucho mayores ($IC_{50} > 130 \mu M$ en todos los casos).

Se puede observar que el compuesto **6** es menos citotóxico que el compuesto **5**, por lo que se podría concluir que la adición de un grupo SiMe_3 disminuye la citotoxicidad del compuesto. Además, todos los compuestos sintetizados presentan mejores datos de citotoxicidad (menor IC_{50}) que el compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ por lo que se puede afirmar que la adición de sustituyentes en los anillos ciclopentadienilo mejora la actividad anti-cáncer de los compuestos.

Por otro lado, en comparación con el cisplatino, se puede ver que todos los compuestos titanoceno son menos activos que éste, lo cual es de esperar dado la alta actividad anti-cáncer de los complejos de platino. Aun así, los resultados obtenidos con los compuestos titanoceno son bastante prometedores ya que aunque no presenten datos de citotoxicidad tan buenos como el cisplatino, se sabe que los compuestos de titanio se toleran con mayor facilidad en dosis más altas, pues no tienen tantos efectos secundarios como ocurre con el cisplatino.

En principio, teniendo en cuenta que según la literatura el ADN es el objetivo biológico de los compuestos titanoceno, y en vista de los resultados de citotoxicidad obtenidos, se podría pensar que los compuestos **5** y **7** deben presentar un grado de interacción mayor con los distintos fragmentos moleculares constituyentes del ADN (bases nitrogenadas, nucleótidos, etc.) y con la propia molécula de ADN.

5.3 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE LOS DERIVADOS TITANOCENO CON MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Este estudio se ha llevado a cabo con el fin de observar la posible interacción de los compuestos titanoceno con diferentes moléculas de interés biológico, para observar si existe una posible relación entre el grado de interacción (medido mediante voltametría cíclica) y su citotoxicidad (discutido en el apartado 5.2).

Las moléculas de interés biológico que se han utilizado durante los ensayos de voltametría cíclica fueron guanosina, citosina, timina, adenosina y ADN de esperma de pez de cadena sencilla. Todos los voltamogramas se obtuvieron utilizando la modalidad de voltametría cíclica lineal con un electrodo de trabajo de glassy carbón (GC), uno de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de Pt. Los ensayos electroquímicos se llevaron a cabo utilizando varias concentraciones de compuestos titanoceno, bases nitrogenadas y ADN a diferentes velocidades de barrido.

5.3.1 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$

5.3.1.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$

El estudio mediante voltametría cíclica del derivado $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ en presencia y ausencia de moléculas de interés biológico se ha realizado utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vitrificado “glassy carbon” en una disolución acuosa de DMSO al 10% con NaCl con una concentración de 0.1 M como electrolito soporte. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl y como contraelectrodo, uno de platino. En todos los estudios llevados a cabo, la medida electroquímica se ha realizado utilizando disoluciones recién preparadas.

Los datos encontrados en bibliografía (Ravera y *col.*, 2009) establecen que el derivado $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ se hidroliza rápidamente en disolución acuosa para generar la especie catiónica $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$. Puesto que la reacción de hidrólisis del primer ligando cloruro es muy rápida y la vida media de la especie catiónica generada se estima en unos 50 minutos, al igual que otros autores (Ravera y *col.*, 2009) se propone que la especie mayoritaria presente en la disolución es $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$, la cual es, por tanto, la especie electroactiva.

Como puede observarse en la Figura 33, al realizar un barrido desde potencial 0 a valores negativos a una velocidad de barrido (ν) de 100 mV/s, el derivado titanoceno en disolución acuosa muestra una semionda de reducción (semionda 1 en la Figura 33) de [Ti(IV)/Ti(III)] con un valor de potencial catódico E_{p_c} de -0.459 mV y otra de oxidación (semionda 2 en la Figura 33) de [Ti(III)/Ti(IV)] con un valor de potencial anódico E_{p_a} de -0.343 mV. Los datos electroquímicos correspondientes a este ensayo se muestran en la Tabla 4. A partir de estos datos se puede ver que el valor del potencial formal E^0 es independiente del valor de la velocidad de barrido. El valor del potencial formal del proceso global se calcula a partir de la representación de E^0 frente a la velocidad de barrido, obteniéndose un valor de $E^0 = -0.40$ V, al extrapolar el valor correspondiente a $\nu = 0$ mV/s. El valor del cociente entre la intensidad catódica y anódica es próximo a la unidad y la diferencia de potencial entre picos (ΔE) se encuentra dentro del intervalo 116-218 mV indicando que se trata de un proceso cuasi-reversible, es decir, existe una reacción química asociada a la reacción electroquímica y por lo tanto, la especie de Ti(III) electrogenerada no es químicamente estable y evoluciona en el seno de la disolución.

Tabla 4. Datos electroquímicos de una disolución de $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ (10mM)

ν (V/s)	E_{p_c} (reducción, semionda 1, V)	E_{p_a} (oxidación, semionda 2, V)	E^0 (V)	ΔE (mV)	I_p^c (semionda 1, A)	I_p^a (semionda 2, A)	I_p^c (semionda 1) / I_p^a (semionda 2)
0.1	-0.459	-0.343	-0.40	116	$6.75 \cdot 10^{-5}$	$6.40 \cdot 10^{-5}$	1.05
0.2	-0.473	-0.335	-0.40	138	$8.64 \cdot 10^{-5}$	$8.66 \cdot 10^{-5}$	1.00
0.3	-0.483	-0.330	-0.41	153	$1.02 \cdot 10^{-4}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	1.00
0.4	-0.493	-0.325	-0.41	168	$1.14 \cdot 10^{-4}$	$1.14 \cdot 10^{-4}$	1.00
0.5	-0.498	-0.320	-0.41	178	$1.23 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	1.00
1.0	-0.523	-0.305	-0.41	218	$1.59 \cdot 10^{-4}$	$1.57 \cdot 10^{-4}$	1.01

Nota: $E^0 = E_{p_a} + E_{p_c} / 2$; $\Delta E = E_{p_a} - E_{p_c}$

Los valores de ν (en V/s) corresponden a la velocidad de barrido, los valores de E_{p_c} y E_{p_a} (en V) representan el potencial catódico y anódico respectivamente; E^0 (en V) es el potencial formal del electrodo, ΔE (en V) es la diferencia entre los potenciales anódico y catódico, I_p^a y I_p^c (en A) son las intensidades de pico anódico y catódico respectivamente y I_p^c / I_p^a es el cociente entre las intensidades de pico catódico y anódico.

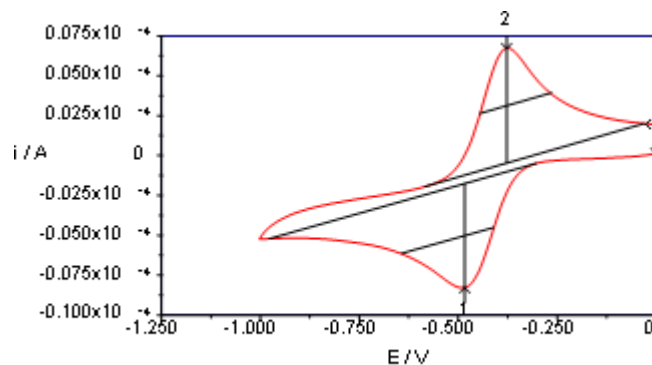
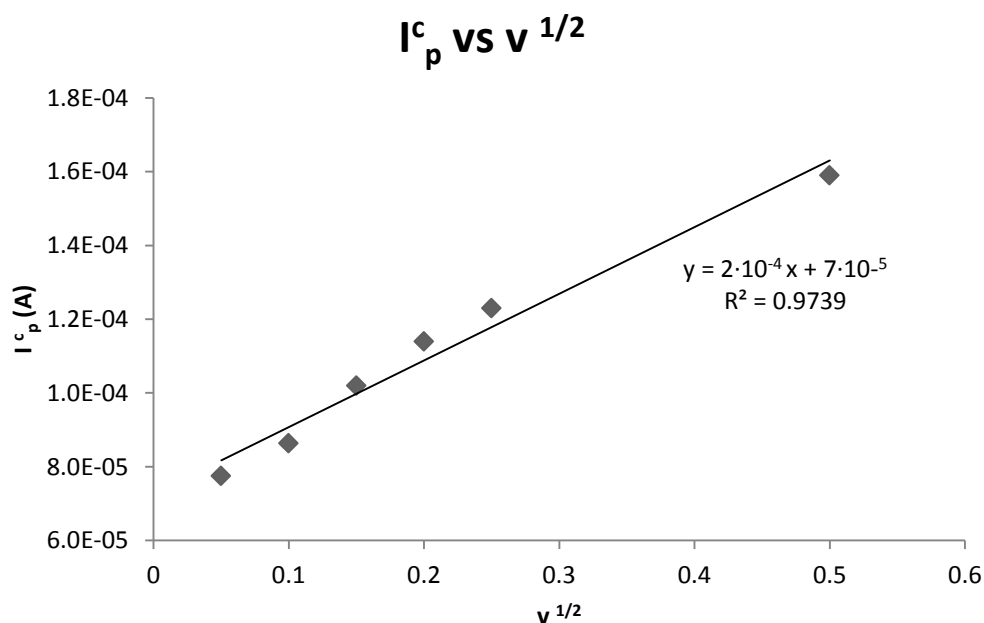


Figura 33. Ciclovoltamperograma de $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ 10 mM en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $v=100$ mV/s.(1): semionda de reducción. (2): semionda de oxidación.

Representando la intensidad de pico catódico (I_p^c) frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) se observa una relación lineal entre I_p^c y $v^{1/2}$ (Gráfica 1), lo que indica que se trata de un proceso controlado por difusión, en el que el mecanismo de transporte de la especie electroactiva se da desde el seno de la disolución a la superficie del electrodo de trabajo, tal como ocurre en los estudios realizados por Wang y colaboradores (Wang y col., 2003).



Gráfica 1. Relación entre I_p^c y $v^{1/2}$ para una disolución de $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ 10 mM en agua/DMSO 10%

Por otro lado, el coeficiente de difusión D del complejo $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ en las condiciones de trabajo utilizadas puede determinarse mediante la ecuación de Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.686 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot c \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2}$$

Donde i_p es la intensidad de pico (en A), n es el número de electrones transferidos en el proceso redox, A es el área del electrodo de trabajo (cm^2), c es la concentración de la especie electroactiva (mol/cm^3), D es el coeficiente de difusión (cm^2/s) y v es la velocidad de barrido (V/s). A partir de la gráfica 1, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9739$ y una pendiente $2 \cdot 10^{-4}$ y teniendo en cuenta que electrodo de trabajo utilizado tiene un diámetro de 2 mm, se calcula el coeficiente de difusión $D = 5.61 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

5.3.1.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ CON BASES NITROGENADAS Y NUCLEÓTIDOS

La adición de distintas moléculas de interés biológico a una disolución recién preparada del compuesto $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ a $\text{pH} = 7.4$ (pH fisiológico) provoca una disminución en la intensidad del pico de reducción y un desplazamiento del potencial de reducción hacia valores más negativos, tal y como se observa en las Figuras 34 y 35 para la interacción del derivado titanoceno con guanosina y timina, ambas a una concentración de 10 mM.

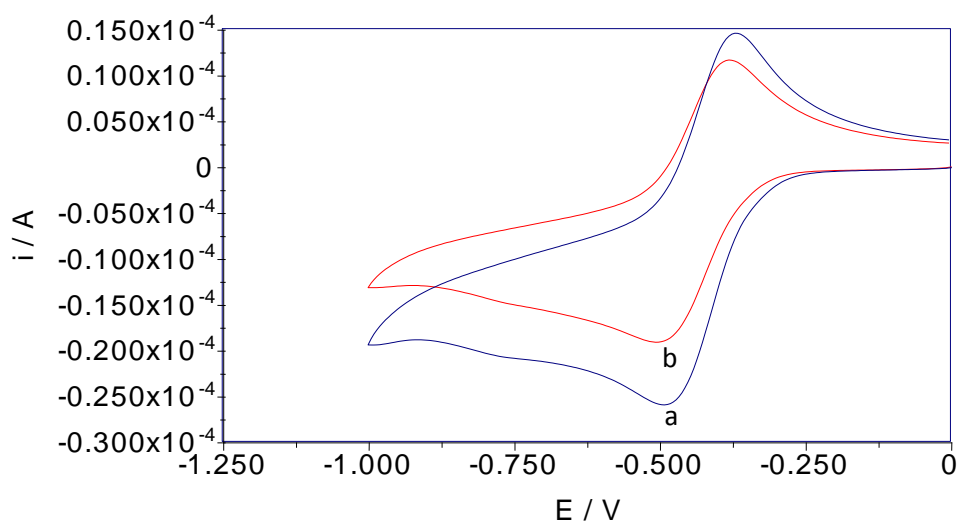


Figura 34. Ciclovoltamperograma de $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; $\text{pH} = 7.4$; $v = 100 \text{ mV}/\text{s}$ (a) antes y (b) después de la adición de guanosina 10 mM.

