



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PRUEBAS
DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA
DE NUEVAS FERROCENIL ESTIBINAS”**

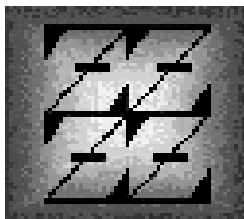
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ELIZABETH REYES LUENGAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. PANKAJ SHARMA



MÉXICO D.F., 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Química Inorgánica 1 y en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Pankaj Sharma y asesoría técnica del Dr. Noé Rosas Espinosa.

El trabajo de investigación que se presenta para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, fue realizado gracias al apoyo financiero otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGPA, proyecto N° IN-218901) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto N° 38761-E).

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida
y esta profesión.

A mis padres, familia y amigos
por apoyarme incondicionalmente.

A la generosidad, paciencia y comprensión
de las personas que me apoyaron para
la culminación de este proyecto.

ÍNDICE

	página
Abreviaturas y acrónimos.....	i
Lista de figuras y esquemas.....	iii
Lista de tablas.....	iv
Lista de espectros.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEÓRICO.....	3
A. Generalidades del ferroceno.....	3
1. Química del ferroceno.....	3
2. Aplicaciones biomédicas del ferroceno.....	5
B. Generalidades del antimonio.....	7
1. Método de síntesis de estibinas terciarias.....	9
C. Proceso oxidativo.....	10
1. Definición de radical libre.....	11
a. Efecto de los radicales libres en el organismo.....	13
b. Patologías relacionadas con el efecto de los radicales libres.....	14
2. Antioxidantes.....	15
a. Definición de antioxidante.....	15
b. Sistema antioxidante endógeno.....	17
c. Sistema antioxidante exógeno.....	17
3. Lipoperoxidación espontánea.....	19
4. Métodos para determinar actividad antioxidante.....	21
a. Método de DPPH.....	21

b. Ensayo de SRATB.....	22
D. Cáncer.....	24
1. Definición de cáncer.....	25
a. Tipos de cáncer.....	25
b. Agentes que causan cáncer.....	26
2. Citotoxicidad.....	27
a. Estimación de citotoxicidad.....	28
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
III. OBJETIVOS.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
A. Diagrama de flujo.....	32
B. Línea mixta de vacío-gas inerte.....	33
1. Técnica de Schlenk.....	34
C. Síntesis química de nuevas ferrocenil estibinas terciarias.....	35
1. Metodología.....	35
a. Material, equipo y reactivos.....	35
b. Procedimiento.....	36
c. Extracción y purificación.....	39
D. Evaluación biológica.....	39
1. Reducción del radical de DPPH.....	39
a. Material, equipo y reactivos.....	39
b. Procedimiento.....	40
2. Ensayo de SRATB.....	41
a. Material, equipo y reactivos.....	41

b. Procedimiento.....	42
3. Citotoxicidad.....	44
VI. RESULTADOS.....	45
A. Compuestos sintetizados.....	45
B. Actividad antioxidante.....	49
1. Reducción del radical DPPH.....	49
2. Ensayo de SRATB.....	49
C. Actividad citotóxica.....	52
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	53
VIII. CONCLUSIONES.....	59
IX. REFERENCIAS.....	60
X. APÉNDICE.....	66
A. Concentración inhibitoria al 50% de la Quercetina y BHT.....	66
B. Curva estándar del Malondialdehído.....	66
C. Espectros de las ferrocenilestibinas.....	68
1. Cloro bis [dimetil (1-ferroceniletil) amina] de antimonio (III).....	68
a. Espectro de IR.....	68
b. Espectro de masas (FAB ⁺).....	69
c. Espectro de RMN- ¹ H.....	70
d. Espectro de RMN- ¹³ C.....	71
2. Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina.....	72
a. Espectro de IR.....	72
b. Espectro de masas (FAB ⁺).....	73
c. Espectro de RMN- ¹ H.....	74
d. Espectro de RMN- ¹³ C.....	75

3. 1-(2-difenilestibanyl ferrocenil) etil dimetilamina.....	76
a. Espectro de IR.....	76
b. Espectro de masas (FAB ⁺).....	77
c. Espectro de RMN- ¹ H.....	78
d. Espectro de RMN- ¹³ C.....	79
4. Dicloro [tris (dimetilaminoetil) ferrocenil estibina N, Sb] de platino (II).....	80
a. Espectro de IR.....	80
b. Espectro de masas (FAB ⁺).....	81

Lista de abreviaturas y acrónimos

Å	Angstrom
Acetil CoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
BHT	<i>Tert</i> -butilhidroxitolueno
<i>c</i>	Cuarteto
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
COSY	Correlación espectroscópica ¹ H- ¹ H
Cp	Ciclopentadienilo
δ	Desplazamiento
<i>d</i>	Señal doble
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	Radical de 2,2-difenil-1-picril hidracilo
EM(FAB ⁺)	Espectrometría de masas por Bombardeo atómico rápido positivo
ERNO	Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HETCOR	Correlación espectroscópica ¹ H- ¹³ C
IR	Infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LBD	Lipoproteínas de baja densidad
<i>m</i>	Multiplete
[M] ⁺	Ión molecular
MDA	Malondialdehído
MHz	Megahertz
mm	Milimoles
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
nm	Nanomoles
ppm	Partes por millón
RL	Radical libre
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Señal simple
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos, pH=7.4
SRATB	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
μL	Microlitros
μM	Micromoles
<i>ν</i>	Vibración de los enlaces expresados en cm ⁻¹

Nota: en el trabajo las siglas están escritas en el idioma español.

Lista de figuras

(Título, página)

- Figura 1. Estructura del ferroceno, 3
- Figura 2. Compuestos que contienen ferroceno, 7
- Figura 3. Estructura piramidal del antimonio, 9
- Figura 4. Línea mixta de vacío-gas inerte, 33
- Figura 5. Numeración de protones y carbonos, 54

Lista de esquemas

(Título, página)

- Esquema 1. Acilación de Friedel- Crafts, 4
- Esquema 2. Condensación de Mannich, 4
- Esquema 3. Litiación del ferroceno, 5
- Esquema 4. Reacciones de haluros de antimonio, 10
- Esquema 5. Formación del malondialdehído, 20
- Esquema 6. Reducción del radical DPPH, 22
- Esquema 7. Reacción del MDA con el ATB, 24
- Esquema 8. Reacción general de las ferrocenilestibinas, 37
- Esquema 9. Reacción de ferrocenilestibina con tetracloroplatinato, 38

Lista de tablas

(Título, página)

- Tabla 1 Propiedades relevantes del antimonio, 8
- Tabla 2 Radicales libres y características químicas fundamentales, 12
- Tabla 3 Patologías relacionadas con los radicales libres, 15
- Tabla 4 Defensas antioxidantes, 16
- Tabla 5 Factores cancerígenos, 27
- Tabla 6 Porcentaje de reducción del DPPH, 49
- Tabla 7 Porcentaje de inhibición sobre la peroxidación de lípidos, 50
- Tabla 8 Concentración inhibitoria al 50%, 51
- Tabla 9 Porcentaje de inhibición del crecimiento en células cancerosas, 52

Lista de espectros

(espectro, compuesto, página)

Espectro de IR

Espectro de EM (FAB⁺)

Espectro de RMN-¹H Cloro bis[dimetil(1-ferroceniletíl)amina] de antimonio

Espectro de RMN-¹³C (III), 68

Espectro de IR

Espectro de EM (FAB⁺)

Espectro de RMN-¹H

Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina, 72

Espectro de RMN-¹³C

Espectro de IR

Espectro de EM (FAB⁺)

Espectro de RMN-¹H

Espectro de RMN-¹³C 1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina, 76

Espectro de IR

Espectro de EM (FAB⁺)

Dicloro [tris-(dimetilaminoetil) ferrocenil estibina
N,Sb] de platino (II), 80

RESUMEN

El trabajo de tesis experimental comprendió la síntesis, identificación y caracterización de las nuevas ferrocenil estibinas, así como la determinación de la actividad antioxidante y citotóxica. Las nuevas ferrocenil estibinas se sintetizaron en condiciones de atmósfera inerte, empleando la monolitiación de ferroceno y adición de tricloruro de antimonio ó cloruro de difenil estibina, para obtener la correspondiente ferrocenil estibina. Asimismo, se caracterizaron mediante la Espectroscopia en el Infrarrojo, la Resonancia Magnética Nuclear, la Espectrometría de Masas y Difracción de Rayos X.

En cuanto a la actividad antioxidante, ésta se comprobó a través de dos métodos: 1) reducción del radical libre estable 2,2-difenil picril hidracilo (DPPH) y 2) el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB), en la inhibición de peroxidación de lípidos en cerebro de rata. En el primer método las ferrocenil estibinas no mostraron actividad antioxidante, ya que no redujeron el radical DPPH; mientras que en el segundo método, los compuestos inhibieron la peroxidación de lípidos a una concentración más baja que los antioxidantes de referencia (BHT y quercetina). La prueba de citotoxicidad se realizó manejando linfocitos normales y cinco líneas celulares cancerosas (sistema nervioso central, leucemia, colon, próstata y mama), en donde se demostró que los compuestos son citotóxicos.

INTRODUCCIÓN

La investigación de nuevos fármacos para combatir las enfermedades que atacan al hombre, ha sido una de las principales metas que se han planteado muchos investigadores de todo el mundo; por lo que se investiga la síntesis de nuevos compuestos que ayuden a combatir las enfermedades como la malaria y el cáncer, las cuales son un problema de salud mundial.

En la actualidad, unos 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica en África, Asia Sur-Oriental y América del Sur y se estima que anualmente causa un millón de muertes. En lo que respecta al cáncer es, sin duda, una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país desde finales del siglo XX convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo–individuales y ambientales– con los que se asocia. Cada año se presentan más de seis millones de muertes por algún tipo de neoplasia maligna en el ámbito mundial. De ahí la importancia de generar nuevos compuestos que permitan contrarrestar estos problemas de salud.¹

La síntesis de derivados de ferroceno ha despertado un gran interés, debido a que es una entidad muy versátil, ya que es posible introducir dentro del anillo ferrocénico un gran número de sustituyentes diferentes como fosfinas, aminas, tioéteres, entre otros.² En los últimos años, se han dado a conocer compuestos derivados de ferroceno efectivos contra la malaria. Entre ellos se encuentra un derivado de artemisina y la ferrocloroquina, los cuales atacan principalmente al *plasmodium falciparum*.^{3, 4}

Por otro lado, recientemente ha surgido un campo de aplicación potencial de derivados de ferroceno, ya que se ha encontrado que algunos compuestos muestran actividad antineoplásica; se ha demostrado que ciertas sales ferrocénicas son más efectivas que el cisplatino. Así, Jaouen y colaboradores demostraron que el ferrocifeno, tanto el isómero *E* como el *Z*, tienen la capacidad de interaccionar con el receptor de estrógeno, que propicia el cáncer de seno. Asimismo, recientemente se publicó que en dos compuestos análogos del tamoxifeno pero derivados del ferroceno, se identificó una actividad antioxidante significativa contra las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ERNO).^{5, 6}

Por otra parte, hasta ahora sólo las ferrocenilfosfinas han sido bien estudiadas y solamente existe un informe en la literatura sobre estibinas con grupos ferrocénicos no sustituidos, la cuales fueron aisladas y caracterizadas por CLAR.⁷ Además, recientemente nuestro grupo de trabajo publicó algunos nuevos compuestos estibínicos conteniendo anillos aromáticos heterocíclicos, en los cuales se encontró actividad antitumoral con una notable selectividad.^{8, 9}

En base a esto, surge el interés por generar compuestos aminoferrocenil estibínicos, los cuales podrían presentar una actividad farmacológica importante, como anticancerígenos y antioxidantes.

I. MARCO TEÓRICO

A. Generalidades del Ferroceno

La estructura de emparedado del ferroceno fue sugerida en 1952, tras el descubrimiento por G. Wilkinson y E.O. Fischer de manera independiente y confirmada más tarde por cristalografía de rayos X. Fue el primer derivado de hidrocarburo de hierro puro preparado, cuya estabilidad excepcional causó gran entusiasmo entre los investigadores. En el transcurso de los años se han sintetizado derivados de dicitropentadienilo, de los elementos de la primera serie de transición desde vanadio hasta níquel, inclusive rutenio y osmio.¹⁰

El ferroceno es también conocido como dicitropentadienilo de hierro, cuya fórmula química es: $C_{10}H_{10}Fe$. Los ligantes ciclopentadienilo (Cp) están unidos al átomo de hierro, ocupando éste el centro del complejo (figura 1).

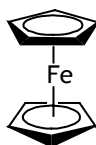
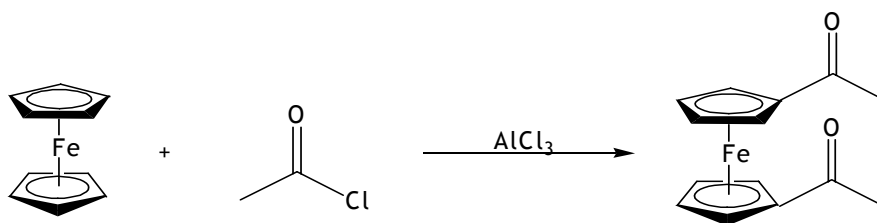


Figura 1. Estructura del ferroceno

La estructura de ferroceno es la más simple y estable de todos los metallocenos. Son denominados metallocenos debido a que los anillos de ciclopentadienilo reaccionan y se comportan muy similar al anillo del benceno.¹¹

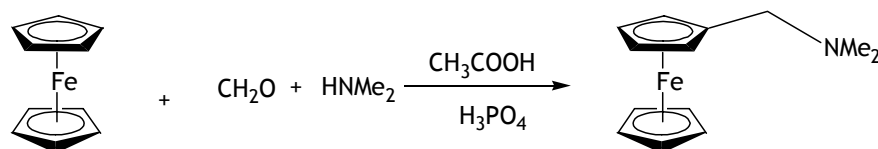
1. QUÍMICA DEL FERROCENO

Los metallocenos son sólidos cristalinos coloreados, la mayoría funden alrededor de 173 °C, son estables térmicamente y subliman rápidamente bajo presión reducida. El ferroceno es notablemente resistente al aire, humedad y descomposición térmica; sin embargo, experimenta algunas reacciones obteniendo numerosos derivados de ferroceno.¹³ En el ferroceno se puede llevar a cabo la acilación de Friedel-Crafts, empleando cloruro de acetilo y cloruro de aluminio para obtener un compuesto diacetilo, con un grupo acetilo sustituido en cada uno de los anillos Cp¹³ (esquema 1).



Esquema 1. Acilación de Friedel- Crafts

El anillo de ferroceno presenta una extensa variedad de reacciones de sustitución electrofílica, el único problema con los electrófilos involucra el hecho de que el átomo de hierro en el ferroceno por sí sólo es un buen nucleófilo.¹³ Un ejemplo de la reactividad de los anillos de ferroceno, se muestra en el esquema 2, la cual es una condensación de Mannich.¹³

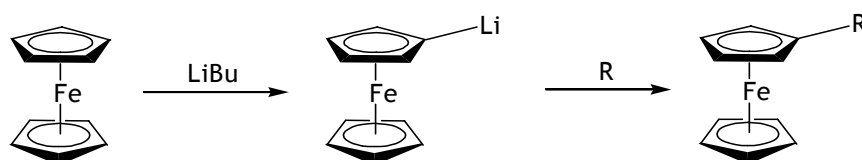


Esquema 2. Condensación de Mannich

Las transformaciones a derivados de ferroceno ocurren mayormente por sustitución electrofílica o por reacciones que involucran metalación de primer paso.^{14, 15} Así, el monolitioferroceno es el reactivo clave para la preparación

de ferrocenos sustituidos y que usualmente se preparan por uno de los tres procedimientos siguientes:¹⁶

- Litiación de ferroceno por exceso de n-butilio en éter dietílico a temperatura ambiente. Se ha reportado un 25% de monolitioferroceno formado, el restante corresponde al ferroceno que no reaccionó¹⁵⁻¹⁷ (Esquema 3).



Esquema 3. Litiación del ferroceno

- Reacción de Intercambio halógeno-metal entre bromoferroceno y n-butilio en éter dietílico. El monolitioferroceno es obtenido con excelentes rendimientos¹⁸.
- Transmetalación entre ferroceno cloromercúrico y n-butilio en éter dietílico. El rendimiento obtenido de monolitioferroceno es cercano al 65%.^{19,20}

2. APLICACIONES BIOMÉDICAS DEL FERROCENO

La bioquímica del cáncer es extraordinariamente compleja, pero universalmente se ha aceptado que los radicales libres juegan un rol importante, sobre todo en la promoción de carcinogénesis y tumores. Se ha encontrado que el proceso carcinogénico y metastático puede inhibirse por medio de antioxidantes inhibidores de radicales libres; así, se ha descubierto que la actividad carcinostática es favorecida por medio de complejos de

metales que sirven de neutralizadores del radical anión superóxido.²¹

Algunos compuestos que contienen metales son buenos agentes reductores, por ejemplo, los radicales hidroxilo y superóxido oxidan fácilmente al ferroceno hasta el ión ferrocenio, el cual es muy estable; por lo tanto, esta actividad redox puede servir para eliminar el efecto de los radicales libres en el organismo. Además, se ha observado que el ferroceno podría servir como un buen agente antioxidante y antineoplásico.²¹ En los últimos años se han sintetizado polímeros conjugados conteniendo ferroceno y sales ferrócénicas monoméricas, las cuales han manifestado una notable actividad antineoplásica ante ascitos de Erlich (tumor en ratones).²² Por lo que, en un futuro podrían convertirse en agentes terapéuticos potentes.

Recientemente se publicó, que en dos compuestos análogos del tamoxifeno, pero derivados del ferroceno conocidos como el [1-(4-hidroxifenil)-1-(fenil)-2-ferrocenil-but-1-eno] y el 1-di-(4-hidroxifenil)-2-ferrocenil-but-1-eno, se identificó una actividad antioxidante significativa contra las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ERNO), al utilizar la técnica de Resonancia de espín electrónico (REP) y Espectrofotometría UV-VIS.²³ Además de que estos dos compuestos se han estudiado ampliamente en células cancerosas de mama, demostrando tener efectos antiproliferativos contra éste tipo de cáncer, el cual afecta a una de cada nueve mujeres en todo el mundo.

En cuanto a la malaria, ésta es una enfermedad infecciosa causada por un protozoo unicelular del género *Plasmodium*, que afecta principalmente al hombre. Recientemente se publicó que derivados de artemisina y cloroquina que contienen un núcleo ferrocénico muestran una potente

actividad contra la especie *falciparum*.²⁴

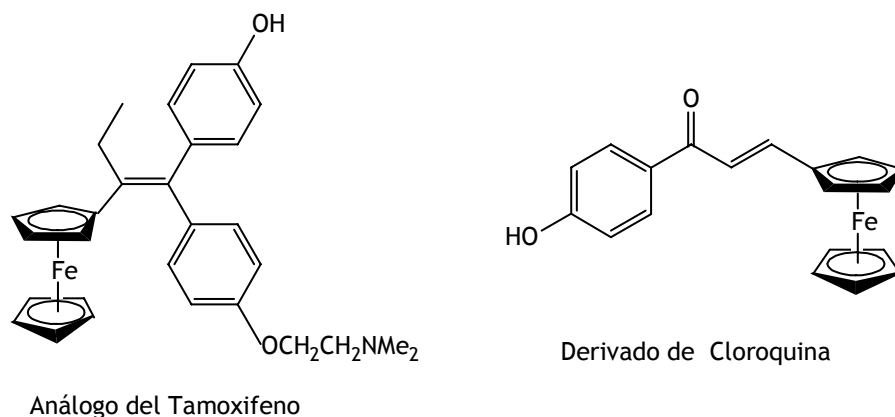


Figura 2. Compuestos que contienen ferroceno

B. Generalidades del Antimonio

Los elementos: nitrógeno, fósforo, arsénico, antimonio y bismuto pertenecen al grupo 15 ó VA de la tabla periódica, la cual constituye la tercera columna de bloque *p*. Para estos elementos la configuración electrónica del estado basal corresponde a ns^2np^3 y generalmente presentan estado de oxidación de III y V.²⁵

Aunque pertenecen al mismo grupo, las propiedades de los elementos varían considerablemente al descender en este. Así, los ángulos de enlace disminuyen conforme se desciende en el grupo, cuyo fenómeno se fundamenta en el efecto del par inerte. Asimismo se observa que el par de electrones *s*, está menos disponible, por lo tanto, los enlaces que se forman ocurren principalmente en los orbitales *p*, lo cual permite que los ángulos de enlace se aproximen a 90° .²⁵ La estructura electrónica y algunas propiedades del antimonio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades relevantes del Antimonio²⁵

Propiedades	Antimonio
Símbolo	Sb
Número atómico	51
Masa atómica (g/mol)	121.76
Estado de agregación	Sólido
Radio covalente (Å)	1.38
Radio atómico (Å)	1.59
Radio iónico (Å)	0.89 Sb (III) y Sb (V)
Radio de Van Der Waals (Å)	2.20
Electronegatividad	1.9
Densidad (g/mL)	6.62
Punto de ebullición	1380° C
Punto de fusión	630.5° C
Configuración electrónica	[Kr]364d105s25p3
1 ^{er} potencial de ionización (Ev)	8.68
Isótopos (%) de abundancia	121 (57.25) y 123 (42.75)

De acuerdo al Modelo de Repulsión del Par Electrónico de la Capa de Valencia (MRPECV), para los compuestos de estado de oxidación (+3), con fórmula general R₃ME (donde M= N, P, As, Sb o Bi; R= alquilo o arilo y E= par electrónico libre), presentan la forma piramidal con un enlace de valencia promedio que disminuye de arsénico a bismuto, llegando a medir cerca de 90° y cuyo par electrónico libre ocupa la posición apical. El antimonio presenta un ángulo de enlace de 97°, aunque la geometría exacta y los ángulos de enlace entre los sustituyentes dependen del grado de repulsión producido por el par

electrónico libre y por la actividad estereoquímica del mismo (figura 4).²⁵

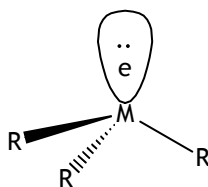


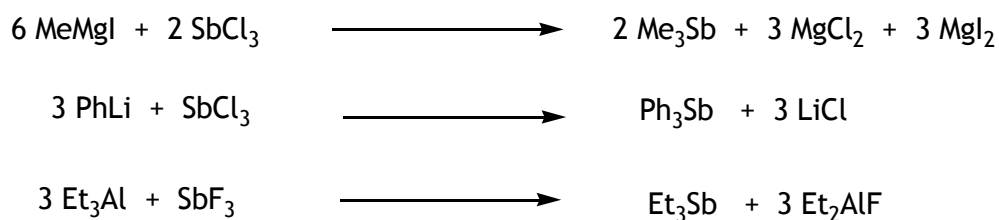
Figura 3. Estructura piramidal del antimonio.

