

Síntesis y estudios mecanísticos de complejos de molibdenoceno: Interacción de agentes metálicos anti-cáncer con el transporte de proteínas.

Xiomara Narváez Pita

Una tesis sometida como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

En

QUÍMICA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Nilka Rivera, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Luis Morell, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Enrique Meléndez, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Ricardo R. López, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

René Vieta, Ph.D.
Director, Departamento de Química

Fecha

RESUMEN

Nuevos complejos organometálicos fueron sintetizados, partiendo del dicloruro de molibdenoceno (Cp_2MoCl_2) y cuatro ligandos: L-Acido ascórbico(L-AA), 6-o-palmitoil-L-acido ascórbico (PAA), Etil maltol y D-penicilamina, Los productos obtenidos fueron purificados y caracterizados por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$), infrarrojo (FT-IR), y análisis elemental, para elucidar su estructura. Estos complejos presentan estabilidad a pH fisiológico y tres de ellos son altamente solubles en agua, excepto el $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, el cual es ligeramente soluble. La técnica de voltametría cíclica, (CV), se usó para determinar el comportamiento redox de los complejos sintetizados, en CH_3CN mostrando comportamientos electroquímicos reversibles, y mayor estabilidad de estos complejos comparados con el compuesto de partida el dicloruro de molibdenoceno. Estudios similares se hicieron bajo condiciones fisiológicas, en amortiguador Tris-HCl a pH=7.4, donde el comportamiento redox de $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$, $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, y $[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$, fue irreversible y para el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$ fue reversible. Se estudio la interacción entre los complejos y la proteína Ubiquitina, por UV-VIS, voltametría cíclica (CV), fluorescencia, y dicroísmo circular(CD), encontrándose alguna clase de interacción. Las actividades citotóxicas de los complejos sintetizados, fueron investigadas en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29 usando el ensayo MTT a 72 horas. El complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ mostró mayor actividad citotóxica con un valor del IC_{50} de 0.33 mM, seguido del $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$ con un valor de 0.8 mM, el $[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$ con 1.60 mM, y el $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$ con 1.78 mM. En cuanto a la línea celular de HT-29, el complejo de $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ mostró un IC_{50} de 0.050 mM, siendo el más activo; seguido del $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$, con un valor de IC_{50} de 0.55 mM y $[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$ con 0.63mM. Incluir esta clase de ligandos en el dicloruro de molibdenoceno, mejoró sus propiedades antitumorales.

Abstract

New organometallic complexes were synthesized, using molybdenocene dichloride as starting material (Cp_2MoCl_2) and four ligands: L-ascorbic acid (L-AA), 6-o-palmitoyl-L-ascorbic acid (PAA), ethylmaltol and D-penicillamine. The products obtained were purified and characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton (^1H -NMR), infrared (FT-IR), and elemental analysis, to elucidate the structure. These complexes exhibit stability at physiological pH, and three of them are highly soluble in water, except $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, which is slightly soluble. Cyclic voltammetry (CV) was used to determine the redox behavior of the complexes in CH_3CN , showing reversible electrochemical behavior and more stability when compared with molybdenocene dichloride. Similar studies were performed under physiological conditions in Tris-HCl at pH = 7.4, where the redox behaviors of $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$, $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ and $[\text{Cp}_2\text{Mo(ethylmaltol)}]\text{Cl}$, were irreversible and reversible for $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicillamine)}]\text{Cl}$. The binding interactions between ubiquitin (Ub) and molybdenocene derivatives were monitored by UV-VIS, cyclic voltammetry (CV), fluorescence and circular dichroism (CD) and weak Ub-metal interactions were detected. The cytotoxic activities of the complexes were investigated in cancer cell lines MCF-7 breast and colon cancer HT-29 using the MTT assay at 72 hours. The complex $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ showed higher cytotoxic activity with an IC_{50} value of 0.33 mM, followed by $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$, with a value of 0.8 mM, the $[\text{Cp}_2\text{Mo(ethylmaltol)}]\text{Cl}$ with 1.60 mM, and $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicillamine)}]\text{Cl}$ with 1.78 mM. As for the cell line HT-29, $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ complex showed an IC_{50} of 0.050 mM, the most active, followed by $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$, with an IC_{50} value of 0.55 mM and $[\text{Cp}_2\text{Mo(ethylmaltol)}]\text{Cl}$ with 0.63 mM. The inclusion this class of ligands in molybdenocene dichloride improves the anti-tumor properties of the corresponding derivatives.

© *Xiomara Narváez Pita* 2012

A Dios

A los que han partido dejando una huella imborrable María Margarita y José María

A mi familia quien es mi apoyo y mi inspiración:

Mis padres: Teresa y José

Mis hermanos: Nancy, Miguel, Carlos y Fabio.

Mis sobrinos: Santi y David

Agradecimientos

Agradezco a la universidad de Puerto Rico -Recinto Universitario de Mayagüez por permitirme crecer profesionalmente.

Mi más sincero agradecimiento y admiración para mi consejero el Dr. Enrique Meléndez Martínez, por permitirme ser parte de su laboratorio de investigación, por su paciencia, por compartir sus conocimientos y guiarme en mi trabajo de grado.

A la Dra. Belinda Pastrana, Dr. Félix Román y al Dr. Jaime Ramírez Vick por su colaboración.

Agradezco a mi comité graduado por su tiempo y aportes: Dra. Nilka Rivera, Dr. Luis Morell, Dr. Ricardo López.

A mis compañeros de laboratorio, al Dr. Gao, a mi estudiante subgraduado Omar Colón por su colaboración.

A mis amigos que siempre han estado ahí cuando los necesito, brindándome su apoyo incondicional: Indira, Dianellys, Marcia, Tati, Ariel, Celia, Amira.

Tabla de contenido

Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Esquemas	xv
Apéndices	xv
1. Introducción	1
1.1 Objetivos.....	8
1.2 Trabajos Previos	9
1.2.1 Cisplatino (Cis-diaminodicloro-platino (II))	9
1.2.2 Diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2).....	11
1.2.3 Otros Complejos Metálicos como agentes anti-cáncer.....	14
2. Síntesis de nuevos complejos de dicloruro de molibdenoceno	16
2.1 Reactivos	16
2.2 Metodología.....	16
2.2.1 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-ácido ascórbico})$	16
2.2.2 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{6-o-palmitoil-L ácido ascórbico})$	17
2.2.3 Síntesis del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{Etil maltol})]\text{Cl}$	18
2.2.4 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}[(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$	18
2.2.5 Preparación de Buffer Tris-HCl.....	18
2.2.6 Preparación de Buffer Fosfato	18
2.2.7 Preparación de la solución de la proteína	19
2.3. Caracterización de los nuevos complejos.....	19
2.3.1 Análisis Elemental	19
2.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón $^1\text{H-NMR}$	20
2.3.3 Infrarrojo (FT-IR)	20
2.3.5 Voltametría Cíclica (CV).....	20

2.3.6 Espectroscopía de Fluorescencia	21
2.3.7 Dicroísmo circular	21
2.4. Resultados y Discusión.....	22
2.4.1 Síntesis de nuevos complejos derivados de Cp_2MoCl_2	22
2.4.2 Análisis elemental.....	25
2.4.3 Infrarrojo (FT-IR)	25
2.4.4 Resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN	30
2.4.5 Caracterización de los complejos por Dicroísmo circular	39
2.4.6 Caracterización de los complejos por espectroscopía UV-VIS	41
2.4.7 Caracterización de los nuevos complejos por Voltametría Cíclica (CV)	44
2.4.8 Caracterización de los complejos por Fluorescencia	49
3. Estudios de interacción del dicloruro de molibdenoceno y sus nuevos derivados con la proteína Ubiquitina.....	53
3.1 Estudios de interacción por espectroscopía Ultravioleta –visible	53
3.1.1 Preparación de soluciones de dicloruro de molibdenoceno, nuevos complejos de molibdenoceno y la solución de Ubiquitina.....	53
3.2 Estudios electroquímicos de interacción por Voltametría Cíclica.....	53
3.2.1 Preparación de la superficie de los electrodos y parámetros instrumentales	54
3.3 Estudios de interacción por espectroscopía de Fluorescencia	54
3.4 Estudios de interacción por Dicroísmo Circular.....	54
3.5 Resultados y discusión.....	54
3.5.1 Estudios de interacción por espectroscopía Ultravioleta –visible.....	54
3.5.2 Estudios electroquímicos de interacción por Voltametría Cíclica	56
3.5.3 Estudios de interacción por espectroscopía de fluorescencia	63
3.5.4 Estudios de interacción por Dicroísmo Circular (CD).....	70
4. Estudios de actividad citotóxica de nuevos complejos de molibdenoceno en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29.....	76
4.1 Materiales y Metodología.....	76

4.2 Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29	76
4.3 Ensayo de Viabilidad MTT	77
4.4 Resultados y Discusión.....	78
5. Conclusiones y futuros trabajos	82
Referencias Bibliográficas	84
Apéndices	89

Lista de Tablas

Tabla 1. Composición de carbono e hidrógeno en los nuevos complejos sintetizados, según análisis elemental realizado por Atlantic Microlab.....	25
Tabla 2. Señales de resonancia magnética de protón $^1\text{H-NMR}$, del ligando y complejo del L-ácido ascórbico en D_2O	33
Tabla 3. Señales de resonancia magnética de protón $^1\text{H-NMR}$, del ligando y complejo del 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico en DMSO-d_6	35
Tabla 4. Señales de resonancia magnética de protón $^1\text{H-NMR}$, del ligando y complejo del Etil maltol en D_2O	37
Tabla 5. Señales de resonancia magnética de protón $^1\text{H-NMR}$, del ligando y complejo de D-penicilamina en D_2O	39
Tabla 6. Porcentaje de interacción del cambio en potencial $\%(\Delta E_{pa})$, y en corriente $\%(\Delta I_{pa})$ de pico anódico, de los nuevos complejos sintetizados.....	63
Tabla 7. Constantes de quenching, k_q , entre la ubiquitina y nuevos complejos sintetizados.	67
Tabla 8. Valores de IC_{50} (mM) de los complejos sintetizados y el dicloruro de molibdenoceno en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de colon HT-29.....	80

Lista de Figuras

Figura 1. Cisplatino, compuesto organometálico usado como droga anti-cáncer.....	2
Figura 2. Estructura del metalloceno dihaluro de molibdenoceno.....	3
Figura 3. Estructura terciaria de la proteína Ubiquitina.	6
Figura 4. Proceso de la ubiquitinación, realizado por la ubiquitina.	7
Figura 5. Estructuras de algunos compuestos organometálicos con propiedades antitumorales.	10
Figura 6. Estructura química de los complejos HC11 y RM175.	14
Figura 7. Montaje del equipo usado en las síntesis de nuevos complejos derivados de bis(ciclopentadienilo)dicloruro de molibdeno (Cp_2MoCl_2).	17
Figura 8. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado del ácido ascórbico.....	26
Figura 9. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico.....	27
Figura 10. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de Etil maltol.....	28
Figura 11. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de D-penicilamina.	29
Figura 12. Espectro de protón ^1H -NMR, del compuesto de partida Cp_2MoCl_2 en D_2O	31
Figura 13. Espectro de protón ^1H -NMR del ligando L-ácido ascórbico (superior) y del complejo sintetizado $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6)$ (inferior), en D_2O	32
Figura 14. Espectro de protón ^1H -NMR del ligando 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico, (superior) y del complejo sintetizado $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_7)$, (inferior) en DMSO-d_6	34
Figura 15. Espectro de protón ^1H -NMR del ligando Etil maltol, (superior) y del complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3)]\text{Cl}$, (inferior) en D_2O	36
Figura 16. Espectro de protón ^1H -NMR del ligando D-penicilamina, (superior) y del complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S})]\text{Cl}$, (inferior) en D_2O	38
Figura 17. Espectro de dicroísmo circular (CD), de nuevos complejos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ (superior) y $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ (inferior).	40
Figura 18. Estructura del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, que presenta actividad óptica debido a que posee un centro quiral (*).	41

Figura 19. Estructura del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, que presenta actividad óptica debido a que posee un centro quiral (*).	41
Figura 20. Espectros electrónicos UV-Vis de ligandos etil maltol, 6-o-palmitoil, nuevos complejos sintetizados y Cp_2MoCl_2 , en buffer Tris-HCl a pH=7.4.	43
Figura 21. Espectros electrónicos UV-Vis de ligandos L-AA, D-penicilamina, y sus complejos sintetizados, en buffer Tris-HCl a pH=7.4.....	43
Figura 22. Voltamogramas cíclicos de los complejos dicloruro de molibdenoceno, etil maltol y PAA (superior), y L-ácido ascórbico, D-penicilamina (inferior) en CH_3CN con $([\text{NBu}_4]\text{PF}_6)$ 0.1 M como electrolito de soporte.....	45
Figura 23. Voltamogramas cíclicos de los ligandos L-AA, (superior), 6-o-palmitoil-L-AA (PAA) (inferior) y su complejos sintetizados en buffer Tris-HCl a pH=7.4, comparados con el compuesto de partida Cp_2MoCl_2	47
Figura 24. Voltamogramas cíclicos de los ligandos etil maltol (superior), D-penicilamina (inferior) y sus complejos sintetizados en buffer Tris-HCl a pH=7.4, comparados con el Cp_2MoCl_2	48
Figura 25. Espectros de emisión de la fluorescencia del Cp_2MoCl_2 , excitado a 280 nm.	50
Figura 26. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando L-ácido ascórbico y su complejo excitados a 280 nm.	50
Figura 27. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando 6-o-palmitoil y su complejo, excitados a 280 nm.....	51
Figura 28. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando etil maltol y su complejo, excitados a 280 nm.....	51
Figura 29. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando D-penicilamina y su complejo, excitados a 280 nm.	52
Figura 30. Espectro electrónico UV-VIS de la proteína ubiquitina 2.5×10^{-5} M, en amortiguador Tris-HCl a pH=7.4	55
Figura 31. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, a condiciones fisiológicas.	56
Figura 32. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo Cp_2MoCl_2 , con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (superior) y con la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina (inferior). ...	58
Figura 33. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.....	59

Figura 34. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ con solución $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Ubiquitina.	59
Figura 35. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.....	60
Figura 36. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ con con la solución $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Ubiquitina.....	60
Figura 37. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.....	61
Figura 38. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ con la solución $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Ubiquitina.....	61
Figura 39. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.	62
Figura 40. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ con la solución $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Ubiquitina.	62
Figura 41. Espectro de fluorescencia de la proteína ubiquitina en amortiguador 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4).	65
Figura 42. Espectros de fluorescencia obtenidos en la titulación de la proteína Ubiquitina con el dicloruro de molibdenoceno, en el rango espectral de 295 nm a 475 nm.	67
Figura 43. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con el complejo que tiene el ligando L-ácido áscórbico, en rango espectral de 295 nm - 500 nm. ..	68
Figura 44. Espectros de fluorescencia obtenidos en la titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, en el rango espectral de 295 nm a 500 nm.....	68
Figura 45. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, en el rango espectral de 300 nm a 420 nm.....	69
Figura 46. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{penicilamina})]\text{Cl}$, en el rango espectral de 295 nm- 500 nm. .	69
Figura 47. Espectro ultravioleta lejano de CD de una proteína con estructura de hélice alfa(a), y de una proteína con estructura tipo beta plegada (b) (28).	71
Figura 48. Espectro de CD en el ultravioleta lejano y cercano de la proteína ubiquitina.	72
Figura 49. Espectro de CD de la titulación de la proteína ubiquitina con el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$	74
Figura 50. Espectro de CD de titulación de la proteína ubiquitina con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$	75

Figura 51. Ensayo colorimétrico de MTT para determinar la citotoxicidad del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, en la línea de cáncer de colon HT-29.....	78
Figura 52. Reacción ocurrida en el ensayo colorimétrico de viabilidad MTT.....	79
Figura 53. Curvas de respuesta sigmoideal, del IC_{50} de los complejos sintetizados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.	81
Figura 54. Efecto (IC_{50}) de los complejos sintetizados en la línea celular de cáncer de colon HT-29 después de 72 horas de exposición a la droga.	81

Lista de Esquemas

Esquema 1. Ligandos bidentados usados en la síntesis de los nuevos complejos	5
Esquema 2. Reacciones entre el dicloruro de molibdenoceno y ligandos L-AA, etil maltol, D-penicilamina, y PAA.....	24

Apéndices

Apéndice 1. Voltamogramas cíclicos de los ligandos usados para sintetizar los nuevos complejos en CH ₃ CN con ([NBu ₄]PF ₆) 0.1 M como electrolito de soporte.	89
Apéndice 2. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo Cp ₂ Mo(L-AA), a condiciones fisiológicas.	89
Apéndice 3. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo Cp ₂ Mo(PAA), a condiciones fisiológicas.	90
Apéndice 4. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo [Cp ₂ Mo(etil maltol)]Cl, a condiciones fisiológicas.....	90

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad que causa millones de muertes en el mundo entero debido a la habilidad de sus células de proliferarse en el cuerpo. Existen muchas clases de cáncer que atacan tanto a niños como ancianos, sin distinción de género o raza; entre los factores que causan esta mortal enfermedad están los factores genéticos, y la exposición a áreas de trabajo con niveles altos de contaminación, incluyendo el deterioro del medio ambiente.

Son muchos los esfuerzos que desde hace muchos años, la comunidad científica ha venido realizando para encontrar posibles curas o tratamientos que puedan otorgar una mejor calidad de vida a los pacientes que padecen esta nefasta enfermedad y que se encuentran en etapas terminales. Existen diversos tratamientos contra el cáncer que dependen tanto de la clase de cáncer (mama, colon, hígado, piel, etc), como de la etapa de desarrollo de la enfermedad (temprana o terminal). Estos tratamientos tienen como objetivo tratar de eliminar o evitar la proliferación de estas células malignas en el organismo; entre ellos se encuentra la radioterapia, la cual mata las células directamente, al incidirlas con rayos de alta energía, y la quimioterapia que se realiza por medio de la administración al paciente de sustancias químicas que actúan como drogas y que son capaces de atacar estas células malignas (1).

Una de las drogas empleadas en la quimioterapia es el cisplatino (cis-diclorodiaminoplatino (II)), (Figura 1). Esta sustancia química (complejo metálico de platino (II)), presenta grandes propiedades antitumorales, y ha sido usada desde hace muchos años para tratamientos contra el cáncer. Cis-platino ha demostrado ser una

muy buena alternativa para el tratamiento de cáncer testicular, dando una mejor calidad de vida y esperanza de cura a los pacientes que lo padecen. Todas estas propiedades se deben a la facilidad que tiene el cis-platino para formar aductos con el DNA, evitando la transcripción, replicación y división celular, contribuyendo a sus cualidades antitumorales, y por lo cual se ha buscado la eficacia de esta droga contra otros tipos de cáncer. Hoy día, se efectúan diversas investigaciones acerca de esta droga para poder entender la selectividad que tiene el cis-platino entre los tumores y las células sanas (2,3).

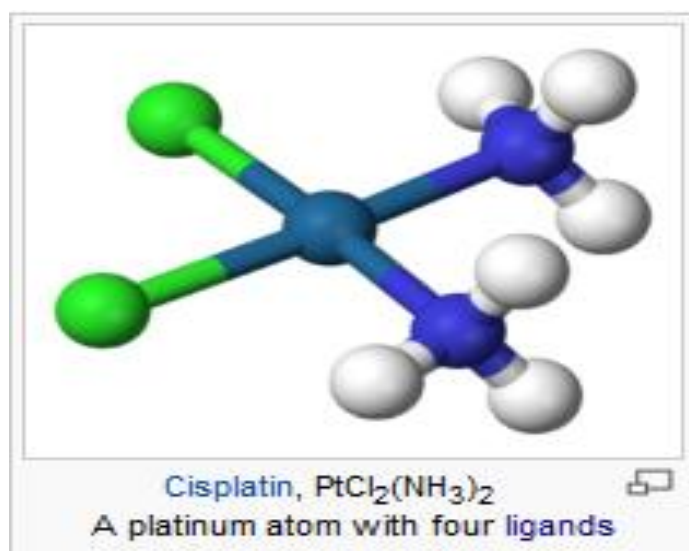


Figura 1. Cisplatino, compuesto organometálico usado como droga anti-cáncer.

Gracias a las cualidades antitumorales del cis-platino surgió un gran interés por los compuestos inorgánicos, tanto así que en los últimos años, se han venido realizando investigaciones enfocadas a sintetizar nuevos complejos metálicos que permitan ser una alternativa como agentes antitumorales, abriendo el interés principalmente por los metalocenos que tienen en su centro un átomo metálico, y en los cuales estas propiedades son bien prometedoras.

Cuando el átomo central del metalloceno es titanio, niobio, vanadio ó molibdeno (Figura 2), se dice que estos compuestos organometálicos tienen mucha actividad antitumoral, siendo una buena alternativa para reemplazar al cis-platino, puesto que son compuestos que presentan diferente química de coordinación y mecanismo de acción, al igual que no presentan toxicidad hacia las células sanas. Esto hace que actúen de forma diferente contra los tumores (3). Se han sintetizado especialmente dihaluros de metallocenos que contienen titanio como átomo metálico central, pero se ha encontrado que es muy inestable a pH fisiológico.

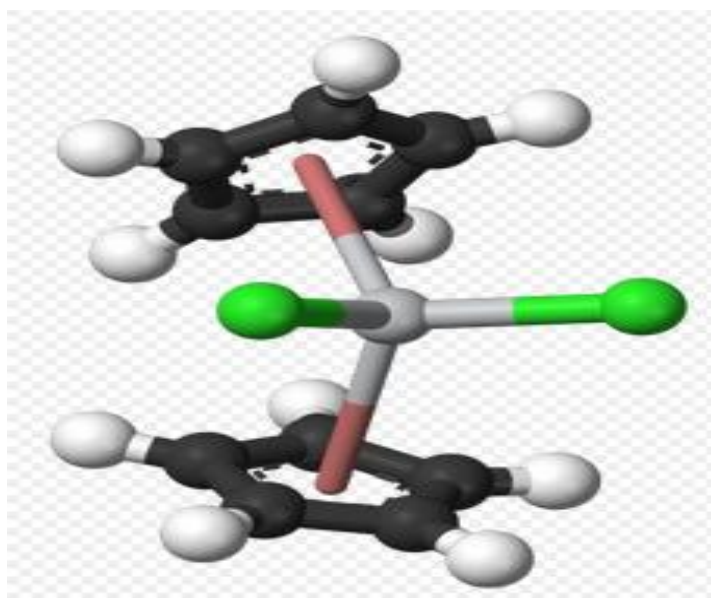
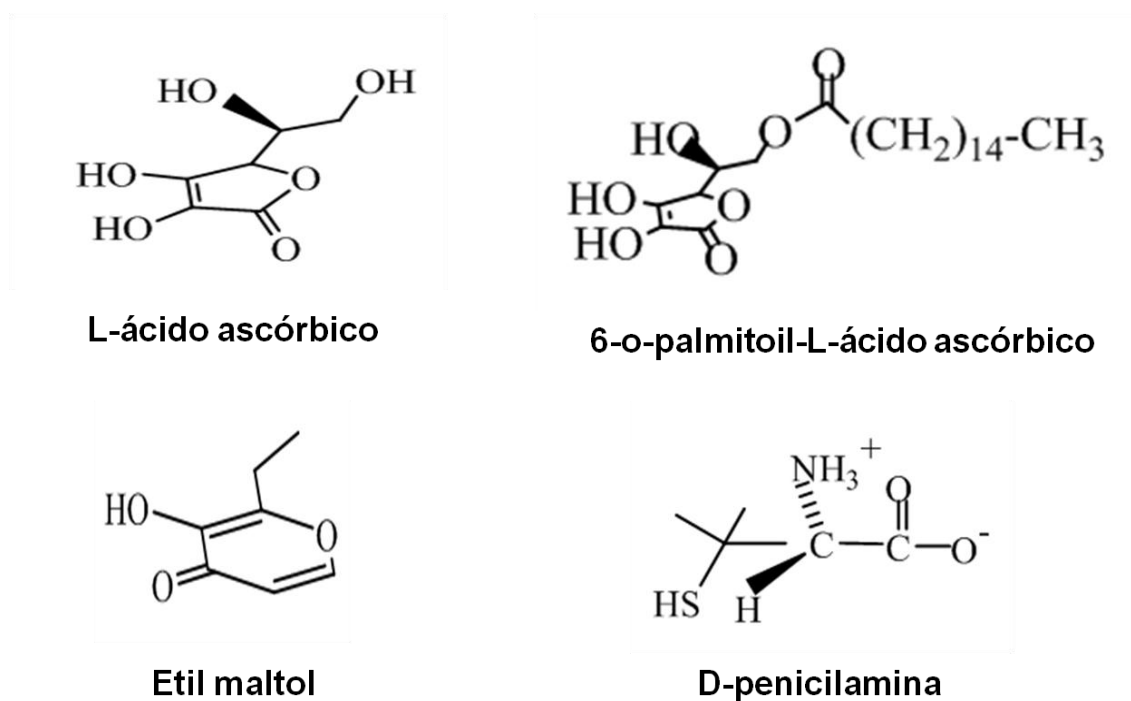


Figura 2. Estructura del metalloceno dihaluro de molibdenoceno.

Un buen candidato de dihaluro de metalloceno es aquel que contenga como átomo central el molibdeno. Este complejo es muy viable debido a que presenta características importantes para ser utilizado como agente antitumoral como lo son su gran estabilidad a pH fisiológico y su solubilidad en agua, que sería ideal para el fin de usarlo como agente antitumoral. Este compuesto organometálico no se ha estudiado en detalle aún (4), por lo cual será nuestra base de investigación para conocer más a fondo su

desempeño como agente anti cáncer, ya que puede ser una gran alternativa como medicamento para ser usado en el tratamiento de quimioterapia, y explorar su acción en diversos tipos de cáncer. Es necesario desarrollar nuevos medicamentos que sean más amigables al organismo, que ofrezcan mejores bondades a los pacientes que lo padecen y que sean más efectivos en la lucha contra esta terrible enfermedad. Es por esto que nuestro trabajo fue enfocado en sintetizar nuevos complejos de molibdenoceno; para esto usaremos cuatro ligandos que son agentes quelantes bidentados (Esquema 1) que dan como resultado quelatos de cinco y seis miembros: L-ácido ascórbico (vitamina C), 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico(derivado de la vitamina C), etil maltol y D-penicilamina; El L-ácido ascórbico, tiene una estructura de lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, es hidrosoluble, posee propiedades antioxidantes; cuando una sustancia se une a una molecula de vitamina C es más fácil que atraviese la barrera hemato-encefálica, actuando el L-ácido ascórbico como un vehículo pudiendo transportar cualquier sustancia al cerebro; existen reportes que indican que el L-ácido ascórbico es citotóxico hacia células neoplásicas malignas por acción directa, al tener actividad pro-oxidante ya que es generador de H_2O_2 que actúa como pro-apoptótico para células cancerosas (5-6). El 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico, compuesto liposoluble ha sido usado como sustituto del L-ácido ascórbico debido a que es un antioxidante mucho más potente; estudios reportados de su actividad citotóxica en células tumorales GH₃ en ratas, reportan valores de IC₅₀ entre 125 y 150 μ M; estos efectos citotóxicos son debidos a su capacidad para inducir la apoptosis (muerte celular) (7). El etil maltol (2-etil-3-hidroxi-4-piranona) es una α -hidroxicetona cíclica, usado en la industria de alimentos como potenciador de sabores, y es un agente quelante capaz de estabilizar centros metálicos (8). La D-penicilamina un aminotiol hidrofílico, que es usada como droga en el tratamiento de varias enfermedades como

son la artritis reumatoidea ya que tiene propiedades antiinflamatorias; la enfermedad de Wilson y el envenenamiento con metales pesados, debido a su capacidad de formar fácilmente quelatos con el cobre y dejando como producto de esta interacción, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (9). Luego de sintetizar los nuevos complejos se caracterizaran por diferentes técnicas espectroscópicas, se estudiaran las interacciones de estos metalocenos con la Ubiquitina (Figura 3). También se hicieron estudios de la actividad citotóxica de los nuevos complejos hacia líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y cáncer de colon HT-29.



Esquema 1. Ligandos bidentados usados en la síntesis de los nuevos complejos de molibdenoceno.

Ubiquitina

Ubiquitina (Ub) es una pequeña proteína altamente conservada presente en las células eucarióticas. Su nombre procede del Latin “*unique*” que significa “en todos lados” ; existe como un monómero libre y unida covalentemente a un amplia variedad

de proteínas celulares (10). Una de las funciones más importantes es el marcaje de proteínas para conducir las a la degradación proteosómica y lisosomal, para eliminarlas de nuestro organismo. También posee otra función como es la ubiquitinación, modificación de una proteína por medio de un enlace covalente a uno o más monómeros de ubiquitina, que es importante para la reparación del ADN, transcripción, traducción, ensamblaje de organelos así como la localización intramolecular de una amplia variedad de proteínas, jugando un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas en la célula (11).

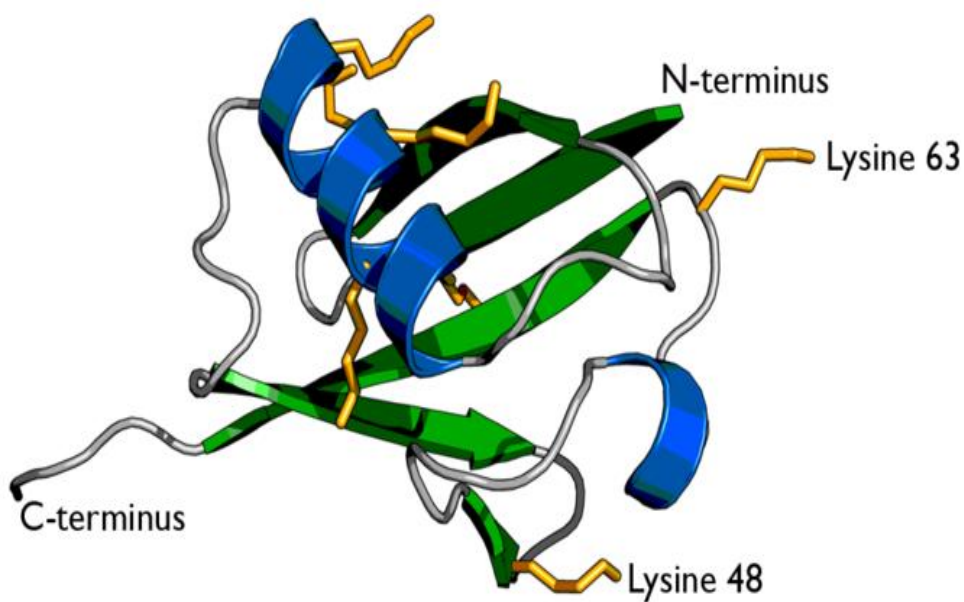


Figura 3. Estructura terciaria de la proteína Ubiquitina.

La ubiquitina está formada por 76 aminoácidos, es de tamaño pequeño y tiene un peso molecular de 8.5 KDa. Análisis previos de su estructura cristalina revelan una conformación globular compacta, constituida por cinco láminas beta y una hélice alfa de

tres vueltas y media. Contiene un núcleo hidrofóbico y un gran número de puentes de hidrógeno por lo cual es estable a cambios de pH (permanece plegada entre pH=1-13) y de temperatura (estable por debajo de los 80°C). Su extremo C-terminal (Arg₇₄-Gly₇₅-Gly₇₆) sobresale de la estructura globular formando un apéndice de gran movilidad (12).

Mecanismo de Ubiquitinación

En la Ubiquitinación (Figura 4), la ubiquitina es activada por la enzima E1 activante de la ubiquitina (requiere una molécula de ATP). El próximo paso es la transferencia de la ubiquitina de E1 a E2 vía reacción de trans (tio)esterificación. Finalmente con la intervención de ubiquitina ligasa E3, un enlace isopéptido es formado entre una lisina de la proteína marcada y el terminal- C de la ubiquitina (13).

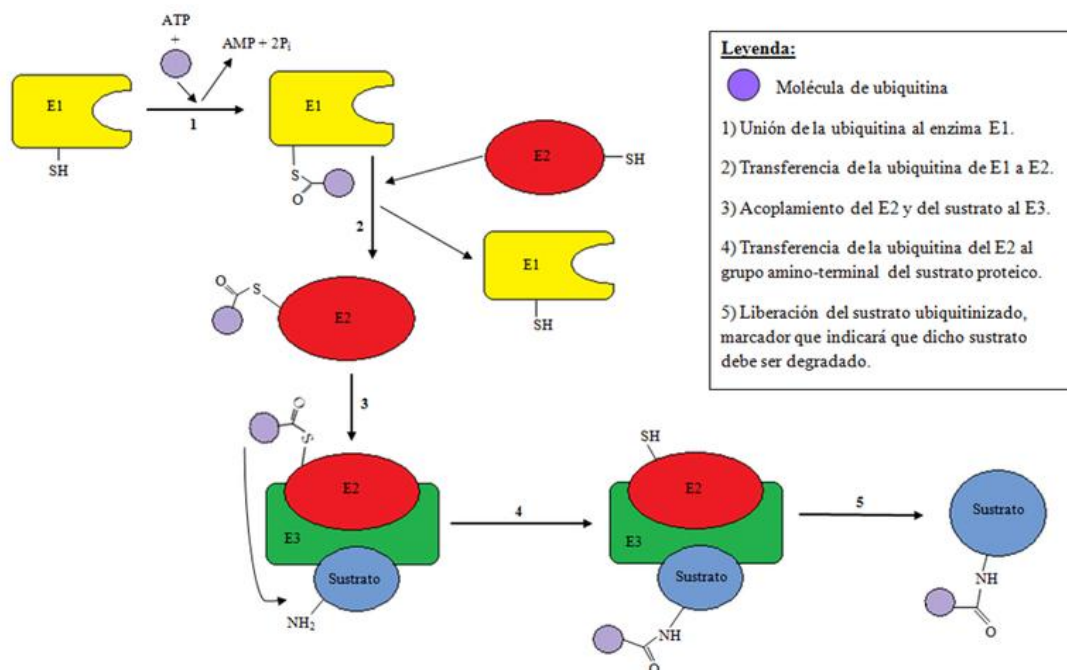


Figura 4. Proceso de la ubiquitinación, realizado por la ubiquitina.