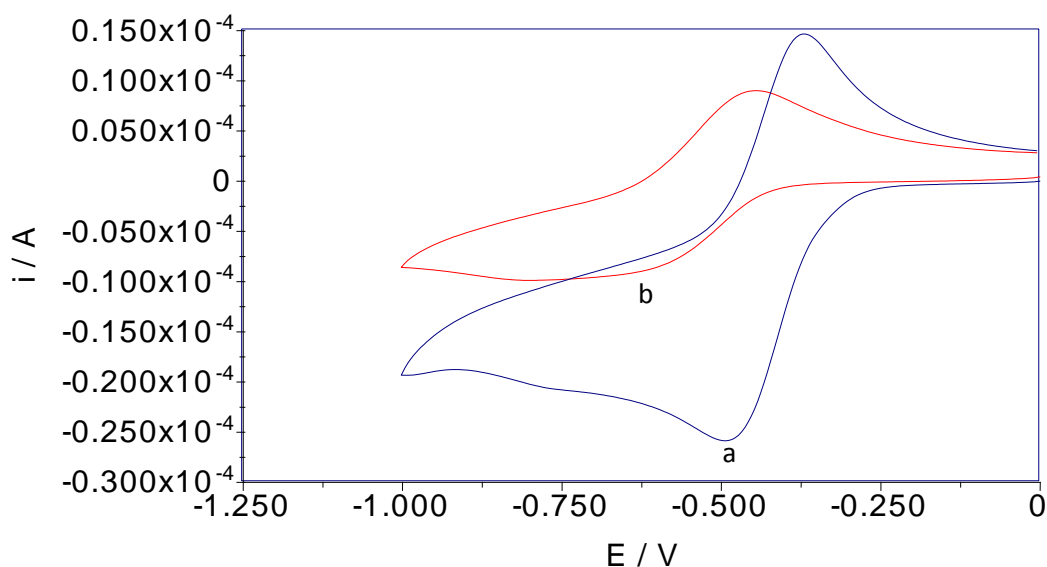


Figura 35. Ciclovoltamperograma de $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ 10 mM en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH = 7.4; $\nu = 100$ mV/s (a) antes y (b) después de la adición de timina 10 mM.

Este comportamiento se explica por la interacción entre el derivado titanoceno y la molécula biológica con la consiguiente formación de un complejo de mayor tamaño y con menor velocidad de difusión lo que se pone de manifiesto en un menor valor de D. A modo de ejemplo, para la interacción entre $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ y guanosina, el valor del potencial formal es de -0.43 V y el coeficiente de difusión calculado a partir de la pendiente de la recta obtenida al representar la intensidad de pico catódico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido es de $6.88 \cdot 10^{-7}$ cm²/s. Este valor se obtiene a partir de la representación gráfica y posterior análisis matemático de los datos de la Tabla 5.

Tabla 5. Datos electroquímicos de una disolución de $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$ (10 mM) y guanosina (10 mM)

ν (V/s)	E_p^c (reducción, semionda 1, V)	E_p^a (oxidación, semionda 2, V)	E^0 (V)	ΔE (mV)	I_p^c (semionda 1, A)	I_p^a (semionda 2, A)	I_p^c (semionda 1) / I_p^a (semionda 2)
0.05	-0.478	-0.383	-0.43	95	$9.34 \cdot 10^{-6}$	$9.32 \cdot 10^{-6}$	1.00
0.10	-0.483	-0.378	-0.43	105	$1.24 \cdot 10^{-5}$	$1.41 \cdot 10^{-5}$	0.88
0.20	-0.488	-0.373	-0.43	115	$1.73 \cdot 10^{-5}$	$1.94 \cdot 10^{-5}$	0.89
0.30	-0.499	-0.368	-0.43	131	$2.08 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	0.90
0.40	-0.499	-0.368	-0.43	131	$2.08 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	0.90
0.50	-0.509	-0.358	-0.43	151	$2.54 \cdot 10^{-5}$	$2.85 \cdot 10^{-5}$	0.89

Nota: $E^0 = E_{p_a} + E_{p_c} / 2$; $\Delta E = E_{p_a} - E_{p_c}$

5.3.1.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ CON ADN

En los ciclovoltamperogramas obtenidos (Figura 36) para los ensayos en presencia y en ausencia de ADN del derivado titanoceno en relación $[\text{ADN}]/[\text{Ti}] = 0.1$ y a pH 7.4, se observa que la adición de ADN no modifica el valor la intensidad de pico catódico ni el valor del potencial de reducción. El resto de parámetros de la medida permanece invariable, tal como el valor del potencial formal del electrodo que permanece constante en -0.43 V, la diferencia de potencial entre los picos catódico y anódico del sistema (ΔE) que varía entre 107 y 195 mV dependiendo de la velocidad de barrido y la relación entre I_p^c/I_p^a que es próxima a la unidad. Todos estos parámetros muestran el carácter cuasi-reversible del sistema. El coeficiente de difusión calculado para este ensayo fue de $1.11 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, que es inferior al valor del coeficiente de difusión calculado para la especie electroactiva generada por el derivado $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ ($D = 5.61 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) y superior al calculado para el complejo formado entre $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y guanosina ($D = 6.88 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$).

Este resultado coincide con lo encontrado en un estudio publicado anteriormente (Ravera y col., 2009) entre el derivado $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y ADN de cadena sencilla, demostrando que la intensidad de pico catódica varía de forma lineal con el pH y observándose una disminución de la intensidad de pico únicamente a valores de pH muy bajos (pH = 3).

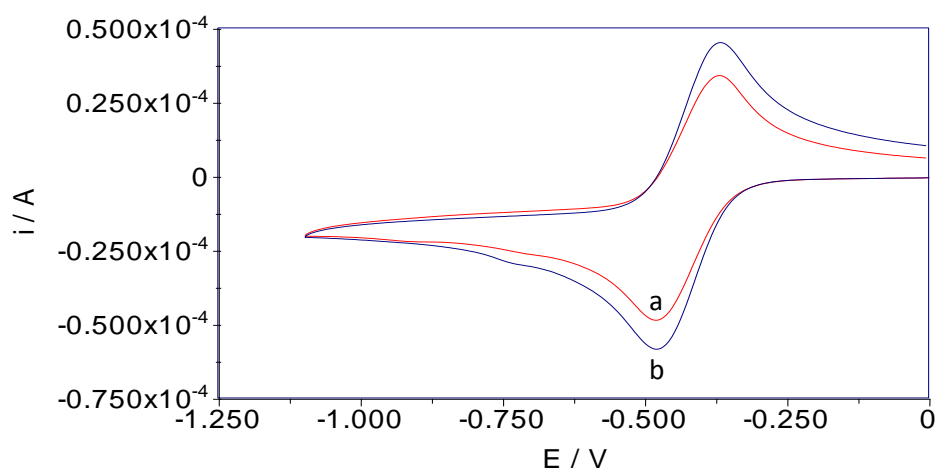


Figura 36. Ciclovoltamperogramas de $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH = 7.4; $\nu = 100 \text{ mV/s}$ (a) antes y (b) después de la adición de ADN 1 mM.

5.3.2 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5

5.3.2.1 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL COMPUESTO 5

La caracterización electroquímica del compuesto **5** en presencia y ausencia de moléculas de interés biológico se ha realizado utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vitrificado “glassy carbon” en una disolución acuosa de DMSO al 10% con un electrolito de NaCl en una concentración de 0.1 M. El electrodo de referencia utilizado ha sido un electrodo de Ag/AgCl y el contraelectrodo ha sido uno de platino. En todos los estudios llevados a cabo, la medida electroquímica se ha realizado utilizando disoluciones recién preparadas.

En primer lugar, se puede ver en el ciclovoltamperograma del compuesto **5** (Figura 38) un comportamiento reversible asociado al proceso de reducción oxidación [Ti(IV)/Ti(III)] y [Ti(IV)/Ti(III)], lo que pone de manifiesto la mayor estabilidad de la especie electrogenerada de Ti(III) en el medio de reacción respecto a la especie catiónica generada por la hidrólisis del derivado titanoceno la cual puede ser debida a la posible coordinación del doble enlace de la cadena alquénica al centro de titanio catiónico (Figura 37).

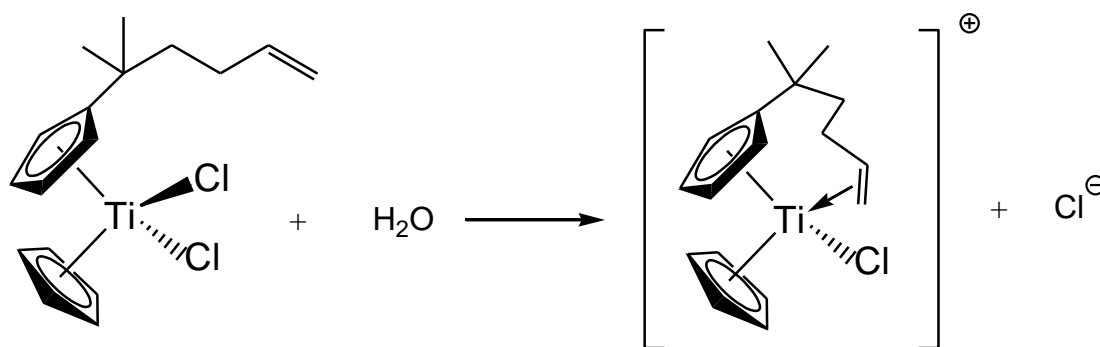


Figura 37. Reacción de hidrólisis del derivado titanoceno

En el ciclovoltamperograma también se aprecia una separación de picos entre 51 y 66 mV que depende de la velocidad de barrido y se puede ver que el cociente I_p^c/I_p^a es próximo a la unidad. El valor del potencial formal E^0 es de -0.49 V desplazado hacia valores más negativos respecto al titanoceno y el valor del coeficiente de difusión para este derivado es de $1.26 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Estos datos se han obtenido a partir del análisis matemático de los valores de la Tabla 6.

Tabla 6. Datos electroquímicos de una disolución del compuesto 5 (10 mM)

ν (V/s)	E_p^c (reducción, semionda 1, V)	E_p^a (oxidación, semionda 2, V)	E^0 (V)	ΔE (mV)	I_p^c (semionda 1, A)	I_p^a (semionda 2, A)	I_p^c (semionda 1) / I_p^a (semionda 2)
0.1	-0.514	-0.461	-0.49	53	$3.65 \cdot 10^{-6}$	$2.55 \cdot 10^{-6}$	1.43
0.2	-0.514	-0.463	-0.49	51	$4.02 \cdot 10^{-6}$	$4.27 \cdot 10^{-6}$	0.94
0.3	-0.514	-0.468	-0.49	46	$4.69 \cdot 10^{-6}$	$5.69 \cdot 10^{-6}$	0.82
0.4	-0.514	-0.458	-0.49	56	$5.56 \cdot 10^{-6}$	$6.97 \cdot 10^{-6}$	0.80
0.5	-0.514	-0.463	-0.49	51	$6.50 \cdot 10^{-6}$	$8.40 \cdot 10^{-6}$	0.77
1.0	-0.514	-0.448	-0.48	66	$1.47 \cdot 10^{-5}$	$2.52 \cdot 10^{-5}$	0.58

Nota: $E^0 = E_{p_a} + E_{p_c} / 2$; $\Delta E = E_{p_a} - E_{p_c}$

En este caso la sustitución de uno de los anillos ciclopentadienilo con un ligando sugiere que este derivado se reduce ligeramente peor que el derivado titanoceno, como consecuencia de las propiedades electrodonadoras del sustituyente en el anillo, así como de las posibilidades de coordinación del doble enlace del sustituyente alqueniilo.

