



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**Nuevos compuestos organometálicos con
potencial actividad antiparasitaria**

Esteban A. Rodríguez Arce

Directoras: Dra. Dinorah Gambino

Dra. Ana Lucía Otero

Facultad de Química, UdelaR

Cátedra de Química Inorgánica, DEC

Montevideo, Uruguay

2018

*Esta tesis está dedicada a mi madre, mi hermana y mi padre,
quienes son mi razón de vivir....*

“If you want, you can”

Quiero agradecer a mi familia, en especial a mi madre, mi hermana y mi padre, quienes han sido un apoyo incondicional en todo este proceso. Agradezco a mis dos directoras de tesis Dinorah (la profe) y Lucia (la profesorcita), quienes fueron una gran guía en el transcurso de estos años, tanto a nivel laboral como personal. Gran parte de mi proceso de aprendizaje y maduración se los debo a ustedes. Agradezco también a la cátedra de Química Inorgánica por toda la ayuda académica, y por todos esos bellos momentos que me hicieron vivir. De este grupo humano me llevo grandes amigos, quienes estoy seguro seguiremos cultivando nuestra amistad. Agradezco en particular a Fery quien fue mi amiga y apoyo incondicional en gran parte de esta etapa. Doy gracias a Nico y Lore que siempre tuvieron un consejo para mí, al grupo de la “comunidad latina” que me trajeron alegría, a Mario, Delfi, Gonza y Pejo que siempre tuvieron una sonrisa, cariño y ánimo para entregarme. Doy gracias a las personas del grupo de investigación que siempre estuvieron dispuesto a ayudarme: a Lara, Euge y Mariana que se convirtieron en grandes personas para mí, Bruno, Marisol y Julio que siempre estuvieron dispuesto a entregar su ayuda. Agradezco también a la cátedra de Química Analítica, en especial a Mariela e Ignacio, quienes durante mi época como docente en esta cátedra aumentaron mi conocimiento en la química y en la docencia. Agradezco al grupo de cristalografía, en especial a Leopoldo que me entregó todo el conocimiento relacionado con esa área. Doy gracias a los profesores de la Universidad de Chile Claudio Olea y Juan Diego Maya quienes me recibieron con toda la disposición en sus laboratorios para realizar dos pasantías de investigación, y a Michel y Alejandra que siempre me dieron una mano para realizar los experimentos. Al profesor Joao Costa Pessoa y la profesora Isabel Correia del Instituto Superior Técnico de Lisboa que me recibieron en su laboratorio y me entregaron su ayuda para realizar los experimentos de difracción circular.

Fuera del ámbito académico, quiero agradecer a las personas que fueron el pilar fundamental de todo este proceso. Muchas gracias Panchito por acompañarme en todo este camino, por darme siempre para adelante y nunca abandonarme. A mis amigos chilenos residentes, que con el paso del tiempo se transformaron en mi familia, especialmente a Made, Silvi, Rolo, Carlitos y Nacho, sin ustedes nada de esto sería posible. A mi familia de Uruguay Celeste, este cuadro de futbol me enseñó lo que es la verdadera amistad, lo que es la garra charrúa, y me mostró como es el verdadero Uruguay, agradezco especialmente a Ale y Viole por hacerme parte de su familia.

Doy gracias al Uruguay, por recibirme y hacerme sentir como uno más de ustedes....

Índice general

Capítulo 1. Introducción	5
Capítulo 2. Antecedentes y Propuesta	68
Capítulo 3. Materiales y Métodos	103
Capítulo 4. Compuestos con el core Ru(II)-ciclopentadienilo {RuCp}	140
Capítulo 5. Compuestos organometálicos de renio(I)-tricarbonilo, <i>fac</i> -{Re(CO) ₃	202
Capítulo 6. Compuestos de Pd(II) y Pt(II) con el co-ligando 1,1'-bis-difenilfosfino ferroceno, {M(dppf)}	251
Capítulo 7. Conclusiones y Perspectivas	385
Apéndice 1. Datos cristalográficos	
Apéndice 2. Trabajos publicados	

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Contenido

1.1	Química Inorgánica Medicinal	7
1.1.2	Complejos metálicos de platino y paladio	10
1.1.2	Complejos metálicos de rutenio	13
1.1.3	Complejos metálicos de renio	15
1.2	Química Bioorganometálica	16
1.2.1	Compuestos organometálicos	16
1.2.2	Compuestos bioorganometálicos	18
1.3	Enfermedades tropicales desatendidas	25
1.3.1	Enfermedad de Chagas	27
1.3.1.1	Distribución de la enfermedad	29
1.3.1.2	El parásito y su transmisión	31
1.3.1.3	Fisiopatología y diagnóstico	33
1.3.1.4	Tratamiento	35
1.3.2	Enfermedad del sueño	37
1.3.2.1	Epidemiología	40
1.3.2.2	El parásito y el vector	41
1.3.2.3	Fisiopatología y diagnóstico	46
1.3.2.4	Tratamiento	48
1.4	Bibliografía	51

1.1 Química Inorgánica Medicinal

Los iones metálicos juegan un papel importante en organismos vivos debido a que participan de numerosos procesos biológicos. Por ejemplo, el ion ferroso en la hemoglobina es fundamental para el transporte de oxígeno, los iones calcio son un componente vital de los huesos y otros elementos de transición son esenciales para el funcionamiento de enzimas [1]. La Química Bioinorgánica es el área de la Química que estudia la función de los iones metálicos en sistemas biológicos, incluyendo el estudio de fenómenos naturales como el comportamiento de metaloproteínas, o fenómenos artificiales relacionados con la importancia de éstos en medicina y toxicología [2]. De este último punto emerge un área denominada Química Inorgánica Medicinal que está relacionada, entre otros aspectos, con el estudio y desarrollo de complejos metálicos con actividad terapéutica o de diagnóstico [1,3].

Si bien la Química Inorgánica Medicinal es un área relativamente joven, el valor terapéutico de los iones metálicos ha sido conocido desde hace miles de años. Por ejemplo, la utilización de plata, oro y hierro para “curaciones mágicas” data de hace más de cinco mil años [1]. Uno de los primeros metalofármacos con aplicaciones terapéuticas fue sintetizado en 1912 por el científico Paul Ehrlich. Este fármaco llamado Salvarsan es un compuesto de As que fue utilizado para el tratamiento de la sífilis [4] hasta que fue reemplazado por la penicilina después de la segunda guerra mundial [5]. Sin embargo, el inicio de la Química Inorgánica Medicinal moderna comenzó luego del descubrimiento de las propiedades anticancerígenas del cisplatino, que será abordado en profundidad más adelante.

La Química Inorgánica Medicinal presenta dos focos principales de estudio. Por un lado, fármacos (ligandos) que poseen blancos de acción que son determinados por la presencia de iones metálicos en los sistemas biológicos, como por ejemplo los metales presentes en el sitio activo de enzimas. Por otro lado, compuestos metálicos en los que el ion metálico juega un rol fundamental para la actividad farmacológica del compuesto [2]. Independientemente de esta categorización, que en muchos casos resulta útil, la Química Inorgánica Medicinal abarca un amplio rango de aplicaciones médicas como lo son: la suplementación de elementos esenciales, el uso de compuestos metálicos como agentes terapéuticos y de diagnóstico, radiofármacos de terapia y diagnóstico, agentes de

contraste para MRI, inhibidores enzimáticos, reconocimiento de proteínas, entre otros [3,6]

En el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos, la participación de la química inorgánica ha generado que se amplíe el rango de elementos químicos disponibles para el uso medicinal, incluyendo elementos metálicos radiactivos o altamente tóxicos. Algunos metalofármacos diseñados como agentes terapéuticos actualmente son utilizados para el tratamiento médico en enfermedades humanas y otros se encuentran en fases clínicas avanzadas. El cisplatino (*cis*-diaminodicloro-platino(II)) es uno de los fármacos más utilizados en la terapia antitumoral, y otros complejos basados en platino como el carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, también son utilizados en clínica en algunos países como agentes anticancerígenos (éstos serán abordados en detalle más adelante). Otros ejemplos de la participación de la Química Inorgánica Medicinal en el desarrollo de fármacos lo constituyen el tris(8-hidroxiquinolato) de galio(III) (KP46) que presenta propiedades antitumorales y cuya formulación vía oral actualmente se encuentra en fase clínica [7,8], y algunos complejos de rutenio (III) que avanzaron hasta ensayos clínicos de fase II (que serán mencionados en detalle más adelante) [9]. Por otro lado, los radiofármacos terapéuticos (que son capaces de administrar dosis citotóxicas de radiación dirigidas directamente al tejido local) se emplean comúnmente en etapas avanzadas del cáncer de próstata, de mamas, de pulmón, de vejiga y de tiroides [10]. Por ejemplo, se utilizan soluciones salinas inyectables de ^{153}Sm y ^{89}Sr para el tratamiento del dolor paliativo del cáncer metastásico de hueso, compuestos de ^{90}Y se utilizan para el tratamiento del linfoma no Hodgkin y complejos de ^{166}Ho , $^{186/188}\text{Re}$, ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{288}Lu que están actualmente en ensayos clínicos para el uso contra diversos tipos de cáncer. También se han desarrollado metalofármacos con propiedades antimicrobianas y antiparasitarias. Por ejemplo, el fármaco llamado melarsoprol es un compuesto de arsénico utilizado contra la Tripanosimiasis Africana Humana y el compuesto de antimonio (Pentostam®) es utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis [11]. Otros compuestos metálicos se utilizan también como bactericidas como, por ejemplo, los complejos de bismuto utilizados contra la bacteria *Helicobacter pylori* causante de gastritis tipo B, úlceras en el tracto gastrointestinal y cáncer gástrico [12], o los ungüentos de Ag(I) que son utilizados para la reparación y tratamiento de infecciones resultantes de quemaduras de segundo y tercer grado [13,14].

Los compuestos de coordinación con actividad terapéutica pueden clasificarse en dos grandes grupos.

- a) **La actividad farmacológica es debida a la presencia del metal:** En este tipo de compuestos el ion metálico es el responsable de la acción terapéutica. Los ligandos del complejo en su forma libre no presentan actividad farmacológica, pero sin embargo la unión de éstos al centro metálico, genera un efecto beneficioso sobre la biodisponibilidad y biodistribución, lo que puede resultar en un efecto positivo sobre la actividad biológica o en una disminución de la toxicidad.
- b) **Complejos metálicos con ligandos bioactivos:** En este grupo de compuestos, el o los ligandos del complejo son moléculas bioactivas, es decir, son moléculas orgánicas que presentan en su forma libre una actividad farmacológica determinada. La coordinación de estas moléculas bioactivas a diferentes centros metálicos puede mejorar su perfil farmacológico. La interacción metal-ligando bioactivo, genera en muchos casos un efecto sinérgico entre las características farmacológicas del ligando y del metal. La formación del complejo puede aumentar la biodisponibilidad del ligando bioactivo, debido a que esta unión va a modificar la solubilidad, la lipofilia y la estabilidad de la molécula. Esta unión al metal puede generar que el fármaco orgánico tenga un mayor tiempo de residencia en el organismo, permitiéndole así alcanzar el blanco terapéutico de manera más eficiente, y de esta forma mejorar su índice terapéutico, ya sea por incremento de la actividad biológica, por disminución de la toxicidad, o ambos. Además, es posible que al estar inmerso en el compuesto de coordinación, la molécula bioactiva logre evadir los múltiples mecanismos de resistencia celular (que es uno de los problemas frecuentemente observados en la terapia con agentes quimioterapéuticos) debido a que la molécula se encontraría “disfrazada” en una nueva entidad química (compuesto de coordinación) que no sería susceptible a los procesos moleculares de rechazo contra el fármaco.

En relación al átomo metálico, la coordinación del ligando orgánico bioactivo puede generar una disminución de la toxicidad del metal, ya que al estar coordinado se encuentra menos biodisponible para participar de reacciones indeseadas, como por ejemplo, la inhibición de enzimas u otras reacciones que generan efectos dañinos para el organismo [15,16]. Algunos ejemplos del

sinergismo metal-fármaco son los complejos insulino-miméticos de vanadio con ligandos biguanidas [17], los complejos tripanosomicidas de rutenio con el ligando clotrimazol [18] o complejos antitumorales de cobre con tiosemicarbazonas [19].

A continuación se presentan algunos de los ejemplos más relevantes de la actividad farmacológica de compuestos de coordinación de platino, paladio, rutenio y renio, metales que son los metales involucrados directamente en este Trabajo de tesis.

1.1.1. Complejos metálicos de platino y paladio

Como se mencionó anteriormente, el descubrimiento de la actividad anticancerígena del cisplatino (*cis*-diaminodichloro-platino (II)) marcó el inicio del desarrollo de la Química Inorgánica Medicinal moderna. La actividad farmacológica de este compuesto fue descubierta accidentalmente en el año 1965 por el biofísico Rosenberg, quien demostró que el complejo de la figura 1.1 era capaz de inhibir *in vitro* la reproducción de *Escherichia coli* [1,20–22]. Si bien en aquella época sólo los compuestos orgánicos estaban aceptados como apropiados para el uso medicinal en humanos, y la utilización de compuestos metálicos se veía truncada por los posibles efectos tóxicos, Rosenberg luego de realizar numerosos ensayos y a través del *National Cancer Institute*, finalmente logró presentar la patente del cisplatino para su uso como agente anticancerígeno en el año 1979 [1].

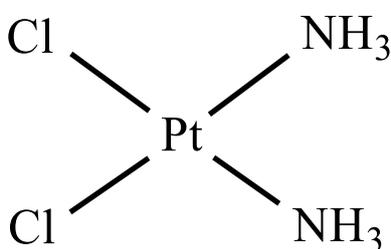


Figura 1.1: Estructura del fármaco cisplatino.

Luego de este importante descubrimiento, se desarrollaron numerosas investigaciones para comprender el modo de acción por el cual actúa este compuesto anticancerígeno. Uno de sus principales mecanismos se basa en la formación de aductos con el ADN [1,23]. El cisplatino es administrado como un complejo neutro por vía intravenosa, y es transportado por el torrente sanguíneo (donde sufre hidrólisis parcial, que es una de las causas principales de su toxicidad) e ingresa a la célula cancerígena, preferentemente mediante transporte pasivo (figura 1.2) [24]. En el interior de la célula el complejo se hidroliza, generando un complejo con carga positiva que es atraído por la carga negativa externa del ADN. Posteriormente, el complejo hidrolizado se coordina a los átomos de nitrógeno de las bases del ADN, principalmente guanina, y en menor grado a adenina y citosina [25]. Esto provoca desenrollamiento y flexión del ADN que evita la transcripción y replicación de la biomolécula, iniciando la apoptosis celular [26].

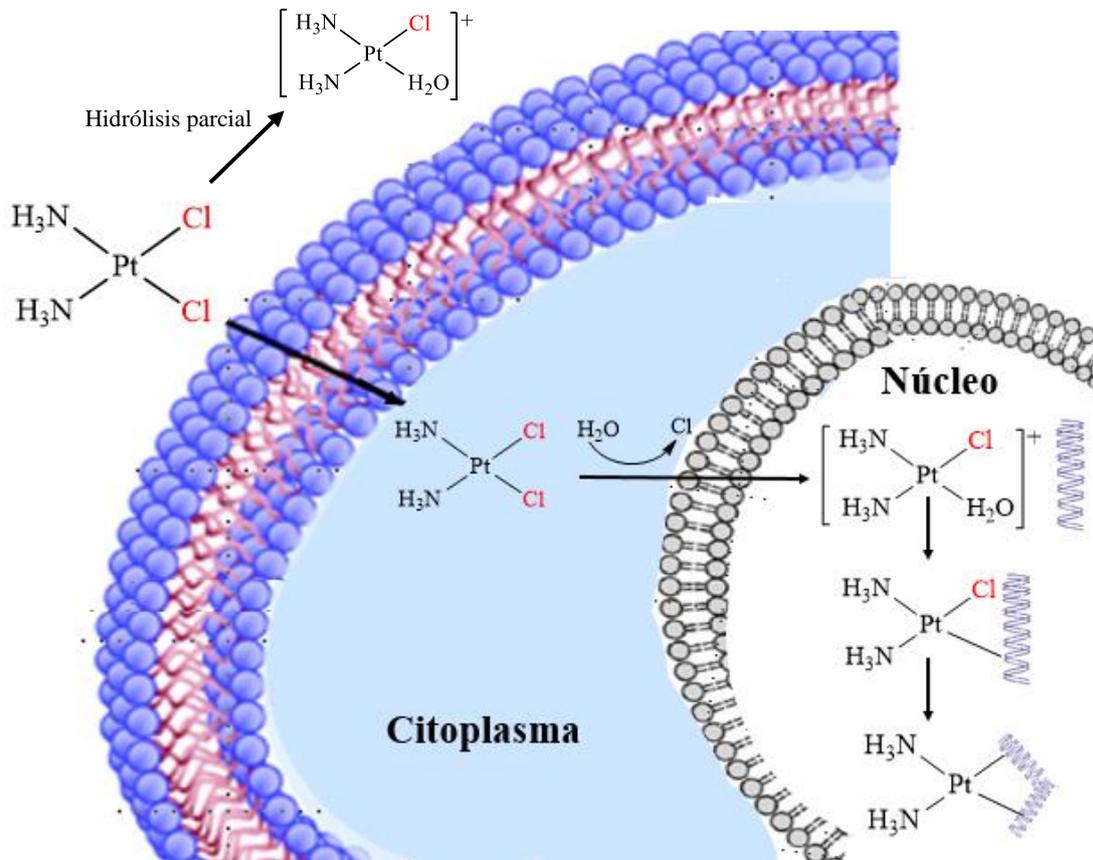


Figura 1.2: Representación esquemática del mecanismo de acción del fármaco cisplatino.

Con el fin de evitar los efectos tóxicos del cisplatino, se han desarrollado otros complejos basados en platino para su uso en terapia antitumoral. El carboplatino y el oxaliplatino han sido aprobados por el FDA (*Food and Drug Administration*) y se encuentran en uso clínico. El nedaplatino, lobaplatino y heptaplatino se encuentran en ensayos clínicos en los Estados Unidos, pero ya están en uso clínico en Japón, China y Corea del Norte (figura 1.3).

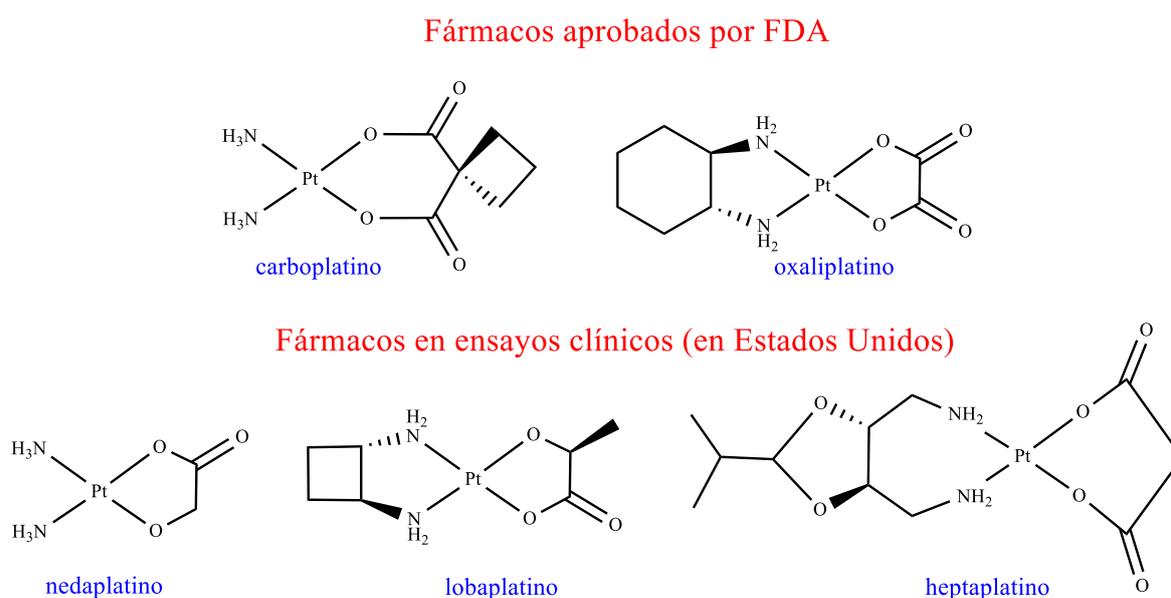


Figura 1.3: Metalofármacos de platino utilizados en terapia antitumoral.

Los fármacos antitumorales de Pt(II) han presentado algunas desventajas como efectos secundarios adversos, resistencia de los tumores, baja solubilidad en medio acuoso, entre otras. En este marco, otra de las estrategias utilizadas para diseñar nuevos agentes antitumorales con propiedades farmacológicas mejoradas, ha sido la de modificar la naturaleza del ion de metálico central. Entre los primeros complejos metálicos “sin platino” que fueron estudiados para el tratamiento del cáncer se encuentran los derivados de paladio(II). Esto fue motivado por las similitudes químicas existentes entre ambos iones metálicos, y en particular la analogía estructural encontrada en complejos con estos metales [27]. En general, los complejos de Pt(II) son termodinámicamente más estables y poseen una cinética de sustitución más lenta que los de Pd(II); de hecho los compuestos de Pd(II) intercambian ligandos 10^4 - 10^5 veces más rápido que los análogos de Pt(II).

Debido a este rápido intercambio de ligandos, los derivados de paladio(II) pueden no mantener su integridad estructural en fluidos biológicos durante el tiempo necesario para alcanzar los objetivos farmacológicos. Sin embargo, la elección correcta de los ligandos es determinante para modificar la reactividad de los complejos de paladio [28]. De esta manera, se han sintetizado numerosos complejos de paladio(II) que han mostrado prometedoras características antitumorales, especialmente con ligandos aromáticos nitrogenados, tales como los derivados de piridina, quinolina, pirazol y 1,10-fenantrolina, y ligandos quelantes N,S como los derivados de tiosemicarbazonas y ditiocarbamatos [29–33].

1.1.2 Complejos metálicos de rutenio

En la búsqueda de nuevos metalofármacos anticancerígenos “sin platino”, los complejos de rutenio también han sido unos de los más estudiados. Esto es debido a algunas propiedades químicas y biológicas que ofrecen los compuestos basados en este metal y que los hacen adecuados para el estudio y desarrollo de potenciales fármacos [34,35].

Los compuestos de rutenio presentan en general una baja toxicidad, probablemente debido a las similitudes metabólicas existentes entre rutenio y hierro. Los estados de oxidación biológicamente relevantes del rutenio, (II) y (III), presentan una gran afinidad por ligandos nitrogenados y azufrados presentes en los sistemas biológicos como el ADN, enzimas y proteínas. En algunos complejos, los potenciales de reducción del par redox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ están comprendidos dentro de los rangos de potencial asequibles a nivel biológico, permitiendo la biorreducción de estos compuestos en el medio. En particular, agentes reductores, como glutatión, ascorbato y algunas enzimas, son capaces de reducir $\text{Ru}(\text{III})$ a $\text{Ru}(\text{II})$, y por el contrario, el oxígeno molecular y la enzima citocromo oxidasa son capaces de oxidar el ion $\text{Ru}(\text{II})$ a $\text{Ru}(\text{III})$. De esta manera, es posible obtener profármacos basados en rutenio que podrían activarse en los tejidos tumorales hipóxicos mediante un proceso de biorreducción, y a su vez, reoxidarse en células normales oxigenadas lo que conduciría a una mayor selectividad y a una baja toxicidad en células normales [36]. La geometría octaédrica de los complejos hexacoordinados de $\text{Ru}(\text{II})$ y $\text{Ru}(\text{III})$ permite la interconversión *in vivo* entre ambos estados de oxidación, sin requerimientos energéticos extra para posibles rearrreglos estructurales. Además, esta

geometría amplía las posibilidades de unión a posibles dianas terapéuticas en comparación a la geometría plano cuadrada de los compuestos de Pt(II). Por otro lado, como se ha mencionado, el intercambio de ligandos es un factor determinante en la actividad biológica, ya que está directamente relacionado con la estabilidad del complejo y con los procesos de activación, desactivación y detoxificación en el medio biológico. La cinética de sustitución de ligandos en complejos de rutenio (II) y (III) es similar a la de los complejos de Pt(II), siendo los complejos de Ru(III) más inertes a la sustitución.

Por otro lado, las células cancerígenas se caracterizan por poseer una demanda de hierro superior que las células normales. Esto conlleva a que posean receptores de transferrina en la superficie celular que presentan una alta selectividad hacia los aductos de transferrina con compuestos de Ru(II) y Ru(III) circulantes en sangre [37]. La transferrina es la encargada de transportar el ion férrico en la sangre, pero sólo 1/3 de sus sitios están ocupados por dicho metal. El resto de las posiciones vacantes podría ser ocupado por iones rutenio, lo que generaría una disminución de la toxicidad de sus compuestos y un transporte selectivo hacia las células tumorales [38,39].

La potencialidad anticancerígena de los complejos de rutenio fue examinada por primera vez por Clarke y col., quienes estudiaron los cloro-amino derivados de fórmula general $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_{6-x}\text{Cl}_x]^{y+}$. En particular, los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{NH}_3)_5]^+$, *cis*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_4]^+$ y *fac*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3]$ fueron diseñados en analogía al cisplatino, ya que contienen ligandos cloruro sustituibles para una posible unión al ADN [40,41]. Si bien estos compuestos mostraron buena actividad antitumoral, presentaron baja solubilidad. Esto fue mejorado al reemplazar los ligandos NH_3 por moléculas dimetilsulfóxido (dmsO). Estudios iniciales *in vitro* e *in vivo* realizados por Mestroni, Alessio y col. en complejos *cis* y *trans* $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_4]$ revelaron resultados alentadores de actividad anticancerígena [42]. Los compuestos más prometedores fueron los complejos $\text{Na}\{\text{trans}-[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{dmsO})(\text{Im})]\}$ (NAMI) y su sal de imidazolio $\text{ImH}\{\text{trans}-[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{dmsO})(\text{Im})]\}$ (NAMI-A, Im = imidazol) (figura 1.4 a). Este último compuesto mostró en diversos ensayos preclínicos interesante actividad antimetastásica en un amplio rango de tumores, como la metástasis pulmonar [43]. Sin embargo, los malos resultados obtenidos en ensayos clínicos de fase I y II detuvieron los estudios para su posible aplicación [44]. Por otro lado, se desarrolló el complejo $\text{IndH}\{\text{trans}-[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$ (KP1019, Ind = indazol) (figura 1.4 b), el cual ha superado los ensayos clínicos de fase I como agente antineoplásico. Su mecanismo de

acción y el transporte hacia el interior de las células están asociados a su unión a la transferrina [45,46].

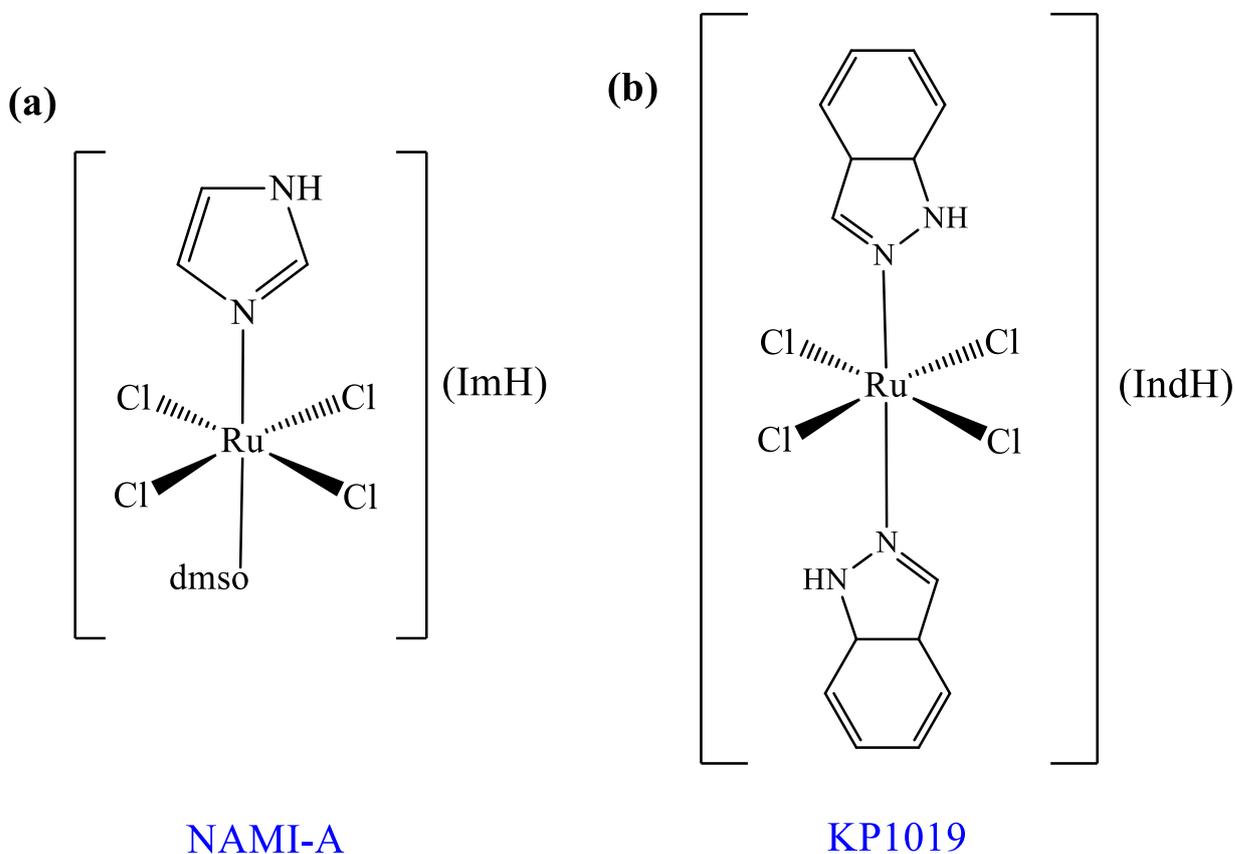


Figura 1.4: Estructura de los compuestos (a) NAMI-A y (b) KP1019.

1.1.3 Complejos metálicos de renio

El tecnecio es uno de los elementos químicos más usados en Medicina Nuclear formando compuestos de coordinación del radionucleido Tc-99m. Un radiofármaco muy utilizado en clínica como agente de diagnóstico para obtener imágenes del miocardio es el Cardiolite®, que es un complejo de ^{99m}Tc con ligandos metoxiisobutilisonitrilo [47]. Su ubicación en la Tabla periódica determina que el renio y el tecnecio posean similitudes químicas que hacen que complejos análogos con estos centros metálicos posean propiedades fisicoquímicas similares, en particular aquellas propiedades determinadas

por el radio atómico o iónico, como por ejemplo, la geometría e índice de coordinación, distancias y ángulos de enlaces, lipofilia, entre otras [48,49].

En este sentido, numerosas investigaciones se han enfocado en desarrollar métodos sintéticos y diversos estudios sobre complejos análogos a los de tecnecio, basados en renio. Sin embargo, las diferencias en la cinética de sustitución de ligandos y en las propiedades redox de los complejos análogos, determinaron diferencias cuando éstos fueron evaluados en medios biológicos. En particular, estos compuestos análogos de Tc y Re mostraron distinta estabilidad *in vitro* e *in vivo*, diferente afinidad hacia biomoléculas y distinta biodistribución [50–53]. Específicamente, los complejos de renio (I) han atraído la atención de los investigadores debido a sus características fisicoquímicas que determinan una importante potencialidad en aplicaciones biológicas [54–56].

1.2 Química Bioorganometálica

1.2.1 Compuestos organometálicos

La química organometálica es un punto de contacto unificador entre la química inorgánica clásica y la química orgánica. La característica principal de los compuestos organometálicos es que existe al menos un enlace metal-carbono en la interacción entre el metal y el (o los) ligando(s) [57,58]. El primer compuesto organometálico, publicado en el año 1831, fue la denominada sal de Zeise de fórmula $\text{KPtCl}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (figura 1.5) [59]. Sin embargo, los primeros estudios desarrollados sobre compuestos organometálicos de metales de transición fueron iniciados a finales del siglo XIX con el desarrollo de complejos con ligandos carbonilos de aplicación en metalurgia [60–62].

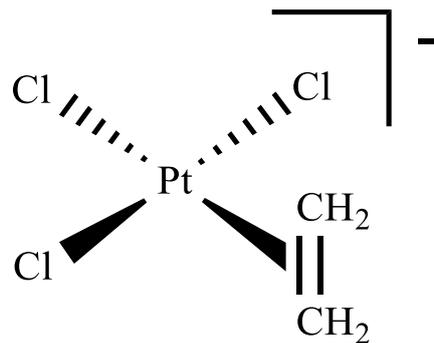


Figura 1.5: Estructura de la sal de Zeise.

Un importante avance en el desarrollo de la química organometálica de metales de transición ocurrió a mediados del siglo XX luego del descubrimiento y elucidación estructural del ferroceno [$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$] [63–65] (figura 1.6). Este descubrimiento confirmó por primera vez la presencia del enlace organometálico Fe-C, y reveló la estructura “sándwich” de este compuesto.

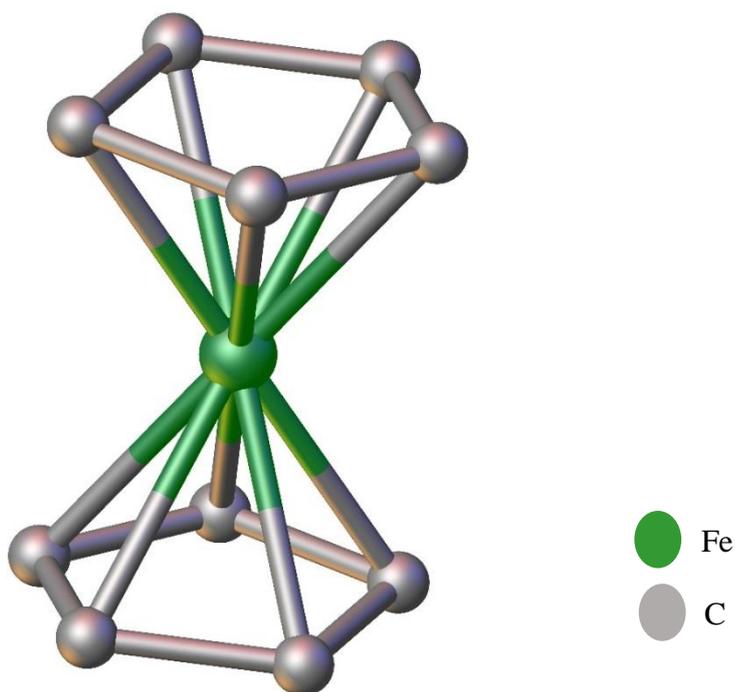


Figura 1.6: Estructura cristalina del ferroceno. Los átomos de hidrógeno no fueron incluidos para una mejor comprensión de la estructura.

Los compuestos organometálicos pueden tener uno o varios enlaces metal-carbono, y a su vez, uno o más átomos metálicos. En estos compuestos, los ligandos pueden unirse al metal a través de diferentes números de átomos de carbono. Este concepto se denomina hapticidad, y se denota con la letra griega *eta* (η) y un superíndice numérico indicando el número de átomos de carbono que interaccionan directamente con el centro metálico [57,58]. Así por ejemplo, y como se detallará en capítulos posteriores, un ligando como el ciclopentadienilo puede unirse al centro metálico por un átomo de carbono (hapticidad 1, η^1), por tres átomos de carbono (hapticidad 3, η^3) o cinco átomos de carbono (hapticidad 5, η^5).

En los compuestos organometálicos, los ligandos C-dadores poseen la capacidad de unirse al átomo metálico de varias formas, generando así complejos con distintas estructuras y estequiometrías. Para predecir la estabilidad de un complejo organometálico se utiliza la denominada “regla de los 18 electrones” o regla del número atómico efectivo [57], la cual señala que cuando el metal alcanza una configuración en la capa externa $ns^2(n-1)d^{10}np^6$, existen 18 electrones en los orbitales de valencia lo que le confiere una configuración de alta estabilidad (configuración de capa cerrada). A pesar de que esta regla se cumple en la mayoría de los casos, existen evidencias de complejos que se estabilizan con 16 electrones [66], como por ejemplo la sal de Zeise de la figura 1.5.

El desarrollo y estudio de los compuestos organometálicos estaba inicialmente enfocado hacia su aplicación como catalizadores de diversos procesos debido a que son excelentes candidatos para su uso en reacciones donde se requieren transformaciones moleculares en las cuales es necesario que los reactivos se coordinen con facilidad al átomo metálico y que a su vez, los productos se eliminen fácilmente de la esfera de coordinación del mismo. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado diferentes compuestos organometálicos aplicados a sistemas biológicos, ya sea para su uso como catalizadores biológicos (al participar como cofactores de enzimas) o su aplicación en terapia, entre otras aplicaciones biológicas posibles.

1.2.2 Compuestos bioorganometálicos

Los compuestos organometálicos, en comparación a los complejos de coordinación clásicos, ofrecen diversas características que los vuelven buenos candidatos para el diseño de metalofármacos. Estos compuestos presentan una gran variedad de estructuras, que van desde estructuras lineales a las octaédricas (e incluso estructuras más complejas), son compuestos cinéticamente estables, generalmente neutros, y son relativamente lipofílicos. Los compuestos organometálicos derivados de metallocenos, compuestos con ligando areno de estructura *half-sandwich*, y los complejos con ligandos carbonilo (figura 1.7) han sido ampliamente estudiados como catalizadores, pero muchos de ellos han mostrado potencialidad en Química Medicinal.

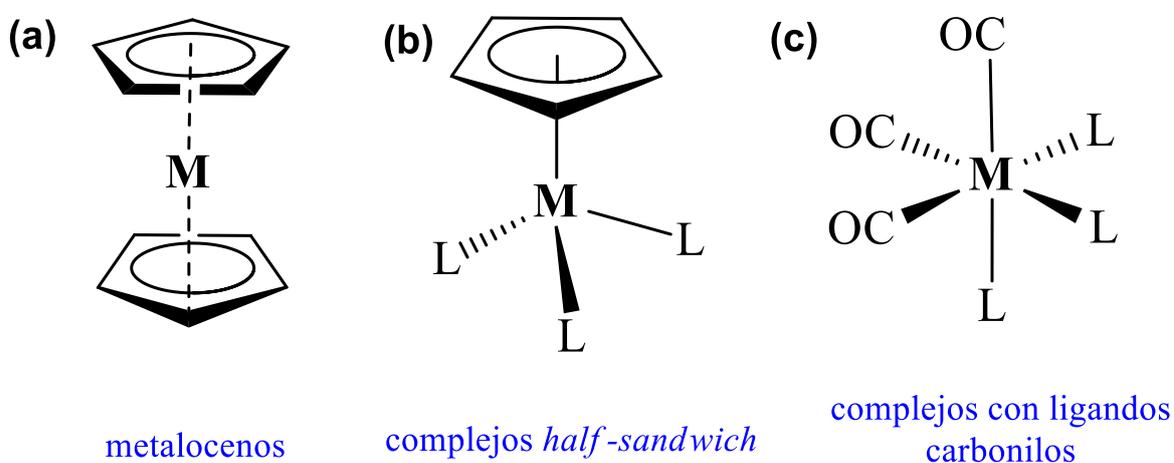


Figura 1.7: Compuestos organometálicos comúnmente utilizados en procesos catalíticos [57].

El concepto de Química Bioorganometálica fue introducido por Gérard Jaouen en el año 1985 quien definió a esta área como el estudio de biomoléculas o moléculas biológicamente activas que contienen al menos un átomo de carbono unido directamente a un átomo metálico o metaloide [67–70]. Esta área abarca el estudio de complejos organometálicos con ligandos clásicos como CO y alquilos, o biomoléculas como los esteroides, aminoácidos, azúcares, péptidos, ADN, vitaminas, enzimas y anticuerpos unidos por enlace metal-carbono, donde todos tienen en común su capacidad de desempeñar un rol en diversos procesos biológicos [69]. La gran expansión del desarrollo de complejos organometálicos ha generado que la Química Bioorganometálica se centre en cinco campos principales de estudio que se resumen en el esquema de la figura 1.8.

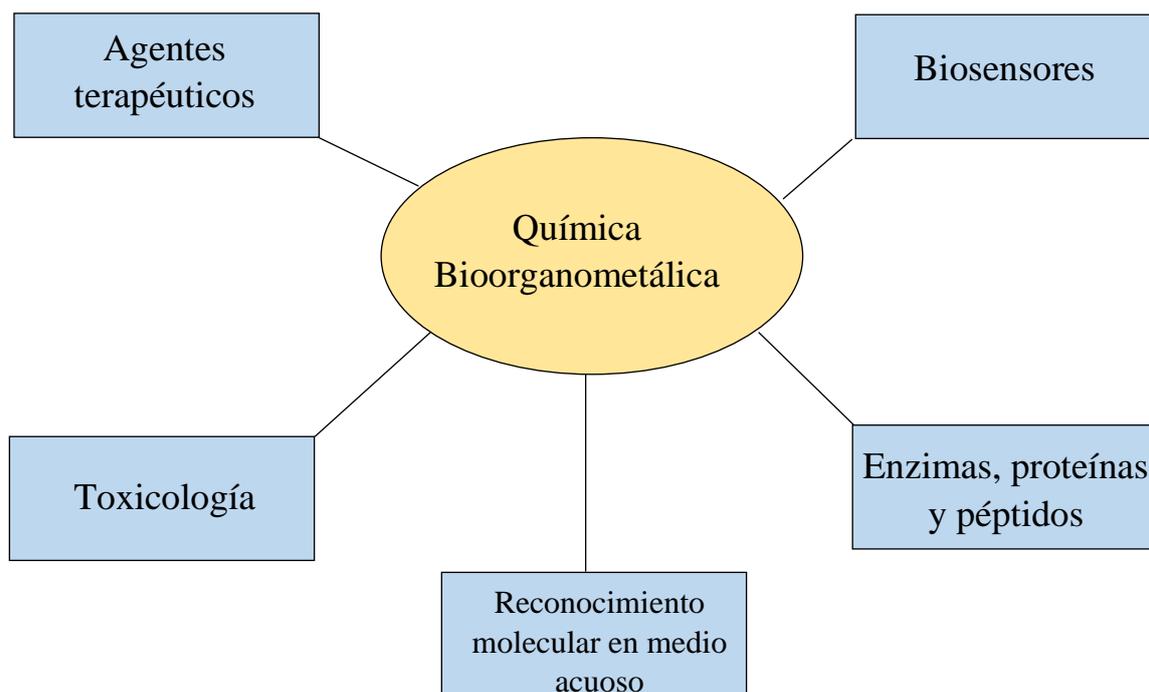
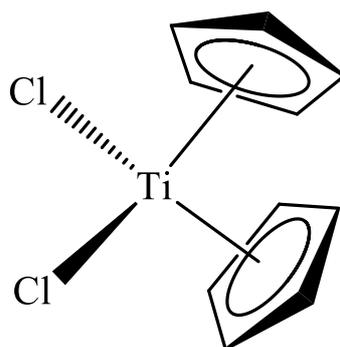


Figura 1.8: Principales campos de investigación en la Química Bioorganometálica.

En relación al grupo de agentes terapéuticos organometálicos, diversos complejos han sido estudiados como potenciales fármacos para nuevas terapias contra el cáncer, el VIH, y la malaria, y también como radiofármacos y antibióticos [70]. Los primeros compuestos organometálicos que emergieron como una terapia alternativa contra el cáncer fueron los metallocenos.

Los primeros trabajos fueron realizados por Köpf y col. quienes investigaron los dicloruros de metalloceno (MCl_2Cp_2) (donde Cp = ciclopentadienilo) como potenciales agentes anticancerígenos. En particular, el dicloruro de titanoceno [$Ti^{IV}Cl_2Cp_2$] (figura 1.9), que es un compuesto que integra en una misma entidad el fragmento titanoceno y ligandos *cis*-dihaluro (estrategia similar a la del cisplatino) [71,72], mostró interesantes propiedades antiproliferativas *in vitro* y prometedora actividad antitumoral *in vivo*. Su principal blanco de acción es el ADN, específicamente interaccionando con los grupos fosfatos de esta biomolécula [73]. El estudio sobre este compuesto avanzó hacia ensayos clínicos de fase II, pero se detuvo el desarrollo clínico de este compuesto debido a los efectos tóxicos renales y hepáticos que mostraron los pacientes estudiados [74].



Dicloruro de titanoceno

Figura 1.9: Estructura química del compuesto dicloruro de titanoceno.

Se han estudiado además, otros compuestos organometálicos basados en rutenio, como potenciales nuevos agentes anticancerígenos, siendo los más estudiados los complejos Ru^{II} -arenos de estructura *half sándwich* [75]. Los arenos son ligandos que estabilizan el estado de oxidación (II) del rutenio y son relativamente inertes a la sustitución en condiciones fisiológicas. Los complejos Ru^{II} -areno de estructura *piano-stool* que poseen una fórmula general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-areno})(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ (figura 1.10) han mostrado interesantes propiedades anticancerígenas. En estos compuestos, X comúnmente corresponde a un ligando monodentado, e Y y Z a un ligando bidentado, los cuales son incluidos para modular las propiedades biológicas del complejo [69,75].

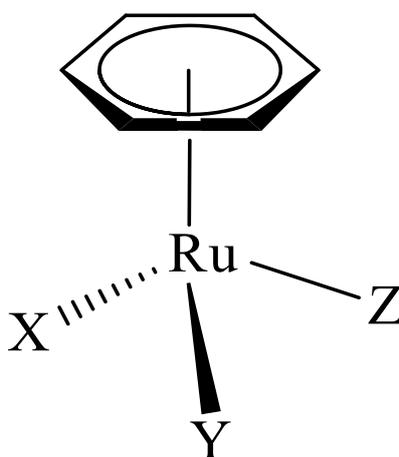


Figura 1.10: Estructura *piano-stool* (taburete de piano) de los complejos Ru^{II} -areno de fórmula general $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-areno})(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$.

Un ejemplo de este tipo de compuestos con propiedades antitumorales interesantes, son los complejos derivados de $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-areno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (RAPTA, PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) (figura 1.11). Se observó que el complejo RAPTA-C, y el análogo de benceno (RAPTA-B), son capaces de reducir el crecimiento de tumores metastásicos pulmonares en ratones CBA portadores del carcinoma mamario [76]. También se han sintetizado complejos que combinan las características estructurales del compuesto de coordinación clásico NAMI-A y el organometálico Ru^{II} -areno, entre los que destacan los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}(\text{N-vinylimidazol})_2]\text{Cl}$ y $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-benceno})(\text{N-metilimidazol})_3](\text{BF}_4)_2$ que mostraron interesantes propiedades anticancerígenas *in vitro* y han sido seleccionados para posteriores estudios *in vivo* [77].

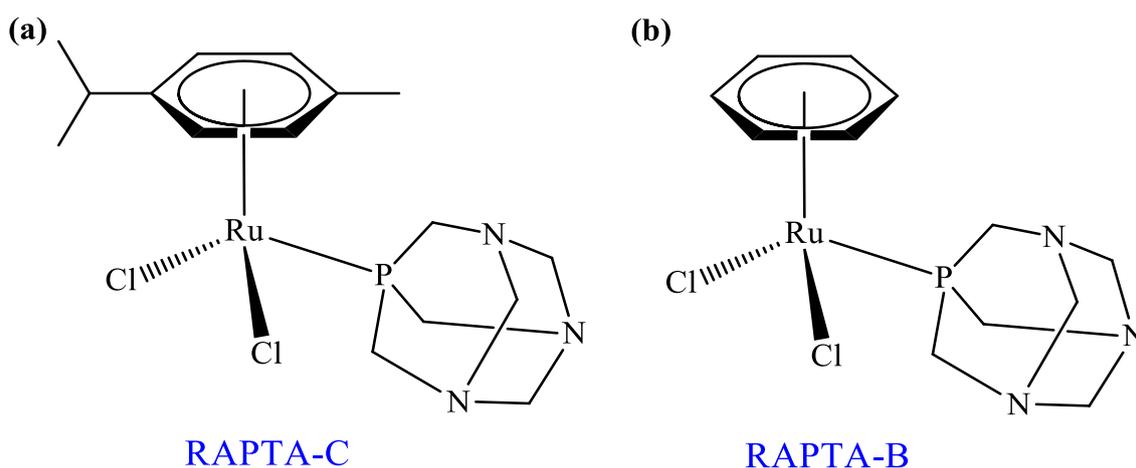


Figura 1.11: Estructura química de los compuestos denominados (a) RAPTA-C y (b) RAPTA-B.

Por otro lado, el ferroceno ha sido una pieza fundamental en el desarrollo de potenciales fármacos bioorganometálicos (figura 1.6). Debido a las interesantes propiedades fisicoquímicas que este compuesto presenta (como su fácil funcionalización, su estabilidad en solución acuosa y su elevada lipofilia) y en conjunto con la ausencia de toxicidad (se puede inyectar, inhalar o tomar por vía oral sin causar problemas de salud importantes), se han estudiado las potenciales aplicaciones clínicas de una gran variedad

de compuestos organometálicos que contienen el fragmento de ferroceno [70]. La actividad citotóxica de este compuesto está relacionada, entre varias otras, con la interacción con enzimas oxido-reductasas (como glucosa oxidasa (GOx) o glucosa deshidrogenasa (GDH)), la inhibición de las enzimas responsables de la replicación y transcripción del ADN (topoisomerasas I y II) y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) causantes de daño en el ADN, enzimas, y la membrana celular [1,78]. En este contexto, Jaouen y col. sustituyeron los anillos fenilos de diferentes fármacos existentes, y de algunos productos naturales, por moléculas de ferroceno. De esta manera intentan modificar la lipofilia de la molécula original e introducir un grupo que contiene un ion metálico con actividad redox. Cuando se modificó el grupo fenilo del compuesto antitumoral tamoxifeno (figura 1.12) se obtuvieron importantes avances en este sentido. El tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) utilizado como tratamiento de primera línea contra el cáncer de mamas. Su actividad se limita sólo a los tumores que expresan receptores de estrógeno ER (+), que constituyen cerca del 60% de los casos de cáncer de mama [43,79]. La sustitución del anillo fenilo en esta estructura dio origen al compuesto llamado ferrocifeno, el cual fue sintetizado para superar algunas de las deficiencias observadas en el tamoxifeno. En el diseño del ferrocifeno, el esqueleto de trifeniletieno del fármaco original se mantuvo en la estructura (para garantizar el reconocimiento del receptor de estrógeno) y se incluyó el fragmento de ferroceno para aprovechar la eventual oxidación del ion metálico en el metabolismo. El ion férrico es citotóxico para las células tumorales, por lo que la combinación de las actividades antiestrogénicas y citotóxicas sería una excelente estrategia en el diseño de este nuevo fármaco.

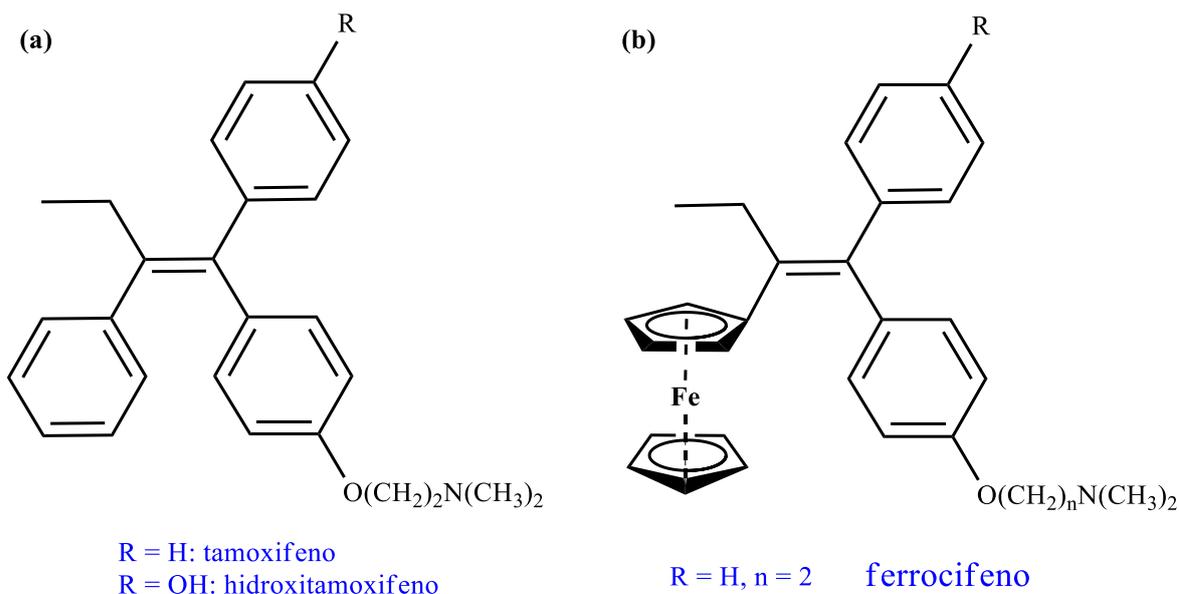


Figura 1.12: Estructura molecular de (a) tamoxifeno y (b) ferrocifeno.

Se realizaron numerosas modificaciones a la molécula original de tamoxifeno, lográndose establecer diversas relaciones estructura-actividad. Dentro de las más relevantes, se observó que la inclusión del anillo de ferroceno y el aumento de la longitud de la cadena lateral dimetilaminoalquilo disminuyeron la afinidad por el receptor de estrógeno [1,43]. Sin embargo, los ferrocifenos sintetizados mostraron una elevada inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama humano (MCF-7, receptor de estrógeno positivo) casi al mismo nivel que el tamoxifeno [43,80,81]. Los autores señalan que la inclusión del ferroceno introduce un mecanismo adicional ausente en el tamoxifeno que causa lesiones sobre el ADN (posiblemente a través de la generación de EROS) de las células MCF-7 [80]. De esta manera confirmaron la hipótesis inicial planteada, donde el esqueleto original del tamoxifeno (trifeniletilen) le confiere reconocimiento por el receptor de estrógeno, mientras que la presencia del fragmento de ferroceno induce daños al ADN, producidos por una reacción de Fenton [82].

Por otro lado, recientemente ha surgido un gran interés por desarrollar métodos sintéticos que permitan la obtención de compuestos organometálicos que incluyan el centro $Re(I)$ -tricarbonilo. Como se expondrá en detalle en el capítulo 5, los ligandos carbonilo estabilizan el bajo estado de oxidación del renio a través de un mecanismo de retrodonación, y por efecto *trans* se aumenta la labilidad de los otros ligandos, permitiéndoles ser sustituidos fácilmente. Un ejemplo de este tipo de compuestos es el

complejo *fac*-[Re^I(CO)₃(H₂O)₃], donde la estabilidad del *core fac*-{Re(CO)₃} permite que en el medio biológico exista un fácil intercambio de los ligandos acuo por átomos donores presentes en algunas biomoléculas [43,83]

Una amplia variedad de ligandos han sido coordinados al fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃} [83]. Se han desarrollado complejos con propiedades antiproliferativas que incluyen este fragmento organometálico [84], por ejemplo los complejos Re(I)-tricarbonilo con ligandos amino derivados de fosfinas, aminoácidos y péptidos que mostraron actividad *in vitro* contra células de cáncer de mama y carcinoma uterino. Por otro lado, los complejos con ligandos 2-(dimetilamino)etóxido [Re(CO)₃(η²-Me₂NCH₂CH₂O)(μ-OH)Re₂(CO)₃(η²-Me₂NCH₂CH₂O)] y [Re₃(CO)₉(μ₃-OH)(μ-OH)₂(μ-OCH₂CH₂NMe₂H)] fueron eficaces y selectivos para reducir el crecimiento de las células causantes de la leucemia y del linfoma humano y murino, así como también las células de carcinoma uterino [85].

Los ejemplos mencionados en relación a la Química Inorgánica Medicinal, tanto a compuestos de coordinación clásicos como organometálicos han generado un gran interés en utilizar este tipo de compuestos para combatir también enfermedades parasitarias. En los últimos 15 años, la Química Inorgánica Medicinal ha centrado su atención hacia el desarrollo de potenciales fármacos metálicos contra enfermedades parasitarias de alta incidencia en regiones pobres del planeta. Estas enfermedades son conocidas como enfermedades desatendidas, entre las cuales se encuentran la malaria, la tripanosomiasis americana, tripanosomiasis africana humana, leishmaniasis, amebiasis, entre otras [86,87].

1.3 Enfermedades tropicales desatendidas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs: *Neglected tropical diseases*) son un grupo de 20 enfermedades transmisibles que prevalecen en zonas tropicales y subtropicales en 149 países del planeta [88,89]. Estas enfermedades son causadas por variados patógenos como virus, bacterias, protozoarios y helmintos. En su mayoría, estas enfermedades afectan a las poblaciones más pobres del planeta.

Las NTDs hoy en día afectan a más de 1400 millones de personas, incluyendo más de 500 millones de niños [90]. En el año 2013 se produjeron alrededor de 142 mil muertes, observándose una disminución en comparación a las 204 mil reportadas en el año 1990 [91]. Las NTDs abarcan las enfermedades que se producen principalmente en los trópicos, pero en la práctica hace alusión a aquellas enfermedades infecciosas que prosperan en ambientes húmedos y cálidos. Hasta la fecha la OMS ha clasificado dentro de este grupo a 20 enfermedades: Dengue, Rabia, Tracoma, Úlcera de Buruli, Yaws (bostezo), Lepra, Enfermedad de Chagas, Enfermedad del sueño, Leishmaniasis, Teniasis y neurocisticercosis, Enfermedad del gusano de Guinea, Equinococosis, Trematodiasis (Enfermedad transmitida por los alimentos), Filariasis linfática, Ceguera de los ríos, Esquistosomiasis, Helmintiasis transmitida por el suelo, Micetoma, Envenenamiento por mordedura de serpiente, Sarna y otras ectoparasitosis.

Durante décadas estas enfermedades han sido descuidadas, inicialmente como parte de una indiferencia general por el mundo en desarrollo (ya que afectan principalmente a los países más pobres del planeta), y más recientemente, debido a que el énfasis ha sido puesto en la disminución de la prevalencia de VIH/SIDA, la tuberculosis y la malaria [92]. Actualmente se invierten muchos recursos para combatir estas tres “grandes” enfermedades, pero no existe una inversión importante para combatir las NTDs [93,94]. La importancia de las NTDs se ha subestimado ya que muchas de ellas son asintomáticas y presentan largos periodos de incubación, y no se realiza muy a menudo la conexión entre una NTDs y la muerte, ya que la enfermedad ha estado latente durante un largo periodo de tiempo [95]. Además, las áreas de alta endemicidad se encuentran comúnmente en áreas geográficamente aisladas, lo que genera que el tratamiento y prevención de éstas sean mucho más complejos [93].

En este grupo de veinte enfermedades se encuentran tres parasitosis cuyos agentes etiológicos pertenecen a la familia taxonómica Trypanosomatidae. Estos agentes son los tripanosomas causantes de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) y la enfermedad del sueño (Tripanosomiasis africana humana), y los parásitos de *Leishmania spp* responsables de las leishmaniasis. Estas tres enfermedades son las NTDs con las mayores tasas de mortalidad.

1.3.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El nombre de la enfermedad proviene del Dr. Carlos Chagas quien en el año 1909, en el interior de Minas Gerais, Brasil, describió esta tripanosomiasis humana [96]. La enfermedad se caracteriza por ser una parasitosis de gran importancia para la mayoría de los países latinoamericanos, en los cuales es considerada un problema de salud público. Las estimaciones señalan que se producen aproximadamente 20,000 muertes por año, y que existen alrededor de 10 millones de personas actualmente infectadas, muchas de ellas sin saberlo, y otros 100 millones que viven en áreas de riesgo de transmisión [97,98].

La principal vía de transmisión es vectorial, mediante la picadura de insectos hematófagos de la familia Triatominae (Hemiptera, Reduvidae) que transmiten el parásito por las heces, el cual penetra la piel o las mucosas del huésped mamífero, alcanzando los tejidos del mismo donde finalmente se establece.

Existen más de 150 especies de triatomino que están implicadas en la transmisión de la enfermedad de Chagas, las cuales difieren según la zona geográfica donde se desarrollen. Cada región posee un vector principal, por ejemplo, en el Cono Sur (Chile, Bolivia, Argentina y Uruguay) el principal vector es el *Triatoma infestans*, en Centroamérica el *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* que se encuentra desde el centro de México hasta Panamá (figura 1.13) [99].

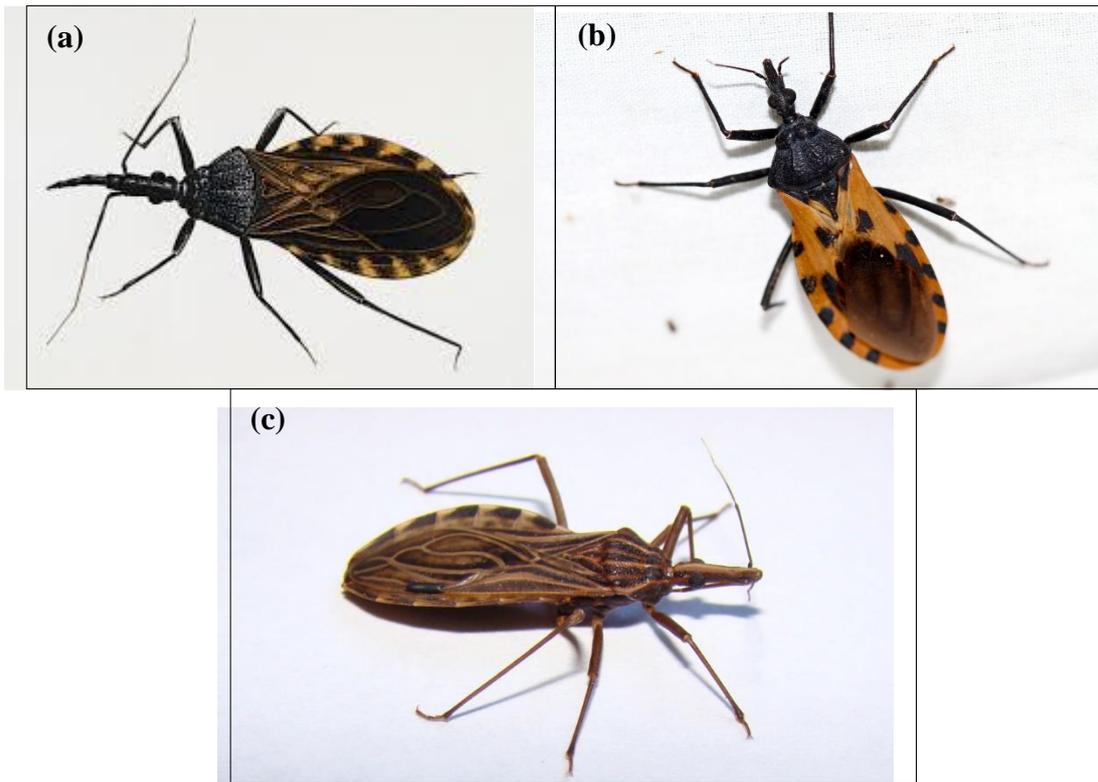


Figura 1.13: Principales especies de triatomino que transmiten la enfermedad de Chagas: (a) *Triatoma infestans*, (b) *Rhodnius prolixus* y (c) *Triatoma dimidiata*.

La enfermedad de Chagas está directamente relacionada con la pobreza, debido a que los insectos triatomíneos proliferan fácilmente en entornos con condiciones de vivienda precaria, lo que genera que aquellas personas que tienen menores recursos económicos sean los más vulnerables a la infección [99,100].

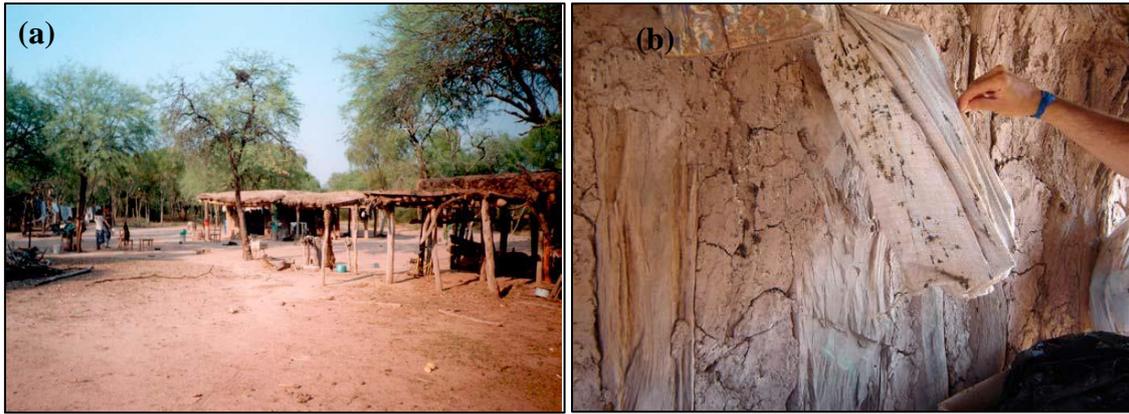


Figura 1.14: (a) Ejemplo de un entorno familiar típico en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas, ubicada en el bosque seco del Chaco alrededor de la aldea de Amamá, al norte de Argentina. (b) Interior de la casa donde se observa el tipo de construcción de las paredes que a menudo están habitadas por insectos vectores, como lo demuestran las heces de insectos en las paredes y tapices.

1.3.1.1 Distribución de la enfermedad

Los orígenes y distribución de la enfermedad de Chagas en América Latina datan de la época precolombina. Se han encontrado indicios de la presencia de *T. cruzi* en momias de más de 4000 años de antigüedad. Sin embargo, la asociación de este parásito con el humano se estima que se originó hace aproximadamente 2000 años A.C.

Esta enfermedad afecta principalmente a América Latina, causando incapacidad y muerte en las personas infectadas [101]. Existe una alta incidencia de la misma en 21 países de este continente (2/3 pertenecientes al cono sur), siendo aquellos con más casos estimados Argentina, Brasil, México y Bolivia. Pero si se considera sólo la vía de transmisión vectorial, los países que lideran el número de casos reportados serían Bolivia, Argentina y Paraguay (zona del Gran Chaco) (figura 1.15).

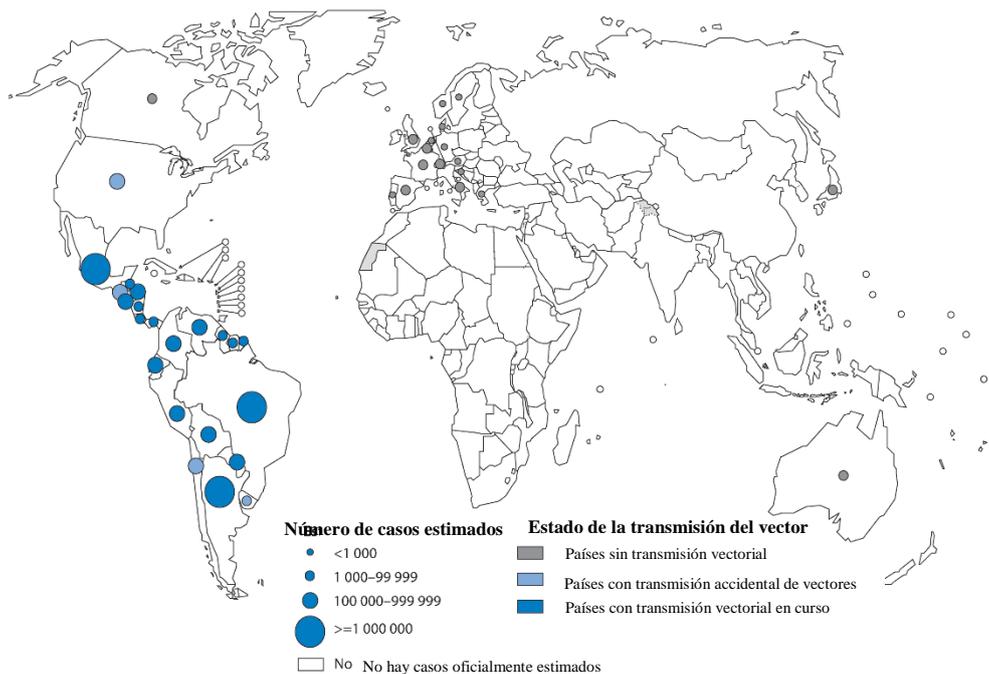


Figura 1.15: Distribución geográfica de casos de infección por *Trypanosoma cruzi*, según estimaciones oficiales de la OMS y estado de la transmisión vectorial (período de notificación 2006-2009) [102].

En sus inicios, la infección causada por *T. cruzi* sólo existía entre animales salvajes. Sin embargo, luego que los triatomíneos se volvieron insectos con hábitats urbanos, se incorporó al humano (y animales domésticos) al ciclo de transmisión. Si bien durante muchos años la tripanosomiasis americana fue una enfermedad rural, los cambios socioeconómicos, el éxodo de la población rural, la deforestación y la urbanización han modificado el perfil epidemiológico hacia un fenómeno más urbano/periurbano.

La expansión de esta enfermedad hacia el resto de los continentes debido principalmente a la migración de personas infectadas, se relaciona con formas de transmisión no vectorial. Estas otras vías de transmisión son la congénita (de madre a hijo), la transfusión de sangre y el trasplante de órganos en países donde no existen controles adecuados [96,103]. Esta diversidad en las formas de transmisión aumenta aún más la dificultad de poder controlar la enfermedad. Por lo tanto, el efecto de la globalización en su distribución ha generado un número creciente de casos en los Estados Unidos, Canadá y varios países de Europa y del Pacífico Occidental [103].

Además, en los últimos 30 años ha existido una rápida propagación mundial del *virus de inmunodeficiencia humana* (VIH), que en conjunto con la evolución epidemiológica de *T. cruzi*, ha llevado a la aparición de co-infecciones por *T. cruzi*/VIH. La propagación de

la pandemia del VIH no solo ha modificado el espectro patológico de la enfermedad de Chagas, sino también su epidemiología. Desde la década del 80, cuando fue reportado el primer caso de coinfección VIH/*T. cruzi*, hasta el día de hoy se han reportado casos en 9 países [104].

1.3.1.2 El parásito y su transmisión

El *Trypanosoma cruzi* es un organismo unicelular que posee algunas estructuras celulares características. En particular, presenta un núcleo cuya organización estructural es semejante al de las células eucariotas típicas (con un diámetro cercano a los 2,5 μm), conteniendo un nucléolo centralizado que en la forma amastigota y epimastigota del parásito se presenta con un aspecto redondeado, y en tripomastigotas metacíclicos aparece como un organelo alargado [105]. Posee una mitocondria única que se extiende a lo largo del cuerpo celular del parásito. La matriz mitocondrial tiene una región especializada formada por ADN extracelular correspondiente al genoma mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual puede llegar a representar cerca del 25 % del ADN total [106]. Posee un flagelo que es responsable de la movilidad del parásito, y en particular en las formas epimastigota y tripomastigota está adherido al cuerpo del parásito (también puede observarse en amastigotas, pero su tamaño es mucho más pequeño). Una característica distintiva que poseen los parásitos tripanosomátidos es la presencia de unos organelos llamados glicosomas, los cuales compartimentalizan el proceso de glicólisis, permitiéndole al parásito una adaptación metabólica dependiendo de los diferentes entornos a los que se expone durante su ciclo de vida [107–110].

El parásito *T. cruzi* posee un ciclo de vida complejo, con etapas de desarrollo tanto en el vector como en el huésped mamífero. Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, como también formas infectivas y no infectivas. En el huésped mamífero se encuentran las formas tripomastigota sanguínea y amastigota, mientras que en el vector se localizan los tripomastigotas metacíclicos y epimastigotas. La forma de tripomastigotas es la forma infectiva y no replicativa del parásito; y las formas amastigota y epimastigota son replicativas no infectivas [111]. El ciclo de vida de *T. cruzi*, que se ejemplifica en el esquema de la figura 1.16, involucra cambios morfológicos (tamaño y forma celular, posición del núcleo y kinetoplasto y longitud del flagelo) y metabólicos del parásito [112].

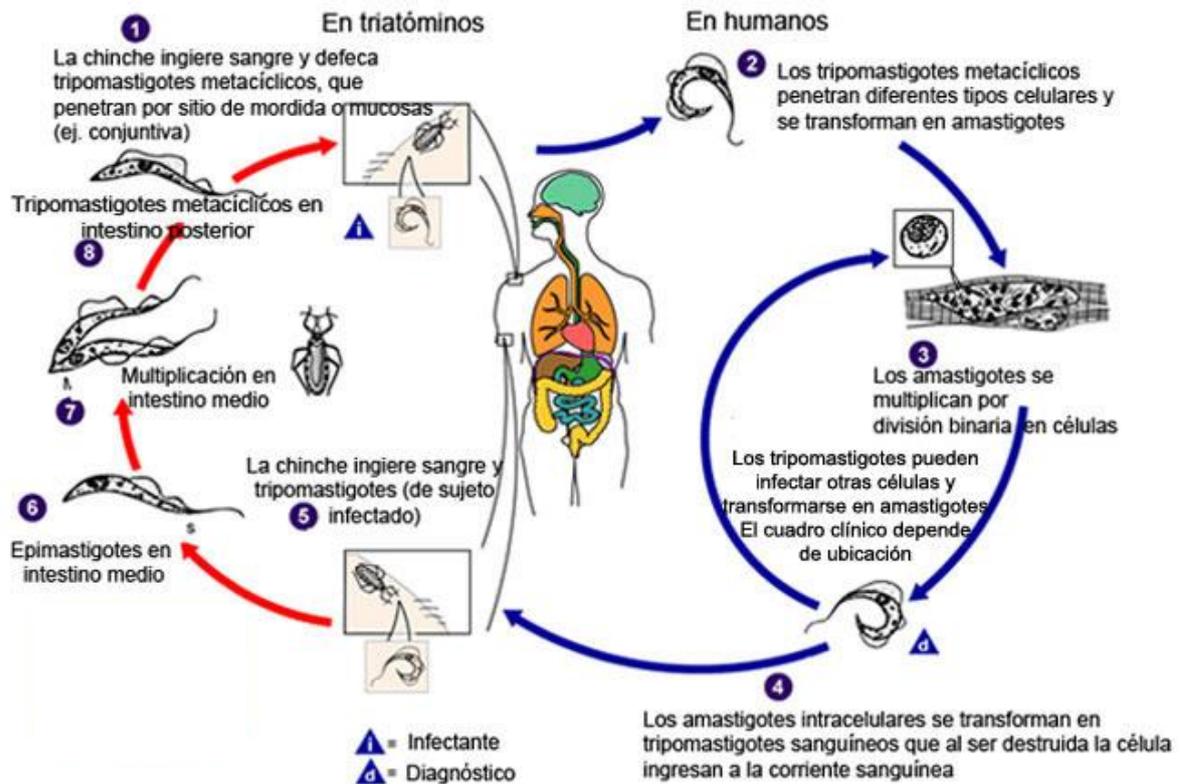


Figura 1.16: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* [113].

Los tripomastigotas metacíclicos se desarrollan en el recto del insecto triatomineo, y contenidos en las heces del vector inician la infección en el huésped vertebrado (1) (figura 1.16). Éstos ingresan al organismo del mamífero a través de la herida ocasionada por la picadura del insecto, o a través de otras áreas de la piel lesionada o por las mucosas (oral/digestiva). Esta incorporación del parásito al hospedero se efectúa cuando el infectado frota instintivamente la picadura, los ojos, la boca, o cualquier lesión en la piel. Una vez dentro del mamífero, los parásitos penetran las células cercanas al sitio de inoculación (macrófagos, fibroblastos y células epiteliales) mediante fagocitosis o endocitosis. Luego de que los tripomastigotas metacíclicos invaden las células hospederas, pierden su flagelo y se convierten en amastigotas las que residen en el citoplasma de las células infectadas (2). Estas amastigotas comienzan un proceso de replicación múltiple, mediante fisión binaria, generando posteriormente el colapso de la célula hospederas (3). Esto provoca la liberación de los parásitos al torrente sanguíneo, transformándose nuevamente en la forma tripomastigota. Debido a su alta capacidad infectiva, los tripomastigotas circundantes pueden invadir otras células del huésped, y así repetir este proceso varias veces (4). El ciclo de vida de *T. cruzi* en el insecto comienza cuando el vector se alimenta de la sangre del mamífero infectado (5). Es ahí donde los

tripomastigotas sanguíneos ingresan al tubo digestivo del insecto, y se transforman a la forma epimastigota (6). Se multiplican en el intestino del insecto aumentando considerablemente su número hasta que alcanzan el recto del vector, convirtiéndose en tripomastigotas metacíclicos, culminando así el ciclo de vida (7-8) [113]

1.3.1.3 Fisiopatología y diagnóstico

En el humano la enfermedad de Chagas presenta dos etapas características, una etapa primaria o aguda, y una secundaria o crónica.

La etapa aguda se inicia inmediatamente después de la infección, donde se observa una pequeña llaga en la zona de la picadura. Luego de un periodo de incubación, que va entre 5 a 7 días (o algunos casos ha llegado a 10 o 12 días), comienza la etapa aguda de la enfermedad, con una duración aproximada de dos meses [103]. Durante esta fase existe un gran número de parásitos circulantes en sangre. En la mayoría de los casos esta etapa puede ser asintomática, pero dependiendo del sitio de inoculación se pueden observar diferentes manifestaciones. El primer signo observado puede ser un chancro en la piel (chagoma) el cual desencadena una reacción inflamatoria con edema intersticial y reacción por hiperplasia de los ganglios en torno a la lesión. Cuando la infección se da en la mucosa ocular o próxima a ésta, se genera un edema orbital unilateral morado (signo de Romana u ojo en compota, figura 1.17). Se presenta fiebre durante varias semanas, y pueden aparecer dolores de cabeza, palidez, mialgias, disneas, diarreas, miocarditis (dolor en el pecho probablemente por insuficiencia cardiaca), entre otras. En algunos casos, en particular en niños menores de cinco años y ancianos, puede existir una alta tasa de mortalidad en esta etapa.



Figura 1.17: Signo de Romaña, la inflamación que se observa en el párpado derecho es un indicador de la enfermedad de Chagas en etapa aguda.

Posteriormente, y por acción de la producción de anticuerpos IgM, continúa la fase crónica de la enfermedad la cual puede durar hasta 10 o 20 años. En esta etapa se encuentran la mayor parte de los pacientes infectados, aproximadamente el 70% de los casos. Los parásitos se encuentran ocultos en los tejidos, especialmente en el corazón y músculo liso digestivo. En algunos casos puede ser asintomática, y puede presentarse de por vida en los pacientes infectados. En el 30 % de los infectados, pueden aparecer signos y síntomas patogénicos de la dolencia cardíaca (miocardiopatía crónica chagásica) [96], en la que los pacientes presentan insuficiencia cardíaca, arritmias y tromboembolismo, siendo todas ellas manifestaciones clínicas que pueden generar incapacidad física y muerte en los pacientes [103,114]. Otras afecciones observadas en los tejidos viscerales son el megaesófago y megacolon (lesiones digestivas), que ocurre en el 10% de los pacientes. En un porcentaje menor, cerca del 3 % de los infectados, se observan daños en el sistema nervioso periférico. [96,103].

Cabe mencionar también la enfermedad de Chagas neonatal. Esta infección se puede transmitir a través del líquido amniótico o por vía transplacentaria. La frecuencia de este contagio se encuentra entre un 0,5 y un 5 %, dentro de los cuales el 50 % es asintomático en los recién nacidos [115].

El diagnóstico para esta enfermedad está basado en pruebas o métodos directos e indirectos. Los métodos directos buscan detectar la presencia de parásitos en sangre. Entre ellos se encuentran el xenodiagnóstico (método muy sensible y específico para la fase aguda), el microhematocrito y el hemocultivo [115]. Por su parte, los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos IgM que se unen a antígenos específicos del parásito. Actualmente los métodos utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI)

y ELISA de parásitos totales o recombinante (donde ambos presentan una sensibilidad y especificidad cercana al 100 %), y la hemaaglutinación directa (con y sin 2-mercapoetanol) y la hemoaglutinación indirecta (HAI), pero ambos de muy baja sensibilidad [96,115].

1.3.1.4 Tratamiento

Actualmente no existe una vacuna ni un tratamiento efectivo para la enfermedad de Chagas. Los tratamientos actualmente empleados van a depender de la etapa en la cual sea diagnosticada la enfermedad, es decir, en la fase aguda o crónica.

Independientemente del mecanismo de transmisión, todos los pacientes diagnosticados en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas deben ser tratados, debido a que existe un consenso en que el tratamiento puede resultar beneficioso hasta en un 100 %. La quimioterapia actualmente utilizada para esta fase se limita fundamentalmente a dos compuestos nitroheterocíclicos. Estos fármacos son el Nifurtimox y el Benznidazol los cuales se descubrieron empíricamente hace más de cinco décadas [116].

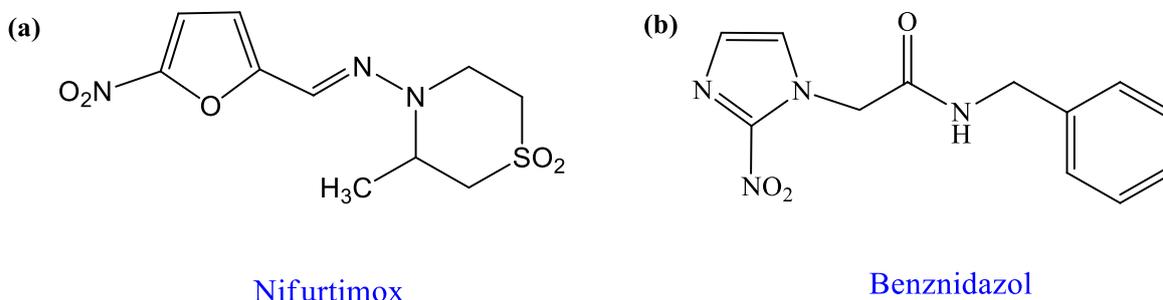


Figura 1.18: Fármacos empleados en la quimioterapia para la enfermedad de Chagas. (a) Nifurtimox y (b) Benznidazol.

El Nifurtimox (Lampit®) fue desarrollado originalmente por el laboratorio Bayer, pero actualmente se encuentra discontinuado en su producción industrial. Por su parte el Benznidazol (Radanil®, Rochagan®) se desarrolló inicialmente por el laboratorio Roche, quien cedió la patente de este fármaco al gobierno brasilero donde actualmente es producido por el Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco (LAFEPE).

Ambos fármacos son activos contra las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, aunque sus mecanismos de acción antichagásica parecieran ser diferente [117]. En el caso de Nifurtimox (tal como será descrito en capítulos posteriores), uno de los mecanismos

de acción propuestos es la reducción metabólica del grupo nitro de esta molécula, generando posteriormente especies reactivas de oxígeno (EROS) que son tóxicas para el parásito [118]. Sin embargo, actualmente se han planteado otros mecanismos de acción relacionados con alteraciones en la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y cambios en el potencial de la membrana mitocondrial de *T. cruzi*, como también la posible generación de metabolitos citotóxicos derivados de nitrilo [119,120]. El mecanismo de acción propuesto para el fármaco benznidazol también está relacionado con el metabolismo reductivo, pero sin la generación de EROS, sino que implica la modificación covalente de macromoléculas mediante intermediarios de reducción del grupo nitro [121,122] y la formación de metilglioxal, un cetoaldehído altamente tóxico. El tratamiento con Nifurtimox tiene una duración aproximada de 60 días, en el que la dosis recomendada es de 12 a 15 mg/Kg/día cada 12 horas en pacientes de hasta dos meses de edad, y cada 8 horas en pacientes de primera y segunda infancia. En pacientes adolescentes y adultos la dosis recomendada es de 8 a 10 mg/Kg/día cada 8 horas. En relación a Benznidazol, la dosis recomendada es de 5 mg/Kg/día cada 12 horas para todas las edades, aunque algunos autores señalan que en niños se pueden emplear dosis de hasta 10 mg/Kg/día [115].

El uso de estos medicamentos en la fase aguda de la enfermedad está ampliamente aceptado y ha demostrado ser exitoso. Sin embargo, ambos fármacos presentan importantes efectos adversos, y su eficacia en la etapa crónica es aún controversial. La efectividad del tratamiento varía según la zona geográfica de la infección, probablemente debido a diferencias en la susceptibilidad a los fármacos de las diferentes cepas del parásito [123]. Entre los efectos secundarios observados en el tratamiento con Nifurtimox se encuentran: pérdida incontrolable de peso, náuseas, vómitos, prurito, neuropatía periférica, leucopenia, neurotoxicidad, entre otros. Con respecto a Benznidazol, los efectos adversos comúnmente observados son: edemas, fiebre, prurito, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica (trastorno hemorrágico en el cual el sistema inmunitario destruye las plaquetas), dolores musculares articulares, entre otros [124,125]. En caso de aparecer algunos de estos efectos indeseables, se debe suspender inmediatamente la medicación, y reiniciar el tratamiento luego de 30 días. No se recomienda el uso de estos fármacos durante el embarazo, la lactancia y en pacientes con enfermedades graves concomitantes (insuficiencia cardiaca, renal, hepática y respiratoria) [115], y, en particular, el Nifurtimox está contraindicado en personas con antecedentes neurológicos o psiquiátricos.

Aun no existe un consenso sobre el uso de estos fármacos en la fase crónica de la enfermedad. La duda sobre la eficacia de su utilización radica en que el tratamiento con éstos, aunque la parasitemias y el serodiagnóstico puedan negativizarse, no altera la reacción serológica, la afección cardíaca, ni la progresión de la enfermedad. Como tratamiento alternativo para esta fase de la enfermedad se empleó el Allopurinol (fármaco utilizado para la hiperpuricemia), observándose respuestas antichagásicas similares a las obtenidas con Nifurtimox y Benznidazol. Los pacientes analizados mostraron ser seronegativos luego del tratamiento con Allopurinol, observándose una notable disminución de los efectos secundarios en comparación a lo observado en pacientes tratados con los fármacos nitroheterocíclicos [126]. Sin embargo, se deben esperar más estudios al respecto para corroborar estos resultados alentadores.

Hoy en día existe un número significativo de posibles candidatos como potenciales nuevos fármacos. Algunos de ellos son los compuestos inhibidores de cruzipaina [127–129], compuestos inhibidores de la actividad de enzimas que están compartimentalizadas en el glicosoma [130], compuestos que influyen en el metabolismo del tripanotión (inhibiendo la actividad enzimática de la tripanotión sintetasa, tripanotión reductasa y tripanotión glioxalasa) [131–133] y compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol [134–138].

1.3.2 Enfermedad del sueño

La Tripanosomiasis Africana Humana (HAT), también conocida como la enfermedad del sueño, es causada por la infección del parásito *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). Dependiendo de la zona geográfica donde se desarrolle, existen dos subespecies causantes de la enfermedad en humanos: *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b rhodesiense*) y *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b gambiense*) que son transmitidos al humano por diferentes especies de la mosca tse-tsé (Diptera, *Glossina genus*) (figura 1.19) [139].



Figura 1.19: Mosca tsé-tsé, vector de transmisión de la Tripanosomiasis Africana Humana.

Esta enfermedad afecta a 36 países ubicados al sur del desierto del Sahara (África sub-Sahariana) donde se encuentra el vector [140]. Se presenta en dos formas características:

- a) Enfermedad de progresión lenta, endémica en la zona del África occidental y central, causada por el parásito *T. b. gambiense* (g-HAT)
- b) Enfermedad de progresión rápida, endémica en el territorio africano oriental y meridional, causada por el parásito *T. b. rhodesiense* (r-HAT) [141,142]

En ambos casos no existe una superposición entre las áreas endémicas, excepto en Uganda que ha sido el único país endémico para ambas formas de la enfermedad, aunque en diferentes regiones de este mismo país (figura 1.20). Otros tripanosomas que también radican en el continente africano son el *Trypanosoma brucei brucei*, el *Trypanosoma vivax* y el *Trypanosoma evansi*, los cuales son responsables de generar enfermedad en animales domésticos y salvajes [143].

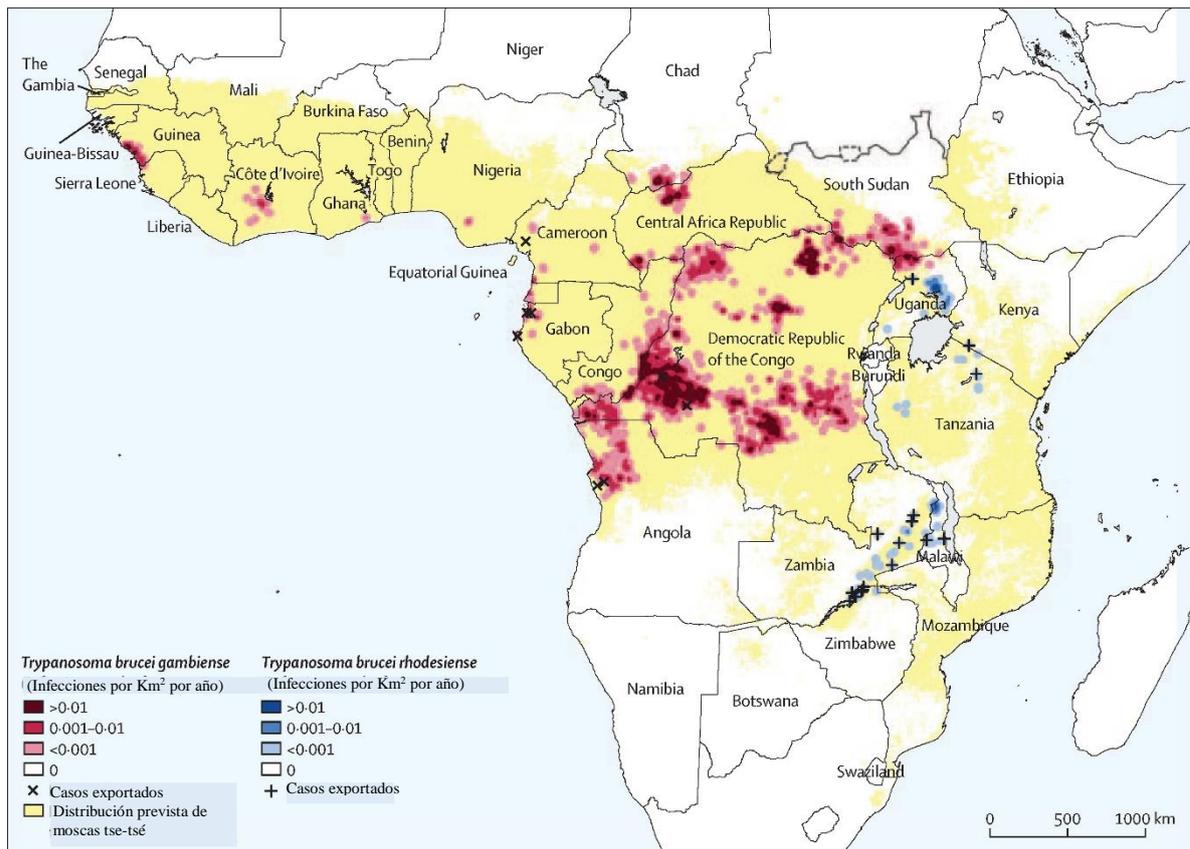


Figura 1.20: Distribución geográfica de las infecciones notificadas de Tripanosomiasis africana humana (período de notificación 2010-2014) [142].

La enfermedad del sueño fue descrita por primera vez en el siglo XIII, pero la distribución de la enfermedad en África se produjo luego de la Primera Guerra Mundial, donde la inestabilidad política y las guerras regionales provocaron la ola epidémica en este continente. A partir del año 1970 la situación epidémica empeoró debido al brote de HAT en países que no mantuvieron estrictas actividades de vigilancia como fue el caso de Sudán del Sur, Uganda, la República Democrática del Congo y Angola [143].

Desde aquel entonces emergieron numerosas actividades de control, que en conjunto con el conocimiento de esta epidemia por parte de organizaciones internacionales y organizaciones sin fines de lucro, redujeron el número de nuevos casos. La Organización Mundial de la Salud publicó en el año 2009 que la cifra de casos reportados cayó por debajo de 10 mil (por primera vez en 50 años), llegando a registrarse en el año 2015 sólo 2804 casos [140]. A pesar de esta notable mejoría, el número estimado de nuevos casos por año podría ser aún mayor debido a la insuficiente cobertura por parte de los sistemas

de vigilancia. Esta enfermedad ocupa el tercer lugar entre las enfermedades parasitarias en el África sub-sahariana como causante de muertes [144].

1.3.2.1 Epidemiología

Los tripanosomas causantes de la HAT son clásicamente transmitidos mediante la picadura de las moscas tse-tsé [142]. Estos insectos sólo se encuentran en la zona sub-sahariana de África, pero por razones que aún se desconocen, sólo algunas de ellas transmiten la enfermedad. Las personas que se encuentran más expuestas a contraer esta enfermedad son las poblaciones rurales que habitan en estas regiones, y que a su vez dependen de la agricultura, la pesca, la cría de animales o la caza (actividades que los exponen a la picadura de estas moscas). Esta población rural posee un limitado acceso a los servicios de salud lo que complica aún más el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Además, el desplazamiento de las poblaciones, la guerra y la pobreza son factores importantes que facilitan la diseminación de la enfermedad [140]. Si bien los cambios en el uso de la tierra y el clima redujeron drásticamente las poblaciones de las moscas tse-tsé, y por ende la transmisión de *T. brucei*, el descuido político y social de esta enfermedad podría conducir a un resurgimiento de esta parasitemia. El último pico alarmante de transmisión se observó a finales de la década de 1990, donde se requirieron esfuerzos sólidos y coordinados entre diferentes instituciones para el control de la enfermedad. De los 2804 casos reportados por la OMS en el años 2015, 2722 fueron causados por *T. b. gambiense* (observándose una disminución del 90 % de los casos desde 1999) y 71 de los casos fueron causados por *T. b. rhodesiense* (reducción del 89 % desde 1999) [142].

A pesar de los esfuerzos realizados para la erradicación de la enfermedad del continente africano, aún se observa casos de g-HAT en la República Democrática del Congo (el 86 % de los casos), seguida de la República Centroafricana (5 % de los casos) y Chad (2 % de los casos). A finales del 1990 la enfermedad del sueño fue la primera o segunda causa de muerte en estas regiones del continente, incluso antes que el VIH/SIDA. A partir del año 2015 estos países fueron los únicos que informaron la aparición de más de 50 casos por año. Sin embargo, en países como Sudan del Sur (un área de disturbios civiles) y Guinea (un área de brote de la enfermedad del virus del Ébola) la incidencia informada y

real de la enfermedad puede diferir considerablemente [142]. Por otro lado, los casos reportados de *r*-HAT se concentran principalmente en Malawi y Uganda, representado el 82 % de los casos.

Todas las personas, independientemente de la edad y el sexo, están en riesgo de contraer la enfermedad. Sin embargo, se ha observado una mayor prevalencia en adultos, y la distribución por sexo es dependiente de la actividad de riesgo realizada. Así por ejemplo, las actividades de caza y pesca aumentan las probabilidades de infección en hombres, y las actividades como la agricultura de pequeños cultivos aumentan la probabilidad de contagio en mujeres.

Si bien la HAT es una enfermedad endémica del continente africano, se han reportado casos en todos los continentes [145]. La mayoría de los casos reportados son causados por *T. b. rhodensiense* en turistas que han visitado parques nacionales y reservas de caza en Tanzania, Kenia, Malawi, Uganda, Zambia y Zimbawe. Los casos reportados de *g*-HAT son menos habituales e incluyen emigrantes, refugiados y expatriados de varios años. Debido a que la infección puede estar separada del diagnóstico por períodos de hasta 30 años, el diagnóstico de *g*-HAT debería considerarse en todos los pacientes que alguna vez han vivido en países endémicos [146].

La transmisión de la enfermedad es mayoritariamente vectorial, pero también se han reportado otras vías como la transmisión sexual, accidentes de laboratorio, transfusiones de sangre y trasplantes de órganos [147,148].

1.3.2.2 El parásito y el vector

Las moscas tse-tsé son hematófagos, y tanto los machos como las hembras son capaces de transmitir los tripanosomas [142,149]. Existen alrededor de 31 especies y subespecies de este insecto las que se agrupan en tres grupos según su morfología, preferencias de hábitat y habilidad para transmitir la enfermedad: Forest, Riverine y Savannah [150].

Los principales vectores de transmisión de *T. b. gambiense* son la *Glossina fuscipes* y la *Glossina palpalis* (pertenecientes al grupo *palpalis riverine*) [151]. Aquellos que transmiten *T. b. rhodensiense* son *G. f. fuscipes* (en Uganda) y las especies del grupo Savannah, que incluyen *Glossina morsitans* y *Glossina pallidipes* [152,153].

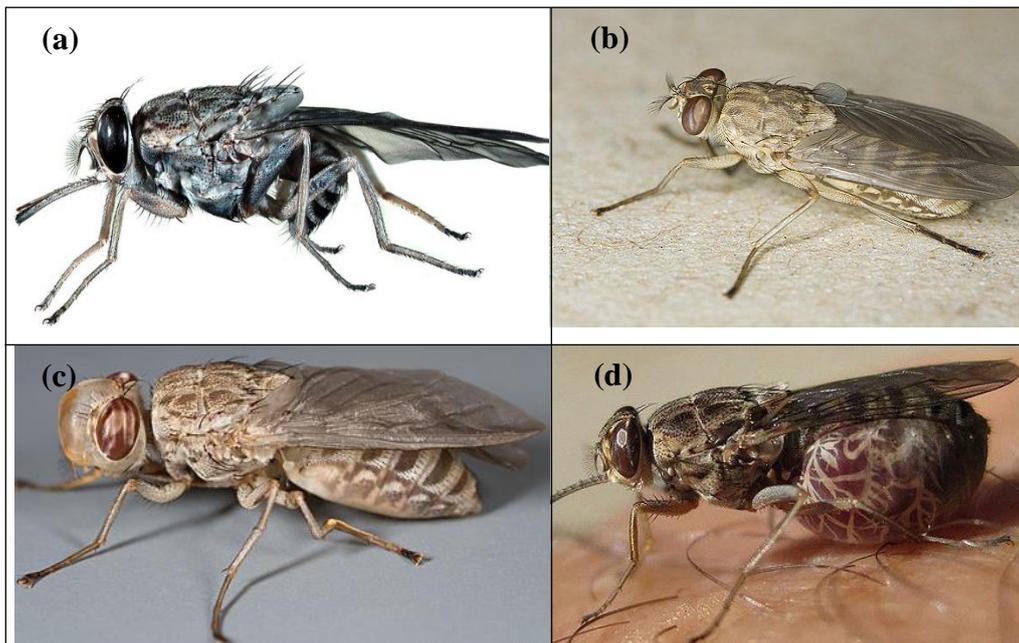


Figura 1.21: Principales especies de moscas tse-tsé que transmiten HAT: (a) *Glossina fuscipes*, (b) *Glossina palpalis*, (c) *Glossina morsitans* y (d) *Glossina pallidipes*.

Las moscas tse-tsé son vivíparas. La mosca hembra es quien deposita una larva completamente desarrollada que se adentra en el suelo, se convierte en pupa y emerge como una mosca adulta luego de un mes. Las moscas recién eclosionadas no están infectadas con tripanosomas, ya que para ello necesita alimentarse de algún huésped mamífero infectado, ya sea ingiriendo tripanosomas de la sangre del mamífero o entrando en contacto con la piel del mismo, ingresando así los parásitos al tracto digestivo de la mosca [154,155]. Si se analiza una población normal/natural de moscas tse-tsé, solo una pequeña proporción de éstas (alrededor de 0,01 %) posee una infección madura de *T. brucei* [156]. Sin embargo, una mosca tse-tsé que se alimenta cada 3 días, podría infectar a un gran número de personas durante su periodo de vida que va de 2 a 3 meses [142].

Los parásitos de *Trypanosoma brucei* son organismos unicelulares (protozoarios) pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y al género Trypanosoma. Son células alargadas de 15 a 30 μm de largo y presentan una alta movilidad debido a la presencia de flagelo [157]. Los humanos han desarrollado un particular sistema de inmunidad innato contra HAT debido a la actividad de complejos séricos (la apolipoproteína L-1 (ApoL1) y la proteína relacionada con la haptoglobina (Hpr) que tienen una capacidad eficaz para

matar tripanosomas, sin embargo, los parásitos *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* son capaces de evadir este mecanismo de defensa [158,159].

El *T. brucei* tienen una organización celular similar a las células eucariotas. Como se muestra en la figura 1.22 [160], contiene un núcleo, una mitocondria tubular que contiene el kinetoplasto (condensación del ADN mitocondrial circular) y un flagelo unido a la célula por una membrana ondulante que le da movilidad [142,149].

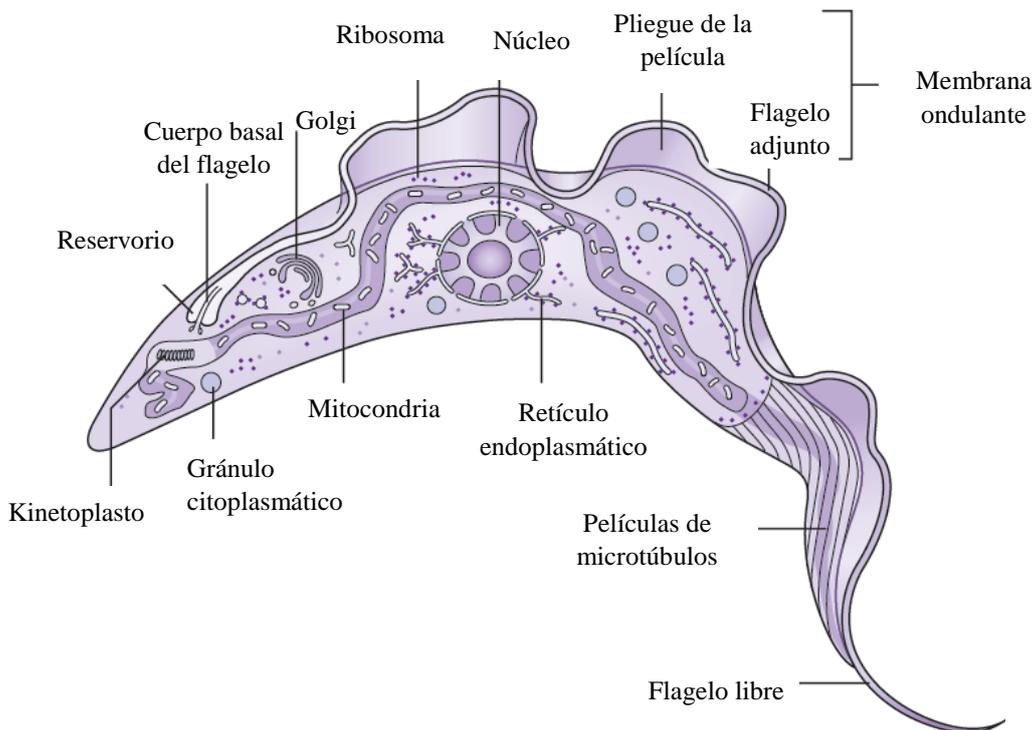


Figura 1.22: Morfología de *Trypanosoma brucei*.

Durante su ciclo de vida, al igual que *Trypanosoma cruzi*, los parásitos de *T. brucei* alternan etapas en el huésped mamífero y en el vector. Dadas las enormes variaciones entre ambos hospederos, los parásitos sufren importantes cambios morfológicos y metabólicos que le permiten adaptarse rápidamente a los diferentes entornos, como lo son la sangre del mamífero y el tracto digestivo de la mosca tse-tsé. A su vez, son capaces también de alternar entre formas proliferativas y no proliferativas dentro de un mismo hospedero. En la figura 1.23 se muestra un esquema que ejemplifica el ciclo del parásito *Trypanosoma brucei* [161].

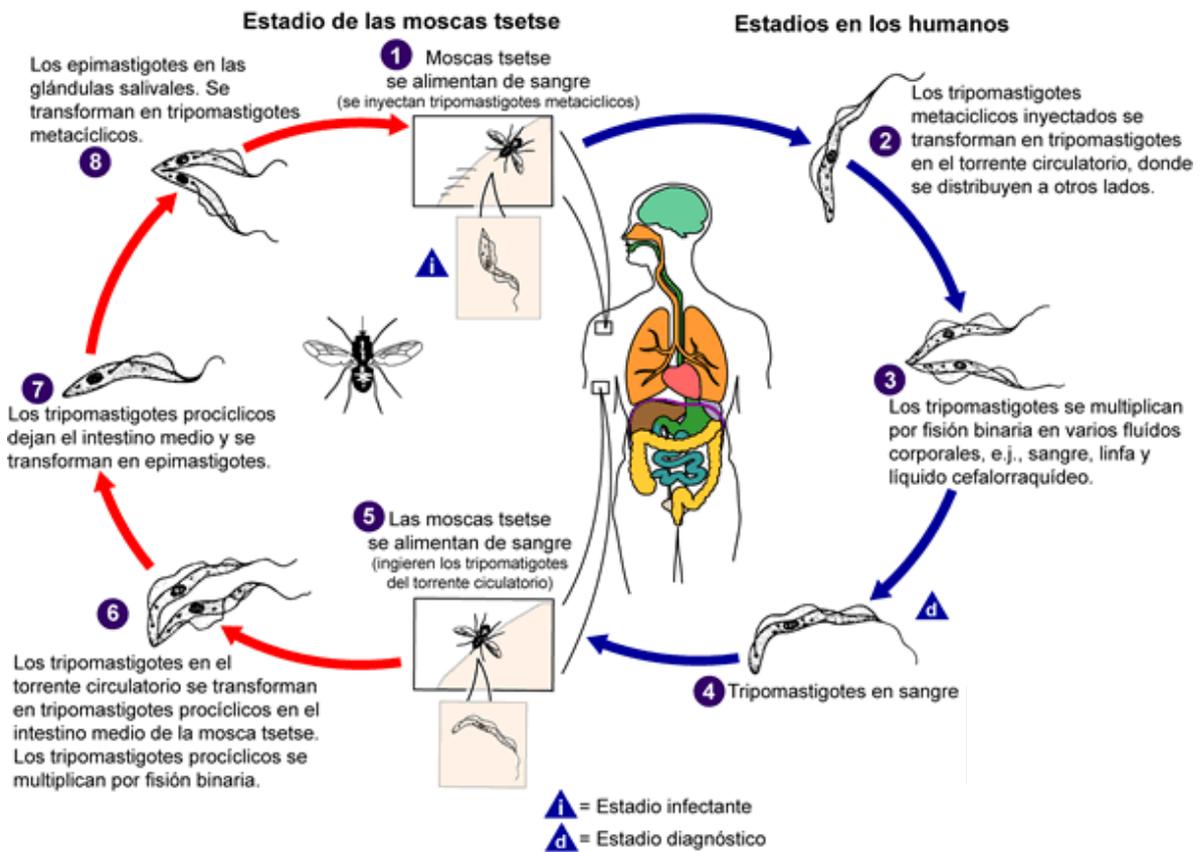


Figura 1.23: Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* [161].

A partir de la figura, se puede considerar como inicio del ciclo de vida de *T. brucei* cuando la mosca tse-tsé se alimenta de la sangre del mamífero. Durante la picadura, el vector inyecta tripomastigotas metacíclicos no proliferativos desde las glándulas salivales hacia el sistema linfático del mamífero, para posteriormente pasar al torrente sanguíneo del mismo **(1)**. En la sangre del hospedador mamífero, los tripomastigotas metacíclicos se transforman a la forma proliferativa de tripomastigotas, denominada forma sanguínea alargada (*slender*) **(2)**. En esta etapa, el kinetoplasto está localizado en la región posterior de la célula (figura 1.24) y la actividad mitocondrial está casi reprimida, obligando al parásito a utilizar la glucosa presente en la sangre del mamífero para obtener energía mediante el proceso de glicólisis efectuada en el glicosoma. Los tripomastigotas infectivos comienzan a replicarse rápidamente mediante fisión binaria **(3)**, se transportan hacia otros sitios del cuerpo, invadiendo así otros fluidos como la linfa y el líquido cefalorraquídeo **(4)**. A medida que aumenta el número de parásitos en sangre, comienza

a observarse una diferenciación hacia una forma no proliferativa, de morfología más gruesa y con un flagelo más corto, denominada forma *stumpy* (rechoncha). La acumulación de células no proliferativas limita el aumento del número de parásitos, alargando la vida del hospedador. La mosca tse-tse al alimentarse de la sangre del humano infectado, incorpora a su organismo los tripomastigotas *stumpy* (5). Los tripomastigotas *stumpy* se caracterizan por estar pre-adaptados a las fuentes energéticas encontradas en el insecto, observándose un alargamiento de su mitocondria y la expresión de enzimas que participan en el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria, las cuales no están presentes en los tripomastigotas sanguíneos *slender* [162]. Los parásitos se transportan hacia el estómago de la mosca, transformándose rápidamente a tripomastigotas procíclicos proliferativos, los cuales se replican rápidamente mediante fisión binaria. Este paso es esencial para la transmisión y establecimiento de la infección en el vector [163]. En esta etapa, el kinetoplasto se desplaza hacia una zona media entre la región anterior de la célula y el núcleo [164], la mitocondria se alarga y la prolina pasa a ser la principal fuente de energía de los parásitos (6) [162]. Los tripomastigotas procíclicos detienen su proliferación y migran hacia las glándulas salivales de la mosca, transformándose allí en la forma epimastigota (7). Con la ayuda del flagelo los epimastigotas se adhieren a las paredes de las glándulas y comienzan nuevamente la proliferación mediante fisión binaria (8). En esta zona del sistema digestivo algunos epimastigotas se desarrollan en tripomastigotas metacíclicos no proliferativos libres en el lumen del vector, y preparados para su transmisión a un nuevo hospedador [165].

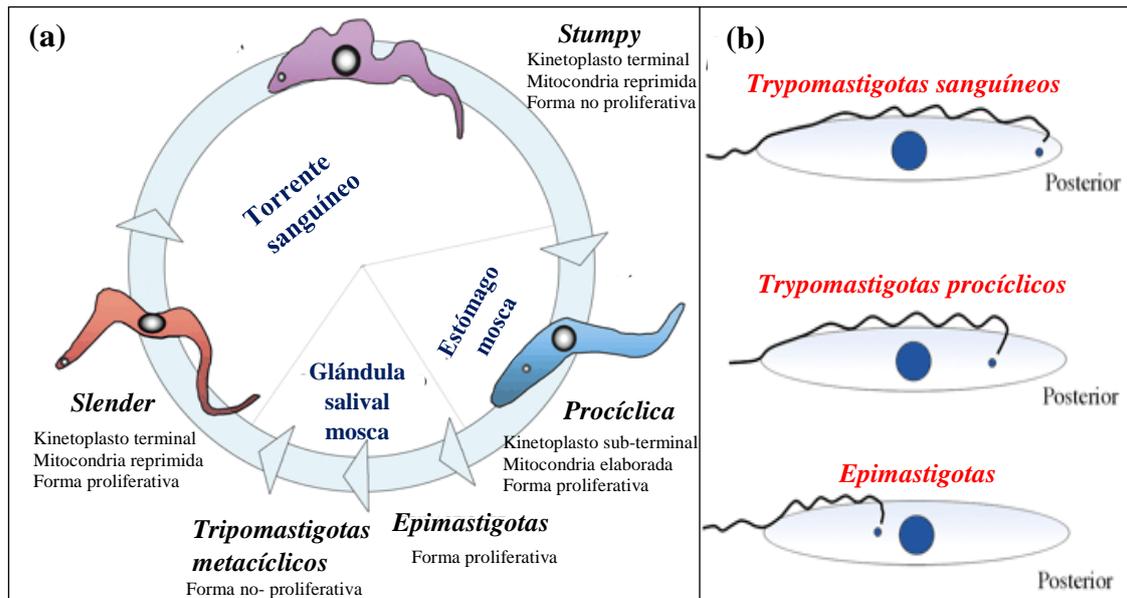


Figura 1.24: Esquema representativo de (a) cambios morfológicos de *T. brucei* y (b) cambios en la ubicación del kinetoplasto durante el ciclo de vida del parásito [164].

1.3.2.3 Fisiopatología y diagnóstico

La fisiopatología de esta enfermedad va a depender del tipo de subespecie de *T. brucei* que realiza la infección, la respuesta del huésped mamífero, y la etapa en la que se encuentra la enfermedad. Se han observado diferentes variaciones de virulencia y patogenicidad en esta enfermedad, las que son atribuidas a las diferentes cepas del parásito [166]. Si bien ambas subespecies del parásito conducen a la muerte del humano infectado cuando no son tratadas, la enfermedad causada por *T. b. rhodesiense* es típicamente aguda, progresa a una enfermedad de segundo estadio en pocas semanas y provoca la muerte luego de 6 meses [167]. Por su parte, la *g*-HAT sigue un curso crónico progresivo con una duración de 3 años aproximadamente, aunque con una gran variabilidad interpersonal [95,168], donde incluso se han reportado portadores sanos y autocurados [169].

La enfermedad presenta dos etapas características: una primera etapa hemolinfática y una segunda etapa meningoencefálica. En esta última etapa los parásitos traspasan la barrera hematoencefálica e invaden el sistema nervioso central. Los trastornos neurológicos,

como el trastorno del sueño, son típicos en esta segunda etapa, aunque la mayoría de los síntomas son comunes en ambas fase de la enfermedad.

Luego de la picadura de la mosca tse-tsé, se observa en aquel sitio una reacción dérmica (chancro de inoculación) de 3 a 4 cm, la cual aparece dentro de 2 a 3 días en personas que han sido infectadas con *T. b. rhodesiense* [166,167], pero rara vez es observada esta reacción dérmica en *g*-HAT.

En la primera etapa de *g*-HAT los pacientes presentan fiebre durante aproximadamente 7 días. También se presenta cefalea, prurito y linfadenopatía. Otros síntomas menos frecuentes, son la hepatoesplenomegalia, edema y disfunción endócrina. En la segunda etapa de *g*-HAT los trastornos neuropsiquiátricos acompañan a las características de la primera etapa, y la fiebre se vuelve menos frecuente. Es característico en esta fase observar trastornos del sueño (del que deriva el nombre de la enfermedad), observándose interrupción del ciclo sueño-vigilia, y con un inicio de sueño con la misma probabilidad de ocurrir durante el día o la noche [170–172]. También se pueden encontrar alteraciones cardíacas, las cuales se desarrollan en una etapa temprana de la enfermedad, siendo la anomalía más comúnmente observada la perimiocarditis [173], sin embargo, la relevancia clínica es mucho menor a la generada por la enfermedad de Chagas [174].

Las características clínicas de *r*-HAT son similares a las observadas en *g*-HAT, pero tal como fue mencionado, una de las diferencias primarias está relacionada con el chancro tripanosómico. A menudo se observan trastornos inespecíficos de los ganglios linfáticos (linfadenopatía) y la presencia de fiebre en ambas etapas de la enfermedad (con mayor frecuencia en niños) [175]. La presentación de edema es informada con mayor frecuencia en los pacientes infectados con *T. b. rhodesiense*, como así también la afectación hepática con hepatomegalia e ictericia (aumento de bilirrubina en sangre), e incluso a veces con presencia de ascitis [142]. De forma contraria, la disfunción tiroidea, la insuficiencia suprarrenal y la miocarditis son signos más comunes observados en *g*-HAT.

Las pruebas de serodiagnóstico confiables sólo existen para la infección causada por *T. b. gambiense*, siendo la prueba de detección más comúnmente utilizada la prueba de “tarjetas de aglutinación para la tripanosomiasis” (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*, CATT) desarrolladas hace más de 40 años. Estas pruebas detectan anticuerpos específicos de *T. b. gambiense* [176]. Si bien CATT ha desempeñado un rol fundamental en el control de HAT, su implementación para la detección a gran escala en

instalaciones de salud fijos es un problema importante, ya que a menudo estos lugares carecen de herramientas necesarias para desarrollar estas pruebas. En un esfuerzo por abordar las deficiencias encontradas en CATT, se han desarrollado dos pruebas de rápido diagnóstico (llamadas RDT, *Rapid Serodiagnostic Tests*) las cuales detectan anticuerpos del huésped infectados por *T. b. gambiense*, y han mostrado muy buenos resultados [177]. Aún no existe un test de serodiagnóstico aplicable para la infección causada por *T. b. rhodesiense*. La *r*-HAT generalmente se presenta con elevados niveles de parasitemia, y para su confirmación se utilizan técnicas aplicadas en sangre. El diagnóstico del estadio neurológico de HAT se realiza mediante examen de líquido cefalorraquídeo tomado por punción lumbar, para determinar el número de tripanosomas y el número de glóbulos blancos existentes en el paciente infectado [178].