El antimonio (Sb) forma triorganometálicos en estado de oxidación III, los cuales normalmente actúan como bases de Lewis o donadores de pares electrónicos. Los trihaluros de antimonio (con excepción de los fluoruros) se descomponen parcialmente y de forma reversible con formación de compuestos insolubles que contienen los cationes SbO^+ (antimonilo). Algunos de los trihaluros de antimonio forman compuestos de adición fundamentalmente del tipo 1:1 con moléculas orgánicas como donadoras de pares electrónicos. Los tricloruros de antimonio tienen muy poca tendencia a utilizar sus pares de electrones no compartidos en reacciones del tipo donador-aceptor.²⁵

1. METODO DE SÍNTESIS DE ESTIBINAS TERCIARIAS

El ferroceno es el reactivo de partida para la preparación de numerosos derivados usados en el área de la Química Inorgánica, Ciencias de materiales, en Catálisis, etc.

Los enlaces carbono-antimonio se forman fácilmente por medio de la reacción entre un haluro de antimonio y un compuesto organometálico, así como con un reactivo grignard, organolitado u organoaluminio.²⁶ En el esquema 4, se muestran ejemplos.



Esquema 4. Reacciones de haluros de antimonio.

Los compuestos organolitios son bases fuertes y reaccionan instantáneamente con donadores de protones. Uno de los métodos utilizados para sintetizar estibinas terciarias ha sido la reacción de metátesis (metalación) con reactivos organolitios, los cuales pueden reaccionar con trihalogenuros de antimonio y producir las estibinas con rendimientos aceptables. Las reacciones de metátesis se llevan a cabo entre dos compuestos, que reaccionan para formar dos nuevos compuestos sin que se produzca cambio en el número de oxidación.²⁶

C. Proceso Oxidativo

Se denomina sustancia oxidante a todo aquel compuesto que tiene la capacidad de oxidar otras moléculas. Los reactantes del oxígeno se producen como una consecuencia inevitable de la vida aeróbica y su control es determinante para conservar los efectos benéficos sobre procesos tan importantes como la conversión del piruvato en Acetil CoA, la conversión del ácido glutámico en protombina, etc.²⁷

El equilibrio de las sustancias oxidantes en el organismo se mantienen gracias a tres líneas de defensa: antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos y genes inducibles por el estrés oxidativo. Si no se logra el equilibrio

en los niveles de oxidantes y antioxidantes, el resultado final será un proceso patológico, donde las sustancias oxidantes catalizan reacciones oxidativas sobre las proteínas, el ADN y los lípidos principalmente.²⁸

El proceso de oxidación de una sustancia se puede dar por la pérdida de un electrón ó por la ganancia de un átomo de oxígeno. Aunque se postuló que la toxicidad del oxígeno es ocasionada por la inactivación directa de las enzimas celulares; investigadores como Gershman y Gilbert propusieron que los efectos nocivos del oxígeno se debían a los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno (ERO); los radicales libres son los más reactivos en el proceso oxidativo.²⁹

1. DEFINICIÓN DE RADICAL LIBRE

Un radical libre (RL) se define como aquella molécula ó átomo que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad.^{28, 30}

Es una entidad química muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de moléculas que forman parte de la estructura celular, como son los carbohidratos, los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y los derivados de cada uno de ellos.³¹

Un radical libre para lograr su equilibrio químico, sustrae un electrón a cualquier molécula vecina, provocando la oxidación de la misma, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre con diversos grados

de capacidad oxidativa; se genera así una reacción en cadena.²⁸ En la tabla 2 se resumen los principales radicales libres y sus características.

Tabla 2. Radicales libres y características químicas fundamentales.²⁸

Nombre	Fórmula	Características
Átomo de hidrógeno	H	Radical libre más simple.
Anión Superóxido	$^{\circ}\text{O}_2^-$	Radical centrado en el oxígeno con reactividad limitada.
Hidroxilo	$^{\circ}\text{OH}$	Radical centrado en el oxígeno muy reactivo, ataca a todas las moléculas del organismo humano.
Peroxilo, acoxilo	ROO° , RO°	Radicales centrados en el oxígeno y formados (además de otras vías) durante la degradación de los peróxidos orgánicos.
Óxidos de nitrógeno	NOO° , NO°	El óxido nítrico (NO°) se forma <i>in vivo</i> a partir del aminoácido L-arginina. El dióxido de nitrógeno (NO_2°) se produce cuando el NO reacciona con O_2 presente en el aire contaminado y en el humo de la materia orgánica en combustión (humo de cigarrillo).

Los radicales libres se generan continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo un almacenamiento de RL particular en cada especie celular y en algunos tipos logran una mejor adaptación a su hábitat. Cuando aumentan o disminuyen las concentraciones en el organismo de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se pueden presentar reacciones fisiológicas importantes.^{31, 33}

a. Efecto de los radicales libres en el organismo

Numerosos estudios han mostrado la relación de los RL en la etiología de diversas patologías.²⁹ Como se mencionó anteriormente, dada su alta inestabilidad atómica, los RL reaccionan con una biomolécula, sustraen un electrón provocando la oxidación, perdiendo entonces su función específica en la célula. La mayoría de los componentes celulares pueden ser dañados por las ERO pero son las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos y los carbohidratos los principales blancos de las reacciones de estas especies.^{29, 31, 32}

Proteínas: La oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina da lugar a la formación de entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y producción de grupos carbonilos que impiden el cumplimiento de algunas funciones como transporte iónico de membranas, receptores, mensajeros celulares y enzimas reguladoras del metabolismo.²² Muchas metaloproteínas, como las hemoproteínas, pueden también dañarse al reaccionar con las ERO; de igual manera los enlaces peptídicos son susceptibles de daño por estas sustancias, lo cual genera su rompimiento. Finalmente, la reacción de las proteínas con las ERO puede dar lugar a subproductos que aumenten el daño inicial.²⁹

Lípidos: Los radicales libres hidroxilo, perhidroxilo y el oxígeno singlete reaccionan con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de la membrana celular, para formar finalmente hidroperóxidos lipídicos. El proceso inicia cuando la especie reactiva abstrae un átomo de hidrógeno a uno de los carbonos metilénicos de la cadena hidrocarbonada,

dando origen así a un radical lipídico. La oxidación lipídica tiene la característica de ser una reacción en cadena, en la cual, el ácido graso oxidado se transforma en un radical de ácido graso capaz de oxidar otra molécula vecina. Los productos finales de la peroxidación lipídica como hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos pueden difundirse a sitios diferentes de donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis.

Ácidos nucleicos: El daño sobre el ADN genera bases modificadas. Dichas modificaciones producen reacciones de entrecruzamiento y ruptura de la hebra del ADN. Cuando el daño es muy grande y no puede ser reparado por los sistemas biológicos, se produce una mutación o la muerte celular.³⁰

Carbohidratos: Estas moléculas son menos sensibles al ataque de los radicales libres. Aun así, los monosacáridos pueden reaccionar con el radical hidroxilo y producir sustancias reactivas. Por su parte, los polisacáridos cuando son atacados por las ERO pueden fragmentarse para producir moléculas más pequeñas; este es el caso del ácido hialurónico que al sufrir el ataque de radicales hidroxilo da como resultado una disminución de líquido sinovial de las articulaciones.³¹

b. Patologías relacionadas con el efecto de los radicales libres

Muchas enfermedades, desde las tumorales hasta las crónico-degenerativas y la demencia se han asociado con los radicales libres; estas patologías son conocidas como enfermedades oxidativas. Desde hace más de 50 años diferentes investigadores han venido estudiando los efectos que sobre

la salud tienen los radicales libres.³⁴ En la tabla 3 se muestran las patologías relacionadas con el efecto de los radicales libres.

Tabla 3. Patologías relacionadas con el efecto de los radicales libres.³⁴

Sistema	Patología
Cardiovascular	Ateroesclerosis, infarto del miocardio, cardiopatías.
Neurológico	Enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, traumatismos craneales.
Ocular	Cataratas, daño degenerativo de la retina.
Respiratorio	Distrés respiratorio (Síndrome de dificultad respiratoria adulta), cáncer de pulmón, enfisema.
Renal	Síndrome autoinmune, nefrotoxicidad por metales.
Gastrointestinal	Enfermedad intestinal inflamatoria. Diabetes

2. ANTIOXIDANTES

En el organismo existen sistemas biológicamente activos conocidos como antioxidantes que actúan para proteger y contribuir al equilibrio fisiológico garantizando la vida. Los estudios epidemiológicos, experimentales y clínicos han demostrado que los antioxidantes proveen una eficacia biológica en la prevención y en la disminución de los efectos negativos de las enfermedades producidas por el estrés oxidativo.³¹

a. Definición de Antioxidante

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato.³² Estas sustancias deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita

prevenir la acumulación de elementos oxidantes, estado conocido como estrés oxidativo. El antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico, que en algunos casos como, por ejemplo, la vitamina E, puede regenerarse a su forma reducida por la acción del ascorbato y la glutatión peroxidasa.³²

La actividad antioxidante de muchas sustancias depende del metabolismo celular y son conocidos como antioxidantes endógenos, entre los cuales se encuentran la superóxido de dismutasa, las catalasas y la glutatión peroxidasa. También existen factores nutricionales, conocidos como antioxidantes exógenos, entre los más estudiados están el alfa-tocoferol, los beta-carotenos, el ácido ascórbico y los polifenoles.³⁴⁻³⁶ En la tabla 4 se resumen los antioxidantes más importantes.

Tabla 4. Defensas antioxidantes³³⁻³⁵

Exógenos	Endógenos
Ácido ascórbico	Glutatión
alfa-tocoferol	Coenzima Q
beta-carotenos, carotenos, luteína, licopeno y zeaxantina	Proteínas hemo: ceruplasmina, lactoferrina y ferritina.
Flavonoides	Bilirrubina.
Cofactores enzimáticos:	Uratos.
Minerales: selenio, cobre, zinc, hierro, manganeso	Enzimas: superóxido de dismutasa, catalasas y glutatión peroxidasa.

La eficacia del antioxidante durante el estrés oxidativo depende de la molécula específica que lo cause; por ejemplo, la vitamina E reacciona con radicales peroxilo e hidroxilo; los beta-carotenos neutralizan el oxígeno monoatómico, y la dismutasa superóxido neutraliza el anión radical

superóxido formándose peróxido de hidrógeno, el cual finalmente se convierte en agua.³⁶

b. Sistema Antioxidante Endógeno

El sistema endógeno está compuesto por diversas proteínas, enzimas y algunos cofactores que actúan sinérgicamente para disminuir la carga de los radicales libres en el organismo y de esta manera, reducir o evitar las enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Una variedad de proteínas y de enzimas sintetizadas en el cuerpo pueden funcionar como antioxidantes. Los niveles de estos compuestos están determinados por su velocidad de síntesis y por lo tanto, no pueden ser manipulados fácilmente.^{34, 37}

El sistema enzimático constituye la primera línea de defensa celular frente a los daños oxidativos. Su principal función es eliminar los radicales libres superóxido y peróxido de hidrógeno para evitar que se forme el radical hidroxilo, considerado el radical más reactivo de las especies de oxígeno.³⁶

c. Sistema Antioxidante Exógeno

Una alimentación equilibrada debe proporcionar todos los nutrientes para garantizar el buen funcionamiento del organismo, entre estos nutrientes algunos cumplen la función de actuar como antioxidantes y otros no nutrientes que también presentan esta propiedad. Existe evidencia de que algunas sustancias provenientes de alimentos de origen vegetal pueden

proteger contra ciertas enfermedades degenerativas. Dentro de este grupo se encuentran el alfa-tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico y los carotenos.³⁷

La vitamina C, la vitamina E y los retinoides conforman un sistema antioxidante integrado con la glutatión; son inhibidores de las ERO y protegen a los tejidos de los daños oxidativos inducidas por éstos que son característicos en la inflamación aguda y en las enfermedades inflamatorias crónicas.³⁵

Ácido ascórbico: Las evidencias demuestran que puede tener una acción antioxidante dual en los sistemas biológicos; actúa en el plasma como inhibidor de radicales libres, disminuyendo estas especies reactivas y de esta manera evita el daño a las membranas biológicas y las lipoproteínas. Adicionalmente tiene la habilidad de regenerar la actividad de los antioxidantes liposolubles como el alfa-tocoferol y el beta-caroteno, asegurando la principal acción antioxidante en la fase lipídica.³¹⁻³⁷ También es un protector efectivo para evitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LBD), y por lo tanto, disminuir la progresión de la aterosclerosis.

Vitamina E o alfa-tocoferol: su función antioxidante la ejerce a través de varios mecanismos como son el donar hidrógenos, neutralizar el oxígeno singlete y los peróxidos, inhibir radicales libres hidroxilo y el anión peróxido.^{23, 29} Se ha reconocido como el antioxidante más efectivo para detener la peroxidación lipídica de la membrana celular, debido a su solubilidad y a su proximidad a los lípidos en las LBD.³⁷

Carotenoides: se conocen más de 600 compuestos, 50 de ellos en alimentos. Los más estudiados son el beta-caroteno, gamma-caroteno, licopenos y luteínas, entre otros. Casi todos los componentes estudiados de

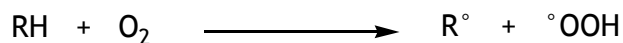
ésta familia tiene la capacidad antioxidante, siendo el más representativo el beta -caroteno, el cual se acumula en las membranas de los tejidos. Su función antioxidante la ejerce reaccionando con el radical peroxilo (ROO^\cdot) para formar un compuesto que sea un no radical libre, neutralizando el oxígeno singlete e inhibiendo la peroxidación lipídica.^{29, 31} Además complementa la acción de la vitamina E.

3. LIPOPEROXIDACIÓN ESPONTÁNEA

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que produce un suministro continuo de radicales libres que inician la peroxidación posterior.³⁸

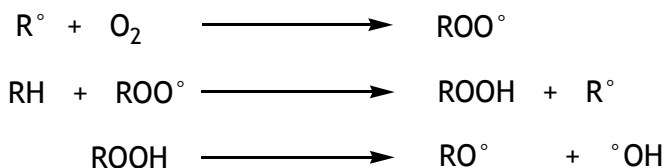
El proceso de la peroxidación lipídica comprende tres etapas:

1. Iniciación:



El precursor molecular para el proceso de iniciación es generalmente el producto hidropéroxido ROOH , el cual provoca cambios subsecuentes en la estructura, función, permeabilidad de la membrana celular, y por último, la muerte de la célula.

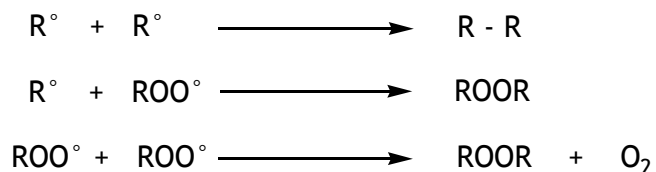
2. Propagación:



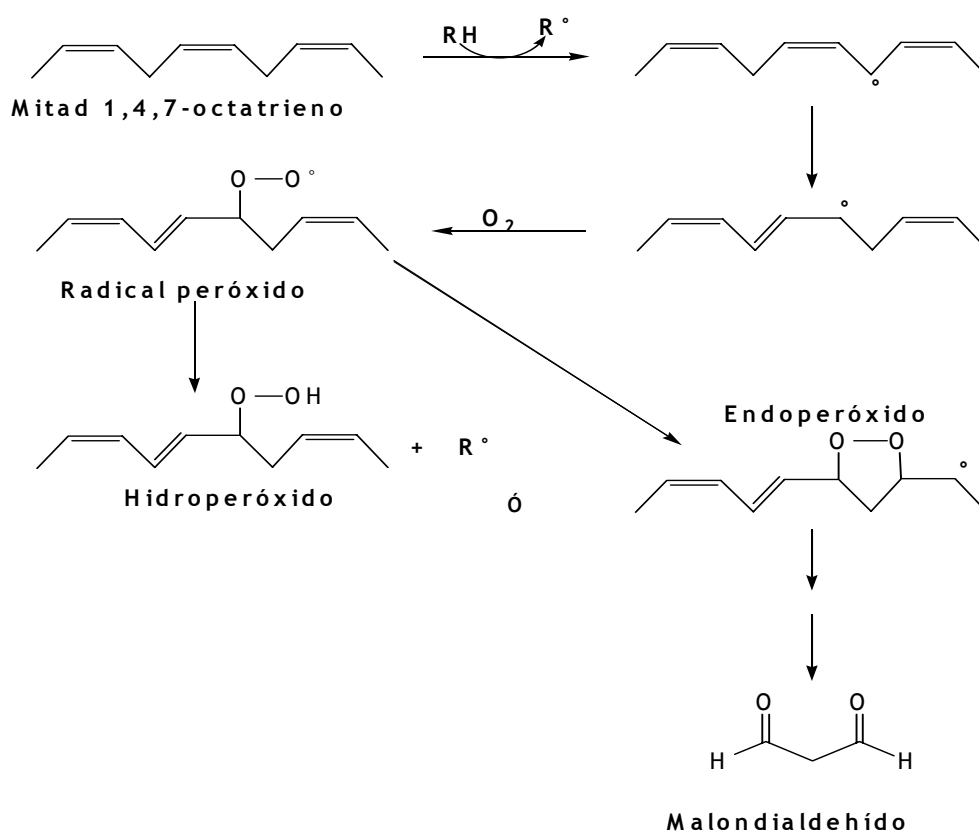
En la etapa de propagación las dobles ligaduras del radical lipídico experimentan una reordenación para formar dienos conjugados. El ataque de un oxígeno molecular produce un radical lipídico peroxidado, cuyo radical

puede abstraer un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un lípido hidroxiperoxidado ó un lípido endoperoxidado.

3. Terminación:



La formación del lípido endoperoxidado en ácidos grasos poliinsaturados que contienen tres ó más dobles enlaces *cis* de metileno alílico (CH₂) alternados, lleva a la formación del malondialdehído (MDA), el cual es un producto citotóxico que daña proteínas y ADN³⁸ (esquema 5).



Esquema 5. Formación del MDA.

Se ha encontrado que entre los órganos como el hígado, el riñón, el músculo esquelético, corazón y cerebro, estos dos últimos presentan una

mayor susceptibilidad a ser peroxidados.³⁹ Dentro de los factores que propician la alta susceptibilidad por estrés oxidativo en el cerebro se encuentra:

- Alto contenido de ácidos grasos insaturados omega 3 y 6, fáciles de peroxidar.
- Elevado contenido de oxígeno por unidad de peso (aproximadamente el 20% de la cantidad total empleada en humanos).
- Alto contenido de hierro y ascorbato, los cuales son clave para la reacción de lipoperoxidación.