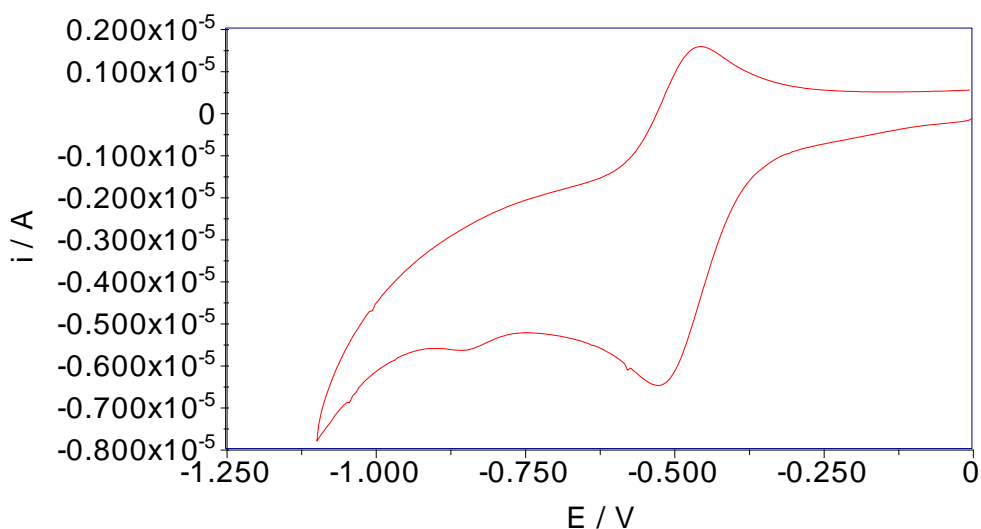


Figura 38. Ciclovoltamperograma del compuesto 5 10 mM en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH = 7.4; $\nu = 100$ mV/s.

5.3.2.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5 CON BASES NITROGENADAS Y NUCLEÓTIDOS.

La adición de distintas moléculas de interés biológico tal como la adenosina, citosina y guanosina a una disolución recién preparada del compuesto 5 provoca una disminución muy importante en la intensidad del pico de reducción, tal y como se observa en los

ciclovoltamperogramas de los ensayos realizados para estudiar la interacción entre el compuesto **5** con disoluciones recién preparadas de adenosina 50 mM (Figura 39), citosina 50 mM (Figura 40) y guanosina 30 mM (Figura 41) a pH 7.4.

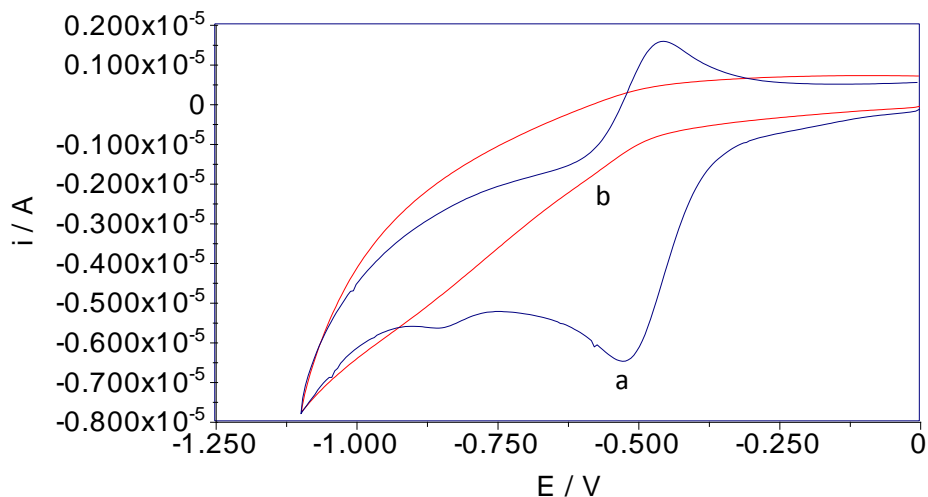


Figura 39. Ciclovoltamperogramas del complejo **5** (10 mM) en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $\nu=100$ mV/s (a) antes y (b) después de la adición de adenosina.

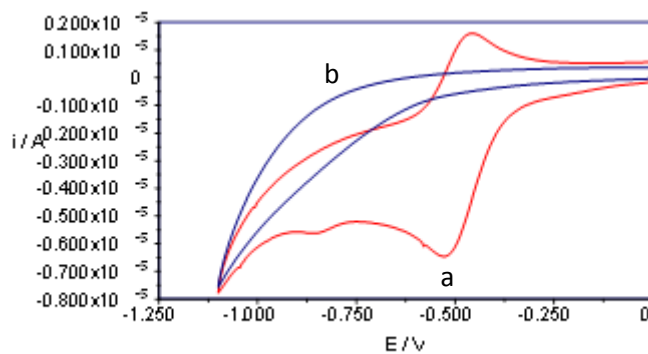


Figura 40. Ciclovoltamperogramas del complejo **5** (10 mM) en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $\nu=100$ mV/s (a) antes y (b) después de la adición de citosina.

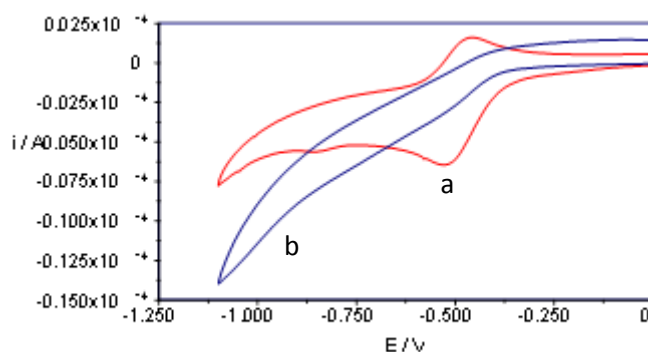


Figura 41. Ciclovoltamperogramas del compuesto **5** (10 mM) en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $\nu=100$ mV/s (a) antes y (b) después de la adición de guanosina.

En este caso no se tiene información suficiente para calcular los coeficientes de difusión de los procesos correspondientes a la interacción del compuesto **5** con bases nitrogenadas y nucleótidos. Aun así, se puede apreciar en los ciclovoltamperogramas que existe una interacción entre el compuesto **5** y las moléculas de interés biológico anteriormente mencionadas.

5.3.2.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5 CON ADN

Con respecto a la adición de ADN, se puede ver en el ciclovoltamperograma del compuesto **5** (Figuras 42 y 43) en presencia de esta molécula de interés biológico y con una relación $[\text{ADN}]/[\text{Ti}] = 0.1$ y a pH = 7.4 (pH fisiológico) que no existe una variación significativa del valor de potencial formal, cuyo valor es de -0.51 V, ni de la intensidad de pico de reducción, aunque sí se aprecia una ligera disminución del coeficiente de difusión calculado, que es $2.77 \cdot 10^{-9}$ cm²/s.

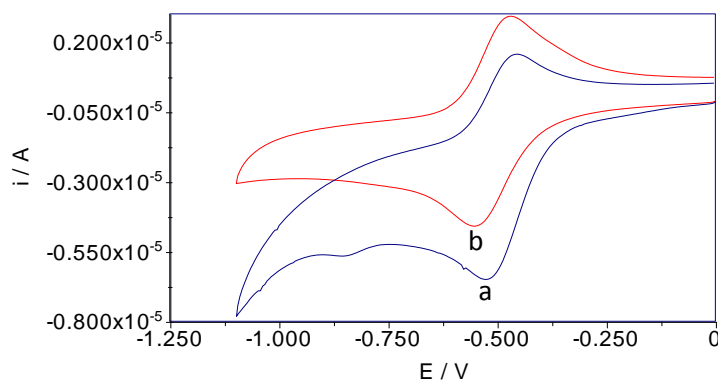


Figura 42. Ciclovoltamperograma del compuesto **5** (10mM) en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $\nu=100$ mV/s (a) antes y (b) después de la adición de ADN 1 mM.

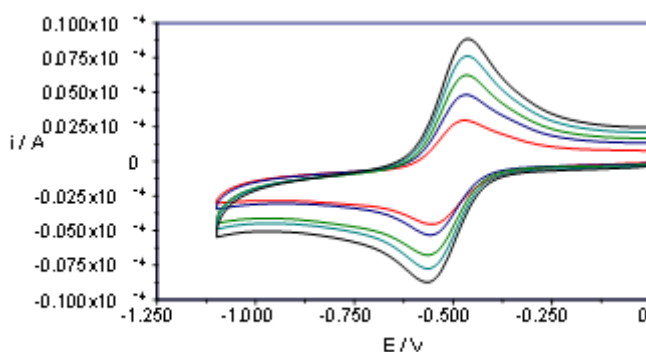


Figura 43. Ciclovoltamperogramas del compuesto **5** (10 mM) en agua/DMSO 10% y ADN 1 mM medidos a 100, 200, 300, 400 y 500 mV/s.

5.3.3 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS 6 Y 7

Con respecto a los compuestos **6** y **7**, el comportamiento electroquímico de las especies generadas por hidrólisis de estos compuestos muestra la existencia de procesos irreversibles y difícilmente reproducibles, lo que indica una menor estabilidad de las especies generadas y una menor vida media quizá debida a una mayor tendencia a la hidrólisis. A modo de ejemplo, en la Figura 44 se recoge el ciclovoltamperograma obtenido para una disolución acuosa de DMSO al 10% del compuesto **7**. Como se puede observar, la especie generada por hidrólisis muestra un comportamiento irreversible con una onda de reducción a potenciales muy negativos en comparación a los ya observados para las especies $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y para el compuesto **5**. Esto es quizá debido a la precipitación de algunas especies de titanio electroactivas en las mezclas acuosas, debido a la mayor carga hidrofóbica de los sustituyentes de los anillos ciclopentadienilo de los derivados titanoceno en los compuestos **6** y **7** en comparación con el compuesto $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y el compuesto **5**.

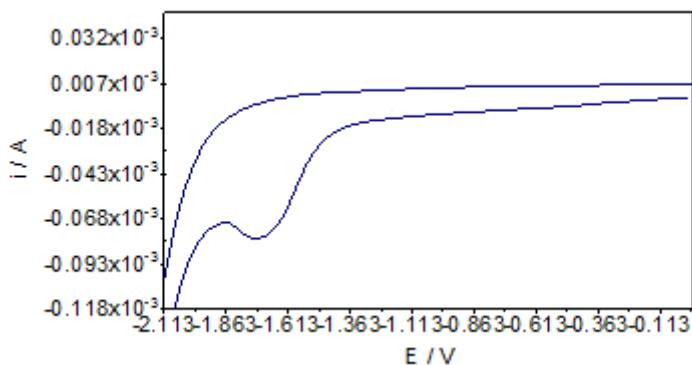


Figura 44. Ciclovoltamperograma del compuesto **7** (10 mM) en agua/DMSO 10% con NaCl 0.1 M como electrolito soporte; pH =7.4; $\nu=100\text{mV/s}$.

