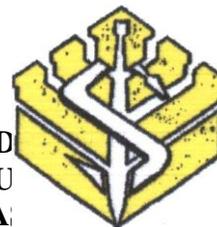




**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS**



**“Complejos de Titanio con Clotrimazol y Cloroquina: síntesis, caracterización,
interacciones con ADN”**

Trabajo de Investigación presentado ante el Consejo de la Escuela de Bioanálisis, Sede Aragua, de la Facultad de Ciencias de la Salud por la Dra. Clara Hernández de Golding como requisito para el ascenso en el escalafón universitario a la categoría de: **PROFESORA ASOCIADA.**

Maracay, junio de 2008

ACTA

El jurado designado por el Consejo de Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, e integrado por los Prof(s): Ledia Triana (Coordinadora), Francisco Triana y Miguel Ángel Luis para evaluar el trabajo de Ascenso titulado: **"COMPLEJOS DE TITANIO CON CLOTRIMAZOL Y CLOROQUINA: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN, INTERACCIONES CON ADN"** presentado por la Prof. Clara María Hernández de Golding, C.I: N° 5.229.192, como requisito de mérito para ascender a la categoría de Profesora Asociada dentro del Escalafón Universitario, después de evaluar y oír la exposición y defensa de dicho trabajo en el Salón de Profesores de la Escuela de Bioanálisis, Sede Aragua, acordó lo siguiente:

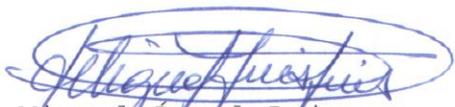
1. El trabajo reúne todas las condiciones exigidas como credencial para su ascenso: originalidad, rigor metodológico y resultados de gran utilidad para la elaboración de nuevas drogas en las terapias anticancerígenas.
2. El jurado considera que dicho trabajo reúne los méritos para ser divulgado en formato de publicación, por lo tanto, le otorga la calificación de "Mención Publicación".
3. Por todo lo anterior, el jurado aprueba dicho trabajo por unanimidad como requisito para el ascenso de la Prof. Clara Hernández a la categoría de Profesora Asociada dentro del Escalafón Universitario.

Maracay, a los veintinueve días del mes de julio de dos mil ocho.

EL JURADO


Prof. Ledia Triana
C.I: 6.238.078
COORDINADORA


Prof. Francisco Triana
C.I: 6.344.016


Prof. Miguel Ángel Luis
C.I: 7.221.077

INDÍCE

	página
Resumen	i
Abstract	ii
1 Introducción y Planteamiento del Problema	1
2 Objetivos	4
3 Marco Teórico	5
3.1 El Cáncer	5
3.2 Metales en medicina	8
3.3 Ligandos: Clotrimazol y Cloroquina	11
3.4 El ácido desoxiribonucleico (ADN)	13
3.5 Interacción de complejos metálicos con el ADN	15
3.6 Interacción de complejos metálicos con el ADN. Espectroscopia UV-VIS	19
3.7 Interacción de complejos metálicos con el ADN. Viscosimetría	22
3.8 Interacción de complejos metálicos con el ADN. Electroforesis	23
3.9 Interacción de complejos metálicos con el ADN. Covalencia	25
4 Marco metodológico	27
4.1 Aspectos generales de la síntesis de los complejos de titanio	27
4.2 Plan de trabajo experimental	28
4.3 Síntesis de los complejos de titanio	29
4.3.1 Extracción de la cloroquina base	29
4.3.2 Síntesis de $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ [1]	29
4.3.3 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]	30
4.3.4 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]	30
4.4 Estudio de la interacción de los complejos de titanio con el ADN	31
4.4.1 Titulaciones espectrofotométricas	31
4.4.2 Desnaturalización térmica del ADN	32
4.4.3 Viscosimetría	33
4.4.4 Electroforesis	34
4.4.5 Estudio de covalencia	34
5. Resultados y discusión	36
5.1 Síntesis y caracterización de los compuestos propuestos	36
5.1.1 Extracción de la Cloroquina base	36
5.1.2 Síntesis de $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ [1]	38
5.1.3 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]	43
5.1.4 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]	50
5.2 Interacción de los complejos de titanio con ADN	56
5.2.1 Titulaciones espectrofotométricas	56
5.2.2. Viscosimetría	69
5.2.3 Electroforesis	73
5.2.4 Estudio de covalencia	75
6. Conclusiones	77
7. Referencias	79

Resumen

La segunda causa de muerte en el mundo se encuentra asociada al cáncer; debido a esto, la investigación en los últimos años se ha enfocado en el diseño de nuevas drogas para su tratamiento. En este sentido, este trabajo está dirigido a la obtención de complejos organometálicos de titanio con cloroquina y clotrimazol, como son: $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ (**1**), $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ (**2**) y $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ (**3**). Estos fueron sintetizados utilizando Cp_2TiCl_2 , clotrimazol, cloroquina, AgNO_3 o KPF_6 , en THF a -80°C .

Los mismos se caracterizaron por análisis elemental, infrarrojo, conductividad molar, RMN ^1H , ^{31}P y espectrometría de masas. El análisis de los resultados obtenidos mediante las técnicas de elucidación empleadas, nos permite proponer que los complejos con CQ poseen una geometría de bipirámide trigonal mientras que el complejo con CTZ presenta geometría plana con enlaces η^5 del Ti al anillo aromático.

También se realizó el estudio de la interacción de estos complejos con el ADN, debido a que éste, es un posible blanco de acción en el tratamiento del cáncer. Este estudio se llevó a cabo por las siguientes técnicas: titulaciones espectrofotométricas, desnaturalización térmica de ADN, viscosimetría, electroforesis y estudio de covalencia. Se determinó la constante de interacción por UV-Visible para los complejos, obteniéndose $(1.8 \pm 0.5) \cdot 10^5$, $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^5$ y $(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para **1**, **2** y **3** respectivamente. Los estudios de desnaturalización muestran que el ADN es fuertemente estabilizado por estos complejos. El incremento de viscosidad observado sugiere que estos complejos en estudio actúan como intercaladores del ADN, mientras que el ensayo por electroforesis revela que estos complejos ejercen un efecto relajante sobre el plásmido super-enrollado, debido a la aparición de la forma circular. Por otra parte, también fue posible establecer que los complejos presentan interacción covalente con el ADN. Con base en estos resultados, se concluye que los complejos

$\text{CpTi}(\text{CQ})_2(\text{NO}_3)_3$ y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ y $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ podrían ser considerados para ser estudiados como agentes antitumorales.

Abstract

The second cause of death in the world is linked to cancer. As a result, research in recent years has focused on the design of new drugs for treatment. In this sense, this work is directed at obtaining titanium organometallic complexes with chloroquine and clotrimazole, such as: $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ (**1**), $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ (**2**) y $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ (**3**). These were synthesized using Cp_2TiCl_2 , clotrimazole, chloroquine, AgNO_3 or KPF_6 in THF to $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

They were characterized by elemental analysis, infrared, molar conductivity, ^1H NMR, ^{31}P , and mass spectrometry. The analysis of the results achieved through the elucidation of employed techniques, enables us to propose that the complex geometry with CQ have a trigonal-bipyramidal while the complex with CTZ presented plane geometry with links η^5 with Ti to the aromatic ring. The study of the interaction of these complexes with DNA, which is a potential target for the complexes action in the treatment of cancer, was pursued. This study was carried out by the following techniques: spectrophotometric titrations, thermal denaturation of DNA, viscosity, electrophoresis and study of covalency.

It was determined by the interaction of UV-Visible to the complex, obtaining $(1.8 \pm 0.5) \cdot 10^5$, $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^5$ and $(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ for **1**, **2** and **3** respectively. Denaturation studies show that DNA is strongly stabilized by these complexes. The increase in viscosity observed suggests that these complexes under study acted as interlayer in DNA, whereas the test by electrophoresis reveals that these complexes exert a relaxing effect on the supercoiled plasmid due to the emergence of the circular form. On the other hand, it was also possible that the complex presents covalent interaction with DNA. Based on these results, we conclude that the complex $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ (**1**),

$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ (**2**) y $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_2$ (**3**) should be considered to be studied as anti-tumor agents.

1. INTRODUCCION y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La sociedad en la que vivimos actualmente es cada vez más competitiva. Esto ha llevado a adoptar hábitos, conductas y un ritmo de vida acelerados. La mala alimentación, pocas horas para el descanso y la contaminación son algunos de los males actuales de todo individuo. Las consecuencias de estos malos hábitos se evidencian en el aumento de enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se encuentran la hipertensión arterial, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, obesidad y cirrosis hepática, entre otras.

Estas enfermedades ocupan los primeros lugares de morbi-mortalidad general, en el mundo y en todos los grupos sociales, y sobre todo en el adulto joven. Su repercusión va más allá del paciente porque involucran a la familia y a la sociedad. Además, estas enfermedades representan grandes inversiones por parte del estado para mantener la infraestructura del sistema de salud. La búsqueda de tratamientos efectivos contra todo tipo de enfermedad es el principal propósito de muchas investigaciones científicas en el mundo.

En el [Cuadro 1](#) se presentan las cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela para el año 2005, de acuerdo a lo publicado en el Anuario de Mortalidad del Ministerio de Sanidad (MS). El cáncer ocupa el segundo lugar (15 % de la mortalidad en el país¹) desde hace 25 años.

No obstante, la tendencia estadística indica que dentro de 10 a 15 años, el cáncer pasará a ser la principal causa de mortalidad en todo el mundo. Muchos investigadores están centrados en la búsqueda de la cura contra el cáncer, pero al parecer la enfermedad también ha ido evolucionando y cada día cobra más víctimas.

Causas de muerte	Mortalidad	%
1. Enfermedades cardíacas	24 353	20.71
2. Cáncer	18 155	14.93
3. Enfermedades cerebrovasculares	8 695	7.40
4. Suicidios y homicidios	8 614	7.31
5. Accidentes de todo tipo	8 471	7.19
6. Otras causas	49 543	42.05
Total	117 831	100.00

Cuadro 1. Las cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela, para ambos géneros en el año 2005.

Por mucho tiempo, los compuestos orgánicos se han empleados en drogas con fines terapéuticos, y desde hace algún tiempo compuestos inorgánicos y organometálicos han sido empleados como potenciales quimioterapéuticos que pueden constituir una vía alternativa y eficaz para el tratamiento del cáncer.

Muchos complejos inorgánicos y compuestos de naturaleza orgánica, tanto naturales como sintéticos, han sido utilizados como medicamentos a lo largo del tiempo para combatir diferentes enfermedades tales como la artritis reumatoide, enfermedades coronarias, bactericidas tópicos, diuréticos, agentes antivirales y en el tratamiento contra el cáncer, donde el platino ha tenido muy buen desempeño. El uso de complejos inorgánicos en medicina está en continuo crecimiento. A pesar de sus efectos adversos sobre los riñones, la médula y vías digestivas, la cisplatina es usada desde el siglo pasado y es uno de los mejores agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer de vejiga y próstata.

En la búsqueda de nuevas drogas capaces de atacar células cancerosas muchos investigadores trabajan arduamente en la síntesis de complejos metálicos con ligandos orgánicos de reconocida trayectoria terapéutica, teniendo en mente mejorar las características individuales de tales compuestos y procurando la ganancia sinérgica que se obtiene al combinar los beneficios de

ambas especies en una sola molécula. Basado en estos razonamientos, se presentan los objetivos de este trabajo.

2. **OBJETIVOS**

Objetivo General

Estudiar complejos organometálicos de Titanio con ligandos Clotrimazol (CTZ) y Cloroquina (CQ) con posible actividad antitumoral.

Objetivos específicos

1. Diseñar protocolos para sintetizar complejos de titanio con los ligandos clotrimazol y cloroquina.
2. Sintetizar complejos de titanio con ligandos clotrimazol y cloroquina.
3. Caracterizar los complejos de Titanio sintetizados.
4. Estudiar la interacción de los complejos de titanio con el ADN de timo de ternera.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. El Cáncer

El cáncer se inicia cuando una célula rompe los límites normales de desarrollo y comienza por si sola un crecimiento descontrolado. Casi todos los tejidos del cuerpo humano pueden producir células malignas, incluso algunos las producen de diferentes tipos. Las células normales se reproducen cuando otras células vecinas les envían señales bioquímicas indicándoles que deben hacerlo, de esta forma cada tejido mantiene un tamaño y una estructura apropiada. Las células cancerosas, violan este esquema, no obedecen al control usual de su proliferación y siguen un patrón descontrolado de reproducción. Estas pueden migrar desde el sitio donde comienzan a formarse hacia otros tejidos cercanos, los cuales son invadidos, formando masas en diferentes partes del cuerpo.

Los tumores de células malignas, con el tiempo, se hacen más agresivos y llegan a ser mortales cuando alteran tejidos y órganos requeridos para la supervivencia del organismo².

3.1.1. Tipos de Cáncer

El cáncer puede surgir en casi cualquier parte del cuerpo. Según el órgano afectado y el origen de la enfermedad, los tipos de cáncer se clasifican en:

- * **El carcinoma:** Es el mas común entre los diferentes tipos de cáncer, proviene de las células que cubren las superficies externas e internas del cuerpo. Ejemplos: cáncer de pulmón, mamas y colon.
- * **El sarcoma:** Aparece en células que se encuentran en los tejidos que sostienen el cuerpo con el hueso, el cartílago, el tejido conectivo, el músculos y la grasa.

- * **El linfoma:** Se origina en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmune del cuerpo.
- * **Leucemia:** Es el cáncer de células inmaduras de la sangre producidas en la médula ósea y que tienden a acumularse en grandes cantidades dentro del torrente sanguíneo³.

La aplicación de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia biológica consiguen la curación de $\approx 50\%$ de los pacientes diagnosticados en fase inicial. Este porcentaje es muy bajo y cada día se hacen esfuerzos para mejorar en los tratamientos existentes y desarrollar nuevas estrategias que sean más efectivas.

3.1.2. Tratamientos para el Cáncer

El tratamiento es muy variable y depende de factores tales como tipo, lugar y la gravedad de la enfermedad, así como el estado físico del paciente. Los tratamientos son diseñados para eliminar las células cancerosas o para llevarlas a su muerte por medio de la supresión de las señales necesarias para la división celular o para estimular las defensas propias de las células sanas. Los tratamientos se basan en sus efectos y modos de acción.

Los tratamientos son usados constantemente en combinación, ya sea simultánea o secuencialmente⁴. El objetivo principal del tratamiento contra el cáncer es erradicar la enfermedad. Si este objetivo no puede lograrse, el segundo objetivo será la paliación, la disminución de los síntomas, prolongación de la vida y la conservación de la calidad de la misma.

Algunos de los tratamientos más comunes empleados contra el cáncer pueden resumirse en:

- * **Cirugía:** Se extrae el órgano afectado (cuando es posible). Este tratamiento es efectivo sólo en aquellos casos en los que el tumor cancerígeno está localizado y aún no se ha producido la proliferación de las células cancerígenas en el cuerpo de la persona afectada.

- * Radioterapia: Suele complementar a la cirugía. Se emplea radiación de alta energía para destruir a las células cancerígenas. Para el tratamiento con radioterapia externa, el paciente ha de acudir al hospital. Otro posible modo de aplicar la radioterapia, es la implantación de una cápsula con sustancias radioactivas en la zona del tumor. En algunos casos se recurre a otro método denominado terapia de radiación intraperitoneal en el que se inyecta un líquido radioactivo directamente en el abdomen a través de un catéter. Los efectos secundarios son sequedad y prurito, pérdida del apetito y sensación de cansancio.
- * Quimioterapia: Consiste en la utilización de agentes químicos para provocar la regresión o disminuir la velocidad de crecimiento tumoral. Con este tratamiento el paciente recibe medicamentos por vía oral o intravenosa para eliminar las células cancerosas que hayan podido sobrevivir a la radioterapia o a la cirugía. Al igual que la radioterapia, se puede aplicar también a través de un catéter. Los avances en las investigaciones están consiguiendo que surjan medicamentos cada vez menos agresivos para el paciente y más tóxicos para el tumor.

El principal problema de la quimioterapia es su falta de selectividad y destruye tanto las células malignas como las sanas dejando al paciente bajo en defensas y con el riesgo de padecer enfermedades infecciosas. El tratamiento quimioterapéutico puede provocar daños en el riñón y otros órganos⁵.

- * Terapia Biológica: también llamada inmunoterapia (o terapia modificadora de la respuesta biológica o bioterapia) se vale del sistema inmunológico del organismo para combatir el cáncer. Las células, anticuerpos y órganos del sistema inmunológico actúan para proteger y defender al organismo de invasores externos, como bacterias y virus. Este tipo de terapia está diseñada para potenciar al sistema inmunológico, bien sea haciendo al sistema inmunológico selectivo a las células cancerígenas, evitando que las células cancerosas se propaguen a otros lugares del organismo o mejorando la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar células normales dañadas o destruidas por otros tipos de tratamiento de cáncer, como la quimioterapia o la radioterapia^{5,6}.

3.2. Metales en medicina

Los complejos inorgánicos han sido utilizados como agentes quimioterapéuticos desde el siglo pasado en patologías como la artritis reumatoide (sales de oro)^{7,8}, enfermedades coronarias (complejos de hierro)⁹, bactericidas tópicos (sales de plata)^{10,11}, diuréticos (sales mercuriales)¹², agentes antivirales (complejos de paladio, platino y zinc)¹³ y en el tratamiento contra el cáncer (complejos de platino)¹⁴ así como para muchas otras enfermedades.

La versatilidad y campo de utilidad de los complejos inorgánicos radica en las características variables que los metales presentan, debido a las propiedades particulares que les confieren los orbitales (*d*) de su capa electrónica. De acuerdo con el estado de oxidación del metal, se le pueden unir ligandos de diferente naturaleza; es así como ligandos atractores (blandos) de electrones se unen a metales con estado de oxidación bajo y ligandos dadores (duros) de electrones se unen a metales con estado de oxidación alto. Los compuestos de coordinación adoptan diferentes geometrías según el número de coordinación y a los ligandos involucrados en el complejo, lo que también les otorga ciertas características que influyen en su potencial actividad biológica.

La cisplatina *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] es usada desde 1979 y es uno de los mejores agentes anticancerígenos por su alto nivel de efectividad en el tratamiento contra el cáncer de vejiga y próstata. Sin embargo, sus efectos adversos sobre el sistema renal, la médula ósea y el aparato digestivo limitan notablemente su empleo.

El titanio, Ti, es el primero de los elementos de la serie de transición del bloque *d* y posee cuatro electrones de valencia [Ar] 3*d*² 4*s*². Sus posibles estados de oxidación son -I, 0, II, III y IV; pero de todos estos, el Ti (IV) es el más estable. El Ti (IV) tiene una configuración *d*⁰ y cinco geometrías de coordinación: geometría tetraédrica o tetraédrica distorsionada; bipirámide trigonal distorsionada, octaédrica, bipirámide pentagonal y dodecaédrica distorsionada^{15,16}, para 4, 5, 6, 7 y 8 coordinaciones (Figura 1).

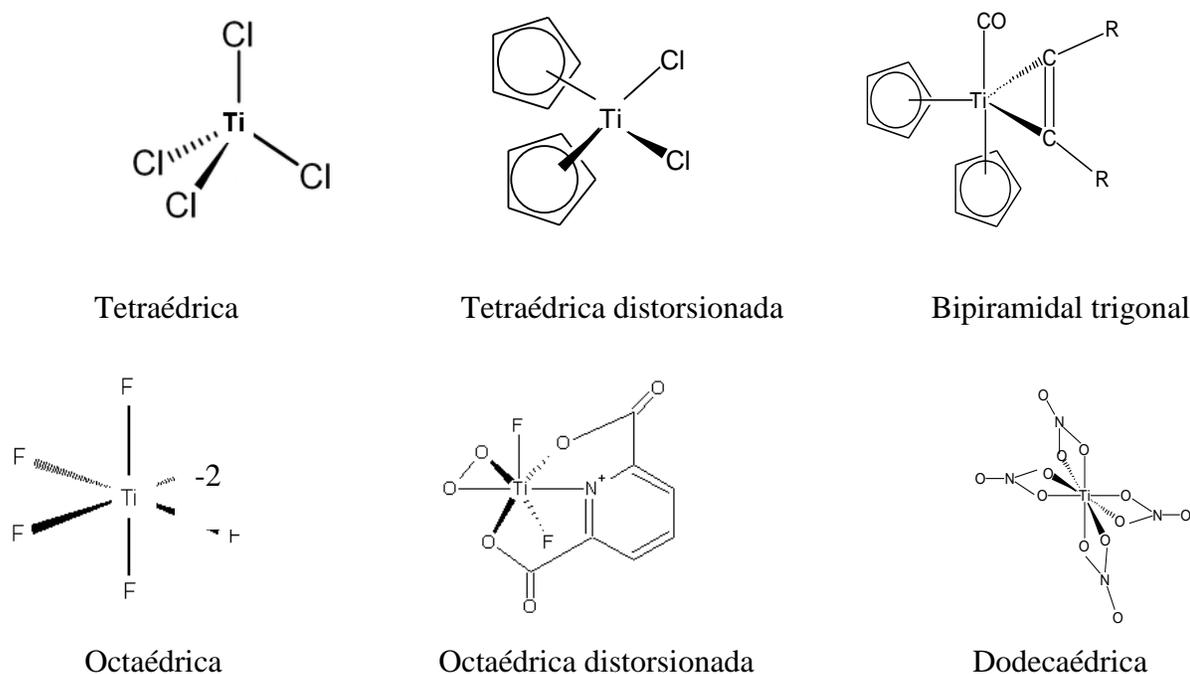


Figura 1. Estereoquímica del Titanio (IV).

El titanio se puede encontrar naturalmente en los seres humanos y en algunos alimentos como la lechuga, el cerdo, el pollo, la margarina y la pimienta. Solamente el 3% se absorbe directamente y el mismo se excreta por la orina¹⁷. Adicionalmente, el titanio es ampliamente usado en prótesis¹⁸.

El complejo más investigado de los organometálicos del titanio es el Titanoceno¹⁹ el cual es activo contra diversos tipos de carcinomas humanos, incluyendo carcinomas gastrointestinales, colon, mama y corazón. Debido a los excelentes resultados obtenidos se encuentra ahora en la fase II de los ensayos clínicos, usado en dosis de 560 mg/Kg y ha mostrado nefrotoxicidad baja para la dosis aplicada^{17,20}.

El Titanoceno es menos tóxico que el cisplatino aún cuando se sabe que es clínicamente activo como droga. Se posee poca información del mecanismo de acción del fármaco sobre el ADN. Estudios realizados con análogos del Titanoceno y bases nitrogenadas mostraron que el centro metálico se une covalentemente con los átomos dadores de electrones presentes en las bases nitrogenadas de ADN. Estos átomos pueden ser los de oxígeno de los grupos fosfato y de las 2-desoxirribofuranosa, así como los átomos de nitrógeno de las bases^{21,22} (Figura 2).

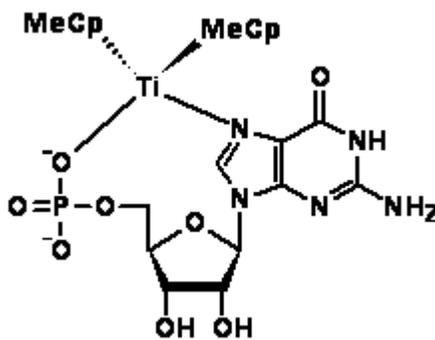


Figura 2. Coordinación de complejo de titanio a través de los oxígenos de los grupos fosfato y de nitrógeno de la base nitrogenada.

3.3. Ligandos: Clotrimazol y Cloroquina

Los iones o moléculas que se unen al centro metálicos en un complejo de coordinación se denominan ligandos. Los ligandos pueden ser monodentados, bidentados o polidentados, dependiendo del número de grupos por los cuales se coordina.