Recientemente se han descubierto nuevos roles de la ubiquitinación han dado con el descubrimiento de una variedad de dominios de ubiquitina alfa helicoidales (9); la caracterización de estos dominios ha contribuido al avance de la biología de la ubiquitina basada en mecanismos regulatorios. Uno de estos dominios es el UIM (motivo de interacción de ubiquitina) que promueve la ubiquitinación en algunas proteínas por si mismas (10), y consiste de un solo motivo de α -hélice con una secuencia de 20 residuos correspondiente a: *X-Ac-Ac-Ac-Ac- _ -X-X-Ala-X-X-X-Ser-X-X-Ac-X-X-X-X*. El espacio *_*, representa la Leucina o cualquier otro gran residuo hidrofóbico, **Ac** representa el ácido Glutámico o al ácido Aspártico (residuos acídicos), un residuo de alanina centrada, y los espacios *X*, están ocupados por cualquier otro residuo (13).

1.1 Objetivos

General

Se sintetizaron nuevos complejos derivados del dicloruro de molibdenoceno, para estudiar la interacción de éstos metalocenos con la ubiquitina, para determinar el posible mecanismo de transporte de la droga anti cáncer efectuado por esta proteína.

Específicos

- Sintetizar nuevos complejos de molibdenoceno y caracterizarlos posteriormente usando varias técnicas espectroscópicas tales como NMR, UV-VIS, CV, CD y fluorescencia.

- Estudiar las interacciones of los nuevos complejos de molibdenoceno con la proteína Ub usando UV-VIS, CV, CD, y fluorescencia.
- Analizar la actividad citotóxica de los nuevos complejos de molibdenoceno, en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y cáncer de colon HT-29 por medio del ensayo colorimétrico MTT.

1.2 Trabajos Previos

1.2.1 Cisplatino (Cis-diaminodicloro-platino (II))

Cis-platino fue sintetizado por primera vez en 1844 por Michel Peyrone, pero fue hasta 1972 cuando *Barnett Rosenberg* descubrió por casualidad la actividad antitumoral de este compuesto mientras trabajaba con un electrodo de platino en un cultivo bacterial de *E. coli*. Este descubrimiento causó un impacto de cómo la química inorgánica puede ser usada para desarrollar compuestos farmacéuticos que tengan la habilidad de actuar como agentes anti cáncer. Cis-platino muestra reactividad hacia el ADN pues tiene facilidad para formar aductos covalentes, cis-platino-ADN, los cuales pueden actuar contra las células cancerosas. Se ha demostrado la efectividad de esta droga para combatir el cáncer testicular y el cáncer de ovario, pero posee limitaciones debido a que puede ocasionar daño a órganos y tejidos sanos debido a su alta toxicidad (2). El Cis-platino es administrado en pacientes por vía intravenosa y al cabo de un día, el 65-98% de la droga es enlazado al plasma de las proteínas (14).

Peleg-Shulman y su grupo de trabajo (2002), investigaron las interacciones de cis-platino y trans-platino con proteínas, comparando la reactividad de los aductos formados, usando dos modelos of proteínas tales como ubiquitina (Ub) y mioglobina de

corazón de caballo (Mb). Encontrando que trans-platino formaba un solo aducto, mientras que cis-platino formaba cuatro aductos diferentes, los cuales fueron analizados por ionización electrospray acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS) en razón de 1:1. Estudios cinéticos fueron realizados para determinar la velocidad de enlace de la proteína y encontraron que el cis-platino se enlaza más rápido a ambas proteínas que el trans-platino. El sitio preferido de enlace para cis-platino es la MET1, cuando se enlaza a la ubiquitina (14)

Casini y su grupo de trabajo (2009), analizaron las reacciones de tres importantes compuestos metálicos medicinales : cis-platino, trans-platino y el rutenio RAPTA-C, con mezclas de las proteínas ubiquitina, citocromo C y superóxido dismutasa, usando espectrometría de masas de alta- resolución acoplada a ionización electrospray (ESI-MS), suministrando información de las interacciones metal-proteína y mostrando que el cis-platino fue moderadamente reactivo hacia las proteínas, mientras que RAPTA-C mostró la mayor reactividad ya que fue el único compuesto metálico que mostró selectividad de enlace en la proteína, debido posiblemente a las interacciones hidrofóbicas inducidas por el anillo de areno y también se estudió los efectos citotóxicos de ellos y conociendo el modo de acción de estas drogas metálicas en la célula (15).

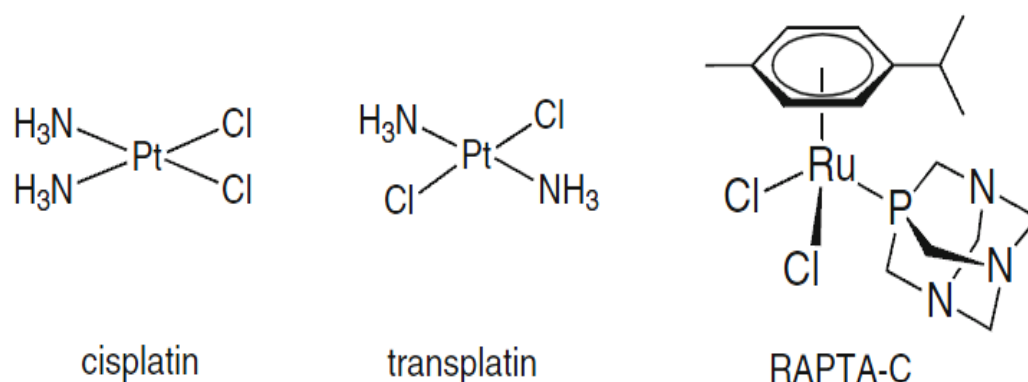


Figura 5. Estructuras de algunos compuestos organometálicos con propiedades antitumorales.

Williams y su grupo de trabajo (2010), estudiaron los cambios conformacionales en la proteína ubiquitina en fase gaseosa, inducida cuando reacciona con la droga anti cáncer, cis-platino, usando espectrometría de masas (IM-MS). Se determinó la formación de aductos, siendo el mono-aducto $[Ub + Pt (NH_3)_2]$ la especie más abundante después de 24h de reacción (razón molar 1:1) y se determinó el sitio de enlace del compuesto cis-platino en la proteína ubiquitina, a través del N-terminal del residuo de metionina. Pequeñas distorsiones estructurales fueron determinadas después de la platinación de la proteína usando movilidad de iones en fase gaseosa en un rápido tiempo de milisegundos (16).

1.2.2 Diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2)

El dicloruro de molibdenoceno fue sintetizado por primera vez por Cooper y Green (14). Köpf-Maier and Köpf publicaron la actividad anti cáncer de dicloruro de molibdenoceno a finales de los 1970 (17-18)

Marks y colaboradores (1991), estudiaron la química de coordinación del dicloruro de molibdenoceno a nucleobases /nucleótidos en solución acuosa y en estado sólido por espectroscopía de 1H -NMR; el Cp_2MoCl_2 en solución acuosa sufre la sustitución de los iones cloruro Cl^{-1} por los iones acuohidroxo dentro de los primeros 60 minutos, formándose la especie $Cp_2Mo(H_2O)OH^{+}$, siendo el enlace Mo-Cp hidrolíticamente estable a pH fisiológico(19).

Vujevic y colaboradores (2003), sintetizaron a partir del dicloruro de molibdenoceno tres complejos derivados molibdenoceno-aminoácidos compuestos del tipo $[Cp_2Mo(IV)(\kappa N, \kappa O-AA)]^{+} Cl^{-} \cdot xH_2O$ con AA =-fenilalaninato (x =1.5), DL-leucinato

($x = 2$) and DL-valinato ($x = 1$), que son cinéticamente estables en el rango de pH de 2.3-11.5, realizando mediciones por UV-VIS, ^{13}C -NMR, y ESI-MS (20).

Harding y colaboradores (1998), estudiaron las interacciones del dicloruro de molibdenoceno, con cuatro oligonucleótidos d(CGCATATGCG)₂, dATGGTA, dApT, y dCpG, usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H - NMR), sugiriendo que el enlace a bajo pH es observado, y que la coordinación es menos favorable a alto pH debido a la competición con la hidrólisis, que incrementa al aumentar el valor de pH ya que los sitios de enlace no están disponibles debido a los enlaces de hidrógeno y a efectos estéricos. Los aductos estables metaloceno-ADN pueden ser formados a $\text{pH} < 4.0$, pero a $\text{pH} > 6.0$ es muy improbable que se formen (4).

Harding y colaboradores (2004), investigaron la interacción de ligandos biológicos (aminoácidos) con el dicloruro de molibdenoceno a condiciones de pH fisiológico y concluyó que aminoácidos que contienen sulfuro (como cisteína), son de gran afinidad a el diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2) y demostró que cada dihaluro de metaloceno tiene un diferente mecanismo de acción hacia ligandos biológicos(21).

Erxleben (2004), estudió en solución acuosa la interacción del dicloruro de molibdenoceno con dipéptidos y tripéptidos que contienen cisteína en un rango de pH de 2-9. El $\text{Cp}_2\text{Mo}^{+2}$, coordina al grupo tiolato de péptidos que tienen la forma X-Cys-Y, ayudando a liberar los aminoácidos en el extremo carboxilo del residuo de cisteína, por medio de hidrólisis a alta temperatura. Los enlaces peptídicos no son tan fáciles de romper bajo condiciones moderadas, es por esto que se buscan nuevos agentes que sean

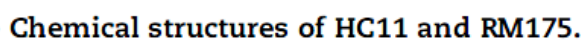
eficientes para romper este tipo de enlaces para aplicaciones en bioquímica y biología molecular, siendo el dicloruro de molibdenoceno un buen candidato (22).

Meléndez y colaboradores (2004), realizaron estudios para elucidar la coordinación del dicloruro de molibdenoceno con ADN de timo de ternera a pH=7.4 en buffer, usando espectroscopía de emisión por plasma inducido (ICPES), voltametría cíclica, y resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones. Su grupo observó que el ADN se enlaza al molibdenoceno en un 5-12% (21), contradiciendo los resultados de Harding. (18) En un estudio posterior Meléndez también observó que el molibdenoceno se coordina débilmente con las bases purinas y casi insignificadamente con el grupo fosfoéster, usando espectroscopia de ^1H y ^{31}P -NMR (23-24).

Meléndez y colaboradores (2009), sintetizaron dos complejos de molibdenoceno y con ligandos quelantes que contienen oxígeno, maltolato y malonato, resultando ser solubles en agua y más estables que el Cp_2MoCl_2 . También estudió las interacciones metal-albúmina usando espectroscopía UV-VIS, donde no se observaron nuevas bandas, indicando que la interacción no se realiza por coordinación con el centro metálico. Para observar el comportamiento redox se usó voltametría cíclica en amortiguador tris-HCl a pH=7.4, encontrando que las posibles interacciones entre el molibdenoceno y la albúmina son de carácter hidrofóbico, como se había sugerido antes por otros grupos, dando una interacción del 30% para el Cp_2MoCl_2 , un 21% para el $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{malonato})$, y un 15% para el $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{maltolato})\text{Cl}$, siendo el molibdenoceno mas afín a la albúmina que los nuevos complejos. Los efectos citotóxicos en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29 se determinaron usando el ensayo MTT, a 72 h. $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{malonato})$ resulto ser más citotóxico que el $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{maltolato})\text{Cl}$, en HT-

1.2.3 Otros Complejos Metálicos como agentes anti-cáncer

Guichard y su grupo de trabajo (2006), estudiaron la actividad antitumoral de dos complejos de rutenio RM175 y HC11 *in vitro* e *in vivo*, encontrando en sus estudios *in vitro* que el HC11, es diez veces más activo que el RM175 y que el cis-platino en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780, y en hepatocitos humanos; la toxicidad de este compuesto puede estar relacionada con el ligando de areno y su modificación (26).



Gómez y su grupo de trabajo (2009) sintetizaron nuevos complejos de titanoceno, $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\{\text{CMe}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)\})\text{Cl}_2](1)$, que al hacerlos reaccionar

con 9-BBN(borabicyclononano) se forman los complejos sustituidos $[\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4(\text{CMe}_2\{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{BC}_8\text{H}_{14}\}))\text{Cl}_2](2)$. Fueron probados como agentes antitumorales en diferentes clases de líneas celulares tumorales, para entender la relación entre los grupos unidos al anillo de ciclopentadienilo y su actividad citotóxica. La presencia de grupos alquilo en el anillo de ciclopentadienilo incrementa ligeramente la citotoxicidad de los complejos en algunas líneas celulares estudiadas con respecto al complejo de partida, el dicloruro de titanoceno. El grupo borilo en el anillo de ciclopentadienilo tiene una influencia negativa sobre su actividad en adenocarcinoma de cérvix humana (HeLa), en melanoma maligno (Fem-x) y en células de leucemia humana (K562) y un efecto positivo en carcinoma de mama humano (MDA-MB-361) (27).

2. Síntesis de nuevos complejos de dicloruro de molibdenoceno

2.1 Reactivos

Los reactivos usados para los diversos experimentos fueron comprados de Sigma-Aldrich: diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2) al 97%; ; Ubiquitina de eritrocitos bovinos >98%, L- Ácido ascórbico, 6-o-palmitoil-L- ácido ascórbico (PAA), etill maltol y D-penicilamina; Agua desionizada; óxido de deuterio (D_2O) 99.9%; buffer Tris-HCl; buffer PBS; Metanol (CH_3OH); hidróxido de sodio (NaOH); ácido clorhídrico (HCl); sefadex lipofílico.

2.2 Metodología

2.2.1 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-ácido ascórbico})$

0.1836 gramos (0.6 mmoles) de diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2), fueron sonicados en 16.0 mL de agua desionizada desgaseada (H_2O) por ~ 2h, hasta que la solución se tornó de color marrón oscuro. Se transfirió esta solución a un matraz de fondo redondo de 50.0 mL de tres cuellos (Figura 7), y fue mezclada con 0.1088 gramos (0.6 mmoles) de L- ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), bajo atmósfera inerte (nitrógeno, N_2) constante, usando la línea de Schlenk . El valor de $\text{pH}=5.4$ se ajustó durante la reacción con NaOH ; la solución fue dejada toda la noche con agitación constante; el producto obtenido, el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6)$, es un sólido marrón oscuro que fue aislado evaporando el solvente en vacío.



Figura 7. Montaje del equipo usado en las síntesis de nuevos complejos derivados de bis(ciclopentadienilo)dicloruro de molibdeno (Cp_2MoCl_2).

2.2.2 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(6-o-palmitoil-L ácido ascórbico)}$

0.0823 gramos (0.20 mmoles) de PAA ($\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_7$) (ligeramente soluble en agua), fueron sonicados en 10.0 mL de agua desionizada desgaseada (H_2O) por $\sim 2\text{h}$, hasta que se formó una emulsión. Se sonicaron 0.0589 gramos (0.20 mmoles) de diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2), en 6.0 mL de agua desionizada desgaseada (H_2O) por $\sim 2\text{h}$, hasta que la solución se tornó de color marrón oscuro, para luego ser mezclados en un matraz de fondo redondo de 50.0 mL y tres cuellos, bajo atmósfera inerte (nitrógeno, N_2). Se monitoreó el valor de pH durante la reacción fijándose a 10.0 con hidróxido de sodio (NaOH). La solución se dejó toda la noche con agitación constante; el producto de la reacción es un precipitado de color amarillo oscuro presente a través de la reacción, que fue separado por filtración, obteniéndose el complejo de fórmula ($\text{Cp}_2\text{Mo(C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_7)$).

2.2.3 Síntesis del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{Etil maltol})]\text{Cl}$

0.1508 gramos (0.5 mmoles) de diclorobis(ciclopentadienilo)molibdeno(IV) (Cp_2MoCl_2) fueron mezclados con 0.0712 gramos (0.5 mmoles) de etil maltol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$), en un matraz de fondo redondo de 50 mL de tres cuellos que contenía 10.0 mL de agua desionizada desgaseada (H_2O), con agitación constante. Se monitoreó el valor de pH durante la reacción fijándose a 10.0, y bajo atmósfera inerte (nitrógeno, N_2) durante toda la noche. El sólido rojizo oscuro obtenido es el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3)$ que fue aislado y purificado finalmente por medio de una columna cromatográfica, usando Sefadex lipofílico (20-100 μm , de Aldrich) como fase estacionaria, y metanol como fase móvil.

2.2.4 Síntesis del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}[(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$

Fue sintetizado y purificado de forma similar al complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{6-o-palmitoil-L ácido ascórbico})$, pero a un $\text{pH}=6.8$, obteniéndose un complejo de fórmula $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S})$ y de color rojizo oscuro.

2.2.5 Preparación de Buffer Tris-HCl

Se pesaron 3.0285 gramos de tris(hidroximetil)aminometano, y 0.1461 gramos de cloruro de sodio (NaCl), que se adicionaron en un matraz volumétrico de 250.0 mL que contenía agua desionizada (H_2O), hasta total disolución con agitación constante. Se fijó a pH fisiológico, $\text{pH}=7.4$ usando ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M, y se completa hasta la marca, para obtener una concentración final de 100 mM Tris /10 mM NaCl .

2.2.6 Preparación de Buffer Fosfato

Se preparó una solución 10 mM de fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), pesando 0.268 gramos que se agregaron en un matraz volumétrico

de 100.0 mL disolviéndolos con agua desionizada, y completando hasta la marca. De manera similar se preparó una solución de 25.0 mL, pero de fosfato monobásico de sodio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pesando 0.0345 gramos de éste compuesto. Luego se mezclaron en un matraz volumétrico de 200.0 mL, que contenía 0.2338 gramos de cloruro de sodio (NaCl), 19.0 mL de la solución de fosfato monobásico y 81.0 mL de la solución de fosfato dibásico. Se fijó el pH a valor fisiológico $\text{pH}=7.4$ con ácido clorhídrico 0.1 M y se completó hasta la marca con agua desionizada para obtener una concentración final de 10 mM fosfato/ 20 mM NaCl .

2.2.7 Preparación de la solución de la proteína

En un matraz volumétrico de 100.0 mL, se adicionaron 0.0214 gramos de ubiquitina que se disolvieron con buffer tris o buffer fosfato (dependiendo el análisis) a pH fisiológico, completándose hasta la marca, para una concentración final de 2.5×10^{-5} M. Esta solución se almacena a 5°C , y es estable hasta por un mes.

2.3. Caracterización de los nuevos complejos

Se caracterizaron los nuevos complejos sintetizados para elucidar su estructura usando análisis elemental y diversas técnicas espectroscópicas.

2.3.1 Análisis Elemental

Muestras de los nuevos complejos puros fueron secadas en vacío, y fueron enviadas a Atlantic Microlab, para determinar el porcentaje de H y C presente.

2.3.2 Resonancia magnética nuclear de protón $^1\text{H-NMR}$

Se usaron las técnicas espectroscópicas de $^1\text{H-NMR}$ y ^{13}C , disolviendo las diferentes muestras en solventes deuterados tales como D_2O (para los complejos solubles en agua), y DMSO (para el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(6-o-palmitoil-L ácido ascórbico)}$ que es ligeramente soluble en agua). Para estos análisis se usó un espectrómetro de 500 MHz de la compañía Bruker, con banda ancha y sonda QXI El NMR Bruker 500 MHz, es un instrumento equipado con un poderoso magneto superconductor de 11.4 Tesla.

2.3.3 Infrarrojo (FT-IR)

Se hizo una pastilla de KBr que contenía aproximadamente, 5% de los respectivos complejos, para luego analizarla en un espectrofotómetro de infrarrojo (FT-IR) Bruker Vector-22, en el rango de frecuencia de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, para obtener las diferentes bandas de los grupos funcionales característicos.

2.3.4 Espectroscopía UV-VIS

Soluciones de concentración $4.0 \times 10^{-4}\text{ M}$ de los nuevos complejos y del Cp_2MoCl_2 fueron preparadas en buffer 100 mM Tris /10 mM NaCl a pH=7.4 (fisiológico), usando un espectrofotómetro Lambda Bio 20 Perkin Elmer de doble haz, equipado con un controlador de temperatura, un software WinLab (Perkin Elmer), y usando una celda de cuarzo de paso óptico de 1cm.

2.3.5 Voltametría Cíclica (CV)

Se estudió el comportamiento redox de los complejos en solventes orgánicos (acetonitrilo, CH_3CN), usando hexafluorofosfato de tetrabutilamonio ($[\text{NBu}_4]\text{PF}_6$) 0.1 M como electrolito de soporte, y en amortiguador 100 mM Tris /10 mM NaCl a pH=7.4. Las soluciones de los complejos $1.0 \times 10^{-3}\text{ M}$ se desgasean con nitrógeno

antes del análisis para eliminar el oxígeno presente. Los experimentos se realizaron usando un analizador electroquímico voltamétrico BAS CV-50W que consta de una celda electroquímica y tres electrodos. Como electrodo de trabajo se usó un electrodo de carbono de vidrio, al cual se le da un tratamiento de limpieza previo a cada análisis, pasándolo durante 1 minuto por tres superficies de rugosidad diferente que contienen una pequeña cantidad de alúmina $0.05\ \mu\text{m}$ disuelta en agua desionizada, para luego sonificarlo por otro minuto, finalmente lavarlo y secarlo, para ponerlo en la celda electroquímica. El electrodo auxiliar fue un alambre de platino y el electrodo de referencia es Ag/AgCl, 3 M NaCl. Los parámetros que se usaron durante los análisis fueron variados, empleando ventanas de potencial que van desde +1.5 V hasta -1.5 V, corrientes de +100 μA hasta -100 μA , y una velocidad de barrido de 100 mV/s.

2.3.6 Espectroscopía de Fluorescencia

Se usó un espectrofluorómetro Shimadzu RF-S301PC, equipado con dos monocromadores, uno de emisión, otro de excitación, dos tubos fotomultiplicadores y una lámpara de Xenón de 150 W. Se obtuvieron espectros de emisión de soluciones del orden de 10^{-4} M de los nuevos complejos y del Cp_2MoCl_2 , preparadas en amortiguador 100 mM Tris /10 mM NaCl a pH=7.4, usando como parámetros una longitud de onda de excitación de 280 nm, en un rango espectral de emisión de 300 nm a 400 nm, alta sensibilidad, velocidad lenta y un ancho de rendija para excitación de 10 nm y para emisión de 5 nm.

2.3.7 Dicroísmo circular

Se prepararon soluciones de los complejos del orden de 10^{-4} M, usando como solvente amortiguador 10 mM fosfato/20 mM NaCl a pH=7.4 (fisiológico), que se analizaron en

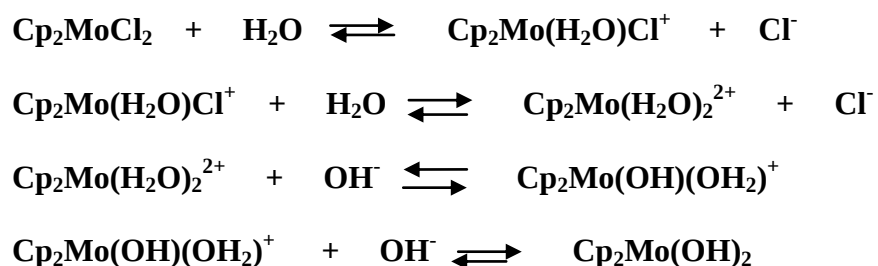
un espectropolarímetro JASCO J810, equipado con una lámpara de xenón monocromática, linealmente polarizada y conectado a un controlador de temperatura JASCO PTC-423S, usando una celda de cuarzo de paso óptico de 1cm. Los parámetros que se usaron fueron un rango espectral de 180 nm a 450 nm, una velocidad de rastreo o barrido de 100 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 s, ancho de banda de 2 nm, “data pitch” de 0.1 nm, y cada espectro obtenido fue el promedio de 6 barridos.

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1 Síntesis de nuevos complejos derivados de Cp_2MoCl_2

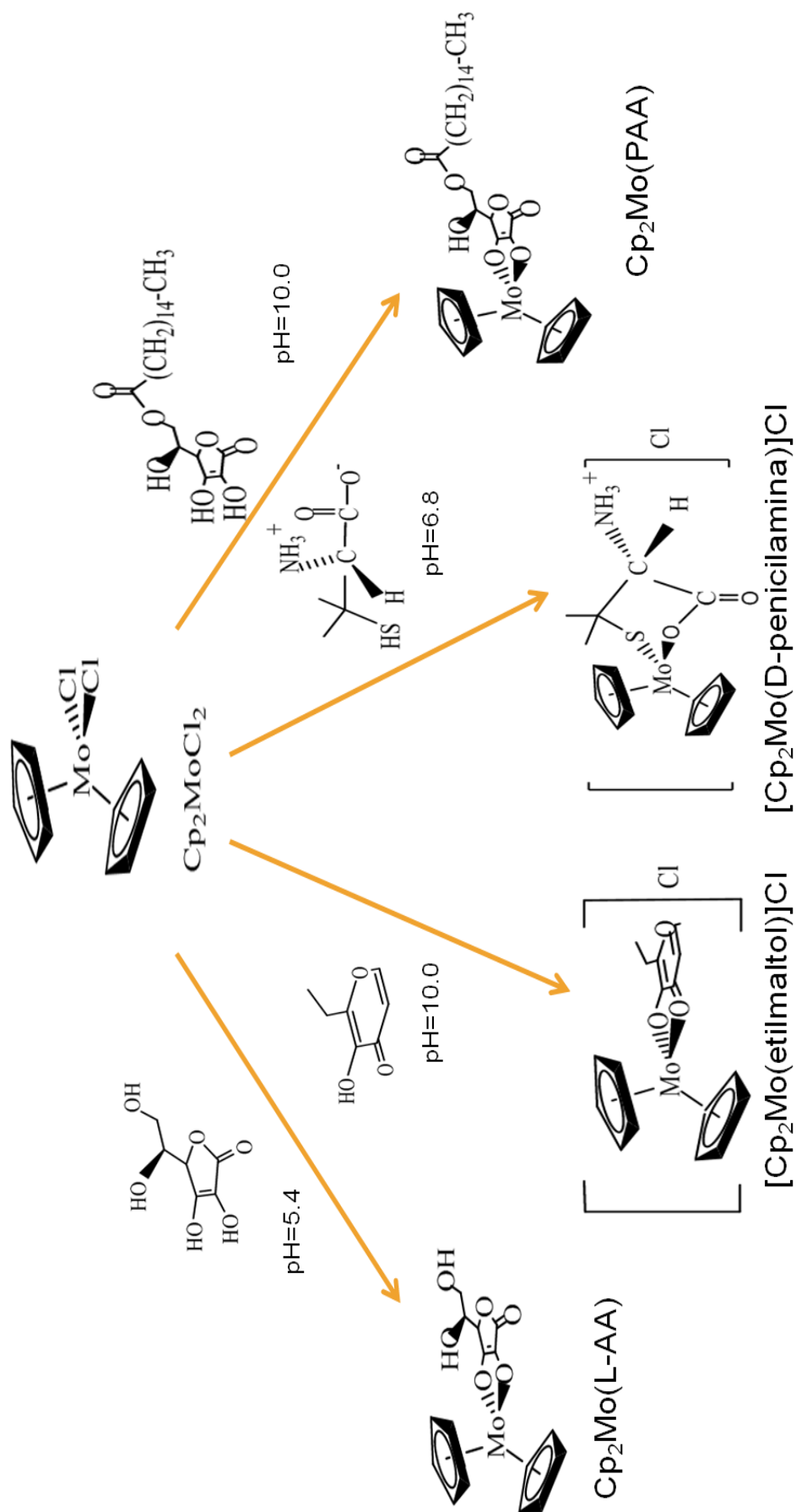
La reacción entre el dicloruro de molibdenoceno (Cp_2MoCl_2) y los diferentes ligandos L- ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), de PAA ($\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_7$), etil maltol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$), y D-penicilamina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$), se realizaron a una relación molar 1:1. Sonicar el dicloruro de molibdenoceno, asegura que los ligandos cloruro Cl^- , se desprendan del complejo de partida, formándose los iones acuohidroxos, y que durante la reacción los ligandos se anclen con mayor facilidad al $\text{Cp}_2\text{Mo}^{+2}$. En todas las síntesis se observó un cambio de color, esto debido a las transiciones electrónicas del Mo^{+4} , lo que indica que las reacciones se completaron. Los complejos obtenidos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-ácido ascórbico})$, $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ y $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, mejoraron las propiedades de solubilidad del complejo de partida en agua, siendo altamente solubles, a excepción del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ que es ligeramente soluble en agua. En cuanto a la estabilidad, todos los complejos son bien estables, almacenándose por un largo periodo a 20°C . El complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, es higroscópico, por lo cual se debe almacenar en condiciones de vacío.

El mecanismo de reacción general propuesto que ocurre cuando el dicloruro de molibdenoceno se disuelve en agua es (19):



Evidenciando la estabilidad del enlace Mo-Cp, el cual está presente en todos los productos de reacción; todos los ligandos que se usaron en las síntesis de los nuevos complejos forman quelatos con $\text{Cp}_2\text{Mo}^{+2}$, (L-acido ascórbico y PAA) y con $\text{Cp}_2\text{Mo}^{+1}\text{Cl}$, (los ligandos etil maltol y D-penicilamina).

Las reacciones químicas generales que describen las síntesis de los nuevos complejos son:



Esquema 2. Reacciones entre el dicloruro de molibdenoceno y los ligandos L-AA, etil maltol, D-penicilamina, y PAA.

2.4.2 Análisis elemental

Los compuestos analizados se enviaron a Atlantic Microlab para corroborar la fórmula propuesta para cada uno de ellos (Tabla 1). El cálculo teórico del porcentaje de carbono e hidrógeno se hizo usando el programa *Molecular Weight de Matthew Monroe*. Según el resultado del análisis elemental, los complejos formados por 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico, etil maltol, y D-penicilamina se encuentran hidratados, conteniendo dentro de su estructura 2.5 moléculas de agua (H₂O).

	% C		% H	
Fórmula Complejo	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental
Cp₂Mo(C₂₂H₃₆O₇)(H₂O)_{2.5}	56.04	55.70	7.50	7.40
Cp₂Mo(C₅H₉NO₂S)Cl(H₂O)_{2.5}	39.61	39.80	5.54	5.51
Cp₂Mo(C₇H₇O₃)Cl(H₂O)₃	44.89	44.85	5.097	4.82

Tabla 1. Composición de carbono e hidrógeno en los nuevos complejos sintetizados, según análisis elemental realizado por Atlantic Microlab.

2.4.3 Infrarrojo (FT-IR)

Otra técnica muy útil para elucidar la estructura de los nuevos complejos sintetizados es la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), la cual muestra las vibraciones características de los grupos funcionales presentes en los complejos. El espectro FT-IR del complejo de partida presenta una banda característica del estiramiento C-H (sp²), de los anillos de ciclopentadienilo, a una frecuencia de ~3094 cm⁻¹, que se encuentra a la misma frecuencia presente en los complejos sintetizados en los complejos de [Cp₂Mo(etil maltol)]Cl y [Cp₂Mo(D-penicilamina)]Cl. A diferencia,

los complejos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ sufren un ligero desplazamiento hacia frecuencias más altas, $\sim 3114\text{ cm}^{-1}$, y $\sim 3116\text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

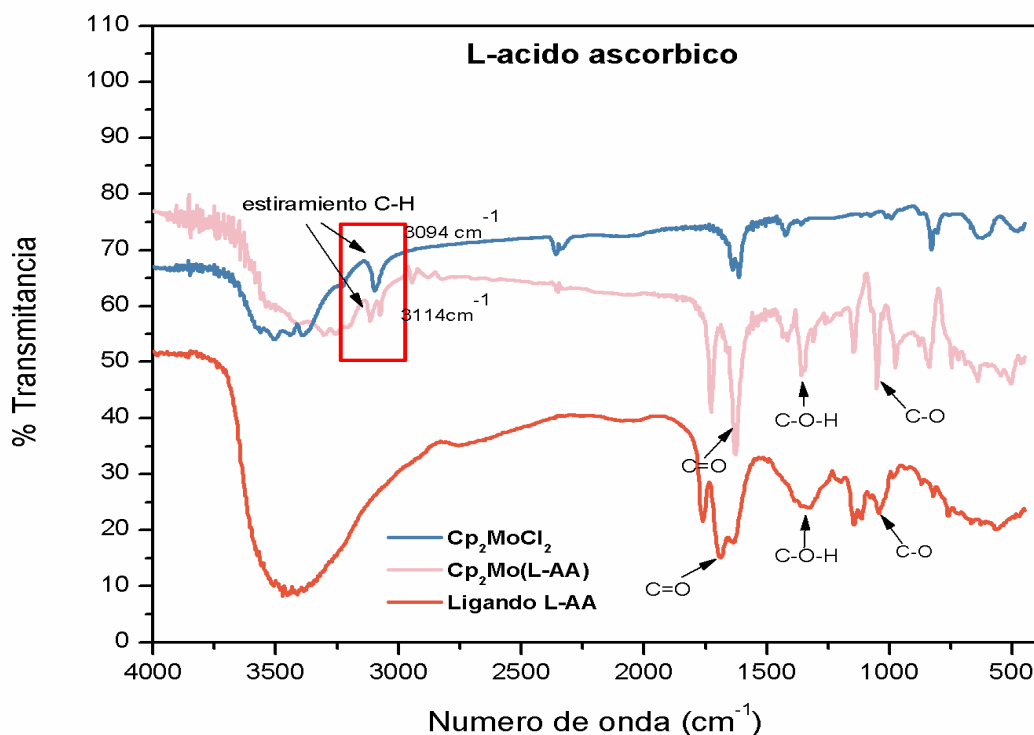


Figura 8. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado del ácido ascórbico.

La Figura 8, muestra el espectro del ligando L-ácido ascórbico y del complejo derivado. En ambos se aprecian las bandas características como son la vibración $\text{C}=\text{O}$, presente en el ligando a una frecuencia de $\sim 1688\text{ cm}^{-1}$ y en el complejo se desplaza a frecuencias más bajas $\sim 1628\text{ cm}^{-1}$. Esta banda es debida al anillo de la lactona. La vibración $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ presente en el ligando a una frecuencia de $\sim 1348\text{ cm}^{-1}$, se desplaza en el complejo a $\sim 1355\text{ cm}^{-1}$, debida a los grupos hidroxilo. La vibración $\text{C}-\text{O}$ en el ligando a $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ y en el complejo se puede apreciar a la misma frecuencia, banda que corresponde al anillo de lactona. La vibración de los grupos $\text{O}-\text{H}$ del ligando

se aprecia con gran intensidad en $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ (banda fuerte), pero disminuye en intensidad en el espectro del complejo, sugiriendo que la coordinación del L-ácido ascórbico con el molibdenoceno es vía oxígeno.