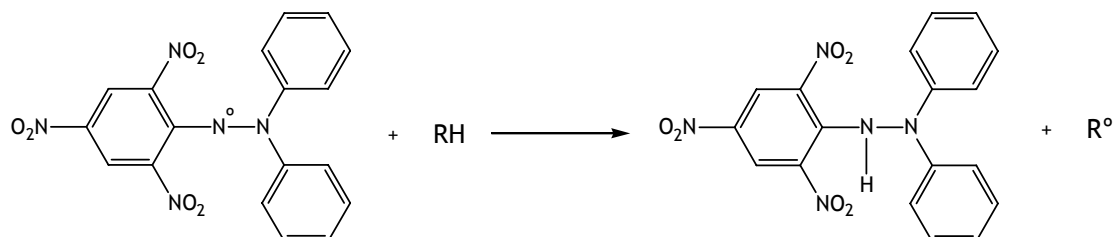
4. MÉTODOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La lipoperoxidación es una reacción mediada por los radicales libres, por lo que la actividad antioxidante puede demostrarse a través de la reducción del radical 2,2-difenil picril hidracilo (DPPH); o bien, mediante la prueba bioquímica: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB), empleando una fuente de lípidos en el homogenizado de cerebro de rata.

a. Método de DPPH

Es un método rápido y económico que permite ensayar la reactividad de los compuestos para actuar como donadores de hidrógeno y evaluar de esta manera, la actividad antioxidante. Este método emplea el radical libre estable 2,2-difenil picril hidracilo (DPPH), el cual acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable.⁴⁰

La estructura del DPPH y su reducción por un antioxidante se muestra en el esquema 6. El electrón desapareado en el radical libre DPPH muestra un máximo de absorción a 517 nm y presenta un color violeta intenso en solución de etanol.⁴⁰



Esquema 6. Reducción del radical DPPH

Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, la absorbencia decrece ya que el radical de DPPH es neutralizado por un antioxidante que le dona un hidrógeno para generar la forma reducida DPPH-H, y como resultado el color cambia de violeta intenso a amarillo claro. Por tanto, mientras más rápido disminuya la absorbencia, mayor será la potencia antioxidante del compuesto en términos de habilidad para donar hidrógenos.⁴¹

b. Ensayo de SRATB

Los hidroperóxidos (ROOH) se consideran los principales productos de la reacción de iniciación de la lipoperoxidación; son especies lábiles de naturaleza muy transitoria, las cuales experimentan arreglos con los radicales libres. El cambio debido a los rompimientos forma productos secundarios como el pentanal, el hexanal, el 4-hidroxinonal y el malondialdehído.⁴²

El Malondialdehído (MDA) es un dialdehído de tres carbonos con grupos

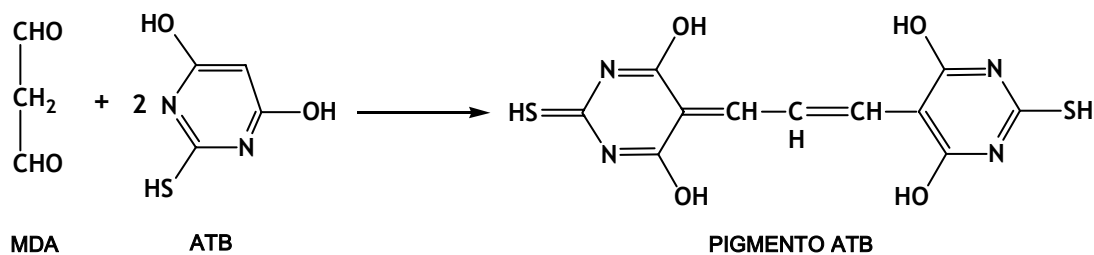
carbonilo en la posición 1 y 3. Hay diferentes teorías acerca del posible mecanismo para la formación del MDA, una de ellas es, a través de hidroperóxidos formados a partir de ácidos grasos poliinsaturados con tres o más dobles enlaces alfa o beta que permiten la formación del grupo peróxido, el cual experimenta ciclizaciones para formar finalmente el MDA.⁴²

Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (ATB) pero que no son MDA, se llaman sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) porque:

- Reaccionan con ATB para dar un mismo aducto en el espectro obtenido del estándar de MDA.
- El espectro UV es idéntico que el estándar del MDA a pHs de 7 y 2.
- El rendimiento de MDA determinado por el ensayo de ATB coincide con el determinado por el método de CLAR.

Los factores que determinan la formación de MDA en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados son: el grado de insaturación del ácido graso, la presencia de metales, el pH y la temperatura.⁴²

El ensayo de ATB se fundamenta en la reacción de condensación de una molécula de MDA con dos moléculas de ATB en calentamiento, para formar un pigmento rojo. La reacción ocurre por ataque de la forma monoenólica del MDA en los grupos metilenos activos del ATB (esquema 7). La intensidad del color es una medida de la concentración de ATB. La espectrofotometría ultravioleta -visible del pigmento da un primer máximo de absorción a 532-535 nm. y el segundo a 245-305 nm.³⁹



Esquema 7. Reacción de MDA con ATB

La velocidad de reacción del MDA con el ATB depende de la concentración de ATB, la temperatura y el pH; usando 80 μM de ATB la reacción se completa en 5 minutos a 94°C, pero también se lleva a cabo utilizando 20 μM de ATB a ebullición durante 30 minutos.³⁸

D. Cáncer

La hipótesis que los radicales libres pueden estar involucrados en la carcinogénesis está basada en que muchos carcinógenos son radicales libres y se convierten *in vivo* a estas especies, o son productos de reacciones biológicas de radicales libres. Además, en muchos antioxidantes se observa una importante inhibición de la carcinogénesis en diversos modelos con animales. Esta evidencia sugiere que los radicales libres juegan un papel importante en la iniciación de esta enfermedad.⁴³

Una característica común de los promotores de tumor (grasas insaturadas, peróxido de hidrógeno, ésteres de forbol, fenobarbital y radiación) puede ser su habilidad para producir radicales de oxígeno, por lo que estos pueden ser importantes en el desarrollo y/o progresión del tumor. Los mecanismos que pueden estar involucrados en la promoción son desconocidos.⁴³

1. Definición de cáncer

El cáncer representa un grupo de enfermedades caracterizada por la multiplicación incontrolada y anárquica de ciertas células en el organismo. Estas células “malignas” son muy a menudo diferentes de las células normales. Presentan anomalías de estructura y de comportamiento, anomalías diversas según el tipo de células afectadas, que pueden variar con la evolución de la enfermedad: el núcleo se hipertrofia, la célula entera puede agrandarse, las divisiones celulares tienen un desarrollo anormal y generalmente más rápido.⁴³

a. Tipos de cáncer

Se distinguen habitualmente tres tipos de cánceres: los cánceres llamados sólidos, las leucemias y los hematosarcomas.

En los **cánceres sólidos**, las células cancerosas se desarrollan en un órgano (riñón, hígado, cerebro, etc.) constituyendo un tumor que comprime, invade y destruye los tejidos, incluso los que le rodean. En algunos casos las células cancerosas pueden pasar a la sangre o a los vasos linfáticos para formar colonias de células cancerosas en otros órganos lejos del tumor de origen, a lo que se denomina *metástasis*.⁴³

En las **leucemias**, las células cancerosas no forman al principio un tumor localizado, pero invaden uniformemente la sangre y todos los órganos hematopoyéticos (médula ósea, ganglios linfáticos). Sin embargo, ocurre

también que en las leucemias las células malignas pueden producir secundariamente tumores que comprimen e invaden otros órganos diferentes de los que producen los glóbulos de la sangre. Ocurre muy comúnmente en hígado y cerebro.⁴³

Los **hematosarcomas**, representan una categoría intermedia. En el torrente sanguíneo existe un sistema denominado sistema linfático, el cual se encarga de alimentar y eliminar los desechos celulares; está constituido por finas canículas repartidas por casi todo el organismo, las cuales tienen por misión recuperar la linfa, líquido incoloro donde se bañan las células del cuerpo. El recorrido de los vasos linfáticos es interrumpido por los ganglios linfáticos, los cuales actúan como filtros para impedir el paso de ciertas partículas o células voluminosas (como las células cancerosas). Los ganglios están situados en diferentes partes del cuerpo; hay en la ingle, en la axila, a nivel del cuello, etc. Los ganglios pueden dar lugar a cánceres a partir de sus propias células: estos son los hematosarcomas. Se desarrollan como tumores sólidos y pueden invadir los tejidos de alrededor. Pueden también complicarse a leucemias si infiltran la médula ósea.⁴³

b. Agentes que causan cáncer

Las radiaciones, sobre todo las ionizantes, pueden provocar la ruptura del ADN o alteraciones en su estructura. Por su parte, muchos fármacos y otros compuestos (orgánicos e inorgánicos) pueden reaccionar químicamente con el ADN, causando alteraciones y también su rompimiento. Los factores fisicoquímicos pueden afectar al ADN en un solo sitio (daño puntual) o afectar

varios sitios simultáneamente. A veces el daño se revierte por los mecanismos celulares de reparación, en otras ocasiones el daño es más grave o más extenso y no logra repararse a tiempo; la célula entonces se transforma en tumoral.⁴³ En la tabla 5 se presentan los principales factores que pueden inducir cáncer.

Tabla 5. Factores cancerígenos⁴⁴

1. Físicos:	Radiaciones ultravioleta y radiaciones ionizantes.
2. Químicos:	Infinidad de sustancias naturales y artificiales: alquitrán, metilcolantreno, nicotina, algunos solventes, fármacos y aditivos.
3. Biológicos:	Algunos virus, como el virus de Epstein-Barr y el virus del papiloma (en humanos), el virus de la leucemia en ratones.
4. Mutaciones espontáneas:	Ocurridas al azar durante el proceso de replicación del material genético celular.

2. CITOTOXICIDAD

En general, la respuesta del sistema inmunitario puede provocar la muerte de células por lisis (rompimiento de la membrana y la célula blanco estalla) o por apoptosis (la célula muere porque el citoplasma y el núcleo se fragmentan).

La muerte celular por citotoxicidad llamada apoptosis, generalmente se inicia por la inducción de un programa de muerte celular que está codificado genéticamente en todas las células del cuerpo. Como consecuencia, ocurre la fragmentación de la célula a la que se le ha inducido el programa y se observa que el citoplasma se fragmenta y queda reducido a vesículas, sin que la membrana estalle, ni los organelos o el contenido del citoplasma se liberen al espacio intersticial, y sin que se inicie una reacción inflamatoria alrededor de la célula que muere. La muerte celular programada puede ocurrir

espontáneamente o puede ser inducida por varios factores o por algunas células. Las principales células inductoras de la apoptosis son los linfocitos T citotóxicos.⁴⁵

a. Estimación de citotoxicidad

La citotoxicidad o toxicidad en cultivos celulares, se puede subdividir en actividad citostática (detener el crecimiento celular) o actividad citocida (muerte celular). La muerte celular ó citotoxicidad se puede determinar mediante la cuantificación del daño en la membrana plasmática. Las enzimas *Cinasa de Adenilato* (KA) y *Deshidrogenasa de lactato* (DHL) se encuentran en todas partes, son estables y se liberan rápidamente al medio de cultivo cuando se producen daños en la membrana plasmática.

El ensayo de Sulforrodamina B, es un método rápido, sensible y económico para la determinación de citotoxicidad inducida por fármacos. Se fundamenta en la medición del contenido de proteínas de las células cancerosas que se adhieren a la base de una microplaca de 96 pozos empleando Sulforrodamina B (SRB), un colorante aniónico que se une a residuos de aminoácidos (con carácter básico) en las células que han sido adheridas con ácido tricloroacético (TCA), de esta manera, entre mayor sea la densidad óptica a 515 nm, mayor será el contenido de proteínas, y por ende, menor la inhibición del crecimiento celular.^{46, 47}

II. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El ferroceno es una entidad muy versátil ya que es posible introducir en el anillo ferrocénico un gran número de sustituyentes diferentes como fosfinas, aminas, tioéteres, entre otros. Aunado a esto, los compuestos ferrocénicos tienen gran importancia actualmente en la Química y en la Medicina, debido sobre todo a las propiedades (actividad biológica) y características estructurales que poseen.²

Existen evidencias de que en algunos compuestos que contienen el anillo ferrocénico dentro de su estructura, se ha observado actividad antineoplásica y antioxidante. Cabe mencionar⁴⁻⁶ que no existe hasta ahora, información sobre síntesis y caracterización de ferrocenil estibinas en la literatura.

Es por esto que, surge el interés por generar nuevos compuestos aminoferrocenil estibínicos a través de una ruta sencilla y con rendimientos aceptables, los cuales podrían presentar una actividad farmacológica importante.

Por esta razón, una vez obtenidas las aminoferrocenil estibinas serán evaluadas en pruebas de actividad antioxidante y citotóxica, para conocer el perfil farmacológico, y de esta manera proporcionar una contribución en el área química y biológica sobre estos compuestos.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Síntesis y caracterización de nuevas ferrocenil estibinas terciarias y evaluar actividad antioxidante y citotóxica.

Objetivos particulares:

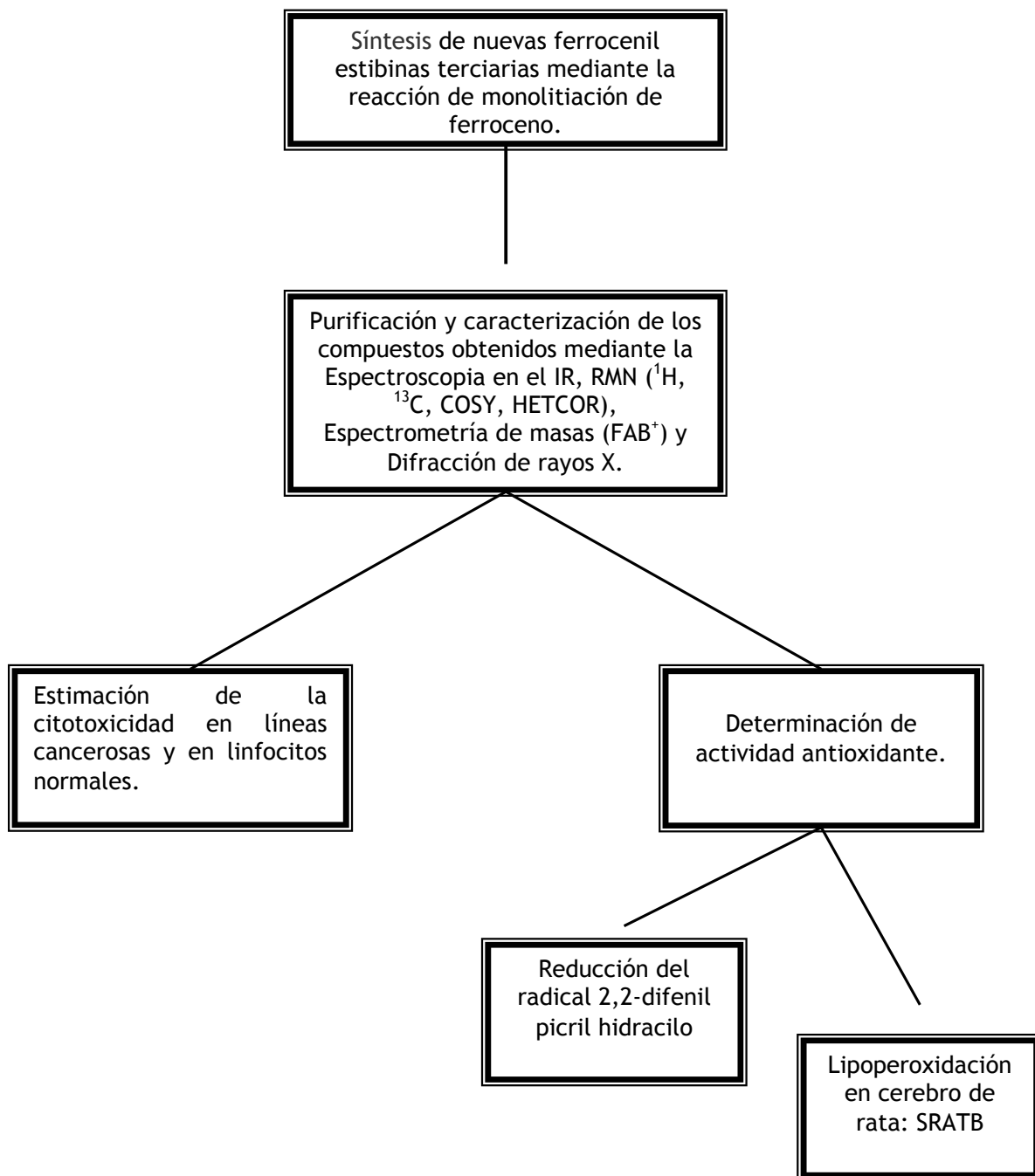
- Sintetizar ferrocenil estibinas mediante la reacción de monolitiación de ferroceno.
- Caracterizar los compuestos obtenidos por Espectroscopia en el Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (FAB⁺) y por Difracción de Rayos X cuando se logre obtener un cristal de calidad.
- Evaluar la actividad de los compuestos ferrocenil estibínicos sobre el radical libre DPPH.
- Determinar el efecto de los compuestos ferrocenil estibínicos sobre la peroxidación de lípidos en cerebro de rata.
- Estimar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados en líneas celulares de cáncer humano.

IV. HIPÓTESIS

Teniendo como antecedente que con ciertos derivados de ferroceno se observa una notable actividad antitumoral, así como compuestos estibínicos con anillos aromáticos heterocíclicos; las nuevas ferrocenil estibinas sintetizadas y sus complejos con platino y paladio podrían mostrar actividad antioxidante y citotóxica.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Diagrama de flujo



B. Línea mixta de vacío-gas inerte

Para la preparación de compuestos inorgánicos, orgánicos y organometálicos sensibles al aire, se utiliza un equipo de vidrio y gas inerte para excluir la atmósfera del ambiente. Las técnicas se han adaptado para la manipulación de soluciones, sólidos y gases que reaccionan en presencia de alguno de los componentes del aire (ver figura 5). Uno de los métodos para la evacuación idónea del material de vidrio consiste de varios ciclos de evacuación-llenado con gas inerte, lo cual evita la necesidad de emplear técnicas de alto vacío.

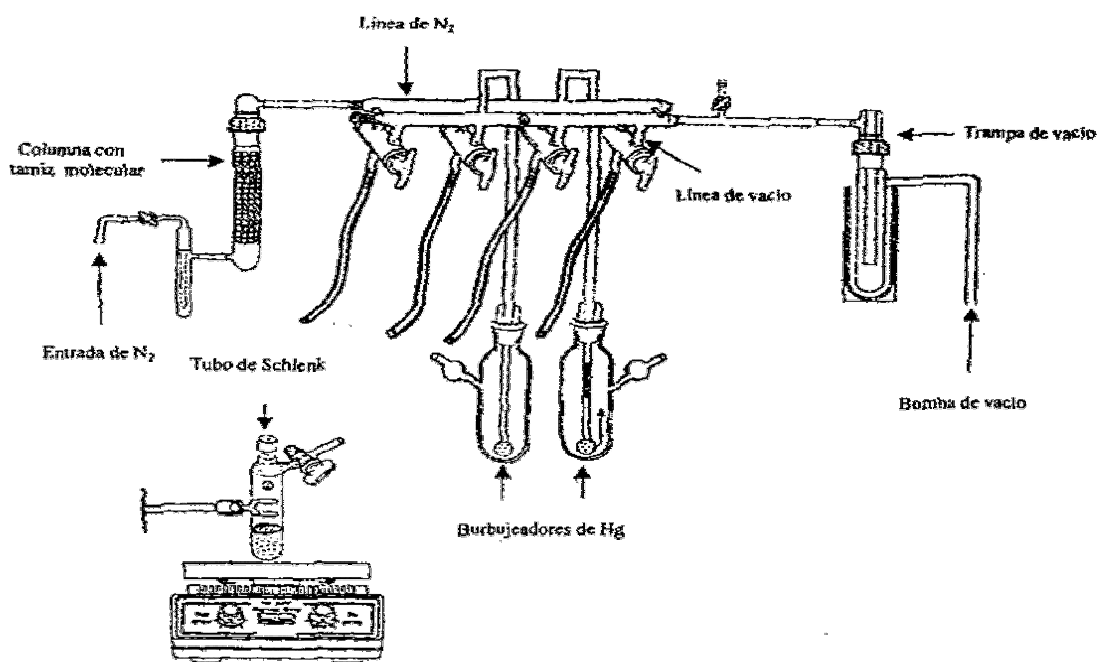


Figura 4. Línea mixta de vacío-gas inerte

Usualmente se requiere de un gas inerte puro, que puede ser nitrógeno, argón o helio, para las operaciones de evacuación-llenado. El equipo se llena con un gran volumen del gas ó se evacua seguido de un llenado con gas. Para realizar en forma eficiente estas operaciones de purgado del equipo de vidrio

a utilizar, es necesario contar con una línea mixta de vacío- gas inerte con varias mangueras para trabajo rudo, ya que éstas brindan mayor libertad de movimiento entre la línea mixta de vacío- gas inerte y el equipo schlenk. Es indispensable que la línea mixta cuente con un burbujeador de mercurio (para proteger el equipo de vidrio contra presiones excesivas), un burbujeador de aceite mineral (como indicador del flujo del gas inerte), una bomba de vacío mecánica, una trampa de disolventes (para colocar hielo seco o nitrógeno líquido), un tamiz molecular para asegurar que el flujo de nitrógeno se encuentre libre de agua y llaves de paso con dos vías, las cuales permiten seleccionar entre gas inerte ó vacío en la misma manguera.⁴⁸

1. TÉCNICA SCHLENK

La técnica de Schlenck se utiliza comúnmente para la manipulación de compuestos sensibles al aire atmosférico. Por lo que se hace uso de un tubo Schlenck, el cual consta de un tubo de vidrio largo cerrado por uno de los extremos, con una llave lateral para la entrada de gas inerte; y en el otro extremo abierto, el cual generalmente se cierra con un tapón de hule para tener una atmósfera inerte dentro del tubo.⁴⁸

Para purgar el equipo de vidrio Schlenck es preciso realizar ciclos de evacuación-llenado de gas inerte, ya sea manejando un gran volumen de gas o evacuando seguido de un llenado con gas. Una vez purgado, las operaciones que se llevan a cabo con dicho equipo de vidrio son diversas. Por ejemplo, puede colocarse en el tubo Schlenck un compuesto sensible al ambiente atmosférico, haciendo uso de un embudo de adición y manteniendo el flujo

constante de gas. De esta manera, la técnica de Schlenk permite abrir el sistema de reacción para adicionar otros reactivos o trasvasar un compuesto con un flujo constante de gas inerte y mantener a los compuestos sensibles aislados de la atmósfera.⁴⁸

C. Síntesis química de nuevas ferrocenil estibinas terciarias

1. METODOLOGÍA

a. Material, equipo y reactivos

Material

Tubos schlenck de 100 y 250 mL

Tapones de hule

Matraz erlenmeyer de 25 y 125 mL

Jeringas de vidrio 5, 10 y 20 mL

Agujas de acero inoxidable calibre 22

Vasos de precipitados 10, 50 y 250 mL

Embudo de separación de 250 mL

Soporte universal

Pinzas de tres dedos con nuez

Anillo metálico

Agitadores magnéticos

Embudo de plástico

Embudo buchner

Matraz kitazato 12 y 250 mL

Matraz bola de 100 mL

Espátula de acero inoxidable

Equipo

Balanza semianalítica OHAUS

Balanza analítica METTLER AE100

Aparato Fisher Johns para punto de fusión

Línea mixta de vacío- gas inerte

Parrillas de agitación

Reactivos

α -(N, N-dimetilamino) etilferroceno, 98%, Strem chemicals

Tricloruro de antimonio III (SbCl_3), 99.999%, Aldrich Chem Co

Trifenil estibina III, 99%, Aldrich Chem Co

Tert-butilitio 1.7 M solución en pentano, Aldrich Chem Co

Nitrógeno (N_2) gas, 99.995%

Eter anhidro 99.9%, Aldrich Chem. Co

Diclorometano grado CLAR

Cloroformo 99.9%, grado CLAR, J.T.Baker

Hexano 95%, grado CLAR, J.T Baker

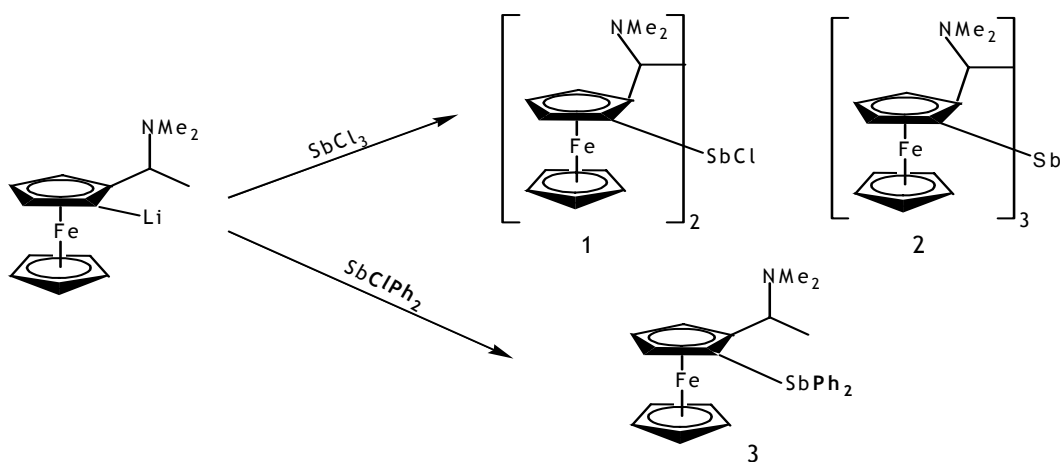
Acetona 99.9%, grado CLAR, Sigma-Aldrich.