La química medicinal busca ligandos, que al coordinarse a los centros metálicos, incrementen la actividad biológica, disminuyan la toxicidad y contribuyan a mejorar la solubilidad de los nuevos agentes quimioterapéuticos. El clotrimazol y la cloroquina como ligandos han despertado gran

interés en el laboratorio de Bioinorgánica para el desarrollo de nuevos fármacos. Por lo tanto serán los ligandos utilizados para la obtención de nuevos compuestos de coordinación de titanio.

El clotrimazol (CTZ)²³ (figura 3), es un derivado imidazólico, que se administra como método de tratamiento para infecciones fúngicas. Posee un amplio espectro de actividad biológica, gran eficacia y escasos efectos secundarios. Esto lo ha convertido en el compuesto usado por excelencia en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos como la *Candida albicans* y otras afecciones micóticas de la piel y la boca. En laboratorio ha sido evaluado en enfermedades como Leishmaniasis²⁴ y Mal de Chagas²⁵, con resultados prometedores. De igual forma, el clotrimazol también ha demostrado que es capaz de inhibir la proliferación de células cancerígenas tanto *in Vitro* como *in Vivo*²⁶.

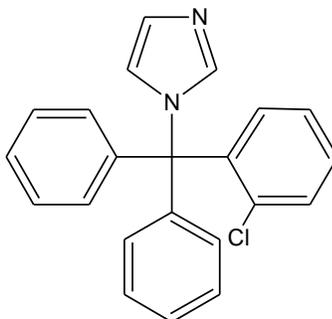


Figura 3. Estructura del clotrimazol (CTZ).

La cloroquina (CQ) (figura 4), pertenece al grupo de las 4-aminoquinolinas. La cloroquina resulta ser un excelente ligando debido a la presencia de los tres nitrógenos, los cuales constituyen tres posibles sitios de enlaces. Este fármaco sintético es activo contra las formas asexuales eritrocíticas de la mayoría de cepas de *Plasmodium malariae*, *ovale*, *vivax* y *Falciparum*. Se utiliza en el tratamiento de la malaria y ocasionalmente en artritis reumatoidea y lupus discoide debido a sus efectos antiinflamatorios.

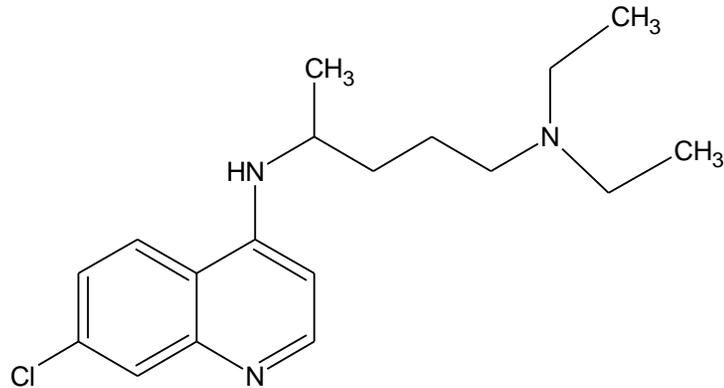


Figura 4. Estructura de la cloroquina (CQ).

La cloroquina se usó por primera vez en los años 40, poco después de la segunda guerra mundial y resultó ser efectiva para curar todas las formas de malaria sin embargo, con el transcurrir de los años los parásitos del *Plasmodium falciparum* se han vuelto resistentes a la cloroquina, por lo que se han hecho diversas modificaciones en la búsqueda de nuevos fármacos derivados de la CQ²⁷.

Entre los complejos ya reconocidos de metales con cloroquina se encuentra el complejo $[\text{AuPh}_3(\text{CQ})]\text{PF}_6$, el cual resultó ser más tóxico para el parásito *Plasmodium Falciparum* que la cloroquina aislada²⁸. También están los complejos $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$ y $[\text{Cu}(\text{CQ})_2]\text{Cl}$ los cuales mostraron tener mejor actividad biológica²⁹ que el ligando.

3.4. El ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN conserva la información hereditaria a lo largo de un polímero orgánico tan frágil que se fragmenta cuando se agita en solución. El ADN es un polímero lineal de 4 subunidades monoméricas ordenadas en una secuencia lineal precisa, donde se encuentra codificada la información genética.

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una molécula de elevado peso molecular de estructura de doble hélice dextrógira, constituida por desoxirribosa (un azúcar de cinco átomos de carbono) y grupos fosfato, localizados en la parte exterior de la hélice; posee cuatro bases nitrogenadas o nucleótidos de las cuales hay dos pirimidínicas, la citosina y la timina y dos púricas, la adenina y la guanina (Figura 5) que se sitúan en el interior de la doble hélice y configuran el código genético de los organismos vivos, base de la herencia biológica³⁰.

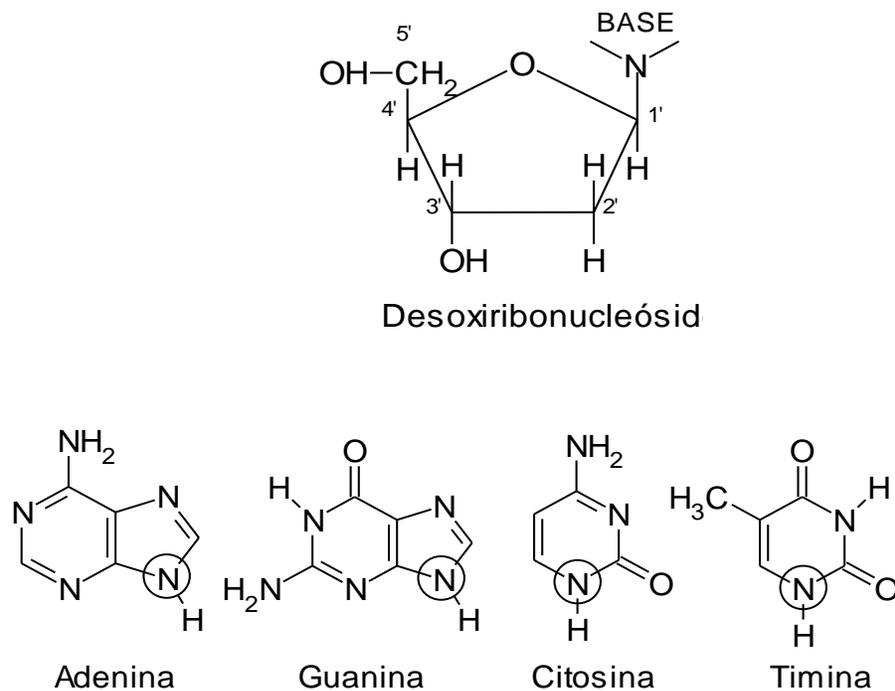


Figura 5. Estructura del azúcar desoxirribosa enlazada a una base, las bases púricas (adenina y guanina) y las bases pirimidínicas (timina y citosina) (los N de enlace señalados con un círculo).

La estructura del ADN según el modelo propuesto por Watson y Crick corresponde a una doble hélice (Figura 6), como una escalera de caracol. Los lados longitudinales de la escalera están

formados por moléculas de azúcar y fosfatos alternados. Los peldaños de la escalera están formados por las bases nitrogenadas, una base por cada azúcar-fosfato y dos bases formando cada peldaño. Las bases emparejadas se encuentran a través de la hélice y se mantienen juntas por medio de puentes de hidrógeno ³¹.



Figura 6. Estructura del ADN propuesta por Watson y Crick.

3.5. Interacción de complejos metálicos con el ADN

La interacción puede ser covalente o no covalente. La interacción covalente implica coordinación del centro metálico con el ADN o uno de sus fragmentos (debido a los grupos nitrogenados, fosfatados etc.). La interacción no covalente puede ser a su vez de dos tipos (1) a través de puentes de hidrógeno, cuando las interacciones son de tipo dipolo-dipolo o (2) intercalación cuando las moléculas planares se disponen entre los pares de bases de ADN y quedan estabilizadas por interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals.

a) Interacciones covalentes:

Los complejos metálicos pueden formar enlaces de coordinación por medio de los oxígenos cargados negativamente de los grupos fosfatos, por los grupos hidroxilo del anillo de desoxiribosa y por los átomos donadores de electrones de las bases nitrogenadas del ADN. En cada uno de los casos de interacción covalente, el metal se enlaza de forma estable.

Un claro ejemplo de este tipo de interacción, es el de la cis-platina, un fármaco antitumoral, que una vez hidrolizado el complejo dentro de la célula, se intercambia uno de los átomos de cloro por una molécula de agua, al alcanzar el núcleo se une al ADN mediante la formación de un enlace con las bases nitrogenadas³². La Figura 7 muestra las cuatro formas que han sido propuestas para explicar la formación de enlace entre la cis-platina y el ADN.

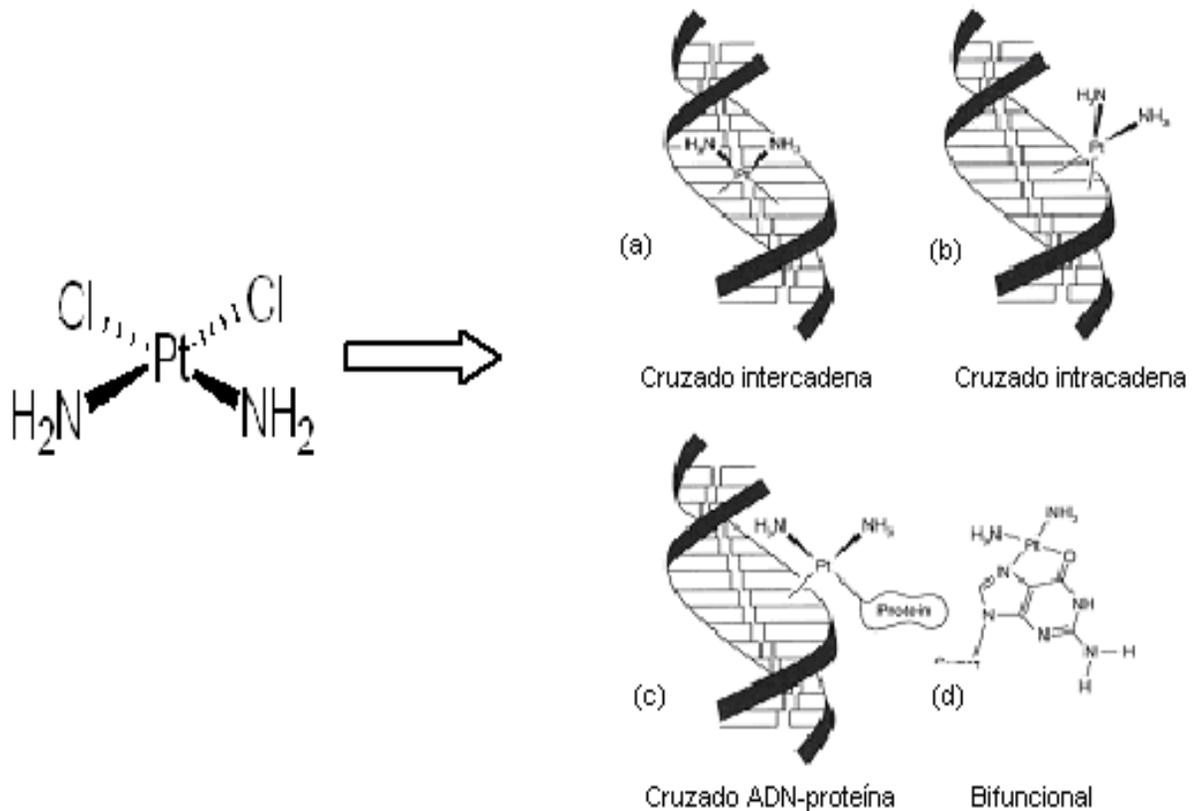


Figura 7. Cis-platina y tipos de interacciones covalentes, a) Enlace cruzado intercadena: enlace de bases nitrogenadas de distintas cadenas con el mismo centro metálico. b) Enlace cruzado intracadena: bases nitrogenadas de la misma cadena se enlazan al mismo átomo metálico. c) Enlace cruzado ADN-proteína: el complejo metálico está unido al ADN por medio de una base nitrogenada y al mismo tiempo una proteína se encuentra enlazada al átomo metálico. d) Enlace bifuncional a la guanina: Consiste en la coordinación de la guanina al metal por medio de un nitrógeno y también por un oxígeno.

De igual modo se conocen otros compuestos metálicos que interactúan covalentemente con el ADN tales como los complejos de titanio (mostrado en la figura 3), complejos de osmio y de platino que se muestran en la Figura 8.

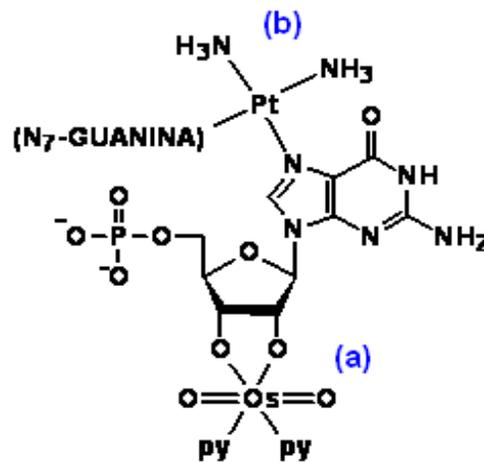


Figura 8. (a) Coordinación de un complejo de osmio a un nucleótido por medio de los oxígenos de un azúcar (ribosa). (b) Coordinación de la cis-platina a una base nitrogenada (guanina).

b) Interacciones no covalentes:

Esta interacción no implica la formación de un enlace químico propiamente dicho sino que puede clasificarse como interacciones por puente de hidrógeno, interacciones intercalativas e interacciones por las cavidades.

Las interacciones por puente de hidrógeno son producto de las fuerzas que se producen entre los hidrógenos de los complejos y los átomos de oxígeno y nitrógeno presentes en el ADN. Un ejemplo de este tipo de interacción entre un complejo metálico y el ADN, es la que se produce entre el complejo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ y los grupos fosfatos presentes en el biopolímero³³.

Las interacciones intercalativas consisten en la disposición del complejo, o parte de éste, entre pares de bases nitrogenadas consecutivas del ADN, manteniéndose estabilizado por las fuerzas de Van der Waals³⁴. Este tipo de interacción fue propuesta por primera vez por Lerma³⁵ para explicar la asociación del ADN a moléculas aromáticas planares tales como las aminoacridinas (acridina naranja) y las fenantridinas (bromuro de etidio). En la Figura 9, se muestra la forma en como intercala el complejo $[\text{Pt}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})(\text{terpy})]$ al ADN.

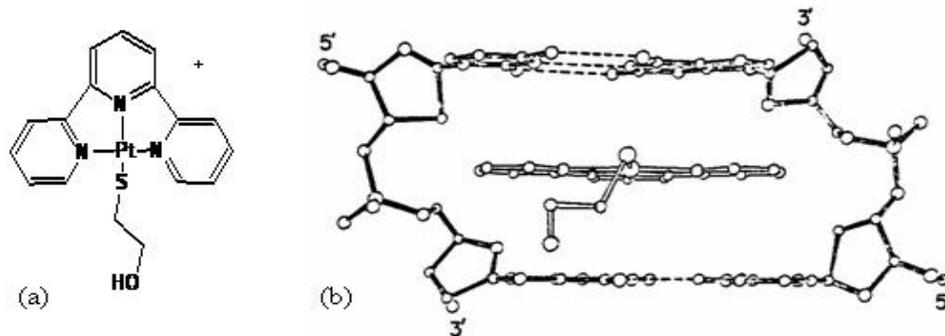


Figura 9. (a) Estructura del primer metalintercalador $[\text{Pt}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})(\text{terpy})]$. (b) Estructura de un polinucleótido con el complejo $[\text{Pt}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})(\text{terpy})]$ intercalado.

De igual forma, entre las interacciones no covalentes se encuentran las interacciones que ocurren entre los complejos y las cavidades o surcos de la molécula de ADN.

Agentes que se unen a un surco: la disposición en doble hélice de las cadenas de ADN hace que se formen unas hendiduras a lo largo del exterior de la hélice donde residen los grupos fosfato de

los nucleótidos. Estos surcos, conocidos como surco menor y surco mayor, (Figura 10), debido a su diferente estructura, muestran distinta preferencia por determinados ligandos.

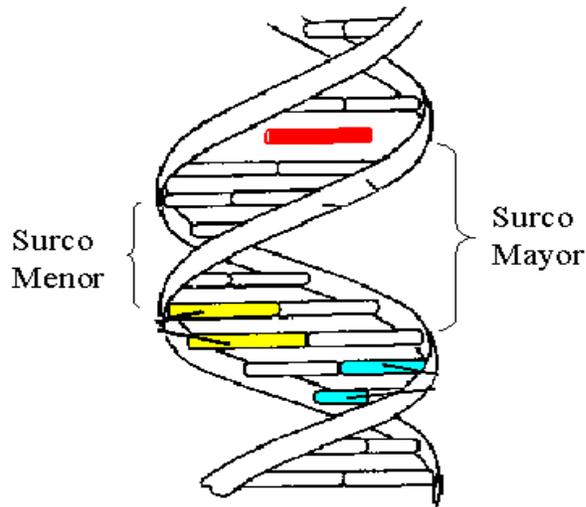


Figura 10. Surcos en la doble hélice del ADN.

Rompedores de hebra: Este tipo de agentes interactúa con el ADN de forma que, una parte de su estructura es capaz de unirse reversiblemente al ADN, mientras que otra forma radicales libres que rompen la doble hélice imposibilitando su replicación. Los distintos tipos de interacción **complejo-ADN** se pueden distinguir mediante técnicas experimentales y teóricas que se describirán mas adelante.

3.6. Interacción de los complejos metálicos con el ADN. Espectroscopia UV-VIS.

El espectro electromagnético es una escala en la que puede situarse cualquier onda de energía. En dicha escala se representa la frecuencia, así como la longitud de onda de la radiación electromagnética, siendo ambas inversamente proporcionales. En esta escala pueden definirse intervalos dentro de los cuales las ondas electromagnéticas se comportan de forma similar. Algunos de los intervalos son la región del ultravioleta y la región del visible.

La radiación ultravioleta (UV), es la [radiación electromagnética](#) cuya longitud de onda va aproximadamente desde los 400 nm, el límite de la luz violeta, hasta los 200 nm y se divide en tres zonas:

UV-A: Banda más cercano al espectro visible ubicada desde 320 a 400 nm.

UV-B: Banda que se encuentra entre 280 y 320 nm.

UV-C: Banda de longitud de onda menor a 280 nm.

La región del visible comienza a partir de ≈ 400 nm hasta ≈ 1000 nm y es la radiación que puede ser detectada por el ojo humano. Comparada con la totalidad del espectro electromagnético, constituye una porción muy reducida, pero es la más estudiada y conocida³⁶.

En el estudio espectrofotométrico, cuando un átomo absorbe radiación, los electrones son promovidos desde un orbital de baja energía a otro de mayor energía, cuando el electrón se relaja hasta el estado fundamental se libera la misma cantidad de energía que se absorbió anteriormente (fotón) y la energía del fotón va a depender de la frecuencia de la radiación.

Con el espectro de UV-VIS, durante la titulación de una solución de complejo metálico con ADN (titulante) y estudiando el cambio tanto de la absorbancia como de la longitud de onda a la cual ocurre el proceso, se pueden observar dos comportamientos. Si la absorbancia disminuye con incrementos del volumen de ADN, se denomina hipocromismo. Lo contrario se conoce como hipercromismo. Otra característica que se puede observar en el espectro es si ocurren desplazamientos de los mismos hacia el visible. En este caso se dice que hubo desplazamiento batocrómico, o batocromismo, en caso contrario se conoce como ipsocromismo.

Según el estudio realizado por Xiiu-Hua Zou y colaboradores³⁷, puede determinarse la constante de interacción entre el ADN y el complejo metálico, con titulaciones espectrofotométricas por medio de la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F) = [\text{ADN}]/(\varepsilon_B - \varepsilon_F) + 1/Kb(\varepsilon_B - \varepsilon_F) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

[ADN]= concentración molar del ADN.

ε_F = coeficiente de extinción molar del complejo libre ($\varepsilon_F = A/[\text{Metal}]$).

ε_B = coeficiente de extinción molar del complejo enlazado.

ε_A = coeficiente de extinción para el metal en cada punto de la titulación.

Kb = constante de interacción.

A= absorbancia.

[Metal]= concentración molar del complejo metálico.

Kb oscila, generalmente, entre $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ para distintos sistemas complejo metálico-ADN. Permite determinar si el complejo interactúa o no con el ADN sin discriminar el tipo de interacción que se produce (covalente o no covalente).

Adicionalmente existen perfiles de desnaturalización térmica del ADN, la cual se sigue por medidas de la absorbancia en el UV-VIS, de un sistema sometido a una tasa de calentamiento. Este tipo de experimento, cuyas variaciones sirven para evaluar interacciones estabilizantes o desestabilizantes, indica que si obtenemos un sistema complejo-ADN con punto de desnaturalización mayor que el del ADN solo, entonces el metal actúa estabilizando la doble hélice. Caso contrario ocurre al obtenerse una temperatura de desnaturalización menor.

3.7. Interacción de los complejos metálicos con el ADN. Viscosimetría.

La viscosidad es la propiedad que caracteriza la resistencia de un líquido o gas a fluir. La viscosidad de las partículas que están presentes como un fluido (líquido o gas) depende de las

interacciones existentes entre las especies presentes (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y otras), del tamaño y la forma.

La intercalación es una interacción importante entre especies presentes en un fluido constituido por ADN y un complejo metálico. Consiste en la disposición del complejo o parte de éste, entre las bases nitrogenadas del ADN. Esto produce un alargamiento en la doble hélice; lo que trae como consecuencia una variación en la viscosidad del fluido⁴¹.

Por medio del estudio de la viscosidad de distintas soluciones de complejos metálicos con ADN se puede inferir el tipo de interacción que existe entre el complejo de estudio y el ADN. Xiiiau-Hua Zou³⁷ y cols. y Yumin Song⁴² y cols., demostraron que cuando la interacción es de tipo intercalativa, la relación de viscosidades se incrementa de manera proporcional con una relación de la concentración de metal / [ADN]. El aumento de la relación de viscosidad, es debido a que las bases nitrogenadas se separan para acomodar el ligando y en consecuencia se produce un alargamiento la hélice del ADN.

Mediante la gráfica de la viscosidad relativa $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus [Metal]/[ADN] se puede observar el comportamiento de la viscosidad con el cambio de concentración del complejo. Donde η es la viscosidad del ADN en presencia del complejo y η_0 es la viscosidad de ADN solo. Los valores de viscosidad son calculados por los tiempos obtenidos de las distintas soluciones al pasar por un viscosímetro. Si la gráfica muestra una tendencia ascendente, significa que el complejo estudiado es un intercalador en caso contrario se interpreta la ausencia de intercalación y se dice que el complejo no es intercalante.

Estudios recientes han aportado información acerca de las diferentes tendencias observadas en la gráfica de la viscosidad relativa versus la relación de concentraciones concentración Metal /

ADN; y es que una tendencia descendente de la viscosidad con el aumento de la concentración de complejo es una prueba de que la interacción existente es meramente electrostática⁴³.

3.8. Interacción de los complejos metálicos con el ADN. Electroforesis.

La electroforesis es una técnica analítica para la separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico, como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato.

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en cubetas de acrílico, generalmente horizontales. La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico.

La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa con un tamaño de poro homogéneo que se haya sumergido y embebido en la fase móvil. El polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño es la agarosa. La migración de los fragmentos de ácidos nucleicos (ADN o ARN), en sus diferentes formas (superenrollado, relajado, linearizado o fragmentado) en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico, depende tanto del voltaje del campo, como del tamaño de poro del gel de agarosa.