1.3.2.4 Tratamiento

Son pocos los fármacos disponibles para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana humana, y la selección de éstos se basa principalmente en la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente y la subespecie de *T. brucei* causante de la enfermedad. La tabla 1.1 resume los tratamientos estándar utilizados para HAT y sus principales reacciones adversas [149].

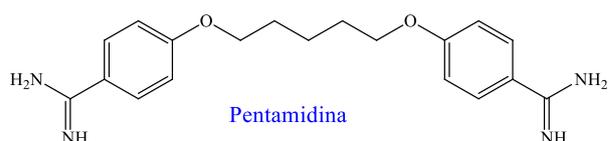
Tabla 1.1: Tratamientos estándar para la Tripanosomiasis africana humana y sus principales reacciones adversas.

Fármaco	Etapas	Ruta de aplicación	Dosis	Principales reacciones adversas a los medicamentos
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>				
Pentamidina ^a	Primera	Intramuscular	4 mg/Kg peso corporal a intervalos de 24 horas durante 7 días	Hipoglucemia, dolor en el lugar de la inyección, diarrea, náuseas, vómitos
Eflornitina	Segunda	Intravenosa (infusión > 30 min)	100 mg/Kg peso corporal a intervalos de 6 horas durante 14 días	Diarrea, náuseas, vómitos, convulsiones; anemia, leucopenia y trombocitopenia
Melarsoprol ^b	Segunda	Intravenosa	2,2 mg/Kg peso corporal a intervalos de 24 horas durante 10 días	Síndromes de encefalopatía, reacciones cutáneas, neuropatías motoras y sensoriales periféricas, tromboflebitis
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>				

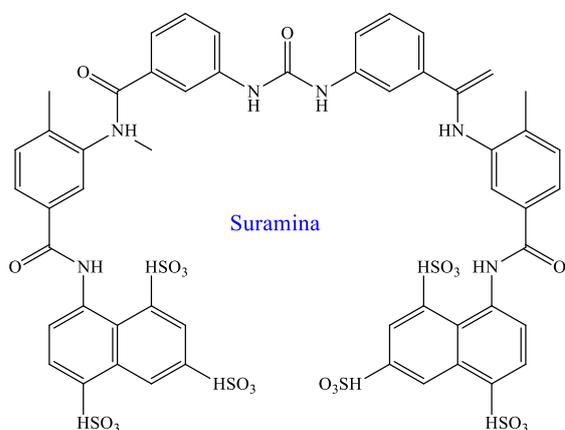
Suramina ^a	Primera	Intravenosa	Dosis de prueba de 4-5 mg / kg de peso corporal en el día 1, luego cinco inyecciones de 20 mg / kg de peso corporal cada 7 días (p. Ej., Día 3, 10, 17, 24, 31); dosis máxima por inyección 1 g	Reacciones de hipersensibilidad (aguda, tardía); albuminuria, cylinduria, hematuria, neuropatía periférica
Melarsoprol ^a	Segunda	Intravenosa	Tres series de 3,6 mg / kg de peso corporal, la serie espaciada por intervalos de 7 días; dosis máxima por día 180 mg	Síndromes de encefalopatía, reacciones cutáneas, neuropatías motoras y sensoriales periféricas, tromboflebitis
^a : Países endémicos: de acuerdo con la legislación nacional o directrices. ^b : Solo donde eflornitina no está disponible o donde el melarsoprol es el tratamiento de primera línea según lineamientos nacionales.				

Son cinco los fármacos utilizados de forma rutinaria en el tratamiento de HAT: pentamidina y suramina utilizados para tratar la enfermedad en la primera etapa; y melarsoprol, eflornitina y nifurtimox para la segunda etapa (figura 1.25). Todos estos fármacos son donados por los fabricantes, y la OMS ha garantizado su distribución mundial de forma gratuita. Mientras más temprano se efectúe el tratamiento de HAT, serán mejores las perspectivas de tolerabilidad y cura. Sin embargo, los fármacos utilizados en la primera etapa generalmente no curan la enfermedad en la segunda etapa, o dicho de otra forma, está injustificado el uso de fármacos de la segunda etapa en el tratamiento de la primera. Esto es debido a que los medicamentos utilizados en la segunda fase de la enfermedad cruzan la barrera hematoencefálica, y tienden a ser más tóxicos y complejos de administrar que los fármacos de la primera etapa.

Fármacos utilizados en la primera etapa de HAT

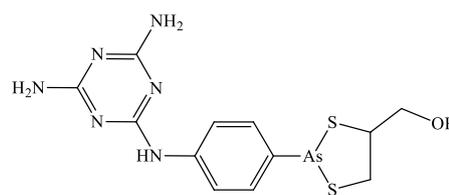


Pentamidina

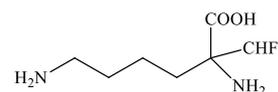


Suramina

Fármacos utilizados en la segunda etapa de HAT



Melarsoprol



Eflornitina

Figura 1.25: Fármacos empleados en la quimioterapia para la Tripanosomiasis Africana Humana.

a) Tratamiento de la primera etapa de HAT

La eficacia del uso de pentamidina en pacientes con *g*-HAT es de un 95 a 98%. Sin embargo, aun son limitados los datos relacionados a pacientes con *r*-HAT, donde solamente el fármaco suramina es efectivo en esta etapa [179,180].

b) Tratamiento de la segunda etapa de HAT

Uno de los fármacos utilizados para el tratamiento en la segunda etapa de HAT es el compuesto organoarsénico llamado melarsoprol. Este fármaco se utiliza en pacientes infectados con *T. b. gambiense* (en países de escasos recursos donde la droga eflornitina no se encuentra disponible) y es el único tratamiento para la segunda etapa de *r*-HAT.

La eflornitina (α -difluorometilornitin, DFMO) es la única “nueva” molécula para el tratamiento de la tripanosomiasis africana que se ha registrado en los últimos 50 años. La monoterapia con eflornitina ha demostrado ser efectiva en un 90 % a 95 % de los casos con *g*-HAT, cuya utilización ha disminuido la tasa de mortalidad observada en la terapia con melarsoprol [181].

En la actualidad, el tratamiento de primera línea para combatir la segunda etapa de *g*-HAT es la terapia de combinación Nifurtimox-eflornitina (NECT). En comparación con la monoterapia con melarsoprol o eflornitina, el NECT ha presentado una tasa de curación mucho más elevada y tasas de mortalidad inferiores al 1 %. Además, ha mostrado efectos secundarios adversos menos graves, el método de administración es más simple y de menor duración, y se postula que evita la resistencia mostrada por el parásito [182–184]. En el año 2009, NECT fue incluido en la lista de fármacos esenciales de la OMS. Ésta organización suministra a los países endémicos un kit de NECT completo el cual contiene todos los medicamentos y materiales necesarios para su administración [182–187].

En resumen, es de gran importancia el diseño de nuevos compuestos activos contra ambos parásitos tripanosomátidos (*T. cruzi* y *T. brucei*). En este sentido, la Química Inorgánica Medicinal, y en particular, la Química Bioorganometálica surge como una novedosa estrategia para el desarrollo de agentes antiparasitarios. Si bien ésta es un área desarrollada no hace muchos años, hoy en día existe un gran número de investigaciones enfocadas hacia esta aplicación [188–191]. En este sentido, este Trabajo de tesis pretende aportar nuevas y novedosas herramientas terapéuticas basadas en compuestos bioorganometálicos como posibles agentes terapéuticos para combatir la enfermedad de Chagas y/o la enfermedad del sueño.

1.4 Bibliografía

- [1] S. Katja A., Essentials of inorganic chemistry, Wiley, United Kingdom, (2015).
- [2] N. Farrell, Uses of inorganic chemistry in medicine, Royal Society of Chemistry, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA, (1999).
- [3] Z. Guo, P.J. Sadler, Metals in medicine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38 (1999) 1512–1531.
- [4] P. Ehrlich, A. Bertheim, Über das salzsaure 33'-Diamino-44'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.*, 45 (1912) 756–766.
- [5] C. Wermuth, The practice of medicinal chemistry, Third edition, Elsevier Ltd., Burlington, MA 01803, USA, (2008).
- [6] N. Farrell, Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents: Compr. Coord. Chem. II, Pergamon, Oxford, (2003), 809–840.

- [7] P. Collery, J. Domingo, L. Keppler, Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III), *Anticancer Res.*, 16 (1996) 687–691.
- [8] J. Nordenberg, A. Novogrodsky, E. Beery, M. Patia, L. Wasserman, A. Warshawsky, Anti-proliferative effects and phenotypic alterations induced by 8-hydroxyquinoline in melanoma cell lines, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 26 (1990) 905–907.
- [9] K.D. Mjos, C. Orvig, Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Rev.*, 114 (2014) 4540–4563.
- [10] I.G. Finlay, M.D. Mason, M. Shelley, Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: a systematic review, *Lancet Oncol.*, 6 (2005) 392–400.
- [11] L.G. Goodwin, Pentostam® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89 (1995) 339–341.
- [12] P. Malfertheiner, F. Bazzoli, J. Delchier, K. Celiński, M. Giguère, M. Rivière, F. Mégraud, Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial, *The Lancet*, 377 (2011) 905–913.
- [13] S. Eckhardt, P.S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, K.M. Fromm, Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine, *Chem. Rev.*, 113 (2013) 4708–4754.
- [14] Z. Aziz, S.F. Abu, N.J. Chong, A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds, *Burns*, 38 (2012) 307–318.
- [15] R. Sanchez-Delgado, A. Anzellotti, Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 4 (2004) 23–30.
- [16] N.P. Farrell, J. Williamson, D. McLaren, Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (1984) 961–971.
- [17] L. Woo, V. Yuen, K. Thompson, J. McNeill, C. Orvig, Vanadyl–biguanide complexes as potential synergistic insulin mimics, *J. Inorg. Biochem.*, 76 (1999) 251–257.
- [18] R. Sanchez-Delgado, K. Lazard, L. Rincon, J.A. Urbina, A.J. Hubert, A.N. Noels, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases 1 Enhancement

- of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$, *J. Med. Chem.*, 36 (1993) 2041–2043.
- [19] R.W. Byrnes, M. Mohan, W.E. Antholine, R.X. Xu, D.H. Petering, Oxidative stress induced by a copper-thiosemicarbazone complex, *Biochemistry*, 29 (1990) 7046–7053.
- [20] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2467–2498.
- [21] B. Rosenberg, L. Vancamp, T. krigas, Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, 205 (1965) 698–699.
- [22] B. Rosenberg, L. Vancamp, J. Trosko, V. Mansour, Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature*, 222 (1969) 385–386.
- [23] Z.D. Bugarcic, J. Bogojeski, B. Petrovic, S. Hochreuther, R. van Eldik, Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 12329–12345.
- [24] F. Arnesano, G. Natile, Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA, *Coord. Chem. Rev.*, 253 (2009) 2070–2081.
- [25] P. Takahara, A. Rosenzweig, C. Frederick, S. Lippard, Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin, *Nature*, 377 (1995) 649–652.
- [26] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, *Dalton Trans.*, 47 (2018) 6645–6653.
- [27] E.Z. Jahromi, A. Divsalar, A.A. Saboury, S. Khaleghizadeh, H. Mansouri-Torshizi, I. Kostova, Palladium complexes: new candidates for anti-cancer drugs, *J. Iran. Chem. Soc.*, 13 (2016) 967–989.
- [28] A. Abu-Surrah, M. Kettunen, Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin, *Curr. Med. Chem.*, 13 (2006) 1337–1357.
- [29] S. Nadeem, M. Bolte, S. Ahmad, T. Fazeelat, S.A. Tirmizi, M.K. Rauf, S.A. Sattar, S. Siddiq, A. Hameed, S.Z. Haider, Synthesis, crystal structures and antibacterial and antiproliferative activities *in vitro* of palladium(II) complexes of triphenylphosphine and thioamides, *Inorg. Chim. Acta*, 363 (2010) 3261–3269.

- [30] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents, *Coord. Chem. Rev.*, 253 (2009) 1384–1397.
- [31] G. Faraglia, D. Fregona, S. Sitran, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Baccichetti, U. Casellato, R. Graziani, Platinum(II) and palladium(II) complexes with dithiocarbamates and amines: synthesis, characterization and cell assay, *J. Inorg. Biochem.*, 83 (2001) 31–40.
- [32] L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran, D. Fregona, Synthesis, characterization, and comparative *in vitro* cytotoxicity studies of platinum(II), palladium(II), and gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate complexes, *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 1588–1595.
- [33] M. Juribašić, K. Molčanov, B. Kojić-Prodić, L. Bellotto, M. Kralj, F. Zani, L. Tušek-Božić, Palladium(II) complexes of quinolinylaminophosphonates: Synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 867–879.
- [34] A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *J. Inorg. Biochem.*, 106 (2012) 90–99.
- [35] E.S. Antonarakis, A. Emadi, Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66 (2010) 1–9.
- [36] E. Reisner, V.B. Arion, B.K. Keppler, A. Pombeiro, Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs, *Protag. Chem. Piero Zanello*, 361 (2008) 1569–1583.
- [37] H. Wee, P. Dyson, Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006 (2006) 4003–4018.
- [38] R. Sutak, E. Lesuisse, J. Tachezy, D.R. Richardson, Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence, *Trends Microbiol.*, 16 (2008) 261–268.
- [39] E. Alessio, Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017 (2016) 1549–1560.
- [40] M.J. Clarke, M. Buchbinder, A.D. Kelman, Binding of pentaammineruthenium(III) to double-helical and single-stranded DNA, *Inorg. Chim. Acta*, 27 (1978) L87–L88.

- [41] M.J. Clarke, B. Jansen, K.A. Marx, R. Kruger, Biochemical effects of binding $[(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{II}}]^{2+}$ to DNA and oxidation to $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}]^{n+}$ -DNA, *Inorg. Chim. Acta*, 124 (1986) 13–28.
- [42] E. Alessio, G. Mestroni, G. Nardin, W.M. Attia, M. Calligaris, G. Sava, S. Zorzet, *Cis-* and *trans*-dihalotetrakis(dimethyl sulfoxide)ruthenium(II) complexes $(\text{RuX}_2(\text{DMSO})_4)$; X = Cl, Br): synthesis, structure, and antitumor activity, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 4099–4106.
- [43] M. Gielen, E. Tiekink, *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*, Wiley, (2005).
- [44] S. Leijen, S.A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy, *Invest. New Drugs*, 33 (2015) 201–214.
- [45] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.*, 100 (2006) 891–904.
- [46] J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, A phase I and pharmacological study with imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent, *Clin. Cancer Res.*, 10 (2004) 3717-3727.
- [47] L. Maffioli, J. Steens, E. Pauwels, E. Bombardieri, Applications of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi in oncology, *Tumori J.*, 82 (1996) 12–21.
- [48] R D Peacock, K. Schwochau, *The chemistry of technetium and rhenium* Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York (1968).
- [49] J.M. Mayer, Metal-oxygen multiple bond lengths: a statistical study, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 3899–3903.
- [50] R. Schibli, C. Dumas, J. Petrig, L. Spadola, L. Scapozza, E. Garcia-Garayoa, P.A. Schubiger, Synthesis and *in vitro* characterization of organometallic rhenium and technetium glucose complexes against glut 1 and hexokinase, *Bioconjug. Chem.*, 16 (2005) 105–112.
- [51] C.Y. Chan, P.A. Pellegrini, I. Greguric, P.J. Barnard, Rhenium and technetium tricarbonyl complexes of n-heterocyclic carbene ligands, *Inorg. Chem.*, 53 (2014) 10862–10873.

- [52] H.-J. Pietzsch, A. Gupta, M. Reisgys, A. Drews, S. Seifert, R. Syhre, H. Spies, R. Alberto, U. Abram, P.A. Schubiger, B. Johannsen, Chemical and biological characterization of technetium(I) and rhenium(I) tricarbonyl complexes with dithioether ligands serving as linkers for coupling the Tc(CO)₃ and Re(CO)₃ moieties to biologically active molecules, *Bioconjug. Chem.*, 11 (2000) 414–424.
- [53] J. Giglio, G. Patsis, I. Pirmettis, M. Papadopoulos, C. Raptopoulou, M. Pelecanou, E. León, M. González, H. Cerecetto, A. Rey, Preparation and characterization of technetium and rhenium tricarbonyl complexes bearing the 4-nitrobenzyl moiety as potential bioreductive diagnostic radiopharmaceuticals *in vitro* and *in vivo* studies, *Eur. J. Med. Chem.*, 43 (2008) 741–748.
- [54] K. W. Lo, A. Choi, W. Law, Applications of luminescent inorganic and organometallic transition metal complexes as biomolecular and cellular probes, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 6021–6047.
- [55] V. Fernandez-Moreira, F.L. Thorp-Greenwood, M.P. Coogan, Application of d⁶ transition metal complexes in fluorescence cell imaging, *Chem. Commun.*, 46 (2010) 186–202.
- [56] K. Ranasinghe, S. Handunnetti, I.C. Perera, T. Perera, Synthesis and characterization of novel rhenium(I) complexes towards potential biological imaging applications, *Chem. Cent. J.*, 10 (2016) 71-81.
- [57] C.E. Housecroft, A. Sharpe, Química inorgánica, Segunda Edición, Pearson Prentice Hall, Madrid, España, (2005).
- [58] A. Hill, E.W. Abel, A.G. Davies, D. Phillips, J.D. Woollins, Organotransition metal chemistry, The Royal Society of Chemistry, (2002).
- [59] W.C. Zeise, Von der Wirkung zwischen Platinchlorid und Alkohol, und von den dabei entstehenden neuen Substanzen, *Ann. Phys.*, 97 (1831) 497–541.
- [60] W. Hieber, H. Lagally, Über Metallcarbonyle XXXV Über Iridiumcarbonyl, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 245 (1940) 321–333.
- [61] W. Hieber, H. Fuchs, Über Metallcarbonyle XXXVIII Über Rheniumpentacarbonyl, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 248 (1941) 256–268.
- [62] L. Mond, C. Langer, F. Quincke, L-Action of carbon monoxide on nickel, *J. Chem. Soc. Trans.*, 57 (1890) 749–753.
- [63] T.J. Kealy, P.L. Pauson, A new type of organo-iron compound, *Nature*, 168 (1951) 1039-1040.

- [64] S.A. Miller, J.A. Tebboth, J.F. Tremaine, Dicyclopentadienyliron, *J. Chem. Soc.*, (1952) 632–635.
- [65] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M.C. Whiting, R.B. Woodward, The structure of iron bis-cyclopentadienyl, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2125–2126.
- [66] D. Shriver, P. Atkins, C. Langford,., *Química Inorgánica*, REVERTÉ, S. A., (1998).
- [67] G.Vessieres, Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay, *Pure Appl. Chem.*, 57 (1985) 1865–1985.
- [68] S. Top, G. Jaouen, A. Vessieres, J.P. Abjean, D. Davoust, C.A. Rodger, B.G. Sayer, M.J. McGlinchey, Chromium tricarbonyl complexes of estradiol derivatives: differentiation of .alpha- and .beta-dia stereoisomers using 1- and 2-dimensional NMR spectroscopy at 500 MHz, *Organometallics*, 4 (1985) 2143–2150.
- [69] G. Jaouen, *Bioorganometallics*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Paris, France, (2006).
- [70] C.G. Hartinger, P.J. Dyson, Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 391–401.
- [71] H. Köpf, P. Köpf-Maier, Titanocene dichloride—the first metallocene with cancerostatic activity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 18 (1979) 477–478.
- [72] P. Köpf-Maier, B. Hesse, R. Voigtländer, H. Köpf, Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of titanocene dihalides (C₅H₅)₂TiX₂ (X=F, Cl, Br, I, NCS) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug-induced side effects, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 97 (1980) 31–39.
- [73] M. Guo, Z. Guo, P. Sadler, Titanium(IV) targets phosphoesters on nucleotides: implications for the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6 (2001) 698–707.
- [74] K. Mross, P. Robben-Bathe, L. Edler, J. Baumgart, W.E. Berdel, H. Fiebig, C. Unger, Phase I clinical trial of a day-1, -3, -5 every 3 weeks phase i clinical trial of day-1, -3, -5 every 3 weeks schedule with titanocene dichloride (MKT 5) in patients with advanced cancer (phase I study group of the AIO of the German Cancer Society), *Oncol. Res. Treat.*, 23 (2000) 576–579.
- [75] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler, Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes, *Chem. Commun.*, (2005) 4764–4776.

- [76] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T.J. Geldbach, G. Sava, P.J. Dyson, *In Vitro* and *in vivo* evaluation of ruthenium(II)–arene PTA complexes, *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 4161–4171.
- [77] C.A. Vock, C. Scolaro, A.D. Phillips, R. Scopelliti, G. Sava, P.J. Dyson, Synthesis, characterization, and *in vitro* evaluation of novel ruthenium(II) η^6 -arene imidazole complexes, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 5552–5561.
- [78] L. Ali, S. Aamer, F. Abdul, M. Urooj, C. Ali, Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives, *Appl. Organomet. Chem.*, 31 (2016) e3664.
- [79] A. Vessieres, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen, Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators) the influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects, *Dalton Trans.*, (2006) 529–541.
- [80] S. Top, A. Vessières, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen, Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) dual activity in the hydroxy-ferrocifen series, *J. Organomet. Chem.*, 637–639 (2001) 500–506.
- [81] E.W. Neuse, Polymeric organoiron compounds as prodrugs in cancer research, *Macromol. Symp.*, 172 (2001) 127–138.
- [82] P. Köpf-Maier, H. Köpf, E.W. Neuse, Ferricenium complexes: A new type of water-soluble antitumor agent, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 108 (1984) 336–340.
- [83] R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A.P. Schubiger, Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application, *Coord. Chem. Rev.*, 190–192 (1999) 901–919.
- [84] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 3–25.
- [85] W. Wang, Y.K. Yan, T. Andy Hor, J.J. Vittal, J.R. Wheaton, I.H. Hall, Synthesis, X-ray structures, and cytotoxicity of rhenium(I) carbonyl 2-(dimethylamino)ethoxide complexes, *Polyhedron*, 21 (2002) 1991–1999.
- [86] M. Navarro, C. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives, *Drug Discov. Today*, 15 (2010) 1070–1078.
- [87] D. Gambino, Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents, *Coord. Chem. Rev.*, 255 (2011) 2193–2203.
- [88] www.cdc.gov, (visitado en mayo del 2018).

- [89] http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en, (visitado en mayo del 2018).
- [90] <https://www.dndi.org>, (visitado en mayo del 2018).
- [91] Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, *The Lancet*, 385 (2015) 117–171.
- [92] N. Feasey, M. Wansbrough-Jones, D.C.W. Mabey, A.W. Solomon, Neglected tropical diseases, *Br. Med. Bull.*, 93 (2010) 179–200.
- [93] P. Hotez, E. Ottesen, A. Fenwick, D. Molyneux, The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination, Springer US, (2006) 23–33.
- [94] L. Payne, J.R. Fitchett, Bringing neglected tropical diseases into the spotlight, *Trends Parasitol.*, 26 (2010) 421–423.
- [95] F. Checchi, J.A. Filipe, D.T. Haydon, D. Chandramohan, F. Chappuis, Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness, *BMC Infect. Dis.*, 8 (2008) 16-26.
- [96] H. Cerecetto, A. Rojas de Arias, M. González, D. Gambino, J. Charris, I. Carvalho, V. L. Campo, P. de Andrade, L. Otero, G. Rivera, D. F. Kawano, N. Campillo, J.A. Páez, G. Mahler, L. Muschietti, V. P. Sulsen, V. Martino, L. W. Tinoco, M. C. Vega, M. Rolon, G. Yaluf, J. Giarolia, V. Almeida, A. Gil, A. Lopez de Cerain, A. Monge, A. Olguin, J. Paniagua-solís, Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos, RIDIMEDCHAG-CYTED (Silanes), México (2011).
- [97] J. Alonso-Padilla, A. Rodríguez, High throughput screening for anti-*Trypanosoma cruzi* drug discovery, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8 (2014) e3259.
- [98] P.J. Hotez, E. Dumonteil, L. Woc-Colburn, J.A. Serpa, S. Bezek, M.S. Edwards, C.J. Hallmark, L.W. Musselwhite, B.J. Flink, M.E. Bottazzi, Chagas disease: “the new HIV/AIDS of the americas,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (2012) e1498.
- [99] A. Rassi Jr, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *The Lancet*, 375 (2010) 1388–1402.
- [100] R.L. Tarleton, R. Reithinger, J.A. Urbina, U. Kitron, R.E. Gürtler, The challenges of chagas disease— grim outlook or glimmer of hope?, *PLOS Med.*, 4 (2007) e332.
- [101] <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>, (visitado en mayo del 2018).
- [102] http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png, (visitado en mayo del 2018).

- [103] I. Molina, F. Salvador, A. Sánchez-Montalvá, Actualización en enfermedad de Chagas, *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica*, 34 (2016) 132–138.
- [104] <http://www.who.int/chagas/epidemiology/co-infection/en/>, (visitado en mayo del 2018).
- [105] W. Souza, H. Meyer, On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms spindle fibers in the dividing nucleus, *J. Protozool.*, 21 (2007) 48–52.
- [106] T.A. Shapiro, P.T. Englund, The structure and replication of Kinetoplast DNA, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49 (1995) 117–143.
- [107] V. Hannaert, P. Michels, Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastida, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26 (1994) 205–212.
- [108] V. Hannaert, F. Bringaud, F.R. Opperdoes, P. Michels, Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida, *Kinetoplastid Biol. Dis.*, 2 (2003) 11-42.
- [109] P. Michels, F. Bringaud, M. Herman, V. Hannaert, Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids, *Peroxisomes Morphol. Funct. Biog. Disord.*, 1763 (2006) 1463–1477.
- [110] F.R. Opperdoes, Compartmentation of carbohydrate metabolism in Trypanosomes, *Annu. Rev. Microbiol.*, 41 (1987) 127–151.
- [111] T.U. de Carvalho, W. de Souza, Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28 (1986) 205–212.
- [112] M.P. Barrett, R.J. Burchmore, A. Stich, J.O. Lazzari, A.C. Frasch, J.J. Cazzulo, S. Krishna, The trypanosomiasis, *The Lancet*, 362 (2003) 1469–1480.
- [113] <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>, (visitado en mayo del 2018).
- [114] D.M. Engman, J.S. Leon, Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity, *Acta Trop.*, 81 (2002) 123–132.
- [115] J. Chiarpenello, Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), *Fund. MF*, 7 (2004) 114–119.
- [116] H. Cerecetto, M. Gonzalez, Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2 (2002) 1187–1213.
- [117] S. Moreno, R. Docampo, R.P. Mason, W. Leon, A.O.M. Stoppani, Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations, *Arch. Biochem. Biophys.*, 218 (1982) 585–591.

- [118] H. Cerecetto, M. González, Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism, *Future Microbiol.*, 6 (2011) 847–850.
- [119] M. Boiani, L. Piacenza, P. Hernández, L. Boiani, H. Cerecetto, M. González, A. Denicola, Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?, *Biochem. Pharmacol.*, 79 (2010) 1736–1745.
- [120] B.S. Hall, C. Bot, S.R. Wilkinson, Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 13088–13095.
- [121] R. Docampo, Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs, *Chem. Biol. Interact.*, 73 (1990) 1–27.
- [122] J.A. Urbina, R. Docampo, Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, *Trends Parasitol.*, 19 (2003) 495–501.
- [123] S.M. Murta, R.T. Gazzinelli, Z. Brener, A.J. Romanha, Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 93 (1998) 203–214.
- [124] J.A. Castro, M.M. deMecca, L.C. Bartel, Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (american trypanosomiasis), *Hum. Exp. Toxicol.*, 25 (2006) 471–479.
- [125] L.C. Bartel, M. Montalto de Mecca, S.L. Fanelli, C. Rodriguez de Castro, E.G. Diaz, J.A. Castro, Early nifurtimox-induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart, *Hum. Exp. Toxicol.*, 26 (2007) 781–788.
- [126] R.H. Gallerano, J.J. Marr, R.R. Sosa, Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43 (1990) 159–166.
- [127] J.C. Engel, P.S. Doyle, I. Hsieh, J.H. McKerrow, Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Exp. Med.*, 188 (1998) 725–734.
- [128] S.C. Barr, K.L. Warner, B.G. Kornreic, J. Piscitelli, A. Wolfe, L. Benet, J.H. McKerrow, A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (2005) 5160–5161.
- [129] P.S. Doyle, Y.M. Zhou, J.C. Engel, J.H. McKerrow, A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 (2007) 3932–3939.

- [130] C. Sanz-Rodríguez, J.L. Concepción, S. Pekerar, E. Oldfield, J.A. Urbina, Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 12377–12387.
- [131] S.L. Oza, E. Tetaud, M.R. Ariyanayagam, S.S. Warnon, A.H. Fairlamb, A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 35853–35861.
- [132] R. Perez-Pineiro, A. Burgos, D.C. Jones, L.C. Andrew, H. Rodriguez, M. Suarez, A.H. Fairlamb, D.S. Wishart, Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors, *J. Med. Chem.*, 52 (2009) 1670–1680.
- [133] N. Greig, S. Wyllie, T.J. Vickers, A.H. Fairlamb, Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*, *Biochem. J.*, 400 (2006) 217–223.
- [134] I. Molina, J. Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, A. Blanco-Grau, A. Sánchez-Montalvá, X. Vidal, A. Pahissa, randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease, *N. Engl. J. Med.*, 370 (2014) 1899–1908.
- [135] J.A. Urbina, Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (2009) 311–318.
- [136] J.A. Urbina, G. Payares, C. Sanoja, R. Lira, A.J. Romanha, *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21 (2003) 27–38.
- [137] J. Molina, O. Martins-Filho, Z. Brener, A.J. Romanha, D. Loebenberg, J.A. Urbina, Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (2000) 150–155.
- [138] C.A. Morillo, H. Waskin, S. Sosa-Estani, M. del Carmen Bangher, C. Cuneo, R. Milesi, M. Mallagray, W. Apt, J. Beloscar, J. Gascon, I. Molina, L.E. Echeverria, H. Colombo, J.A. Perez-Molina, F. Wyss, B. Meeks, L.R. Bonilla, P. Gao, B. Wei, M. McCarthy, Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. Cruzii* carriers: the stop-Chagas trial, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 69 (2017) 939–947.

- [139] J. Keating, J.O. Yukich, C.S. Sutherland, G. Woods, F. Tediosi, Human african trypanosomiasis prevention, treatment and control costs: a systematic review, *Acta Trop.*, 150 (2015) 4–13.
- [140] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en>, (visitado en mayo del 2018).
- [141] P.P. Simarro, G. Cecchi, M. Paone, J.R. Franco, A. Diarra, J.A. Ruiz, E.M. Fèvre, F. Courtin, R.C. Mattioli, J.G. Jannin, The Atlas of human african trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases, *Int. J. Health Geogr.*, 9 (2010) 57-75.
- [142] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human african trypanosomiasis, *The Lancet*, 390 (2017) 2397–2409.
- [143] B. Bouteille, A. Buguet, Human african trypanosomiasis, Second Ed., Academic Press, Oxford, (2014), 618–624.
- [144] R. Brun, J. Blum, Human african trypanosomiasis, *Trop. Dis.*, 26 (2012) 261–273.
- [145] P.P. Simarro, J.R. Franco, G. Cecchi, M. Paone, A. Diarra, J.A. Ruiz Postigo, J.G. Jannin, Human african trypanosomiasis in non-endemic countries (2000–2010), *J. Travel Med.*, 19 (2012) 44–53.
- [146] D. Sudarshi, S. Lawrence, W.O. Pickrell, V. Eligar, R. Walters, S. Quaderi, A. Walker, P. Capewell, C. Clucas, A. Vincent, F. Checchi, A. MacLeod, M. Brown, Human african trypanosomiasis presenting at least 29 years after infection—what can this teach us about the pathogenesis and control of this neglected tropical disease?, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8 (2014) e3349.
- [147] G. Rocha, A. Martins, G. Gama, F. Brandão, J. Atouguia, Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness, *The Lancet*, 363 (2004) 247.
- [148] B.L. Herwaldt, Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures, *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (2001) 659–688.
- [149] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, C. Burri, Human african trypanosomiasis, *The Lancet*, 375 (9) 148–159.
- [150] G. Cecchi, R. Mattioli, J. Slingenbergh, S. De la rocque, Land cover and tsetse fly distributions in sub-Saharan Africa, *Med. Vet. Entomol.*, 22 (2008) 364–373.
- [151] P. Grébaut, T. Melachio, S. Nyangmang, V.E. Eyenga, G.-R. Njitchouang, E. Ofon, F. Njiokou, G. Simo, Xenomonitoring of sleeping sickness transmission in Campo (Cameroon), *Parasit. Vectors*, 9 (2016) 201-210.

- [152] P. Solano, S. Torr, M. Lehane, Is vector control needed to eliminate gambiense human african trypanosomiasis?, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3 (2013) 33-36.
- [153] W. Shereni, N.E. Anderson, L. Nyakupinda, G. Cecchi, Spatial distribution and trypanosome infection of tsetse flies in the sleeping sickness focus of Zimbabwe in Hurungwe District, *Parasit. Vectors*, 9 (2016) 605-614.
- [154] P. Capewell, C. Cren-Travaillé, F. Marchesi, P. Johnston, C. Clucas, R.A. Benson, T.-A. Gorman, E. Calvo-Alvarez, A. Crouzols, G. Jouvion, V. Jamonneau, W. Weir, M.L. Stevenson, K. O'Neill, A. Cooper, N.K. Swar, B. Bucheton, D.M. Ngoyi, P. Garside, B. Rotureau, The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne african trypanosomes, *ELife*, 5 (2016) e17716.
- [155] G. Caljon, N. Van Reet, C. De Trez, M. Vermeersch, D. Pérez-Morga, J. Van Den Abbeele, The dermis as a delivery site of *Trypanosoma brucei* for tsetse flies, *PLOS Pathog.*, 12 (2016) e1005744.
- [156] V. Jamonneau, S. Ravel, M. Koffi, D. Kaba, D. Zeze, L. Ndri, B. Sane, B. Coulibaly, G. Cuny, P. Solano, Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire, *Parasitology*, 129 (2004) 693–702.
- [157] D. Steverding, The history of african trypanosomiasis, *Parasit. Vectors*, 1 (2008) 3-11.
- [158] V. Benoit, P. Etienne, The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill, *Mol. Microbiol.*, 76 (2010) 806–814.
- [159] E. Pays, B. Vanhollebeke, P. Uzureau, L. Lecordier, D. Pérez-Morga, The molecular arms race between african trypanosomes and humans, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12 (2014) 575-585.
- [160] C. Burri, J. Blum, Human african trypanosomiasis, Fourth Ed., Elsevier, (2017), 966-970.
- [161] <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>, (visitado en mayo del 2018).
- [162] J.W. Priest, S.L. Hajduk, Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26 (1994) 179–191.
- [163] K. Vickerman, Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes, *Br. Med. Bull.*, 41 (1985) 105–114.
- [164] K.R. Matthews, The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*, *J. Cell Sci.*, 118 (2005) 283-290.

- [165] C. Ooi, P. Bastin, More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3 (2013) 71-83.
- [166] L.M. MacLean, M. Odiit, J.E. Chisi, P.G.E. Kennedy, J.M. Sternberg, Focus-specific clinical profiles in human african trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4 (2010) e906.
- [167] I. Kuepfer, E.P. Hhary, M. Allan, A. Edielu, C. Burri, J.A. Blum, Clinical presentation of *T.b rhodesiense* sleeping sickness in second stage patients from Tanzania and Uganda, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5 (2011) e968.
- [168] V. Jamonneau, H. Ilboudo, J. Kaboré, D. Kaba, M. Koffi, P. Solano, A. Garcia, D. Courtin, C. Laveissière, K. Lingue, P. Büscher, B. Bucheton, Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (2012) e1691.
- [169] F. Checchi, J. Filipe, M.P. Barrett, D. Chandramohan, The natural progression of gambiense sleeping sickness: what is the evidence?, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2 (2008) e303.
- [170] A.K. Njamnshi, P.F. Seke Etet, S. Perrig, A. Acho, J.Y. Funsah, D. Mumba, J.-J. Muyembe, K. Kristensson, M. Bentivoglio, Actigraphy in human african trypanosomiasis as a tool for objective clinical evaluation and monitoring: a pilot study, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (2012) e1525.
- [171] G. Mpandzou, R. Cespuglio, S. Ngampo, B. Bandzouzi, B. Bouteille, P. Vincendeau, A. Buguet, Polysomnography as a diagnosis and post-treatment follow-up tool in human african trypanosomiasis: a case study in an infant, *J. Neurol. Sci.*, 305 (2011) 112–115.
- [172] A. Buguet, L. Bourdon, B. Bouteille, R. Cespuglio, P. Vincendeau, M. Radomski, M. Dumas, The duality of sleeping sickness: focusing on sleep, *Sleep Med. Rev.*, 5 (2001) 139–153.
- [173] J.A. Blum, C. Schmid, C. Burri, C. Hatz, C. Olson, B. Fungula, L. Kazumba, P. Mangoni, F. Mbo, K. Deo, A. Mpanya, A. Dala, J.R. Franco, G. Pohlig, M.J. Zellweger, Cardiac Alterations in human african trypanosomiasis (*T.b gambiense*) with respect to the disease stage and antiparasitic treatment, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3 (2009) e383.
- [174] J.A. Blum, M.J. Zellweger, C. Burri, C. Hatz, Cardiac involvement in african and american trypanosomiasis, *Lancet Infect. Dis.*, 8 (2008) 631–641.

- [175] C.D. Kato, A. Nanteza, C. Mugasa, A. Edyelu, E. Matovu, V.P. Alibu, Clinical profiles, disease outcome and co-morbidities among *T. b rhodesiense* sleeping sickness patients in Uganda, *PLOS ONE*, 10 (2015) e0118370.
- [176] E. Magnus, N. Van Meirvenne, T. Vervoort, D. Le Ray, M. Wery, Use of freeze-dried trypanosomes in the indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of sleeping sickness, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 58 (1978) 103–109.
- [177] V. Jamonneau, O. Camara, H. Ilboudo, M. Peylhard, M. Koffi, H. Sakande, L. N’Dri, D. Sanou, E. Dama, M. Camara, V. Lejon, Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in west Africa, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9 (2015) e0003480.
- [178] M. Dieudonné, M. Joris, P. Pati Patient, B. Philippe, L. Veerle, Stage determination in sleeping sickness: comparison of two cell counting and two parasite detection techniques, *Trop. Med. Int. Health*, 18 (2013) 778–782.
- [179] U. Bronner, F. Doua, Ö. Ericsson, L.L. Gustafsson, T. Miézan, M. Rais, L. Rombo, Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in Côte d’Ivoire, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85 (1991) 608–611.
- [180] K. Urech, A. Neumayr, J. Blum, Sleeping sickness in travelers - do they really sleep?, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5 (2011) e1358.
- [181] F. Chappuis, N. Udayraj, K. Stietenroth, A. Meussen, P.A. Bovier, Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human african trypanosomiasis, *Clin. Infect. Dis.*, 41 (2005) 748–751.
- [182] E. Alirol, D. Schrupf, J. Amici Heradi, A. Riedel, C. de Patoul, M. Quere, F. Chappuis, Nifurtimox-Eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human african trypanosomiasis: médecins sans frontières experience in the Democratic Republic of the Congo, *Clin. Infect. Dis.*, 56 (2013) 195–203.
- [183] J. Franco, P. Simarro, A. Diarra, J. Ruiz-Postigo, M. Samo, J. Jannin, Monitoring the use of nifurtimox-eflornithine combination therapy (NECT) in the treatment of second stage gambiense human african trypanosomiasis, *Res. Rep. Trop. Med.*, 3 (2012) 93–101.
- [184] G. Priotto, S. Kasparian, W. Mutombo, D. Ngouama, S. Ghorashian, U. Arnold, S. Ghabri, E. Baudin, V. Buard, S. Kazadi-Kyanza, M. Ilunga, W. Mutangala, G. Pohlig, C. Schmid, U. Karunakara, E. Torreele, V. Kande, Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense*

- trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial, *The Lancet*, 374 (2009) 56–64.
- [185] C. Schmid, A. Kuemmerle, J. Blum, S. Ghabri, V. Kande, W. Mutombo, M. Ilunga, I. Lumpungu, S. Mutanda, P. Nganzobo, D. Tete, N. Mubwa, M. Kisala, S. Blesson, O.V. Mordt, In-hospital safety in field conditions of Nifurtimox Eflornithine combination therapy (NECT) for *T. b gambiense* sleeping sickness, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (2012) e1920.
- [186] F. Checchi, P. Piola, H. Ayikoru, F. Thomas, D. Legros, G. Priotto, Nifurtimox plus Eflornithine for late-stage sleeping sickness in Uganda: a case series, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 1 (2007) e64.
- [187] G. Priotto, C. Fogg, M. Balasegaram, O. Erphas, A. Louga, F. Checchi, S. Ghabri, P. Piola, Three drug combinations for late-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: a randomized clinical trial in Uganda, *PLOS Clin. Trials*, 1 (2006) e39.
- [188] D. Gambino, L. Otero, Design of prospective antiparasitic metal-based compounds including selected organometallic cores, *Inorg. Chim. Acta*, 472 (2018) 58–75.
- [189] S. Pomel, F. Dubar, D. Forge, P.M. Loiseau, C. Biot, New heterocyclic compounds: synthesis and antitrypanosomal properties, *New Dev. Antiinfectives Res.*, 23 (2015) 5168–5174.
- [190] P.V. Simpson, C. Nagel, H. Bruhn, U. Schatzschneider, Antibacterial and antiparasitic activity of manganese(I) tricarbonyl complexes with ketoconazole, miconazole, and clotrimazole ligands, *Organometallics*, 34 (2015) 3809–3815.
- [191] A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sánchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, R.A. Maldonado, R.A. Sánchez-Delgado, Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 3867–3877.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES Y PROPUESTA

ANTECEDENTES Y PROPUESTA

Contenido

2.1 Antecedentes	70
2.1.1 Ligandos bioactivos	71
2.1.1.1 Tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído	71
2.1.1.2 <i>N</i> -óxido de 2-mercaptopiridina	75
2.1.1.3 Clotrimazol	78
2.1.2 Fragmentos organometálicos	82
2.1.2.1 Ru(II)-ciclopentadienilo {RuCp}	82
2.1.2.2 Re(I)-tricarbonilo, <i>fac</i> -{Re(CO) ₃ }	85
2.1.2.3 M(II)-1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, {M(dppf)}	86
2.2 Propuesta	90
2.2.1 Objetivos generales y específicos	90
2.2.1.1 Objetivo general	90
2.2.1.2 Objetivos específicos	91
2.3 Bibliografía	91

2.1 ANTECEDENTES

En este capítulo se expondrán los antecedentes bibliográficos que llevaron al desarrollo de este Trabajo de tesis. Se expondrán los antecedentes relevantes de cada uno de los ligandos y centros metálicos (fragmentos organometálicos) seleccionados, para finalmente exponer los objetivos planteados en esta tesis doctoral.

El grupo de investigación donde se realizó este trabajo (Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos) se ha dedicado al desarrollo de compuestos de coordinación con actividad frente a parásitos tripanosomátidos. Para la obtención de dichos compuestos se han empleado dos estrategias.

- a) Coordinación de ligandos intercalantes del ADN a iones metálicos de importancia biológica.
- b) Coordinación de ligandos orgánicos bioactivos a iones metálicos de importancia biológica.

En relación a la primera estrategia, debido a las similitudes encontradas entre células tumorales y células parasitarias (procesos metabólicos comunes, rápida velocidad de replicación, entre otras), se ha propuesto que aquellos compuestos que interactúan eficientemente con el ADN, principal blanco de compuestos metálicos antitumorales, tienen amplias posibilidades de mostrar actividad tripanosomicida [1,2]. Un ejemplo de esta estrategia son los compuestos de oxovanadio(IV) desarrollados que mostraron afinidad por esta biomolécula, y a su vez, actividad *in vitro* contra *T. cruzi* [3]. Con respecto a la segunda estrategia utilizada, y como se mencionará más adelante, se han diseñado compuestos de coordinación clásicos que incluyen iones metálicos con potencialidad terapéutica y ligandos orgánicos activos frente a *T. cruzi*. Por otro lado, debido a las similitudes genómicas encontradas entre *T. cruzi* y *T. brucei*, el grupo de investigación ha ampliado el estudio de la potencialidad terapéutica de los compuestos diseñados evaluándolos también en este parásito. Además, en los últimos años el estudio de la potencialidad tripanosomicida de los compuestos metálicos se ha expandido a compuestos bioorganometálicos [4,5].

Continuando con esa línea, en este Trabajo de tesis se desarrollarán nuevos compuestos bioorganometálicos con potencial actividad contra parásitos tripanosomátidos, en

particular, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, aplicando la segunda estrategia mencionada. Para tal fin, un objetivo primordial es determinar el efecto de la complejación (unión metal-ligando bioactivo) sobre la actividad biológica y las propiedades fisicoquímicas de los ligandos bioactivos seleccionados. Los compuestos desarrollados han sido diseñados de forma racional, es decir, los metales y fragmentos organometálicos seleccionados, los coligandos y contraiones empleados, como así también los ligandos bioactivos seleccionados, se han elegido de manera de modular las propiedades biológicas de los ligandos bioactivos en estos nuevos compuestos.

Para este propósito, se seleccionaron tres tipos de ligandos bioactivos: el derivado de imidazol llamado clotrimazol (CTZ), tiosemicarbazonas que contienen al farmacóforo 5-nitrofurano (HL) y el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo). A su vez, se seleccionaron tres familias de centros organometálicos: rutenio(II)-ciclopentadienilo ($\{RuCp\}$), renio(I)-tricarbonilo $\{fac-Re(CO)_3\}$, y $M(II)$ -1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno ($\{M(dppf)\}$, donde $M = Pd$ o Pt). A continuación se exponen los aspectos relevantes desde el punto de vista biológico de estos centros organometálicos y de los ligandos bioactivos seleccionados, que motivaron su elección para el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos como potenciales fármacos contra parásitos tripanosomátidos. Las características químicas de estas entidades serán profundizadas en la introducción de los capítulos correspondientes.

2.1.1 Ligandos bioactivos

2.1.1.1 Tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído

Las tiosemicarbazonas son moléculas orgánicas que tienen una estructura química general que incluye: un átomo de nitrógeno azometínico (N1), un nitrógeno hidrazínico (N2), el grupo tiocarbonilo (C=S) y un grupo amino (N3) (figura 2.1 a). Estas moléculas han mostrado interesantes propiedades farmacológicas, las cuales han sido ampliamente estudiadas por la Química Medicinal, como así también por la Química Inorgánica Medicinal debido a las características quelantes que éstas poseen. Las tiosemicarbazonas han mostrado actividad como agentes antitumorales, antivirales, antifúngicos,

antibacterianos y antimaláricos. La actividad antitumoral ha sido una de las propiedades biológicas más estudiadas. La Tiaprina (3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona) ha ingresado a fases clínicas como potencial antileucémico [6]. En relación a la aplicación como potenciales agentes antiparasitarios, foco de este Trabajo de tesis, Cohen y col. han estudiado un grupo de tiosemicarbazonas que mostraron una elevada actividad contra *Trypanosoma cruzi* [7]. La actividad antichagásica observada es debida a que estos compuestos actuarían como inhibidores de la cruzipaína, principal proteasa de *T. cruzi* que se expresa en todas las etapas del ciclo de vida del parásito y que es esencial para la replicación de la forma intracelular [8].

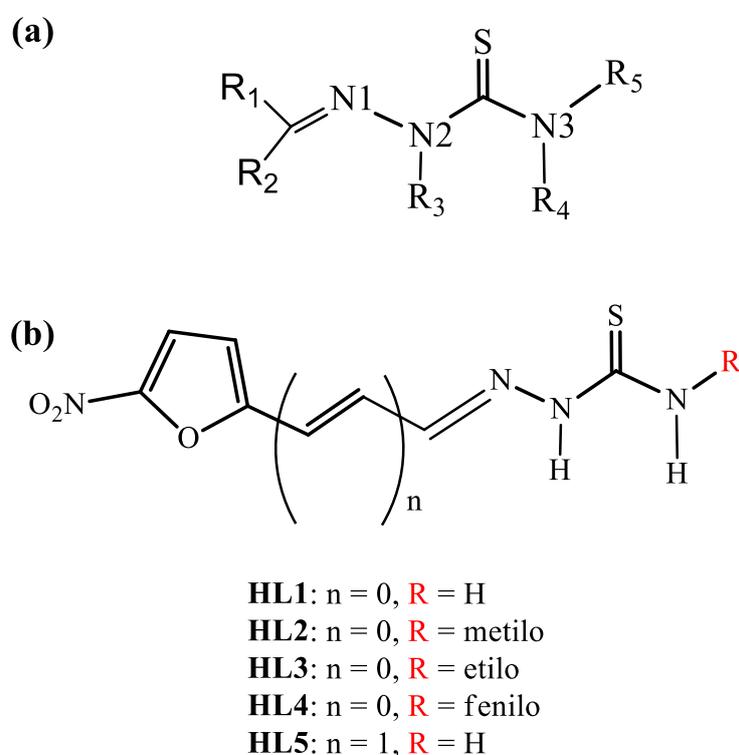


Figura 2.1: (a) Estructura general de las tiosemicarbazonas y (b) tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído.

Con estos antecedentes, Cerecetto y col. en colaboración con nuestro grupo de investigación, sintetizaron una serie de tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído como potenciales agentes antichagásicos (HL). Como se muestra en la figura 2.1b, estos compuestos combinan en una misma molécula el grupo 5-nitrofurano,

que es el farmacóforo del fármaco antichagásico Nifurtimox y la tiosemicarbazona descrita como un potencial inhibidor de cruzipaina [8].

El Nifurtimox es un compuesto nitroheterocíclico que actúa como un profármaco. Como se explicó en el capítulo 1, en uno de los mecanismos propuestos, esta molécula debe someterse a un proceso de biotransformación para mostrar su actividad antichagásica. En particular, su accionar comienza mediante un proceso de nitrorreducción. El proceso de biorreducción de este fármaco puede ser catalizado por dos clases de enzimas, las nitrorreductasas tipo I y tipo II. Específicamente, las enzimas del tipo II contienen FMN (flavín mononucleótido) o FAD (flavín adenín dinucleótido) como cofactor, y su actividad enzimática es sensible al oxígeno del medio. Como se muestra en el esquema de la figura 2.2, estas enzimas catalizan la reducción por un electrón del grupo nitro para generar un nitro anión radical [9], el cual en presencia de oxígeno reacciona para generar el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ y regenerar el compuesto original [10]. El radical superóxido generado, producirá posteriormente peróxido de hidrogeno (H_2O_2) de forma espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), para que finalmente, la interacción entre H_2O_2 y este radical superóxido, mediante reacción de Fenton, produzcan el radical hidroxilo OH^{\cdot} [11].

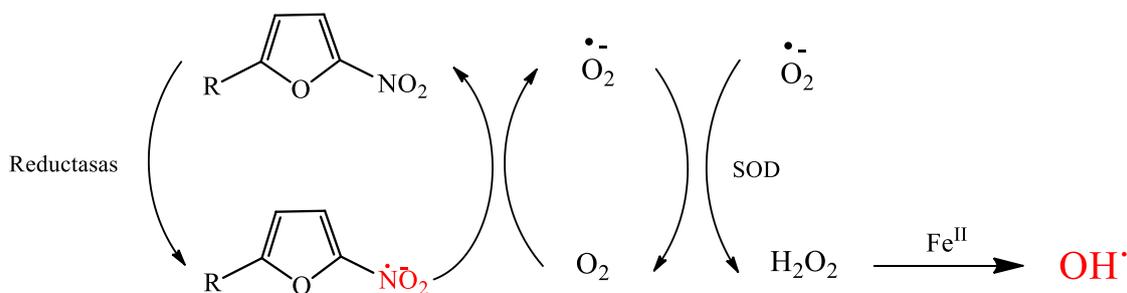


Figura 2.2: Esquema representativo del principal mecanismo de acción antichagásico del fármaco Nifurtimox.

El radical hidroxilo es un fuerte oxidante, no específico, que puede reaccionar y dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Si bien la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) mediante este proceso de reciclaje redox afecta tanto al parásito como al huésped mamífero, las defensas antioxidantes del parásito son mucho más limitadas, y, en particular, la ausencia de catalasa en *T. cruzi* (enzima que cataliza la dismutación de

H₂O₂ para generar O₂ y H₂O [9]) conlleva a que éste tienda a acumular peróxido de hidrogeno, haciendo al parásito más sensible al estrés oxidativo [12]. Cabe destacar que mediante el análisis de espectros de EPR de células intactas de *T. cruzi* tratadas con este fármaco, se identificó la presencia del nitro anión radical (NO₂⁻), especie que da inicio a la cadena de reacciones que generan el estrés oxidativo (figura 2.2) [11].

Se ha comprobado que las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL) también poseen la capacidad de generar EROS en los parásitos de *T. cruzi* mediante la biorreducción del grupo nitro presente en la estructura molecular de estos compuestos, de forma similar al mecanismo de acción postulado para Nifurtimox. A efectos de comprender la actividad anti-*T. cruzi* de estas moléculas, resultó de gran interés estudiar electroquímicamente el potencial de reducción del grupo nitro en HL, lo que daría una idea de la factibilidad de que estos compuestos fueran reducidos en el medio biológico. En estudios de voltametría cíclica, estos compuestos mostraron potenciales de reducción del grupo nitro menos negativo que el Nifurtimox (indicando que la bio-reducción de estas moléculas sería más favorable que la del fármaco). Posteriormente, a través de la medida de espectros de EPR (utilizando la técnica de *spin trapping* para atrapar los radicales de tiempos de vida cortos) se evidenció la generación del nitro anión radical y del radical hidroxilo en parásitos intactos de *T. cruzi* por la acción de estos compuestos [8,13,14]. Además, mediante experimentos de medida de la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos de *T. cruzi*, se confirmó la participación de los compuestos HL en el proceso de reciclaje redox. Por otro lado, se determinó que las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído podrían inhibir la cruzipaina, por lo que podrían seguir un mecanismo de acción dual incluyendo la inhibición enzimática y, a su vez, la generación de estrés oxidativo en los parásitos mediante la generación de especies reactivas del oxígeno [8].

Además, nuestro grupo de investigación ha desarrollado varias series de complejos metálicos de rutenio, paladio y platino donde se incluyeron como ligandos estas tiosemicarbazonas bioactivas. Los complejos fueron evaluados *in vitro* contra *T. cruzi*, observándose a nivel general un aumento de la actividad citotóxica en comparación a los ligandos en su forma libre y al fármaco Nifurtimox. En todos los casos se confirmó que la generación de EROS en los parásitos de *T. cruzi* también forma parte del mecanismo de acción antichagásico de los complejos diseñados [4,5,15–19].

2.1.1.2 *N*-óxido de 2-mercaptopiridina

El *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) es uno de los precursores del fármaco L-092,201 (figura 2.3). Este fármaco (desarrollado por Merck, Sharp y Dohme Research Labs) es un potente inhibidor de la enzima NADH-fumarato reductasa (FR) presente en los parásitos *Haemonchus contortus*, y se ha confirmado también que inhibe la FR de *Trypanosoma brucei* [20]. Por su parte, el compuesto Hmpo ha mostrado una elevada actividad citotóxica contra *Trypanosoma cruzi*, siendo uno de sus principales blancos de acción la enzima NADH fumarato reductasa (*Tc*FR), enzima que participa del metabolismo de la glucosa en los parásitos tripanosomátidos (figura 2.4) [21].

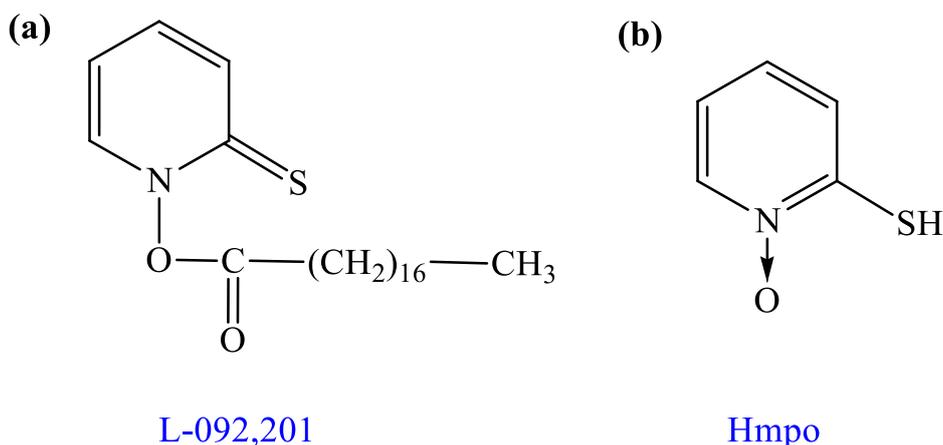


Figura 2.3: (a) Estructura del fármaco L-092,201 y (b) estructura del *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo).

Los parásitos tripanosomátidos poseen un metabolismo de la glucosa complejo donde aproximadamente el 70 % de la glucosa consumida es convertida en succinato, posicionando a éste como su principal producto de excreción, a excepción de la formas sanguíneas de *T. brucei* donde el metabolismo energético está basado en la oxidación de la glucosa de la sangre del hospedero [22–24]. En la figura 2.4 se muestra un esquema representativo de este proceso glicolítico.

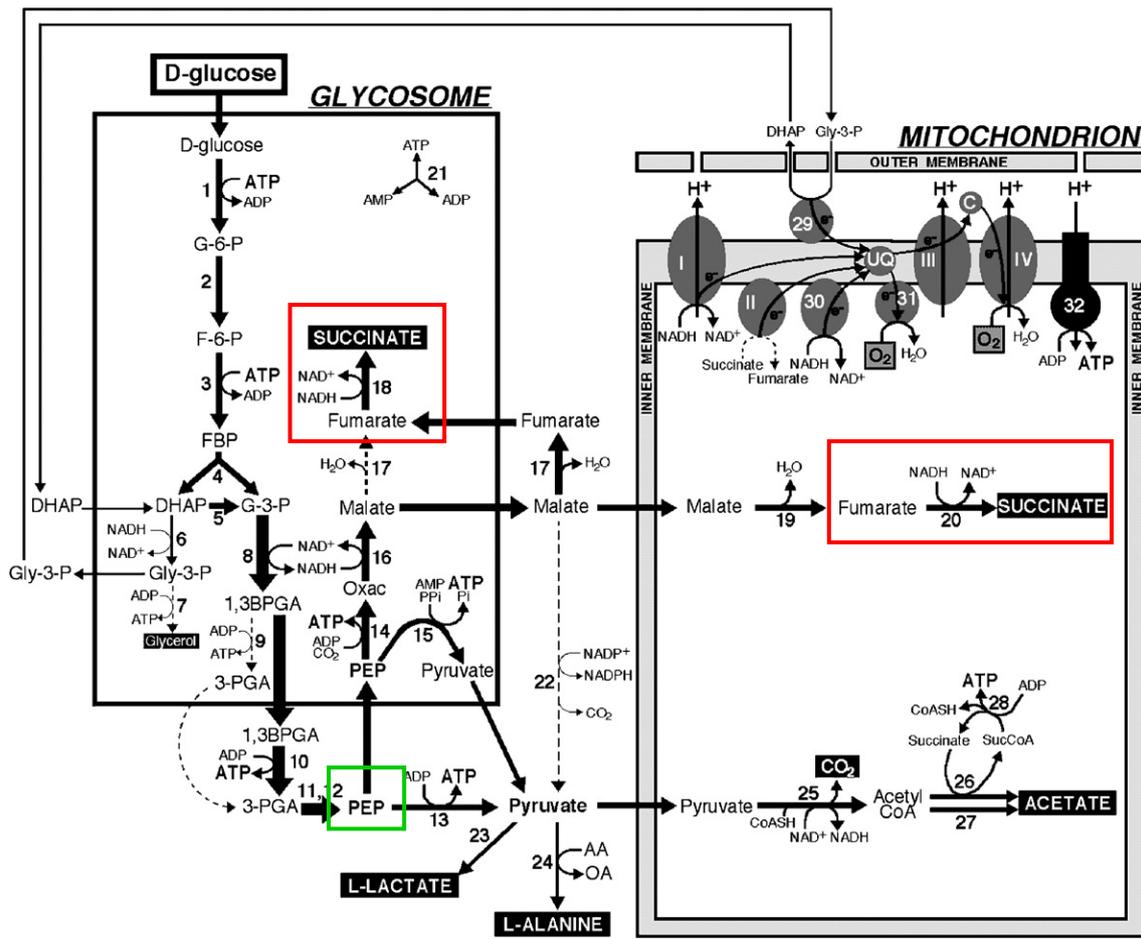


Figura 2.4: Representación esquemática del metabolismo de la glucosa en tripanosomátidos. Los cuadros negros resaltan los productos finales de excreción (acetato, L-alanina, glicerol, L-lactato, succinato y CO₂). Las flechas con diferente grosor representan el flujo metabólico de cada paso enzimático, y las flechas punteadas indican pasos que posiblemente ocurren en un bajo nivel o no ocurren. Este esquema fue extraído de la referencia [24].

A nivel general, luego de que ocurre la oxidación de la glucosa se genera el fosfoenolpiruvato (PEP) (cuadro verde). La producción de succinato a partir del PEP se inicia por la acción de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (reacción 14) y la malato deshidrogenasa (reacción 16) que convierten el PEP en malato. Este producto metabólico es convertido posteriormente en fumarato por dos isoformas de la enzima fumarasa, una citosólica (reacción 17) y otra mitocondrial (reacción 19). Finalmente este compuesto es convertido a succinato por dos enzimas oxido-reductasas dependientes de

NADH, la fumarato reductasa glicosomal (reacción 18) [22,25] y la fumarato reductasa mitocondrial (reacción 19) (cuadros rojos) [23].

Los parásitos tripanosomátidos en condiciones anaeróbicas utilizan el fumarato como aceptor de electrones, reduciéndolo a succinato en una reacción catalizada por la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH (figura 2.5). De esta manera, esta enzima es la oxido-reductasa principal en la eliminación del exceso de equivalentes de reducción en estas condiciones, y del mantenimiento del balance redox intracelular en condiciones normales.

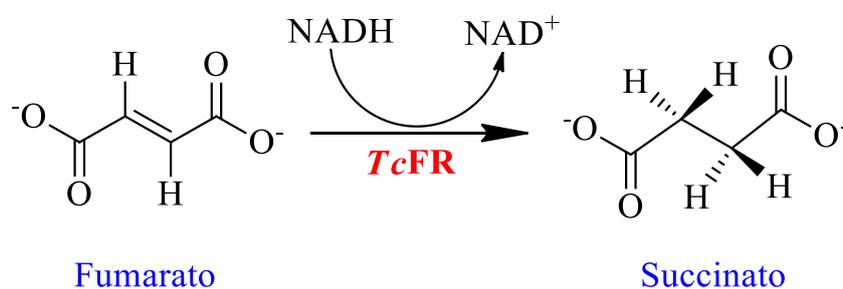


Figura 2.5 Reacción de reducción de fumarato a succinato, a expensas de NADH, catalizada por la enzima FR.

Una característica importante, es que la NADH-fumarato reductasa es una enzima que está presente en los parásitos tripanosomátidos, pero no en células normales de los mamíferos [26–28]. Específicamente en *T. cruzi*, esta enzima está presente en todas las etapas del ciclo de vida del parásito, lo que sumado a su gran importancia en el mantenimiento del balance redox del parásito, determina que pueda ser considerada como un interesante blanco terapéutico para el diseño de nuevos agentes antichagásicos [29,30].

Como se mencionó anteriormente, el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) es un inhibidor de la enzima fumarato reductasa. Estudios de inhibición enzimática realizados sobre la enzima aislada de epimastigotas de *T. cruzi* (*TcFR*) mostraron un IC₅₀ = 35 μM. Además, al cultivar células de epimastigotas de *T. cruzi* con Hmpo durante 5 días en presencia de succinato (sustrato de la enzima *TcFR*), se observó que al agregar este compuesto al medio de cultivo existe una disminución significativa del efecto inhibitorio del crecimiento celular generado por Hmpo. A partir de los experimentos realizados, se

confirmó que el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina disminuye la acumulación de succinato en epimastigotas de *T. cruzi* en una forma dosis-dependiente. Se evaluó también el efecto que genera el Hmpo sobre la viabilidad celular en las otras etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*. En esos estudios se confirmó que esta molécula es también un potente inhibidor de la proliferación de amastigotas de *T. cruzi* (producidos por infección de mioblastos de mamíferos por tripomastigotas de *T. cruzi*), y la pre-incubación de tripomastigotas con Hmpo mostró también inhibición de la infección en los mioblastos [21].

En conclusión, el Hmpo es una molécula que posee una elevada actividad anti- *T. cruzi*. Si bien aún no está claro si su modo de acción se debe exclusivamente a la inhibición de la TcFR, las bajas dosis empleadas para inhibir el crecimiento celular del parásito ($IC_{50} = 0,08 \mu M$) y la baja toxicidad para los cultivos celulares de mamífero, sugieren que este compuesto puede ser un potencial agente antichagásico.

El grupo de investigación donde se realizó este Trabajo de tesis también ha utilizado el Hmpo como ligando bioactivo en el diseño de potenciales metalofármacos. En particular, se evaluaron *in vitro* los compuestos $[M^II(mpo)_2]$ ($M = Pd$ o Pt) y $[Au^I_2(mpo)_2(PPh_3)_2]$ contra *T. cruzi*, observándose un considerable aumento de la actividad antiparasitaria en comparación al ligando en su forma libre (fue evaluada la sal sódica Nampo) [31,32].

2.1.1.3 Clotrimazol

El Clotrimazol (CTZ), [1-(2-clorofenil)-difenil-metil] imidazol (figura 2.6), fue el primer compuesto derivado de imidazol desarrollado para el tratamiento de infecciones micóticas humanas. Este compuesto fue sintetizado en los laboratorios de investigación de Bayer y fue descrito por primera vez en el año 1969 [33]. El Clotrimazol, como así también muchos compuestos derivados de azol, juegan un rol importante en la terapia antifúngica.

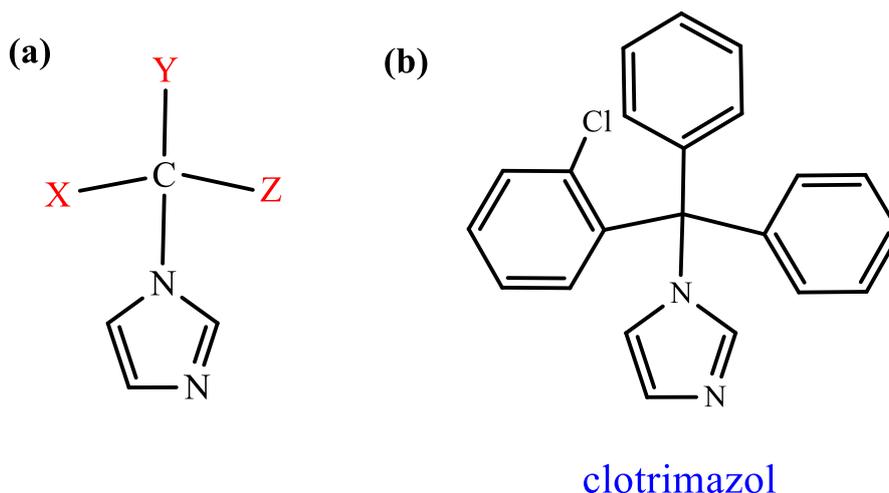
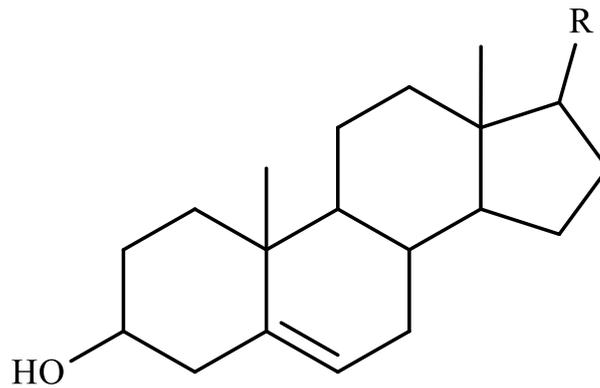


Figura 2.6: (a) estructura general de compuestos derivados de imidazol y (b) estructura del fármaco Clotrimazol.

Los compuestos imidazólicos con propiedades antimicóticas poseen una estructura química general (figura 2.6 a) con dos características principales para dicha actividad biológica: el anillo imidazol (o en algunos casos triazol) no debe poseer sustituyentes, y debe existir un enlace covalente nitrógeno-carbono entre el anillo heterocíclico y el resto de la molécula. Los sustituyentes de este átomo de carbono (x, y, z en la figura 2.6) son fundamentales para modular la actividad antifúngica.

El principal mecanismo de acción antifúngica de los azoles es la inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana (BEM) [34]. Los esteroides son moléculas derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 2.7) que desempeñan una función estructural en las membranas celulares [35]. En esta ruta biosintética, el producto final obtenido es el ergosterol (similar al colesterol presente en humanos), el cual es un componente esencial de la membrana citoplasmática fúngica. La pérdida progresiva de ergosterol en los hongos genera alteraciones de la estructura de la membrana citoplasmática conduciendo finalmente a un eflujo letal de iones y material citoplasmático.



R = hidrocarburos saturados o insaturados

Figura 2.7: Estructura general de los esteroides

En los últimos años se han desarrollado diversos compuestos dirigidos a la inhibición de la BEM en parásitos tripanosomátidos, utilizando fármacos ya empleados con éxito contra patógenos fúngicos. Esto es debido a que los parásitos tripanosomátidos poseen estrechas similitudes con los hongos en cuanto a la composición y la biosíntesis de esteroides. En particular, se ha desarrollado y estudiado como potenciales agentes contra parásitos tripanosomátidos un conjunto de compuestos derivados de azol. Por ejemplo, para los compuestos fluconazol e itraconazol se ha confirmado, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, su potencialidad como agentes antiproliferativos de *Leishmania spp.* [36,37] y *Trypanosoma cruzi* [38,39]. Los triazólicos antifúngicos posaconazol y ravuconazol también han demostrado, mediante estudios *in vitro* y en modelos de animales, su potente actividad anti-*T. cruzi* y su elevada selectividad, incluso en cepas resistentes a los fármacos antichagásicos Benznidazol y Nifurtimox [40–42]. Estudios recientes han evaluado la seguridad y eficacia del uso de posaconazol en pacientes chagásicos crónicos en monoterapia, y en combinación con Benznidazol. En particular, este compuesto demostró actividad tripanostática durante el tratamiento, aunque fue ineficaz en el uso a largo plazo en portadores asintomáticos de *T. cruzi* [43,44].

Al igual que los hongos, el *T. cruzi* posee claras diferencias en la ruta biosintética de esteroides de membrana respecto al huésped mamífero. Las principales diferencias radican en que los mamíferos producen colesterol utilizando complejos multi-catalíticos, mientras que el protozoo produce ergosterol utilizando proteínas monofuncionales [45]. A pesar de la presencia de colesterol en los parásitos, se ha confirmado que éstos no son capaces

de sustituir por colesterol los esteroides sintetizados endógenamente [46]. A partir de estas diferencias y del conocimiento de la BEM de los parásitos, se han investigado diversos inhibidores de esta ruta biosintética, los cuales actúan en diferentes etapas de la biosíntesis de ergosterol a partir de ácido mevalónico (figura 2.8).

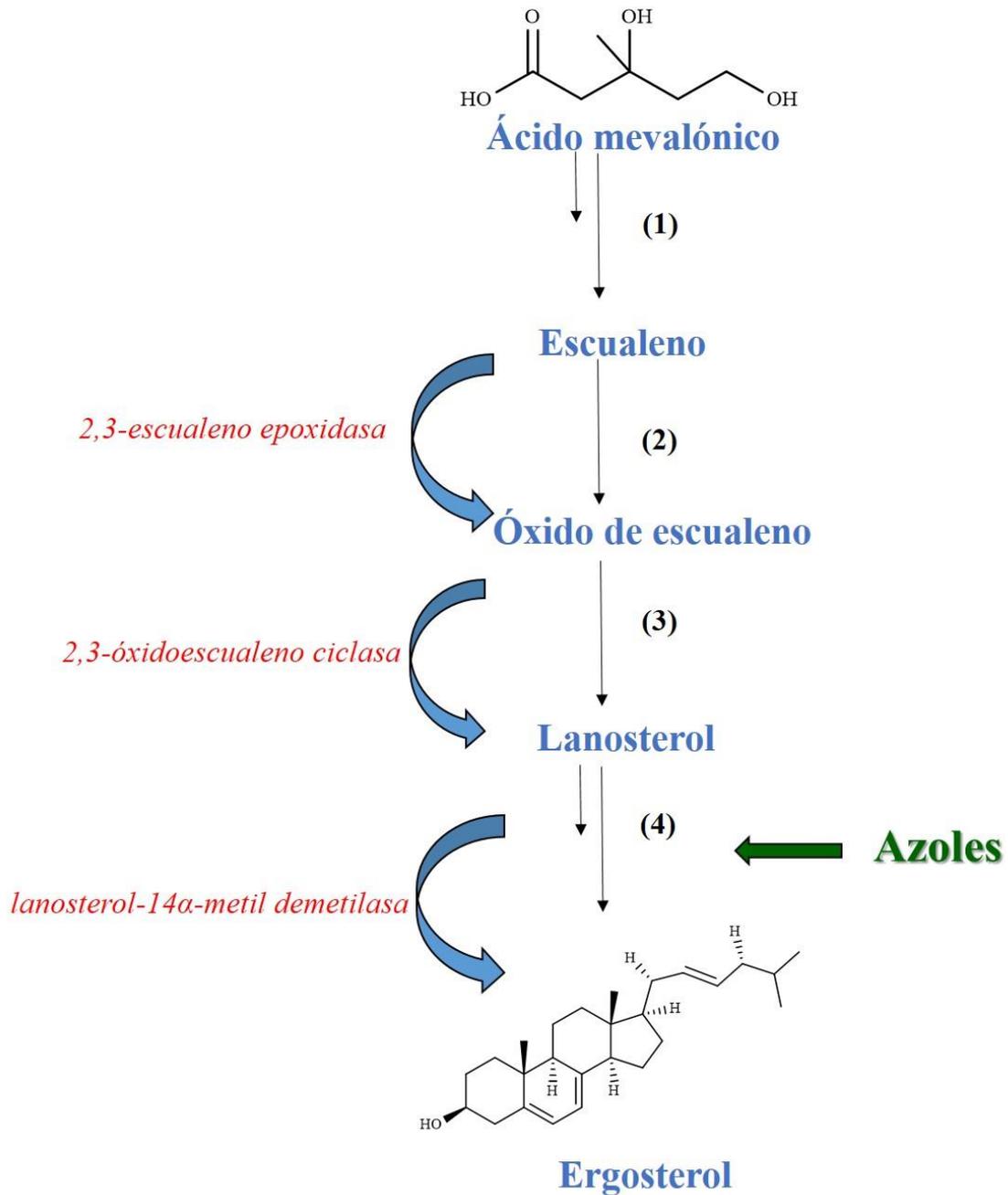


Figura 2.8: Esquema de la biosíntesis de esteroides de membrana.

Las etapas de la BEM que han sido mayormente investigadas como potenciales dianas terapéuticas son: la transformación de mevalonato en escualeno [47], la transformación de escualeno en óxido de escualeno [48], la inhibición de las enzimas lanosterol sintasa [49], oxidoescualeno ciclasa [50] y escualeno sintasa [51], la C-14 demetilación del lanosterol [52], y potenciales fármacos que actúan directamente sobre el ergosterol [53]. De todas éstas, la diana terapéutica más estudiada es la enzima C-14 esterol demetilasa.

El Clotrimazol ha mostrado actividad antiproliferativa sobre los parásitos de *T. cruzi* [54]. La actividad antichagásica de este compuesto, como también la de otros derivados de azoles, es debida a que actúan como inhibidores específicos de la enzima α -C-14 demetilasa dependiente de citocromo P-450, enzima que cataliza la conversión de lanosterol a ergosterol en la ruta biosintética (figura 2.8) [55].

2.1.2 Fragmentos organometálicos

2.1.2.1 Ru(II)-ciclopentadienilo {RuCp}

El estudio y desarrollo de complejos de rutenio como potenciales agentes antiparasitarios inició hace más de 20 años con los trabajos del grupo de investigación de Sánchez-Delgado y col. Este grupo desarrolló inicialmente compuestos de coordinación clásicos con ligandos bioactivos derivados de azoles como el clotrimazol (CTZ) y el ketoconazol (KTZ) [54–56]. Posteriormente, y considerando las interesantes propiedades antitumorales de los complejos *half sandwich* Ru^{II}-areno, desarrollaron complejos organometálicos que incluían el fragmento {Ru^{II}-*p*-cimeno} y estos ligandos azoles. De esta manera, obtuvieron los complejos [Ru^{II}(η^6 -*p*-cimeno)Cl₂(L)], [Ru^{II}(η^6 -*p*-cimeno)(en)(L)](BF₄)₂, [Ru^{II}(η^6 -*p*-cimeno)(bipy)(L)](BF₄)₂ y [Ru^{II}(η^6 -*p*-cimeno)(acac)(L)](BF₄) (L = CTZ o KTZ, en = etilendiamina, bipy = bipyridina y acac = acetilacetato) [57,58]. Éstos fueron evaluados *in vitro* contra *T. cruzi* y *Leishmania major*, y en osteoblastos humanos para evaluar la selectividad de la actividad antiparasitaria. Los compuestos resultaron ser activos contra ambos parásitos, con valores de LD₅₀ (dosis letal media) en el rango micromolar o submicromolar. Además, los

compuestos que incluyeron ligandos cloruro y acetilacetato fueron evaluados *in vivo* contra la leishmaniasis cutánea en ratones BALB/c infectados con promastigotas metacíclicas de *L. major*, mostrando una moderada, pero selectiva actividad [59].

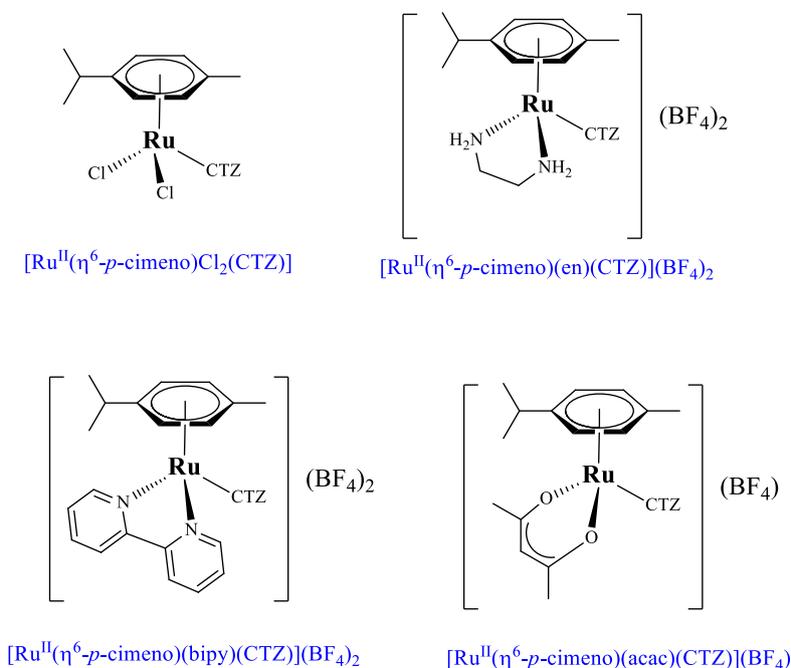


Figura 2.9: Algunos de los complejos organometálicos desarrollados por Sanchez-Delgado y col.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado también complejos que incluían el *core* $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-}p\text{-cimeno}\}$ y las tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofuraldéido (HL) como ligandos [4,5,60]. Se sintetizaron complejos dinucleares de fórmula $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ ($\text{X} = \text{Cl}^-$ o PF_6^-) (figura 2.10) los cuales fueron evaluados *in vitro* contra *T. cruzi* y *T. brucei*. El complejo que incluyó el ligando HL4 (figura 2.10) fue el que mostró la mejor actividad citotóxica contra ambos parásitos, y se observó que aquellos complejos que incluyeron el contraión Cl^- fueron más activos que los que poseen PF_6^- . Se estudiaron también los probables mecanismos de la acción antiparasitaria observada, en particular, se confirmó la generación por biorreducción de radicales intraparasitarios tóxicos en *T. cruzi*, la inhibición de cruzipaina de *T. cruzi* y la interacción con ADN.

Además, se incluyeron estudios sobre la interacción de estos compuestos con albúmina y transferrina [4,5,60].

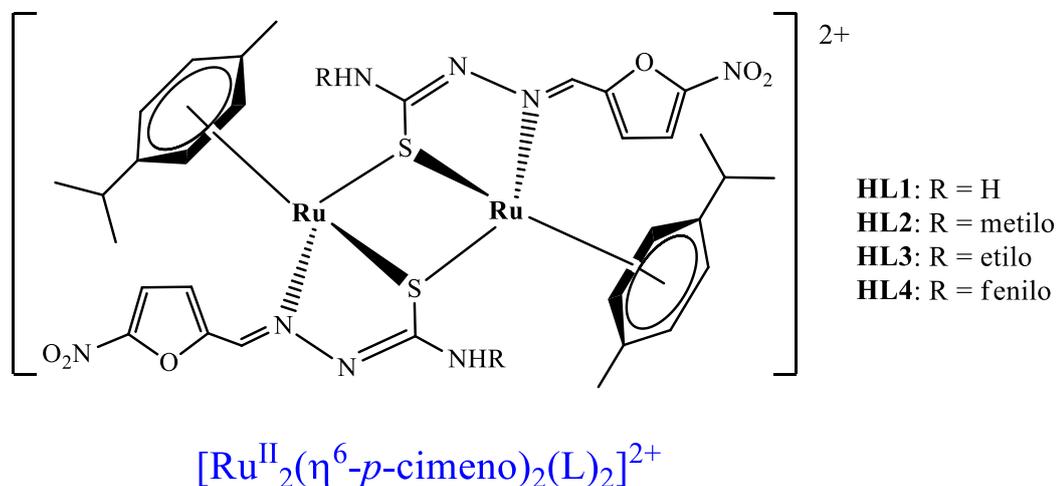


Figura 2.10: Complejos que incluyen el fragmento organometálico $\{Ru^{II}\text{-}p\text{-cimeno}\}$ y las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurraldehído.

Previo a este Trabajo de tesis, no existían publicaciones relacionadas con la potencialidad tripanosomicida de compuestos organometálicos que incluyan el fragmento $\{RuCp\}$. Sin embargo, considerando las propiedades antiproliferativas de los complejos Ru^{II} -areno, junto con las alentadoras propiedades anticancerígenas de los metalocenos (mencionados en la introducción), se han desarrollado compuestos que incluyen el fragmento organometálico $\{Ru^{II}\text{-ciclopentadienilo}\}$ ($RuCp$) como potenciales antitumorales. Cabe destacar, por ejemplo, el complejo $[Ru^{II}CpCl(PTA)_2]$ que fue evaluado en células de adenocarcinoma murino TS/A [61], o los complejos del tipo $[Ru^{II}Cp(CO)L]^+$ con ligandos piridocarbazol que resultaron ser fuertes y selectivos inhibidores de la proteína quinasa GSK-3 y Pim-1 [62]. En este contexto, el grupo de investigación de M. Helena García y col. han desarrollado diversos complejos que incluyen el fragmento organometálico $\{RuCp\}$, los cuales mostraron interesantes propiedades anticancerígenas [63–66].

2.1.2.2 Re(I)-tricarbonilo, *fac*-{Re(CO)₃}

En base a las interesantes propiedades biológicas, que fueron mencionadas en la introducción, que presentan complejos que incluyen el fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃}, se ha incluido este *core* organometálico en el diseño de potenciales agentes antiparasitarios. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha sintetizado y estudiado la potencial actividad tripanosomicida de complejos de Re(I)-tricarbonilo con ligandos semicarbazona derivados del salicilaldehído. Los complejos mostraron una moderada actividad *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* (con valores de IC₅₀ entre 57,3 μM y 187,0 μM), observándose un incremento de la actividad antiparasitaria, con respecto al correspondiente ligando libre, luego del incluir este fragmento organometálico [67].

Otro ejemplo existente en la literatura sobre complejos de Re(I)-tricarbonilo con actividad contra *T. cruzi*, son los complejos desarrollados por Klahn y col. Este grupo sintetizó en primera instancia complejos ciretrenil iminas derivados del 5-nitrofurano que incluían el *core* [Re^ICp(CO)₃]. Los estudios *in vitro* mostraron que si bien los complejos fueron menos activos que el Nifurtimox, éstos poseen una actividad citotóxica superior que los fragmentos organometálicos por separado. Los autores proponen que esto se podría deber a un aumento en la lipofilia o a un sinergismo entre los fragmentos organometálicos y el grupo 5-nitrofurano [68]. Posteriormente, los autores diseñaron otros complejos ciretrenil derivados del 5-nitrotiofeno y del 5-nitrofurano incluyendo un ligando azina (2,3-diaza-1,3-butadieno) (figura 2.11). Estos compuestos fueron evaluados *in vitro* contra *T. cruzi* obteniéndose valores de IC₅₀ entre 12,7 μM y 87,7 μM, observándose que luego de la inclusión de estos ligandos existe un aumento de la actividad antichagásica. Los autores proponen que esto estaría relacionado con que la conjugación π facilitó la comunicación electrónica entre los fragmentos organometálicos y los grupos nitroheterocíclicos [69].

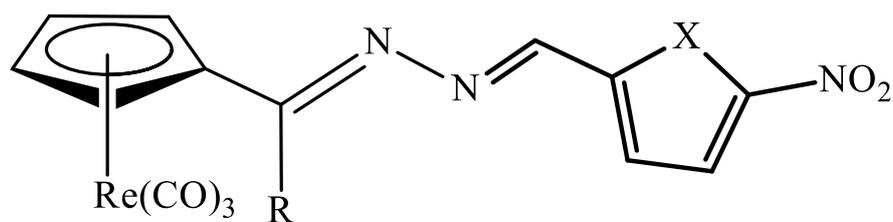


Figura 2.11: Estructura de los compuestos ciretrenil derivados del 5-nitrotiofeno y 5-nitrofurano.

1.2.3 M(II)-1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, {M(dppf)}

La inclusión del fragmento de ferroceno en moléculas bioactivas ha sido una novedosa estrategia, denominada generación de análogos, para el diseño de nuevos fármacos, ya sea para disminuir la toxicidad en células normales y/o para mejorar su índice terapéutico. Un ejemplo lo constituye el ferrocifeno mencionado en el capítulo anterior.

La primera aplicación de esta estrategia en el desarrollo de potenciales fármacos antiparasitarios lo constituye el desarrollo de la ferroquina, análogo del agente antimalárico Cloroquina (figura 2.12). La malaria es una enfermedad parasitaria causada por el parásito *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), el cual actualmente ha mostrado resistencia hacia los fármacos antimaláricos, y en particular hacia la Cloroquina [70,71]. En base a los novedosos resultados obtenidos con los ferrocifenos, y apoyados en el hecho de que los parásitos del género *P. falciparum* requieren hierro para su desarrollo dentro de los glóbulos rojos del huésped mamífero infectado, Biot y col. aplicaron el mismo concepto a la molécula de Cloroquina, introduciendo un fragmento ferroceno en la estructura de este fármaco. Este grupo sintetizó varios compuestos análogos a la Cloroquina sustituyendo dos grupos metileno de la cadena butilo lateral de la cloroquina por ferroceno, y se modificó también el grupo amino terminal [72]. La figura 2.12 muestra la estructura de la ferroquina y alguno de los compuestos derivados generados. La actividad antimalárica de la ferroquina fue estudiada *in vitro* sobre una cepa de *P. falciparum* sensible a Cloroquina (HB35CQS) mostrando la ferroquina y la Cloroquina similar actividad. Sin embargo, el estudio *in vitro* sobre una cepa resistente a Cloroquina (Dd2) mostró valores de $IC_{50} = 22$ nM para ferroquina, e $IC_{50} = 130$ nM para Cloroquina [73]. Posteriormente, mediante estudios *in vivo* sobre ratones infectados con cepas de

Plasmodium sensibles y resistentes a Cloroquina, se confirmó que la molécula de ferroquina es el compuesto más activo de todos los sintetizados, y que administrado durante 4 días a una dosis de 8,4 mg/Kg protege a los ratones de la infección mortal [74,75]. Los cambios en la actividad biológica observados en la ferroquina respecto a la Cloroquina estarían asociados a la modificación de la lipofilia del compuesto original, pero también a la generación de radicales libres por reacciones tipo Fenton a nivel del fragmento de ferroceno [76].

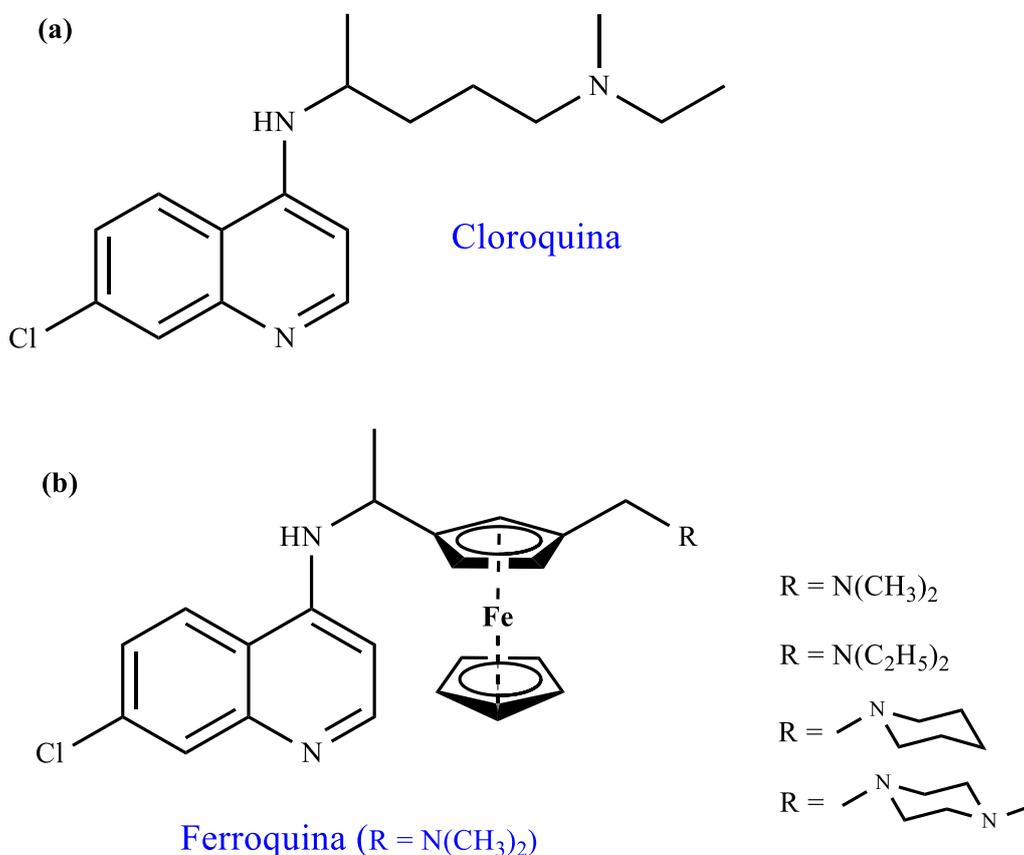


Figura 2.12: Estructura molecular de (a) cloroquina y (b) ferroquina y derivados.

La ferroquina fue también evaluada contra *T. brucei* mostrando una interesante actividad *in vitro*, que según señalan los autores, estaría relacionada con la generación de EROS causantes de daño celular, similar a lo observado en los parásitos de *P. falciparum* [77].

Además de estos antecedentes, el grupo de Cicarelli y col. diseñaron complejos derivados de ferrocenil y benzil diamina (hidroxicloruro de *N*₁-benzil, *N*₂-metilferroceniletano-1,2-

diamina y hidroxidocloruro de N_1, N_2 -dibenziletano-1,2-diamina, respectivamente) los cuales fueron evaluados contra *T. cruzi* y *T. brucei* [78]. Estos compuestos mostraron un aumento de la actividad tripanosomicida luego de la inclusión del fragmento de ferroceno probablemente, según señalan los autores, debido al aumento de la lipofilia y/o a las diferencias en las propiedades redox o la geometría de la molécula luego de la inclusión del ferroceno.

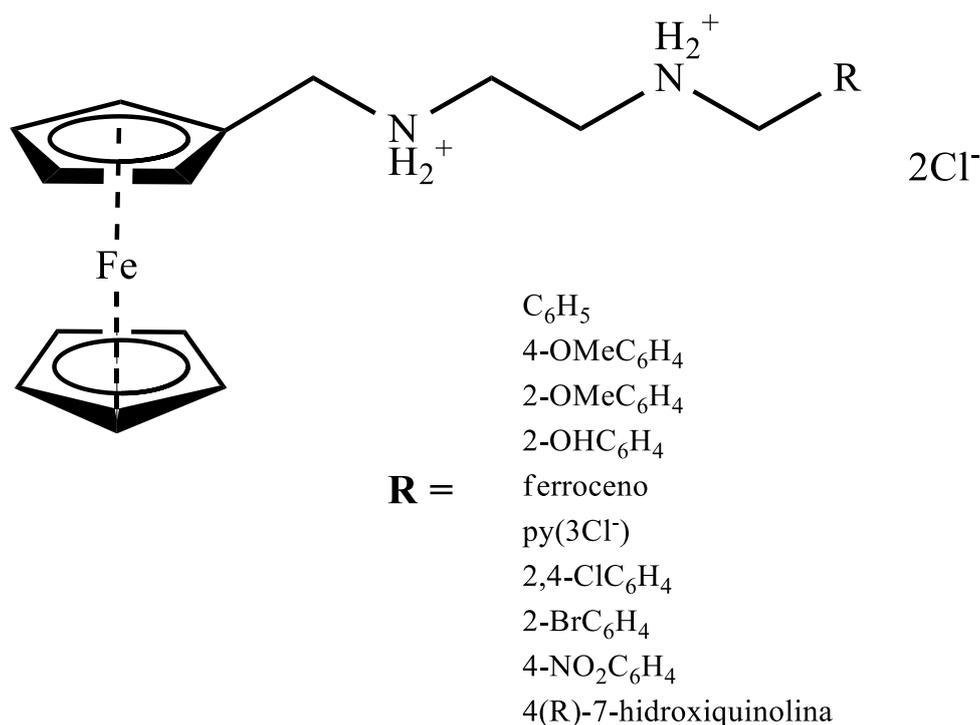


Figura 2.13: Estructura de los compuestos derivados de ferrocenil diamina.

Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de dos iones metálicos en el diseño de nuevos fármacos ejerce un efecto cooperativo sobre la actividad citotóxica y las propiedades fisicoquímicas de interés biológico de los complejos finales. A menudo estos compuestos son capaces de superar la resistencia celular, debido a la posibilidad de combinar los diferentes mecanismos de acción intrínsecos de cada fragmento metálico [79,80]. Los ejemplos existentes de esta estrategia se basan en la combinación de las características químico-biológicas de centros metálicos farmacológicamente relevantes.

La mayoría de estos compuestos han sido diseñados como potenciales agentes anticancerígenos. Por ejemplo, se han estudiado complejos heterobimetálicos de Ru(II)

similar a RAPTA como los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cymeno})\text{Cl}][\text{Ti}^{\text{IV}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Cl}_2(\mu\text{-}\eta^5:\kappa^1\text{-C}_5\text{H}_4(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2)](\text{BF}_4)$ ($n = 0, 2$), complejos heterobimetálicos de Au(I)/Ru(II) con ligandos carbenos *N*-heterocíclicos [81,82], compuestos heterobimetálicos Pt(II)/Au(I) con ligandos dipiridil-fosfina [83], compuestos basados en Ti(IV) análogos al dicloruro de titanoceno como los complejos $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Me}(\mu\text{-mba})\text{Au}^{\text{I}}(\text{NHC})]$, $[\text{Ti}^{\text{IV}}\text{Cl}_2\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\kappa\text{-}(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}_2(\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2)]\cdot 2\text{THF}$ ($\text{M} = \text{Pd}$, $n = 0, 2$ y 3 ; $\text{M} = \text{Pt}$, $n = 0, 2$ y 3), $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Me}(\mu\text{-mba})\text{Au}^{\text{I}}(\text{PR}_3)]$, $[\text{Ti}^{\text{IV}}(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2\{\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{PPh}_2\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}\}_2]$ y $[[\text{Ti}^{\text{IV}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\mu\text{-}\eta^5:\kappa^1\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)\text{Cl}_2\text{Au}^{\text{I}}](\text{PF}_6)]$ [84–88], complejos heteronucleares de Au(I) análogos a la auranofina, como los compuestos dinucleares con ligandos derivados de ferroceno del tipo Au(I)/Fe(II) con ligandos ferrocenil-amida fosfina $\text{PPh}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOFc}$ (Fc = grupo ferrocenil ferroceno) de fórmula $[\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{PPh}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOFc})]$, o los complejos $[\text{Au}^{\text{I}}(\text{FcCO}\text{-triptofano}\text{-OMe})(\text{PR}_3)]$ y $[\text{Au}^{\text{I}}(\text{FcCO}\text{-prolinamida})(\text{PR}_3)]$ [89,90]. Cabe destacar, que en todos estos compuestos se observó un incremento en la actividad antitumoral en comparación a los respectivos complejos homonucleares.

Un derivado de ferroceno que ha sido empleado en un principio con fines catalíticos, es el 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, dppf. En los últimos años, este fragmento organometálico ha sido empleado como coligando en el diseño de potenciales metalofármacos heterobimetálicos con propiedades anticancerígenas. Por ejemplo, el complejo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{L})(\mu^2\text{-}\eta^2\text{-CS}_3)\text{Pd}^{\text{II}}(\text{dppf})](\text{PF}_6)$, (donde HL = 5-metoxi-1,3-bis(1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzeno) mostró una citotoxicidad mayor que el cisplatino y la auranofina sobre varias líneas de células cancerígenas humanas, y además, mostró citotoxicidad sobre líneas celulares sensibles y resistentes al cisplatino [91].

El intento de reemplazar el uso clínico del fármaco cisplatino, ha llevado al diseño y evaluación de nuevos compuestos de Pt(II) con ligandos ferrocenil derivados. Estudios han demostrado que compuestos del tipo Pt(II)-dppf exhiben actividad antineoplásica y antimicrobiana [92,93]. Este tipo de compuestos incluyen en una misma entidad el fragmento *cis*-Pt(II) que presenta una gran afinidad por el ADN [94], un ligando ferrocenil derivado que genera comúnmente aumento en la actividad antiproliferativa, y coligandos difosfinas que son químicamente similares al 1,2-bis(difenilfosfino)-etano (dppe) cuyos compuestos han mostrado una actividad antitumoral prometedora [92]. En base a este antecedente, Mello y col. sintetizaron el complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{dppf})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$ el

cual mostró una gran afinidad por el ADN, pudiendo ser considerado como un potencial compuesto anticancerígeno [95].

Cabe destacar que al inicio de este Trabajo de tesis, no se habían reportado estudios sobre la potencialidad tripanosomicida de compuestos que incluyen el fragmento organometálico $\{M(dppf)\}$ ($M = Pd$ o Pt).

2.2 PROPUESTA

En base a todo lo expuesto, en este Trabajo de tesis se pretende desarrollar tres series de complejos organometálicos que incluyen ligandos bioactivos:

1. Complejos que incluyen el fragmento Ru(II)-ciclopentadienilo y dos tipos de ligandos bioactivos: tiosemicarbazonas bidentadas derivadas del 5-nitrofuraldehído y Clotrimazol.
2. Complejos que incluyen el fragmento Re(I)-tricarbonilo y tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofuraldehído.
3. Complejos heterobimetálicos que incluyen el fragmento $M(II)$ -1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno ($M = Pd$ o Pt) y dos tipos de ligandos bioactivos: *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) y tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofuraldehído.

2.2.1 Objetivos generales y específicos.

2.2.1.1 Objetivo general: El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de nuevos compuestos bioorganometálicos como potenciales herramientas terapéuticas para el tratamiento de las tripanosomiasis americana y africana humana. Si bien el grupo de investigación trabaja hace años en Química Inorgánica Medicinal desarrollando compuestos metálicos con ligandos bioactivos contra *T. cruzi* para obtener compuestos con actividad incrementada y perfil farmacológico mejorado, es objetivo general de la propuesta actual profundizar los trabajos ya iniciados previamente en Química Organometálica. Se pretende explorar las potencialidades de ésta para el desarrollo de compuestos metálicos tripanosomicidas y generar capacidades en el trabajo en Química Organometálica.

2.2.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar exhaustivamente por diferentes técnicas nuevos compuestos de Ru(II)-ciclopentadienilo ($\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}$), Re(I)-tricarbonilo (*fac*- $\{\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\}$) y M(II)-1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno ($\{\text{M}^{\text{II}}(\text{dppf})\}$), M = Pd o Pt), que incluyan los ligandos bioactivos seleccionados (tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído, clotrimazol y *N*-óxido de 2 mercaptopiridina).
- Estudiar propiedades fisicoquímicas de potencial interés biológico de los compuestos desarrollados: lipofilia, estabilidad, comportamiento electroquímico.
- Evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos contra *T. cruzi* y *T. brucei* y su citotoxicidad en células mamíferas modelo.
- Incursionar en la comprensión del probable mecanismo de acción de aquellos compuestos que resulten bioactivos. Se estudiará el ADN como blanco potencial para todos los compuestos además de la formación intraparasitaria de radicales libres tóxicos para el parásito, la inhibición de la biosíntesis de esteroides o la inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa, según corresponda.
- Estudiar la probable interacción de los complejos con albúmina sérica bovina como modelo de proteína transportadora de fármacos.
- Realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos para los compuestos objeto de esta propuesta y los obtenidos anteriormente para compuestos de coordinación clásicos y organometálicos de estos centros metálicos con los mismos ligandos bioactivos.

2.3 BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Farrell, Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic, Second Ed., Oxford, (2003), 809–840.

- [2] K.E. Kinnamon, E.A. Steck, D.S. Rane, Activity of antitumor drugs against African Trypanosomes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15 (1979) 157–160.
- [3] J. Benítez, L. Guggeri, I. Tomaz, J.C. Pessoa, V. Moreno, J. Lorenzo, F.X. Avilés, B. Garat, D. Gambino, A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agent, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 1386–1394.
- [4] B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones, *Biol. Trace Elem. Res.*, 153 (2013) 371–381.
- [5] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sanchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 1534–1543.
- [6] F.J. Giles, P.M. Fracasso, H.M. Kantarjian, J.E. Cortes, R.A. Brown, S. Verstovsek, Y. Alvarado, D.A. Thomas, S. Faderl, G. Garcia-Manero, L.P. Wright, T. Samson, A. Cahill, P. Lambert, W. Plunkett, M. Sznol, J.F. DiPersio, V. Gandhi, Phase I and pharmacodynamic study of Triapine®, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia, *Leuk. Res.*, 27 (2003) 1077–1083.
- [7] X. Du, C. Guo, E. Hansell, P.S. Doyle, C.R. Caffrey, T.P. Holler, J.H. McKerrow, F.E. Cohen, Synthesis and structure–activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain, *J. Med. Chem.*, 45 (2002) 2695–2707.
- [8] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faundez, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 4885–4893.
- [9] R.P. Mason, J.L. Holtzman, Mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates, *Biochemistry*, 14 (1975) 1626–1632.
- [10] R.P. Mason, J.L. Holtzman, The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67 (1975) 1267–1274.

- [11] R. Docampo, S. Moreno, A. Stoppani, W. Leon, F.S. Cruz, F. Villalta, R. Muniz, Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*, *Biochem. Pharmacol.*, 30 (1981) 1947–1951.
- [12] J.F. Turrens, Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa, oxidative stress aging dis. - mitochondrial aging neuronal function neurodegener. *Oxidative Metab. Disord. Dis.*, 25 (2004) 211–220.
- [13] C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, L. Otero, D. Gambino, M. González, H. Cerecetto, Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 61 (2005) 2933–2938.
- [14] D. Gambino, L. Otero, J. D. Maya, A. Morello, C. Rigol, G. Barriga, J. Rodriguez, C. Folch, E. Norambuena, M. Gonzalez, C. Olea Azar and H. Cerecetto, Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Med. Chem.*, 4 (2008) 11–17.
- [15] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3322–3331.
- [16] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. Diego Maya, D. Gambino, Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 411–418.
- [17] C. Sarniguet, J. Toloza, M. Cipriani, M. Lapier, M. Vieites, Y. Toledano-Magaña, J. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, V. Moreno, J. Maya, C. Azar, D. Gambino, L. Otero, Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites, *Biol. Trace Elem. Res.*, 159 (2014) 379–392.
- [18] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J.D. Maya, B. Garat, D. Gambino, Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 1033–1043.
- [19] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino, L. Otero,

- Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (2014) 4677–4689.
- [20] J. Mracek, J. Snyder, U. Chavez, J. F. Turrens, A soluble fumarate reductase in *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes, *J. Protozool.*, 38 (1991) 554–558.
- [21] J.F. Turrens, C.L. Newton, L. Zhong, F.R. Hernandez, J. Whitfield, R. Docampo, Mercaptopyridine-*N*-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts, *FEMS Microbiol. Lett.*, 175 (1999) 217–221.
- [22] S. Besteiro, M. Biran, N. Biteau, V. Coustou, T. Baltz, P. Canioni, F. Bringaud, Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 38001–38012.
- [23] V. Coustou, S. Besteiro, L. Rivière, M. Biran, N. Biteau, J.-M. Franconi, M. Boshart, T. Baltz, F. Bringaud, A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 16559–16570.
- [24] P. Michels, F. Bringaud, M. Herman, V. Hannaert, Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids, *Peroxisomes Morphol. Funct. Biog. Disord.*, 1763 (2006) 1463–1477.
- [25] F.R. Opperdoes, A. Markoš, R.F. Steiger, Localization of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of cultured procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 4 (1981) 291–309.
- [26] E. Lohmeier, D.S. Hagen, P. Dickie, J.H. Weiner, Cloning and expression of the fumarate reductase gene of *Escherichia coli*, *Can. J. Biochem.*, 59 (1981) 158–164.
- [27] A. Miura, M. Kameya, H. Arai, M. Ishii, Y. Igarashi, A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of hydrogenobacter thermophilus TK-6, *J. Bacteriol.*, 190 (2008) 7170–7177.
- [28] J. F. Turrens, The enzyme NADH-fumarate reductase in trypanosomatids: a potential target against parasitic diseases, *Mol. Cell. Pharmacol.*, 4 (2012) 117–122.
- [29] A. Boveris, C.M. Hertig, J.F. Turrens, Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 19 (1986) 163–169.

- [30] A. Denicola-Seoane, H. Rubbo, E. Prodanov, J.F. Turrens, Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54 (1992) 43–50.
- [31] M. Vieites, P. Smircich, B. Parajón-Costa, J. Rodríguez, V. Galaz, C. Olea-Azar, L. Otero, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Gómez-Barrio, B. Garat, D. Gambino, Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol *N*-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 (2008) 723–735.
- [32] M. Vieites, P. Smircich, L. Guggeri, E. Marchán, A. Gómez-Barrio, M. Navarro, B. Garat, D. Gambino, Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol *N*-oxide gold(I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp* insight into its mechanism of action, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 1300–1306.
- [33] M. Plempel, K. Bartmann, K. H. Büchel, E. Regel, Experimentelle befunde über ein neues, oral wirksames antimykotikum mit breitem wirkungsspektrum, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 94 (1969) 1356–1364.
- [34] H. Van Den Bossche, G. Willemsens, W. Cools, W.F.J. Lauwers, L. Le Jeune, Biochemical effects of miconazole on fungi II inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*, *Chem. Biol. Interact.*, 21 (1978) 59–78.
- [35] R.J. Rodriguez, L.W. Parks, Structural and physiological features of sterols necessary to satisfy bulk membrane and sparking requirements in yeast sterol auxotrophs, *Arch. Biochem. Biophys.*, 225 (1983) 861–871.
- [36] D.H. Beach, L.J. Goad, G.G. Holz, Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania promastigotes*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 31 (1988) 149–162.
- [37] D.T. Hart, W.J. Lauwers, G. Willemsens, H. Vanden Bossche, F.R. Opperdoes, Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33 (1989) 123–134.
- [38] L.J. Goad, R.L. Berens, J.J. Marr, D.H. Beach, G.G. Holz, The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 32 (1989) 179–189.

- [39] R.E. McCabe, J.S. Remington, F.G. Araujo, *in vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma Cruzi*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (1986) 280–284.
- [40] J. Urbina, G. Payares, L. Contreras, A. Liendo, C. Sanoja, J. Molina, M. Piras, R. Piras, N. Perez, P. Wincker, D. Loebenberg, Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1998) 1771–1777.
- [41] J. Molina, O. Martins-Filho, Z. Brener, A.J. Romanha, D. Loebenberg, J.A. Urbina, Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (2000) 150–155.
- [42] J.A. Urbina, G. Payares, C. Sanoja, R. Lira, A.J. Romanha, *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21 (2003) 27–38.
- [43] I. Molina, J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, A. Blanco-Grau, A. Sánchez-Montalvá, X. Vidal, A. Pahissa, Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease, *N. Engl. J. Med.*, 370 (2014) 1899–1908.
- [44] C.A. Morillo, H. Waskin, S. Sosa-Estani, M. del Carmen Bangher, C. Cuneo, R. Milesi, M. Mallagray, W. Apt, J. Beloscar, J. Gascon, I. Molina, L.E. Echeverria, H. Colombo, J.A. Perez-Molina, F. Wyss, B. Meeks, L.R. Bonilla, P. Gao, B. Wei, M. McCarthy, Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. Cruzi* carriers: the stop-Chagas trial, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 69 (2017) 939–947.
- [45] C.W. Roberts, R. McLeod, D.W. Rice, M. Ginger, M.L. Chance, L.J. Goad, Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 126 (2003) 129–142.
- [46] M.G. Pereira, E.S. Nakayasu, C. Sant'Anna, N.N.T. De Cicco, G.C. Atella, W. de Souza, I.C. Almeida, N. Cunha-e-Silva, *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions, *PLOS ONE*, 6 (2011) e22359.
- [47] M.B. Martin, J.S. Grimley, J.C. Lewis, H.T. Heath, B.N. Bailey, H. Kendrick, V. Yardley, A. Caldera, R. Lira, J.A. Urbina, S.N.J. Moreno, R. Docampo, S.L. Croft,

- E. Oldfield, Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy, *J. Med. Chem.*, 44 (2001) 909–916.
- [48] K. Lizardi, J.A. Urbina, W. de Souza, Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (1990) 2097–2105.
- [49] B.M. Joubert, F.S. Buckner, S.P.T. Matsuda, Trypanosome and animal lanosterol synthases use different catalytic motifs, *Org. Lett.*, 3 (2001) 1957–1960.
- [50] F.S. Buckner, J.H. Griffin, A.J. Wilson, W.C. Van Voorhis, Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 1210–1215.
- [51] J.A. Urbina, J.L. Concepcion, A. Montalvetti, J.B. Rodriguez, R. Docampo, Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 (2003) 2047–2050.
- [52] J.A. Urbina, R. Lira, G. Visbal, J. Bartrolí, *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (2000) 2498–2502.
- [53] S.L. Croft, Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (1999) 215–220.
- [54] R.A. Sanchez-Delgado, K. Lizardi, L. Rincon, J.A. Urbina, A.J. Hubert, A.N. Noels, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases 1 enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$, *J. Med. Chem.*, 36 (1993) 2041–2043.
- [55] R.A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, K. Lizardi, R. Atencio, M. Capparelli, F. Vargas, J.A. Urbina, A. Bouillez, A.F. Noels, D. Masi, Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases: synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chim. Acta*, 275–276 (1998) 528–540.
- [56] M. Navarro, T. Lehmann, E.J. Cisneros-Fajardo, A. Fuentes, R.A. Sánchez-Delgado, P. Silva, J.A. Urbina, Toward a novel metal-based chemotherapy against

- tropical diseases: synthesis and characterization of new Ru(II) and Ru(III) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Polyhedron*, 19 (2000) 2319–2325.
- [57] A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sánchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, R.A. Maldonado, R.A. Sánchez-Delgado, Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 3867–3877.
- [58] E. Iniguez, A. Sánchez, M.A. Vasquez, A. Martínez, J. Olivas, A. Sattler, R.A. Sánchez-Delgado, R.A. Maldonado, Metal–drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 18 (2013) 779–790.
- [59] E. Iniguez, A. Varela-Ramirez, A. Martínez, C.L. Torres, R.A. Sánchez-Delgado, R.A. Maldonado, Ruthenium-clotrimazole complex has significant efficacy in the murine model of cutaneous leishmaniasis, *Acta Trop.*, 164 (2016) 402–410.
- [60] B. Demoro, R. de Almeida, F. Marques, C.P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodriguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino, A.I. Tomaz, Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism, *Dalton Trans.*, 42 (2013) 7131–7146.
- [61] D.N. Akbayeva, L. Gonsalvi, W. Oberhauser, M. Peruzzini, F. Vizza, P. Bruggeller, A. Romerosa, G. Sava, A. Bergamo, Synthesis, catalytic properties and biological activity of new water soluble ruthenium cyclopentadienyl PTA complexes $[(C_5R_5)RuCl(PTA)_2]$ (R = H, Me; PTA = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane), *Chem. Commun.*, (2003) 264–265.
- [62] E. Meggers, G. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. Mulcahy, N. Pagano, D. Williams, Exploring chemical space with organometallics: ruthenium complexes as protein kinase inhibitors, *Synlett*, 8 (2007) 1177–1189.
- [63] M. Helena Garcia, T.S. Morais, P. Florindo, M. Piedade, V. Moreno, C. Ciudad, V. Noe, Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes with heteroaromatic ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 354–361.
- [64] V. Moreno, J. Lorenzo, F.X. Aviles, M.H. Garcia, J.P. Ribeiro, T.S. Morais, P. Florindo, M.P. Robalo, Studies of the antiproliferative activity of ruthenium (II)

- cyclopentadienyl-derived complexes with nitrogen coordinated ligands, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010 (2010) 11-22.
- [65] V. Moreno, M. Font-Bardia, T. Calvet, J. Lorenzo, F.X. Avilés, M.H. Garcia, T.S. Morais, A. Valente, M.P. Robalo, DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 241–249.
- [66] T.S. Morais, F. Santos, L. Côrte-Real, F. Marques, M.P. Robalo, P.J.A. Madeira, M.H. Garcia, Biological activity and cellular uptake of $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)(\text{Me}_2\text{bpy})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ complex, *J. Inorg. Biochem.*, 122 (2013) 8–17.
- [67] I. Machado, S. Fernández, L. Becco, B. Garat, J.S. Gancheff, A. Rey, D. Gambino, New fac-tricarbonyl rhenium(I) semicarbazone complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation, *J. Coord. Chem.*, 67 (2014) 1835–1850.
- [68] R. Arancibia, A.H. Klahn, G.E. Buono-Core, E. Gutierrez-Puebla, A. Monge, M.E. Medina, C. Olea-Azar, J.D. Maya, F. Godoy, Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of ferrocenyl and cyrhetrenyl imines derived from 5-nitrofurane, *J. Organomet. Chem.*, 696 (2011) 3238–3244.
- [69] R. Arancibia, A. Hugo Klahn, G.E. Buono-Core, D. Contreras, G. Barriga, C. Olea-Azar, M. Lapier, J.D. Maya, A. Ibañez, M.T. Garland, Organometallic Schiff bases derived from 5-nitrothiophene and 5-nitrofurane: synthesis, crystallographic, electrochemical, ESR and anti-*Trypanosoma cruzi* studies, *J. Organomet. Chem.*, 743 (2013) 49–54.
- [70] R.G. Ridley, Malaria: Dissecting chloroquine resistance, *Curr. Biol.*, 8 (1998) R346–R349.
- [71] C.P. Sanchez, P. Horrocks, M. Lanzer, Is the putative chloroquine resistance mediator CG2 the Na^+/H^+ exchanger of plasmodium falciparum?, *Cell*, 92 (1998) 601–602.
- [72] C. Biot, G. Glorian, L.A. Maciejewski, J.S. Brocard, O. Domarle, G. Blampain, P. Millet, A.J. Georges, H. Abessolo, D. Dive, J. Lebib, Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene–chloroquine analogue, *J. Med. Chem.*, 40 (1997) 3715–3718.
- [73] L. Delhaes, C. Biot, L. Berry, P. Delcourt, L. Maciejewski, D. Camus, J. Brocard, D. Dive, Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity, *ChemBioChem*, 3 (2002) 418–423.