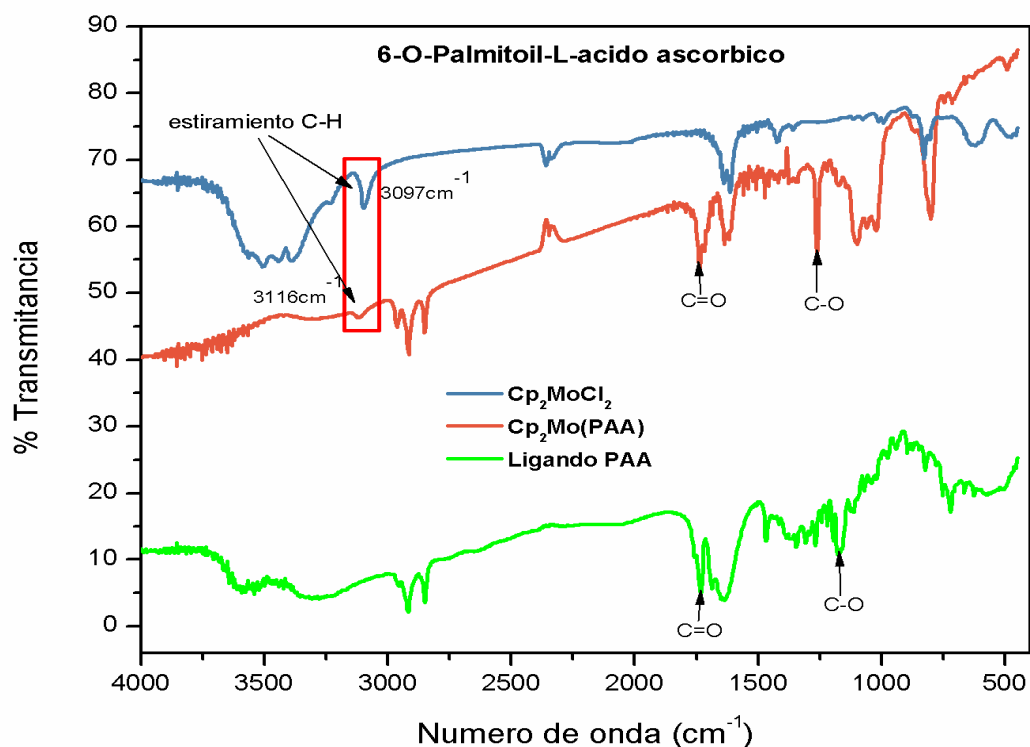


Figura 9. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico.

La Figura 9, muestra el espectro del ligando 6-o-palmitoil- L-ácido ascórbico y del complejo derivado. Se aprecian las bandas características del estiramiento C-H a frecuencias de 2917 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} , debidas a la cadena alifática del ligando y que se aprecian con un ligero desplazamiento, hacia frecuencias más bajas en el complejo. La vibración C=O, presente en el ligando y en el complejo aparecen a la misma frecuencia de $\sim 1734\text{ cm}^{-1}$, banda debida al anillo de lactona. El estiramiento C-O en el ligando a $\sim 1172\text{ cm}^{-1}$ y en el complejo se puede apreciar a una frecuencia de 1261 cm^{-1} , banda

que corresponde también al anillo de lactona. La vibración en $\sim 3250\text{ cm}^{-1}$ debida a los grupos O-H del ligando, no se aprecian casi en el espectro del complejo, lo que sugiere que la coordinación con el metal es vía oxígeno. El desplazamiento en algunas de las bandas sugiere que hay coordinación del 6-o-palmitoil-L-AA con el centro metálico del molibdenoceno.

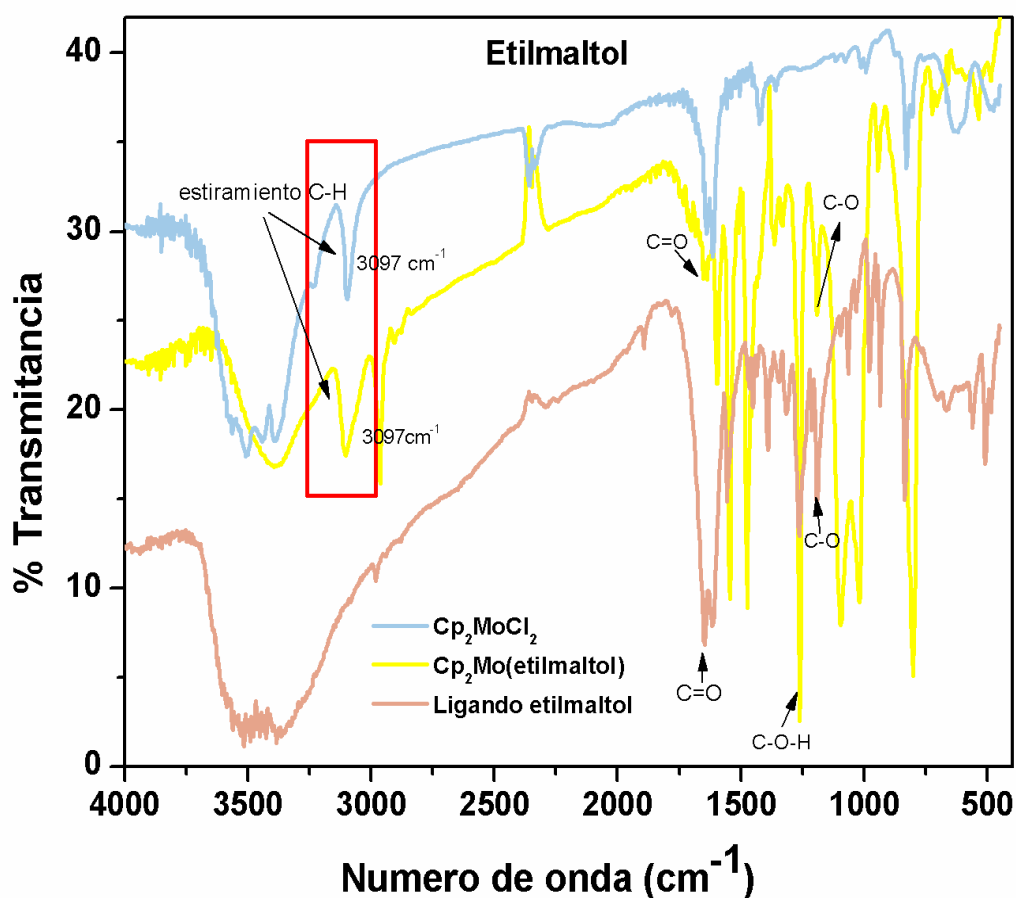


Figura 10. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de Etil maltol.

La Figura 10, muestra el espectro del ligando etil maltol y del complejo derivado; se aprecian las bandas características del estiramiento C-H a frecuencias de 2982 cm^{-1} en el ligando y a 2963 cm^{-1} en el complejo, debidas al etilo presente en el ligando y se

aprecia con un ligero desplazamiento, hacia frecuencias más bajas en el complejo. La vibración C=O es una banda fuerte presente en el ligando en $\sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ y en el complejo a una frecuencia de $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$, debida al anillo de lactona. El estiramiento C-O en el ligando y en el complejo salen a la misma frecuencia $\sim 1194 \text{ cm}^{-1}$, banda que corresponde también al anillo de lactona. El desplazamiento en algunas de las bandas sugiere la coordinación del palmitoil con el centro metálico del molibdenoceno.

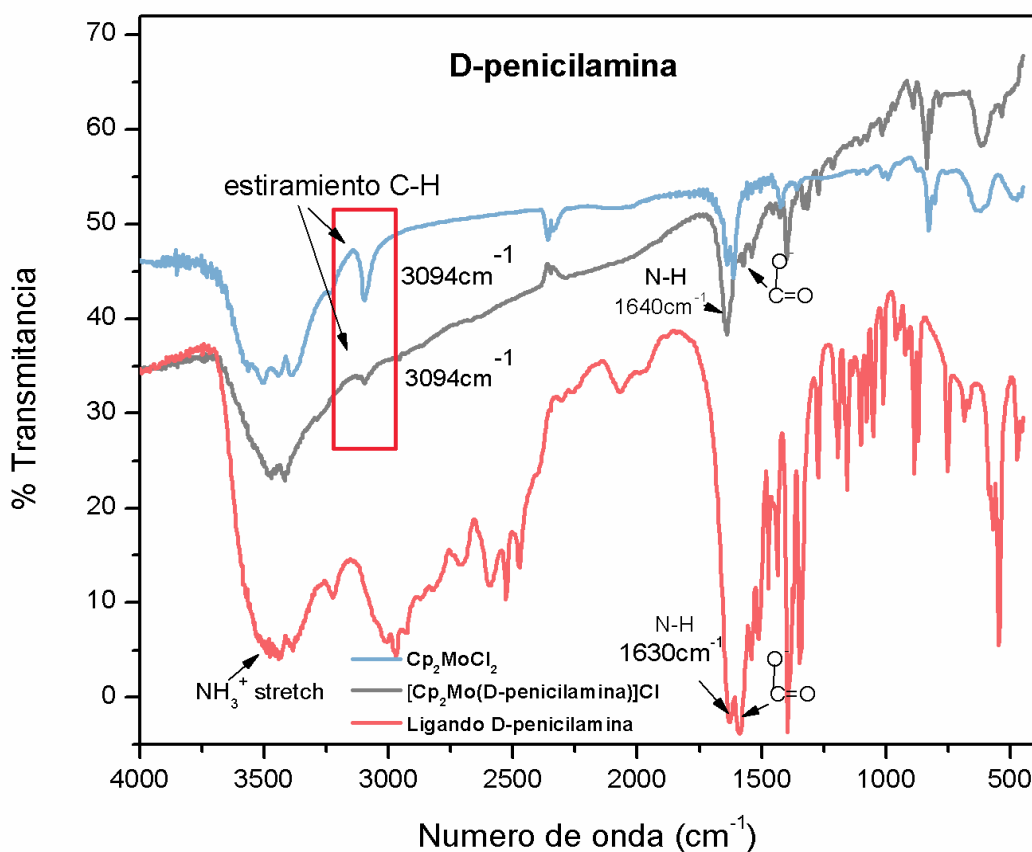


Figura 11. Espectro de FT-IR del ligando y complejo sintetizado de D-penicilamina.

La Figura 11, muestra el espectro del ligando D-penicilamina y del complejo sintetizado. La D-penicilamina es un compuesto derivado de la cisteína, por lo que tiene en su estructura los grupos característicos de un aminoácido, el ión amonio –

NH_3^+ y el ión carboxilo COO^- ya que se comportan como “*zwitterions*”. Las bandas correspondientes al estiramiento NH_3^+ se aprecian como una banda ancha a una frecuencia de $\sim 3436 \text{ cm}^{-1}$, que también la presenta el espectro del complejo a $\sim 3476 \text{ cm}^{-1}$. El estiramiento asimétrico de la vibración COO^- presenta una banda fuerte en 1580 cm^{-1} para el ligando y 1573 cm^{-1} para el complejo; y el estiramiento simétrico COO^- una banda fuerte en 1400 cm^{-1} tanto en el ligando como en el complejo. La banda débil del estiramiento del grupo tiol, S-H, a una frecuencia de $\sim 2468 \text{ cm}^{-1}$ del ligando, no aparece en el espectro del complejo lo que sugiere que una de los átomos por los cuales el molibdenoceno se enlaza es por el azufre, debido a la afinidad que existe entre ellos.

2.4.4 Resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN

Los nuevos complejos sintetizados se caracterizaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN, ya que es una técnica muy robusta para elucidar cualquier estructura. La Figura 12 presenta el espectro de RMN de ^1H para el dicloruro de molibdenoceno. En la Figura 13, se observa el espectro obtenido tanto para el ligando, como para el nuevo complejo sintetizado del L- ácido ascórbico en agua deuterada, D_2O . Comparando el espectro del ligando con el del complejo sintetizado observamos los picos correspondientes a los protones: H_A (doblete) con una señal $\delta = 4.90 \text{ ppm}$; H_B (triplete) con desplazamiento $\delta = 4.01 \text{ ppm}$; H_C (doblete) con $\delta = 3.70 \text{ ppm}$; estas señales se observan en el espectro del complejo desplazándose hacia campos altos (Tabla 2).

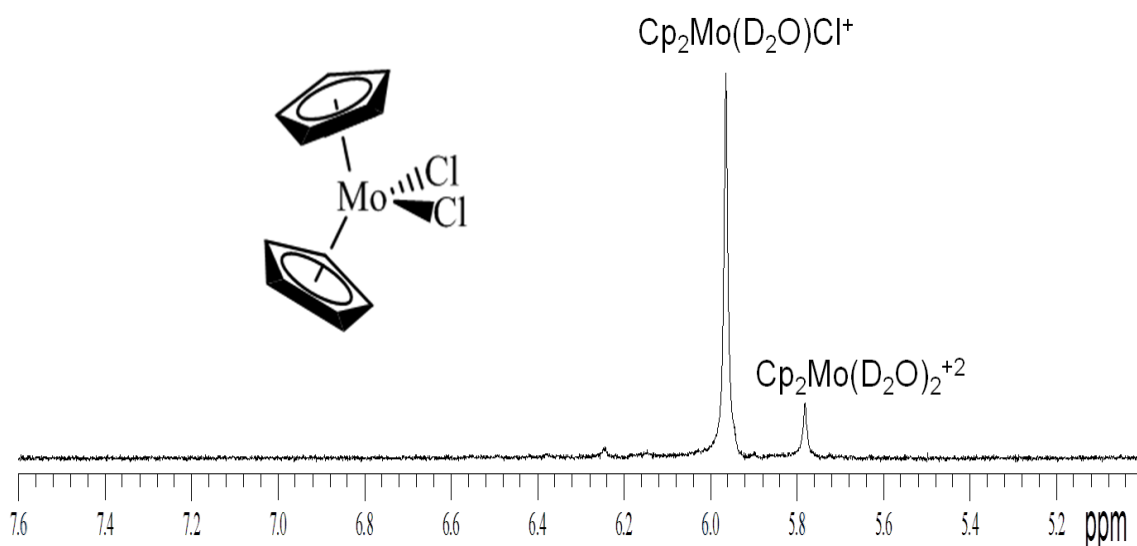


Figura 12. Espectro de protón ^1H -NMR, del compuesto de partida Cp_2MoCl_2 en D_2O .

El espectro del complejo muestra la señal correspondiente a los protones de los anillos de ciclopentadienilo (Cp) con dos singletes en la región de $\delta=5.65$ ppm y $\delta=5.70$ ppm sufriendo un ligero desplazamiento de la señal, mientras que en el complejo de partida el dicloruro de molibdenoceno (Figura 12), estos singletes muestran señal de resonancia en $\delta=5.78$ ppm y $\delta=5.96$ ppm, que corresponden a la formación de los iones acuahidroxo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D}_2\text{O})\text{Cl}^+$ y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D}_2\text{O})_2^{+2}$ (21). Las señales de los protones de los grupos hidroxilo en el espectro no se observan por el intercambio que sufren con el deuterio, debido al disolvente D_2O .

El espectro de protón ^1H -RMN del ligando 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico y del nuevo complejo sintetizado en dimetil sulfóxido deuterado, DMSO-d_6 (Figura 14), muestra sus señales de resonancia características donde se puede apreciar que las señales de los protones H_A , $\delta=11.15$ ppm y H_B , $\delta=8.43$ ppm presentes en el espectro del ligando, no se muestran en el espectro del complejo, lo que sugiere que el centro metálico del molibdenoceno se une al ligando por esta parte de la molécula del L-ácido ascórbico.

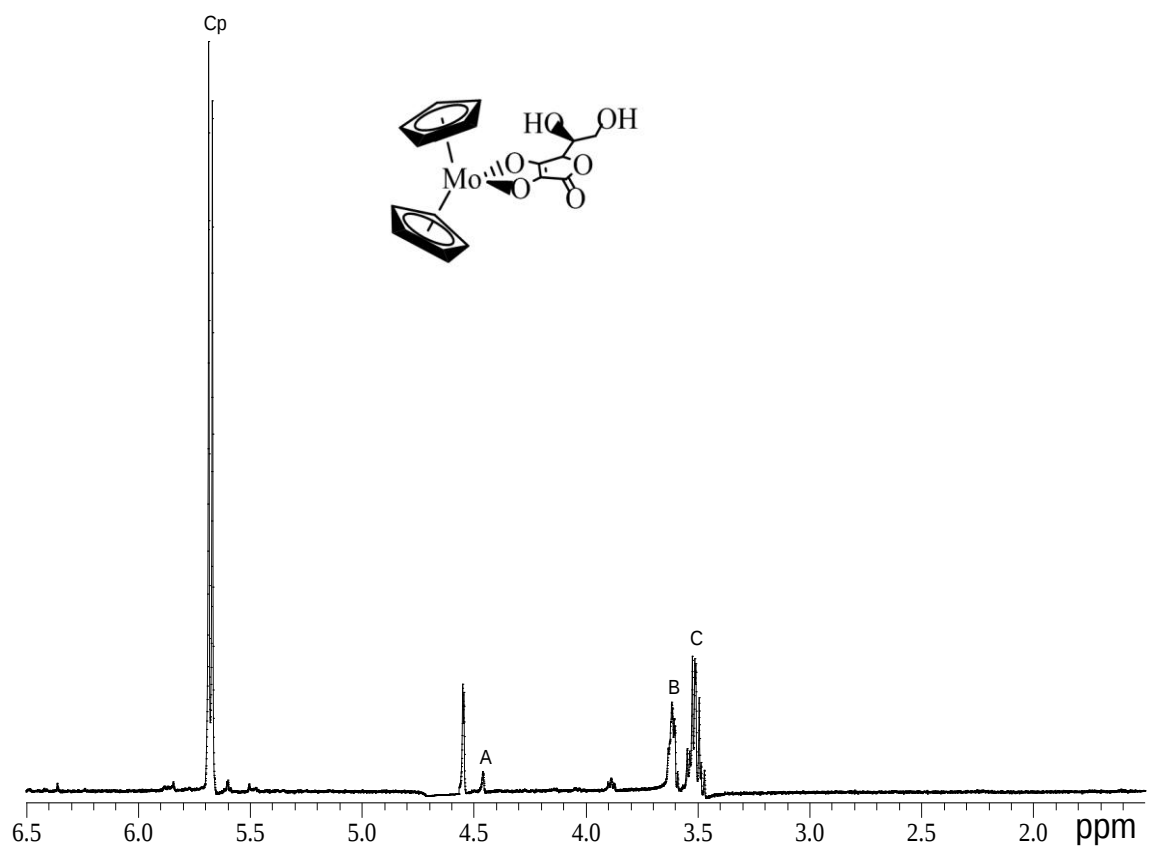
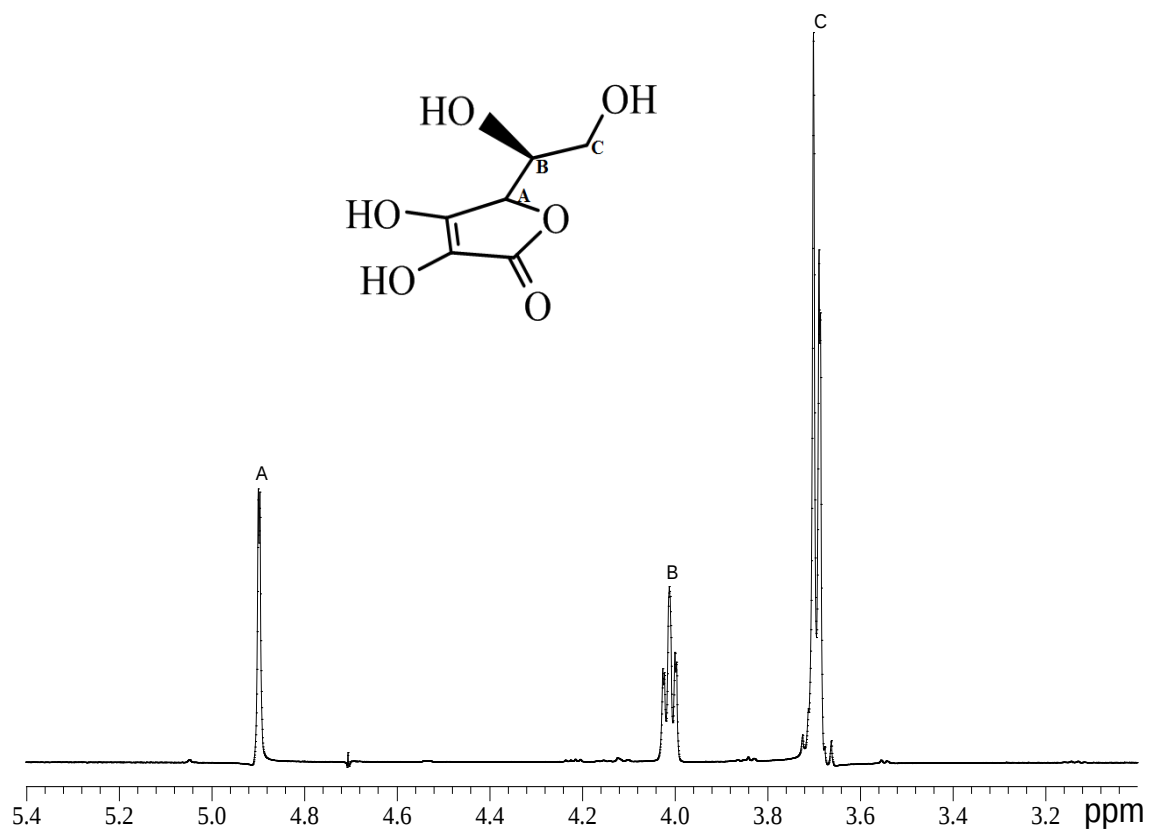


Figura 13. Espectro de protón ¹H-NMR del ligando L-ácido ascórbico (superior) y del complejo sintetizado Cp₂Mo(C₆H₆O₆) (inferior), en D₂O.

Las otras señales de los protones sufren un ligero desplazamiento hacia campos altos, así como los picos correspondientes a los protones de los anillos de los ciclopentadienilos, Cp, que comparados con el Cp_2MoCl_2 , se desplazan hacia campos altos Cp(I) $\delta=5.70$ ppm $\delta=5.68$ ppm (Tabla 3).

Compuesto	Protón	Desplazamiento (δ =ppm)	Integral	Multiplicidad
Ligando L-ácido ascórbico	H _A	4.90	1	Doblete
	H _B	4.01	1	Triplete
	H _C	3.70	2	Doblete
Cp₂Mo(L-ácido ascórbico)	H _A	4.45	1	Doblete
	H _B	3.63	1	Triplete
	H _C	3.50	2	Doblete
	Cp(I)	5.70	5	Singlete
	Cp(II)	5.65	5	Singlete

Tabla 2. Señales de resonancia magnética de protón ^1H -NMR, del ligando y complejo del L-ácido ascórbico en D_2O .

La Figura 15, muestra el espectro de protón, ^1H -NMR del ligando Etil maltol y del complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ en agua deuterada D_2O . Comparando los espectros se observan las señales de los diferentes picos tanto en el ligando como en el complejo, la señal de los protones H_A y H_B del ligando en el complejo se desplazan hacia campos altos y la señal de los protones H_C y H_D del ligando se desplazan hacia campos bajos. La señal de resonancia del grupo hidroxilo no se observa en ninguno de los espectros debido a que se intercambia con el deuterio del disolvente D_2O . Los protones de los anillos del ciclopentadienilo, Cp muestran una sola señal, un singlete con un $\delta=5.73$ ppm, indicando que los protones de los anillos son magnéticamente equivalentes.

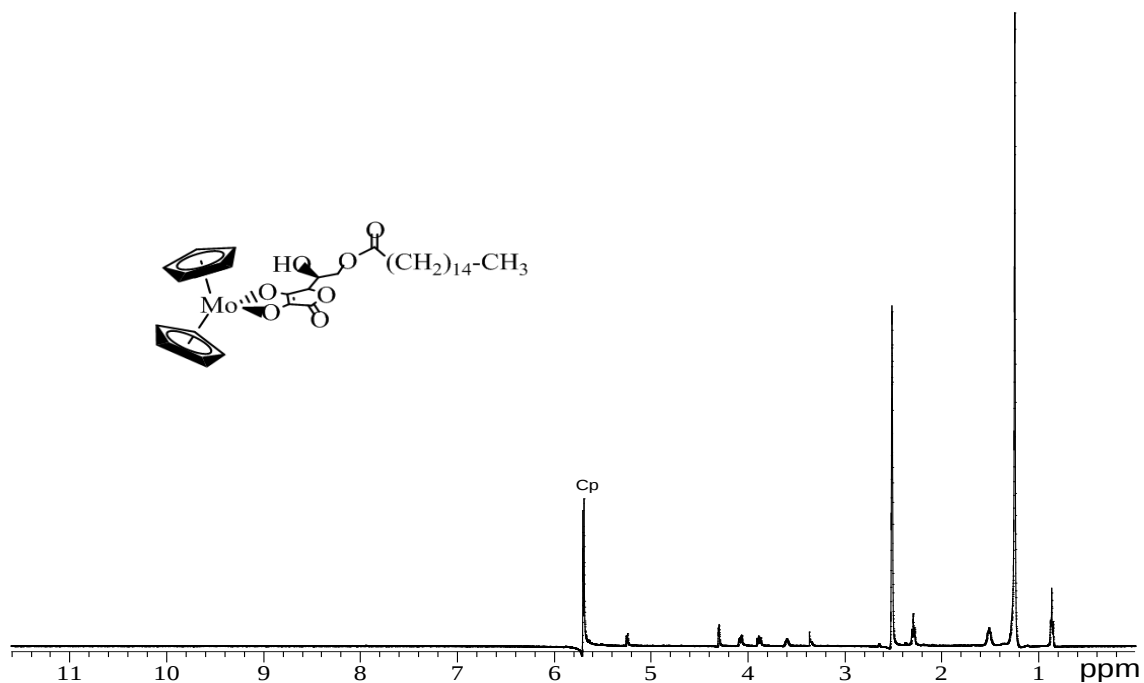
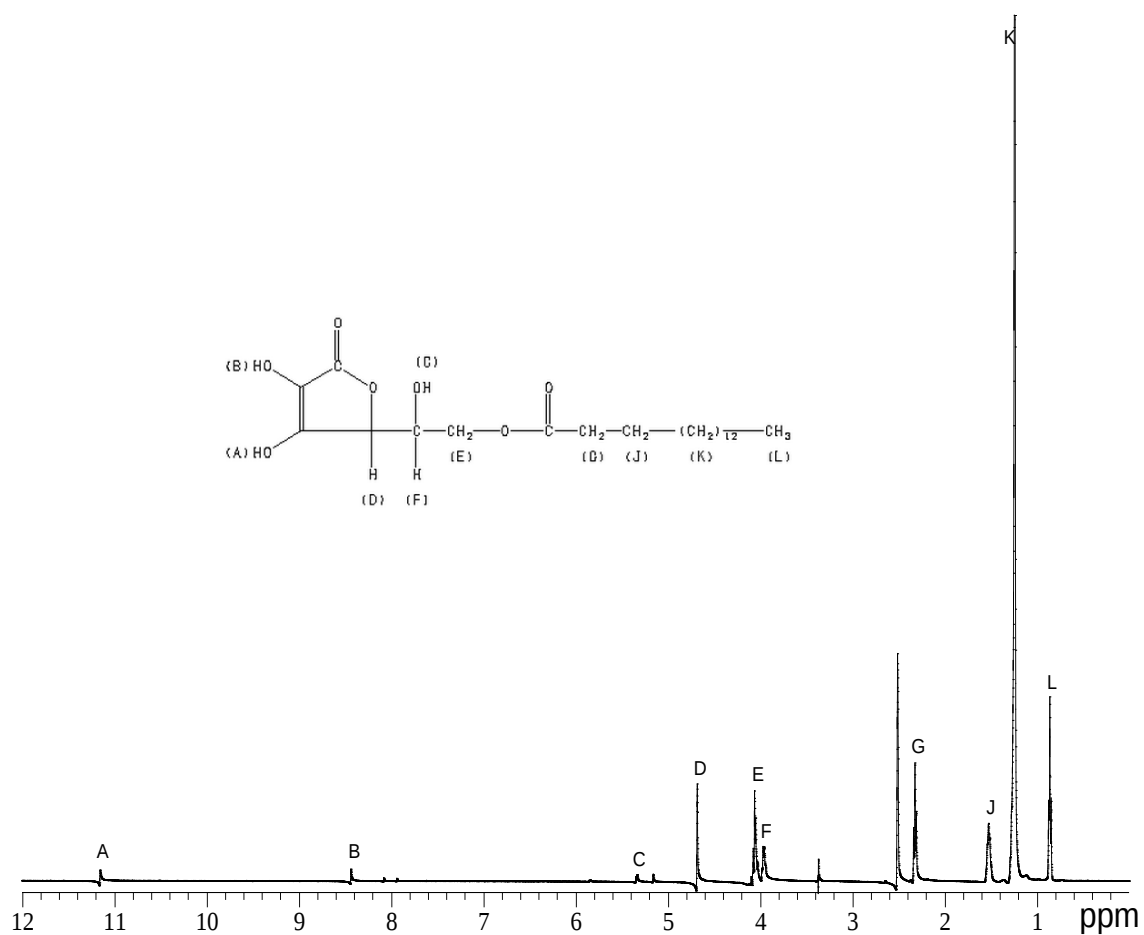


Figura 14. Espectro de protón ¹H-NMR del ligando 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico, (superior) y del complejo sintetizado $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_7)$, (inferior) en DMSO-d_6 .

Compuesto	Protón	Desplazamiento (δ ppm)	Integral	Multiplicidad
Ligando 6-o-palmitoil-L-AA	H _A	11.15	1	Singlete
	H _B	8.43	1	Singlete
	H _C	5.33	1	Doblete
	H _D	4.68	1	Singlete
	H _E	4.05	2	Triplete
	H _F	3.95	1	Cuartete
	H _G	2.32	2	Triplete
	H _J	1.52	2	Multiplete
	H _K	1.24	2	Multiplete
	H _L	0.86	3	Triplete
Cp ₂ Mo(PAA)	H _A	X	1	Singlete
	H _B	X	1	Singlete
	H _C	5.25	1	Doblete
	H _D	4.30	1	Singlete
	H _E	4.07	2	Triplete
	H _F	3.86	1	Cuartete
	H _G	2.27	2	Triplete
	H _J	1.51	2	Multiplete
	H _K	1.24	2	Multiplete
	H _L	0.86	3	Triplete
	Cp(I)	5.70	5	Singlete
	Cp(II)	5.68	5	Singlete

Tabla 3. Señales de resonancia magnética de protón ¹H-NMR, del ligando y complejo del 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico en DMSO-d₆.

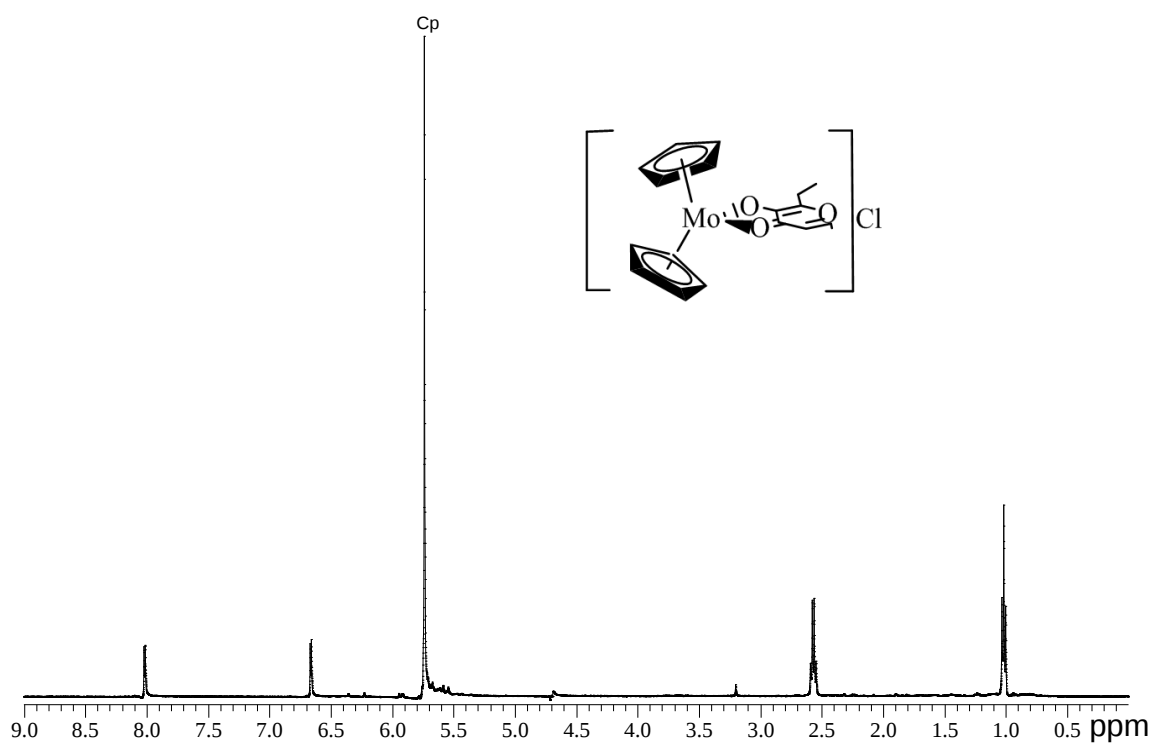
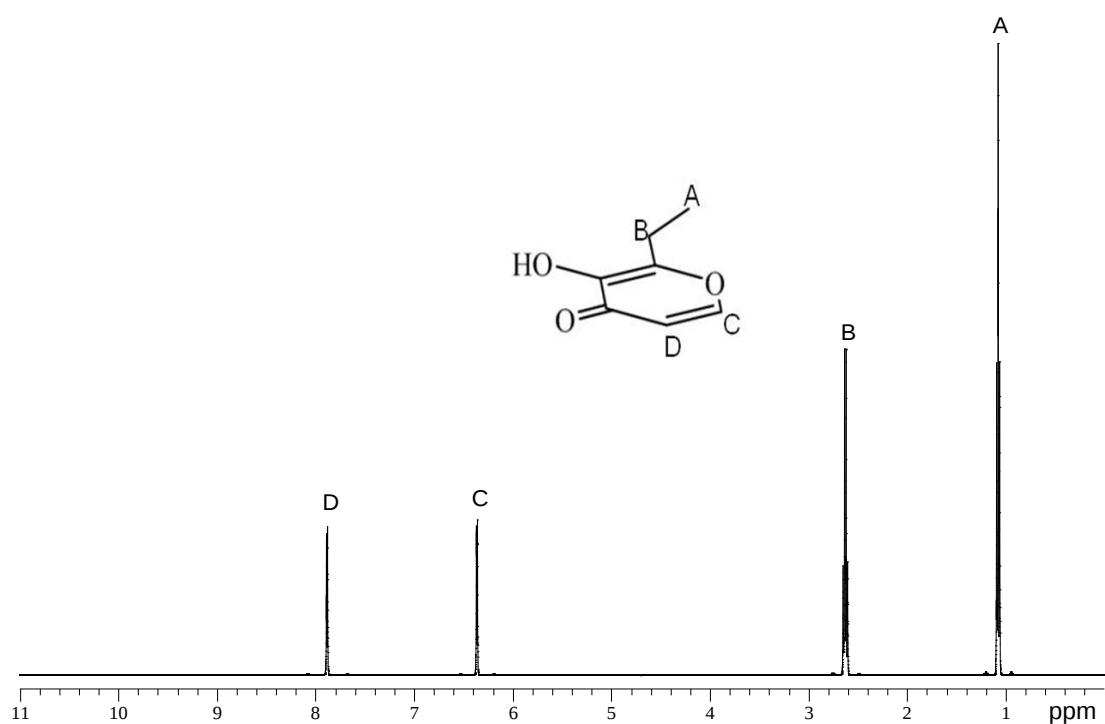


Figura 15. Espectro de protón ^1H -NMR del ligando Etil maltol, (superior) y del complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3)]\text{Cl}$, (inferior) en D_2O .