Sulfato de sodio anhidro, almacén Instituto de Química UNAM

b. Procedimiento

Síntesis de:

1. Cloro-bis [dimetil(1-ferroceniletil)amina] de antimonio (III)
2. Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina
3. [1-(2-difenilestibanil-ferrocenil)-etil]-dimetil-amina

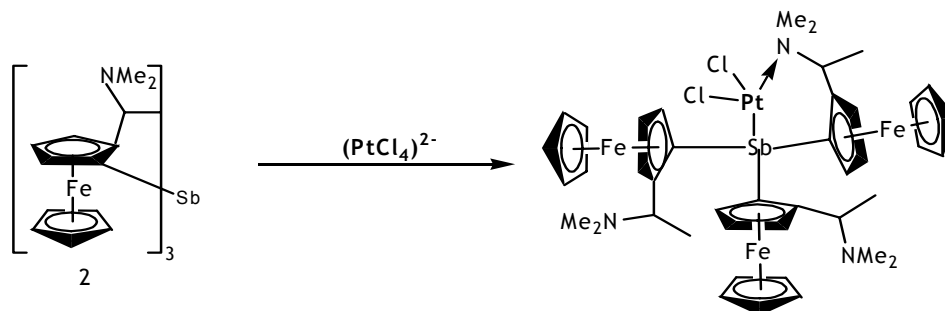


Esquema 8. Reacción general de ferrocenilestibinas.

La reacción se llevó a cabo en condiciones de atmósfera inerte (nitrógeno), a baja temperatura (-10°C) y con agitación constante; en un tubo schlenck se colocó 10 mmol (2.57 g) de α -(N,N-dimetilamino) etilferroceno y se disolvió en 20 mL éter anhidro, a continuación se adicionó muy lentamente 8 mmol (4.8 mL) de tert-butilitio 1.7 M solución en pentano; después de 10 minutos se agregó 3.3 mmol (0.75 g) de tricloruro de antimonio (III) previamente disuelto en 10 mL de éter anhidro. Finalmente se retiró el baño de hielo y se dejó a temperatura ambiente bajo condiciones de flujo de nitrógeno y agitación constante por un lapso de 4 a 5 horas para el compuesto 1. En el caso del compuesto 2, se procedió a mantener las condiciones por un período de 20 horas.

Para el compuesto **3** antes de realizar la monolitiación, se preparó el cloruro de difenil estibina a partir de 1.25 mmol (0.28 g) de tricloruro de antimonio (III) y 2.5 mmol (0.88 g) de trifenilestibina en condiciones de atmósfera inerte. Una vez obtenido, en otro tubo schlenk se colocó 3.75 mmol (0.96 g) de α -(N, N-dimetilamino) etilferroceno y 8 mL de éter anhidro, en seguida se añadió muy lentamente 3.12 mmol (1.8 mL) de tert-butilitio 1.7 M solución en pentano; después de 10 minutos se adicionó el cloruro de difenil estibina. Se conservó la atmósfera de nitrógeno y agitación constante por un espacio de 14 horas.

4. Dicloro-[tris-(2-dimetilaminoetil) ferrocenil) estibina-N, Sb] de platino (II)



Esquema 9. Reacción de ferrocenil estibina con tetracloroplatinato.

Una vez obtenido el compuesto **2**, se hizo reaccionar con tetracloroplatinato de potasio (II), de la siguiente manera:

Se desgasificó 10 mL de agua destilada con flujo de nitrógeno y agitación durante dos horas. Transcurrido el tiempo se tomó 5 mL y se disolvió 0.2 mmol (0.08 g) de tetracloroplatinato de potasio (II). Por otro lado, en un tubo schlenk se disolvió 0.2 mmol (0.13 g) del compuesto **2** en 10 mL de acetona. A continuación se agregó el tetracloroplatinato de potasio (II)

completamente disuelto y se conservó la reacción durante 20 horas manteniendo condiciones de atmósfera de nitrógeno y agitación constante.

a. Extracción y purificación

Concluido el tiempo de reacción, la solución se concentró a su mitad de volumen en el rotavapor, después se colocó en un embudo de separación el cual contenía 10 ml de agua fría; se adicionó 20 ml cloroformo y/o diclorometano, se colectó la fase orgánica en un matraz erlenmeyer y en seguida se le adicionó sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se filtró al vacío y se concentró en un rotavapor a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido obtenido se purificó por recristalización con una mezcla de hexano: acetona (50:50).

D. Evaluación biológica

1. Reducción del radical libre 2,2-difenil picril hidracilo (DPPH)

La determinación de actividad antioxidante, se realizó midiendo de manera indirecta la reducción del radical DPPH (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro) por medio de la espectrofotometría UV-VIS.

a. Material, equipo y reactivos

Material

Microplacas de 96 pozos para ELISA

Micropipetas

Recipientes

Puntas para micropipetas

Tubos Eppendorf de 2mL

Equipo

Lector de ELISA BIO-TEK (modelo ELX808)

Reactivos

2,2-difenil picril hidracilo (DPPH)

Etanol

Dimetilsulfóxido (DMSO)

b. Procedimiento

En una placa de ELISA se adicionó 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones por triplicado, a continuación se agregó 150 µL de una solución etanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µM; inmediatamente se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbencia a 515 nm en un lector de ELISA.

La actividad antioxidante sobre el DPPH se expresó como por ciento de reducción y se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

donde:

C= absorbencia del control (DPPH)

E= absorbencia del experimental (mezcla: DPPH + compuesto problema)

2. Ensayo de SRATB

a. Material, equipo y reactivos

Material

Tijeras de disección

Pinzas

Bisturí

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Tubos Eppendorf de 2 mL

Gradilla

Equipo

Incubadora

Balanza analítica METTLER AE100

Centrífuga clínica (3400 rpm)

Microcentrífuga refrigerada

Homogenizador manual

Baño térmico

Espectrofotómetro UV-VIS, Spectronic Génesis 5

Lector de ELISA BIO-TEK (modelo ELX808)

Reactivos

Solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.4 (SAF)

Ácido tricloroacético (ATC) al 30%

Hidróxido de sodio (NaOH) 0.05 N

Ácido tiobarbitúrico en NaOH 0.05 N (ATB)

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Etanol

Agua desionizada

Material biológico

Cerebro de rata wistar macho (200-250 g)

b. Procedimiento

Animal

Se empleó una rata wistar macho (200-250 g), la cual fue colocada en una caja de acrílico transparente, por un período de 12 horas en luz y 12 horas en oscuridad a una temperatura de 24-25°C, con libre acceso al agua y alimento antes de realizar el experimento.

Disección y homogenizado del cerebro de rata

La rata se anestesió por inhalación con éter y fue sacrificada por dislocación cervical. Inmediatamente se extrajo el cerebro y se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) en baño de hielo. Posteriormente se lavó perfectamente con agua desionizada, se pesó y se llevó a una proporción 1:10 con solución SAF; a continuación se homogenizó durante 60 segundos a 4°C utilizando un homogenizador con pistilo de teflón. Una vez homogenizado

se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, en seguida se recuperó el sobrenadante y se procedió a efectuar la cuantificación de proteínas y ajuste a la concentración deseada, por medio de la espectrofotometría UV-VIS.

Cuantificación de proteínas

Se tomó 30 μL del sobrenadante y se adicionó 2.97 mL de agua desionizada, se midió la absorbencia a 280 nm y 205 nm; los valores obtenidos se sustituyeron en la fórmula:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = \frac{A_{205}}{\left[27 + 120 \left(\frac{A_{280}}{A_{205}} \right) \right]} \times 100$$

Y finalmente la concentración de proteínas se ajustó a 2.3529 mg/mL

Lipoperoxidación

Se colocó 425 μL del homogenizado (2.3529 mg/mL) en tubos Eppendorf de 2 mL, se adicionó 25 μL del compuesto a probar (20 veces más concentrado) disuelto en el vehículo y se incubó a 37°C por 30 minutos y con agitación constante.

A continuación se añadió 50 μL de sulfato de hierro (FeSO_4) 100 μM , cuya concentración final debió ser 10 μM , y se procedió a incubar por 60 minutos a 37°C con agitación constante. En seguida se adicionó 500 μL de reactivo ATB (el reactivo de ATB es una mezcla 1:1 de ATB 1% en solución de NaOH 0.05 N y ATC al 30%) y se incubó en baño de hielo durante 10 minutos. A continuación se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos.

Posteriormente se incubaron a ebullición durante 30 minutos. Se dejaron enfriar y se destaparon los tubos Eppendorf. Finalmente se determinó la absorbencia a 532 nm en un lector de ELISA. La concentración de SRATB se calculó por medio de la interpolación de la curva estándar de MDA (apéndice, página 67)

El resultado final es expresó en nanomoles (nm) de SRATB por miligramo de proteína. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

donde: **A** es absorbencia del control y **A₁** es absorbencia de la muestra a probar.

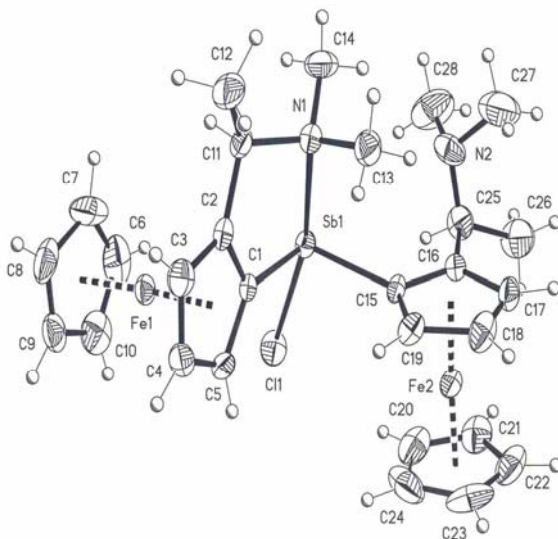
E. Citotoxicidad

La realización de la prueba de citotoxicidad fue llevada a cabo por la M. en C. María Teresa Ramírez Alpizar técnico de laboratorio. Los compuestos se evaluaron en cinco líneas cancerosas: colon (HCT-15), leucemia (K562), mama (MCF-7), próstata (PC-3) y sistema nervioso central (U25). La citotoxicidad se reportó como porcentaje de inhibición del crecimiento de las células cancerosas.

VI. RESULTADOS

A. Compuestos sintetizados

1. Cloro bis [dimetil (1-ferroceniletíl) amina] de antimonio (III)



Cristales naranja

Fórmula molecular:

$C_{28}H_{36}Cl_1Fe_2N_2Sb_1$

Peso molecular: 669.523 g/mol

Punto de fusión: 130 °C

Rendimiento: 50%

IR: $\nu(C-Sb)$: 492.11 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^2}-H)$: 3094.81 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^3}-H)$: 2967.99-2927.58 cm^{-1} , $\nu(C-N)$: 1238.91-1001.78 cm^{-1} . (apéndice, página 68)

EM (FAB⁺), m/z (%); $R_1 = Cl$, $R_2 = Sb$, $R_3 = \alpha$ (N,N-dimetilamino) etilferroceno

$[M]^+$: 668(20), $[M-R_1]^+$: 633 (7), $[M-R_1-R_2]^+$: 512(6), $[M-R_1-R_2-R_3]^+$: 257 (100).

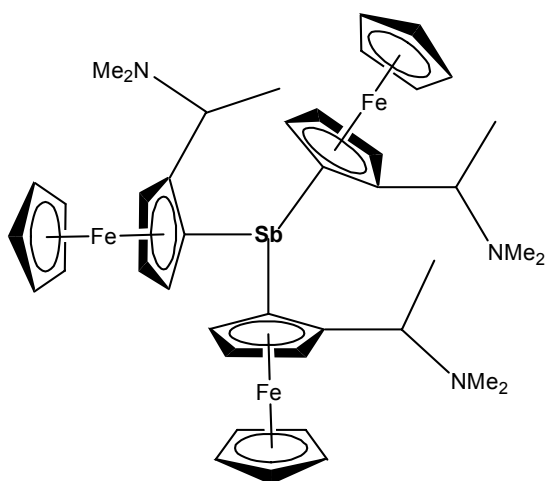
(apéndice, página 69)

RMN-¹H [CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)]: 1.20 (3H, *d*, $J=6.61$ Hz, H-12), 1.98 (6H, *s*, H-13 y H-14), 4.14 (1H, *c*, $J=1.5$ Hz, H-11), 4.16 (1H, *t*, $J=4.8$ Hz, H-4), 4.23 (1H, *m*, H-3), 4.25 (1H, *m*, H-5), 4.30 (5H, *s*, anillo A). (apéndice, página 70)

RMN-¹³C [CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)]: 8.12 (C-12), 39.77 (C-13 y C-14), 59.82 (C-11), 69.73 (C-4), 68.20 (C-3), 74.10 (C-5), 67.69 (anillo A), 84.86 (C-2) 96.18 (C-Sb). (apéndice, página 71)

Difracción de rayos X: longitud de enlace: Sb-C(1)= 2.093 Å, Sb-C(15)= 2.144 Å,
Sb-Cl= 2.515 Å, Sb-N(1)= 2.584

2. Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina



Sólido cristalino naranja

Fórmula molecular: C₃₉ H₄₈ Fe₃ N₃ Sb₁

Peso molecular: 889.69 g/mol

Punto de fusión: 40 °C

Rendimiento: 50%

IR: $\nu(\text{C-Sb})$: 492.96 cm⁻¹, $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$: 3091.68 cm⁻¹, $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$: 2968.67 cm⁻¹, $\nu(\text{C-N})$: 1238.49-1002.17 cm⁻¹. (apéndice, página 72)

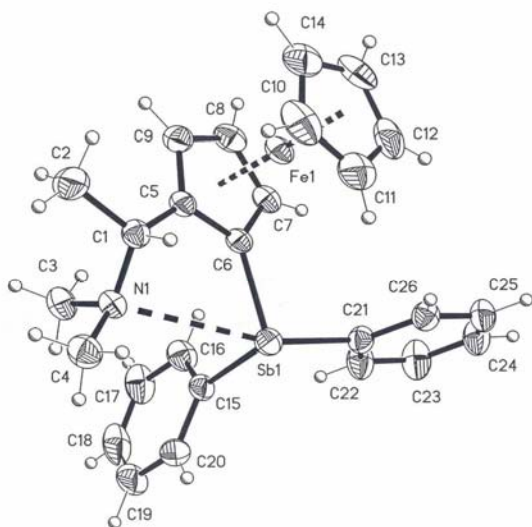
EM (FAB⁺), m/z (%); R₁= NMe₂ R₂= α (N, N-dimetilamino) etilferroceno

[M]⁺: 889 (38), [M-R₁]⁺: 845 (5), [M-R₁-C₁₂H₁₂Fe]⁺: 633 (100), [M-2R₁-C₁₂H₁₂Fe]⁺: 545 (30), [M-2R₁-2(C₁₂H₁₂Fe)]⁺: 333 (12). (Apéndice, página 73)

RMN-¹H [CDCl₃, 300 MHz, δ(ppm)]: 1.20 (3H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-12), 1.97 (6H, *s*, H-13 y H-14), 3.72 (5H, *s*, anillo A), 4.14 (1H, *c*, *J*=3.0 Hz, H-11), 4.16 (1H, *t*, *J*=3.6 Hz, H-4), 4.18 (1H, *m*, H-3), 4.23 (1H, *m*, H-5). (Apéndice, página 74)

RMN-¹³C [CDCl₃, 300 MHz, δ(ppm)]: 8.08 (C-12), 39.76 (C-13 y C-14), 59.80 (C-11), 67.68 (C-4), 68.21 (C-3), 69.72 (C-5), 74.11 (anillo A), 84.88 (C-2), 96.20 (C-Sb). (apéndice, página 75)

3. [1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina



Cristales naranja

Fórmula molecular:

$C_{26} H_{28} Fe_1 N_1 Sb_1$

Peso molecular: 532. 12 g/mol

Punto de fusión: 60 °C

Rendimiento: 50%

IR: $\nu(C-Sb)$: 453.43 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^2}-H)$: 3060.21 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^3}-H)$: 2967.63-2932.59 cm^{-1} ,
 $\nu(C-N)$: 1233-1063.59 cm^{-1} . (apéndice, página 76)

EM (FAB⁺), m/z (%); $R_1 = NMe_2$ $R_2 =$ fenilo

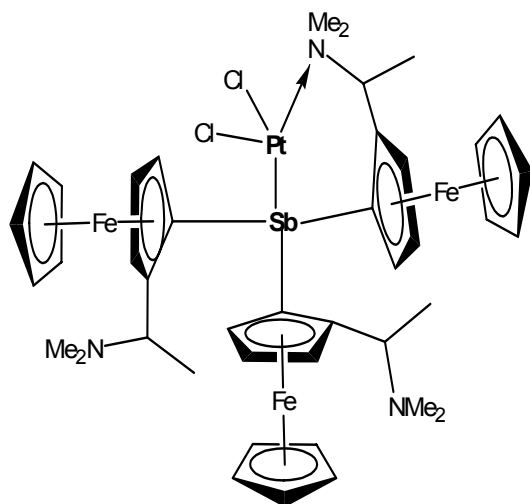
$[M]^+$: 531 (100), $[M-R_1]^+$: 487 (62), $[M-R_2]^+$: 454 (28). (apéndice, página 77)

RMN-¹H [CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)]: 1.15 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-12), 1.73 (6H, *s*, H-13 y H-14), 3.84 (1H, *c*, $J = 6.3$ Hz, H-11), 4.00 (5H, *s*, anillo A), 4.12 (2H, *m*, H-3), 4.20 (1H, *t*, H-4), 4.30 (1H, *m*, H-5) 7.23 (3H, *m*, anillo D), 7.31 (3H, *m*, anillo C), 7.45 (2H, *m*, anillo D), 7.58 (2H, *m*, anillo C). (apéndice, página 78)

RMN-¹³C [CDCl₃, 300 MHz, δ (ppm)]: 7.50 (C-12), 38.66 (C-13 y C-14), 59.30 (C-11), 68.89 (C-3), 68.99 (C-4), 69.31 (C-5), 74.06 (anillo A), 96.64 (C-2), 127.64 (anillo D), 127.84 (anillo C), 128.09 (anillo D), 128.17 (anillo C), 135.82 (C₁₅-Sb), 136.57 (C₁-Sb). (apéndice, página 79)

Difracción de rayos X: longitud de enlace: Sb-C(6) = 2.124 Å, Sb-C(15) = 2.142 Å, Sb-C(21) = 2.162 Å, Sb-N(1) = 3.041 Å.