- [74] L. Delhaes, H. Abessolo, C. Biot, L. Berry, P. Delcourt, L. Maciejewski, J. Brocard, D. Camus, D. Dive, *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites, *Parasitol. Res.*, 87 (2001) 239–244.
- [75] O. Domarle, G. Blampain, H. Agnani, T. Nzadiyabi, J. Lebib, J. Brocard, L. Maciejewski, C. Biot, A.J. Georges, P. Millet, *In Vitro* antimalarial activity of a new organometallic analog, ferrocene-chloroquine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1998) 540–544.
- [76] C. Biot, D. Taramelli, I. Forfar-Bares, L.A. Maciejewski, M. Boyce, G. Nowogrocki, J.S. Brocard, N. Basilico, P. Olliaro, T.J. Egan, Insights into the mechanism of action of ferroquine relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity, *Mol. Pharm.*, 2 (2005) 185–193.
- [77] S. Pomel, C. Biot, C. Bories, P.M. Loiseau, Antiprotozoal activity of ferroquine, *Parasitol. Res.*, 112 (2013) 665–669.
- [78] A. Velásquez, A.I. Francisco, A. Kohatsu, F.A. de J. Silva, D.F. Rodrigues, R.G. da Teixeira, B.G. Chiari, M. de Almeida, V. Isaac, M.D. Vargas, R. Cicarelli, Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24 (2014) 1707–1710.
- [79] V. Fernández-Moreira, C. Gimeno, Heterobimetallic complexes for theranostic applications, *Chem. Eur. J.*, 24 (2018) 3345–3353.
- [80] M. Berardini, T.J. Emge, J.G. Brennan, Heterobimetallic platinum-titanium complexes: potential anticancer drugs, *Inorg. Chem.*, 32 (1993) 2724–2728.
- [81] F. Pelletier, V. Comte, A. Massard, M. Wenzel, S. Toulot, P. Richard, M. Picquet, P. Le Gendre, O. Zava, F. Edafe, A. Casini, P.J. Dyson, Development of bimetallic titanocene–ruthenium–arene complexes as anticancer agents: relationships between structural and biological properties, *J. Med. Chem.*, 53 (2010) 6923–6933.
- [82] B. Bertrand, A. Citta, I.L. Franken, M. Picquet, A. Folda, V. Scalcon, M.P. Rigobello, P. Le Gendre, A. Casini, E. Bodio, Gold(I) NHC-based homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, characterization and evaluation as potential anticancer agents, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 20 (2015) 1005–1020.
- [83] M. Wenzel, E. Bigaeva, P. Richard, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini, E. Bodio, New heteronuclear gold(I)–platinum(II) complexes with cytotoxic properties: are two metals better than one?, *J. Inorg. Biochem.*, 141 (2014) 10–16.

- [84] Y.F. Mui, J. Fernández-Gallardo, B.T. Elie, A. Gubran, I. Maluenda, M. Sanaú, O. Navarro, M. Contel, Titanocene–gold complexes containing N-heterocyclic carbene ligands inhibit growth of prostate, renal, and colon cancers *in vitro*, *Organometallics*, 35 (2016) 1218–1227.
- [85] J. Fernandez-Gallardo, B.T. Elie, T. Sadhukha, S. Prabha, M. Sanau, S.A. Rotenberg, J.W. Ramos, M. Contel, Heterometallic titanium-gold complexes inhibit renal cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *Chem. Sci.*, 6 (2015) 5269–5283.
- [86] J.F. González-Pantoja, M. Stern, A.A. Jarzecki, E. Royo, E. Robles-Escajeda, A. Varela-Ramírez, R.J. Aguilera, M. Contel, Titanocene–phosphine derivatives as precursors to cytotoxic heterometallic TiAu₂ and TiM (M = Pd, Pt) compounds studies of their interactions with DNA, *Inorg. Chem.*, 50 (2011) 11099–11110.
- [87] J. Fernández-Gallardo, B.T. Elie, F.J. Sulzmaier, M. Sanaú, J.W. Ramos, M. Contel, Organometallic titanocene–gold compounds as potential chemotherapeutics in renal cancer study of their protein kinase inhibitory properties, *Organometallics*, 33 (2014) 6669–6681.
- [88] M. Wenzel, B. Bertrand, M.-J. Eymin, V. Comte, J.A. Harvey, P. Richard, M. Groessl, O. Zava, H. Amrouche, P.D. Harvey, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini, Multinuclear cytotoxic metallodrugs: physicochemical characterization and biological properties of novel heteronuclear gold–titanium complexes, *Inorg. Chem.*, 50 (2011) 9472–9480.
- [89] H. Goitia, Y. Nieto, M.D. Villacampa, C. Kasper, A. Laguna, M.C. Gimeno, Antitumoral gold and silver complexes with ferrocenyl-amide phosphines, *Organometallics*, 32 (2013) 6069–6078.
- [90] M.C. Gimeno, H. Goitia, A. Laguna, M.E. Luque, M.D. Villacampa, C. Sepúlveda, M. Meireles, Conjugates of ferrocene with biological compounds Coordination to gold complexes and antitumoral properties, *J. Inorg. Biochem*, 105 (2011) 1373–1382.
- [91] L. Tabrizi, H. Chiniforoshan, The cytotoxicity and mechanism of action of new multinuclear Scaffold Au^{III}, Pd^{II} pincer complexes containing a bis(diphenylphosphino) ferrocene/non-ferrocene ligand, *Dalton Trans.*, 46 (2017) 14164–14173.
- [92] V. Scarcia, A. Furlani, B. Longato, B. Corain, G. Pilloni, Heteropolymetallic complexes of 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf): solvolytic behavior and cytostatic properties towards the KB cell-line of dppf and 1,2-

- bis(diphenylphosphino)ethane cis-complexes of Pt(II) and Pd(II), *Inorg. Chim. Acta*, 153 (1988) 67–70.
- [93] R. Mason, K. McGrouther, P. Ranatunge-Bandarage, B. Robinson, J. Simpson, Toxicology and antitumour activity of ferrocenylamines and platinum derivatives, *Appl. Organomet. Chem.*, 13 (1999) 163–174.
- [94] B. Longato, B. Corain, G.M. Bonora, G. Pilloni, Reactivity of novel *cis*-platinum(II) complexes with nucleosides, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 75–79.
- [95] L.D. Mello, E.S. Ribeiro, L.T. Kubota, S. Elmroth, R. Pereira, Electrochemical and spectroscopic evidences of the interaction between DNA and Pt(II)(dppf)-complex, *BioMetals*, 22 (2009) 385–392.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Contenido

3.1 Síntesis	107
3.1.1 Síntesis de precursores	107
3.1.1.1 Síntesis de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$	107
3.1.1.2 Síntesis de $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$	107
3.1.1.3 Síntesis de $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ (M = Pd o Pt)	107
3.1.2 Síntesis de los compuestos $\{\text{RuCp}\}$	108
3.1.2.1 Síntesis de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$	108
3.1.2.2 Síntesis de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$	109
3.1.3 Síntesis de los compuestos <i>fac</i> - $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$	110
3.1.3.1 Síntesis de <i>fac</i> - $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$	110
3.1.4 Síntesis de los compuestos $\{\text{M}(\text{dppf})\}$ (M = Pd o Pt)	110
3.1.4.1 Síntesis de $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	111
3.1.4.2 Síntesis de $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	112
3.2 Caracterización	112
3.2.1 Caracterización en estado sólido	112
3.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos	112
3.2.1.2 Espectroscopía infrarroja	112
3.2.1.3 Difracción de rayos X en monocristal	113
3.2.2 Caracterización en solución	114
3.2.2.1 Conductimetría	114

3.2.2.2	Espectrometría de masa	115
3.2.2.3	Resonancia magnética nuclear	115
3.2.2.4	Voltametría cíclica	116
3.2.3	Lipofilia	118
3.3	Actividad biológica	118
3.3.1	Actividad <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
3.3.1.1	Inhibición del crecimiento de epimastigotas de la cepa Y	119
3.3.1.2	Inhibición del crecimiento de epimastigotas de la cepa Dm28c	120
3.3.1.3	Inhibición del crecimiento de tripomastigotas de la cepa Dm28c	120
3.3.2	Actividad <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma brucei</i>	121
3.3.3	Citotoxicidad inespecífica <i>in vitro</i> en células mamíferas modelo	122
3.3.3.1	Citotoxicidad en macrófagos murinos J774	122
3.3.3.2	Citotoxicidad en células endoteliales humanas EA.hy926	123
3.3.3.3	Citotoxicidad en células Vero epiteliales (ATCC CCL81)	124
3.4	Mecanismo de acción	125
3.4.1	Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana en <i>T. cruzi</i>	125
3.4.2	Generación de especies radicalarias en <i>T. cruzi</i>	126
3.4.3	Efecto sobre el consumo de oxígeno de <i>T. cruzi</i>	127
3.4.4	Inhibición de la actividad enzimática de NADH-fumarato reductasa de <i>T. cruzi</i>	127
3.4.5	Estudio de cambios redox intracelulares en <i>T. brucei</i>	128
3.4.6	Interacción con ADN	128
3.4.6.1	Estudios de interacción con ADN por medidas de absorción atómica	128
3.4.6.2	Estudios de interacción con ADN por medidas de fluorescencia	129

3.4.6.3	Estudios de interacción con ADN por medidas de dicroísmo circular	131
3.5	Interacción con la proteína albúmina sérica bovina (BSA)	132
3.5.1	Estudios de interacción con BSA por medidas de fluorescencia	132
3.5.2	Estudios de interacción con BSA por medidas de dicroísmo circular	134
3.6	Bibliografía	134

3.1 Síntesis

3.1.1 Síntesis de precursores

3.1.1.1 Síntesis de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$

La síntesis del precursor de rutenio se realizó siguiendo un procedimiento experimental previamente descrito [1]. Se disolvieron 2,00 g (10 mmol) de RuCl_3 en 80 mL de etanol absoluto, y sobre esta solución se añadieron 11,63 g (44 mmol) de trifenilfosina. La mezcla se calentó a reflujo, bajo atmósfera de dinitrógeno, y se añadieron 12 mL de ciclopentadienilo previamente destilado. Luego de dos horas de reflujo, se observó la precipitación de cristales anaranjados, los cuales se filtraron en atmósfera de N_2 y se lavaron con porciones sucesivas de etanol frío, agua destilada y una mezcla etanol/éter de petróleo (1:1). El sólido obtenido fue secado a vacío.

3.1.1.2 Síntesis de $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$

La síntesis del compuesto precursor de renio se realizó según un procedimiento previamente reportado [2]. Se hizo reaccionar en atmósfera de N_2 , 1,00 g (1,5 mmol) de $[\text{Re}_2(\text{CO})_{10}]$ y 0,12 mL (1,6 mmol) de Br_2 en 50 mL de hexano. La solución se agitó hasta observar la desaparición del color ámbar característico del Br_2 . El sólido obtenido se separó por rotaevaporación y se purificó mediante sublimación a 90°C a presión reducida.

3.1.1.3 Síntesis de $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ ($\text{M} = \text{Pd}$ o Pt)

Los precursores $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]\cdot\text{CHCl}_3$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]\cdot\text{CHCl}_3$ se obtuvieron a partir de los complejos $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$, respectivamente. Los cuatro complejos fueron obtenidos según técnicas previamente descritas [3].

- a) $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$: Se disolvieron 0,25 g (1,41 mmol) de PdCl_2 en 5 mL de DMSO, y la suspensión obtenida se agitó en caliente ($\sim 100^\circ\text{C}$) hasta obtener una solución homogénea. La agitación se mantuvo hasta alcanzar la temperatura ambiente,

observándose inmediatamente la precipitación de un sólido amarillo el cual fue lavado con dos porciones de éter anhidro.

- b) $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$: Se disolvieron 0,625 g (1,50 mmol) de $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ en 5 mL de agua destilada, y sobre esta solución se añadieron 0,3 mL de DMSO. La solución fue agitada a temperatura ambiente hasta observar la precipitación de un sólido blanco. Este sólido se lavó con porciones sucesivas de agua destilada, etanol y éter anhidro.

Obtenidos ambos complejos $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$, se sintetizaron los compuestos $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]\cdot\text{CHCl}_3$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]\cdot\text{CHCl}_3$ siguiendo métodos experimentales previamente descritos [4]. Se disolvieron cantidades equimolares del complejo $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$ (60 mg; 0,18 mmol de $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$, y 188 mg; 0,44 mmol de $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsO})_2]$) y el ligando dppf (Pd(II): 100 mg, Pt(II): 246 mg) en 15 mL de cloroformo, y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. Posteriormente, se evaporó el solvente hasta un volumen aproximado de 5 mL, observándose la precipitación de un sólido de color rojo para el complejo de Pd(II) y amarillo para el complejo de Pt(II), que fue separado por centrifugación y lavado con dos porciones de éter anhidro. Los sólidos obtenidos se secaron al aire durante un día.

3.1.2 Síntesis de los compuestos $\{\text{RuCp}\}$

3.1.2.1 Síntesis de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$

El complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$, que será codificado como RuCpCTZ , se sintetizó a partir de la reacción entre el precursor $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$ y el ligando Clotrimazol (CTZ) (figura 3.1). Experimentalmente, se disolvieron 0,32 g (0,50 mmol) del precursor y 0,12 g (0,45 mmol) de AgCF_3SO_3 en 10 mL de diclorometano seco y destilado. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos, para posteriormente añadir 0,17 g (0,50 mmol) del ligando CTZ. La solución resultante se agitó nuevamente durante 2 horas. El precipitado formado, correspondiente a AgCl , se separó por filtración bajo N_2 , y el sobrenadante se evaporó a vacío. Se obtuvo un sólido color amarillo, el cual se purificó por columna de sílica gel GF254 utilizando como fase móvil éter de petróleo/acetona (1:1).

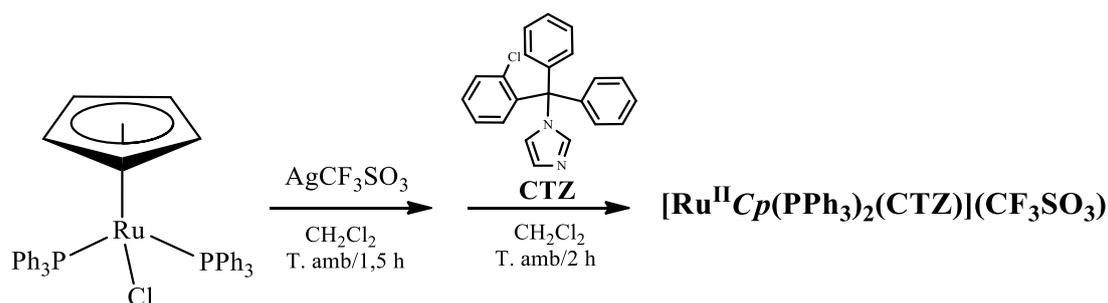


Figura 3.1: Esquema de síntesis del compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$.

3.1.2.2 Síntesis de los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$

La síntesis de los tres complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$, codificados como RuCpL , fue realizada siguiendo el mismo procedimiento experimental (figura 3.2). Se disolvieron 0,320 g (0,50 mmol) del precursor $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$ y 0,50 mmol del ligando tiosemicarbazona (HL2 = 0,113 g; HL3 = 0,120 g y HL4 = 0,145 g) en 10 mL de diclorometano seco y destilado. A esta mezcla se añadieron 6 mL de metanol y se mantuvo el sistema en condiciones de reflujo durante 24 horas en atmósfera de N_2 . La solución obtenida se rotaevaporó a sequedad, y el sólido obtenido fue purificado por separación en columna de sílica gel, y se utilizó como fase móvil diclorometano seco y destilado. El eluido se rotaevaporó a sequedad, y se obtuvo en todos los casos un sólido color violeta que fue recristalizado en una mezcla diclorometano: hexano (1:2) y guardado en heladera a $\sim 4^\circ\text{C}$.

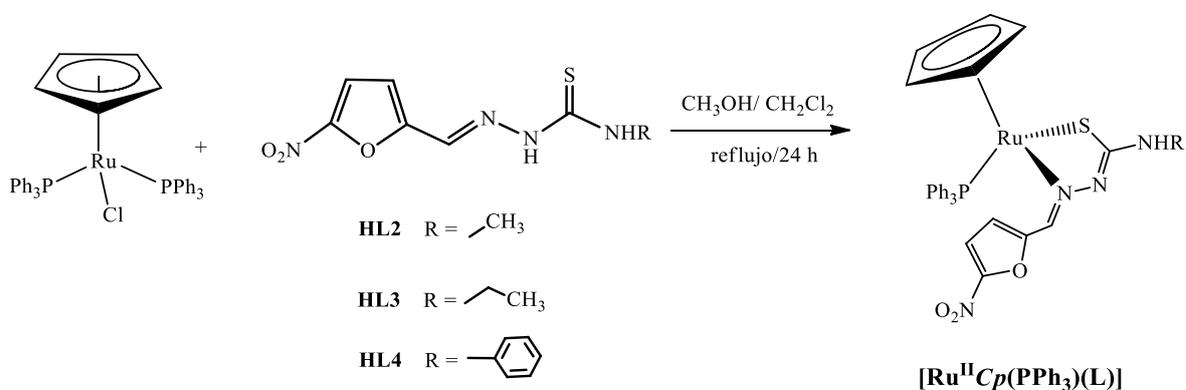


Figura 3.2: Esquema de síntesis de los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$.

3.1.3 Síntesis de los compuestos *fac*-{Re(CO)₃}

3.1.3.1 Síntesis de los compuestos *fac*-[Re^I(CO)₃Br(HL)]

El esquema de síntesis de los tres complejos codificados Re-(CO)₃-HL se muestra en la figura 3.3. En condiciones de reflujo, se disolvieron 0,108 mmol del ligando HL (23 mg de HL1, 28 mg de HL4, y 22 mg de HL5), y sobre esta solución se añadieron 44 mg (0,108 mmol) del precursor [ReBr(CO)₅] previamente disueltos en 5 mL de tolueno en caliente. La mezcla de ambos reactivos se mantuvo en condiciones de reflujo durante 24 horas. Luego de este tiempo, se observó, en todos los casos, la precipitación de un sólido color café, que fue separado por centrifugación y lavado con dos porciones de tolueno. Los compuestos obtenidos se secaron a vacío durante 2 a 3 días.

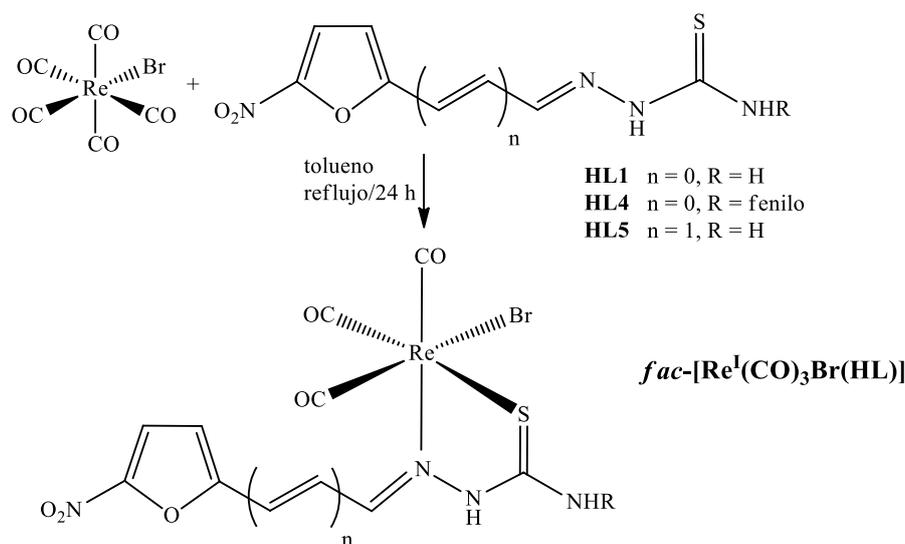


Figura 3.3: Esquema de síntesis de los compuestos *fac*-[Re^I(CO)₃Br(HL)].

3.1.4 Síntesis de los compuestos {M(dppf)} (M = Pd o Pt)

La síntesis de todos los complejos {M(dppf)} se realizó siguiendo el mismo procedimiento experimental que se resume en la figura 3.4.

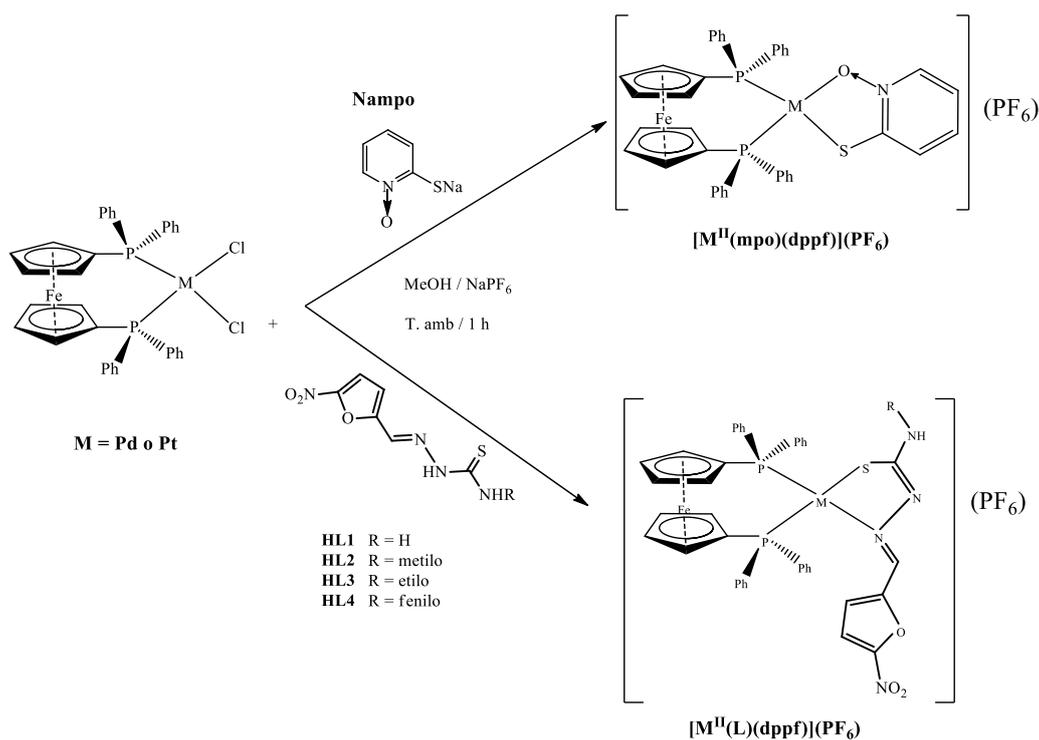


Figura 3.4: Esquema de síntesis de los complejos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[M^{II}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ ($M = \text{Pd}$ o Pt).

3.1.4.1 Síntesis de los compuestos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$, $M = \text{Pd}$ o Pt

La síntesis de los dos complejos M-dppf-mpo se realizó disolviendo 50 mg del precursor $[M^{II}\text{Cl}_2(\text{dppf})] \cdot \text{CHCl}_3$ en 10 mL de metanol (0,059 mmol de $[\text{Pd}^{II}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$; 0,053 mmol de $[\text{Pt}^{II}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$), y sobre esta solución se agregaron cantidades equimolares de la sal Nampo (sal sódica de *N*-óxido de 2-mercaptopiridina) previamente disueltos en 5 mL de metanol (8,8 mg para el compuesto de Pd(II) y 7,9 mg para el de Pt(II)). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y, posteriormente, se evaporó el solvente hasta obtener un volumen aproximado de 5 mL. Se enfrió a temperatura ambiente, se agregó NaPF_6 disuelto en el mínimo volumen de metanol (9,9 mg; 0,059 mmol para el compuesto de Pd(II) y 8,9 mg; 0,053 mmol para el compuesto de Pt(II)). La solución obtenida se mantuvo 24 horas en heladera ($\sim 4^\circ\text{C}$), y, posteriormente, se observó la precipitación de un sólido, color marrón para el complejo de paladio y amarillo para el complejo de platino, que fue luego recrystalizado mediante difusión lenta líquido/líquido diclorometano:hexano. Por este procedimiento se obtuvieron monocristales de ambos compuestos.

3.1.4.2 Síntesis de los compuestos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$, M = Pd o Pt

La síntesis de los ocho complejos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$, codificados M-dppf-L, se realizó disolviendo 50 mg del precursor $[M^{II}Cl_2(dppf)]$ (0,059 mmol de $[Pd^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$ o 0,053 mmol de $[Pt^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$) en 10 mL de metanol. Sobre esta solución se agregaron cantidades equimolares del ligando HL (complejos de Pd^{II} : 12,6 mg de HL1, 13,4 mg de HL2, 14,3 mg de HL3 y 17,2 mg de HL4; complejos de Pt^{II} : 11,3 mg de HL1, 12,1 mg de HL2, 12,8 mg de HL3 y 15,4 mg de HL4) que fueron previamente disueltos en 5 mL de metanol. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y, posteriormente, se evaporó el solvente hasta un volumen aproximado de 5 mL. Se añadieron 46 mg (0,27 mmol) de $NaPF_6$ disuelto en el mínimo volumen de metanol, y luego de 24 horas en heladera ($\sim 4^\circ C$) se observó la precipitación de los compuestos. Los sólidos obtenidos se recrystalizaron mediante difusión lenta líquido/líquido diclorometano:hexano, obteniéndose monocristales de los ocho compuestos.

3.2 Caracterización

3.2.1 Caracterización en estado sólido

3.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por análisis elemental de C, N, H y S. Los análisis fueron realizados en un analizador Thermo Scientific Flash 2000 con un procesador de datos Eager 200, perteneciente a la Facultad de Química, UdelaR. Los resultados obtenidos por esta técnica permitieron confirmar las fórmulas propuestas para cada complejo.

3.2.1.2 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis que permite identificar energías vibracionales de enlace de las moléculas estudiadas [5]. Los espectros de infrarrojo permitieron identificar la presencia de los ligandos en los complejos sintetizados. La estrategia de análisis consistió en identificar en los espectros de infrarrojo de cada ligando libre las bandas de vibración características, y, posteriormente, identificar estas mismas en los espectros de los complejos sintetizados. Considerando corrimientos en las frecuencias de vibración de alguna de estas bandas, se pudo identificar los sitios y modos de coordinación del ligando hacia cada centro metálico. Los espectros de infrarrojo fueron medidos en un rango entre 4000 y 400 cm^{-1} en pastillas de KBr utilizando un equipo Shimadzu IRPrestige-21 de Facultad de Química, UdelaR.

3.2.1.3 Difracción de rayos X en monocristal

La cristalografía de rayos X es una técnica de difracción que brinda una descripción detallada de la disposición espacial de los átomos en una molécula, la cual se realiza en un difractómetro de rayos X de monocristal. La emisión de los rayos X se genera en el interior del circuito del tubo de rayos X del difractómetro, donde la emisión de electrones de alta energía (efectuado en el cátodo) incide directamente sobre el ánodo metálico del equipo (que puede ser de cobre o molibdeno), provocando la remoción de electrones en las capas internas de estos átomos metálicos. La vacancia electrónica generada en la capa más próxima al núcleo (capa K), es luego sustituida por un electrón ubicado en la capa L (proceso denominado línea K_{α}). Este proceso provoca la liberación de fotones de alta energía llamados rayos X. La energía de los rayos X generados dependerá del tipo de ánodo utilizado en cada medida (cada átomo posee un espectro de rayos X propio y característico), siendo: $\text{MoK}_{\alpha} = 0,7107 \text{ \AA}$ y $\text{CuK}_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$.

La difracción se produce cuando la radiación generada (por el átomo de Cu o Mo) pasa a través de una estructura periódica, con características que se repiten regular e infinitamente en el espacio (denominados planos de difracción). La distancia con la que se repite esta periodicidad es aproximadamente igual a la longitud de onda de los rayos X emitidos por la fuente. En el interior de un monocristal existe diferentes familias de planos, con distintas direcciones y espaciados, que son característicos para cada muestra, y corresponden a la denominada huella dactilar de las sustancias cristalinas. De esta manera, conociendo las direcciones de estos planos es posible estudiar el sistema cristalino y las dimensiones de la celda unitaria, y sabiendo las intensidades de difracción,

que están relacionadas con la naturaleza y posición de cada átomo en la celda, es posible conocer la estructura tridimensional interna del cristal estudiado [6].

Utilizando esta técnica, fue posible resolver la estructura cristalina de los complejos $[(\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2)]$ y $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de siete de los compuestos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

La muestra monocristalina estudiada del complejo $[(\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2)]$ se obtuvo mediante evaporación lenta de una solución de $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ en acetona- d_6 . La resolución de la estructura del compuesto fue realizada en la Facultad de Química, UdelaR, por quien suscribe con la tutoría del Prof. Leopoldo Suescun, y se efectuó en el difractor Bruker D8 Venture utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$. Las intensidades de difracción de rayos X fueron colectadas e integradas con el programa APEX2 v2014.5--0 (Bruker AXS). Estas intensidades fueron escaladas, y corregidas por absorción empleando el método de multi-scan) con el programa SADABS V2014/2 (Bruker AXS Inc.. La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXT-2014 [7] y el modelo molecular de refinamiento fue desarrollado por alternancia de ciclos de los métodos de Fourier y de matriz de mínimos cuadrados con el programa Olex2 [8].

Las medidas de difracción de los complejos $\{\text{M}(\text{dppf})\}$ las realizó el profesor Oscar Piro en la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se utilizó un difractor Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD con radiación $\text{MoK}\alpha$. Las intensidades de difracción fueron colectadas, integradas y escaladas con el programa CrysAlisPro. La estructura fue resuelta con SHELXT y el modelo de refinamiento molecular usando matriz completa de mínimos cuadrados con este mismo programa [7,9].

3.2.2 Caracterización en solución

3.2.2.1 Conductimetría

Los compuestos de coordinación cargados forman sales que tienen la capacidad de disociarse en solución y conducir la corriente eléctrica, comportándose como electrolitos. La magnitud de la conducción depende de la concentración de los iones en solución, la carga y el tamaño de los mismos, la temperatura de medida y la constante dieléctrica del disolvente utilizado. De esta manera, la determinación de la conductividad molar de una

solución de complejo describe si éste es neutro o cargado, y, si se eligen adecuadamente las condiciones de medida, permite determinar la naturaleza del electrolito.

Se han reportado valores de conductividad molar de numerosos complejos en diferentes solventes, y mediante comparación con estos valores se identificaron los tipos de electrolitos presentes en solución de cada complejo sintetizado [10]. Las medidas de conductividad fueron realizadas a 25°C en soluciones de concentración 10^{-3}M de complejo en DMSO usando un conductímetro Jenway 4310. Para algunos complejos, se midió la conductividad a diferentes tiempos luego de la preparación de la solución, de manera de identificar posibles sustituciones de ligandos cargados por moléculas de DMSO, para así estimar la estabilidad de los compuestos en solución de DMSO. Ésta resulta de interés ya que para la evaluación biológica de los compuestos desarrollados se parte de soluciones stock en DMSO que luego se diluyen en el medio de cultivo del parásito o célula mamífera modelo.

3.2.2.2 Espectrometría de masa

La espectrometría de masa es una técnica que brinda información sobre la estructura del complejo en solución mediante la determinación de la masa del ion molecular, de los patrones isotópicos y del patrón de fragmentación. En particular, la detección de ion molecular permitió elucidar la presencia en solución de los complejos diméricos $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$ [11].

Los espectros fueron medidos en un espectrómetro de masa Perkin Elmer AxION 2 TOF MS utilizando análisis directo de muestra (DSA) con ionización química de presión atmosférica (APCI) y detección con tiempo de vuelo (DSA-APCI-TOF/MS). Los compuestos fueron disueltos en acetonitrilo. Las muestras se corrieron en el modo de trampa de ionización positiva con un voltaje de vuelo de 10 KV en el tubo. El voltaje de salida del capilar fue fijado a 110 V, normal para el análisis MS. El espectro de masa fue medido en un rango de masas de 100-1300 m/z y una tasa de adquisición de 2 espectros/s.

3.2.2.3 Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), es una técnica ampliamente utilizada para la determinación estructural de compuestos en solución. La técnica se aplica sobre átomos que poseen un espín nuclear distinto de cero. En este trabajo de tesis se

trabajó con ^1H , ^{13}C y ^{31}P cuyo espín nuclear es igual a $1/2$. Cuando se aplica un campo magnético externo (B_0) sobre estos átomos, la interacción entre el momento magnético nuclear y B_0 , promueve que los dos estados de espín dejen de ser degenerados, provocando una mayor población de los espines alineados a favor de B_0 en los niveles de menor energía. Al aplicar radiación electromagnética, del rango de las radiofrecuencias, se genera la excitación de los espines de menor energía hacia los niveles donde se encuentran los espines alineados en contra de B_0 , hasta alcanzar un estado de equilibrio denominado absorción de resonancia. La absorción de resonancia es la que se detecta en la técnica de RMN. En los espectros de RMN, los valores de desplazamiento químico (δ) y de constante de acoplamiento (J) entre núcleos activos, brindan información del entorno químico alrededor del átomo en estudio. Esta información es fundamental para lograr dilucidar la estructura y estereoquímica de los complejos en solución, y, además, confirmar si la estructura cristalina resuelta por DRX (en aquellos complejos estudiados por esa técnica) se mantiene en solución [12]. En este trabajo de tesis se midieron espectros unidimensionales de ^1H RMN, ^{13}C RMN y ^{31}P RMN y espectros bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H COSY y heteronucleares ^1H - ^{13}C HSQC.

Los espectros de RMN unidimensionales de los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$ se midieron en acetona- d_6 en un equipo Bruker Avance 400 de la Facultad de Ciencias de la Universidade de Lisboa, Portugal. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C RMN de los compuestos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$, en acetona- d_6 , y los de otros compuestos sintetizados, en DMSO- d_6 a 30°C , se midieron en un equipo Bruker DPX-400 perteneciente a Facultad de Química, Udelar. En todos los casos se utilizó un B_0 de 400 MHz para los espectros de ^1H , y de 100 MHz para los espectros de ^{13}C .

El espectro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN del compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ se midió en un equipo Bruker AVANCE III 400 ($B_0 = 161,98$ MHz) del Instituto Superior Técnico de la Universidade de Lisboa, Portugal. Los espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de los compuestos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ se midieron en un equipo Bruker Advance 400 ($B_0 = 160,984$ MHz) perteneciente a la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile.

3.2.2.4 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica (VC) es una de las técnicas electroquímicas más utilizadas para el estudio de procesos redox en sistemas complejos. La VC se basa en la medición de la variación de la corriente eléctrica al aplicar un barrido de potencial en forma cíclica. La medida se realiza sobre un electrodo de trabajo que se encuentra inmerso en una solución que contiene la especie electroactiva en estudio. La velocidad de barrido del potencial aplicado, medida en voltios por unidad de tiempo, (mV/s) es constante. Experimentalmente, se utilizó un sistema de tres electrodos: un electrodo de trabajo en cuya superficie ocurre el proceso redox, un electrodo de referencia que corresponde a una semicelda de potencial conocido que actúa como referencia de medición, y un electrodo auxiliar que equilibra la corriente observada en el electrodo de trabajo para cerrar el circuito eléctrico formado [13].

En este trabajo de tesis se utilizó la técnica de VC como una técnica de caracterización electroquímica en solución de algunos de los complejos sintetizados, pero además, se utilizó como una herramienta para determinar la factibilidad de la generación de especies reactivas del oxígeno a partir de los complejos que incluyen los ligandos tiosemicarbazona derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL).

Todos los experimentos de VC se realizaron en un equipo Epsilon Electrochemical Analyzer perteneciente a la Facultad de Química, UdelaR. Las soluciones de cada complejo estudiado fueron desoxigenadas vía purga de nitrógeno durante 15 minutos previamente a realizar las medidas. En todos los sistemas se utilizó un volumen final de 10 mL, una concentración 1mM de complejo y una concentración 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBA) utilizado como electrolito soporte.

El estudio por VC de los complejos RuCpL fue realizado sobre soluciones de éstos en DMSO. En los procesos de reducción se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de gota colgante de mercurio HDME (de sus siglas en inglés *Hanging Mercury Drop Electrode*), como electrodo de referencia Ag/Ag⁺, y como electrodo auxiliar un alambre de platino. Para el estudio de los procesos de oxidación se utilizó una celda electroquímica estándar de tres electrodos constituida por un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y platino como electrodo auxiliar.

Los complejos del centro *fac*-{Re(CO)₃} fueron estudiados en soluciones en DMSO y acetonitrilo. En todos los casos se utilizó el sistema de celda electroquímica estándar con

tres electrodos, carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como electrodo auxiliar.

Los diez compuestos de la serie {M(dppf)} fueron medidos en soluciones de los complejos disueltos en acetonitrilo utilizando el mismo sistema de celda electroquímica estándar de tres electrodos, carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como electrodo auxiliar.

3.2.3 Lipofilia

Se determinó la lipofilia de los compuestos Re-CO₃-HL y M-dppf-L por medio de una técnica de cromatografía en capa fina (TLC) de fase reversa. Los experimentos se realizaron en placas de TLC C-18 de fase reversa SIL RP-18 W/UV. La composición de la fase móvil se ajustó de tal forma de poder diferenciar según su lipofilia los complejos de cada serie y los ligandos tiosemicarbazona libres.

- a) Fase móvil utilizada para los complejos Re-CO₃-HL: metanol: DMF: buffer Tris (10 mM, pH = 7,4), 20:20:60 v/v/v.
- b) Fase móvil utilizada para los complejos M-dppf-L: metanol: DMF: H₂O, 65:5:30 v/v/v).

Las placas se corrieron en una cámara cromatográfica, se secaron, y las manchas se detectaron con luz ultravioleta. Los valores de R_f obtenidos se promediaron para dos a tres determinaciones, y se convirtieron a valores de R_M mediante la expresión de la ecuación 3.1 [14–17].

$$R_M = \log_{10}\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad \text{Ec.3.1}$$

3.3 Actividad biológica

3.3.1 Actividad *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*

Los estudios de actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* fueron realizados, en algunos casos sobre la forma epimastigota (cepa Dm28c y cepa Y), y en otros sobre la forma infectiva tripomastigota (cepa Dm28c). La citotoxicidad en *T. cruzi* fue expresada en valores de IC₅₀ (de sus siglas en inglés, *half maximal inhibitory concentration*)

3.3.1.1 Inhibición del crecimiento de epimastigotas de la cepa Y

El estudio de inhibición de la proliferación de epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa Y por efecto del compuesto RuCpCTZ y del ligando CTZ se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica de Facultad de Ciencias, UdelaR.

Las células de epimastigotas de *T. cruzi* fueron cultivadas a 28°C en un medio axénico (BHI-triptosa) suplementado con un 5% de suero fetal bovino según procedimientos previamente descritos [18,19]. Las células de un cultivo de 10 días se inocularon en 50 mL de medio de cultivo fresco hasta una concentración de 10⁶ células/mL. El crecimiento celular fue seguido día a día por medidas de absorbancia del cultivo a $\lambda = 600$ nm. Antes de la inoculación, se agregó una dosis fija de cada compuesto preparado a partir de una solución stock fresca en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no excedió el 0,4% v/v. Se comprobó que esta concentración de solvente orgánico, utilizado como vehículo, no tiene efecto sobre el crecimiento celular de epimastigotas (no se observó un efecto inhibitorio de la proliferación celular hasta un 1% v/v de DMSO). Se evaluó la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular por comparación con un control negativo (medido en presencia y ausencia del vehículo) y con Nifurtimox como control positivo (fármaco tripanosomicida de referencia).

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PGI, de su sigla en inglés *percentage of growth inhibition*) según la ecuación 3.2, donde A_p corresponde a la absorbancia medida a una longitud de onda de 600 nm (A₆₀₀) del cultivo que contiene al compuesto en el día 5, A_{0p} corresponda a la A₆₀₀ del medio de cultivo medido justo después de la adición del compuesto (día 0), A_c corresponde a la A₆₀₀ del cultivo en ausencia del compuesto (control) en el día 5 y A_{0c} el valor de absorbancia del control en el día cero.

$$\%PGI = \left[1 - \left(\frac{A_p - A_{0p}}{A_c - A_{0c}} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.2}$$

Para determinar los valores de IC₅₀, se siguió el crecimiento de los parásitos en ausencia (control) y presencia de concentraciones crecientes del compuesto. En el quinto día, se midió la absorbancia y se relacionó con el control, donde el IC₅₀ se determinó como la concentración de compuesto necesaria para reducir la relación de absorbancia a un 50%.

3.3.1.2 Inhibición del crecimiento de epimastigotas de la cepa Dm28c

Los experimentos en epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa Dm28c se realizaron en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, UdelaR. La evaluación de la actividad *in vitro* fue realizada para los dos compuestos M-dppf-mpo. Las células de epimastigotas de *T. cruzi* se mantuvieron en un crecimiento exponencial a 28°C en un medio de infusión hepática triptosa (LIT, de su sigla en inglés *liver infusión tryptose*) complementado con un 10 % v/v de suero fetal bovino. Se analizó el efecto sobre el crecimiento celular incubando una concentración inicial de 10⁶ células/mL con diversas concentraciones de compuesto (desde 0 a 6 µM) durante 5 días en placas de 96 pocillos. Los compuestos fueron añadidos a partir de una solución stock en DMSO, inmediatamente después de la preparación de la misma. La concentración de DMSO no superó el 0,4% v/v, ya que se confirmó que esta concentración utilizada no tiene efecto sobre la proliferación de los parásitos [14,15]. El porcentaje de crecimiento celular fue determinado a partir de la ecuación 3.2 por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Se registraron las curvas dosis-respuesta, de las cuales se determinaron los valores de IC₅₀. Los resultados se expresaron como el promedio ± DS (desviación estándar) correspondiente a los ensayos realizados por triplicado. También se utilizó Nifurtimox como control positivo.

3.3.1.3 Inhibición del crecimiento de tripomastigotas de la cepa Dm28c

Se realizaron estos estudios en tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) para todos los complejos organometálicos que incluyen los ligandos tiosemicarbazonas (HL). La cepa utilizada pertenece al Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Varios de estos estudios fueron realizados en dos pasantías de investigación realizadas en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) bajo

la supervisión de los Dres. Juan Diego Maya y Claudio Olea Azar, y con la ayuda del Dr. Michel Lapier.

Para lograr una adecuada proliferación de tripomastigotas se infectaron células Vero con tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* obtenidos a partir de cultivos de epimastigotas de 15 días (cepa Dm28c). Las células infectadas eclosionaron luego de un tiempo provocando la liberación de más tripomastigotas al medio celular, los que fueron cosechados y utilizados para infectar otros cultivos de células Vero. Los tripomastigotas obtenidos fueron incubados durante 5 a 7 días a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂. Luego de este tiempo, se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 3000 g por 5 minutos. Los pellets de tripomastigotas fueron resuspendidos en medio RPMI (sigla en inglés *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con 5 % de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina hasta una concentración final de 10⁷ parásitos/mL (2,1·10⁸ tripomastigotas son equivalentes a 1 mg de proteína o 12 mg en masa húmeda). Obtenida esta concentración de parásitos, y utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano, se incubó los tripomastigotas en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de cada complejo durante 24 horas a 37°C. Luego de este tiempo, se añadió en cada pocillo de la placa, 100 µL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) de concentración 0,5 mg/mL, y se incubó por 4 horas a 28°C según procedimientos previamente desarrollados [20,21]. El MTT es un tetrazolio que se metaboliza en las células viables reduciéndose a formazán, un compuesto de color azul que posee un máximo de absorción a una longitud de onda de 570 nm. Se determinó espectrofotómicamente la concentración de formazán formado, lo que permitió determinar la viabilidad celular. Concluidas las 4 horas de incubación, los cuerpos celulares fueron homogeneizados añadiendo el solubilizante dodecil sulfato de sodio (SDS, por su sigla en inglés) al 10 % en HCl 0,1 mM, y se incubó nuevamente durante la noche a 37°C y 5 % CO₂. Concluido este tiempo, se midió la A₅₇₀ en cada uno de los pocillos utilizando un espectrofotómetro de lector de placas Biochrom® Asys Expert Plus, Biochrom, USA. Los parásitos sin el tratamiento descrito fueron usados como control (100 % de viabilidad).

3.3.2 Actividad *in vitro* contra *Trypanosoma brucei*

Los ensayos de actividad *in vitro* fueron realizados sobre la forma infectiva *T. brucei brucei* (cepa 427) en el laboratorio del Grupo de Biología Redox de Tripanosomas del

Institut Pasteur de Montevideo, dirigido por el Dr. Marcelo Comini. Los estudios fueron realizados para los compuestos RuCpCTZ, RuCpL y M-dppf-L.

La forma infectiva de *T. brucei brucei* (cepa 427), línea celular 449 (codificando una copia de la proteína represora de tet: Pleo^R) [22], fue cultivada de forma aeróbica en un incubador humidificado a 37°C con 5 % de CO₂ en un medio HMI-9 [23] suplementado con un 10% v/v de suero fetal de ternero, 10 unidades/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina y 0,2 µg/mL de fleomicina. Los ensayos fueron realizados según procedimientos previamente descritos [15]. Se preparó una solución stock de concentración 10 mM de cada complejo en DMSO y se diluyó en el medio de cultivo hasta obtener siete concentraciones experimentales (desde 25 hasta 0,3 µM). La concentración máxima de solvente orgánico utilizado como vehículo (DMSO) no superó el 1% v/v, concentración que según se comprobó previamente no es nociva para los parásitos. Inmediatamente luego de la preparación de las soluciones, se agregó cada compuesto (y también sólo DMSO) en los pocillos a las concentraciones mencionadas, y se incubó la placa de cultivo durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Luego de este tiempo, se contaron los parásitos viables en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico. Cada condición testeada fue realizada por triplicado. Para cada concentración de compuesto, se calculó la citotoxicidad a partir de la ecuación 3.3, donde los datos se representaron como el porcentaje de citotoxicidad (% citotoxicidad) en función de la concentración de complejo. Se obtuvieron los valores finales de IC₅₀ a partir de las curvas dosis-respuesta ajustadas a una ecuación sigmoideal (modelo de Boltzmann) o extrapolados de gráficas de un ajuste no lineal.

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \left(\frac{\text{valor experimental} - \text{control de DMSO}}{\text{control de crecimiento} - \text{control de DMSO}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

3.3.3 Citotoxicidad inespecífica *in vitro* sobre células mamíferas modelo

3.3.3.1 Citotoxicidad en macrófagos murinos (J774)

Estos estudios, realizados por el Grupo de Biología Redox de Trypanosomas, fueron realizados para los compuestos RuCpCTZ y RuCpL.

Se cultivó la línea celular de macrófagos de ratón J774 en una atmósfera humidificada con CO₂/aire (5/95%) a 37°C en medio DMEM (de su sigla en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10 % v/v de suero fetal de ternero, 10 unidades/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina. Se preparó soluciones stock de los complejos a evaluar de la misma forma descrita en el experimento de actividad contra *T. brucei*. Éstas se diluyeron posteriormente en el medio de cultivo hasta obtener siete concentraciones experimentales (desde 100 a 0,5 µM). La concentración máxima de DMSO utilizado no superó el 1% v/v. Esta concentración de DMSO es tolerada por los macrófagos murinos de la línea celular J774. Cada condición fue testada por triplicado. Se evaluó el efecto citotóxico de los compuestos en los macrófagos por ensayos colorimétricos de células viables con el reactivo WST-1 (sal de tetrazolio que genera formazán). La absorbancia del formazán producido por las células metabólicamente activas, se midió a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia a 630 nm) con un lector de microplacas EL 800 (Biotek). La metodología empleada había sido descrita previamente [24]. Se calculó la citotoxicidad a partir de la ecuación 3.3 de igual manera que para el experimento en *T. brucei*.

3.3.3.2 Citotoxicidad en células endoteliales humanas (EA.hy926)

Al igual que los estudios en tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c), los experimentos en células endoteliales EA.hy926 se desarrollaron parcialmente en las pasantías de investigación realizadas en el ICBM de la Universidad de Chile. Los ensayos se realizaron en los compuestos Re-CO₃-HL y M-dppf-L.

Las líneas celulares endoteliales EA.hy926 (línea celular humana permanente derivada por fusión de las células endoteliales de la vena umbilical humana HUVEC con células pulmonares humanas A549) se mantuvieron en el medio nutritivo Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino al 10 % (25 mM), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 mg/mL). Las células se mantuvieron como un cultivo de monocapa en matraces de cultivo de tejidos (Thermo Scientific Nunc™) en una incubadora a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Se extrajo el medio de cultivo IMDM de la placa quedando solamente las células EA.hy926 adheridas a la superficie del recipiente. Se añadió solución tampón PBS (pH = 7,4) para lavar las células adheridas y eliminar el suero fetal bobino residual, el cual inactiva la tripsina posteriormente añadida. Se agregó 1 mL de tripsina (1X) y se incubó

durante 5 minutos a 37°C y 5 % CO₂, para que así las células adheridas a la superficie quedasen completamente suspendidas en tripsina. Posteriormente, se añadió 2 mL de medio de cultivo y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm (a esta velocidad de centrifugación las células no son dañadas). El pellet de células obtenido fue re-suspendido en 5 mL de IMDM y se realizó el conteo celular mediante cámara de Neubauer. Conocido el número de células por mililitro obtenido, se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C y 5 % CO₂ (condiciones óptimas para lograr la adhesión de las células a la superficie de cada pocillo). Luego de este tiempo, se añadieron los compuestos testeados, previamente disueltos en una solución stock de DMSO, y se incubaron durante 24 horas a 37°C. De forma simultánea se realizaron dos controles negativos (células sin tratar y células con adición sólo de DMSO). El procedimiento continuó con la adición de MTT, de forma similar a lo realizado en el experimento con tripomastigotas Dm28c.

3.3.3.3 Citotoxicidad en células Vero epiteliales (ATCC CCL81)

Estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, UdelaR, para los dos compuestos M-dppf-mpo.

La línea celular ATCC CCL81 es ampliamente utilizada para investigación fenotípica de fármacos ya que es considerada como célula normal derivada del tejido epitelial normal [25]. Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, gentamicina (50 mg/L) y anfotericina B (2 mg/L) a 37°C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂. Después de alcanzar la confluencia, se separaron y se contaron las células. Para los ensayos, se sembraron 10⁵ células/mL en placas de 96 pocillos (NUNC™). Las placas fueron incubadas bajo las mismas condiciones (37°C, 5 % CO₂) durante 24 horas (tiempo óptimo para lograr una correcta adhesión de las células antes de la prueba con los compuestos). Se preparó una solución stock de cada complejo en DMSO, y se realizó una doble dilución de 500 a 3,9 µg/L (la concentración de DMSO no excedió el 5 % v/v en el medio de cultivo). Las células se expusieron a varias concentraciones de cada complejo y se incubaron durante 24 horas. Luego de este tiempo, se añadió una solución de resazurina sobre el cultivo celular y se incubó nuevamente por 6 horas. Se detectó la respiración celular, utilizada como un indicador de viabilidad celular, mediante la reducción de resazurina a resorufina cuyo

color rosado y fluorescencia son indicativos de viabilidad celular (un persistente color azul de resazurina es un signo de muerte celular). Las medidas de fluorescencia (filtro de excitación = 530 nm y filtro de emisión = 590 nm) se realizaron en un microfluorímetro SPECTRA fluor Plus (Tecan). Los valores de IC₅₀ se definieron como la mayor concentración de complejo a la que el 50 % de las células son viables con respecto al control. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

3.4 Mecanismo de acción

3.4.1 Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana en *T. cruzi*

Como se detalló en el capítulo 2, el mecanismo de acción principal del ligando bioactivo CTZ involucra la inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana (BEM) [26,27]. Basado en esto, se estudió la participación del compuesto RpCpCTZ en la inhibición de esta ruta biosintética en los parásitos *T. cruzi* [28]. Los estudios fueron realizados en el laboratorio de Química Orgánica del grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias, UdelaR bajo la supervisión de los Drs. Mercedes González y Hugo Cerecetto, y con la ayuda del Dr. Javier Varela.

El experimento se realizó sobre epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) las cuales se mantuvieron en medio axénico (BHI-triptosa) a 28 °C y con fuerte aireación. Se utilizó una concentración de 10⁷ parásitos/mL para el estudio. El compuesto RuCpCTZ y el ligando CTZ (disueltos ambos en DMSO) se agregaron a una concentración equivalente al valor de IC₅₀ obtenido en los estudios de actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, y se incubaron durante 72 horas a 28°C (la concentración de DMSO no superó el 0,4% v/v en el medio de cultivo). De forma simultánea, se incubó un control que incluía un 0,4% v/v de DMSO solo, y un control positivo correspondiente a terbinafina (compuesto que participa de la inhibición enzimática en la biosíntesis de esteroides de membrana). Concluido el tiempo de incubación, se efectuó la extracción de los esteroides de la membrana de los parásitos. Para ello, las cuatro muestras (control, control positivo, parásitos tratados con CTZ, y parásitos tratados con el complejo RuCpCTZ) se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos. Se suspendió el pellet de parásitos en 1 mL de buffer fosfato (0,05 M, pH = 7,4) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El pellet resultante fue re-suspendido en 1 mL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1), y la

suspensión resultante se mantuvo a 4 °C durante 12 horas. Luego se realizó la separación de fases del medio añadiendo 5 mL de una solución saturada de NaCl. Se extrajo la fase orgánica y se añadió 1 ml de CHCl₃ para extraer nuevamente esta fase (este paso se repitió dos veces para lograr una buena separación). Luego se añadieron 3 mL de hexano (observándose tres fases), y se extrajo la fase orgánica de hexano (fase central) y con ella se sembró la placa de cromatografía en capa fina (TLC). Antes de correr la placa sembrada, se realizó una TLC con los patrones utilizados en el experimento (ergosterol, lanosterol, colesterol y escualeno), utilizando hexano como fase móvil, para corroborar la pureza de éstos. En la TLC se sembraron, por lo tanto, los extractos de los parásitos tratados con el complejo y con CTZ, los tratados con terbinafina, el control, y los cuatro patrones mencionados [29]. El patrón de escualeno fue identificado realizando dos corridas cromatográficas con hexano como fase móvil, y los otros patrones se identificaron luego con la fase móvil hexano/AcOEt (8:2). Se reveló la placa de TLC con luz ultravioleta y vapores de yodo.

3.4.2 Generación de especies radicalarias en *T. cruzi*

Como se mencionó anteriormente, es conocido que uno de los mecanismos de acción de los ligandos tiosemicarbazona derivados del 5-nitrofuraldehído (HL) es la generación de radicales tóxicos para el parásito. Se estudió la capacidad de producción de radicales libres de todos los complejos que incluyeron estos ligandos mediante la técnica de Resonancia Electrónica Paramagnética EPR (de su sigla en inglés, *Electron Paramagnetic Resonance*) y se utilizó DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina) como atrapador de radicales de corto tiempo de vida media. Los estudios fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Se preparó una solución aproximadamente 1 mM de cada complejo en DMSO, o en DMF para los compuestos M-dppf-L, y ésta se añadió sobre una mezcla que contenía epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c, concentración final de proteína entre 4 a 8 mg/mL equivalentes a entre 300 y 600 millones de parásitos/mL) y DMPO (concentración final de 250 mM). La mezcla se transfirió a un capilar de capacidad de 50 µL que fue puesto luego en el equipo de EPR. Los espectros de EPR se registraron en la banda X (9,85 GHz) utilizando un espectrómetro Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y 50 kHz de modulación de campo. Todos los espectros se registraron en la misma escala luego de 15

barridos [1,30]. Los espectros de EPR fueron simulados con el programa WINEPR Simfonia versión 1,25, y con WinSim 2002 versión 0,98.

3.4.3 Efecto sobre el consumo de oxígeno de *T. cruzi*

Se estudió la influencia de los complejos Re-(CO)₃-HL y M-dppf-L sobre la velocidad del consumo de oxígeno en los parásitos de *T. cruzi*. Se utilizaron epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) las cuales fueron cosechadas por centrifugación a 500 g, y posteriormente lavadas y re-suspendidas en buffer fosfato de sodio 0,05 M (pH 7,4) conteniendo NaCl 0,107 M. Se llevaron a cabo mediciones de respiración polarográficamente con un electrodo Clark No. 5331 (Yellow Springs Instruments, modelo 53 YSI) conectado a un registrador Goerz RE 511 de monocanal a 100 mV [31–33]. Se añadió una cantidad equivalente a 1,2 mg de proteína/mL a una cámara de capacidad de 0,6 mL y se registró la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo, a una temperatura de 28°C. Los complejos estudiados fueron disueltos en DMSO, y se utilizó una concentración final de 40 µM. Los resultados se corrigieron de acuerdo con el efecto producido por solo DMSO.

Estos estudios se realizaron en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por el Dr. Michel Lapier.

3.4.4 Inhibición de la actividad enzimática de NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*

Para los estudios de inhibición de la actividad enzimática de NADH-fumarato reductasa (*TcFR*) se utilizaron extractos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c). Los parásitos crecieron en medio LIT a 28°C suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Los extractos proteicos fueron preparados a partir de $5 \cdot 10^7$ parásitos crecidos exponencialmente, según modificaciones a la técnica previamente descrita [34]. Se utilizó una concentración de 10^7 parásitos/mL que fueron cosechados por centrifugación a 500 g y luego re-suspendidos en buffer MST (manitol 0,23 M; sacarosa 0,07 M; Tris/HCl 5 mM; pH 7,4) suplementado con tabletas de inhibidores de proteasa (SIGMAFAST). Las suspensiones celulares de epimastigotas fueron homogeneizadas en presencia de 0,1 % del surfactante Triton X-100 y KCl 200 mM en hielo con un homogeneizador Elvehjem teflón-vidrio, utilizado para romper las membranas celulares

y extraer la enzima. Como fue descrito previamente, esta preparación se utilizó inmediatamente para el ensayo espectrofotométrico de la actividad de la enzima fumarato reductasa dependiente de la velocidad de oxidación de NADH a una longitud de onda de 340 nm (absortividad molar $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) utilizando una concentración de 250 μM de NADH en buffer HEPES (30 mM, pH 7,0) con KCl (125 mM) y fumarato (0,5 mM) [35].

Estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias, UdelaR por la Lic. Florencia Mosquillo y la Dra. Leticia Pérez Diaz.

3.4.5 Estudio de cambios redox intracelulares en *T. brucei*

La proteína hGrx-roGFP2 (biosensor), utilizada en este experimento fue expresada y purificada según un método previamente descrito [36]. El biosensor fue pre-reducido con ditioneitol (DTT) 20 mM en buffer PBS (pH 7,4) conteniendo EDTA de concentración 1 mM, por 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de agente reductor DTT se eliminó por filtración en gel en un Sephadex G25 (columna PD10, GE-Healthcare) equilibrado con EDTA 1 mM en buffer PBS. Se midió la concentración de la proteína hGrx-roGFP2 a una longitud de onda de 280 nm ($\epsilon_{280} = 23.290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Se incubaron los complejos M-dppf-L durante 1 minuto a temperatura ambiente utilizando una concentración de 1 μM del biosensor reducido. Se utilizó una concentración de cada complejo equivalente al valor de IC_{50} obtenido en los experimentos de actividad *in vitro* contra *T. brucei*. Luego de la incubación, se midieron los espectros de fluorescencia a una $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ en un equipo Cary Eclipse. Los controles utilizados incluyeron la incubación del biosensor con disulfuro de glutatión (GSSG) 0,2 mM y DTT 1 mM en concentraciones equimolares con respecto a cada compuesto ensayado.

Estos estudios fueron realizados en el laboratorio del Grupo de Biología Redox de Tripanosomas del Institut Pasteur de Montevideo por la Dra. Andrea Medeiros y dirigidos por el Dr. Marcelo Comini.

3.4.6 Interacción con ADN

3.4.6.1 Estudios de interacción con ADN por medidas de absorción atómica

El estudio de interacción primaria con ADN por medidas de absorción atómica fue realizado para el complejo RuCpCTZ. Se utilizó para determinar la existencia y el grado de interacción entre este complejo y la biomolécula. El estudio se realizó a partir de modificaciones de un procedimiento previamente reportado [37]. Se utilizó ADN de timo de ternero (ct-DNA, de sus siglas en inglés, *calf thymus DeoxyriboNucleic Acid*) tipo I, N° D-1501, SIGMA.

Se disolvieron 50 mg de ct-DNA en 30 mL de agua destilada, y la suspensión se agitó manualmente 3 a 4 veces por día durante 3 días. Se preparó una solución de complejo de concentración 1 mM en DMSO. Se mezcló 1 mL de la solución de ct-DNA y 1 mL de solución de complejo y se incubó a 37°C durante 96 horas (el experimento se realizó por triplicado). Concluido este tiempo, se agregaron 4 mL de etanol y 0,2 mL de una solución 2 M de NaCl, para luego centrifugar entre 15 a 20 min a 50 rpm. El precipitado obtenido (correspondiente a ADN unido al complejo) fue redisoluto en 1 mL de DMSO y 1 mL de agua destilada. Este procedimiento se repitió tres veces hasta que el sólido obtenido se disolvió finalmente en 3 mL de agua destilada. Esta solución fue utilizada para medir la concentración de ADN y la concentración de rutenio unido a él. Para la cuantificación de ADN se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm ($\epsilon = 6.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1603. Para la cuantificación del metal unido al ADN mediante espectroscopía de absorción atómica de llama se utilizó un equipo Perkin Elmer AAnalyst 200 spectrometer (Norwalk, CT, USA). La composición de la llama fue acetileno (2,5 L/min) y aire (10,0 L/min). Utilizando una solución estándar de rutenio, se realizó la curva de calibración que permitió dosificar el metal presente.

3.4.6.2 Estudios de interacción con ADN por medidas de fluorescencia

Los estudios de interacción competitiva con el aducto {ADN-BE} (BE = bromuro de etidio) se efectuaron en Facultad de Química, Udelar.

Se preparó una solución de ct-DNA de concentración 1 mg/mL (~2mM/nucleótido) mediante agitación magnética suave durante 24 horas a temperatura ambiente en buffer Tris/HCl (10 mM; pH 7,4). Luego de observar una correcta homogeneidad en la solución, se determinó la concentración de la solución stock de ct-DNA por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm ($\epsilon_{260} = 6.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [38]. La solución de BE se preparó en buffer Tris/HCl a una concentración de 5 mM, y se mantuvo en heladera a ~4°C. Preparadas ambas soluciones, se realizó la mezcla entre BE y ADN en una relación

molar 1:2, respectivamente, y se incubó durante 24 horas a 4 °C. La solución de los complejos se preparó a partir de una solución stock en DMSO seguida de apropiadas diluciones hasta obtener concentraciones de cada complejo entre 1-110 μM (excepto en el estudio del complejo RuCpCTZ donde la concentración máxima fue hasta 60 μM). La concentración de DMSO fue de 5 % v/v en todos los casos. Luego de la incubación de la solución {ADN-BE}, se añadió cada concentración de complejo, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se midieron los blancos correspondientes a soluciones de complejos sólo en DMSO y muestras de ADN-complejo (sin la presencia de BE) para confirmar que ninguno de estos sistemas presente fluorescencia en las condiciones de medida. Luego de la incubación del aducto {ADN-BE} con los complejos, se midieron los espectros de fluorescencia a una $\lambda_{\text{exc}} = 510$ nm en un rango de longitud de onda entre 520 y 650 nm utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301Pc. Para el tratamiento de los datos, se corrigió la intensidad de emisión fluorescente, por la absorción y el efecto de filtro interno, a la longitud de onda de máxima emisión (594 nm), utilizando los valores de absorción registrados para cada complejo. La corrección se efectuó según lo expresado en la ecuación 3.4, donde IF corresponde a la intensidad de fluorescencia medida, A_{exc} y A_{em} corresponden a la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 510 y 594 nm, respectivamente, de una solución de complejo a la máxima concentración estudiada [39]. Utilizando esta ecuación se corrigió cada uno de los espectros medidos.

$$IF_{\text{corregida}} = IF \cdot 10^{[(A_{\text{exc}}+A_{\text{em}})/2]} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Luego de corregir cada espectro, se realizó un análisis sobre el grado de *quenching* de la fluorescencia del aducto {ADN-BE} mediante el cálculo de la intensidad relativa porcentual, la normalización de la fluorescencia y el ajuste de Stern-Volmer. Para analizar la variación de la intensidad de emisión fluorescente del aducto {ADN-EB} con el aumento de la concentración de complejo, se construyó un gráfico de intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (594 nm) (% $IF_{\text{corr}}@594$ nm) en función de la concentración de complejo, donde se considera como 100 % la fluorescencia de la solución en ausencia de complejo.

La normalización de los datos de fluorescencia permiten realizar un análisis cualitativo de la desactivación de la fluorescencia (*quenching*) por efecto del complejo. Se normalizan los espectros de IF de cada solución medida, por el valor de intensidad de fluorescencia obtenido a 594 nm (máximo de emisión). Si se observan desplazamientos

de este máximo de emisión en los espectros normalizados, sería indicativo de eliminación de BE del aducto.

Los mecanismos implicados en la desactivación de la fluorescencia efectuada por los complejos, se evaluaron mediante el análisis del ajuste de Stern-Volmer (ecuación 3.5). El ajuste está basado en el apagamiento estático (*quenching* estático) de la intensidad de fluorescencia del aducto {ADN-BE}. El aducto presenta un máximo de fluorescencia que disminuye en intensidad luego de agregar concentraciones crecientes de complejo, es decir, el complejo apaga la fluorescencia del aducto en un proceso de transferencia de energía entre la especie excitada {ADN-BE}* y el quencher (complejo).



Al aplicar estado estacionario sobre este proceso de *quenching* estático, se obtiene finalmente la ecuación de Stern-Volmer, que corresponde a la gráfica lineal de I_{F_0}/I_F en función de la concentración del quencher, cuya pendiente de la curva es equivalente al valor de la constante de Stern-Volmer (K_{SV}). En esta ecuación, I_{F_0} e I_F corresponden a la intensidad de emisión fluorescente del aducto en ausencia y presencia de complejo, respectivamente [39]. Los valores de K_{SV} obtenidos fueron utilizados para analizar el grado de interacción entre el ADN y el complejo.

$$\frac{I_{F_0}}{I_F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Ec. 3.5}$$

3.4.6.2 Estudios de interacción con ADN por medidas de dicroísmo circular

Se realizaron experimentos de interacción con ADN de los compuestos M-dppf-L mediante espectrofotometría de dicroísmo circular (DC) durante una pasantía de investigación realizada en el Laboratorio del Grupo de Química Bioinorgánica y Desarrollo de Fármacos (BIOIN) del Centro de Química Estructural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa. Los experimentos fueron realizados bajo la supervisión del Dr. João Costa Pessoa y de la Dra. Isabel Correia.

La solución de ct-DNA (Sigma Aldrich #D3664) se preparó en un recipiente que contenía 1 mg de ADN, y sobre éste se añadieron 4 mL de buffer Tris/HCl (10 mM; pH 7,4). La suspensión resultante se mantuvo en heladera ($\sim 4^\circ\text{C}$) entre 3 y 4 días hasta observar una

solución homogénea. La concentración de esta solución se determinó por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $6.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La solución de ct-DNA utilizada en cada experimento se preparó por dilución de esta solución stock en buffer Tris/HCl. La solución de cada complejo se preparó a partir de una solución stock de concentración 2 mM en DMSO. Las soluciones fueron utilizadas para realizar las medidas inmediatamente después de ser preparadas. Se registraron los espectros de DC en el rango del UV y del visible utilizando condiciones experimentales diferentes en cada caso.

En las medidas realizadas en el rango del UV, se utilizó una concentración de ct-DNA de entre 50-60 μM /nucleótido, una concentración de DMSO de 5 % v/v, un volumen final de 3 mL y celdas de cuarzo SUPRASIL® de 1 cm de longitud de camino óptico. se colectaron los espectros entre 235 y 300 nm, con 5 acumulaciones a una velocidad de barrido de 50 nm/min. En las medidas en el rango del visible, se utilizó una concentración de ct-DNA de 200 μM /nucleótido, 20 % v/v de DMSO, un volumen final de 3,5 mL y celdas de 2cm de longitud de camino óptico. Los espectros fueron medidos entre 300 y 600 nm, utilizando 3 acumulaciones a una velocidad de barrido de 200 nm/min. En todos los casos se mantuvo una relación molar ADN:complejo constante de 1:0,5 o 1:0,25. Los espectros de DC fueron medidos a tiempo cero y a diferentes tiempos luego de la preparación de la muestra. En todas las medidas se utilizó como línea de base el espectro de DC del buffer Tris/HCl medido antes de cada experimento realizado. Esta línea de base fue restada a cada uno de los espectros medidos. Los espectros fueron medidos a 25°C en un espectropolarímetro Jasco J-720 que posee un fotomultiplicador UV-Vis (180 – 800 nm) (EXEL-308) utilizando cubetas de cuarzo Suprasil® CD.

3.5 Interacción con la proteína albúmina sérica bovina (BSA)

3.5.1 Estudios de interacción con BSA por medidas de fluorescencia

En los estudios de interacción con BSA por medidas de fluorescencia se utilizó el mismo espectrofluorímetro mencionado en el experimento con ADN. Se preparó una solución stock de BSA de concentración 50 μM en buffer PBS (10 mM, pH 7,4) mediante agitación magnética suave (evitando desnaturalización) a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución obtenida, se filtró con papel de filtro para evitar partículas en suspensión. La concentración de BSA obtenida se determinó por medidas de absorbancia a una longitud

de onda de 278 nm ($\epsilon_{278} = 43.824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución stock de cada complejo se preparó en DMSO a una concentración de 2 mM. Utilizando una concentración constante de 1 μM de BSA, se prepararon 15 muestras con diferentes relaciones molares BSA:complejo desde 1:0 hasta 1:20. La concentración de DMSO en el medio fue de 2 % v/v. Para cada muestra se preparó un blanco que contenía la misma concentración de complejo y DMSO, pero sin la inclusión de la proteína. Las 15 muestras y sus respectivos blancos se incubaron durante 24 horas a 37°C. Luego de este tiempo, se midieron los espectros de emisión de fluorescencia a una $\lambda_{\text{exc}}=295$ nm en un rango de longitud de onda entre 300 y 450 nm. Obtenidos los espectros de emisión fluorescente de las muestras (IF_{muestras}) y sus respectivos blancos (IF_{blancos}), se calculó la intensidad de fluorescencia real (IF) según la ecuación 3.6. Se corrigió la IF finalmente obtenida por la absorción y el efecto de filtro interno a la longitud de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{em}}= 340$ nm) según la ecuación 3.4.

$$IF = IF_{\text{muestras}} - IF_{\text{blancos}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

Al igual que para los estudios realizados con ADN, se analizó el grado de interacción entre los complejos y la proteína mediante el cálculo de intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (340 nm) ($\%IF_{\text{corr}}@340$ nm) y el ajuste de Stern-Volmer. Además, en estos estudios se incluyó el análisis de la constante de unión aparente y el número de tipos de sitios de unión entre la proteína y el complejo, mediante el ajuste de la ecuación 3.7. La ecuación proviene del proceso de *quenching* estático existente en la interacción proteína-complejo, asumiendo que hay un número “n” de tipos de sitios de unión, iguales e independientes, entre BSA y el complejo estudiado. En las condiciones experimentales realizadas, la proteína es la única especie fluorescente, de tal manera que la relación de la concentración de proteína y el área del pico de fluorescencia puede representarse por la ecuación 3.7. A partir del ajuste lineal de los datos, la pendiente de la curva corresponde a la constante aparente de unión (K_a), y el intercepto es indicativo del número de tipos de sitios de unión.

$$\log[(IF_0 - IF) / IF] = \log K_a + n \log[\text{complejo}] \quad \text{Ec. 3.7}$$

En la ecuación 3.7, IF_0 e IF corresponden a la intensidad de fluorescencia (a 340 nm) en ausencia y presencia del *quencher* (complejo), K_a es la constante de unión aparente, y n es el número de tipos de sitios de unión [40–42].

3.5.2 Estudios de interacción con BSA por dicroísmo circular

Los estudios de interacción con BSA mediante espectrofotometría de DC fueron también realizadas durante la pasantía de investigación en el Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Se preparó una solución stock de BSA aproximadamente 250 μM en buffer PBS (10 mM, pH 7,4) mediante agitación esporádica de forma manual. Se determinó la concentración por medidas espectrofotométricas a una longitud de onda de 280 nm ($\epsilon_{280} = 43.824 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se preparó una solución stock de cada complejo estudiado en DMSO a una concentración 2 mM. Las soluciones se utilizaron inmediatamente después de su preparación para realizar las medidas. Los espectros de DC se registraron en el rango del visible, utilizando una concentración de BSA de 100 μM , 15 % v/v de DMSO, y una relación molar BSA: complejo de 1:1 en todos los casos. Se utilizó un volumen final de 3,5 mL y celdas de cuarzo SUPRASIL® de 2 cm de longitud de camino óptico. Se midieron los espectros entre 330 y 600 nm, con 3 acumulaciones a una velocidad de barrido de 200 nm/min. Los espectros de DC fueron medidos a tiempo cero y después de 24 horas de incubación a 35°C. En todas las medidas se utilizó como línea de base el espectro de DC del buffer PBS medido antes de cada experimento realizado. Esta línea de base fue restada a cada uno de los espectros medidos. Los espectros de dicroísmo circular fueron medidos a 25°C en un espectropolarímetro Jasco J-720 que posee un fotomultiplicador UV-Vis (180 – 800 nm) (EXEL-308) utilizando cubetas de cuarzo Suprasil® CD.

3.6 Bibliografía

- [1] M. Bruce, N. Windsor, Cyclopentadienyl-ruthenium and -osmium chemistry: convenient high-yield synthesis of some cyclopentadienyl ruthenium or osmium tertiary phosphine halide complexes, *Aust. J. Chem.*, 30 (1977) 1601–1604.

- [2] S. Schmidt, W. Trogler, F. Basolo, M.A. Urbancic, J.R. Shapley, Pentacarbonylrhenium halides, John Wiley & Sons, Inc., (1990) 160–165.
- [3] T. Al-Allaf, L.J. Rasha, A.S. Abu-Surrah, R. Fawzi, M. Steimann, Chemical properties and cytotoxic activity of complexes of platinum(II) and palladium(II) containing dmsO and various anions; synthesis and structural characterization of $[\text{Pt}(\text{dmsO})_2\{\text{O}_2(\text{CO})_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\}]$, *Transit. Met. Chem.*, 23 (1998) 403–406.
- [4] T. Al-Allaf, H. Schmidt, K. Merzweiler, C. Wagner, D. Steinborn, Carboxylation of (DPPF)- MCl_2 [DPPF=1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene; M=Pt or Pd] in aqueous and non-aqueous solution: crystal and molecular structures of $[\text{Pt}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{DPPF})]$ and of $[\text{PtCl}(\text{NO}_3)(\text{DPPF})]$, *J. Organomet. Chem.*, 678 (2003) 48–55.
- [5] K. Nakamoto, Infrared Raman Spectra Inorg. Coord. Compd., John Wiley & Sons, Inc.,(2008).
- [6] M. Catti, H. Monaco, G. Artioli, D. Viterbo, M. Milanesio, G. Gilli, P. Gilli, G. Zanotti, G. Ferraris, Fundamentals of crystallography, Third Edition, Oxford University Press, (2011).
- [7] G.M. Sheldrick, A short history of it SHELX, *Acta Crystallogr. Sect. A*, 64 (2008) 112–122.
- [8] O.V. Dolomanov, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A.K. Howard, H. Puschmann, it OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.*, 42 (2009) 339–341.
- [9] G.M. Sheldrick, it SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. Sect. A*, 71 (2015) 3–8.
- [10] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.*, 7 (1971) 81–122.
- [11] W. Henderson, J.S. McIndoe, Mass spectrometry of inorganic, coordination and organometallic compounds., John Wiley & Sons, (2005).
- [12] D. Ebsworth, Spectroscopic properties of inorganic and organometallic compounds, British Library Cataloguing, (1968).
- [13] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 60 (1983) 702-706.
- [14] J. Benítez, L. Becco, I. Correia, S.M. Leal, H. Guiset, J.C. Pessoa, J. Lorenzo, S. Tanco, P. Escobar, V. Moreno, B. Garat, D. Gambino, Vanadium polypyridyl

- compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 303–312.
- [15] M. Fernández, L. Becco, I. Correia, J. Benítez, O.E. Piro, G.A. Echeverria, A. Medeiros, M. Comini, M.L. Lavaggi, M. González, H. Cerecetto, V. Moreno, J.C. Pessoa, B. Garat, D. Gambino, Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents, *J. Inorg. Biochem.*, 127 (2013) 150–160.
- [16] C. Hansch, A. Leo, Exploring QSAR fundamentals and applications in chemistry and biology: the hydrophobic parameter: measurement and calculation, American Chemical Society Ed., Washington, (1995).
- [17] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, P. Saenz, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, C. Olea-Azar, 1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure–activity relationships, *J. Med. Chem.*, 42 (1999) 1941–1950.
- [18] J. Varela, M. Gonzalez, M. Lavaggi, M. Cabrera, A. Rodríguez, P. Mino, X. Chiriboga, H. Cerecetto, Bioactive-guided identification of labdane diterpenoids from aerial parts of *aristeguetia glutinosa* as anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Nat. Prod. Commun.*, 7 (2012) 1139–1142.
- [19] P. Hernández, R. Rojas, R.H. Gilman, M. Sauvain, L.M. Lima, E.J. Barreiro, M. González, H. Cerecetto, Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates, *Eur. J. Med. Chem.*, 59 (2013) 64–74.
- [20] S. Muelas-Serrano, J.J. Nogal-Ruiz, A. Gómez-Barrio, Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Parasitol. Res.*, 86 (2000) 999–1002.
- [21] M. Faundez, L. Pino, P. Letelier, C. Ortiz, R. López, C. Seguel, J. Ferreira, M. Pavani, A. Morello, J.D. Maya, Buthionine sulfoximine increases the toxicity of Nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (2005) 126–130.
- [22] S. Biebinger, L. Elizabeth Wirtz, P. Lorenz, C. Clayton, Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 85 (1997) 99–112.

- [23] H. Hirumi, Continuous cultivation of *Trypanosoma-brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum-protein without feeder cell-layers, *J. Parasitol.*, 75 (1989) 985–989.
- [24] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sanchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 1534–1543.
- [25] F. Pavan, P. Maia, S. Leite, V. Deflon, A. Batista, D. Sato, S. Franzblau, C. Leite, Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (2010) 1898–1905.
- [26] R.A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, K. Lazardi, R. Atencio, M. Capparelli, F. Vargas, J.A. Urbina, A. Bouillez, A.F. Noels, D. Masi, Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4 Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chim. Acta*, 275–276 (1998) 528–540.
- [27] K. Lazardi, J.A. Urbina, W. de Souza, Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (1990) 2097–2105.
- [28] J. Varela, E. Serna, S. Torres, G. Yaluff, I.N. de Bilbao, P. Miño, X. Chiriboga, H. Cerecetto, M. González, *In vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from *Aristeguietia glutinosa* and mechanism of action studies, *Molecules*, 19 (2014) 8488-8502.
- [29] A. Gerpe, G. Álvarez, D. Benítez, L. Boiani, M. Quiroga, P. Hernández, M. Sortino, S. Zacchino, M. González, H. Cerecetto, 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene, *Bioorg. Med. Chem.*, 17 (2009) 7500–7509.
- [30] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino, L. Otero, Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (2014) 4677–4689.

- [31] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J.D. Maya, B. Garat, D. Gambino, Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 1033–1043.
- [32] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. Diego Maya, D. Gambino, Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 411–418.
- [33] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3322–3331.
- [34] M. Vieites, P. Smircich, B. Parajón-Costa, J. Rodríguez, V. Galaz, C. Olea-Azar, L. Otero, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Gómez-Barrio, B. Garat, D. Gambino, Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol *N*-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 (2008) 723–735.
- [35] P.B. Christmas, J.F. Turrens, Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 183 (2000) 225–228.
- [36] F. Sardi (tesis), Generación y caracterización de biosensores redox para el estudio de procesos biológicos en tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo, 2016.
- [37] R.E. Mahnken, M.A. Billadeau, E.P. Nikonowicz, H. Morrison, Development of photo *cis*-platinum reagents. Reaction of *cis*-dichlorobis(1,10-phenanthroline)rhodium(III) with calf thymus DNA, nucleotides and nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 9253–9265.
- [38] J.K. Barton, J.M. Goldberg, C.V. Kumar, N.J. Turro, Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 2081–2088.
- [39] J. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer Science, New York, (2006).

- [40] T.S. Singh, S. Mitra, Interaction of cinnamic acid derivatives with serum albumins: A fluorescence spectroscopic study, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 78 (2011) 942–948.
- [41] H. Gao, L. Lei, J. Liu, Q. Kong, X. Chen, Z. Hu, The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 167 (2004) 213–221.
- [42] J. Tian, J. Liu, J. Zhang, Z. Hu, X. Chen, Fluorescence studies on the interactions of barbaloin with bovine serum albumin, *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (2003) 579–582.

CAPÍTULO 4

COMPUESTOS CON EL CORE

$R_U(\text{III})$ -CICLOPENTADIENILO

$\{R_U CP\}$

COMPUESTOS CON EL *CORE* Ru(II)- CICLOPENTADIENILO {RuCp}

Contenido

4.1	Introducción	143
4.1.1	Compuestos de coordinación de rutenio con el ligando CTZ	146
4.1.2	Compuestos de coordinación de rutenio con ligandos tiosemicarbazona	148
4.2	Compuesto [Ru^{II}Cp(PPh₃)₂(CTZ)](CF₃SO₃)	152
4.2.1	Síntesis	152
4.2.2	Caracterización en estado sólido	153
4.2.2.1	Análisis elemental	153
4.2.2.2	Espectroscopía infrarroja	153
4.2.3	Caracterización en solución	155
4.2.3.1	Conductimetría	155
4.2.3.2	Resonancia magnética nuclear	156
4.2.4	Actividad biológica	161
4.2.4.1	Actividad antiparasitaria	161
4.2.4.2	Citotoxicidad en modelos de células de mamífero	162
4.2.5	Mecanismo de acción	163
4.2.5.1	Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana en <i>T. cruzi</i>	163
4.2.5.2	Interacción con ADN	165
4.2.5.2.1	Estudios de interacción primaria con ADN por medidas de absorción atómica	165
4.2.5.2.2	Estudios de interacción con ADN por medidas de fluorescencia	166

4.2.6	Conclusiones parciales	169
4.3	Compuestos [Ru^{II}Cp(PPh₃)(L)]	169
4.3.1	Síntesis	169
4.3.2	Caracterización en estado sólido	170
4.3.2.1	Análisis elemental	170
4.3.2.2	Espectroscopía infrarroja	171
4.3.3	Caracterización en solución	173
4.3.3.1	Conductimetría	173
4.3.3.2	Resonancia magnética nuclear	174
4.3.3.3	Estudio electroquímico	179
4.3.4	Actividad biológica	183
4.3.4.1	Actividad antiparasitaria	183
4.3.4.1.1	Actividad contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	184
4.3.4.1.2	Actividad contra <i>Trypanosoma brucei</i>	185
4.3.4.2	Citotoxicidad inespecífica en un modelo de células de mamífero	185
4.3.5	Mecanismo de acción	186
4.3.5.1	Generación de especies radicalarias en <i>T. cruzi</i>	186
4.3.5.2	Interacción con ADN	188
4.3.6	Conclusiones parciales	191
4.4	Conclusiones generales del capítulo	191
4.5	Bibliografía	192

Capítulo 4: Compuestos con el *core* Ru(II)-ciclopentadienilo {RuCp}

4.1 Introducción

En el presente capítulo se expone el desarrollo de un grupo de compuestos de coordinación que incluyen al fragmento Ru^{II}- η^5 -ciclopentadienilo (fragmento {RuCp}) y a ligandos con actividad antiparasitaria, en particular, el ligando clotrimazol (CTZ) y tres tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL). En este capítulo se aborda la síntesis y caracterización de estos compuestos, pero además se incluye un estudio de algunas propiedades fisicoquímicas como parte de la caracterización, ya que éstas pueden influir en su aplicación biológica. Se incorpora además la evaluación de la actividad *in vitro* contra los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *T. brucei*, y estudios de citotoxicidad en un modelo de células de mamífero a efectos de estudiar la selectividad de la actividad antiparasitaria. Finalmente, se realizó un estudio de los probables mecanismos de acción antiparasitaria que tendrían los compuestos diseñados.

En capítulos anteriores fueron explicadas en profundidad las ventajas farmacológicas que han mostrado los compuestos organometálicos basados en rutenio, específicamente aquellos compuestos con el fragmento *half-sandwich* {RuCp}. Sin embargo, aún no han sido abordados en profundidad los aspectos químicos detrás de este fragmento organometálico y como éstos influyen en la coordinación a los ligandos bioactivos estudiados.

Los compuestos de coordinación de Ru(II) con el fragmento organometálico η^5 -ciclopentadienilo poseen diversas características, tanto estructurales como electrónicas, que justifican su inclusión en complejos con diversas aplicaciones [1].

El ligando ciclopentadienilo se caracteriza por ser un ligando versátil en la coordinación, es decir, posee diversos modos coordinativos o hapticidad (η). Puede coordinar al centro metálico mediante la interacción con uno de sus átomos de carbono del anillo o hapticidad 1 (η^1), tres átomos de carbono (η^3) o con los cinco átomos de carbono del anillo (η^5) (figura 4.1 a) [2]. En el fragmento organometálico {RuCp} el ligando ciclopentadienilo presenta hapticidad cinco, interactuando con tres de los seis sitios de coordinación del ion metálico de rutenio. Esta coordinación del ligando genera una estructura muy

característica de este fragmento denominada estructura *piano-stool* o taburete de piano. Éste y otros fragmentos organometálicos {Ru-areno} de estructura *piano-stool*, se caracterizan por generar compuestos estables que cumplen la regla de los 18 electrones [2]. En la figura 4.1 b se muestra la estructura *piano-stool* del fragmento organometálico {RuCp}, donde se puede observar que alrededor del átomo central quedan disponibles tres sitios de coordinación para reaccionar con otros ligandos.

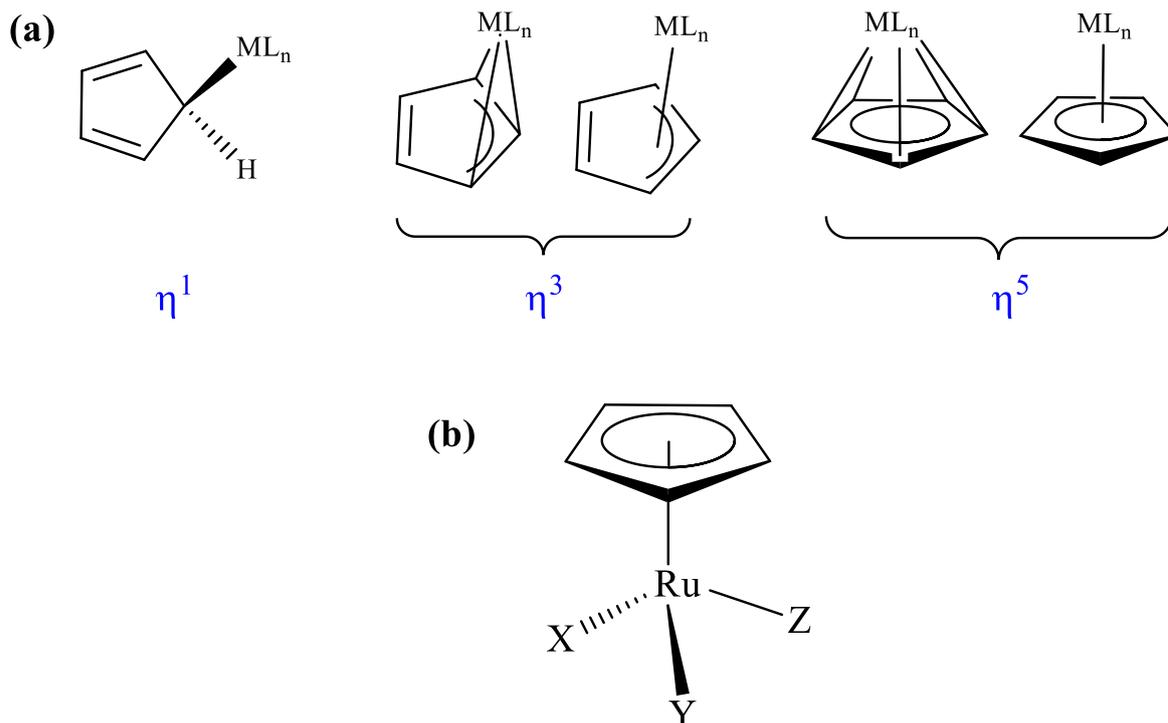


Figura 4.1: (a) Modos de coordinación o hapticidad del ligando ciclopentadienilo. (b) Estructura *piano-stool* o taburete de piano del fragmento organometálico {RuCp}.

Un conocido compuesto organometálico con el fragmento {RuCp}, y que posee todas las características anteriormente mencionadas, es el complejo [Ru^{II}CpCl(PPh₃)₂] (figura 4.2). Este complejo de coordinación es un compuesto estable que se genera por la alta afinidad que tiene el centro metálico de Ru(II) por ligandos blandos como lo son la trifenilfosfina (PPh₃) y el ciclopentadienilo (Cp). Las características estructurales y electrónicas de este compuesto hacen que los ligandos trifenilfosfina y cloruro sean relativamente lábiles en la estructura, generando así una alta capacidad de interacción del fragmento {RuCp} con otros ligandos [3]. Estas características han convertido al complejo [Ru^{II}CpCl(PPh₃)₂] en un excelente precursor de numerosos complejos organometálicos {RuCp} con

aplicaciones en diversas áreas como la catálisis [1,4–6], la química de materiales [7], la óptica no lineal [8–10], la química inorgánica medicinal, entre otras [11].

En este último punto, el compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$ ha sido utilizado como precursor de numerosos complejos organometálicos con actividad antitumoral. Gran parte de estos complejos fueron sintetizados por Morais y col., quienes utilizando este compuesto como precursor han dado origen a una gran variedad de complejos de coordinación con ligandos bidentados del tipo N,O [12] y N,N [12,13], o con ligandos monodentados derivados de imidazol [14–16] (figura 4.2). Para la síntesis de todos estos compuestos se utilizó la sal de AgCF_3SO_3 para facilitar la eliminación del ligando cloruro de la esfera de coordinación (precipitando como AgCl), y a su vez la especie CF_3SO_3^- actuó como contraión de estos complejos catiónicos. Todas estas moléculas mantuvieron características químico-estructurales comunes entre sí. Por ejemplo, se mantuvo el estado de oxidación (II) del centro metálico, la hapticidad 5 del ligando ciclopentadienilo no fue modificada, y en todos los compuestos se mantuvo la singular estructura de *piano-stool* del fragmento organometálico. A partir de este precursor también se han diseñado complejos con otras características estructurales, como son los compuestos poliméricos de $\{\text{RuCp}\}$ [17].

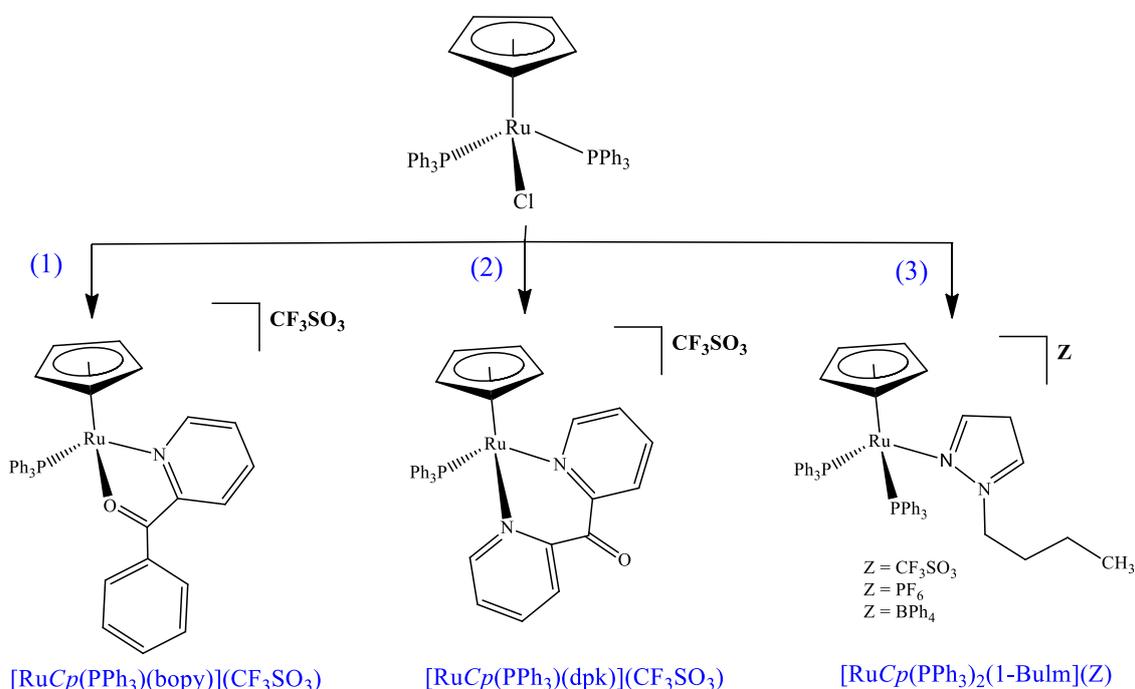


Figura 4.2: Ejemplos de compuestos organometálicos $\{\text{RuCp}\}$ sintetizados a partir del precursor $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$ utilizando ligandos del tipo (1) N,O, (2) N,N y (3) N-imidazol.

En este Trabajo de Tesis se desarrollaron compuestos con el fragmento {RuCp} incluyendo un ligando derivado del imidazol (con N como donador) y tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (ligandos bidentados N,S).

4.1.1 Compuestos de coordinación de rutenio con el ligando CTZ

En los últimos años se han desarrollado numerosos compuestos de coordinación con actividad biológica de rutenio con ligandos derivados de azol. Los azoles son compuestos aromáticos heterocíclicos de cinco miembros que contienen un átomo de nitrógeno y al menos otro átomo distinto de carbono como parte del anillo, pudiendo ser ese otro átomo nitrógeno, oxígeno o azufre [18,19]. Aquellos azoles que incluyen dos átomos de nitrógeno en el anillo heterocíclico son denominados imidazoles, y se caracterizan por ser compuestos muy abundantes en la naturaleza y formar parte de diversas biomoléculas, como por ejemplo el aminoácido histidina. Desde el punto de vista de la química de coordinación, los imidazoles son considerados excelentes ligandos debido a que poseen electrones disponibles, en los átomos de nitrógeno, para coordinar a diferentes centros metálicos. Es así que se han desarrollado numerosos compuestos de coordinación con estos ligandos y centros metálicos de Au, Ir, Rh, Pt, Cu, entre otros [20,21]. Los ligandos imidazoles son considerados, generalmente, como un moderado dador sigma (σ -dador) y un débil aceptor pi (π -aceptor), lo que se traduce en que en la serie de ligandos N-donores posean un nivel de basicidad intermedio entre el amoníaco y la piridina [22,23].

Numerosos imidazoles han mostrado ser activos en diversas patologías, lo que ha fomentado su utilización como ligandos bioactivos en compuestos de coordinación. Entre los imidazoles más utilizados, y tal como se mencionó en capítulos previos, se encuentran ketoconazol, benzimidazol (uno de los fármacos antichagásicos, figura 1.18 del capítulo 1) y clotrimazol (figura 2.6 del capítulo 2). En particular este último compuesto, el clotrimazol (CTZ), es un clásico ligando bioactivo monodentado, que coordina a través del átomo de nitrógeno N1, y se ha utilizado como ligando de numerosos complejos de rutenio con diversas propiedades biológicas.

Los primeros complejos de interés biológico Ru-CTZ fueron desarrollados por Sánchez-Delgado y col. Éstos incluían centros metálicos Ru(II) o Ru(III). Algunos de los compuestos desarrollados por este grupo son los complejos (*cis, fac*-[Ru^{II}Cl₂(dmsó)₃(CTZ)], *cis, cis, trans*-[Ru^{II}Cl₂(dmsó)₂(CTZ)₂], Na[Ru^{III}Cl₄(dmsó)(CTZ)]

y Na[*trans*-Ru^{III}Cl₄(CTZ)₂] (figura 4.3). Específicamente, los compuestos de Ru(II) formaron complejos de bajo spin con una elevada estabilidad, similar a los complejos de Fe(II) producidos en sistemas biológicos [23]. Los complejos sintetizados por este grupo de investigación, resultaron ser aniónicos o neutros. En todos los compuestos se mantuvo el entorno geométrico octaédrico y el estado de oxidación (II) del centro metálico.

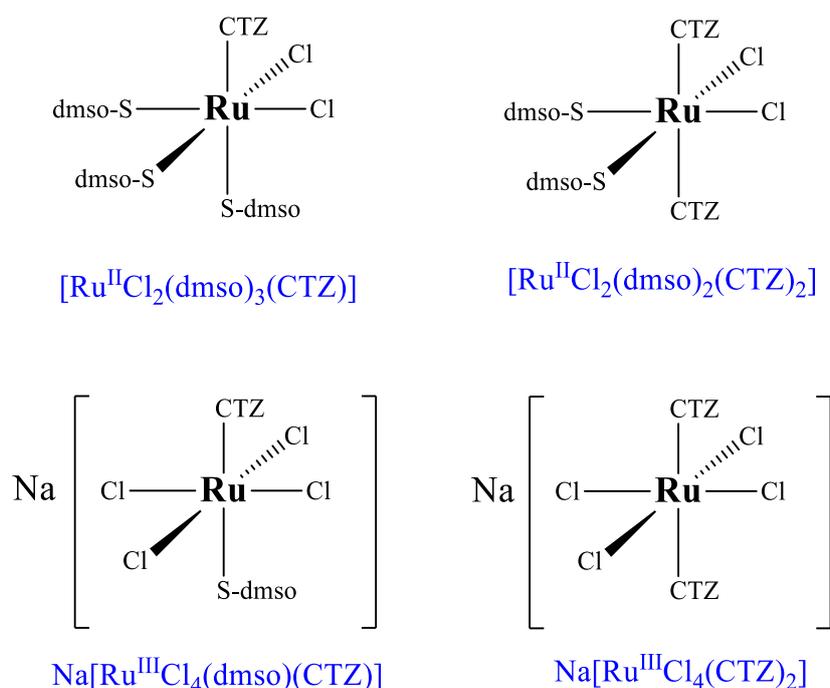


Figura 4.3: Algunos complejos de coordinación Ru-CTZ desarrollados por Sánchez-Delgado y col.

Posteriormente, ese grupo desarrolló compuestos organometálicos que incluían el fragmento {Ru^{II}-*p*-cimeno} y el ligando CTZ (figura 2.9, capítulo 2). La presencia del ligando areno en la estructura proporcionó una elevada estabilidad, y los compuestos mostraron interesantes propiedades fisicoquímicas y biológicas. La esfera de coordinación del átomo metálico central se completó con el ligando CTZ coordinado de forma monodentada a través del átomo de nitrógeno N1 y los otros coligandos, generando finalmente una geometría pseudo octaédrica alrededor del átomo de rutenio. Todos los complejos Ru^{II}(*p*-cimeno)-CTZ mantuvieron la estructura característica de *piano-stool*, con el ligando organometálico ocupando tres sitios de coordinación.

4.1.2 Compuestos de coordinación de rutenio con ligandos tiosemicarbazona

En los últimos años ha crecido considerablemente el desarrollo de compuestos de coordinación con ligandos tiosemicarbazona, tanto de centro metálico de rutenio como de otros metales de transición [24,25]. Las tiosemicarbazonas son moléculas derivadas de iminas formadas mediante reacción de condensación entre un aldehído (o cetona) y una tiosemicarbazida. Estas moléculas son consideradas muy buenos ligandos ya que poseen una gran versatilidad y flexibilidad, lo que facilita la coordinación a iones metálicos. Se han reportado numerosos complejos con este tipo de ligandos, en los cuales se han observado diversos modos de coordinación. En la figura 4.4 se muestran algunos ejemplos de la variedad de coordinación que se ha observado en complejos metálicos con tiosemicarbazonas. Estos modos son determinados preferentemente por la naturaleza del centro metálico y las condiciones de síntesis del complejo [26].

La coordinación usualmente observada en estos ligandos es bidentada a través del átomo de azufre tiocarbonílico y el átomo de nitrógeno azometínico, generando una estructura de anillo de cinco miembros (figura 4.4, (modo (1)) [27–31]. En este modo de coordinación la tiosemicarbazona puede actuar como ligando neutro o aniónico debido a la pérdida del protón hidrazínico (N-H). La coordinación bidentada también se puede efectuar a través del nitrógeno hidrazínico y el azufre tiocarbonílico (modo (2)), generando un anillo de cuatro miembros mucho más rígido y menos favorable que el modo (1) comúnmente observado [32,33]. Si la tiosemicarbazona contiene un tercer sitio coordinativo (D) ubicado en una posición que posibilite la coordinación, podría actuar como un ligando tridentado (modo (3)) [34,35]. La versatilidad que posee también le permite actuar como un ligando puente mediante el átomo de azufre (μ -S) (modo (4)) formando así compuestos dinucleares [36] o polinucleares [37]. También pueden actuar como ligando monodentado donde la coordinación se realiza sólo a través del átomo de azufre [38,39]. En el presente capítulo se hará énfasis en el modo (1) de coordinación, sin embargo, en capítulos posteriores se ahondará más en detalle en alguno de los otros modos de coordinación.

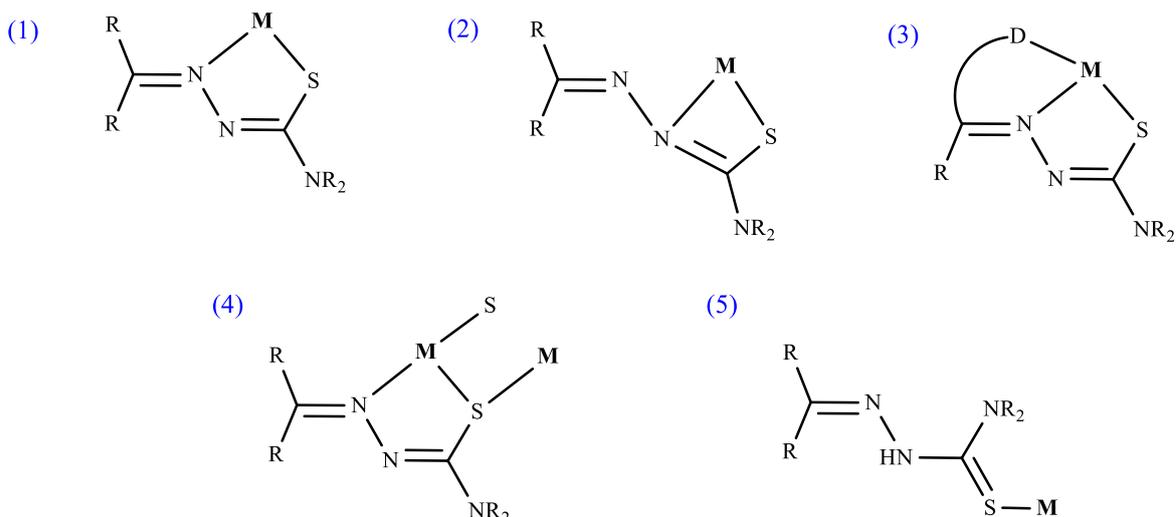


Figura 4.4: Modos de coordinación comúnmente observados en complejos metálicos con tiosemicarbazonas.

En cuanto al desarrollo específico de compuestos organometálicos de rutenio con ligandos tiosemicarbazona, el diseño se ha enfocado fundamentalmente hacia complejos con el fragmento organometálico $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-}p\text{-cimeno}\}$. En la figura 4.5 se muestran algunos ejemplos de los compuestos que han sido desarrollados, donde cabe destacar los sintetizados por Beckford y col., quienes obtuvieron un gran número de complejos con este fragmento organometálico y tiosemicarbazonas derivadas de antraldehído (ATSC) y derivadas de piperonal (pPhTSC) [40,41]. Wei Su y col. sintetizaron también complejos de $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-}p\text{-cimeno}\}$ con tiosemicarbazonas derivadas de 4-fluoro benzaldehído y tiosemicarbazonas derivadas del benzaldehído (HL) [42,43]. Otros complejos sintetizados con este fragmento organometálico fueron los desarrollados por N. Raja y col. quienes utilizaron ligandos derivados de feniltiosemicarbazonas [44].

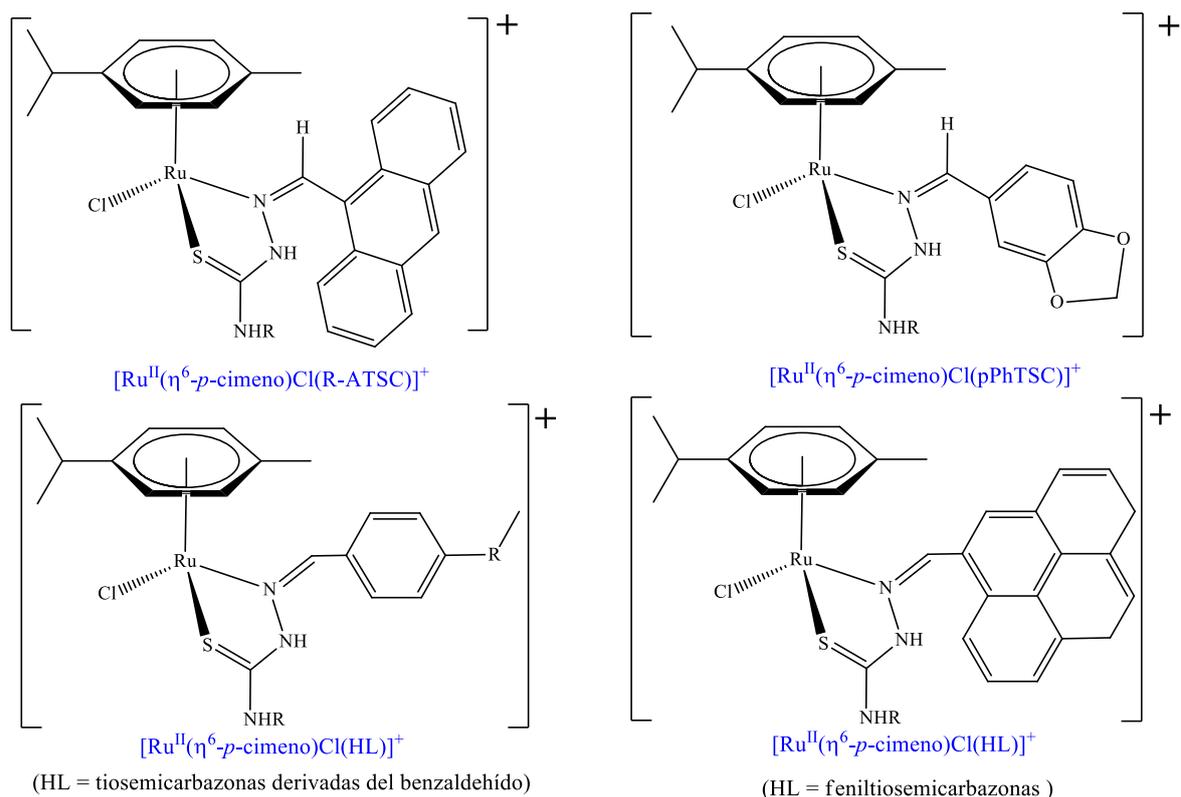


Figura 4.5: Ejemplo de algunos complejos organometálicos $\{Ru^{II}\text{-}p\text{-cimeno}\}$ con diversas tiosemicarbazonas.

Aunque el diseño de estos complejos fue enfocado hacia diferentes aplicaciones, todos ellos poseen características comunes. En todos estos complejos los ligandos tiosemicarbazona coordinaron de forma neutra (HL) y bidentada (a través del átomo de azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico, modo (1)), se mantuvo la configuración *piano-stool* del fragmento organometálico, no se modificó el estado de oxidación (II) ni la geometría pseudo octaédrica del átomo metálico central.

En la búsqueda bibliográfica realizada, no se encontraron estructuras reportadas de complejos con el fragmento $\{RuCp\}$ y tiosemicarbazonas.

Las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL) utilizadas en este capítulo fueron sintetizadas previamente por parte de nuestro grupo de investigación y han sido ampliamente estudiadas por éste (figura 4.6) [45].

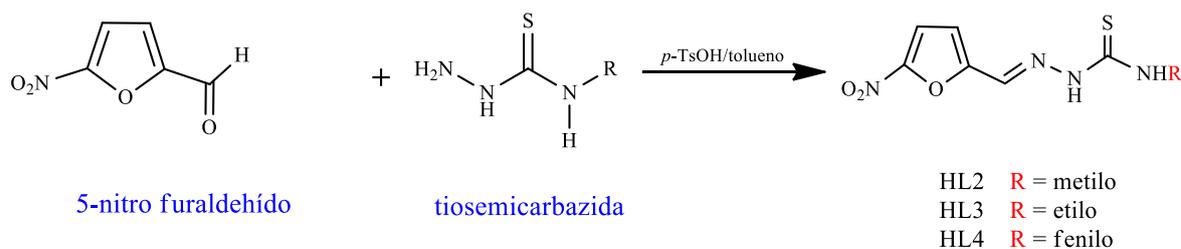


Figura 4.6: Reacción de condensación para la síntesis de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro furaldehído utilizadas como ligandos en los complejos $\{RuCp\}$.

Durante los últimos 15 años se han utilizado estas moléculas como ligandos en numerosos complejos de coordinación de diferentes centros metálicos [24,25,46–48]. Específicamente, el grupo de investigación ha desarrollado diferentes familias de compuestos de coordinación con el ion central de rutenio. Los primeros compuestos sintetizados fueron tres series de complejos de fórmula $[Ru^{II}Cl_2(HL)_2]$, $[Ru^{III}Cl_3(dmsO)(HL)]$ y $[Ru^{III}Cl(PPh_3)(L)_2]$ (figura 4.7) [47]. En esta serie de compuestos, el estado de oxidación del ion metálicos central quedó determinada tanto por la naturaleza del precursor de rutenio como por la relación molar (Ru: tiosemicarbazona) empelada en la síntesis. Posteriormente, se sintetizó otra serie de complejos de Ru(II) con estas tiosemicarbazonas, incluyendo en la esfera de coordinación al ligando PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano). En estos compuestos, de fórmula $[Ru^{II}Cl_2(HL)(HPTA)_2]Cl_2$, la inclusión del ligando PTA permitió aumentar considerablemente la solubilidad en agua de los complejos ($S > 10$ mM) [46]. En estos 15 complejos de rutenio con los ligandos tiosemicarbazona derivadas del 5-nitro furaldehído, se observó siempre una coordinación bidentada hacia el átomo metálico a través del azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico. En algunos casos coordinaron como ligandos neutro (HL), y en otros como ligandos monoaniónico (L).

Por último, se obtuvieron los complejos organometálicos $[Ru^{II}_2(p\text{-cimeno})_2(L)_2]X_2$ ($X = Cl$ o PF_6) (figura 2.10, capítulo 2) en los cuales se observó también que los ligandos tiosemicarbazona coordinaron de forma bidentada al centro de Ru(II) [49,50].

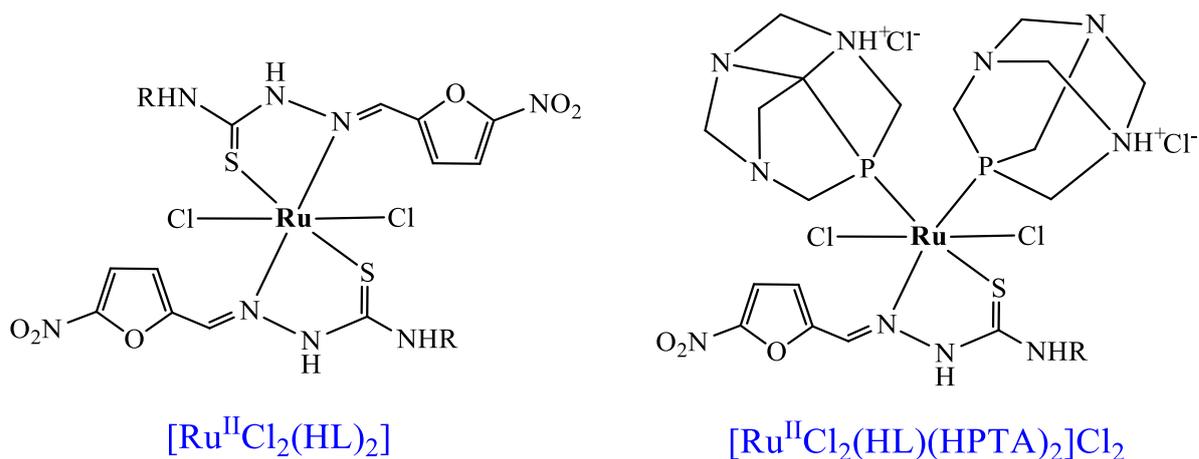


Figura 4.7: Ejemplo de algunos complejos de rutenio con las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurraldehído.

4.2. Compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$

4.2.1 Síntesis

A partir del método experimental de síntesis detallado en el capítulo 3, se preparó el compuesto de fórmula $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$, que de aquí en más se codificará como RuCpCTZ (figura 4.8). Similar a lo expuesto en la introducción a este capítulo, el complejo se obtuvo a partir del precursor $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{CpCl}(\text{PPh}_3)_2]$ el cual se hizo reaccionar con AgCF_3SO_3 , que luego de observar la precipitación de AgCl , se añadieron cantidades equimolares del ligando CTZ. Se obtuvo una masa de 190 mg de un sólido amarillo equivalente a un 32 % de rendimiento de reacción.

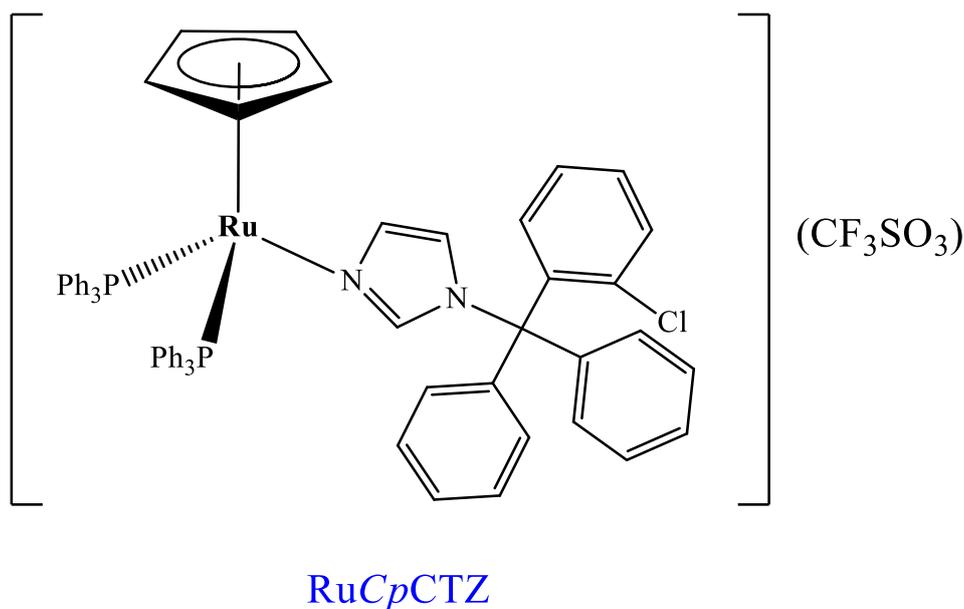


Figura 4.8: Estructura del compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$.

4.2.2 Caracterización en estado sólido

4.2.2.1 Análisis elemental

La fórmula global propuesta para el complejo RuCpCTZ fue $\text{C}_{64}\text{H}_{52}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{P}_2\text{RuS}$. Los resultados del análisis elemental de C, H, N y S se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Resultados de análisis elemental de C, H, N y S del complejo RuCpCTZ.

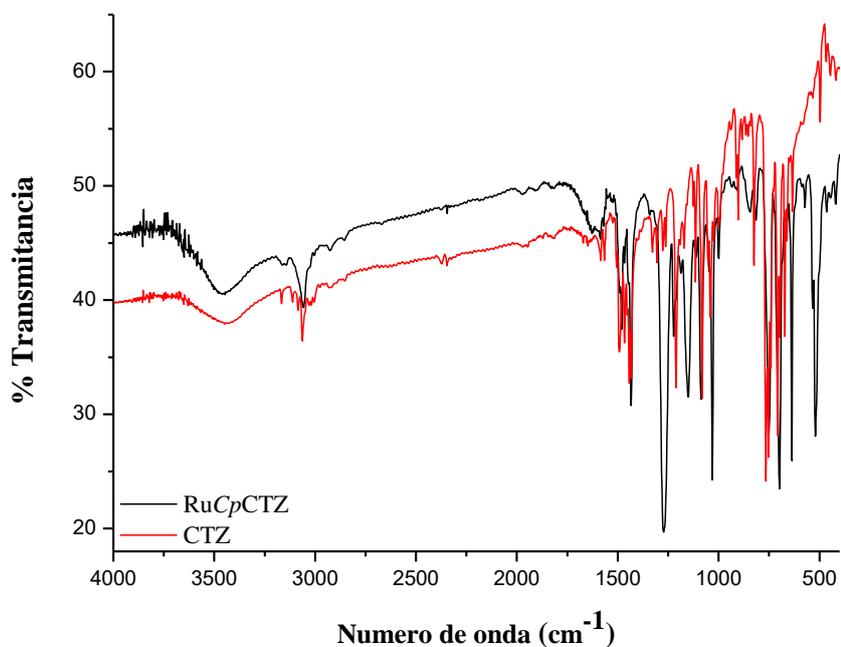
	%C	%H	%N	%S
Teórico	64,89	4,42	2,36	2,71
Experimental	64,75	4,44	2,38	2,67

Comparando los valores porcentuales teóricos para la fórmula propuesta con los valores experimentales del compuesto sintetizado, los resultados indican que la fórmula del compuesto efectivamente corresponde a $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$.