Compuesto	Protón	Desplazamiento (δ =ppm)	Integral	Multiplicidad
Ligando Etil maltol	H _A	1.08	3	Triplete (CH ₃)
	H _B	2.64	2	Cuartete (CH ₂)
	H _C	6.37	1	Doblete
	H _D	7.88	1	Doblete
[Cp₂Mo(Etil maltol)]Cl	H _A	1.01	3	Triplete (CH ₃)
	H _B	2.56	2	Cuartete (CH ₂)
	H _C	6.67	1	Doblete
	H _D	8.01	1	Doblete
	Cp	5.73	10	Singlete

Tabla 4. Señales de resonancia magnética de protón ¹H-NMR, del ligando y complejo del Etil maltol en D₂O.

El espectro de protón ¹H-NMR (Figura 16), del ligando D-penicilamina y su complejo muestra tres señales de resonancia para el ligando las cuales están presentes en el espectro del complejo, la señal de H_A que se desplaza hacia campos bajos y las señales de los protones H_B y H_C hacia campos altos (Tabla 5); los protones de los anillos de ciclopentadienilio Cp, muestran dos singletes a $\delta=5.61$ ppm y $\delta=5.60$ ppm, lo que indica que los anillos en la molécula del complejo están de forma asimétrica, no siendo sus protones equivalentes. El centro metálico del CpMo⁺² se une al ligando formando un quelato (S), (O), debido a la afinidad del molibdeno por el azufre.

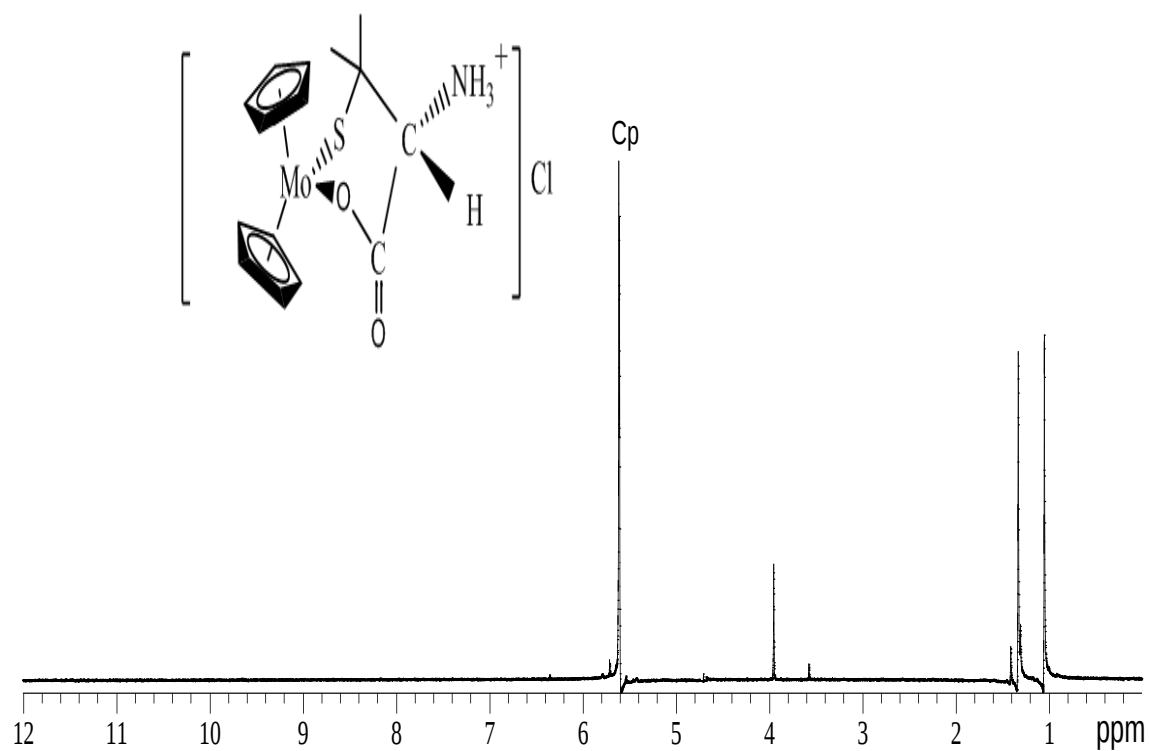
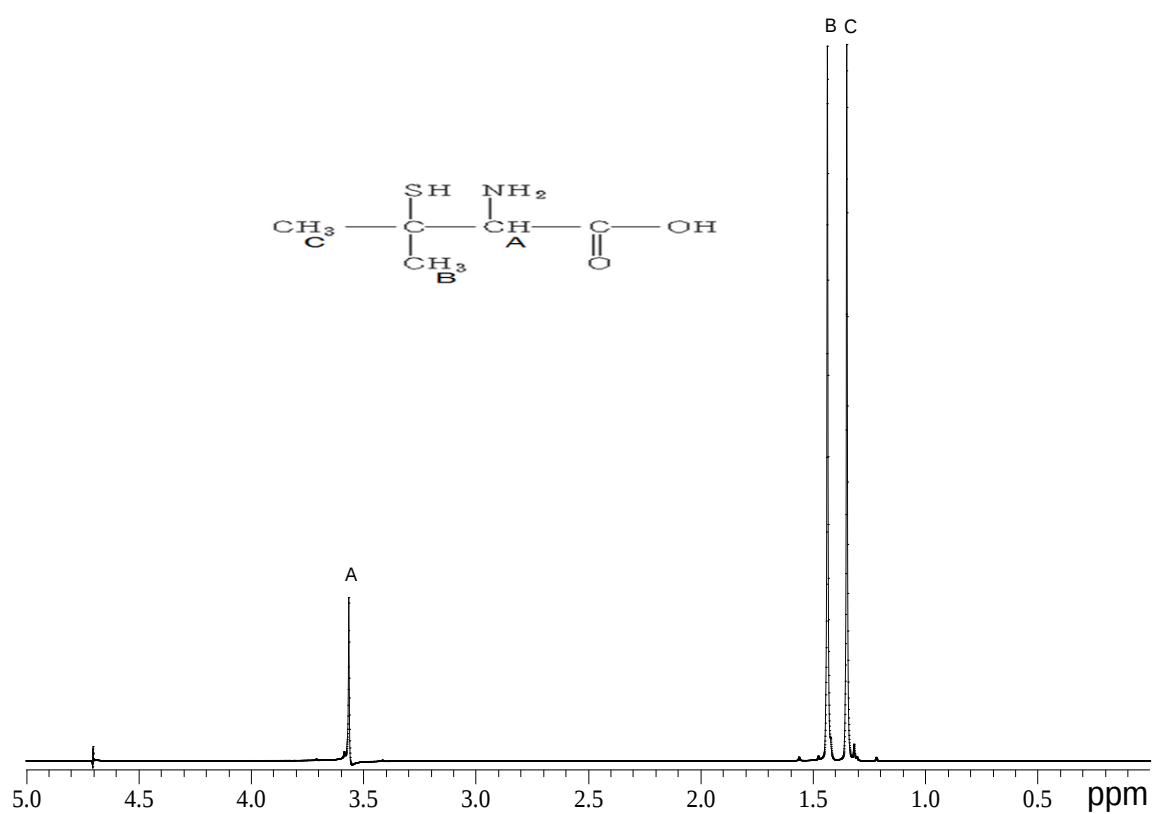


Figura 16. Espectro de protón $^1\text{H-NMR}$ del ligando D-penicilamina, (superior) y del complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S})]\text{Cl}$, (inferior) en D_2O .

Compuesto	Protón	Desplazamiento (δ =ppm)	Integral	Multiplicidad
Ligando D-penicilamina	H _A	3.57	1	Doblete
	H _B	1.44	1	Triplete
	H _C	1.35	2	Doblete
Cp₂Mo(D-penicilamina)	H _A	3.95	1	Doblete
	H _B	1.33	1	Triplete
	H _C	1.05	2	Doblete
	Cp(I)	5.61	5	Singlete
	Cp(II)	5.60	5	Singlete

Tabla 5. Señales de resonancia magnética de protón ¹H-NMR, del ligando y complejo de D-penicilamina en D₂O.

2.4.5 Caracterización de los complejos por Dicroísmo circular

Los nuevos complejos sintetizados se analizaron por CD, en donde sólo Cp₂Mo(PAA), y [Cp₂Mo(D-penicilamina)]Cl mostraron bandas en sus espectros (Figura 17), ya que estos complejos presentan actividad óptica, rotan la luz polarizada, debido a la presencia de centros quirales dentro de su estructura molecular. El Cp₂Mo(PAA), muestra una gran banda de absorción con un máximo en 280.6 nm y el [Cp₂Mo(D-penicilamina)]Cl, muestra dos mínimos uno en 230 nm y otro en 284.7 nm, y dos máximos uno en 258.5 nm y otro en 320.8 nm, de menor intensidad.

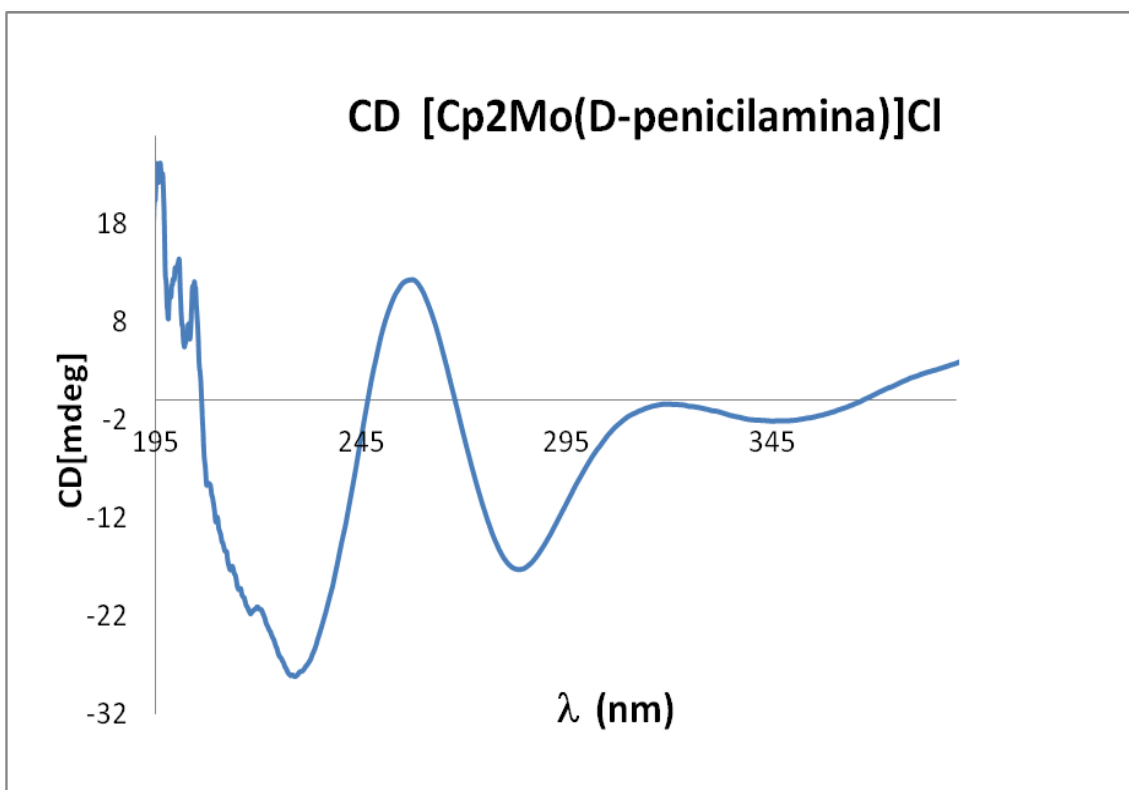
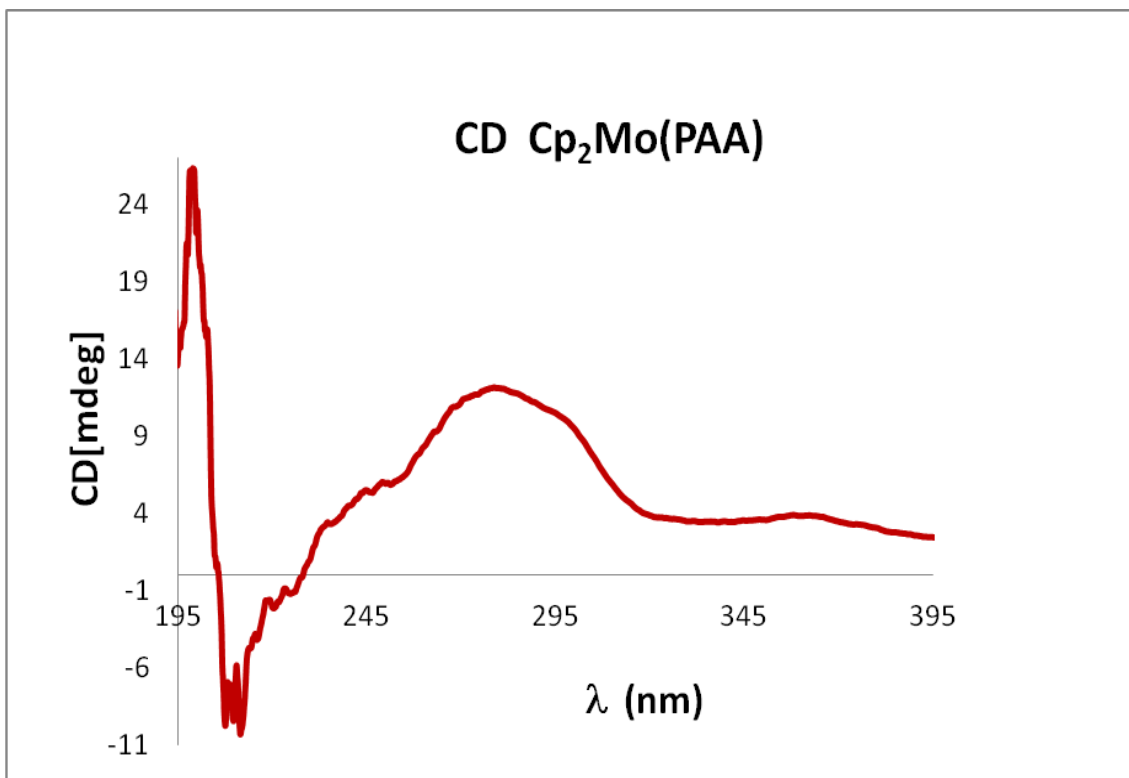


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular (CD), de nuevos complejos $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ (superior) y $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$ (inferior).

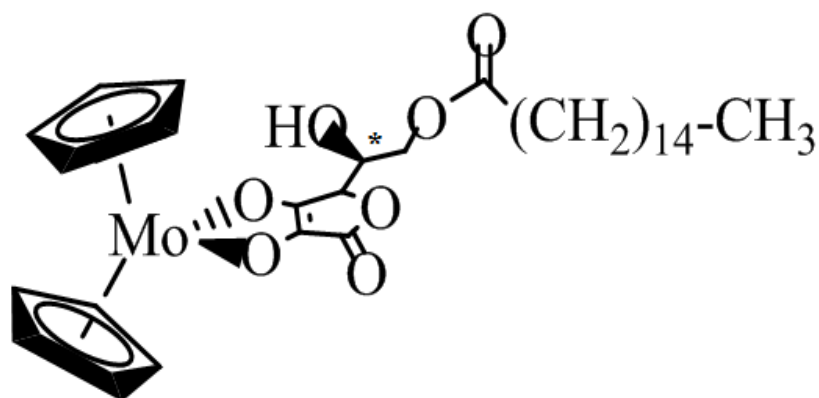


Figura 18. Estructura del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, que presenta actividad óptica debido a que posee un centro quiral (*).

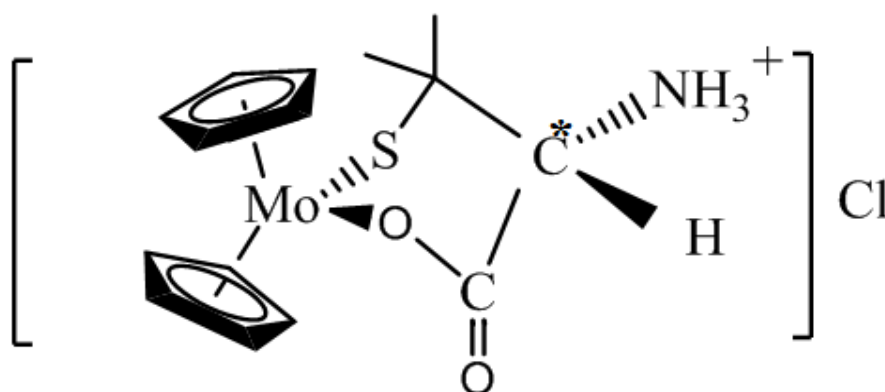


Figura 19. Estructura del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$, que presenta actividad óptica debido a que posee un centro quiral (*).

2.4.6 Caracterización de los complejos por espectroscopía UV-VIS

Las Figuras 20 y 21, muestran los espectros electrónicos tomados al dicloruro de molibdenoceno, a los diferentes ligandos y a los nuevos complejos. Se observa para el espectro del Cp_2MoCl_2 una banda de absorción a una longitud de onda $\lambda = 378 \text{ nm}$,

debida a las transiciones d-d del metalloceno ($\epsilon = 96 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En los espectros de los complejos $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ se observa que estas transiciones se desplazan hacia el azul del espectro electromagnético a unas longitudes de onda de $\lambda = 338 \text{ nm}$, 353 nm , y 369 nm respectivamente. En el espectro del $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ se observa esta transición con un ligero desplazamiento hacia el rojo en $\lambda = 392 \text{ nm}$; estos desplazamientos indican que el ambiente del centro metálico del metalloceno ha cambiado debido a la coordinación con los ligandos, lo que evidencia la formación de los nuevos complejos.

En los espectros de los complejos se observan también las bandas correspondientes a las transiciones $\pi-\pi^*$ que corresponden a los anillos de ciclopentadienilo (Cp), en el rango de $\lambda = 208\text{-}215 \text{ nm}$.

El ligando etil maltol muestra una banda de absorción intensa en $\lambda = 275 \text{ nm}$, que se desplaza hacia el azul, en el complejo formado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ a una $\lambda = 230 \text{ nm}$; el ligando 6-o-palmitoil-L-AA muestra una banda de absorción en $\lambda = 382 \text{ nm}$, que no se aprecia con facilidad en el complejo.

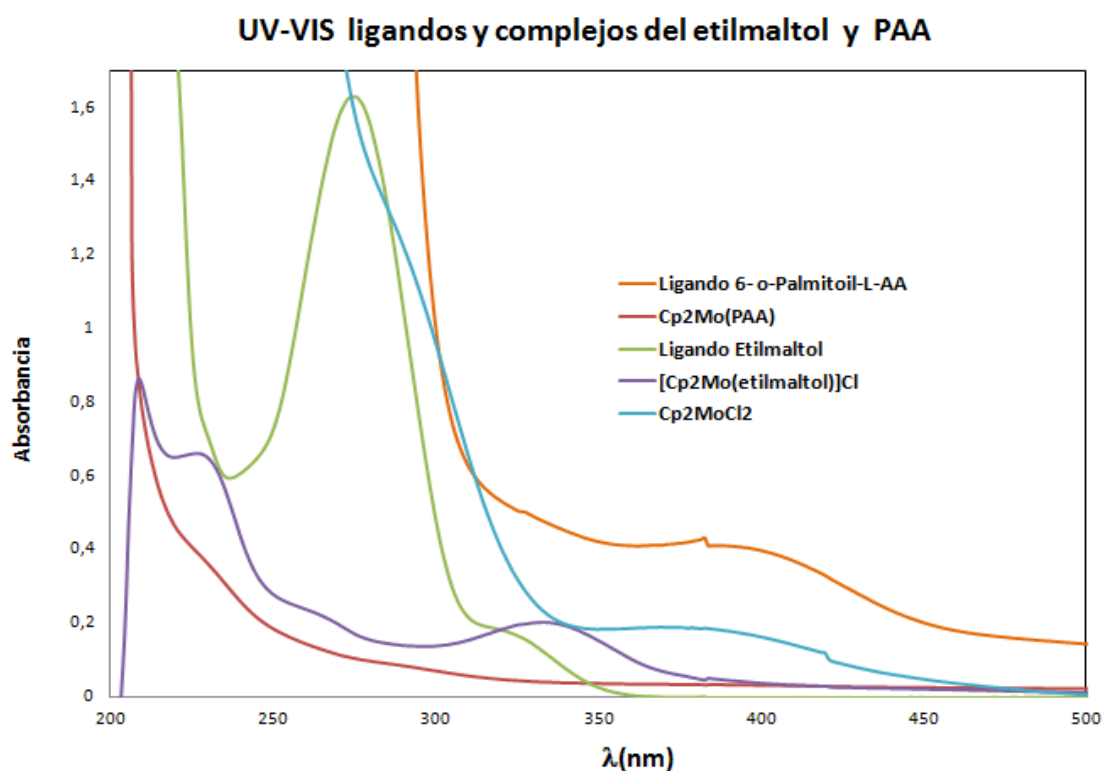


Figura 20. Espectros electrónicos UV-Vis de ligandos etil maltol, 6-o-palmitoil, nuevos complejos sintetizados y Cp_2MoCl_2 , en buffer Tris-HCl a pH=7.4.

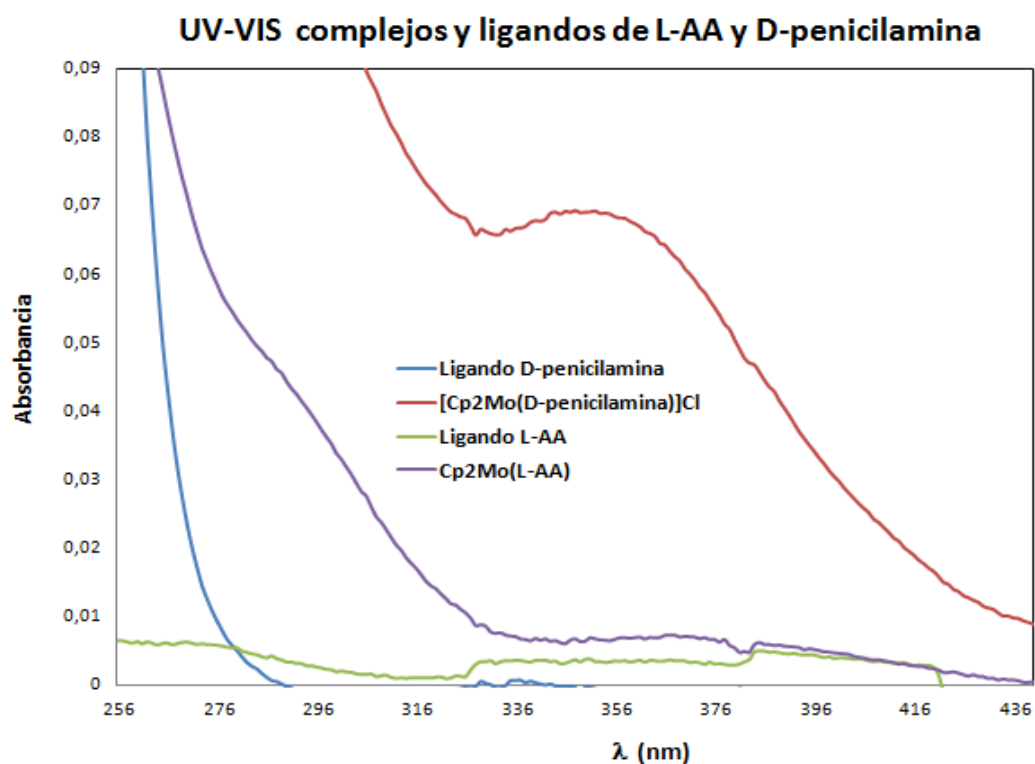


Figura 21. Espectros electrónicos UV-Vis de ligandos L-AA, D-penicilamina, y sus complejos sintetizados, en buffer Tris-HCl a pH=7.4.

2.4.7 Caracterización de los nuevos complejos por Voltametría Cíclica (CV)

Se estudió el comportamiento redox de los nuevos complejos sintetizados en acetonitrilo CH_3CN , usando como electrolito de soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio ($[\text{NBu}_4]\text{PF}_6$) 0.1 M.

Todos los complejos sintetizados presentan un comportamiento reversible, pudiéndose apreciar en los complejos de Cp_2MoCl_2 , $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, un pico de reducción $E_{pc} = 527 \text{ mV}$, 960 mV y 841 mV , y de oxidación, con un potencial de pico anódico $E_{pa} = 602 \text{ mV}$, 1035 mV y 887 mV respectivamente. $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ tiene un hombro a $E_{pa} = 900 \text{ mV}$ que pudiese atribuirse a dos fenómenos: la oxidación de etilmaltol ó la oxidación de $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})(\text{CH}_3\text{CN})]^{+/++}$.

Para los complejos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})$, y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$, se observa un pico de reducción con un potencial de pico catódico E_{pc} de 710 mV y 447 mV y dos picos de oxidación $E_{pa} = 777 \text{ mV}$ - 1255 mV , y $E_{pa} = 490 \text{ mV}$ - 906 mV respectivamente; estos picos de oxidación son debidos a la formación de las especies electrodeficientes Mo(V) ($\text{Cp}_2\text{MoL}^{0/1+}$) y posiblemente $[(\text{Cp}_2\text{MoL}(\text{CH}_3\text{CN}))]^{0/1+}$ ó Mo(VI) que ha mostrado tener propiedades antitumorales (43).

Los picos de oxidación en todos los nuevos complejos tienden hacia potenciales más positivos en comparación con el complejo de partida, lo que indica que son mucho más estables en solventes orgánicos. En cuanto a los ligandos en este medio, mostraron un comportamiento irreversible, donde solo se observan los picos de oxidación, a potenciales más positivos, excepto para el ligando D-penicilamina, que no presenta comportamiento redox en este solvente orgánico (Apéndice 1).

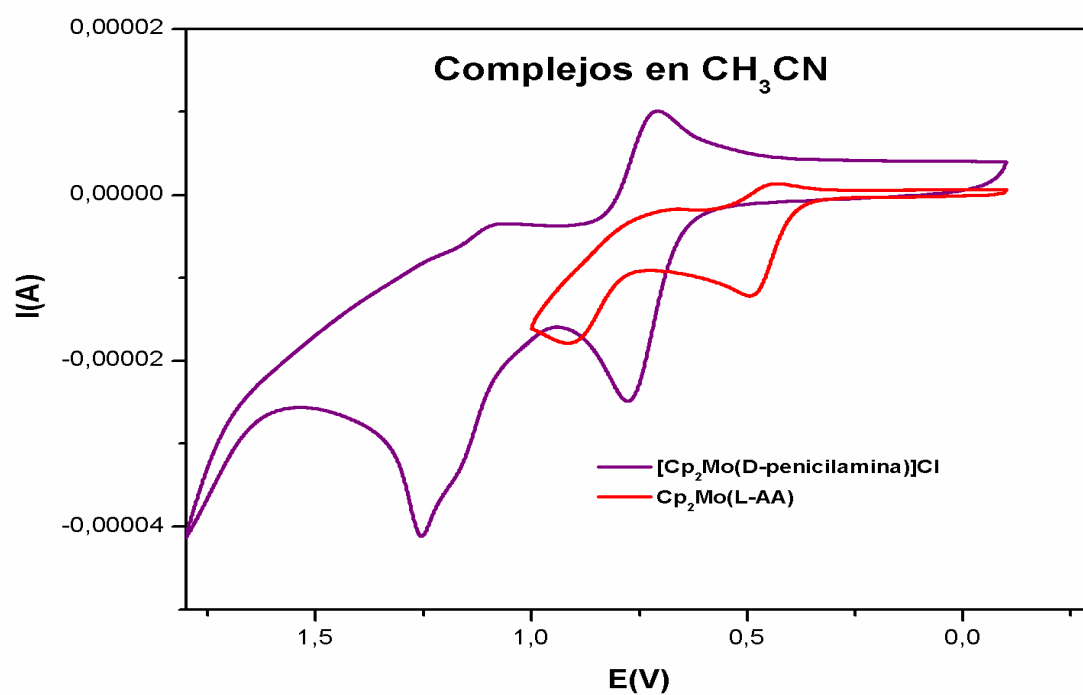
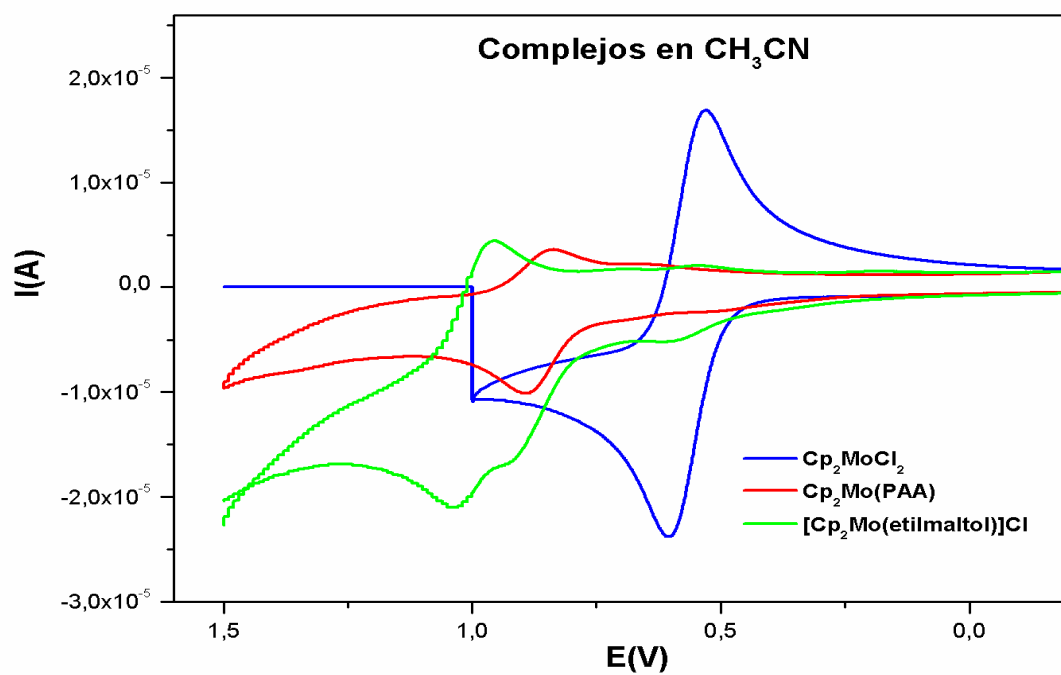


Figura 22. Voltamogramas cíclicos de los complejos dicloruro de molibdenoceno, etil maltol y PAA (superior), y L-ácido ascórbico, D-penicilamina (inferior) en CH₃CN con ([NBu₄]PF₆) 0.1 M como electrolito de soporte.

Se caracterizaron los complejos en buffer Tris-HCl a pH=7.4, a condiciones fisiológicas, para conocer su importancia ya que muchos procesos biológicos que involucran la oxidación dan como resultado el daño de moléculas biológicas (41). Se encontró que todos presentan un comportamiento irreversible en medio acuoso (Figuras 23 y 24), presentando un pico de oxidación, uno hacia potenciales más positivos respecto al complejo Cp_2MoCl_2 , como lo fue el $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, con un potencial de pico anódico E_{pa} de 825 mV, lo que lo hace más estable en medio acuoso que el compuesto de partida, y hacia menores potenciales como $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, con $E_{pa} = 688$ mV, y $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, con $E_{pa} = 601$ mV. El complejo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$, presenta igual potencial de oxidación que el dicloruro de molibdenoceno $E_{pa} = 705$ mV, el pico de oxidación en el Cp_2MoCl_2 es debido a la formación de especies Mo(V) electrodeficientes y reactivas, o a la formación de un complejo estable metal-oxo que evita la reducción de la misma (25).

En cuanto a los ligandos (excepto el de 6-o-palmitoil-L-AA, que no presenta señal), muestran un pico de oxidación menos positivo que sus respectivos complejos y que el molibdenoceno.