La separación efectiva de las distintas formas de ADN o ARN depende tanto de la masa como de la carga/masa de los distintos fragmentos. Transcurrido el tiempo de separación, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente tras iluminación con luz UV, es un método

generalizado de detección de fragmentos de ADN, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice de ADN y emite luz visible (fluorescencia).

En el estudio de la interacción de los complejos metálicos con el ADN, esta técnica permite diferenciar entre intercalación del complejo y clivaje del ADN por efecto del complejo. Los plásmidos pueden encontrarse en forma relajada o superenrollados. Cuando un compuesto se intercala en el ADN se produce cierto grado de desenrollamiento y se modifica la tensión de las cadenas del ADN, lo que trae como consecuencia que disminuyan las unidades superenrolladas y el número de revoluciones completas de una cadena de nucleótidos alrededor del eje de la doble hélice⁴⁴.

En la Figura 11, se muestran las formas que puede adoptar un plásmido. La forma I, es el plásmido súperenrollado, la forma I_0 es el plásmido relajado o circular producto de una intercalación. La forma II es otra forma relajada del plásmido pero producto de la ruptura de una de las cadenas de nucleótidos; la forma III es el plásmido linearizado producto de la ruptura en ambas cadenas de nucleótidos. La ruptura de ambas cadenas en diferentes partes del plásmido puede llegar a producir fragmentos del mismo.

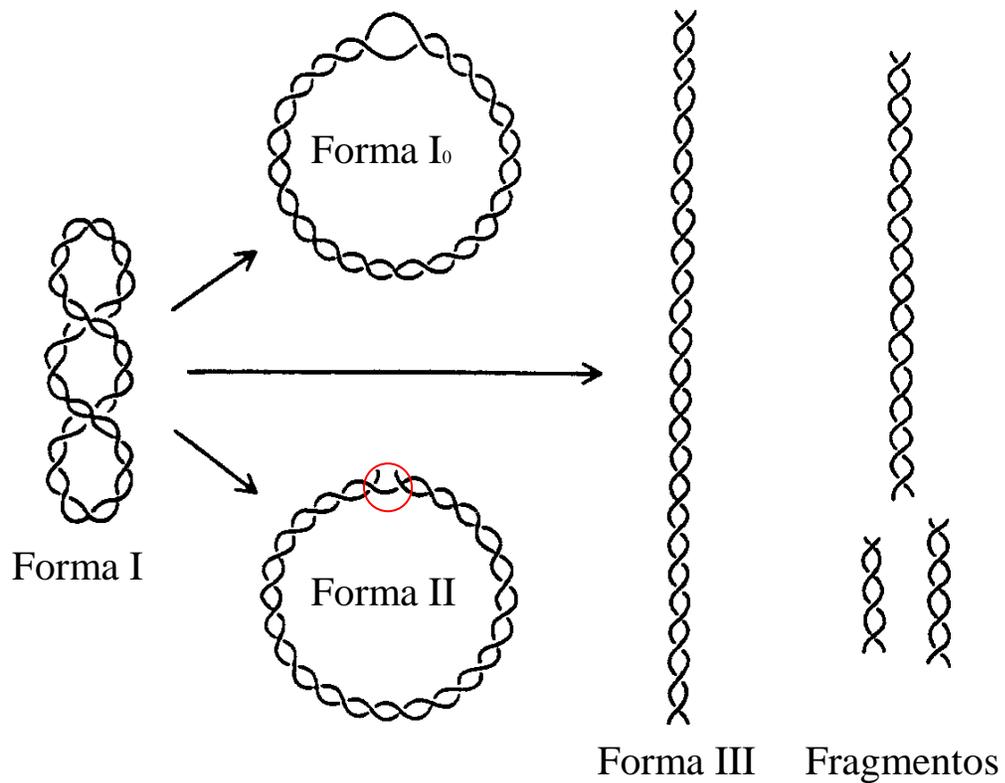


Figura 11. Formas que puede adoptar el plásmido. Explicación en el texto.

3.9. Interacción de los complejos metálicos con el ADN. Covalencia.

Existen una gran cantidad de complejos metálicos que presentan interacción covalente con el ADN entre los cuales se encuentran algunos complejos de platino que han sido usados clínicamente en diferentes tipos de cáncer. El mecanismo de acción propuesto para estas drogas es la formación de enlaces covalentes entre el platino y los nitrógenos de las guaninas del ADN⁴⁵. Un ejemplo de esto se tiene en la Figura 12.

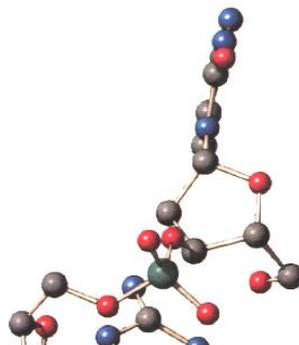


Figura 12. Complejo de cis-platino interactuando con las guaninas de un polinucleótido.

El estudio por covalencia consiste en incubar solución de complejo y solución de ADN a temperatura controlada. Transcurrido el período de incubación, la solución es dializada a pH controlado⁴⁶. Se divide en dos porciones. En una de ellas se determina la cantidad de complejo metálico que reaccionó (mediante Plasma Inductivamente Acoplado, ICP-ES o por absorción atómica) con el ADN y con la otra, la cantidad de ADN es obtenida por un método indirecto conocido como el Ensayo de Burton⁴⁷ por UV-VIS. Una vez obtenida la concentración de complejo de titanio y la concentración de ADN, se procede a determinar la proporción de nano moles de complejo que covalentemente están unidos a un miligramo de ADN o en número de bases de ADN⁴⁷.

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Aspectos generales de la síntesis de los complejos de titanio.

Todas las síntesis de los complejos se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno, utilizando la técnica de Schlenk⁴⁸. Se empleó tetrahidrofurano 99% (Burdick & Jackson) seco con sodio metálico y benzofenona como indicador.

Para la síntesis se requirió Titanoceno (Cp_2TiCl_2) (Strem Chemicals), KPF_6 y AgNO_3 (Aldrich), clotrimazol y cloroquina difosfato (Sigma). Cloroquina difosfato se emplea como material de partida para la obtención de la cloroquina base. Todos estos compuestos fueron utilizados para la obtención de los complejos de titanio.

Los productos de síntesis fueron caracterizados por:

- * Análisis elemental.
- * Espectroscopia infrarroja.
- * RMN en una y dos dimensiones.
- * Espectroscopia de Masa.
- * Conductividad molar.

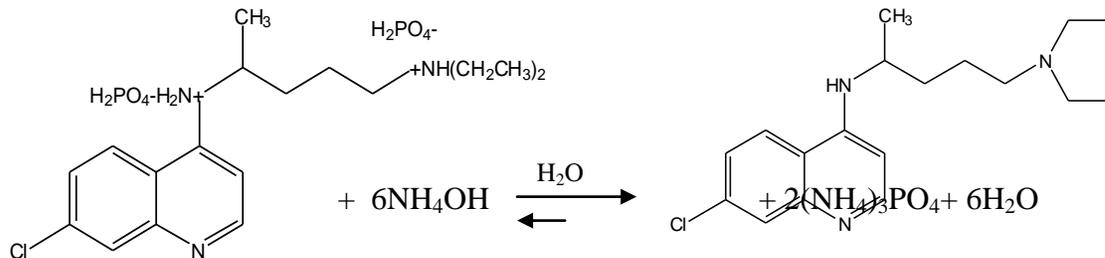
Los análisis elementales se realizaron en un analizador Fisons EA 1108. Los espectros de IR se hicieron en un espectrómetro Nicolet Magna IR 560, en pastillas de KBr, mientras que, para los espectros de RMN se utilizó un espectrómetro Bruker AVANCE 300 y espectrómetro Bruker AVANCE 500.

4.2. Plan de trabajo experimental



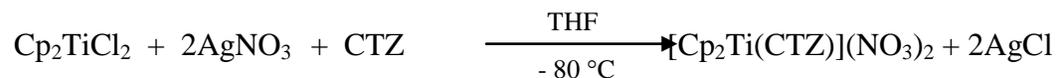
4.3. Síntesis de los complejos de Titanio

4.3.1 Extracción de la cloroquina base.



A una solución de cloroquina difosfato ($C_{18}H_{26}ClN_3 \times 2H_3PO_4$) (10 g, 19,4mmol) en 55 ml de agua, se le añaden 10 ml de hidróxido de amonio lentamente y con agitación. Luego se agrega cloroformo. Esta solución se coloca en un embudo de separación donde se procede a separar la fase acuosa de la orgánica. A la fase orgánica obtenida se le agrega $MgSO_4$ como desecante y se filtra. La solución obtenida es colocada en un balón y el cloroformo se rotaevapora. Se obtiene un aceite de color amarillo-verdoso, el cual se disuelve en la mínima cantidad de acetonitrilo (≈ 15 mL) y se coloca a $-10^\circ C$ por una noche. El producto obtenido se lava con acetonitrilo frío y se seca al vacío.

4.3.2 Síntesis de $[Cp_2Ti(CTZ)](NO_3)_2$ [1]



Cp_2TiCl_2 (100 mg; 0,402 mmol) se disuelve en tetrahidrofurano seco (15mL), luego se agrega $AgNO_3$ (75mg; 0,442 mmol) y se deja en agitación por 26 h a temperatura ambiente. Se filtra y la solución se coloca en un baño de hielo seco y acetona a $-80^\circ C$ por 10min, luego se añade el clotrimazol (153 mg; 0,443 mmol), y se deja con agitación por 6 h. La solución se concentra y se lleva a $-5^\circ C$ por una noche; sino se observa precipitado la solución se lleva a sequedad y al

residuo obtenido se agrega éter y se agita hasta obtener un sólido amarillo ocre, el cual se filtra, se lava con éter dietílico y se seca al vacío.

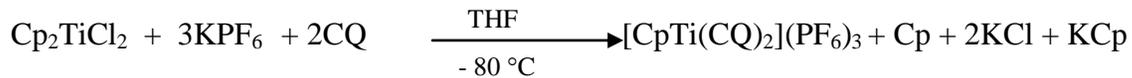
4.3.3 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_2$ [2]



Cp_2TiCl_2 (100 mg; 0,402 mmol) se disuelve en tetrahidrofurano seco (15mL), luego se agrega AgNO_3 (75mg; 0,442 mmol) y se deja en agitación por 25 h a temperatura ambiente. Se filtra y la solución se coloca en un baño de hielo seco y acetona a -80°C por 10min, luego se añade la cloroquina base (141 mg; 0,443 mmol), y se deja con agitación por 26 h. La solución se torna amarilla con sólido suspendido y un aceite marrón en las paredes, la suspensión se coloca en otro balón, se concentra y se deja a -5°C por una noche; el producto obtenido se lava con éter y se seca al vacío.

4.3.4 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]

4.3.5



Cp_2TiCl_2 (100 mg; 0,402 mmol) se disuelve en tetrahidrofurano seco (15 mL), luego se agrega KPF_6 (158 mg; 0,858 mmol) y se deja en agitación por 4,5 días se filtra y la solución se coloca en un baño de hielo seco y acetona a -80°C por 10 min, luego se le añade la cloroquina (129 mg; 0,403 mmol), se deja con agitación por 35 min, se concentra y se lleva a -5°C . Se debe obtener

un precipitado anaranjado, el cual se filtra, se lava con éter dietílico varias veces y se seca al vacío.

4.4. Estudio de la interacción de los complejos de titanio con el ADN

4.4.1 Titulaciones espectrofotométricas

4.4.1.1 Preparación de la solución de ADN.

Se pesa la cantidad de ADN de timo de ternero (CT DNA, ADN TT) necesaria para preparar una solución de 1 mg/ml de ADN en agua, se deja agitando la solución por una noche y luego se determina la concentración exacta de la solución de ADN por UV-Visible en un espectrómetro HP-8453.

4.4.1.2 Determinación de la concentración por UV-Visible

En dos celdas idénticas de cuarzo se colocarán 2 ml de agua, una celda se emplea como blanco y en la otra se coloca 50 μ l de solución de ADN (aprox. 1mg/ml). Luego se usa el máximo de absorbancia del ADN a 260 nm y considerando que a esa longitud de onda la absorptividad molar es de 6600 M^{-1} , se calcula la concentración molar exacta de ADN empleando la ley de Beer, Para el cálculo de la concentración en mg/ml se utiliza 21 como coeficiente de absorptividad molar.

4.4.1.3 Preparación de las soluciones de complejo.

Se pesa la cantidad necesaria para preparar soluciones de los complejos de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en Dimetilsulfóxido (DMSO) u otro solvente según la solubilidad propia del complejo a estudiar.

4.4.1.4 Condiciones experimentales en Titulaciones espectrofotométricas.

Para determinar las condiciones de trabajo, en dos celdas de cuarzo se colocan 2 ml del mismo solvente en donde se disuelve el complejo, una de las celdas se toma como blanco y a la otra se le añaden alícuotas de solución de complejo. Se toman los espectros después de cada adición, y se prosigue con adiciones de complejo en cada celda hasta conseguir una banda bien definida en el espectro UV-Visible. Se calcula la concentración a la cual se obtuvo una señal de absorbancia cercana a 1. Con los datos de cada dilución se calcula el coeficiente de absorptividad molar del complejo estudiado.

4.4.1.5 Titulación con ADN

Para realizar la titulación con ADN se agregan alícuotas de ADN de concentración conocida (aprox. 1mg/ml) tanto al blanco como a la celda con la muestra, para restar la absorbancia del ADN de aquella del complejo. Después de cada adición de ADN la celda se agita y luego se toman los espectros. Se obtendrá un espectro por cada adición de ADN.

4.4.2. Desnaturalización Térmica de ADN

Para realizar el estudio de desnaturalización térmica de ADN, inicialmente se determina la temperatura de desnaturalización del ADN solo, para lo cual en una celda de cuarzo se colocaron 75µl de la solución de ADN, se completó con buffer hasta 3000µl y se colocó en el equipo de UV-Visible con un programa ascendente de temperatura que permite obtener lecturas de absorbancia a 260nm.

Una vez determinada la temperatura de desnaturalización del ADN solo, se procedió a realizar mezclas con relación [complejo]/[ADN] de 0,2 y con distintos tiempos de incubación (1/2, 2 y 24 horas). Se procedió a determinar la nueva temperatura de fusión de las mezclas complejo-ADN.

El resultado obtenido es una gráfica de absorbancia Vs. temperatura y el cálculo de la primera derivada (donde la primera derivada es igual a cero) es la temperatura de desnaturalización.

4.4.3 Viscosimetría.

4.4.3.1 Preparación de las mezclas.

Se coloca la solución de ADN ≈ 1 mg/ml, solución de complejo y el volumen de solvente del necesario para que el efecto del solvente sea el mismo en todas la mezclas, para ello se asegura que el volumen de DMSO en las mezclas sea siempre el mismo.

4.4.3.2 Medidas de viscosidad.

Se colocan las mezclas en un viscosímetro de Oswald, el cual se mantiene sumergido en un baño de agua termostatzado a 25 °C. Con un cronometro y se registra el tiempo que cada solución tarda en recorrer un bulbo de 0.5 ml. Cada medida se toma tantas veces como sea necesario para reducir la dispersión.

4.4.4. Electroforesis.

Se utiliza plásmido superenrollado (pUC119), el cual se incuba hasta por 18 h a 37°C con soluciones del complejo en estudio a diferentes concentraciones. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la reacción se detiene con 2M NaCl suficiente para que la concentración final sea de 0,2M. Después de haber preparado un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se procede a depositar 5 μ L de cada muestra mezclados con 2 μ L de solución de buffer de carga

(Buffer de TBE, glicerina y azul de bromofenol), en cada uno de los pozos del gel de agarosa preparado. Se inicia la electroforesis aplicando la diferencia de potencial a ambos extremos de la cámara de separación. El primer pozo debe contener sólo el plásmido superenrollado sin complejo. Después de culminada la separación, se coloca el gel de agarosa sobre un transiluminador de UV donde se procede a tomar la fotografía a la placa.

4.4.5 Estudio de covalencia.

Se ponen en contacto soluciones de concentración conocida de los complejos y del ADN durante un tiempo de incubación de hasta 72 horas. La solución obtenida se somete a un proceso varias precipitaciones y resuspensiones del ADN, obteniéndose como resultado una solución de ADN resuspendido que se divide en dos porciones. A la primera se le determina la concentración de metal en nmoles/mL por espectrofotometría de absorción atómica o de plasma acoplado inductivamente. Con la segunda porción se mide la concentración del ADN en mg/mL mediante el ensayo de Burton.

4.4.5.1 Ensayo de Burton.

Consiste en incubar alícuotas de la solución de ADN resuspendido y de soluciones patrón de ADN para preparar una curva de calibración (previamente hidrolizadas en HClO_4), con difenilamina. Con el complejo fenilamina – desoxirribosa ya formado, de coloración azul se procede a determinar la concentración de ADN cada celda midiendo la absorbancia a 595 nm, mediante en un espectrofotómetro de UV-VIS, de patrones y muestras incubadas.

4.4.5.2 Determinación de la concentración de titanio por absorción atómica ICP.

Se preparan patrones de concentración conocida de titanio. Luego las muestras son analizadas por absorción atómica a la longitud de onda apropiada y comparadas con una curva de calibración.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis y caracterización de los compuestos propuestos.

5.1.1 Extracción de la cloroquina base.

La cloroquina base (CQ) se utiliza en medicina y se comercializa como la sal difosfato. Sin embargo, para coordinarla a metales de transición, resulta mucho más conveniente usar la base libre, a fin de tener disponibles los tres átomos de nitrógeno para coordinar.

La preparación de este ligando ha sido reportado previamente y su caracterización realizada por análisis elemental, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H , espectroscopía infrarroja y punto de fusión³².

El análisis elemental de la cloroquina obtenida (Tabla I) concuerda con la estructura propuesta para la cloroquina base.

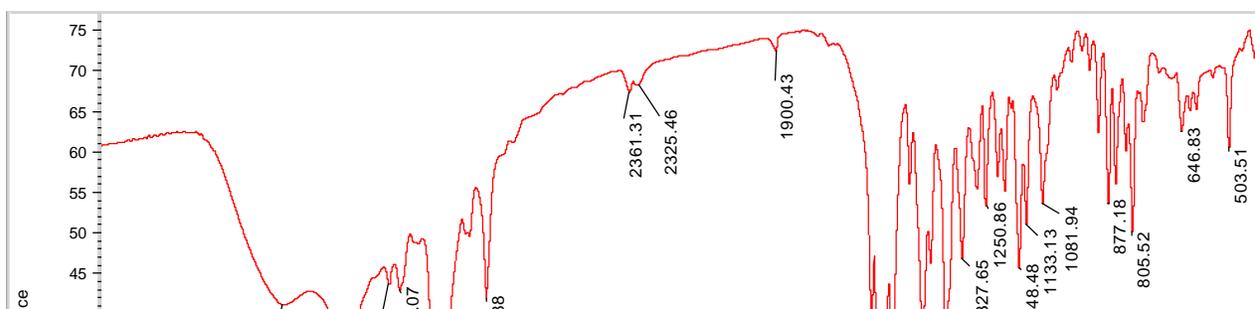
Elemento	% Calculado	% Obtenido	Variación
Carbono	67,63	67,96	0,33
Hidrógeno	8,13	7,82	0,31
Nitrógeno	13,14	13,13	0,01

Tabla I. Análisis elemental de la cloroquina base (CQ).

El espectro de IR en bromuro de potasio (Figura 13) mostró las señales más importantes de la cloroquina base como son los estiramientos N-H, C=N y C=C de los compuestos aromáticos (Tabla II):

Estiramiento	Frecuencia ν (cm^{-1})
N-H	3240 y 3431
C=C	1573
C=N	1608

Tabla II. Señales más importantes del espectro infrarrojo de la cloroquina base (CQ).



N-H

C=N

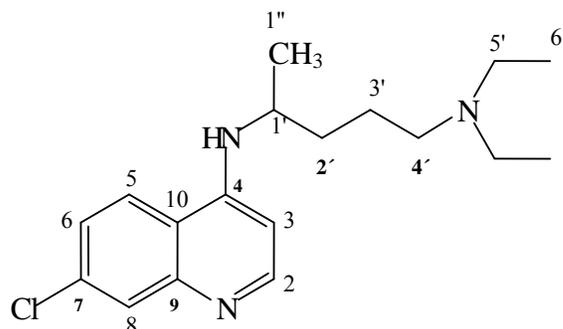
C=C

Figura 13. Espectro de infrarrojo de la cloroquina base (CQ) en KBr.

La asignación de los protones de la cloroquina por medio de RMN ^1H en DMSO se muestra en la Tabla III.

<i>Asignación</i>	δ_{H} (ppm) de la CQ	<i>Multiplicidad</i>
H_5	8,43	d
H_2	8,41	d
H_8	7,82	d
H_6	7,49	dd
H_3	6,56	d
NH	6,97	
H_1'	3,77	m
$H_4' H_5'$	2,43	m

H_2, H_3	1,71	m
$H_{1''}$	1,30	t
H_6'	0,96	t



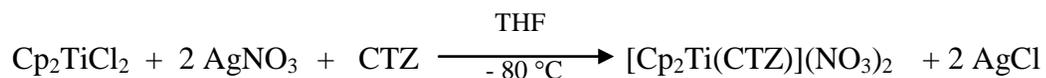
1

Estructura de la cloroquina

Tabla III. Desplazamiento químico de los protones de la cloroquina base en $(CD_3)_2SO$ realizado en un equipo de 300 MHz. (d:doblete, dd:doblete de doblete m:multiplete y t:triplete). El espectro se encuentra en el ANEXO.

5.1.2 Síntesis de $[Cp_2Ti(CTZ)](NO_3)_2$ [1]

$[Cp_2Ti(CTZ)](NO_3)_2$ es un sólido marrón-ocre que se obtiene con un 70% de rendimiento, estable al aire y soluble en diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetona, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y acetonitrilo. Su punto de fusión está entre 151- 154°C y se descompone a 157°C.



El análisis elemental (Tabla IV) se corresponde con la fórmula propuesta para el complejo con dos moléculas de agua $[Cp_2Ti(CTZ)H_2O](NO_3)_2 \cdot H_2O$ [1]:

Elemento	% Calculado	% Obtenido	Variación
Carbono	56,31	56,81	0,50
Hidrógeno	4,54	3,93	0,60
Nitrógeno	8,20	8,25	0,50

Tabla IV. Análisis elemental del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1].

El espectro de infrarrojo (Figura 14) muestra las señales correspondientes a las vibraciones del clotrimazol (CTZ) como son los estiramientos $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$ en compuestos heterocíclicos, en $1571,5$ y 1445 cm^{-1} respectivamente, y la banda característica del nitrato $\nu(\text{N}-\text{O})$, que se encuentra como contracción en 1388 cm^{-1} . Tal como se muestra en la Tabla V.

Estiramiento	Frecuencia ν (cm^{-1})
C=C	1571
C=N	1445
N-O	1388

Tabla V. Señales más importantes del espectro infrarrojo del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1].