4.2.2.2 Espectroscopía infrarroja

En la figura 4.9 se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos para el complejo $RuCpCTZ$ y para el ligando CTZ, medidos en un rango entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$ en pastillas de KBr.

(a)



(b)

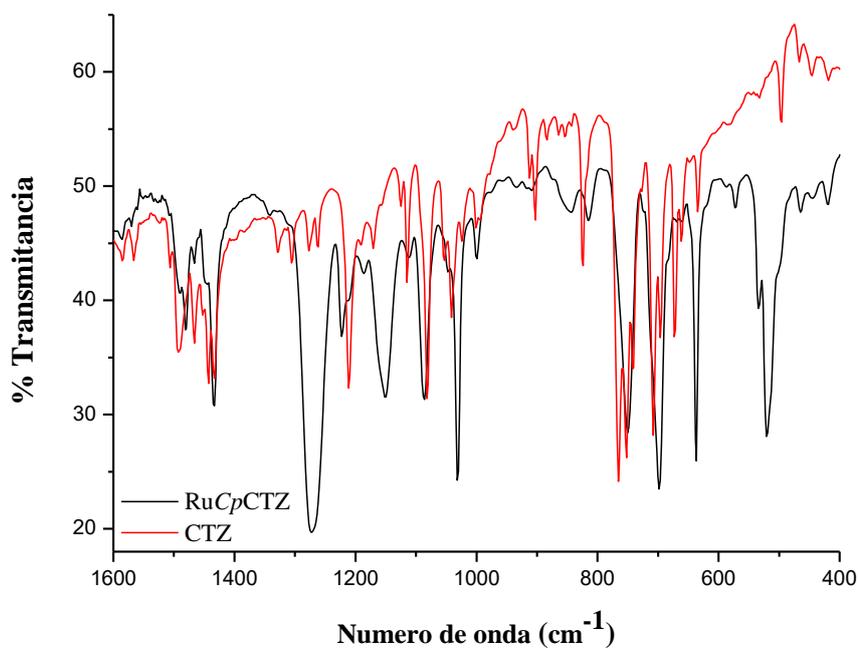


Figura 4.9: Espectros FTIR del complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)_2(CTZ)](CF_3SO_3)$ y del ligando CTZ en un rango de (a) $4000-400\text{ cm}^{-1}$ y (b) una ampliación entre $1600-400\text{ cm}^{-1}$.

Las bandas IR del complejo RuCpCTZ fueron asignadas según lo reportado en trabajos previamente desarrollados con estos mismos ligandos, siendo posible la identificación de las bandas características del ligando CTZ, del fragmento {RuCp} y del contraión triflato [13,21,51–53].

En el espectro de la figura 4.9 a se observa, a nivel general, un corrimiento de las señales del ligando CTZ como resultado de su coordinación al fragmento organometálico. En la zona hacia altos valores de número de onda, específicamente cercana a los 3055 cm⁻¹, se encuentran las bandas de estiramiento C-H de los anillos aromáticos del CTZ, y también las correspondientes al anillo ciclopentadienilo [51]. En la zona entre 1590-1430 cm⁻¹ (figura 4.9 b) se encuentran las bandas características de los estiramientos C=N y C=C del ligando CTZ. Los corrimientos observados de estas bandas son concordantes con la coordinación monodentada del ligando al centro metálico [21,52,53].

El espectro del complejo muestra nuevas bandas de vibración no pertenecientes al ligando CTZ. Un grupo de tres bandas ubicadas en 1273, 696 y 520 cm⁻¹ corresponden a las bandas características del contraión CF₃SO₃⁻ [13].

Las bandas anteriormente mencionadas se resumen en la tabla 4.2.

Tabla 4.2: Asignación tentativa de las principales bandas del espectro FTIR del complejo [Ru^{II}Cp(PPh₃)₂(CTZ)](CF₃SO₃) y del ligando CTZ en su forma libre

Compuesto	v(C-H) areno	v(C=N) y v(C=C)	CF ₃ SO ₃
CTZ	3063	1585,1566,1492,1453,1434	-
RuCpCTZ	3055	1585,1571,1479,1446,1430	1273,696,520

4.2.3 Caracterización en solución

4.2.3.1 Conductimetría

La conductividad molar, medida en una solución de complejo de concentración 1mM en DMSO, fue de 35 S cm² mol⁻¹. El valor obtenido se encuentra dentro de los rangos de valores que señalan la presencia de electrolitos 1:1 en solución, tal como se propone para el complejo catiónico RuCpCTZ [54].

4.2.3.2 Resonancia magnética nuclear

La caracterización estructural en solución del compuesto RuCpCTZ se realizó por medidas de RMN unidimensional (^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{31}P -RMN) y bidimensional (COSY y HSQC) a temperatura ambiente en soluciones de DMSO-d_6 . En la figura 4.10 se muestra el esquema de cómo se enumeraron los átomos del ligando CTZ.

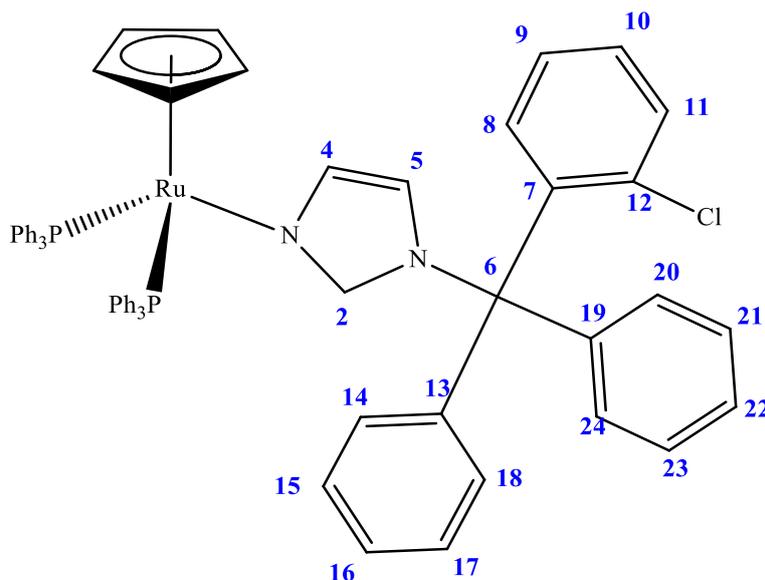


Figura 4.10: Esquema de numeración del ligando CTZ en el complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$.

En relación al espectro ^1H -RMN, el compuesto mostró una alta complejidad debido a que la mayoría de las señales se encuentran en un rango entre 7,75-6,65 ppm (figura 4.11). La asignación de las señales de los protones del ligando CTZ se realizó mediante comparación con el ligando en su forma libre y con otros complejos Ru^{II} -CTZ previamente estudiados por esta técnica. Los trabajos reportados por Sánchez-Delgado y colaboradores, han demostrado que, a excepción de los protones adyacentes al nitrógeno coordinado del grupo imidazol, los protones de los anillos aromáticos no se ven afectados debido a la coordinación al centro metálico de $\text{Ru}(\text{II})$ [21,52,55]. Este mismo comportamiento fue observado en el espectro del compuesto RuCpCTZ , donde no se observaron grandes modificaciones en los desplazamientos químicos de las señales por efecto de la coordinación (tabla 4.3). Como era de esperarse, las señales de los protones H2 y H4 mostraron un corrimiento significativo en los valores de desplazamiento químico ($\Delta\delta$ de 0,31 y 0,16 ppm, respectivamente) con respecto al ligando en su forma libre. Estos

corrimientos son indicativos de una coordinación monodentada al ion metálico central a través del nitrógeno del grupo imidazol del ligando CTZ. Esta modificación de los desplazamientos químicos (δ) como consecuencia de la coordinación, también fue observado en otros complejos de estructura *piano stool* con el fragmento organometálico {RuCp} y ligandos N-donores [13], y también en compuestos Ru^{II}- η^6 -areno con ligandos piridilpirazol, piridilimidazol [56] y derivados de fenozazina y antraceno (ligandos que también coordinan a través de átomos de nitrógeno de anillos heteroaromáticos) [57].

Por otro lado, la señal de resonancia observada en el espectro a 4,50 ppm (de multiplicidad singulete equivalente a cinco protones) fue atribuida a los protones del anillo del ligando ciclopentadienilo. La equivalencia de estos cinco protones es concordante con la hapticidad cinco del ligando Cp al coordinar al centro metálico de rutenio [12,15].

También fue posible asignar los multipletes correspondientes a los protones de los anillos aromáticos de los dos ligandos trifenilfosfina (PPh₃). Debido a la complejidad en esta zona del espectro, y para facilitar la asignación de estas señales, el análisis fue acompañado por experimentos de acoplamiento homonuclear ¹H-¹H COSY. En este espectro bidimensional (figura 4.12) se puede observar los acoplamientos comúnmente observados entre los multipletes de las señales de los protones de los tres anillos aromáticos del ligando PPh₃.

En la tabla 4.3 se resumen los valores de desplazamiento químico de todas las señales asignadas en el espectro, tanto para el complejo RuCpCTZ como para el ligando CTZ.

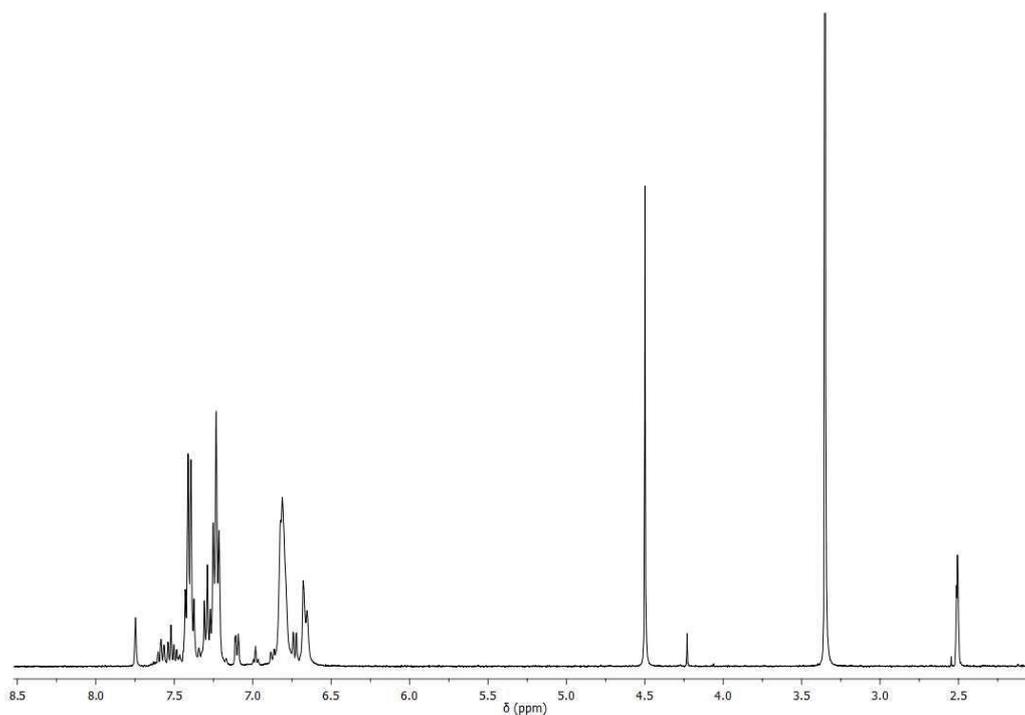


Figura 4.11: Espectro ^1H -RMN de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ en solución de DMSO-d_6 a 30°C .

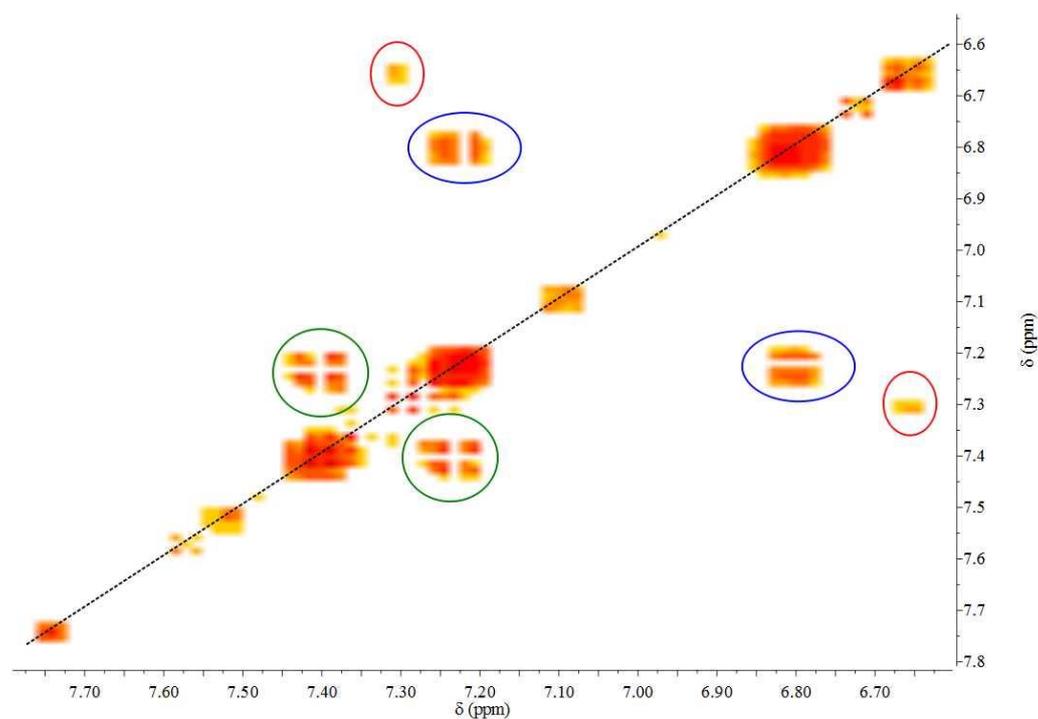


Figura 4.12: Espectro ^1H - ^1H COSY de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ en solución de DMSO-d_6 a 30°C .

Tabla 4.3: Valores de desplazamiento químico (δ) en ppm para el compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ y el ligando CTZ medidos en solución de DMSO- d_6 a 30°C .

Protón	δ_{H} (integración, multiplicidad)		$\Delta\delta$
	CTZ	$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$	
H2	7,44 (1, t)	7,75 (1, s)	0,31
H4	6,91 (1, t)	7,07 (1, dd)	0,16
H5	6,73 (1, t)	6,72 (1, dd)	-0,01
H8	6,80 (1, d)	6,79 (1, m)	-0,01
H11	7,40 (1, t)	7,38 ^a (1, m)	-0,002
H9, H10, H14, H16, H18. H20, H22, H24	7,32 (8, m)	6,79 (8, m)	0,47
H15, H17, H21, H23	7,01 (4, m)	6,66 (4, m)	-0,35
Cp	-	4,50 (5, s)	-
PPh₃	-	7,38 (12, m), 7,27 (6, m), 7,21 (12, m)	-
^a : Solapado con señales de PPh ₃			

Con respecto al espectro de ^{13}C -RMN (figura 4.13), también se observó una alta complejidad en un rango entre 127-138 ppm, lo que dificultó la identificación inequívoca de todos los átomos de carbono en la estructura. En este rango de desplazamiento químico se encuentran las señales correspondientes a los átomos de carbono de los ligandos CTZ y PPh₃. Para facilitar la asignación de estas señales, se realizaron experimentos bidimensionales de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC. En este espectro (figura 4.14) se identificó claramente el acoplamiento entre H2-C2 (7,75-138,2 ppm) y entre H4-C4 (7,07-130,0 ppm) del ligando CTZ. De igual forma a lo observado en el espectro ^1H -RMN, estas dos señales del ligando CTZ son las que sufren las mayores variaciones por la coordinación [55]. Fuera de este rango de señales se observó a 83,2 ppm una única señal correspondiente a los átomos de carbono del anillo ciclopentadienilo [56] y a 121,9 ppm la señal correspondiente al carbono del contraión CF_3SO_3^- [58].

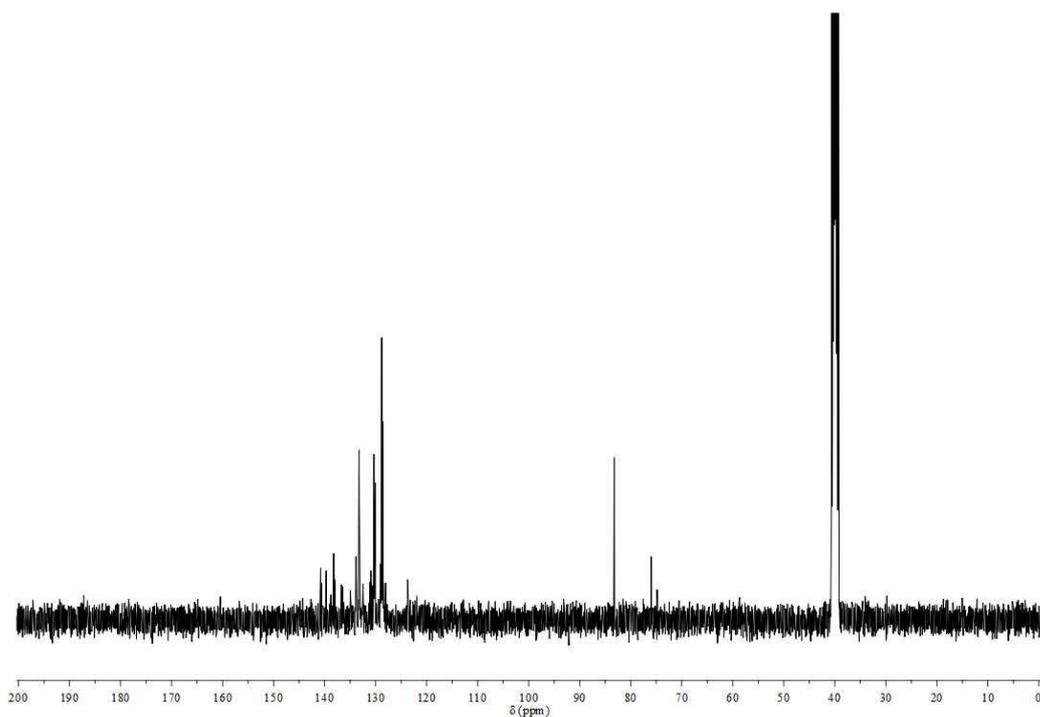


Figura 4.13: Espectro ^{13}C -RMN de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ en solución de DMSO-d_6 a 30°C .

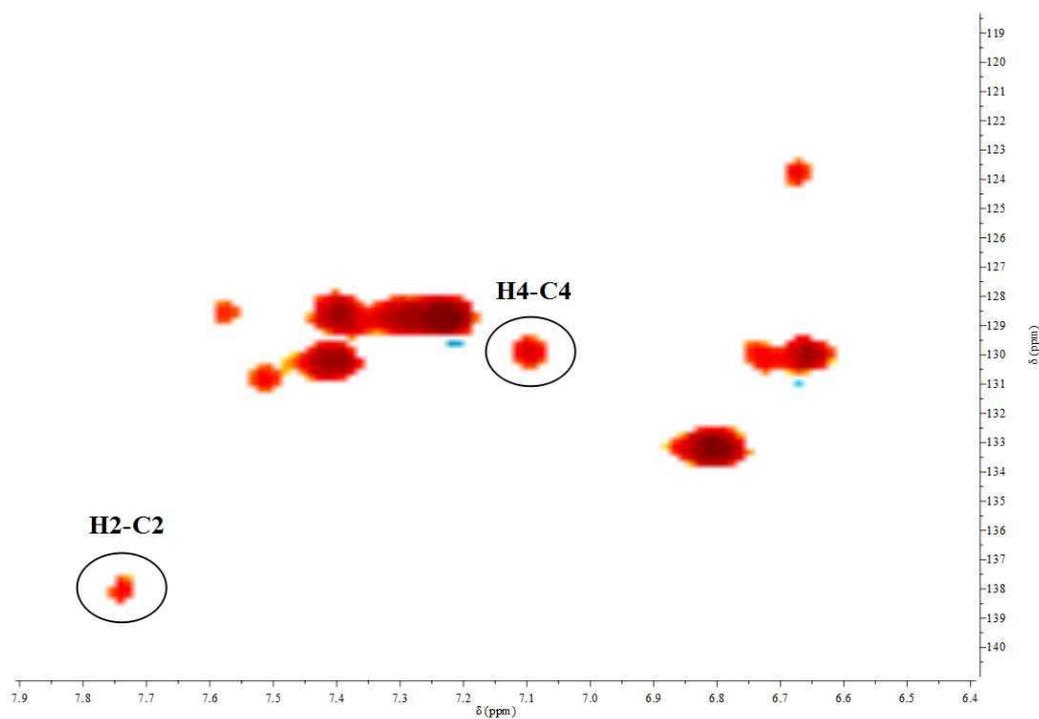


Figura 4.14: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ en solución de DMSO-d_6 a 30°C .

Finalmente, en el espectro ^{31}P -RMN, se observó una única y aguda señal a 41 ppm correspondiente a los dos ligandos trifenilfosfina. Esta única señal demuestra la equivalencia existente entre ambos ligandos PPh_3 en la estructura del complejo.

4.2.4 Actividad biológica

4.2.4.1 Actividad antiparasitaria

La actividad antiparasitaria del complejo RuCpCTZ fue evaluada en la forma epimastigota (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi* y en la forma infectiva de *Trypanosoma brucei brucei* (cepa 427). En ambos estudios se incluyó el ligando CTZ en su forma libre para comparar la actividad de éste con la del complejo. Los resultados obtenidos en los estudios se resumen en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Actividad *in vitro* (expresada en valores de IC_{50}) del compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ y del ligando CTZ contra *T. cruzi* y *T. brucei*, citotoxicidad en macrófagos murinos e índices de selectividad (IS).

Compuesto	<i>T. cruzi</i> IC_{50} (μM)	<i>T. brucei</i> IC_{50} (μM)	Macrófagos IC_{50} (μM)	IS ^a	IS ^b
RuCpCTZ	$0,25 \pm 0,08$	$0,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	8	3
CTZ	$1,8 \pm 0,4$	> 25	$55,1 \pm 0,5$	31	< 2

^a: $\text{IS} = \text{IC}_{50}$ en macrófagos/ IC_{50} en *T. cruzi*
^b: $\text{IS} = \text{IC}_{50}$ en macrófagos/ IC_{50} en *T. brucei*
 Los resultados corresponden al valor medio de tres experimentos diferentes e independientes

El estudio de inhibición de la proliferación de *T. cruzi* reveló que el complejo RuCpCTZ posee una elevada actividad citotóxica sobre el parásito, con un valor de IC_{50} que se encuentra en el rango submicromolar. Al comparar este valor de actividad con el obtenido para el ligando libre, se observa que la inclusión del fragmento organometálico $\{\text{RuCp}\}$ aumenta hasta seis veces la actividad citotóxica sobre el parásito. Además, el complejo mostró un incremento de la actividad antiparasitaria de hasta 30 veces en comparación al fármaco tripanosomicida de referencia Nifurtimox ($\text{IC}_{50} = 8,0 \mu\text{M}$) [59]. Además, cabe destacar que el complejo RuCpCTZ mostró una actividad citotóxica sobre epimastigotas

de *T. cruzi* superior a la obtenida en los estudios de otros complejos Ru^{II}-CTZ, tanto clásicos como organometálicos, previamente estudiados [52].

Con respecto a la evaluación de la actividad sobre *T. brucei*, el estudio reveló que el complejo RuCpCTZ es activo contra el parásito, mostrando un efecto del tipo dosis-dependiente. Al igual que para *T. cruzi*, la complejación del ligando CTZ al fragmento organometálico {RuCp} provocó un aumento de la actividad citotóxica de hasta 40 veces sobre la forma infectiva del parásito. Este resultado indicaría que la coordinación del fragmento organometálico al ligando CTZ juega un papel determinante en la actividad biológica contra *T. brucei*.

Por otra parte, los valores de IC₅₀ obtenidos para el ligando CTZ señalan que esta molécula, posee una actividad citotóxica superior en *T. cruzi* que en *T. brucei*. Estos resultados se pueden correlacionar, y están de acuerdo, con el contenido de esteroides que posee cada especie estudiada, y también con la etapa del ciclo de vida del parásito utilizado en el estudio *in vitro*. En la etapa de epimastigotas del ciclo de vida de *T. cruzi*, los parásitos contienen cerca de un 40 % de ergosterol, mientras que *T. brucei* contiene predominantemente colesterol, incorporado del medio por un mecanismo de endocitosis mediado por receptores [60]. El mismo análisis puede ser extrapolado al complejo RuCpCTZ, para el que se observó también una mayor actividad citotóxica contra *T. cruzi* que contra *T. brucei*.

4.2.4.2 Citotoxicidad en modelos de células de mamífero

Para estudiar la selectividad de la actividad tripanosomicida del complejo, se evaluó la actividad citotóxica de éste y del ligando libre en un modelo de células mamíferas. Los estudios se realizaron sobre una línea de macrófagos murinos (J774). Los resultados de citotoxicidad (expresada en el valor de IC₅₀) permitieron conocer la selectividad que tienen los compuestos hacia ambos parásitos. La selectividad fue analizada mediante el índice de selectividad (IS), que corresponde a la relación entre el valor de IC₅₀ obtenido en macrófagos y el IC₅₀ obtenido en los parásitos. Una mayor selectividad se ve reflejada en un mayor valor de IS. Los resultados de la actividad citotóxica en este modelo de células de mamífero y de los correspondientes índices de selectividad se muestran en la tabla 4.4.

Los resultados muestran que si bien el compuesto RuCpCTZ presentó una mayor citotoxicidad en macrófagos que el ligando CTZ, el complejo mostró una moderada selectividad hacia ambos parásitos (*T. cruzi* y *T. brucei*).

4.2.5 Mecanismo de acción

Basándose en una de las hipótesis planteada para el diseño de los compuestos de coordinación con actividad biológica, la coordinación del ligando bioactivo, en este caso el ligando CTZ, al fragmento organometálico farmacológicamente relevante, {RuCp}, generaría un compuesto final con un mecanismo de acción dual o múltiple, afectando a diferentes blancos o procesos biológicos significativos para el parásito. El compuesto RuCpCTZ podría actuar a nivel del blanco propio del ligando bioactivo (inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana en *T. cruzi*) y a nivel de otro blanco asociado a la presencia del metal, como el ADN, conduciendo así a efectos aditivos. Por lo tanto, se realizaron estudios para obtener información sobre el probable mecanismo de acción antiparasitario del complejo RuCpCTZ, analizando ambos potenciales blancos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.2.5.1 Inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana en *T. cruzi*

Los esteroides de la membrana celular de *T. cruzi* son esenciales para conservar la integridad estructural y el normal funcionamiento del parásito. La biosíntesis de estos esteroides implica al menos 20 etapas metabólicas donde algunos pasos involucran enzimas específicas que difieren entre las células mamíferas y las de tripanosomátidos (figura 2.8 del capítulo 2). La inhibición de alguna de estas enzimas es una estrategia frecuentemente utilizada en la búsqueda de nuevos agentes antichagásicos [61–63]

Para estudiar si el complejo RuCpCTZ participa en la inhibición de esta biosíntesis, o dicho de otra forma, si el mecanismo de acción antiparasitario propio del ligando bioactivo se mantiene en el complejo, se realizó un estudio de inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana (BEM) en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2).

Como se mencionó en el capítulo 3, se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* con el complejo o con el ligando CTZ durante 72 horas a una concentración equivalente al valor de IC₅₀ obtenido en el estudio *in vitro* en *T. cruzi*. Posteriormente se extrajeron los

esteroles de los parásitos y dichos extractos lipídicos se sembraron en una placa cromatográfica de capa fina (TLC). Como control positivo se incluyó un cultivo de parásitos tratados con un compuesto llamado terbinafina. La terbinafina es un inhibidor de la enzima escualeno epoxidasa, también conocida como escualeno mono-oxigenasa, la cual cataliza la epoxidación de escualeno a (3S)-2,3-óxidoescualeno [61] (reacción (2) de la figura 2.8, capítulo 2). Es así que finalmente en la placa de TLC se sembraron los extractos lipídicos de los parásitos tratados con RuCpCTZ, CTZ, terbinafina, y un control negativo correspondiente a parásitos en el medio de BHT (parásitos sin tratamiento). Además, se incluyó el sembrado de patrones de ergosterol, lanosterol, colesterol y escualeno, sustratos y/o productos de la ruta biosintética, utilizados como control comparativo en el análisis. La placa de TLC revelada por vapores de yodo y luz UV, se muestra en la figura 4.15.

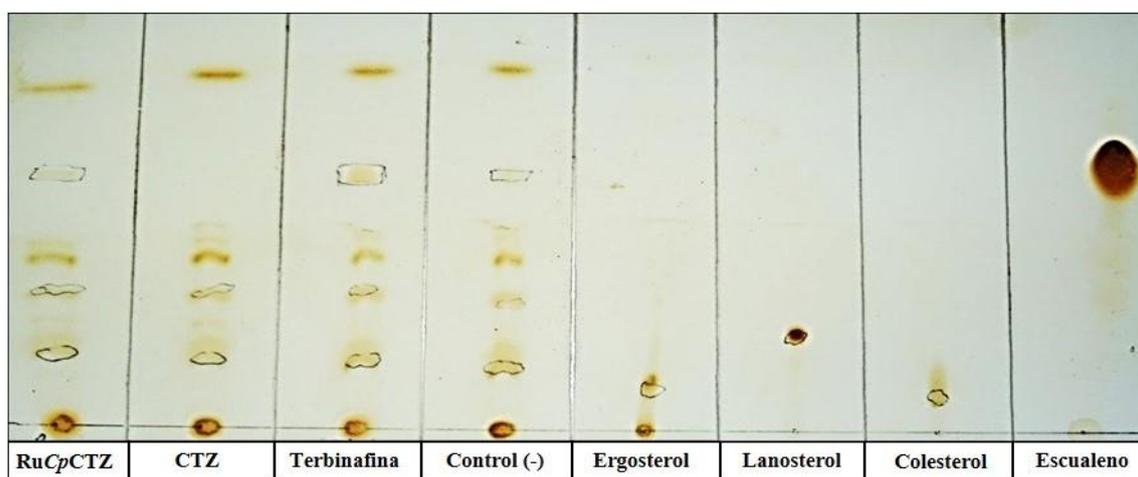


Figura 4.15: Placa cromatográfica TLC de los extractos lipídicos de *T. cruzi* después del tratamiento de los parásitos con $[Ru^{II}Cp(PPH_3)_2(CTZ)](CF_3SO_3)$, CTZ y terbinafina. Se incluye cuatro patrones de esteroides. La placa fue revelada con vapores de yodo y luz UV.

Tal como se mencionó en el capítulo 2, el clotrimazol y otros derivados de azoles inhiben la proliferación de los parásitos de *T. cruzi* cortando pasos de la BEM, específicamente bloqueando la enzima lanosterol-14 α -metil demetilasa dependiente de citocromo P-450. Esta enzima es la responsable de catalizar la conversión de lanosterol a ergosterol en la ruta biosintética ((reacción (4) de la figura 2.8, capítulo 2) [21,64,65]. Estudios previos han demostrado que los azoles previenen específicamente la hidroxilación del carbono 14 α -metilo del lanosterol, bloqueando la subsecuente formación de ergosterol [65]. Como resultado se observó que en los extractos lipídicos de los parásitos tratados con CTZ existe

una acumulación de lanosterol en la placa de TLC (carril 2, figura 4.15). Este resultado está de acuerdo con la inhibición de la enzima lanosterol-14 α -metil-demetilasa, que al no funcionar con normalidad disminuye la formación del producto provocando la acumulación de lanosterol. Por lo tanto, este resultado confirma que el CTZ en su forma libre tiene el mecanismo de acción previamente estudiado (la inhibición de esta enzima), y en consecuencia se valida el experimento realizado.

Con respecto al extracto de los parásitos tratados con el complejo RuCpCTZ (carril 1, figura 4.15), y al igual que en los extractos de los parásitos tratados con terbinafina, se observó la acumulación de escualeno en la placa. Este resultado señala que el complejo estaría afectando la BEM al mismo nivel que la terbinafina, es decir, inhibiendo la enzima 2,3-escualeno epoxidasa. En el extracto de parásitos tratado con CTZ no se observó acumulación de escualeno, por lo que se puede inferir que la acumulación de este sustrato en el caso de RuCpCTZ es debida a la complejación del CTZ al fragmento organometálico {RuCp}. De esta manera se puede concluir que el complejo RuCpCTZ sí afecta la BEM de *T. cruzi* inhibiendo una enzima distinta a la inhibida por el ligando bioactivo CTZ.

4.2.5.2 Interacción con ADN

El ADN se utiliza como blanco terapéutico en el tratamiento de patologías altamente proliferativas como el cáncer. Los parásitos también proliferan rápidamente. Según los antecedentes presentados en el capítulo 2, compuestos de coordinación del tipo Ru^{II}-CTZ (clásicos y organometálicos) previamente reportados poseen la capacidad de interactuar con el ADN [21,66,67], y además, existen evidencias de que complejos que incluyen el fragmento organometálico {RuCp} presentan afinidad por esta biomolécula [15,16,68]. Entonces, estos antecedentes motivaron estudiar la interacción con ADN como un posible mecanismo de acción antiparasitario del complejo RuCpCTZ.

4.2.5.2.1 Estudios de interacción primaria con ADN por medidas de absorción atómica

El primer acercamiento en la determinación de la posible interacción del complejo RuCpCTZ con el ADN, fue realizado mediante estudios de absorción atómica del metal unido a la biomolécula. Esta técnica ha sido utilizada como una aproximación primaria

para estudiar la interacción entre el ADN y complejos metálicos [24,25,46]. Los estudios de interacción primaria permiten determinar la existencia y el nivel de la interacción entre la biomolécula y el complejo metálico.

Mediante el procedimiento experimental realizado, detallado en el capítulo 3, se obtuvo una solución final donde se encontraría disuelta la fracción de ADN unida al complejo (denominada complejo Ru-ADN). Utilizando espectroscopía de absorción atómica de llama, se cuantificó la concentración de rutenio existente en el complejo Ru-ADN. A partir de la curva de calibración (figura 4.16), se obtuvo una concentración de rutenio en la solución de 0,187 mg/L (equivalente al promedio del experimento realizado por triplicado). Sobre esta misma solución se cuantificó la concentración de ADN unido al complejo mediante medidas de absorbancia (λ_{260} , $\epsilon = 6.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) encontrándose una relación equivalente a 1,12 nmol de rutenio por mg de ADN. El valor obtenido por este método señala un bajo nivel de unión entre el complejo RuCpCTZ y el ADN. Este bajo nivel de interacción se infiere al comparar el valor obtenido con el observado en los estudios de otros complejos de rutenio que interactúan eficientemente con ADN, donde los valores fluctúan entre 40 y 300 nmol de Ru/mg de ADN [46,49,69].

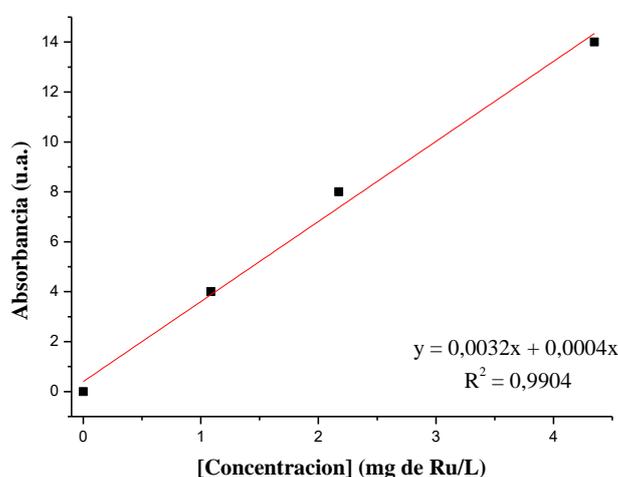


Figura 4.16: Curva de calibración para la cuantificación de rutenio en el complejo Ru-ADN.

4.2.5.2.2 Estudios de interacción con ADN por medidas de fluorescencia

Complementando los estudios de interacción primaria realizados, se realizó un análisis de interacción con ADN mediante medidas de fluorescencia. En este experimento, y tal como se planteó en el capítulo 3, se analiza la disminución de la intensidad de fluorescencia del aducto {ADN-BE}, donde BE es bromuro de etidio, generada por la interacción del complejo RuCpCTZ con la biomolécula.

El bromuro de etidio (BE) es una molécula intercalante del ADN, la cual al interaccionar con la biomolécula forma el aducto {ADN-BE}. Este aducto posee una fuerte emisión fluorescente ($\lambda_{exc} = 510$ nm) cuyo máximo de emisión se encuentra a 594 nm. Luego de realizar una titulación de este aducto con concentraciones crecientes de RuCpCTZ (entre 0-60 μ M) se obtuvo como resultado el espectro de emisión que se muestra en la figura 4.17 (a).

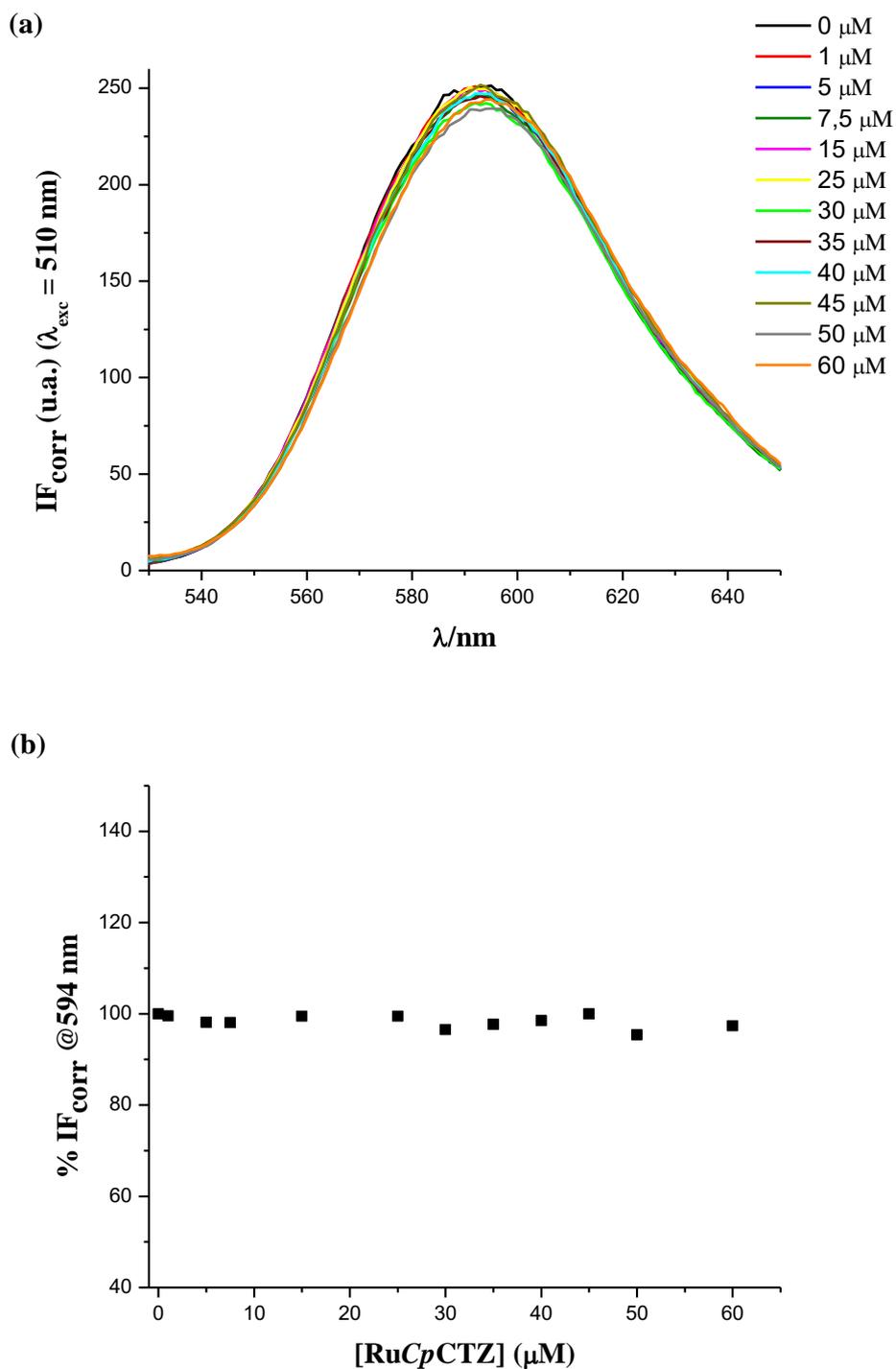


Figura 4.17: (a) Espectro de emisión de fluorescencia del estudio de interacción competitiva de $[Ru^{II}Cp(PPh_3)_2(CTZ)](CF_3SO_3)$ con el aducto {ADN-BE} para concentraciones de $RuCpCTZ$ de 0 a 60 μM . (b) Gráfica de intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{\text{em}} = 594 \text{ nm}$ al aumentar la concentración de complejo.

El espectro de emisión del aducto {ADN-BE}, no mostró ninguna variación en la intensidad de fluorescencia hasta una concentración de 60 μM de compuesto, por lo que

se infiere que el complejo RuCpCTZ no estaría apagando la fluorescencia de este aducto a las concentraciones estudiadas. Este resultado se puede interpretar como que no existiría una fuerte interacción entre la biomolécula y el complejo RuCpCTZ que provoque el desplazamiento del BE, y en consecuencia una disminución de la fluorescencia.

Por lo tanto, ambos estudios, interacción primaria y fluorescencia, indicarían que el complejo RuCpCTZ no presentaría una fuerte interacción con el ADN.

4.2.6 Conclusiones parciales

Se logró sintetizar y caracterizar completamente el primer compuesto organometálico con el fragmento {RuCp} y el ligando clotrimazol (CTZ). Este complejo mostró una elevada actividad citotóxica contra los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *T. brucei*, que fue incluso superior a la del ligando bioactivo en su forma libre. Los experimentos realizados para dilucidar el probable mecanismo de acción antiparasitario, revelaron que este complejo participaría de la inhibición de la BEM en *T. cruzi* a un nivel diferente al que actúa el ligando libre. Sin embargo, la interacción con ADN como parte del mecanismo de acción dual del complejo podría ser descartada. El ADN no sería una diana de acción antiparasitaria.

En base a estos resultados, el complejo [Ru^{II}Cp(PPh₃)₂(CTZ)](CF₃SO₃) no podría ser considerado como un nuevo agente antiparasitario organometálico debido a la baja selectividad observada en los estudios *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos son un punto de partida para continuar con el desarrollo de compuestos organometálicos con actividad antiparasitaria.

4.3 Compuestos [Ru^{II}Cp(PPh₃)(L)]

4.3.1 Síntesis

Basado en la reacción entre el precursor [Ru^{II}CpCl(PPh₃)₂] y los ligandos tiosemicarbazona derivadas del 5-nitrofuraldehído (figura 3.4, capítulo 3), se logró obtener tres complejos organometálicos [Ru^{II}Cp(PPh₃)(L)] que codificaremos RuCpL (figura 4.18). Para estudiar el efecto de la coordinación de las tiosemicarbazonas con diferente sustituyentes R en el grupo amino terminal (HL1-HL4), se planteó la síntesis

con cuatro de éstas. Sin embargo, no fue posible obtener un complejo de pureza adecuada con el ligando HL1 (R = H).

Los tres complejos $RuCpL$ de color violeta fueron obtenidos con aceptables rendimientos: 18 % (60 mg) para $RuCpL2$, 25 % (84 mg) para $RuCpL3$ y 18 % (65 mg) para $RuCpL4$.

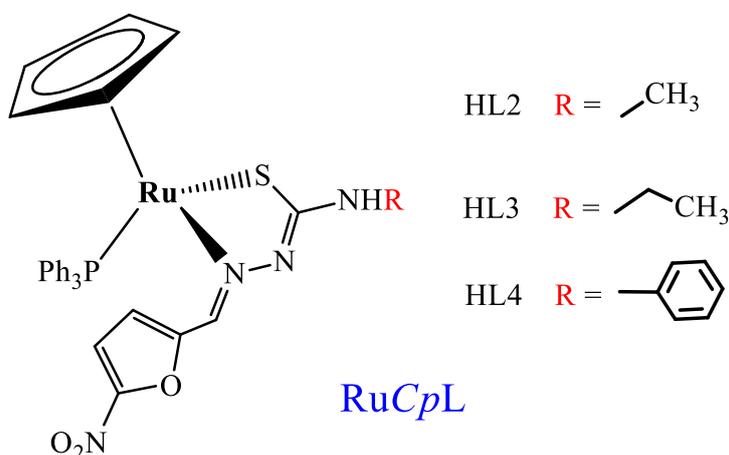


Figura 4.18: Estructura de los compuestos $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$.

4.3.2 Caracterización en estado sólido

4.3.2.1 Análisis elemental

El análisis elemental de elementos livianos, específicamente el contenido porcentual de C, H, N y S de cada compuesto, reveló que los tres complejos $RuCpL$ se ajustan a la fórmula propuesta. De esta manera los compuestos obtenidos son de fórmula $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$ ($RuCpL2$), $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$ ($RuCpL3$) y $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$ ($RuCpL4$).

En la tabla 4.5 se muestran los valores porcentuales de C, H, N y S, teóricos y experimentales.

Tabla 4.5: Resultados de análisis elemental de C, H, N y S de los complejos $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$.

Compuesto	%C _{experimental} (%C _{teórico})	%H _{experimental} (%H _{teórico})	%N _{experimental} (%N _{teórico})	%S _{experimental} (%S _{teórico})	Formula
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$	55,00 (54,95)	4,13 (4,15)	8,60 (8,54)	4,91 (4,89)	$C_{30}H_{27}N_4O_3PRuS$
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$	55,64 (55,60)	4,34 (4,36)	8,35 (8,37)	4,77 (4,79)	$C_{31}H_{29}N_4O_3PRuS$
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$	58,45 (58,57)	4,05 (4,07)	7,85 (7,81)	4,45 (4,47)	$C_{35}H_{29}N_4O_3PRuS$

4.3.2.2 Espectroscopía infrarroja

Se midieron los espectros de infrarrojo de los tres complejos $RuCpL$ y de los respectivos ligandos en su forma libre (HL2-HL4) en pastillas de KBr en un rango entre los 4000-400 cm^{-1} . En la figura 4.19 se muestra, como ejemplo, el espectro de infrarrojo obtenido para el complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$ y el ligando HL4.

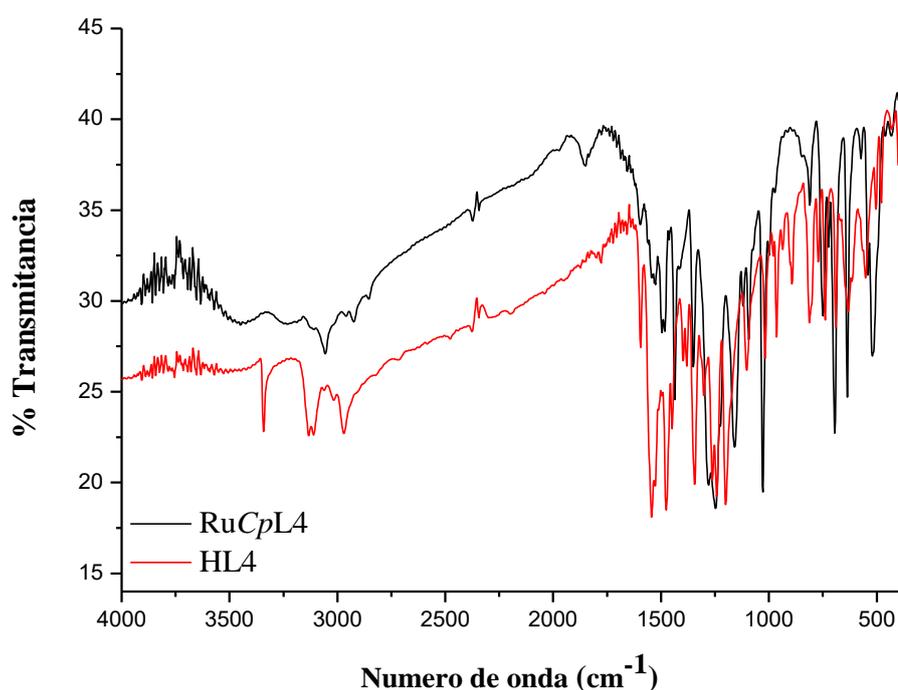


Figura 4.19: Espectro de infrarrojo del complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$ y del ligando HL4 en el rango de 4000-400 cm^{-1} .

Los tres complejos $RuCpL$ presentaron un espectro IR similar, aunque se observó un aumento en la complejidad de los espectros a medida que creció el largo de la cadena carbonada del sustituyente R.

Tal como se mencionó en la sección introductoria de este capítulo, los ligandos 5-nitrofuril tiosemicarbazona (HL) son capaces de interactuar con centros metálicos por diferentes modos de coordinación. Los espectros de infrarrojo de los ligandos HL han sido previamente estudiados y asignados mediante el estudio de espectros experimentales y teóricos, pudiéndose definir el patrón espectral característico de cada uno ellos [70].

Los espectros de estos ligandos, como también el de compuestos de coordinación con estos ligandos, poseen tres bandas de vibración características que son fundamentales para predecir el modo de coordinación con los centros metálicos. Estas tres bandas corresponden a los estiramientos $\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu(\text{C}=\text{S})$ y $\nu(\text{N}-\text{N})$ [24,25,45–49,70,71]. En particular, en este capítulo, la caracterización de estas tres vibraciones de estiramiento fueron esenciales para comprender el modo de coordinación que tienen los ligandos HL al centro organometálico $\{\text{RuCp}\}$.

La coordinación más favorable, y comúnmente observada, de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído es la coordinación bidentada a través del nitrógeno azometínico y del azufre tiocarbonílico. Esto se traduce en que en los espectros de los complejos se observe un desplazamiento hacia frecuencias más bajas en las bandas de los estiramientos $\text{C}=\text{N}$ y $\text{C}=\text{S}$ por efecto de la coordinación [24,46–48]. En los espectros de los complejos RuCpL , la banda de vibración del estiramiento $\nu(\text{C}=\text{N})$ (identificada entre los 1650 a 1500 cm^{-1} en los ligandos libres) también se desplazó hacia frecuencias más bajas. Por otro lado, la banda de vibración $\nu(\text{C}=\text{S})$ (alrededor de los 820 a 850 cm^{-1} en el ligando libre) no pudo ser asignada debido a la alta complejidad observada en esa zona del espectro, comportamiento que ha sido previamente observado y discutido en otros compuestos metálicos con estos ligandos [70]. Como se ha reportado en literatura, esta banda de vibración se encuentra en regiones de número de onda donde coexisten bandas de otros grupos funcionales que forman parte de este mismo ligando. Por ejemplo, en esta zona espectral se encuentran las bandas de tijereteo (*scissoring*) del furano y los modos de aleteo simétrico (*wagging*) de los hidrógenos del furano, y sus combinaciones. Si bien en los espectros de los complejos RuCpL se observan variaciones en esta zona del espectro (entre 750 a 900 cm^{-1}), la banda del estiramiento $\text{C}=\text{S}$, que resulta útil para corroborar la coordinación del azufre tiocarbonílico al metal, no pudo ser asignada.

La tercera banda de vibración característica de los ligandos HL es la correspondiente al estiramiento $\nu(\text{N}-\text{N})$, y se encuentra en un rango entre 1100 y 1120 cm^{-1} . En los espectros de infrarrojo de los complejos RuCpL , se observó un desplazamiento hacia números de onda mayores en comparación al respectivo ligando HL. Este comportamiento es concordante con la deslocalización electrónica producida en la molécula como consecuencia de la coordinación a través del átomo de nitrógeno azometínico y/o la deprotonación del ligando HL.

La deprotonación del ligando HL es otra característica de la coordinación comúnmente observada en complejos metálicos con estos ligandos, provocando que éstos actúen como

ligandos aniónicos. Como confirmación de que la deprotonación ocurre, en los espectros de infrarrojo de los tres complejos $RuCpL$ no se observó la banda de vibración del estiramiento $\nu(N-H)$ del ligando (observada en la figura 4.19 a 3354 cm^{-1}) [45], lo que estaría en concordancia con la formación de los complejos neutros $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$.

En conclusión, el análisis de los espectros de infrarrojo indicaron que todos los complejos presentaron la coordinación bidentada (a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico) y aniónica de los ligandos HL al centro metálico.

Por otro lado, fue posible identificar en los espectros de todos los complejos las bandas de vibración características del fragmento $\{RuCp\}$, las cuales son concordantes con la hapticidad 5 del ligando ciclopentadienilo en la coordinación con el ion metálico central [51].

Tabla 4.6: Asignación tentativa de las bandas de vibración significativas de los complejos $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$.

Compuesto	$\{RuCp\}$	$\nu(C=N)$	$\nu_s(NO_2)$	$\nu(N-N)$	$\delta(NO_2) + \text{furano}$
HL2	-	1599	1354	1114	808
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$	3051	1578	1348	1138	806
HL3	-	1602	1352	1104	805
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$	3054	1577	1350	1147	804
HL4	-	1595	1344	1104	811
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$	3057	1591	1350	1153	804

4.3.3 Caracterización en solución

4.3.3.1 Conductimetría

La conductividad molar medida en la solución 10^{-3} M de cada complejo en DMSO fue de 3, 2 y 3 $S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ para los complejos $RuCpL2$, $RuCpL3$ y $RuCpL4$, respectivamente. Los valores obtenidos señalan que estos compuestos no son conductores de la corriente eléctrica en solución y confirman la neutralidad de los mismos [54]. Las medidas se continuaron durante 5 días luego de la preparación de la solución, donde no se observaron cambios en los valores de conductividad. Esto da cuenta de la estabilidad de los complejos a la sustitución en solución de DMSO durante el tiempo de estudio.

4.3.3.2 Resonancia magnética nuclear

Se determinaron los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{31}P -RMN de los tres complejos y de los respectivos ligandos. Todos los espectros fueron medidos a temperatura ambiente y en solución de acetona- d_6 .

En el análisis del espectro ^1H -RMN, los tres complejos mostraron un perfil espectral similar. La integración y la multiplicidad de cada una de las señales permitieron caracterizar completamente la estructura en solución de los complejos. Para el análisis de los espectros, se numeraron los protones de los ligandos tiosemicarbazona como se muestra en la figura 4.20.

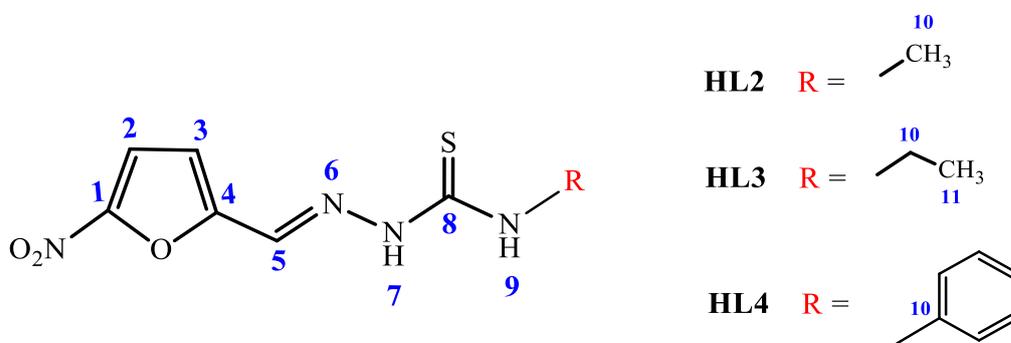


Figura 4.20: Esquema de numeración de los protones de los ligandos 5-nitrofuril tiosemicarbazona (HL) en los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$.

En la figura 4.21 se muestra el espectro ^1H -RMN del complejo RuCpL2 , que se utilizará como ejemplo para describir las señales de éste y de los demás complejos.

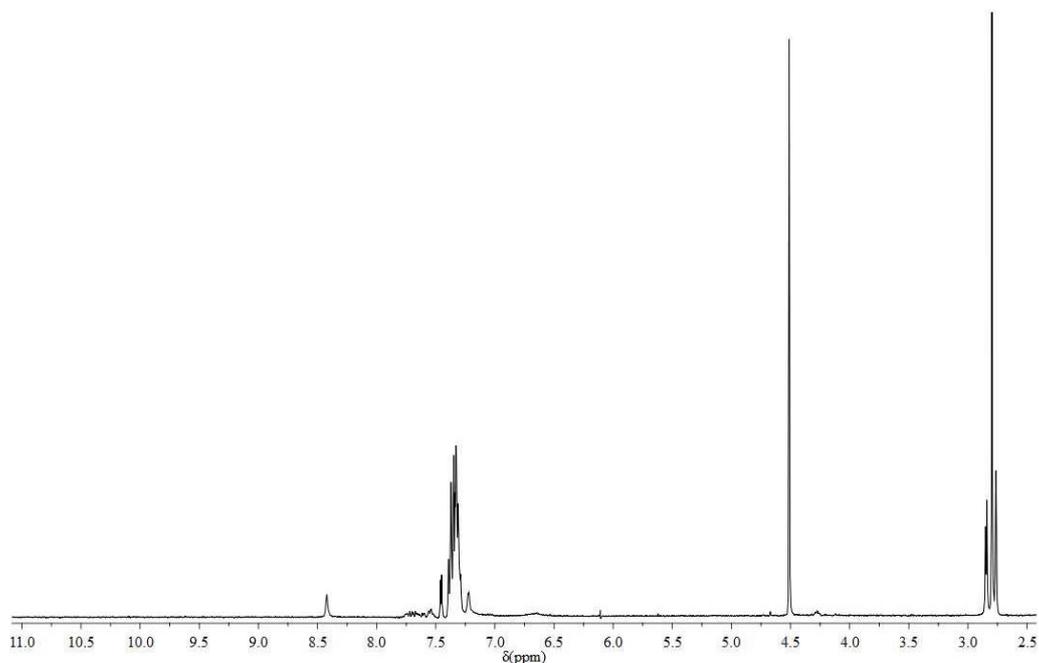


Figura 4.21 Espectro ^1H -RMN del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}2)]$ en solución de acetona- d_6 .

En el espectro ^1H -RMN, se observó una señal de multiplicidad singulete cercano a los 4,5 ppm equivalente a cinco protones, que como se mencionó en el complejo RuCpCTZ , corresponde a la señal característica del ligando ciclopentadienilo en el fragmento $\{\text{RuCp}\}$ [12,15].

Con respecto al ligando bioactivo, en los espectros de los tres complejos se observaron las señales características de las tiosemicarbazonas. Se identificaron los dos dobletes de los protones del anillo furano H2 y H3 (con una constante de acoplamiento $J_{\text{H,H}} = 3,8 \text{ Hz}$), el singulete correspondiente al protón ilidénico (H5) y la señal del protón amino terminal (H9). Si bien no existen estudios previos de ^1H -RMN de complejos medidos en acetona- d_6 para comparar los valores de desplazamiento químico con otros compuestos, la asignación de las señales fue complementada con experimentos ^1H - ^1H COSY. Al comparar las señales de estos protones en el complejo RuCpL y en su respectivo ligando HL, se observó un corrimiento de la señal del protón H9 (NH-R) hacia campos magnéticos menores de casi 1 ppm, lo que podría explicarse por un efecto de retrodonación π que ocurre desde del metal hacia los orbitales del ligando. Un efecto similar se observó en el resto de los protones del ligando a excepción de H3 y H5 que sufren un leve efecto de desapantallamiento ($\sim 0,3 \text{ ppm}$).

Además, en los espectros de los tres complejos se logró identificar las señales de cada sustituyente R de la cadena alifática, es decir, los protones del grupo metilo en RuCpL2 (singulete equivalente a tres protones), el grupo etilo en RuCpL3 (quintuplete y triplete de $J_{H,H} = 7,2$ Hz) y fenilo en RuCpL4 (lográndose identificar inequívocamente sólo el triplete equivalente al protón ubicado en posición *para* del anillo con un $J_{H,H} = 7,4$ Hz). En todos los casos se observó la ausencia de la señal correspondiente al protón H7 (cerca a los 11 ppm en el ligando libre), lo que confirma la deprotonación de los ligandos tiosemicarbazona al coordinar al fragmento {RuCp}.

Finalmente, y al igual que en el espectro del complejo RuCpCTZ, se asignaron también los multipletes de los protones de los anillos aromáticos del ligando trifenilfosfina. La tabla 4.7 resume los valores de desplazamiento químico (δ) de todas las señales asignadas de los tres compuestos y de los respectivos ligandos.

Tabla 4.7: Desplazamientos químicos (δ) del espectro $^1\text{H-RMN}$ en ppm de los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$ y de los ligandos HL en acetona- d_6 .

H	δ_{H} (ppm)						$\Delta\delta^{\text{a}}$
	HL2	RuCpL2	HL3	RuCpL3	HL4	RuCpL4	$\Delta\delta_2/\Delta\delta_3/\Delta\delta_4$
H-Cp	-	4,51	-	4,50	-	4,57	-
H2	7,61	7,22	7,61	7,23	7,64	7,23-7,42 ^c	-0,39/-0,38/ ^d
H3	7,18	7,45	7,18	7,45	7,37	7,23-7,42 ^c	0,27/0,27/ ^d
H5	8,09	8,42	8,09	8,41	8,20	8,54	0,33/0,32/0,34
H7	10,86	-	10,80	-	11,16	-	-
H9	8,41	7,34 ^b	8,43	7,34 ^b	9,98	8,72	-1,07/-1,09/-1,26
H10	3,14	2,76	3,72	3,30	-	-	-0,38/-0,42/ ^d
H11	-	-	1,22	1,15	-	-	^d /-0,07/ ^d
<i>o</i>-H	-	-	-	-	7,70	7,49	-0,21
<i>m</i>-H	-	-	-	-	7,37	7,23-7,42 ^c	^d
<i>p</i>-H	-	-	-	-	7,22	7,00	-0,22

^a: $\Delta\delta = (\Delta\delta_{\text{complejo}} - \Delta\delta_{\text{ligando}})$
^b: Solapado con señales de PPh₃
^c: multiplete equivalente a 19 protones
^d: no determinado

La asignación de las señales de los espectros de ^{13}C -RMN se realizó de forma tentativa, lográndose identificar la mayoría de las señales de los átomos de carbono del ligando HL y PPh_3 , y los carbonos del ligando ciclopentadienilo. El análisis del espectro fue complementado con experimentos de acoplamiento heteronuclear HSQC y HMBC. Los valores de desplazamiento de estas señales se resumen en la tabla 4.8.

En los espectros de todos los complejos, se observó cerca de los 80 ppm la señal correspondiente a los átomos de carbono del anillo ciclopentadienilo. En un intervalo entre 115-150 ppm se encuentran las señales de la mayoría de los átomos de carbono del ligando HL. En los espectros de los complejos RuCpL2 y RuCpL3 se logró identificar las señales de los carbonos del grupo metilo y etilo del sustituyente R de la cadena. Exclusivamente en el complejo RuCpL4 fue posible identificar la señal del átomo de carbono más cercano al sitio de coordinación (C8). Tal como se ha reportado en otros complejos que incluyen estos ligandos tiosemicarbazona, esta señal se desplazó hacia mayores ppm en relación al grupo de señales correspondiente a los átomos de carbono del resto de la cadena.

En estos espectros, también fue posible identificar las señales de los carbonos del ligando trifenilfosfina en los tres complejos. En la figura 4.22 se muestra, como ejemplo, el espectro de ^{13}C -RMN obtenido para el complejo RuCpL2 .

Tabla 4.8: Desplazamientos químicos (δ) del espectro ^{13}C -RMN en ppm de los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$ en acetona- d_6 .

C	δ_{C} complejo (ppm)		
	$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L2})]$	$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L3})]$	$[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L4})]$
C-Cp	79,43	79,47	79,72
C1	150,27	149,83	-
C2	117,81	117,30	-
C3	115,68	115,65	-
C4	150,25	151,44	151,07
C5	136,66	136,74	140,19
C8	-	-	185,27
C10	32,65	40,91	136,66
C11	-	15,53	121,57
C12+C14	-	-	129,36

C13	-	-	123,55
C15	-	-	121,57
CH-PPh₃	134,61	134,58	134,50
	132,67	130,02	132,69
	128,45	128,53	128,60
C- PPh₃	129,52	133,72	130,15

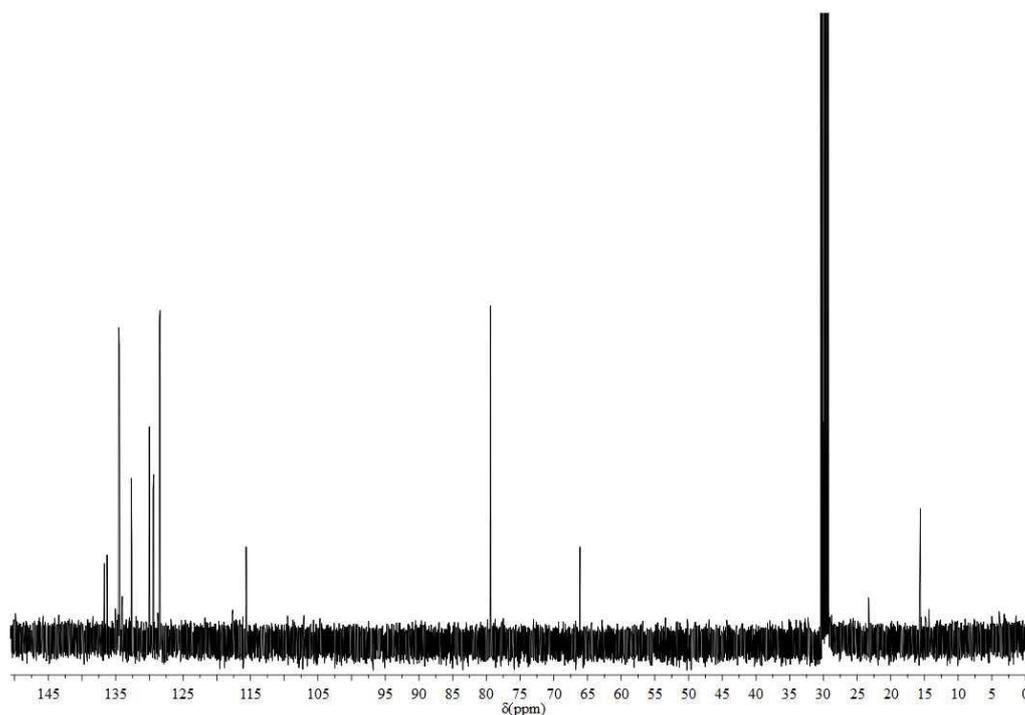


Figura 4.22: Espectro de ^{13}C -RMN del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}_2)]$ en solución de acetona- d_6 .

El espectro de ^{31}P -RMN mostró en todos los casos una única señal aguda cercana a los 52 ppm atribuida al ligando trifenilfosfina. Se muestra como ejemplo en la figura 4.23 el espectro ^{31}P -RMN del complejo RuCpL_2 donde se observa esta única señal mencionada.

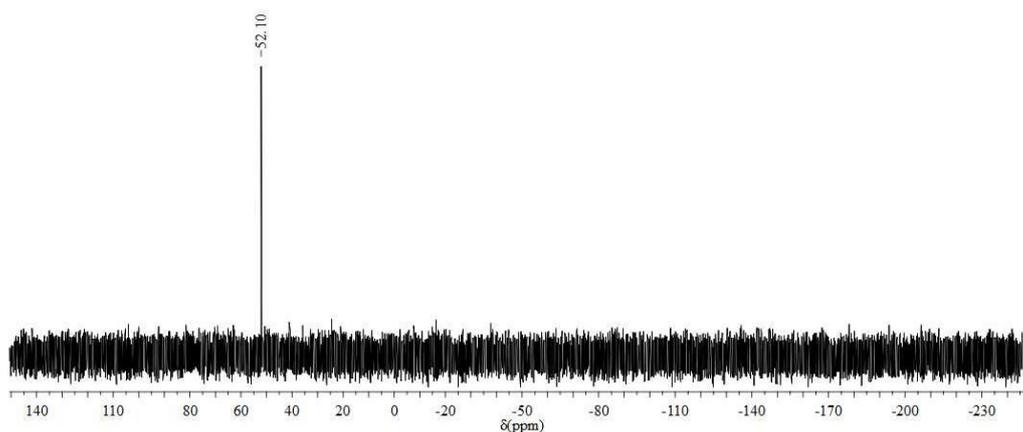


Figura 4.23: Espectro ^{31}P -RMN del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}_2)]$ en solución de acetona- d_6 .

4.3.3.3 Estudio electroquímico

El estudio electroquímico de los complejos RuCpL fue realizado por medidas de voltametría cíclica sobre una solución de cada compuesto de concentración 1 mM en DMSO. Para el estudio de los procesos de oxidación se utilizó como electrodo de trabajo un disco de carbón vítreo, y en el análisis de los procesos de reducción se utilizó electrodo de gota colgante de mercurio (HDME).

En la figura 4.24 se muestran los voltamogramas obtenidos para los tres complejos en el barrido hacia potenciales anódicos y hacia potenciales catódicos (velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s). En estos voltamogramas se observa que los tres complejos poseen un comportamiento electroquímico similar, tanto en la zona asociada a procesos de oxidación (figura 4.24 a) como también en los procesos de reducción (figura 4.24 b).

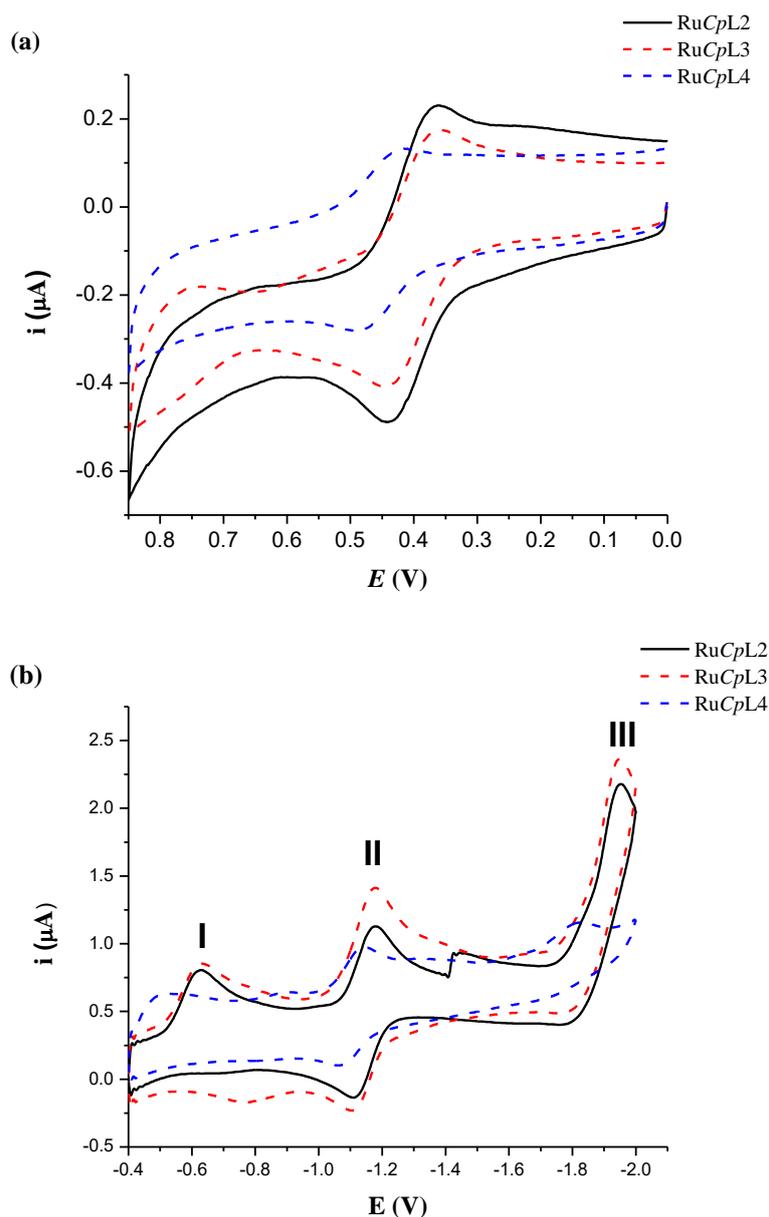


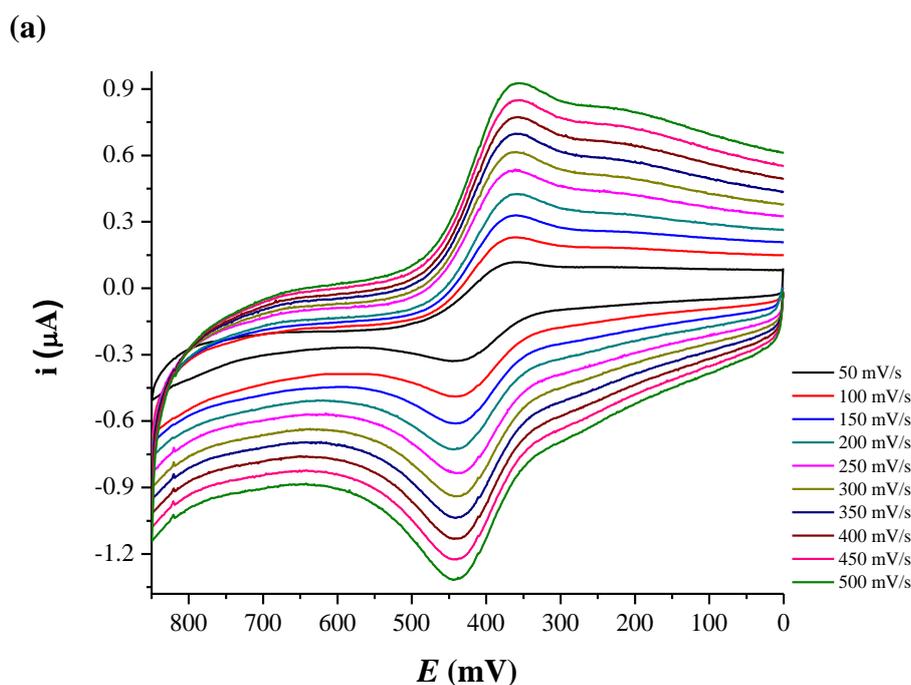
Figura 4.24: Voltamogramas cíclicos de los complejos $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$ en la dirección (a) anódica y (b) catódica.

En el barrido hacia potenciales anódicos, se observó cerca de 0,4 V (referido al electrodo Ag/AgCl) un proceso redox reversible, que fue atribuido a la oxidación Ru(II)/Ru(III). La asignación de este par redox está fundamentada en que el valor de potencial observado es similar al comúnmente obtenido en los estudios electroquímicos realizados con otros compuestos organometálicos con el fragmento $\{\text{RuCp}\}$ [12,13,15]. En este proceso de oxidación, la diferencia entre el potencial del pico catódico y el pico anódico (ΔE_p) es cercano a los 0,06 V, que según la ecuación de Nerst, es indicativo de un mecanismo reversible de transferencia de un electrón [72]. En la gráfica de la figura 4.25 a, se muestra

como ejemplo este proceso de oxidación en el complejo RuCpL2 medido en un rango restringido de potencial a diferentes velocidades de barrido (entre 50 y 500 mV/s). En esta gráfica se puede observar que tanto los valores de potencial del pico anódico (E_{pa}) como del pico catódico (E_{pc}) no cambian al variar la velocidad de barrido. Basándose en el análisis de la intensidad de corriente de ambos picos, se observó que la relación I_{pa}/I_{pc} es cercana a 1 en los tres compuestos, lo que es concordante con otra de las características que determinan a un proceso reversible.

La ecuación de Randles-Sevcik (Ec. 4.1) es la expresión matemática que describe la intensidad máxima del pico (i_p) en un proceso electroquímico reversible. En esta ecuación se deduce que la densidad de corriente de pico (en unidades de A/cm^2) es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) (también es proporcional a la concentración (C) de la especie electroactiva y al coeficiente de difusión (D), pero en el análisis realizado estos parámetros permanecen constantes). Al graficar i_p en función de $v^{1/2}$ (figura 4.25 b) se observa que efectivamente existe una relación de proporcionalidad entre ambos parámetros tanto para el pico anódico como para el pico catódico.

$$i_p = -(2,69 \cdot 10^5)n^{3/2} \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{Ec. 4.1}$$



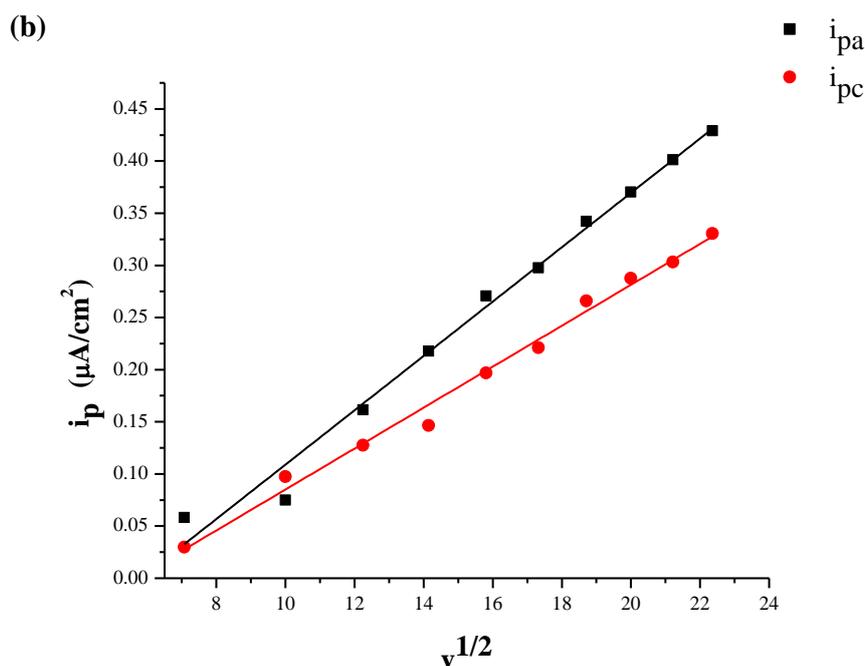


Figura 4.25: (a) Voltamogramas cíclicos del complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$ en el rango de oxidación medidos a diferentes velocidades de barrido de potencial. (b) Gráfica de i_{pa} e i_{pc} versus $(\text{velocidad de barrido})^{1/2}$ para el mismo complejo.

Por otro lado, en el barrido hacia potenciales negativos se observaron tres procesos redox que están asociados al ligando bioactivo. El par redox I, cercano a los $-0,6$ V (referido al electrodo Ag/Ag^+), corresponde a un proceso irreversible atribuido a la reducción del grupo nitro protonado ($R-NO_2H$) generando un nitro anión radical; este proceso de autoprotonación de los ligandos 5-nitrofuril tiosemicarbazona ha sido también observado en algunos compuestos de coordinación [24,25,73,74]. El proceso electroquímico correspondiente al par redox II, es un proceso cuasi reversible que ha sido atribuido a la reducción del grupo nitro generando un nitro anión radical NO_2^- mediante la transferencia de un electrón, según ha sido previamente reportado para otros complejos de coordinación con estos mismos ligandos. El proceso electroquímico III, observado a valores de potencial cercanos a los $-2,0$ V (vs Ag/Ag^+), corresponde a un proceso irreversible equivalente a la reducción del nitroanión radical a un derivado de hidroxilamina ($R-NHOH$) [24,25,46,49,73,75].

Con respecto al proceso electroquímico II, como se ha descrito en el capítulo 2, el primer paso del mecanismo de acción antiparasitario de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído, y de complejos con estos ligandos, es la bio-reducción del grupo nitro

que genera posteriormente otras especies radicalarias tóxicas para el parásito mediante reciclaje redox. El estudio electroquímico de este par redox reveló que existe un desplazamiento del potencial del pico (E_{pa} y E_{pc}) hacia valores menos negativos en todos los complejos en comparación al respectivo ligando en su forma libre, observándose una disminución (en valor absoluto) de hasta 0,05 V posterior a la coordinación. Esta disminución en los valores de potencial, podría relacionarse con un aumento de la capacidad de bio-reducción de los ligandos al formar el complejo organometálico, lo que favorecería la generación de especies radicalarias tóxicas en el parásito [24,25,46,75]. En la tabla 4.9 se resumen los valores de potencial de todos los procesos electroquímicos descritos.

Tabla 4.9: Datos electroquímicos de los compuestos $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$

Compuesto	Ru(II)/Ru(III)	Cupla I	Cupla II (HL) ^c		Cupla III
	$E_{1/2}$ (V) ^a	E_{pc} (V) ^b	E_{pa} (V) ^b	E_{pc} (V) ^b	E_{pc} (V) ^b
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$	0,40	-0,63	-0,98 (-1,00)	-1,04 (-1,09)	-1,95
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$	0,40	-0,63	-0,98 (-1,02)	-1,06 (-1,11)	-1,95
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$	0,45	-0,51	-0,94 (-0,99)	-1,02 (-1,07)	-1,82

$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$
^a: valor referido a electrodo Ag/AgCl
^b: valor referido a electrodo Ag/Ag⁺
^c: valor obtenido de la referencia [76]

4.3.4 Actividad biológica

4.3.4.1 Actividad antiparasitaria

La actividad antiparasitaria de los complejos $RuCpL$ fue evaluada en los parásitos *T. cruzi* y *T. brucei*. La selectividad en la actividad en ambos parásitos fue estudiada utilizando dos modelos de células de mamífero, macrófagos murinos J774 y células endoteliales humanas EA.hy926.

Los resultados de todos los estudios *in vitro* realizados con estos complejos se resumen en la tabla 4.10, y son discutidos a continuación.

Tabla 4.10: Actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, *T. brucei*, citotoxicidad en macrófagos murinos J774 y células endoteliales humanas EA.hy926, y valores de índice de selectividad (IS) de [Ru^{II}Cp(PPh₃)₂(L)] y HL (incluidos para comparación).

Compuesto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ / μM	<i>T. brucei</i> IC ₅₀ / μM	Macrófagos IC ₅₀ / μM	EA.hy926 IC ₅₀ / μM	IS	IS
HL2	17,4 ± 1,9 ^c	11,3 ^e	36,4 ± 4,2 ^c	>100 ^f	2 ^g (>6 ^h)	3 ⁱ (9 ^j)
RuCpL2	4,14 ± 0,21	14,9 ± 1,4	>20 ^d	>20 ^d	>5 ^a	>1 ^b
HL3	18,5 ± 1,7 ^c	17,0 ^e	34,0 ± 2,1 ^c	>100 ^f	2 ^g (>5 ^h)	2 ⁱ (>6 ^j)
RuCpL3	0,41 ± 0,02	3,5 ± 0,5	>20 ^d	>20 ^d	>49 ^a	>6 ^b
HL4	22,7 ± 1,6 ^c	>100 ^e	> 100 ^c	>100 ^f	>4 ^a	-
RuCpL4	>20 ^d	10,7 ± 0,2	>20 ^d	>20 ^d	-	>2 ^b

^a IS: IC₅₀ macrófagos o EA.hy926 / IC₅₀ *T. cruzi*
^b IS: IC₅₀ macrófagos o EA.hy926 / IC₅₀ *T. brucei brucei*
^c Datos de referencia [50]
^d No determinado exactamente debido a la baja solubilidad de los compuestos
^e Datos de referencia [49]
^f Datos de referencia [48]
^g IS: IC₅₀ macrófagos / IC₅₀ *T. cruzi*
^h IS: IC₅₀ EA.hy926 / IC₅₀ *T. cruzi*
ⁱ IS: IC₅₀ macrófagos / IC₅₀ *T. brucei brucei*
^j IS: IC₅₀ EA.hy926 / IC₅₀ *T. brucei brucei*
 Los resultados son la medida de tres diferentes experimentos independientes.

4.3.4.1.1 Actividad contra *Trypanosoma cruzi*

Los tres complejos RuCpL fueron evaluados *in vitro* sobre la forma infectiva tripomastigota del ciclo evolutivo de *T. cruzi*, y a partir de las curvas de dosis-respuesta se obtuvo el valor de IC₅₀ en cada evaluación.

Los resultados de estos estudios revelaron que los compuestos {RuCp} son activos contra *T. cruzi*, mostrando valores de IC₅₀ que se encuentran en el rango micromolar o submicromolar. A excepción del compuesto RuCpL4, los complejos mostraron un incremento de la actividad anti-*T. cruzi* de 4 a 45 veces respecto a la observada para la correspondiente tiosemicarbazona en su forma libre. Además, los complejos (RuCpL2 y RuCpL3) resultaron ser de 5 a 49 veces más activos, respectivamente, que el fármaco tripanosomicida utilizado como referencia (IC₅₀ Nifurtimox = 20,1 ± 0,8 μM) [46].

Cabe destacar que los complejos RuCpL resultaron ser más activos, sobre la forma infectiva tripomastigota de *T. cruzi* que otros complejos de coordinación de Ru(II) con estos mismos ligandos. La actividad de los complejos RuCpL fue mayor a la de los complejos organometálicos [Ru^{II}₂(*p*-cimeno)₂(L)₂]Cl₂ y [Ru₂(*p*-cymene)₂(L)₂](PF₆)₂ [50] y muy superior a la obtenida en los complejos de la serie [Ru^{II}Cl₂(HL)(HPTA)₂]Cl₂ [46].

El complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}3)]$ presentó la mayor actividad citotóxica en *Trypanosoma cruzi*, comparando con los otros complejos RuCpL y con todos los complejos de $\text{Ru}(\text{II})$ con los ligandos HL reportados a la fecha.

4.3.4.1.2 Actividad contra *Trypanosoma brucei*

Se evaluó la actividad *in vitro* de los complejos sobre la forma infectiva de *T. brucei brucei*. Los resultados de los ensayos mostraron que los tres complejos RuCpL testeados son activos contra el parásito, mostrando valores de IC_{50} que se encuentran en el rango micromolar (tabla 4.10).

La comparación de estos valores con la actividad antiparasitaria del respectivo ligando tiosemicarbazona, muestra un incremento de la actividad de HL3 y HL4 en los complejos $\text{RuCpL}3$ y $\text{RuCpL}4$. La actividad observada se encuentra en el mismo nivel a la obtenida en los complejos organometálicos $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ ($\text{X} = \text{Cl}^-$ o PF_6^-) que incluyen estas mismas tiosemicarbazona bioactivas [49].

4.3.4.2 Citotoxicidad inespecífica en modelos de células de mamífero

La selectividad de la actividad tripanosomicida de los compuestos fue evaluada en dos modelos de células mamíferas: una línea celular de macrófagos murinos (J774) y en células endoteliales humanas (EA.hy926). A partir de los valores de IC_{50} obtenidos en estos estudios se pudo conocer la selectividad (expresada en el índice de selectividad) que poseen los complejos hacia ambos parásitos.

A pesar de que no se pudo obtener una determinación exacta de los valores de IC_{50} en estos estudios, debido a problemas de solubilidad de los complejos en el medio de cultivo, en todos los casos la citotoxicidad sobre ambas líneas celulares fue mayor a $20 \mu\text{M}$. Los complejos mostraron de moderados a buenos índices de selectividad hacia ambos parásitos-

Los estudios de evaluación *in vitro* contra *T. cruzi* y *T. brucei*, revelaron que el complejo $\text{RuCpL}3$ sería el más promisorio de los tres compuestos RuCpL . Desde el punto de vista de la selectividad, este compuesto mostró muy buena selectividad hacia *T. cruzi* y una moderada a buena selectividad hacia *T. brucei*, con valores de índice de selectividad de >49 y >6 , respectivamente.

4.3.5 Mecanismo de acción

4.3.5.1 Generación de especies radicalarias en *T. cruzi*

Como se mencionó anteriormente, los ligandos 5-nitrofuril tiosemicarbazona y los compuestos de coordinación que contienen estos ligandos, han demostrado la capacidad de generar especies radicalarias tóxicas en *Trypanosoma cruzi* por la biorreducción del grupo nitro presente en la estructura molecular de los ligandos, mecanismo de acción similar a uno de los postulados para el Nifurtimox [45,71]. Según los resultados obtenidos en los estudios electroquímicos, los complejos RuCpL tendrían capacidad de ser reducidos a nivel del grupo nitro (incluso superior a la de los ligandos) para generar el nitro anión radical, y en consecuencia, producir el resto de los radicales del reciclaje redox en el interior del parásito.

Para estudiar si estas especies radicalarias son realmente generadas por los complejos en *T. cruzi*, se realizaron medidas de resonancia electrónica paramagnética (EPR) en parásitos intactos incubados con los complejo RuCpL utilizando la técnica de *spin trapping*.

Se utilizó DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina) como atrapador de especies radicalarias de cortos tiempos de vida, y se identificó en los espectros de EPR las señales de los aductos de espín de cada radical atrapado. Como se detalló en el capítulo 3, los complejos se incubaron con epimastigotas de *T. cruzi* y el atrapador DMPO, y posteriormente se registraron los espectros de EPR. En la figura 4.26 se muestra, como ejemplo, el espectro de EPR experimental (línea negra) obtenido luego de la incubación con el complejo RuCpL3, y el espectro simulado (línea roja) a partir de las constantes de acoplamiento hiperfino de los aductos de espín identificados.

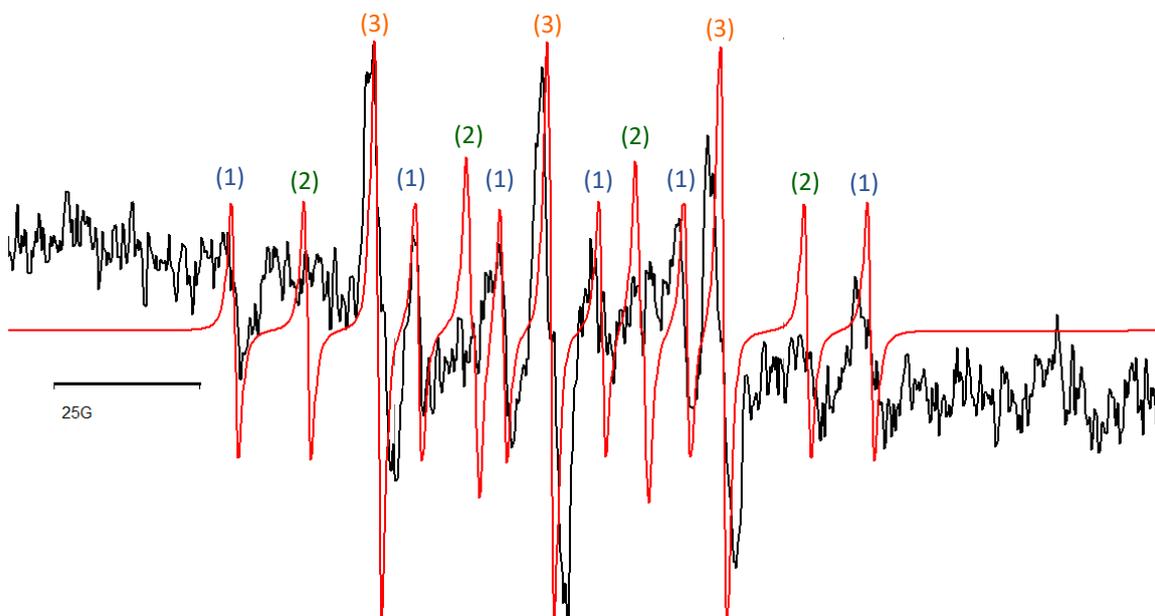


Figura 4.26: Espectro de EPR experimental (línea negra) y simulado (línea roja) obtenido luego de minutos de incubación del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}_2)]$ (1 mM) con epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) y DMPO. Se muestran las señales características de (1) aducto de espín de DMPO-nitrocompuesto, (2) aducto de espín DMPO-OH· y (3) oxidación DMPO y/o DMPO-OH·.

Los tres complejos mostraron un patrón similar de líneas en el espectro correspondiente a trece líneas asociadas a tres aductos de espín. El primer aducto de espín identificado corresponde a un patrón de seis líneas ((1), figura 4.26) cuyas constantes de acoplamiento hiperfino ($a_{\text{N}} = 15,0 \text{ G}$ y $a_{\text{H}} = 22,5 \text{ G}$) están de acuerdo con el atrapamiento de un radical centrado en carbono [77]. Este aducto de espín podría relacionarse con la biorreducción intracelular de los complejos y la formación de aductos radicales nitroheterocíclico carbonado-DMPO.

El segundo aducto identificado corresponde a un patrón de cuatro líneas ((2), figura 4.26) de intensidades 1:2:2:1 correspondiente al aducto DMPO-OH· [77]. Las constantes de acoplamiento hiperfino ($a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 10,5 \text{ G}$) y el patrón de señales obtenido, es similar al observado en otros aductos DMPO-OH· [78,79]. Tal como se explicó en el capítulo 2, los radicales hidroxilos son generados en el medio celular como consecuencia de procesos redox producidos por las enzimas nitrorreductasas presentes en el parásito.

Finalmente, el tercer patrón corresponde a 3 líneas ((3), figura 4.26) y se relaciona con la oxidación del atrapador y/o la rápida descomposición del aducto DMPO-OH· [77,80].

Es así que mediante las medidas de resonancia electrónica paramagnética y utilizando la técnica de *spin trapping*, se confirmó la capacidad de los tres complejos RuCpL de producir radicales libres en el parásito. De esta manera se puede concluir que el mecanismo de acción antiparasitario propio de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldéhidó puede mantenerse en los complejos RuCpL.

4.3.5.2 Interacción con ADN

La inclusión del fragmento organometálico {RuCp} o específicamente el centro metálico de rutenio, podría determinar que ocurriera la interacción con ADN, constituyéndose esta biomolécula en un segundo blanco de acción antiparasitario. Además, se ha confirmado que compuestos metálicos que incluyen las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldéhidó poseen afinidad por el ADN [24,25,48,50,75]. Si bien el complejo RuCpCTZ no mostró una interacción relevante con la biomolécula, se realizó el estudio de interacción con ADN de los complejos RuCpL mediante experimentos de desplazamiento de bromuro de etidio por medidas de fluorescencia.

Se realizó la titulación del aducto {ADN-BE} con concentraciones crecientes de cada complejo, entre 0 μM y 110 μM . En la figura 4.27 a se muestra el efecto del agregado del complejo RuCpL3 sobre el espectro de emisión fluorescente del aducto.

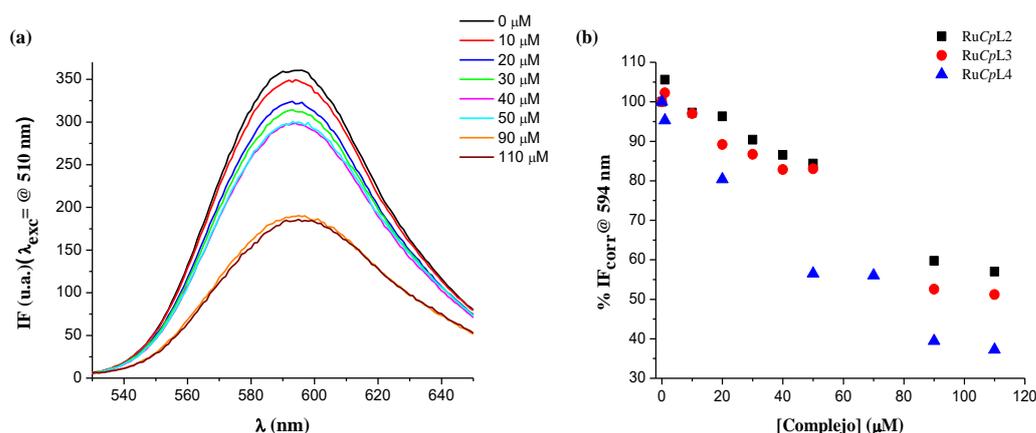


Figura 4.27: (a) *Quenching* de la emisión fluorescente del aducto {ADN-BE} ($\lambda_{\text{exc}} = 510$ nm) observado durante la interacción del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}3)]$. Un resultado similar fue observado para todos los complejos RuCpL. (b) Intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{\text{em}} = 594$ nm al incrementar la concentración de los complejos:

cuadrados: $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}2)]$, círculos: $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}3)]$, triángulos: $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}4)]$.

La disminución observada de la intensidad de fluorescencia del aducto {ADN-BE} se relacionó directamente con el aumento de la concentración de complejo, donde el nivel de *quenching* fue similar para los tres complejos. La figura 4.27 b muestra la variación de la intensidad relativa de fluorescencia del aducto {ADN-BE} al aumentar la concentración de cada complejo. En esta gráfica se observa que efectivamente la disminución de % IF es similar entre los tres compuestos, siendo el complejo $\text{RuCpL}4$ quien mostró el mayor grado de *quenching* en el experimento (hasta un 60%)

La disminución de la intensidad fluorescente que se obtuvo se puede relacionar con el probable desplazamiento de bromuro de etidio del aducto {ADN-BE} producido por la interacción de los complejos RuCpL con la biomolécula. Para conocer cuál sería el mecanismo de interacción entre los complejos y el ADN es necesario realizar otras técnicas complementarias a ésta, ya que el resultado obtenido sugiere la existencia de una interacción pero no permite distinguir si el desplazamiento del BE ocurre como resultado de intercalación de los complejos RuCpL o por cambios conformacionales del ADN por la interacción de los complejos en otras regiones de la biomolécula. Ambos mecanismos propuestos provocarían la eliminación de BE del aducto lo que se refleja en la disminución de la intensidad de fluorescencia del aducto.

Para relacionar la disminución de la intensidad de fluorescencia con el grado de interacción entre los complejos y el ADN, se realizó el análisis de Stern-volmer cuya ecuación de ajuste fue detallada en el capítulo 3. El ajuste de Stern-Volmer (ejemplificado con el complejo $\text{RuCpL}3$ en la figura 4.28) mostró en todos los casos una desviación positiva de la linealidad de la ecuación (figura 4.28 a), efecto que es comúnmente observado cuando el grado de *quenching* de la fluorescencia es relativamente alto [48,81]. En el rango de bajas concentraciones de complejo, el ajuste de IF_0/IF es lineal, indicando así la presencia de sólo un fluoróforo en el sistema en estudio. En esta zona de la gráfica se cumple la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 3.4), que permite finalmente obtener la constante de Stern-Volmer (K_{SV}).

Los valores de K_{SV} obtenidos a partir del ajuste se resumen en la tabla 4.11. En ella se observa que todos los complejos testeados poseen una afinidad similar por el ADN, independientemente de la naturaleza del ligando bioactivo. Al comparar estos valores con los reportados para otros complejos de $\text{Ru}(\text{II})$ con ligandos planos, típicos intercalantes

del ADN, las constantes de los complejos $RuCpL$ mostraron un nivel de interacción más bajo que éstos. En particular, los complejos con los ligandos aromáticos conjugados bipyridina (bpy) y 1,10 fenantrolina (phen), $[Ru^{II}(bpy)(pp[2,3]p)_2](ClO_4)_2$ y $[Ru^{II}(phen)(pp[2,3]p)_2](ClO_4)_2$ (pp[2,3]p = (pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolina) mostraron valores de $\log K_{SV}$ de 5,8 y 6,0 (se utiliza el log de K_{SV} para comparar con mayor facilidad el grado de interacción) [82].

Tabla 4.11: Constante de Stern-Volmer de los complejos $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L)]$ en el estudio de desplazamiento del BE del aducto {ADN-BE}

Complejo	$K_{SV} (M^{-1})$	Log K_{SV}
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L2)]$	3835	3,6
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$	5362	3,7
$[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L4)]$	16254	4,2

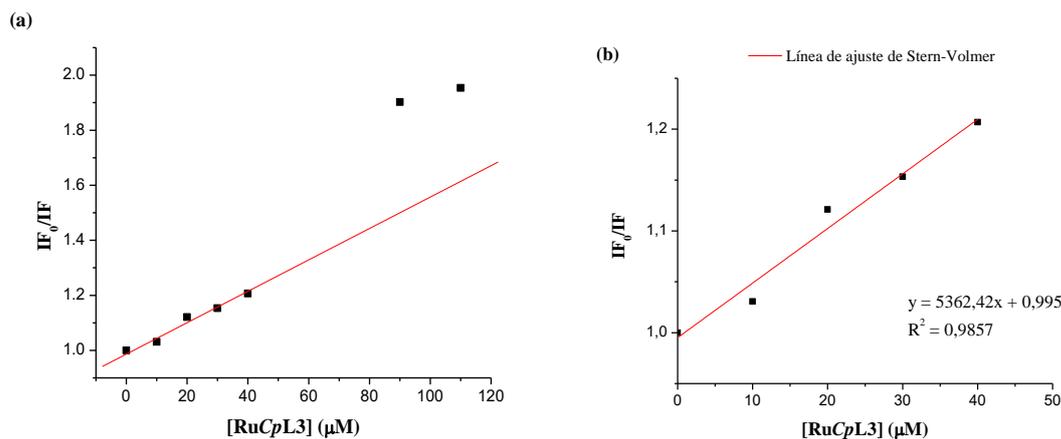


Figura 4.28: (a) Gráfica de IF_0/IF en función de la concentración del complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$ en todo el rango de concentraciones estudiado y (b) ajuste de Stern-Volmer realizado para el complejo $[Ru^{II}Cp(PPh_3)(L3)]$.

Los resultados del experimento de desplazamiento del BE del aducto {ADN-BE} para los complejos $RuCpL$ indican que esta biomolécula podría ser un blanco de acción en el parásito. Sin embargo, no se observó una correlación entre la interacción con esta biomolécula y la actividad antiparasitaria.

4.2.6 Conclusiones parciales

Se obtuvieron tres nuevos complejos organometálicos con el fragmento {RuCp} y tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído como ligandos, de fórmula $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$, los cuales fueron caracterizados en estado sólido y en solución. Todos los compuestos resultaron ser activos contra la forma infectiva de *T. cruzi* y *T. brucei*, con valores de IC_{50} en el rango micromolar.

En cuanto al probable mecanismo de acción, los compuestos fueron capaces de producir radicales libres en *T. cruzi*, por lo que se puede concluir que los complejos metálicos mantendrían el modo de acción del farmacóforo 5-nitrofurano. Además los complejos demostraron tener capacidad de interaccionar con el ADN, mostrando los tres compuestos una similar afinidad por la biomolécula.

Los resultados globales apuntan a que el complejo RuCpL3 sería el más prometedor compuesto para realizar otros estudios.

4.4 Conclusiones generales del capítulo

Se sintetizaron cuatro compuestos organometálicos que incluyen el fragmento $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-}\eta^5\text{-ciclopentadienilo}$ (fragmento {RuCp}) y ligandos orgánicos con actividad antiparasitaria (ligandos bioactivos). En particular, se sintetizó el complejo con el ligando bioactivo Clotrimazol $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ (RuCpCTZ) y tres complejos con las tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofuraldehído $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}2)]$, $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}3)]$ y $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}4)]$ (RuCpL). Todos ellos fueron caracterizados exhaustivamente en estado sólido y en solución utilizando técnicas que permitieron confirmar las fórmulas y estructuras de los compuestos.

Con respecto a la actividad antiparasitaria, todos los compuestos {RuCp} resultaron ser activos contra la forma infectiva de *T. cruzi* y de *T. brucei*, donde a excepción del compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L}4)]$, se observó un aumento de la actividad en comparación al ligando bioactivo en su forma libre. En todos los casos, se observó también una actividad citotóxica contra *T. cruzi* superior a la obtenida con el fármaco tripanosomicida Nifurtimox. Desde el punto de vista de la selectividad, los estudios en modelos de células de mamífero revelaron que el compuesto RuCpCTZ presenta una aceptable a buena

selectividad hacia ambos parásitos, y los complejos RuCpL presentan moderados a buenos índices de selectividad hacia los mismos.

En el caso de RuCpCTZ se comprobó que el complejo participa de la inhibición de la BEM en *T. cruzi* (incluso inhibiendo una enzima distinta a la que inhibe el ligando libre). Los complejos RuCpL mantendrían como mecanismo de acción antiparasitaria el propuesto para los ligandos bioactivos, es decir la generación de radicales libres en los parásitos. Los estudios de interacción con ADN como parte del mecanismo de acción dual de los complejos revelaron una interacción de intensidad media entre el ADN y los complejos RuCpL. No se observó interacción con el ADN del compuesto RuCpCTZ. Si bien ambos grupos de complejos organometálicos poseen características estructurales comunes, al parecer el ligando bioactivo y la estructura global del compuesto juegan un papel primordial en la interacción con esta biomolécula.

En definitiva se sintetizaron los primeros complejos Ru^{II}-η⁵-ciclopentadienilo con estos ligandos bioactivos. Los resultados confirman la validez de la hipótesis planteada en este capítulo. El diseño racional de complejos organometálicos mediante la modificación de ligandos y co-ligandos de la esfera de coordinación del centro de Ru(II) puede generar complejos con propiedades fisicoquímicas y biológicas mejoradas.

4.5 Bibliografía

- [1] M.E. Thibault, D.V. DiMondo, M. Jennings, P.V. Abdelnur, M.N. Eberlin, M. Schlaf, Cyclopentadienyl and pentamethylcyclopentadienyl ruthenium complexes as catalysts for the total deoxygenation of 1,2-hexanediol and glycerol, *Green Chem.*, 13 (2011) 357–366.
- [2] C. Housecroft, A.G. Sharpe, *Inorganic chemistry*, Fourth Ed., Pearson Education Limited, (2012).
- [3] T. Wilczewski, M. Bocheńska, J.F. Biernat, Cyclopentadienyl-ruthenium complexes, *J. Organomet. Chem.*, 215 (1981) 87–96.
- [4] D. Grotjahn, A. Rheingold, C. Incarvito, Combined effects of metal and ligand capable of accepting a proton or hydrogen bond catalyze anti-markovnikov hydration of terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 3884–3887.
- [5] M. Bullock, P. Ghosh, P. Fagan, E. Hauptman, Metal-catalyzed selective deoxygenation of diols to alcohols, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 3887–3890.

- [6] M. Schlaf, P. Ghosh, P.J. Fagan, E. Hauptman, R.M. Bullock, Catalytic deoxygenation of 1,2-propanediol to give n-propanol, *Adv. Synth. Catal.*, 351 (2009) 789–800.
- [7] A.J. Blake, P.J. Dyson, R.C. Gash, B. Johnson, P. Trickey, Bis(cyclopentadienyl) clusters of ruthenium: the synthesis, characterisation and molecular structures of $[\text{Ru}_5\text{C}(\text{CO})_{10}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$ and $[\text{Ru}_6\text{C}(\text{CO})_{12}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2]$, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1994) 1105–1108.
- [8] A. Valente, S. Royer, M. Narendra, T. Silva, P. Mendes, M.P. Robalo, M. Abreu, J. Heck, M.H. Garcia, Synthesis of new Fe(II) and Ru(II) η^5 -monocyclopentadienyl compounds showing significant second order NLO properties, *J. Organomet. Chem.*, 736 (2013) 42–49.
- [9] M. Helena Garcia, J.C. Rodrigues, A. Romão Dias, M. Piedade, M. Teresa Duarte, M. Robalo, N. Lopes, Second harmonic generation of η^5 -monocyclopentadienyl ruthenium *p*-benzonitrile derivatives by Kurtz powder technique crystal and molecular structure determinations of $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)((+)\text{-DIOP})(p\text{-NCC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)][\text{X}]$, $\text{X}=\text{PF}_6^-$, CF_3SO_3^- and $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)((+)\text{-DIOP})(\text{NCCH}_3)][\text{PF}_6]$, *J. Organomet. Chem.*, 632 (2001) 133–144.
- [10] M.H. Garcia, P. Florindo, M. Piedade, M.T. Duarte, M.P. Robalo, J. Heck, C. Wittenburg, J. Holtmann, E. Licandro, Synthesis of organometallic Ru(II) and Fe(II) complexes containing fused rings hemi-helical ligands as chromophores, evaluation of non-linear optical properties by HRS, *J. Organomet. Chem.*, 693 (2008) 2987–2999.
- [11] T.S. Morais, F.C. Santos, T.F. Jorge, L. Côrte-Real, P.J.A. Madeira, F. Marques, M.P. Robalo, A. Matos, I. Santos, M.H. Garcia, New water-soluble ruthenium(II) cytotoxic complex: biological activity and cellular distribution, *J. Inorg. Biochem.*, 130 (2014) 1–14.
- [12] T.S. Morais, T. Silva, F. Marques, M.P. Robalo, F. Avecilla, P.J.A. Madeira, P. Mendes, I. Santos, M.H. Garcia, Synthesis of organometallic ruthenium(II) complexes with strong activity against several human cancer cell lines, *J. Inorg. Biochem.*, 114 (2012) 65–74.
- [13] T.S. Morais, F. Santos, L. Côrte-Real, F. Marques, M.P. Robalo, P.J.A. Madeira, M.H. Garcia, Biological activity and cellular uptake of $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)(\text{Me}_2\text{bpy})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ complex, *J. Inorg. Biochem.*, 122 (2013) 8–17.

- [14] T.S. Morais, M.H. Garcia, M.P. Robalo, M.F.M. Piedade, M.T. Duarte, M.J. Villa de Brito, P.J. Amorim Madeira, Synthesis and structural characterization of new piano-stool ruthenium(II) complexes bearing 1-butyylimidazole heteroaromatic ligand, *J. Organomet. Chem.*, 713 (2012) 112–122.
- [15] V. Moreno, M. Font-Bardia, T. Calvet, J. Lorenzo, F.X. Avilés, M.H. Garcia, T.S. Morais, A. Valente, M.P. Robalo, DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 241–249.
- [16] M. Helena Garcia, T.S. Morais, P. Florindo, M. Piedade, V. Moreno, C. Ciudad, V. Noe, Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes with heteroaromatic ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 354–361.
- [17] A. Valente, M.H. Garcia, F. Marques, Y. Miao, C. Rousseau, P. Zinck, First polymer “ruthenium-cyclopentadienyl” complex as potential anticancer agent, *J. Inorg. Biochem.*, 127 (2013) 79–81.
- [18] J.A. Maertens, History of the development of azole derivatives, *Clin. Microbiol. Infect.*, 10 (2004) 1–10.
- [19] T. Eicher, S. Hauptmann, The chemistry of heterocycles: structure, reactions, syntheses, and applications, G. Thieme Ed., (1995).
- [20] F. Schmitt, K. Donnelly, J.K. Muenzner, T. Rehm, V. Novohradsky, V. Brabec, J. Kasparikova, M. Albrecht, R. Schobert, T. Mueller, Effects of histidin-2-ylidene vs imidazol-2-ylidene ligands on the anticancer and antivasular activity of complexes of ruthenium, iridium, platinum, and gold, *J. Inorg. Biochem.*, 163 (2016) 221–228.
- [21] R.A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, K. Lazard, R. Atencio, M. Capparelli, F. Vargas, J.A. Urbina, A. Bouillez, A.F. Noels, D. Masi, Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases: synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chim. Acta*, 275–276 (1998) 528–540.
- [22] M. Andersson-Trojer, A. Movahedi, H. Blanck, M. Mayden, Imidazole and triazole coordination chemistry for antifouling coatings, *J. Chem.*, 2013 (2013) 23.
- [23] R.J. Sundberg, R.B. Martin, Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems, *Chem. Rev.*, 74 (1974) 471–517.
- [24] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. Diego Maya, D. Gambino,

- Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 411–418.
- [25] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3322–3331.
- [26] A.A. Ibrahim, H. Khaledi, P. Hassandarvish, H. Mohd Ali, H. Karimian, Indole-7-carbaldehyde thiosemicarbazone as a flexidentate ligand toward Zn^{II}, Cd^{II}, Pd^{II} and Pt^{II} ions: cytotoxic and apoptosis-inducing properties of the Pt^{II} complex, *Dalton Trans.*, 43 (2014) 3850–3860.
- [27] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 4 (2004) 31–39.
- [28] M. Campbell, Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones, *Coord. Chem. Rev.*, 15 (1975) 279–319.
- [29] S. Padhyé, G.B. Kauffman, Transition metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones, *Coord. Chem. Rev.*, 63 (1985) 127–160.
- [30] D.X. West, A.E. Liberta, S.B. Padhye, R.C. Chikate, P.B. Sonawane, A.S. Kumbhar, R.G. Yerande, Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies, *Coord. Chem. Rev.*, 123 (1993) 49–71.
- [31] P. Paul, S. Datta, S. Halder, R. Acharyya, F. Basuli, R.J. Butcher, S.-M. Peng, G.-H. Lee, A. Castineiras, M.G.B. Drew, S. Bhattacharya, Syntheses, structures and efficient catalysis for C–C coupling of some benzaldehyde thiosemicarbazone complexes of palladium, *J. Mol. Catal. Chem.*, 344 (2011) 62–73.
- [32] F. Basuli, S. Peng, S. Bhattacharya, Unusual coordination mode of thiosemicarbazone ligands a search for the origin, *Inorg. Chem.*, 39 (2000) 1120–1127.
- [33] D. Mishra, S. Naskar, M. Drew, S.K. Chattopadhyay, Synthesis, spectroscopic and redox properties of some ruthenium(II) thiosemicarbazone complexes: structural description of four of these complexes, *Inorg. Chim. Acta*, 359 (2006) 585–592.
- [34] P. Kalavani, R. Prabhakaran, F. Dallemer, P. Poornima, E. Vaishnavi, E. Ramachandran, V.V. Padma, R. Renganathan, K. Natarajan, DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II)

- complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity, *Metallomics*, 4 (2012) 101–113.
- [35] R. Prabhakaran, S.V. Renukadevi, R. Karvembu, R. Huang, J. Mautz, G. Huttner, R. Subashkumar, K. Natarajan, Structural and biological studies of mononuclear palladium(II) complexes containing N-substituted thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.*, 43 (2008) 268–273.
- [36] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, E.M. Vázquez-López, Synthesis and characterization of thiosemicarbazone derivatives of 2-chloro-4-hydroxybenzaldehyde and their rhenium(I) complexes, *Polyhedron*, 28 (2009) 3915–3922.
- [37] P.N. Yadav, M.A. Demertzis, D. Kovala-Demertzi, A. Castineiras, D.X. West, Synthesis, solution and spectral studies of palladium(II) complexes with 2-hydroxyacetophenone N(3)-propylthiosemicarbazone: crystal structure of a tripalladium complex, *Inorg. Chim. Acta*, 332 (2002) 204–209.
- [38] Y.-P. Tian, W. Yu, C. Zhao, M. Jiang, Z. Cai, H. Kun Fun, Structural characterization and second-order nonlinear optical properties of zinc halide thiosemicarbazone complexes, *Polyhedron*, 21 (2002) 1217–1222.
- [39] Y. Tian, C. Duan, C. Zhao, X. You, T. Mak, Z. Zhang, Synthesis, crystal structure, and second-order optical nonlinearity of bis(2-chlorobenzaldehyde thiosemicarbazone)cadmium halides (CdL_2X_2 ; X = Br, I), *Inorg. Chem.*, 36 (1997) 1247–1252.
- [40] F. Beckford, D. Dourth, M. Shaloski Jr., J. Didion, J. Thessing, J. Woods, V. Crowell, N. Gerasimchuk, A. Gonzalez-Sarrías, N.P. Seeram, Half-sandwich ruthenium–arene complexes with thiosemicarbazones: synthesis and biological evaluation of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{piperonal thiosemicarbazones})\text{Cl}]\text{Cl}$ complexes, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 1019–1029.
- [41] F.A. Beckford, A. Stott, A. Gonzalez-Sarrías, N.P. Seeram, Novel microwave synthesis of half-sandwich $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}]$ complexes and an evaluation of the biological activity and biochemical reactivity, *Appl. Organomet. Chem.*, 27 (2013) 425–434.
- [42] W. Su, Z. Tang, Q. Xiao, P. Li, Q. Qian, X. Lei, S. Huang, B. Peng, J. Cui, C. Huang, Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium(II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands, *J. Organomet. Chem.*, 783 (2015) 10–16.