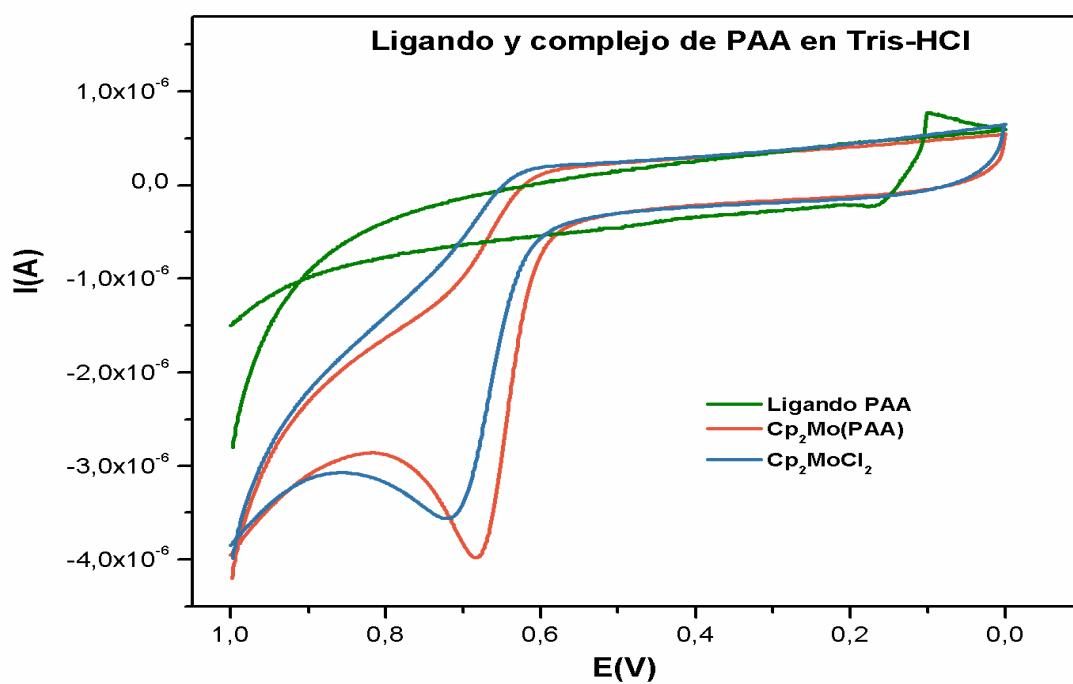
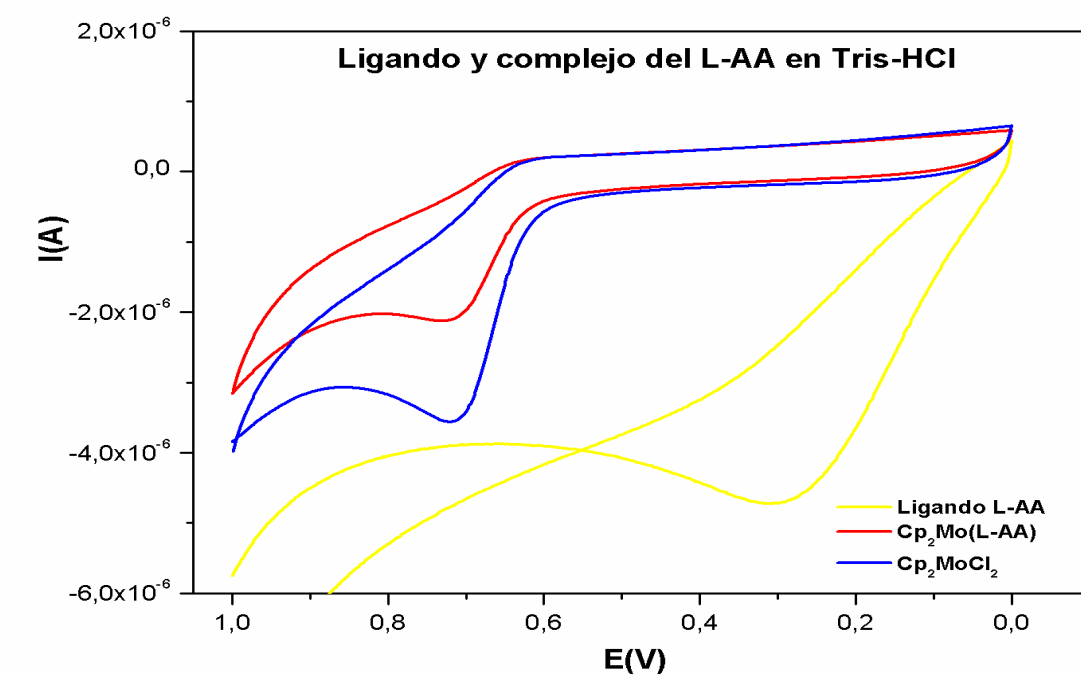


Figura 23. Voltamogramas cíclicos de los ligandos L-AA, (superior), 6-o-palmitoil-L-AA (PAA) (inferior) y su complejos sintetizados en buffer Tris-HCl a pH=7.4, comparados con el compuesto de partida Cp_2MoCl_2

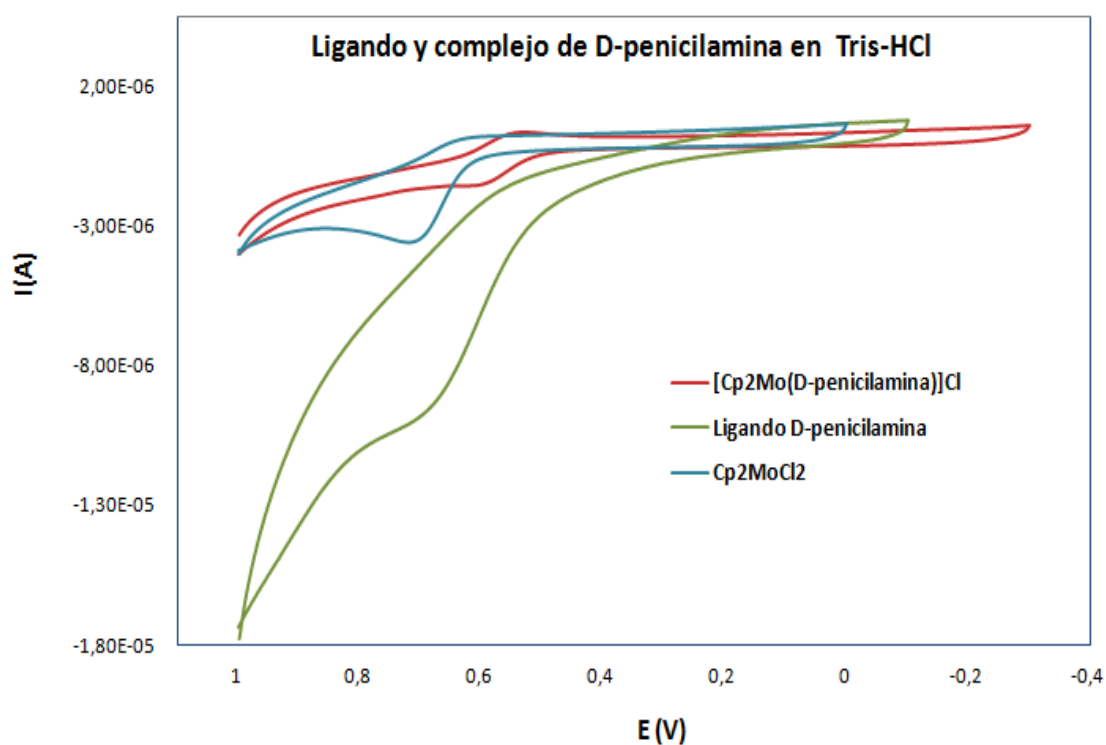
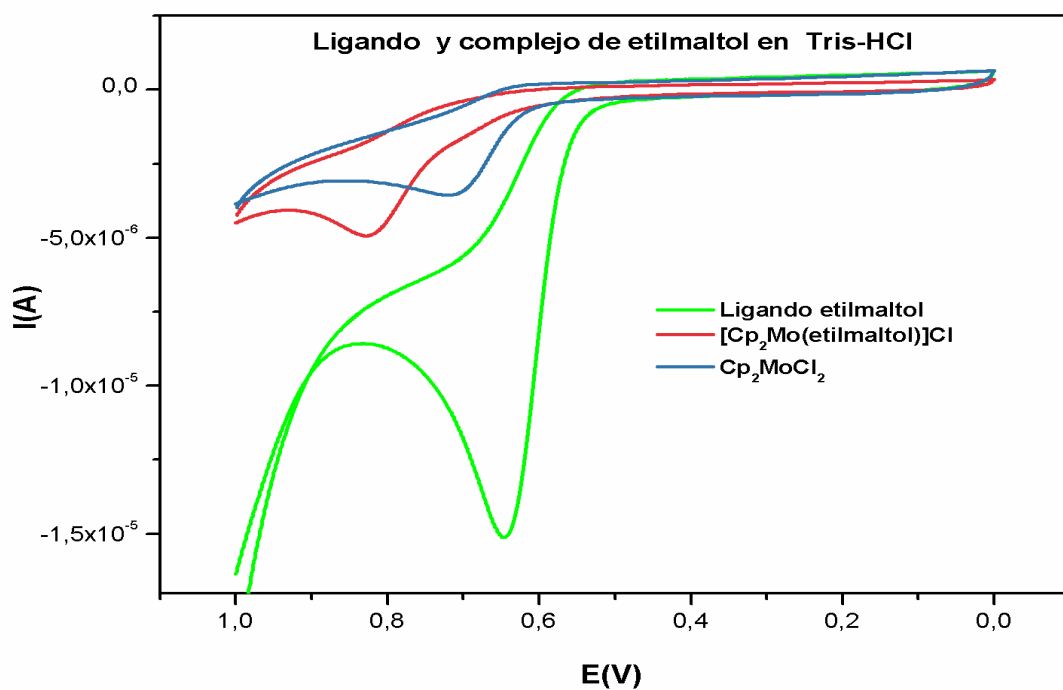


Figura 24. Voltamogramas cíclicos de los ligandos etil maltol (superior), D-penicilamina (inferior) y sus complejos sintetizados en buffer Tris-HCl a $\text{pH}=7,4$, comparados con el Cp_2MoCl_2 .

2.4.8 Caracterización de los complejos por Fluorescencia

Se caracterizaron los complejos por espectroscopia de fluorescencia, encontrándose que nuestros complejos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ fluorescen pues emiten radiación electromagnética de gran intensidad al ser excitados en una longitud de onda de 280 nm, comparada con el compuesto de partida el Cp_2MoCl_2 (banda de emisión 307 nm, Intensidad = 15998) , mostrando bandas de emisión muy intensas en 448.4nm (intensidad = 204308), y en 440.2 nm (intensidad = 61279) respectivamente. Por lo tanto, se pueden considerar como fluoróforos, característica muy apreciable ya que podrían ser usados en aplicaciones biológicas. Los complejos $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, y el $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, presentan un espectro de emisión de fluorescencia muy similar al dicloruro de molibdenoceno, con bandas más débiles en comparación con los otros complejos mencionados. Los ligandos etil maltol y D-penicilamina presentan bandas de emisión de casi la misma intensidad que sus complejos; los ligandos L-ácido ascórbico y PAA muestran bandas de emisión de intensidades despreciables comparadas con sus respectivos complejos.

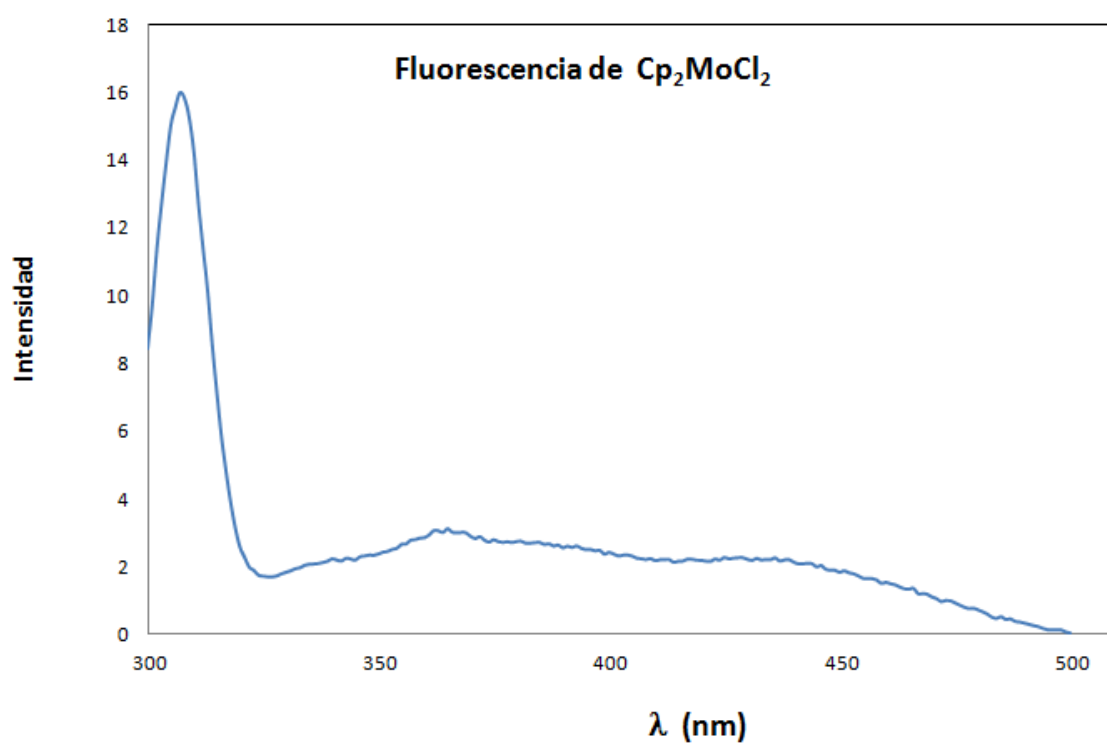


Figura 25. Espectros de emisión de la fluorescencia del Cp_2MoCl_2 , excitado a 280 nm.

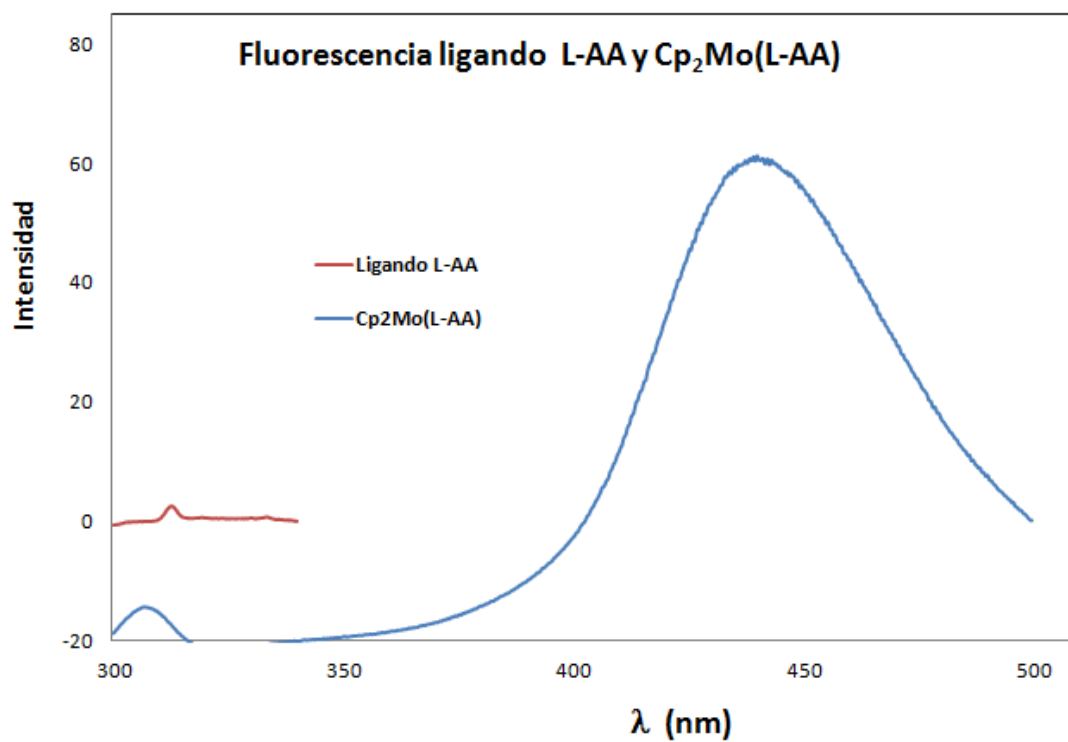


Figura 26. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando L-ácido ascórbico y su complejo excitados a 280 nm.

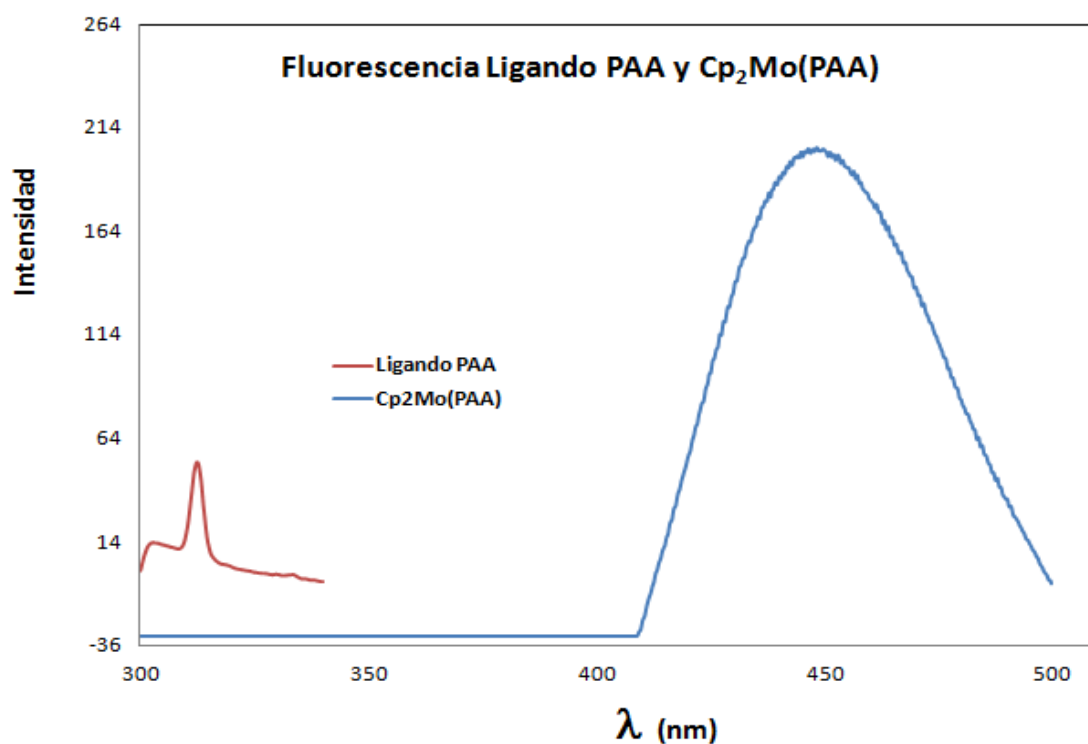


Figura 27. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando 6-o-palmitoil y su complejo, excitados a 280 nm.

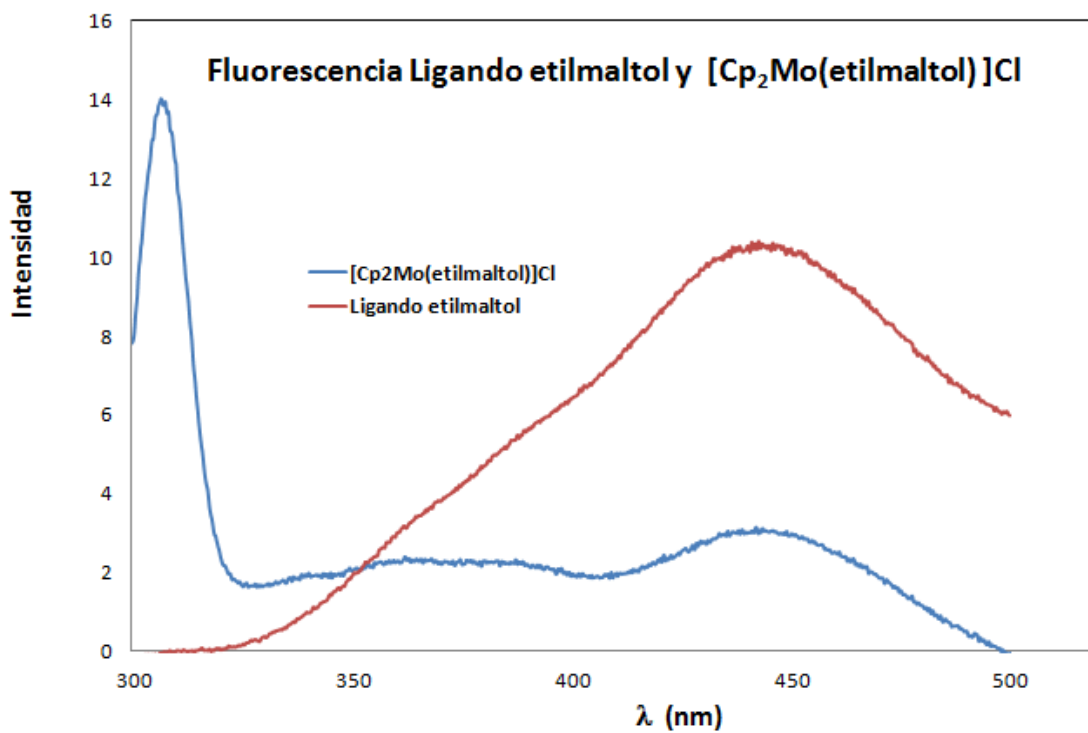


Figura 28. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando etil maltol y su complejo, excitados a 280 nm.

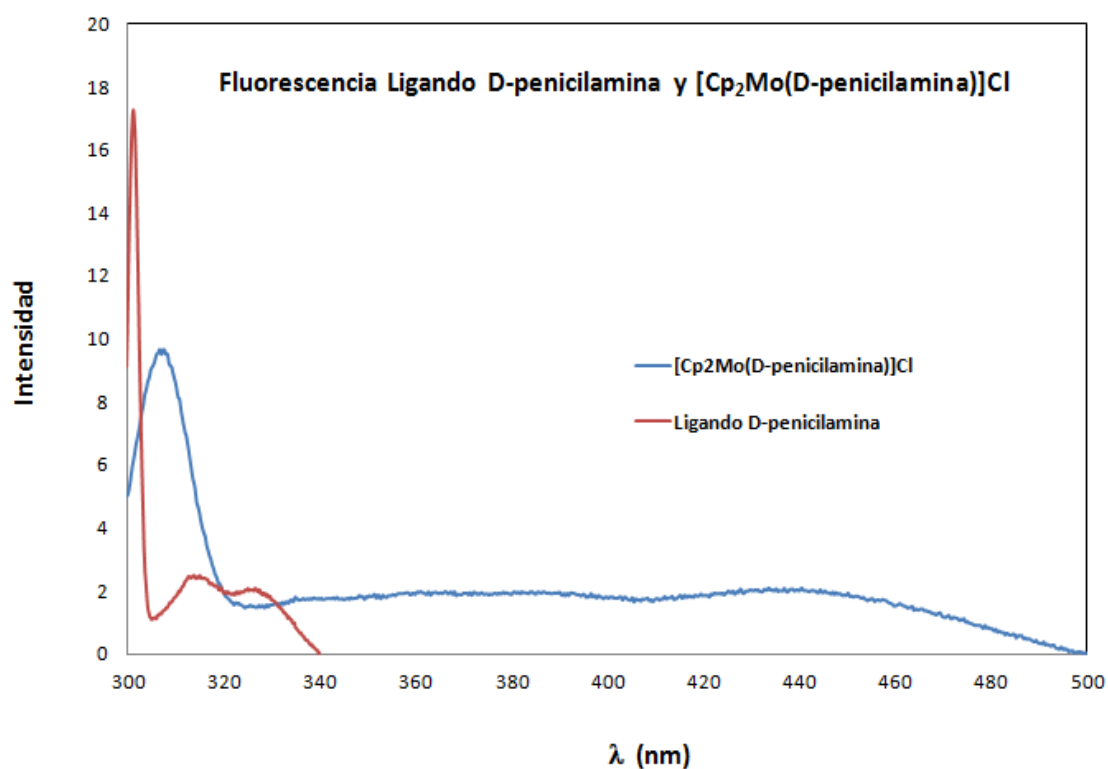


Figura 29. Espectros de emisión de la fluorescencia del ligando D-penicilamina y su complejo, excitados a 280 nm.

3. Estudios de interacción del dicloruro de molibdenoceno y sus nuevos derivados con la proteína Ubiquitina

3.1 Estudios de interacción por espectroscopía Ultravioleta –visible

3.1.1 Preparación de soluciones de dicloruro de molibdenoceno, nuevos complejos de molibdenoceno y la solución de Ubiquitina

Se pesaron cantidades apropiadas de molibdenoceno y de los nuevos complejos y se disolvieron en 10.0 mL de buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), para obtener concentraciones finales de 4.0×10^{-5} M de los complejos; la solución del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ se sonicó por 20 minutos para lograr su completa disolución.

La solución de ubiquitina se preparó según el procedimiento descrito anteriormente en buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), para obtener concentraciones finales de 2.5×10^{-5} M.

3.2 Estudios electroquímicos de interacción por Voltametría Cíclica

Se pesaron cantidades apropiadas de molibdenoceno y de los nuevos complejos y se disolvieron en 10.0 mL de buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), para obtener concentraciones finales de 1.0×10^{-4} M de los complejos; la solución del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ se sonicó por 20 minutos para lograr su completa disolución.

La solución de ubiquitina se preparó según el procedimiento descrito anteriormente.

3.2.1 Preparación de la superficie de los electrodos y parámetros instrumentales

La superficie del electrodo de trabajo utilizado de carbón de vidrio, se limpio según lo descrito en la sección 4.5, así como también los parámetros instrumentales.

3.3 Estudios de interacción por espectroscopía de Fluorescencia

Se pesaron cantidades apropiadas de molibdenoceno y de los nuevos complejos y se disolvieron en 10.0 mL de buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), para obtener concentraciones finales del orden de 10^{-4} M de los complejos; la solución del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ se sonicó por 20 minutos para lograr su completa disolución.

La solución de ubiquitina se preparó según el procedimiento descrito anteriormente.

3.4 Estudios de interacción por Dicroísmo Circular

La solución de ubiquitina se preparó según el procedimiento descrito anteriormente, pero en buffer 10 mM fosfato/20 mM NaCl (pH=7.4), para obtener una concentración final de 1.0×10^{-6} M.

Se pesaron cantidades apropiadas de molibdenoceno y de los nuevos complejos y se disolvieron en 10.0 mL de amortiguador 10 mM fosfato/ 20 mM NaCl. (pH=7.4), para obtener concentraciones finales del orden de 10^{-4} M de los complejos; la solución del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ se sonicó por 20 minutos para lograr su completa disolución.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Estudios de interacción por espectroscopía Ultravioleta –visible

UV-VIS es una técnica utilizada para monitorear posibles interacciones débiles entre la proteína ubiquitina - molibdenoceno y los nuevos complejos sintetizados.

La ubiquitina absorbe en esta región del espectro electromagnético ya que presenta el residuo aromático tirosina (Tyr) en su estructura, con una banda a una longitud de onda de 278 nm.

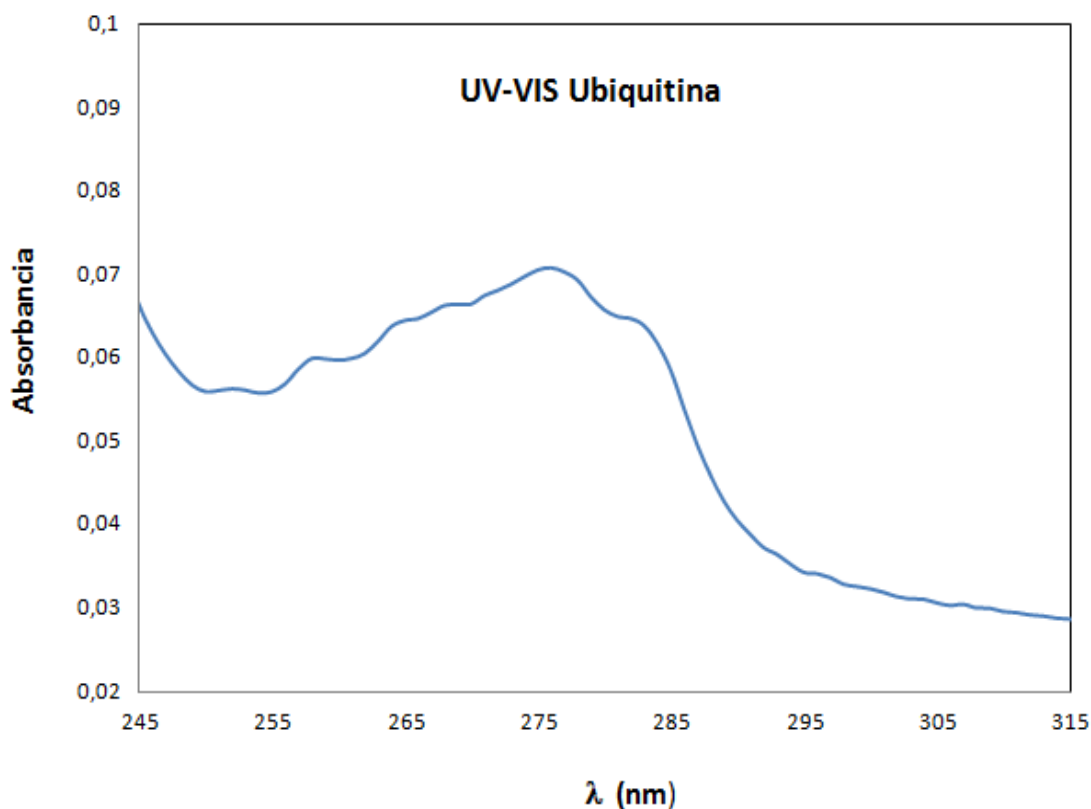


Figura 30. Espectro electrónico UV-VIS de la proteína ubiquitina 2.5×10^{-5} M, en amortiguador Tris-HCl a pH=7.4

La solución de ubiquitina fue titulada agregándole alícuotas de las diferentes soluciones de los complejos, obteniendo un espectro electrónico después de cada adición, en el rango de 200 nm a 600 nm; la banda correspondiente a la ubiquitina desaparece a medida que se agrega las alícuotas del complejo por el factor de dilución; no se observó en ninguna de las titulaciones la aparición de nuevas bandas ó puntos isobésticos lo que indica que no hay interacción por coordinación de los nuevos complejos con la proteína ubiquitina.

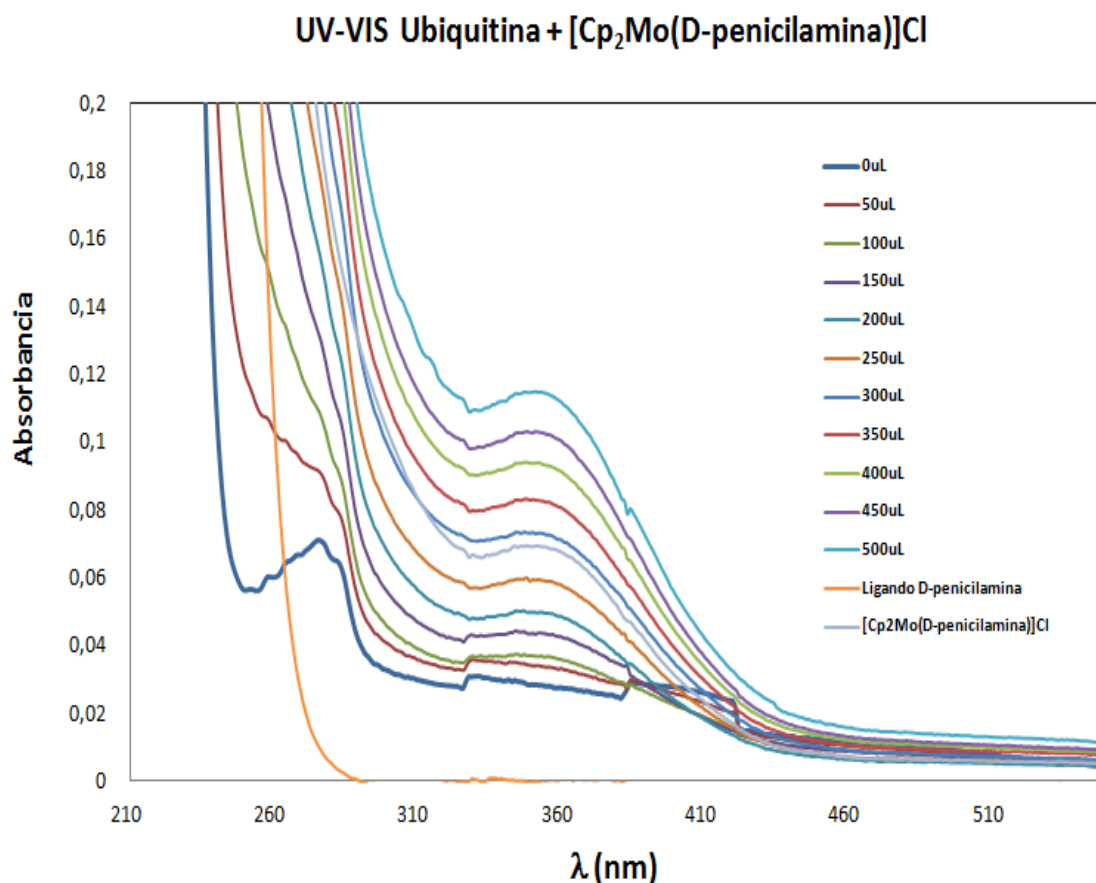


Figura 31. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$, a condiciones fisiológicas.

3.5.2 Estudios electroquímicos de interacción por Voltametría Cíclica

La técnica electroquímica de voltametría cíclica permite estudiar el comportamiento redox de una especie metálica que puede ser afectado por el ambiente que rodea el centro metálico ya sea por factores tales como el disolvente, el ligando o la carga.

Se estudió la posible interacción de dicloruro de molibdenoceno con la proteína ubiquitina. Para esto se tituló primero la solución del metaloceno agregándole cuatro alícuotas de 250 μL del amortiguador, 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), adquiriendo un voltamograma después de cada adición, para obtener los valores de los

picos de oxidación, potencial anódico (E_{pa}) y el valor de la corriente de oxidación producida (I_{pa}). Luego se realizó un análisis similar pero adicionando cuatro alícuotas de la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina. . La Figura 32 (superior), muestra los voltamogramas obtenidos en la titulación con el amortiguador Tris/NaCl, donde se observa que el cambio en el potencial anódico a medida que se añade el buffer es insignificante. Al añadir la solución de proteína se puede ver mayor cambio en estos valores, pues se desplaza hacia potenciales más positivos, tendiendo el pico de oxidación a desaparecer. Para tener una mejor idea del cambio en potencial y en corriente, se determinó el porcentaje de interacción entre el metal y la ubiquitina (28), obteniéndose un porcentaje de interacción máximo de 4.83% en cuanto al potencial y de 26.96% para la corriente, sugiriendo algún tipo de interacción entre este metaloceno y la proteína bajo condiciones fisiológicas.

Estudios similares a los realizados al dicloruro de molibdenoceno se llevaron a cabo con los nuevos complejos sintetizados, midiéndose el porcentaje de interacción del cambio de potencial y corriente, en cada uno de estos complejos con la ubiquitina. En las Figuras 33-40, se muestra el comportamiento de los diferentes complejos; el porcentaje de interacción del cambio en el potencial y en la corriente del pico anódico de los complejos se resumen en la Tabla 6, donde se observa que de los nuevos complejos sintetizados, el complejo $[Cp_2Mo(D\text{-penicilamina})]Cl$ muestra el mayor porcentaje de interacción respecto al cambio en corriente 45.50%, seguido del $Cp_2Mo(L\text{-AA})$ con 15.03%, el $Cp_2Mo(PAA)$ con 12.72% y el $[Cp_2Mo(etil\ maltol)]Cl$ con 7.58%.