6. CONCLUSIONES

- Se han sintetizado tres complejos titanoceno (**5**, **6** y **7**) utilizando técnicas de Schlenk y se han caracterizado mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y análisis elemental de C e H, obteniéndose espectros de RMN y resultados de análisis en los cuales se observó que la síntesis de estos compuestos fue realizada con éxito y alta pureza.
- Se han utilizado datos de IC_{50} obtenidos en los ensayos previos, para comparar la actividad citotóxica de los compuestos titanoceno estudiados. Se observó que los compuestos con mayor citotoxicidad son los derivados **5** y **7**, mientras que el derivado **6** posee menor citotoxicidad.
- Todos los compuestos titanoceno sintetizados (**5-7**) tienen una mayor actividad citotóxica que el compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ por lo que se concluye que la adición de sustituyentes en los anillos ciclopentadienilo de esta molécula tiene efectos positivos en la actividad anti-cáncer de estos compuestos.
- Mediante los ensayos electroquímicos de voltametría cíclica se puede ver que existe interacción entre el compuesto de referencia $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ y las moléculas de interés biológico estudiadas (guanosina, citosina, timina, adenosina) ya que se aprecian disminuciones en los valores de las intensidades de pico catódico y desplazamientos de los potenciales de reducción hacia valores más negativos. No puede decirse lo mismo con respecto a la adición de ADN ya que no se modifican estos parámetros por lo que se concluye que este compuesto, en las condiciones estudiadas, no interacciona con el ADN de la misma manera que lo hace con las otras moléculas de interés biológico.
- Con respecto a los estudios de voltametría cíclica llevados a cabo con el compuesto **5**, se observó también una interacción entre este compuesto y las moléculas de interés biológico ya que, al igual que ocurría con el compuesto $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$, se aprecian disminuciones en los valores de las intensidades de pico catódico y se puede ver también que los potenciales de reducción se desplazan hacia valores más negativos. De la misma manera que ocurría con el $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$, no se aprecia una interacción entre el compuesto **5** y el ADN en las

condiciones estudiadas ya que no existen variaciones significativas del potencial de reducción y de la intensidad de pico catódico.

- Los ensayos de electroquímica llevados a cabo para los derivados **6** y **7** muestran un comportamiento no reversible con procesos difícilmente reproducibles quizá debido a una mayor tendencia a la hidrólisis y formación de especies insolubles con comportamiento electroquímico anómalo.
- El estudio electroquímico llevado a cabo muestra que no se puede establecer una correlación entre citotoxicidad y grado de interacción (medido mediante electroquímica) ya que existen muchos otros factores como las reacciones de hidrólisis, difusión celular y fuerza de enlace con proteínas de transporte que también tienen una influencia enorme en la actividad citotóxica de estos derivados, no solo la capacidad de interacción con las distintas moléculas componentes de las dianas biológicas.
- El siguiente paso en el estudio de la actividad anti-cáncer de estos derivados titanoceno sería estudiar estos compuestos con albúmina o HSA (human serum albumin) y transferrina o HST (human serum transferrin) para observar si estos derivados organometálicos son capaces de interactuar con estas proteínas de transporte, y esta interacción puede ser observada mediante técnicas electroquímicas.

7. TÉRMINOS ESPECÍFICOS DE BIOLOGÍA Y MEDICINA

A continuación se definen algunos términos importantes de biología y medicina que se utilizan a lo largo de este proyecto fin de carrera.

- **ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN).** El ácido desoxirribonucleico es una molécula de alto peso molecular (macromolécula) constituida por tres partes diferentes: un grupo fosfato, un monosacárido del tipo pentosa (la desoxirribosa) y una base nitrogenada cíclica que puede ser púrica (adenina o citosina) o pirimidínica (timina o guanina). La unión de la base nitrogenada con la pentosa forma un nucleósido. Éste, uniéndose al grupo fosfato forma un nucleótido. A su vez, la unión de los nucleótidos entre sí mediante un enlace diéster da lugar a un polinucleótido, que en este caso es el ácido desoxirribonucleico o ADN. Estructuralmente la molécula de ADN se presenta en forma de dos cadenas helicoidales arrolladas alrededor de un mismo eje. Estas cadenas están unidas en pares entre sí por las bases nitrogenadas (Figura 45). Existe también la posibilidad de encontrar cadenas sencillas de ADN, las cuales normalmente se tuercen para favorecer las interacciones entre las distintas bases nitrogenadas de la misma cadena.

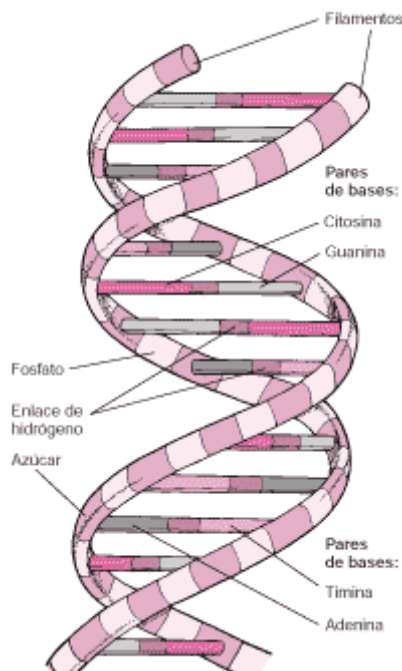


Figura 45. Doble hélice de ADN

- **CÁNCER.** Conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (conocidas como células cancerosas), con crecimiento y división más allá de los límites normales (invasión del tejido circundante y a veces, metástasis).
- **CARCINOMA.** Forma de cáncer con origen en las células de tipo epitelial o glandular de tipo maligno. Es el tipo más común de cáncer. Algunos carcinomas comunes se dan en la piel, la boca, el pulmón, las mamas, el estómago, el colon y el útero.
- **CIRUGÍA.** Tratamiento practicable cuando el tumor es de fácil acceso. Desgraciadamente, la metástasis no puede ser controlada con la cirugía dado que si el tumor se encuentra situado en órganos vitales, éstos no pueden ser extirpados.
- **CITOTOXICIDAD.** Cualidad de ser tóxico a células. Un ejemplo de agente citotóxico puede ser una sustancia química como el cisplatino, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$
- **IC₅₀.** Es una medida de la eficacia que tiene un compuesto para inhibir la función biológica o bioquímica. Este índice representa la cantidad de complejo requerida para aniquilar el 50% de la población celular estudiada, para ensayos donde se observa la evolución de la proliferación celular utilizando complejos con actividad anticancerosa. Cuanto menor es el índice IC₅₀, mayor es la efectividad antineoplásica del compuesto.
- **METÁSTASIS.** Propagación a distancia, por vía fundamentalmente linfática o sanguínea, de las células originarias del cáncer, que origina el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino de dicha metástasis. Estas propiedades diferencian a los tumores malignos de los benignos, que son limitados y no producen metástasis.
- **QUIMIOTERAPIA.** Empleo de fármacos en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas. Tiene como función impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos utilizados en estos tratamientos se denominan medicamentos citotásticos, citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El objetivo de este tratamiento es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes agentes quimioterapéuticos varía según la dosis que se administre. Debido a su

inespecificidad pueden afectar a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa. Por tanto, la quimioterapia es la utilización de diversos fármacos que tienen la propiedad de interferir con el ciclo celular, ocasionando la destrucción de células. (Figura 46).



Figura 46. Mecanismo de acción de la Quimioterapia.

- **RADIOTERAPIA.** Tratamiento oncológico que utiliza las radiaciones y y las partículas- α para eliminar las células tumorales, generalmente cancerígenas, en la parte del organismo donde se apliquen (tratamiento local). La radioterapia actúa sobre el tumor, destruyendo las células malignas e impidiendo su crecimiento y reproducción.
- **TRANSFERRINA.** Es una proteína del grupo de las globulinas que capta el hierro de los alimentos, lo acumula y transporta, constituyendo la principal proteína fijadora de hierro circulante.
- **TUMOR.** Generalmente se trata de cualquier protuberancia causada por el aumento en el número de células que lo componen. Puede ser benigno o maligno. Los malignos son los que están asociados al cáncer. Se clasifican en carcinomas, sarcomas y teratomas.

8. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Abeyasinghe, P.; Harding, M.; **Antitumor bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdenocene dichloride and derivatives.** *Dalton Trans.* **2007**, 3474-3482.
- Allen, O.; Croll, L.; Gott, A.; Knox, R.J.; McGowan, P.C.; **Functionalized Cyclopentadienyl Titanium Organometallic Compounds as New Antitumor Drugs.** *Organometallics.* **2004**, *23*, 288–292.
- Causey, P.W.; Baird, M.C.; Cole, S.P.C.; **Synthesis, Characterization, and Assessment of Cytotoxic Properties of a Series of Titanocene Dichloride Derivatives.** *Organometallics.* **2004**, *23*, 4486–4494.
- Chauhan, M.; Arjmand, F.; **Synthesis, characterization and interaction of a new chiral trinuclear complex [bis(aquodiaminotryptophanato) Cu^{II}-Sn^{IV}]chloride with calfthymus DNA.** *Transition Met. Chem.* **2005**, *30*, 481-487.
- Christodoulou, C.; Ferry, D.R.; Fyfe, D.W.; Young, A.; Doran, J.; Sheehan, T.M.T.; Eliopoulos, A.; Hale, K.; Baumgart, J.; Sab, G.; Kerr, D.J.; **Phase I trial of weekly scheduling and pharmacokinetics of titanocene dichloride in patients with advanced cancer.** *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2761–2769.
- Gielen, M.; Tiekink, E.R.T.; **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents.** Wiley. **2005**.
- Gómez-Ruiz, S.; Kaluđerović, G.N.; Prashar, S.; Polo-Cerón, D.; Fajardo, M.; Žižak, Ž.; Juranić, Z.D.; Sabo, T.J.; **Cytotoxic studies of substituted titanocene and *ansa*-titanocene anticancer drugs.** *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1558-1570.
- Gómez-Ruiz, S.; Kaluđerović, G.N.; Žižak, Ž.; Besu, I.; Juranić, Z.D.; Prashar, S.; Fajardo, M.; **Anticancer drugs based on alkenyl and boryl substituted titanocene complexes.** *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 1981-1987.

- Gómez-Ruiz, S.; **New directions in the fight against cancer: From metal complexes to nanostructured materials.** *Molecules at Work.* Ed. B. Pignataro, Wiley, **2011.**
- Guo, M.; Guo, Z.; Sadler, P.J.; **Titanium(IV) targets phosphoesters on nucleotides: implications for the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride.** *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 698-707.
- Guo, M.; Sadler, P.J.; **Competitive binding of the anticancer drug titanocene dichloride to *N,N'*-ethylenebis(*o*-hydroxyphenylglycine) and adenosine triphosphate: a model for Ti^{IV} uptake and release by transferrin.** *J. Chem. Soc.* **2000 (A)**, 7–9.
- Guo, M.; Sun, H.; McArdle, H.J.; Gambling, L.; Sadler, P.J.; **Ti^{IV} Uptake and Release by Human Serum Transferrin and Recognition of Ti^{IV} -Transferrin by Cancer Cells: Understanding the Mechanism of Action of the Anticancer Drug Titanocene Dichloride.** *Biochem.* **2000 (B)**, 39, 10023–10033.
- Hadjiliadis, N.; Sletten, E.; **Metal Complex-DNA Interactions.** Wiley. **2009.**
- Health at a Glance: Europe 2010. OECD, **2010.**
- Hejmadi, M.; **Introduction to Cancer Biology.** Momna Hejmadi & Ventus Publishing ApS, **2010.**
- Hogan, M.; Tacke, M.; **Titanocenes: Cytotoxic and Anti-angiogenic Chemotherapy Against Advanced Renal-Cell Cancer.** *Top. Organomet. Chem.* **2010**, 32, 119-140.
- Idainés F.; Matta, J.; Meléndez, E.; **Water-soluble molybdenocene complexes with both proliferative and antiproliferative effects on cancer cell lines and their binding interactions with human serum albumin.** *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, 14, 1109-1117.
- Kaluđerović, G.N.; Tayurskaya, V.; Paschke, R.; Prashar, S.; Fajardo, M.; Gómez-Ruiz, S.; **Synthesis, characterization and biological studies of alkenyl-substituted titanocene(IV) carboxylate complexes.** *Appl. Organomet. Chem.* **2010**, 24, 656-662.