- [43] W. Su, Q. Zhou, Y. Huang, Q. Huang, L. Huo, Q. Xiao, S. Huang, C. Huang, R. Chen, Q. Qian, L. Liu, P. Li, Synthesis, crystal and electronic structure, anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes with thiosemicarbazones, *Appl. Organomet. Chem.*, 27 (2013) 307–312.
- [44] N. Raja, N. Devika, G. Gupta, V.L. Nayak, A. Kamal, N. Nagesh, B. Therrien, Biological activities of pyrenyl-derived thiosemicarbazone half-sandwich complexes, *J. Organomet. Chem.*, 794 (2015) 104–114.
- [45] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faundez, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 4885–4893.
- [46] C. Sarniguet, J. Toloza, M. Cipriani, M. Lapier, M. Vieites, Y. Toledano-Magaña, J. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, V. Moreno, J. Maya, C. Azar, D. Gambino, L. Otero, Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites, *Biol. Trace Elem. Res.*, 159 (2014) 379–392.
- [47] M. Pagano, B. Demoro, J. Toloza, L. Boiani, M. González, H. Cerecetto, C. Olea-Azar, E. Norambuena, D. Gambino, L. Otero, Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.*, 44 (2009) 4937–4943.
- [48] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino, L. Otero, Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (2014) 4677–4689.
- [49] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sanchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 1534–1543.
- [50] B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones, *Biol. Trace Elem. Res.*, 153 (2013) 371–381.

- [51] E.A. Nyawade, H.B. Friedrich, B. Omondi, Synthesis, characterisation and crystal structures of new water-soluble 1-alkanamedicarbonyl(η^5 -cyclopentadienyl)ruthenium(II) tetrafluoroborate complex salts, *Inorg. Chim. Acta*, 415 (2014) 44–51.
- [52] A. Martínez, T. Carreon, E. Iniguez, A. Anzellotti, A. Sánchez, M. Tyan, A. Sattler, L. Herrera, R.A. Maldonado, R.A. Sánchez-Delgado, Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 3867–3877.
- [53] S. Betanzos-Lara, C. Gómez-Ruiz, L.R. Barrón-Sosa, I. Gracia-Mora, M. Flores-Álamo, N. Barba-Behrens, Cytotoxic copper(II), cobalt(II), zinc(II), and nickel(II) coordination compounds of clotrimazole, *J. Inorg. Biochem.*, 114 (2012) 82–93.
- [54] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.*, 7 (1971) 81–122.
- [55] R.A. Sanchez-Delgado, K. Lazard, L. Rincon, J.A. Urbina, A.J. Hubert, A.N. Noels, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases: enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$, *J. Med. Chem.*, 36 (1993) 2041–2043.
- [56] H. Mishra, R. Mukherjee, Half-sandwich η^6 -benzene Ru(II) complexes of pyridylpyrazole and pyridylimidazole ligands: synthesis, spectra, and structure, *J. Organomet. Chem.*, 691 (2006) 3545–3555.
- [57] C.A. Vock, W.H. Ang, C. Scolaro, A.D. Phillips, L. Lagopoulos, L. Juillerat-Jeanneret, G. Sava, R. Scopelliti, P.J. Dyson, Development of ruthenium antitumor drugs that overcome multidrug resistance mechanisms, *J. Med. Chem.*, 50 (2007) 2166–2175.
- [58] C. Tsai, J. Tung, J. Chen, F. Liao, S. Wang, S. Wang, L. Hwang, C. Chen, Crystal of meso-*p*-tolyl-porphyrinato copper(II) $\text{Cu}(\text{tptp})$ and di-cation ion-pair complex $[\text{H}_4\text{tptp}]^{2+}[\text{CF}_3\text{SO}_3]^{2-}$ formation during the reaction of $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ with meso-*p*-tolyl-porphyrin in CDCl_3 , *Polyhedron*, 19 (2000) 633–639.
- [59] G. Álvarez, J. Varela, P. Márquez, M. Gabay, C.E. Arias Rivas, K. Cuchilla, G.A. Echeverría, O.E. Piro, M. Chorilli, S.M. Leal, P. Escobar, E. Serna, S. Torres, G. Yaluff, N.I. Vera de Bilbao, M. González, H. Cerecetto, Optimization of

- antitrypanosomatid agents: identification of nonmutagenic drug candidates with *in vivo* activity, *J. Med. Chem.*, 57 (2014) 3984–3999.
- [60] W. de Souza, J. Rodrigues, Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2009 (2009) 1-19.
- [61] K. Lizardi, J.A. Urbina, W. de Souza, Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (1990) 2097–2105.
- [62] J.A. Urbina, Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (2009) 311–318.
- [63] F.S. Buckner, J.H. Griffin, A.J. Wilson, W.C. Van Voorhis, Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 1210–1215.
- [64] J.A. Urbina, G. Payares, C. Sanoja, R. Lira, A.J. Romanha, *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21 (2003) 27–38.
- [65] J.A. Urbina, G. Payares, C. Sanoja, J. Molina, R. Lira, Z. Brener, A.J. Romanha, Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187 activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21 (2003) 39–48.
- [66] E. Iniguez, A. Varela-Ramirez, A. Martínez, C.L. Torres, R.A. Sánchez-Delgado, R.A. Maldonado, Ruthenium-clotrimazole complex has significant efficacy in the murine model of cutaneous leishmaniasis, *Acta Trop.*, 164 (2016) 402–410.
- [67] L. Colina-Vegas, J.L. Dutra, W. Villarreal, J.H. de A. Neto, M.R. Cominetti, F. Pavan, M. Navarro, A.A. Batista, Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Inorg. Biochem.*, 162 (2016) 135–145.
- [68] V. Moreno, J. Lorenzo, F.X. Aviles, M.H. Garcia, J.P. Ribeiro, T.S. Morais, P. Florindo, M.P. Robalo, Studies of the antiproliferative activity of ruthenium (II) cyclopentadienyl-derived complexes with nitrogen coordinated ligands, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010 (2010) 11.
- [69] E. Cabrera, H. Cerecetto, M. González, D. Gambino, P. Noblia, L. Otero, B. Parajón-Costa, A. Anzellotti, R. Sánchez-Delgado, A. Azqueta, A.L. de Ceráin, A.

- Monge, Ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes: new DNA binding agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 39 (2004) 377–382.
- [70] D. Gambino, L. Otero, M. Vieites, M. Boiani, M. González, E.J. Baran, H. Cerecetto, Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: experimental and theoretical study, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 68 (2007) 341–348.
- [71] D. Gambino, L. Otero, J. D. Maya, A. Morello, C. Rigol, G. Barriga, J. Rodriguez, C. Folch, E. Norambuena, M. Gonzalez, C. Olea Azar and H. Cerecetto, Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Med. Chem.*, 4 (2008) 11–17.
- [72] E.R. Brown, R.F. Large, *Electrochemical methods*, Interscienc Ed., New York, (1971).
- [73] C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, L. Otero, D. Gambino, M. González, H. Cerecetto, Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 61 (2005) 2933–2938.
- [74] L. Otero, C. Folch, G. Barriga, C. Rigol, L. Opazo, M. Vieites, D. Gambino, H. Cerecetto, E. Norambuena, C. Olea-Azar, ESR, electrochemical and reactivity studies of antitrypanosomal palladium thiosemicarbazone complexes, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 70 (2008) 519–523.
- [75] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J.D. Maya, B. Garat, D. Gambino, Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 1033–1043.
- [76] M. Bruce, N. Windsor, Cyclopentadienyl-ruthenium and -osmium chemistry: convenient high-yield synthesis of some cyclopentadienyl ruthenium or osmium tertiary phosphine halide complexes, *Aust. J. Chem.*, 30 (1977) 1601–1604.
- [77] K. Makino, T. Hagiwara, A. Murakami, A mini review: fundamental aspects of spin trapping with DMPO, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.*, 37 (1991) 657–665.
- [78] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, A. Morello, J. Diego Maya, C. Moncada, E. Cabrera, R. di Maio, M. González, H. Cerecetto, ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofuran derivative analogues of Nifurtimox by

- electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction, *Free Radic. Res.*, 37 (2003) 993–1001.
- [79] C.L. Hawkins, M.J. Davies, Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals, *Chem. Res. Toxicol.*, 14 (2001) 1071–1081.
- [80] B. Aguilera-Venegas, C. Olea-Azar, V. Arán, J. D. Maya, U. Kemmerling, H. Speisky, F. Mendizábal, Electrochemical, ESR and theoretical insights into the free radical generation by 1,1'-hydrocarbylenebisindazoles and its evaluation as potential bio-active compounds, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012) 5837–5863.
- [81] J. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed., Springer Science, New York, (2006).
- [82] B. Wu, L. Gao, Z. Duan, K. Wang, Syntheses and DNA-binding studies of two ruthenium(II) complexes containing one ancillary ligand of bpy or phen: $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{pp}[2,3]\text{p})_2](\text{ClO}_4)_2$ and $[\text{Ru}(\text{phen})(\text{pp}[2,3]\text{p})_2](\text{ClO}_4)_2$, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 1685–1691.

CAPÍTULO 5

COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS DE RENIO(II)-TRICARBONILO,



COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS DE RENIO(I)-TRICARBONILO, *fac*-{Re(CO)₃}

Contenido

5.1	Introducción	205
5.2	Compuestos [Re^I(CO)₃Br(HL)]	212
5.2.1	Síntesis	212
5.2.2	Caracterización en estado sólido	213
5.2.2.1	Análisis elemental	213
5.2.2.2	Espectroscopía infrarroja	213
5.2.3	Caracterización en solución	216
5.2.3.1	Resonancia magnética nuclear	216
5.2.4	Comportamiento en solución: obtención de [Re ^I ₂ (CO) ₆ (L) ₂]	222
5.2.4.1	Espectrometría de masa	226
5.2.4.2	Difracción de rayos X en monocristal	228
5.2.5	Actividad biológica	233
5.2.5.1	Actividad contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	233
5.2.5.2	Citotoxicidad inespecífica	234
5.2.6	Lipofilia	234
5.2.7	Mecanismo de acción	235
5.2.7.1	Generación de especies radicalarias en <i>T. cruzi</i>	235
5.2.7.2	Efecto sobre el consumo de oxígeno de <i>T. cruzi</i>	235
5.2.7.3	Estudios de voltametría cíclica	237

5.2.8	Conclusiones	242
5.3	Bibliografía	243

Capítulo 5: Compuestos organometálicos de renio(I)-tricarbonilo, *fac*-{Re(CO)₃}

5.1 Introducción

En este capítulo se expone el desarrollo de un grupo de nuevos complejos organometálicos de renio(I)-tricarbonilo, que contienen el fragmento *fac*-{Re(CO)₃} e incluyen en la esfera de coordinación del metal tres ligandos bioactivos pertenecientes al grupo de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL1, HL4 y HL5). En este apartado se expone la síntesis y caracterización de estos compuestos, y además se incluye un estudio sobre el particular comportamiento en solución que éstos presentan. Se realizaron medidas de propiedades fisicoquímicas de interés biológico y la evaluación *in vitro* sobre la forma infectiva de *Trypanosoma cruzi*, y se estudió la citotoxicidad en células mamíferas modelo. Además, se realizaron estudios sobre el probable mecanismo de acción antichagásico de dichos complejos.

El renio es un elemento metálico de la tercera serie de transición d de configuración electrónica [Xe]4f¹⁴5d⁵6s². Este elemento químico posee varios estados de oxidación, que van desde -1 al +7, los cuales pueden convertirse unos en otros mediante reacciones de óxido reducción. Por esta razón es necesario controlar cuidadosamente las condiciones experimentales de síntesis para la obtención de compuestos con un determinado estado de oxidación, y así evitar mezclas de productos y resultados no reproducibles. Los estados de oxidación más elevados del renio son estabilizados por ligandos dadores π como O²⁻, NR²⁻, N³⁻ y F⁻, como por ejemplo el anión perrenato (ReO₄⁻) que es la forma química más estable del renio en solución acuosa. El estado de oxidación (I) es estabilizado por ligandos haluro y ligandos aceptores π , como fosfinas terciarias o carbonilos. Los compuestos de coordinación clásicos con este estado de oxidación (configuración electrónica d⁶) son generalmente complejos octaédricos de bajo espín [1]. Se han sintetizado numerosos complejos de Re(I) con diferentes ligandos [2], y específicamente, existe una gran variedad de estos complejos que incluyen el fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃}. Este fragmento se caracteriza por poseer un centro metálico de Re(I) inmerso en un entorno geométrico octaédrico, el cual está unido a tres

ligandos carbonilo ubicados en una estereoisomería facial (*fac*), es decir, los tres ligandos CO están ubicados en la misma cara del octaedro (figura 5.1).

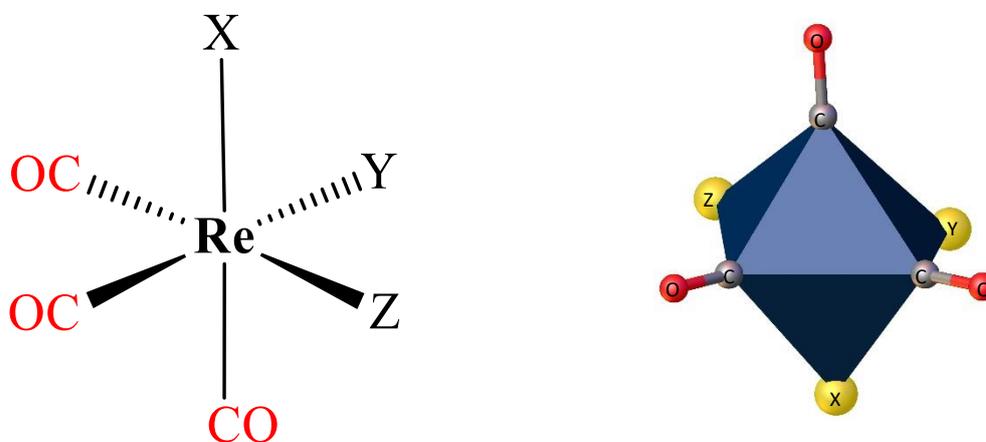


Figura 5.1: Estructura del fragmento *fac*-{Re(CO)₃}.

Los carbonilos son ligandos aceptores π que estabilizan complejos de metales en bajo estado de oxidación. Estas características electrónicas hacen que la estructura del fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃} sea bastante estable, facilitando la coordinación de otros ligandos en los otros sitios vacantes del octaedro (sitios X, Y y Z, figura 5.1). El ligando carbonilo se caracteriza por ser un ligando dador sigma débil y fuerte aceptor π [3]. El HOMO del carbonilo, localizado sobre el C, permite la formación del enlace sigma con el átomo metálico (dador σ débil), favoreciendo la geometría lineal Re-C-O. El LUMO de CO es un orbital π^* , que puede solaparse con los orbitales d de simetría adecuada del metal. Esta interacción conduce a una deslocalización electrónica desde los orbitales d llenos del metal hacia los orbitales π^* vacíos del ligando CO (aceptor π). Este proceso, llamado retrodonación, contribuye a aumentar la fuerza del enlace M-C y a debilitar el enlace C-O [3,4].

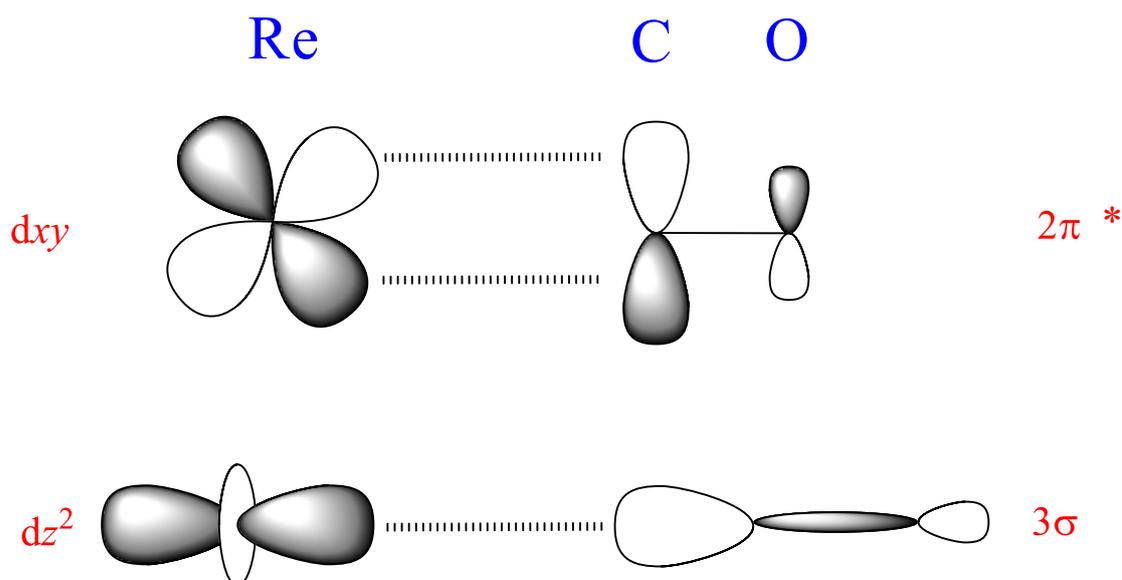


Figura 5.2: Interacción de orbitales de frontera del centro metálico Re(I) y el ligando carbonilo.

Los complejos del tipo $[\text{Re}^{\text{I}}\text{X}(\text{CO})_5]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ o I) han sido ampliamente utilizados como precursores de compuestos inorgánicos que incluyen al fragmento organometálico *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$. Estos precursores permiten obtener dos tipos de estructuras características, siempre con isomería facial. Como se muestra en el esquema de la figura 5.3, se pueden incluir ligandos *cis* bidentados al fragmento $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{X}]$, o ligandos tridentados al fragmento $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$. En ambos casos los ligandos carbonilo ubicados en posición *cis* en el precursor (de color rojo en el esquema), pueden ser cuantitativamente reemplazados por ligandos donores σ [5–9].

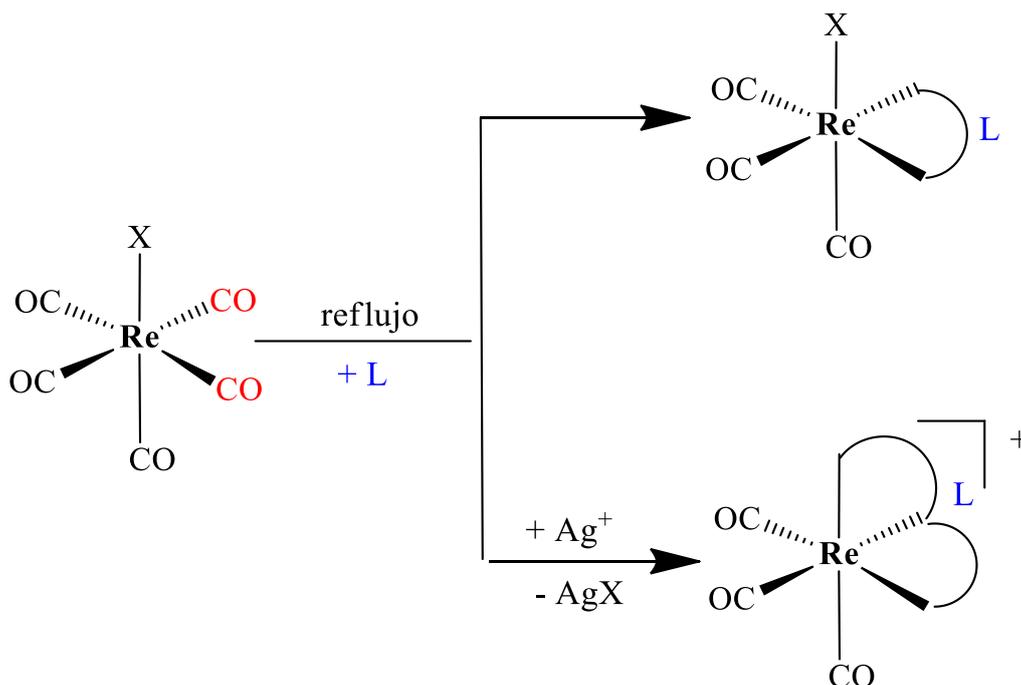


Figura 5.3: Reactividad de $[\text{Re}^{\text{I}}\text{X}(\text{CO})_5]$

Si bien hoy en día estos complejos precursores existen de forma comercial, a mediados de siglo varios autores plantearon métodos sintéticos para la obtención de éstos, y consecuentemente diseñar nuevos compuestos. El primer acercamiento fue realizado por Hieber en el año 1939, quien mediante calentamiento de ReCl_5 , ReCl_3 o K_2ReCl_6 , en presencia de polvo de cobre y a una presión de 200 atm de CO, obtuvo el compuesto $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{CO})_5]$. Además, utilizando condiciones similares de síntesis y el correspondiente haluro de Re, logró también sintetizar los complejos análogos de bromo y yodo [10]. Más de cincuenta años después otros investigadores lograron sintetizar estos mismos compuestos, pero utilizando condiciones experimentales más suaves y rendimientos superiores a los reportados por Hieber. Es así que, Klahn y col. lograron obtener, con un 86% de rendimiento, el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{CO})_5]$ mediante carbonilación reductiva de K_2ReCl_6 en presencia de sodio [11]. Por otro lado, Schmidt y col. sintetizaron el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$, con un 91% de rendimiento, mediante reacción entre $[\text{Re}_2(\text{CO})_{10}]$ y Br_2 [12] (procedimiento utilizado en este Trabajo de tesis que fue detallado en el capítulo 3). En este último caso, los autores también sintetizaron los complejos análogos con los otros haluros, pero con condiciones experimentales más complejas y obteniendo rendimientos inferiores a los descritos anteriormente.

Se han sintetizado numerosos complejos organometálicos a partir del precursor *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$, todos ellos con diversas aplicaciones. Alguno de éstos son los complejos

neutros del tipo $fac-[Re^I(CO)_3Br(L)]$ ($L =$ ligandos bidentados derivados de 1,10-fenantrolina), los cuales han presentado novedosas propiedades luminiscentes [13–16]. Otra aplicación encontrada para este tipo de compuestos metálicos es su probable actividad catalítica, como por ejemplo, el complejo $fac-[Re^I(CO)_3Br(Anth-N2)]$ ($Anth-N2 =$ derivado de antraceno) caracterizado como potencial electrocatalizador del proceso de reducción de CO_2 a CO [17] y el complejo $[Re^I(CO)_3Br(thf)_2]$ que cataliza reacciones de cetiminas aromáticas con aldehídos para dar derivados de isobenzofurano [18]. Desde el punto de vista biológico, los complejos sintetizados a partir del precursor $fac-[Re^IBr(CO)_5]$ han mostrado una elevada estabilidad y baja toxicidad en humanos [19]. En ese sentido, complejos $fac-[Re^I(CO)_3Br(L)]$ ($L =$ ligandos piridina-triazol o quinolina-triazol) han sido estudiados como potenciales generadores de imágenes en células de adenocarcinoma de colon [20].

Los dos sitios de coordinación vacantes del fragmento $fac-[Re^I(CO)_3Br]$ presentan una elevada afinidad por ligandos con átomos donores N,S como lo son las tiosemicarbazonas. Como se mencionó en el capítulo anterior, las tiosemicarbazonas son ligandos versátiles que pueden coordinar a iones metálicos por diferentes modos de coordinación, y de forma neutra o aniónica [21–28]. Estas características han permitido obtener diferentes complejos derivados de $fac-[Re^I(CO)_3Br]$ con tiosemicarbazonas, los cuales han mostrado diferentes características estructurales que repercuten directamente sobre sus propiedades.

Varios complejos de fórmula general $[Re^I(CO)_3Br(HL)]$ (HL corresponde a diferentes tiosemicarbazonas, todas coordinando de forma protonada y por ende, actuando como ligando neutro) mostraron la coordinación bidentada comúnmente observada para las tiosemicarbazonas, a través del átomo de azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico. Algunos de estos ejemplos son los complejos estudiados por Nuñez-Montenegro y col. (figura 5.4) que lograron sintetizar este tipo de estructuras utilizando tiosemicarbazonas derivadas del 2-etoxi-3-metoxi-benzaldehído [26], del 2-cloro-4-hidroxi-benzaldehído [23], del 4-(metiltio)benzaldehído [29] y derivados de resorcinol [30]. Por otro lado, si la tiosemicarbazona contiene sustituyentes que pueden actuar como nuevos sitios de coordinación, es posible generar otro tipo de estructuras. Por ejemplo, la reacción del precursor $fac-[Re^I(CO)_3Br]$ con las tiosemicarbazonas que incluyen como sustituyente un anillo piridina, han dado como resultado estructuras del tipo $[Re(CO)_3(L)]$, donde la tiosemicarbazona tridentada provoca la eliminación del ligando bromuro de la esfera de coordinación del metal [31] (figura 5.4).

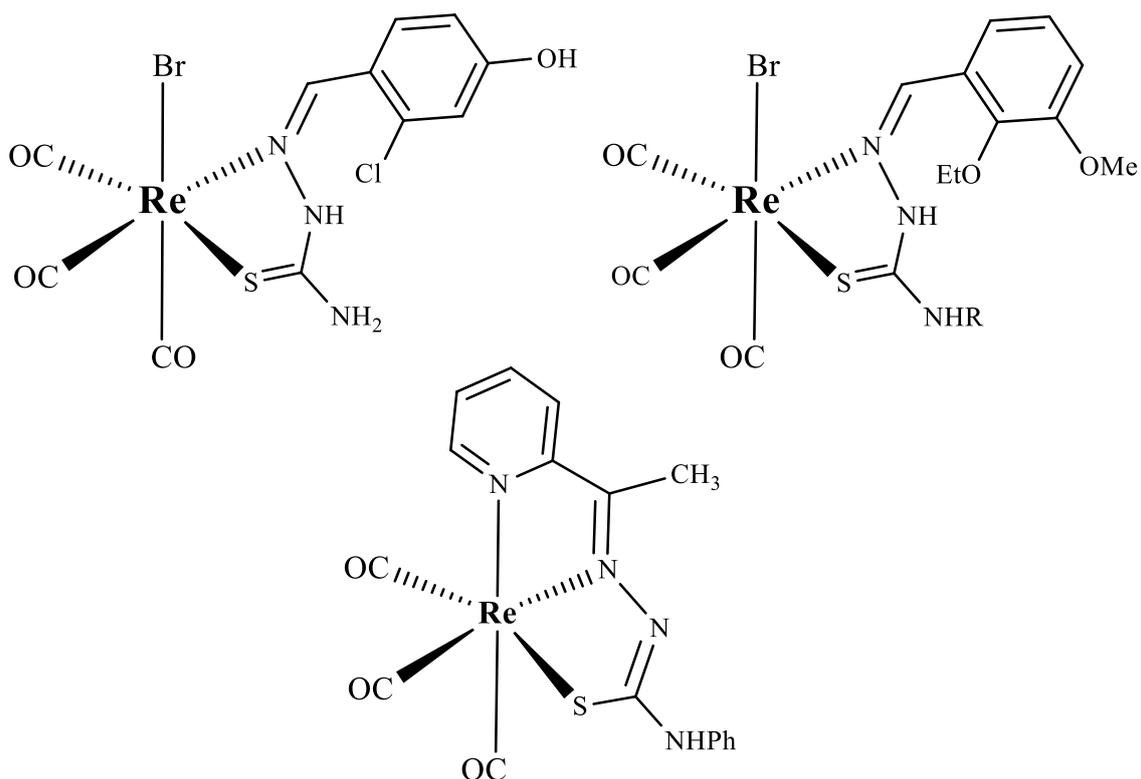


Figura 5.4: Algunos ejemplos de complejos que incluyen el fragmento *fac*-{Re(CO)₃} y ligandos tiosemicarbazonas.

Algunos de los complejos [Re^I(CO)₃Br(HL)] anteriormente mencionados presentaron un comportamiento inusual en solución. Estos compuestos pueden sufrir la deprotonación del ligando tiosemicarbazona (en el átomo de nitrógeno hidrazínico), y de forma simultánea la labilización del ligando bromuro de la esfera, lo que en conjunto genera la formación de complejos diméricos de fórmula [Re₂^I(CO)₆(L)₂]. Los estudios realizados por Nuñez-Montenegro y col. han demostrado que la evaporación lenta del solvente de una solución de monómero, favorece la obtención de monocristales del complejo dinuclear para el estudio por difracción de rayos X [23,26,29,30]. En todas estas estructuras dinucleares los ligandos tiosemicarbazona coordinaron de forma bidentada a cada centro metálico (a través del átomo de azufre tiocarbonilo y el nitrógeno azometínico), y actuaron también como ligando puente μ -S conectando ambos centros metálicos de Re(I), tal como se muestra en el esquema de la figura 5.5. Además, se observó que este proceso de dimerización puede ser acelerado al adicionar un medio básico a la solución del monómero (NaOH o NaOMe). Este antecedente había sido previamente reportado por Carballo y col. quienes obtuvieron el primer complejo

dinuclear Re(I)-tricarbonilo con tiosemicarbazonas bidentadas derivadas del ferrocenilcarbaldehído a partir de la reacción del complejo monomérico con NaOMe [32].

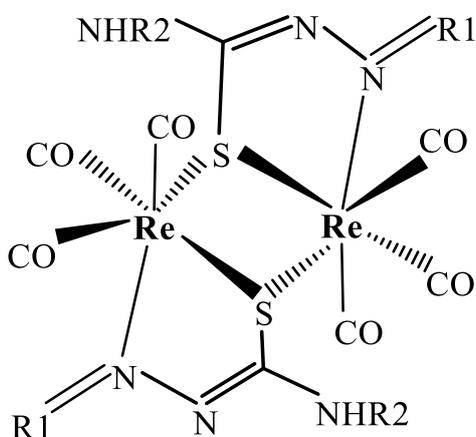


Figura 5.5: Estructura de los complejos dinucleares $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$.

También se han reportado estructuras de dímeros Re(I)-tricarbonilo con ligandos tiosemicarbazona donde los centros metálicos se encuentran unidos mediante enlaces puentes no azufrados. Por ejemplo, utilizando tiosemicarbazonas derivadas de 2,2-dipiridilcetona se obtuvieron los complejos dinucleares del tipo $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6\text{Br}(\text{L})]$ [33] (figura 5.6), o usando 4-acetilpiridina tiosemicarbazona se obtuvieron los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}_2\text{Br}_2(\text{CO})_6(\text{HL})_2]$. En ambos casos, fueron las características estructurales de las tiosemicarbazonas las que permitieron obtener complejos dinucleares de Re(I) sin utilizar puente $\mu\text{-S}$ [34].

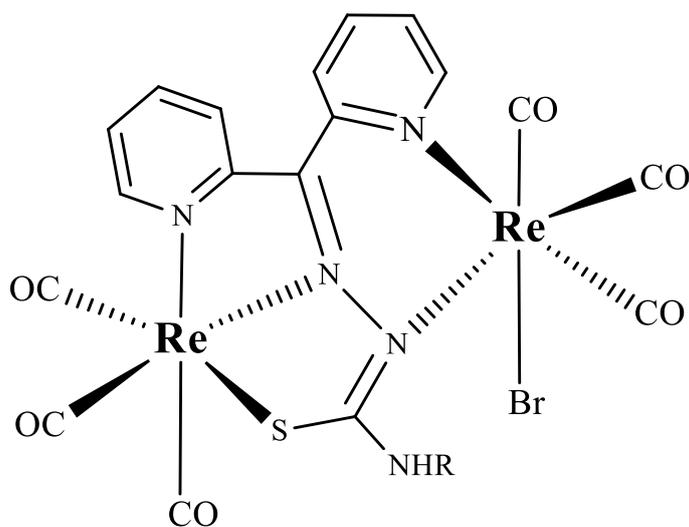


Figura 5.6: Estructura del complejo dinuclear $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6\text{Br}(\text{L})]$ [33].

La mayoría de los complejos metálicos que han incluido como ligando las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído son compuestos mononucleares con las tiosemicarbazonas coordinando de forma bidentada mediante el S tiocarbonílico y el N azometínico. Sin embargo, mediante estudios de difracción de rayos X se evidenció la formación de complejos diméricos en los complejos que incluyeron el fragmento organometálico $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-}p\text{-cimeno}\}$ desarrollados por Demoro y col. [35,36]. Los complejos de fórmula $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{Cl}_2$ y $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2](\text{PF}_6)_2$, mostraron que las tiosemicarbazonas coordinaron de forma bidentada hacia cada centro de Ru(II), y a su vez actuaron como ligando puente $\mu\text{-S}$ conectando ambos iones metálicos.

5.2 Compuestos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$

5.2.1 Síntesis

Se sintetizaron tres compuestos que incluyen el fragmento *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$ con las tiosemicarbazonas seleccionadas tal como se detalló en el capítulo 3 (que codificaremos Re-(CO)₃-HL). En esta serie de compuestos, se planteó la síntesis con tres tiosemicarbazonas para estudiar el efecto de la coordinación de ligandos con diferente sustituyente en el grupo amino terminal (R), y diferente largo de la cadena alifática (n). Para la obtención de los compuestos se hizo reaccionar $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$ con el respectivo ligando tiosemicarbazona, HL1 (R = H, n = 0), HL4 (R = fenilo, n = 0) y HL5 (R = H, n = 1), en cantidades equimolares. Todos los compuestos, de fórmula $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$, $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ y $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$ (figura 5.7), se obtuvieron como sólidos de color marrón con aceptables rendimientos: para el complejo Re-(CO)₃-HL1 se obtuvo un 61 % de rendimiento (36 mg), para el complejo Re-(CO)₃-HL4 un 58 % (36 mg), y un 53 % de rendimiento (38 mg) para el compuesto Re-(CO)₃-HL5.

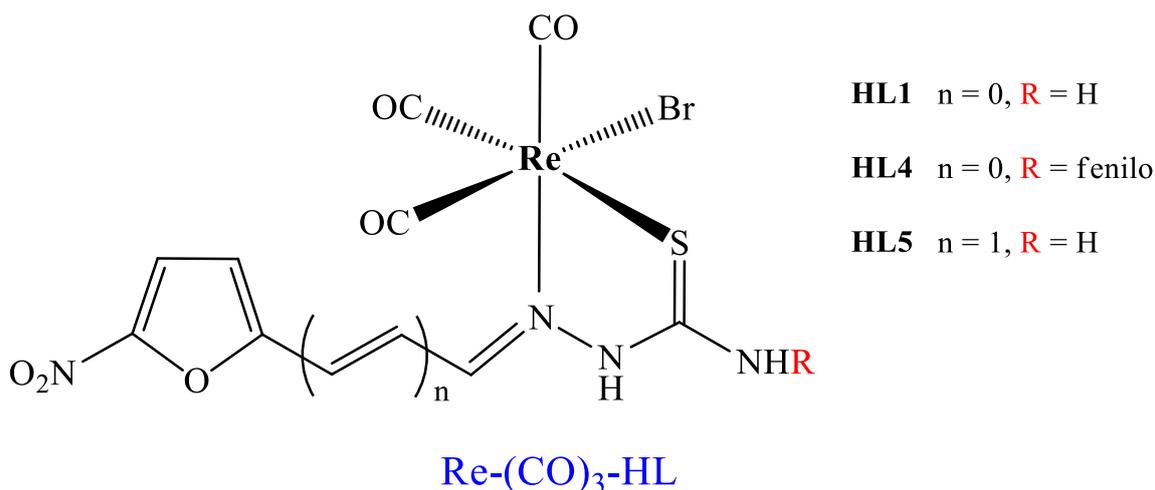


Figura 5.7: Estructura de los compuestos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$.

5.2.2 Caracterización en estado sólido

5.2.2.1 Análisis elemental

La fórmula química propuesta para cada complejo se confirmó mediante análisis elemental de elementos livianos carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. El valor porcentual obtenido de cada uno de estos elementos confirmó la fórmula propuesta para cada complejo. En la tabla 5.1 se muestran los valores teóricos y experimentales.

Tabla 5.1: Resultados de análisis elemental de C, H, N y S de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$.

Complejo	%C _{experimental} (%C _{teórico})	%H _{experimental} (%H _{teórico})	%N _{experimental} (%N _{teórico})	%S _{experimental} (%S _{teórico})	Fórmula
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$	19,25 (19,15)	1,03 (1,07)	9,94 (9,93)	5,67 (5,68)	C ₉ H ₆ BrN ₄ O ₆ SRe
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	28,12 (28,13)	1,59 (1,57)	8,70 (8,75)	5,02 (5,01)	C ₁₅ H ₁₀ BrN ₄ O ₆ SRe
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	22,37 (22,38)	1,36 (1,37)	9,52 (9,49)	5,48 (5,43)	C ₁₁ H ₈ BrN ₄ O ₆ SRe

5.2.2.2 Espectroscopía infrarroja

Se midieron los espectros de infrarrojo de los tres complejos en pastillas de KBr en un rango entre 400 y 4000 cm^{-1} , se identificaron las bandas de vibración características de

cada ligando y se analizaron posibles corrimientos de las bandas asociadas a los grupos involucrados en la coordinación.

La asignación de las bandas características de los ligandos tiosemicarbazonas fue esencial para comprender el modo de coordinación hacia el fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃}. En la figura 5.8 se muestra, como ejemplo, el espectro de infrarrojo obtenido para el complejo Re-(CO)₃-HL1 y el del ligando HL1 libre para su comparación.

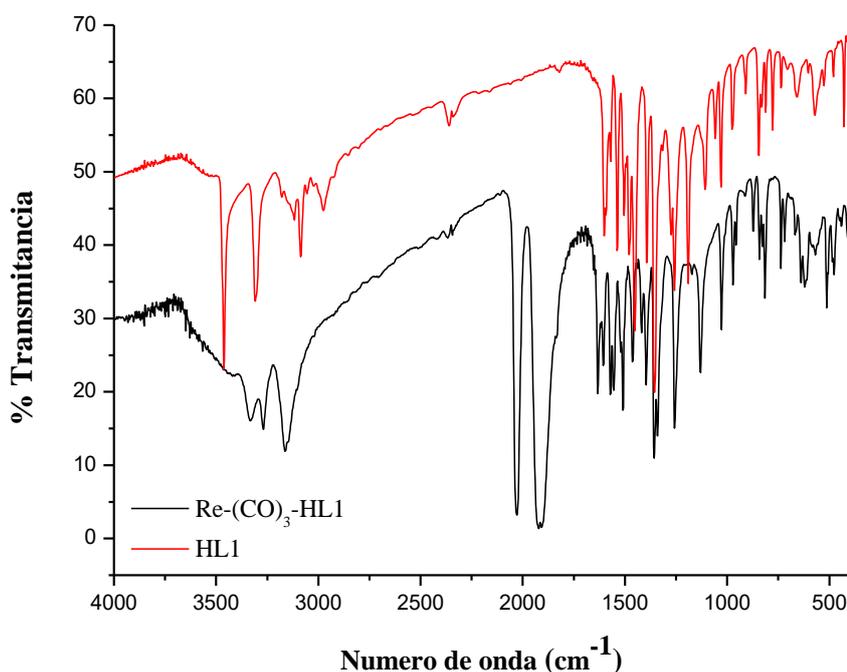


Figura 5.8: Espectros IR del complejo [Re^I(CO)₃Br(HL1)] (línea negra) y del ligando HL1 (línea roja) en el rango entre 4000-400 cm⁻¹.

Los tres complejos mostraron un perfil espectral similar, observándose a nivel general variaciones en los valores de número de onda de las bandas correspondientes a grupos funcionales del ligando como consecuencia de la coordinación. Como se observa en la figura 5.8, los espectros de infrarrojo de los complejos mostraron, entre los 1900 a 2030 cm⁻¹, tres bandas intensas que no están presentes en el espectro del ligando HL libre. Estas bandas (en algunos casos observadas como dos bandas debido al solapamiento entre ellas) corresponden a las vibraciones del estiramiento del enlace CO de los ligandos carbonilo, cuyos valores de energía observados son característicos del fragmento pseudooctaédrico *fac*-{Re(CO)₃} [7,37–41]. En base a antecedentes reportados en

literatura, la banda de mayor energía de las tres (observada entre 2026 y 2029 cm^{-1}), fue asignada a la vibración en fase de los tres ligandos carbonilos (figura 5.9), y las dos bandas de menor energía fueron asignadas a vibraciones fuera de fase: como se muestra en la figura 5.9 [38,42].

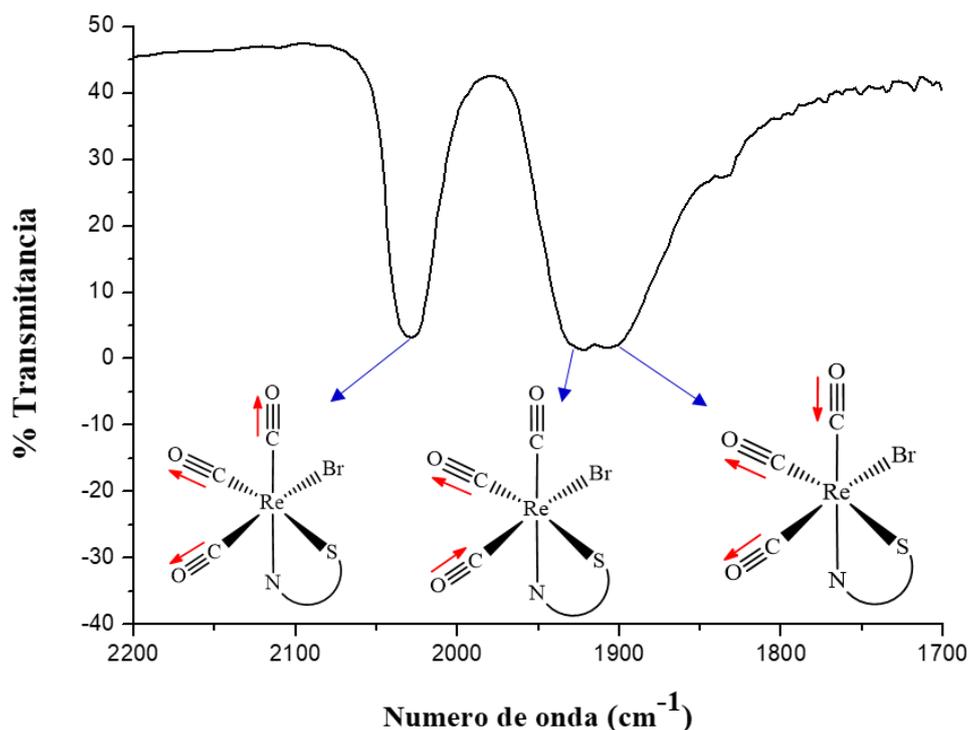


Figura 5.9: Espectro IR del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ en el rango entre 2200-1700 cm^{-1} , incluyendo la asignación de las vibraciones asociadas a los ligandos carbonilo en la estructura del complejo

En relación a los ligandos tiosemicarbazona, en capítulos previos se mencionó que la coordinación bidentada más favorable de estos ligandos (a través del azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico) es evidenciada en los espectros IR mediante la disminución de la energía de las bandas correspondientes a $\nu(\text{C}=\text{N})$ y $\nu(\text{C}=\text{S})$ [43–46]. En los espectros de los tres complejos $\text{Re}-\text{CO}_3\text{-HL}$ se observó esta misma disminución de energía de las bandas, lo que estaría indicando que estos ligandos coordinan también de forma bidentada hacia este fragmento organometálico. Con respecto a la banda de vibración del enlace $\text{C}=\text{S}$, ésta no pudo ser asignada en los espectros de los complejos debido a la elevada

complejidad en esta zona espectral, debida a la coexistencia de otras vibraciones correspondientes a otros grupos funcionales de este mismo ligando (similar a lo observado en los complejos RuCpL del capítulo 4) [47]. En relación a la banda $\nu(\text{N-N})$, se observó en todos los casos un aumento de energía de la vibración por la coordinación, en concordancia con la coordinación del ligando tiosemicarbazona a través del nitrógeno azometínico.

Las bandas de vibración del estiramiento del enlace (N-H), observada entre 3120 y 3250 cm^{-1} en el ligando libre [48], se mantiene en los espectros de los complejos (con pequeñas variaciones de energía). Esto confirmaría que las tiosemicarbazonas no se deprotonan al coordinar al centro metálico, y, por lo tanto, actúan como ligandos neutros en los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$.

La tabla 5.2 resumen los valores de energía (en cm^{-1}) de las bandas de vibración asignadas de los complejos y los respectivos ligandos HL.

Tabla 5.2: Bandas de vibración de importancia de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$.

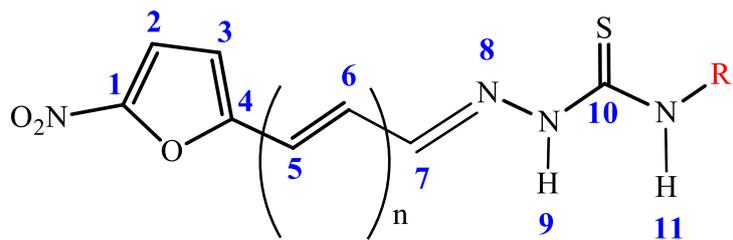
Compuesto	$\nu(\text{C}\equiv\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu_s(\text{NO}_2)$	$\nu(\text{N-N})$	$\delta(\text{NO}_2) + \text{furano}$
HL1	-	1599	1354	1114	808
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$	2026, 1925, 1906	1558	1358	1129	816
HL4	-	1595	1344	1104	811
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	2026, 1958, 1914	1594	1347	1116	808
HL5		1610	1353	1112	810
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	2029, 1921, ^a	1561	1347	1144	813

^a: Banda solapada con la señal de 1921 cm^{-1} .

5.2.3 Caracterización en solución

5.2.3.1 Resonancia magnética nuclear

La caracterización en solución de los complejos se realizó mediante experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensional (^1H y ^{13}C RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC). Los estudios fueron realizados a temperatura ambiente en soluciones de cada complejo en DMSO- d_6 y acetona- d_6 (dependiendo del análisis realizado). Se numeraron los átomos del ligando tiosemicarbazona como se muestra en la figura 5.10.



HL1: $n = 0$ **R = H**
HL4: $n = 0$ **R = fenilo**
HL5: $n = 1$ **R = H**

Figura 5.10: Esquema de numeración de los átomos de los ligandos tiosemicarbazonas HL.

En relación a los espectros ^1H -RMN, la figura 5.11 muestra como ejemplo el espectro del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ medido en DMSO-d_6 .

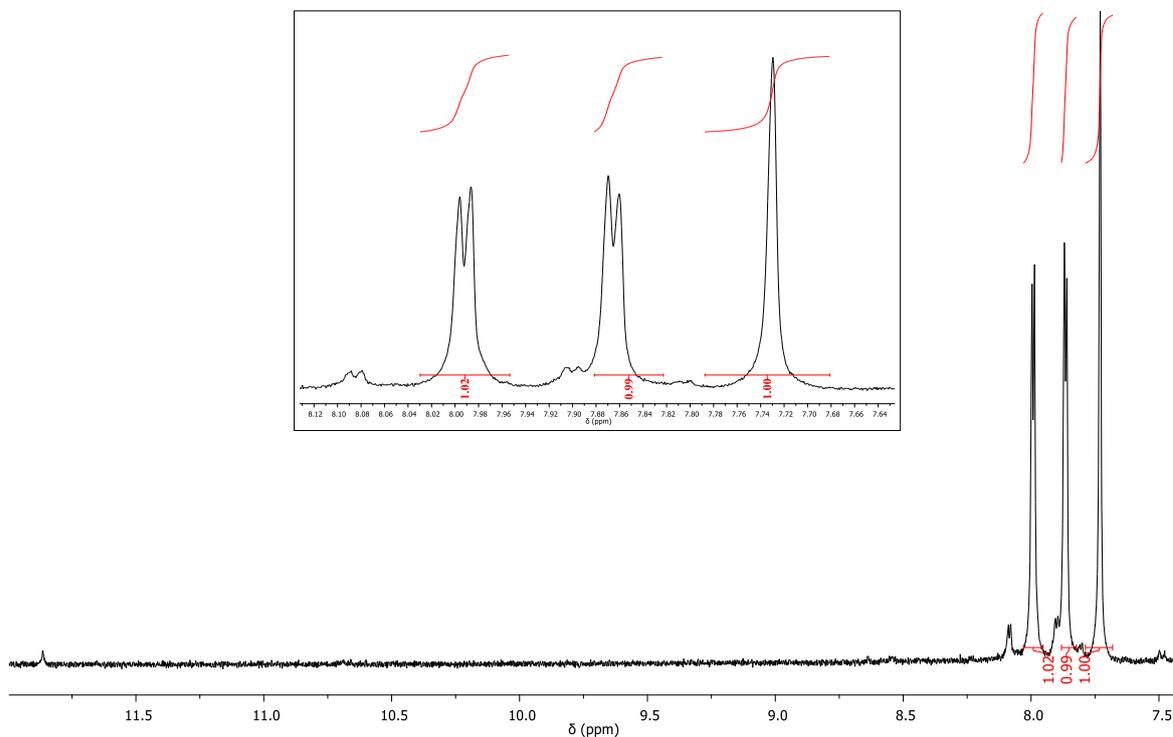


Figura 5.11: Espectro ^1H -RMN del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$. Recuadro: ampliación del espectro entre 7,63 y 8,13 ppm.

Los tres complejos mostraron un perfil espectral similar. Los espectros de los complejos $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL}$ mostraron dos señales con multiplicidad doblete correspondiente a los protones del anillo furano (H2 y H3, $J_{\text{H,H}} = 3,7$ Hz), donde la señal correspondiente al protón más cercano al grupo nitro fue la desplazada hacia menor campo magnético, de forma similar a lo observado en los espectros de los complejos RuCpL discutidos en el capítulo 4. Entre 7,24 y 7,91 ppm se observó el singulete correspondiente al protón ilidénico (H7) en los tres complejos. La señal del protón del grupo amino terminal (H11), sólo pudo ser identificada en el espectro del complejo $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL4}$ mientras que para los complejos de HL1 y HL5 (que presentan un grupo terminal NH_2), no se observó la señal correspondiente [49]. En el espectro del complejo $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL4}$ se identificaron también las señales correspondiente a los protones del sustituyente fenilo, observándose un doblete atribuido a los protones ubicados en posición *orto* ($J_{\text{H-H}} = 8,0$ Hz), y dos tripletes de $J_{\text{H-H}} = 8,0$ Hz y $J_{\text{H-H}} = 7,2$ Hz correspondientes a los protones ubicados en posición *meta* y *para*, respectivamente. Como se observa en la figura 5.11, hacia valores de bajo campo magnético se observó una señal de baja intensidad la cual podría corresponder al protón del nitrógeno hidrazínico (H9). Este átomo tiene características de protón ácido, es decir, podría ser fácilmente intercambiado por protones de moléculas de agua. Al utilizar un solvente que tiene capacidad de absorber agua del ambiente, como el DMSO-d_6 , este efecto de intercambio provocaría que en los espectros se observen señales con muy baja intensidad o incluso que no aparezca la señal de este protón. Para confirmar la presencia de este protón en la estructura de los complejos, se midieron los espectros $^1\text{H-RMN}$ de los complejos y de los ligandos HL libres utilizando acetona- d_6 como solvente. En la figura 5.12 se muestran, como ejemplo, los espectros medidos del complejo $\text{Re-CO}_3\text{-HL4}$ y del ligando HL4.

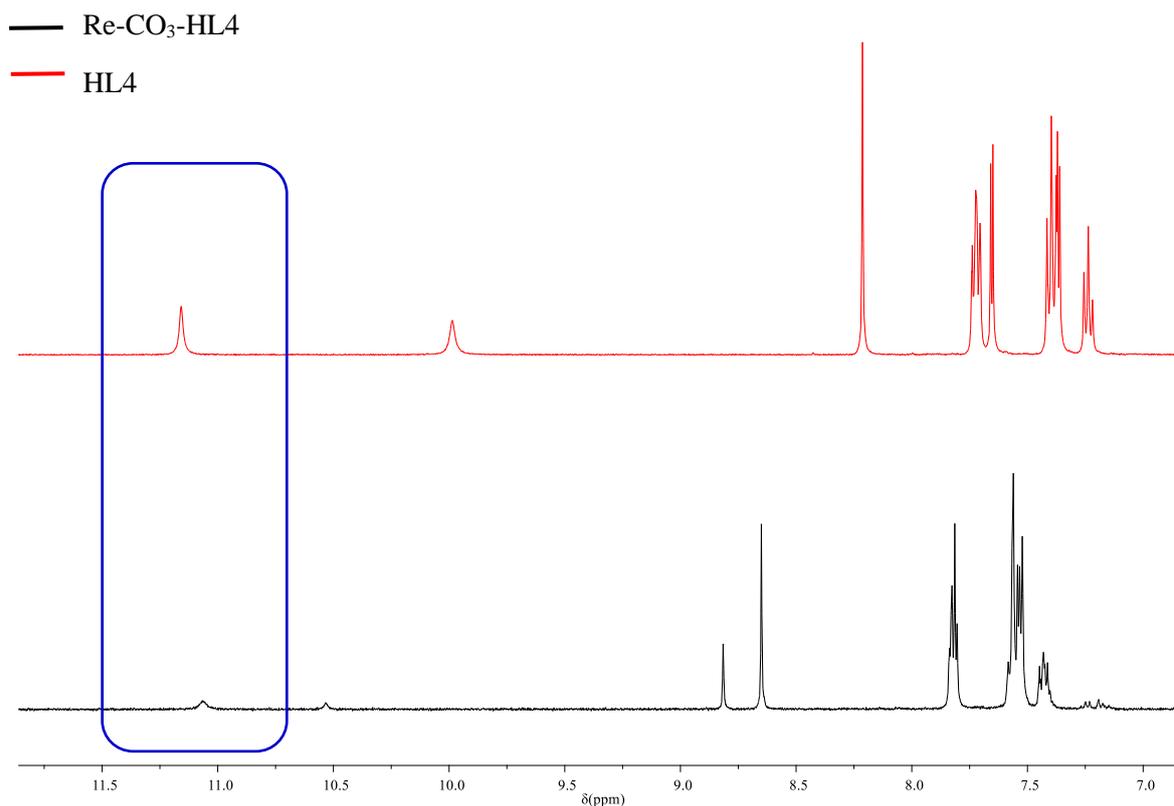


Figura 5.12: Espectros ¹H-RMN del complejo [Re^I(CO)₃Br(HL4)] (línea negra) y del ligando HL4 (línea roja) medidos en acetona-d₆.

En acetona, todos los espectros mostraron una señal de multiplicidad singulete equivalente a un protón. Esta señal es correspondiente al protón H9, cuya presencia en los espectros confirma la monoprotonación del nitrógeno hidrazínico en las tiosemicarbazonas coordinadas al centro de Re(I) [35,50].

La tabla 5.3 resume los valores de desplazamientos químicos (δ) de las señales asignadas en los espectros, medidos en DMSO-d₆ y acetona-d₆, de los complejos y de los respectivos ligandos tiosemicarbazona.

Tabla 5.3: Valores de desplazamiento químico (δ) de los espectros ^1H -RMN de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ y de los ligandos HL medidos en solución de DMSO- d_6 y acetona- d_6 .

H	δ_{H} (ppm)						$\Delta\delta^{\text{a}}$
	HL1	Re-CO ₃ - HL1	HL4	Re-CO ₃ - HL4	HL5	Re-CO ₃ - HL5	$\Delta\delta_1/\Delta\delta_4/\Delta\delta_5$
2	7,80	7,99	7,85	7,82	7,74	7,53	0,19/-0,03/-0,21
3	7,37	7,86	7,52	7,78	7,00	7,18	0,49/0,26/0,18
5	-	-	-	-	7,00	7,24	^d / _d /0,24
6	-	-	-	-	7,00	7,80	^d / _d /0,80
7	7,98	7,73	8,09	7,91	7,87 ^c	8,07	-0,25/-0,18/0,20
9	10,90 ^b	8,93 ^b	11,16 ^b	11,07 ^b	10,60 ^b	12,48 ^b	-1,97/-0,09/1,88
11	8,54	nd	10,20	10,04	8,34	nd	^d /-0,16/ ^d
<i>o</i> -fenil	-		7,54	7,57	-	-	^d /0,03/ ^d
<i>m</i> -fenil	-		7,40	7,35	-	-	^d /-0,05/ ^d
<i>p</i> -fenil	-		7,24	7,09	-	-	^d /-0,15/ ^d

^a: $\Delta\delta = \delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$
^b: medido en acetona- d_6
^c: solapada con una de las señales del NH_2 de HL5
^d: no determinado

Como consecuencia de la coordinación al fragmento organometálico, se observó una variación en los valores de desplazamiento químicos de todas estas señales de los ligandos HL.

Los experimentos de ^{13}C -RMN fueron medidos a temperatura ambiente y en soluciones de cada complejo en DMSO- d_6 . La figura 5.13 muestra, como ejemplo, el espectro obtenido para el complejo $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL1}$.

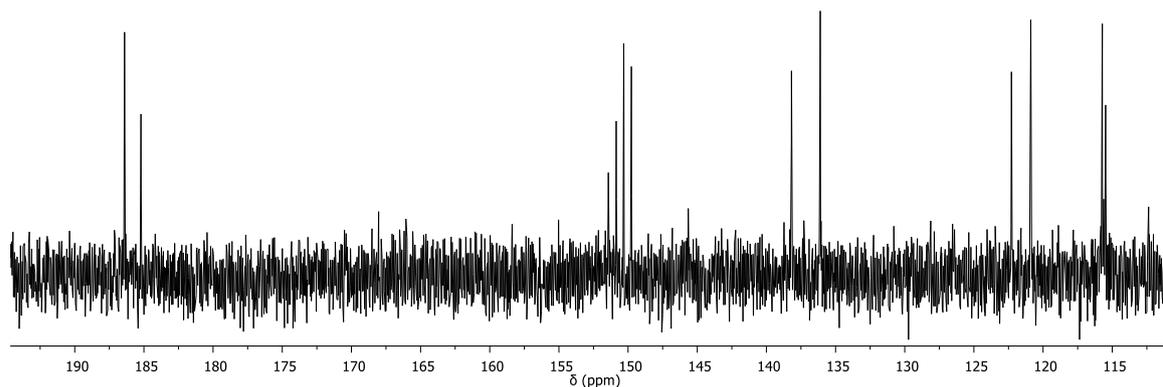


Figura 5.13: Espectro ^{13}C -RMN del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$.

La asignación de las señales de los átomos de carbono de los ligandos HL en los complejos fue realizada por experimentos de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC según la asignación previamente realizada de los protones de esta molécula, y fueron luego confirmadas en los espectros unidimensionales de ^{13}C -RMN. Con respecto a los átomos de carbono de los ligandos carbonilo, las señales fueron asignadas directamente en los espectros ^{13}C -RMN según datos espectrales de otros compuestos de $\text{Re}(\text{I})$ -tricarbonilo [51,52]. En todos los espectros se observó una señal cercana a los 180 ppm que se atribuyó a los tres ligandos carbonilo, sin embargo, se observó otra señal en esta misma zona espectral que tiene relación con el comportamiento en solución de los compuestos que será discutido más adelante.

Tabla 5.4: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro ^{13}C -RMN de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ medidos en solución de DMSO-d_6 .

C	δ_{C} (ppm)		
	Re-CO ₃ -HL1	Re-CO ₃ -HL4	Re-CO ₃ -HL5
1	150,86	151,23	152,76
2	120,89	115,12	115,40
3	115,72	118,39	129,38
4	149,75	149,10	149,88
5	-	-	128,01
6	-	-	124,91
7	136,11	138,63	153,46
<i>o</i> -fenil	-	122,35	-
<i>m</i> -fenil	-	129,01	-
<i>p</i> -fenil	-	123,95	-
<i>Carbonilo</i>	185,21	183,83	178,98

5.2.4 Comportamiento en solución: obtención de $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$

Para estudiar el comportamiento en solución de los complejos, se midieron los espectros de ^1H -RMN (en solución de DMSO-d_6) a diferentes tiempos luego de la preparación de la solución. En la figura 5.14 se muestra, como ejemplo, una zona del espectro obtenido de la solución recién preparada del complejo $\text{Re-CO}_3\text{-HL1}$ (t_0) y el espectro obtenido luego de 24 horas.

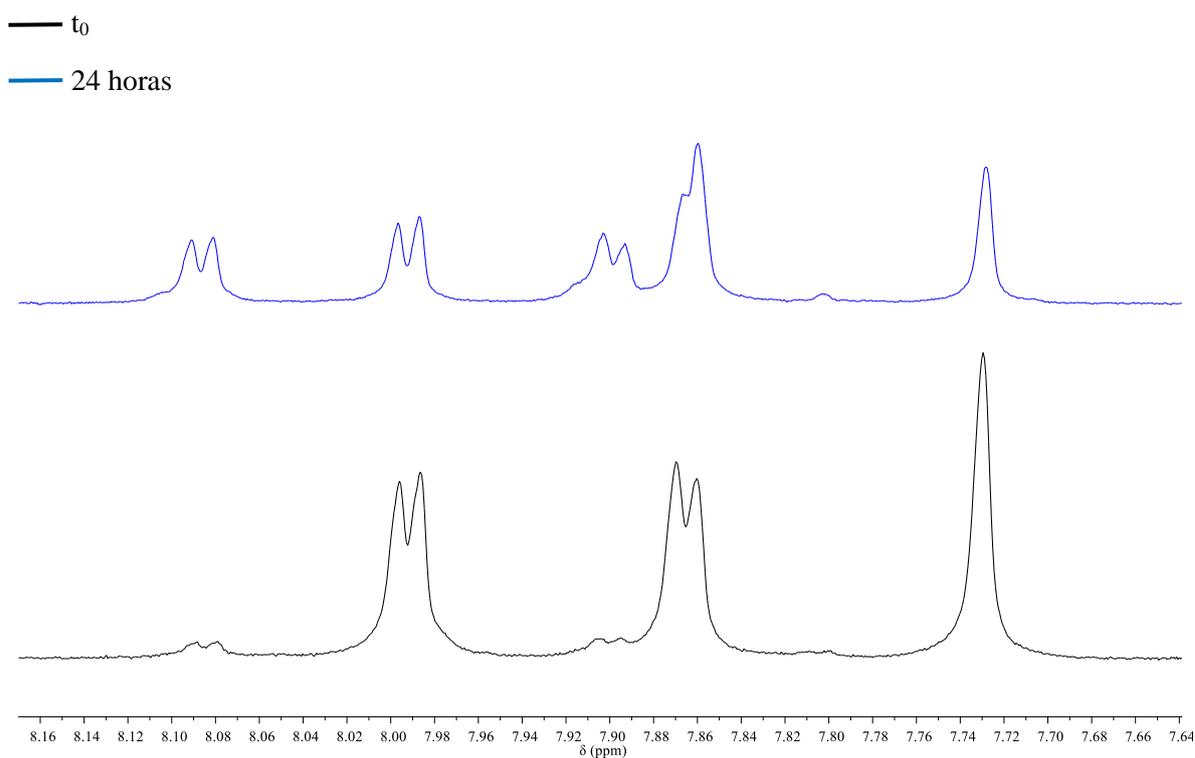


Figura 5.14: Espectro ^1H -RMN del compuesto $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ medido a tiempo cero (líneas negra) y 24 horas luego de la preparación de la solución en DMSO-d_6 (líneas azules).

A tiempo cero, las tres señales observadas en esa zona (dos dobletes y un singulete) corresponden a los protones del anillo furano y al protón ilidénico de HL1 en el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$, tal como fue mencionado anteriormente. Sin embargo, es posible observar en este espectro la presencia de dos dobletes de baja intensidad a 7,90 y 8,09 ppm. El espectro medido luego de 24 horas mostró algunos cambios en comparación al espectro inicial, observándose un aumento de la intensidad de los dos últimos dobletes mencionados, y cambios en la integración y multiplicidad de la señal de 7,86 ppm del

espectro inicial. Estos cambios en el tiempo indicarían que el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ estaría siendo convertido en otra especie con el mismo patrón espectral en esa zona, es decir, dos dobletes y un singulete (este último superpuesto con la señal de 7,86 ppm).

En base a los antecedentes señalados en la introducción del capítulo, que aludían a la dimerización observada en sistemas químicamente relacionados, se propuso que la especie generada con el tiempo correspondería al complejo $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L1})_2]$ [23,26,29,30,32,53–57]. En el espectro medido luego de 24 horas, las señales correspondientes a cada compuesto (monómero y dímero) poseen la misma relación de intensidades relativas. Considerando que cada señal del dímero es equivalente a dos moléculas de tiosemicarbazona, esta relación de intensidades evidencia que luego de este tiempo se encuentran en solución un 75 % de la especie monomérica y un 25 % del dímero. Los experimentos ^1H -RMN fueron medidos hasta 5 días luego de la preparación de la solución, observándose que todos los espectros fueron similares al espectro medido a las 24 horas, lo que indica que estas dos especies coexisten de forma estable en la solución.

Tanto para el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ como para $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_3(\text{HL5})]$, el estudio con el tiempo de los espectros ^1H -RMN también reveló la formación del dímero $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$. La relación de las intensidades de las señales, entre las correspondientes al monómero y el dímero, indican la existencia de un 75 % de la especie monomérica y un 25 % del complejo dinuclear en solución para ambos complejos, las cuales permanecen constantes durante los 5 días de estudio.

Sin embargo, para el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ se observó un comportamiento ligeramente diferente. La figura 5.15 muestra, como ejemplo, una zona de los espectros ^1H -RMN de ese complejo medido a t_0 y 24 horas.

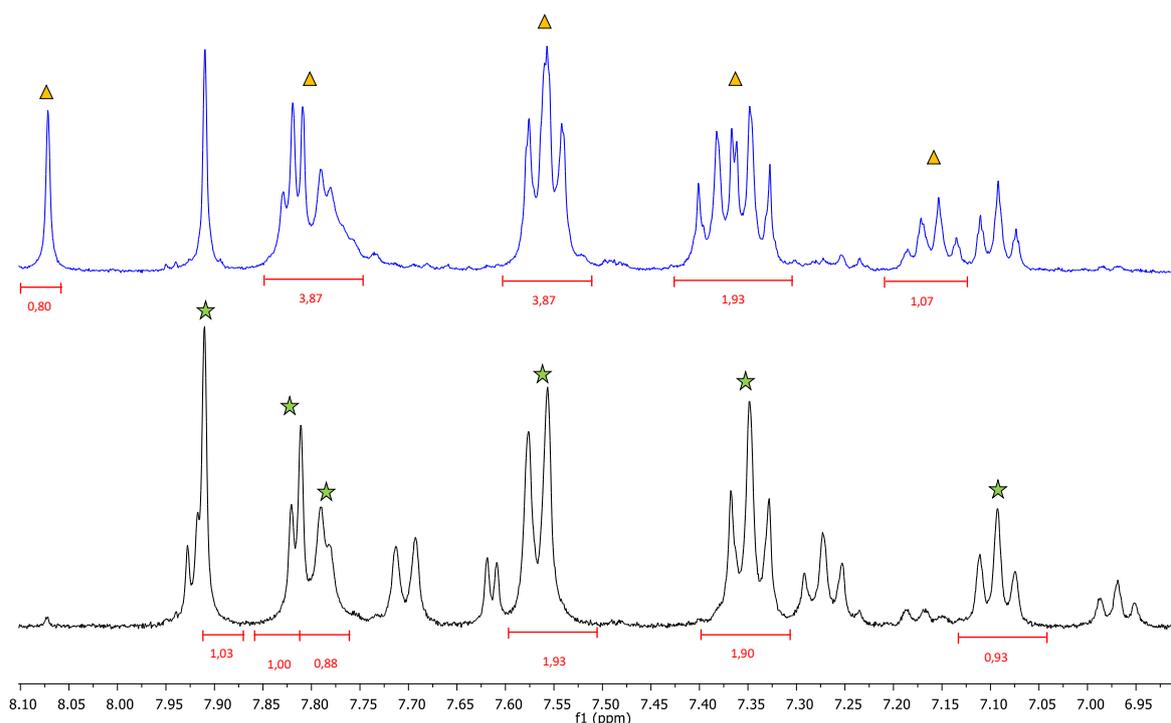


Figura 5.15: Espectros ^1H -RMN del compuesto $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_3(\text{HL4})]$ medidos a tiempo cero (línea negra) y 24 horas luego de la preparación de la solución en DMSO-d_6 (línea azul).

El espectro ^1H -RMN medido a t_0 mostró las señales correspondientes a los protones del monómero $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_3(\text{HL4})]$ (señales marcadas con estrella en la figura 5.15), pero además se observó un grupo de señales de menor intensidad relativa que sigue el mismo patrón espectral. En este caso, luego de 24 horas se observó la desaparición de estas señales de baja intensidad, y un nuevo grupo de señales con similar patrón espectral fue observado nuevamente (señales marcadas con triángulos en la figura 5.15). Este comportamiento indica que las señales de baja intensidad que desaparecieron corresponderían a un complejo intermediario, que posteriormente da lugar a la formación del dímero $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2]$.

En base a lo mencionado en la introducción de este capítulo, los complejos mononucleares del tipo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{X}(\text{HL})]$ (X = haluro, HL = tiosemicarbazonas) en solución de DMSO tienden a la deprotonación del ligando HL , que a su vez induce labilización del ligando halogenuro, generando una posición vacante en la esfera de coordinación del metal. Esta posición libre es ocupada por el átomo de azufre de la

tiosemicarbazona coordinada a un monómero vecino, generando así de forma espontánea complejos dinucleares de tiosemicarbazonato [23,26,29,30,58]. Este mismo análisis puede ser extrapolado hacia el sistema de los complejos $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL}$, que si bien no se identificó cual sería la especie intermediaria, hemos propuesto que podría corresponder al complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3(\text{DMSO})(\text{L})]^+$ generado por la coordinación de moléculas de solvente en la posición vacante generada por la labilización del ligando bromuro. En base a todo lo expuesto, la figura 5.16 resume el proceso de dimerización planteado para los tres complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ [59].

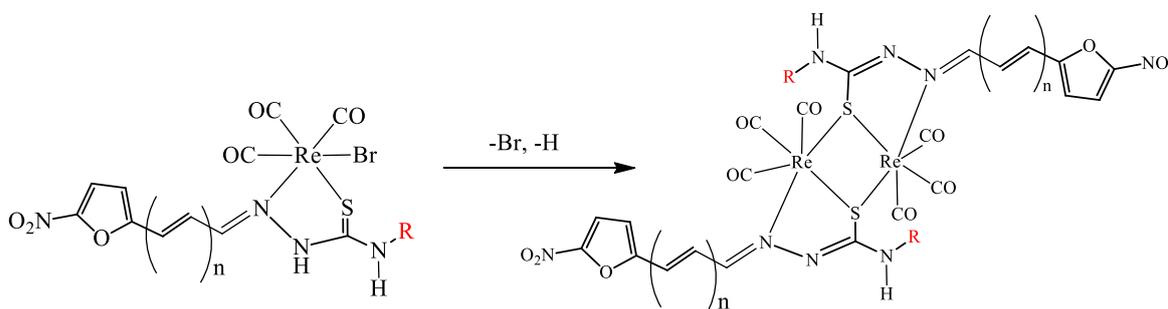


Figura 5.16: Esquema del probable mecanismo de dimerización de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_3\text{HL}]$.

Las tablas 5.5 y 5.6 resumen los valores de desplazamiento químico de las señales de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN correspondientes a los tres dímeros $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$.

Tabla 5.5: Valores de desplazamiento químico (δ) de las señales asignadas en el espectro de ^1H -RMN de los complejos $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$ medidos luego de 24 horas en solución de DMSO-d_6 .

H	δ_{H} (ppm)					
	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L1})_2]$	$\Delta\delta^a$	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2]$	$\Delta\delta^a$	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L5})_2]$	$\Delta\delta^a$
2	8,09	0,29	7,82 ^b	-0,03	7,53 ^b	-0,21
3	7,90	0,53	7,78 ^b	0,26	7,18 ^b	0,18
5	-	-	-	-	7,24 ^b	0,24
6	-	-	-	-	7,80 ^b	0,80
7	7,86	-0,12	8,07	-0,02	8,18	0,31
9	-	-	-	-	-	-
11	nd	-	10,28	0,08	nd	-

<i>o</i> -fenil	-	-	7,56 ^b	0,02	-	-
<i>m</i> -fenil	-	-	7,38 ^b	-0,02	-	-
<i>p</i> -fenil	-	-	7,15	-0,09	-	-
^a : $\Delta\delta = \delta_{\text{dímero}} - \delta_{\text{ligando}}$ ^b : solapada con señales del monómero nd: no determinado						

Tabla 5.6: Valores de desplazamiento químico (δ) de las señales asignadas en el espectro de ^{13}C -RMN de los complejos $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{HL})_2]$ medidos luego de 24 horas en solución de DMSO- d_6 .

C	δ_{C}		
	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L1})_2]$	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2]$	$[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L5})_2]$
1	151,42	151,82	152,80
2	122,29	115,41	117,99
3	115,48	120,21	128,72
4	150,35	149,69	150,25
5	-	-	131,66
6	-	-	128,56
7	138,19	141,32	157,88
<i>o</i> -fenil	-	122,87	-
<i>m</i> -fenil	-	129,24	-
<i>p</i> -fenil	-	124,72	-
carbonilo	186,40	183,83	181,14

5.2.4.1 Espectrometría de masa

Se realizaron experimentos de espectrometría de masa en solución de acetonitrilo de los tres complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$, para confirmar la presencia de los dímeros en solución. La figura 5.17 muestra, como ejemplo, el espectro de masa experimental obtenido para el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ y el espectro calculado para el dímero $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L1})_2]$.

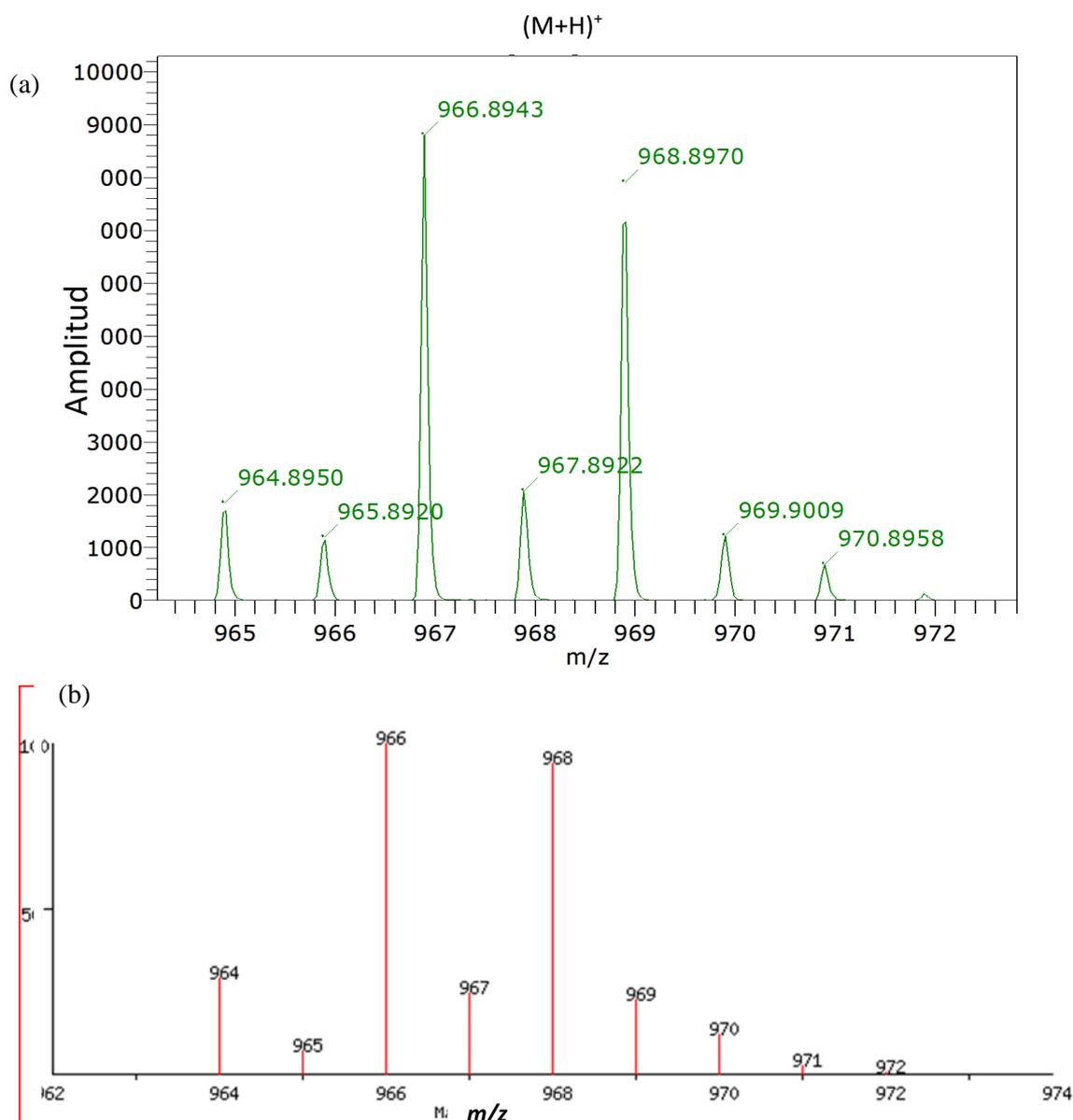


Figura 5.17: (a) Fragmento del espectro de masas experimental de una solución de $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL}1)]$ y (b) Espectro simulado para el complejo $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L}1)_2]$.

El espectro de masa de todos los compuestos mostró una distribución isotópica y un ion molecular que da cuenta de la presencia en solución del dímero $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$ tal como muestra el ejemplo de la figura 5.17. La tabla 5.7 resume los valores de m/z del ion molecular identificado para cada complejo.

Tabla 5.7: Masa molecular calculada y relación m/z de los picos obtenidos por espectrometría de masa para los complejos $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$.

Complejo	M (teórico)	m/z (M+H) ⁺
$[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L}1)_2]$	966	966,89

$[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2]$	1118	1118,96
$[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L5})_2]$	1020	1020,93

5.2.4.2 Difracción de rayos X en monocristal

Se obtuvieron monocristales adecuados para el estudio por difracción de rayos X del compuesto $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ mediante evaporación lenta de una solución de $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ en acetona- d_6 . En la figura 5.18 se muestra un diagrama de la estructura cristalina resuelta de este dímero, y en la tabla 5.8 se resumen los parámetros de celda, y los datos de colección y refinamiento para la elucidación de la estructura de este complejo (otros datos cristalográficos se adjuntan en el apéndice 1 (A1)).

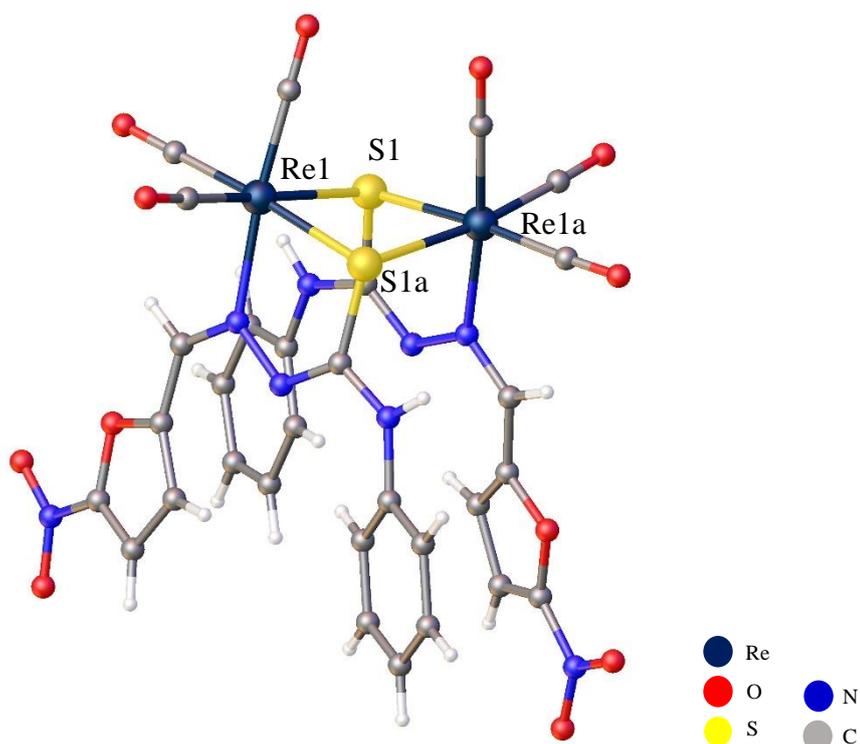


Figura 5.18: Estructura cristalina del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2]$. Las moléculas de acetona de cristalización no fueron incluidas para una mejor visualización de la estructura.

Tabla 5.8: Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

Fórmula Empírica	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{Re}_2\text{S}_2$
------------------	--

Peso Fórmula	1235,22
Temperatura (K)	298 (2)
Longitud de onda (Å)	CuK _α = 1,5418
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Dimensiones de la celda unitaria	
a (Å)	27,145 (5)
b (Å)	12,132 (2)
c (Å)	14,098 (3)
β (°)	113,37 (1)
Volumen (Å ³)	4261,79 (14)
Z; densidad (calculado, Mg/m ³)	4; 1,925
Coefficiente de Absorción (mm ⁻¹)	12,505
F(000)	2384
Forma/ color Cristal	Prisma rectangular/ marrón rojizo
Tamaño del cristal (mm ³)	0,029 x 0,060 x 0,176
θ-rango (°) para colección de datos	3,547 a 72,249
Rango de índices de Miller	-33 ≤ h ≤ 33, -14 ≤ k ≤ 14, -17 ≤ l ≤ 17
Reflexiones colectadas	36310
Reflexiones independientes	4198 [R(int) = 0,0399]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	3752
Compleitud (%)	99,9 (a θ = 72,249°)
Corrección de absorción	multi-scan
Max. y min. de transmisión	0,7536 y 0,5021
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²
Datos / restricciones / parámetros	4198/0/282
Calidad del ajuste F ²	1,144
Índice R final ^a [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0184, wR2 = 0,0437
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0234, wR2 = 0,0455
^a R ₁ = Σ F _o - F _c / Σ F _o , wR ₂ = [Σw(F _o ² - F _c ²) ² / Σw(F _o ²) ²] ^{1/2}	

El compuesto cristaliza en un sistema monoclinico con un grupo espacial $C2/c$. La estructura del dímero está compuesta por dos subunidades *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3(\text{L4})]$ unidas mediante dos enlaces puentes $\mu\text{-S}$ que conectan ambos centros metálicos. En la figura 5.19 se muestra la unidad asimétrica de este dímero, donde se observa que la estructura de este complejo pentacoordinado es estabilizada por moléculas de acetona de cristalización mediante la interacción de enlaces de hidrógeno con el grupo amino terminal, e interacciones más débiles del tipo Van der Waals con el átomo de azufre y el sustituyente fenilo.

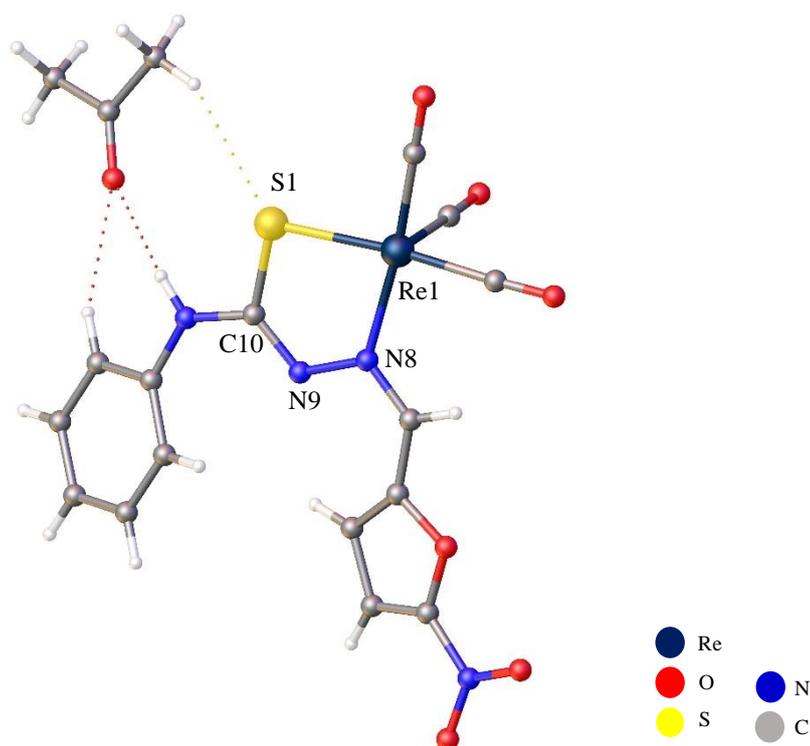


Figura 5.19: Estructura de la unidad asimétrica del dímero $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

En la estructura del dímero, ambos iones metálicos se encuentran en un entorno geométrico pseudo-octaédrico. Cada uno de ellos está unido a tres ligandos carbonilos con isomería facial, y al átomo de nitrógeno azometínico (N8) y el azufre tiocarbonílico (S1) del ligando tiosemicarbazona. La esfera de coordinación del metal se completa con el átomo de azufre tiocarbonílico del monómero vecino (S1a). El núcleo de este dímero (*core*) está compuesto de un rectángulo asimétrico, denominado Re_2S_2 , que es característico de este tipo de estructuras (figura 5.20) [23,26,29,30,32,53–56]. En este *core*, la asimetría del rectángulo se debe a que el átomo de azufre del ligando perteneciente al monómero vecino se encuentra unos 0,1 Å más alejado que el azufre del

ligando del monómero inicial. De hecho, el puente Re-S-Re es relativamente asimétrico, de forma similar a lo reportado en otras estructuras dinucleares basadas en este mismo tipo de interacción [23,60,61]. Los ángulos de enlace en el *core* son todos cercanos a los 90°, y la distancia Re1-Re1a es demasiado grande para ser un rectángulo simétrico (>3,53 Å, que corresponde al valor de la diagonal si fuese completamente simétrico), tal como se observa en la tabla 5.9. Por otro lado, las distancias Re-C (carbonilo) se encuentran dentro de los mismos rangos observados en otros complejos que incluyen al fragmento *fac*-{Re(CO)₃} [23,26,29,30,32,53–57].

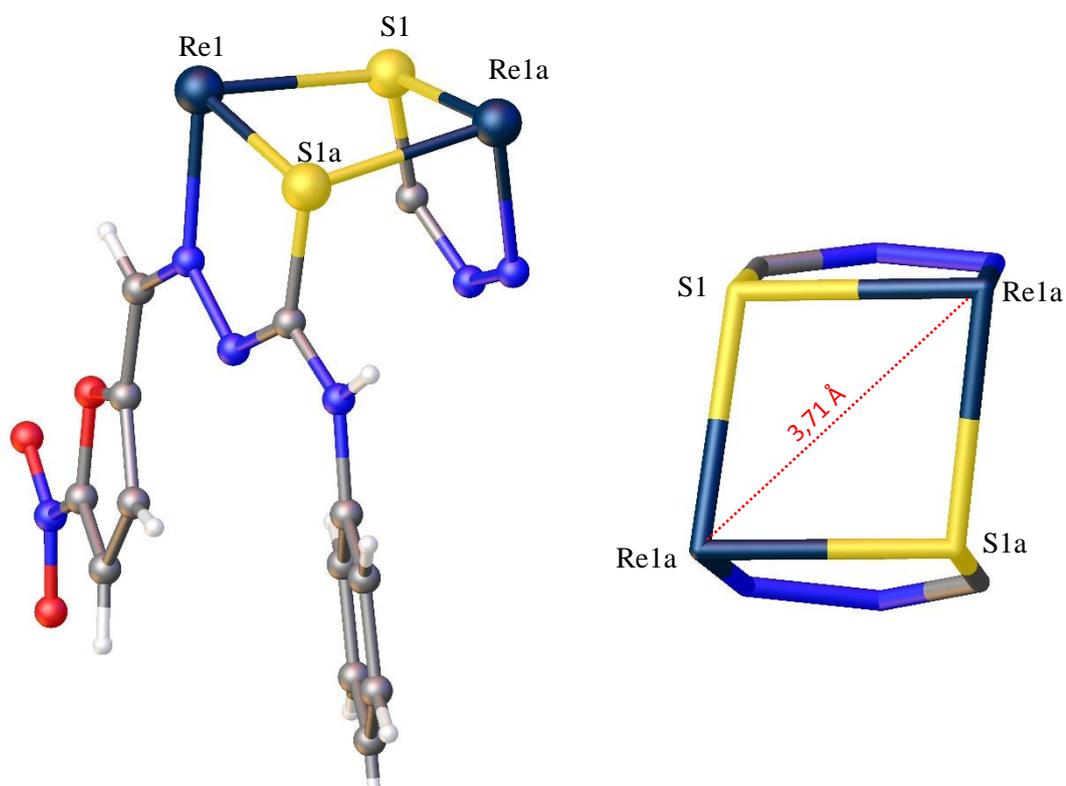


Figura 5.20: *Core* Re₂S₂ del complejo [Re^I₂(CO)₆(L4)₂]·2(CH₃)₂CO y paralelogramo formado en el centro del dímero.

Tabla 5.9: Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace alrededor del centro metálico en [Re^I₂(CO)₆(L4)₂]·2(CH₃)₂CO.

Distancias de enlace					
Re1 – C01	1,9178 (35)	Re1 – C02	1,9395 (35)	Re1 – S1	2,4490 (6)
Re1 – C03	1,9274 (31)	Re1 – N8	2,1896 (21)	Re1 – S1a	2,5513 (7)
Ángulos de enlace					
C01 – Re1 – C03	90,09 (13)	N8 – Re1 – C02	97,21 (10)	S1a – Re1 – C01	172,41 (10)

C01 – Re1 – C02	89,35 (15)	S1 – Re1 – C01	92,46 (10)	S1a – Re1 – C03	86,06 (10)
C02 – Re1 – C03	87,12 (13)	S1 – Re1 – C03	97,46 (9)	S1a – Re1 – C02	96,98 (11)
N8 – Re1 – C01	93,50 (11)	S1 – Re1 – C02	175,06 (9)	S1a – Re1 – N8	89,88 (6)
N8 – Re1 – C03	174,39 (11)	S1 – Re1 – N8	78,10 (6)	S1a – Re1 – S1	81,58 (2)

La coordinación bidentada del ligando 5-nitrofuril tiosemicarbazona (a través de S1 y N8) ha sido también evidenciada por estudios de DRX en monocristal en complejos mononucleares de Pd(II) [50]. Además, como se mencionó en la introducción del capítulo, se obtuvieron estructuras díméricas en complejos con estos ligandos y el fragmento organometálico {Ru^{II}-*p*-cimeno}, donde la interacción entre ambos centros metálicos de Ru(II) se generó también mediante puentes azufrados [35,36].

Cabe mencionar que la interacción del dímero con moléculas de acetona de cristalización favorece la formación de la red cristalina a temperatura ambiente. La figura 5.21 muestra el empaquetamiento cristalino en la red (vista a lo largo del eje b) donde se observa que los dímeros se disponen como cadenas en una dirección cristalográfica.

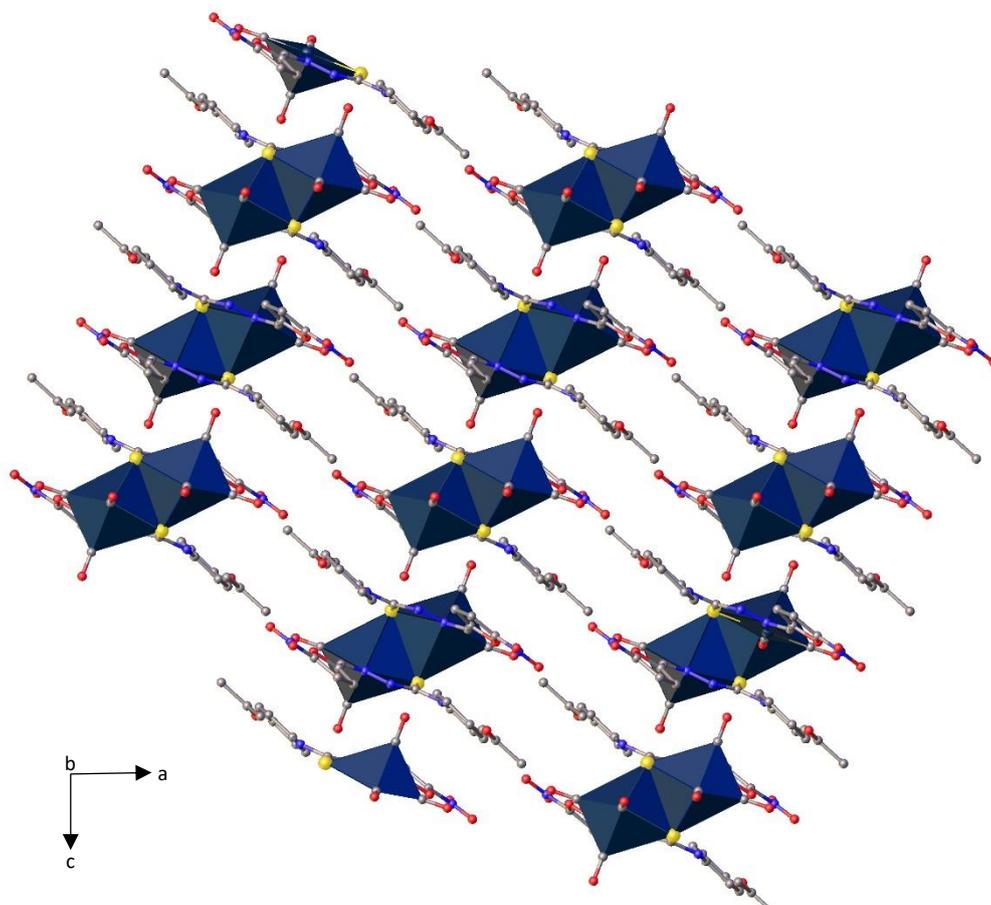


Figura 5.21: Empaquetamiento cristalino del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L4})_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

5.2.5 Actividad biológica

5.2.5.1 Actividad contra *Trypanosoma cruzi*

Los tres complejos $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL}$ fueron evaluados *in vitro* contra la forma infectiva tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c). Los resultados obtenidos se compararon con la actividad antiparasitaria de los ligandos bioactivos previamente evaluados. En la tabla 5.10 se muestran los valores de IC_{50} obtenidos en estos estudios.

Tabla 5.10: Actividad *in vitro* de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ contra tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c), citotoxicidad en células endoteliales (EA.hy926) y valores de índice de selectividad (IS) calculados.

Compuesto	<i>T. cruzi</i> IC_{50} (μM)	EA.hy926 IC_{50} (μM)	IS
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$	$2,4 \pm 0,2$	$36,9 \pm 0,7$	15
HL1	$9,8 \pm 1,5$	> 100	> 10
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	$1,3 \pm 0,3$	$14,3 \pm 0,6$	11
HL4	$22,7 \pm 1,6$	> 100	>4
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	$2,01 \pm 0,03$	$43,6 \pm 1,1$	22
HL5	$12,7 \pm 1,7$	$44,9 \pm 5,3$	3

Los tres complejos resultaron ser activos contra la forma infectiva de *T. cruzi*, mostrando valores de IC_{50} en el rango micromolar. Los compuestos mostraron un incremento de la actividad antiparasitaria de 4 a 17 veces, con respecto al correspondiente ligando bioactivo libre. No se observó una diferencia sustancial en la actividad biológica al modificar las características estructurales de la tiosemicarbazona, es decir, ni al cambiar el largo de la cadena alifática ni al modificar el sustituyente R.

Además, los complejos mostraron una actividad contra *T. cruzi* de 8 a 15 veces superior a la observada para el fármaco tripanosomicida de referencia, Nifurtimox, ($\text{IC}_{50} = 20,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$) [44]. La evaluación *in vitro* del precursor $[\text{Re}^{\text{I}}\text{Br}(\text{CO})_5]$ mostró una baja actividad contra el parásito [40], por lo que se puede inferir que la unión del fragmento organometálico *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$ con las tiosemicarbazonas bioactivas es la responsable

de este aumento en la actividad respecto a la tiosemicarbazona libre, independientemente del tipo de tiosemicarbazona utilizada.

5.2.5.2 Citotoxicidad inespecífica

La selectividad de la actividad anti-*T. cruzi* de los complejos fue evaluada analizando la citotoxicidad *in vitro* sobre células endoteliales humanas (EA.hy926), utilizadas como células mamíferas modelo. Como se observa en la tabla 5.10, los tres complejos mostraron de moderadas a buenas selectividades hacia los parásitos. Si bien todos los complejos mostraron un cierto grado de toxicidad sobre las células mamíferas, en el complejo Re-(CO)₃-HL5 se observó que la inclusión del fragmento organometálico *fac*-{Re(CO)₃} mejoró considerablemente la selectividad del ligando bioactivo hacia los parásitos

5.2.6 Lipofilia

Se determinó la lipofilia como parte del estudio de propiedades fisicoquímicas de interés biológico. En particular, se utilizó como una propiedad para predecir el pasaje a través de la membrana celular y analizar si se correlaciona con la actividad biológica observada [62].

Se determinó la lipofilia por cromatografía en capa fina de fase reversa (TLC-C18) utilizada para simular los lípidos hidrofóbicos de las membranas celulares o receptores biológicos. Se utilizó como fase móvil una mezcla metanol/DMF/buffer Tris pH 7,4 (20:20:60 v/v/v) intentando simular un medio hidrofílico.

La tabla 5.11 resume los valores de R_f medidos y los R_M calculados para los tres complejos y sus respectivos ligandos HL medidos en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 5.11: Valores de R_f y R_M de los complejos Re-(CO)₃-HL y de los ligandos HL usando la fase móvil metanol/DMF/buffer Tris pH 7,4 (20:20:60 v/v/v).

Compuesto	R_f	R_M
[Re ^I (CO) ₃ Br(HL1)]	0,11	0,91
HL1	0,66	-0,29

$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	0,04	1,38
HL4	0,20	0,60
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	0,12	0,87
HL5	0,70	-0,37
$R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$		

Todos los complejos resultaron ser más lipofílicos que las correspondientes tiosemicarbazonas. Como se esperaba, la lipofilia de los compuestos incrementó al aumentar la complejidad del sustituyente R en la cadena del ligando, siendo así el complejo Re-(CO)₃-HL4 el más lipofílico y el que presentó la mayor actividad contra *T. cruzi*. Sin embargo para establecer una correlación entre la lipofilia y la actividad biológica observada sería necesario considerar una serie más amplia de compuestos estructuralmente relacionados.

5.2.7 Mecanismo de acción

5.2.7.1 Generación de especies radicalarias en *T. cruzi*

Como para todos los complejos que incluyen como ligandos las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído, se estudió la capacidad de los complejos Re-(CO)₃-HL de generar EROS en los parásitos de *T. cruzi*. Utilizando la técnica de *spin trapping* [63,64], se realizaron medidas de resonancia electrónica paramagnética (EPR) en parásitos intactos que fueron incubados con los complejos Re-(CO)₃-HL, y se añadió DMPO como atrapador de especies radicalarias de cortos tiempos de vida. A diferencia de lo comúnmente observado en todos los sistemas anteriormente estudiados, por primera vez no se observaron señales en los espectros de EPR de los parásitos tratados con cada uno de los compuestos. Este resultado evidencia que la generación de radicales libres no sería un probable mecanismo de la actividad antiparasitaria observada.

5.2.7.2 Efecto sobre el consumo de oxígeno de *T. cruzi*

Antecedentes bibliográficos, incluyendo los ligandos bioactivos HL y complejos que incluyen a estos ligandos, señalan que la biorreducción intracelular y la consecuente

generación de estrés oxidativo en *T. cruzi* tienen un efecto directo sobre el consumo de oxígeno de los parásitos. En particular, la participación de éstos en el proceso de reciclaje redox genera un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos [43,49,50,65].

Se estudió la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos de *T. cruzi* en presencia de los complejos de $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL}$. Se trataron epimastigotas de *T. cruzi* con una concentración $40\ \mu\text{M}$ de cada complejo (disuelto en DMSO) y se registró la concentración de oxígeno en el tiempo a 28°C , según lo descrito en la sección experimental del capítulo 3. En la figura 5.22 se muestra, como ejemplo, la gráfica obtenida en el estudio del complejo $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL4}$.

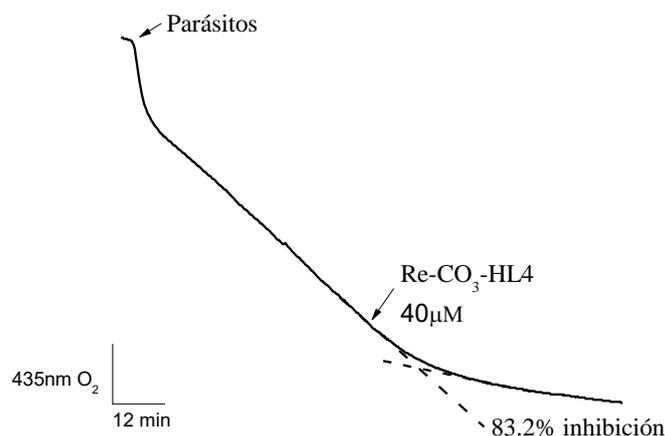


Figura 5.22: Efecto del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$ sobre la velocidad de consumo de oxígeno en la respiración de los parásitos de *T. cruzi*.

A partir de las pendientes de las gráficas de concentración de oxígeno $[\text{O}_2]$ en función del tiempo (antes y después del agregado del complejo), se obtuvo la variación porcentual total de la velocidad de consumo de oxígeno en los parásitos. La variación observada fue comparada contra parásitos tratados sólo con DMSO (control). Los resultados se resumen en la tabla 5.12.

Tabla 5.12: Efecto de la adición de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ sobre el consumo de oxígeno en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

Compuesto	Disminución del consumo de oxígeno (%) respecto al control
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$	3,7
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	83,2
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	12,3

Los resultados obtenidos revelaron, en todos los casos, una disminución de la velocidad de consumo de oxígeno en los parásitos luego de ser tratados con los complejos. Considerando estos resultados, y en conjunto con la falta de generación de EROS observada en los experimentos de EPR, se podría deducir que los complejos *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ tendrían un mecanismo de acción antichagásico diferente a lo esperado, y que estaría relacionado con la inhibición de la respiración mitocondrial.

5.2.7.3 Estudios de voltametría cíclica

Habiendo confirmado que los compuestos $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL}$ actuarían en los parásitos por un mecanismo de acción diferente al conocido para los ligandos bioactivos y para todos los compuestos metálicos con estos ligandos, surge la interrogante de conocer qué factores serían los influyentes en este inusual comportamiento. En este sentido, una propiedad fisicoquímica relevante que permite predecir la generación de EROS intracelular de los compuestos, es el potencial electroquímico al cual ocurre la reducción del grupo nitro de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído.

Para conocer este parámetro fisicoquímico (como parte también de la caracterización en solución de los compuestos), se realizaron medidas de voltametría cíclica a temperatura ambiente en solución 1mM de cada complejo en DMSO. En todos los estudios se utilizó un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como electrodo auxiliar. En la figura 5.23 se muestran los voltamogramas cíclicos, medidos en la dirección catódica, obtenidos para los complejos y sus respectivos ligandos HL.

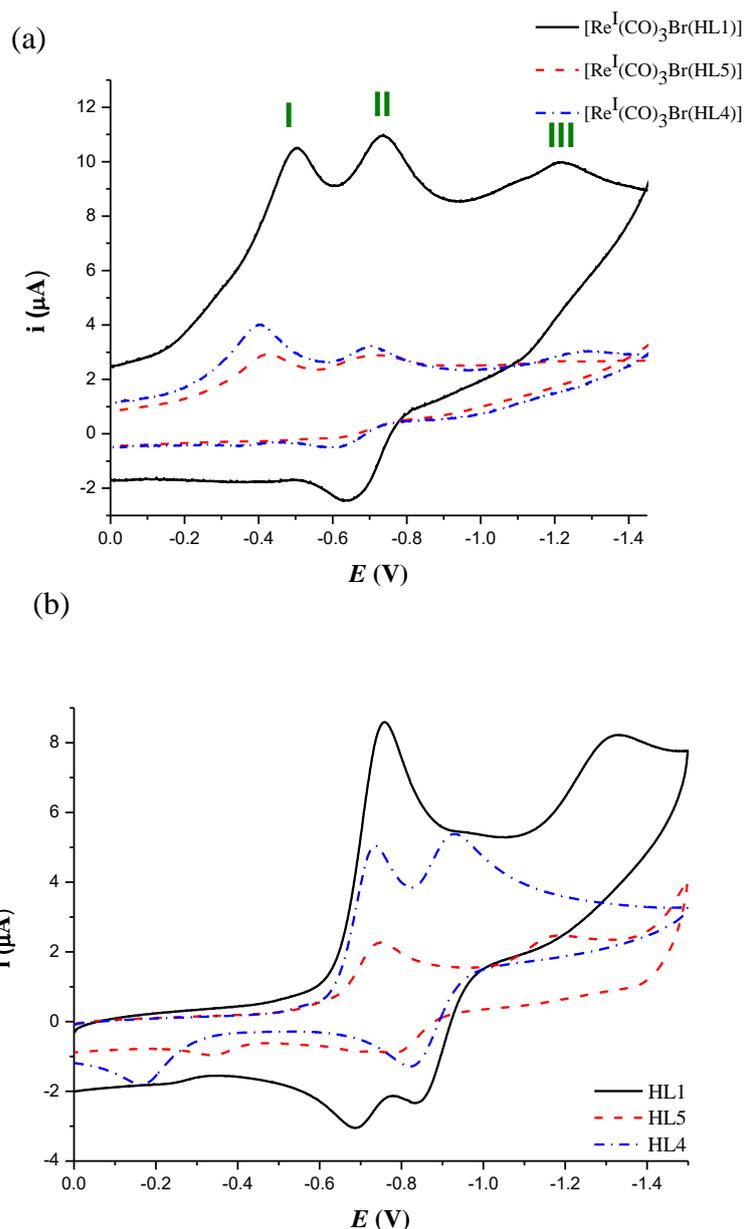


Figura 5.23: Voltamogramas cíclicos medidos en la dirección catódica para (a) los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ y (b) los ligandos HL. Los voltamogramas fueron medidos a una velocidad de barrido de 100 mV/s en solución 1 mM de DMSO. Los potenciales fueron referidos al electrodo Ag/AgCl.

Los tres complejos mostraron un comportamiento electroquímico similar, observándose tres procesos de reducción que están asociados al ligando tiosemicarbazona [35,43,44,49,50]. Cercano a los -0,7 V se observó un proceso de reducción cuasi reversible correspondiente a la generación del nitro anión radical ($\text{NO}_2^{\cdot-}$) mediante reducción del grupo nitro (proceso II). Hacia potenciales más negativos, se observó un

proceso de reducción irreversible (proceso III) correspondiente a la consecuente reducción al derivado de hidroxilamina [49,66]. Hacia valores de potencial menos negativos se detectó un proceso de reducción irreversible (proceso I) que no se observa en los voltamogramas de los ligandos HL (figura 5.23 b). Para asignar esta señal, y basados en los resultados obtenidos en los estudios que confirmaron la dimerización que sufren los compuestos con el tiempo, se estudió el comportamiento electroquímico durante 24 horas luego de la preparación de la solución. En la figura 5.24 se muestran, como ejemplo, los voltamogramas medidos a diferentes tiempos del complejo $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL1}$.

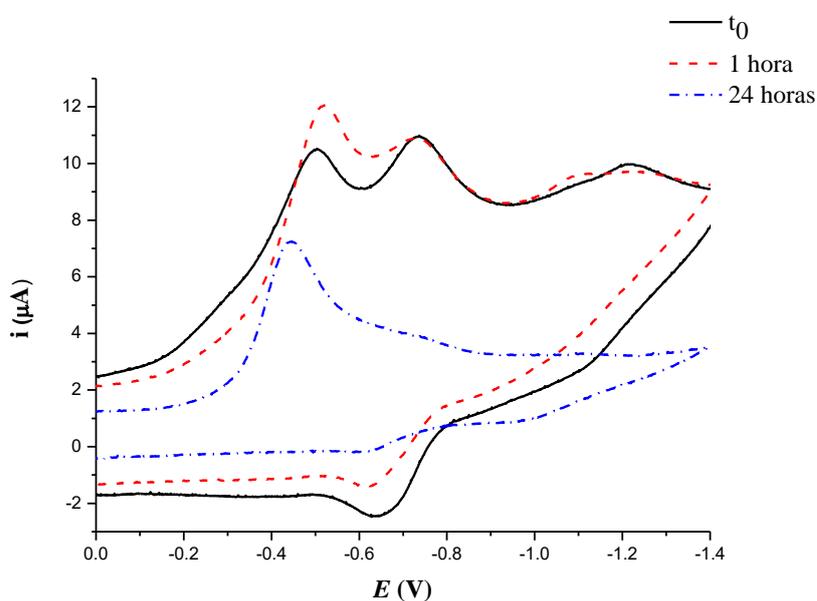


Figura 5.24: Voltamogramas cíclicos medidos en una solución del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ en la dirección catódica a diferentes tiempos: tiempo cero (línea negra), 1 hora (línea roja) y 24 horas (línea azul) después de la preparación de la solución. Los voltamogramas fueron medidos a una velocidad de barrido de 100 mV/s en solución 1 mM de DMSO, y los potenciales fueron referenciados al electrodo de Ag/AgCl .

El estudio electroquímico en el tiempo, mostró en los tres complejos cambios en las intensidades relativas de las señales correspondientes a los procesos I y II. Luego de una hora de la preparación de la solución, y hasta finalizado el estudio, se observó una disminución de la intensidad de la señal anódica y catódica del proceso II, y de forma simultánea, un aumento de la intensidad de la señal del pico catódico del proceso electroquímico I. Este resultado estaría en concordancia con la conversión en solución

con el tiempo de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ en los dímeros $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$. Por lo que esta señal podría corresponder a la reducción del grupo nitro de los ligandos tiosemicarbazona en los complejos dinucleares, que como se observa en los voltamogramas sería un proceso irreversible. De esta manera, la formación del dímero (que genera una disminución de la concentración de monómero en la solución) provoca que el potencial de reducción del grupo nitro sea menos negativo cuando se dimerizan los compuestos. Los valores de potencial de los procesos electroquímicos seleccionados se resumen en la tabla 5.13.

Tabla 5.13: Datos electroquímicos de los compuestos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ y de los ligandos HL utilizando un electrodo de carbón vítreo a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Los valores de potencial son referenciados al electrodo Ag/AgCl.

Compuesto	Re ^I /Re ^{II}	Cupla I (dímero)	Cupla II (HL) (monómero)	
	<i>E_{pa}</i> (V)	<i>E_{pc}</i> (V)	<i>E_{pa}</i> (V)	<i>E_{pc}</i> (V)
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$	1,21	-0,50	-0,64 (-0,64)	-0,74 (-0,72)
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL4})]$	1,19	-0,40	-0,61 (-0,62)	-0,70 (-0,70)
$[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL5})]$	1,24	-0,43	-0,61 (-0,64)	-0,71 (-0,71)

En base a los resultados obtenidos en este Trabajo de tesis, como también en otros sistemas desarrollados por el grupo de investigación, los estudios de voltametría cíclica han demostrado que la coordinación de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído a diferentes iones metálicos generan un leve desplazamiento del potencial de reducción del par redox nitro/nitro anion radical hacia valores menos negativos. Esta disminución del potencial de reducción (en valor absoluto), genera un aumento de la capacidad de biorreducción intracelular de los complejos para dar especies radicalarias tóxicas en el parásito, con respecto a los ligandos libres [35,43,44,49,50]. Sin embargo, los dímeros de Re(I) generados muestran un desplazamiento significativo del potencial de reducción de este proceso. Dicho valor podría encontrarse fuera de la ventana de potencial de las enzimas que catalizan la biorreducción de los compuestos en el parásito. Además, el proceso de reducción observado en los dímeros es irreversible, lo que generaría que éstos no puedan participar del reciclaje redox en los parásitos. Estos antecedentes podrían explicar la falta de generación de EROS en los parásitos por parte de los complejos Re-(CO)₃-HL.

Por otro lado, el barrido hacia potenciales anódicos fue realizado sobre soluciones de cada complejo en acetonitrilo, donde la ventana de potencial de este solvente permitió identificar procesos de óxido-reducción con potenciales hasta 1,5 V (no así con DMSO como solvente). En la figura 5.25 se muestran los voltamogramas obtenidos en el barrido hacia potenciales positivos de los complejos $\text{Re}-(\text{CO})_3\text{-HL}$.

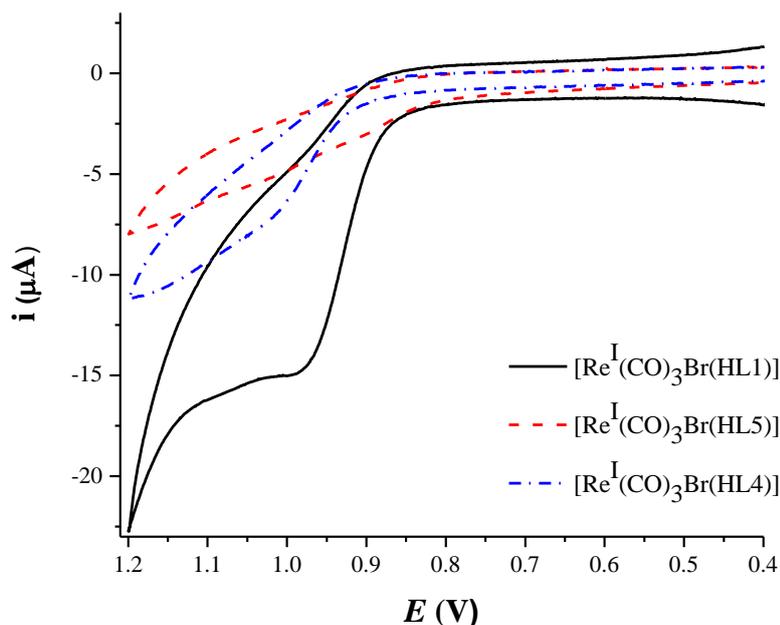


Figura 5.25: Voltamogramas cíclicos de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ medidos en la dirección anódica a una velocidad de barrido de 100 mV/s en solución 1 mM en acetonitrilo. Los potenciales fueron referenciados al electrodo de Ag/AgCl.

En los tres voltamogramas se observó un proceso de oxidación irreversible, cercano a los 1,2 V, correspondiente al par redox $\text{Re}(\text{I})/\text{Re}(\text{II})$, característico de compuestos del tipo $\text{Re}(\text{I})$ -tricarbonilo [67,68]. Los valores de E_{pa} , resumidos en la tabla 5.13, señalan que la naturaleza del sustituyente R y/o el largo de la cadena del ligando tiosemicarbazona son relevantes para el proceso de oxidación. Esto está de acuerdo con lo observado en otros complejos *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{L})]$ (L = ligando bidentado) donde se ha demostrado que el potencial redox $\text{Re}(\text{I})/\text{Re}(\text{II})$ varía con la capacidad electrodonora del ligando L [67].

La dimerización con el tiempo de los complejos $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ también genera un efecto sobre este proceso de oxidación del centro metálico. Los voltamogramas medidos a tiempo cero, una hora y 24 horas luego de la preparación de la solución, mostraron un

desplazamiento del valor de E_{pa} hacia potenciales más positivos (figura 5.26). Este resultado señala que, al formarse la especie dinuclear el proceso de oxidación del centro metálico se hace menos favorable.

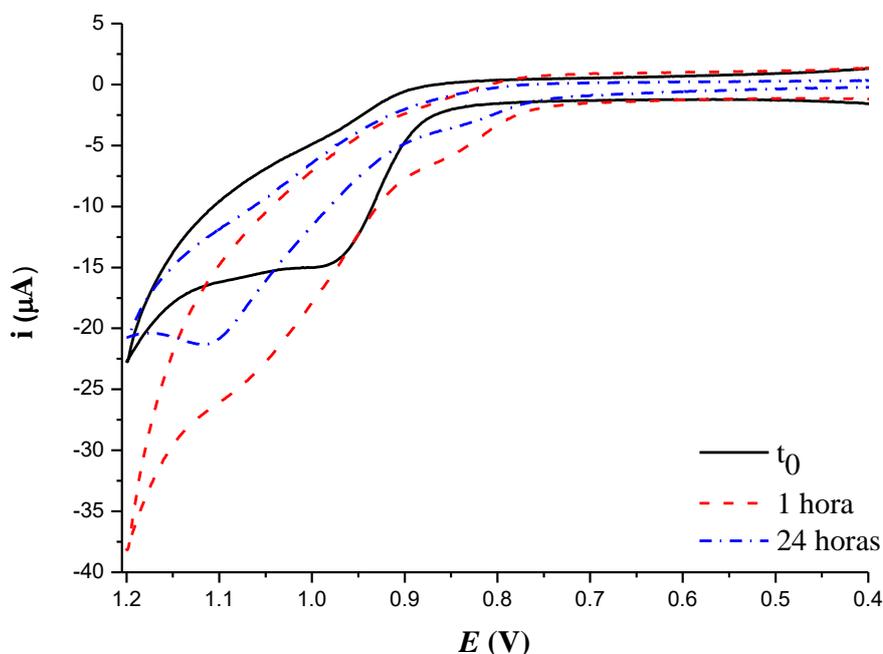


Figura 5.26: Voltamogramas cíclicos medidos en una solución del complejo $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL1})]$ en la dirección anódica a diferentes tiempos: tiempo cero (línea negra), 1 horas después (línea roja) y 24 horas (línea azul). Los voltamogramas fueron medidos a una velocidad de barrido de 100 mV/s en solución 1mM en acetonitrilo, y los potenciales fueron referidos al electrodo de Ag/AgCl.