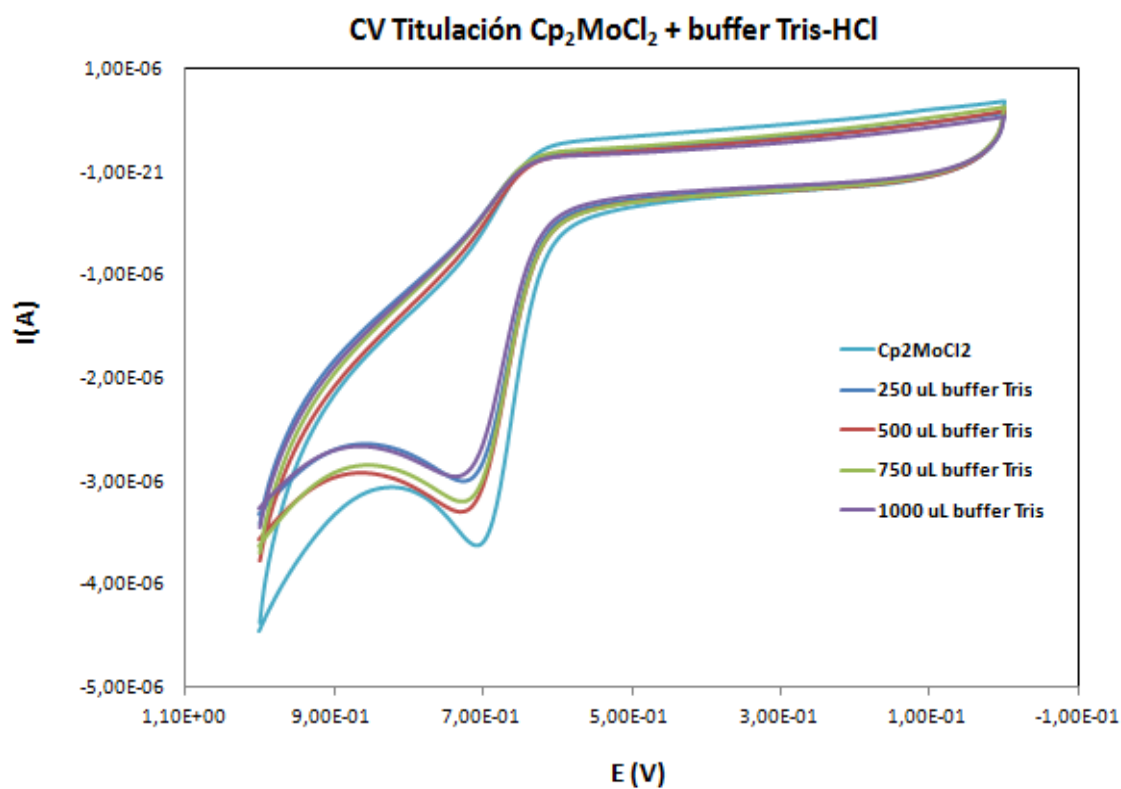


Figura 32. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo Cp_2MoCl_2 , con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (superior) y con la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina (inferior).

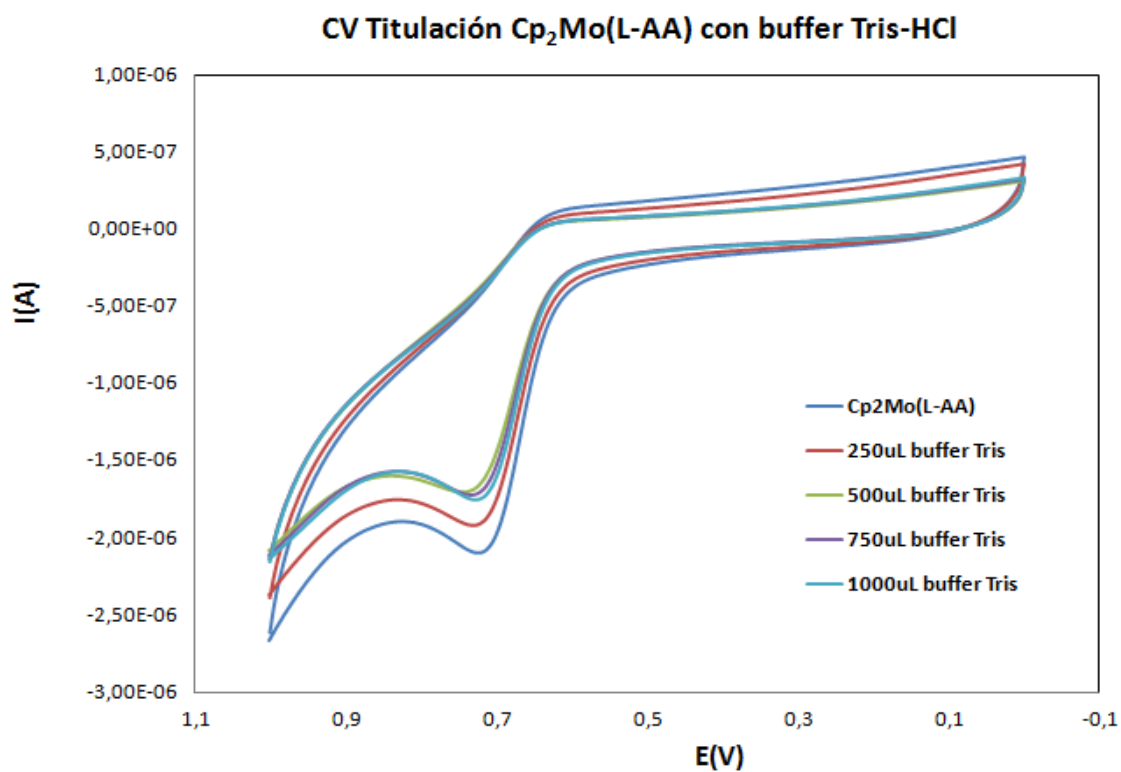


Figura 33. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.

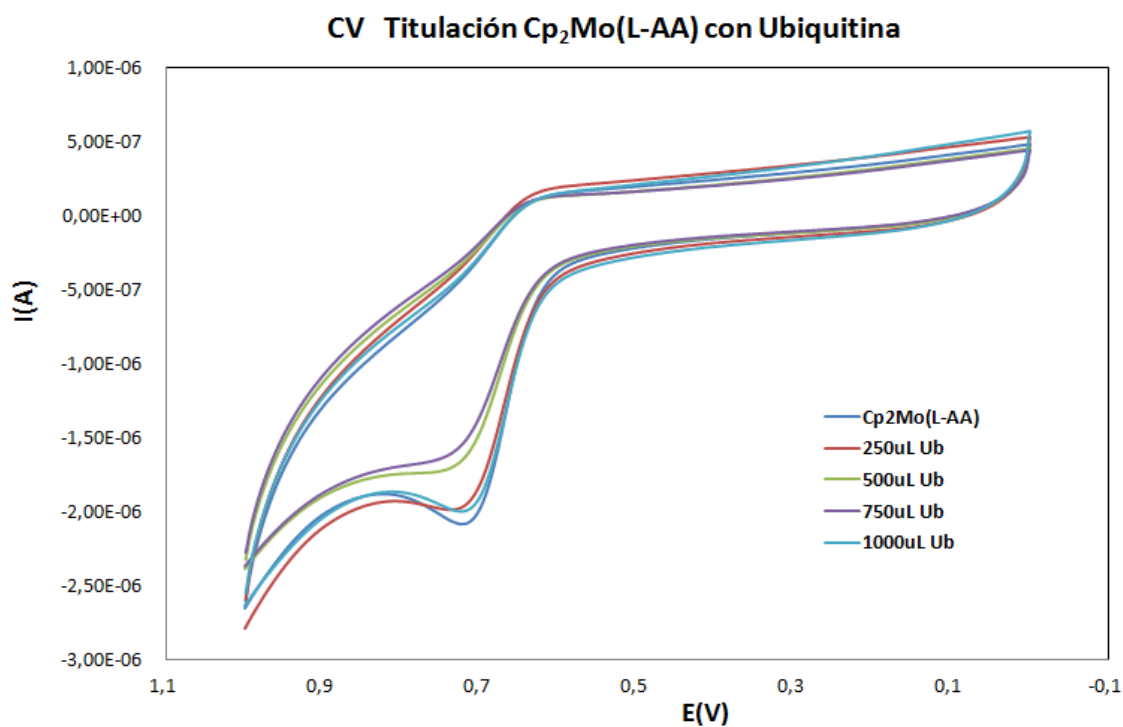


Figura 34. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$ con solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina.

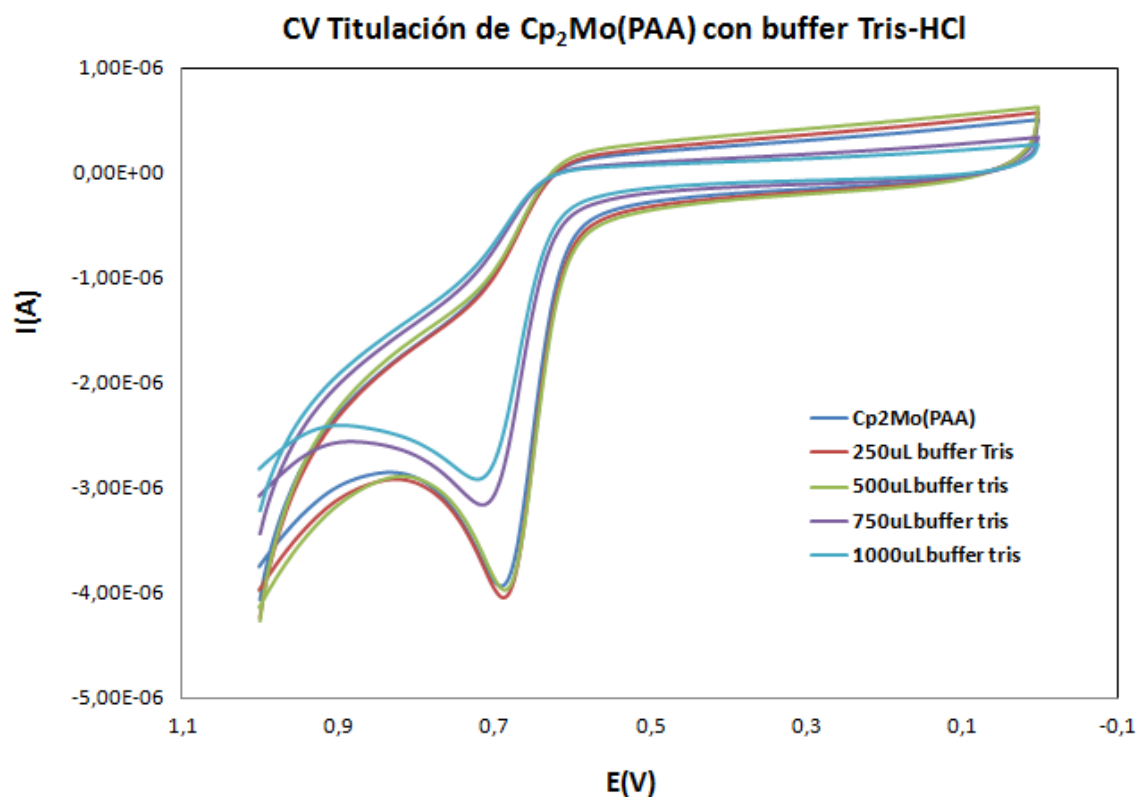


Figura 35. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.

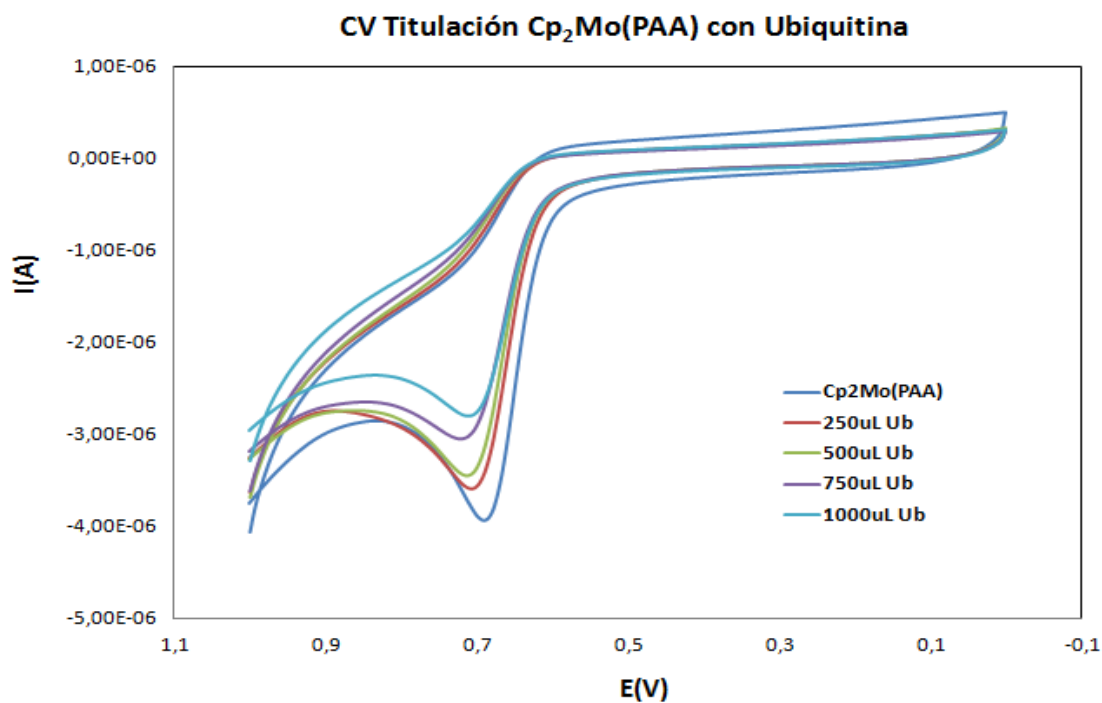


Figura 36. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ con con la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina

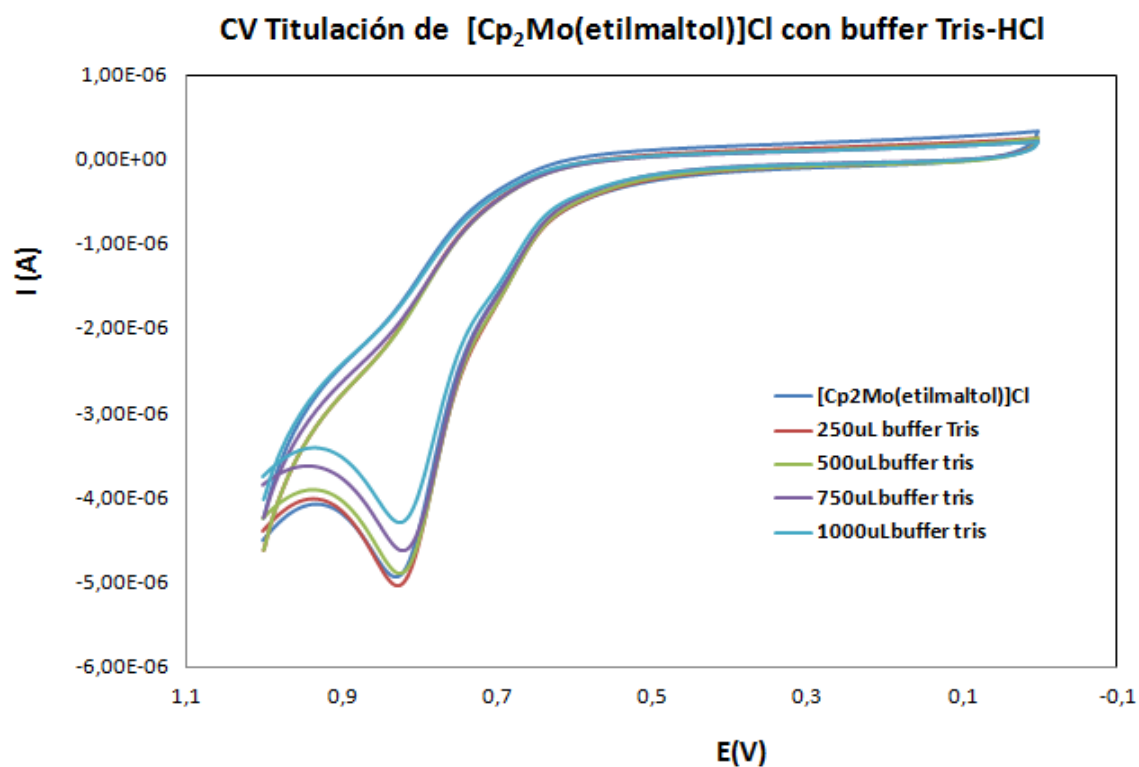


Figura 37. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.

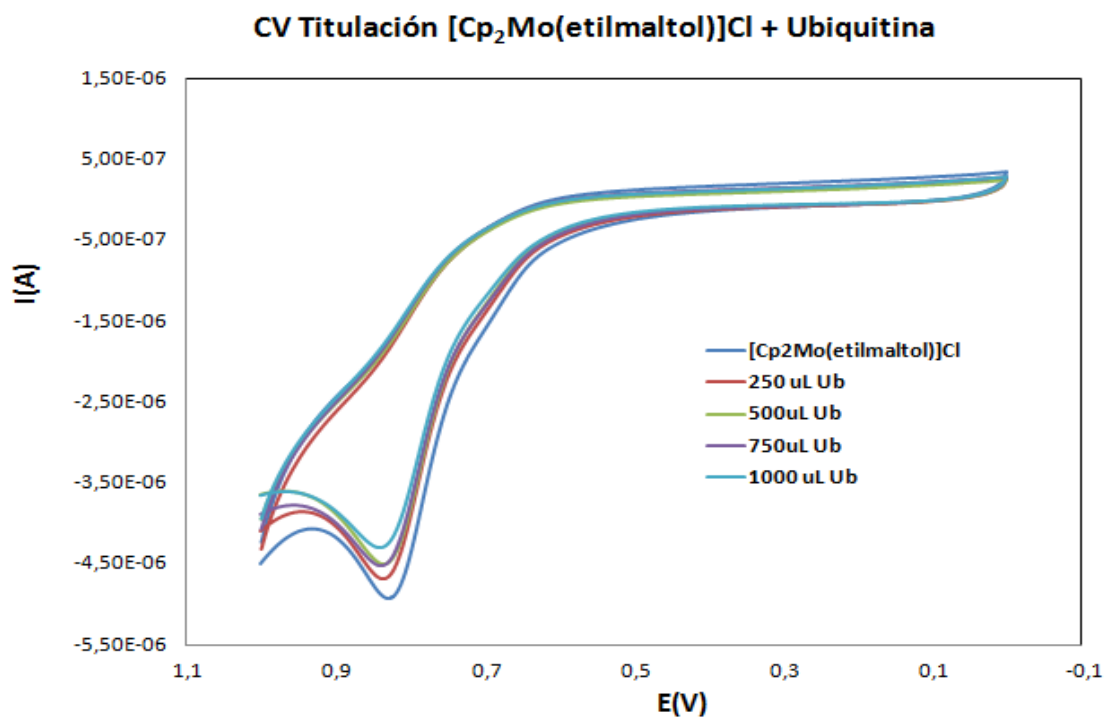


Figura 38. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$ con la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina.

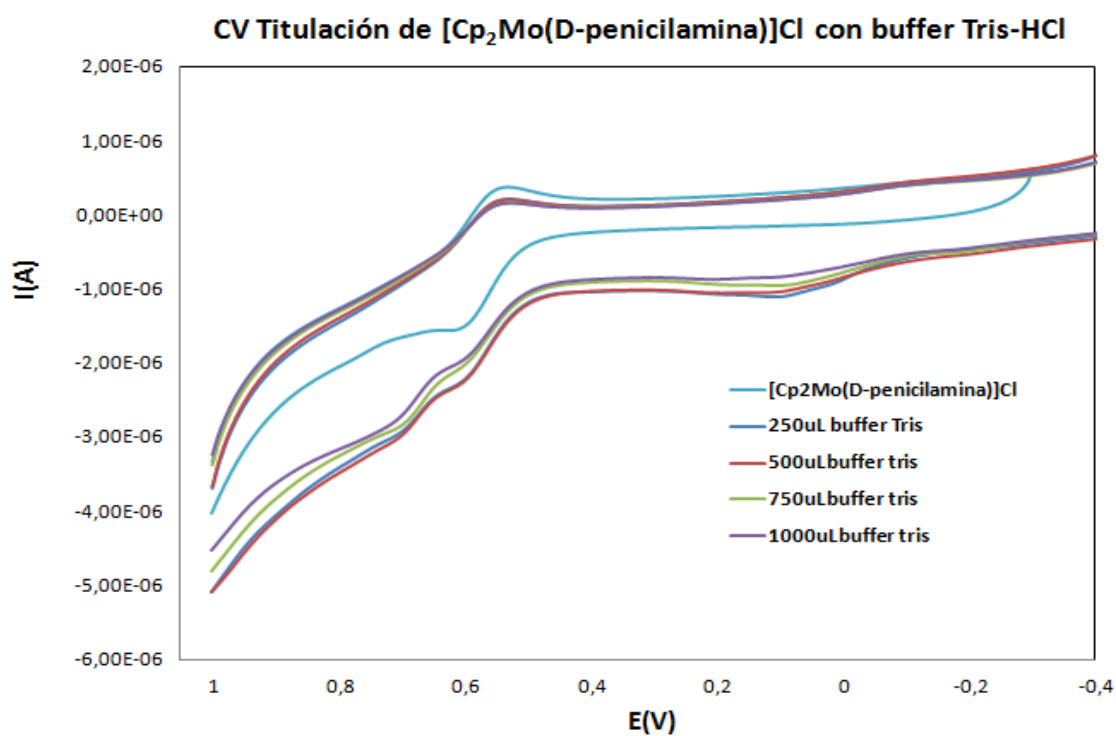


Figura 39. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ con buffer 100 mM Tris/ 10 mM NaCl.

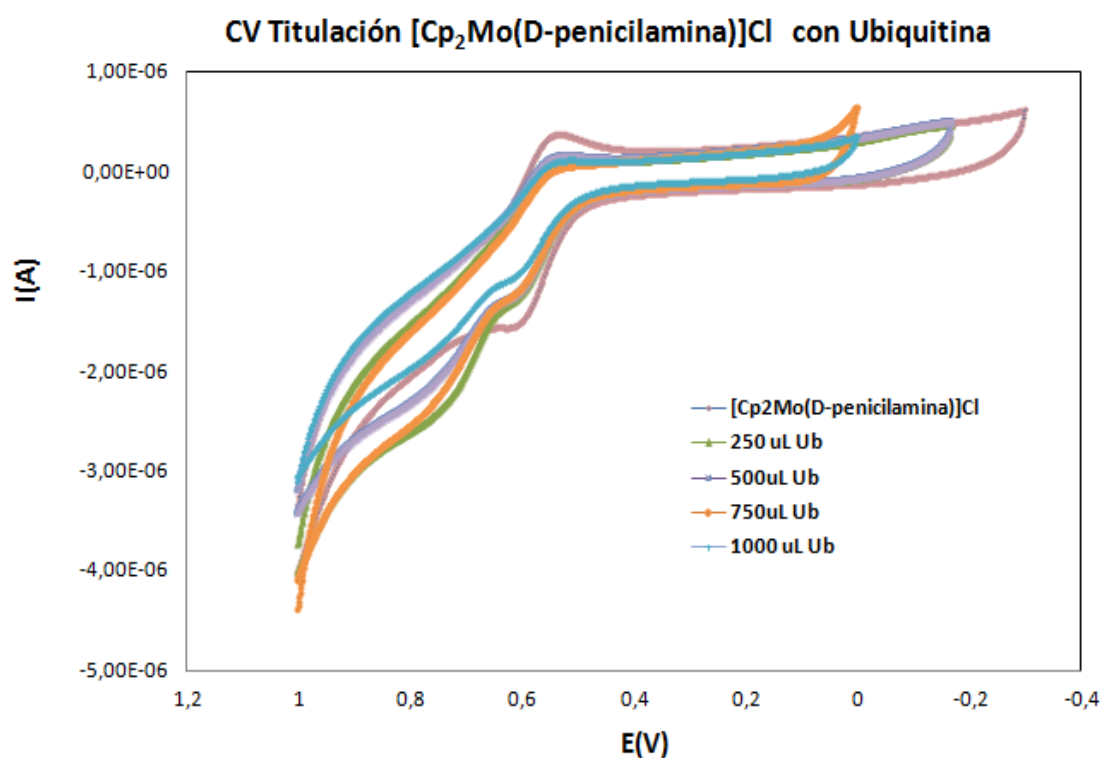


Figura 40. Voltamogramas cíclicos de la titulación del complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ con la solución 2.5×10^{-5} M de Ubiquitina.

Complejo	%(ΔE_{p_a})	%(ΔI_{p_a})
Cp₂MoCl₂	4.83	26.96
Cp₂Mo(L-AA)	1.10	15.03
Cp₂Mo(PAA)	3.98	12.72
[Cp₂Mo(etil maltol)]Cl	2.08	7.58
[Cp₂Mo(D-penicilamina)]Cl	1.36	45.50

Tabla 6. Porcentaje de interacción del cambio en potencial %(ΔE_{p_a}), y en corriente %(ΔI_{p_a}) de pico anódico, de los nuevos complejos sintetizados.

Estos valores se pueden considerar como un indicador de que si está sucediendo un tipo de interacción entre la ubiquitina y los nuevos complejos es posiblemente de tipo hidrofóbico ya que el análisis por UV-VIS no mostró interacción por coordinación. En estudios previos realizados por otros grupos (29), se encontró que el dicloruro de molibdenoceno se enlaza al suero de albumina HSA por medio de interacciones hidrofóbicas.

3.5.3 Estudios de interacción por espectroscopía de fluorescencia

Las proteínas, macromoléculas compuestas por enlaces peptídicos entre aminoácidos, pueden absorber y emitir radiación electromagnética en la región ultravioleta-visible del

espectro debido a la presencia de residuos aromáticos (30). En la estructura de la ubiquitina que consta de 76 aminoácidos, encontramos la presencia de dos residuos aromáticos, tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), que serían los responsables de las bandas de emisión energética en fluorescencia. La presencia de estos residuos es escasa dentro de la estructura de la proteína ubiquitina (dos residuos de Phe y un residuo de Tyr), aunque es muy raro observar la emisión de la fenilalanina. La espectroscopía de fluorescencia permite estudiar las interacciones de enlace proteína-ligando a partir de la información obtenida por medio de la interpretación de los cambios estructurales, modificación de la estructura tridimensional de la proteína debido a cambios en el entorno de algunos de los fluoróforos. Cuando los ligandos poseen fluorescencia propia, como es el caso de nuestros complejos, esta puede cambiar cuando se une a la proteína (33).

Para analizar la interacción de la proteína ubiquitina con el metalloceno Cp_2MoCl_2 y con los nuevos complejos sintetizados, se realizó la titulación de la proteína con alícuotas de 50 μL de las soluciones 1×10^{-4} M de los complejos $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ y $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$; 4.30×10^{-4} M de $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ y 6.30×10^{-4} M de Cp_2MoCl_2 (análisis por separado), preparadas en amortiguador 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4), obteniéndose el espectro correspondiente después de cada adición del metalloceno. El espectro de fluorescencia de la ubiquitina (Figura 41) muestra dos bandas de emisión, una de mayor intensidad con un máximo en 303 nm, debida a la emisión del residuo aromático tirosina (Tyr) en medio acuoso (33), y otra de menor intensidad en 345 nm.

Las Figura 42-46 muestran los espectros obtenidos para cada titulación. En la titulación con los nuevos complejos se observa como la segunda banda de la proteína tiende a desaparecer a medida que aumenta la adición del complejo. En las titulaciones de la ubiquitina con $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{L-AA})$ y $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, se observa que a medida que se aumenta la concentración de complejo añadida, en la región de 446 nm y 433.2 nm respectivamente, tiende a formarse una nueva banda que corresponde a estos complejos pero con un desplazamiento hacia el azul del espectro, lo que infiere que existe un tipo de enlace entre la ubiquitina y los complejos (29).

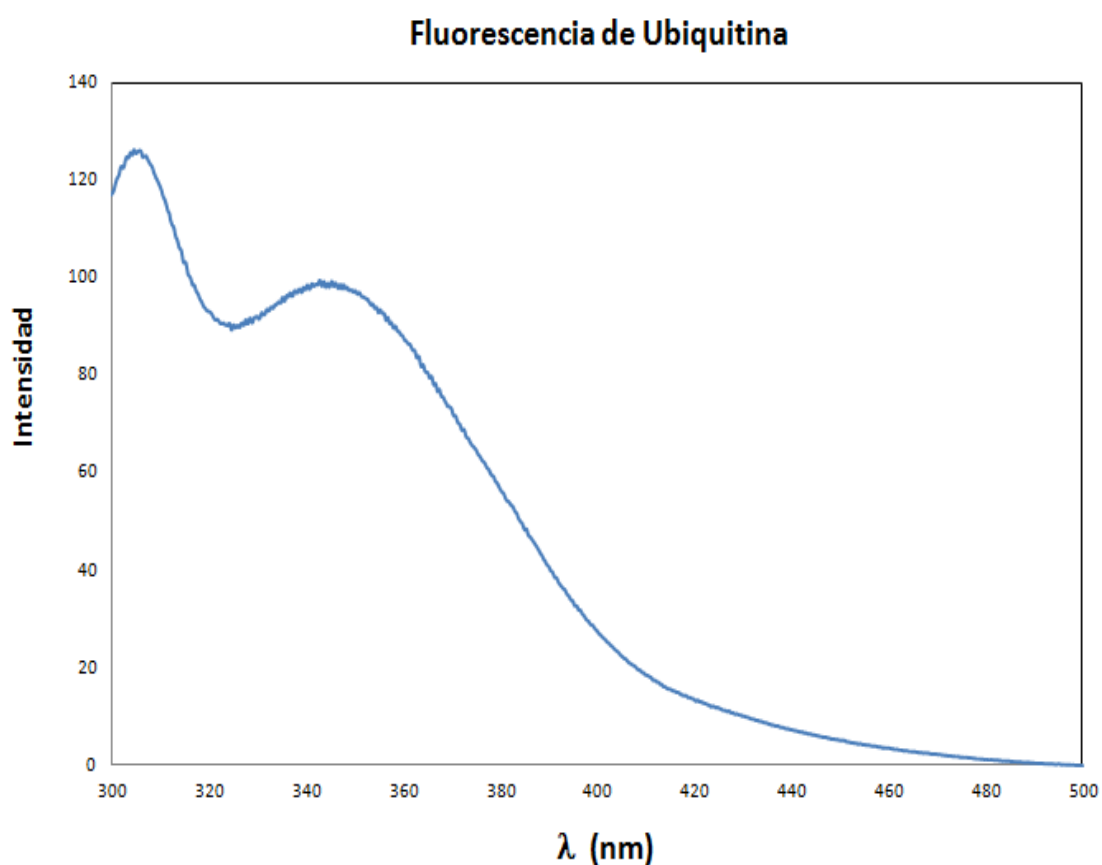


Figura 41. Espectro de fluorescencia de la proteína ubiquitina en amortiguador 100 mM Tris/ 10 mM NaCl (pH=7.4).

En todas las titulaciones se observa como las intensidades de las bandas de ubiquitina decrecen a medida que aumenta la concentración del complejo, fenómeno que se

conoce como “Quenching de fluorescencia” que puede ser de tipo dinámico o estático. Los nuevos complejos sintetizados actúan como “quenchers” y permitirán estudiar la facilidad de estos para acceder a los residuos aromáticos (fluoróforos) de la proteína, lo que se reflejará en la formación de un complejo proteína-ligando. Para discernir el tipo de quenching que ocurre se determinó la constante de quenching bimolecular k_q , usando la relación de Stern-Volmer, para cada una de las dos bandas de emisión de la proteína(31,35):

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad \text{ecuación (1)}$$

donde F_0 y F son las intensidades en ausencia y presencia de quencher respectivamente, k_q es la constante de quenching bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida de la fluorescencia en ausencia del quencher ($\sim 10^{-8}$ para la mayoría de las moléculas), $[Q]$ es la concentración del quencher y K_{sv} es la constante de quenching de Stern-Volmer.

Todos los valores de las constantes de quenching bimolecular k_q , obtenidas para cada titulación (Tabla 7), arrojan valores mayores que para el típico quenching por difusión $k_q \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (31,35), obteniéndose la mayor constante de quenching dinámico para la interacción ubiquitina- $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$. Estos valores indican algún tipo de interacción por medio de un enlace proteína-ligando ya sea de tipo hidrofóbico combinado con interacciones electrostáticas y/o puentes de hidrógeno, en todos los estudios realizados.

Primera banda de Ubiquitina			
Titulación	Ecuación recta	$kq(M^{-1}s^{-1})$	R
Ub + Cp_2MoCl_2	$y = 3753x + 1.0001$	$3.75E+11$	0.9915
Ub + Cp_2Mo (L-AA)	$y = 5720.1x + 1.026$	$5.72E+11$	0.8885
Ub + [Cp_2Mo (etil maltol)]Cl	$y = 19835x + 1.1283$	$1.98E+12$	0.8635
Ub + [Cp_2Mo (D-penicilamina)]Cl	$y = 10717x + 1.0631$	$1.07E+12$	0.9289
Ub + Cp_2Mo (PAA)	$y = 63343x + 0.9211$	$6.33E+12$	0.9884
Segunda banda de Ubiquitina			
Titulación	Ecuación recta	$kq(M^{-1}s^{-1})$	R
Ub + Cp_2MoCl_2	$y = 3772.2x + 0.9433$	$3.77E+11$	0.9856
Ub + Cp_2Mo (L-AA)	$y = 10447x + 0.9935$	$1.04E+12$	0.9002
Ub + [Cp_2Mo (etil maltol)]Cl	$y = 49755x + 1.1376$	$4.98E+12$	0.9815
Ub + [Cp_2Mo (D-penicilamina)]Cl	$y = 45190x + 1.2009$	$4.52E+12$	0.8898
Ub + Cp_2Mo (PAA)	$y = 88606x + 0.8176$	$8.86E+12$	0.9705

Tabla 7. Constantes de quenching, kq , entre la ubiquitina y nuevos complejos sintetizados.