4. Dicloro [tris-(dimetilaminoetil) ferrocenil estibina N,Sb] de platino (II)



Polvo café claro

Fórmula molecular:

$C_{39}H_{48}Cl_2Fe_3N_3Pt_1Sb_1$

Peso molecular: 1156.90 g/mol

Punto de fusión: 40° C

Rendimiento: 40%

IR: $\nu(C-Sb)$: 496.23 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^2}-H)$: 3088.23 cm^{-1} , $\nu(C_{sp^3}-H)$: 2972.89 cm^{-1} , $\nu(C-N)$: 1239.28-1002.56 cm^{-1} . (apéndice, página 80)

EM (FAB⁺), m/z (%):

[M⁺]: 1156 (0.5), [M⁺ - Pt]: 961 (0.2). (apéndice, página 81)

B. Actividad Antioxidante

1. MÉTODO DE DPPH

En la tabla 6 se muestra el porcentaje de reducción obtenido de la ferrocenilestibinas. Se evaluaron a tres concentraciones diferentes usando DMSO como vehículo.

Tabla 6. Porcentaje de reducción del radical DPPH.

Compuesto	% de Inhibición		
	1 μM	10 μM	100 μM
1	1.42	12.14	42.81
2	2.05	7.02	44.56
3	2.69	12.92	36.38
4	1.68	9.64	48.15

* El compuesto es activo si el porcentaje de inhibición es mayor al 50%

2. ENSAYO DE SRATB

El ensayo de SRATB se efectuó para conocer la peroxidación de lípidos en el cerebro de rata; en un ensayo preliminar las ferrocenilestibinas (tabla 7), se probaron a tres concentraciones diferentes para determinar el porcentaje de inhibición y la concentración a la cual se observaba la actividad antioxidante.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición sobre la peroxidación de lípidos.

Compuesto	Conc (μM)	nmol /mg prot.	(%)Inhibición
1	1	6.156	28.48
	10	0.404	95.31
	100	0.295	96.58
2	1	6.937	19.41
	10	0.377	95.62
	100	0.338	96.08
3	1	4.866	43.47
	10	0.308	96.42
	100	0.308	96.42
4	1	7.403	16.55
	10	0.513	94.22
	100	0.582	93.43

* El compuesto es activo si el porcentaje de inhibición es mayor al 50%

En la tabla 8 se muestran las repeticiones realizadas del ensayo de SRATB, para obtener la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}). Es importante mencionar que los dos primeros compuestos fueron disueltos en etanol y los restantes en DMSO, debido a la solubilidad de los mismos.

Los valores representan el promedio de cuatro a siete experimentos independientes \pm el error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnet para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (concentración cero).

Tabla 8. Concentración inhibitoria al 50%.

Compuesto	Conc(μM)	nmol/mg prot	Inhibición (%)	CI ₅₀ (μM)
1 (n=5)	0	8.28 \pm 0.30	---	
	1.0	7.84 \pm 0.39	5.32 \pm 2.92	
	1.33	7.70 \pm 0.38	7.14 \pm 2.50	
	1.78	6.99 \pm 0.36	15.63 \pm 2.76	2.28 \pm 0.04
	2.37	3.52 \pm 0.74*	58.05 \pm 7.88	
	3.16	0.56 \pm 0.06*	93.13 \pm 0.93	
	0	8.83 \pm 0.27	---	
2 (n=7)	1.0	8.20 \pm 0.26	7.11 \pm 1.40	
	1.33	8.01 \pm 0.28	9.34 \pm 0.87	
	1.78	7.00 \pm 0.40	20.98 \pm 2.63	2.29 \pm 0.96
	2.37	3.23 \pm 1.25*	65.10 \pm 13.04	
	3.16	0.57 \pm 0.08*	93.52 \pm 0.87	
	0	7.77 \pm 0.52	---	
3 (n=5)	0.50	8.39 \pm 0.45	4.13 \pm 2.09	
	0.75	7.55 \pm 0.59	14.26 \pm 2.71	
	1.00	5.09 \pm 0.66**	41.71 \pm 7.09	1.10 \pm 0.02
	1.25	1.25 \pm 0.48**	85.62 \pm 5.63	
	1.50	0.46 \pm 0.06**	94.76 \pm 0.67	
	0	9.86 \pm 0.56	---	
4 (n=4)	0.56	8.62 \pm 0.39	12.38 \pm 1.41	
	1.00	8.23 \pm 0.38	16.38 \pm 1.13	
	1.78	7.09 \pm 0.26**	27.79 \pm 2.18	1.91 \pm 0.96
	3.16	0.83 \pm 0.19**	91.69 \pm 1.63	
	5.62	0.68 \pm 0.24**	93.39 \pm 2.02	
	10.00	0.44 \pm 0.09**	95.64 \pm 0.70	

* Considerar al menos tres puntos significativos para el cálculo de la CI₅₀

La CI_{50} de los compuestos estudiados, fue comparada con dos antioxidantes de referencia: la quercetina y el *tert* butil hidroxitolueno, los cuales presentan una CI_{50} de $4.11 \pm 0.26 \mu\text{M}$ y $12.86 \pm 0.64 \mu\text{M}$ respectivamente (tabla 11, apéndice).

C. Actividad Citotóxica

La citotoxicidad de las ferrocenil estibinas (tabla 9) se comprobó mediante el ensayo de sulforrodamina B, en donde se emplearon linfocitos normales y cinco líneas cancerosas con el propósito de evaluar la actividad citotóxica de los compuestos.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las células cancerosas y linfocitos normales.

COMPUESTO	<u>LÍNEA CELULAR</u>					
	U-251 SNC	PC-3 PRÓSTATA	K-562 LEUCEMIA	HCT-15 CÓLON	MCF-7 MAMA	LINFOCITOS NORMALES
1	100	100	59.4	100	100	100
2	100	100	52.45	100	100	100
3**	SA	2.55	SA	25.25	SA	37.45
4	100	84.81	66.21	100	100	90.23

El experimento fue realizado a $10\mu\text{M}$, excepto en el compuesto 3 que se realizó a $50 \mu\text{M}$; SA: sin actividad

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la síntesis de las ferrocenilestibinas, se utilizó material perfectamente lavado y secado; se empleó una línea mixta de vacío-gas inerte y tubos schlenk con la finalidad de evitar el contacto con el ambiente, ya que éste afecta la reacción y ocasiona la descomposición parcial del tricloruro de antimonio y difenil estibina.

Durante el transcurso de la síntesis, se controló la atmósfera de nitrógeno, la temperatura y el tiempo de reacción. La síntesis de los compuestos se realizó a -10°C , ya que a ésta temperatura se propicia la formación del compuesto litiado; además el *tert*-butilitio es muy reactivo (reacción exotérmica). Una vez adicionado el *tert*-butilitio, transcurrieron 10 minutos e inmediatamente se agregó el tricloruro de antimonio o difenil estibina, para evitar que ocurriera la litiación en los dos anillos del ferroceno. El flujo de nitrógeno y la agitación fueron constantes durante toda la reacción. El tricloruro de antimonio y difenil estibina son compuestos sensibles a la humedad y oxígeno del ambiente, por lo que, se manejaron en condiciones de atmósfera inerte.

El compuesto 1 se obtuvo con un rendimiento del 50%, tiene un peso molecular de 669.52 g/mol y p.f. de 130°C . Es soluble en acetona, cloroformo, diclorometano y parcialmente soluble en DMSO. La elucidación estructural se realizó mediante la interpretación de los espectros de las técnicas espectroscópicas utilizadas. En el espectro de IR, se observaron las bandas características del enlace C-Sb (492 cm^{-1}), los dobles enlaces del anillo de

ferroceno (3094 cm^{-1}), los enlaces sencillos C-H ($2967\text{-}2927\text{ cm}^{-1}$) y el enlace C-N ($1238\text{-}1001\text{ cm}^{-1}$). En el espectro de masas, se visualizó el ión molecular (668), el fragmento sin un cloro (633), sin el antimonio (512) y el pico base (257) que es la parte más estable de la molécula.

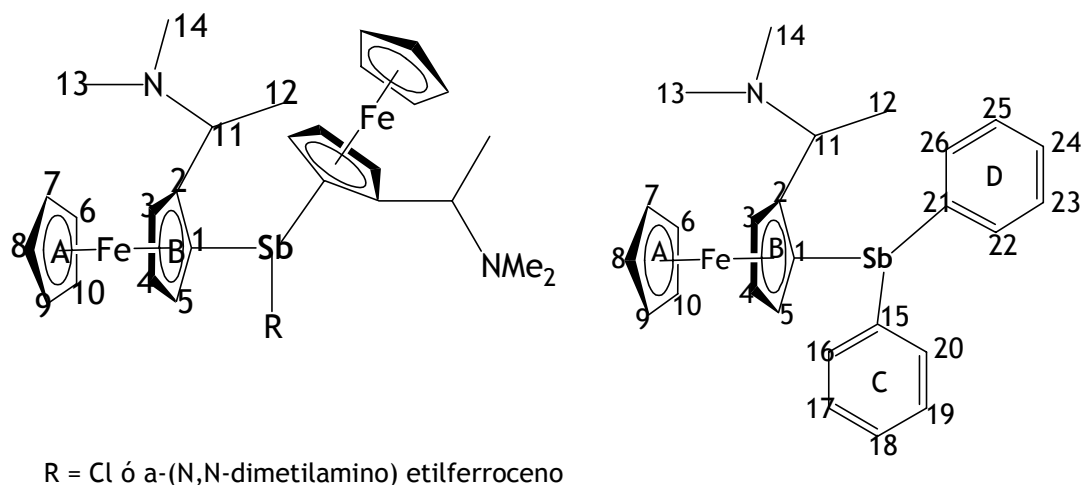


Figura 5. Numeración de los protones y de los anillos.

En los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , la asignación de las señales de cada protón y carbono se confirmó mediante la correlación bidimensional ^1H - ^1H (COSY) y la correlación ^1H - ^{13}C (HÉTCOR) respectivamente. La numeración fue de acuerdo a la figura 6. Así, se determinó una señal doble a 1.2 ppm, que pertenece a los hidrógenos del metilo (H-12), los cuales interactúan con el protón del metino (H-11) que se observa a 4.14 ppm; los protones de los metilos (H-13 y H-14) son equivalentes entre sí, por lo que muestran una señal simple a 1.9 ppm; el hidrógeno de la posición 3 (H-3) se haya más protegido, debido al sustituyente en la posición *orto*, de ahí que se visualice a 4.23 ppm; por su parte el hidrógeno 5 (H-5) presenta un desplazamiento químico a 4.25, debido a que está menos protegido porque se encuentra cercano al antimonio (atractor de electrones); el

protón H-4 se muestra a 4.16, ya que no está influenciado por ningún sustituyente. Los hidrógenos del anillo A son equivalentes, por lo que se observa una señal simple a 4.30 ppm. En cuanto al espectro de RMN-¹³C, se observó un desplazamiento químico a 8.12 ppm que corresponde al carbono del metilo(C-12), 39.77 ppm pertenece a los carbonos de los dos metilos (C₁₃ y C₁₄); los desplazamientos químicos: 67.69 ppm, 68.20 ppm y 74.19 ppm representan a los carbonos 3, 4 y 5 del anillo B, debido al efecto de los sustituyentes de la posición 3 y 5; a 69.73 ppm se observa la señal de los carbonos del anillo A, los cuales son equivalentes; el carbono 2 del anillo B se presenta a 84.86 ppm y a 96.18 ppm se visualiza el carbono enlazado al antimonio.

La estructura molecular del compuesto fue confirmada mediante la técnica de Difracción de rayos X, en la cual se determinó que es un monómero, con estructura piramidal y con interacciones intramoleculares. Presenta un sistema cristalino orto-rómbico, una longitud de enlace promedio (C-Sb) de 2.09 Å a 2.58Å y un ángulo de enlace C-Sb-C de 95°.

El compuesto **2** es un sólido cristalino naranja, cuyo punto de fusión es de 40°C. Tiene un peso molecular de 889.69 g/mol; y se obtuvo con un rendimiento del 50%. Es soluble en solventes orgánicos (acetona cloroformo, diclorometano). La confirmación estructural se llevo a cabo mediante de la interpretación de los espectros de IR, EM(FAB⁺), RMN-¹H, RMN-¹³C (correlación COSY y HETCOR), en donde se nota que los datos de cada uno de los espectros, son muy parecidos al compuesto **1**, excepto en la espectrometría de masas, ya que se obtuvo un ión molecular igual a 889, el cual coincide con el peso molecular del compuesto;

asimismo, se determinó el fragmento sin grupo dimetil amino (845) y el pico base (633), en el cual se ha perdido un grupo α -(N,N-dimetilamino) etilferroceno.

El compuesto 3 se obtuvo como un sólido cristalino de color naranja, cuyo punto de fusión es de 60°C; presenta un peso molecular de 532.12 g/mol y se consiguió con un rendimiento del 50%. En el espectro de IR, las bandas características de los enlaces que conforman el compuesto, son semejantes a los compuestos anteriores. En el espectro de masas, se visualizó el ión molecular (531), el cual corresponde al peso molecular del compuesto; igualmente, se detectó parte de la molécula sin el dimetil amino (487). En el espectro de RMN-¹H, se encontró señales parecidas a los dos compuestos anteriores, excepto en los anillos C y D; a 7.23 ppm se observaron tres protones del fenilo (anillo D, H-23, H-24 y H-25); los dos hidrógenos restantes de éste fenilo se visualizaron a 7.45 ppm (H-22 y H-26); en el anillo C, a 7.31 ppm se observan tres protones (H-17, H-18 y H-19) y a 7.58 ppm se encuentra una señal múltiple para los dos hidrógenos restantes (H-16 y H-20). Para el espectro de RMN-¹³C, las señales fueron muy similares a los dos compuestos anteriores en el anillo de ferroceno; en cuanto a los fenilos, los desplazamientos químicos se visualizaron a 127.64 ppm y 128.09 ppm para los carbonos del anillo D; a 127.84 ppm y 128.17 ppm se obtuvieron los carbonos del anillo C; el desplazamiento químico del C₁ y C₁₅ son 136.57 ppm y 135.82 ppm respectivamente.

La estructura molecular del compuesto 3 fue confirmada a través de la técnica de Difracción de rayos X, en la cual se determinó que presenta una la

longitud de enlace promedio (C-Sb) de 2.12 Å a 2.16Å y un ángulo de enlace C-Sb-C de 94.97° y 96.76°.

El compuesto 4 es un sólido cristalino de color café claro, cuyo punto de fusión es de 40°C. Tiene un peso molecular de 1156.90 g/mol; y se obtuvo con un rendimiento del 40% y es soluble en cloroformo, acetona diclometano. La confirmación estructural no se pudo llevar a cabo completamente, debido a que los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C, no se lograron interpretar. En el espectro de IR, las bandas características de los enlaces que conforman el compuesto, son semejantes a los compuestos anteriores. En el espectro de masas, se visualizó el ión molecular (1156), el cual corresponde al peso molecular del compuesto; igualmente, se detectaron algunos de los fragmentos de la molécula. Aunque no se tiene la confirmación por RMN-¹H y de RMN-¹³C, puede presumirse que si se obtuvo el compuesto, ya que el ión molecular coincide al peso molecular y las bandas características de los enlaces presentes en la estructura concuerdan ala del compuesto.

En lo que respecta a las pruebas de actividad biológica, al evaluar la actividad antioxidante por medio del método de DDPH, se determinó que los compuestos analizados no muestran actividad sobre el radical DPPH, es decir, carecen de la habilidad para reducir a éste radical. Sin embargo, al determinar la actividad antioxidante sobre la peroxidación de lípidos en el cerebro de rata mediante el ensayo de SRATB, las ferrocenil estibinas terciarias mostraron una actividad antioxidante importante. Existen varios mecanismos por los cuales pueden actuar los compuestos para neutralizar a los radicales libres; en este

caso, no puede establecerse el mecanismo por el cual las ferrocenil estibinas neutralizan a los radicales libres, ya que se requiere realizar otras pruebas que permitan determinar el mecanismo por el que los radicales libres son neutralizados.

En cuanto a la CI_{50} , en los dos primeros compuestos (tabla 8), no fue posible determinar un tercer punto con diferencia significativa ($p \leq 0.05$), por lo que se tomó en cuenta un punto sin diferencia significativa, con la finalidad de establecer un valor aproximado de la CI_{50} .

Al comparar la CI_{50} de los compuestos ensayados con dos antioxidantes de referencia: la quercetina y el *tert* butil hidroxitolueno, cuya CI_{50} es de $4.11 \pm 0.26 \mu\text{M}$ y $12.86 \pm 0.64 \mu\text{M}$ respectivamente, se distingue que los compuestos analizados muestran un mayor porcentaje de inhibición a la formación de SRATB, a concentraciones más bajas que los dos antioxidantes de referencia.

En cuanto a la actividad citotóxica, los compuestos (tabla 9) resultaron ser citotóxicos para los cinco tipos de células cancerosas, ya que inhibieron el crecimiento de todas las células por arriba del 50%; el compuesto 3 a una concentración de $50 \mu\text{M}$ inhibió el crecimiento celular en un 25% en cáncer de colon. Si bien los compuestos inhibieron el crecimiento de las células cancerosas, igualmente revelaron toxicidad para los linfocitos normales; por lo que, quizá cambiando el método de estimación de citotoxicidad y las concentraciones de los compuestos, se pueda encontrar una baja toxicidad hacia los linfocitos normales.

VIII. CONCLUSIONES

La reacción de monolitiación de ferroceno permitió sintetizar las nuevas ferrocenil estibinas terciarias con rendimientos del 50%. Asimismo, se obtuvo un complejo con platino.

Todos los compuestos se identificaron y caracterizaron mediante las técnicas espectroscópicas de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HÉTCOR), en el IR, EM (FAB⁺); y a través de la Difracción de rayos X se confirmó la estructura molecular de los compuestos 1 y 3.

En cuanto a la actividad antioxidante, las ferrocenil estibinas terciarias por el método de DPPH, no mostraron una actividad sobre éste radical, es decir, carecen de la habilidad para reducir el DPPH y/o actuar como donadores de hidrógeno.

En la peroxidación de lípidos en el cerebro de rata mediante el ensayo de SRATB, los compuestos estudiados presentaron una notable actividad antioxidante.

Al compararse la CI_{50} de los compuestos ensayados con dos antioxidantes de referencia: la quercetina y el *tert* butil hidroxitolueno, las ferrocenil estibinas son más efectivas, ya se requiere una menor concentración para inhibir la formación de SRATB.

En la prueba de citotoxicidad los compuestos inhibieron el crecimiento de las células cancerosas, pero también revelaron toxicidad para los linfocitos normales, por lo que, las ferrocenil estibinas poseen actividad citotóxica.

X. APÉNDICE

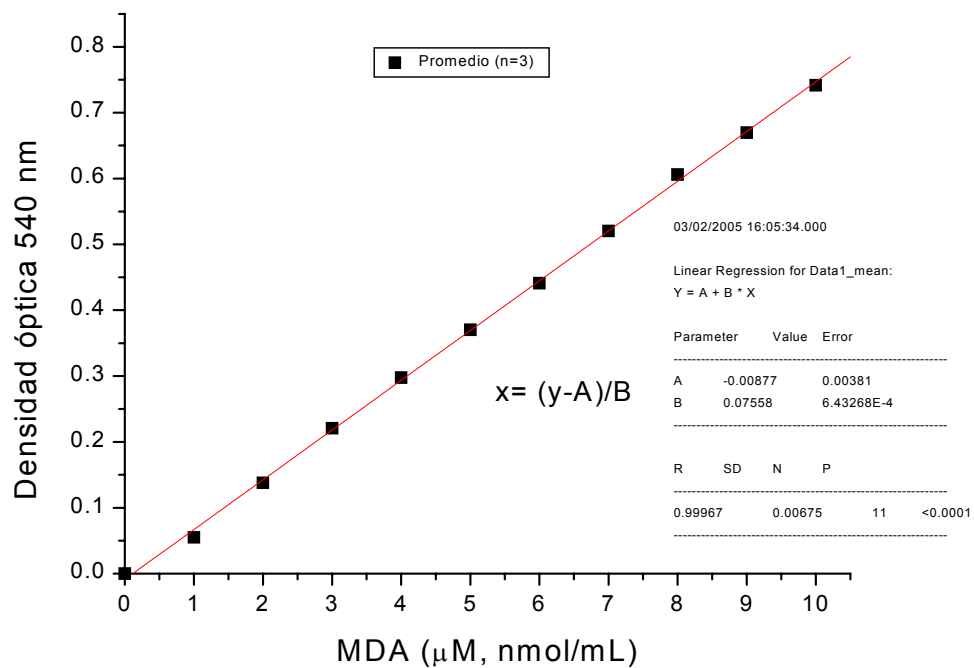
A. Concentración inhibitoria al 50% de la Quercetina y BHT.