5.2.8 Conclusiones

Se sintetizaron tres nuevos compuestos de coordinación que incluyeron al fragmento organometálico *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$ y tiosemicarbazonas bioactivas derivadas del 5-nitrofuraldehído. Se obtuvieron los compuestos con buenos rendimientos. Éstos fueron caracterizados por diferentes técnicas analíticas que confirmaron la naturaleza de estos complejos mononucleares neutros de fórmula $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$. Los estudios sobre el comportamiento en solución de estos compuestos, realizados mediante resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa, difracción de rayos X de monocristal y

estudios de voltametría cíclica, confirmaron que éstos dimerizan con el tiempo convirtiéndose en especies dinucleares de fórmula $[\text{Re}^{\text{I}}_2(\text{CO})_6(\text{L})_2]$.

Los complejos *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ mostraron actividad citotóxica sobre la forma infectiva de *Trypanosoma cruzi*, con valores de IC_{50} en el rango micromolar. Además, mostraron de moderadas a buenas selectividades hacia los parásitos. Los complejos $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-HL}$ mostraron una actividad de 8 a 15 veces superior a la del fármaco de referencia Nifurtimox, y de 4 a 17 veces superior a la actividad antichagásica de los ligandos tiosemicarbazona libres.

Se confirmó que el mecanismo de acción propio del ligando bioactivo no se mantiene en los complejos $\text{Re}(\text{I})$ -tricarbonilo, por lo que la generación de EROS en los parásitos no formaría parte del mecanismo de acción anti-*T. cruzi*. Los estudios confirmaron que esta particularidad se debe probablemente al potencial de reducción del grupo nitro y a la irreversibilidad de este proceso en las especies diméricas generadas en solución. De esta manera, el mecanismo de acción antiparasitario propuesto para los complejos *fac*- $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$ estaría relacionado con la inhibición de la respiración mitocondrial de *T. cruzi* observada a partir de la disminución de la velocidad del consumo de oxígeno de los parásitos por efecto de los complejos.

5.3 Bibliografía

- [1] F. A. Cotton, G. Wilkinson, M. Murillo, *Advanced inorganic chemistry*, 6th Edition, Wiley, New York, (1999).
- [2] J.E. Turp, Rhenium, *Coord. Chem. Rev.*, 52 (1983) 249–283.
- [3] S. Hostachy, C. Policar, N. Delsuc, $\text{Re}(\text{I})$ carbonyl complexes: multimodal platforms for inorganic chemical biology, *Bioinorg. Chem. Eur. Union*, 351 (2017) 172–188.
- [4] U. Schatzschneider, Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs), *Br. J. Pharmacol.*, 172 (2015) 1638–1650.
- [5] M. Casanova, E. Zangrando, F. Munini, E. Iengo, E. Alessio, *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dmsO})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)$: a new versatile and efficient $\text{Re}(\text{I})$ precursor for the preparation of mono and polynuclear compounds containing *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ fragments, *Dalton Trans.*, (2006) 5033–5045.
- [6] W.J. Kirkham, A.G. Osborne, R.S. Nyholm, M. Stiddard, Carbonyldi(tertiary arsine) complexes of rhenium, *J. Chem. Soc.*, (1965) 550–553.

- [7] D.R. Gamelin, M.W. George, P. Glyn, F.-W. Grevels, F. Johnson, W. Klotzbuecher, S.L. Morrison, G. Russell, K. Schaffner, J.J. Turner, Structural investigation of the ground and excited states of $\text{ClRe}(\text{CO})_3(4,4'\text{-bipyridyl})_2$ using vibrational spectroscopy, *Inorg. Chem.*, 33 (1994) 3246–3250.
- [8] A.A. Martí, G. Mezei, L. Maldonado, G. Paroliti, R.G. Raptis, J.L. Colón, Structural and photophysical characterisation of *fac*-[tricarbonyl(chloro)(5,6-epoxy-1,10-phenanthroline)rhenium(I)], *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005 (2005) 118–124.
- [9] M. Wrighton, D.L. Morse, Nature of the lowest excited state in tricarbonylchloro-1,10-phenanthroline-rhenium(I) and related complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 998–1003.
- [10] W. Hieber, H. Schulten, Mitteilung über metallcarbonyle über rhenium-kohlenoxyd-verbindungen, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 243 (1939) 164–173.
- [11] H. Klahn, B. Oelckers, A. Toro, F. Godoy, Direct and high yield syntheses of $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ and $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ by sodium reduction of K_2ReCl_6 under CO, *J. Organomet. Chem.*, 548 (1997) 121–122.
- [12] S.P. Schmidt, W.C. Trogler, F. Basolo, M.A. Urbancic, J.R. Shapley, Pentacarbonylrhenium halides, John Wiley & Sons, (1990) 160–165.
- [13] G. Zhao, J. Zhao, Y. Hu, D. Zhang, X. Li, Recent advances of neutral rhenium(I) tricarbonyl complexes for application in organic light-emitting diodes, *Synth. Met.*, 212 (2016) 131–141.
- [14] T. Yu, D. Tsang, V. Au, W.H. Lam, M. Chan, V. Yam, Deep red to near-infrared emitting rhenium(I) complexes: synthesis, characterization, electrochemistry, photophysics, and electroluminescence studies, *Chem. Eur. J.*, 19 (2013) 13418–13427.
- [15] X. Li, D. Zhang, W. Li, B. Chu, L. Han, J. Zhu, Z. Su, D. Bi, D. Wang, D. Yang, Y. Chen, Very high-efficiency organic light-emitting diodes based on cyclometallated rhenium (I) complex, *Appl. Phys. Lett.*, 92 (2008) 083302-083305.
- [16] Z. Si, J. Li, B. Li, Z. Hong, S. Lu, S. Liu, W. Li, High performance yellow light-emitting organic electrophosphorescent devices based on Re(I) complex, *Appl. Phys. A*, 88 (2007) 643–646.
- [17] T.A. Manes, M.J. Rose, Redox properties of a bis-pyridine rhenium carbonyl derived from an anthracene scaffold, *Inorg. Chem. Commun.*, 61 (2015) 221–224.

- [18] Y. Kuninobu, Y. Nishina, C. Nakagawa, K. Takai, Rhenium-catalyzed insertion of aldehyde into a C–H bond: synthesis of isobenzofuran derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 12376–12377.
- [19] H.C. Bertrand, S. Clède, R. Guillot, F. Lambert, C. Policar, Luminescence modulations of rhenium tricarbonyl complexes induced by structural variations, *Inorg. Chem.*, 53 (2014) 6204–6223.
- [20] R. Huang, G. Langille, R.K. Gill, C. Li, Y. Mikata, M.Q. Wong, D.T. Yapp, T. Storr, Synthesis, characterization, and biological studies of emissive rhenium–glutamine conjugates, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 18 (2013) 831–844.
- [21] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 4 (2004) 31–39.
- [22] F. Basuli, S. Peng, S. Bhattacharya, Unusual coordination mode of thiosemicarbazone ligands a search for the origin, *Inorg. Chem.*, 39 (2000) 1120–1127.
- [23] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, E.M. Vázquez-López, Synthesis and characterization of thiosemicarbazone derivatives of 2-chloro-4-hydroxybenzaldehyde and their rhenium(I) complexes, *Polyhedron*, 28 (2009) 3915–3922.
- [24] P.N. Yadav, M.A. Demertzis, D. Kovala-Demertzi, A. Castineiras, D.X. West, Synthesis, solution and spectral studies of palladium(II) complexes with 2-hydroxyacetophenone N(3)-propylthiosemicarbazone: crystal structure of a tripalladium complex, *Inorg. Chim. Acta*, 332 (2002) 204–209.
- [25] Y. Tian, C. Duan, C. Zhao, X. You, T.C.W. Mak, Z. Zhang, Synthesis, crystal structure, and second-order optical nonlinearity of bis(2-chlorobenzaldehyde thiosemicarbazone)cadmium halides (CdL_2X_2 ; X = Br, I), *Inorg. Chem.*, 36 (1997) 1247–1252.
- [26] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, E.M. Vázquez-López, Synthesis and characterization of thiosemicarbazone derivatives of 2-ethoxy-3-methoxybenzaldehyde and their rhenium(I) complexes, *Polyhedron*, 27 (2008) 2867–2876.
- [27] M. Campbell, Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones, *Coord. Chem. Rev.*, 15 (1975) 279–319.
- [28] J.S. Casas, M.S. García-Tasende, J. Sordo, Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones: a structural review, *Coord. Chem. Rev.*, 209 (2000) 197–261.

- [29] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, J.M. Hermida-Ramón, E.M. Vázquez-López, Synthesis, characterization, reactivity and computational studies of new rhenium(I) complexes with thiosemicarbazone ligands derived from 4-(methylthio)benzaldehyde, *Polyhedron*, 30 (2011) 2146–2156.
- [30] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, U. Abram, E.M. Vázquez-López, Preparation and characterization of rhenium(I) complexes with thiosemicarbazone ligands derived from resorcinol, *Polyhedron*, 65 (2013) 221–228.
- [31] I.G. Santos, U. Abram, R. Alberto, E.V. Lopez, A. Sanchez, Tricarbonylrhenium(I) complexes with thiosemicarbazone derivatives of 2-acetylpyridine and 2-pyridine formamide showing two unusual coordination modes of tridentate thiosemicarbazone ligands, *Inorg. Chem.*, 43 (2004) 1834–1836.
- [32] R. Carballo, J.S. Casas, E. García-Martínez, G. Pereiras-Gabián, A. Sánchez, J. Sordo, E.M. Vázquez-López, J.C. Garcia-Montegudo, U. Abram, Reaction of bromopentacarbonylrhenium(I) with ferrocenylcarbaldehyde thiosemicarbazones: the first X-ray diffraction studies of metal carbonyl complexes containing bidentate thiosemicarbazone ligands, *J. Organomet. Chem.*, 656 (2002) 1–10.
- [33] G. Pereiras-Gabián, E.M. Vázquez-López, U. Abram, Dimeric rhenium(I) carbonyl complexes with thiosemicarbazone backbone, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 630 (2004) 1665–1670.
- [34] R. Carballo, J.S. Casas, E. Garcia-Martinez, G. Pereiras-Gabian, A. Sanchez, U. Abram, E.M. Vazquez-Lopez, Dimeric rhenium(I) thiosemicarbazone complexes: formation, crystal structures, and the role of N-H and C-H interactions, *Cryst. Eng. Comm*, 7 (2005) 113–120.
- [35] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sanchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 1534–1543.
- [36] B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones, *Biol. Trace Elem. Res.*, 153 (2013) 371–381.
- [37] X. Li, D. Zhang, G. Lu, G. Xiao, H. Chi, Y. Dong, Z. Zhang, Z. Hu, Synthesis and characterization of novel rhenium (I) complexes with large Stokes shift for

- applications in organic electroluminescent devices, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 241 (2012) 1–7.
- [38] R.W. Balk, D.J. Stufkens, A. Oskam, Characterization of metal-to-ligand charge-transfer and intraligand transitions of *fac*-[Re(CO)₃L(X)] complexes [L = di-imine; X = halide or Mn(CO)₅] and explanation of the photochemistry of [Re(CO)₃L{Mn(CO)₅}] using the resonance Raman effect, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1981) 1124–1133.
- [39] R. Alberto, A. Egli, U. Abram, K. Hegetschweiler, V. Gramlich, P.A. Schubiger, Synthesis and reactivity of [NEt₄]₂[ReBr₃(CO)₃] formation and structural characterization of the clusters [NEt₄][Re₃(μ₃-OH)(μ-OH)₃(CO)₉] and [NEt₄][Re₂(μ-OH)₃CO₆] by alkaline titration, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1994) 2815–2820.
- [40] I. Machado, S. Fernández, L. Becco, B. Garat, J.S. Gancheff, A. Rey, D. Gambino, New *fac*-tricarbonyl rhenium(I) semicarbazone complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation, *J. Coord. Chem.*, 67 (2014) 1835–1850.
- [41] R. Arancibia, A.H. Klahn, G.E. Buono-Core, E. Gutierrez-Puebla, A. Monge, M.E. Medina, C. Olea-Azar, J.D. Maya, F. Godoy, Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of ferrocenyl and cyrhetrenyl imines derived from 5-nitrofurane, *J. Organomet. Chem.*, 696 (2011) 3238–3244.
- [42] A. Vlček, Ultrafast excited-state processes in Re(I) carbonyl-diimine complexes: from excitation to photochemistry, Heidelberg Ed., Berlin, (2010) 115–158.
- [43] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. Diego Maya, D. Gambino, Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 411–418.
- [44] C. Sarniguet, J. Toloza, M. Cipriani, M. Lapier, M. Vieites, Y. Toledano-Magaña, J. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, V. Moreno, J. Maya, C. Azar, D. Gambino, L. Otero, Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites, *Biol. Trace Elem. Res.*, 159 (2014) 379–392.
- [45] M. Pagano, B. Demoro, J. Toloza, L. Boiani, M. González, H. Cerecetto, C. Olea-Azar, E. Norambuena, D. Gambino, L. Otero, Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.*, 44 (2009) 4937–4943.
- [46] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino, L. Otero,

- Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (2014) 4677–4689.
- [47] D. Gambino, L. Otero, M. Vieites, M. Boiani, M. González, E.J. Baran, H. Cerecetto, Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: experimental and theoretical study, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 68 (2007) 341–348.
- [48] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faundez, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 4885–4893.
- [49] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J.D. Maya, B. Garat, D. Gambino, Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 1033–1043.
- [50] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3322–3331.
- [51] P. Saxena, B. Shankar, M. Sathiyendiran, Dimeric and monomeric fac-rhenium(I)tricarbonyl complexes containing 2-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenolate, *J. Organomet. Chem.*, 799–800 (2015) 82–89.
- [52] S. Sato, T. Morimoto, O. Ishitani, Photochemical synthesis of mer-[Re(bpy)(CO)₃Cl], *Inorg. Chem.*, 46 (2007) 9051–9053.
- [53] T.R. Hayes, A.S. Powell, C.L. Barnes, P.D. Benny, Synthesis and stability of 2+1 complexes of N,N-diethylbenzoylthiourea with [MI(CO)₃]⁺ (M = Re, 99mTc), *J. Coord. Chem.*, 68 (2015) 3432–3448.
- [54] M.L. Low, G. Paulus, P. Dorlet, R. Guillot, R. Rosli, N. Delsuc, K.A. Crouse, C. Policar, Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Zn(II) and Re(I) complexes derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin, *BioMetals*, 28 (2015) 553–566.

- [55] B. Schmitt, T. Gerber, E. Hosten, R. Betz, Monomeric/dimeric complexes of *fac*-[Re(CO)₃]⁺ with benzoylthiourea derivatives, *Inorg. Chem. Commun.*, 24 (2012) 136–139.
- [56] U. Abram, S. Abram, R. Alberto, R. Schibli, Ligand exchange reactions starting from [Re(CO)₃Br₃]²⁻ synthesis, characterization and structures of rhenium(I) tricarbonyl complexes with thiourea and thiourea derivatives, *Inorg. Chim. Acta*, 248 (1996) 193–202.
- [57] R. Schaefer, W. Kaim, J. Fiedler, Di- and trinuclear complexes with sulfide-bridged rhenium in very different oxidation states (Re^IRe^{VII}, Re^IRe^{VI}Re^I, Re^IRe^{VII}Re^I) The d⁰/d¹ transition in tetrathiometalates, *Inorg. Chem.*, 32 (1993) 3199–3200.
- [58] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, E.M. Vázquez-López, Synthesis, characterization and binding affinities of rhenium(I) thiosemicarbazone complexes for the estrogen receptor (α/β), *J. Inorg. Biochem.*, 140 (2014) 53–63.
- [59] L. Helm, Ligand exchange and complex formation kinetics studied by NMR exemplified on *fac*-[(CO)₃M(H₂O)]⁺ (M=Mn, Tc, Re), *Appl. NMR Inorg. Organomet. Chem.*, 252 (2008) 2346–2361.
- [60] G. Thiele, G. Liehr, E. Lindner, Kristall- und Molekülstruktur von Bis[tricarbonyl(diäthylthiophosphinato)rhenium(+I)], *Chem. Ber.*, 107 (1974) 442–447.
- [61] G. Thiele, G. Liehr, E. Lindner, Die konformation des μ-bis[tetracarbonylrhenium(I)]-bis-[tetracarbonyl(trithiocarbonato)rhenium(I)], eines überraschenden reaktionsproduktes bei der umsetzung von CF₃Re(CO)₅ mit CS₂, *J. Organomet. Chem.*, 70 (1974) 427–435.
- [62] L. Di, E.H. Kerns, Lipophilicity methods, Second Edition., Academic Press, Boston, (2016) 299–306.
- [63] K. Makino, T. Hagiwara, A. Murakami, A mini review: Fundamental aspects of spin trapping with DMPO, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.*, 37 (1991) 657–665.
- [64] H. Shi, G. Timmins, M. Monske, A. Burdick, B. Kalyanaraman, Y. Liu, J. Clément, S. Burchiel, K.J. Liu, Evaluation of spin trapping agents and trapping conditions for detection of cell-generated reactive oxygen species, *Arch. Biochem. Biophys.*, 437 (2005) 59–68.
- [65] D. Gambino, L. Otero, J. D. Maya, A. Morello, C. Rigol, G. Barriga, J. Rodriguez, C. Folch, E. Norambuena, M. Gonzalez, C. Olea Azar and H.

- Cerecetto, Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Med. Chem.*, 4 (2008) 11–17.
- [66] C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, L. Otero, D. Gambino, M. González, H. Cerecetto, Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 61 (2005) 2933–2938.
- [67] D.L. Reger, K.J. Brown, J.R. Gardinier, M.D. Smith, Syntheses and structural characterizations of rhenium carbonyl complexes of a bitopic ferrocene-linked bis(pyrazolyl)methane ligand, *J. Organom. Chem.*, 690 (2005) 1889–1900.
- [68] R.M. Silva, B.J. Liddle, S.J. Lindeman, M.D. Smith, J.R. Gardinier, Ligand-promoted solvent-dependent ionization and conformational equilibria of $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}[\text{CH}_2(\text{S-tim})_2]$ (tim = 1-methylthioimidazolyl) crystal structures of $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}[\text{CH}_2(\text{S-tim})_2]$ and $\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})[\text{CH}_2(\text{S-tim})_2]\}(\text{PF}_6)$, *Inorg. Chem.*, 45 (2006) 6794–6802.

CAPÍTULO 6

COMPUESTOS DE Pd(II) Y Pt(II) CON
EL CO-LIGANDO 1,1' BIS-
DIFENILFOSFINO FERROCENO,
 $\{M(dppf)\}$

COMPUESTOS DE Pd(II) Y Pt(II) CON EL CO- LIGANDO 1,1' BIS-DIFENILFOSFINO FERROCENO, {M(dppf)}

Contenido

6.1	Introducción	255
6.1.1	Compuestos de coordinación de Pd(II) y Pt(II) con el ligando <i>N</i> -óxido de 2-mercaptopiridina	262
6.1.2	Compuestos de coordinación de Pd(II) y Pt(II) con los ligandos tiosemicarbazona derivados de 5-nitrofuraldehído	264
6.2	Compuestos [M^{II}(mpo)(dppf)](PF₆)	266
6.2.1	Síntesis	266
6.2.2	Caracterización en estado sólido	267
6.2.2.1	Análisis elemental	267
6.2.2.2	Espectroscopía infrarroja	268
6.2.2.3	Difracción de rayos X en monocristal	269
6.2.3	Caracterización en solución	276
6.2.3.1	Conductimetría	276
6.2.3.2	Resonancia magnética nuclear	277
6.2.3.3	Estudio electroquímico	287
6.2.4	Actividad biológica	292
6.2.4.1	Actividad antiparasitaria	292
6.2.4.2	Citotoxicidad inespecífica	293
6.2.5	Mecanismo de acción	294

6.2.5.1	Inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	294
6.2.5.2	Producción de especies radicalarias en <i>Trypanosoma cruzi</i>	299
6.2.6	Interacción con BSA	300
6.2.6	Conclusiones parciales	303
6.3	Compuestos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆)	304
6.3.1	Síntesis	304
6.3.2	Caracterización en estado sólido	305
6.3.2.1	Análisis elemental	305
6.3.2.2	Espectroscopía infrarroja	306
6.3.2.3	Difracción de rayos X en monocristal	309
6.3.3	Caracterización en solución	319
6.3.3.1	Resonancia Magnética Nuclear	319
6.3.3.2	Estudio Electroquímico	325
6.3.3.3	Lipofilia	329
6.3.4	Actividad biológica	331
6.3.4.1	Actividad antiparasitaria	331
6.3.4.1.1	Actividad contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	331
6.3.4.1.2	Actividad contra <i>Trypanosoma brucei</i>	332
6.3.4.2	Citotoxicidad inespecífica	335
6.3.5	Mecanismo de acción	336
6.3.5.1	Generación de especies radicalarias en <i>Trypanosoma. cruzi</i>	336
6.3.5.2	Efecto sobre el consumo de oxígeno de <i>Trypanosoma cruzi</i>	339
6.3.5.3	Estudio de cambios redox intracelulares en <i>Trypanosoma brucei</i>	340
6.3.5.4	Interacción con ADN	345
6.3.4.4.1	Interacción con ADN mediante medidas de fluorescencia	345
6.3.4.4.2	Interacción con ADN mediante medidas de dicroísmo circular	351
6.3.6	Interacción con BSA	359

6.3.6.1	Interacción con BSA mediante medidas de fluorescencia	359
6.3.6.2	Interacción con BSA mediante medidas de dicroísmo circular	362
6.3.7	Conclusiones parciales	371
6.4	Conclusiones generales	371
6.5	Bibliografía	372

Capítulo 6: Compuestos de Pd(II) y Pt(II) con el coligando 1,1'-bis-difenilfosfino ferroceno, {M(dppf)}

6.1 Introducción

En este capítulo se presenta el desarrollo de una nueva serie de compuestos organometálicos que incluyen el fragmento M^{II} -1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (fragmento {M(dppf)}), donde M = Pd o Pt, y ligandos bioactivos contra parásitos tripanosomátidos, seleccionándose en particular el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) y cuatro tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL). En este capítulo se aborda la síntesis y caracterización de estos compuestos, y el estudio de algunas propiedades fisicoquímicas de interés biológico. Se evaluó la actividad *in vitro* contra los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *T. brucei*, y se estudió la citotoxicidad en células mamíferas modelo como parte del análisis de la selectividad de la actividad antiparasitaria. Se realizaron también estudios para dilucidar el mecanismo probable de acción antiparasitario, relacionados con cambios redox en los parásitos tripanosomátidos y con la interacción con ADN, y se incluyó un estudio de interacción con albúmina sérica bovina como modelo de proteína transportadora de fármacos del sistema circulatorio mamífero. Para una mejor comprensión, este capítulo fue dividido en dos partes, la primera de ellas relacionada con los complejos con el ligando Hmpo, y la segunda relacionada con los complejos con las tiosemicarbazonas bioactivas.

El paladio y el platino son metales de las series 4d y 5d, respectivamente, y pertenecen al mismo grupo del sistema periódico. Estas características hacen que estos elementos tengan importantes similitudes químicas. Ambos tienen la capacidad de formar compuestos de coordinación con diferentes estados de oxidación, siendo los más comunes los estados de oxidación II y IV. Sin embargo, también pueden presentar estado de oxidación I y III (donde hay involucrados enlaces M-M) y estado de oxidación 0 (donde están presentes ligandos PR₃, CO u otros ácidos- π con formación de clúster) [1].

La mayoría de los complejos de paladio y platino presentan el estado de oxidación II, con una configuración d^8 y un entorno geométrico plano cuadrado alrededor del catión metálico, generando así compuestos diamagnéticos. Ambos iones poseen la tendencia de formar compuestos neutros de estequiometría MX_2L_2 (X = ligando aniónico

monodentado y L = ligando donador neutro) que pueden encontrarse en configuración *cis* o *trans*. Sin embargo, también se pueden encontrar complejos iónicos con otras estequiometrías como ML_4^{2+} , ML_3X^+ , MLX_3^- , MX_4^{2-} u otras. Los iones M(II) (M = Pd o Pt) generalmente muestran una baja afinidad por átomos donores duros como el fluor u oxígeno, y poseen una mayor preferencia por ligandos halogenuro más pesados, ligandos azufrados y ligandos aceptores π . La diferencia más notoria entre estos iones metálicos radica en la velocidad relativa de sustitución, donde se ha encontrado que los complejos de paladio (II) experimentan reacciones de sustitución 10^5 veces más rápidas que complejos análogos de platino [2].

Por otro lado, el descubrimiento y elucidación estructural del ferroceno ha marcado el punto inicial para el desarrollo de la química organometálica moderna. Esta molécula posee la fórmula general $M(\eta^5-Cp)_2$ característica de los metallocenos, donde *Cp* = ciclopentadienilo. Éstos se caracterizan por poseer una estructura del tipo *sándwich* donde el centro metálico está situado entre dos ligandos aromáticos (o derivados) con enlaces π (ver figura 1.6, capítulo 1) [3]. Estructuralmente, el ferroceno está formado por dos anillos ciclopentadienilo y un centro metálico de hierro en estado de oxidación II. Es un compuesto estable que cumple la regla de los 18 electrones característica de los compuestos organometálicos [1]. En fase gaseosa los anillos ciclopentadienilo se encuentran eclipsados (alineados en el eje de simetría principal), pero en estado sólido existen varias fases en las cuales los anillos están paralelos, pero con orientaciones diferentes generando diferentes conformaciones entre ellos. Este comportamiento se debe a que la barrera de potencial para la rotación de los dos anillos es baja, y a 298 K existen movimientos incluso en el estado sólido [3].

El ferroceno se ha utilizado como esqueleto para la formación de numerosas moléculas derivadas del mismo, presentando una gran variedad de posibles sustituciones en ambos anillos *Cp*. Los patrones de sustitución comúnmente observados son del tipo 1-sustituidos (sustituyentes en uno de los anillos *Cp*) y 1,1'- disustituidos (sustituyentes en ambos anillos). La sustitución de los anillos del ferroceno se ve favorecida por la estructura resonante que este posee, la cual le confiere la capacidad de realizar reacciones características de compuestos aromáticos como las reacciones de sustitución electrofílica, por ejemplo, la reacción de Friedel-Crafts con anhídrido acético (o cloruro de acetilo) en presencia de ácido fosfórico como catalizador [4]. El tipo y número de sustituyentes que posea el ferroceno va a generar cambios en las propiedades fisicoquímicas del mismo, como por ejemplo, su carácter lipofílico, su reactividad y su potencial redox. Además,

estas sustituciones generan cambios en las características espectroscópicas del mismo debido a los cambios conformacionales que generan sobre la estructura del ferroceno [5]. Desde el punto de vista de la química de coordinación, las moléculas derivadas de ferroceno han sido utilizadas como ligando en numerosos complejos metálicos [6]. Un tipo ampliamente estudiado de estos ligandos lo integran los ferrocenil fosfino derivados [7–9]. La capacidad de transferir las características del grupo ferrocenilo a los complejos resultantes, sin alterar las características inherentes del mismo, ha ampliado su utilización para el diseño de complejos metálicos aplicados como catalizadores, materiales y fármacos. Uno de los ferrocenil fosfino derivados probablemente mejor desarrollados es el 1,1'-bis(difenilfosfino) ferroceno (denominado dppf), sintetizado por primera vez hace más de cuatro décadas [10,11], aunque los estudios de su singularidad química comenzaron a ser apreciados a mediados de los años 90 [12]. Como se observa en la figura 6.1, el dppf está formado por un fragmento de ferroceno sustituido en ambos anillos *Cp* por grupos difenilfosfino (PPh_2), por lo que de ahora en más cuando se haga referencia a cada anillo *Cp* del dppf, en sentido estricto se hará alusión al anillo ciclopentadienilo fosfinado (*Cp*- PPh_2).

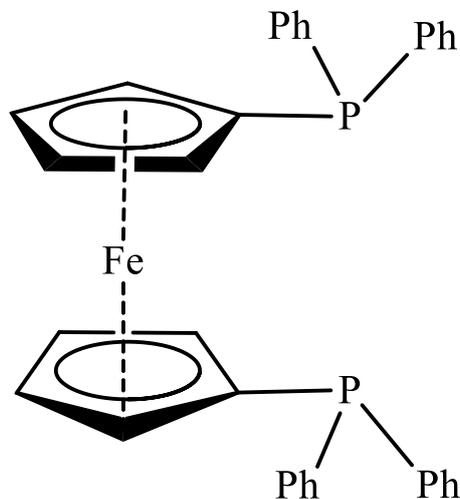


Figura 6.1: Estructura del 1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno, dppf.

El dppf coordina principalmente a través de los átomos de fósforo, y, por lo general, no se produce una interacción formal ferrocenilo-metal. Sólo se han reportados en la literatura algunos complejos con este tipo de interacción, como, por ejemplo, el complejo $[Pd^{II}(dppf)(PPh_3)](BF_4)_2$ compuesto en el que se evidenció la presencia del enlace dativo Fe-Pd [13].

En relación a la coordinación comúnmente observada para este ligando, el dppf puede interactuar con centros metálicos de diferentes maneras. Posee la capacidad de actuar como ligando monodentado, bidentado o puente, generando diferentes estructuras en los complejos obtenidos (figura 6.2). Además, para ajustar su modo de coordinación o aliviar la tensión impuesta por la formación del complejo, los anillos *Cp* del ligando dppf pueden sufrir tres variaciones que se resumen en la figura 6.3: los anillos *Cp* pueden girar alrededor del eje *Cp*(centroide)-Fe-*Cp*(centroide) generando diferentes conformaciones, los anillos pueden alejarse o acercarse al centro de Fe(II) provocando diferentes inclinaciones del dppf, y además, los átomos de fósforo pueden divergir de la coplanaridad con los anillos *Cp* generando los diferentes modos de coordinación previamente mencionados.

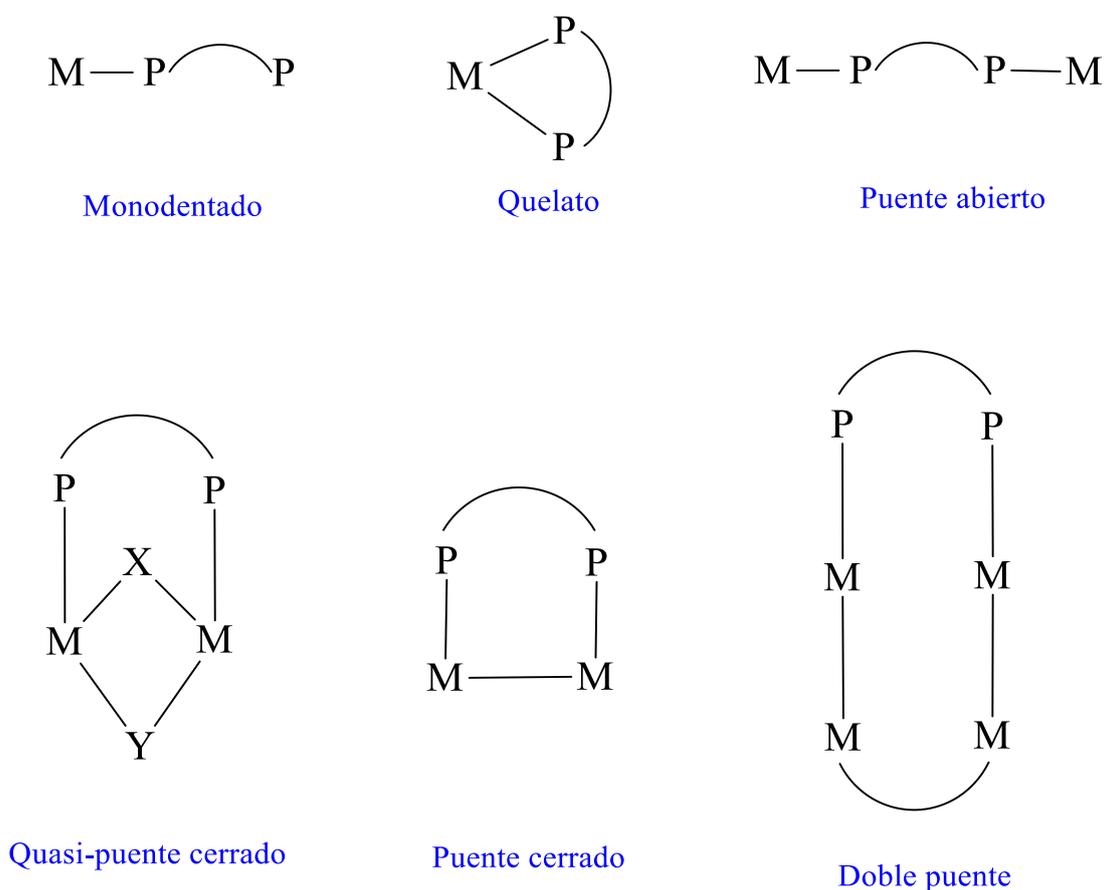


Figura 6.2: Modos de coordinación comúnmente observados del ligando dppf

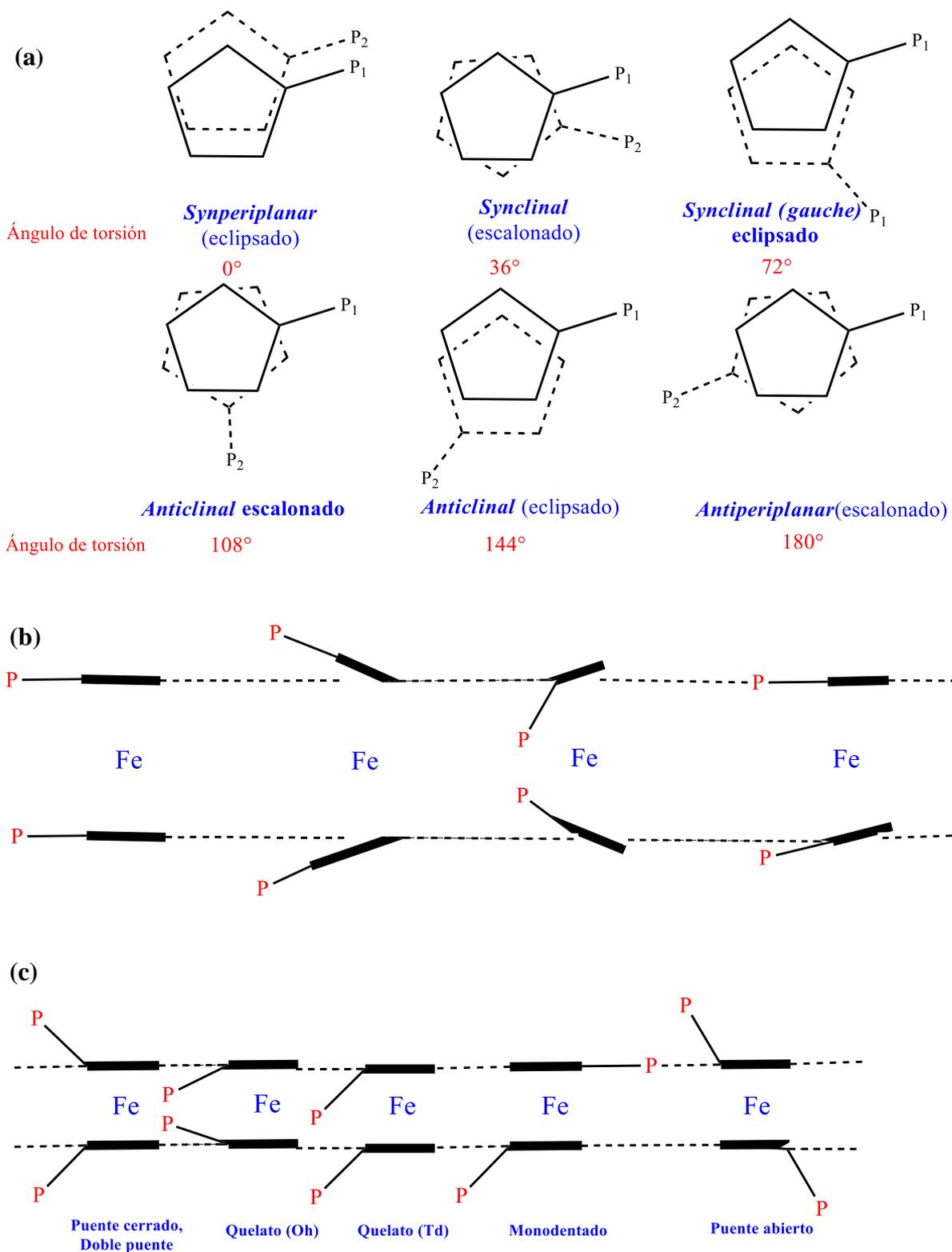


Figura 6.3: (a) Seis conformaciones ideales de dppf que surgen de la torsión $Cp(\text{centroide})\text{-Fe-Cp}(\text{centroide})$. (b) Posibles inclinaciones de los anillos Cp de dppf. (c) Posibles inclinaciones de los átomos de fósforo en la coordinación de dppf.

Todas estas diferentes conformaciones estructurales del ligando le confieren la capacidad de adaptarse a los requerimientos geométricos y estéricos del ion metálico central. Dependiendo del tipo de metal utilizado se pueden obtener complejos con geometrías no comunes, como por ejemplo la geometría trigonal plana estabilizada por el dppf en el complejo $[\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{dppf})_2]$ (figura 6.4) [14], o números de coordinación superiores como en los complejos con dppf de número de coordinación siete como $[\text{W}^{\text{II}}\text{I}_2(\text{CO})_3(\text{dppf})]$ [15]. Éstos y muchos otros ejemplos dan cuenta de la gran versatilidad del dppf como ligando.

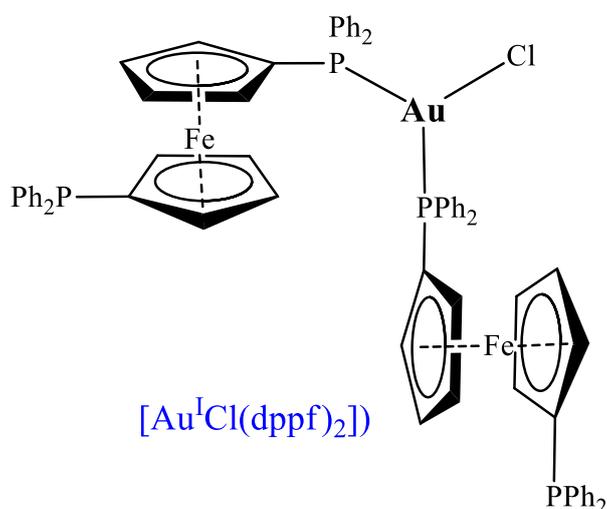


Figura 6.4: Estructura del complejo $[\text{Au}^{\text{I}}\text{Cl}(\text{dppf})_2]$.

Un compuesto organometálico derivado del 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno que ha sido ampliamente estudiado como catalizador de reacciones de acoplamiento, es el complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$. La estructura cristalina resuelta de este compuesto mostró un entorno geométrico pseudo cuadrado plano en torno al ion metálico central, donde el ligando dppf coordina de forma bidentada a través de los átomos de fosforo [16] (Figura 6.5).

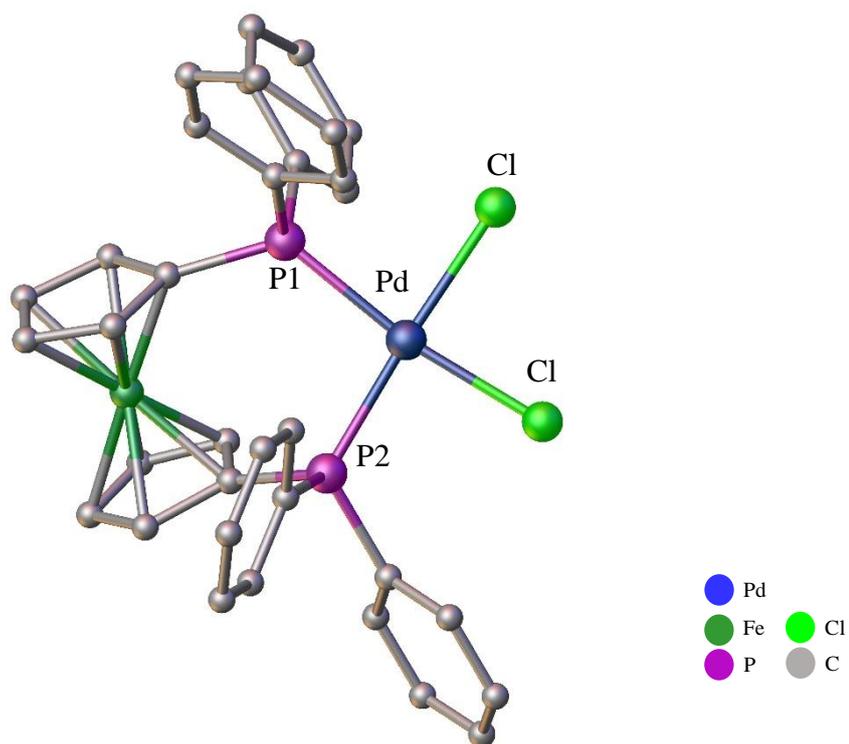


Figura 6.5: Estructura cristalina del compuesto $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]\cdot\text{CHCl}_3$. Los átomos de hidrógeno del ligando dppf y la molécula de CHCl_3 de cristalización, no fueron incluidos para una mejor visualización de la estructura [16].

En esta estructura los ligandos cloruro se encuentran en posición *trans* a ambos grupos fosfino lo que genera un efecto labilizador sobre ambos ligandos Cl^- (efecto *trans*) [2], provocando que sean fácilmente sustituidos por otros ligandos para la formación de nuevos complejos metálicos a partir de él.

Se sintetizó también el complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ cuya estructura cristalina reveló las mismas características estructurales que su análogo de paladio [17] generando también su utilización como precursor de numerosas especies químicas [18]. Luego del descubrimiento de las propiedades farmacológicas del cisplatino, ambos complejos se utilizaron como precursores para la generación de nuevos complejos como potenciales fármacos. Desde el punto de vista químico, ambos fragmentos organometálicos $\{\text{Pd}(\text{dppf})\}^{2+}$ y $\{\text{Pt}(\text{dppf})\}^{2+}$ (que denominaremos genéricamente $\{\text{M}(\text{dppf})\}$, donde M = Pd o Pt) presentan una alta acidez de Lewis lo que les confiere una gran afinidad por átomos donores, como N y S (bases blandas de Pearson) y en menor grado por el oxígeno, de pequeños ligandos o de biomoléculas [19]. De esta manera, utilizando este fragmento organometálico se han sintetizado numerosos compuestos con novedosas propiedades fisicoquímicas, las cuales han favorecido su aplicación como potenciales fármacos por su

elevada afinidad de interacción con biomoléculas. Por ejemplo, los complejos *cis*-[Pt^{II}(dppf)(S)₂] (S = dimetilsulfóxido o dimetilformamida) han mostrado una elevada afinidad de interacción con nucleósidos [18,19], o el complejo [Pd₂{(C,N)-C₁₂H₈NH₂}]₂(μ-dppf)Cl₂, que incluye un ligando intercalante del ADN y el fragmento dppf y que ha mostrado una elevada actividad anticancerígena, y una gran afinidad de interacción con ADN y con proteínas como albumina sérica bovina (BSA) [20].

Debido a las numerosas características comunes entre Pd(II) y Pt(II) mencionadas anteriormente, se diseñaron nuevos complejos análogos con dichos centros metálicos. En particular, en este capítulo se expone el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos heterobimetálicos que incluyen al fragmento {M(dppf)} con los ligandos O,S *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) y cuatro N,S tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído (HL).

6.1.1 Compuestos de coordinación de Pd(II) y Pt(II) con el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina

Los derivados de *N*-óxido de piridina son compuestos heterocíclicos cuya estructura resonante, le confieren una elevada reactividad [21,22]. Uno de estos compuestos que ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su estructura y propiedades, es el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo). Esta molécula existe en dos formas tautoméricas, siendo la estructura protonada en el átomo de oxígeno la predominante. Esto está de acuerdo con el patrón de tautomería de las mercaptopiridinas (α -mercapto derivados de compuestos *N*-heteroaromáticos) [23,24] (figura 6.6).

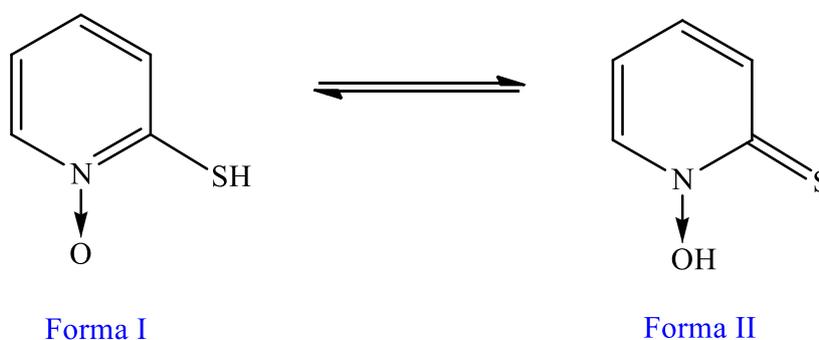


Figura 6.6: Formas tautoméricas del compuesto *N*-óxido de 2-mercaptopiridina

Desde el punto de vista de la química de coordinación, el Hmpo es un excelente ligando, ya que la presencia de átomos donores, como el oxígeno del grupo *N*-óxido y el azufre tiocarbonílico, le confiere una elevada afinidad por iones metálicos. El Hmpo ha demostrado su capacidad para actuar como ligando bidentado o monodentado con iones metálicos del bloque d y f. En cuanto a complejos con aplicación biológica, se puede mencionar al compuesto $[\text{Zn}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$, utilizado como agente antifúngico, cuya estructura cristalina resuelta por DRX mostró una coordinación bidentada de los dos ligandos mpo [25], o el complejo de ^{113}Sn , $[\text{Sn}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$, utilizado como marcador de plaquetas en el plasma sanguíneo para la evaluación de posibles complicaciones tromboembólicas [26], que mostró las mismas características estructurales que su análogo de Zn(II). En relación a complejos con lantánidos enfocados hacia el tratamiento del cáncer, se ha resuelto la estructura de los compuestos de fórmula $[\text{M}^{\text{III}}(\text{mpo})_3(\text{dmsO})_2]$ ($\text{M} = \text{Sm}$ o Pr) donde el ion metálico se encontró coordinado a tres moléculas de mpo de forma bidentada [27–29]. En cuanto a complejos de la primera serie de transición con este ligando, se han sintetizados complejos homolépticos de centro metálico Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(III), Ni(II), Cu(II) [30] y V(IV) [31,32]. En todos los casos se observó una coordinación bidentada del ligando. También se han reportado complejos heterolépticos de la primera serie de transición como $[\text{Co}(\text{mpo})_2\text{L}]$ ($\text{L} =$ ligandos fosfinas o piridinas) [33]. Por otro lado, se han obtenido también complejos de la segunda y tercera serie de transición como los complejos $[\text{Zr}^{\text{IV}}(\text{mpo})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Hg}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$ y el complejo de Ru(II), $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{S-mpo})(\text{bpy})(\text{tpy})](\text{PF}_6)$ ($\text{bpy} = 2,2'$ -bipiridina y $\text{tpy} = 2,2':6',2'$ -terpiridina). Este último mostró una coordinación monodentada del ligando mpo a través del átomo de azufre [34]. Cabe mencionar que los métodos de síntesis de todos estos compuestos utilizan la sal sódica del ligando (Nampo).

En relación a compuestos metálicos de Pd(II) y Pt(II) con este ligando, se han sintetizado los complejos homolépticos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$. El primero de ellos fue el complejo de paladio, sintetizado por Shi y colaboradores [35], quienes a partir de PdCl_2 y Hmpo obtuvieron el compuesto *cis*- $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$ con un 60 % de rendimiento. La resolución de la estructura cristalina de este compuesto reveló una coordinación bidentada del ligando mpo y un entorno geométrico plano cuadrado en torno al ion metálico. El compuesto análogo de platino se sintetizó en el año 1983 a partir de una solución de K_2PtCl_4 y la sal sódica del ligando (Nampo) [36]. La estructura cristalina fue resuelta recién en el año 2005 por Zhou y col. [37] donde también se observó una coordinación bidentada del ligando mpo, pero con la diferencia que el compuesto de platino presentó una isomería *trans*.

Los compuestos $[M^{II}(\text{mpo})_2]$ y $[V^{IV}O(\text{mpo})_2]$ fueron ampliamente estudiados por nuestro grupo de investigación (sintetizados a partir de modificaciones de los procedimientos experimentales originales), desde el punto de vista químico y de su aplicación biológica [38]. A partir de los resultados obtenidos con estos compuestos, se sintetizó luego el complejo de Au(I) $[\text{Au}^I_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$ [39], donde se observó también la coordinación bidentada de los ligandos mpo. Los últimos complejos sintetizados, y evaluados como potenciales agentes contra *Mycobacterium tuberculosis*, fueron los compuestos $[\text{Bi}^{III}(\text{mpo})_3]$, $[\text{Ga}^{III}(\text{mpo})_3]$ y $[\text{Fe}^{III}(\text{mpo})_3]$ (este último fue sintetizado por modificación de procedimientos previamente descritos) [40]. Los estudios estructurales de estos compuestos confirmaron también la coordinación bidentada en estos complejos.

6.1.2 Compuestos de coordinación de Pd(II) y Pt(II) con los ligandos HL (tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro furaldehído)

Tal como se ha expuesto en capítulos previos, las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro furaldehído poseen características químico-estructurales que las convierten en versátiles ligandos. En los capítulos 4 y 5 se describieron los diferentes modos de coordinación de éstas y otras tiosemicarbazonas en complejos metálicos de Ru(II) y Re(I). En este apartado, se realizará una breve descripción de las tiosemicarbazonas como ligandos de complejos de Pd(II) y Pt(II).

El diseño de complejos de Pd(II) y Pt(II) con ligandos tiosemicarbazona se ve favorecido por el carácter “blando” del átomo de azufre de estos ligandos, lo que resulta adecuado para la interacción con estos iones metálicos. Luego del descubrimiento de la actividad inhibitoria de la división celular del complejo $[\text{Pt}^{II}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (conocido como cisplatino), el desarrollo de complejos M(II)-tiosemicarbazonas con potencial actividad antitumoral aumentó considerablemente [41,42]. A partir de esa fecha se han desarrollado complejos con diferentes características estructurales, por ejemplo, complejos M(II)-TSCN (TSCN = tiosemicarbazona tridentada) tetranucleares, dinucleares y mononucleares [43]. En relación a compuestos mononucleares, numerosos complejos con tiosemicarbazonas y estos centros metálicos han sido reportados en la literatura, donde cabe mencionar los complejos de fórmula $[\text{M}^{II}\text{Cl}_2(\text{HL})]$ sintetizados por Beraldo y col. [44] (HL= fenilacetaldehído tiosemicarbazona), los complejos con las tiosemicarbazonas derivadas de la 2-benzoil piridina (2Bz4DR, R = H, metilo o fenilo) de fórmula general $[\text{Pd}^{II}\text{Cl}(2\text{Bz4DR})]$ [45], y los complejos con tiosemicarbazonas derivadas de la 1-

indanona (HL) de fórmula $[M^{II}Cl_2(HL)]$ y $[M^{II}(L)(HL)]Cl$ [46]. En todos estos compuestos se observó una coordinación bidentada de la tiosemicarbazona a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico.

En relación a las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído que se utilizaron en esta parte del trabajo de tesis, también han formado parte de la esfera de coordinación de complejos de M(II). Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un número importante de complejos de Pd(II) y Pt(II) con estas tiosemicarbazonas con diversas características químico-estructurales y novedosas propiedades biológicas. Los primeros compuestos metálicos diseñados fueron los complejos de Pd(II) con las ocho tiosemicarbazonas (HL) señaladas en la figura 2.1b del capítulo 2 con sustituyentes H, metilo, etilo y fenilo en el N terminal. Cuatro de ellas presentan una cadena más larga (derivados de 5-nitrofurilacroleína) que separa el grupo 5-nitrofurano de la tiosemicarbazona. Como se resume en la figura 6.7, dependiendo de la relación molar utilizada entre la sal de paladio precursora y los ligandos tiosemicarbazona, se obtuvieron dos series de compuestos de ocho miembros cada una: la primera serie de fórmula $[Pd^{II}Cl_2(HL)]$ se obtuvo cuando se utilizó una relación molar 1:1, y la segunda serie de fórmula $[Pd^{II}(L)_2]$ se obtuvo al usar una relación 1:2 (HL corresponde al ligando coordinando de forma neutra, y L al ligando aniónico monodeprotonado) [47]. La resolución de la estructura cristalina de uno de estos compuestos confirmó la coordinación bidentada del ligando, a través del átomo de nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico, y un entorno geométrico pseudo plano cuadrado alrededor del ion metálico Pd(II).

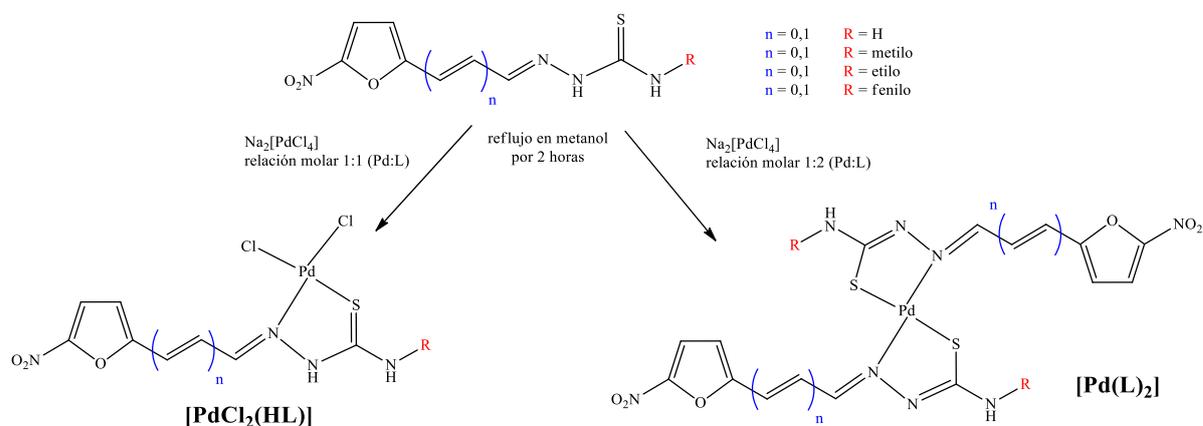


Figura 6.7: Esquema general de la síntesis de los complejos $[Pd^{II}Cl_2(HL)]$ y $[Pd^{II}(L)_2]$ con los ligandos HL de cadena corta y cadena larga.

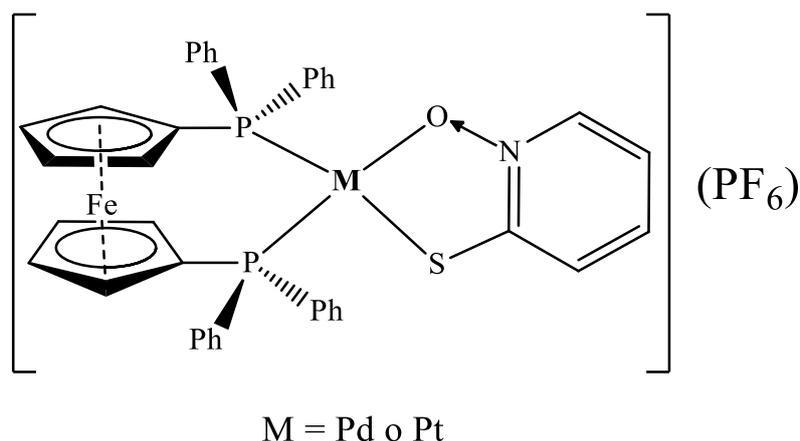
También se sintetizaron los compuestos análogos de Pt(II) con estos mismos ligandos [48,49].

Enfocados hacia el diseño de complejos M(II)-tiosemicarbazonas solubles en agua, posteriormente se incluyó el coligando hidrosoluble PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) en la esfera de coordinación de estos iones metálicos. Utilizando las cuatro tiosemicarbazonas HL de cadena corta, se obtuvieron los complejos de fórmula $[M^{II}Cl(L)(PTA)]$, (M = Pd y Pt). En estos estudios, los resultados de los análisis realizados (que incluyeron cálculos teóricos) confirmaron la fórmula propuesta de estos ocho complejos [50].

6.2 Compuestos $[M^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$

6.2.1 Síntesis

Los complejos de Pd(II) y Pt(II) con el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina, que codificaremos por simplicidad M-dppf-mpo, fueron sintetizados según lo indicado en el capítulo 3. El método de síntesis está basado en la reacción del respectivo precursor $[M^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$ (M = Pd o Pt) y la sal sódica del ligando (Nampo). Los sólidos obtenidos en la síntesis fueron recristalizados, mediante difusión lenta líquido-líquido CH_2Cl_2 /hexano, obteniéndose cristales de color rojo para el complejo $[Pd^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$ con un 63 % de rendimiento (40 mg), y cristales de color amarillo para el complejo $[Pt^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$ con un 50 % de rendimiento (31 mg) (Figura 6.8).



M-dppf-mpo

Figura 6.8: Estructura de los compuestos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ (M = Pd o Pt).

6.2.2 Caracterización en estado sólido

6.2.2.1 Análisis elemental

A partir de la fórmula propuesta para cada complejo, se calculó la composición porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. Mediante análisis elemental de elementos livianos, medido sobre las muestras recristalizadas, se obtuvo la composición porcentual experimental de cada uno de estos elementos químicos en la muestra, y se comparó con los valores calculados para cada complejo.

Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla 6.1, confirmaron la fórmula propuesta para cada complejo, correspondiente a $[\text{Pd}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{Pt}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Tabla 6.1: Resultados del análisis elemental de C, H, N y S de los complejos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Complejo	%C _{experimental} (%C _{teórico})	%H _{experimental} (%H _{teórico})	%N _{experimental} (%N _{teórico})	%S _{experimental} (%S _{teórico})
$[\text{Pd}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	50,13 (50,26)	3,45 (3,46)	1,50 (1,50)	3,43 (3,44)
$[\text{Pt}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	45,75 (45,90)	3,17 (3,16)	1,37 (1,37)	3,15 (3,14)

6.2.2.2

Espectroscopía infrarroja

Tal como se indicó en los capítulos 4 y 5, la espectroscopía infrarroja fue utilizada para identificar algunas de las bandas de vibración características de grupos funcionales de los ligandos en los complejos obtenidos, y además para identificar en los espectros corrimientos de las bandas asociadas a los grupos involucrados en la coordinación. En la figura 6.9 se muestra, de forma simultánea, los espectros de infrarrojo obtenidos para los compuestos Pd-dppf-mpo y Pt-dppf-mpo. Se observa un perfil espectral similar para ambos complejos. Analizando los espectros IR se realizó la asignación tentativa de las bandas características del ligando mpo y del dppf.

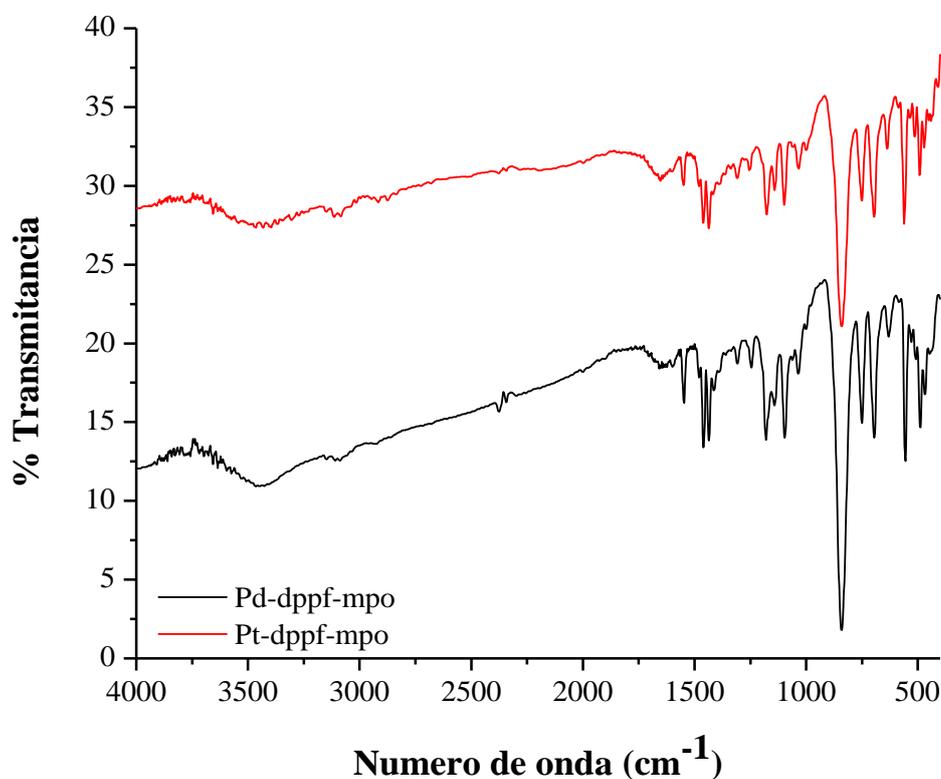


Figura 6.9: Espectro de infrarrojo del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ (línea negra) y del complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ (línea roja) en el rango entre 4000-400 cm^{-1} .

El espectro infrarrojo del ligando bioactivo Hmpo posee tres principales bandas de vibración que corresponden a $\nu(\text{N-O})$, $\delta(\text{N-O})$ y $\nu(\text{C-S})$. La identificación de estas bandas en los espectros de los complejos M-dppf-mpo se realizó de forma tentativa y basada en

asignaciones previas realizadas para estas mismas bandas en compuestos relacionados conteniendo el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina [35,38,51]. En la tabla 6.2 se resumen los valores de energía (en cm^{-1}) de las bandas de vibración asignadas, a partir de los espectros IR, de los complejos M-dppf-mpo y de la sal sódica Nampo.

Tabla 6.2: Asignación de las bandas de los espectros IR de ligando Hmpo (sal sódica), $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Asignación	Nampo	Pd-dppf-mpo	Pt-dppf-mpo
ν (N-O)	1263	1246	1252
δ (N-O)	834	^a	^a
ν (C-S)	706	694	694
ν (M-O)	-	445	450
^a : Solapado con la banda de vibración de $\nu(\text{P-F})$ del contraión PF_6^-			

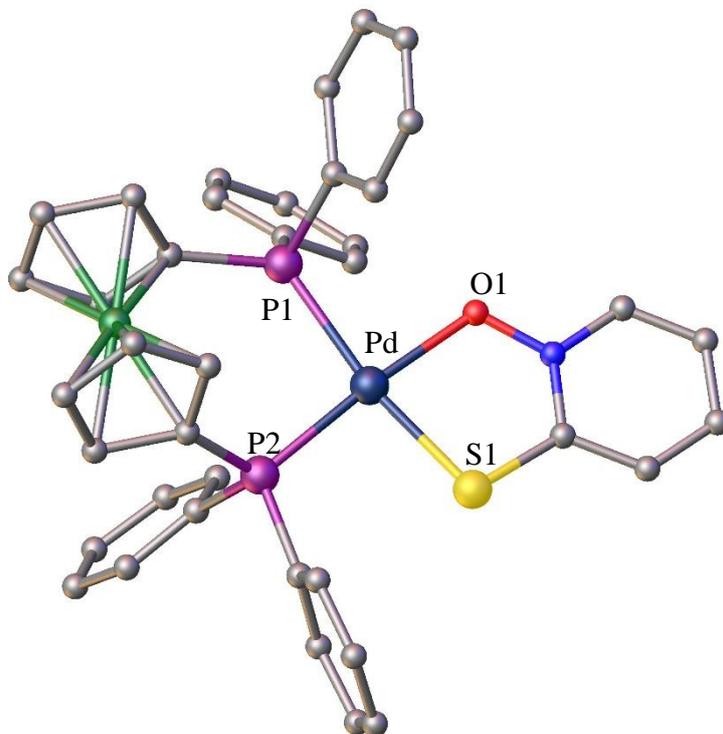
Por efecto de la coordinación se observó un desplazamiento de las bandas $\nu(\text{N-O})$ y $\nu(\text{C-S})$ del Hmpo. El corrimiento está de acuerdo con una coordinación bidentada del ligando mpo a través del átomo de azufre y del oxígeno del grupo *N*-óxido [35,37,38]. La banda correspondiente a la deformación $\delta(\text{N-O})$ no pudo ser asignada en los espectros de los complejos debido a que en esta misma zona espectral se observó una intensa banda correspondiente a la vibración $\nu(\text{P-F})$ del contraión hexafluorofosfato. Esta banda fue observada a 834 cm^{-1} en el espectro de Pd-dppf-mpo y a 840 cm^{-1} en el de Pt-dppf-mpo. Se identificó también la banda correspondiente a $\delta(\text{PF}_6)$ cercana a los 560 cm^{-1} en ambos complejos [52]. Hacia valores de menor energía se observó una débil banda atribuida al estiramiento metal-ligando $\nu(\text{M-O})$. Sin embargo, la banda $\nu(\text{M-S})$ no pudo ser asignada en los espectros de los complejos ya que ésta se encuentra usualmente a valores menores a 400 cm^{-1} [38].

6.2.2.3 Difracción de rayos X en monocristal

Se obtuvieron monocristales adecuados para el estudio por difracción de rayos X en monocristal de ambos compuestos M-dppf-mpo. Éstos se obtuvieron mediante la recristalización por difusión lenta líquido-líquido ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$). En la figura 6.10 se muestra la estructura cristalina resuelta de los dos complejos, y en la tabla 6.3 se resumen

los datos cristalográficos relevantes para la resolución de las estructuras, los parámetros de celda, y los procedimientos de la recolección de datos y resultados de refinación (otros datos cristalográficos se adjuntan en el apéndice 1 (A2 y A3)).

(a)



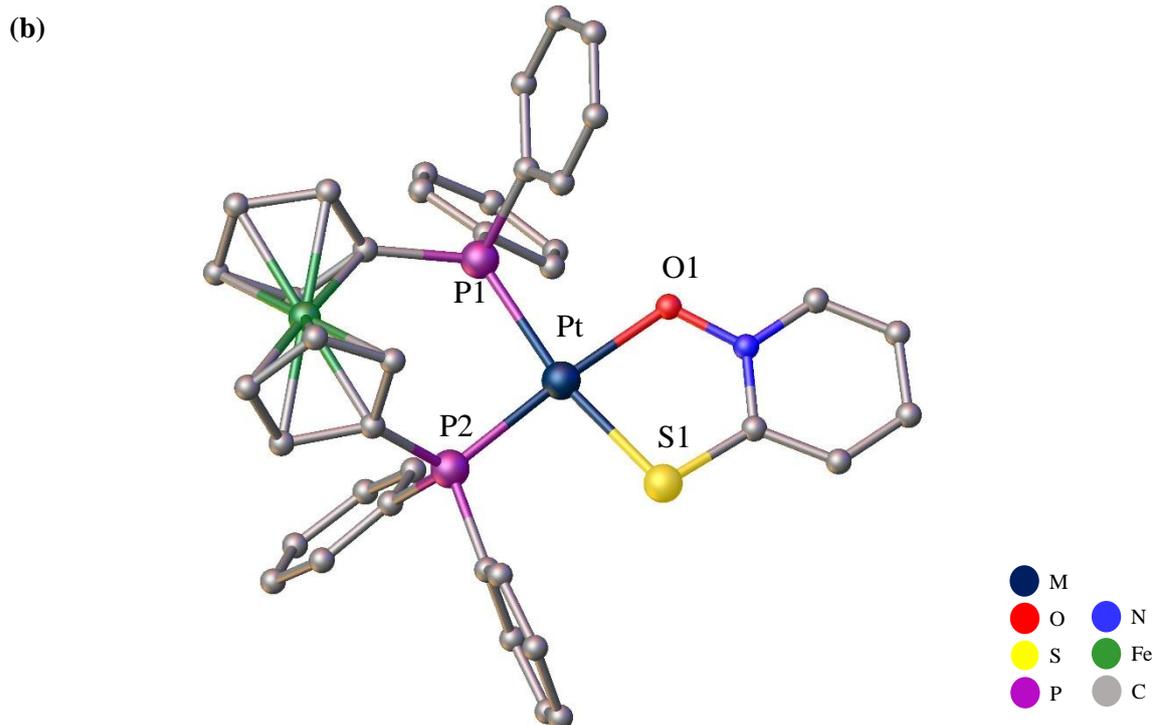


Figura 6.10: Estructura cristalina de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Los átomos de hidrógeno y el contraión hexafluorofosfato no fueron incluidos para una mejor visualización de las estructuras.

Tabla 6.3: Datos del cristal y resultados del refinamiento de la estructura de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

	$[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	$[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$
Fórmula Empírica	$\text{C}_{39} \text{H}_{32} \text{F}_6 \text{Fe} \text{N} \text{O} \text{P}_3 \text{Pd} \text{S}$	$\text{C}_{39} \text{H}_{32} \text{F}_6 \text{Fe} \text{N} \text{O} \text{P}_3 \text{Pt} \text{S}$
Peso Fórmula	931,88	1020,57
Temperatura (K)	295 (2)	295 (2)
Longitud de onda (Å)	$\text{MoK}_\alpha = 0,7107$	$\text{MoK}_\alpha = 0,7107$
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$	$P2_1/c$
Dimensiones Celda Unitaria		
a (Å)	10,345 (2)	10,3631 (5)
b (Å)	22,319 (3)	22,363 (1)
c (Å)	17,307 (3)	17,3974 (9)
β (°)	106,23 (2)	106,240 (6)
Volumen (Å ³)	3836,6 (10)	3871,0 (3)
Z; densidad (calculado, Mg/m ³)	4; 1,613	4; 1,751
Coefficiente de Absorción (mm ⁻¹)	1,089	4,224

F(000)	1872	2000
Forma / color cristal	Aguja/púrpura	Aguja/púrpura
Tamaño del cristal (mm ³)	0,99 x 0,042 x 0,027	0,259 x 0,048 x 0,036
θ-rango (°) para colección de datos	3,00 a 26,00	2,99 a 26,00
Rango de índices de Miller	-12≤h≤12, -26≤k≤27, -21≤l≤21	-12≤h≤12, -27≤k≤17, -21≤l≤21
Reflexiones colectadas	18298	17086
Reflexiones independientes	7532 [R(int) = 0,1320]	7599 [R(int) = 0,0528]
Reflexiones observadas [I>2σ(I)]	3308	5221
Complejidad (%)	99,8 (a θ = 26,00°)	99,8 (a θ = 26,00°)
Corrección de absorción	Semi empírico	Semi empírico
Max. y min. de transmisión	0,9712 y 0,6707	1,000 y 0,851
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²
Datos / restricciones / parámetro	7532 / 0 / 478	7599 / 0 / 478
Calidad del ajuste F ²	0,995	1,018
Índice R final ^a [I>2σ(I)]	R1 = 0,0761, wR2 = 0,1348	R1 = 0,0452, wR2 = 0,0730
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1826, wR2 = 0,1847	R1 = 0,0829, wR2 = 0,0864
^a R _I = Σ F _o - F _c /Σ F _o , wR ₂ = [Σw(F _o ² - F _c ²) ² /Σw(F _o ²) ²] ^{1/2}		

El estudio de difracción de rayos X en monocristal, mostró que los complejos son isomorfos, presentando ambos un sistema cristalino monoclinico y un grupo espacial P2₁/c. El isomorfismo fue atribuido debido a que ambos poseen la misma estructura molecular y la misma distribución de átomos, formando la misma red cristalina.

En ambas estructuras se observó una coordinación bidentada de los dos ligandos, y un entorno geométrico pseudo plano cuadrado en torno al ion metálico central, con una desviación rms de la planaridad menor a 0,054 Å. En la tabla 6.4 se resumen los valores de distancias y ángulos de enlace en torno a M(II).

Tabla 6.4: Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace alrededor de átomo metálico central en los complejos [Pd^{II}(mpo)(dppf)](PF₆) y [Pt^{II}(mpo)(dppf)](PF₆).

[Pd ^{II} (mpo)(dppf)](PF ₆)		[Pt ^{II} (mpo)(dppf)](PF ₆)	
Distancias de enlace			
Pd-O1	2,059(6)	Pt-O1	2,071(4)
Pd-P1	2,335(2)	Pt-P1	2,316(2)
Pd-P2	2,240(3)	Pt-P2	2,239(2)

Pd-S1	2,293(2)	Pt-S1	2,303(2)
Ángulos de enlace			
O1-Pd-P1	174,9(2)	O1-Pt-P1	175,5(1)
O1-Pd-S1	84,4(2)	O1-Pt-S1	84,4(1)
P1-Pd-S1	91,73(9)	P1-Pt-S1	92,42(6)
O1-Pd-P2	87,0(2)	O1-Pt-P2	85,7(1)
P1-Pd-P2	97,03(9)	P1-Pt-P2	97,68(6)
S1-Pd-P2	170,9(1)	S1-Pt-P2	169,51(6)

El ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina coordinó a través del átomo de azufre y el oxígeno del *N*-óxido, tal como se había concluido del estudio de los espectros de infrarrojo. Las distancias y ángulos de enlace entre los átomos donores y el ion metálico central se encuentran dentro de los intervalos de valores reportados en otros complejos con metales de transición que contienen al ligando mpo coordinando de forma bidentada [25,26,33]; sin embargo, las distancias de enlace son inferiores a las observadas en los complejos de lantanoides mencionados en la introducción, que debido a requerimientos estructurales de estos complejos, poseen distancias M-S ~ 2,30 Å y M-O ~ 2,80 Å [27,28]. En comparación a los complejos homolépticos [M^{II}(mpo)₂], las distancias de enlace M-S y M-O se encuentran también dentro de los mismos rangos de valores. En particular, las distancias Pd-S y Pd-O en el compuesto [Pd^{II}(mpo)₂] fueron de 2,242 Å y 2,043 Å, respectivamente [35] y las distancias Pt-S y Pt-O en [Pt^{II}(mpo)₂] fueron de 2,270 Å y 2,007 Å, respectivamente [37].

La coordinación bidentada del ligando 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf) se efectuó a través de ambos átomos de fósforo. Las distancias de enlace M-P1 y M-P2 también se encuentran dentro de los mismos rangos de valores observados en otros complejos que contienen el ligando dppf coordinado de forma bidentada, y no se encontraron grandes variaciones en estas distancias de enlace en comparación al precursor utilizado [M^{II}Cl₂(dppf)]. En particular, en el complejo [Pd^{II}Cl₂(dppf)] se obtuvo Pd-P1 = 2,283 Å y Pd-P2 = 2,301 Å [16], y en [Pt^{II}Cl₂(dppf)] fueron Pt-P1 = 2,252 Å y Pd-P2 = 2,260 Å [17]. El ángulo de torsión del fragmento de ferroceno (ángulo comprendido entre P1-centroide de Cp₁-centroide de Cp₂ -P2) fue cercano a 36° en ambos compuestos, determinando así una conformación del tipo escalonada de los anillos ciclopentadienilo, como se muestra en la figura 6.11. El ligando dppf en su forma libre y los precursores

$[M^{II}Cl_2(dppf)]$ también mostraron este tipo de conformación [16,53], lo que indica que en estado sólido este parámetro permanece invariable al modificar el entorno químico de este fragmento organometálico.

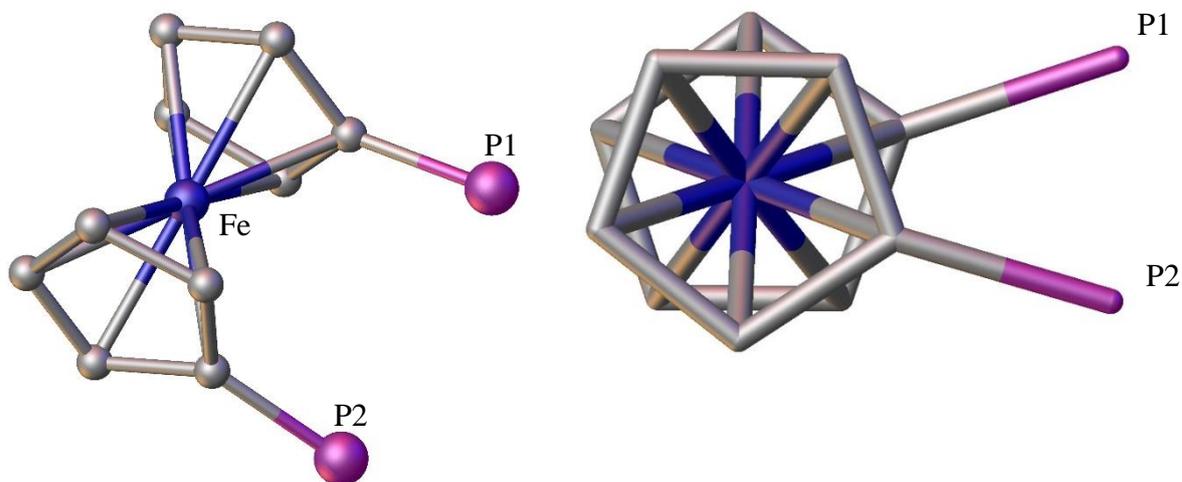
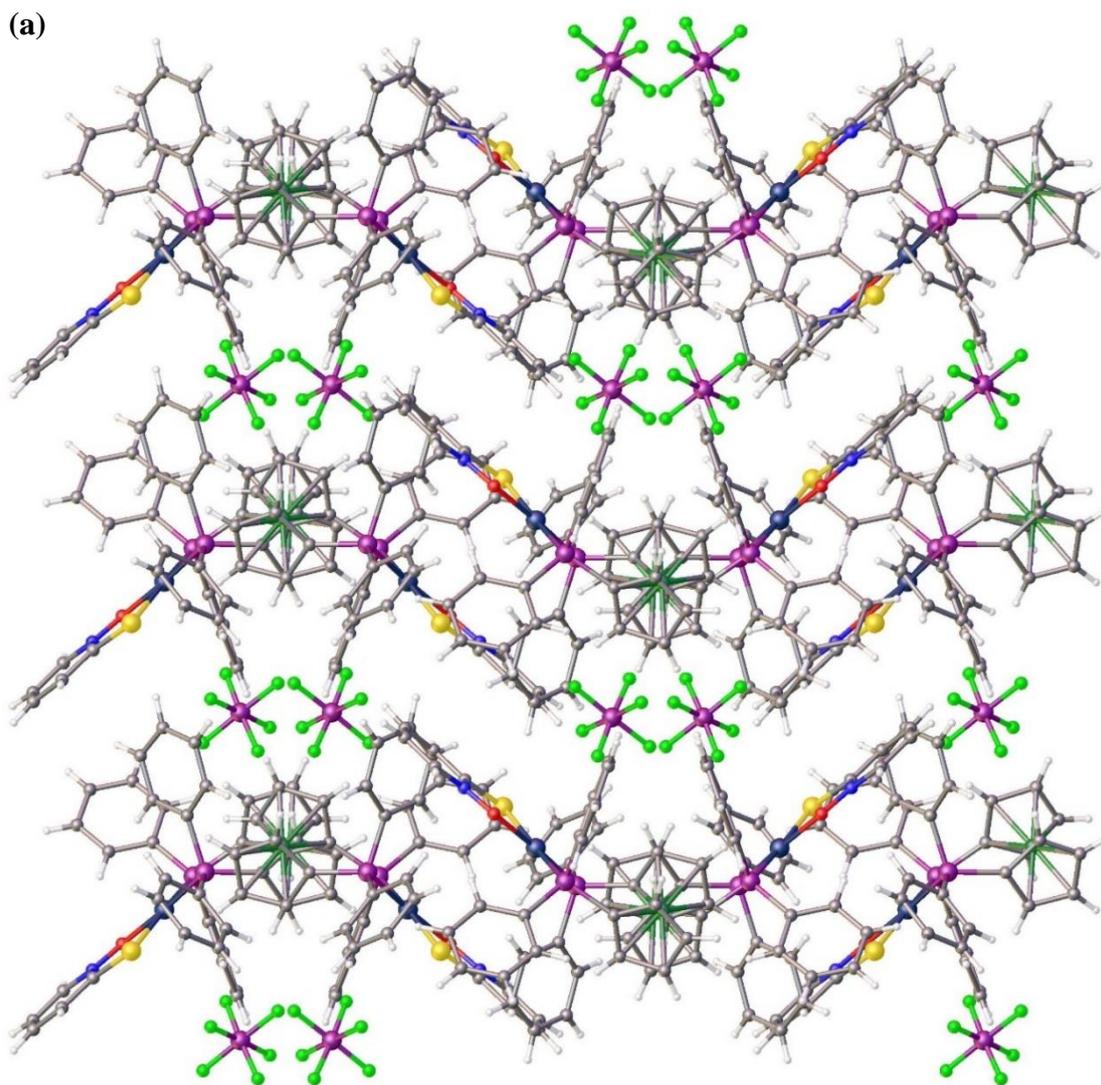


Figura 6.11: Conformación escalonada del ligando dppf en la estructura cristalina de los complejos $[M^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$.

En la figura 6.12a se muestra el empaquetamiento cristalino, en una vista perpendicular al eje *c* cristalográfico, del isomorfo Pd-dppf-mpo. En ella se observa que el complejo catiónico es neutralizado por el contraión hexafluorofosfato (PF_6^-). Además, se puede observar que la estabilización y el empaquetamiento de la estructura en la red se ve favorecido por interacciones intramoleculares e intermoleculares (figura 6.12b). En particular, se observaron interacciones intramoleculares entre el átomo de oxígeno del grupo *N*-óxido y un átomo de hidrógeno del anillo aromático de dppf. Por otro lado, se observaron dos tipos de interacciones intermoleculares efectuadas entre los átomos de hidrógeno del dppf y los átomos de nitrógeno y oxígeno del ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina.



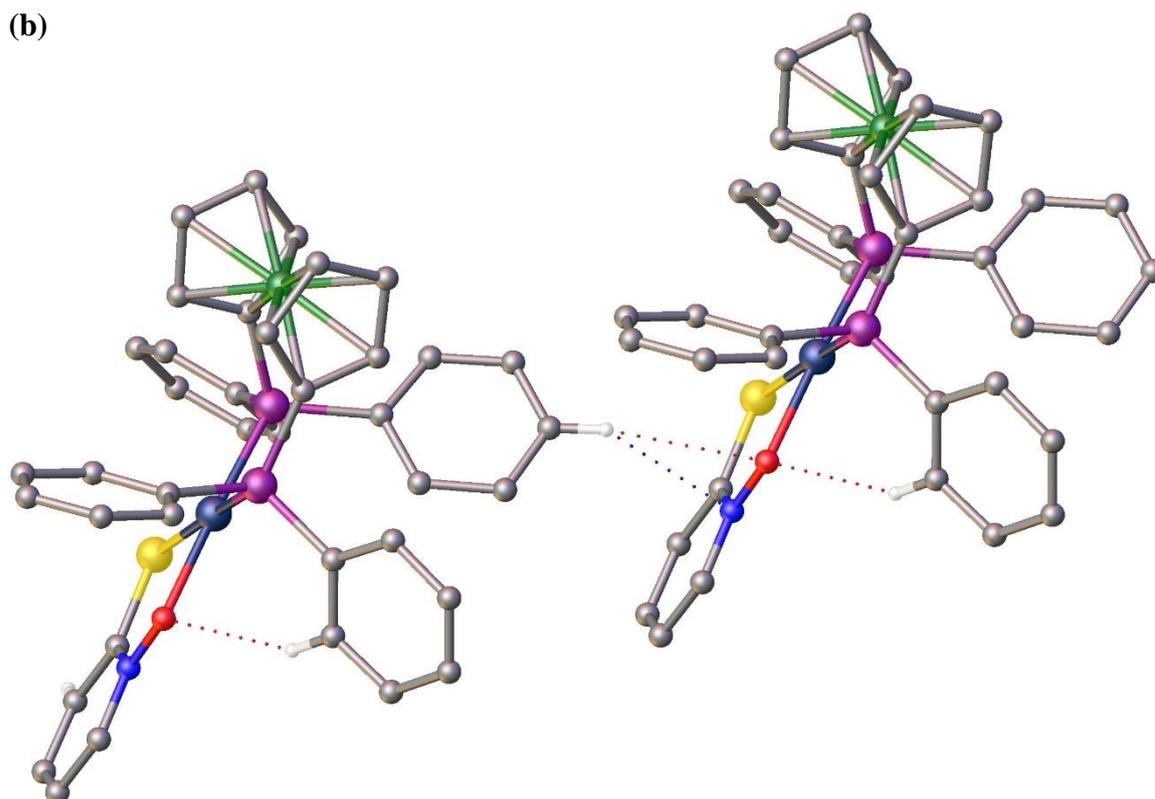


Figura 6.12: (a) Empaquetamiento cristalino del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ en una vista perpendicular al eje c y (b) Interacciones intramoleculares e intermoleculares que estabilizan la red cristalina del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Algunos átomos de hidrógeno no fueron incluidos para una mejor visualización de las estructuras.

6.2.3 Caracterización en solución

6.2.3.1 Conductimetría

La conductividad fue medida en soluciones de concentración 1 mM de complejo en DMSO. Se obtuvo un valor de conductividad molar de $35 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ para el complejo Pd-dppf-mpo y $33 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ para Pt-dppf-mpo. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para electrolitos 1:1 en solución de DMSO (rango entre 23 a $42 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$) [54]. La conductividad fue medida durante cinco días luego de la preparación de la solución, no observándose cambios en estos valores. Esto da cuenta de la estabilidad que estos complejos poseen en solución de DMSO en relación a la posible generación de

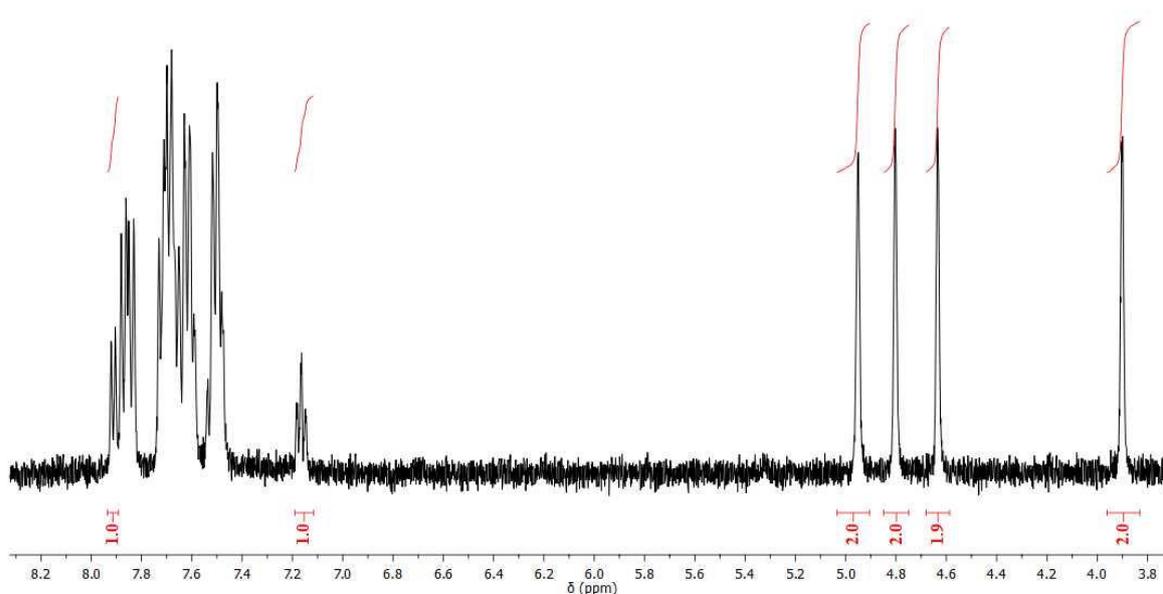
especies con diferente carga por sustitución de mpo por DMSO durante el tiempo de estudio.

6.2.3.2 Resonancia magnética nuclear

Se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensional (^1H , ^{13}C y ^{31}P -RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC) los que permitieron realizar un análisis estructural y conformacional de los complejos en solución. Todos estos experimentos fueron realizados a temperatura ambiente en soluciones de DMSO- d_6 .

En relación a los espectros ^1H -RMN, los dos complejos M-dppf-mpo presentaron un patrón espectral similar, donde las señales observadas corresponden a los protones del ligando mpo y del dppf (figura 6.13). La integración y la multiplicidad de estas señales están en concordancia con la estequiometría obtenida en cada complejo. La tabla 6.5 resume los desplazamientos químicos (δ) en ppm de las señales de dichos espectros de los complejos M-dppf-mpo y de ambos ligandos en su forma libre (dppf y Nampo).

(a)



(b)

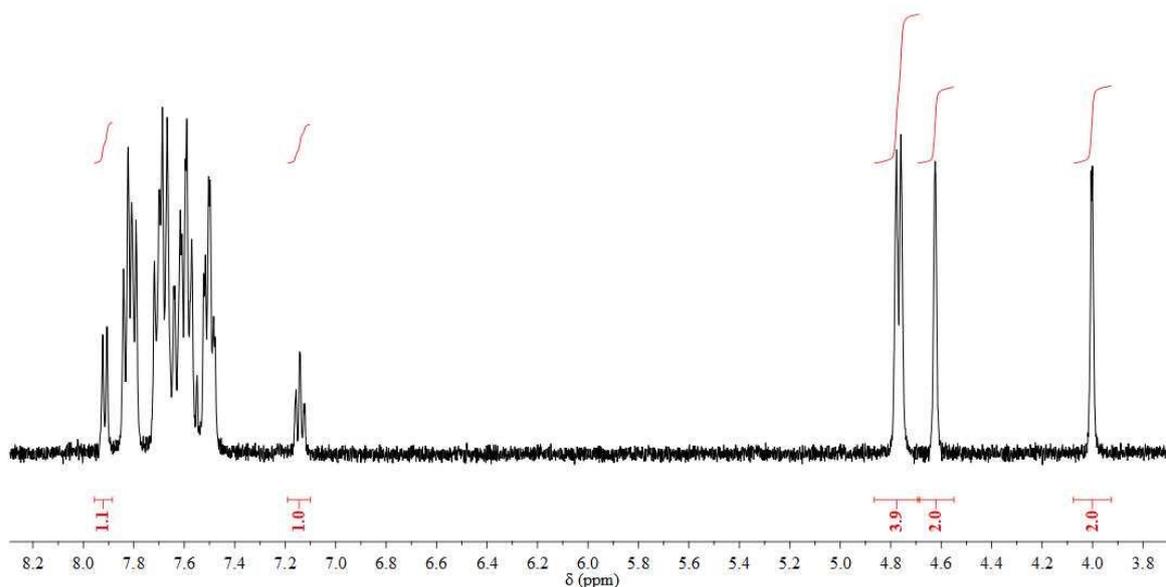


Figura 6.13: Espectro ^1H -RMN de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Tabla 6.5: Valores de desplazamiento químico (δ) en ppm del espectro ^1H -RMN de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de los ligandos mpo (Nampo) y dppf.

Ligando	Protón	δ_{H} (multiplicidad)(integración)				
		Ligando libre	Pd-dppf-mpo	$\Delta\delta^a$	Pt-dppf-mpo	$\Delta\delta^a$
mpo	2	7,32 (d) (1)	7,63 (1) ^(b)	0,31	7,82 ^(b) (1)	0,50
	3	6,74 (t) (1)	7,52 (1) ^(b)	0,78	7,57 ^(b) (1)	0,83
	4	6,55 (t) (1)	7,17 (t)(1)	0,62	7,14 (t) (1)	0,59
	5	7,97 (d) (1)	7,92 (d) (1)	-0,05	7,92 (d) (1)	-0,05
Cp (dppf)	H _a		4,64 (s) (2)	0,70	4,62 (s) (2)	0,68
	H _b	3,94 (s) (4)	4,80 (s) (2)	0,86	4,76 (s) (2)	0,82
	H _c		4,95 (s) (2)	0,68	4,78 (s) (2)	0,51
	H _d	4,27 (s) (4)	3,90 (s) (2)	-0,37	4,00(s) (2)	-0,27
PPh ₂ (dppf)		7,23 (s) (8) 7,34 (s) (12)	7,86 (m) (4) 7,68 (m) (12) 7,50 (m) (4)	-	7,81 (m) (4) 7,67 (m) (12) 7,50 (m) (4)	-

^a : $\Delta\delta = (\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando libre}})$

^b : Solapado con las señales de los protones de PPh₂

Multiplicidad s: singulete, d: doblete, t: triplete, m: multiplete

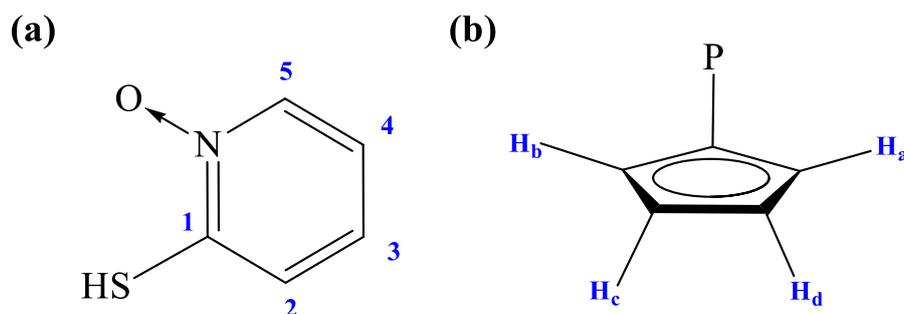


Figura 6.14: Esquema de numeración empleado para (a) Hmpo y (b) dppf

Se asignaron las señales correspondiente a todos los protones del ligando mpo, observándose a nivel general un desplazamiento de las señales hacia menor campo magnético en comparación al ligando libre, debido a un efecto de desapantallamiento como resultado del retiro electrónico causado por la coordinación hacia M(II) [38,39].

Las señales correspondientes a los protones del ligando dppf se observaron en dos zonas espectrales. Hacia valores de alto campo magnético se encuentran cuatro señales de multiplicidad singulete equivalentes cada una a dos protones, correspondiente a H_a, H_b, H_c y H_d de ambos anillos ciclopentadienilo (figura 6.14); entre 7,50-7,86 ppm se encuentran los multipletes equivalentes a los protones de los anillos aromáticos del fragmento difenilfosfino (PPh₂). Para la asignación de estas señales, se efectuó un análisis comparativo con los espectros ¹H-RMN del ligando dppf libre y del respectivo precursor [M^{II}Cl₂(dppf)]. Para el análisis se utilizó lo mencionado en la introducción a este capítulo que hace alusión a la fluxionalidad que posee el ligando dppf en solución al formar complejos de coordinación; es decir, a las diferentes conformaciones que puede adoptar el dppf para adaptarse a los distintos requerimientos geométricos del ión metálico y de los otros ligandos que forman parte del complejo [12].

Como se muestra en la figura 6.15, el espectro ¹H-RMN del ligando dppf en su forma libre posee dos señales de multiplicidad singulete equivalentes a cuatros protones cada una de ellas. Estas señales fueron observadas a 3,94 y 4,27 ppm, y corresponden a los

protones alfa (H_a y H_b) y beta (H_b y H_c), respectivamente, de ambos anillos ciclopentadienilo (la nomenclatura de alfa y beta es con respecto al átomo de carbono C-PPh). Esta asignación es atribuida a que, en solución y a temperatura ambiente, ambos anillos ciclopentadienilo son coplanares, y la libre rotación de éstos genera que promedialmente exista una equivalencia en los protones de ambos anillos como se muestra en la figura 6.16a [12].

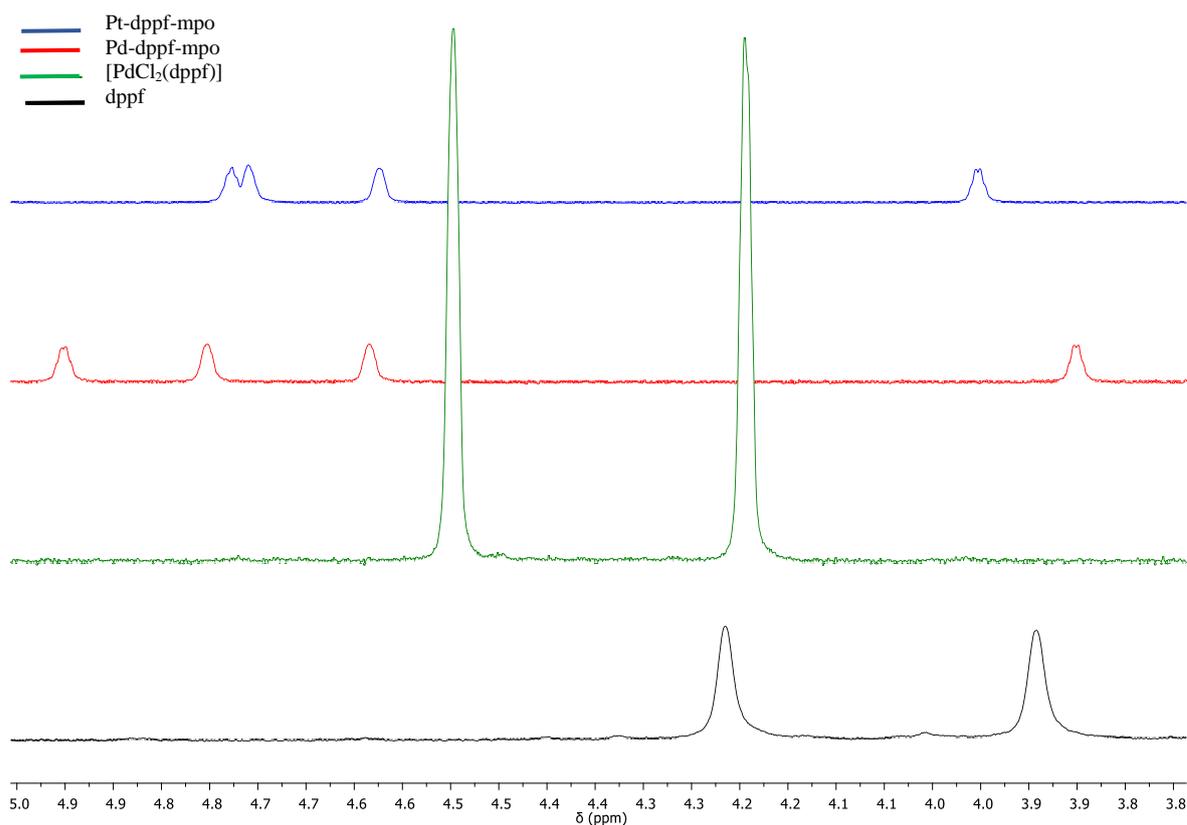


Figura 6.15: Espectros ^1H -RMN entre 3,8 y 5,0 ppm de dppf, $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$, $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

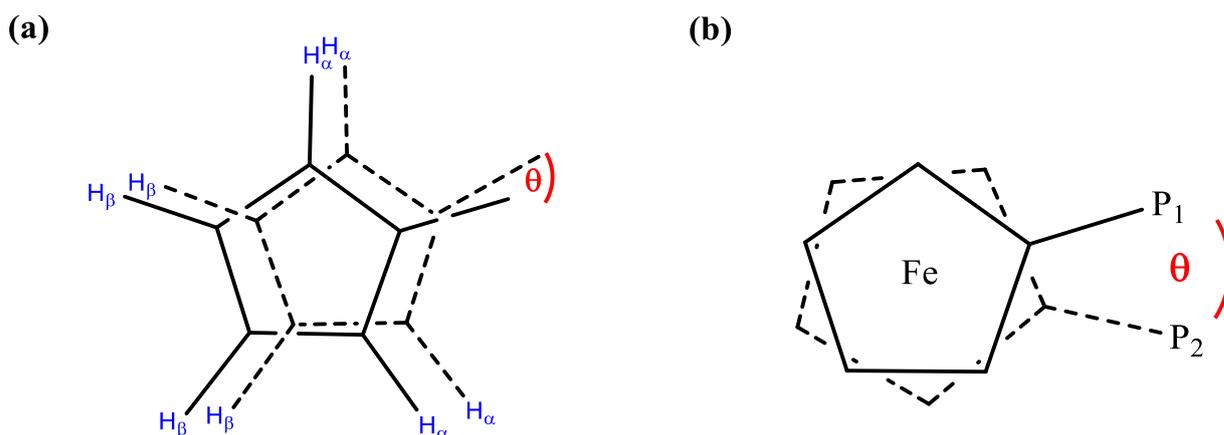


Figura 6.16: Conformación eclipsada y escalonada del ligando dppf.

El mismo análisis se realizó sobre ambos precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$, y se muestra como ejemplo en la figura 6.15 el espectro 1H -RMN del precursor de paladio. El espectro de este compuesto también mostró dos señales de multiplicidad singulete a 4,25 y 4,55 ppm que al igual a lo mencionado anteriormente, corresponden a los cuatro protones alfa y los cuatro protones beta, respectivamente. Este resultado da cuenta que en ambos precursores también existe una equivalencia y coplanaridad de los anillos ciclopentadienilo en la estructura. Sin embargo, la estructura cristalina resuelta para este compuesto mostró que los anillos ciclopentadienilo se encuentran en una conformación escalonada (ángulo $\theta \approx 36^\circ$), como se muestra en el esquema de la figura 6.16b [16]. Para explicar estas diferencias, Housecroft y col. demostraron que el complejo $[Pd^{II}Cl_2(dppf)]$ al estar en solución favorece la libre rotación de los anillos ciclopentadienilo en torno al eje central del hierro, provocando que promedialmente presenten una conformación eclipsada, la cual es dependiente de la temperatura. Esta libre rotación genera que a temperatura ambiente exista una equivalencia entre los protones H_a y H_b , y entre H_c y H_d , generando sólo dos señales en el espectro correspondientes a los protones alfa y beta, similar a lo observado en el ligando libre [55]. Cabe mencionar que el desplazamiento de estas señales hacia menor campo magnético, en comparación al ligando dppf libre, da cuenta de la coordinación al centro metálico $M(II)$.

En relación a los complejos M -dppf-mpo, tal como se mencionó anteriormente, los espectros 1H -RMN mostraron cuatro señales atribuidas a los protones H_a , H_b , H_c y H_d de ambos anillos ciclopentadienilo. Realizando el mismo análisis conformacional del ligando, el estudio mediante difracción de rayos X mostró que los anillos Cp del dppf se

encuentran en una conformación escalonada ($\theta \approx 36^\circ$) igual a lo observado en los precursores. Sin embargo, no se evidenció en los espectros de $^1\text{H-RMN}$ el mismo comportamiento rotacional de los anillos de los precursores. Housecroft y col. realizaron estudios comparativos de estos cambios conformacionales entre el precursor $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ y $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{dppf})(\text{B}_3\text{H}_7)]$ ($\text{B}_3\text{H}_7 =$ ligando derivado del triborano) y señalaron que la presencia de ligandos voluminosos y rígidos, en los sitios de coordinación de $\text{Pd}(\text{II})$ no ocupados por dppf , aumentan la barrera energética para esta rotación [55]. En los complejos M-dppf-mpo la presencia del ligando bidentado y rígido *N*-óxido-2-mercaptopiridina disminuye también la libre rotación de los anillos *Cp*, haciendo que sean diferenciables estos cuatro protones en los espectros $^1\text{H-RMN}$ medidos a temperatura ambiente.

En suma a lo anteriormente señalado, D. Cauzzi y col. demostraron la influencia de la temperatura sobre los cambios conformacionales de los anillos ciclopentadienilo [56]. En estos estudios se demostró que los anillos *Cp* al estar en una conformación escalonada y disminuir la temperatura del experimento de $^1\text{H-RMN}$, es posible identificar los ocho protones inequivalentes del fragmento de ferroceno, reflejado en ocho singuletes en la zona de alto campo magnético del espectro. Los autores señalan que al aumentar la temperatura en el experimento, se produce una equivalencia entre H_a y H_a' , H_b y H_b' , H_c y H_c' , H_d y H_d' (figura 6.17), generando que a temperatura ambiente sean observable sólo cuatro singuletes en el espectro, equivalentes a dos protones cada uno.

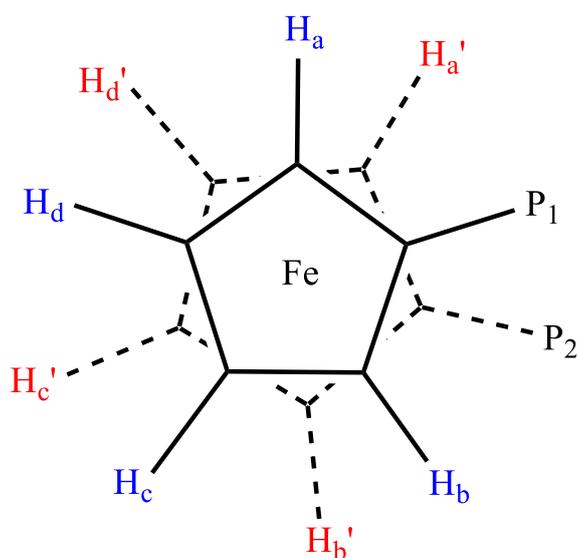
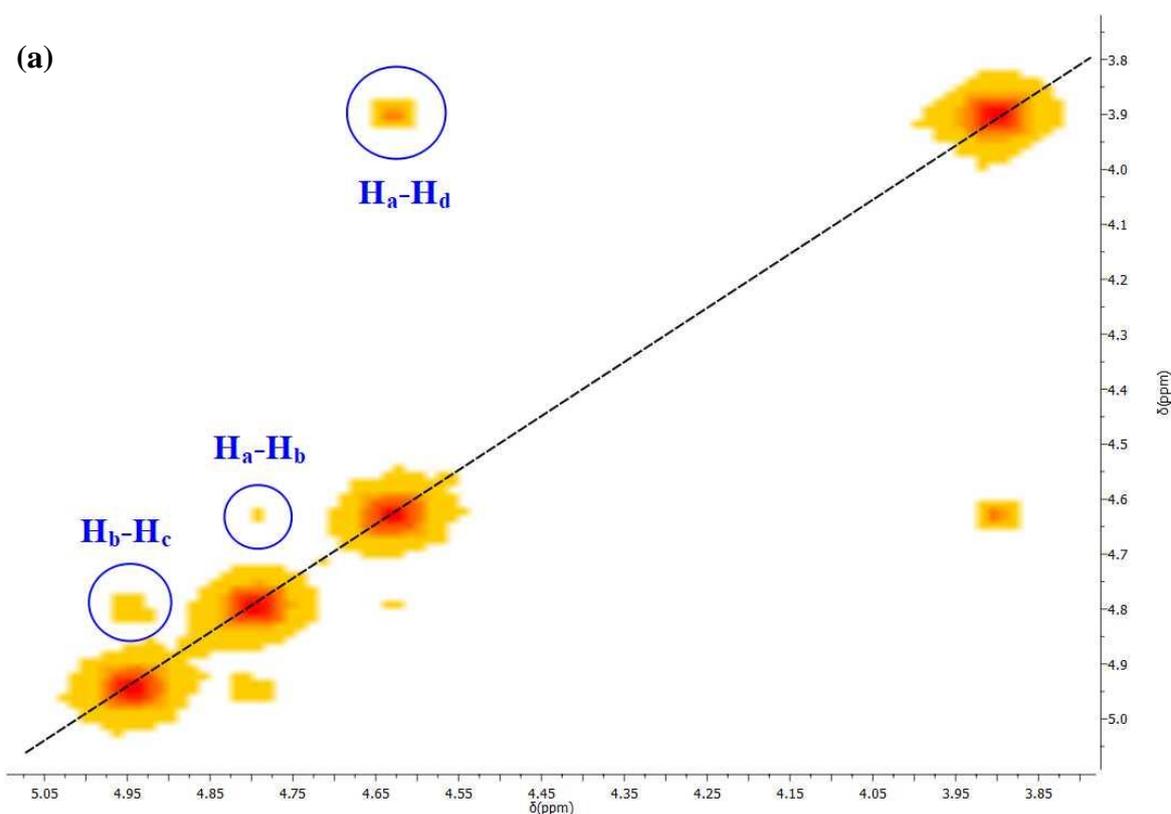


Figura 6.17: Conformación escalonada de los anillos *Cp* del ligando dppf .

Para complementar el análisis realizado, con respecto a la conformación en solución del ligando dppf en los complejos M-dppf-mpo, se realizaron experimentos ^1H - ^1H COSY. En el espectro del complejo de paladio (figura 6.18a) se observaron los acoplamientos que confirman el patrón de correlación $\text{H}_a \rightarrow \text{H}_b \rightarrow \text{H}_c \rightarrow \text{H}_d$ que son concordantes con esta rotación de los anillos Cp , y que a su vez también está de acuerdo con la coordinación bidentada del ligando dppf [55]. El espectro ^1H - ^1H COSY del complejo Pt-dppf-mpo, si bien no mostró el acoplamiento entre H_a y H_b debido a la cercanía que existe entre estas señales (donde el acoplamiento entre ambas se encuentra en la diagonal del espectro), los análisis evidenciaron el mismo comportamiento en solución que el compuesto Pd-dppf-mpo.



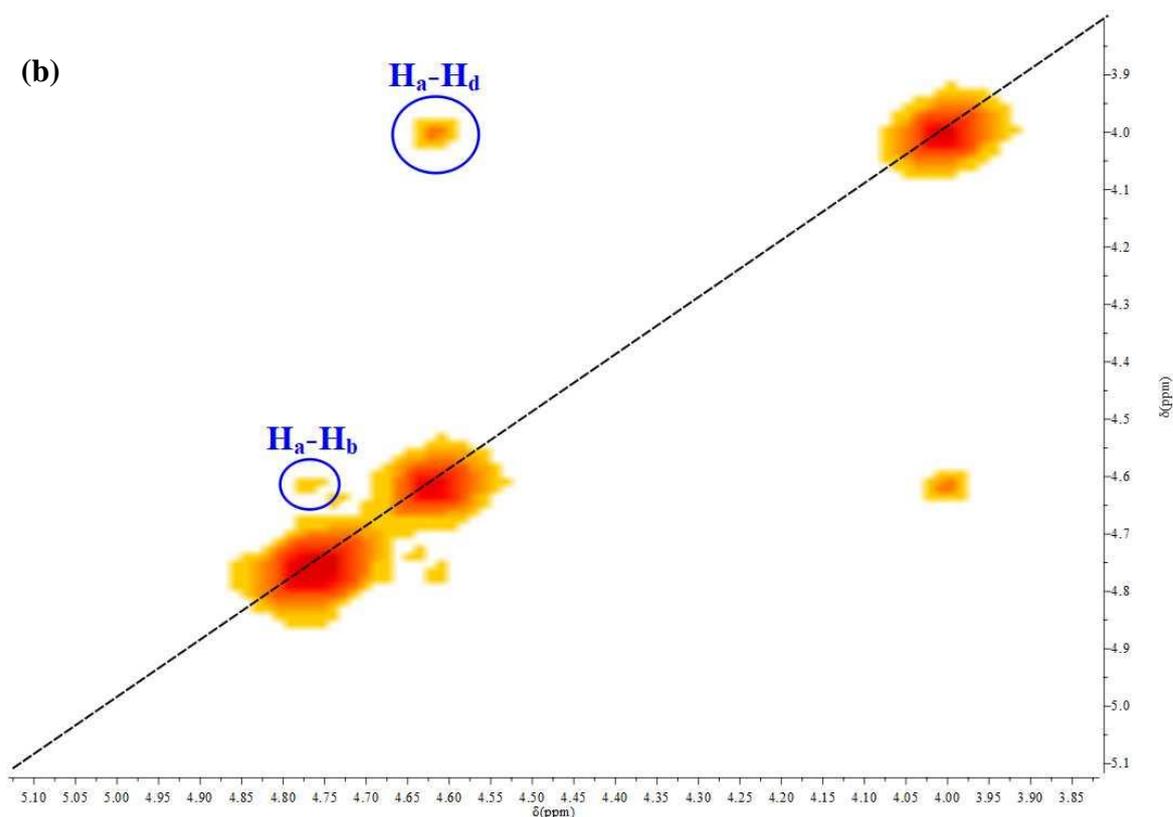


Figura 6.18 Espectros ^1H - ^1H COSY de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Continuando con el análisis del espectro ^1H -RMN del ligando dppf, pero en relación al fragmento difenilfosfino, se observó en ambos complejos tres tripletes ensanchados equivalentes a 20 protones en total. En comparación al ligando dppf libre, estas señales se desplazaron también hacia menor campo magnético y presentaron cambios en la multiplicidad posterior a la coordinación al centro metálico.

Los espectros ^1H -RMN de los complejos M-dppf-mpo fueron medidos luego de 24 horas de la preparación de la solución, no observándose cambios en ellos (no se observaron corrimientos ni cambios en la multiplicidad de las señales, como tampoco aparición de nuevas señales en el espectro). Este comportamiento da cuenta de la estabilidad que presentan los complejos en solución de DMSO durante el tiempo de estudio.

La asignación de las señales de los átomos de carbono se realizó mediante experimentos bidimensionales de ^1H - ^{13}C HSQC y la asignación previa de los espectros ^1H -RMN permitió determinar las señales correspondientes a cada átomo de carbono enlazado al respectivo protón. Para la identificación del átomo C1 del ligando mpo, se realizaron experimentos de acoplamiento ^1H - ^{13}C HMBC, mediante el acoplamiento a más de un

enlace de los protones previamente asignados. Se observó en esta señal un desplazamiento hacia menores ppm como consecuencia de la coordinación a M(II), de forma similar a la observada en los complejos $[M(\text{mpo})_2]$ [38]. La tabla 6.6 resume los valores de desplazamiento químico (δ) de las señales correspondientes a los átomos de carbono de los complejos M-dppf-mpo.

Tabla 6.6: Valores de desplazamiento químico (δ) en ppm de los átomos de carbono de los complejos $[M^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y el ligando Hmpo, obtenidos de los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC. La numeración se indica en la figura 6.14.

Ligando	Carbono	δ_{C} (ppm)				
		Ligando libre	Pd-dppf-mpo	$\Delta\delta^a$	Pt-dppf-mpo	$\Delta\delta^a$
Hmpo	1	167,91	154,9	-13,01	151,8	-16,11
	2	132,32	127,5	-4,82	128,2	-4,12
	3	124,02	132,1	8,08	132,1	8,08
	4	114,66	120,1	5,44	120,7	6,04
	5	139,04	138,1	-0,94	139,1	0,06
dppf	C_a	-	74,86	-	75,16	-
	C_b	-	75,86	-	75,36	-
	C_c	-	77,93	-	76,90	-
	C_d	-	75,92	-	75,88	-

Se realizaron experimentos de ^{31}P -RMN para ambos complejos. La figura 6.19a muestra el espectro del complejo Pt-dppf-mpo. En estos espectros se observaron dos dobletes, a 29,3 y 37,2 ppm en el complejo de Pd(II) y a 9,98 y 21,6 ppm en el de Pt(II) (con respecto al patrón estándar externo H_3PO_4 al 10%), correspondientes a los dos átomos de fósforo del fragmento difenilfosfino del ligando dppf. Estas dos señales son indicativas de la inequivalencia producida entre estos átomos al formar parte del complejo M-dppf-mpo. En el espectro del complejo de platino, junto a cada doblete se observaron dos pequeñas señales (denominados satélites) que corresponden a los acoplamientos $\{\text{Pt-P}\}$ cuyas constantes de acoplamiento ($J_{\text{Pt-P}} J_1 = 1605 \text{ Hz}$ y $J_2 = 18040 \text{ Hz}$) son indicativas de una coordinación *cis*-bidentada hacia Pt(II) [57,58] (figura 6.19b). En ambos espectros se observó también, cercano a los -140 ppm, un septuplete correspondiente al átomo de fósforo del contraión PF_6^- .