- Köpf-Maier, P.; Köpf, H.; **Titanocene Dichloride—The First Metallocene with Cancerostatic Activity.** *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1979**, 18, 477-478.
- Köpf-Maier, P.; Hesse, B.; Voigtländer, R.; Köpf, H.; **Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of titanocene dihalides (C₅H₅)₂TiX₂ (X=F, Cl, Br, I, NCS) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug-induced side effects.** *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1980 (A)**, 97, 31-39.
- Köpf-Maier, P.; Leitner, M.; Köpf, H.; **Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene dichlorides.** *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1980 (B)**, 42, 1789-1791.
- Köpf-Maier, P.; Köpf, H.; **Tumor inhibition by titanocene dichloride: First clues to the mechanism of action.** *Naturwiss.*, **1980**, 67, 415-416.
- Köpf-Maier, P.; Wagner, W.; Köpf, H.; **Different inhibition pattern of the nucleic acid metabolism after in vitro treatment with titanocene and vanadocene dichlorides.** *Naturwiss.*, **1981**, 68, 272-273.
- Köpf-Maier, P.; Grabowski, S.; Liegener, J.; Köpf, H.; **New antitumor titanocene derivatives containing hydrophilic ligands.** *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 108, 99-103.
- Korfel, A.; Scheulen, M.E.; Schmoll, H.J.; Gründel, O.; Harstrick, A.; Knoche, M.; Fels, L.M.; Skorzec, M.; Bach, F.; Baumgart, J.; Sass, G.; Seeber, S.; Thiel E.; Berdel, W.E.; **Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors.** *Clin. Cancer Res.* **1998**, 4, 2701–2708.
- Muhammad, N.; Shah, A.; Rehman, Z.; Shuja, S.; Ali, S.; Qureshi, R.; Meetsma, A.; Tahir, M.N.; **Organotin(IV) 4-nitrophenylethanoates: Synthesis, structural characteristics and intercalative mode of interaction with DNA.** *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3431-3437.
- Ott, I.; Gust, R.; **Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs.** *Arch. Pharm.* **2007**, 340, 117–126.

- Potter, G.D.; Baird, M.C.; Chan, M.; Cole, S.P.C.; **Cellular toxicities of new titanocene dichloride derivatives containing pendant cyclic alkylammonium groups.** *Inorg. Chem. Commun.* **2006**, 9, 1114–1116.
- Ravera, M.; Gabano, E.; Baracco, S.; Osella, D.; **Electrochemical evaluation of the interaction between antitumoral titanocene dichloride and biomolecules.** *Inorg. Chim. Acta.* **2009**, 362, 1303-1306.
- Rauf, S.; Gooding, J.J.; Akhtar, K.; Ghauri, M.A.; Rahman, M.; Anwar, M.A.; Khalid, A.M.; **Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 37, 205-217.
- Reichmann, M.F.; Rice, S.A.; Thomas C.A.; Doty, P.; **A further examination of the molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid.** *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3047-3053.
- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T.; **Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.** *Nature.* **1965**, 205, 698-699.
- Rosenberg, N.; Van Camp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, V.H.; **Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents.** *Nature*, **1969**, 222, 385.
- Ruddon, R.W.; **Cancer Biology.** Oxford University Press, **2007**.
- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.; **Fundamentos de Química Analítica.** Thomson Editores España, **2005**.
- Strohfeldt, K.; Tacke, M.; **Bioorganometallic fulvene-derived titanocene anti-cancer drugs.** *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 1174-1187.
- Sun, H.; Li, H.; Weir, R.A.; Sadler, P.J.; **The First Specific TiIV–Protein Complex: Potential Relevance to Anticancer Activity of Titanocenes.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1577–1579.

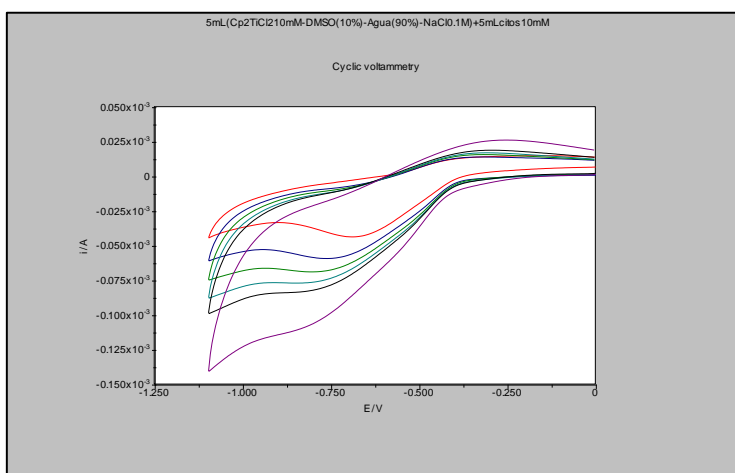
- Tabassum, S.; Bhat, I.; Arjmand, F.; **Synthesis of new heterometallic macromolecules: Their DNA binding, cleavage activity and *in vitro* model electrochemotherapy study.** *Spectrochim. Acta Part A.* **2009**, 74, 1152-1159.
- Tinoco, A.D.; Eames, E.V.; Valentine, A.M.; **Reconsideration of Serum Ti(IV) Transport: Albumin and Transferrin Trafficking of Ti(IV) and Its complexes.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 2262-2270.
- Tinoco, A.D.; Incarvito, C.D.; Valentine, A.M.; **Calorimetric, Spectroscopic, and Model Studies Provide Insight into the Transport of Ti(IV) by Human Serum Transferring.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 3444-3454.
- Wang, S.; Peng, T.; Yang, C.F.; **Investigation on the interaction of DNA and electroactive ligands using a rapid electrochemical method.** *J. Biochem. Biophys. Methods* **2003**, 55, 191-204.
- Willard, H.H.; Merritt, L.L.; Dean, J.A.; Settle, F.A.; **Métodos Instrumentales de Análisis.** Grupo Editorial Iberoamérica. **1991**.
- Zhang, K.; Liu, W.; **Investigation of the Electrochemical Interaction Behavior of DNA with 5-Fluorouracil Derivatives.** *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, 6, 1669-1678.

9. APÉNDICE

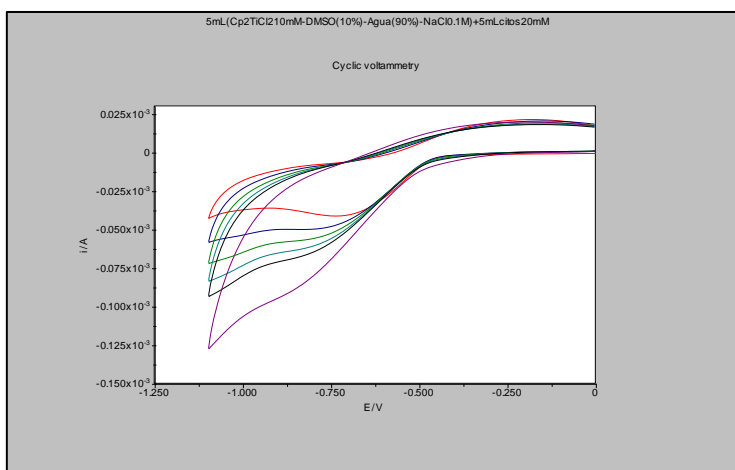
En este apéndice se muestran algunos de los voltamogramas obtenidos en los ensayos realizados a lo largo de este Proyecto Fin de Carrera.

9.1 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ CON MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

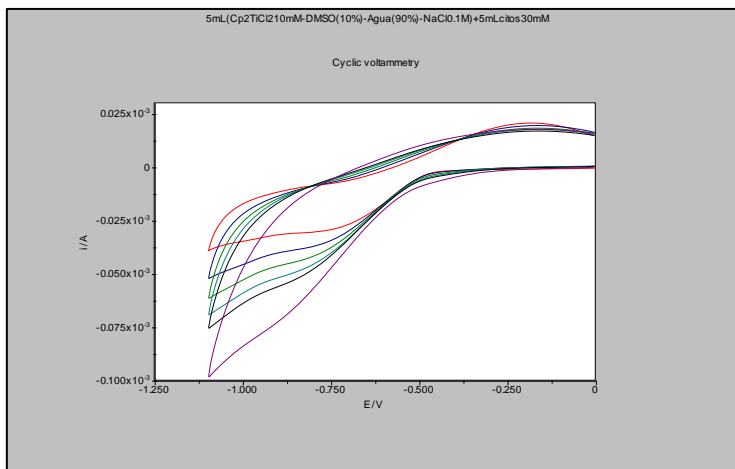
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Citosina 10 mM



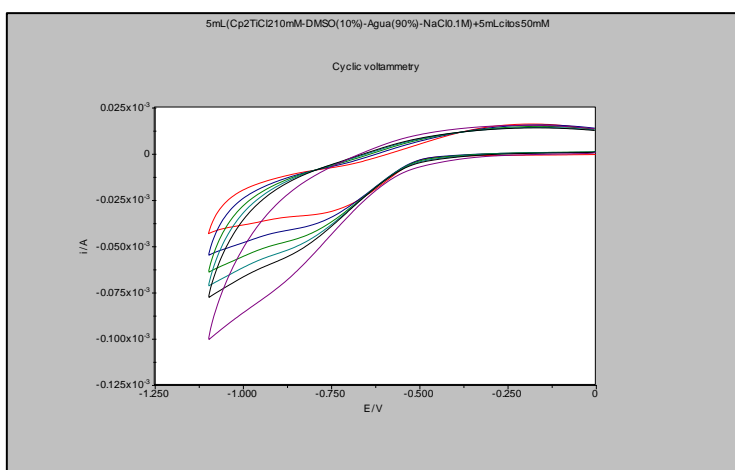
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Citosina 20 mM



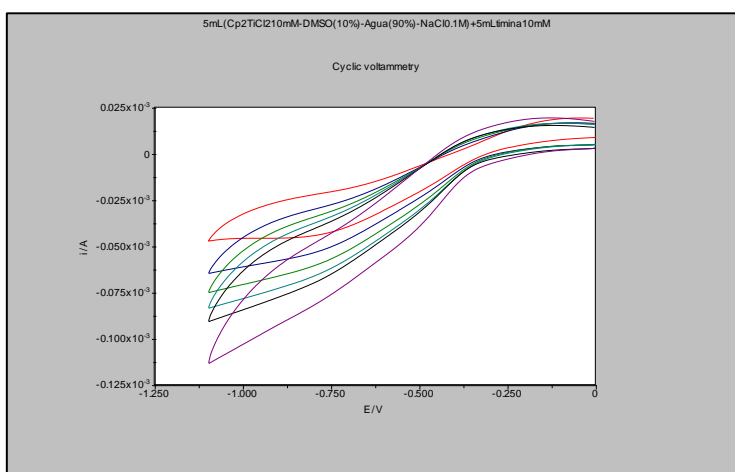
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Citosina 30 mM



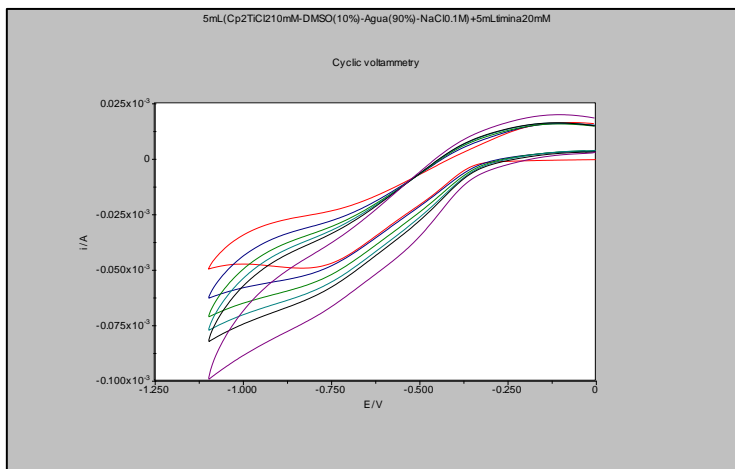
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Citosina 40 mM



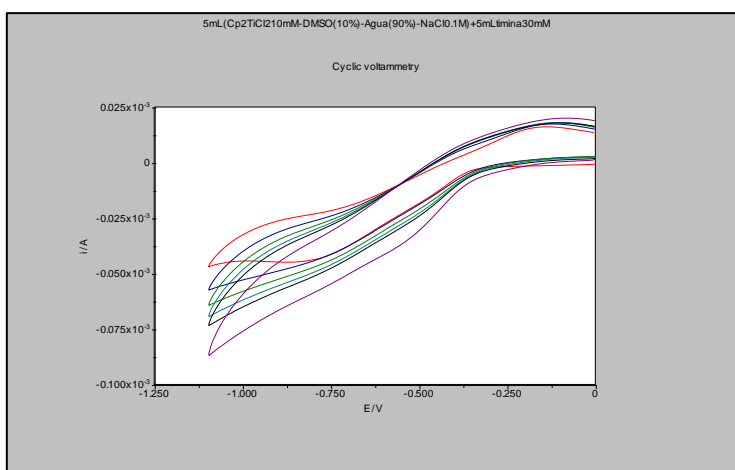
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Timina 10 mM