Compuesto	Conc(μM)	nmol/mg prot	Inhibición (%)	CI ₅₀ (μM)
Quercetina (n=4)	0	9.52 \pm 0.19	-	
	1	8.33 \pm 0.33	11.70 \pm 2.14	
	1.78	7.64 \pm 0.47 *	19.29 \pm 3.32	4.11 \pm 0.26 μM
	3.16	6.21 \pm 0.24 *	34.16 \pm 3.05	
	5.62	3.20 \pm 0.55 *	66.05 \pm 5.62	
	10	1.27 \pm 0.29 *	86.61 \pm 2.92	
BHT (n=4)	0	8.84 \pm 0.59	-	
	7.5	7.65 \pm 0.42	8.16 \pm 1.78	
	10	5.86 \pm 0.78 *	23.98 \pm 6.41	M=12.86 \pm 0.64
	13.34	3.90 \pm 0.71 *	54.99 \pm 7.25	
	17.78	1.09 \pm 0.21 *	82.15 \pm 6.98	
	23.71	0.79 \pm 0.18 *	90.27 \pm 2.51	

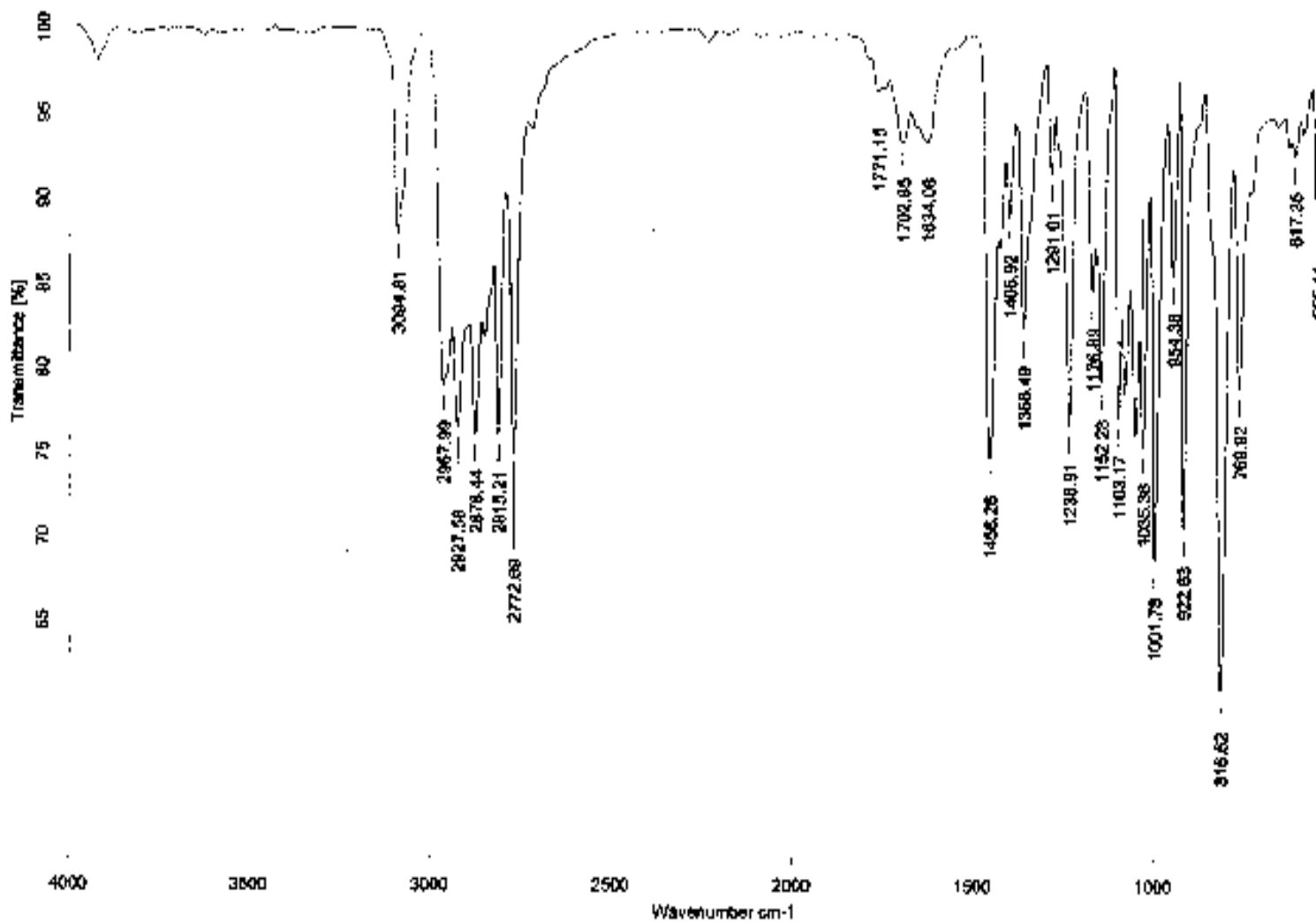
B. Curva estándar del Malondialdehído

MDA (μM)	Densidad óptica a 540 nm			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio \pm ES
0	0	0	0	0 \pm 0
1	0.029	0.058	0.078	0.055 \pm 0.01422
2	0.134	0.129	0.151	0.138 \pm 0.00666
3	0.226	0.203	0.233	0.22067 \pm 0.00906
4	0.304	0.282	0.307	0.29767 \pm 0.00788
5	0.375	0.348	0.388	0.37033 \pm 0.01178
6	0.445	0.417	0.461	0.441 \pm 0.01286
7	0.542	0.484	0.535	0.52033 \pm 0.01828
8	0.597	0.581	0.64	0.606 \pm 0.01762
9	0.655	0.645	0.709	0.66967 \pm 0.01988
10	0.729	0.723	0.773	0.74167 \pm 0.01576

Curva estándar de malondialdehido (MDA)

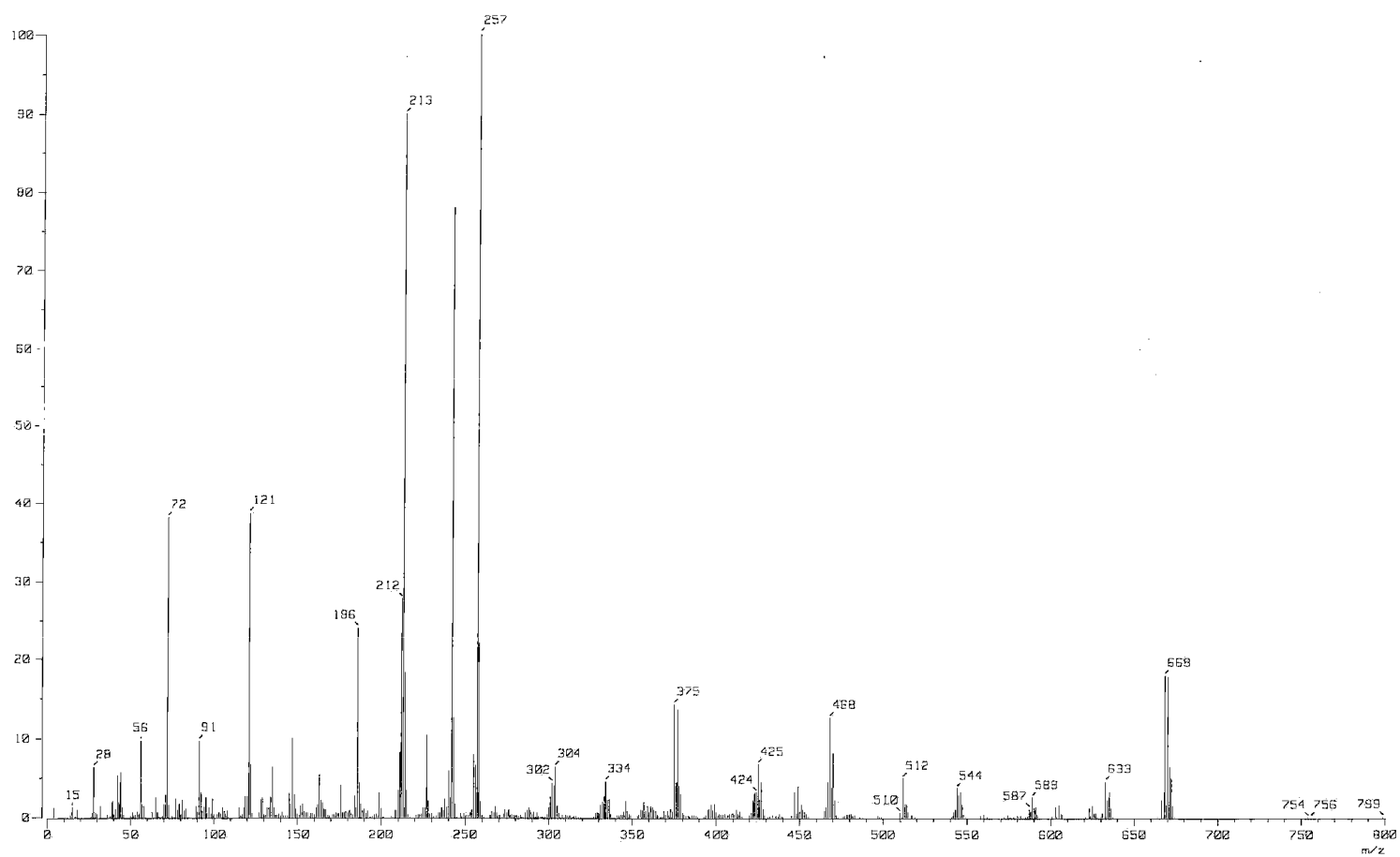


C. Espectros de las ferrocenilestibinas



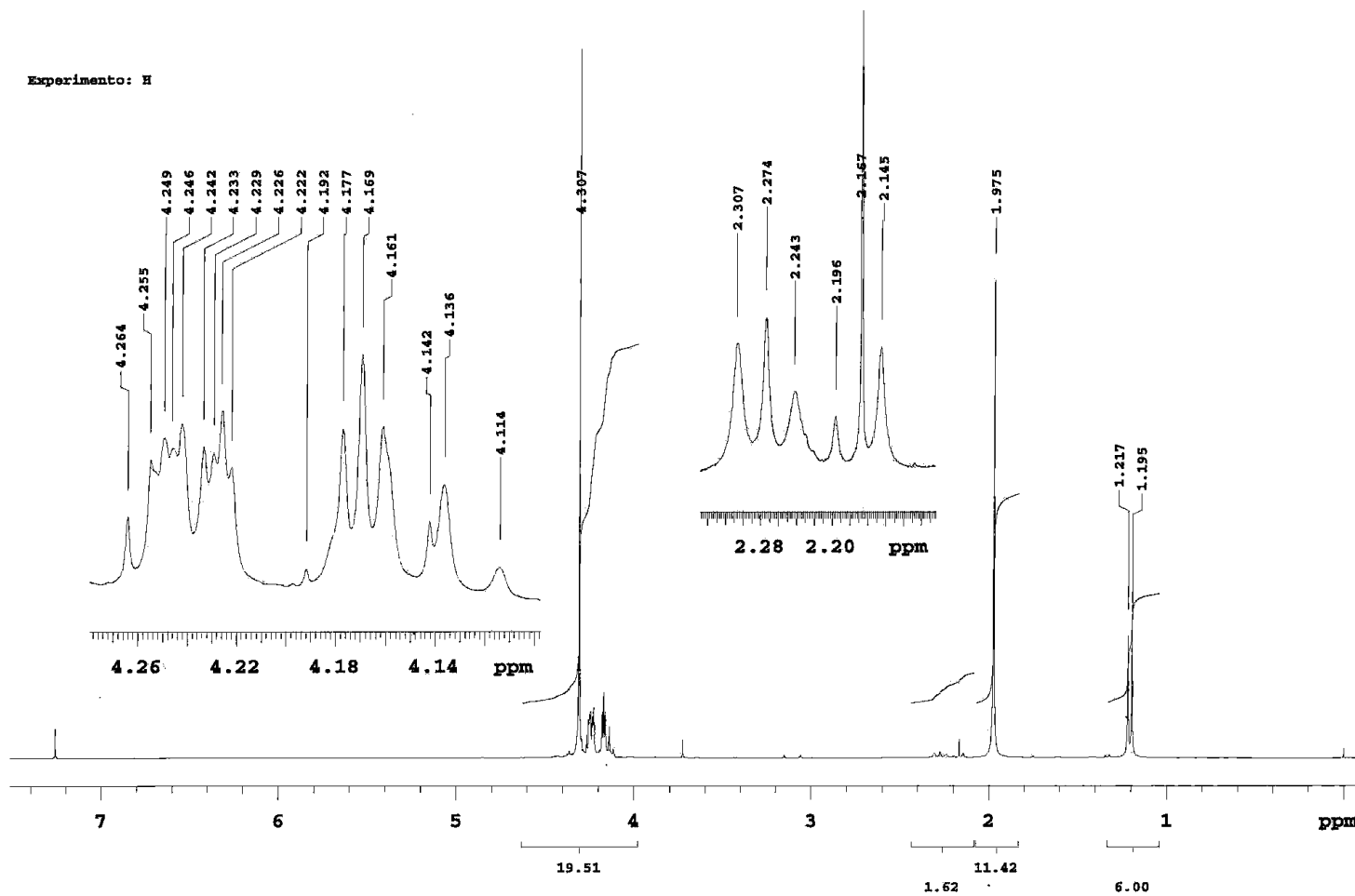
Cloro bis[dimetil(1-ferrocenilet)amina] de antimonio (III)
a. Espectro de IR

[Mass Spectrum]



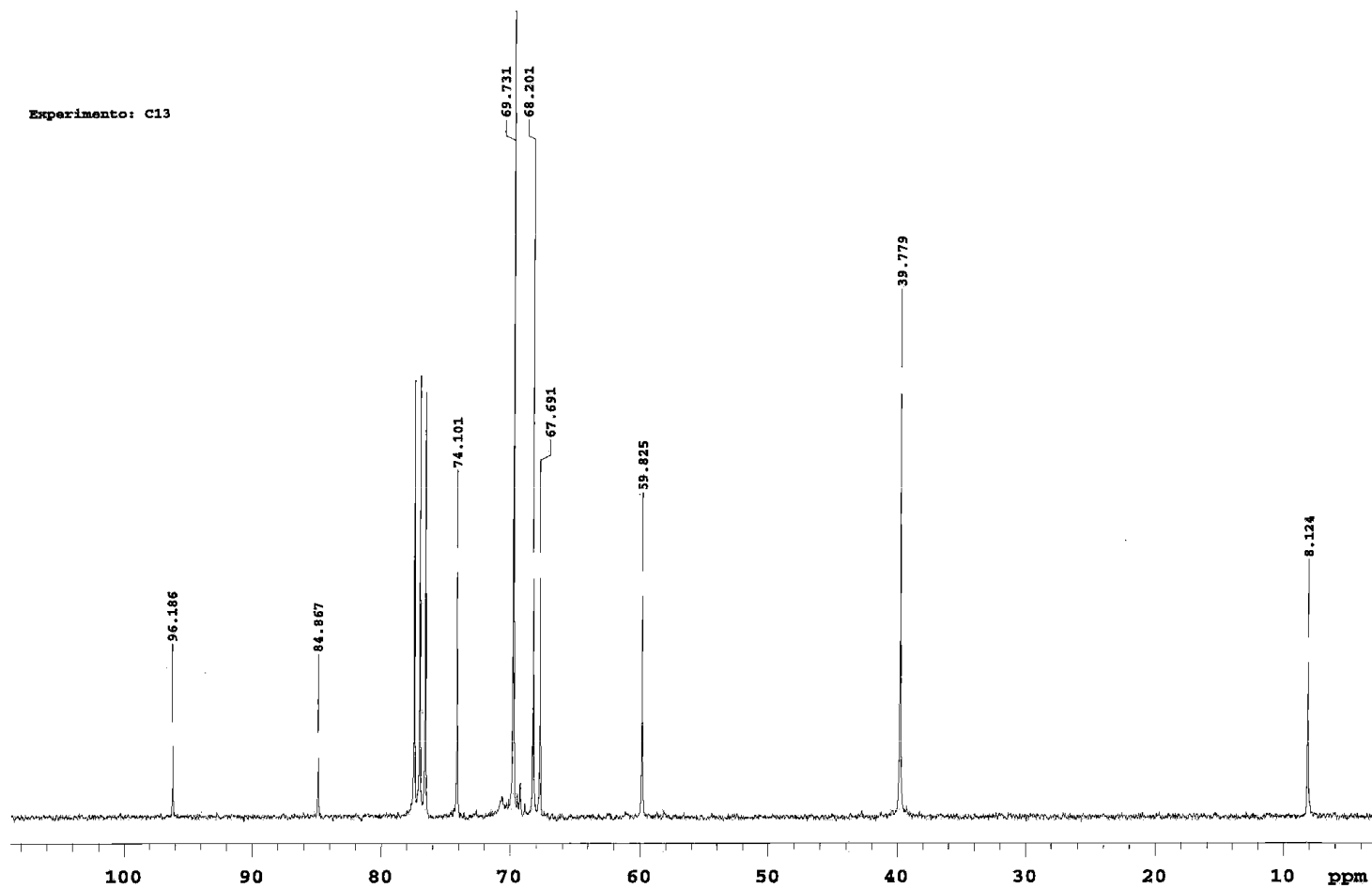
Cloro bis[dimetil(1-ferrocenilet)amina] de antimonio (III)
b. Espectro de masas (FAB⁺)

Experimento: H

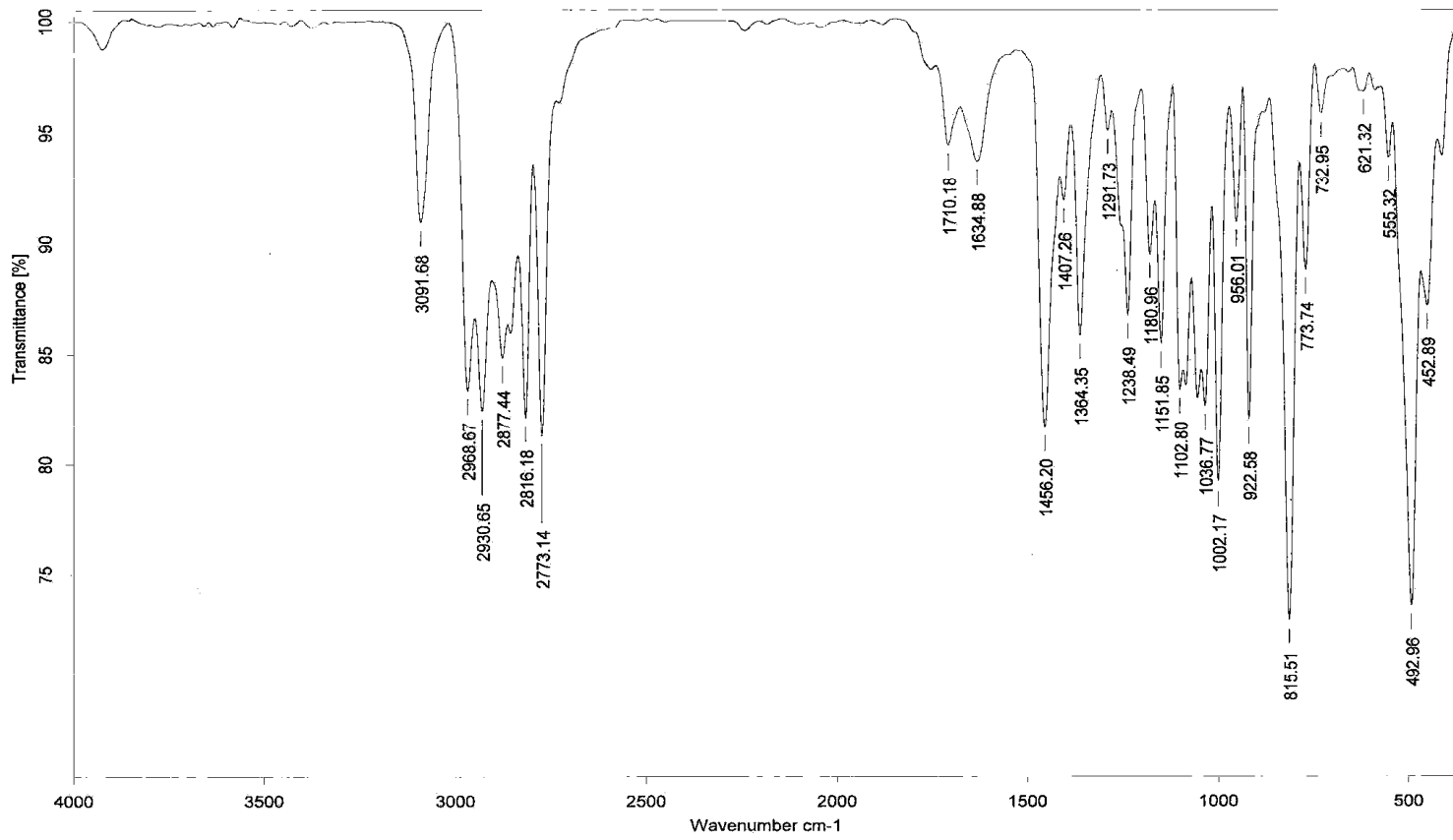


Cloro bis[dimetil(1-ferroceniletíl)amina] de antimonio (III)
c. Espectro de RMN-¹H