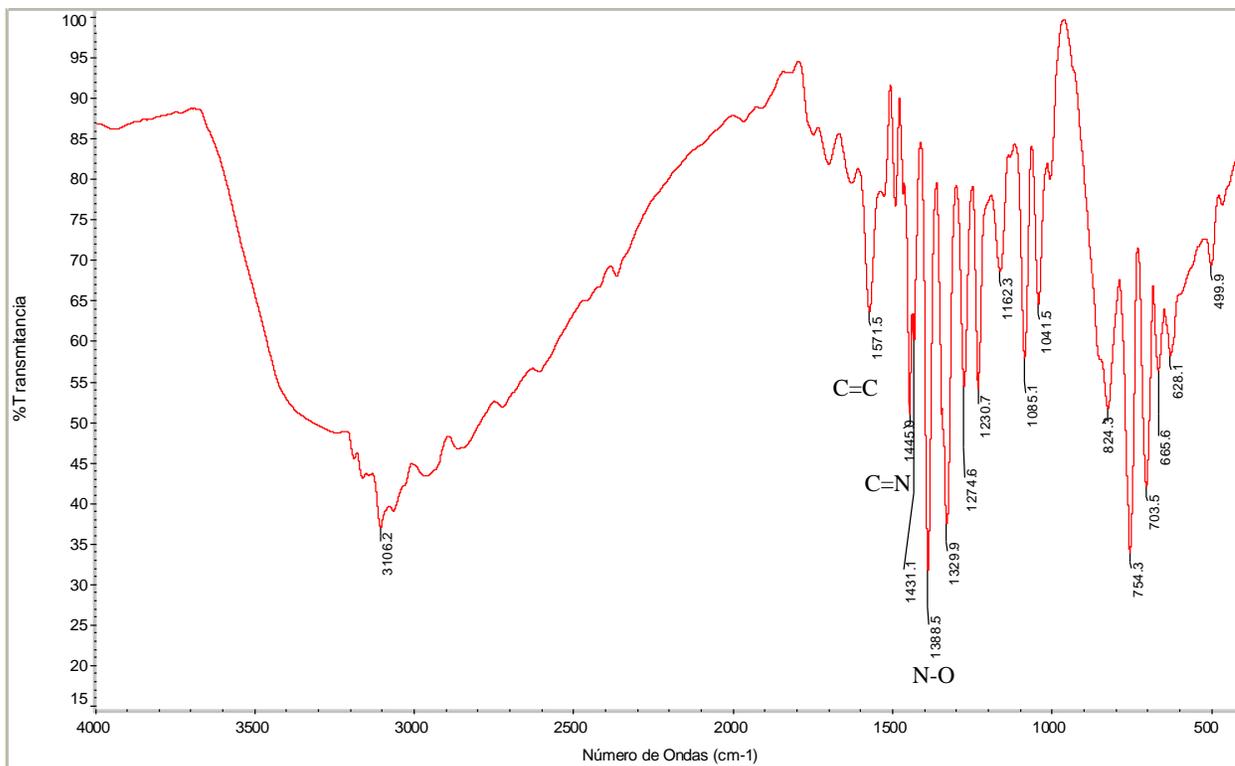
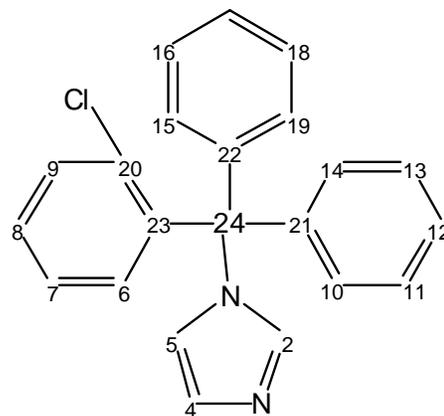


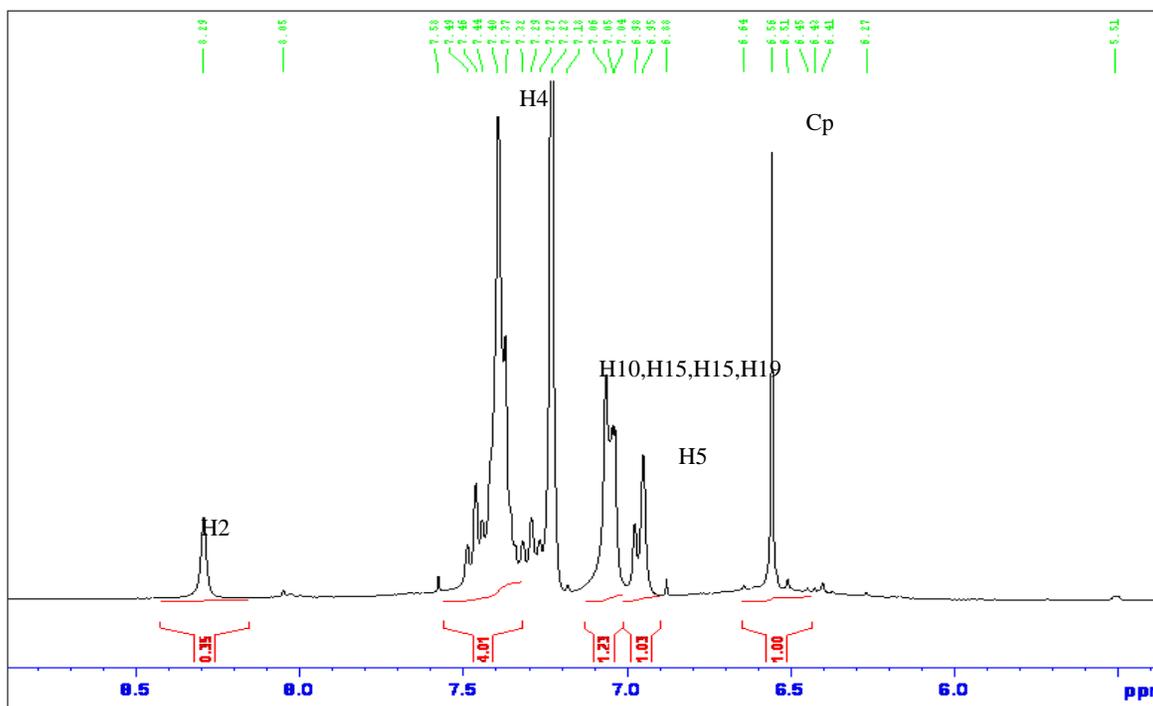
Figura 15. Espectro de infrarrojo del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] en KBr.

En el espectro de RMN ^1H CDCl_3 (Figura 15) se puede observar como los protones H_2 , H_4 y H_5 del clotrimazol se han desplazado a campo bajo en 0,85, 0,36 y 0,25 ppm respectivamente, mientras que el resto de los protones muestra corrimientos menores a 0,10 ppm; con respecto a su posición original en el espectro del clotrimazol libre. También se observó un singlete en la región de 6,56 ppm perteneciente a los protones del ciclopentadienilo (Cp) correspondiente a diez protones. En la Tabla VI se muestran las asignaciones de los protones y su desplazamiento con respecto al clotrimazol libre.

Asignación	δ_H (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm) (con respecto al CTZ libre)
H_2	8,29	0,85
H_4	7,40	0,36
H_5	6,96	0,25
H_6	6,96	0,06
$H_{10}, H_{14}, H_{15}, H_{19}$	7,06	0,11
$H_7, H_8, H_9, H_{11}, H_{12},$ $H_{13}, H_{16}, H_{17}, H_{18}$	7,39	0,07
$10H$ Cp	6,56	-



Estructura del clotrimazol

Tabla VI. Desplazamiento químico de los protones del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] en CDCl_3 .Figura 15. Espectro de RMN ^1H del $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] en CDCl_3

De igual forma el espectro de masas por electrospray (Figura 16) presenta señales que pueden atribuirse a la presencia del ion $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)^+$ en $m/z= 586$, la correspondiente perdida del ion nitrato $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})]^{++}$ a $m/z= 519$ y el ligando clotrimazol en $m/z= 345$. El análisis aquí presentado sugiere que el complejo posee la estructura propuesta.

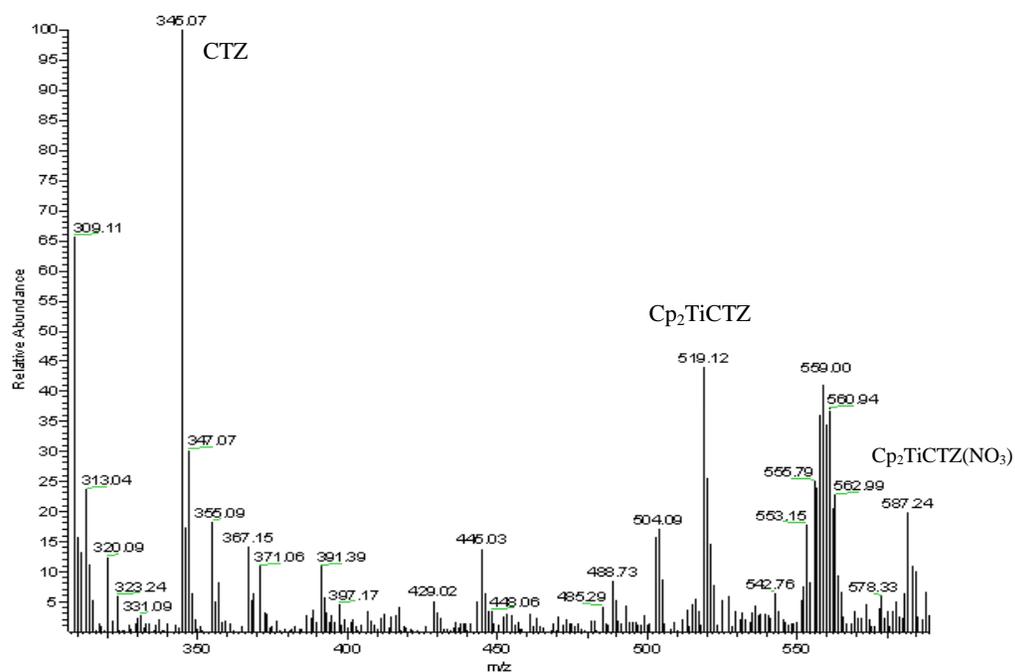


Figura 16. Espectro de masas del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] en metanol.

En función de la caracterización realizada para el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1], se propone una geometría tetraédrica distorsionada para el Ti (IV) (Figura 17)

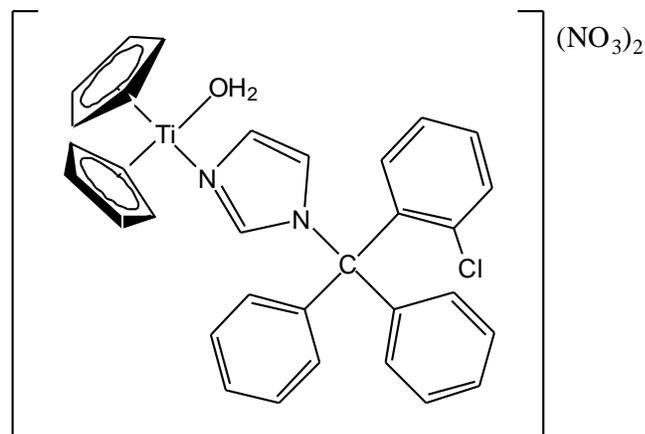
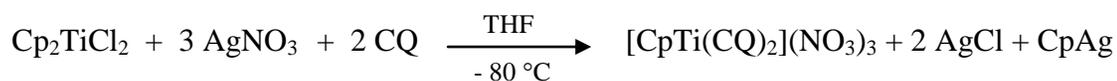


Figura 17. Estructura propuesta para el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]

5.1.3 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]

El complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ es un sólido amarillo claro muy higroscópico y se obtuvo con un 43% de rendimiento. Este es soluble únicamente en dimetilsulfóxido. Tiene un punto de fusión entre 157-159°C.



El análisis elemental del compuesto concuerda con la fórmula propuesta con 15 moléculas de agua. Este resultado sugiere que el complejo es altamente higroscópico.

El espectro de infrarrojo (Figura 19) muestra las señales correspondientes a los estiramientos $\nu(\text{N-H})$ y $\nu(\text{C=N})$ en 3250 y 1551 cm^{-1} de las vibraciones de la cloroquina base así como la $\nu(\text{C=C})$ en compuestos heterocíclicos, en 1613 cm^{-1} (Tabla VII).

Estiramiento	Frecuencia ν (cm^{-1})
N- H	3250
C=C	1613
C=N	1551

Tabla VII. Señales más importantes del espectro infrarrojo del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2].

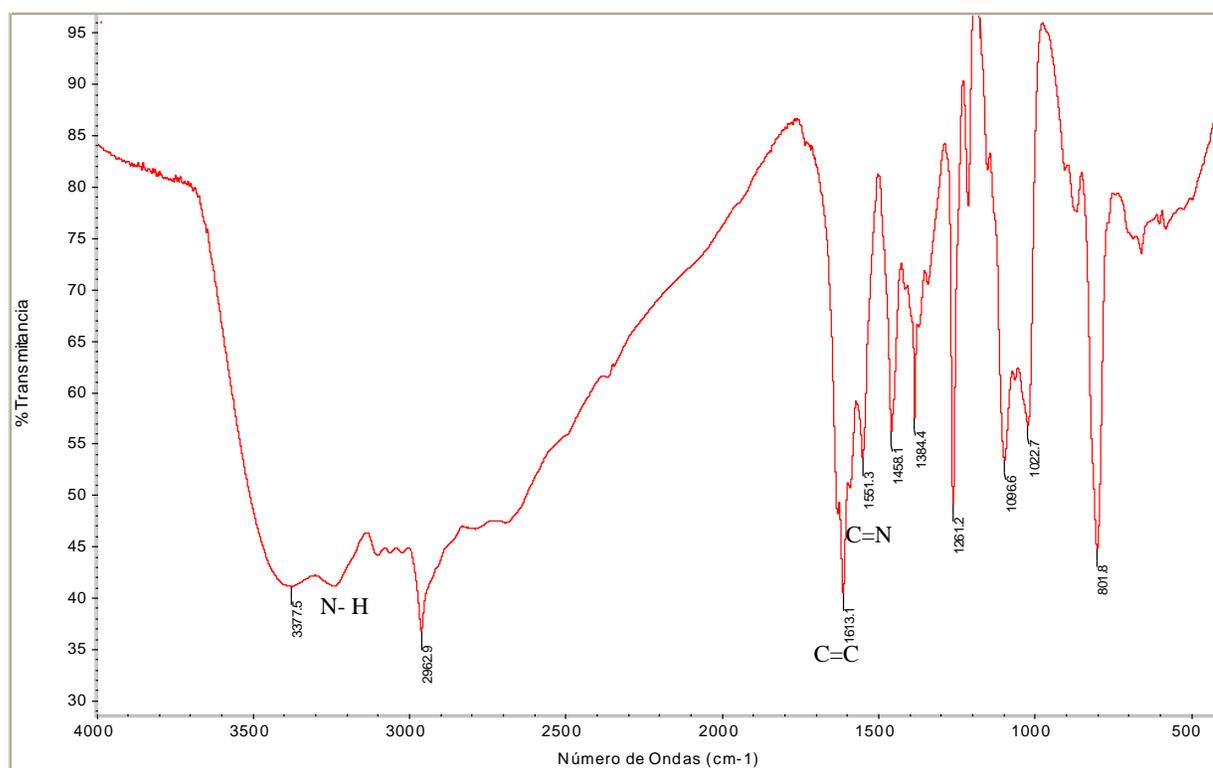
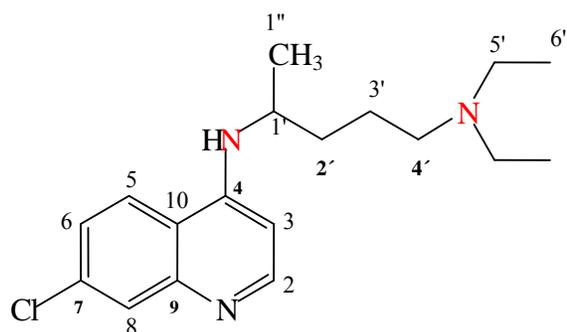


Figura 19. Espectro de infrarrojo del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ en KBr.

El reporte de los estudios de RMN ^1H del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ (Figura 18) permitió asignar los protones y sus desplazamientos químicos y se recogen en la Tabla VIII. Es posible apreciar corrimientos en los desplazamientos químicos a campo bajo de los protones NH y H₅ en 7,41 y 3,00 ppm respectivamente, lo que implica una variación de 0,53 y 0,56 con respecto a la cloroquina libre, por lo que se propone que la coordinación de la cloroquina al titanio es por los

N_4 y N_4' . Por otra parte, la señal correspondiente al ciclopentadienilo se presenta como un doble alrededor de 6.45 ppm (Figura 19), lo que significa que los cinco protones del ciclopentadienilo no son equivalentes, es decir, hay dos pares de protones perfectamente diferenciados y falta un protón por identificar.

<i>Asignación</i>	δ_H (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm) <i>(con respecto al CO libre)</i>
H_8	7,81	0,01
H_2	8,45	0,04
H_5	8,40	0,03
H_6	7,49	0,00
H_3	6,60	0,04
NH	7,50	0,53
H_1'	3,84	0,07
H_5' H_4'	3,00	0,56
H_3' H_2'	1,73	0,02
H_1''	1,24	0,06
H_6'	1,14	0,18
H_{Cp}	6,45-6,54	



Estructura de la cloroquina

Tabla VIII. Desplazamiento químico de los protones del complejo $[CpTi(CO)_2](NO_3)_3$ en $(CD_3)_2SO$ realizado en un equipo de 300 MHz.

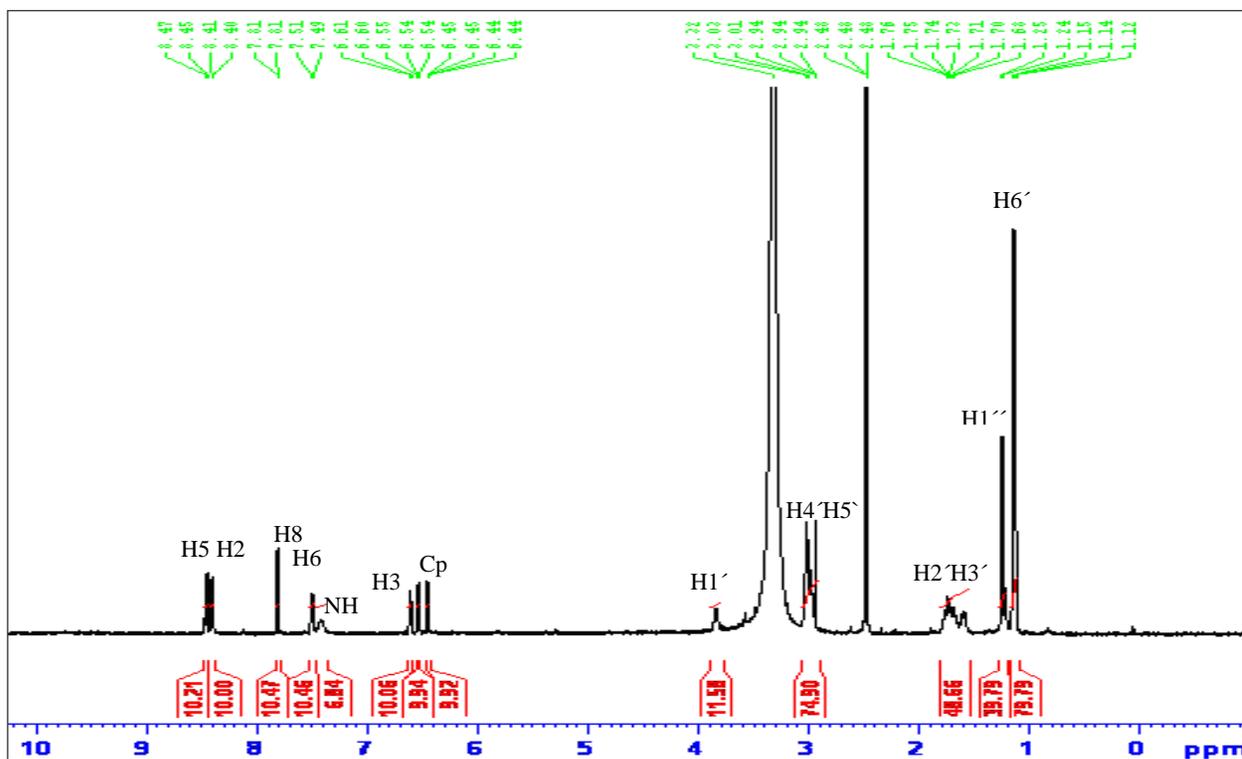


Figura 18. Espectro de RMN ^1H del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

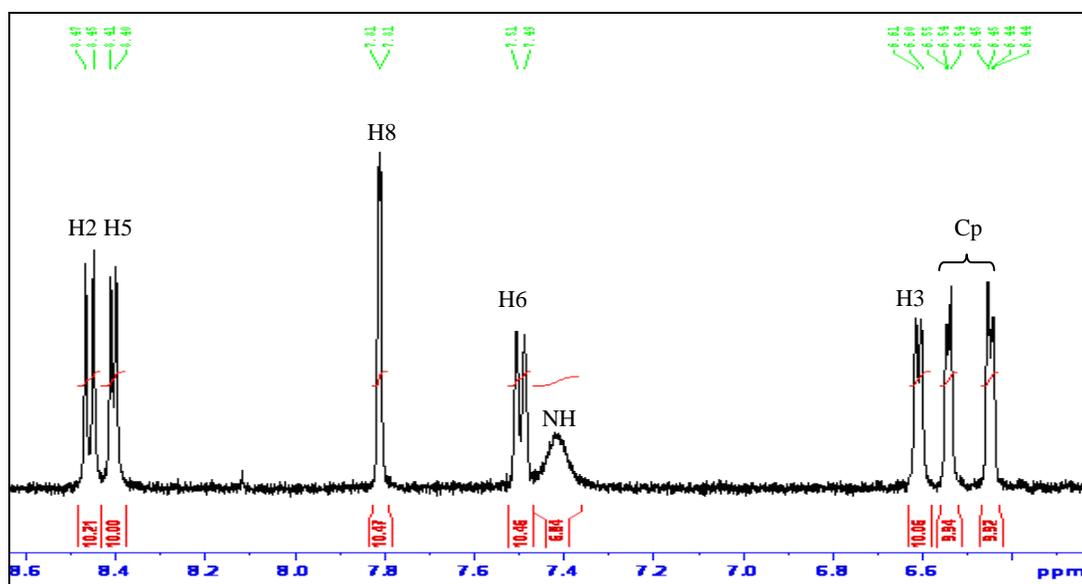


Figura 19. Acercamiento del espectro de RMN ^1H del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

En el espectro de RMN H^1 en dos dimensiones (COSY) (Figura 20), se observa una señal del ciclopentadienilo que acopla con un protón en la zona alifática lo cual es un comportamiento particularmente observado en este complejo. Este protón de la zona alifática es el protón que no se logró asignar en el espectro RMN H^1 (Figura 18). Este fenómeno hace pensar que el grupo ciclopentadienilo no está coordinado al titanio por la nube pi (η^5), como ocurre en la sal de partida (titanoceno), sino que se produjo la formación de un enlace η^1 carbono-titanio el cual se presenta como un H alifático.