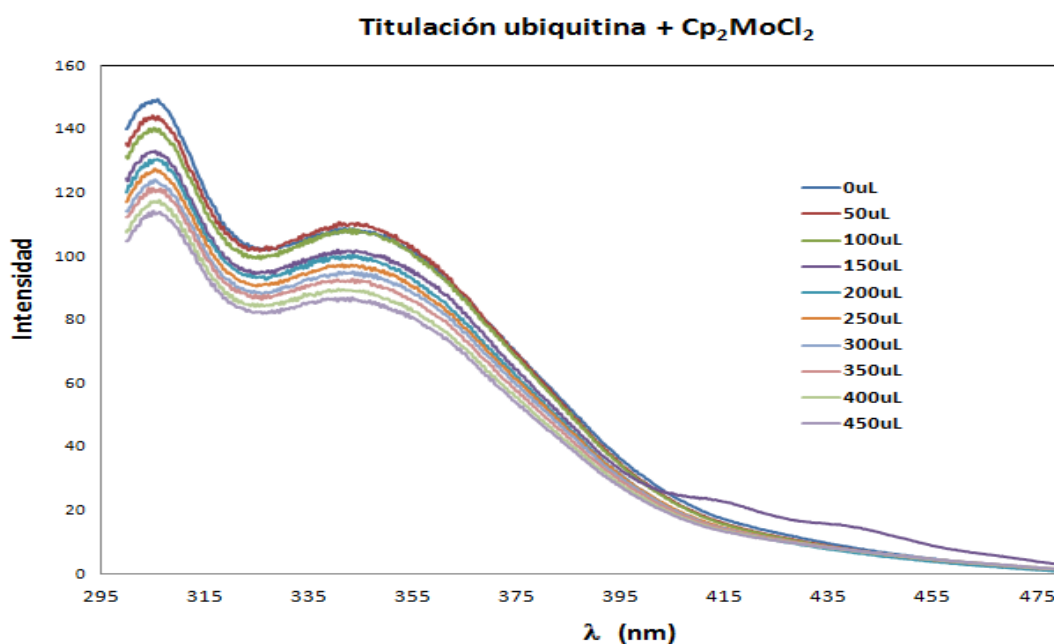


Figura 42. Espectros de fluorescencia obtenidos en la titulación de la proteína Ubiquitina con el dicloruro de molibdenoceno, en el rango espectral de 295 nm a 475 nm.

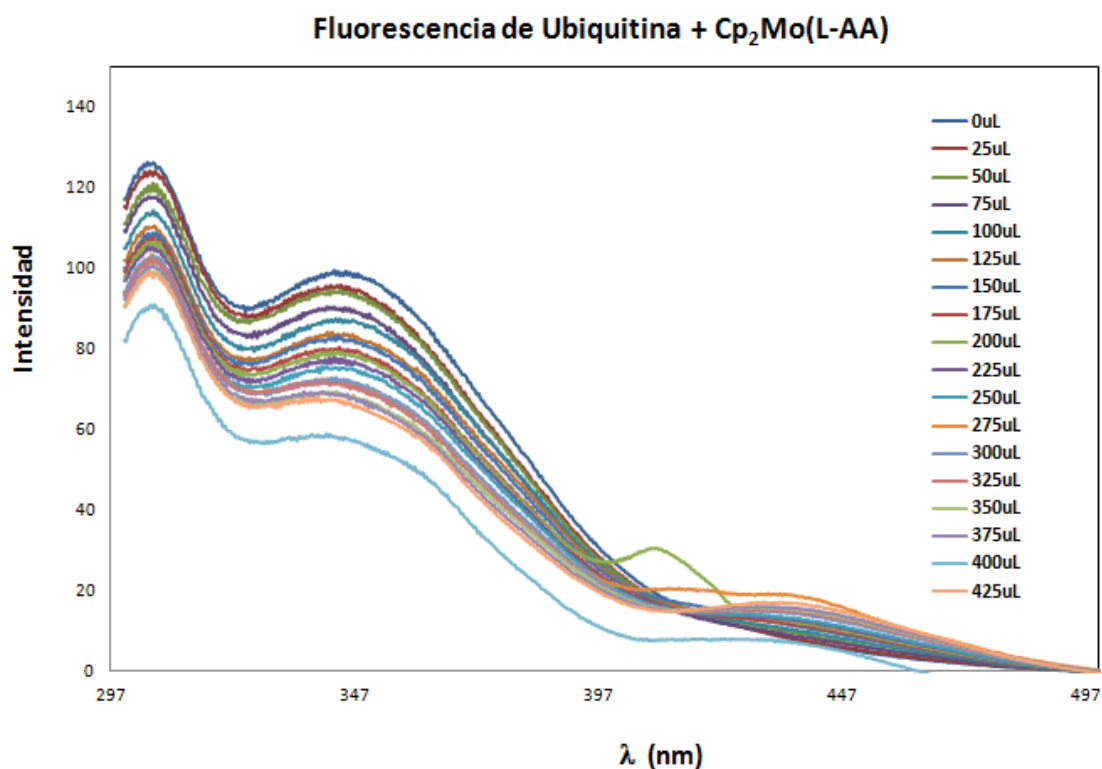


Figura 43. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con el complejo que tiene el ligando L-ácido áscorbico, en rango espectral de 295 nm - 500 nm.

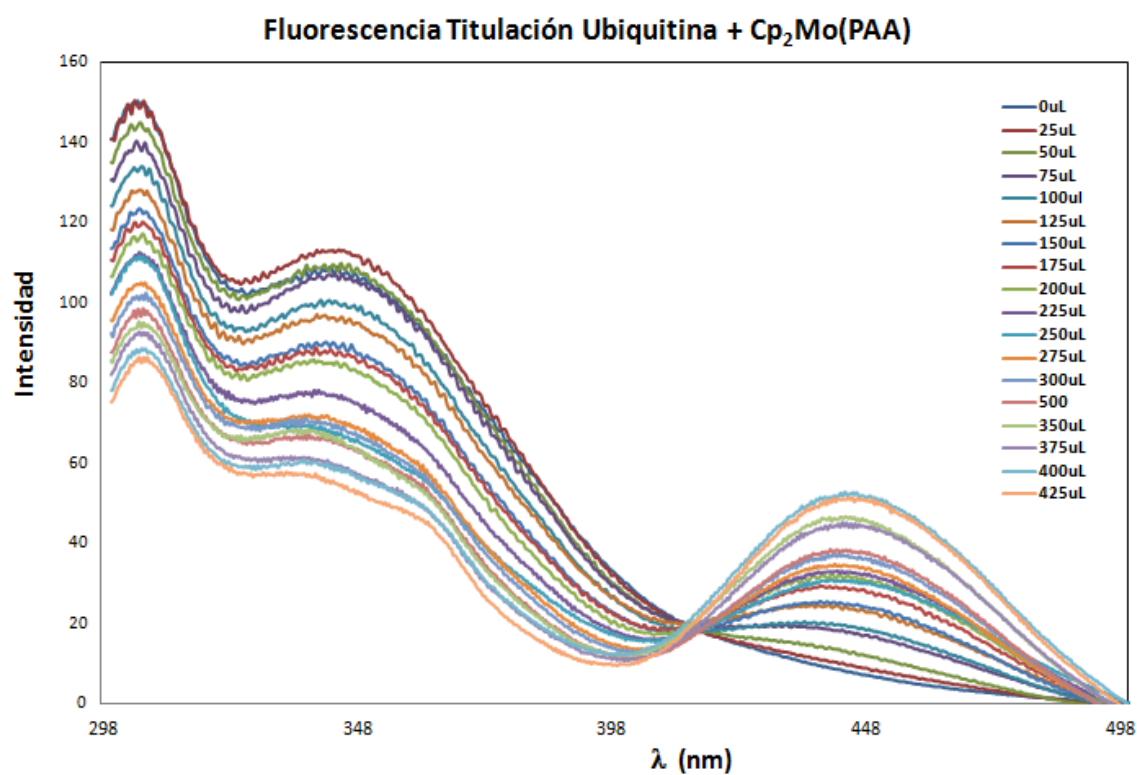


Figura 44. Espectros de fluorescencia obtenidos en la titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$, en el rango espectral de 295 nm a 500 nm.

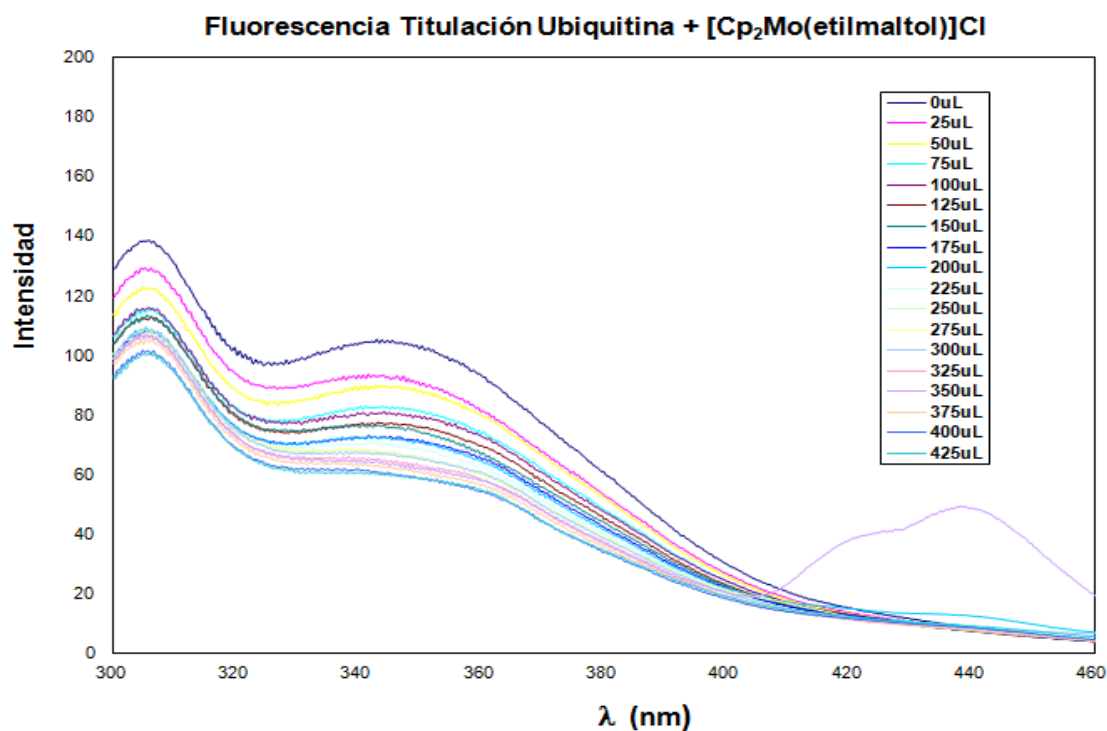


Figura 45. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{etil maltol})]\text{Cl}$, en el rango espectral de 300 nm a 420 nm.

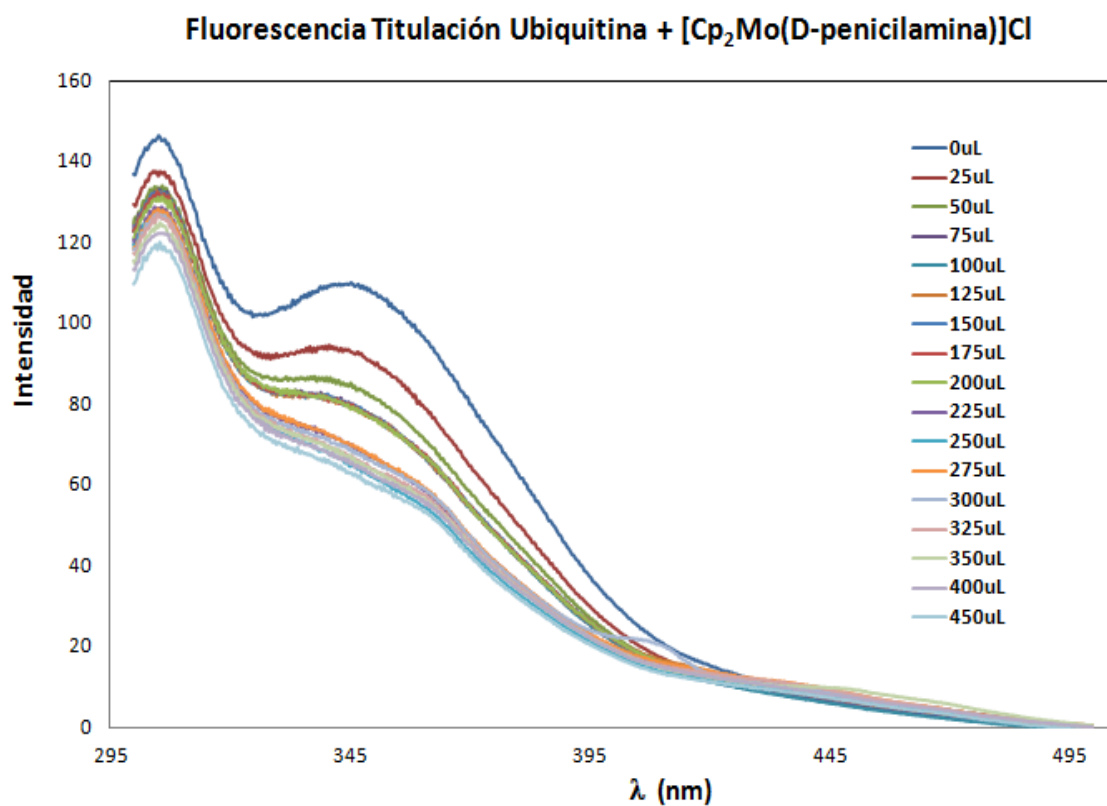


Figura 46. Espectros de fluorescencia obtenidos en titulación de la proteína Ubiquitina con complejo sintetizado $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{penicilamina})]\text{Cl}$, en el rango espectral de 295 nm- 500 nm.

3.5.4 Estudios de interacción por Dicroísmo Circular (CD)

La técnica espectroscópica de dicroísmo circular (actividad óptica) permite estudiar sustancias que tengan dentro de su estructura centros quirales como por ejemplo las proteínas, basándose en que en la ausencia de campos magnéticos estas especies no interaccionan de la misma forma con la luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda (35). Por tanto un espectro de CD refleja la diferencia entre estas absorciones de la luz polarizada.

La espectroscopía de CD es una técnica muy apropiada para monitorear la conformación de proteínas en solución y los cambios que pueden ocurrir en respuesta al ambiente (disolvente, pH, concentración, amortiguador) e interacciones debidas al enlace proteína-ligando. El espectro de una proteína es descrito por dos regiones como lo son el UV lejano que comprende de 180 nm a 240 nm, que es la región donde se pueden apreciar los cambios en la estructura secundaria de la proteína y el UV cercano que va desde 240 nm hasta 320 nm que muestra los cambios en la estructura terciaria. Las unidades del eje Y están dadas por la elipticidad molar media $[\theta]_{MMR}$, unidades(grados.dmol⁻¹.cm²):

$$[\theta]_{MMR} = \frac{\theta}{10 \cdot c \cdot N_A \cdot l}$$

ecuacion (2)

Donde Θ representa la data dada por el equipo en miligrados, C es la concentración molar, N_A es el numero de aminoácidos de la proteína y l esta definida por el paso óptico de la celda de cuarzo, 1cm.

Las estructuras secundarias hélice alfa, presentan un espectro característico en la región UV lejano, presentando un doble mínimo a 222 nm y a 208-210 nm y un máximo mas intenso en 191-193 nm (Figura 47). Las estructuras de lámina beta, muestran un único pico negativo entre 210 nm y 225 nm y un único pico positivo entre 190 a 200 nm, todos estos de menor intensidad que las hélices alfa. En la region UV cercano de una proteína se ven señales originadas por los cromóforos residuos aromáticos y por los enlaces disulfuro en el estado nativo. La fenilalanina presenta una banda de absorción entre 250-270 nm, la tirosina una banda más intensa en 276 nm y un hombro en 283 nm que pueden desplazarse hacia el rojo debido a la formación de puentes de hidrógeno por el grupo fenólico (28).

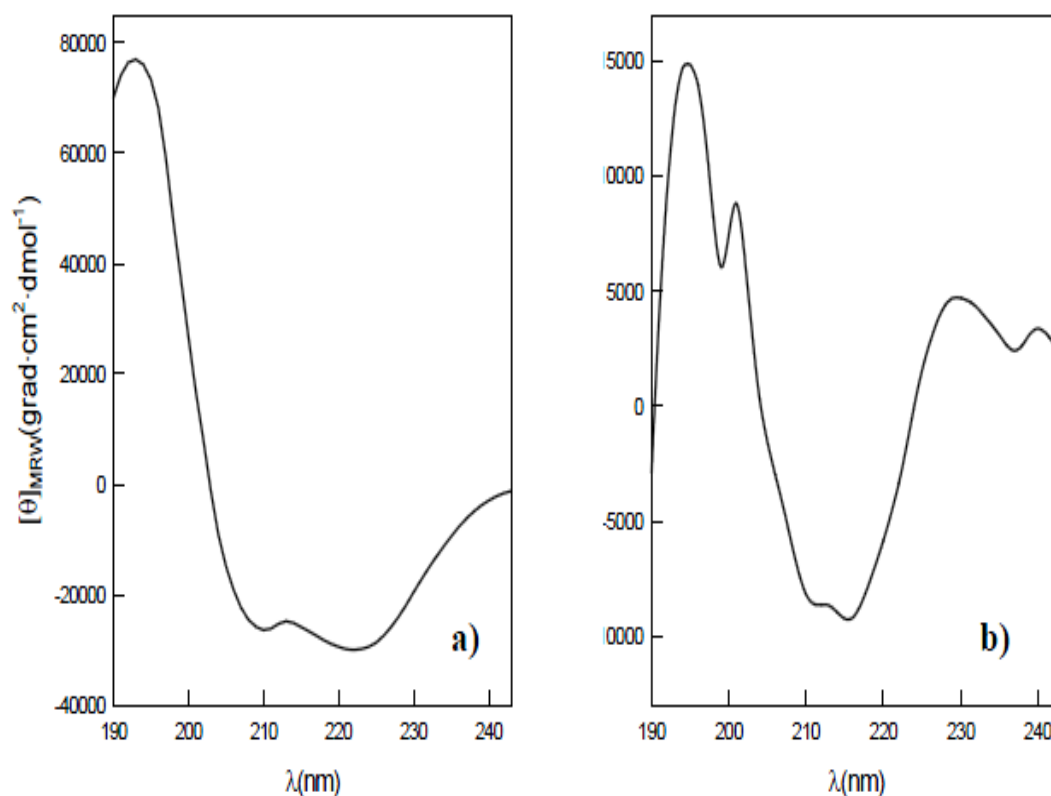


Figura 47. Espectro ultravioleta lejano de CD de una proteína con estructura de hélice alfa(a), y de una proteína con estructura tipo beta plegada (b) (28).

Se llevaron a cabo estudios de interacción entre la ubiquitina y los complejos sintetizados así como del dicloruro de molibdenoceno, titulando la solución de proteína con alícuotas de 50 μL de la solución de cada uno de los complejos; todas las soluciones se prepararon usando amortiguador 10 mM fosfato/20 mM NaCl a pH=7.4 (condiciones fisiológicas), en el rango espectral de 195-450 nm y con una acumulación total de 6 espectros para eliminar las interferencias ocasionadas por el ruido, a temperatura ambiente (20° C).

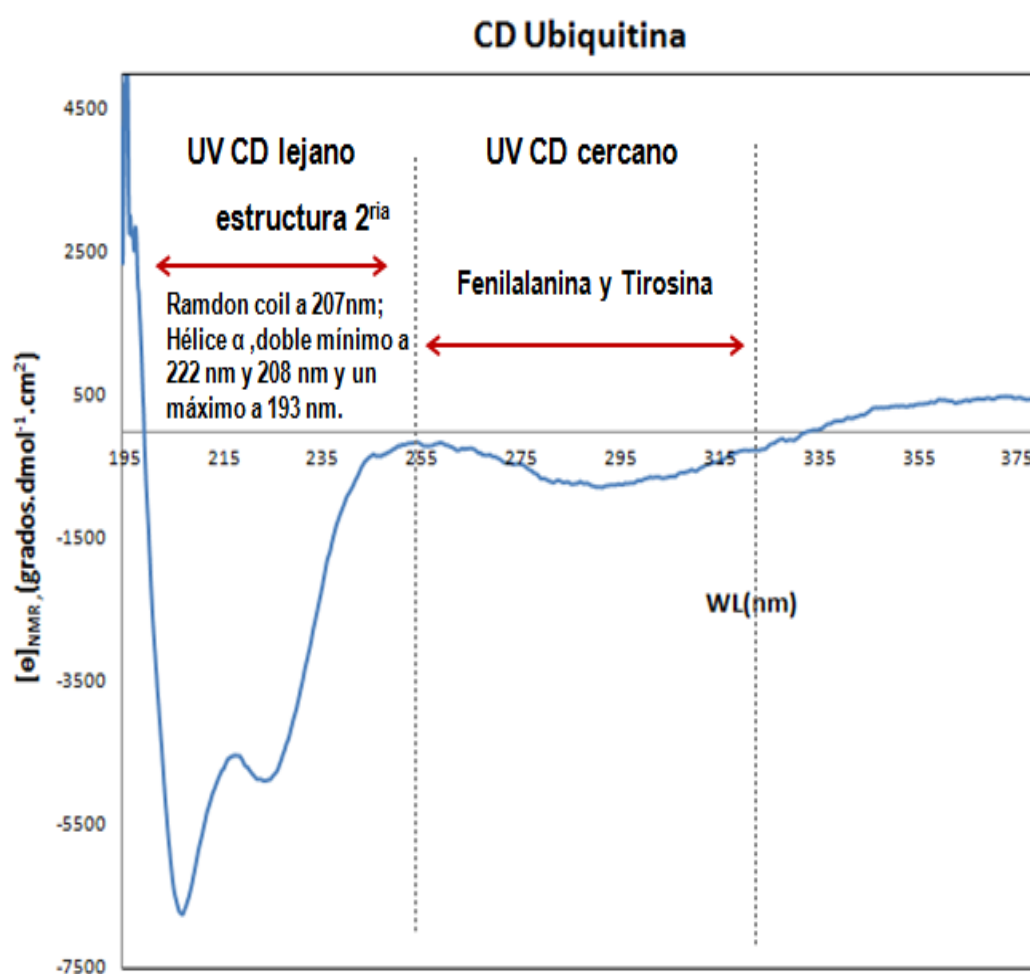


Figura 48. Espectro de CD en el ultravioleta lejano y cercano de la proteína ubiquitina.

La Ubiquitina es una proteína constituida por 76 residuos de aminoácidos que tiene una conformación globular compacta, formada por cinco láminas beta y una hélice alfa de

tres vueltas y media (12). En la Figura 48, se observa el espectro característico de la Ubiquitina donde se puede apreciar los picos mínimos característicos de su estructura secundaria hélice alfa y beta plegada (ultravioleta lejano) al igual que los picos de su estructura terciaria, debido a los residuos aromáticos de tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) (UV cercano).

La Figura 49, muestra el espectro obtenido durante la titulación de la proteína con el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$. Se observa claras diferencias si se compara con el espectro de CD del complejo: el cambio en la forma de las bandas debidas al complejo en la región de 280.6 nm, aumentando su elipticidad definiéndose mejor en dos bandas de dos hombros que salen en 246.2 nm y 280 nm, y desplazándose hacia el azul del espectro. Estas bandas definidas se pueden atribuir al residuo de tirosina que absorbe en esta región, lo cual indica un tipo de interacción de carácter hidrofóbico. A medida que aumenta la adición de la solución del complejo se observa que la banda característica de la estructura hélice alfa (UV lejano) de la proteína, en 222 nm, desaparece observándose al final solo un mínimo en 208 nm. También se observa la aparición de un punto isobéptico en 320nm que origina que la intensidad de la banda en 372 nm aumente.

En la Figura 50 se muestra el espectro obtenido durante la titulación de la ubiquitina con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$, donde al igual que con el complejo anterior se observan modificaciones en el espectro de CD comparado con el espectro de CD del complejo solo: a medida que aumenta la adición de la solución del complejo se observa que la banda característica de la estructura hélice alfa (UV lejano) de la proteína en 210 nm tiende a desaparecer, observándose solo el mínimo en 222 nm.

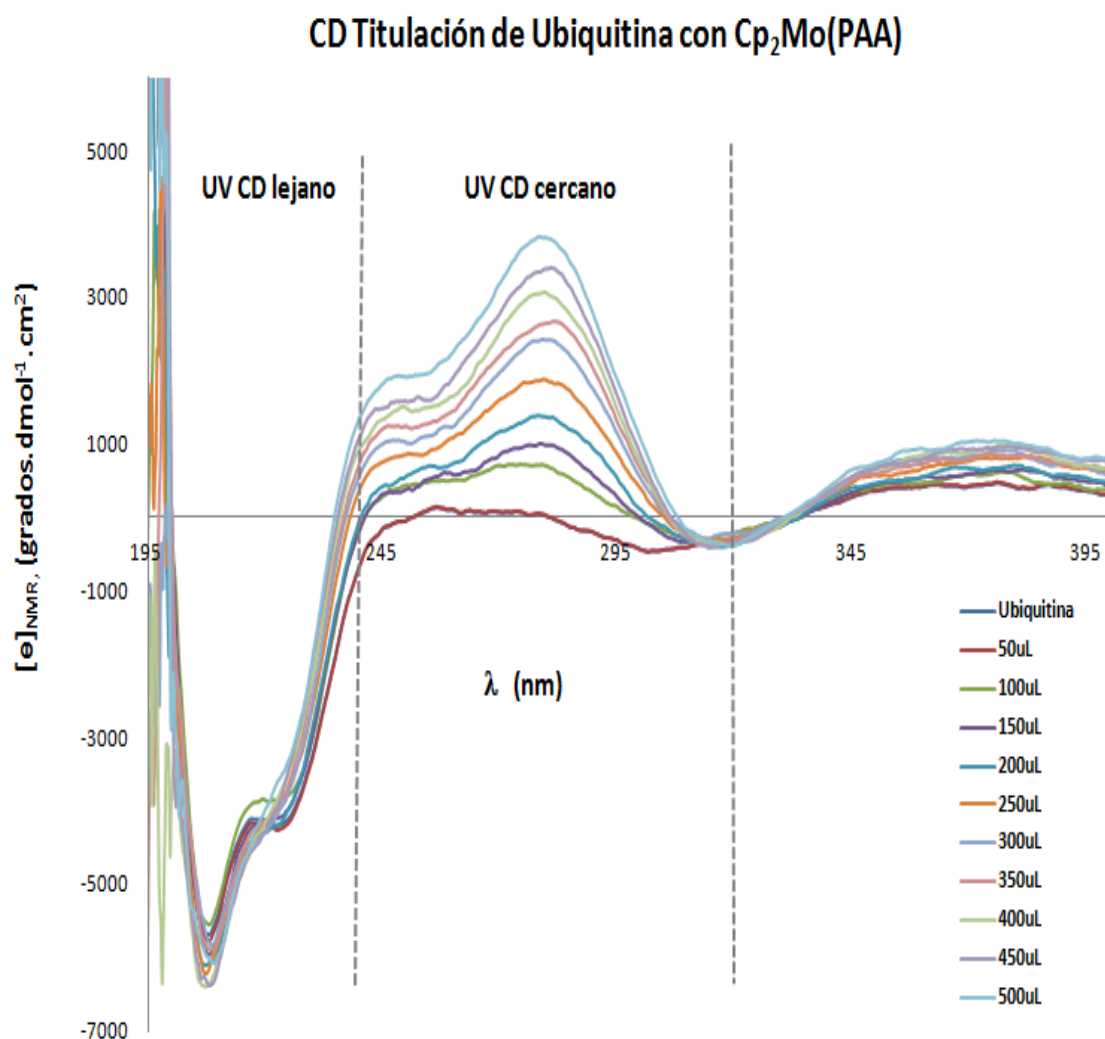


Figura 49. Espectro de CD de la titulación de la proteína ubiquitina con el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$.

También se observa la aparición de tres puntos isobésticos que se deben posiblemente al aumento en la concentración del complejo a medida que se realiza la titulación, o a modificación de la conformación del sistema ubiquitina- complejo. Se observa también la aparición de una banda en la región de 409.7 nm, que puede ser originada por cambios en la estructura del complejo, ya que este presenta actividad óptica. También se mostró un ligero desplazamiento de las bandas hacia la región azul del espectro.

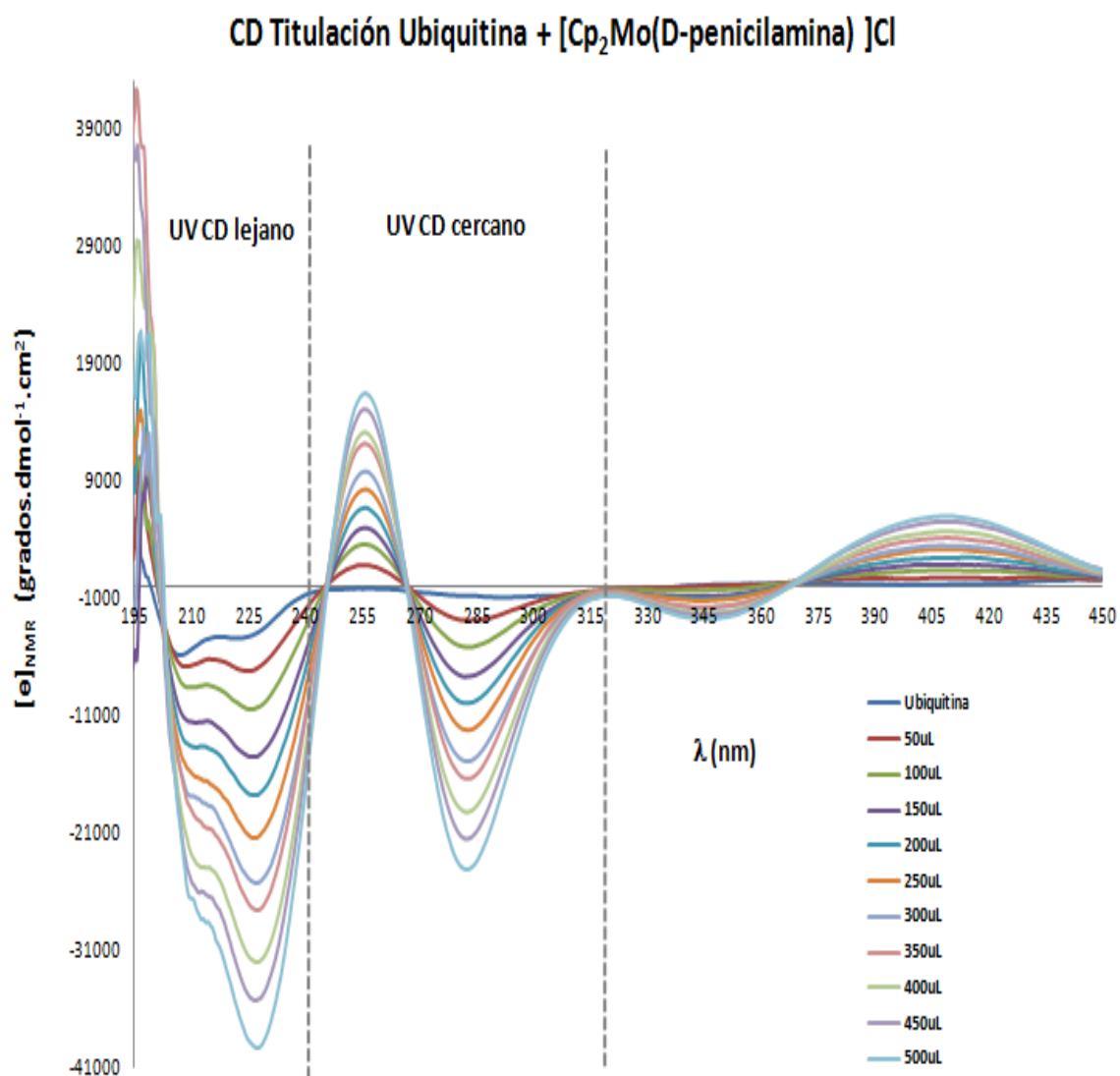


Figura 50. Espectro de CD de titulación de la proteína ubiquitina con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$.

Para los restantes complejos, los espectros de CD de las titulaciones no mostraron cambios significativos que se puedan atribuir a cambios estructurales o conformacionales de la ubiquitina. Por lo tanto, solo $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{PAA})$ y $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{D-penicilamina})]\text{Cl}$ inducen cambios estructurales en la ubiquitina lo que sugiere que existen interacciones complejo-proteína posiblemente de carácter hidrofóbico o electrostático que se pueden monitorear por espectroscopía de CD.

4. Estudios de actividad citotóxica de nuevos complejos de molibdenoceno en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29.

Se determinó la actividad citotóxica de los nuevos complejos sintetizados por medio del ensayo colorimétrico de viabilidad MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul-púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (42), en líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y cáncer de mama MCF-7.

4.1 Materiales y Metodología

3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), Triton X-100, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico, todos fueron comprados de Sigma-Aldrich, y 2-propanol comprado de Fisher. Las células cancerígenas fueron puestas a crecer en un frasco de cultivo de 75 cm² que posee un cuello inclinado, obtenido de Corning Co.; luego del crecimiento las células fueron sembradas en un plato de 96 pozos de Cell star.

4.2 Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HT-29

Los ensayos citotóxicos realizados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 fueron realizados en el laboratorio de biología molecular del profesor Jaime Ramírez Vick, del Departamento de Ingeniería General de la Universidad de Puerto Rico – Recinto de Mayagüez; las células de cáncer de colon HT-29 fueron donadas por el Dr. Jaime Matta del Departamento de Farmacología de la Escuela de Medicina de Ponce.

Las células cancerígenas MCF-7 se cultivaron usando como medio Hyclone DMEM / con alta glucosa, suplementado con L-glutamina (4.00 mM), glucosa (4.5 g/L) y piruvato de sodio comprado de Thermo Scientific; las células cancerígenas HT-29 se cultivaron usando como medio McCoy's 5^a, modificado con L-glutamina de ATCC. El suero fue enriquecido con nutrientes como suero fetal bovino (10 %) comprado de Sigma-Aldrich. La solución antibiótica, antimicótica (1 %), fue comprada de Cellgro y filtrada en una botella que contiene un filtro de acetato de celulosa 0.2 µm. Ambas líneas celulares fueron incubadas en el frasco de cultivo de 75 cm², bajo una atmósfera de aire (95%)/CO₂ (5%) grado USP a 37°C, para su crecimiento y mantenimiento.