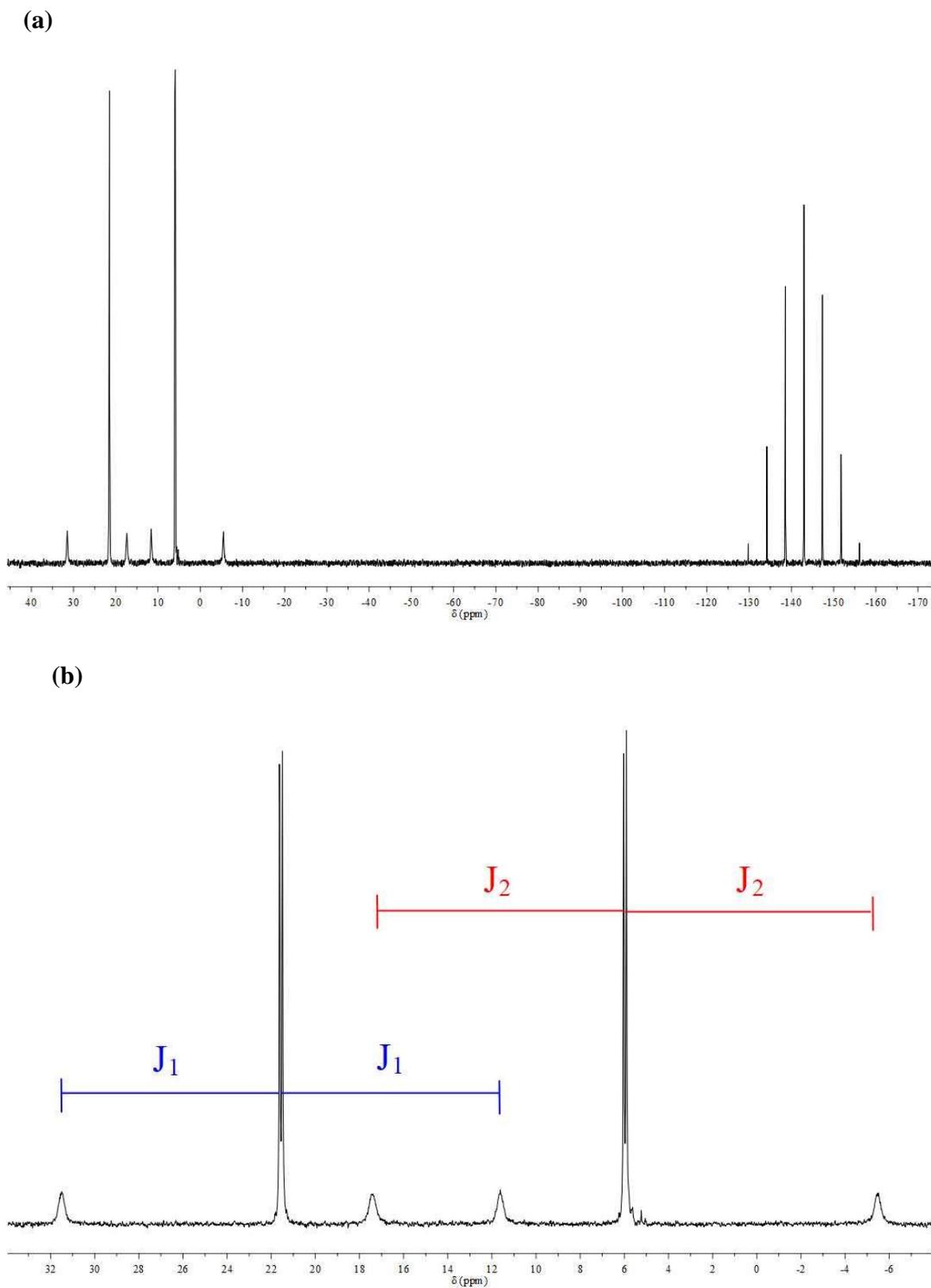


Figura 6.19: (a) Espectro ^{31}P -RMN del complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) Señales de acoplamiento {Pt-P}.

6.2.3.3

Estudio electroquímico

El comportamiento electroquímico de los complejos M-dppf-mpo fue investigado por medidas de voltametría cíclica. Ambos compuestos resultaron ser especies electroactivas en las condiciones empleadas. Como se mencionó en el capítulo 3, las medidas fueron realizadas sobre una solución de concentración 1 mM de cada compuesto en acetonitrilo, utilizando un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo. En la figura 6.20 se muestran los voltamogramas cíclicos medidos para los dos complejos en un rango de potencial entre -2,0 y 1,5 V (referidos al electrodo Ag/AgCl), a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s.

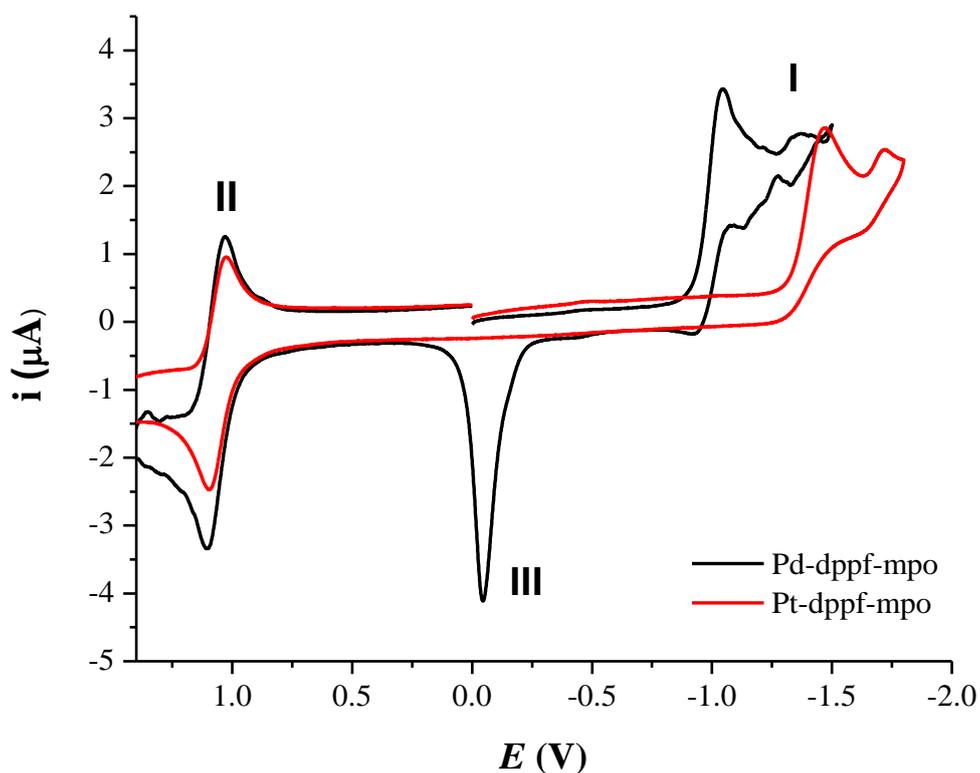


Figura 6.20: Voltamograma cíclico comparativo de los complejos $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Ambos complejos poseen un comportamiento electroquímico similar. Los valores de potencial de los procesos electroquímicos identificados en los voltamogramas se resumen en la tabla 6.7.

Tabla 6.7: Potenciales electroquímicos medidos por voltametría cíclica de los complejos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Los valores de potencial están referidos al electrodo de Ag/AgCl.

Compuesto	Proceso I	Proceso II		Proceso III
	E_{pc} (V)	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)
$[\text{Pd}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	-1,04	1,03	1,11	0,05
$[\text{Pt}^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$	-1,47	1,02	1,10	-

En el barrido hacia potenciales positivos se observó, en ambos voltamogramas, un proceso de oxidación reversible (proceso II) correspondiente a la oxidación del par redox Fe(II)/Fe(III) del fragmento de ferroceno del ligando dppf [18,59,60]. En ambos sistemas la diferencia entre el potencial del pico catódico y anódico (ΔE_p) fue cercana a $0,059/n$ voltios (n = número de electrones transferidos en el proceso redox), lo que según la ecuación de Nerst es indicativo de un mecanismo reversible de transferencia de un electrón [61–64]. Para confirmar la reversibilidad del proceso de oxidación del ligando dppf en los complejos M-dppf-mpo, se evaluó esta cupla redox a diferentes velocidades de barrido (entre 50 y 500 mV/s) en un rango restringido de potencial (figura 6.21).

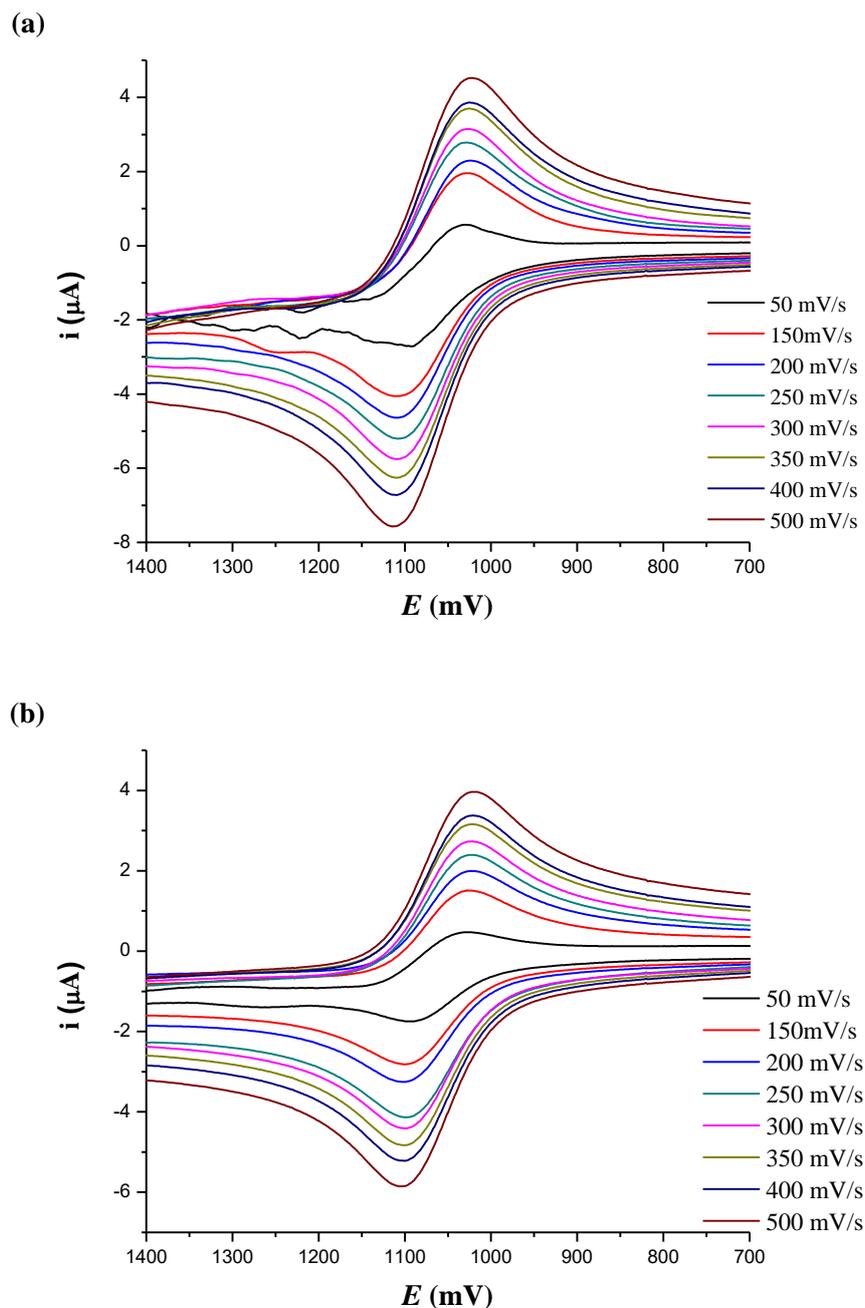


Figura 6.21: Voltamograma cíclico a diferentes velocidades de barrido en un rango de potencial entre 1400-700 mV del compuesto (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

En ambos casos no se observaron variaciones en los valores de potencial (E_{pa} y E_{pc}) al modificar la velocidad de barrido. Además, para a cada velocidad de barrido estudiada la relación de $i_p/v^{1/2}$ permaneció invariante y la relación $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}$ fue cercana a uno en todos los casos. Se observó una relación lineal entre i_p y $v^{1/2}$ (figura 6.22), lo que señala también la

reversibilidad del proceso según lo indicado en la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 6.1) [64]

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2} \quad \text{Ec. 6.1}$$

i_p = Corriente del pico a cada velocidad de barrido (A)

n = Número de electrones transferidos

A = Área del electrodo (cm^2)

D = Coeficiente de difusión (cm^2/s)

C = Concentración (mol/cm^3)

v = Velocidad de barrido (mV/s)

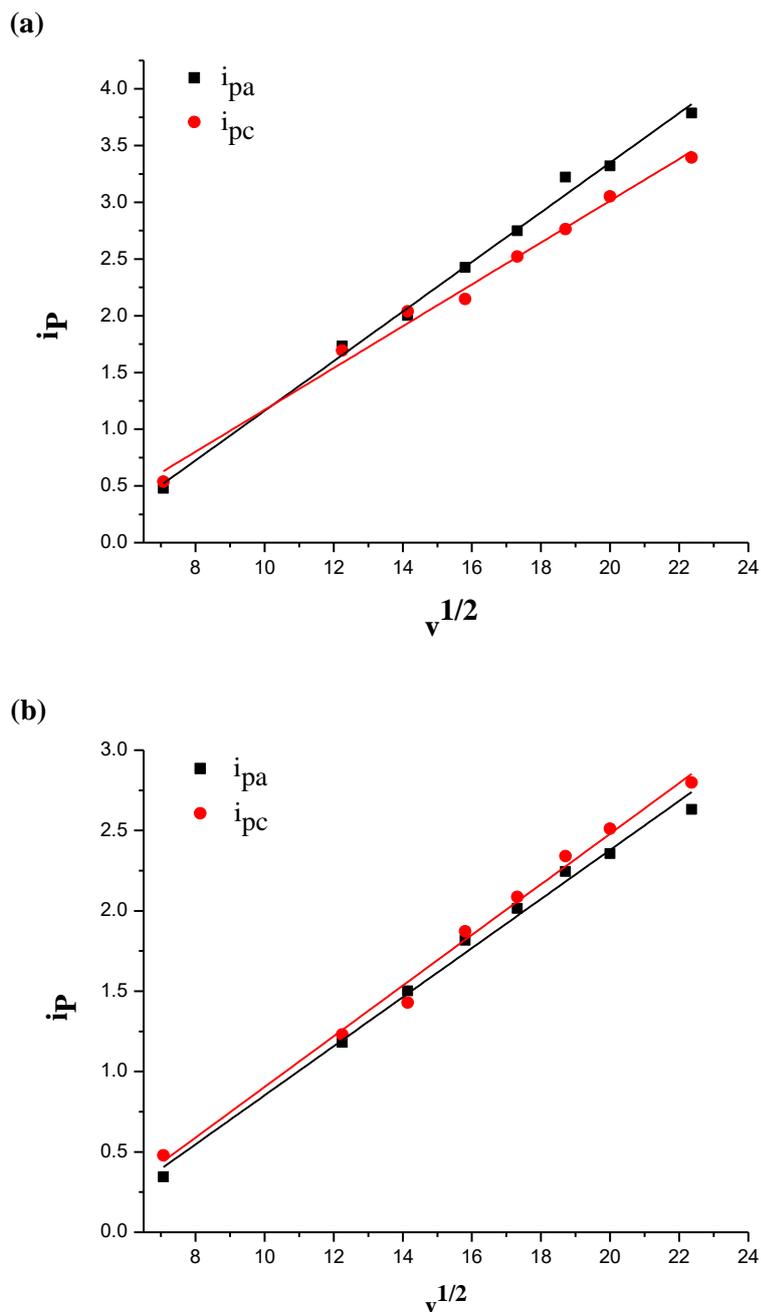


Figura 6.22: Gráfica representativa de la ecuación de Randles-Sevcik para el complejo (a) $[Pd^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$ y (b) $[Pt^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$. Los valores de n , A , D y C en la ecuación son constantes en ambos sistemas.

En el barrido hacia potenciales negativos se observó un proceso de reducción irreversible asociado al ion metálico central $M(II)$ (proceso I), observado a $-1,04$ V en el complejo de paladio y $-1,45$ V en el complejo de platino (referido al electrodo $Ag/AgCl$). En el complejo $Pt-dppf-mpo$ se observó que la intensidad del pico catódico de este proceso fue aproximadamente dos veces superior a la intensidad de corriente del proceso de oxidación

Fe(II)/Fe(III) del ligando dppf, lo que indicaría que la reducción irreversible del centro metálico involucra el doble número de electrones que el proceso II. Sin embargo, el complejo Pd-dppf-mpo mostró la misma relación de intensidad entre estas dos señales, lo que indica que en ambos procesos redox se transfiere la misma cantidad de electrones ($n = 1$). El comportamiento observado es similar a lo reportado en los complejos $[M^{II}(mpo)_2]$ donde también fue identificada la cupla de reducción irreversible para ambos centros metálicos. En base a los estudios electroquímicos sobre ambos complejos homolépticos se propuso que la reducción irreversible del centro metálico en cada complejo correspondería a Pt(II)/Pt(0) y Pd(II)/Pd(I) [38], concordante con lo planteado para los complejos organometálicos estudiados en este trabajo de tesis. Además, Chen y col. sintetizaron y caracterizaron electroquímicamente complejos de Ni(II), Mn(II), Co(III) y Fe(III) que contienen al ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina, y confirmaron que el ligando mpo genera un efecto sobre el potencial redox de estos iones metálicos debido a la alta polarización del enlace *N*-óxido [65]. El potencial de reducción de este proceso fue más negativo en el complejo de platino que en el de paladio, lo que a su vez es similar al comportamiento de los complejos $[M^{II}(mpo)_2]$ [38].

El voltamograma del complejo Pd-dppf-mpo mostró una señal cercana a los 0,0 V que podría atribuirse a un proceso de adsorción irreversible sobre la superficie del electrodo de alguna especie electroactiva generada en el barrido de potencial. Este fenómeno ha sido también observado en otros compuestos de Pd(II) [66].

6.2.4 Actividad biológica

6.2.4.1 Actividad antiparasitaria

Se evaluó *in vitro* la actividad de los complejos M-dppf-mpo sobre la forma epimastigota del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c). Se incluyó en los ensayos el ligando bioactivo en su forma libre (en la forma de sal sódica, Nampo). En la tabla 6.8 se muestran los valores de concentración inhibitoria 50 % (IC₅₀) obtenidos a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta.

Tabla 6.8: Actividad *in vitro* de los complejos $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ contra *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa Dm28c), citotoxicidad en células Vero epiteliales (ATCC CCL81) y valores de índice de selectividad calculado (IS)

Compuesto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ / μM	Células Vero epiteliales IC ₅₀ / μM	IS ^a
Pd-dppf-mpo	0,64 \pm 0,03	24 \pm 12	39
Pt-dppf-mpo	0,28 \pm 0,01	5 \pm 3	18
^a : IS = IC ₅₀ células Vero/IC ₅₀ <i>T. cruzi</i>			

Los dos compuestos resultaron ser activos contra *T. cruzi*, con valores de IC₅₀ en el rango submicromolar, observándose una actividad tres veces superior para el compuesto de Pt(II). En ambos casos se observó un aumento de la actividad antichagásica en comparación al ligando bioactivo Nampo (IC₅₀ = 1,33 \pm 0,08 μM), obteniéndose un aumento de dos a cinco veces en el complejo de paladio y de platino, respectivamente. El fármaco de referencia, Nifurtimox, medido previamente bajo las mismas condiciones experimentales, mostró un valor de IC₅₀ = 6,0 μM [67]. Comparando este valor con los resultados obtenidos para ambos complejos, se observa una actividad contra *T. cruzi* 10 veces superior para el complejo de Pd(II) y 15 veces para el complejo de Pt(II).

6.2.4.2 Citotoxicidad inespecífica

Con el fin de obtener la mayor información sobre la potencialidad farmacológica contra *T. cruzi* de los complejos organometálicos M-dppf-mpo, se evaluó la citotoxicidad inespecífica *in vitro* sobre células epiteliales VERO (ATCC CCL81) utilizadas como células mamíferas modelo. Los valores de IC₅₀ obtenidos de estos estudios se muestran en la tabla 6.8, donde se incluyen los valores de índice de selectividad (IS) calculados a partir de los IC₅₀ obtenidos en ambos experimentos *in vitro*.

El parámetro IS corresponde a la razón entre el IC₅₀ obtenido en los estudios de citotoxicidad en células mamíferas modelo y el IC₅₀ de los estudios de actividad antiparasitaria [68]. Como resultado de estos estudios, se observó que ambos complejos poseen muy buenos índices de selectividad hacia el parásito, siendo más selectivo el complejo Pd-dppf-mpo.

La evaluación *in vitro* sobre epimastigotas de *T. cruzi* de los compuestos homolépticos $[M^{II}(\text{mpo})_2]$, mostró una muy buena actividad antiparasitaria ($IC_{50} [\text{Pd}(\text{mpo})_2] = 0,067 \mu\text{M}$ e $IC_{50} [\text{Pt}(\text{mpo})_2] = 0,200 \mu\text{M}$, cepa Tulahuen 2) [38]. Sin embargo, se observó un incremento considerable de la selectividad hacia los parásitos al incluir el fragmento organometálico dppf ($IS [\text{Pd}(\text{mpo})_2]: 4,9$ e $IS [\text{Pt}(\text{mpo})_2]: >10$).

Estos resultados demuestran que, en todos los casos (complejos homolépticos y heterolépticos-organometálicos), la coordinación del ligando bioactivo *N*-óxido de 2-mercaptopiridina al ión metálico M(II) incrementa la actividad contra *T. cruzi*. Pero además, se puede concluir que, la inclusión del fragmento organometálico dppf provoca una disminución de la toxicidad inespecífica de los compuestos, favoreciendo la selectividad hacia los parásitos.

6.2.5 Mecanismo de acción

6.2.5.1 Inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*

Como se explicó detalladamente en el capítulo 2, el compuesto *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) afecta todas las etapas del ciclo biológico de *T. cruzi*, siendo su principal blanco de acción la enzima *TcFR* [69]. Este antecedente, junto a los trabajos previamente realizados por el grupo con compuestos de coordinación clásicos con mpo como ligando [38,39], motivan el estudio de la influencia que tendría la inclusión del fragmento organometálico $\{M(\text{dppf})\}$ sobre la inhibición de esta enzima.

En el primero de los experimentos realizados, se estudió el efecto de los complejos sobre la actividad de la NADH-fumarato reductasa a una dosis fija de $28 \mu\text{M}$. Bajo las condiciones ensayadas, donde se trataron extractos proteicos crudos de epimastigotas de *T. cruzi* con el ligando Nampo y con los complejos M-dppf-mpo, se observó un incremento del efecto inhibitorio de la actividad enzimática *TcFR* en los complejos con respecto al ligando libre (figura 6.23). Para el complejo de Pt(II), el efecto inhibitorio observado fue mayor lo que podría relacionarse con la mayor actividad observada en los estudios *in vitro* contra epimastigotas de *T. cruzi*.

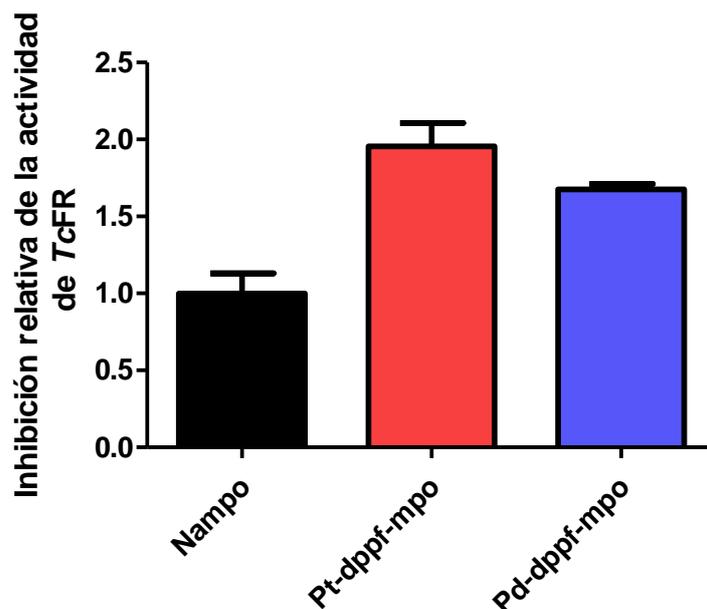


Figura 6.23: Efecto inhibitorio de los complejos M-dppf-mpo y de Nampo sobre la actividad de la enzima *TcFR* de *T. cruzi*. Los extractos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* fueron incubados en ausencia (control) y presencia de una dosis de 28 μM de Nampo, $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. La inhibición enzimática total producida por Nampo (barra negra) fue utilizada para calcular la variación relativa de la inhibición producida por cada complejo (se tomó como 1). Las desviaciones estándar (DS) para cada compuesto corresponden a dos estudios independientes.

Con el fin de caracterizar en mayor detalle la inhibición enzimática observada para ambos complejos, se estudió la dependencia del efecto inhibitorio con la concentración de complejo. Se muestra como ejemplo en la figura 6.24 el efecto del complejo Pt-dppf-mpo, donde ambos mostraron un efecto inhibitorio de la actividad dosis-dependiente.

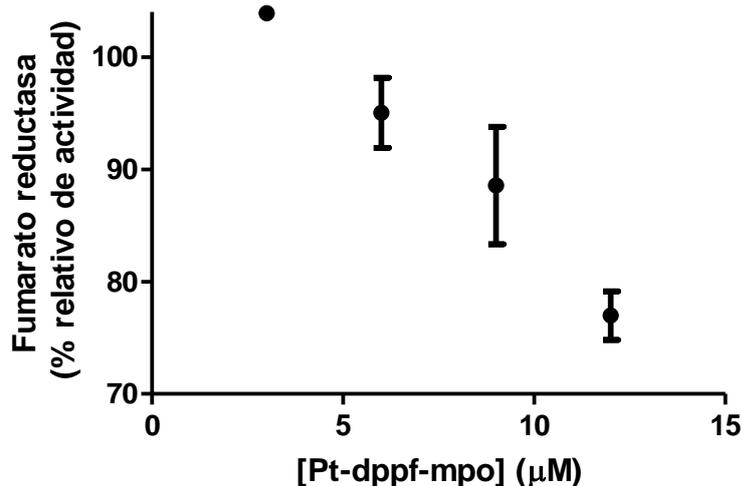


Figura 6.24: Efecto inhibitorio de $[Pt^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$ sobre la actividad de *TcFR* de epimastigotas de *T. cruzi*. Los extractos proteicos fueron incubados con diferentes concentraciones de complejo (3, 6, 9, 12 μM) durante 1 hora a 28 °C. Se muestra el promedio de dos réplicas con sus respectivas DS.

Con el propósito de demostrar que la actividad anti-*T. cruzi* observada para los complejos es causada principalmente por su efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima *TcFR*, se realizó una suplementación del medio de cultivo con succinato (el producto de la reacción catalizada por la enzima) [69]. Se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* durante 5 días en presencia o ausencia (control) de succinato (5 mM), utilizando concentraciones de cada complejo similares al IC_{50} obtenido en los estudios *in vitro* ($Pd-dppf-mpo = 0,6 \mu M$ y $Pt-dppf-mpo = 0,3 \mu M$). Los resultados de los estudios del efecto protector del succinato contra la inhibición del crecimiento de los parásitos se muestran en la gráfica de la figura 6.25.

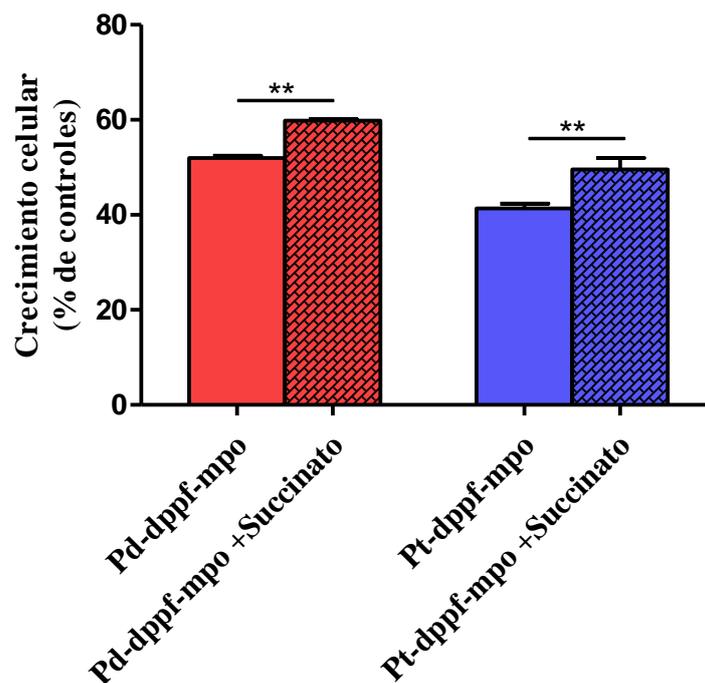


Figura 6.25: Efecto protector del succinato contra la inhibición del crecimiento del parásito causado por $[Pd^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$ y $[Pt^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$. El porcentaje de crecimiento celular se comparó en ambas condiciones: en presencia de succinato (bloque punteado) o en ausencia de succinato (bloque sin punteado). Se muestra el promedio de tres réplicas y la respectiva DS. ** indica valores de $P < 0,01$ t-test.

En los parásitos suplementados con succinato se observó una disminución de la inhibición del crecimiento producida por cada complejo metálico. Si bien no se puede descartar que ambos complejos M-dppf-mpo pudieran estar afectando a otros procesos biológicos contribuyendo al bloqueo del crecimiento de *T. cruzi*, claramente tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima NADH-fumarato reductasa.

Para complementar los resultados obtenidos, se realizaron estudios de anclaje molecular (*docking*) para analizar computacionalmente la interacción entre los complejos y la enzima fumarato reductasa [70,71]. Si bien no es el enfoque de este trabajo de tesis realizar un análisis detallado de los cálculos teóricos, se muestran algunos de los resultados obtenidos que sirven como complemento a los resultados experimentales obtenidos sobre *TcFR*. Los estudios fueron realizados por las Dras. Alicia Merlino y Laura Coitiño del Laboratorio de Química Teórica y Computacional de la Universidad de la República, Uruguay.

En estudios computacionales previamente desarrollados se había optimizado y validado la estructura de la proteína *TcFR* y se había realizado el anclaje molecular con los complejos $[M^{II}(\text{mpo})_2]$ [72]. Utilizando estos resultados, se realizaron estudios de *docking* molecular de esta enzima con los complejos M-dppf-mpo, cuyos resultados se muestran en la figura 6.26.

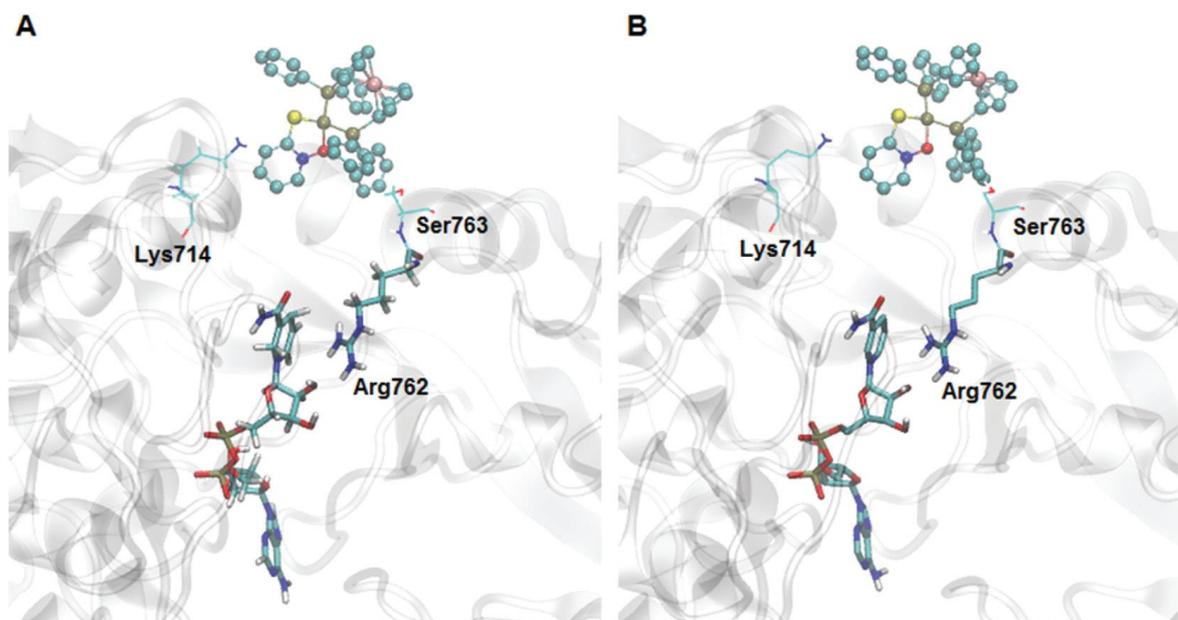


Figura 6.26: Modo predicho de unión a la enzima *TcFR* de (a) $[Pd^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](PF_6)$ y (b) $[Pt^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})](PF_6)$. El cofactor (NADH) y el residuo Arg762 catalítico son mostrados en la representación como barras, los complejos como bolas y palos, y los otros residuos en contacto con el complejo se muestran como líneas.

Se observó que ambas especies $[M^{II}(\text{mpo})(\text{dppf})]^+$ se unen en la cavidad de la enzima (entre los dominios 2 y 3) cerca del sitio de unión del cofactor NADH, posicionándose junto a los residuos Ser763 y Lys714. El aminoácido Ser763 es adyacente al residuo catalítico Arg762 (aminoácido que interacciona directamente con el cofactor NADH) por lo que la unión de los complejos a Ser763 podría afectar de alguna forma al posicionamiento adecuado de este residuo catalítico [72].

Por lo tanto, los estudios realizados apoyan la hipótesis de introducir el fragmento organometálico $\{M(\text{dppf})\}$ en los complejos para modular las propiedades biológicas de estas especies y mejorar no solo su eficiencia antiparasitaria, sino también su capacidad

de inhibición de la enzima *TcFR*, convirtiéndolos así en prometedores líderes para el diseño de nuevos inhibidores selectivos contra *T. cruzi*.

6.2.5.2 Producción de especies radicalarias en *Trypanosoma cruzi*

Según antecedentes bibliográficos, la inclusión del ferroceno y derivados de él en compuestos con potenciales aplicaciones farmacológicas puede generar numerosas ventajas a nivel de su actividad biológica y del mecanismo por el cual actúan [12]. En relación a esto último, numerosos estudios han planteado la hipótesis de la participación del ferroceno en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) debido a la fácil oxidación del centro metálico Fe(II) [62,73,74]. Los parásitos tripanosomátidos son particularmente susceptibles a los radicales libres y estas especies podrían ser parcialmente responsables del efecto contra *T. cruzi*.

En base a estos antecedentes, y sumado a la oxidación reversible Fe(II)/Fe(III) caracterizada en los estudios de voltametría cíclica de los complejos M-dppf-mpo, se estudió mediante resonancia electrónica paramagnética (EPR) la posible generación de especies radicalarias de los complejos en *T. cruzi*. Los complejos fueron incubados con epimastigotas de *T. cruzi* y DMPO (atrapador de especies radicalarias de cortos tiempos de vida). En la figura 6.27 se muestra el espectro EPR obtenido en estos estudios con el complejo Pd-dppf-mpo.

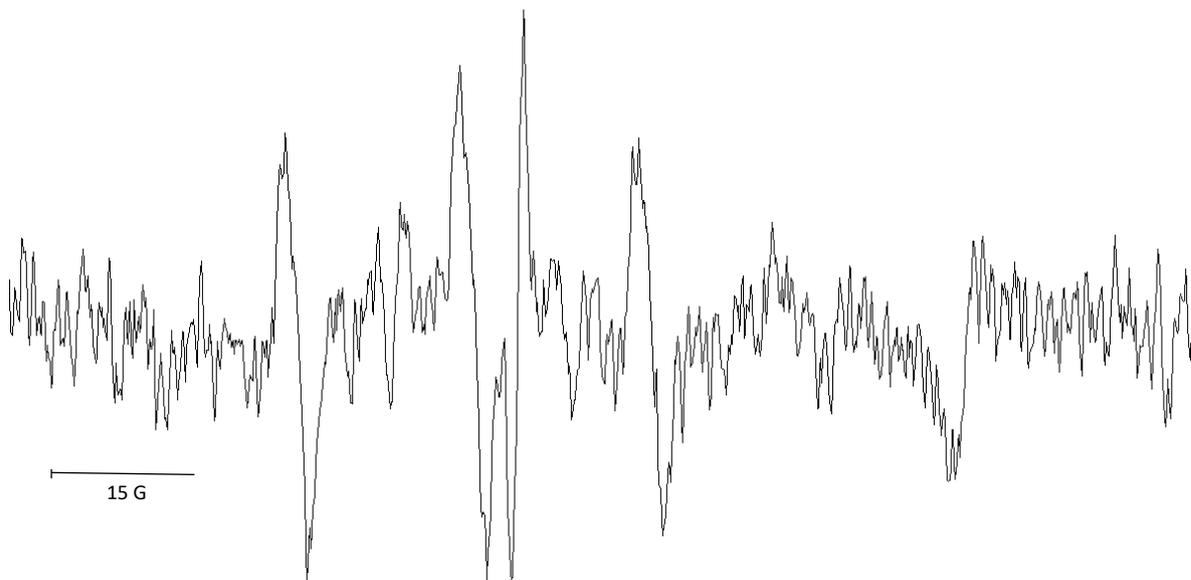


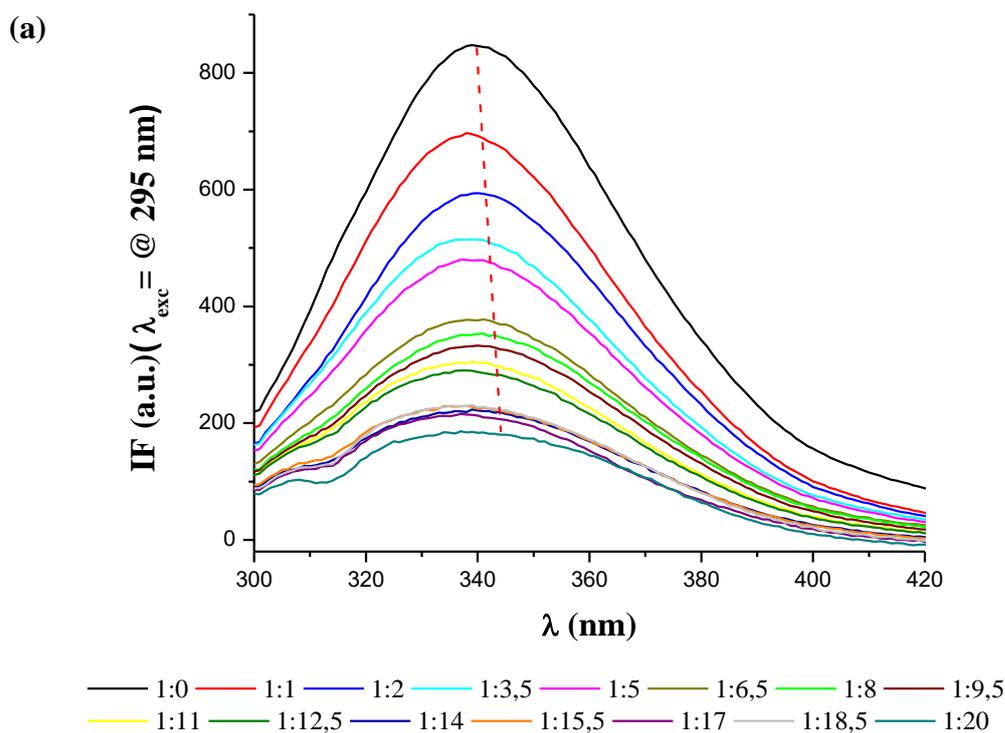
Figura 6.27: Espectro EPR experimental obtenido luego de 5 minutos de incubación de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) con el complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

En ambos espectros de EPR se observaron señales, lo que indicaría que se generaron especies radicalarias en los parásitos intactos por efecto de los mismos. Lamentablemente, no se logró caracterizar el aducto de espín al cual corresponden estas señales. Sin embargo, la presencia de estas señales brinda una importante información. Previamente se demostró que los complejos homolépticos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$ y el Nampo no generan EROS en los parásitos de *T. cruzi*, no observándose señales en los espectros de EPR [38]. Este antecedente motiva a plantear la hipótesis de que la presencia del fragmento dppf en los complejos podría incorporar un nuevo mecanismo de acción por efecto de las EROS generadas.

6.2.6 Interacción con BSA

Motivados en estudiar en profundidad el comportamiento biológico que tendrían los complejos desarrollados, se estudió la interacción entre el complejo Pd-dppf-mpo y la proteína albúmina sérica bovina (BSA) mediante medidas de fluorescencia. Se utilizó BSA como proteína modelo debido su similitud estructural con la albúmina sérica humana HSA (la principal proteína del sistema circulatorio mamífero), su disponibilidad y su bajo costo [75,76].

La proteína BSA posee fluorescencia intrínseca debido a la presencia de dos residuos de triptófano en su estructura (Trp134 y Trp214), principales fluoróforos de la biomolécula [75,77,78]. El Trp134, ubicado en una bolsa hidrofóbica del dominio I de la proteína, es sensible a los cambios de polaridad de su entorno. Pequeños cambios en la vecindad del anillo indol (por interacción con sustratos o alteraciones estructurales, desnaturalización u otros procesos) se ven reflejados en la variación de su emisión fluorescente [79,80]. A pesar de que la proteína HSA sólo posee un residuo de triptófano (Trp214), estudios previos han demostrado que BSA funciona como un excelente modelo al encontrarse similares resultados en los estudios de interacción por medidas de fluorescencia [75]. Se midieron los espectros de emisión fluorescente a temperatura ambiente de BSA ($1 \mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{exc}}=295 \text{ nm}$), en un rango entre 300 y 450 nm, en presencia de concentraciones crecientes del complejo (se utilizó un rango de relación molar BSA:complejo de 0 a 20). Luego de realizar la corrección de los espectros, explicada en el capítulo 3, se obtuvo el espectro de emisión que se muestra en la figura 6.28.



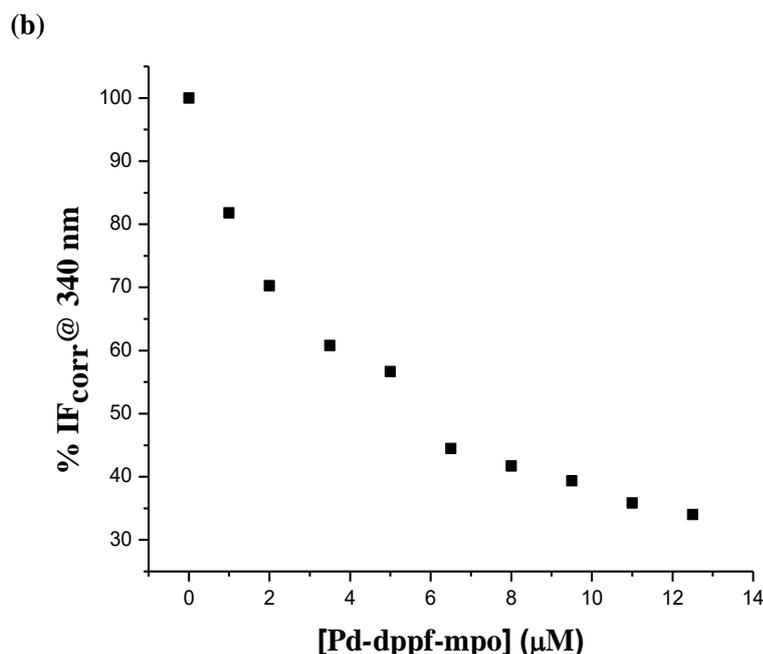


Figura 6.28: (a) Espectro de fluorescencia corregido de la titulación de BSA (1 μM) con diferentes relaciones molares del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. (b) Gráfica de Intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ al aumentar la concentración de complejo.

Se observó una disminución de la intensidad de emisión fluorescente de la proteína al aumentar la relación molar con el complejo Pd-dppf-mpo, generando un *quenching* de la fluorescencia de hasta un 70 %. Como se observa en el espectro (línea roja punteada), el complejo indujo un corrimiento del máximo de emisión hacia mayores longitudes de onda de hasta 4 nm. Este comportamiento sería indicativo de un aumento de la hidrofobicidad en la región que rodea a los residuos de triptófano de BSA, probablemente debido a la interacción con el complejo [75,80–83].

Para conocer el grado de *quenching* de la fluorescencia intrínseca de la proteína debido a la interacción con el complejo, se realizó el ajuste de Stern-Volmer. En la figura 6.29a se muestra la gráfica de este ajuste, donde se observa una relación lineal de IF_0/IF al aumentar la concentración de complejo ($R^2 = 0,9852$). A partir de la pendiente de esta gráfica se obtuvo un valor de $K_{\text{SV}} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Este valor señala un elevado grado de apagamiento de la fluorescencia comparado con lo comúnmente observado en estudios con otros complejos metálicos [79,84].

Con este experimento es posible calcular la constante de unión aparente (K_a) entre BSA y el complejo a partir del ajuste derivado de la ecuación de Hill que se explicó en el capítulo 3. En la figura 6.29 se muestra la gráfica de ajuste de $\log[(IF_0/IF)/IF]$ en función de logaritmo de la concentración de complejo, donde la pendiente de esta curva corresponde a K_a y el intercepto con el eje de las ordenadas corresponde al número de tipos de sitios de unión (n) entre la proteína y el complejo. El ajuste realizado mostró una constante de unión de $3,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, y un único tipo de sitio de unión entre BSA y el complejo ($n \sim 1$). El valor de K_a obtenido se encuentra dentro de los rangos reportados en complejos metálicos, clásicos y organometálicos, que han sido clasificados como buenos interactuantes con BSA, lo que demostraría la alta afinidad existente entre el complejo Pd-dppf-mpo y la proteína [85,86].

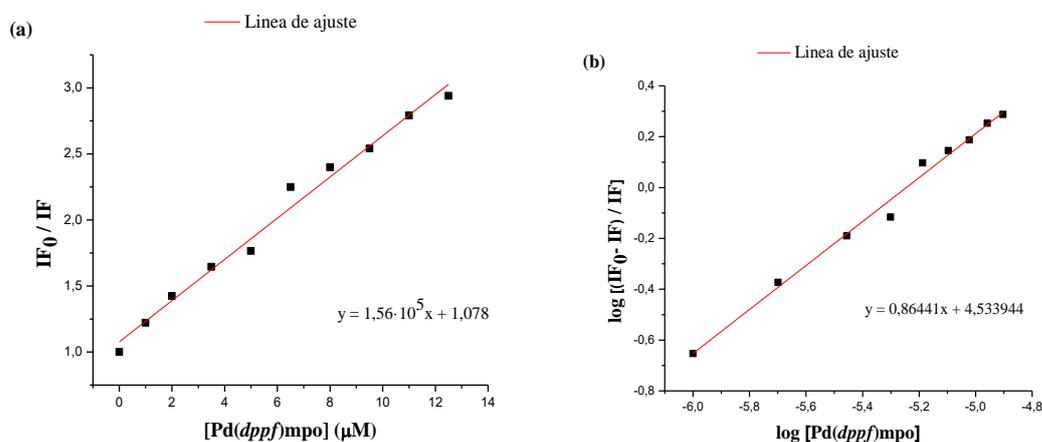


Figura 6.29: (a) Ajuste de Stern Volmer para la titulación de BSA (1 μM) con diferentes relaciones molares de $[Pd^{II}(mpo)(dppf)](PF_6)$. (b) Ajuste derivado de la ecuación de Hill para la titulación de BSA (1 μM) con diferentes relaciones molares de Pd-dppf-mpo.

6.2.7 Conclusiones parciales

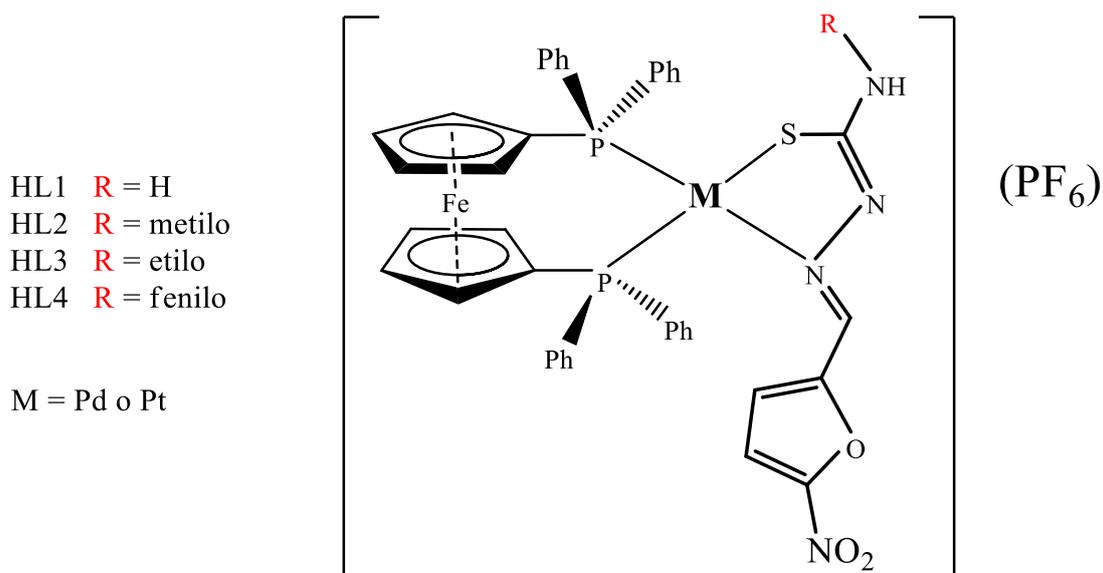
Se obtuvieron dos nuevos complejos organometálicos isomorfos de paladio y platino con el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina de fórmula $[M^{II}(dppf)(mpo)](PF_6)$, los que fueron caracterizados completamente en estado sólido y en solución. Ambos complejos mostraron una elevada actividad citotóxica contra *Trypanosoma cruzi* mostrando un aumento de 10 a 20 veces respecto al fármaco antichagásico de referencia Nifurtimox, y una actividad de 2 a 5 veces mayor que la de la sal sódica del ligando bioactivo Nampo. Los complejos mostraron muy buenos índices de selectividad hacia *T. cruzi*. La inclusión

del fragmento organometálico de ferroceno podría ser responsable de esta selectividad hacia el parásito. Estudios experimentales y computacionales confirmaron que ambos complejos serían muy buenos inhibidores de la actividad de la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH de *T. cruzi*, sugiriendo que esta inhibición podría ser una parte importante del mecanismo de acción tripanosomicida. Además, se confirmó la capacidad de generación de especies radicalarias en los parásitos por la presencia de este fragmento organometálico. Finalmente, el estudio de interacción con BSA sugiere la idea de una elevada interacción entre esta proteína transportadora de fármacos y el complejo Pd-dppf-mpo.

6.3 Compuestos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$

6.3.1 Síntesis

Los compuestos organometálicos de Pd(II) y Pt(II) con las tiosemicarbazonas bioactivas (HL) $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$, codificados como M-dppf-L (figura 6.30), fueron sintetizados por el mismo método experimental que los complejos M-dppf-mpo (detallado en el capítulo 3). Se sintetizaron ocho compuestos (cuatro complejos de Pd(II) y cuatro de Pt(II)). Luego de ser recristalizados por difusión líquido-líquido CH_2Cl_2 /hexano se obtuvieron muestras cristalinas con buenos rendimientos que se resumen en la tabla 6.9.



M-dppf-L

Figura 6.30: estructura de los compuestos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆).

Tabla 6.9: Rendimiento obtenido para los compuestos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆).

Complejo	Color	Rendimiento (%)
Pd-dppf-L1	Marrón oscuro	51
Pd-dppf-L2	Marrón	52
Pd-dppf-L3	Marrón	57
Pd-dppf-L4	Rojo Marrón	46
Pt-dppf-L1	Amarillo	60
Pt-dppf-L2	Amarillo	51
Pt-dppf-L3	Amarillo	60
Pt-dppf-L4	Naranja	52

6.3.2 Caracterización en estado sólido

6.3.2.1 Análisis elemental

Se determinó la composición porcentual de carbono, hidrógeno y nitrógeno de los ocho complejos obtenidos. En la tabla 6.10 se resumen los valores experimentales obtenidos del análisis y el valor teórico calculado a partir de las fórmulas propuestas

Tabla 6.10: Resultados del análisis elemental de C, H y N para los complejos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$.

Complejo	%C _{experimental} (%C _{teórico})	%H _{experimental} (%H _{teórico})	%N _{experimental} (%N _{teórico})
$[Pd^{II}(L1)(dppf)](PF_6) \cdot CH_2Cl_2$	44,52 (44,58)	3,36 (3,26)	5,08 (5,07)
$[Pd^{II}(L2)(dppf)](PF_6) \cdot 2CH_2Cl_2$	42,15 (42,95)	3,44 (3,25)	4,73 (4,66)
$[Pd^{II}(L3)(dppf)](PF_6) \cdot 2CH_2Cl_2$	43,86 (43,44)	3,42 (3,37)	4,40 (4,61)
$[Pd^{II}(L4)(dppf)](PF_6) \cdot CH_2Cl_2$	47,03 (47,85)	3,59 (3,31)	4,31 (4,75)
$[Pt^{II}(L1)(dppf)](PF_6) \cdot 2CH_2Cl_2$	40,08 (39,50)	3,22 (2,90)	4,41 (4,39)
$[Pt^{II}(L2)(dppf)](PF_6) \cdot 2CH_2Cl_2$	40,00 (40,00)	3,19 (3,02)	4,56 (4,34)
$[Pt^{II}(L3)(dppf)](PF_6) \cdot CH_2Cl_2$	41,96 (42,32)	3,35 (3,20)	4,59 (4,59)
$[Pt^{II}(L4)(dppf)](PF_6) \cdot CH_2Cl_2$	44,45 (44,51)	3,32 (3,08)	4,26 (4,42)

Los resultados obtenidos confirmaron la fórmula propuesta para cada complejo, observándose en todos los casos moléculas de diclorometano de cristalización.

6.3.2.2 Espectroscopía infrarroja

Como se señaló en la sección 6.2.2.2, la espectroscopía infrarroja, fue empleada para identificar la presencia de los ligandos en los complejos obtenidos, pero además fue utilizada para elucidar el modo de coordinación de las tiosemicarbazonas al fragmento organometálico $\{M(dppf)\}$. Se midieron los espectros de infrarrojo de los ocho complejos $M-dppf-L$, los ligandos HL y los precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$, en pastillas de KBr en un rango entre $400-4000\text{ cm}^{-1}$. Se identificaron las bandas de vibración características de cada ligando, y se analizaron posibles variaciones en la energía de estas bandas por efecto de la coordinación a $M(II)$. En la figura 6.31 se muestra, como ejemplo, el espectro de infrarrojo de los complejos análogos $M-dppf-L3$.

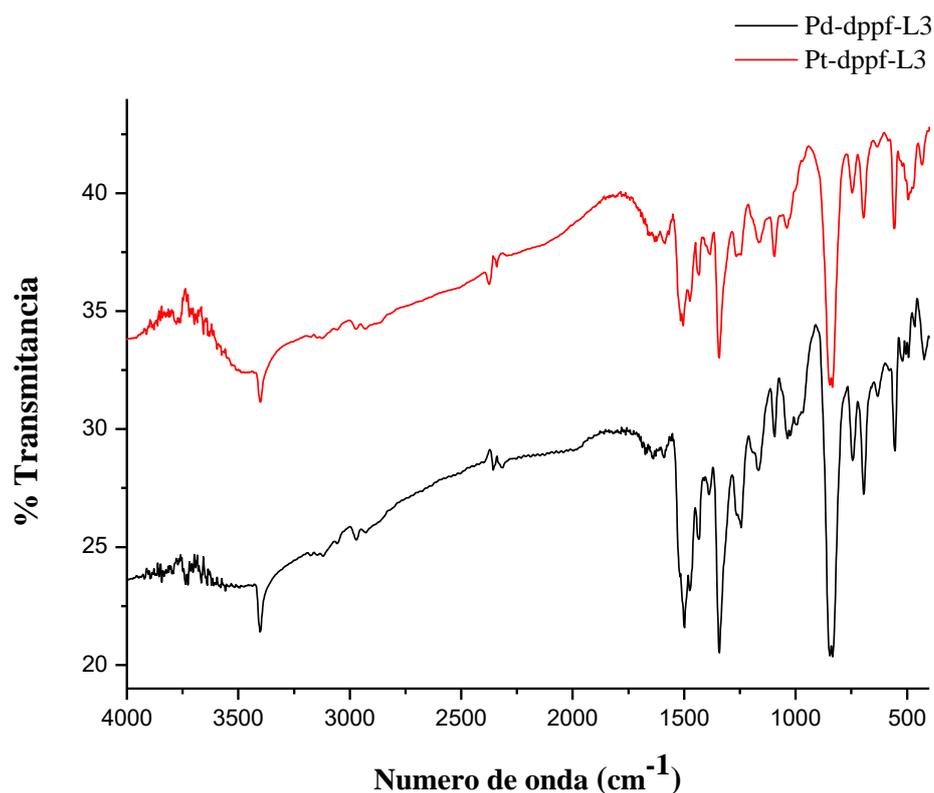


Figura 6.31: Espectro de infrarrojo del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ (línea negra) y $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ (línea roja) en el rango de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Los ocho complejos mostraron un perfil espectral similar, observándose a nivel general un aumento en la complejidad del espectro al incrementar el número de átomos de carbono en el sustituyente R de las tiosemicarbazonas. Como se mencionó en capítulos previos, el tipo de corrimiento en el espectro de las bandas de vibración características de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído señala el modo de coordinación de éstas al centro metálico. Comparando el espectro de infrarrojo de cada complejo con el respectivo ligando HL en la forma libre, se observó una tendencia de desplazamiento de estas bandas ($\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu_s(\text{NO}_2)$, $\nu(\text{N}-\text{N})$, $\delta(\text{NO}_2) + \text{furano}$) que son indicativas de una coordinación bidentada y deprotonada hacia el ion $\text{M}(\text{II})$, que según lo comentado en capítulos previos, se efectúa a través del átomo de azufre tiocarbónico y el nitrógeno azometínico [87]. En la tabla 6.11 se resumen los valores de energía (en cm^{-1}) de las bandas de vibración asignadas en los espectros IR de los complejos M-dppf-L y los ligandos HL libre.

Tabla 6.11: Bandas de vibración seleccionadas de los complejos $[M^II(L)(dppf)](PF_6)$ y los respectivos ligandos HL.

Compuesto	Dppf	$\nu(C=N)$	$\nu_s(NO_2)$	$\nu(N-N)$	$\delta(NO_2) +$ furano	$\nu(P-F)$
HL1^a	-	1602	1356	1108	811	-
Pd-dppf-L1	1437, 1480, 1098, 698, 493	1605	1353	1098	810	842, 558
Pt-dppf-L1	1437, 1480, 1099, 695, 498	1608	1346	1098	810	841, 558
HL2^a	-	1599	1354	1114	808	-
Pd-dppf-L2	1437, 1479, 1096, 696, 494	1591	1350	1097	810	844, 557
Pt-dppf-L2	1437, 1479, 1096, 693, 495	1592	1349	1094	812	849, 558
HL3^a	-	1602	1352	1104	805	-
Pd-dppf-L3	1471, 1437, 1097, 694, 500	1591	1345	1098	811	853, 557
Pt-dppf-L3	1476, 1437, 1097, 694, 502	1591	1343	1098	812	842, 558
HL4^a	-	1595	1344	1104	811	-
Pd-dppf-L4	1480, 1438, 1099, 692, 492	1598	1348	1097	812	845, 558
Pt-dppf-L4	1480, 1438, 1099, 695, 496	1597	1343	1096	812	841, 558

^a: Valores de referencia [87]

No fue posible identificar en los espectros IR de los complejos la banda de estiramiento $\nu(C=S)$ de HL, observada entre 820 a 850 cm^{-1} en los espectros de las tiosemicarbazonas en la forma libre, debido a la presencia de una intensa banda ubicada en esta misma zona espectral. Esta banda, correspondiente a la vibración $\nu(P-F)$ del contraión

hexafluorofosfato, confirma la presencia de este anión en todos los complejos. Se identificó también la banda correspondiente a $\delta(\text{PF}_6)$ cercana a los 558 cm^{-1} [52].

La banda de vibración del estiramiento N-H de las tiosemicarbazonas en su forma libre se encuentra en el rango $3120\text{-}3250 \text{ cm}^{-1}$ [88]. El carácter catiónico de los complejos (confirmado por la presencia de las bandas del contraión PF_6^-) es generado por la coordinación de las tiosemicarbazonas como ligandos aniónicos debido a la deprotonación del nitrógeno hidrazínico. Por lo tanto, se pudo inferir que la banda observada a los 3400 cm^{-1} solamente corresponde a $\nu(\text{NH})$ del grupo amino terminal de las tiosemicarbazonas.

Para la asignación de las bandas correspondientes al fragmento organometálico dppf, se realizó un análisis comparativo con los espectros IR del ligando libre y del respectivo precursor $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$. Según lo reportado en la literatura, los espectros de ambos precursores poseen cinco bandas de vibración características del ligando dppf las que se encuentran a $1480, 1434, 1098, 690, 490 \text{ cm}^{-1}$ [16]. Estas cinco bandas fueron identificadas en los espectros IR de todos los complejos M-dppf-L, no observándose importantes corrimientos como consecuencia de la coordinación del ligando tiosemicarbazona.

6.3.2.3 Difracción de rayos X de monocristal

Se obtuvieron monocristales adecuados para el estudio por difracción de rayos X de siete complejos M-dppf-L y del compuesto $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$. Los cristales se obtuvieron mediante la recristalización por difusión lenta líquido/líquido ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$). Sólo en cuatro complejos M-dppf-L se logró obtener datos adecuados de refinamiento ($R < 5\%$). En la tabla 6.12 se muestran los parámetros de celda, y los datos de colección y refinamiento para la elucidación de las estructuras de estos complejos, y en la tabla 6.13 y en la figura 6.33 se resumen valores de distancias y ángulos de enlace alrededor del ion metálico central M(II). Los parámetros de celda y datos de colección y refinamiento correspondientes a los otros tres complejos M-dppf-L, que tienen un R de ajuste superior al 5 %, se muestran en la tabla 6.14. La lista completa de distancias y ángulos de enlaces, coordenadas atómicas, parámetros de desplazamiento isotrópico, y otros parámetros cristalográficos se adjuntan en el apéndice 1 (A4-A10).

Tabla 6.12: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos [Pt^{II}(L1)(dppf)](PF₆), [Pd^{II}(L2)(dppf)](PF₆), [Pd^{II}(L3)(dppf)](PF₆) y [Pt^{II}(L3)(dppf)](PF₆).

	[Pt ^{II} (L1)(dppf)](PF ₆)	[Pd ^{II} (L2)(dppf)](PF ₆)	[Pd ^{II} (L3)(dppf)](PF ₆)	[Pt ^{II} (L3)(dppf)](PF ₆)
Formula empírica	C ₄₀ H ₃₃ F ₆ FeN ₄ O ₃ P ₃ Pt S	C ₄₁ H ₃₅ F ₆ FeN ₄ O ₃ P ₃ Pd S	C ₄₂ H ₃₇ F ₆ FeN ₄ O ₃ P ₃ Pd S	C ₄₂ H ₃₇ F ₆ FeN ₄ O ₃ P ₃ Pt S
Peso fórmula	1107,61	1032,95	1046,97	1135,66
Temperatura (K)	296 (2)	296 (2)	297 (2)	297 (2)
Longitud de onda (Å)	0,71073	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> ₂ / <i>n</i>			
Dimensiones de celda unitaria				
a (Å)	11,2899 (6)	12,7907 (4)	12,8125 (5)	12,7827 (3)
b (Å)	19,654 (1)	10,2881 (3)	10,3191 (5)	10,3154 (3)
c (Å)	18,494 (1)	32,7377 (8)	32,640 (1)	32,6199 (8)
β (°)	97,665 (5)	98,283 (2)	98,143 (4)	98,323 (3)
Volumen (Å ³)	4067,0 (4)	4263,1 (3)	4272,0 (3)	4255,9 (2)
Z, densidad calculada (Mg/m ³)	4, 1,809	4, 1,609	4, 1,628	4, 1,772
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	4,034	0,994	0,993	3,858
F(000)	2176	2080	2112	2240
Tamaño del cristal (mm ³)	0,226 x 0,123 x 0,073	0,337 x 0,121 x 0,033	0,026 x 0,104 x 0,206	0,062 x 0,118 x 0,356
θ-rango (°) para la colección de datos	2,872 a 27,000	3,032 a 27,000	3,203 a 26,999	3,205 a 26,998
Rangos indexados	-13 ≤ h ≤ 14, -17 ≤ k ≤ 25, -23 ≤ l ≤ 19	-15 ≤ h ≤ 16, -13 ≤ k ≤ 12, -39 ≤ l ≤ 41	-16 ≤ h ≤ 15, -13 ≤ k ≤ 13, -40 ≤ l ≤ 41	-16 ≤ h ≤ 15, -13 ≤ k ≤ 9, -41 ≤ l ≤ 41
Reflexiones colectadas	23769	20038	23277	25067
Reflexiones independientes	8783 [R(int) = 0,0771]	9171 [R(int) = 0,0304]	9193 [R(int) = 0,0564]	9179 [R(int) = 0,0593]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	5487	7379	6293	7840
Completitud (%)	99,8 (to θ=25,242°)	99,8 (to θ=25,242°)	99,8 (to θ=25,242°)	99,8 (to θ=25,242°)
Método de refinamiento	Matriz de mínimos cuadrados en F ²			
Datos / restricciones / parámetros	8783/0/532	9171/0/542	9193/0/550	9179/0/550
Bondad de ajuste en F ²	1,029	1,064	1,033	1,138
Índice R final ^a [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0567, wR2 = 0,1238	R1 = 0,0431, wR2 = 0,0961	R1 = 0,0506, wR2 = 0,0829	R1 = 0,0423, wR2 = 0,0945
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1144, wR2 = 0,1598	R1 = 0,0601, wR2 = 0,1053	R1 = 0,0903, wR2 = 0,0977	R1 = 0,0537, wR2 = 0,1000
Mayor diferencia entre pico y cavidad (e.Å ⁻³)	2,088 y -0,928	0,867 y -0,698	0,654 y -0,500	1,330 y -1,537

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

Tabla 6.13: Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace en torno al centro metálico M(II) en los complejos [Pt^{II}(L1)(dppf)](PF₆), [Pd^{II}(L2)(dppf)](PF₆), [Pd^{II}(L3)(dppf)](PF₆) y [Pt^{II}(L3)(dppf)](PF₆).

	[Pt ^{II} (L1)(dppf)](PF ₆)	[Pd ^{II} (L2)(dppf)](PF ₆)	[Pd ^{II} (L3)(dppf)](PF ₆)	[Pt ^{II} (L3)(dppf)](PF ₆)
Distancias de enlace				
M-N6	2,100 (7)	2,144 (3)	2,151 (3)	2,126 (4)
M-S	2,304 (3)	2,2841 (9)	2,282 (1)	2,293 (1)
M-P1	2,312 (2)	2,3688 (9)	2,378 (1)	2,339 (1)
M-P2	2,269 (2)	2,2785 (9)	2,275 (1)	2,263 (1)
Ángulos de enlace				
N6-M-S	81,1 (2)	82,13 (8)	82,15 (8)	81,9 (1)
P2-M-S	89,17 (9)	87,63 (3)	87,64 (4)	88,91 (4)
P1-M-P2	93,98 (9)	93,30 (3)	92,93 (4)	92,99 (4)
P1-M-N6	96,3 (2)	97,71 (8)	98,06 (8)	96,9 (1)
N6-M-P2	169,7 (2)	166,98 (8)	166,25 (8)	167,3 (1)
S-M-P1	167,1 (1)	174,03 (4)	174,86 (4)	174,61 (5)

Tabla 6.14: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos [Pd^{II}(L4)(dppf)](PF₆), [Pt^{II}(L2)(dppf)](PF₆) y [Pt^{II}(L4)(dppf)](PF₆).

	[Pd ^{II} (L4)(dppf)](PF ₆)	[Pt ^{II} (L2)(dppf)](PF ₆)	[Pt ^{II} (L4)(dppf)](PF ₆)
Formula empírica	C ₄₇ H _{38,5} Cl ₂ F ₆ Fe N ₄ O ₃ P ₃ Pd S	C ₄₁ H ₃₄ F ₆ Fe N ₄ O ₃ P ₃ Pt S	C ₄₆ H ₃₆ F ₆ Fe N ₄ O ₃ P ₃ Pt S
Peso fórmula	1179,44	1120,63	1182,70
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	No determinado	No determinado	No determinado
Grupo espacial	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1
Dimensiones de celda unitaria			
a (Å)	10,1440(2)	14,2063(4)	10,1210(5)
b (Å)	16,1389(4)	17,9235(5)	14,9473(11)
c (Å)	30,5952(10)	19,1150(6)	16,2455(11)
α (°)	79,034(2)	78,854(2)	75,603(6)
β (°)	85,837(2)	79,033(3)	86,203(5)
γ (°)	86,047(2)	67,690(3)	70,471(5)
Volumen (Å ³)	4896,6 (2)	4381,1	2243,1(3)
Z, densidad calculada (Mg/m ³)	4, 1,600	4, 1,699	2, 1,751
Coefficiente de absorción	0,982	3,746	3,663

(mm ⁻¹)			
F(000)	2374	2204	1166
Tamaño del cristal (mm ³)	-	-	-
θ-rango (°) para la colección de datos	3,11 a 29,48	3,16 a 29,22	2,98 a 28,75
Rangos indexados	-13 ≤ h ≤ 12, -17 ≤ k ≤ 21, -41 ≤ l ≤ 39	-18 ≤ h ≤ 19, -24 ≤ k ≤ 23, -25 ≤ l ≤ 25	-12 ≤ h ≤ 13, -19 ≤ k ≤ 19, -21 ≤ l ≤ 19
Reflexiones colectadas	46327	49647	20745
Reflexiones independientes	22658 [R(int) = 0,0537]	20461 [R(int) = 0,0823]	9673 [R(int) = 0,0575]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	-	-	-
Compleitud (%)	-	-	-
Método de refinamiento	-	-	-
Datos / restricciones / parámetros	22658/0/1228	20461/0/533	9673/0/589
Bondad de ajuste en F ²	1,087	1,060	1,182
Índice R final ^a [I > 2σ(I)]	R1 = 0,1229, wR2 = 0,2852	R1 = 0,1139, wR2 = 0,2250	R1 = 0,0983, wR2 = 0,2501
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1662, wR2 = 0,3091	R1 = 0,2098, wR2 = 0,2790	R1 = 0,1151, wR2 = 0,2590
Mayor diferencia entre pico y cavidad (e.Å ⁻³)	2,64 y -2,24	3,78 y -2,28	4,92 y -3,87

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

Desde el punto de vista estructural, siete complejos mostraron características comunes, observándose diferencias sólo en el complejo [Pd^{II}Cl(L1)(dppf)] que serán discutidas más adelante. En los siete compuestos M-dppf-L mencionados, se observó una coordinación *cis*-bidentada de ambos ligandos, y un entorno geométrico pseudo plano cuadrado alrededor de M(II). En la figura 6.32 se muestran, como ejemplo, las estructuras cristalinas resueltas de los complejos isomorfos M-dppf-L3.

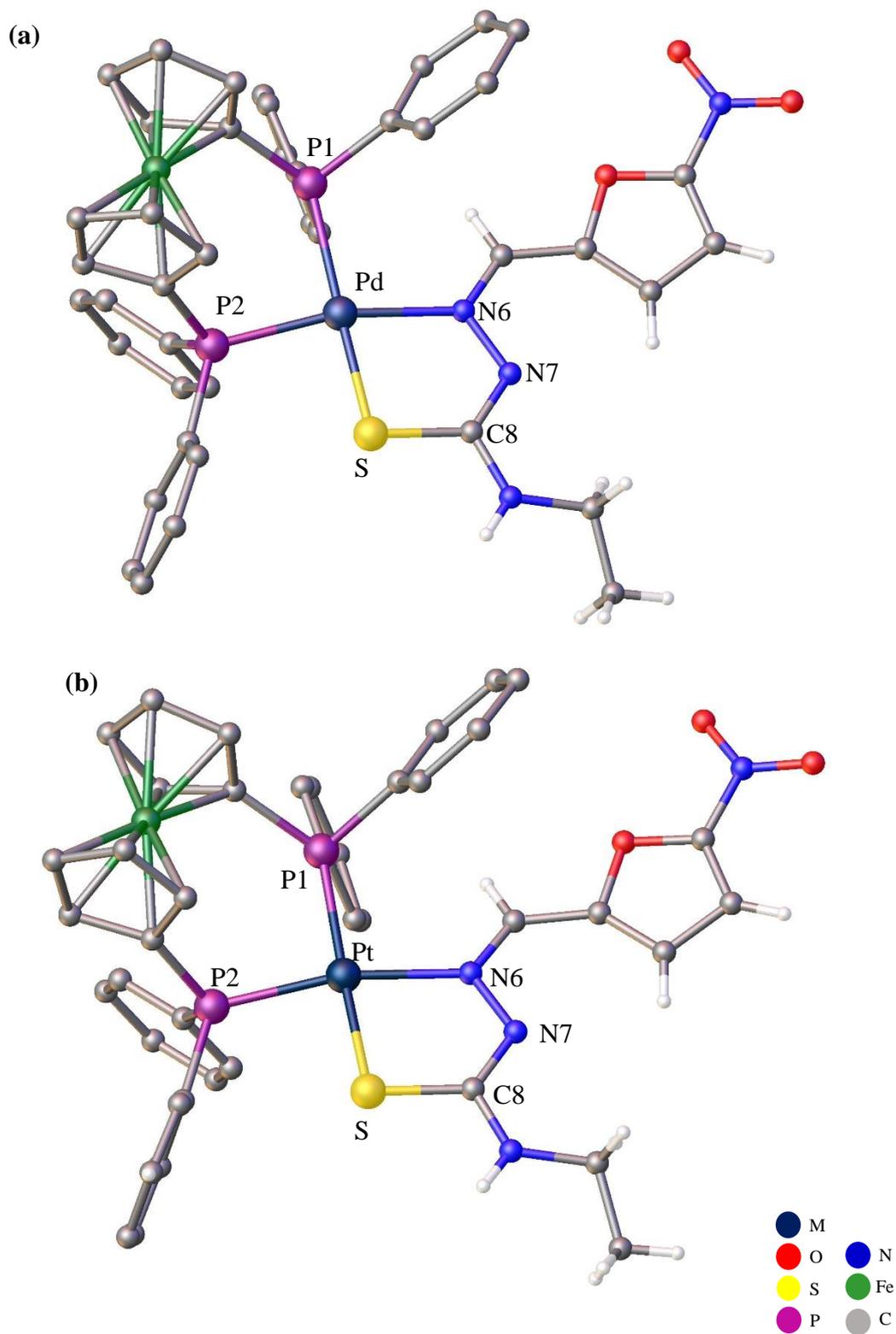


Figura 6.32: Estructura cristalina de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Los átomos de hidrógeno del ligando dppf y el contraión hexafluorofosfato no fueron incluidos para una mejor visualización de las estructuras.

El ligando 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno coordinó a través de ambos átomos de fósforo, igual que en los complejos M-dppf-mpo. Las distancias de enlace M-P1 y M-P2, observadas entre 2,26 y 2,38 Å, se encuentran dentro de los mismos rangos de valores reportados en otros complejos que contienen el ligando dppf coordinando de forma bidentada. El ángulo de coordinación P1-M-P2 fue cercano a 90° en los siete complejos, como se muestra en la figura 6.33a. Los anillos ciclopentadienilo del fragmento de ferroceno mostraron una conformación escalonada, con valores de ángulo de torsión entre los 19-35° (ver figura 6.11), similar a lo observado en los complejos con el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina.

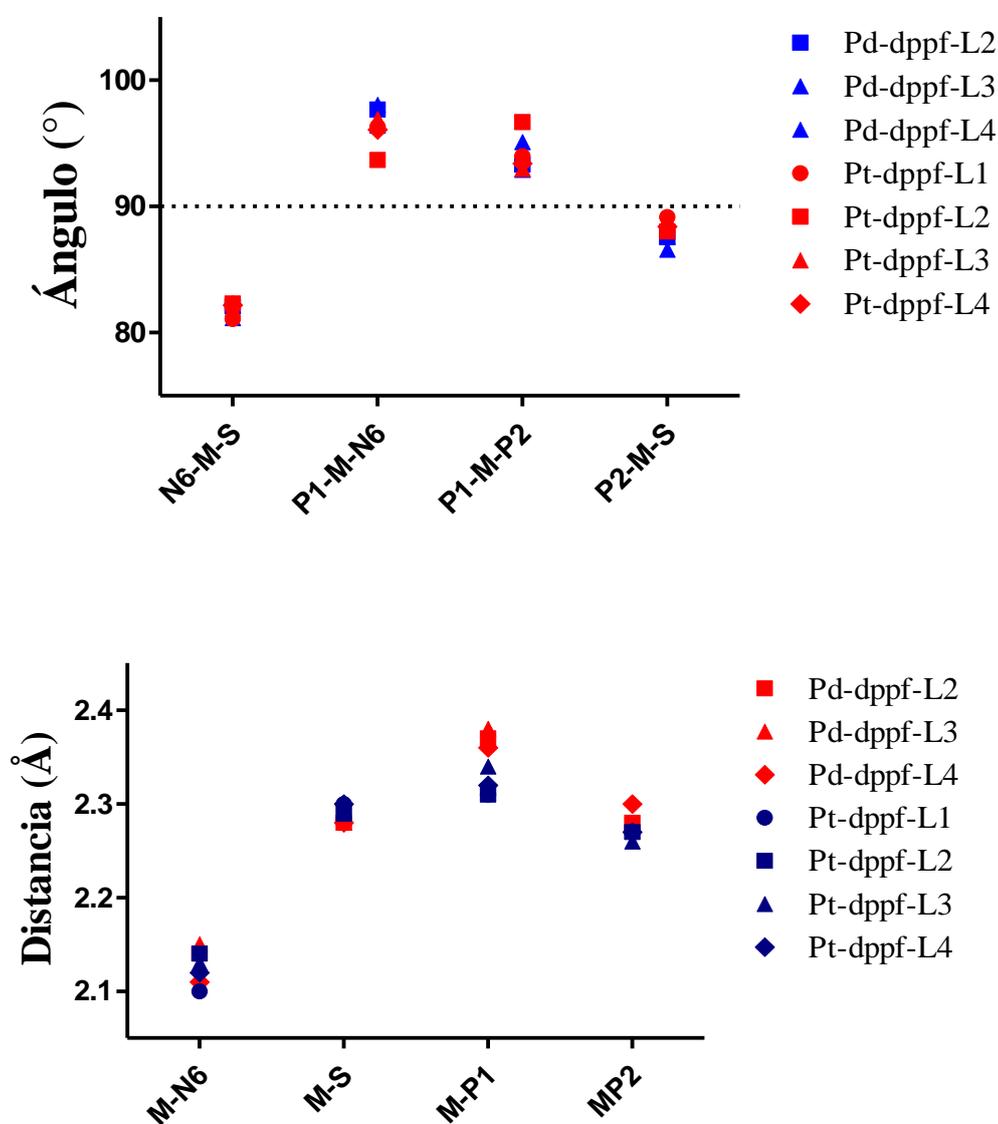


Figura 6.33: Valores de (a) ángulos y (b) de distancias de enlace en torno al centro metálico M(II) de los complejos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆).

En estos siete complejos, los ligandos tiosemicarbazona coordinaron de forma bidentada a través del átomo de azufre tiocarbonílico (S) y el nitrógeno azometínico (N6). Las distancias de enlace M-S (observadas entre 2,28 y 2,30 Å) y M-N6 (entre 2,10 y 2,15 Å) se encuentran dentro de los mismos rangos de valores reportados en otros complejos de Pd(II) con estas mismas tiosemicarbazonas coordinando de forma bidentada [47], y dentro de los mismos intervalos de distancias observados en otros complejos de Pd(II) y Pt(II) con tiosemicarbazonas *cis*-bidentadas [89–92]. En los siete complejos se observó que al modificar el sustituyente R del ligando o al cambiar el ion metálico central, no existen importantes variaciones en las distancias de enlace entre los átomos donores (S y N6) y el ion metálico central (figura 6.33b). Por otro lado, el ángulo de coordinación del ligando tiosemicarbazona (ángulo S-M-N6) es cercano a 82° en todos los casos, y al igual que lo señalado anteriormente, no se observaron variaciones en este parámetro al cambiar el sustituyente R del ligando o el ion M(II).

En el esqueleto de la cadena alifática del ligando tiosemicarbazona, las distancias de enlace C8-S y C8-N7 dan cuenta de un cierto carácter de enlace simple y doble, respectivamente (por ejemplo en el complejo Pd-dppf-L3 estas distancias fueron 1,75 Å y 1,31 Å, respectivamente). Estas diferencias en las distancias de enlace indican una elevada conjugación y deslocalización electrónica de las tiosemicarbazonas provocada por la deprotonación de las mismas como consecuencia de la coordinación al centro metálico [89–92].

Como se muestra en el ejemplo de la figura 6.34, las siete estructuras descritas incluyen el contraión hexafluorofosfato quien estabiliza la estructura del complejo catiónico.

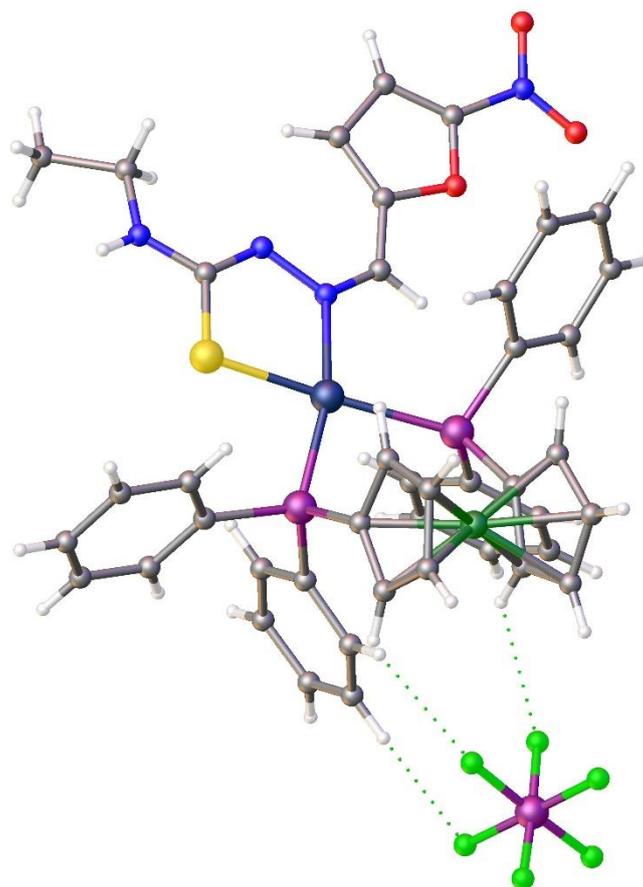


Figura 6.34: Estructura cristalina del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ donde se observa la interacción con el contraión hexafluorofosfato.

Como se mencionó anteriormente, el estudio de difracción de rayos X del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$ mostró resultados diferentes a los discutidos para los siete complejos M-dppf-L resueltos. En la tabla 6.15, se resumen los parámetros de celda, y los datos de colección y refinamiento para la elucidación de las estructuras de este complejo. En el apéndice 1 (A11) se resumen el resto de los datos cristalográficos

Tabla 6.15: Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$.

	$[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$
Formula empírica	$\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{Cl Fe N}_4\text{O}_3\text{P}_2\text{Pd S}$
Peso fórmula	910,41
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (\AA)	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico

Grupo espacial	$P2_1/n$
Dimensiones de celda unitaria	
a (Å)	13,4445(9)
b (Å)	18,7330(9)
c (Å)	19,1700(10)
β (°)	104,931(8)
Volumen (Å ³)	4665,1 (5)
Z, densidad calculada (Mg/m ³)	4, 1,296
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0,903
F(000)	1844
Tamaño del cristal (mm ³)	0,42 x 0,18 x 0,03
θ -rango (°) para la colección de datos	3,09 a 26,00
Rangos indexados	-15 ≤ h ≤ 16, -23 ≤ k ≤ 22, -23 ≤ l ≤ 15
Reflexiones colectadas	27354
Reflexiones independientes	9156 [R(int) = 0,0551]
Datos / restricciones / parámetros	9156/0/478
Bondad de ajuste en F ²	0,968
Indice R final ^a [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0764, wR ₂ = 0,2082
Indices R (todos los datos)	R ₁ = 0,1311, wR ₂ = 0,2402
Mayor diferencia entre pico y cavidad (e.Å ⁻³)	0,80 y -0,80
^a R ₁ = Σ F _o - F _c /Σ F _o , wR ₂ = [Σw(F _o ² - F _c ²) ² /Σw(F _o ²) ²] ^{1/2}	

En este compuesto se observó una coordinación monodentada del ligando tiosemicarbazona a través del átomo de azufre tiocarbonílico (S) (figura 6.35). Este modo de coordinación, según lo expuesto en la introducción del capítulo 4, es uno de los tipos menos comunes de coordinación que presentan los ligandos tiosemicarbazona. Sin embargo, se comprobó mediante todas las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo de tesis que la muestra de monocristal obtenida del complejo [Pd^{II}Cl(L1)(dppf)] no es representativa del *bulk* de la muestra obtenida en la síntesis, ya que todas las otras caracterizaciones realizadas evidenciaron la coordinación bidentada, igual a la observada en los otros siete complejos. Lamentablemente no fue posible obtener monocristales del

compuesto Pd-dppf-L1 análogo a los demás compuestos, por lo que estos datos de difracción sólo se utilizaron como una evidencia de los diversos modos de coordinación que poseen los ligandos tiosemicarbazona.

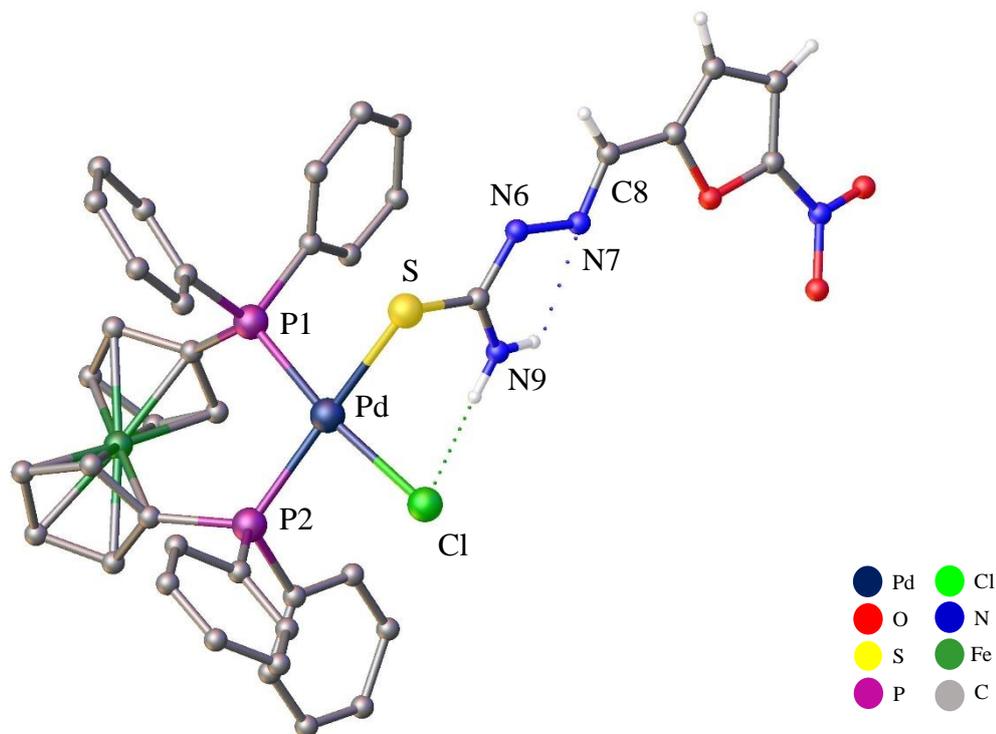


Figura 6.35: Estructura cristalina del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$. Los átomos de hidrógeno del ligando dppf no fueron incluidos para una mejor visualización de la estructura.

En el complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L1})(\text{dppf})]$ el ion metálico se encuentra en un entorno geométrico pseudo plano cuadrado, donde el ligando dppf coordina de forma bidentada a través de ambos átomos de fósforo (distancia Pd-P1 = 2,30 Å y Pd-P2 = 2,28 Å). La tiosemicarbazona L1 coordinada de forma monodentada a través del átomo de azufre tiocarbónico (distancia Pd-S = 2,37 Å) y un ligando cloruro (distancia Pd-Cl = 2,35 Å) completan la esfera de coordinación del metal. Con respecto a la tiosemicarbazona, a excepción del grupo nitro, se observó una pseudo planaridad en la molécula (desviación rms de los átomos del mejor plano de mínimos cuadrados de 0,11 Å) con el grupo NO_2 inclinado en 21° del plano. La planaridad molecular es estabilizada adicionalmente por un enlace de hidrógeno intramolecular N-H...N que implica un átomo de hidrógeno del grupo amino terminal NH_2 y el átomo de nitrógeno N7 (distancia N9...N6 = 2,59 Å, ángulo N9-H...N7 = 106°). Además, el otro átomo de hidrógeno del grupo amino

terminal forma un enlace de hidrógeno intramolecular N9-H...Cl con el ligando cloruro (distancia N9...Cl = 3,43 Å, ángulo N9-H...Cl = 137°). Ambos enlaces de hidrógeno intramoleculares estabilizan la estructura del complejo [Pd^{II}Cl(L1)(dppf)], donde la ausencia del contraión hexafluorofosfato evidencia la neutralidad del compuesto, y por ende, la deprotonación de N7 en la coordinación a Pd(II).

6.3.3 Caracterización en solución

6.3.3.1 Resonancia magnética nuclear

La caracterización en solución de los ocho complejos se realizó mediante experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensional (¹H, ¹³C-RMN) y bidimensional (COSY y HSQC), a temperatura ambiente y en solución de DMSO-d₆. Para facilitar el análisis de los espectros, se numeraron los átomos de ambos ligandos según se muestra en el esquema de la figura 6.36.

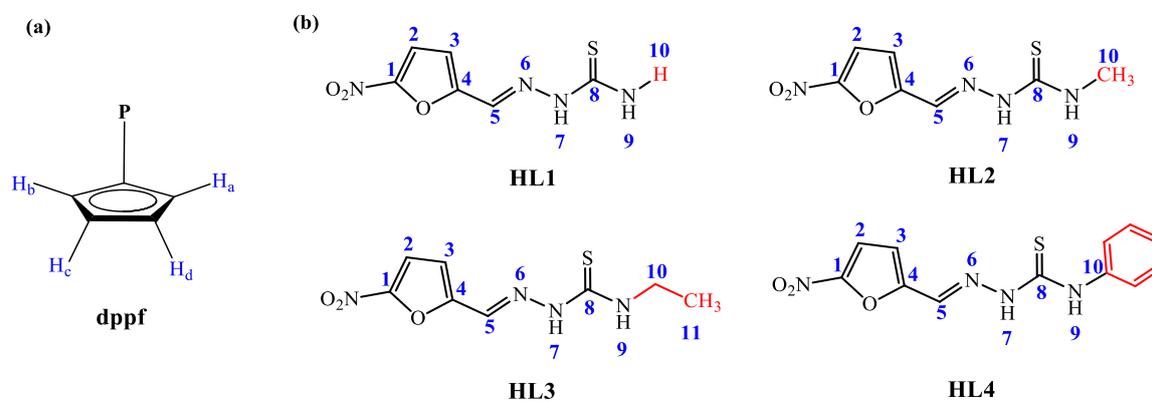


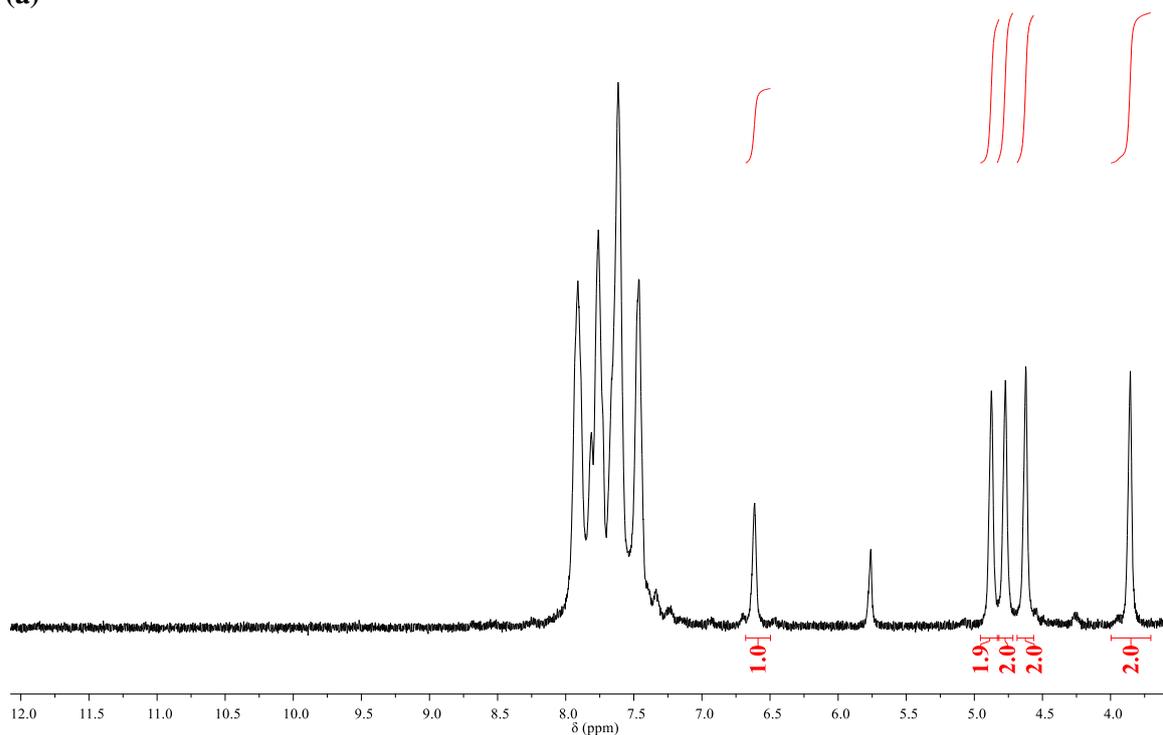
Figura 6.36: Esquema de numeración empleado para los protones de (a) anillo ciclopentadienilo del ligando dppf y (b) tiosemicarbazonas HL.

Los espectros de ¹H-RMN de los ocho complejos mostraron un patrón de señales similar y característico, correspondiente a los protones del ligando dppf y de la respectiva tiosemicarbazona. La integración y multiplicidad de las señales son concordantes con la

estequiometría obtenida en cada compuesto. La figura 6.37 muestra, como ejemplo, los espectros de ^1H -RMN obtenidos para los dos complejos M-dppf-L1.

En las tablas 6.16 a 6.19 se resumen los valores de desplazamiento químico (δ) en ppm de las señales de los espectros de todos los compuestos obtenidos y de los ligandos en su forma libre.

(a)



(b)

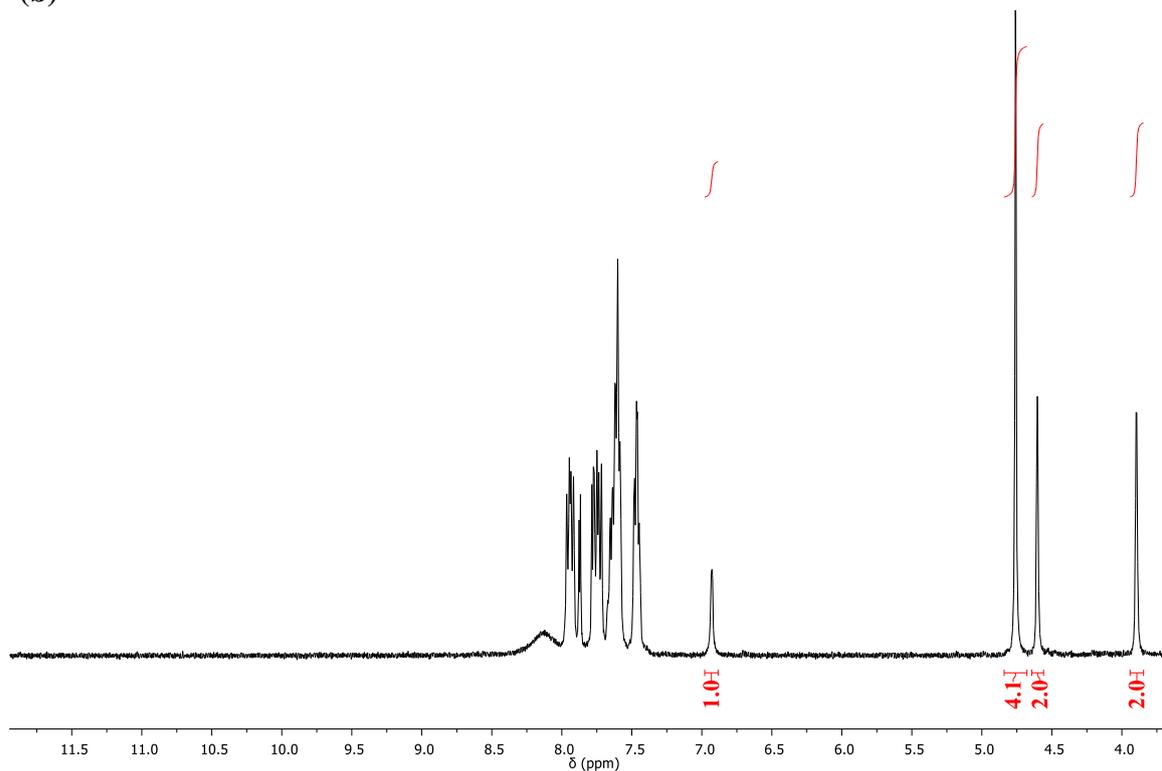


Figura 6.37: Espectros de ^1H -RMN de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$, medidos a 25°C en DMSO-d_6 .

Tabla 6.16: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro de ^1H RMN en ppm, de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de los ligandos HL1 y dppf.

Ligando	H	δ_{H} (multiplicidad)(integración)				
		Ligando libre	Pd-dppf-L1	$\Delta\delta^a$	Pt-dppf-L1	$\Delta\delta^a$
HL1	2	7,80 (d) (1)	7,91 (m) (1)	0,11	7,87 (d) (1)	0,07
	3	7,37 (d) (1)	7,81 (m) (1)	0,44	7,77 (m) (1) ^b	0,40
	5	7,98 (s) (1)	6,61 (s) (1)	-1,37	6,93 (s) (1)	-1,05
	7	11,86 (s) (1)	-	-	-	-
	9	8,54 (s) (1)	7,76 (m)(2)	-0,78	8,13 (s, ancho)	-0,41
	10	8,04 (s) (1)		-0,28		0,09
dppf (anillo Cp)	H _a	3,94 (s) (4)	4,62 (s) (2)	0,68	3,90 (s) (2)	-0,04
	H _b		4,77 (s) (2)	0,83	4,76 (s) (4)	0,82
	H _c	4,27 (s) (4)	4,88 (s) (2)	0,61		0,49
	H _d		3,86 (s) (2)	-0,41	4,60 (s) (2)	0,33
dppf (PPh ₂)			7,91 (m) (4)	-	7,95 (m) (4)	-
		7,23 (s) (8)	7,76 (m) (3)		7,75 (m) (4)	
		7,34 (s) (12)	7,62 (m) (9)		7,62 (m) (8)	
			7,46 (m) (4)		7,47 (m) (4)	

^a: $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{ligando}})$

^b: Solapado con señales de los protones de PPh₂

Multiplicidad: (s) = singulete, (d) = doblete, (t) = triplete, (m) = multiplete

Tabla 6.17: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro de ^1H RMN en ppm, de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L2})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de los ligandos HL2 y dppf.

Ligando	H	δ_{H} (multiplicidad)(integración)				
		Ligando libre	Pd-dppf-L2	$\Delta\delta^a$	Pt-dppf-L2	$\Delta\delta^a$
HL2	2	7,82 (d) (1)	7,63 (m) (1) ^b	-0,19	7,62 (m) (1) ^b	-0,20
	3	7,33 (d) (1)	7,40 (d) (1)	0,07	7,47 (d) (1)	0,14
	5	7,98 (s) (1)	6,67 (s) (1)	-1,31	7,06 (s) (1)	-0,92
	7	11,93 (s) (1)	-	-	-	-
	9	8,58 (s) (1)	8,23 (s) (1)	-0,35	8,44 (s) (1)	-0,14
	10	3,02 (s) (3)	3,83 (s) (3)	0,81	2,87 (s) (3)	-0,15
dppf (anillo Cp)	H _a	3,94 (s) (4)	4,63 (s) (2)	0,69	4,64 (s) (2)	0,70
	H _b		4,79 (s) (2)	0,85	4,71 (s) (2)	0,77
	H _c	4,27 (s) (4)	4,85 (s) (2)	0,58	4,75 (s) (2)	0,48
	H _d		3,89 (s) (2)	-0,38	3,97 (s) (2)	-0,30
dppf (PPh ₂)	7,23 (s) (8) 7,34 (s) (12)	7,94 (t) (4) 7,77 (m) (4) 7,63 (m) (8) 7,47 (m) (4)	-	7,94 (t) (4) 7,75 (m) (4) 7,62 (m) (8) 7,47 (m) (4)	-	

^a: $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{ligando}})$
^b: Solapado con señales de los protones de PPh₂
 Multiplicidad: (s) = singulete, (d) = doblete, (t) = triplete, (m) = multiplete

Tabla 6.18: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro de ^1H RMN en ppm, de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de los ligandos HL3 y dppf.

Ligando	H	δ_{H} (multiplicidad)(integración)				
		Ligando libre	Pd-dppf-L3	$\Delta\delta^a$	Pt-dppf-L3	$\Delta\delta^a$
HL3	2	7,83 (d) (1)	7,63 (m) (1) ^b	-0,20	7,61 (m) (1) ^b	-0,22
	3	7,35 (d) (1)	7,36 (d) (1)	0,01	7,40 (d) (1)	0,05
	5	7,98 (s) (1)	6,73 (s) (1)	-1,25	7,05 (s) (1)	-0,93
	7	11,88 (s) (1)	-	-	-	-
	9	8,61 (s) (1)	8,22 (s) (1)	-0,39	8,43 (s) (1)	-0,18
	10	2,51 (s) (2)	^c	-	^c	-
	11	1,15 (t) (3)	1,11 (t) (3)	-0,04	1,11 (t) (3)	-0,04
dppf (anillo Cp)	H _a	3,94 (s) (4)	4,64 (s) (2)	0,70	4,62 (s) (2)	0,68
	H _b		4,77 (s) (2)	0,83	4,75 (s) (2)	0,81
	H _c	4,27 (s) (4)	4,81 (s) (2)	0,54	4,69 (s) (2)	0,42
	H _d		3,94 (s) (2)	-0,33	4,00 (s) (2)	-0,27
dppf (PPh ₂)	7,23 (s) (8) 7,34 (s) (12)	7,91 (t) (4) 7,76 (m) (4) 7,63 (m) (8) 7,47 (m) (4)	-	7,94 (t) (4) 7,75 (m) (4) 7,60 (m) (8) 7,45 (m) (4)	-	

^a: $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{ligando}})$
^b: Solapado con señales de los protones de PPh₂
^c: Solapado con señales del solvente
 Multiplicidad: (s) = singulete, (d) = doblete, (t) = triplete, (m) = multiplete

Tabla 6.19: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro de ^1H RMN en ppm, de los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L4})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y de los ligandos HL4 y dppf.

Ligando	H	δ_{H} (multiplicidad)(integración)				
		Ligando libre	Pd-dppf-L4	$\Delta\delta^{\text{a}}$	Pt-dppf-L4	$\Delta\delta^{\text{a}}$
HL4	2	7,85 (d) (1)	7,65 (m) (1) ^b	-0,20	7,64 (m) (1) ^b	-0,21
	3	7,52 (d) (1)	7,34 (m) (1) ^c	-0,18	7,41 (m) (1) ^d	-0,11
	5	8,09 (s) (1)	6,74 (s) (1)	-1,35	7,07 (s) (1)	-1,02
	7	12,25 (s) (1)	-	-	-	-
	9	10,20 (s) (1)	10,19 (s) (1)	-0,01	10,40 (s) (1)	0,20
	<i>o</i> -H	7,54 (d) (2)	7,42 (m) (2)	-0,12	7,41 (m) (2)	-0,13
	<i>m</i> -H	7,40 (t) (2)	7,34 (m) (2)	-0,06	7,34 (t) (2)	-0,06
<i>p</i> -H	7,24 (t) (1)	7,12 (t) (1)	-0,12	7,14 (t) (1)	-0,10	
dppf (anillo <i>Cp</i>)	H _a	3,94 (s) (4)	4,69 (s) (4)	0,75	4,22 (s) (2)	0,28
	H _b		4,76 (s) (2)	0,82	4,73 (s) (2)	0,79
	H _c	4,27 (s) (4)	4,69 (s) (4)	0,42	4,56 (s) (2)	0,29
	H _d		4,16 (s) (2)	-0,11	4,68 (s) (2)	0,41
dppf (PPh ₂)	7,23 (s) (8) 7,34 (s) (12)	7,93 (m) (4) 7,82 (m) (4) 7,65 (m) (4) 7,55 (m) (8)	-	7,94 (t) (4) 7,81 (m) (4) 7,64 (m) (4) 7,54 (m) (8)		

^a: $\Delta\delta = (\delta_{\text{Complejo}} - \delta_{\text{ligando}})$
^b: Solapado con señales de los protones de PPh₂
^c: Solapado con señales de los protones *meta* del sustituyente fenilo
^d: Solapado con señales de los protones *orto* del sustituyente fenilo
 Multiplicidad: (s) = singulete, (d) = doblete, (t) = triplete, (m) = multiplete

Hacia valores de alto campo magnético, se identificaron las señales de los protones del fragmento de ferroceno del ligando dppf. En los espectros se observaron cuatro singuletes equivalentes a los protones H_a, H_b, H_c y H_d de ambos anillos *Cp*, que tal como se discutió en los espectros ^1H -RMN de los complejos M-dppf-mpo, son concordantes con la coordinación *cis*-bidentada del ligando dppf [93]. La presencia de estas cuatro señales en los espectros confirma la conformación promedialmente escalonada en solución de los anillos *Cp* en los complejos obtenidos [12,94,95]. Si bien en el espectro del complejo Pt-dppf-L1 se observaron 3 singuletes, sólo se debió al solapamiento entre las señales de H_b y H_c (dicha señal integra para cuatro protones en el espectro), y no tiene relación con posibles cambios conformacionales de los anillos ciclopentadienilo. En suma, y basado en lo mencionado en la sección 6.2.3.2, la coordinación bidentada de la tiosemicarbazona no permite que a temperatura ambiente ocurra la libre rotación de los anillos *Cp*, generando que sean diferenciables en los espectros estos cuatro protones [93]. La

asignación de estas cuatro señales fue además confirmada mediante experimentos ^1H - ^1H COSY, donde en todos los casos se observó un patrón de correlación $\text{H}_a \rightarrow \text{H}_d \rightarrow \text{H}_c$. Entre 7,45 y 7,95 ppm se observaron los multipletes correspondientes a los protones de los anillos aromáticos de PPh_2 del ligando dppf, donde la relación de intensidades relativas se modificó de 8:12 (en el ligando dppf libre) a 4:4:4:8 debido a la inequivalencia química generada en estos protones por la coordinación.

En relación a las tiosemicarbazonas, se identificaron las señales de los dos protones del anillo furano (H_2 y H_3), siendo el protón más cercano al grupo nitro el desplazado hacia menor campo magnético. Se identificó también el singulete correspondiente al protón ilidénico (H_5) y la señal del protón amino terminal (H_9). En todos los complejos se identificaron las señales de los protones correspondientes a cada sustituyente R de la cadena alifática terminal (H_{10}): la señal del protón amino terminal en los complejos M-dppf-L1, la señal cercana a 3 ppm correspondiente al grupo metilo en M-dppf-L2, las dos señales correspondiente al grupo etilo en los compuestos M-dppf-L3 ($\text{H}_{11} = 1,11$ ppm), y las señales correspondientes a los protones *orto*, *meta* y *para* del grupo fenilo en los complejos M-dppf-L4 (tablas 6.14 a 6.18).

Al comparar el espectro de ^1H -RMN de cada complejo con el del respectivo ligando HL en la forma libre, se observó un corrimiento en los valores de desplazamiento químico (δ) de las señales como consecuencia de la coordinación [47,48,96,97]. En todos los espectros se observó la ausencia de la señal correspondiente al protón H_7 , demostrando así que la deprotonación del átomo de nitrógeno hidrazínico, identificada en los estudios en el estado sólido, se mantiene en solución. Esta información confirma, a su vez, que el monocristal estudiado por la técnica de difracción de rayos X del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L}1)(\text{dppf})]$ no es representativo del *bulk* de la muestra, lo que ratifica que en solución las tiosemicarbazonas se mantienen como ligandos aniónicos en los ocho complejos.

Los espectros de ^1H -RMN de los ocho complejos fueron medidos cada 24 horas durante 5 días. No se observó modificación alguna en los espectros (corrimientos ni cambios en la multiplicidad de las señales, como tampoco aparición de nuevas señales en el espectro), lo que da cuenta de la estabilidad que poseen los compuestos en solución de DMSO durante el tiempo de estudio.

La indentificación de las señales de los átomos de carbono se realizó mediante experimentos de ^{13}C -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC. Utilizando espectros de acoplamiento

heteronuclear a un enlace (HSQC) se identificaron los átomos de carbonos unidos a los protones previamente asignados en los espectros ^1H -RMN. Para la identificación del átomo de carbono cercano al sitio de coordinación ($-\text{C}=\text{S}$), la asignación de esta señal se realizó directamente en los espectros de ^{13}C -RMN, basándose en valores de desplazamiento químico reportados en otros complejos con estas mismas tiosemicarbazonas [47]. La tabla 6.20 resume los valores de desplazamiento químico (δ) de las señales correspondientes a los átomos de carbono de los complejos M-dppf-L.

Tabla 6.20: Valores de desplazamiento químico (δ) del espectro ^{13}C -RMN en ppm, de los ocho complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

C	L1		L2		L3		L4	
	Pd ^{II}	Pt ^{II}						
2	135,12	135,09	133,09	133,13	132,82	132,92	132,99	134,34
3	123,08	134,81	122,67	129,10	128,90	128,94	128,66	128,81
5	140,12	141,81	140,98	142,68	143,23	142,72	142,70	142,50
8	174,94	176,44	174,50	177,69	174,54	175,85	173,19	179,08
10	134,20	132,96	76,24	34,07	a	a	-	-
11	-	-	-	-	14,30	13,59	-	-
<i>o</i> -C	-	-	-	-	-	-	121,45	128,67
<i>m</i> -C	-	-	-	-	-	-	129,31	129,40
<i>p</i> -C	-	-	-	-	-	-	124,76	128,45
C_a	75,10	76,29	75,09	74,95	74,94	75,22	75,14	73,94
C_b	75,58	75,68	75,70	77,02	77,61	75,60	75,42	77,65
C_c	77,76	77,20	77,99	75,43	77,85	77,11	77,60	75,59
C_c	75,78	74,87	75,80	76,02	76,39	76,30	76,27	77,81
C_{PPH2}	134,93	135,10	134,96	135,22	135,13	135,63	135,38	135,31
	134,72	134,20	134,22	134,30	134,30	134,93	134,36	134,86
	129,93	129,32	132,92	129,68	133,05	130,50	132,98	132,36
	129,00	129,09	129,08	129,10	128,96	128,78	129,76	129,98

^a: Solapado con señales del solvente

6.3.3.2 Estudio electroquímico

El estudio electroquímico de los ocho complejos M-dppf-L fue realizado mediante voltametría cíclica a temperatura ambiente, utilizando una solución 1 mM de cada complejo en acetonitrilo. Se utilizó un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, y uno de platino como electrodo auxiliar.

Se realizó un barrido de potencial entre -1,8 y 1,5 V a una velocidad de 100 mV/s, donde en estas condiciones todos los complejos resultaron ser especies electroactivas. Los ocho

complejos mostraron un comportamiento electroquímico similar, y en la figura 6.38 se muestra, como ejemplo, el voltamograma cíclico medido para el compuesto Pt-dppf-L1.

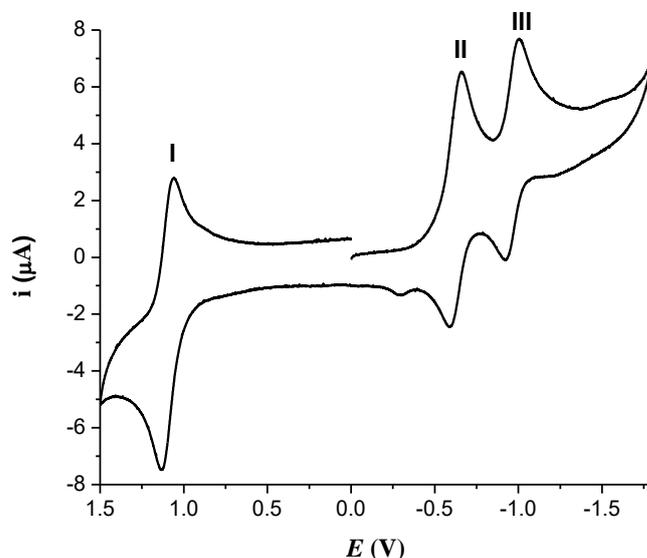


Figura 6.38: Voltamograma cíclico del complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Los valores de potencial de los procesos electroquímicos identificados en los voltamogramas de los ocho complejos se resumen en la tabla 6.21.

Tabla 6.21: Datos electroquímicos de los compuestos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Compuesto	$\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$			Cupla II (HL)		Cupla III (HL)	
	E_{pa}	E_{pc}	$E_{1/2}$	E_{pa}	E_{pc}	E_{pa}	E_{pc}
Pd-dppf-L1	1,14	1,04	1,09	-0,61 (-0,92)	-0,73 (-0,80)	-0,96	-0,94 (-1,02)
Pd-dppf-L2	1,14	1,05	1,10	-0,60 (-0,98)	-0,70 (-0,85)	-0,91	-0,96 (-1,11)
Pd-dppf-L3	1,15	1,04	1,10	-0,71 (-0,95)	-0,71 (-0,84)	-0,94	-0,97 (-1,10)
Pd-dppf-L4	1,14	1,03	1,09	-0,55 (-0,92)	-0,65 (-0,81)	-0,94	-0,92 (-1,04)
Pt-dppf-L1	1,13	1,06	1,10	-0,59 (-0,92)	-0,66 (-0,80)	-0,93	-1,00 (-1,02)
Pt-dppf-L2	1,13	1,05	1,09	-0,60 (-0,98)	-0,67 (-0,85)	-0,97	-1,03 (-1,11)
Pt-dppf-L3	1,13	1,05	1,09	-0,60 (-0,95)	-0,67 (-0,84)	-0,99	-1,07 (-1,10)
Pt-dppf-L4	1,12	1,06	1,09	-0,52 (-0,92)	-0,61 (-0,81)	-0,82	-0,91 (-1,04)

En el barrido hacia potenciales negativos, se observaron dos procesos electroquímicos que están asociados al ligando tiosemicarbazona. En la zona de potencial cercana a -0,6 V (referido al electrodo Ag/AgCl) se observó un proceso de reducción cuasi reversible

(proceso II) el cual fue atribuido a la reducción del grupo nitro a nitro anión radical ($\text{R-NO}_2^{\cdot-}$) mediante la transferencia de un electrón, similar a lo observado en los complejos RuCpL del capítulo 4 e igual a lo reportado en los estudios electroquímicos de otros complejos con estos mismos ligandos [47–49,96,97]. Hacia potenciales más negativos se observó en todos los casos otro proceso de reducción cuasi reversible correspondiente a la posterior reducción al derivado de hidroxilamina (R-NHOH) [98,99].

Al comparar los valores de potencial del proceso electroquímico II de cada complejo con la correspondiente tiosemicarbazona en la forma libre, se observó un desplazamiento de hasta 0,38 V hacia potenciales menos negativos (figura 6.39). Esta disminución en el valor de potencial señala que el proceso de reducción del grupo nitro en los ligandos HL estaría siendo favorecido cuando éstos están unidos al fragmento organometálico $\{\text{M}(\text{dppf})\}$. El aumento de la capacidad de reducción de los ligandos en los complejos organometálicos podría relacionarse, a su vez, con un aumento de la capacidad de biorreducción intracelular de éstos en los parásitos de *T. cruzi* (mecanismo de acción antichagásico de estas tiosemicarbazonas bioactivas). Tal como se observó en los complejos RuCpL , como también en otros complejos metálicos que incluyen las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído, un desplazamiento hacia menores potenciales de reducción de este par redox favorece la generación de EROS en *T. cruzi* [47–49,97].