Experimento: C13

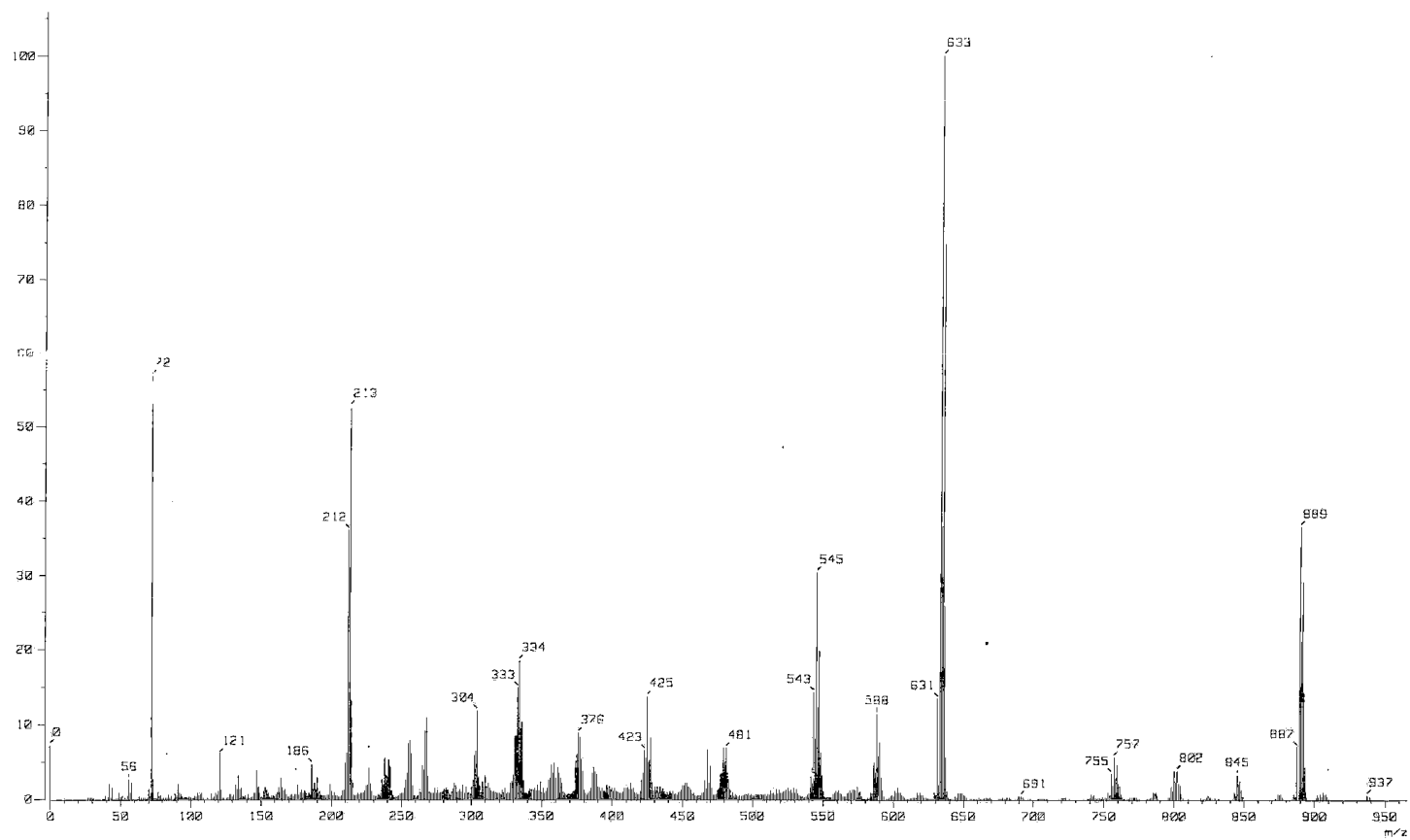


Cloro bis[dimetil(1-ferroceniletil)amina] de antimonio (III)
d. Espectro de RMN- ^{13}C

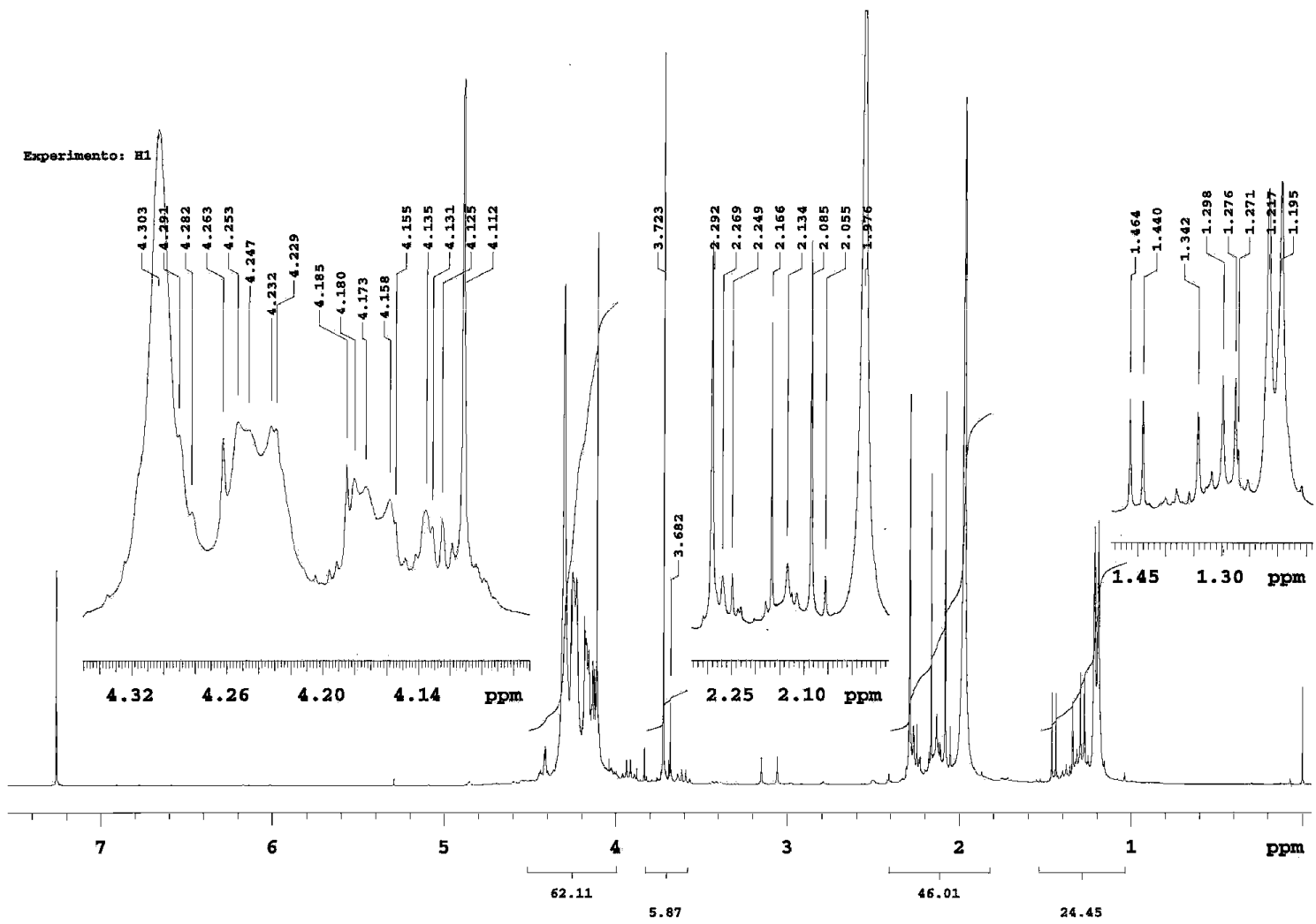


Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina
a. Espectro de IR

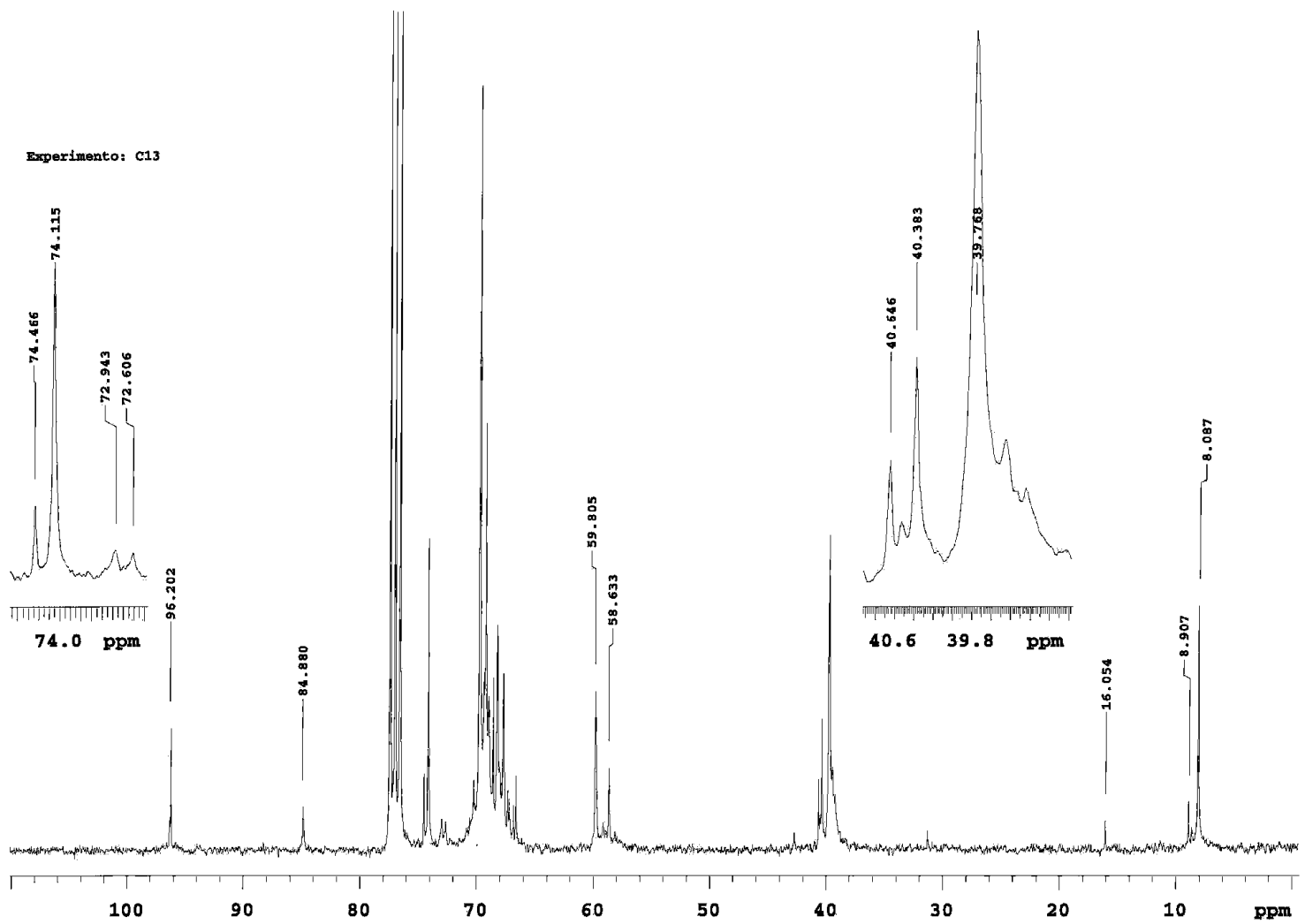
[Mass Spectrum]



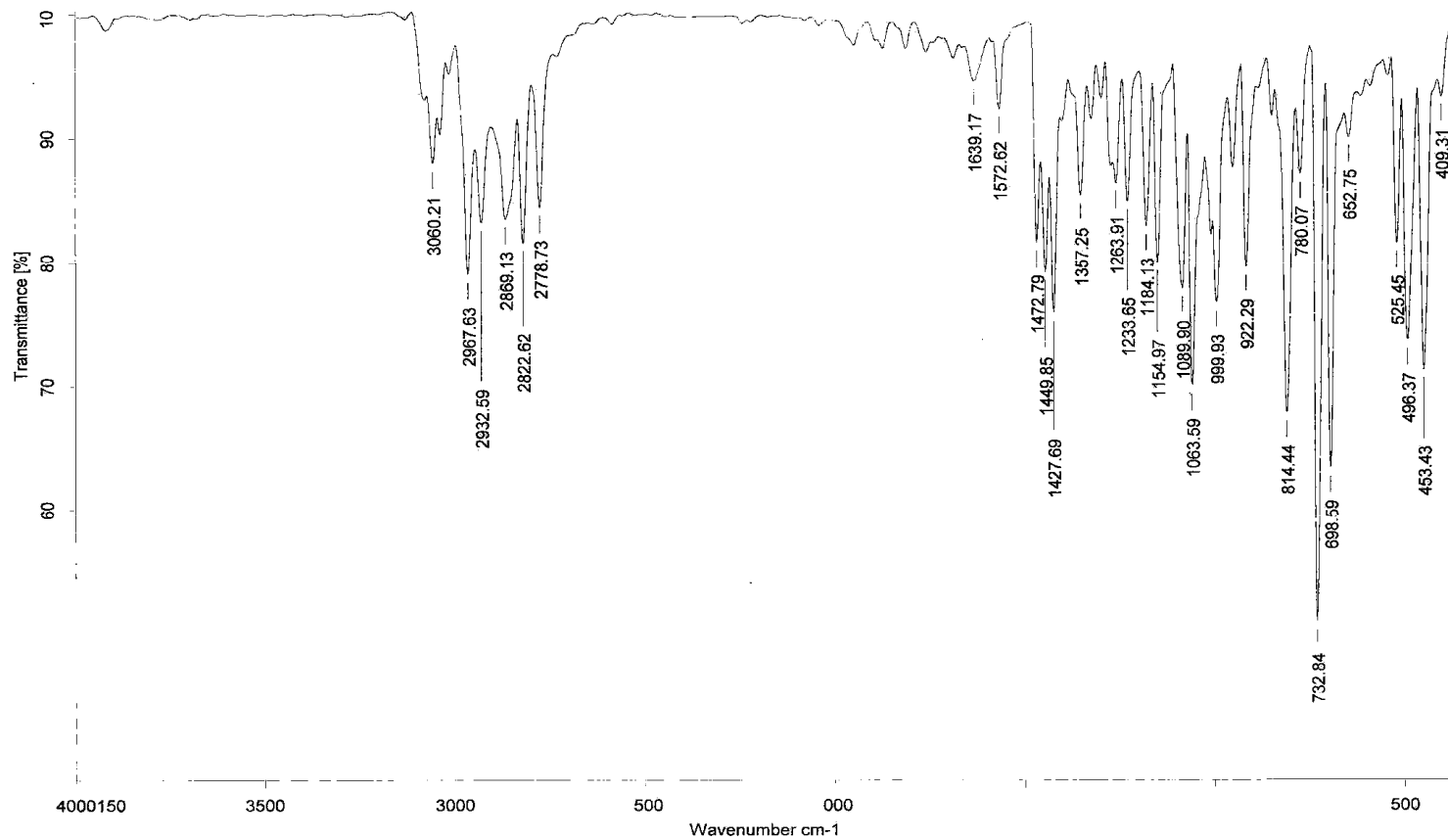
Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina
b. Espectro de masas (FAB⁺)



Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina
c. Espectro de RMN-¹H



Tris [(2-dimetilaminoetil) ferrocenil] estibina
d. Espectro de RMN-¹³C



C:\Infrarrojo\AIR-2005\6813.0

Dr. P. Sharma

Ph2Sbp

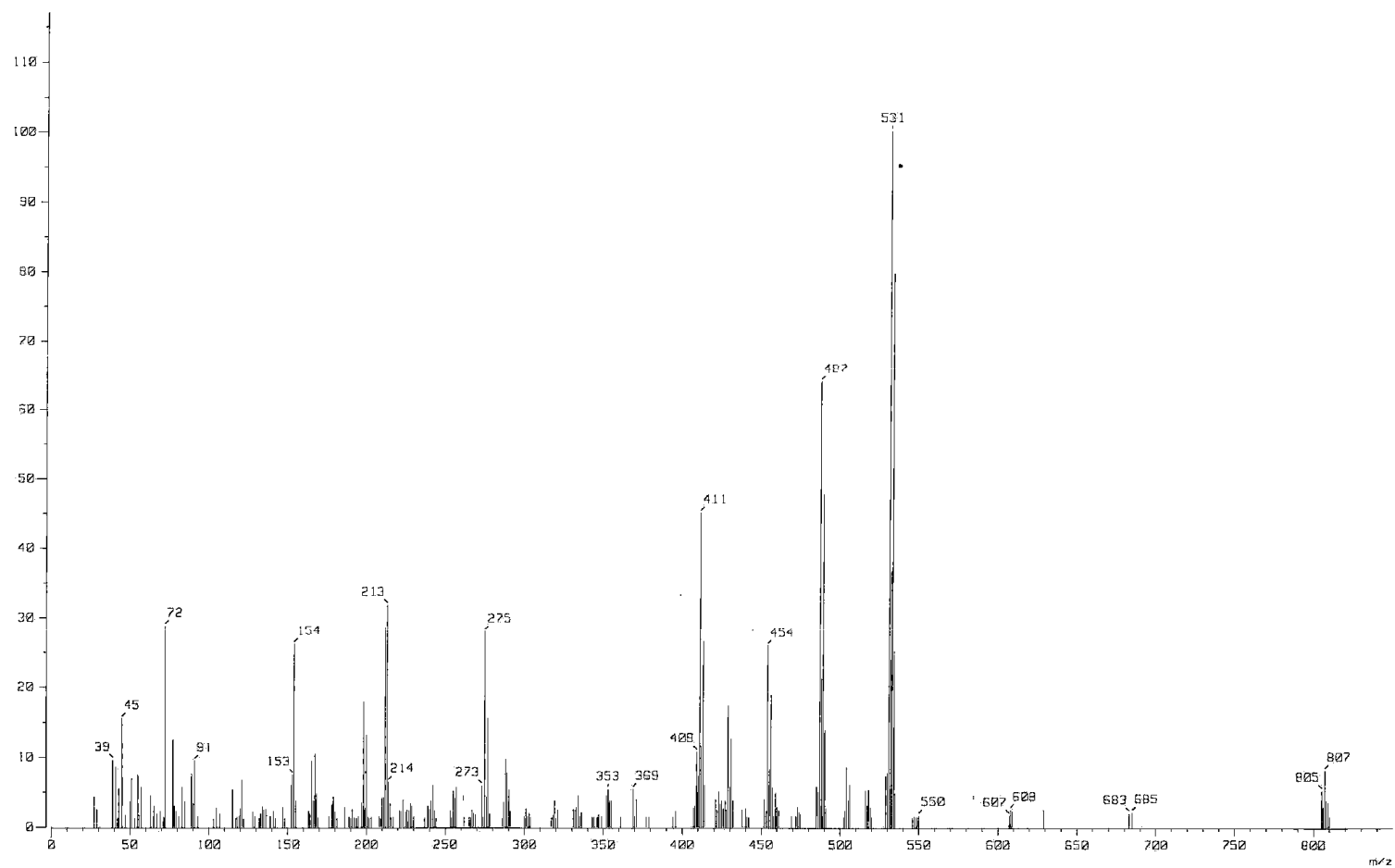
Pastilla-KBr

EGR

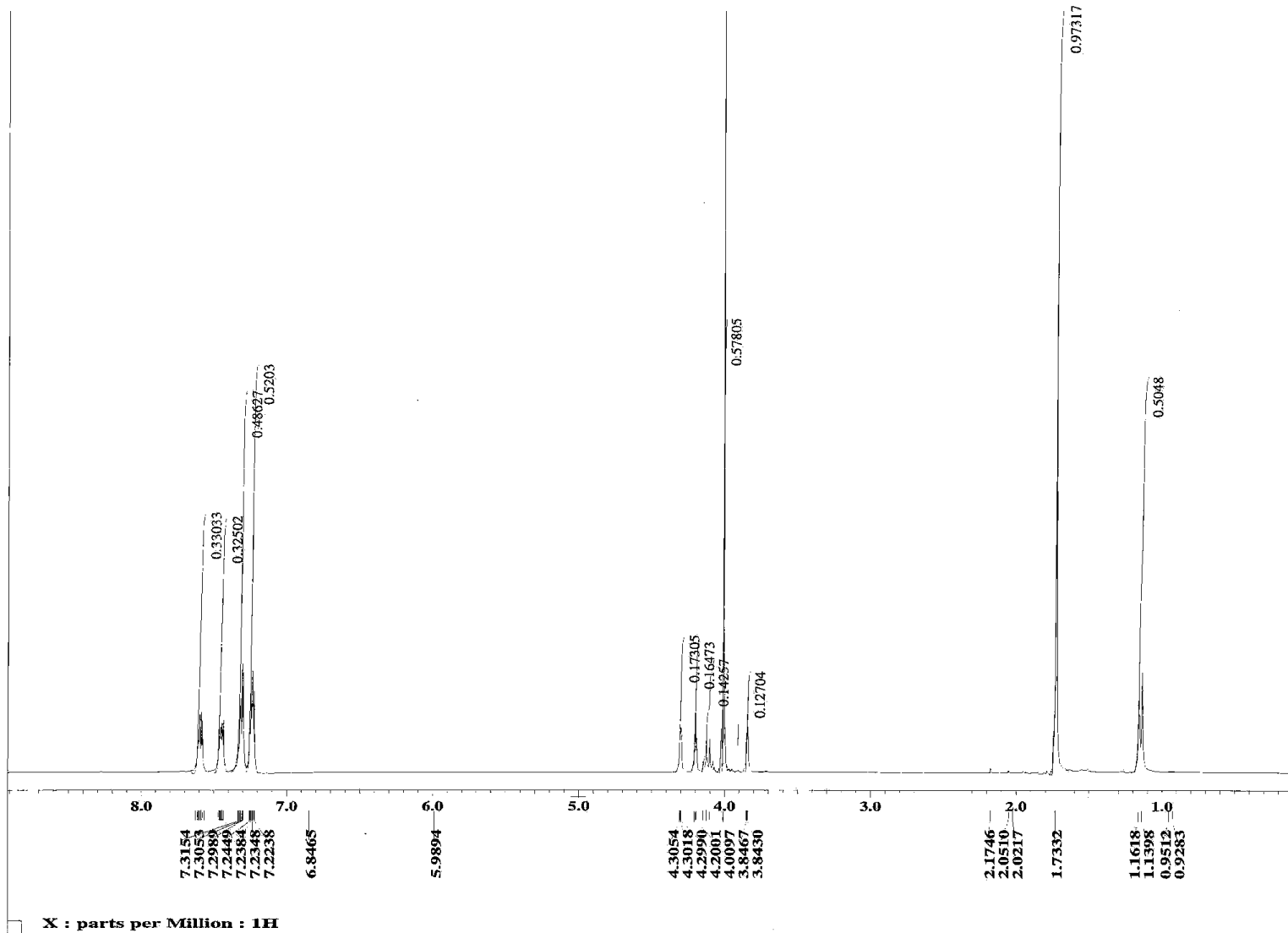
02/02/2005

1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina
a. Espectro de IR

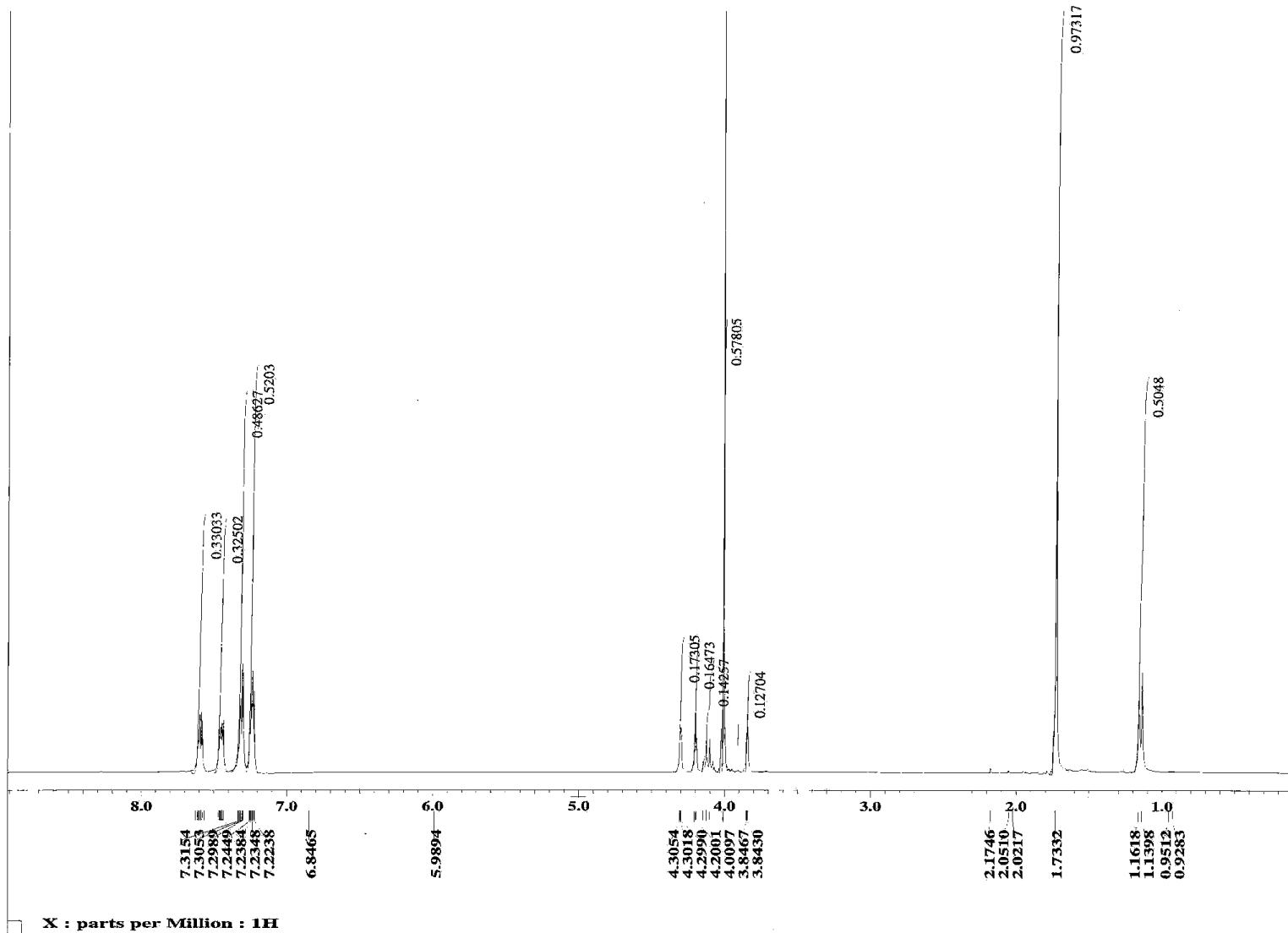
[Mass Spectrum]



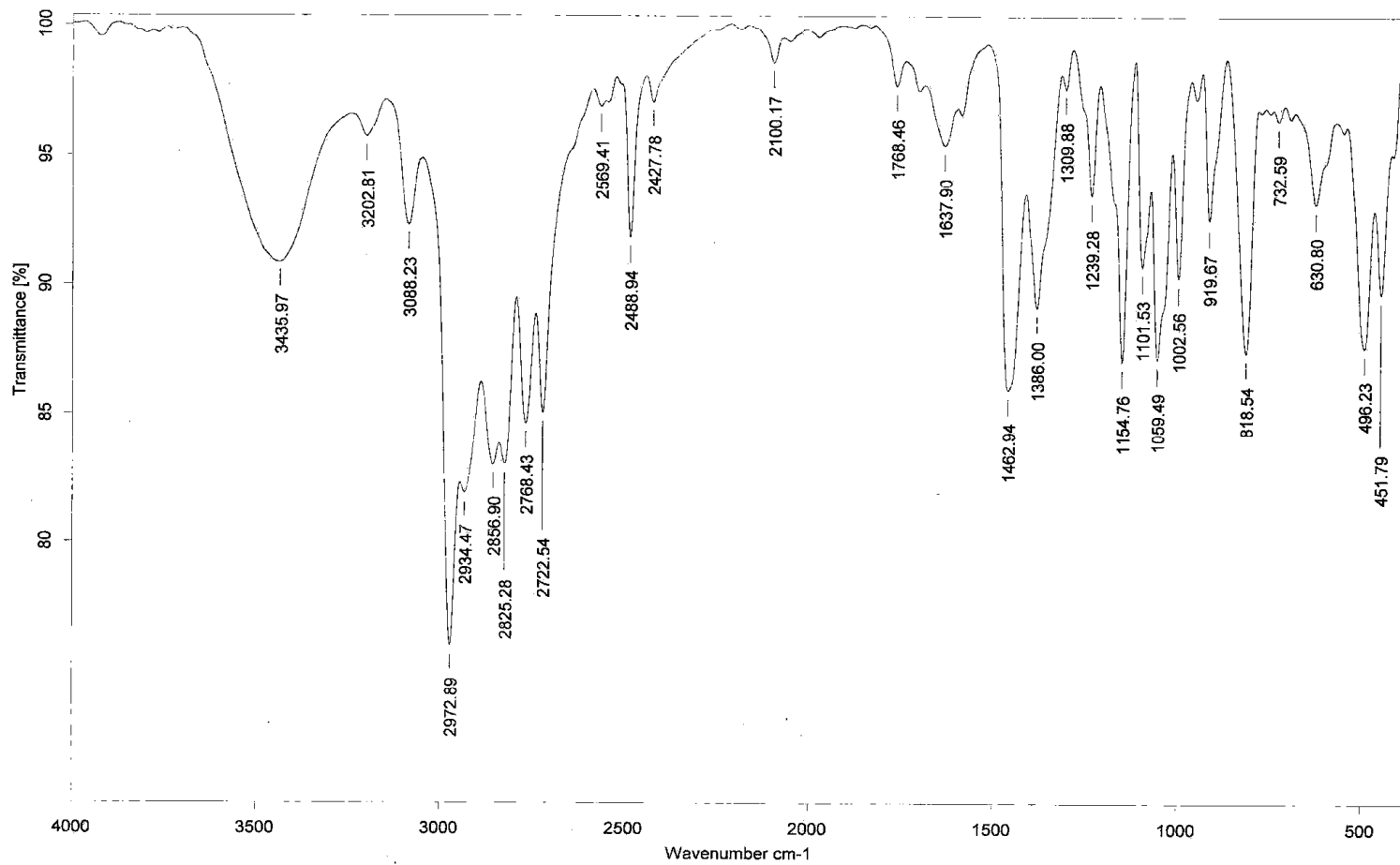
1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina
b. Espectro de masas (FAB⁺)



1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina
c. Espectro de RMN-¹H



1-(2-difenilestibanil-ferrocenil) etil-dimetilamina
d. Espectro de RMN-¹³C



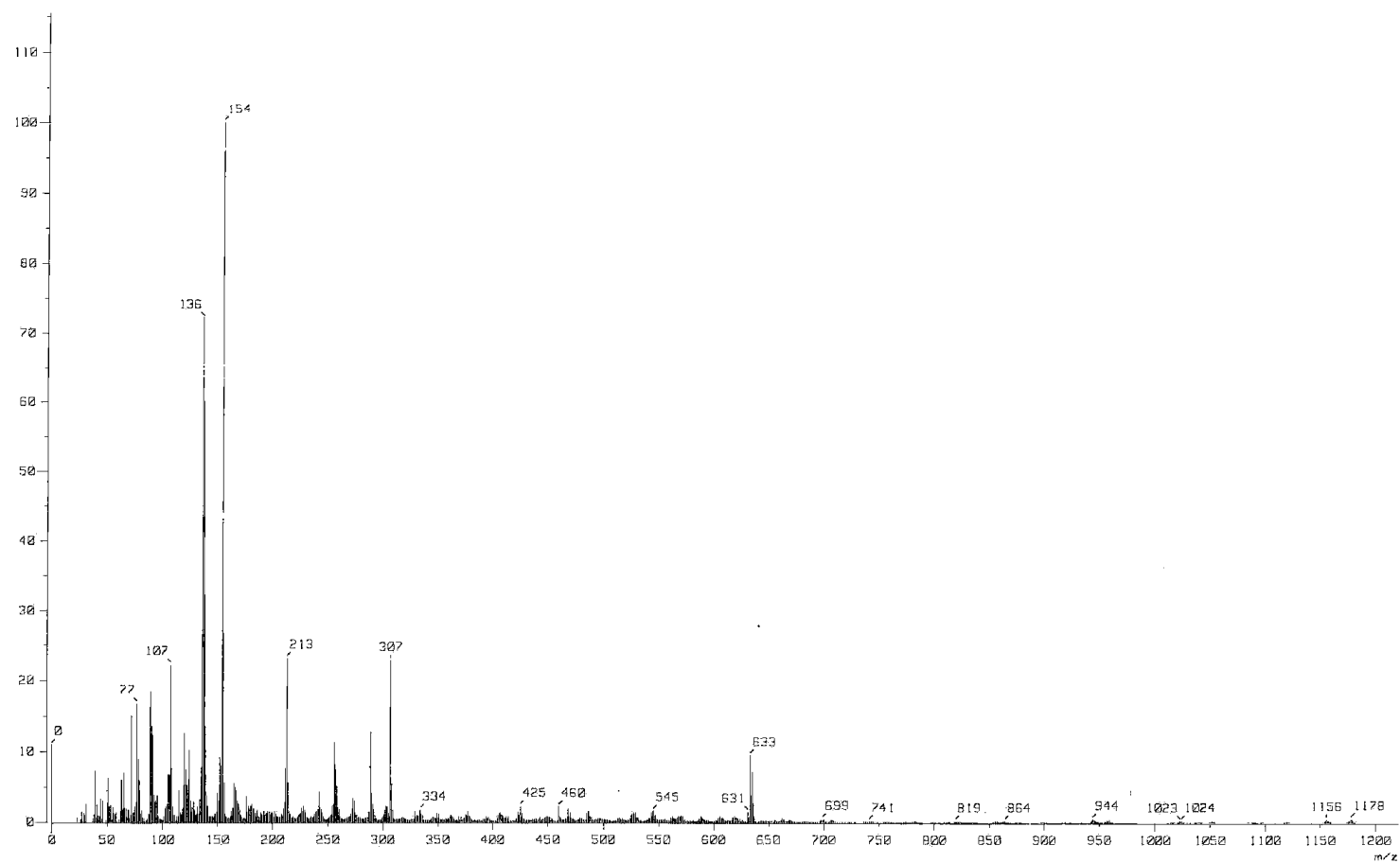
C:\Infrarrojo\AIR-2005\6842.0 Dr. P. Sharma SbL3PtCl2 Pastilla-KBr EGR

03/02/2005

Dicloro [tris-(dimetilaminoetil) ferrocenil estibina N,Sb] de platino (II)

a. Espectro de IR

[Mass Spectrum]



Dicloro [tris-(dimetilaminoetil) ferrocenil estibina N,Sb] de platino (II)

b. Espectro de masas (FAB⁺)

IX. REFERENCIAS

1. Mujeres y Hombres en México 2005. 9ª ed. 2005 Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. México (Publicación anual).
2. Karshtedt D. Bell AT. Tilley TD. Synthesis and study of heterobimetallic complexes supported by a ferrocene-based bisphospine-diamine ligand. *Organometallics* 2003; **22**: 2855-2861.
3. Delhaes L. Biot C. Berry L. Maciejewski LA. Camus D. Brocard JS. Dive D. Novel Ferrocenic Artemisinin Derivatives: Synthesis, In vitro Antimalarial Activity and Affinity of Binding with Ferroprotoporphyrin IX. *Bioorg Med Chem* 2000; **8**: 2739-2745.
4. Wu X. Wilariat P. Go ML. Antimalarial Activity of Ferrocenyl Chalcones. *Bioorg Med Chem Letters* 2002; **12**: 2299-2302.
5. Dayani R. *Organometallics chemistry: Opens New Vistas in Medicine, Material science. Chemical and Engineering News*; 1995.p. 32-36.
6. Top S. Vessières A. Leclercq G. Quivy J. Tang J. Vaisserman J. et. al. Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hidroxiferrocifens: Evidence for an Antiproliferate Effect Hormone- Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chem Eur* 2003; **9**: 5223-5236.
7. Cabrera A. Sharma P. Arias J. Velasco J. Pérez-Flores R. Amidocarbonylation of alkenes at very low pressures with a $\text{Co}_2(\text{CO})_8/\text{SbR}_3$ system: two easy routes to reach *N*-acetyl- α -aminoacids. *J. Mol Cat A* 2004; **212**: 19-23.

8. Sharma P. Rosas N. Cabrera A. Silva MJ. Toscano A. Stibines and bismuthines containing c-heterocyclic substituted thienyl: syntheses, structures and cytotoxicity. *J. Applied Organomet Chem.* (comunicado)
9. Sharma P. Rosas N. Cabrera A. Toscano A. Silva MJ. Perez D. First synthesis and structural report on selenophen-2-yl containing pnictogens: biological activities of tris (selenophen-2-yl) stibine. *J. Organometallic chem.* 2005; **690**: 3286-3291.
10. Haaland A. Molecular structure and bonding in the 3d metallocenes. *Acc Chem Res* 1979; **12**: 415-422.
11. Lukehart CM. *Fundamental transition metal organometallic chemistry.* Wadsworth Inc: Belmont CA; 1985.p. 87-94.
12. Huheey EA. Keitter RL. *Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad.* 4ª ed. Oxford university: Press Harla México; 1997: 7,10-749.
13. Powell P. *Principles of organometallic chemistry.* 2ª ed. New York: Chapman and Hall; 1988.p. 279-303.
14. Slocum DW. Engelman TR. Ernest C. Jennings A. Jones W. Koonsvitsky B. et.al. Ring metalation of dimethylaminomethylferrocene with butyllithium and condensation with electrophilic compounds. Synthesis of 1, 2-disubstituted ferrocenes. *J Am Chem Soc* 1965; **87(6)**: 1241-1246.
15. Collman JP. Hegedus LS. Norton JR. Finke RG. *Principles and applications of organotransition metal chemistry.* University science books: Mill Valley CA; 1987.p. 165-175.

16. Benkeser RA. Goggin D. Scholl G. A route to monosubstituted ferrocene compounds. *J Am Chem Soc* 1954; **76**: 4025-4026.
17. Allcock HR. Lavin KD. Riding GH. Suszko PR. Whittle RR. Synthesis and structure of metallocene cyclophosphazene derivatives. *J Am Chem Soc* 1984; **106**: 2337-2347.
18. Godberg SI. Keith LH. Prokopov TS. A convenient preparation of monolithioferrocene. *J Org Chem* 1963; **28**: 850-851.
19. Rebiere F. Samuel O. Kagan H.B. A convenient method for the preparation of monolithioferrocene. *Tetrahedron letters* 1990; **31**: 3121-3124.
20. Seyferth D. Huffman HP. Burton R. Helling JF. Ferrocene and related organometallic π -complexes. Thermal decomposition of diferrocenylmercury. *Inorg Chem* 1962; **1**: 414-417.
21. Carraher CE. Pittman CU. *Organometallic compounds in biomedical applications*. Florida Atlantic University: Florida Center; 2004: 1-18.
22. Top S. Tang J. Vessieres A. Carrez D. Provot C. Jaouen G. Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of estradiol receptor site directed cytotoxics. *Chem Commun* 1996; **8**: 955-956.
23. Top S. Vessieres A. Cabestaing C. Laios I. Leclereq G. Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series. *J Organomet Chem* 2001, **637-639**: 500-506.
24. Norman NC. *Chemistry of arsenic, antimony and bismuth*. Gran Bretaña: Blackie Academic and Professional; 1998.p. 5-45.

25. Aylett BJ. *Organometallic compounds*. 4^a ed. New York: Chapman and Hall; 1979. p. 387-455.
26. Schwartz RS. *Estrés oxidativo y defensa antioxidante*. Implicaciones en nutrición clínica. En: *Nutrición Clínica: Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales*. Madrid: McGraw.Hill; 2001. p. 83-87.
27. Auroma OI. Free radicals, antioxidant and international nutrition. Asia Pacific. *J. Clinic nutr* 1999, **8(1)**: 53-63.
28. Martínez CM y Sánchez de MFC. *Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante*. En: *Nutrición Clínica: Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales*. Madrid: McGraw- Hill; 2001. p. 91-111.
29. Yuong IS. Antioxidants in health and disease. *J. Clin Pathol* 2001, **54**: 176-186.
30. Rodríguez P.JM. Menéndez L JR. Trujillo JY. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Millit* 2001; **11**: 250-354.
31. Halliwell B. *Antioxidants*. En: *conocimientos actuales sobre nutrición*. 7^a ed. ILSI, OPS, OMS, Washington D.C; 1997. p. 636-644.
32. Fuchs D. Baier-Bitterlich G. Wede I. Wachtr H. *Reactive oxygen and apoptosis*. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold spring harbor laboratory press. North Carolina; 1997. p. 40-139.
33. Valenzuela A. *Estrés oxidativo, una enfermedad de nuestro tiempo: El beneficio de la suplementación de la dieta con sustancias antioxidantes*.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos-Universidad de Chile. Santiago de Chile, 1999.

34. Turturro A. Duffy P. Hart R.W. Antioxidation and evolution: *Dietary restriction and alterations in molecular process*. In: Antioxidants in human health and disease. Cabi Publishing, Canada; 1999. p. 84-85.
35. Parker DV. Nutrition antioxidants and disease prevention: mechanisms of action. In: *Antioxidants in human and disease*. Eds. T.K. Canada; 1999.p. 1-13.
36. Thomas JA. *Estrés oxidativo y defensa oxidante*. En : Nutrición en la salud y en la enfermedad. 9ª ed. México: McGraw-Hill; 2002.p. 863-873.
37. Basu TK. *Potential role of antioxidant vitamins*. In: Antioxidants in human health and disease. Canada: Cabi Publishing; 1999.
38. Wheatley AR. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends analytical chemistry* 2000, **19(10)**: 617-628.
39. Ohkawa H. Ohishi N. Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem* 1979; **95**: 351- 358.
40. Prakash A. Antioxidant activity. *Analytical progress* 2001, **19(2)**:1-7.
41. Molyneux P. The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol* 2004, **26(2)** :211-219.
42. Fernández J. Pérez- Álvarez JA. Fernández- López JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food chemistry* 1997, **59(3)**: 345-353.
43. Khoury S. Jasmin C. *Cáncer los especialistas responden*. España: Aguilar; 1991.p. 29-40.

44. Rojas EO. *Inmunología*. 2^a ed. México: Panamericana; 2003.p. 289-305.
45. Sufiness M. *New approaches to the discovery of antitumor agents*, in Proc. Phytochemical Society of Europe. Biologically Active Natural Products. Hostettmann K. Lea PJ. Eds. Clarendon Press, Oxford; 1987.p. 27: 85.
46. Monks A. Scudiero D. Skehan P. Shoemaker R. Paull K. Vistica D. Hose C. et. al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 757-766.
47. Skehan P. Storeng R. Scudiero D. monks A. McMahon J. Vistica D. Warren JT. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer- Drug Screening. *J. Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 1107-1112.
48. Shriver DF. Drezdson MA. *The manipulation of air sensitive compounds*. 2^a ed. United States of America: John Wiley and Sons; 1986. p. 25-45.