4.3 Ensayo de Viabilidad MTT

EL ensayo colorimétrico MTT para determinar la actividad citotóxica de los nuevos complejos fue evaluada sembrando 10,000 células (HT-29 o MCF-7) por pozo, en un plato de 96 pozos, incubándose por 24 h. Cada plato está formado por 12 columnas y 8 filas que será la cantidad de réplicas para cada concentración. En las dos primeras columnas del plato se añadieron 25 µL de medio por pozo (control), excepto para el complejo de Cp₂Mo(PAA) cuyo medio lleva 5% de DMSO debido a que es ligeramente soluble en agua. Al resto de las columnas se le añadieron 25 µL por pozo de soluciones de diferentes concentraciones de los complejos, las cuales están preparadas en el mismo medio de las células, para luego incubarlo por 72 h, al cabo de las cuales se les adiciona 50 µL por pozo de una solución amarilla de MTT (2.4 mg/mL) preparada en el mismo medio y en la oscuridad, incubando de nuevo por 2 horas. Se remueve el medio y se lava con una solución de buffer fosfato frío (PBS). 180 µL de triton(10 %) en 2-propanol es añadido e incubado para producir un compuesto coloreado de color azul-púrpura (formazán), al cual se le mide la absorbancia a una longitud de onda de

490 nm con una sustracción del “background” a 630 nm en un lector de microplatos ELx808 Biotek, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Se determino el IC₅₀ de los complejos tratando la data con el software Sigma Plot y Prism 3.0 usando curvas de análisis sigmoidal (pendiente variable).

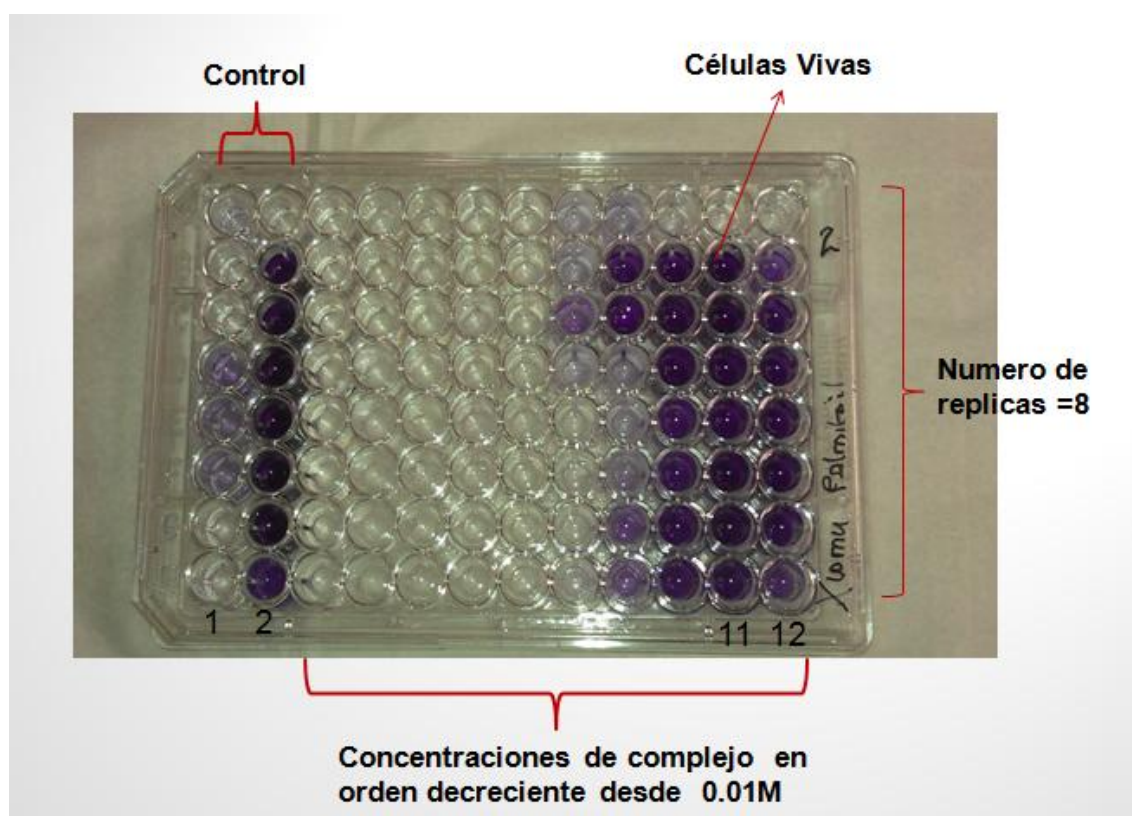


Figura 51. Ensayo colorimétrico de MTT para determinar la citotoxicidad del complejo Cp₂Mo(PAA), en la línea de cáncer de colon HT-29.

4.4 Resultados y Discusión

El ensayo de viabilidad se basó en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que es realizada por la enzima

mitocondrial succinato-deshidrogenasa dando como resultado un compuesto coloreado de color azul-púrpura (formazán) (Figura 51-52) permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

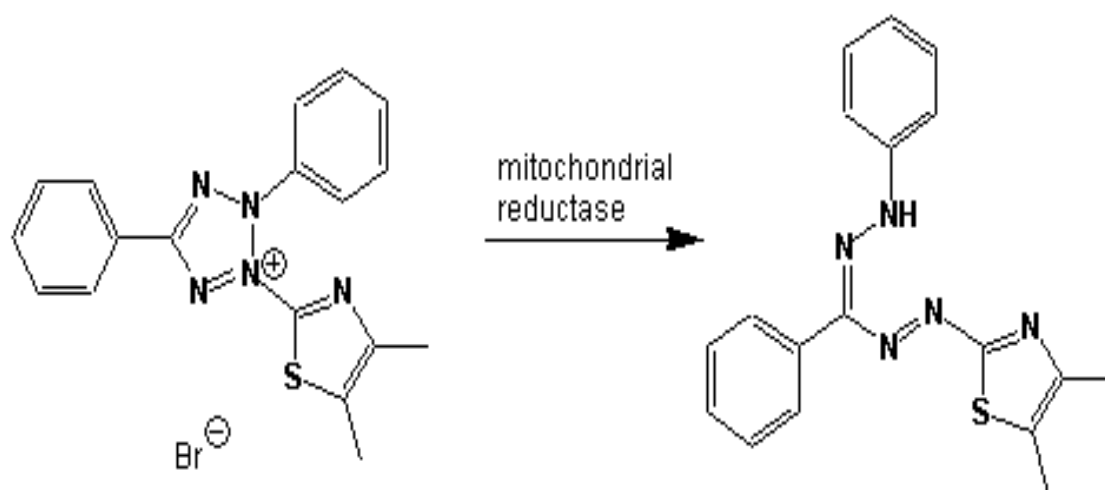


Figura 52. Reacción ocurrida en el ensayo colorimétrico de viabilidad MTT.

Con las absorbancias obtenidas en el ensayo colorimétrico, se halló el % de viabilidad dividiendo el valor de la absorbancia del control entre el valor de absorbancia obtenido para cada concentración; con esto se determinó el IC_{50} de los complejos sintetizados, que es la concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de las células cancerígenas (Tabla 8) y siendo representados graficando el %viabilidad vs el $\log[\text{complejo}]$, generando curvas de respuestas sigmoideal (Figura 53). Comparando los valores obtenidos de los nuevos complejos, con los valores reportados en trabajos anteriores para el dicloruro de molibdenoceno (25) en las dos líneas celulares de cáncer (Tabla 8), se puede ver que en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, todos nuestros complejos mostraron tener actividad citotóxica en comparación

con el compuesto de partida que no muestra actividad (tiene efecto proliferativo), siendo el $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ el compuesto que mostró mayor citotoxicidad $0.33(\pm 0.3)$ mM, seguido del $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$ $0.81(\pm 0.5)$ mM; el compuesto que mostró la menor actividad fue el $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$, como era de esperarse debido a que este complejo presenta un enlace muy fuerte entre el centro metálico y el azufre, lo que impide que interaccione de alguna forma con biomoléculas presentes en las células.

En la línea celular de cáncer de colon se puede ver que tres de los complejos mejoraron en gran manera la actividad citotóxica comparados con el dicloruro de molibdenoceno, siendo el compuesto $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ el de mayor actividad 0.05 mM seguido por el $\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$ y el $[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$, que mostraron valores de IC_{50} muy parecidos, excepto para el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$, quien muestra efectos proliferativos en esta línea celular.

Complejo	IC_{50} (mM)	
	MCF-7	HT-29
Cp_2MoCl_2	Efecto proliferativo	$2.6(\pm 0.3)$
$\text{Cp}_2\text{Mo(L-AA)}$	$0.81(\pm 0.5)$	$0.55(\pm 0.6)$
$\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$	$0.33(\pm 0.3)$	$0.05(\pm 0.3)$
$[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$	$1.6(\pm 0.2)$	$0.63(\pm 0.7)$
$[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$	$1.78(\pm 1)$	Efecto proliferativo

Tabla 8. Valores de IC_{50} (mM) de los complejos sintetizados y el dicloruro de molibdenoceno en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de colon HT-29.

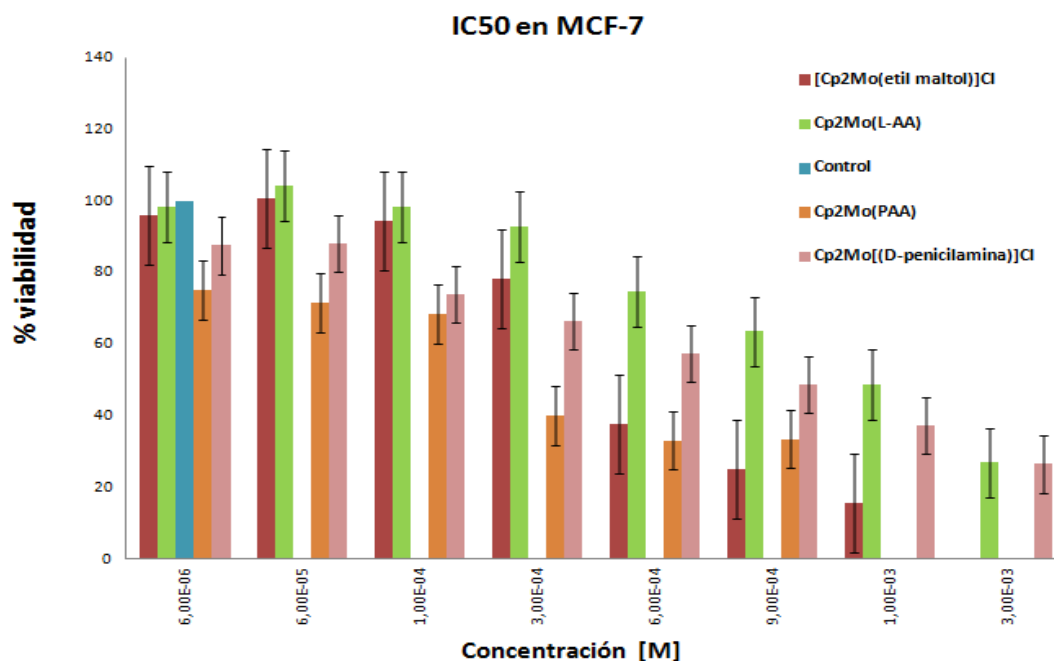


Figura 53. Curvas de respuesta sigmoideal, del IC₅₀ de los complejos sintetizados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

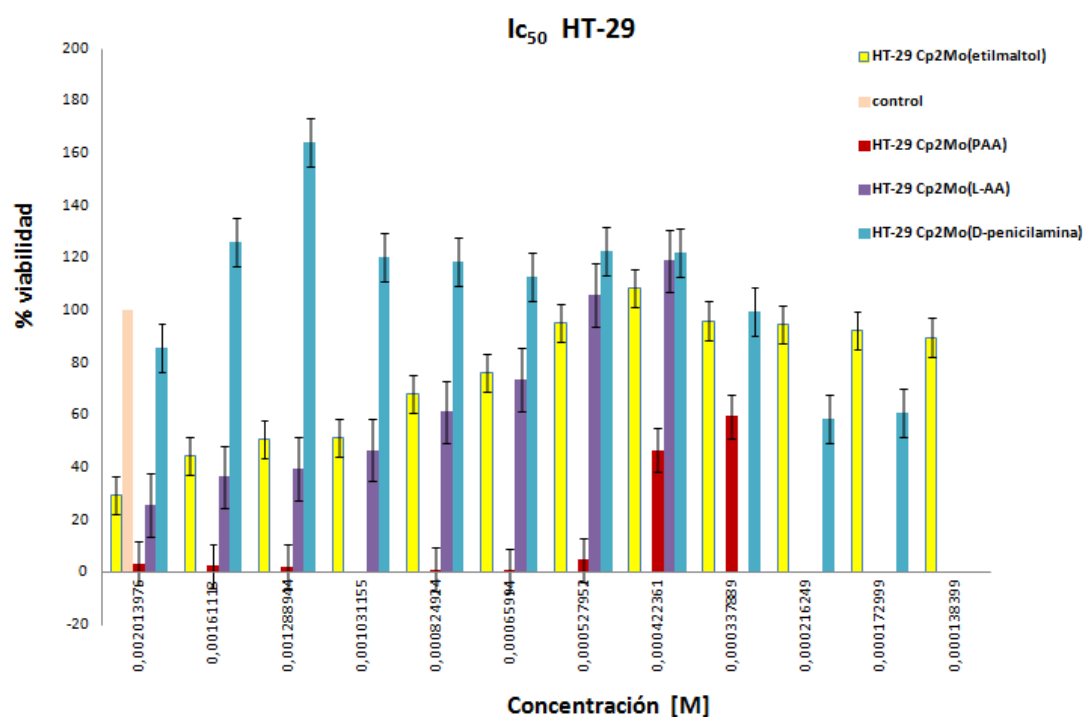


Figura 54. Efecto (IC₅₀) de los complejos sintetizados en la línea celular de cáncer de colon HT-29 después de 72 horas de exposición a la droga.

5. Conclusiones y futuros trabajos

Se sintetizaron cuatro complejos de molibdenoceno substituyendo los cloruros por ligandos bidentados, dando así mayor estabilidad hidrolítica al molibdenoceno. El reemplazo de cloruro por los ligandos 6-o-palmitoil-L-ácido ascórbico, L-ácido ascórbico, etil maltol y D-penicilamina aumentó la actividad citotóxica en MCF-7 comparada con el compuesto de partida el dicloruro de molibdenoceno, quien presenta efectos proliferativos en esta línea celular; y tres de los ligandos excepto el D-penicilamina (efectos proliferativos), mejoraron la citotoxicidad en comparación con el molibdenoceno en la línea cancerosa de HT-29. Estudios electroquímicos sugieren que existe interacción entre todos los complejos y la ubiquitina pero, esta técnica no discrimina que tipo de interacción existe entre ellos, por lo que estos datos no son del todo confiables para explicar la interacción metal-ubiquitina existente pues, además de interacciones enlazantes, hay procesos de difusión, transporte e interfase del electrodo sólido-líquido. Para esto se usó Fluorescencia y Dicroísmo circular (CD). Espectroscopía de Fluorescencia sugiere que todos los complejos interaccionan con ubiquitina a través de interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas, siendo los complejos de D-penicilamina, etil maltol y PAA los de mayor interacción. Por otro lado espectroscopía de CD indica que solo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$ y $[\text{Cp}_2\text{Mo(D-penicilamina)}]\text{Cl}$ inducen cambios estructurales y/o conformacionales entre la ubiquitina, lo que sugiere que su interacción es más fuerte que para los otros complejos.

En trabajos futuros se estudiará más a fondo la interacción de estos complejos mediante CD, para determinar exactamente el sitio en el cual se produce el enlace en la estructura de la proteína; se estudiará la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de

próstata y cerebro, así como estudios *in vivo* de los efectos citotóxicos de éstos complejos.

Referencias Bibliográficas

1. CANCERQUEST; Emory University. <http://www.cancerquest.org>.
2. Rosenberg, B. Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search go on. *In Cisplatin chemistry and biochemistry of a leading anti-cancer drug*, Wiley-VCH: Weinhhheim, **1999**; 3-27.
3. Sadler, P.J.; Guo, Z. Metal complexes in medicine: Design and mechanism of action. *Pure & Appl. Chem.* **1998**, 70(4), 863-871.
4. Harding, M.M.; Mokdsi, G.; Mackay, J. P.; Prodigalidad, M.; Lucas, S.W. Interaction of the antitumor agents molybdocene dichloride with oligonucleotides. *Inorg.Chem.* **1998**, 37, 2432-2437.
5. Sakagami, H.; Satoh, K.; Hakeda, Y.; Kumegawa, M. Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cell Mol Biol.* **2000**, 46(1), 129-143.
6. Salmaso, S.; Pappalardo, J.; Sawant, R.; Musacchio, T.; Rockwell, K.; Caliceti, P.; Torchilin, V. Targeting Glioma Cells in Vitro with Ascorbate-Conjugated Pharmaceutical Nanocarriers. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2348-2355.
7. Kaap, S.; Brechlin, P.; Quentin, I.; Eger, K.; Steinfelder, H.J. Apotosis by 6-o-palmitoyl-L-ascorbic acid coincides with JNK-phosphorylation and inhibition of Mg^{+2} -dependent phosphatase activity. *Biochemical pharmacology.* **2004**, 67, 919-926.
8. Barret, M.C.; Mahon, M.F.; Molloy, K.C.; Stedd, J.W.; Wright, P. Synthesis and structural Characterization of Tin(II) and Zinc(II) derivates of cyclic α -Hydroxyketones, including the structures of $Sn(maltol)_2$, $Sn(tropolone)_2$, $Zn(tropolone)_2$, and $Zn(hinokitiol)_2$. *Inorg. Chem.* **2004**, 40, 4384-4388.
9. Gupte, A.; Wadhwa, S.; Mumper, R. Enhanced intracellular delivery of the reactive oxygen species (ROS)-generating copper chelator D-penicillamine via a novel Gelatin-D-penicillamine conjugate. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1382-1388.

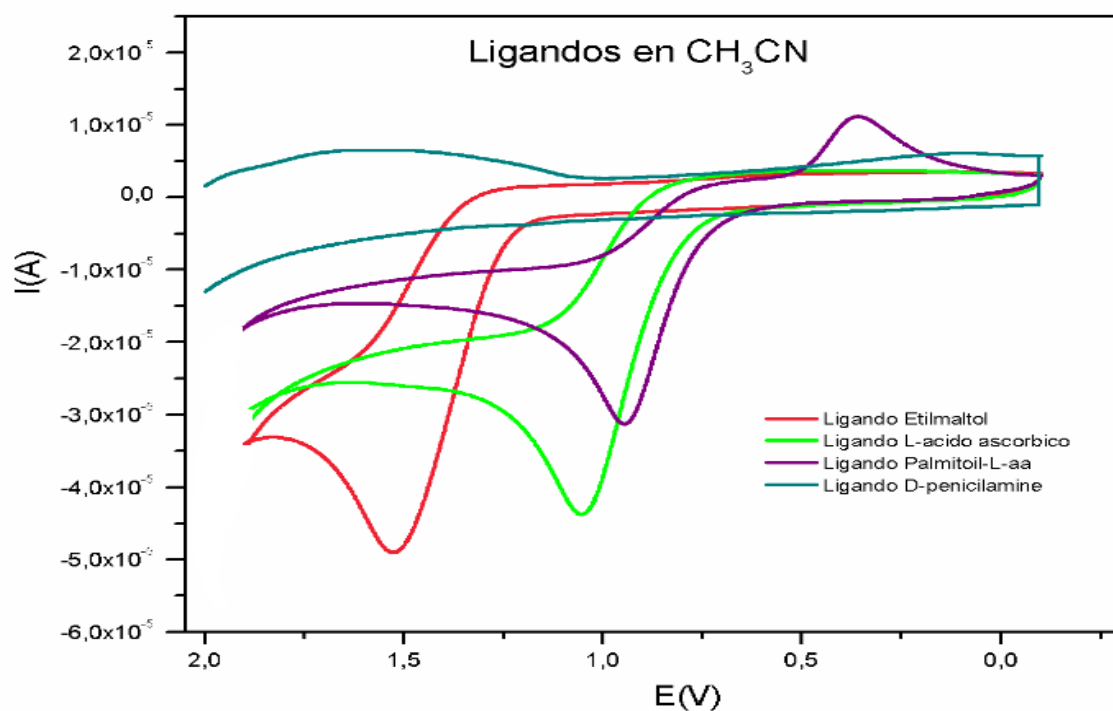
10. Mayer, A.; Wilkinson, K.D. Detection, resolution and nomenclature of Multiple Ubiquitin Carboxyl-terminal esterases from Bovine Calf Thymus. *Biochemistry*. **1989**, *28*, 166-172.
11. Fisher, R. D.; Wang, B.; Alam, S. L.; Higginson, D. S.; Robinson, H.; Wesley, I.; Sundquist, W. I.; Hill, C.P. Structure and Ubiquitin Binding of the Ubiquitin-interacting Motif. *The Journal of Biological Chemistry*. **2003**, *278*, 28976-28984.
12. Carrasco, R.; Bustamante, M.; Gonzalez, O.; Guajardo, L.; Palomo, I. Desgaste muscular en caquexia asociada a neoplasia: mecanismos proteoliticos implicados. *Rev. Biomed*. **2007**, *18*, 182-191.
13. Miller, S.; Malotky, E.; O'Bryan, J.P. Analysis of the Role of Ubiquitin-interacting Motifs in Ubiquitin Binding and Ubiquitylation. *J. Biol. Chem*. **2004**, *279*, 33528-33537.
14. Peleg-Shulman, T.; Najajreh, Y.; Gibson, D. Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics and reactivity. *J. Inorg. Bio*. **2002**, *91*, 306-311.
15. Casini, A.; Gabbiani, Ch.; Michelucci, E.; Messori, L. Exploring metallodrug-protein interactions by mass spectrometry: comparison between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound. *J. Biol. Inorg. Chem*. **2009**, *14*, 761-770.
16. Williams, J.; Phillips, H.; Campuzano, I.; Sadler P.J. Shape changes induced by N-terminal platination of ubiquitin by cisplatin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2010**, *21* (7), 1097-1106.
17. Cooper, R.L.; Green, M.L.H. Some bis- π -cyclopentadienyl halides of molybdenum, tungsten, and rhenium. *J. Chem. Soc. A*. **1967**, 1155-1160.
18. Köpf-Maier, P.; Voithländer, R.; Köpf, H. Molybdenocene-dichloride also Antitumor-Agens. *Naturforscher* , **1979**, *34C*, 1174.

19. Kuo, L.Y.; Kanatzidis, M.G.; Sabat, M.; Tipton, A.L.; Marks, T.J. Metallocene antitumor agents. Solution and solid-state molybdenocene coordination chemistry of DNA constituents. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9027-9045.
20. Vujevic, G.; Janiak, C. Structural studies of Bis(cyclopentadienyl)molybdenum-amino acid complexes. *Z. Anorg. Allg. Chemi.* **2003**, *629*, 2585-2590.
21. Waern, J. B.; Harding, M. M. Coordination Chemistry of the antitumor metallocene molybdocene dichloride with biological ligands. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 206-213.
22. Erxleben, A. Interaction of molybdocene dichloride with Cysteine- containing peptides: Coordination, regioselective hydrolysis and intramolecular aminolysis. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1082-1094.
23. Vera, J.L.; Román, F.; Meléndez, E. Study of titanocene- DNA and molybdenocene-DNA interactions by inductively couple plasma atomic emission spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 399-403.
24. Chávez-Gil, T.; Meléndez, E. Synthesis, spectroscopic and electrochemical characterization of water soluble $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Mo}(\text{thionucleobase/thinucleoside})]\text{Cl}_2$ complexes. *Inorg. Chimica Acta.* **2004**, *357*, 1092-1102.
25. Feliciciano, I.; Matta, J.; Meléndez, E. Water-soluble molybdenocene complexes with both proliferative and antiproliferative effects on cancer cell lines and their binding interactions with human serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*(7), 1109-1117.
26. Guichard, S.M.; Else, R.; Reid, E.; etc and Jordrell D.I. *Biochemical Pharmacology.* **2006**, *71*, 408-415.
27. Gomez-Ruiz, S.; Kaluderovic, G.N.; Zizak, Z.; Besu, I.; Juranic Z.D.; Prashar S.; Fajardo, M. Anti-cancer drugs based on alkenyl and boryl substituted titanocene complexes. *Journal of organometallic Chemistry.* **2009**, *694*, 1981-1987.
28. Rodríguez, M.I., Chávez-Gil, T., Colón Y., Diaz, N.; Meléndez E. Molybdenocene-DNA interaction studies using electrochemical analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* **2005**, *576*(2), 315-322.

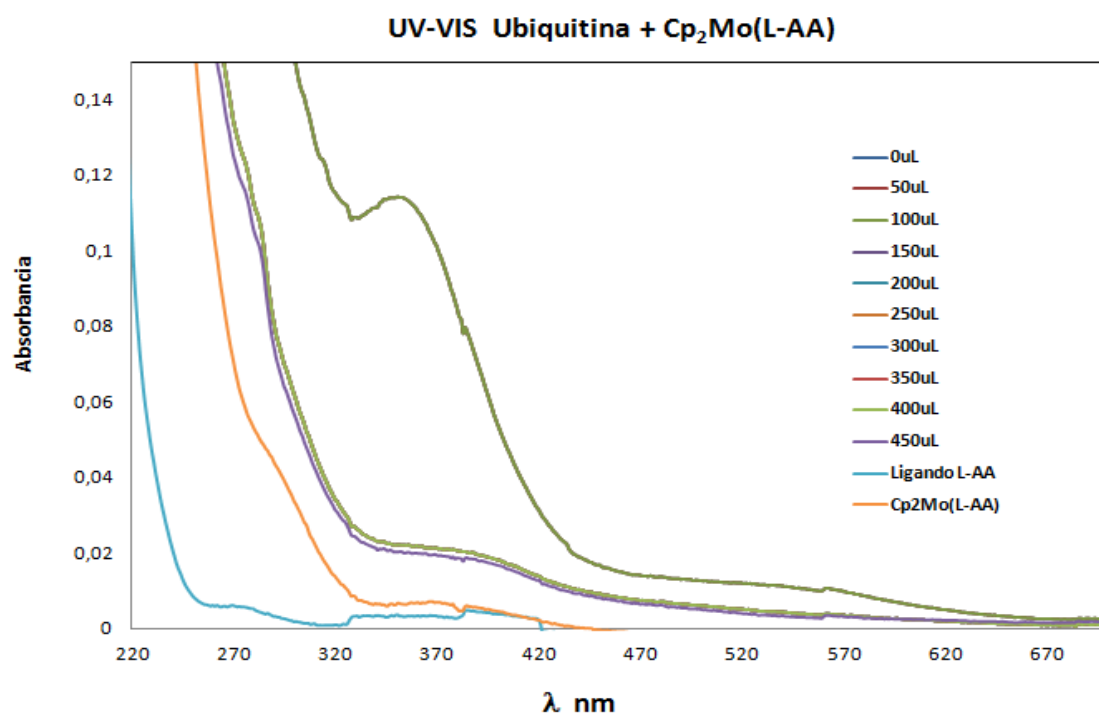
29. Tinoco, A.D.; Eames, E.V.; Valentine, A.M. Reconsideration of serum Ti (IV) transport: albumin and transferrin trafficking of Ti(IV) and its complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2262-2270.
30. Palencia, A. Reconocimiento de secuencias ricas en prolina por dominios modulares de interacción proteína-proteína. *Tesis doctoral, facultad de ciencias, Universidad de granada*, **2008**.
31. Lu, Y.; Feng, Q.; Cui, F.; Xing, W.; Zhang, G.; Yao, X. Interaction of 3'-azido-3'-deamino daunorubicin with human serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, *20*, 6899-6904.
32. Bamezai, S.; Banez, M.A.; Breslow, E. Structural and functional changes associated with modification of the Ubiquitin methionine. *Biochemistry*. **1990**, *29* 5389-5395.
33. Kliger, D.; Lewis, J.; Randal, C.E. *Polarized light in optics and spectroscopy*. **1990**, Academy press, Boston.
34. Jenson, J.; Goldstein, G.; Breslow, E. Physical-Chemical Properties of Ubiquitin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1980**, *624*, 378-385.
35. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence*, 3rd edition; Springer. University of Maryland. **2006**.
36. Clark, M.; Zhu, F.; Frasca, D.R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2511-2533.
37. Meléndez, E. Titanium complexes in cancer treatment: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 309.
38. Kopf-Maier, P; Kopf, H.; Antitumor activity of molybdenocene dichloride Cp_2MoCl_2 . *J.Organomet. Chem.* **1988**, *342*, 167.
39. Pérez, Y.; López, V.; Melendez, E. Water-soluble titanocene complexes with sulfur-containing aminoacids: synthesis, spectroscopic, electrochemical and Ti (IV)-transferrin interaction studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 94-104.

40. Kuo, L.Y.; Kanatzidis, M.; and Marks, T.J. Metallocene antitumor agents. Unusual Mo ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$)₂Cl₂ nucleotide/nucleobase aqueous coordinate on chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7207-7209.
41. Kopf-Maier, P.; Klapotke, T. Antitumor activity of ionic niobocene and molybdenocene complexes in high oxidation states. *J. Cancer res. Clin. Oncol.* **1992**, *118*, 216-221.
42. Arencibia, D.F.; Rosario, L.A.; Curveco, D. L. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea.* **2003**, 40-52.
43. Kotz, J.C.; Vining, W.; Coco, W.; Rosen, R.; Romao, A.; Garcia, M.H. Oxidative electrochemistry of compounds of the type ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$)₂MX₂ where M=Ti (IV), Mo(IV) and W(IV) and X= halide, thiolate, or ferrocenyl. *Organometallics.* **1983**, *2*, 68-79.

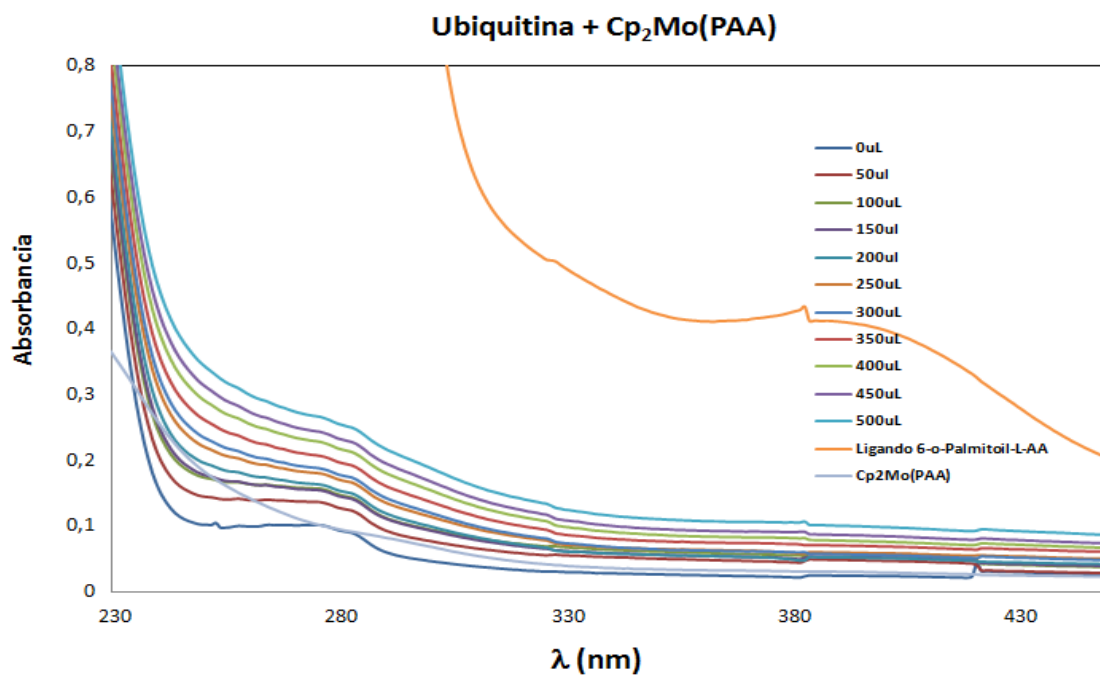
Apéndices



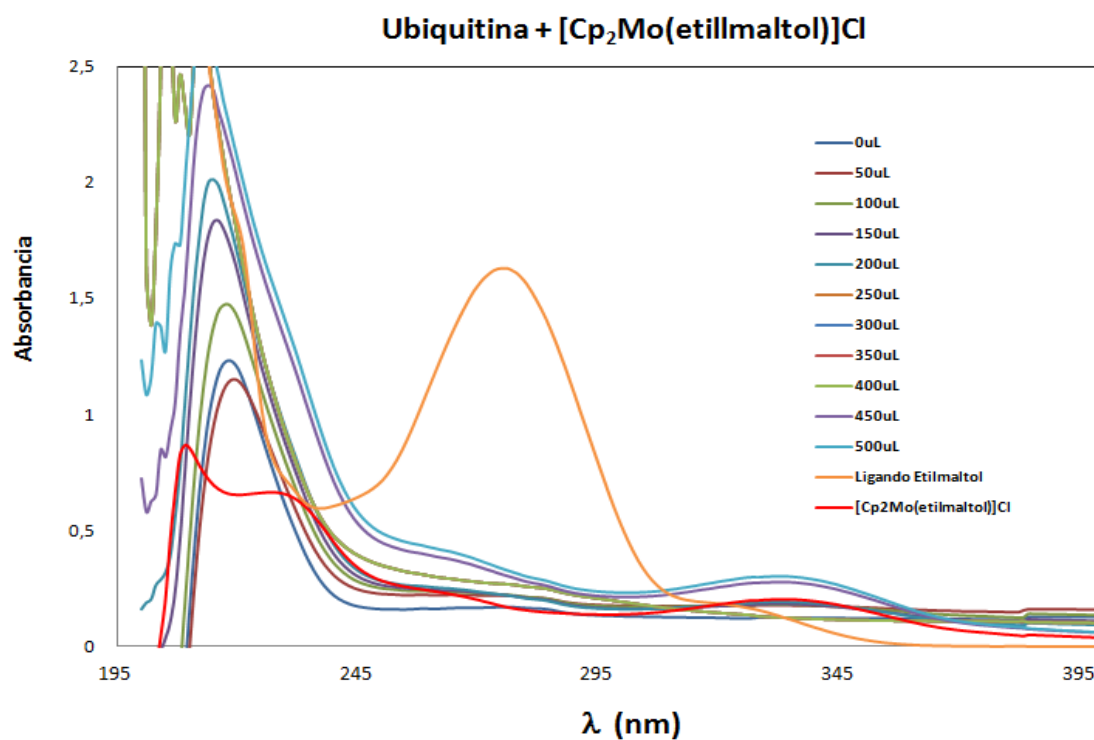
Apéndice 1. Voltamogramas cíclicos de los ligandos usados para sintetizar los nuevos complejos en CH₃CN con ([NBu₄]PF₆) 0.1 M como electrolito de soporte.



Apéndice 2. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo Cp₂Mo(L-AA), a condiciones fisiológicas.



Apéndice 3. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo $\text{Cp}_2\text{Mo(PAA)}$, a condiciones fisiológicas.



Apéndice 4. Espectro electrónico UV-VIS de la titulación de Ubiquitina, con el complejo $[\text{Cp}_2\text{Mo(etil maltol)}]\text{Cl}$, a condiciones fisiológicas.