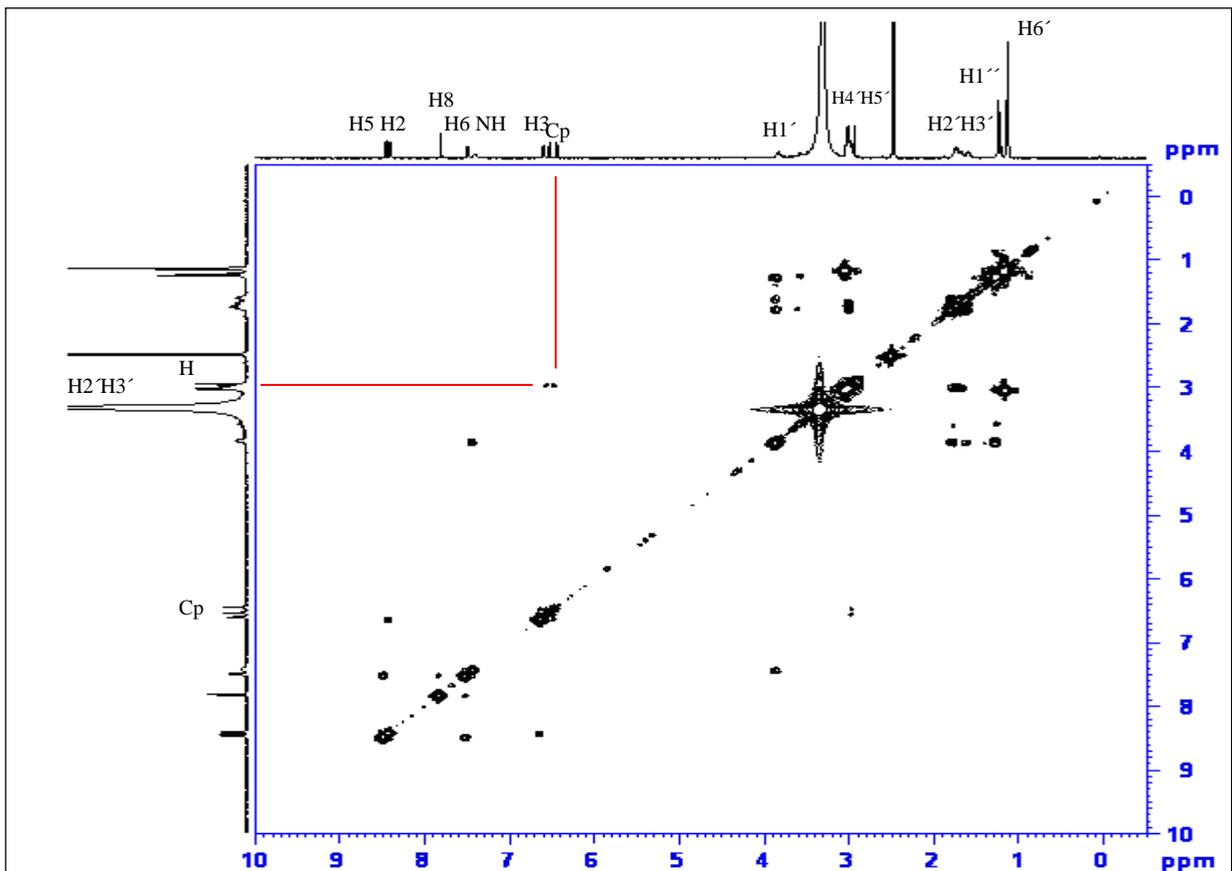


Figura 20. Espectro COSY del complejo $[CpTi(CQ)_2](NO_3)_3$ [2] en $(CD_3)_2SO$ realizado en un equipo de 500 MHz.

El estudio de espectroscopía de masas por electrospray en metanol (Figura 21), muestra señales correspondientes al ion $[\text{CpTiCQ}]^{+3}$ con $m/z= 429$ mientras que con la muestra disuelta en acetonitrilo se observa el ion $[\text{CpTi}(\text{CQ})](\text{NO}_3)^{+2}$ en $m/z= 812$ (Figura 22).

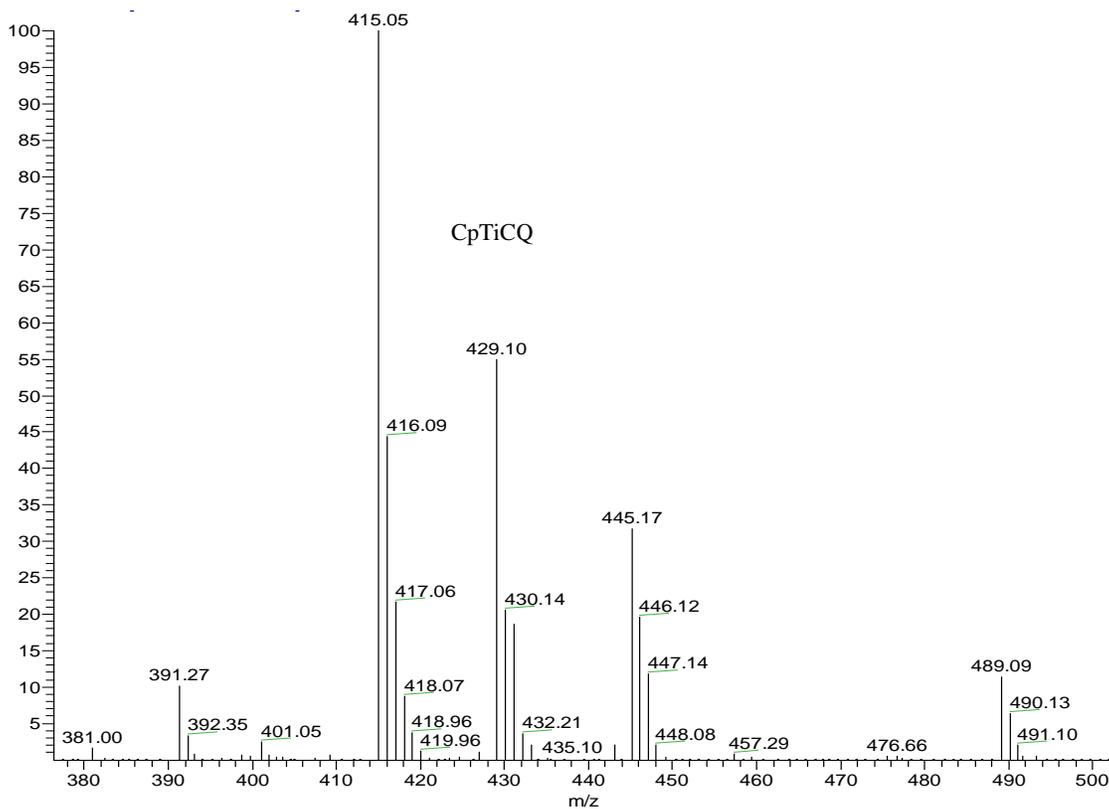


Figura 21. Espectro de masa del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ en metanol.

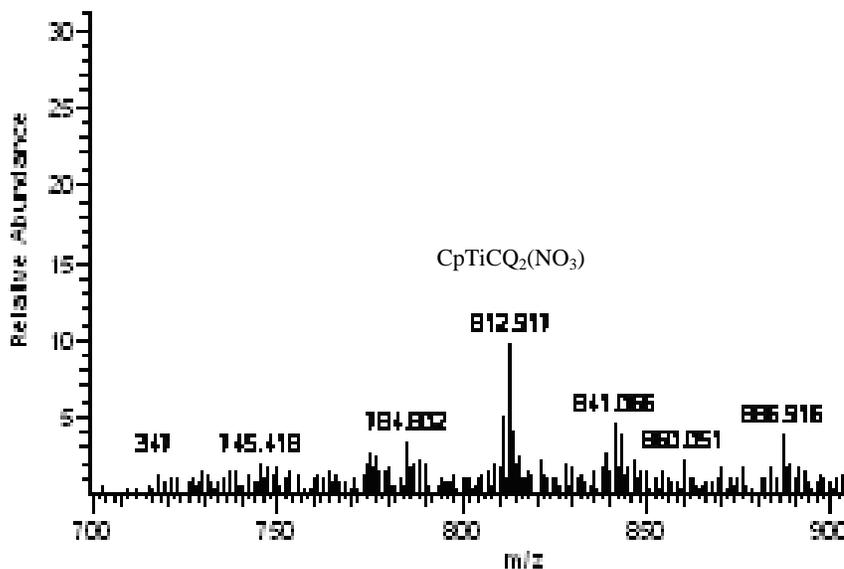


Figura 22. Espectro de masa del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ en acetonitrilo

Según el análisis de los resultados obtenidos la estructura propuesta para el complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2], el Ti tiene una configuración electrónica d^0 y se muestra en la Figura 23 en la cual se observa un arreglo de bipirámide trigonal (no mostrado en la imagen plana de la figura 23).

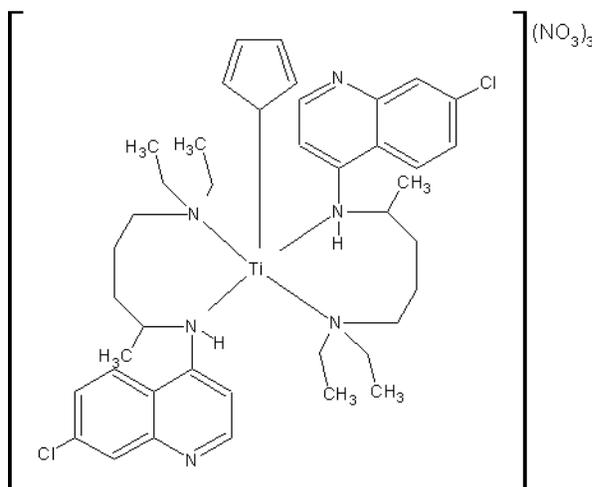


Figura 23. Estructura propuesta para el complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]

5.1.4 Síntesis de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]

El complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ fue sintetizado mediante la reacción de Cp_2TiCl_2 , con KPF_6 para extraer los iones cloruro, produciéndose la precipitación de KCl , el cual fue eliminado de la mezcla de reacción por filtración. Al filtrado se le añadió la cloroquina, en una relación molar de 1:1 respecto al titanoceno en THF, según la ecuación:



Para confirmar la sustitución de los cloruros del titanoceno por hexafluorofosfato, se llevó a sequedad una pequeña cantidad del filtrado, obteniéndose un sólido el cual se analizó por RMN de H^1 y P^{31} , que se muestran en las figuras 24 y 25 respectivamente. Allí pudo asignarse una señal para Cp y otra para P respectivamente.

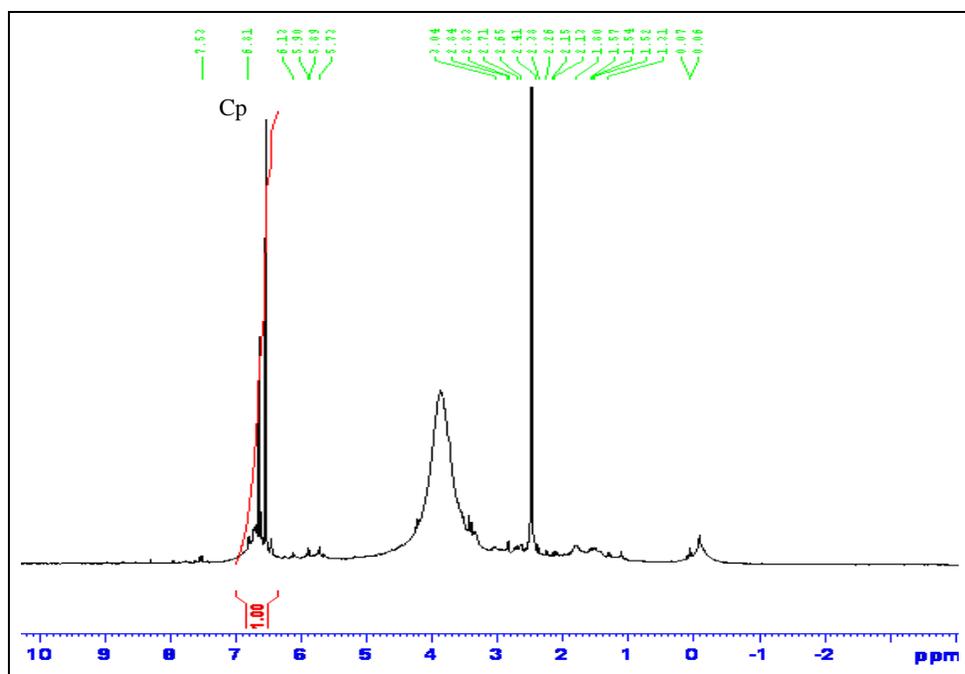


Figura 24. Espectro de RMN H^1 del complejo $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{PF}_6)_2$ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

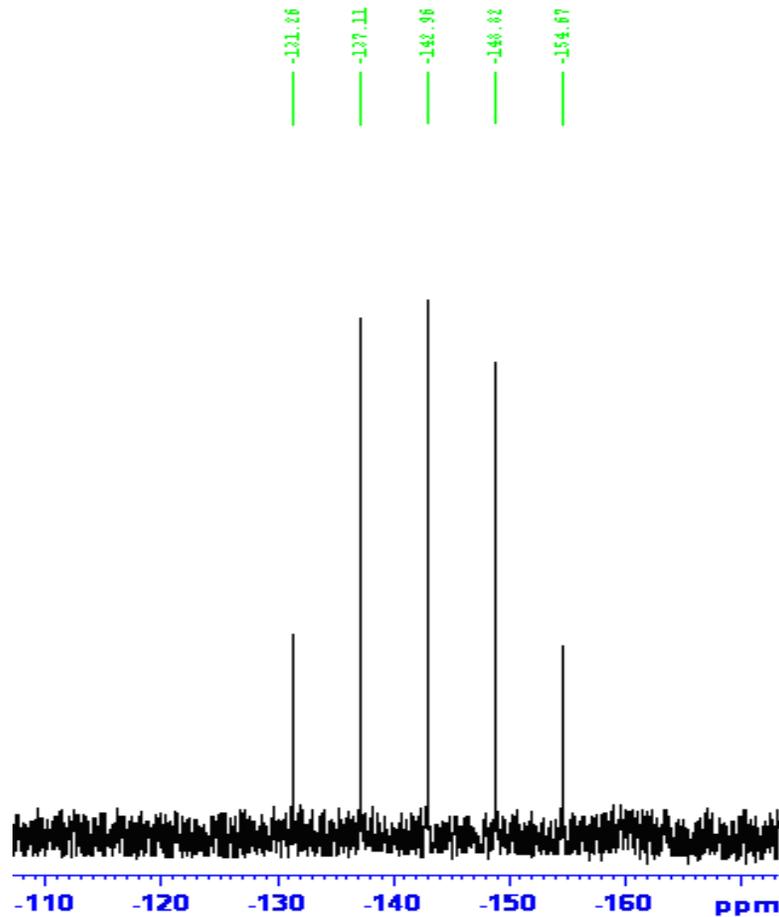


Figura 25. Espectro de RMN ^{31}P del complejo $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{PF}_6)_2$ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Luego de agregar la cloroquina base y dejar reaccionar por 2 días, se procedió a analizar el producto obtenido.

El espectro de infrarrojo (Figura 26) muestra las bandas correspondientes a las vibraciones de la cloroquina como son los estiramientos $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=C})$, y $\nu(\text{C=N})$, así como también se pudo identificar las señales correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{PF}_6)$ y $\nu(\text{H}_2\text{O})$, las cuales se resumen en la Tabla IX.

Estiramiento	Frecuencia ν (cm^{-1})
N-H	3244
C=C	1614
C=N	1552
O-H	3397
P-F	845

Tabla IX. Señales más importantes del espectro infrarrojo del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]

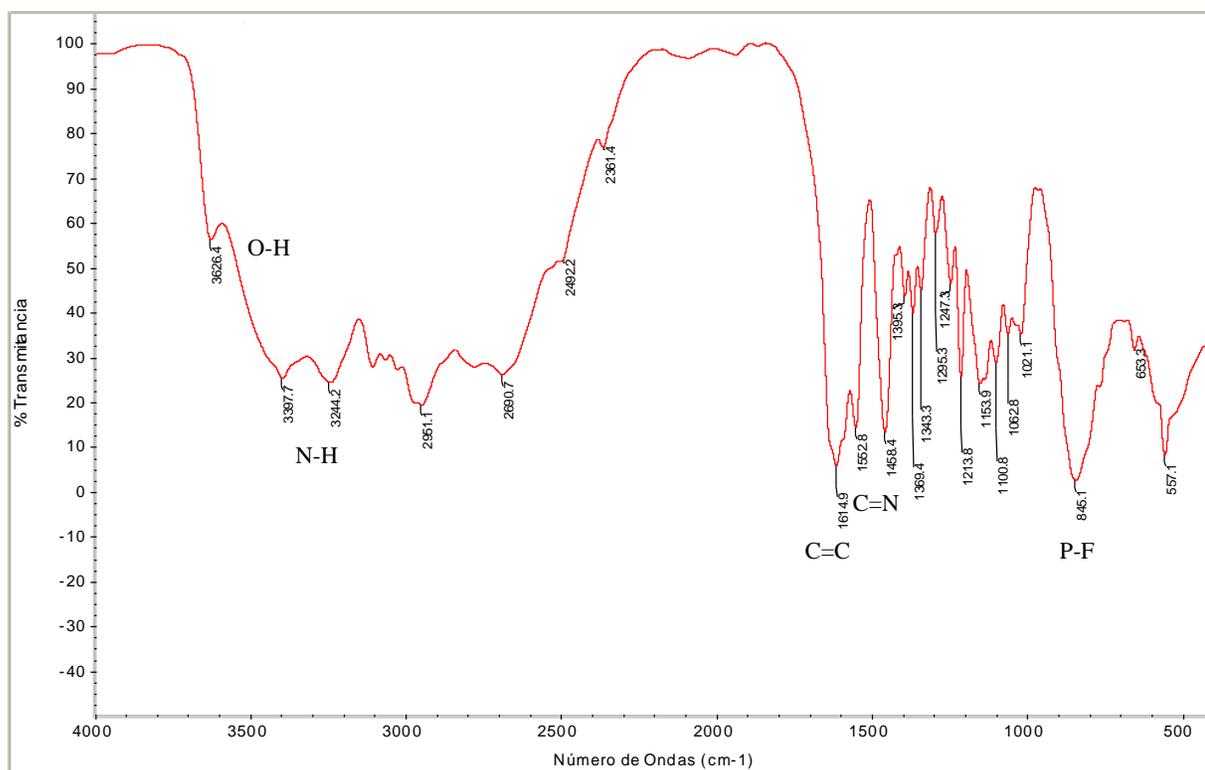
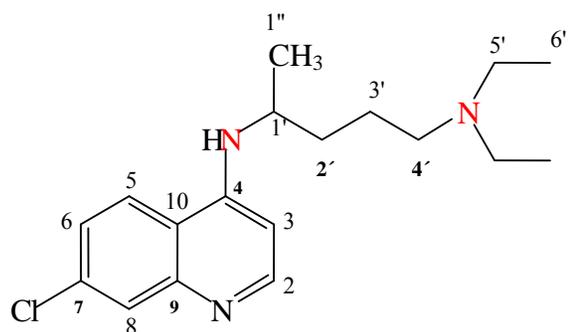


Figura 26. Espectro de infrarrojo del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ en KBr.

El análisis de los espectros de RMN ^1H y COSY (Figura 27 y 28 respectivamente) del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$, permitió asignar todos los protones de la cloroquina. Sus desplazamientos químicos se recogen en la Tabla X. Los corrimientos en el desplazamiento químico de los

protones NH, H_{4'} y H_{5'} de la CQ en el complejo se desplazan a campo bajo en 1,29 y 0,58 ppm respectivamente, con respecto a la cloroquina libre, confirmando que la coordinación de la cloroquina al titanio es por N₄, y N_{4'} al igual que en el complejo [CpTi(CQ)₂](NO₃)₃. De igual forma la señal del ciclopentadienilo en el RMN ¹H se presenta como una señal de doblete alrededor de 6,50 ppm y en el RMN ¹H en dos dimensiones se observa nuevamente una señal del ciclopentadienilo que se acopla con un protón de la parte alifática observándose el mismo comportamiento que con el complejo [CpTi(CQ)₂](NO₃)₃ [2]. Por lo que se propone la formación de un enlace carbono-titanio.

Asignación	δ_H (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm) <i>(con respecto al CQ libre)</i>
H ₈	7,92	0,10
H ₂	8,46	0,05
H ₅	8,65	0,22
H ₆	7,61	0,12
H ₃	6,77	0,21
NH	8,26	1,29
H _{1'}	3,96	0,19
H _{5'} H _{4'}	3,01	0,58
H _{3'} H _{2'}	1,75	0,04
H _{1''}	1,27	0,03
H _{6'}	1,16	0,20
H Cp	6,45-6,54	



Estructura de la cloroquina

Tabla X. Desplazamiento químico de los protones del complejo [CpTi(CQ)₂](PF₆)₃ en (CD₃)₂SO.

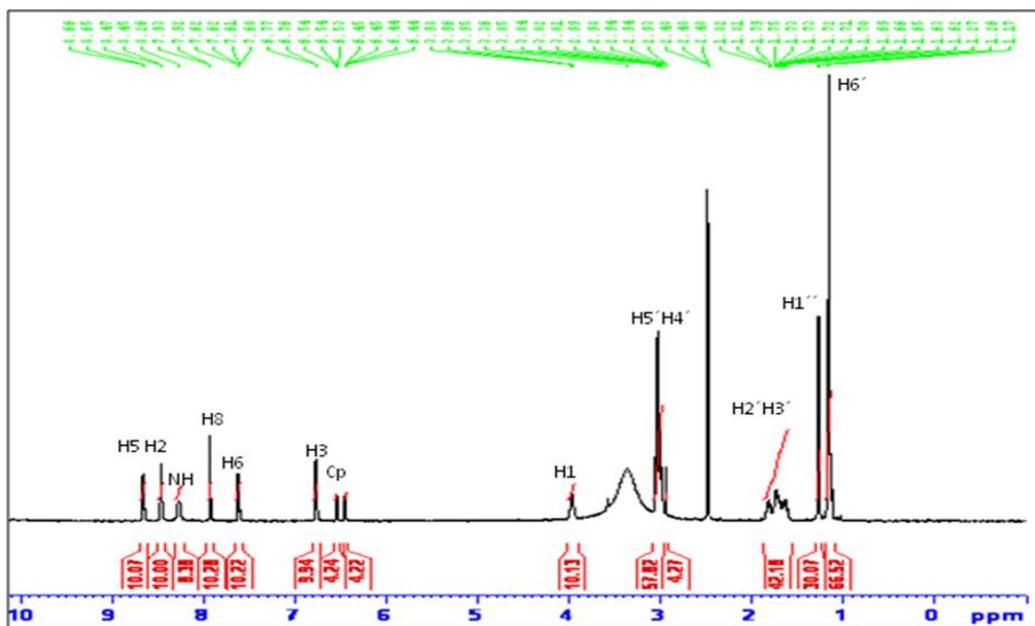


Figura 27. Espectro de RMN ^1H del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

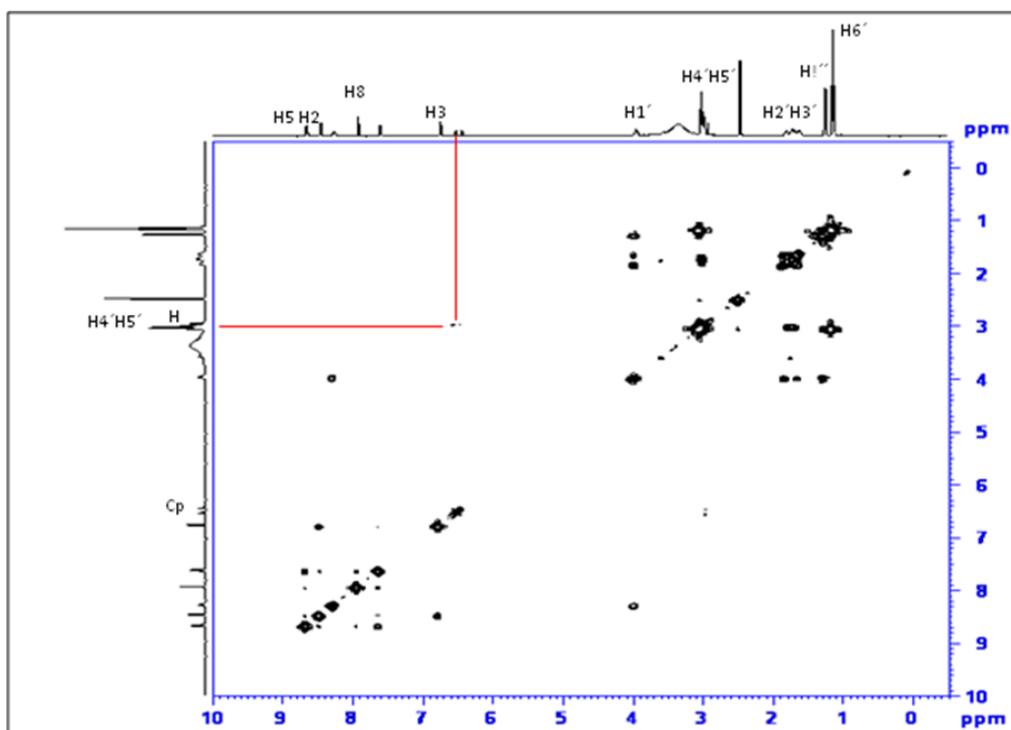


Figura 28. Espectro COSY del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ **[3]** en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

El estudio por espectroscopía de masas por electrospray en metanol (Figura 29), muestra señales correspondientes al ion $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2]^+3$ con $m/z= 751$ y al ligando cloroquina base en $m/z= 321$.