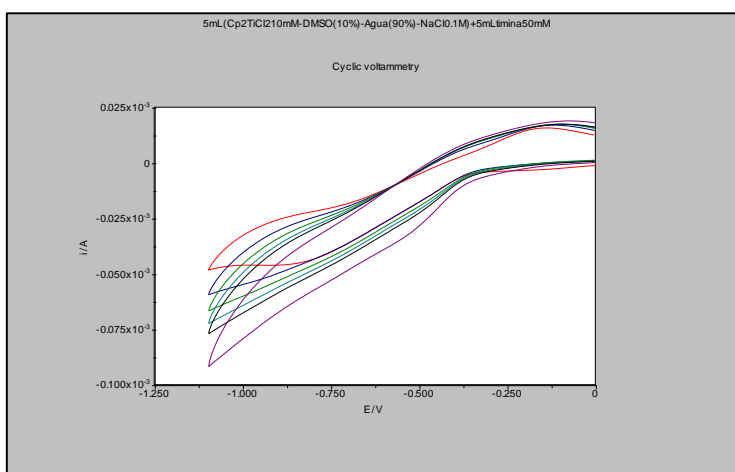
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Timina 20 mM



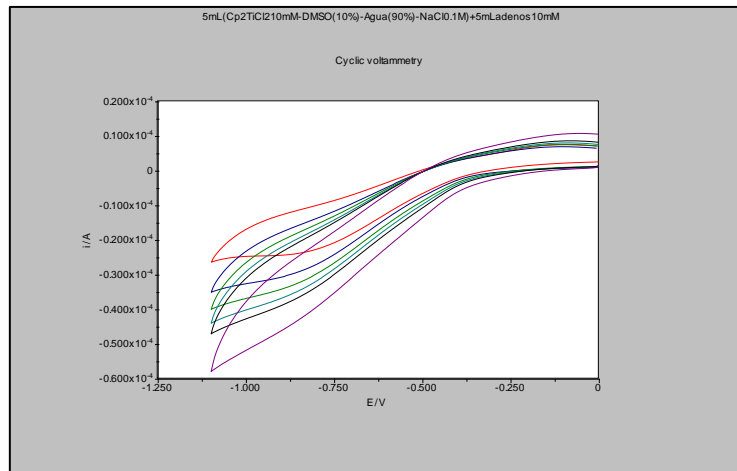
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Timina 30 mM



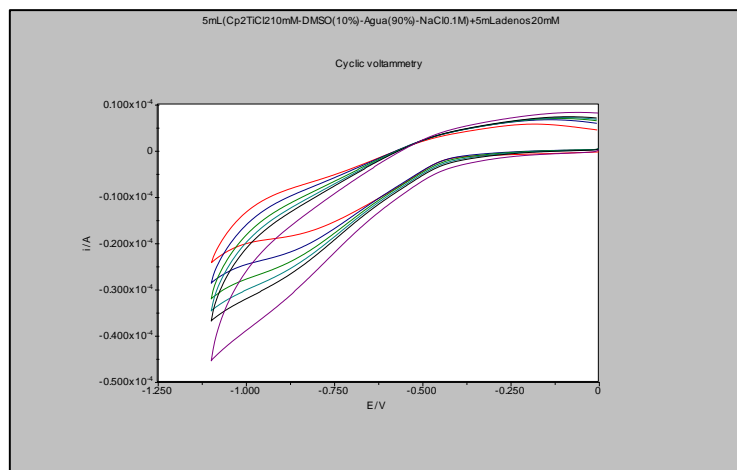
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Timina 50 mM



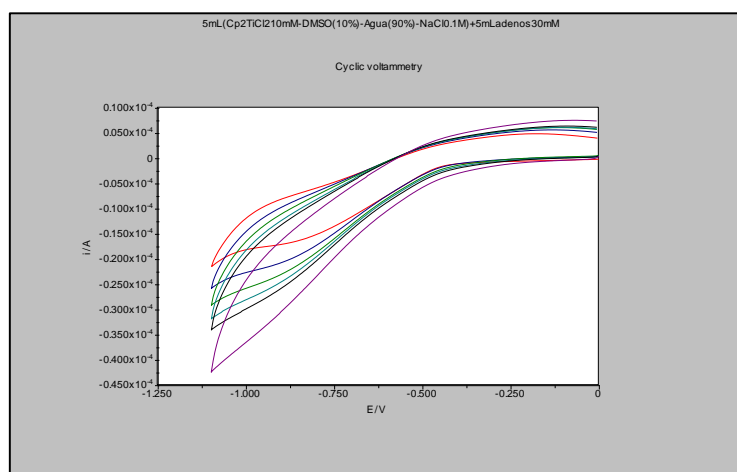
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Adenosina 10 mM



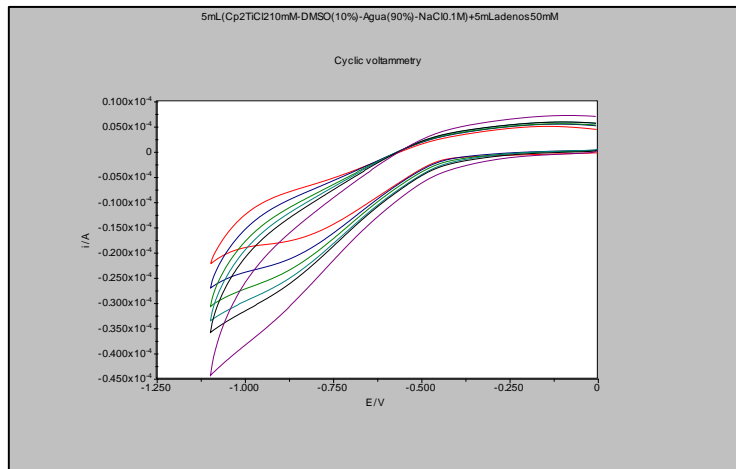
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Adenosina 20 mM



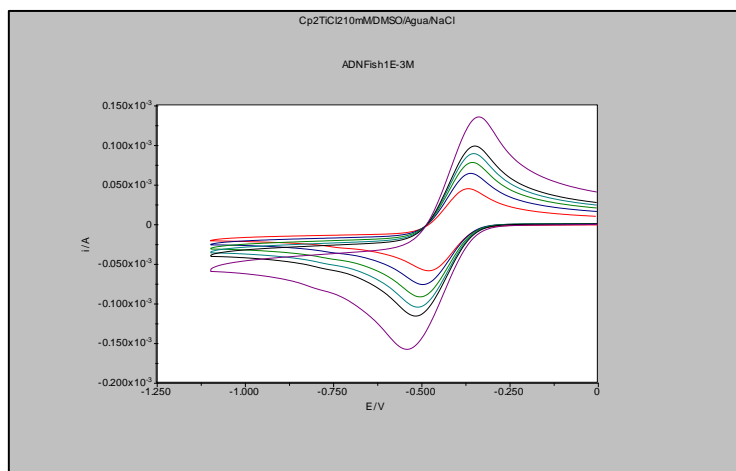
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Adenosina 30 mM



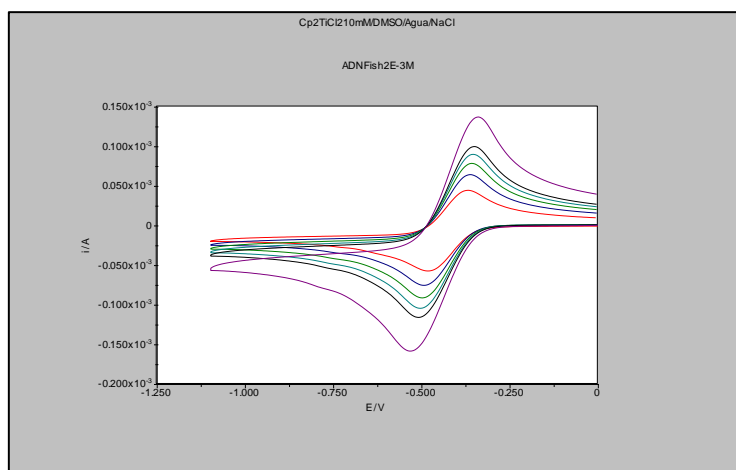
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + Agua (90%) + DMSO (10%) + 0,1 M NaCl + Adenosina 50 mM



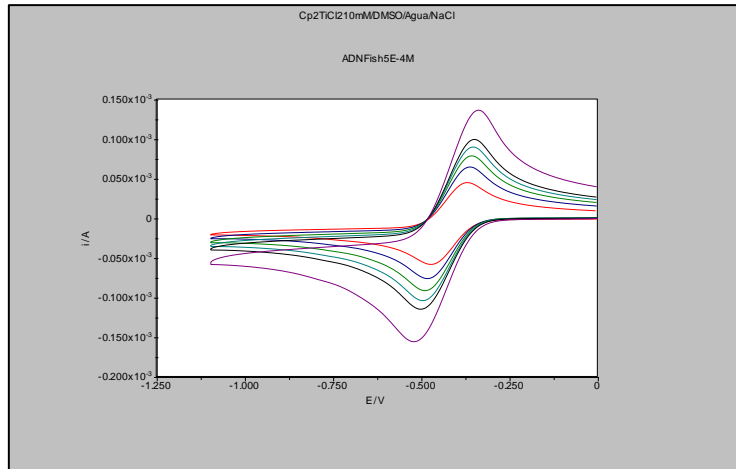
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 1×10^{-3} M



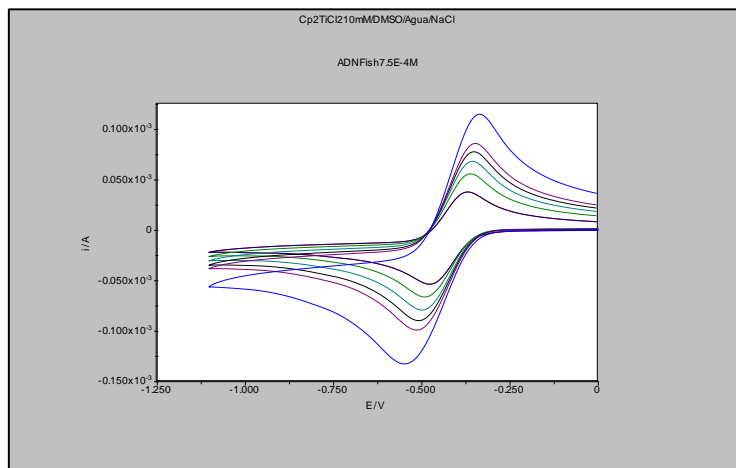
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 2×10^{-3} M



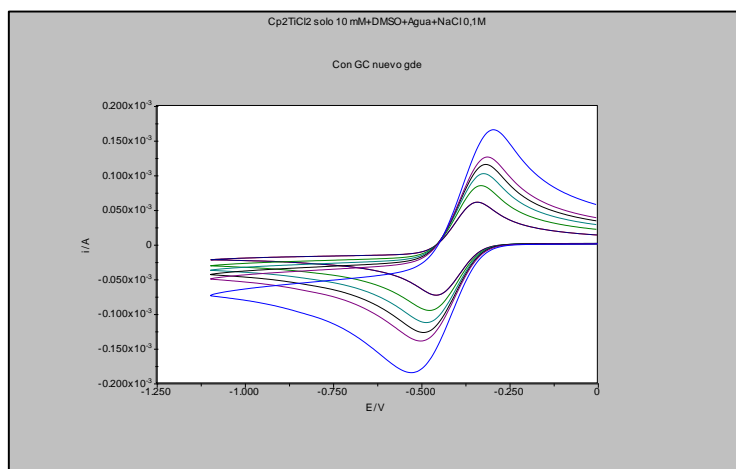
- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 5×10^{-4} M



- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 7.5×10^{-4} M

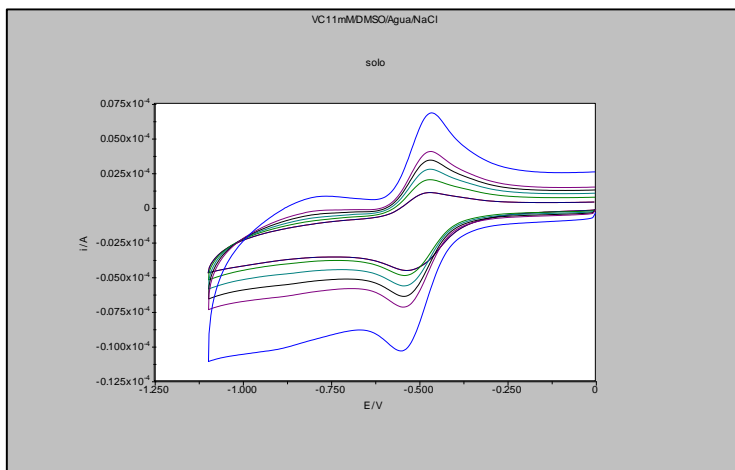


- $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2]$ 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M

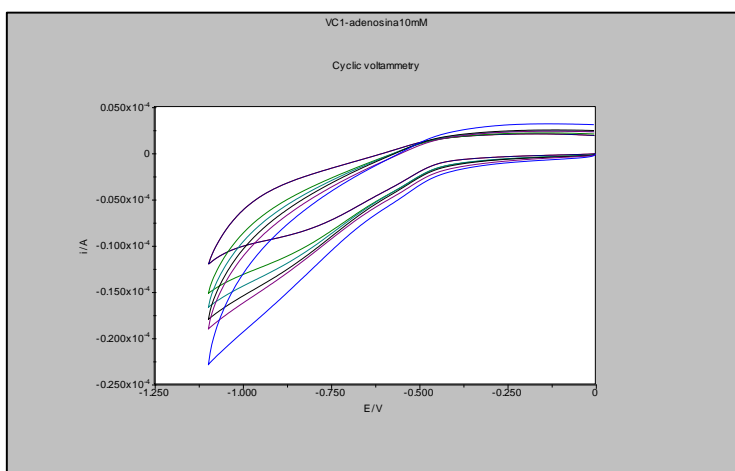


9.2 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DEL COMPUESTO 5 CON MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

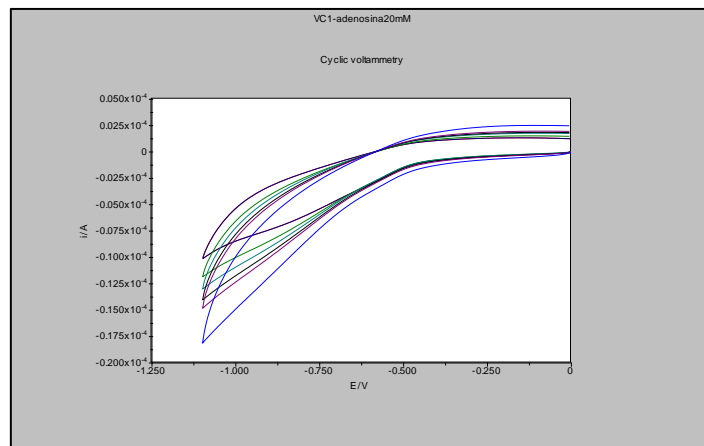
- Compuesto 5 1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M



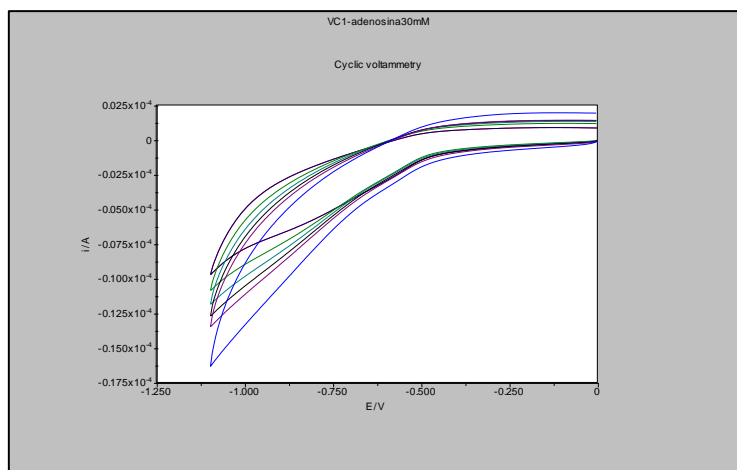
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Adenosina 10 mM



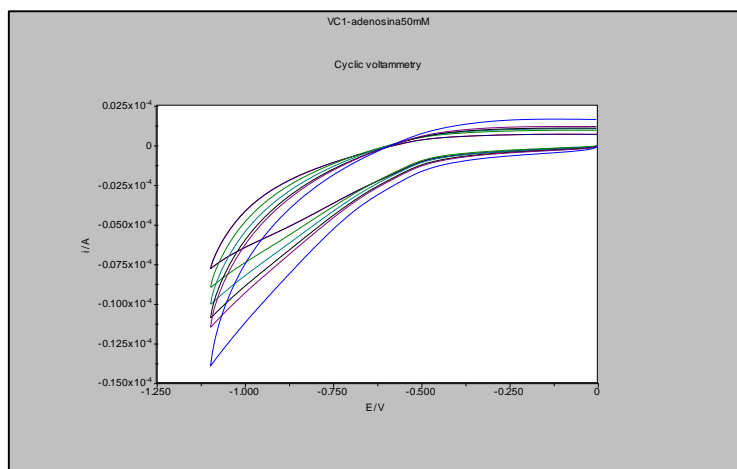
- Compuesto **5** 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Adenosina 20 mM



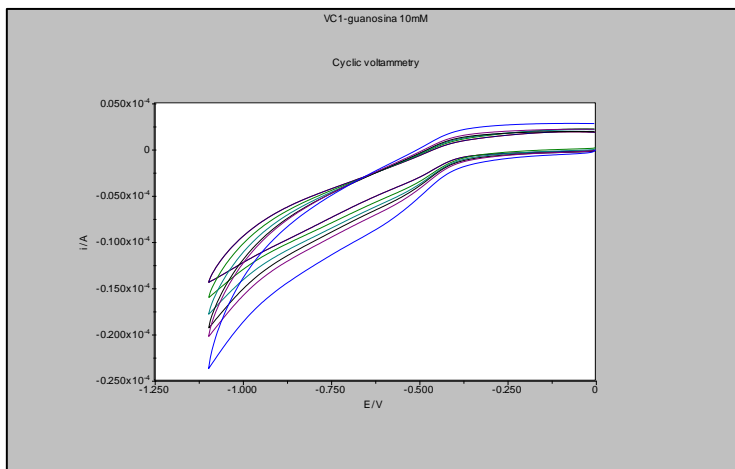
- Compuesto **5** 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Adenosina 30 mM



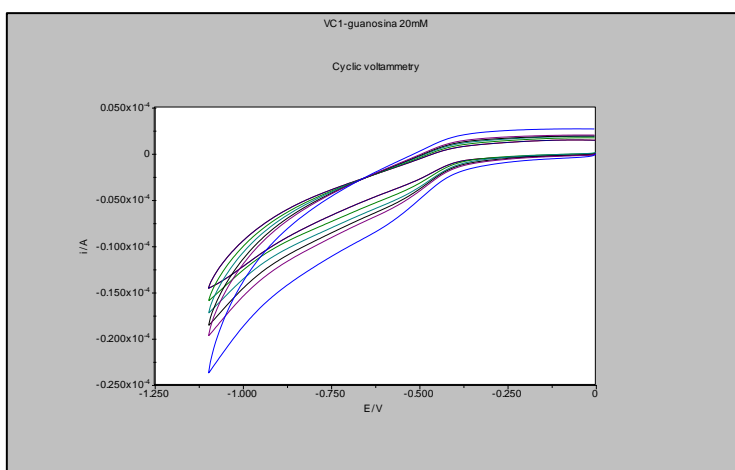
- Compuesto **5** 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Adenosina 50 mM



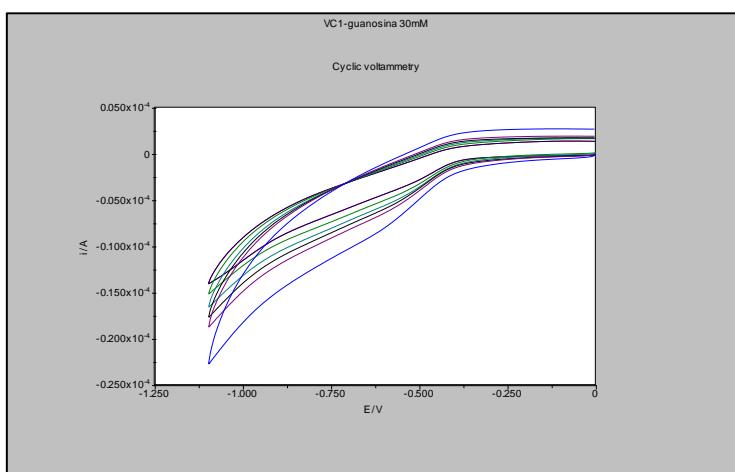
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Guanosina 10 mM



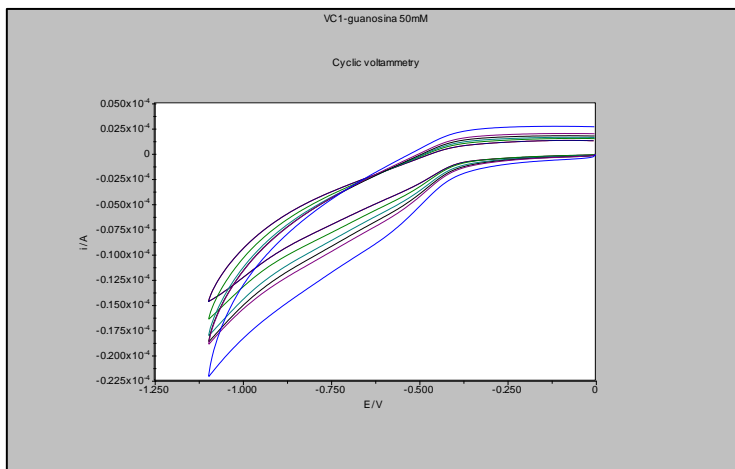
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Guanosina 20 mM



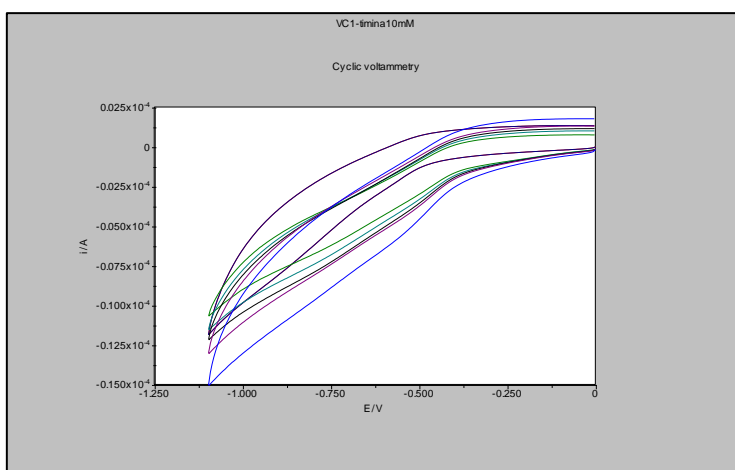
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Guanosina 30 mM



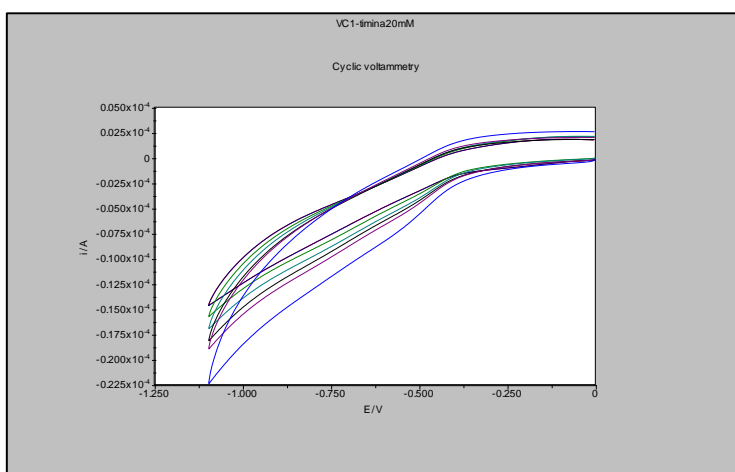
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Guanosina 50 mM