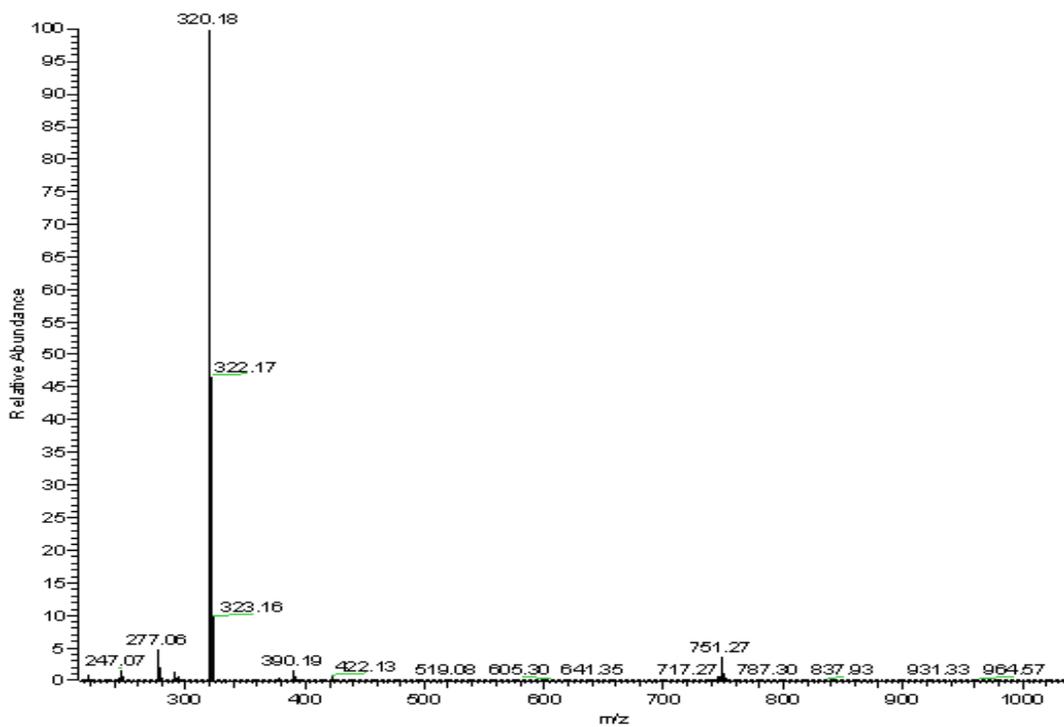


Figura 29. Espectro de masa del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ en metanol.

Basado en los resultados de la caracterización de complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$, se puede asegurar que el mismo está constituido por Titanio (IV) de configuración electrónica d^0 cuya estructura propuesta se muestra en la Figura 30.

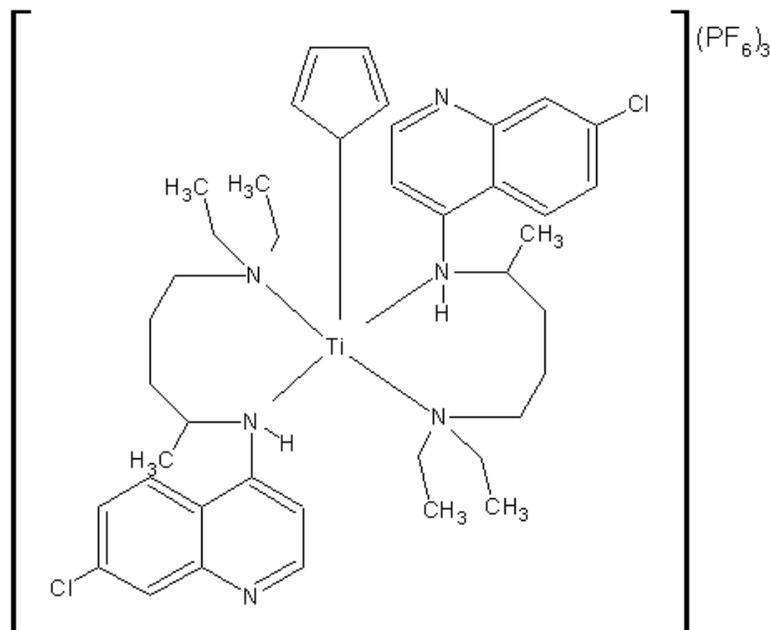


Figura 30. Estructura propuesta para el complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]

El cambio de conformación del grupo ciclopentadienil (de η^5 a η^1) observado en los compuestos que contienen cloroquina ($[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]), ha sido observado también en otros complejos como los reportados por Herbert, D y colaboradores⁴⁸ que observaron este cambio de conformación en complejos de Fe-Cp y Ru-Cp. Igualmente este comportamiento se ha observado en complejos de Pd-Cp⁴⁹ y Re-Cp⁵⁰ los cuales han sido ampliamente estudiados para hacer seguimiento del cambio de conformación de un enlace π metal- ligando a un enlace σ de coordinación.

5.2 Interacción de los complejos metálicos de titanio con ADN.

5.2.1 Titulaciones espectrofotométricas.

La titulación espectrofotométrica es uno de los estudios que se pueden realizar mediante espectroscopia UV-visible, ésta consiste en la observación de los efectos que adiciones sucesivas

de ADN tiene sobre una solución de complejo. La interacción entre un complejo y el ADN trae como consecuencia cambios electrónicos en el complejo, el ADN o ambos, los cuales pueden ser detectados mediante espectroscopía UV-visible, pues éstos se manifiestan como cambios en el espectro de la muestra.

Se realizó la titulación de la cloroquina base, para observar el comportamiento que presenta este ligando con la adición de ADN y así calcular su constante de interacción. En la Figura 31 se presenta el espectro obtenido durante la titulación de la cloroquina base con ADN de timo de ternera. Se observan dos señales con máximos a 263 y 337 nm, las cuales muestran disminución de la absorbancia a medida que se añade solución de ADN (titulante), comportamiento que se conoce con el nombre de hipocromismo.

Existen diversos modelos que permiten obtener las constantes de interacción entre dos especies por métodos espectrofotométricos. La representación gráfica de $[ADN]/(ea-ef)$ versus $[ADN]$ ha sido empleada en numerosas oportunidades y supone la obtención de una línea recta de cuya pendiente e intercepto puede calcularse la constante de interacción⁵¹. Este modelo permitió conocer la constante de interacción del ADN con los diferentes complejos y ligandos a temperatura ambiente. Para el caso de ADN-CQ, el valor obtenido para la constante de interacción entre ambos compuestos fue de $(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^5 M^{-1}$ a 337 nm. De manera análoga, se tituló el clotrimazol y nuevamente se observó hipocromismo con el aumento de la concentración de ADN TT.

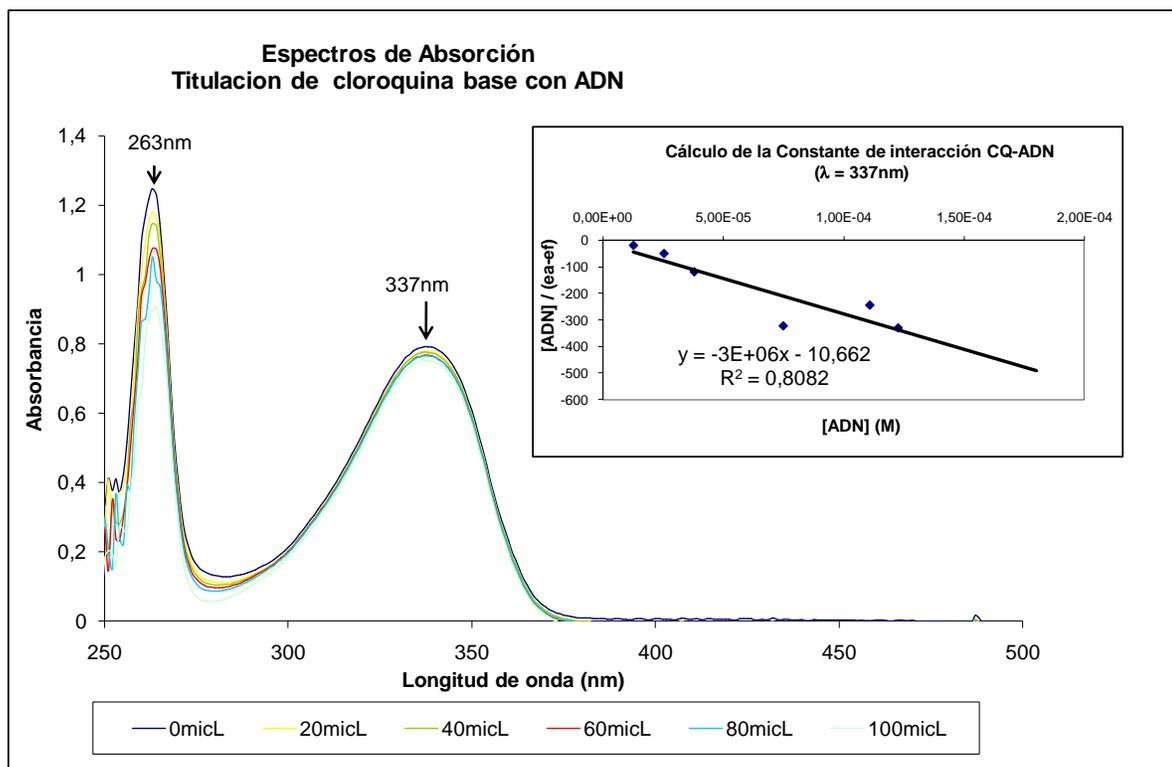


Figura 31. Titulación del ligando Cloroquina con soluciones de ADN.

En la Figura 32, se muestra el comportamiento que presentó la solución de CTZ con cada una de las adiciones de ADN y se determinó la constante de interacción del clotrimazol, con el modelo descrito anteriormente, la cual muestra un valor para la constante de $K = (4,3 \pm 0,9) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ a la longitud de onda de 262 nm.

Previo a la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] se realizó un estudio fotocolorimétrico del complejo en el cual se observan tres bandas de absorción centradas en 262, 335 y 348 nm (Figura 33), Luego se realizó la titulación del complejo de la misma forma en que se hizo con los ligandos solos.

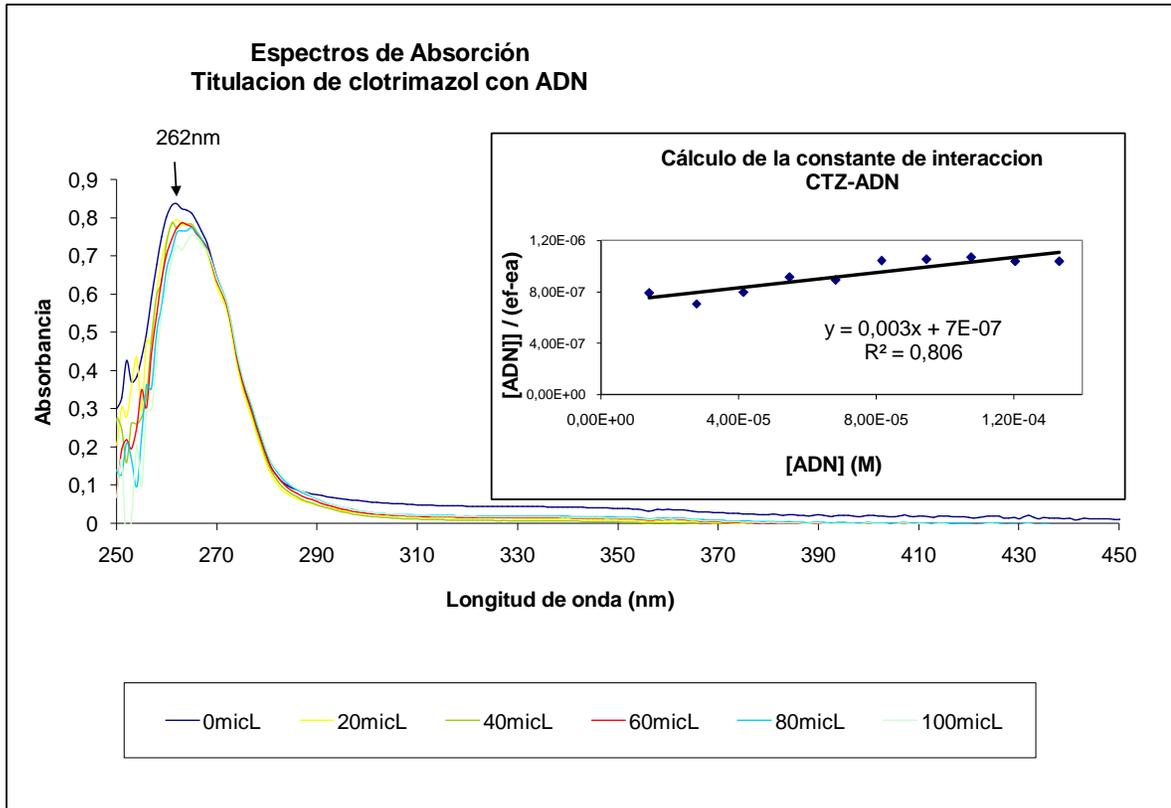


Figura 32. Titulación del ligando Clotrimazol con soluciones de ADN.

Al intentar calcular la constante de interacción a 262 nm, no se obtuvo la linealidad esperada en los resultados. En el caso de las señales a 335 y 348 nm el comportamiento de ambas señales durante la titulación fue aleatorio, es decir no presentaron una tendencia definida de incremento o disminución de la señal de absorbancia a medida avanzaba la titulación. Sin embargo, para adiciones de ADN por encima de 100 μL ($2,0 \cdot 10^{-4}$ M), se observó la aparición de una nueva banda a 290 nm, la cual aumenta a medida que aumenta la concentración de ADN (hipercromismo) y con cuya señal si fue posible determinar la constante de interacción para el

complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]. Con esta banda se tiene que $K_{290} = (2,7 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

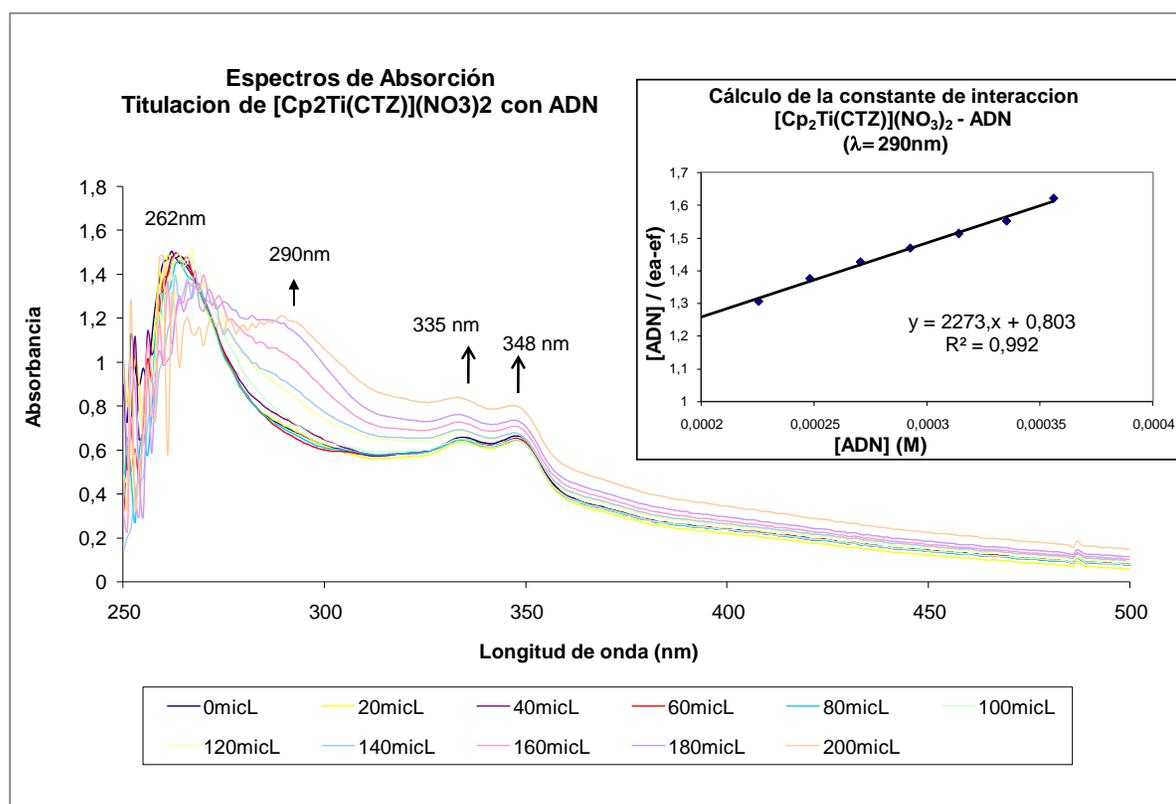


Figura 33. Titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] con soluciones de ADN.

En la titulación del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] (Figura 34), se observan señales en 263 y 335 nm. En la señal que se encuentra a 335 nm la absorbancia disminuye a medida se añade ADN, aunque en algunos casos los cambios fueron poco notorios, fue posible calcular la constante de interacción a esta longitud de onda, cuyo valor es de $K_{335} = (1,8 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

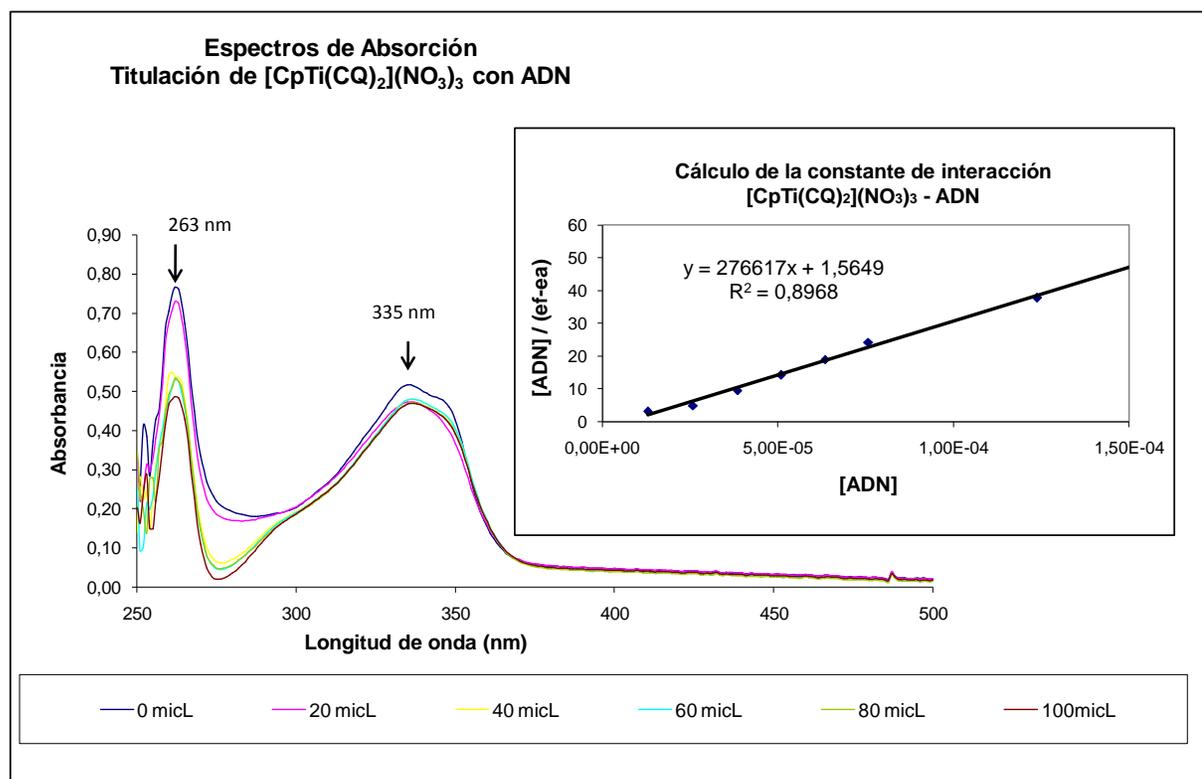


Figura 34. Titulación del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] con soluciones de ADN.

La titulación del complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3] (Figura 35), presenta señales a 262 y 335 nm. El cálculo de la constante de interacción se realizó a 335 nm, obteniéndose como resultado una constante de $K_{335} = (1,5 \pm 0,2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

Un aspecto relevante que destacar en el estudio realizado mediante las titulaciones espectrofotométricas es que, el orden de magnitud de las constantes de interacción obtenidas para los complejos está fuertemente relacionado con el orden de magnitud de las constantes de interacción de los ligandos solos, tal como se muestra en la Tabla XI:

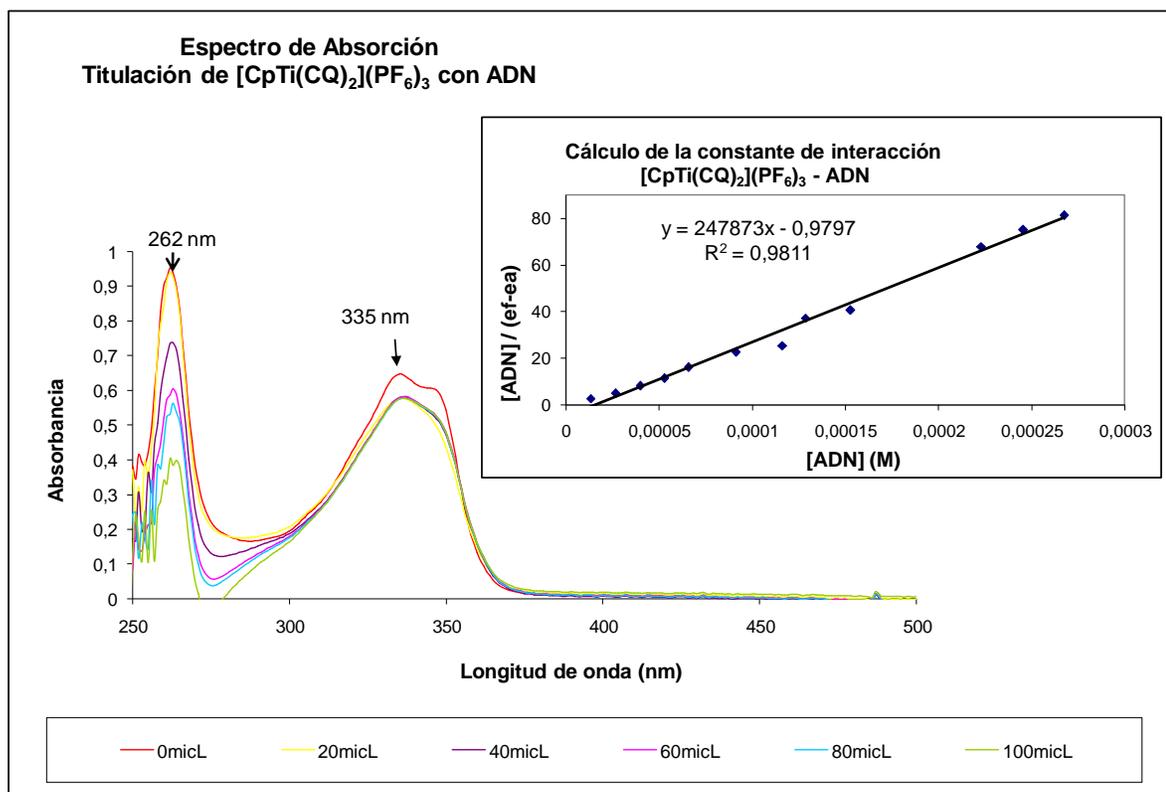


Figura 35. Titulación del complejo [CpTi(CQ)₂](PF₆)₃ [3] con soluciones de ADN.