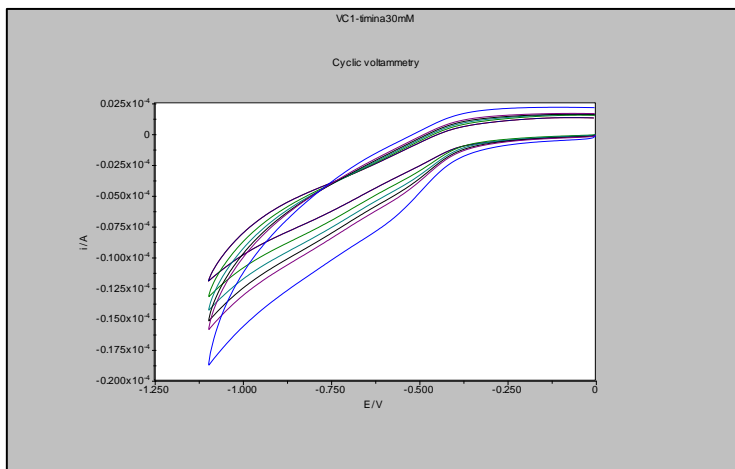
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Timina 10 mM



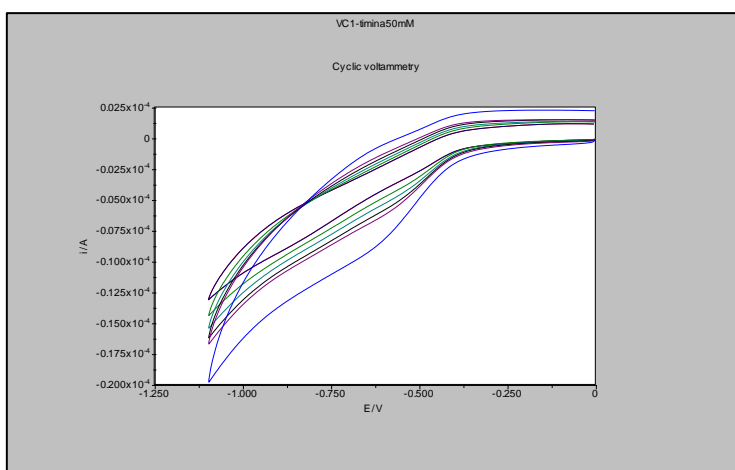
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Timina 20 mM



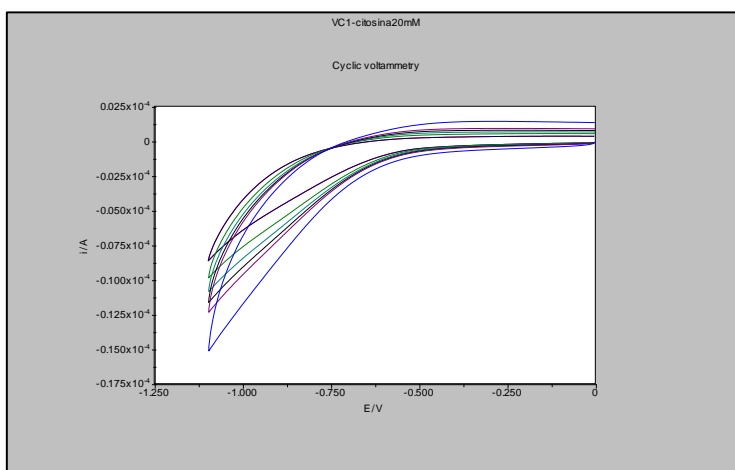
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Timina 30 mM



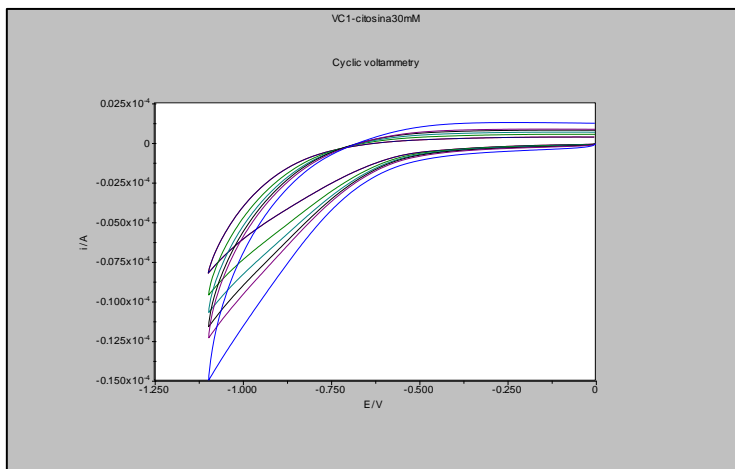
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Timina 50 mM



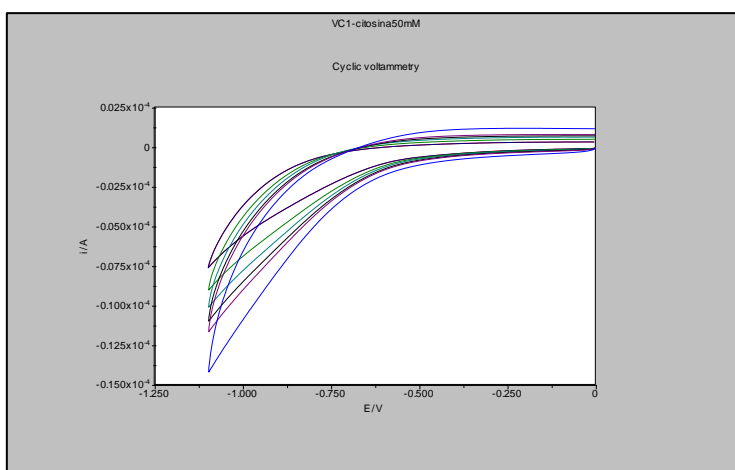
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Citosina 20 mM



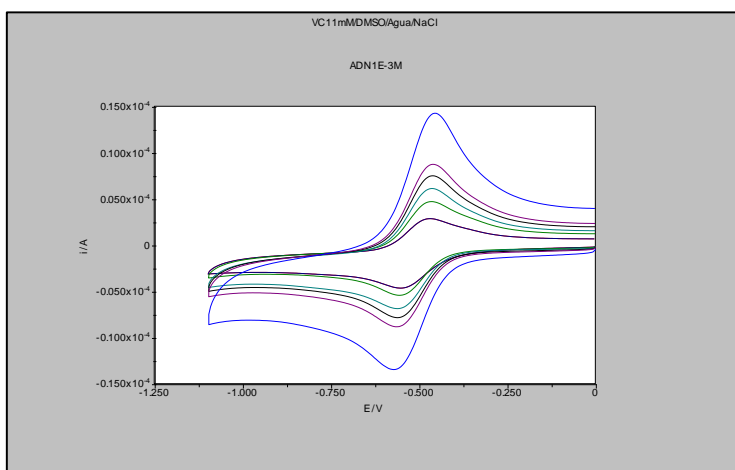
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Citosina 30 mM



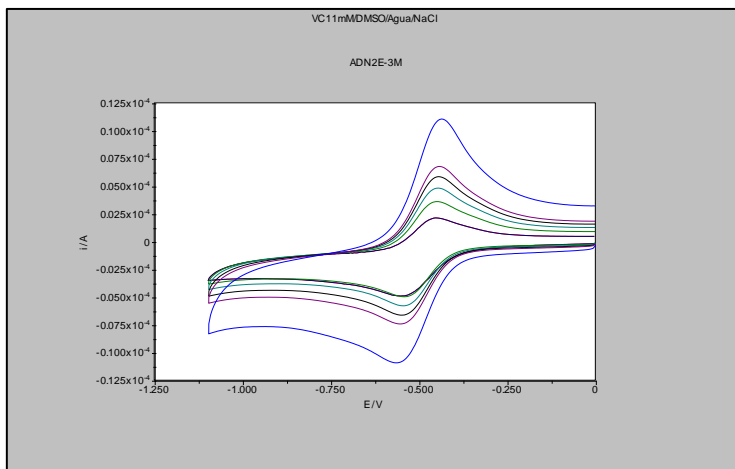
- Compuesto 5 10 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Citosina 50 mM



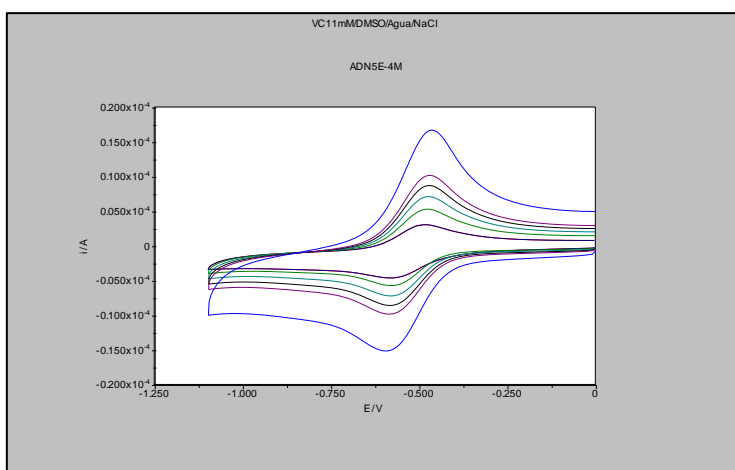
- Compuesto 5 1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 1×10^{-3} M



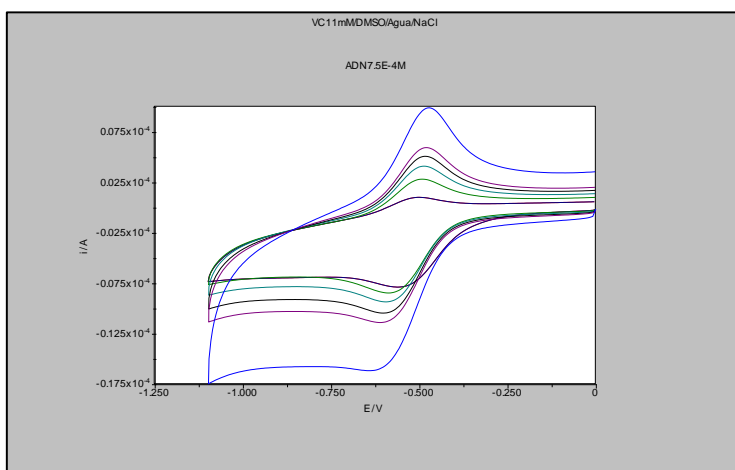
- Compuesto 5 1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 2×10^{-3} M



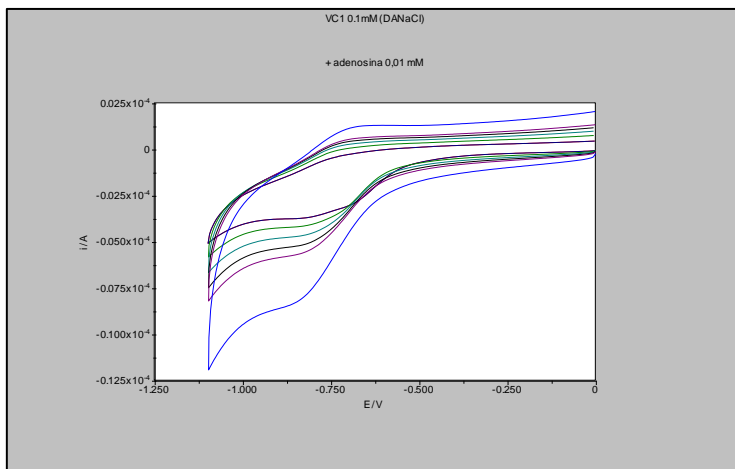
- Compuesto 5 1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 5×10^{-4} M



- Compuesto 5 1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + ADN 7.5×10^{-4} M



- Compuesto 5 0,1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Adenosina 0,01 mM



- Compuesto 5 0,1 mM + DMSO (10%) + Agua (90%) + NaCl 0,1 M + Guanosina 0,01 mM