Ligando	Constante de interacción Ligando-ADN (K) (M ⁻¹)	% Hipocromismo	Complejo	Constante de interacción Complejo-ADN (K) (M ⁻¹)	% Hipocromismo	% Hiperocromismo
Clotrimazol	4,29 · 10 ³	45,11	[Cp ₂ Ti(CTZ)H ₂ O](NO ₃) ₂ ·H ₂ O [1]	2,70 · 10 ³	-	16,83
Cloroquina base	2,81 · 10 ⁵	6,25	[CpTi(CQ) ₂](NO ₃) ₃ [2]	1,77 · 10 ⁵	16,31	-
			[CpTi(CQ) ₂](PF ₆) ₃ [3]	1,53 · 10 ⁵	15,65	-

Tabla XI. Comparación de las constantes de interacción obtenidas en las titulaciones espectrofotométricas.

Los valores de las constantes obtenidas son comparables con valores reportados por Barton y colaboradores⁵², para complejos de rutenio(II)-1,10-fenantrolina los cuales oscilaron entre $5,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $1,15 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Así como también, en complejos de hierro-4,7-difenil-1,10-fenantrolina⁵³ se ha observado valores de constantes de interacción que fluctúan en los órdenes 10^3 y 10^5 M^{-1} . De igual manera, en estos estudios se encontró que los valores de las constantes están más íntimamente relacionados con el ligando que con el centro metálico, Lo cual es congruente con lo observado con los complejos Ti-CTZ y Ti-CQ en este estudio, por lo que puede afirmarse que el centro metálico tiene poca influencia en el valor de la constante de interacción.

Por otra parte, algunos autores han atribuido el comportamiento hipocrómico a una contracción de la molécula de ADN por efecto de la interacción con complejo como Cp_2TiCl_2 y Et_2SnCl_2 , que producen un cambio de la conformación de la doble hélice, mientras que el hipercromismo es producido por el daño en la estructura de la doble hélice del ADN⁵³.

Así mismo, es importante resaltar que las variaciones en los espectros UV- Visible de los compuestos estudiados sólo indican la existencia de alguna interacción entre los compuestos y el ADN. Esta interacción puede ser de tipo covalente (metal-ADN) o no covalente (por medio de una interacción ligando-ADN, interacciones electrostáticas, puente de hidrógeno, intercalación). Sin embargo, con las titulaciones espectrofotométricas no es posible discernir qué tipo de interacción ocurre, para ello es necesario realizar otro tipo de estudios que serán discutidos más adelante.

* Estudio de desnaturalización térmica del ADN

El estudio de desnaturalización térmica del ADN permite establecer si la interacción entre el complejo metálico y el ADN es estabilizante o desestabilizante. Se dice que el ADN está desnaturalizado cuando se alcanza una temperatura a la cual las dos hebras de la molécula se

separan. En este proceso se rompen los puentes de hidrógeno que unen las cadenas y se produce la separación de las mismas, pero no se rompen los enlaces fosfodiéster covalentes que forman la secuencia de la cadena⁵⁴, tal como se muestra en la Figura 36. Algunos autores⁵⁵ se refieren a este proceso como “fusión” aunque cabe destacar que tal denominación se emplea solamente por analogía y nada tiene que ver con el concepto físico-químico del proceso de fusión.

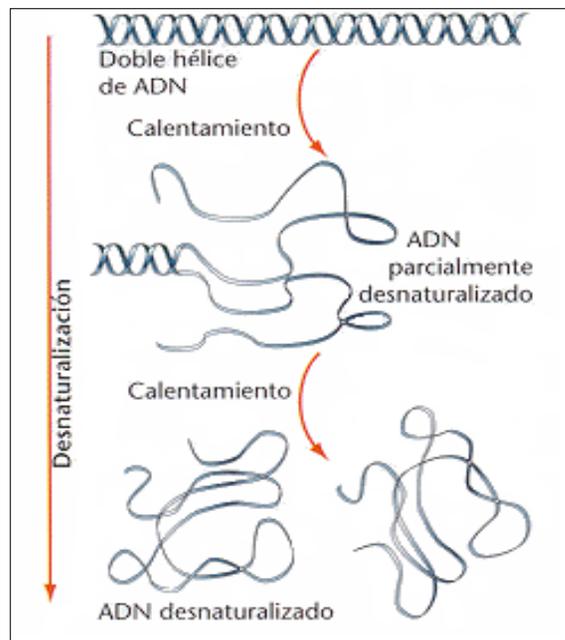


Figura 36. Efecto del incremento de la temperatura sobre la estructura del ADN.

Inicialmente se determinó la temperatura de desnaturalización del ADN solo, cuyo resultado se muestra en la Figura 37. Según este resultado, el ADN solo se desnaturaliza a 65,80°C.

Una vez conocida la temperatura de desnaturalización del ADN solo es necesario conocer el efecto que tiene cada uno de los complejos sobre la macromolécula. La relación $[\text{Complejo}]/[\text{ADN}]$ usada fue de 0,2 en todos los casos siguientes.

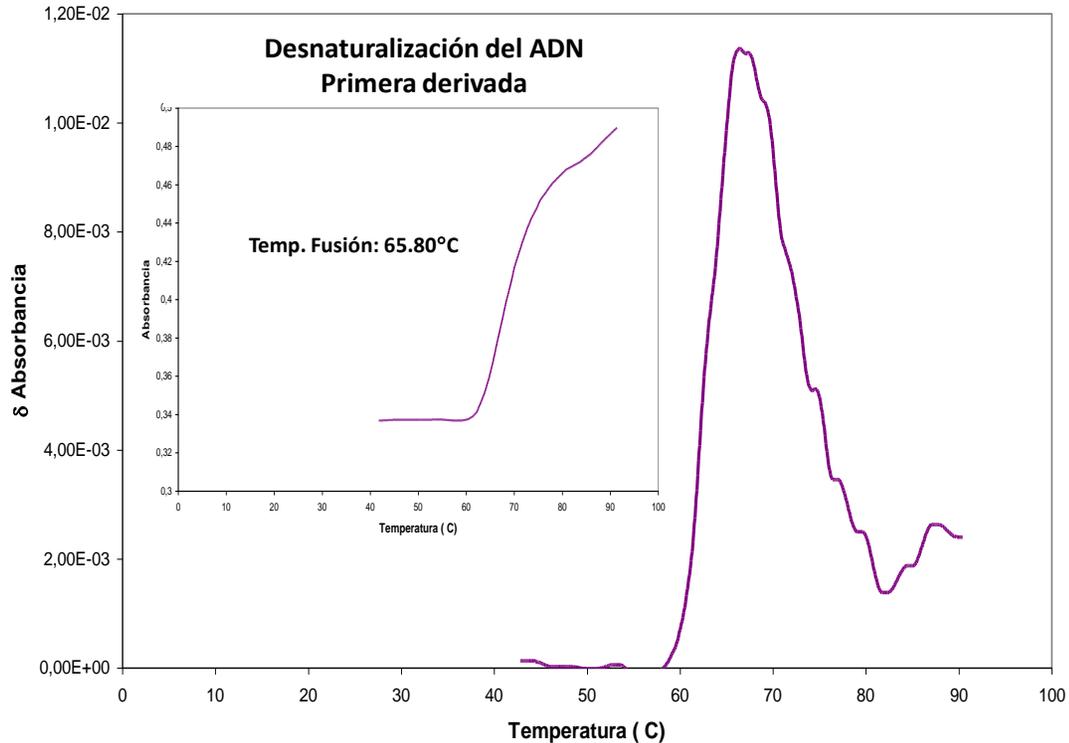


Figura 37. Desnaturalización del ADN en solución.

En el estudio de desnaturalización térmica del ADN con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] con $\frac{1}{2}$ h de incubación la temperatura de fusión del ADN fue de $66,20^\circ\text{C}$, lo cual no representa un cambio significativo comparado con el ADN solo. Sin embargo, luego de 2h de incubación la temperatura de desnaturalización obtenida fue de $79,90^\circ\text{C}$ (Figura 38). Este incremento indica la existencia de una interacción estabilizante entre el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] y el ADN que hace que las hebras permanezcan unidas a temperaturas más elevadas.

Así mismo, con los complejos $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3] también se obtuvo como resultado el aumento del punto de fusión del ADN (Figuras 39 y 40

respectivamente), pero en este caso ambos lograron este efecto con $\frac{1}{2}$ h de incubación las temperaturas de desnaturalización aumentaron hasta $82,70^{\circ}\text{C}$ y $81,70^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

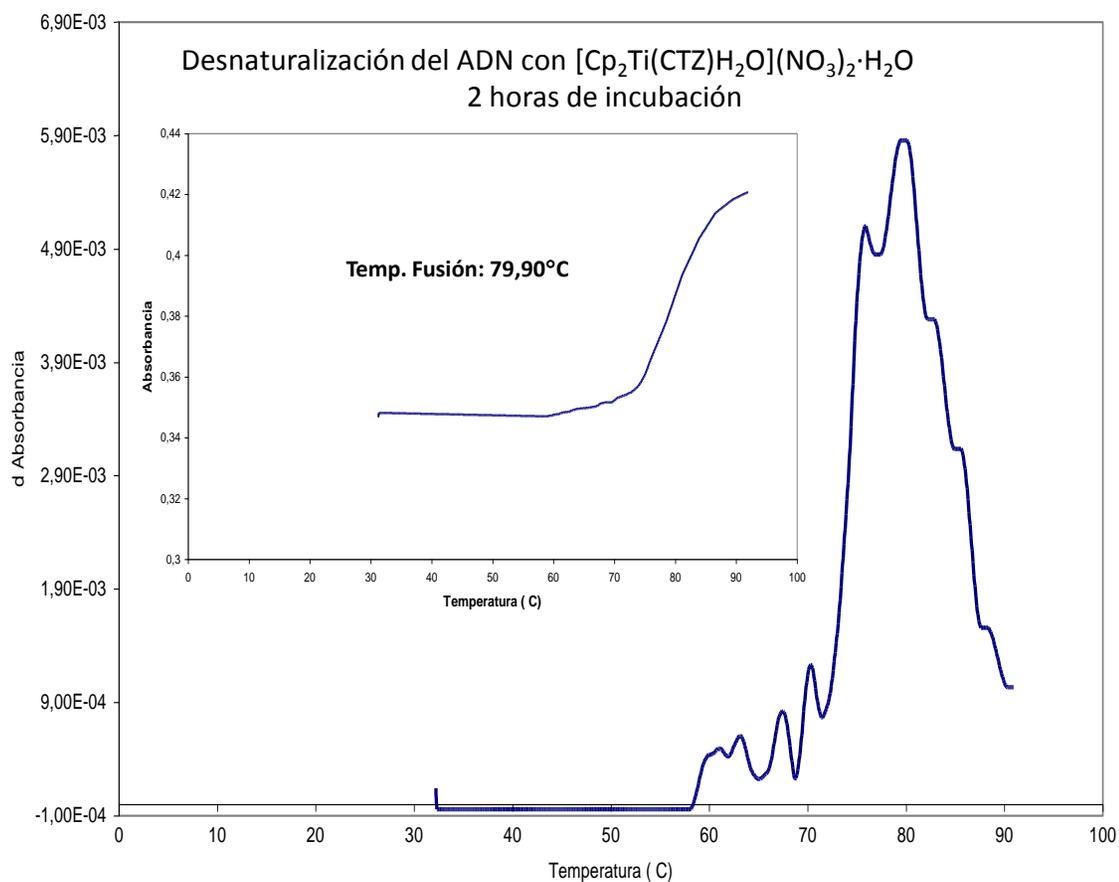


Figura 38. Desnaturalización del ADN en presencia de $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] luego de dos horas de incubación.

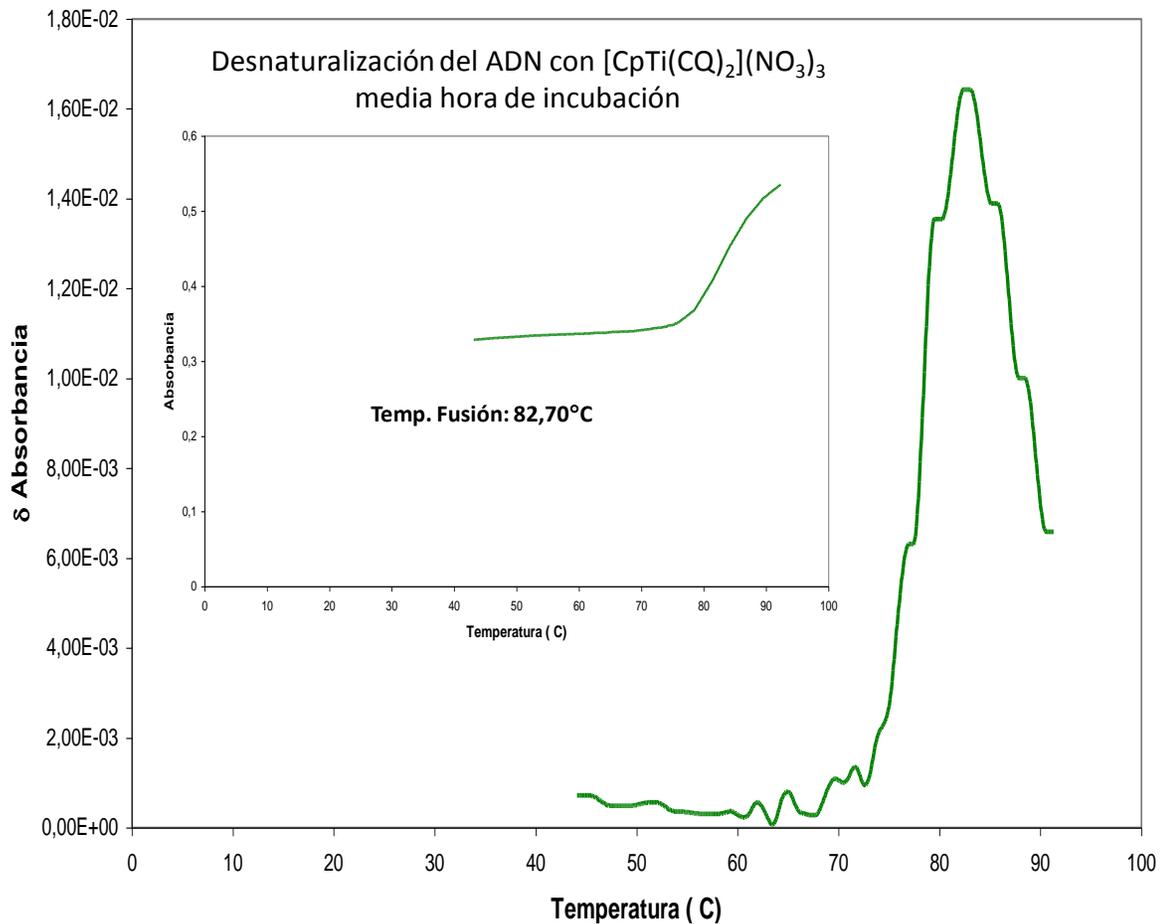


Figura 39. Desnaturalización del ADN en presencia de $[CpTi(CQ)_2](NO_3)_3$ [2] luego de media hora de incubación.

Estas variaciones indican que todos los complejos tienen una interacción estabilizante con el ADN. Sin embargo, los complejos que contienen cloroquina producen este efecto en menor tiempo de incubación que el complejo con clotrimazol.

En la Tabla XII se muestran las variaciones que presentó la temperatura de desnaturalización térmica del ADN en presencia de los distintos complejos.

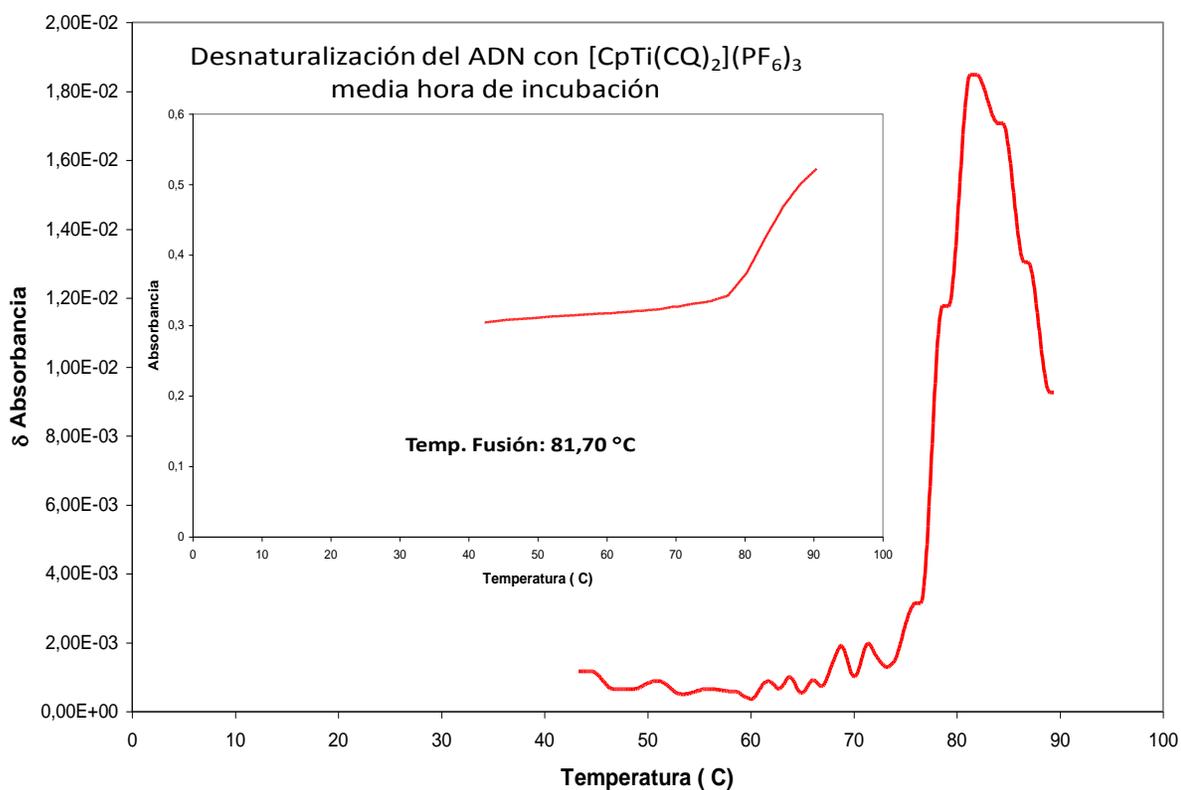


Figura 40. Desnaturalización del ADN en presencia de $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3] luego de media hora de incubación.

Temperatura de desnaturalización térmica del ADN (°C)			65,80
Complejo	Tiempo de incubación (h)	Temperatura de desnaturalización térmica del ADN en presencia de complejo (°C)	Variación (Δ)
$[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]	½	66,20	0,4
$[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]	2	79,90	14,1
$\text{CpTi}(\text{CQ})_2(\text{NO}_3)_3$ [2]	½	82,70	16,9
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3].	½	81,70	15,9

Tabla XII. Comparación de los resultados del estudio de desnaturalización térmica del ADN en presencia de los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})](\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1], $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3].

Según los resultados presentados en la tabla XII, se puede observar que los complejos $\text{CpTi}(\text{CQ})_2(\text{NO}_3)_3$ [2] y $\text{CpTi}(\text{CQ})_2(\text{PF}_6)_3$ [3] producen un efecto ligeramente más estabilizante que el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]. Este resultado está en concordancia con lo esperado dadas las estructuras de los complejos CQ y CTZ. CQ tiene un mayor porcentaje planar que el CTZ por lo que se espera mejor interacción entre eslabones de la cadena del ADN.

El efecto estabilizante puede deberse a diversos tipos de interacciones entre los complejos y el ADN TT, como son la formación de aductos, la intercalación, las interacciones electrostáticas o las interacciones covalentes^{55, 56}.

Algunos compuestos como las antraciclinas y altromicinas, producen un efecto estabilizador de la doble hélice del ADN y también han mostrado tener interacción covalente y por vía de intercalación con el ADN⁵⁵.

5.2.2 Viscosimetría

Los estudios de viscosidad fueron llevados a cabo usando un viscosímetro de Oswald y con los resultados obtenidos para cada uno de los complejos se construyó una gráfica de $(\eta/\eta^0)^{1/3}$ en función de $[\text{complejo}]/[\text{ADN}]^{41}$. Se realizó el mismo procedimiento para los ligandos solos.

En la Figura 41 se presenta el comportamiento mostrado por los ligandos al ser sometidos al estudio de viscosidad. En el caso de la cloroquina base se observa un aumento de la viscosidad relativa con el incremento de la relación $[\text{CQ}]/[\text{ADN}]$, lo cual indica que la cloroquina se comporta como un compuesto intercalador del ADN. Mientras que en el caso del clotrimazol, se observa un comportamiento aleatorio entre los puntos de la gráfica.

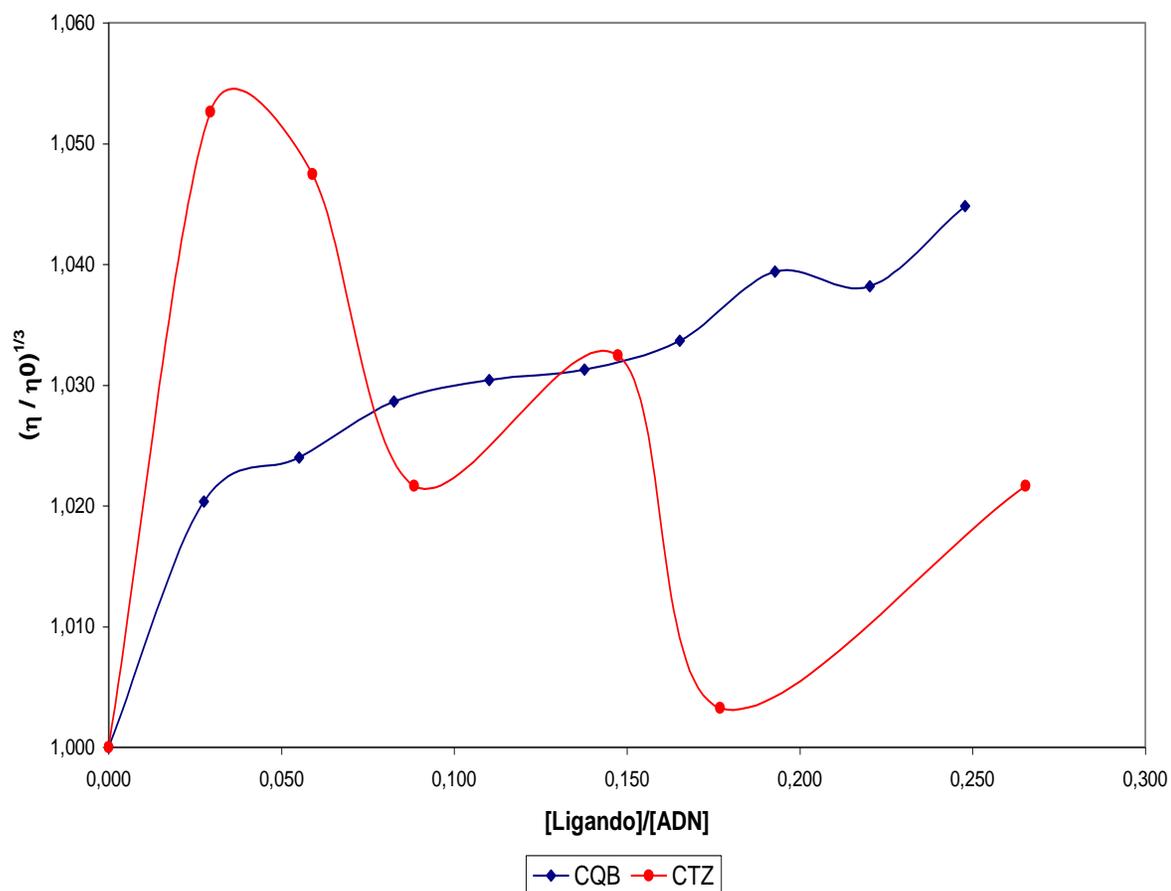


Figura 41. Viscosidad relativa de los ligandos Clotrimazol y Cloroquina con ADN

Asimismo en la Figura 42 se muestra la representación de la viscosidad relativa versus la relación $[\text{Complejo}]/[\text{ADN}]$ para los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ **[1]**, $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ **[2]** y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ **[3]** las cuales presentan tendencia ascendente en el caso de los complejos con cloroquina y tendencia aleatoria con el complejo con clotrimazol.

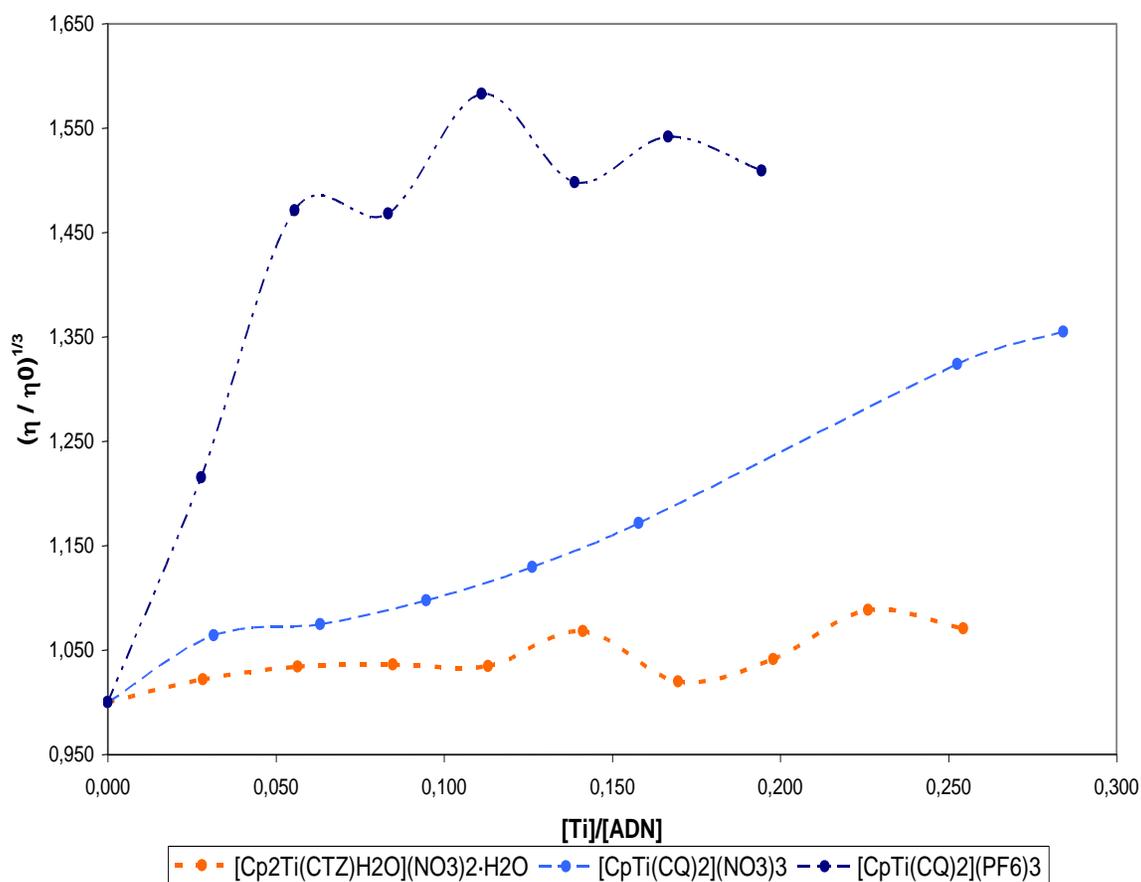


Figura 42. Viscosidad relativa de los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1], $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3] con ADN

Al comparar el efecto de los ligandos solos con aquel de los complejos, sobre el ADN, es evidente la marcada diferencia que hay entre ambos resultados para los complejos que contienen CQ mientras que con el complejo con CTZ esta diferencia no es significativa. Los complejos con CQ realmente muestran un efecto sinérgico hacia la intercalación en la doble hélice del ADN. El incremento en la relación de viscosidades de la solución de ADN en presencia de los complejos con cloroquina ([2] y [3]), es indicativo de intercalación del complejo en el ADN, pues al producirse ésta, se incrementa la separación entre los pares de bases nitrogenadas y por ende en el ADN completo; esto trae como consecuencia el aumento de la viscosidad de la solución, tal como ha sido reportado en el caso del bromuro de etidio que es un intercalador clásico⁵⁷.

Además, se puede observar que las curvas correspondientes a los complejos que tienen el ligando cloroquina muestran un efecto más pronunciado que no se observa con el complejo que posee clotrimazol; esto puede deberse a que la cloroquina presenta mayor área planar (el anillo quinolínico) que el clotrimazol (Figura 43).

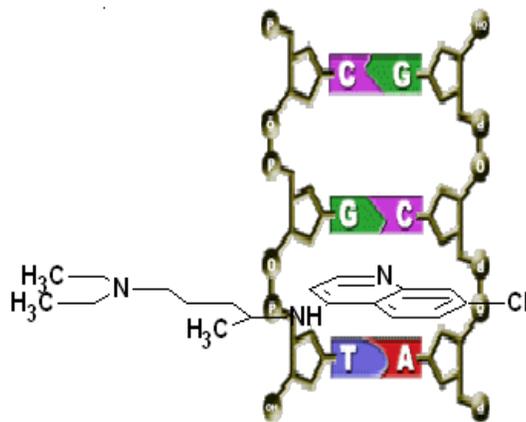


Figura 43. Posible interacción intercalativa entre la cloroquina y el ADN.

Xiong Y y colaboradores⁴², han propuesto que el comportamiento aleatorio en el estudio de viscosidad que presenta el ADN con algunos complejos, se debe a posibles interacciones electrostáticas o a un cambio en la forma del ADN.

Por lo observado en este estudio y en base a la literatura disponible, se puede decir que el complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1] no es un intercalador del ADN TT pero si puede tener otro tipo de interacción con la biomolécula, ya sea, por puente de hidrógeno, por fuerzas electrostáticas o por interacción covalente.

5.2.3 Electroforesis.

El estudio por electroforesis, se realizó aprovechando el hecho de que los plásmidos normalmente se pueden encontrar de diversas formas: relajados, enrollados o superenrollados, dependiendo de la tensión que el medio ejerza sobre ellos y del efecto que tengan agentes externos⁴⁴. De esta forma al poner en contacto el plásmido con compuestos intercaladores por determinado tiempo, se producen cambios en la forma del plásmido y esto trae como consecuencia que su respuesta, al ser sometido a un campo eléctrico, sea distinta con respecto al plásmido original.

Inicialmente se realizaron electroforegramas, de soluciones de ADN con cada uno de los complejos, con ½ h y 18 h de incubación pero no se observó cambio con respecto al plásmido solo. Luego de 58h de incubación se observó la presencia de dos formas de plásmido correspondientes a la forma superenrollada y la forma circular (Figura 44).

En esta figura se evidencia la formación del plásmido circular a todas las concentraciones de complejo estudiadas. Esto es indicativo de la intercalación de los complejos en todo el intervalo. Además, se observa el aumento de la intensidad de la banda correspondiente a la forma circular con el aumento de la concentración de complejo.

Concentración de complejo (µM)	0	12,8	14,3	28,6	57,1	85,7	128,6	214,3
--------------------------------	---	------	------	------	------	------	-------	-------

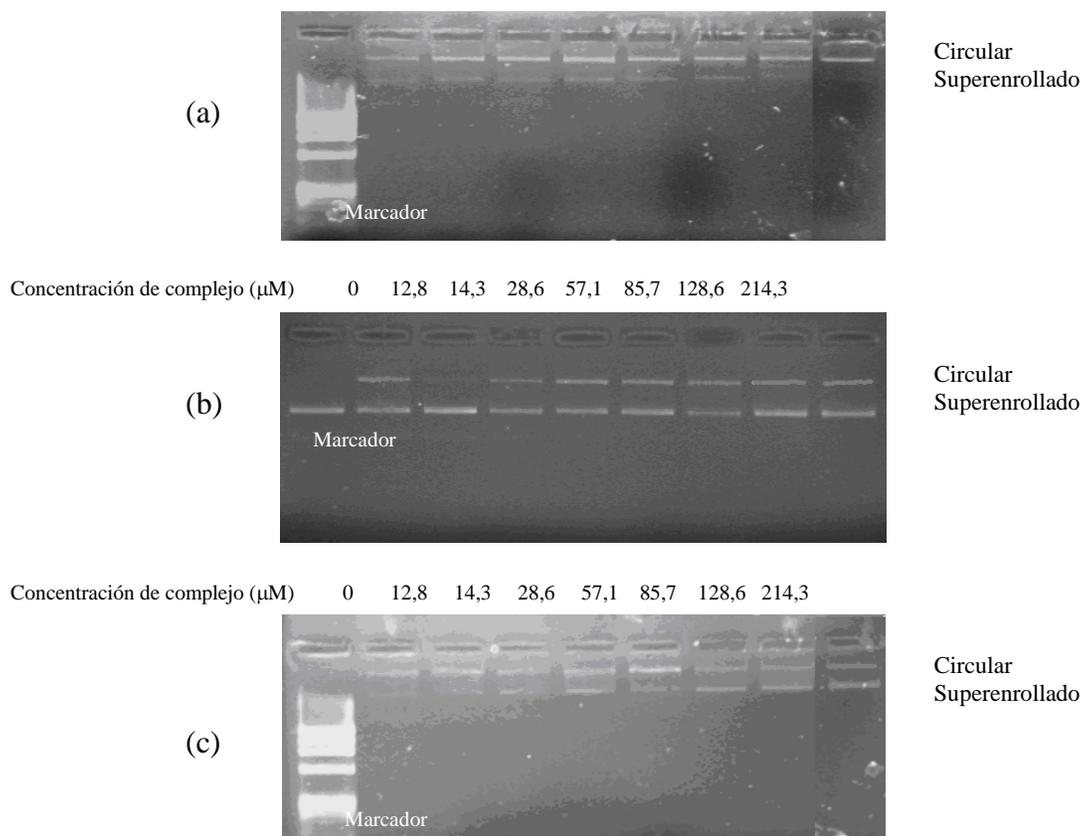


Figura 40. Electroforegramas en geles de agarosa (1%) con 58h de incubación de los complejos estudiados con plásmido pUC119 (a) complejo $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1], (b) Complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y (c) complejo $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3].

5.2.4 Estudio de covalencia.

El estudio de interacción covalente de los complejos metálicos se realizó en dos etapas, la primera consiste en la determinación de la concentración de metal que interaccionó con el ADN, por emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (EA-ICP) para ello se prepararon patrones de titanio, los cuales fueron hidrolizados en HCl 10% por una hora y luego se analizaron. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

Complejo	Concentración del metal (ppm)
$[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]	16,52
$[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]	14,19
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]	22,06
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]	26,04
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]	8,73
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]	10,48

Tabla XIII. Resultados obtenidos del análisis de la concentración de titanio por EA-ICP.

La segunda etapa, consiste en la determinación de la concentración de ADN que interaccionó covalentemente con los complejos por medio del ensayo de Burton. Este método es ampliamente usado para la determinación colorimétrica de ADN. Se aplica el método tanto a patrones como a muestras conteniendo ADN y con una curva de calibración se determina la concentración de ADN presente en las muestras.

Culminada esta etapa, se procede a calcular la cantidad de nmoles de metal/ mg de ADN. Los resultados se presentan en la tabla XIV.

Complejo	Metal/ADN (nmol/mg)
----------	------------------------

$[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1]	389,50
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2]	109,94
$[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3]	423,87

Tabla XIV. Resultados de nmoles de Ti/ mg ADN.

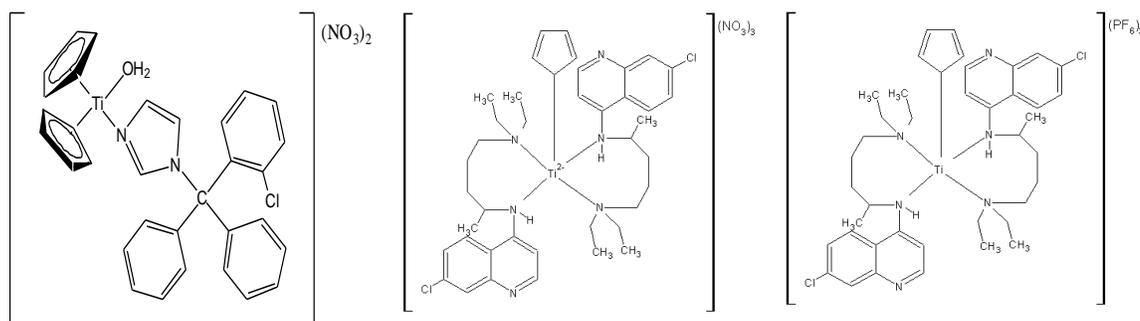
Los valores de nmoles de metal/ mg de ADN son comparables con los valores reportados para complejos de rodio⁵⁸. Los complejos de titanio muestran tener una interacción altamente covalente con el ADN.

Según los resultados obtenidos se puede decir que los tres complejos de titanio obtenidos interaccionan covalentemente con el ADN con el siguiente orden creciente:



6. CONCLUSIONES.

- Se logró la síntesis de tres complejos de titanio con los ligandos clotrimazol (CTZ) y cloroquina (CQ), por la metodología propuesta.
- Se realizó la caracterización de los complejos obtenidos por las técnicas espectroscópicas IR, RMN ^1H , COSY H-H, análisis elemental, conductividad molar y espectroscopia de masa por electrospray. Y basado en los resultados obtenidos se proponen las siguientes estructuras para los complejos sintetizados:



- Mediante las titulaciones espectrofotométricas se logró determinar que existe interacción entre los complejos sintetizados y el ADN TT. Las constantes de interacción calculadas a través de este estudio fueron $2,70 \cdot 10^3$, $1,77 \cdot 10^5$ y $1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, para los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [1], $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ [2] y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ [3] respectivamente.
- Existe relación entre las constantes de interacción para el sistema Ligando-ADN y Complejo-ADN, demostrándose la gran influencia que tiene el ligando sobre el valor de la constante.
- En el estudio de desnaturalización térmica del ADN se pudo constatar que los complejos con cloroquina, estabilizan al ADN mas eficientemente que el complejo que tiene el clotrimazol, debido a que la cloroquina es ligando planar.

- Los estudios de viscosidad confirman el efecto intercalador de la cloroquina base tanto libre como coordinada al centro metálico. Mientras que el complejo Ti-CTZ muestra que podría tener otro tipo de interacción.
- El estudio de electroforesis muestra alteraciones en la estructura del plásmido, las cuales se hacen más evidentes a medida aumenta la concentración del complejo. Las dos estructuras presentes son el plásmido superenrollado (original) y el plásmido circular. Por lo que se puede decir que estos complejos no destruyen el plásmido (forma lineal).
- Tomando en cuenta los resultados del estudio interacción covalente entre los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ **[1]**, $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ **[2]** y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ **[3]** con el ADN TT. Se establece una relación de 389,50, 109,94 y 423,87 nmoles de Ti/ mg de ADN enlazado covalentemente para los complejos respectivamente.
- Finalmente, estos resultados mostraron que los complejos $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CTZ})\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ **[1]**, $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{NO}_3)_3$ **[2]** y $[\text{CpTi}(\text{CQ})_2](\text{PF}_6)_3$ **[3]** tienen algún tipo de interacción con el ADN y podrían ser potenciales agentes antitumorales, debido a que el ADN es el blanco de acción de muchos agentes quimioterapéuticos.

7. REFERENCIAS

1. Capote, L. (2006) Revista Venezolana de Oncología. Vol. 18, nº 4. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela.
2. Robert A. Weinberg (1996) Scientific American. Sept. 32-40.
3. Información en línea disponible por:

<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp> (Consultado: 6/10/07)

4. Información en línea disponible por:
<http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=183&lang=spanish> (Consultado: 6/10/07)
5. Información en línea disponible por:
<http://www.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/ginecologico5.html>.
(Consultado: 9/10/07)
6. Dennis, L., Kasper, E., Braunwald, A., Fauci S., (2005). Harrison, principios de medicina interna. 16^a edición. Mc Graw Hill. Mexico. 520-532
7. Landé, K., (1927) Munich. Med. Wpchschr 74, 1132.
8. Sutton, B.M., (1983). Overview and Current Status of Gold-Containing Antiarthritic Drugs (Platium, Gold and other Metal Chemotherapeutic Agents). ACS. Washington.
9. Buttler, A.R., Glidewell, C., (1987), Chem Soc. Rev. 16:361.
10. Grier, N.. (1983). Silver and its compounds (desinfection, Sterilization and preservation Ed. S.S block) 375-389.
11. Moyer, C.A., (1965), et al Arch. Surg. 90, 812.
12. Cafruny, C. (1968), Pharmacol. Rev. 20, 89
13. Gordon, Y.J., Asher, Y. and Becker, Y. (1975), Antimicrob. Agents Chemother, 8, 377.
14. Kopf-Mair, P. and Kopf, H. Metal Compounds in cancer therapy. (Ed: S.P. Fricker) Chapman & Hall, London (1994), 109-146.
15. Cotton, Wilkinson, (1998). Quimica Inorganica Avanzada. Ed Limaza, S.A. Mexico,
16. Haiduc, I. and Silvestre, C. (1990), Coordination Chem. Rev. 99, 253-296.
17. Francesco, C. and Rossi, M. (2004). Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 4, 49-60.
18. Hongzhe, S., Hongyan L, Sadler, P. (1999). Chemical Reviews, 99, 9 2817-2842.
19. Kopf, H. and Kopf-Maier, P. (1979), Angew. Chem. 91, 509.
20. Christodoulou, C.V., Eliopoulos, A., Young, A. (1998), Br. J. Cancer, 77 2088.
21. Mokdsi, G., Harding, M.M. (1998). Journal of Organometallic Chemistry, 562, 29-35.

22. Guo, M., Sun, H., McArdle, H., (2000), *Biochemistry*, 39, 10023-10033.
23. Buchel, K., Draber, W., Regel, E. (1972). Síntesis of new imidazole derivative: Clotrimazole. *Drugs Made Ger.* 15 208.
24. Beach, D., Goad, L., Holtz, G. (1998), *J. Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 149.
25. Maldonado, R., Molina, J., Payares, G., Urbina, J. (1993). *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1353.
26. Benzanquen, L., Brugnara, C., Byers, H., Gattoni- Celli, S. (1995), *Nature Medicine* 1, 534-540.
27. Wash, N., Singh, H.B., Gajanana, A. y Rauchowdhary, A.N (1987). *Inorg. Chim. Acta.* 35, 133-137.
28. Navarro, M., Perez, H., Sanchez Delgado, R. (1997). *Journal Med. Chem.*40, 1937-1939.
29. Sanchez Delgado, R., Navarro, M., Pérez, H., Urbina, J. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 1095-1099.
30. Lehninger, A., D. Nelson y M. Cox. (1995). *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, Barcelona, 14-26.
31. Información en línea disponible por: http://www.geocities.com/java_cl/INTR.HTML El ADN y la genética molecular. (Consultado: 09/09/2007).
32. Cisneros, E. (2002). Síntesis y caracterización de complejos metálicos de cobre, plata y oro con ligandos planares. Estudio de su interacción con el ADN. Evaluación de su actividad contra *Leishmania*. Resumen de la tesis de grado presentada para optar al título de doctor en ciencias, mención química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas.
33. R.V. Gessner (1985) et al., *Biochemistry* 24 237.
34. Barton, JK. (1994). *Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, Sausalito, pp 455-503.
35. Lerman, JS. (1961). *J Mol Biol*, 3:18-30.
36. Skoog, D., West, D., Holeer, F., (1995) *Química analítica*, Ed. McGraw-Hill Mexico 383-419.

37. Zou, X., B.H.Ye, H. Li y Q. L. Zhang (2001). The desing of new molecular “light switches” for DNA. *J. Boil. Inorg. Chem*, 6: 143-150.
38. Skoog, D.A, Leary J.J., Análisis instrumental, McGraw-Hill, Madrid, 1994.
39. Vargas, F. Medrano, M (2004). *Toxicology Mechanisms and Methods* Taylor & Francis Inc, 14: 227–231,
40. Garcia, M.A., De Pascual, B. (2004). *Oncologia* 27 (2) 69-79.
41. Song, Y., J. Kang y Z. Wang (2002). Study on the interactions between CuL_2 and Morin with DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91: 470-474.
42. Xiong, Y. (1999), *Coordination Chemistry Reviews*. 185-186 / 711-733.
43. Sheehan, D. *Physical Biochem: Principles and applications*, Ed. Wiley, 61-72
44. Morrison H., Mohammad T., y Baird W. M., (1991). *Biorganic. Chem.* 19, 80-100.
45. Morrison,H., Mohammad, T., Baird, W., (2000), *Photochem. And Photobiology*, 71 (4) 369-381.
46. Burton K., (1956) *J. Biochem.* 62, 315.
47. D.F. Shriver, (1969). *The manipulation of air-sensitive compounds*. Eds. Mc. Graw-Hill, Cap. 7,8 y 9 .
48. Herbert, D.; Tanabe, M.; Bourke, S. (2008), *Journal American Chemistry Society*. 130, 4166-4176.
49. Wener, H.; Tune, D.; Parker, G. (1975), *J.Angew. Chem.* 87, 205-206.
50. Casey, C.; O’Connor, J. (1985), *J. Am. Chem. Soc.* 107(5) 1241- 1246.
51. Benesi, H.; Hildebrand, J. (1949), *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2703.
52. Mudasir, N.(1999), *J. Inorg. Biochem.* 77, 239-247.
53. Yang, P.; Guo, M. (1999), *Coordination Chemistry Reviews*(185-186)189-211.
54. Información en línea disponible por: <http://www.um.es/molecula/anucl02.htm>
(Consulta:1/05/2008)
55. Nikolis, N.; Methenitis, C.; Pneumatikakis, G. (2003), *J. Inorg. Biochem* (95) 177-193.
56. Haroutiumiam, S.G.; Bruni, B.; (1991), *Inorg. Chemic. Act.* 127-132.
57. Veal JM, Rill RL (1991) *Biochemistry* 30:1132-1140
58. Menon, E.; Perera, R.; Navarro, M.; Morrison, H. (2004) *Inorg. Chem.* 43, 5373-5381.

ANEXO

Espectro de RMN ^1H de la CQ en $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