En el proceso electroquímico III también se observó una disminución del potencial del pico catódico entre los complejos y el respectivo ligando HL, pero además se observó que la irreversibilidad de este proceso en el ligando libre, se convierte en cuasi reversible cuando se encuentra inmerso en el complejo $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

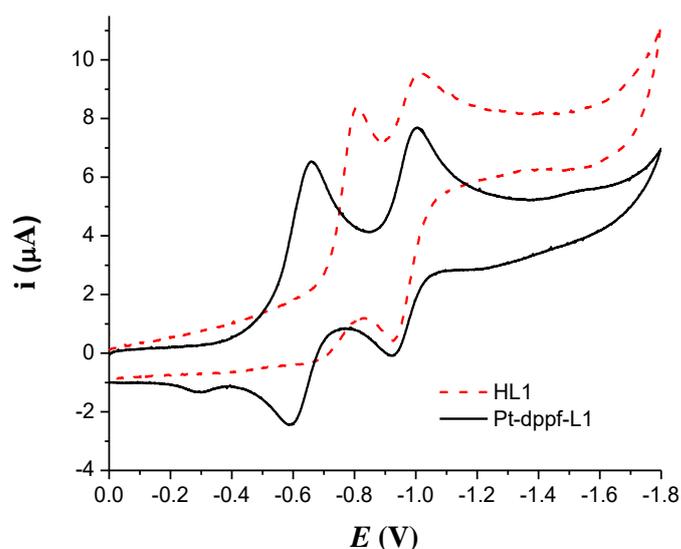


Figura 6.39: Voltamograma cíclico del complejo $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y del ligando HL1 en la dirección catódica a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

En la zona hacia potenciales anódicos, todos los voltamogramas mostraron un proceso de oxidación reversible (proceso I) correspondiente al par redox Fe(II)/Fe(III) del fragmento de ferroceno del ligando dppf [18,59,60]. La diferencia entre el potencial del pico catódico y del pico anódico fue cercana a $0,059/n$ voltios ($n =$ número de electrones transferidos en el proceso redox), correspondiente a un proceso de oxido-reducción reversible de transferencia de un electrón [61–64]. Para confirmar la reversibilidad de este proceso electroquímico, se evaluó esta cupla redox en un rango restringido de potencial a diferentes velocidades de barrido (entre 50 y 500 mV/s). La figura 6.40 muestra, como ejemplo, el estudio realizado en el complejo Pt-dppf-L1, donde se observa que los valores de E_p permanecen invariantes a los cambios de velocidad de barrido y que la relación entre i_{pa}/i_{pc} es cercana a uno en todas las velocidades estudiadas. Además, se observó una relación lineal entre i_p y $v^{1/2}$ (figura 6.40 b) que según la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 6.1), y sumado a todo lo expuesto, confirma la reversibilidad de este proceso redox.

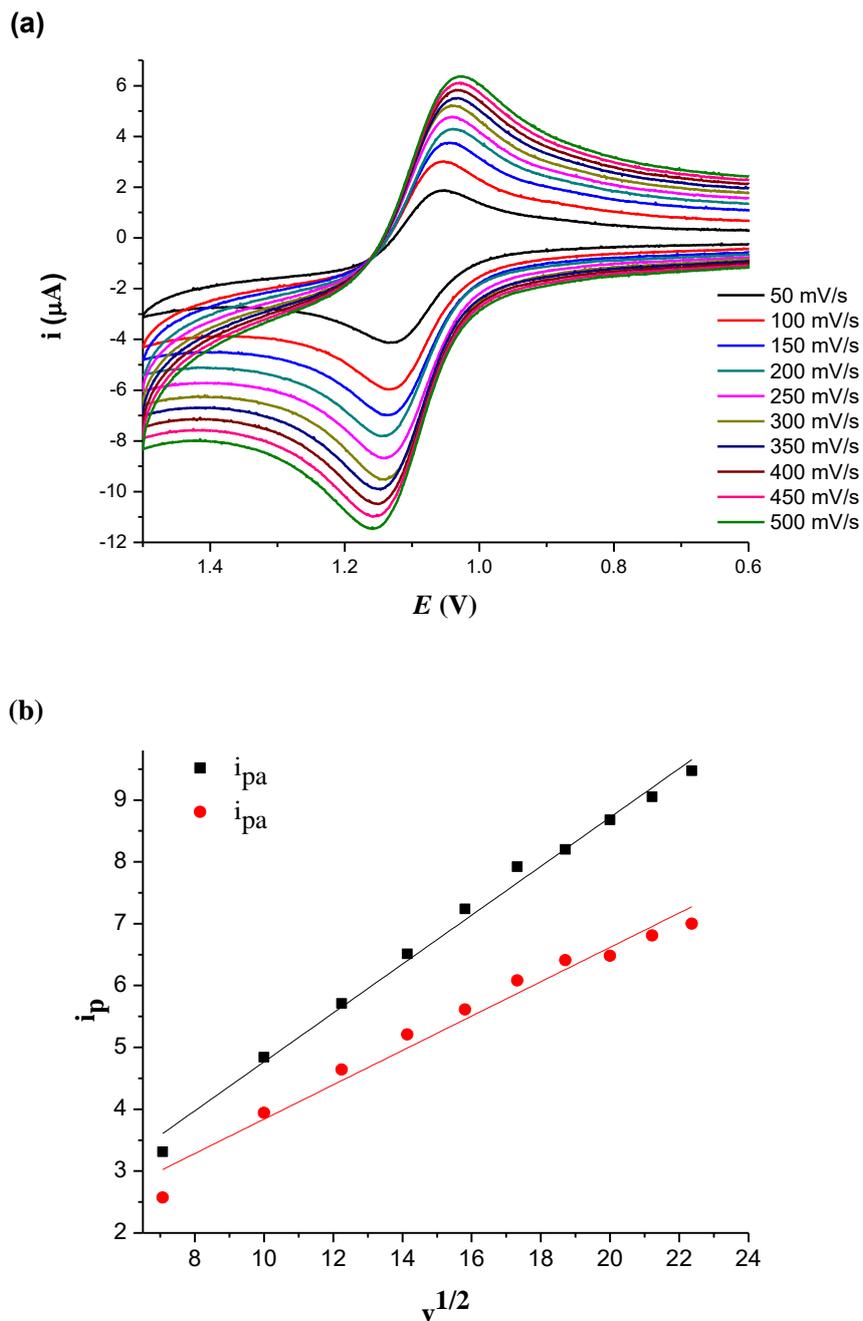


Figura 6.40: (a) Voltamograma cíclico a diferentes velocidades de barrido en un rango de potencial entre 0,6 y 1,5 V del compuesto $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) gráfica representativa de la ecuación de Randles-Sevcik para el complejo $([\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Los valores de n , A , D y C en la ecuación son constantes en ambos sistemas.

6.3.3.3 Lipofilia

La lipofilia es una propiedad fisicoquímica relevante para potenciales fármacos, ya que es uno de los principales factores que controlan el paso a través de la membrana celular [100]. Se evaluó esta propiedad para analizar el efecto que tiene la inclusión del fragmento organometálico {M(dppf)} sobre la lipofilia de las tiosemicarbazonas, y a su vez, para relacionar posteriormente esta propiedad con la actividad biológica de los complejos.

La lipofilia se determinó por cromatografía en capa fina de fase reversa (TLC-C18), utilizada para simular los lípidos hidrofóbicos de las membranas celulares. Se utilizó como fase móvil una mezcla metanol/DMF/H₂O 65:5:30 v/v/v intentando simular un medio hidrofílico. La composición de la fase móvil se puso a punto para diferenciar los complejos entre sí y éstos con las tiosemicarbazonas en la forma libre. La tabla 6.22 resume los valores de R_f medidos en estos estudios y los R_M calculados a partir de ellos para los complejos M-dppf-L y los ligandos HL medidos en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 6.22: Valores de R_M calculados para los complejos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆) y los ligandos HL utilizando la fase móvil metanol/DMF/H₂O 65:5:30 v/v/v.

Compuesto	R _f	R _M
HL1	0,91	-1,00
Pd-dppf-L1	0,48	0,03
Pt-dppf-L1	0,51	-0,02
HL2	0,90	-0,95
Pd-dppf-L2	0,46	0,07
Pt-dppf-L2	0,44	0,10
HL3	0,89	-0,90
Pd-dppf-L3	0,41	0,16
Pt-dppf-L3	0,41	0,16
HL4	0,72	-0,41
Pd-dppf-L4	0,33	0,31
Pt-dppf-L4	0,31	0,35
R _M = log ₁₀ [(1/R _f) - 1]		

Todos los complejos resultaron ser más lipofílicos que las correspondientes tiosemicarbazonas en la forma libre. Este resultado avala la hipótesis planteada de que la

inclusión del fragmento organometálico {M(dppf)}aumentaría la lipofilia de los compuestos. Además, se observó un aumento de la lipofilia al aumentar el largo de la cadena alifática del sustituyente R de este ligando.

A continuación se presentan los resultados de actividad antiparasitaria *in vitro*, y se analizará si esta propiedad fisicoquímica tiene una relación directa con la actividad biológica de los compuestos.

6.3.4 Actividad biológica

6.3.4.1 Actividad antiparasitaria

6.3.4.1.1 Actividad contra *Trypanosoma cruzi*

La actividad de los compuestos M-dppf-L fue evaluada *in vitro* sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi* (fase infectiva del parásito en el huésped mamífero) de la cepa Dm28c. La actividad anti-*T. cruzi* observada en estos estudios se comparó con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación de la evaluación *in vitro* de los ligandos bioactivos en la forma libre (en las mismas condiciones experimentales) [101]. En la tabla 6.23 se resumen los valores de IC₅₀ obtenidos a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta. Parte de los estudios fueron realizados durante dos pasantías de investigación realizadas en el Instituto de Ciencias Biomédicas Médicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 6.23: Actividad biológica *in vitro* de los complejos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆) contra tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
HL1	9,8 ± 1,5 ^a
Pd-dppf-L1	7,58 ± 0,10
Pt-dppf-L1	3,11 ± 0,05
HL2	17,4 ± 1,9 ^a
Pd-dppf-L2	1,42 ± 0,02
Pt-dppf-L2	0,79 ± 0,06
HL3	18,5 ± 1,7 ^a

Pd-dppf-L3	3,6 ± 0,05
Pt-dppf-L3	0,76 ± 0,03
HL4	22,7 ± 1,6 ^a
Pd-dppf-L4	29,42 ± 2,03
Pt-dppf-L4	1,32 ± 0,21
^a : Datos de referencia [101]	

Los ocho compuestos resultaron ser activos contra la forma infectiva de *T. cruzi*, mostrando una elevada actividad citotóxica con valores de IC₅₀ en el rango micromolar o submicromolar. A excepción del complejo Pd-dppf-L4, los compuestos mostraron un incremento de la actividad antitripanosomal en comparación al respectivo ligando bioactivo libre, observándose un aumento de la actividad de hasta 24 veces (ver complejo Pt-dppf-L3). Los complejos de Pt(II) mostraron una mayor actividad anti-*T. cruzi* que los complejos análogos de Pd(II), obteniéndose una actividad hasta 22 veces superior que la de su respectivo análogo de paladio (ver complejos con ligando L4).

Como se muestra en la tabla 6.23, las tiosemicarbazonas HL disminuyen su actividad al aumentar la complejidad del sustituyente R. Sin embargo, al incluir el fragmento organometálico {M(dppf)} esta tendencia se vio modificada, observándose la mayor actividad antichagásica en aquellos complejos que incluyen a los ligandos L2 y L3.

La actividad *in vitro* contra la forma tripomastigota del fármaco antichagásico de referencia Nifurtimox, medida previamente en las mismas condiciones experimentales, mostró un valor de IC₅₀ de 20,1 ± 0,8 μM [97]. Siete de los complejos sintetizados mostraron una actividad anti-*T. cruzi* mayor al Nifurtimox, observándose una actividad de 3 a 26 veces superior a la de éste.

Cabe destacar que la actividad anti-*T. cruzi* observada para los complejos M-dppf-L sobre la fase infectiva del parásito es la más alta encontrada hasta la fecha en compuestos de coordinación que incluyen a estas tiosemicarbazonas bioactivas [47–50,97,101].

6.3.4.1.2 Actividad contra *Trypanosoma brucei*

Los complejos M-dppf-L fueron evaluados *in vitro* contra la forma infectiva de *T. brucei brucei* (cepa 427). La tabla 6.24 muestra los valores de IC₅₀ obtenidos en estos estudios, donde se incluyeron los valores de IC₅₀ reportados para los ligandos bioactivos libres, evaluados previamente en las mismas condiciones [96].

Tabla 6.24: Actividad *in vitro* de los complejos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$ y de los ligandos HL contra la forma infectiva de *T. brucei brucei* (cepa 427).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
HL1	1,1 ^a
Pd-dppf-L1	0,90 ± 0,05
Pt-dppf-L1	0,77 ± 0,02
HL2	11,0 ^a
Pd-dppf-L2	0,93 ± 0,03
Pt-dppf-L2	0,60 ± 0,03
HL3	17,3 ^a
Pd-dppf-L3	0,98 ± 0,06
Pt-dppf-L3	0,52 ± 0,03
HL4	>100 ^a
Pd-dppf-L4	1,56 ± 0,04
Pt-dppf-L4	1,01 ± 0,04
^a : Datos de referencia [96]	

Los ocho compuestos testeados mostraron una elevada actividad contra el parásito con valores de IC₅₀ en el rango submicromolar (0,52 μM - 1,56 μM). Por primera vez en el trabajo del grupo con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldéhido se observó, en una serie completa de compuestos, actividad citotóxica contra la forma infectiva de ambos parásitos genéticamente relacionados.

Los complejos de Pt(II) mostraron un mayor efecto antiproliferativo que sus análogos de paladio, siendo aquellos que incluyen a los ligandos L2 y L3 los que mostraron la mayor actividad anti-*T. brucei*, resultado similar al observado en los estudios *in vitro* contra *T. cruzi*.

Los ligandos bioactivos HL, que fueron evaluados previamente por Demoro y col. [96], mostraron una baja actividad citotóxica contra la forma infectiva de *T. brucei* (incluso HL4 no mostró actividad contra el parásito), observándose una disminución en la actividad al aumentar la complejidad del sustituyente R, resultado semejante al obtenido *in vitro* contra *T. cruzi*. Esta tendencia en la actividad fue observada también en los complejos de Pd(II). Sin embargo, esta tendencia cambió para los complejos de platino,

observándose la misma tendencia que en los estudios *in vitro* contra *T. cruzi* (Pt-dppf-L3 > Pt-dppf-L2 > Pt-dppf-L1 > Pt-dppf-L4).

Al comparar la actividad anti-*T. brucei* de cada ligando HL con la del respectivo complejo organometálico M-dppf-L, se observó un aumento de la actividad antiparasitaria de 2 a 100 veces (en Pd-dppf-L1 y M-dppf-L4, respectivamente).

En base a antecedentes reportados en la literatura por nuestro grupo de investigación, y según lo desarrollado en este trabajo de tesis, se puede inferir que la inclusión de fragmentos organometálicos coordinados a los ligandos bioactivos HL favorece directamente la actividad antiproliferativa contra *T. brucei*. Los primeros complejos organometálicos testeados contra este parásito fueron los dímeros $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ (X = Cl o PF₆) [96], donde la mayor actividad fue observada en el complejo que incluyó al ligando L4 (IC₅₀ = 0,5 μM). Posteriormente, fueron evaluados los complejos RuCpL descritos en el capítulo 4, donde el complejo con resultados más promisorios fue RuCpL3 (IC₅₀ = 3,5 μM). En base a estos antecedentes, en general la serie de complejos M-dppf-L es la que posee la mayor actividad citotóxica contra los parásitos de *T. brucei*. Si bien la actividad biológica del complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$ es similar a la de Pt-dppf-L3, cabe destacar que la serie completa de compuestos M-dppf-L posee una elevada actividad citotóxica contra el parásito, mientras que en los dímeros $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L})_2](\text{X})_2$ es sólo uno de los compuestos quien mostró el aumento de la actividad. De esta manera, la inclusión del fragmento derivado del ferroceno generaría un efecto directo sobre el aumento de la actividad contra *Trypanosoma brucei*.

Por otro lado, no se observó una correlación entre la actividad antiparasitaria (contra *T. cruzi* y *T. brucei*) y la lipofilia medida para los compuestos. En particular, los complejos que incluyeron el ligando HL4 fueron los más lipófilicos, pero no fueron los compuestos más activos. De hecho, ambos complejos (Pd-dppf-L4 y Pt-dppf-L4) mostraron similar lipofilia, pero diferente actividad citotóxica contra los parásitos.

En resumen, la evaluación *in vitro* de los complejos M-dppf-L en la forma infectiva de ambos parásitos, mostró un notable aumento de la actividad antiparasitaria de los ligandos bioactivos en la forma libre. En ambos estudios se demostró que los complejos Pt-dppf-L2 y Pt-dppf-L3 son los más activos, convirtiéndolos así en agentes promisorios contra estos dos parásitos tripanosomátidos.

6.3.4.2

Citotoxicidad inespecífica

Se evaluó la citotoxicidad inespecífica *in vitro* de los compuestos M-dppf-L sobre células endoteliales EA.hy926, utilizadas como células mamíferas modelo. Las células se testearon con diferentes concentraciones de cada complejo en un rango de hasta 50 μM . No se observó actividad citotóxica hasta esa dosis. Se calcularon los índices de selectividad (IS) de cada complejo como el cociente entre el IC_{50} sobre EA.hy926 y el IC_{50} sobre cada parásito. Se obtuvieron buenos a muy buenos índices de selectividad hacia ambos parásitos. La tabla 6.25 resume los valores de IS calculados para los ocho complejos.

Tabla 6.25: Índices de selectividad (IS) calculados.

Compuesto	IS ^a (<i>T. cruzi</i>)	IS ^b (<i>T. brucei</i>)
Pd-dppf-L1	>7	>55
Pt-dppf-L1	>16	>65
Pd-dppf-L2	>35	>54
Pt-dppf-L2	>63	>83
Pd-dppf-L3	>14	>51
Pt-dppf-L3	>66	>56
Pd-dppf-L4	>2	>32
Pt-dppf-L4	>38	>50
^a : IS = IC_{50} EA.hy926/ IC_{50} <i>T. cruzi</i> ^b : IS = IC_{50} EA.hy926/ IC_{50} <i>T. brucei</i> IC_{50} EA.hy926: > 50 μM		

Se observó una significativa disminución de la toxicidad de los ligandos HL por la generación de los complejos M-dppf-L. Estos complejos organometálicos constituyen la primera familia de compuestos que muestran simultáneamente actividades interesantes y de buenos a muy buenos índices de selectividad en ambos parásitos.

En relación a *Trypanosoma cruzi*, los complejos mostraron de moderadas a muy buenas selectividades hacia el parásito observándose valores de IS entre 2 y 66. Estos valores de IS fueron incluso superiores a los calculados para los complejos M-dppf-mpo, en los cuales se había planteado que si bien la presencia del fragmento organometálico no tenía una influencia considerable sobre la actividad antiparasitaria (en comparación a los

complejos homolépticos $[M^{II}(\text{mpo})_2]$, sí generó un importante aumento sobre la selectividad hacia el parásito. En los complejos M-dppf-L, la inclusión de este fragmento organometálico generó un aumento en la actividad antiparasitaria (en comparación al ligando libre y a todos los complejos metálicos con estos mismos ligandos bioactivos) y también un incremento importante de la selectividad hacia el parásito.

La serie completa de los compuestos M-dppf-L mostró también una muy buena selectividad hacia *T. brucei*. Los índices de selectividad calculados fueron entre 32 y 83, y son los valores más elevados que han sido observados en estudios *in vitro* con compuestos de coordinación que incluyen estos mismos ligandos bioactivos [96].

6.3.5 Mecanismo de acción

6.3.5.1 Generación de especies radicalarias en *Trypanosoma cruzi*

La generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) causantes de estrés oxidativo en los parásitos de *T. cruzi*, es uno de los mecanismos de acción antichagásico propuesto para los ligandos bioactivos HL. Esto motivó estudiar la posible generación de EROS por parte de los compuestos M-dppf-L en los parásitos de *T. cruzi*.

Los estudios se realizaron sobre epimastigotas de *T. cruzi*, las que fueron incubadas durante cinco minutos con cada complejo. Al igual que todos los experimentos de EPR realizados en este trabajo de tesis, se implementó la técnica de *spin trapping* incluyendo DMPO como atrapador de radicales de cortos tiempos de vida, permitiendo así identificar patrones espectrales asociados a los diferentes aductos de espín. Los complejos fueron incorporados al medio a partir de diluciones de una solución stock preparada en *N,N*-dimetilformamida (DMF). No se pudo utilizar DMSO como disolvente de los compuestos ya que se observó una intensa señal en el blanco de medida del espectro de EPR (complejo-DMSO-DMPO), cuya presencia invalidaría la posible identificación de algún radical generado en los parásitos por efecto de los compuestos (no se logró identificar el tipo de radical asociado a esta señal).

Se registraron los espectros de EPR luego de la incubación. Se muestra como ejemplo el espectro de EPR experimental y simulado de los parásitos tratados con el complejo Pd-dppf-L4 (figuras 6.41 y 6.42). A pesar de que no se obtuvo una buena resolución de los espectros experimentales, todos ellos mostraron un patrón espectral similar permitiendo

identificar inequívocamente dos aductos de espín (figuras 6.41 y 6.42). A partir de la simulación se calcularon las constantes de acoplamiento hiperfino de estos dos aductos.

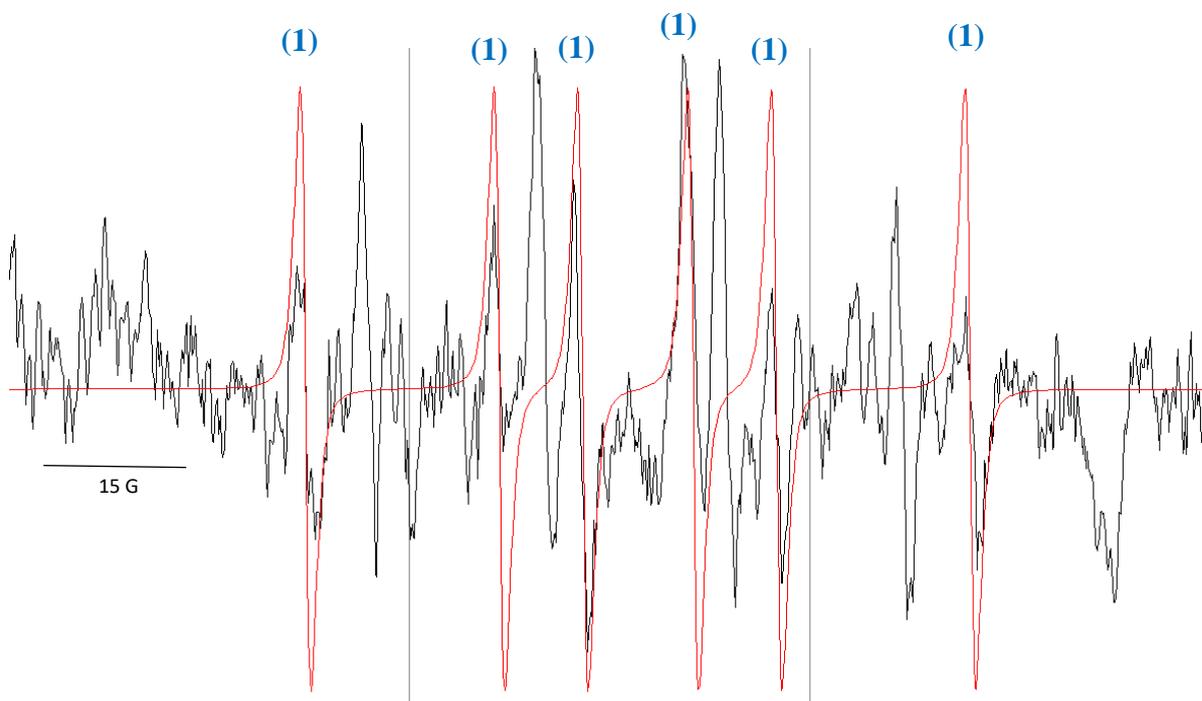


Figura 6.41: (a) Espectro de EPR experimental (línea negra) y simulación del aducto de espín de DMPO-nitrocompuesto (línea roja) obtenido luego de 5 minutos de incubación de epimastigotas de *T. cruzi* con el complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L4})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

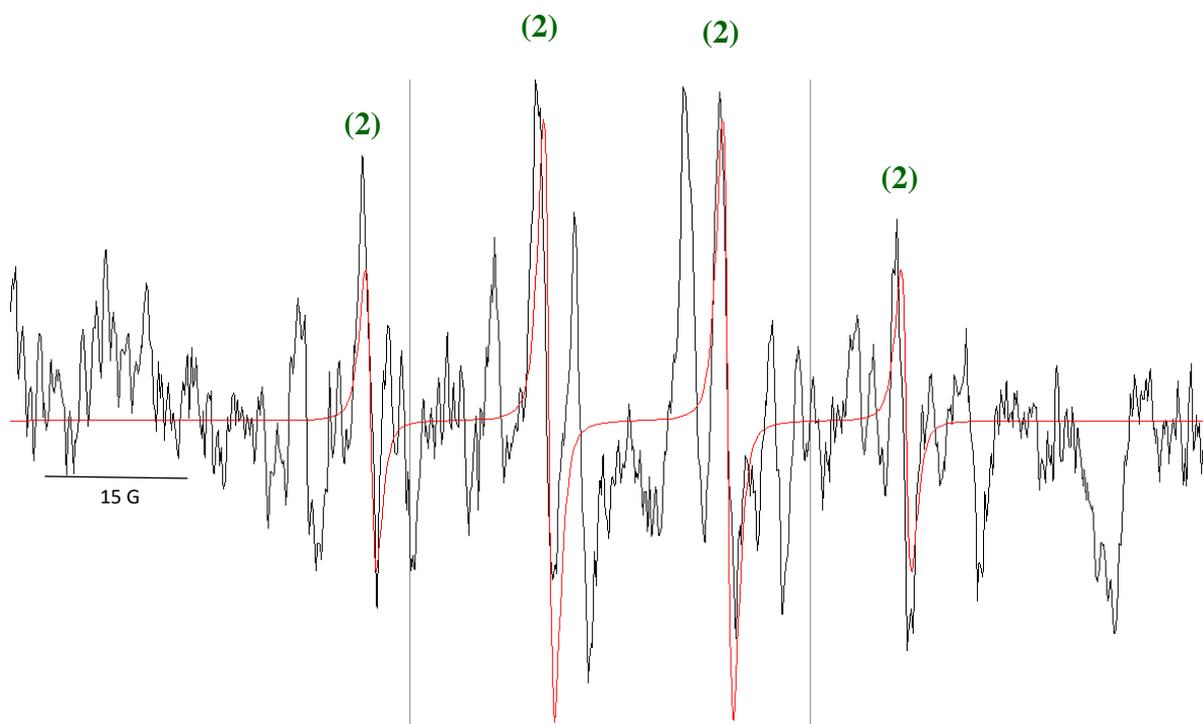


Figura 6.42: Espectro de EPR experimental (línea negra) y simulación del aducto de espín DMPO-OH \cdot (línea roja) obtenido luego de 5 minutos de incubación de epimastigotas de *T. cruzi* con en el complejo [Pd^{II}(L4)(dppf)](PF₆).

En el espectro de la figura 6.41 se muestra el aducto de espín DMPO-nitrocompuesto, el cual corresponde a un patrón espectral de seis líneas de igual intensidad relativa (líneas **(1)**). Las constantes de acoplamiento hiperfino calculadas ($a^N = 16,1$ G y $a^H = 23,1$ G) están de acuerdo con el atrapamiento de un radical centrado en carbono [102]. Este aducto de espín está asociado con la generación del nitro anión radical NO₂⁻ generado por la biorreducción intracelular de los complejos M-dppf-L.

El segundo aducto de espín identificado (figura 6.42) corresponde a un patrón de 4 líneas (líneas **(2)**) de relación de intensidades 1:2:2:1, cuyas constantes de acoplamiento hiperfino calculadas fueron $a_N = a_H = 14,8$ G. Este patrón espectral corresponde al atrapamiento del radical hidroxilo (aducto de espín DMPO/OH \cdot).

Los valores de constantes de acoplamiento hiperfino calculados para estos dos aductos de espín se encuentran dentro de los mismos intervalos observados en otros complejos que incluyen estas mismas tiosemicarbazonas [47,48,50,97,101] u otros nitro compuestos que generan el nitro anión radical y el radical hidroxilo [103,104].

Estos resultados confirman que, al igual que los ligandos bioactivos HL en su forma libre, los complejos M-dppf-L poseen la capacidad de generar especies radicalarias en los parásitos de *T. cruzi*. Esto sugiere que la biorreducción de los complejos (que genera el

nitro anion radical) estaría seguida por la participación de los mismos en el proceso de reciclaje redox, produciendo finalmente radicales hidroxilo tóxicos para el parásito como parte del probable mecanismo de acción anti-*T. cruzi* de estos complejos.

6.3.5.2 Efecto sobre el consumo de oxígeno de *Trypanosoma cruzi*

A partir de los resultados observados en los experimentos de EPR, es posible entonces pensar que los complejos tendrían un efecto directo sobre la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos. Una de las metodologías empleadas para conocer la variación del consumo de oxígeno de los parásitos se basa en la medición del oxígeno disuelto utilizando un electrodo de Clark (oxigrafía).

Se realizaron estudios para conocer la variación del consumo de oxígeno en los parásitos de *T. cruzi* en presencia de los complejos M-dppf-L. Según lo descrito en el capítulo 3, los parásitos de epimastigotas de *T. cruzi* fueron tratados con una concentración final de 40 μ M de cada complejo (disuelto en DMSO) y se registró la variación de la concentración de oxígeno en el tiempo a 28°C. A partir de la pendiente de las gráficas, [O₂] en función del tiempo, se analizó la variación de la velocidad del consumo de oxígeno en los parásitos luego de ser tratados con cada complejo. La variación observada fue comparada contra parásitos tratados sólo con DMSO (control). Los resultados se resumen en la tabla 6.26.

Tabla 6.26: Efecto del agregado de los complejos [M^{II}(L)(dppf)](PF₆) sobre la velocidad de consumo de oxígeno en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c)

Compuesto	Aumento del consumo de oxígeno (%) respecto al control
Pd-dppf-L1	23,1
Pt-dppf-L1	35,9
Pd-dppf-L2	16,5
Pt-dppf-L2	22,5
Pd-dppf-L3	93,6
Pt-dppf-L3	8,2
Pd-dppf-L4	24,7
Pt-dppf-L4	7,9

Todos los complejos generaron un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos. Según lo señalado en el capítulo 2 (ver esquema de la figura 2.2), el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de los parásitos de *T. cruzi* estaría directamente relacionado con la generación de EROS. Este resultado confirma la hipótesis de la participación de los compuestos en el proceso de reciclaje redox del parásito mediante la biorreducción intracelular. El complejo Pd-dppf-L3 mostró el mayor aumento de la velocidad de consumo de oxígeno, y por el contrario, el complejo Pt-dppf- L4 fue el que mostró la menor variación. Sin embargo, no se observó una correlación entre los resultados de actividad *in vitro* contra *T. cruzi* y el efecto sobre el consumo de oxígeno de los parásitos.

6.3.5.3 Estudio de cambios redox intracelulares en *Trypanosoma brucei*

Un enfoque general para el desarrollo de nuevos fármacos contra parásitos tripanosomátidos es el lograr identificar diferencias claves en el metabolismo entre el huésped y el patógeno, para utilizarlas en el diseño de agentes antiparasitarios. Uno de estos procesos es el metabolismo tiol de los tripanosomátidos [106] que se caracteriza por la dependencia que tiene con el hexapéptido tripanotiona (figura 6.43) [107]. La tripanotiona, N^1, N^8 -bis-(glutationil)espermidina, es el principal agente antioxidante de células eucariotas y es fundamental para el crecimiento y proliferación de los parásitos tripanosomátidos [108]. Una de sus principales funciones es mantener el equilibrio redox celular en los parásitos, realizando la función que realiza el glutatión en las células del hospedero mamífero [108,109].

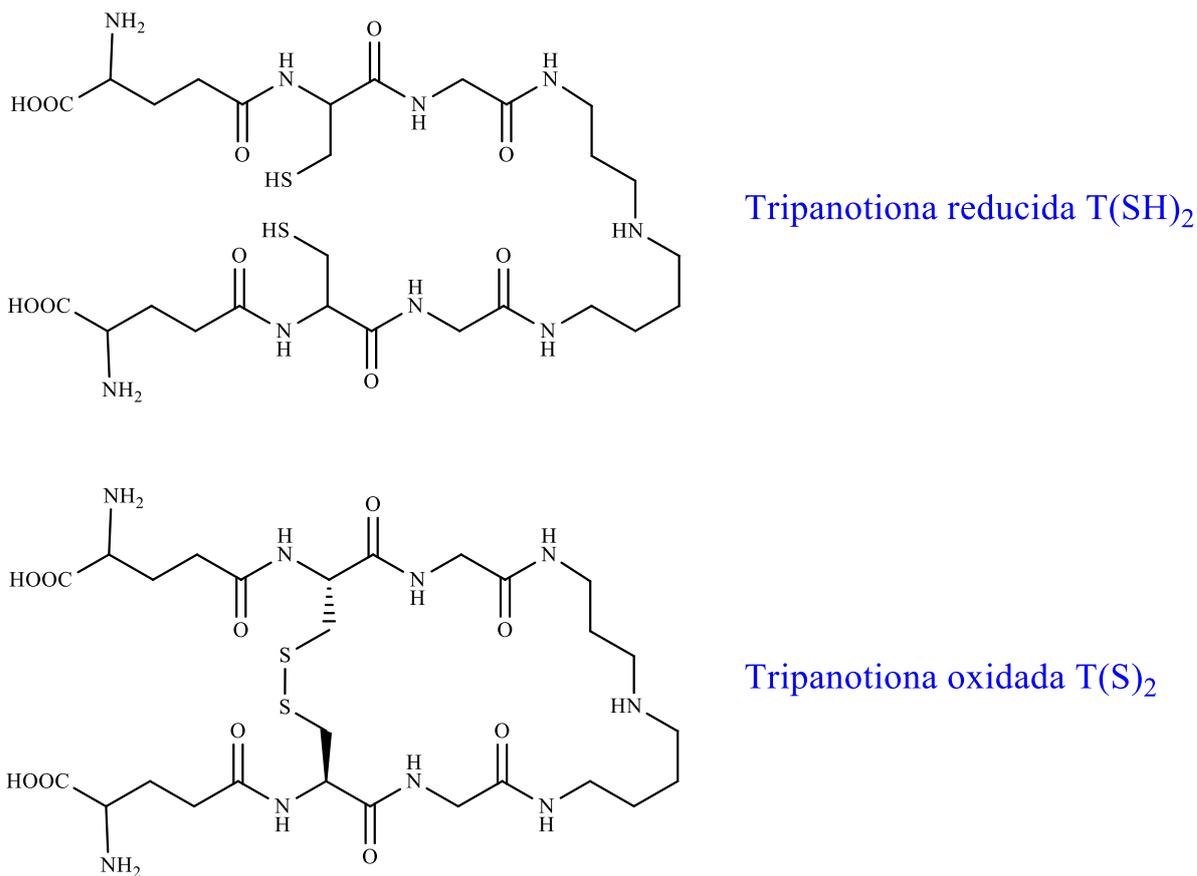


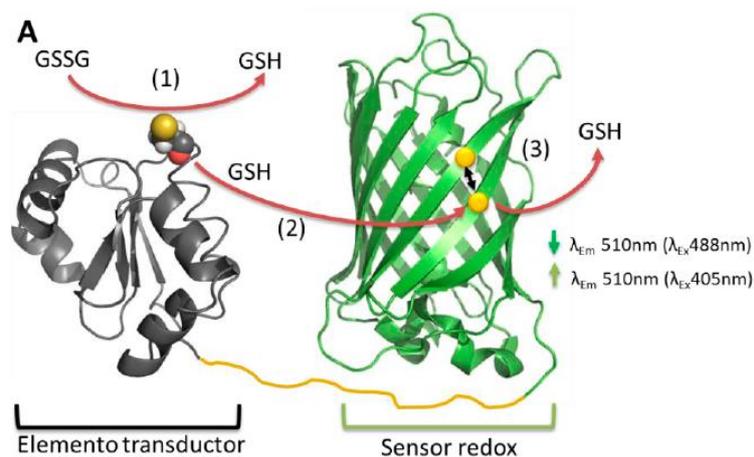
Figura 6.43: Estructura molecular de la tripanotiona en su forma reducida T(SH)₂ y de la tripanotiona en su forma oxidada T(S)₂

Por ser organismos aeróbicos, los parásitos tripanosomátidos están expuestos a especies reactivas de oxígeno (EROS) producidas por el metabolismo celular o por agentes externos y/o el huésped. Los grupos tiólicos de la tripanotiona son fundamentales en la defensa antioxidante del parásito. Las reacciones redox dependientes de NADPH pueden generar la oxidación a su forma disulfuro T(S)₂, la cual puede ser reducida a la forma T(SH)₂ por la tripanotiona reductasa, lo que conduce a la disminución de los niveles de radicales libres y al mantenimiento de un ambiente celular reducido.

Se confirmó que los complejos M-dppf-L son capaces de generar EROS en *T. cruzi* debido a la probable biorreducción intracelular del grupo nitro del ligando bioactivo y/o por la oxidación de Fe(II) del fragmento de ferroceno (que fue confirmado por los experimentos de EPR en los complejos M-dppf-mpo). La generación de EROS intracelular por parte de los complejos podría generar la oxidación de macromoléculas,

como proteínas con grupos tiol y metabolitos de bajo peso molecular como la tripanotona $T(SH)_2$.

Utilizando un biosensor redox que fue expresado en los parásitos de *T. brucei*, se estudió la potencial actividad redox de los complejos M-dppf-L como parte del probable mecanismo causante de la muerte en los parásitos. El biosensor redox utilizado (hGrx-roGFP2) está constituido por la glutaredoxina humana hGrx acoplada a una proteína verde fluorescente roGFP2 que es sensible a cambios redox. Esta unión le brinda la capacidad de identificar cambios en el par redox glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GSSG) que se ven reflejados en variaciones en la intensidad de fluorescencia. A nivel general, el mecanismo del biosensor consta de tres etapas que se resumen en la figura 6.44. En la primera etapa el glutatión disulfuro (GSSG) reacciona con la cisteína nucleofílica del sitio activo de hGrx, generando una cisteína glutationilada (S-SG) y un glutatión reducido (GSH). Luego, el disulfuro mixto de hGrx (S-SG) es atacado por una de las cisteínas redox sensibles del biosensor roGFP2, generando la forma glutationilada del sensor y la forma reducida de hGrx. Finalmente se forma el disulfuro entre una de las cisteínas de roGFP2 y el glutatión por medio de la formación de un enlace disulfuro intramolecular en roGFP2 liberando así otro GSH. Este último paso genera un cambio de la intensidad de fluorescencia en roGFP2 al excitar con una longitud de onda de 488 nm (relacionado al biosensor reducido) y de 405 nm (biosensor oxidado) [110,111].



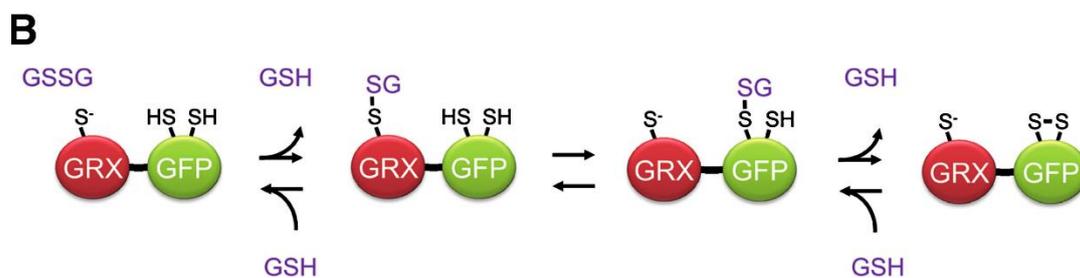


Figura 6.44: Esquema representativo del funcionamiento del biosensor redox hGrx-roGFP2 [110,112].

Se expresó este biosensor redox en los parásitos de *T. brucei*, y éstos fueron luego incubados durante 24 horas con cada complejo M-dppf-L a concentraciones similares y mayores al IC₅₀ obtenido en los estudios *in vitro* (0,37 a 3,30 μM). Se analizó el estado redox del biosensor siguiendo la variación de la relación de intensidad de fluorescencia (IF, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) a $\lambda_{\text{ex}} 405 / \lambda_{\text{ex}} 488 \text{ nm}$. En este estudio, un aumento de esta relación será indicativa de la oxidación del biosensor *in vitro* que se asocia directamente a cambios GSH/GSSG, causado probablemente por la capacidad oxidante de los complejos. La figura 6.45 muestra el estado redox del biosensor expresado en los parásitos (graficados como biosensor reducido) luego de la incubación con las diferentes concentraciones de cada complejo.

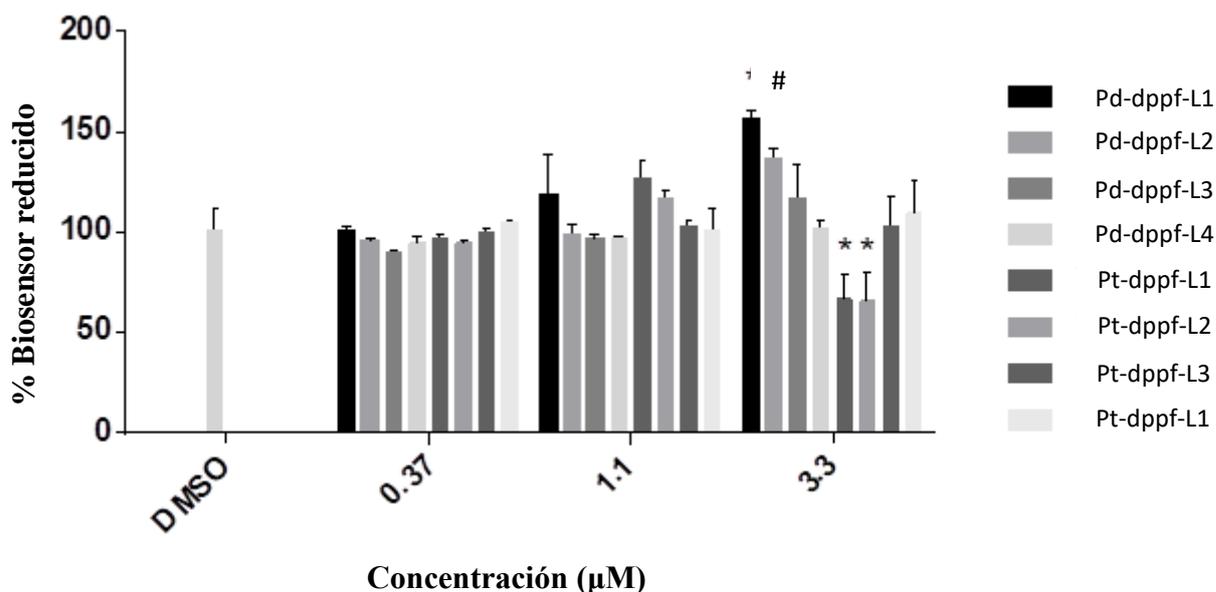


Figura 6.45: Cambios redox intracelulares inducidos por los complejos $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ sobre *T. brucei brucei*. Los valores son expresados como porcentaje

de reducción del biosensor (\pm DS) relativo a las condiciones del control (1% v/v DMSO) en tres réplicas.

Los complejos Pt-dppf-L1 y Pt-dppf-L2 fueron los únicos que generaron oxidación del biosensor de casi un 30 % luego de añadir una concentración de 4 y 5 veces, respectivamente, su valor de IC_{50} (barras marcadas con *). Este porcentaje de oxidación del biosensor es equivalente a la oxidación causada por H_2O_2 (250 μ M), agente oxidante exógeno, en las mismas condiciones experimentales. Un efecto contrario se observó en el complejo Pd-dppf-L1 (barra marcada con #) el cual mostró un incremento del 40 % de la relación de fluorescencia del biosensor, lo que podría relacionarse con la reducción del biosensor o el incremento de la expresión del mismo en los parásitos.

En base a los resultados obtenidos, se realizó un experimento para determinar si los cambios redox intracelulares reportados por el biosensor son causados por la oxidación mediada por los complejos sobre las cisteínas del biosensor o del grupo tiol del GSH fisiológico. Para esto, se purificó la forma reducida del biosensor hGrx-roGFP2 en una concentración de 1 μ M y se incubó *in vitro* durante una hora con 10 veces de exceso de la concentración de IC_{50} (10 x IC_{50}) de Pt-dppf-L1 o Pt-dppf-L2, y también en ausencia o presencia de concentraciones equimolares de GSH (10 μ M). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.46.

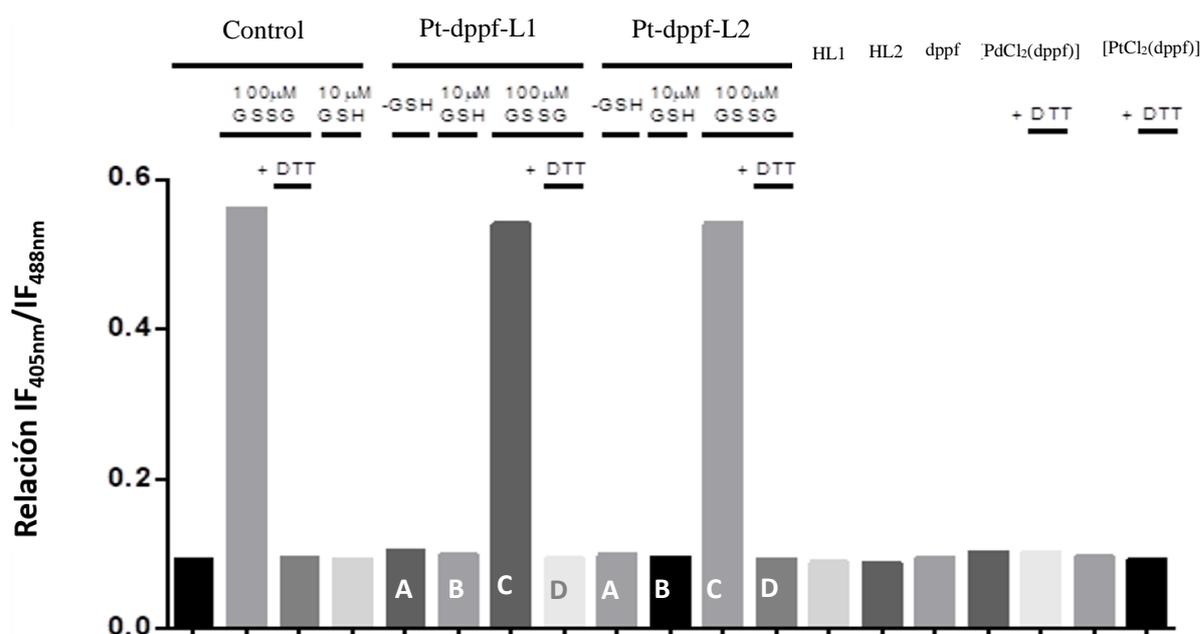


Figura 6.46: Estudio de los posibles cambios redox inducidos por los complejos M-dppf-L *in vitro* sobre el biosensor o el glutatión. Se midió a una longitud de onda de emisión

de 510 nm, y de excitación de 405 nm y 488 nm. Se representa la relación de la intensidad de fluorescencia 405/488 correspondiente a la oxidación del biosensor redox a su forma disulfuro.

El análisis reveló que ninguno de los compuestos testados fue capaz de actuar como oxidante directo de las cisteínas del biosensor o de GSH *in vitro*, debido a que no se observaron cambios en la relación IF_{405}/IF_{488} para las muestras que contenían Grx-roGFP2 reducido con y sin GSH (ver barras A y B, respectivamente). Para descartar una potencial interferencia de los complejos en la respuesta del biosensor, se realizaron nuevos experimentos. En el primero de ellos, se añadió GSSG (oxidante específico del biosensor) en la incubación, observándose en ambos casos, un aumento en la relación de intensidad de fluorescencia (ver barras C) lo que confirma la oxidación del biosensor. En el segundo experimento se añadió DTT (agente reductor del biosensor) el cual se agregó para reducir nuevamente al biosensor y verificar su capacidad redox reversible, y en ambos casos se confirmó esta reversibilidad (ver barras D).

Considerando una potencial degradación de los complejos a nivel intracelular, se realizaron ensayos similares con los ligandos libres (HL1, HL2 y dppf) y ambos precursores ($[Pd^{II}Cl_2(dppf)]$ y $[Pt^{II}Cl_2(dppf)]$) (a una concentración de 10 μM). Los resultados confirmaron que ninguno de ellos induce la oxidación del biosensor (1 μM) después de una hora de incubación.

En conclusión, a partir de los ensayos realizados se puede inferir que el efecto oxidativo intracelular desencadenado por los complejos M-dppf-L no es consecuencia de una acción directa de ellos sobre el biosensor o el glutatión. Sin embargo, y apoyado en los resultados de los estudios realizados sobre *T. cruzi*, se puede inferir que éstos requieren activación a nivel celular para generar EROS y llevar a cabo reacciones de oxidación en *T. brucei* [113].

6.3.5.4 Interacción con ADN

Se estudió la posible interacción de los complejos M-dppf-L con el ADN a efectos de determinar si esta biomolécula puede ser un nuevo blanco de acción en los parásitos.

6.3.5.4.1 Interacción con ADN mediante medidas de fluorescencia

Se estudió la interacción entre el ADN y los complejos M-dppf-L mediante experimentos de desplazamiento de bromuro de etidio (BE) del aducto {ADN-BE} por medidas de fluorescencia. El BE es una molécula conjugada plana que posee una débil emisión fluorescente intrínseca a las longitudes de onda apropiadas. En las condiciones experimentales (pH = 7,4 en buffer Tris/HCl, 2 % v/v de DMSO) el espectro de fluorescencia de esta molécula posee un máximo de emisión a 601 nm ($\lambda_{exc} = 510$ nm). Cuando esta molécula interacciona con el ADN, específicamente mediante intercalación, induce un incremento del rendimiento cuántico de fluorescencia que se expresa en un espectro de emisión con un máximo a 594 nm correspondiente al aducto {ADN-BE} [115].

El aducto {ADN-BE} ($C_{ADN} = 20 \mu\text{M}$ (por nucleótido), $C_{BE} = 10 \mu\text{M}$) fue titulado con concentraciones crecientes de cada complejo en un rango entre 0 y 110 μM , y luego de 30 minutos de incubación se midieron los espectros de emisión fluorescente ($\lambda_{exc} = 510$ nm) en un rango entre 530 y 650 nm. La figura 6.47 muestra, como ejemplo, el espectro de emisión fluorescente corregido (según se explicó en el capítulo 3) del aducto {ADN-BE} incubado con los complejos Pd-dppf-L3 y Pt-dppf-L3.

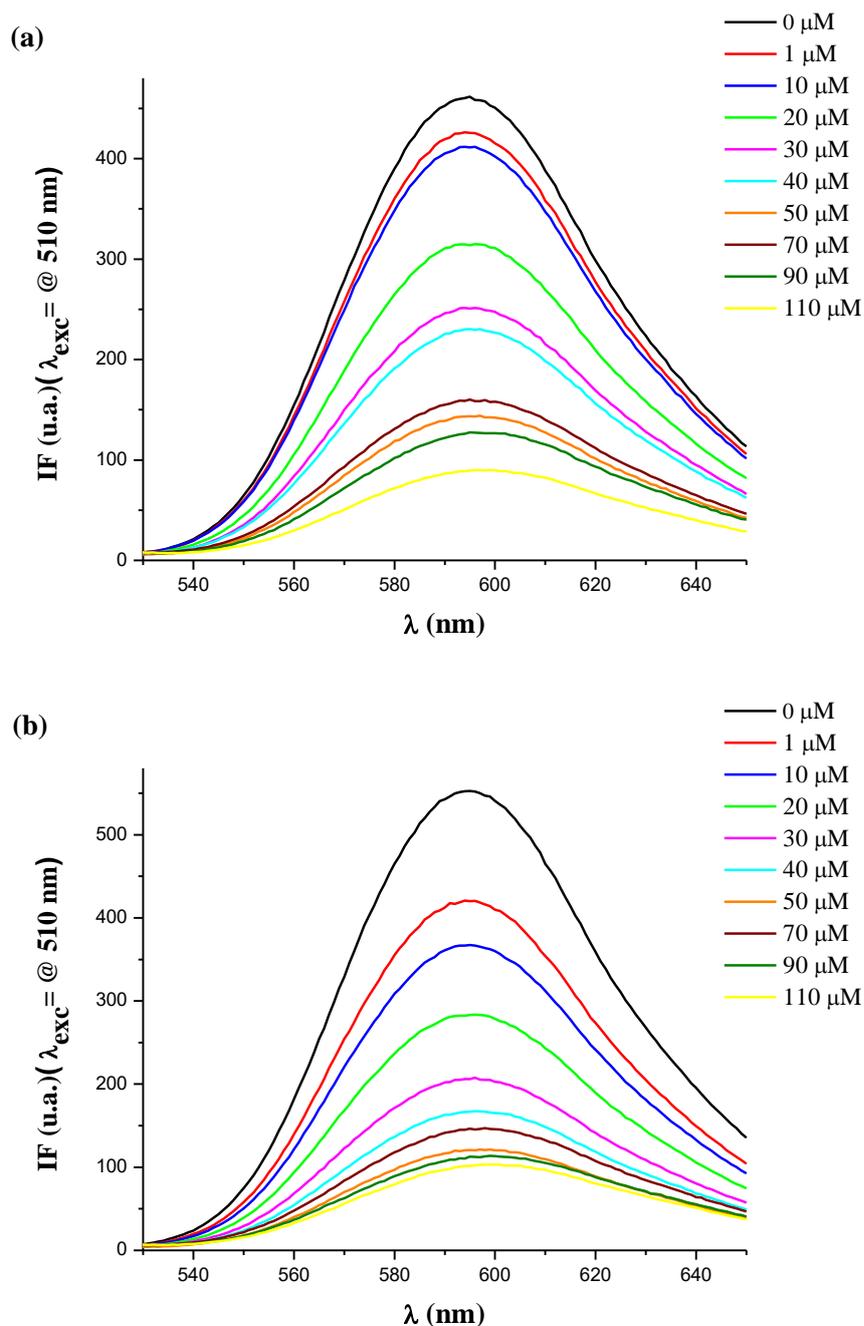


Figura 6.47: *Quenching* de la emisión fluorescente del aducto {ADN-BE} ($\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$) observado por la interacción de los complejos: (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

En todos los espectros se observó una disminución de la fluorescencia del aducto {ADN-BE} al aumentar la concentración de complejo, obteniéndose una disminución de la intensidad relativa de fluorescencia (% IF) de hasta un 80%, como se muestra en la figura 6.48. En ambas series de compuestos se observó que los complejos con el ligando L1 son quienes generan el mayor grado de *quenching* fluorescente de este aducto.

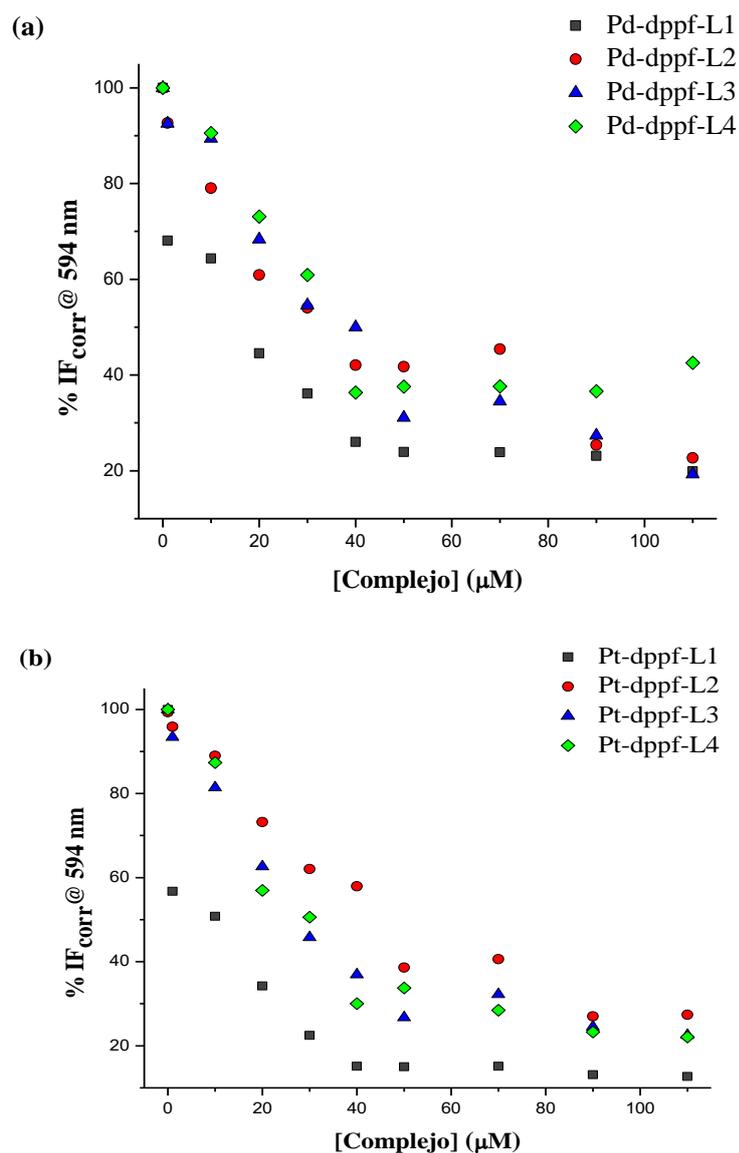


Figura 6.48: Intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{em} = 594$ nm al incrementar la concentración de los complejos de (a) Pd(II) y (b) Pt(II). Cuadrados: complejos con el ligando L1, círculos: complejos con el ligando L2, triángulos: complejos con el ligando L3 y rombos: complejos con el ligando L4.

A concentraciones de complejo superiores a $50 \mu\text{M}$ no se observaron variaciones en la *quenching* de la fluorescencia del aducto. Sin embargo, se observó un desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión fluorescente (figura 6.49). Se observó un desplazamiento batocrómico de hasta 7 nm, cambiando el máximo de emisión de 594 nm a 601 nm (λ_{max} característico del espectro de BE libre) [50]. Este comportamiento sería indicativo de un desplazamiento de BE del aducto como consecuencia de la interacción

de los complejos con la biomolécula, ya sea por intercalación o por que la interacción induce cambios conformacionales en el ADN que afectan los sitios de unión con BE.

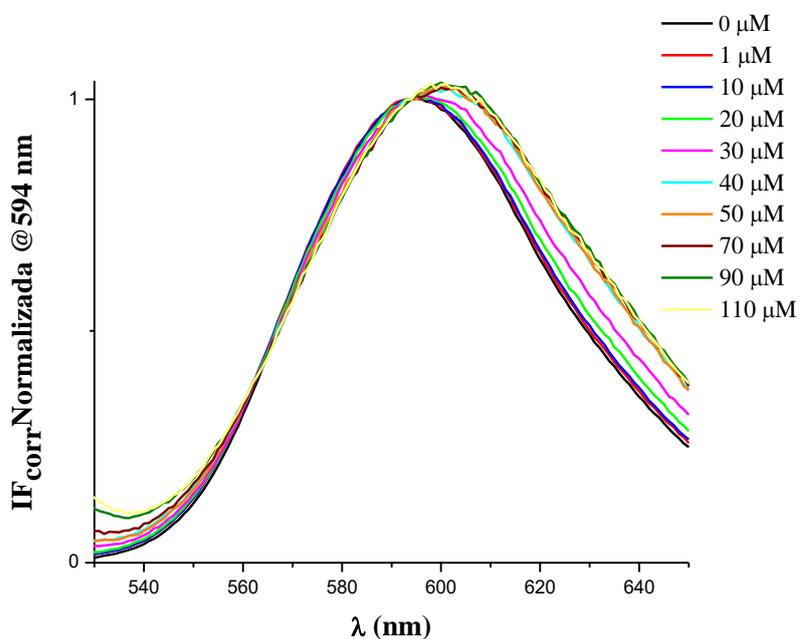


Figura 6.49: Intensidad relativa de fluorescencia normalizada al aumentar la concentración de complejo. Se muestra el espectro del aducto {ADN-BE} incubado con el complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Se evaluaron los mecanismos implicados en la desactivación de la fluorescencia del aducto {ADN-BE} mediante el análisis de Stern-Volmer [116]. El ajuste realizado en cada sistema mostró en todos los casos una desviación positiva de la linealidad de la ecuación de Stern-Volmer (figura 6.50). Este efecto es frecuentemente observado cuando el grado de *quenching* es relativamente alto. La gráfica es lineal a bajas concentraciones de complejo, permitiendo calcular la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) para cada sistema. Los resultados de este ajuste se resumen en la tabla 6.27.

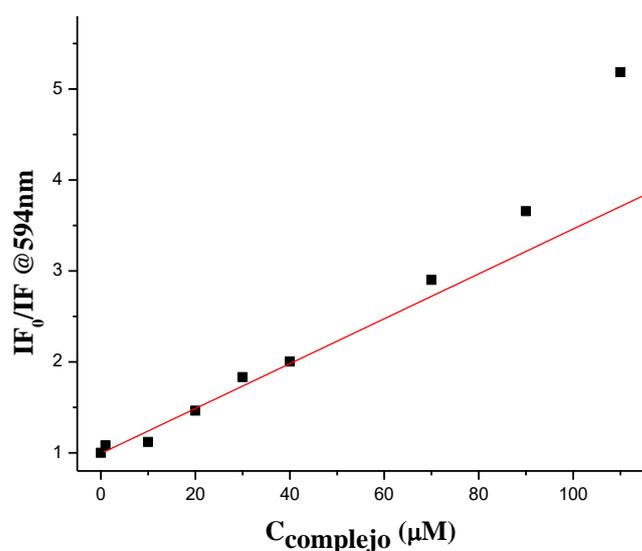


Figura 6.50: Ajuste de Stern Volmer para la titulación del aducto {ADN-BE} con concentraciones crecientes del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$.

Tabla 6.27: Constantes de Stern-Volmer y valor de R^2 obtenidos en el ajuste para los sistemas $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ en la unión competitiva del aducto {ADN-BE} en medio 5 % DMSO/Tris/HCl.

Complejo	$K_{\text{sv}} (\text{M}^{-1})$	$\log K_{\text{sv}}$	R^2
Pd-dppf-L1	66550	4,8	0,984
Pd-dppf-L2	27621	4,4	0,994
Pd-dppf-L3	29319	4,5	0,991
Pd-dppf-L4	21883	4,3	0,950
Pt-dppf-L1	101529	5,0	0,996
Pt-dppf-L2	18229	4,3	0,991
Pt-dppf-L3	43689	4,6	0,995
Pt-dppf-L4	36988	4,6	0,996

En conclusión, todos los compuestos redujeron la intensidad de fluorescencia del aducto {ADN-BE}, siendo los complejos con el ligando L1 los que mostraron el mayor grado de *quenching*. Los valores de $\log K_{\text{sv}}$ obtenidos, a partir del ajuste de Stern-Volmer, son del mismo orden de magnitud a los reportados en los complejos $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{L})(\text{PTA})]$ ($\text{M} = \text{Pd}$ o Pt) que incluyen a estas mismas tiosemicarbazonas [50] y a los complejos RuCpL discutidos en el capítulo 4.

6.3.6.2

Interacción con ADN mediante medidas de dicroísmo circular

Se realizaron estudios de interacción de los complejos M-dppf-L con ADN mediante medidas de dicroísmo circular (DC). El dicroísmo circular es una técnica espectrofotométrica utilizada para analizar sistemas ópticamente activos generados cuando existe quiralidad [117]. Las bases nitrogenadas del ADN son moléculas planas no quirales (ópticamente inactivas), que al estar inmersas en el esqueleto fosfato-azúcar del ADN (mediante enlace glicosídico de C1 del azúcar a N9 de las purinas o N1 en las pirimidinas) adquieren quiralidad (figura 6.51). Esta unión provoca una perturbación de la absorción de la luz ultravioleta de las bases, donde el acoplamiento esteroespecífico de las transiciones electrónicas degeneradas entre bases cromóforas vecinas, da como resultado un espectro de dicroísmo circular característico del ADN en un rango entre 180 a 300 nm [118,119].

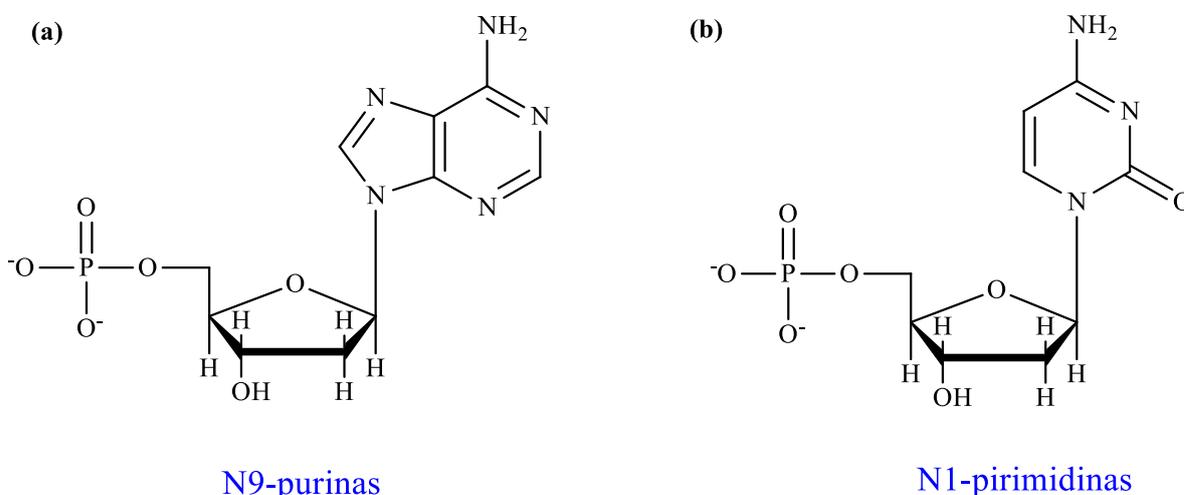


Figura 6.51: Esqueleto fosfato-azúcar del ADN donde se muestra (a) el enlace glicosídico de C1 de ribosa a N9 de las purinas y (b) el enlace glicosídico de C1 de ribosa N1 en las pirimidinas

Los estudios de DC en este intervalo de longitud de onda, proporcionan información sobre las características conformacionales de los ácidos nucleicos en solución, y, por lo tanto, permiten realizar un análisis cualitativo de la conformación del ADN (forma B, forma A, Forma Z, entre otras estructuras del ADN). Se postula que la forma B del ADN es la más

frecuente en sistemas biológicos [120]. Ésta presenta un espectro DC que muestra una banda positiva con un máximo a 275 nm debida al apilamiento de bases del ADN, y una banda negativa a 245 nm debida a la helicidad derecha del ADN [121,122]. Las moléculas que interactúan con el ADN son comúnmente moléculas no quirales que al unirse a la biomolécula pueden generar cambios en los espectros de dicroísmo circular del ADN. Estas variaciones conducen a cambios en la banda positiva y/o negativa (o ambas) propias del espectro DC del ADN, las que pueden sufrir un aumento o una disminución de la intensidad, o un corrimiento batocrómico o hipsocrómico. Estas modificaciones en los espectros DC son indicativas de cambios conformacionales en la biomolécula debido a la unión de un compuesto. A su vez, cambios en el tiempo y/o cambios totales en el espectro DC podrían relacionarse con la ruptura de la estructura del ADN.

Por otro lado, la interacción de pequeñas moléculas con el ADN puede inducir señales en el espectro de dicroísmo circular del ADN en zonas donde éste no las posee (DCI = dicroísmo circular inducido) [121]. Las señales DCI son comúnmente observadas cuando existe una fuerte interacción de estas moléculas con el ADN, por ejemplo cuando la unión ocurre mediante interacción covalente. Por lo tanto, la modificación de las señales del espectro DC del ADN o la presencia de DCI son indicativas de posibles cambios conformacionales, daños o ruptura de la estructura del ADN debido a la interacción con pequeñas moléculas.

Utilizando dicroísmo circular se estudió la interacción de los complejos M-dppf-L con el ADN, y para complementar el análisis realizado, se incluyeron los precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$ y el ligando dppf en la forma libre. Para los experimentos de interacción entre el ADN con los precursores y el ligando dppf, se utilizó metanol como disolvente y una concentración final de 2,5 % v/v. Estudios previos han demostrado que, utilizando esta concentración de metanol en el medio no se generan daños en la estructura del ADN, permitiendo así realizar las medidas de los espectros DC entre 200-300 nm sin dificultad [123]. En la figura 6.52 se muestran los espectros DC del ADN en presencia de ambos precursores.

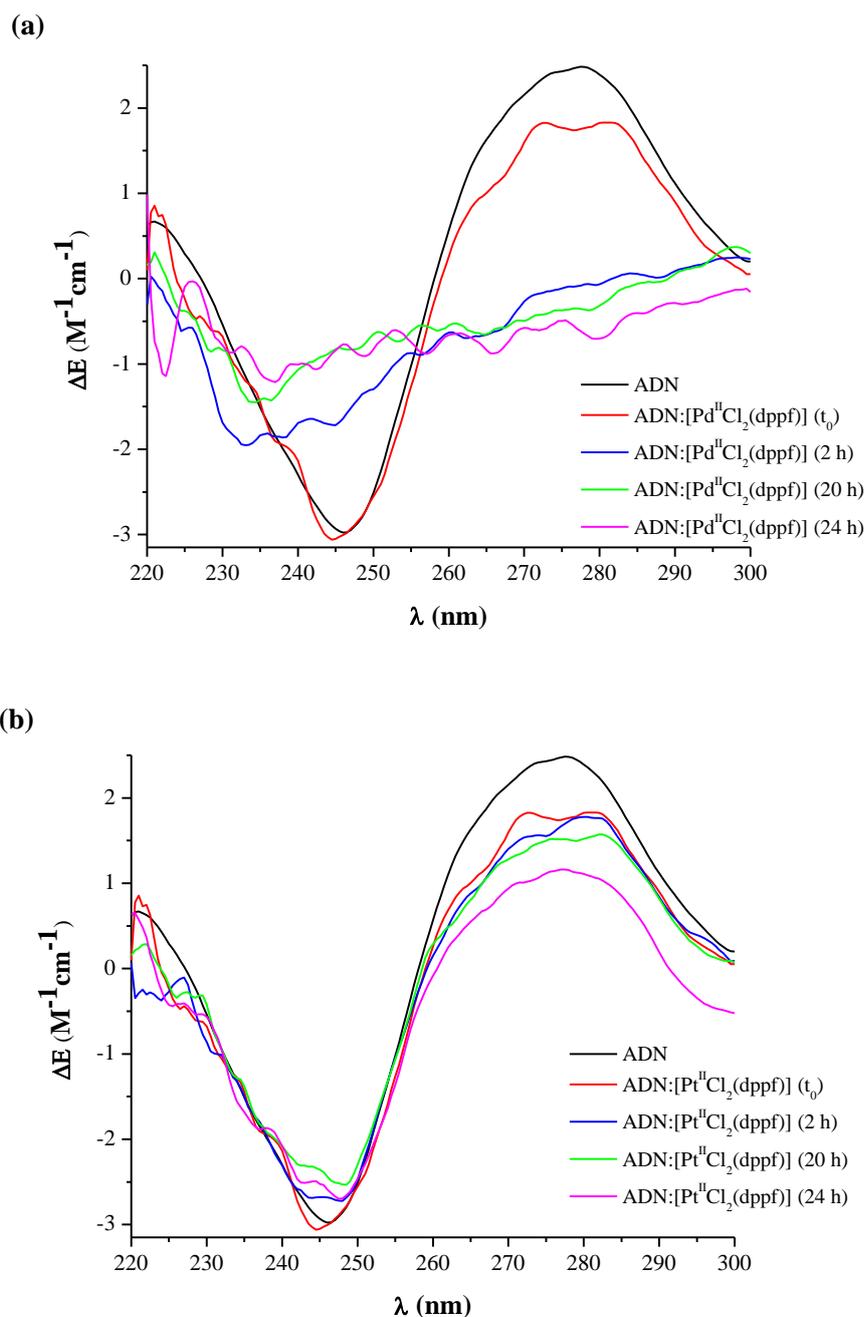
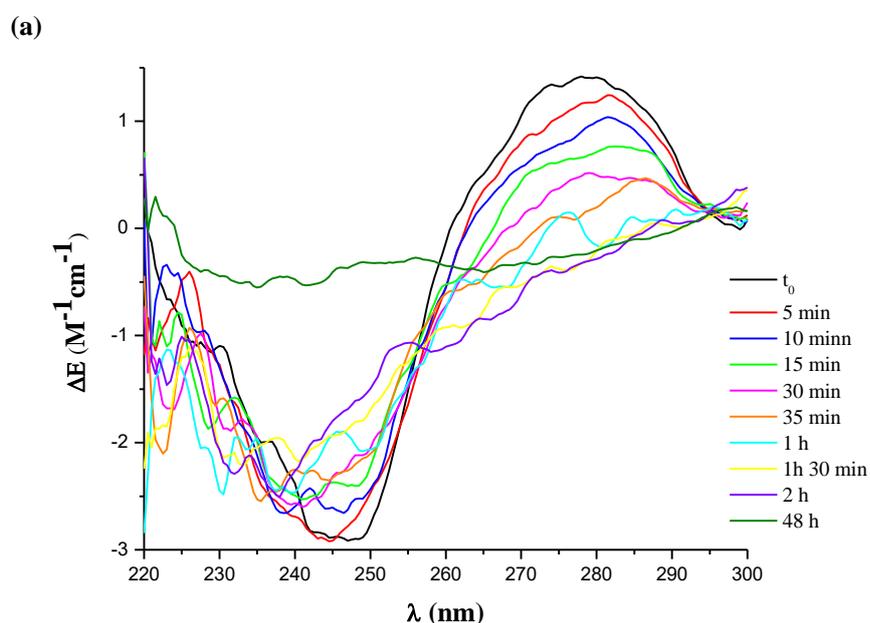


Figura 6.52: Espectro de dicroísmo circular medido a diferentes tiempos en un rango entre 220 y 300 nm (1 cm de camino óptico) de CT-DNA (50 μM) en ausencia y presencia de (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$. Se utilizó una relación molar ADN: compuesto 1:1 (por nucleótido de ADN).

Se observó en ambos sistemas una disminución inmediata (t_0) de la intensidad de la banda positiva del espectro DC del ADN debido a la interacción entre la biomolécula y ambos precursores. Los espectros medidos a diferentes tiempos después de la preparación de la mezcla mostraron una continua disminución de la intensidad de esta señal. La

disminución de intensidad de la banda fue más marcada en la muestra de ADN incubada con el precursor de Pd(II), y para estudiar este comportamiento se midieron los espectros ADN:precursor(Pd) en menores intervalos de tiempos (figura 6.53a). Se observó que hasta dos horas después de la preparación de la mezcla, existe una gradual disminución de la intensidad de la banda positiva y negativa del espectro DC del ADN, hasta una desaparición casi completa de ambas bandas luego de 48 horas de estudio. Los cambios observados en el espectro DC indicarían que el complejo precursor de paladio luego de interactuar con el ADN generaría múltiples quiebres en la estructura de la biomolécula provocando la pérdida completa de su conformación luego de 20 horas [124]. Por otro lado, el espectro DC del ADN incubado con el precursor de platino mostró variaciones en el tiempo sólo en la banda positiva, lo que indicaría que el mecanismo de interacción con la biomolécula sería diferente al de su análogo de paladio [125].

Los espectros de DC del ADN en presencia del ligando dppf libre fueron medidos utilizando diferentes relaciones molares ADN:dppf. En los espectros se observó que, independientemente de la relación molar utilizada, no existen variaciones en el espectro DC del ADN (figura 6.53 b).



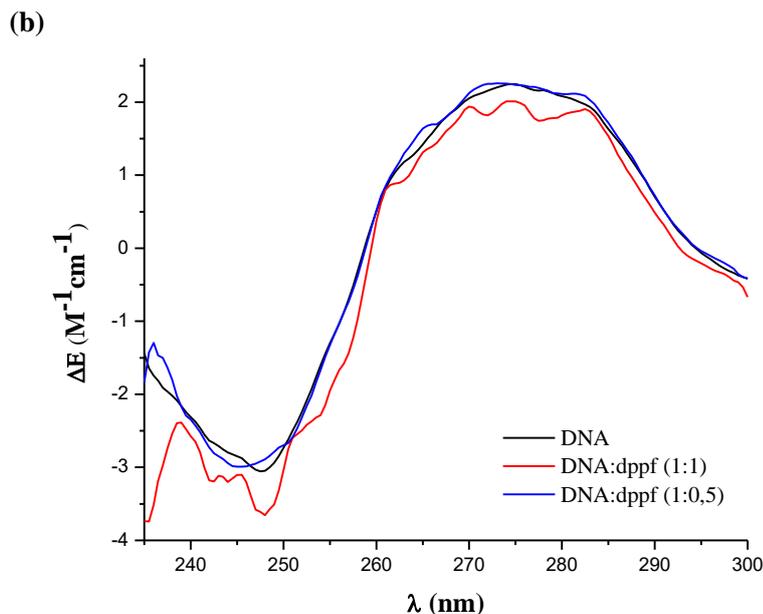


Figura 6.53: (a) Espectro de dicroísmo circular medido a diferentes tiempos en un rango entre 220 y 300 nm (1 cm de camino óptico) de CT-DNA (50 μM) en presencia de $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ (relación molar ADN: compuesto 1:1 (por nucleótido de ADN)). (b) Espectro de dicroísmo circular de ADN en presencia del ligando dppf en su forma libre a diferentes relaciones molares.

Los estudios de DC confirmaron la interacción entre los precursores $[\text{M}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ y el ADN y su mecanismo estaría influenciado por la naturaleza del centro metálico. Si bien podría existir un efecto asociado a la velocidad de sustitución, que como se mencionó en la introducción, sería mayor en complejos de Pd(II), los resultados señalan que el complejo precursor de paladio generaría quiebres de la estructura del ADN en el tiempo, y el complejo de platino afectaría el apilamiento de las bases nitrogenadas de la biomolécula. Estos resultados están en concordancia con lo reportado en otros estudios de interacción con ADN de complejos análogos de Pd(II) y Pt(II), en los cuales se demostró que el tipo de centro metálico generaría diferentes mecanismos de interacción con la biomolécula [125]. Si bien la presencia del ligando dppf en su forma libre no mostró cambios en los espectros DC del ADN, se confirmó que la unión de este ligando a ambos centros metálicos es fundamental para que ocurran los cambios conformacionales observados en la biomolécula.

Para los estudios de interacción con ADN de los complejos M-dppf-L se utilizó DMSO como disolvente de estos compuestos, provocando que los espectros DC del ADN no

podieran ser medidos a una longitud de onda menor a 235 nm. Por lo tanto, se midieron los espectros DC en el rango del visible, entre 300 y 600 nm, para identificar posibles señales de DCI. Los espectros DC del ADN medidos en presencia de cada complejo se muestran en la figura 6.54.

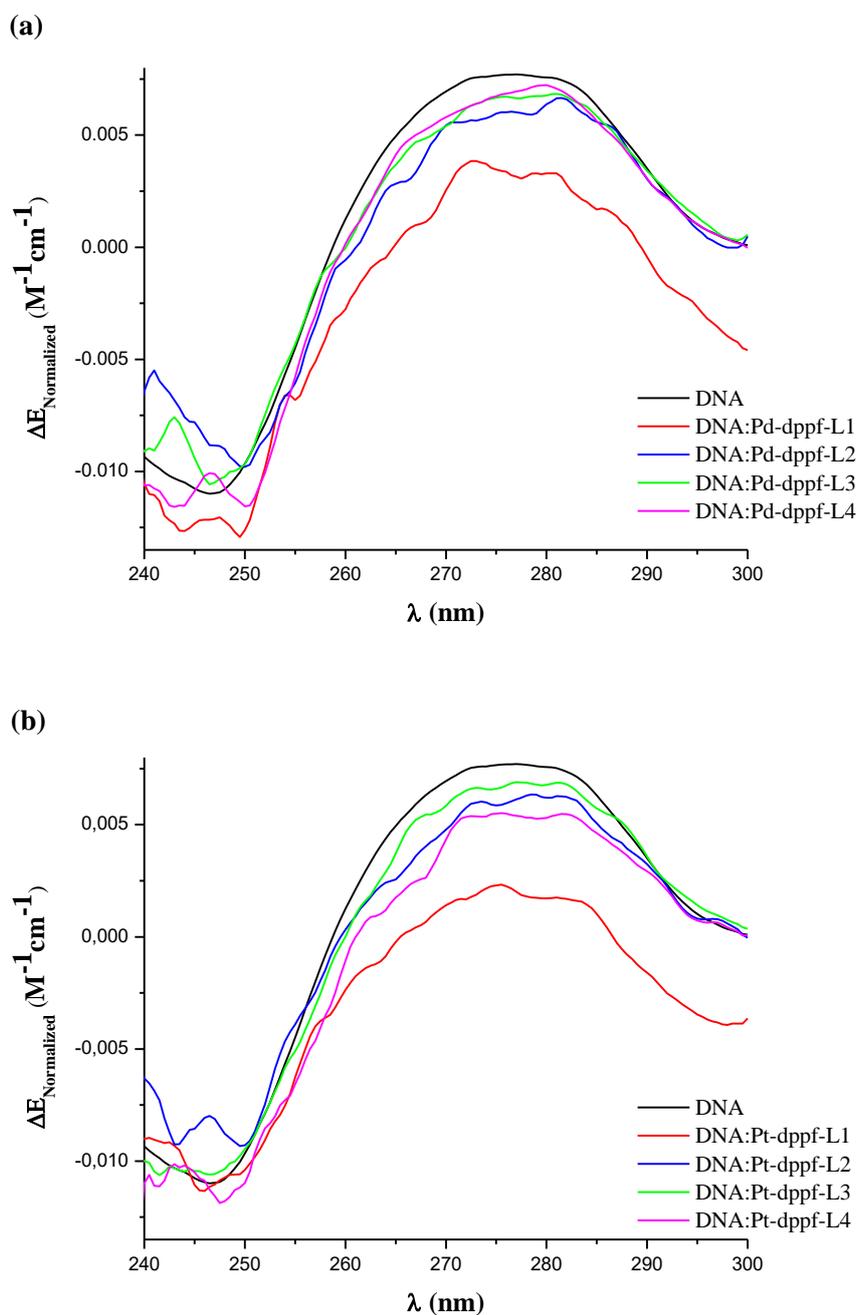
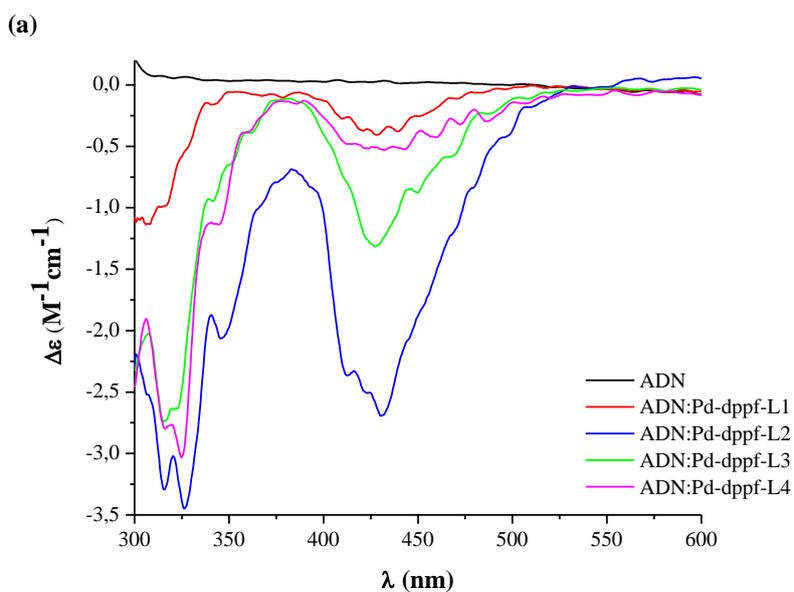


Figura 6.54: Espectros de dicroísmo circular medidos a tiempo cero en un rango entre 240 y 300 nm (1 cm de camino óptico) de CT-DNA (50-60 μM) en ausencia y presencia de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Se utilizó una relación molar ADN: compuesto 1:0,5 (por nucleótido de ADN).

Los espectros DC mostraron que inmediatamente luego de realizar la mezcla ADN:complejo (t_0), existe una disminución de la intensidad de la banda positiva del espectro de ADN. Los complejos con el ligando bioactivo L1 presentaron la mayor disminución de la intensidad de esta señal, señalando que probablemente serían los complejos M-dppf-L1 los que generan los mayores cambios conformacionales en la biomolécula.

Todos los espectros DC fueron medidos luego de 20 horas de la preparación de la mezcla, no observándose modificación alguna en ellos. Esto indicaría que la interacción entre los complejos y el ADN se mantiene durante el tiempo de estudio, o dicho de otra forma, que la nueva conformación adoptada por el ADN debida a la presencia de los compuestos, es constante en el tiempo. Este comportamiento señala que el tipo de interacción entre los compuestos M-dppf-L y el ADN es diferente al efectuado por los precursores, donde probablemente serían los ligandos tiosemicarbazonas los responsables de este tipo de interacción. Además, se observó que la magnitud de los cambios conformacionales generados en el ADN es independiente de la naturaleza del centro metálico, y estaría determinada sólo por el tipo de ligando tiosemicarbazona de cada complejo.

Se midieron los espectros DC en el rango del visible bajo las condiciones experimentales mencionadas en el capítulo 3. El espectro de DC obtenido para cada mezcla ADN:complejo se muestra en la figura 6.55.



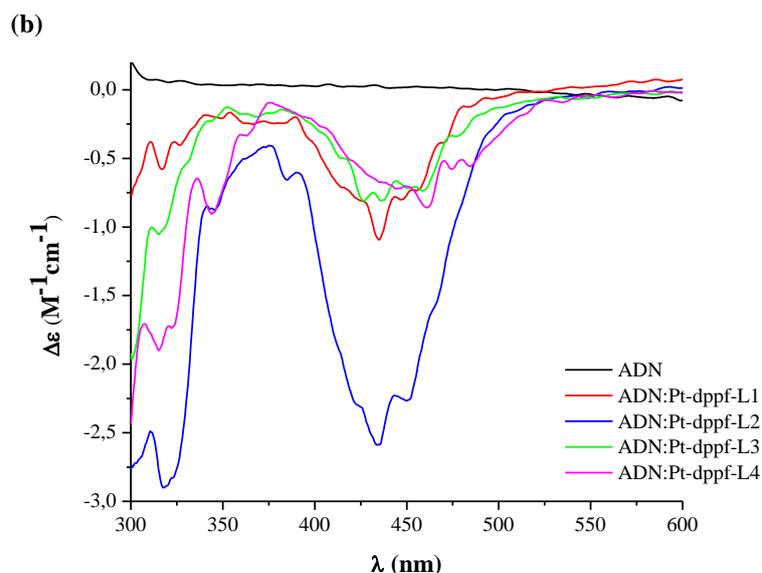


Figura 6.55: Espectro de dicroísmo circular medidos a tiempo cero en el intervalo entre 300-600 nm (2 cm de camino óptico) de CT-DNA (200 μM) en ausencia y presencia de los complejos (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. Se utilizó una relación molar ADN: compuesto 1:0,5 (por nucleótido de ADN).

En todos los espectros DC se observaron dos bandas DCI, una cercana a los 330 nm y otra cercana a 450 nm. La presencia de estas dos señales DCI indica la unión, o al menos la formación de un aducto, entre el ADN y cada complejo organometálico. Por otro lado, los espectros de absorción UV-vis de los complejos M-dppf-L medidos en DMSO/buffer (Tris/HCl), poseen dos máximos de absorción cercanos a estos mismos valores de longitud de onda, por lo que se puede atribuir las dos señales DCI a la presencia de una fuerte interacción entre los complejos y la biomolécula, probablemente mediante enlace covalente.

Los complejos con el ligando bioactivo L2 mostraron la mayor intensidad de las bandas DCI, lo que indicaría que estos complejos son los que poseen la interacción más fuerte con el ADN. En ambas series de complejos se observó que la magnitud de la interacción sería mayor en los complejos de L2, seguidas por los de L3, L4 y L1.

En resumen, se puede concluir que los ocho complejos interaccionan con el ADN y que su mecanismo de interacción sería distinto al propuesto para los precursores. El análisis en la zona del ultravioleta reveló que la unión de los complejos genera cambios conformacionales en el ADN, siendo los complejos con el ligando L1 los que producen

los mayores cambios estructurales en la biomolécula. Esto se podría interpretar como que aquellos complejos con los ligandos con sustituyente R más pequeño, poseen una mayor capacidad de penetración en la molécula de ADN, como por ejemplo entre los pares de bases, afectando en mayor magnitud a la conformación de la biomolécula. Por otro lado, el análisis en el rango del visible reveló la interacción con el ADN de todos los complejos. Serían los complejos con el ligando L2 los que presentan la interacción más fuerte con la biomolécula.

6.3.6 Interacción con BSA

6.3.6.1 Interacción con BSA mediante medidas de fluorescencia

En función de los resultados obtenidos en los estudios de interacción entre BSA y el complejo Pd-dppf-mpo, se empleó la técnica de fluorescencia para estudiar la interacción de los complejos M-dppf-L con esta proteína transportadora.

Se utilizó como modelo la interacción del complejo Pd-dppf-L3, y se midieron los espectros de emisión fluorescente de BSA ($1 \mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{exc}}=295 \text{ nm}$), en un rango entre 300 y 450 nm, en presencia de concentraciones crecientes de este complejo (utilizando un intervalo de relación molar BSA:complejo entre 0 a 20). Luego de la corrección de los espectros de fluorescencia se obtuvo el espectro de emisión fluorescente que se muestra en la figura 6.56.

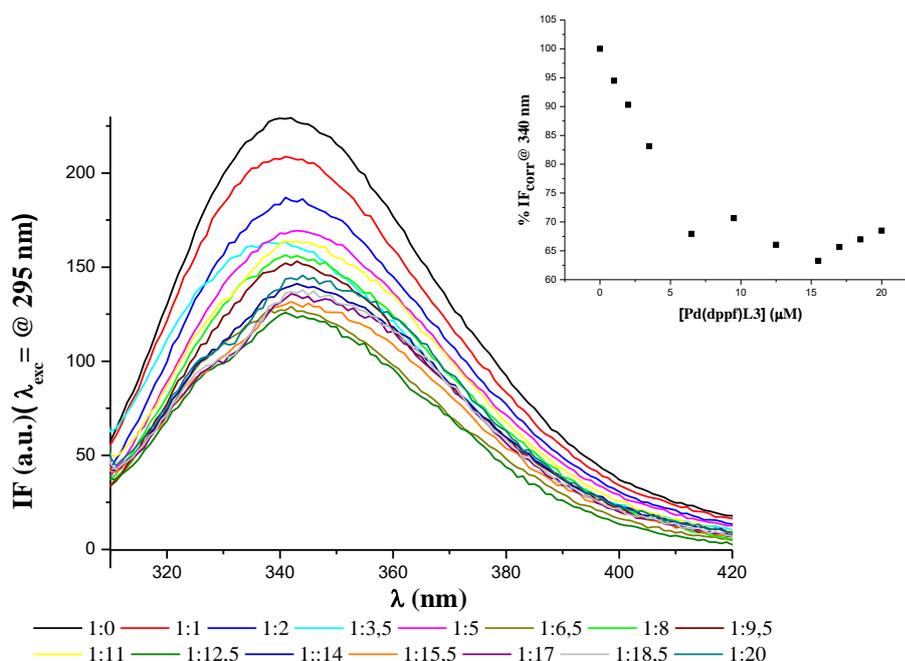


Figura 6.56: Espectro de fluorescencia corregido de la titulación de BSA (1 μM) con diferentes relaciones molares del complejo $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$. En el cuadro superior se muestra la gráfica de Intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ al aumentar la concentración de complejo.

Se observó una disminución de la intensidad de emisión fluorescente intrínseca de la proteína al aumentar la relación molar con el complejo Pd-dppf-L3, provocando un *quenching* de la fluorescencia de hasta un 70 %. Se observó un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión fluorescente de hasta 4 nm (figura 6.57) al aumentar la relación molar BSA:complejo, lo que indicaría un aumento de la hidrofobicidad en la región que rodea a los residuos de triptófano fluorescentes de la BSA, probablemente debido a la interacción con el complejo Pd-dppf-L3 [75,80–83].

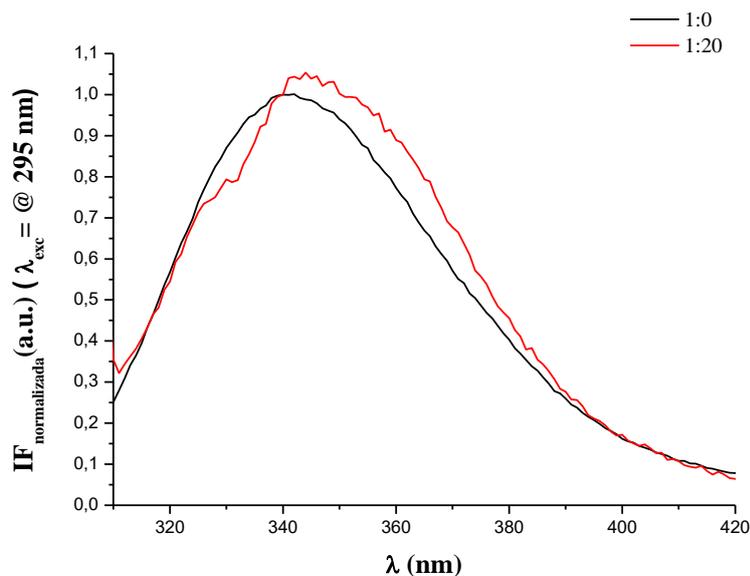


Figura 6.57: Espectro de fluorescencia normalizado de la titulación de BSA (1 μM) con relaciones molares BSA: $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L3})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ 1:0 (línea negra) y 1:20 (línea roja).

El grado de *quenching* de la fluorescencia de la proteína por efecto de la interacción con el complejo, se analizó mediante el ajuste de Stern-Volmer. En la figura 6.58a se muestra la relación lineal existente entre IF_0/IF al aumentar la concentración de complejo ($R^2 = 0,9939$). De la pendiente de esta gráfica se obtuvo un valor de $K_{\text{SV}} = 5,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, lo que señala un menor grado de apagamiento de la fluorescencia comparado con el calculado en Pd-dppf-mpo, pero similar a lo comúnmente observado en estudios con otros complejos metálicos que interaccionan con la proteína [79,84].

La constante de unión aparente (K_a) entre BSA y Pd-dppf-L3 fue calculada a partir del ajuste derivado de la ecuación de Hill (figura 6.58b). La gráfica de ajuste mostró una relación lineal entre el $\log[(\text{IF}_0/\text{IF})/\text{IF}]$ y el logaritmo de la concentración de complejo ($R^2 = 0,9907$). La constante de unión K_a calculada a partir de la pendiente de la curva fue de $6,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, y según el intercepto con el eje de las ordenadas se calculó un único tipo de sitio de unión entre BSA y el complejo ($n \sim 1$).

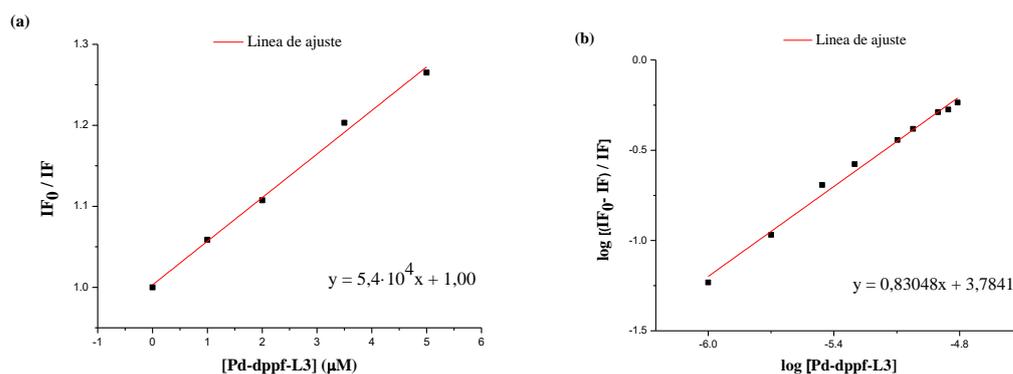


Figura 6.58: (a) Ajuste de Stern Volmer para la titulación de BSA (1 μM) con diferentes concentraciones de $[Pd^{II}(L3)(dppf)](PF_6)$. (b) Ajuste derivado de la ecuación de Hill para la titulación de BSA (1 μM) con diferentes relaciones molares de $[Pd^{II}(L3)(dppf)](PF_6)$.

6.3.6.2 Interacción con BSA mediante medidas de dicroísmo circular

Se realizaron estudios de interacción entre BSA y los complejos M-dppf-L mediante el análisis de espectros de dicroísmo circular. Los espectros DC medidos en el rango del ultravioleta brindan información sobre la estructura secundaria de la proteína, y específicamente modificaciones en los espectros en un rango entre 250-350 nm (UV cercano) dan información sobre la interacción con pequeñas moléculas. La proteína BSA posee un espectro característico en este rango, y a longitudes de onda superiores no presenta señal, por lo que la interacción con complejos de coordinación puede inducir señales DCI en el espectro.

Se utilizó la técnica de DC para estudiar la interacción de los complejos M-dppf-L con BSA, y al igual que en los estudios con ADN, se incluyeron los precursores $[M^{II}(dppf)Cl_2]$ en el análisis.

En relación a los estudios de interacción con los precursores, se utilizó metanol como disolvente de estos compuestos (concentración final de 10 % v/v en el medio). Estudios previos han demostrado que a esta concentración no se generan daños en la estructura de la proteína, permitiendo realizar las medidas de los espectros DC entre 250-300 nm sin dificultad. Para el estudio de interacción con los complejos M-dppf-L se utilizó DMSO como disolvente de éstos (concentración de 15 % v/v en el medio), por lo que sólo fue

posible medir a longitudes de onda superiores a 300 nm como será explicado más adelante.

Los espectros de dicroísmo circular de BSA en presencia de los precursores fueron medidos en el rango del UV cercano y en el rango del visible. En la figura 6.59 se muestran los espectros DC de BSA medidos, en un rango entre 330 y 600 nm, en ausencia y presencia de los precursores. Los espectros fueron registrados luego de 10 minutos de realizar las mezclas BSA:precursor.

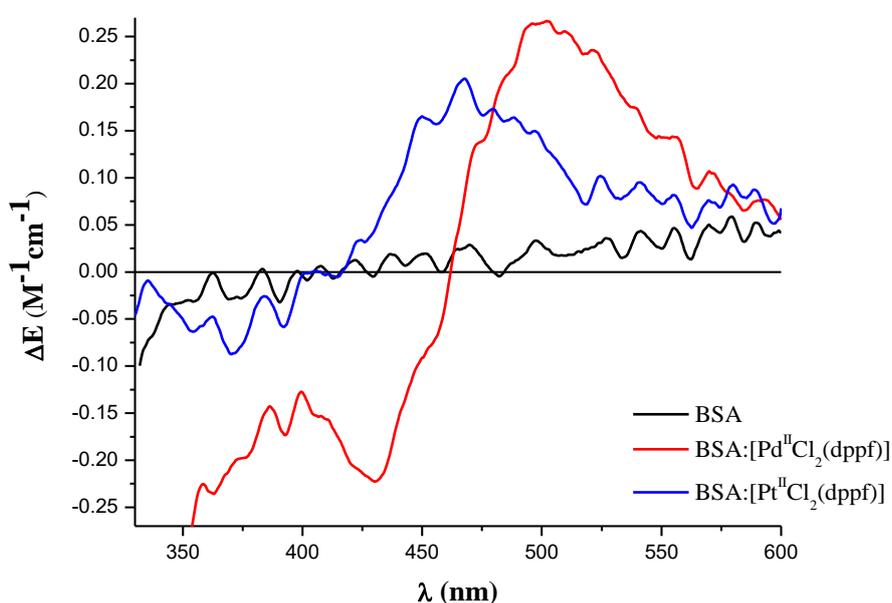


Figura 6.59: Espectro de dicroísmo circular medido en un rango de 330-600 nm (2 cm de camino óptico) de BSA (100 μM) en ausencia y presencia de $[\text{Pd}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ y $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ en relación molar 1:1.

Los espectros de ambos sistemas BSA:precursor mostraron dos señales de DCI, una banda positiva y una banda negativa, que son indicativas de alguna interacción covalente entre estos compuestos y la proteína. Las bandas DCI en el espectro DC con el precursor de paladio se observaron a $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{min}} = 430 \text{ nm}$, y con el precursor de platino a $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{min}} = 420 \text{ nm}$. Posteriormente, ambas mezclas BSA:precursor fueron incubadas durante 24 horas a 35°C y se registraron nuevamente los espectros DC (figura 6.60).

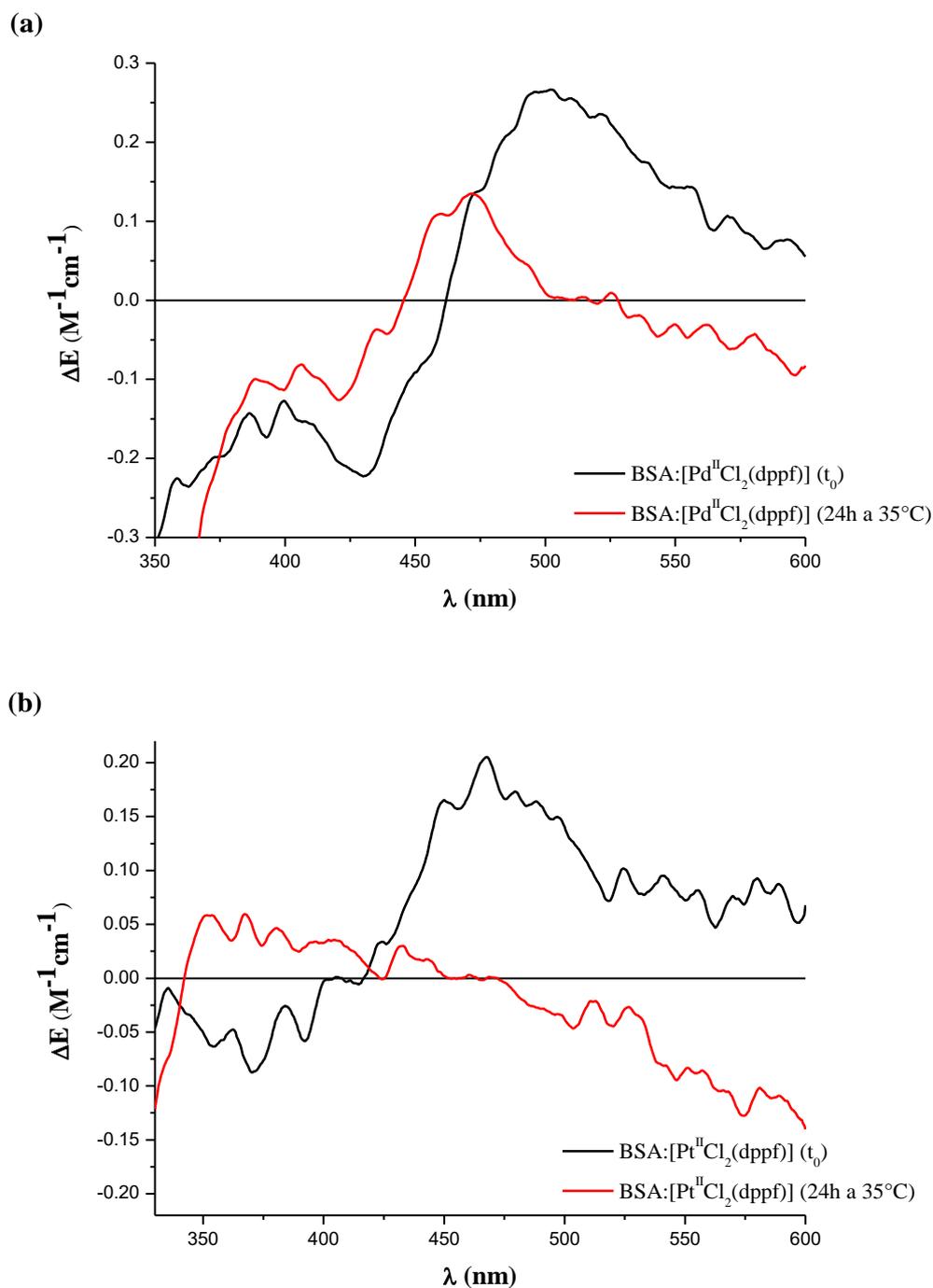


Figura 6.60: Espectro de dicroísmo circular en un rango de 330-600 nm (2 cm de camino óptico) de BSA (100 μM) presencia de (a) [Pd^{II}]Cl₂(dppf) y (b) [Pt^{II}]Cl₂(dppf) en relación molar 1:1. Los espectros fueron medidos 10 minutos luego de realizada la mezcla BSA:precursor (líneas negras) y posterior a la incubación a 35°C por 24 horas (líneas rojas).

En la incubación con el precursor de paladio se observó disminución de la intensidad y desplazamiento hipsocrómico de ambas señales DCI, observándose un desplazamiento de casi 30 nm en la banda positiva. Este comportamiento sugiere dos posibles interpretaciones: la primera señala la idea de que este complejo precursor se uniría en primer lugar a la proteína a través del fragmento hidrofóbico dppf y luego se reacomodaría espacialmente en el tiempo hasta adquirir una orientación más favorable; la segunda hipótesis planteada sugiere que el complejo se uniría a más de un sitio en la proteína, con una preferencia cinética por uno de estos sitios de unión, y que en el transcurso del tiempo ocurriría un rearrreglo a otro(s) sitio(s) generando una interacción más estable [80,126]. El estudio en el tiempo del precursor de Pt(II) reveló un comportamiento diferente a su análogo de paladio, observándose que ambas señales DCI disminuyen su intensidad hasta casi ser despreciables o nulas, lo que indicaría que la rápida interacción observada entre este precursor y BSA no existiría luego del tiempo de incubación.

Los espectros DC registrados en el rango del UV (250-300 nm) también fueron medidos a los 10 minutos de realizada la mezcla y 24 horas luego de la incubación a 35°C. Todos ellos se muestran en la figura 6.61.

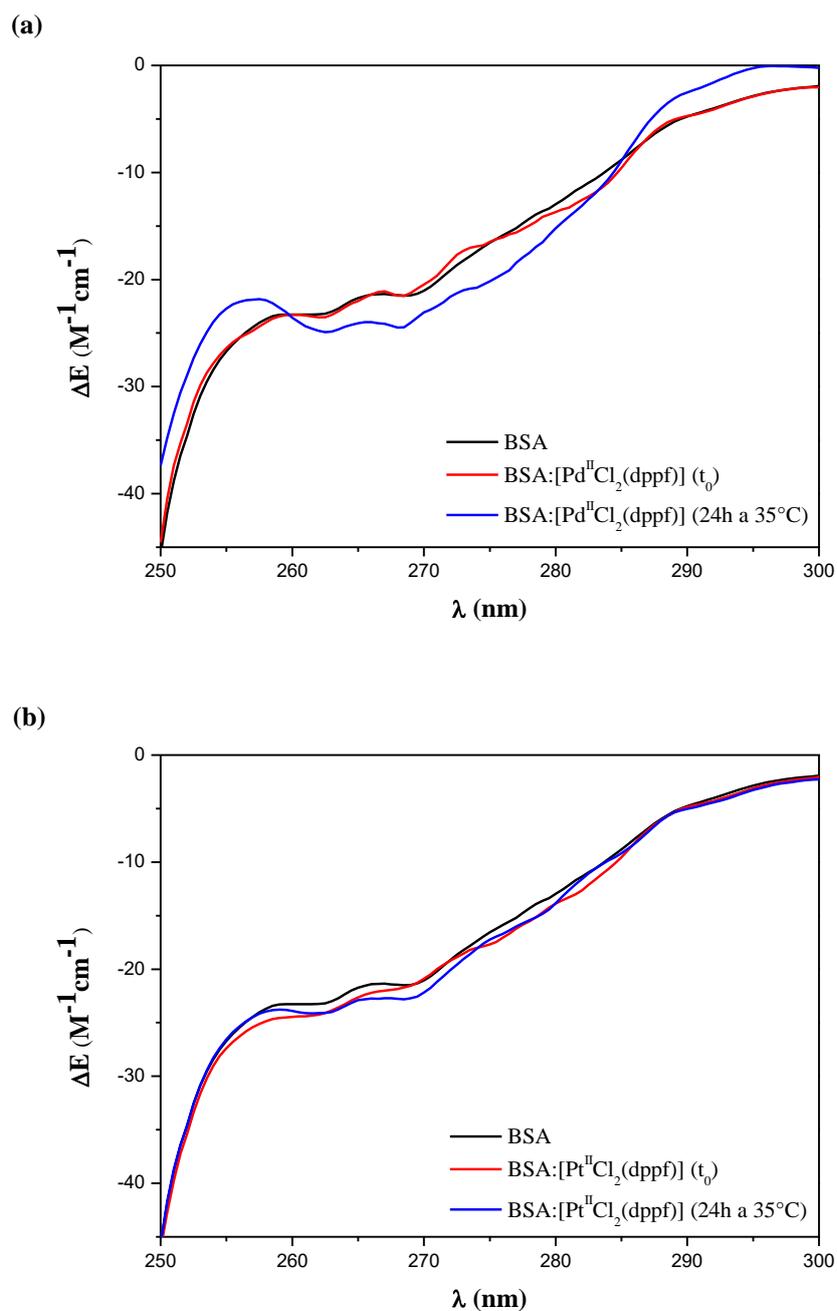


Figura 6.61: Espectro de dicroísmo circular en un rango de 250-300 nm (1 cm de camino óptico) de BSA (100 μ M) en presencia de (a) $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{dppf})\text{Cl}_2]$ y (b) $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{dppf})\text{Cl}_2]$ en relación molar 1:1. Los espectros fueron medidos 10 minutos luego de realizada la mezcla BSA:precursor (línea roja) y posterior a la incubación a 35°C por 24 horas (línea azul).

Los espectros medidos inicialmente mostraron que ambos precursores generan un leve cambio en el espectro DC propio de la proteína, lo que evidencia la rápida interacción entre ellos (concordante con lo observado en el estudio en el rango del visible). Los

espectros DC medidos posteriormente a la incubación de 24 horas mostraron variaciones que fueron mayores en la mezcla con el precursor de paladio.

Comparando los espectros medidos en ambas zonas espectrales, el precursor de paladio mostró en ambos casos una rápida interacción con BSA la cual se modifica en el tiempo hasta alcanzar un complejo BSA:precursor de Pd más estable. Esta interacción en el tiempo es la responsable de generar los mayores cambios sobre la estructura secundaria de la proteína. Para el precursor de Pt(II), no se observaron grandes modificaciones de la estructura secundaria de la proteína en el tiempo, lo que estaría de acuerdo con la casi desaparición de las señales DCI en los espectros. Por lo tanto se puede inferir que el mecanismo de interacción en el tiempo de los complejos con la biomolécula es diferente y está determinado por las características del centro metálico.

En conclusión, los resultados obtenidos mediante espectroscopía de dicroísmo circular mostraron una clara evidencia de la interacción para ambos precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$ con BSA. La unión covalente ocurre de forma rápida para ambos, dando lugar a espectros DC dependientes del tiempo, los cuales se modifican según el tipo de centro metálico utilizado. Para el precursor de Pd(II) se observó un rearrreglo espacial mientras se acomoda en la proteína, y para el de Pt(II) una posible pérdida de la interacción (sin dañar la estructura secundaria de la proteína).

El estudio de interacción de BSA con los complejos M-dppf-L se realizó sólo en el rango del visible debido a la necesidad de utilizar DMSO como solvente de estos compuestos (lo que no permito registrar los espectros a una longitud de onda inferior a 300 nm debido a la propia absorción del solvente) [80]. Los ocho complejos M-dppf-L resultaron ser silenciosos al dicroísmo (no presentan señales DC en los rangos de longitud de onda estudiados). Se midieron los espectros DC en un rango entre 330 y 600 nm de las mezclas BSA:complejo a tiempo cero y luego de 24 horas de incubación a 35°C. En la figura 6.62 se muestran los espectros de dicroísmo circular de BSA, medidos a tiempo cero y 24 horas, en presencia de los complejos de Pd(II).

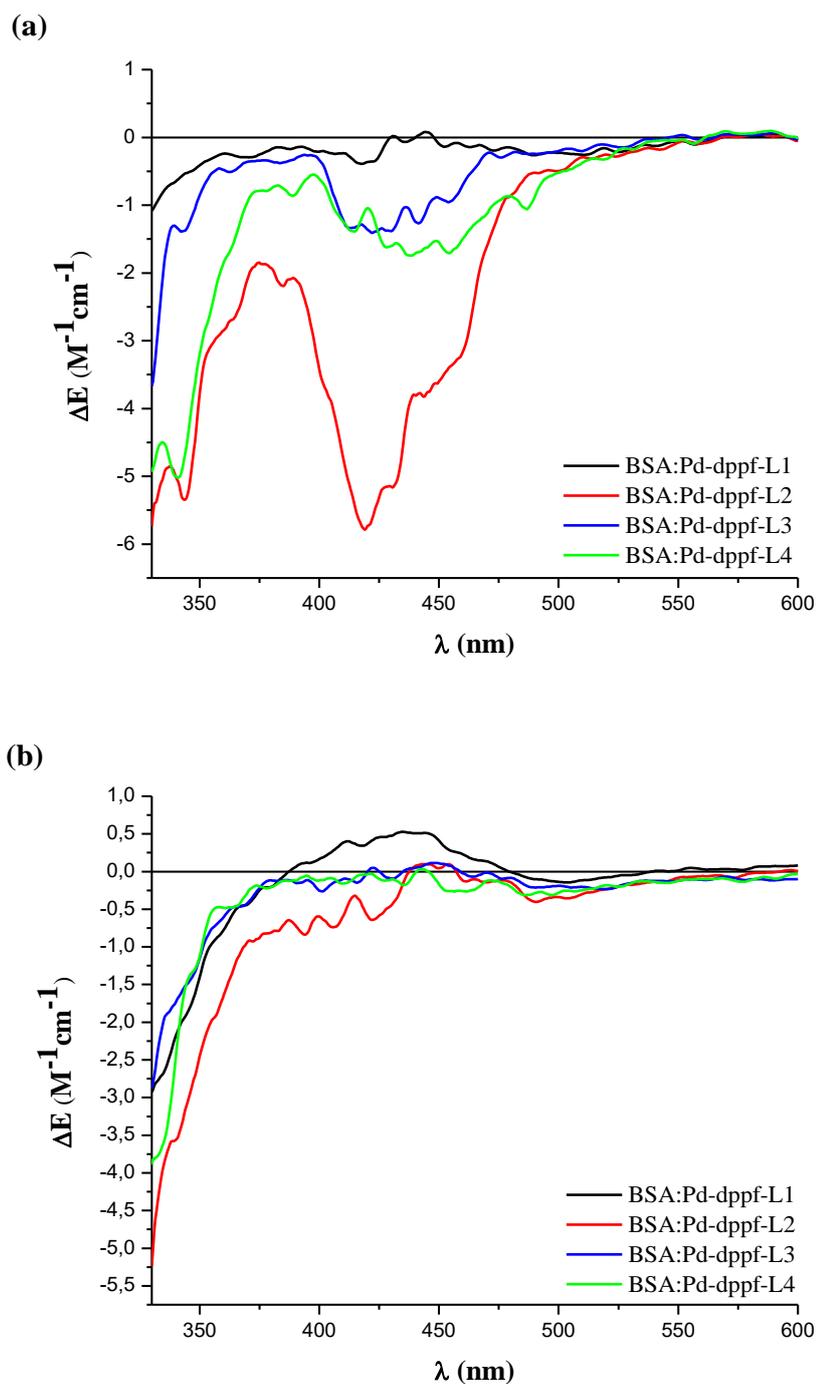
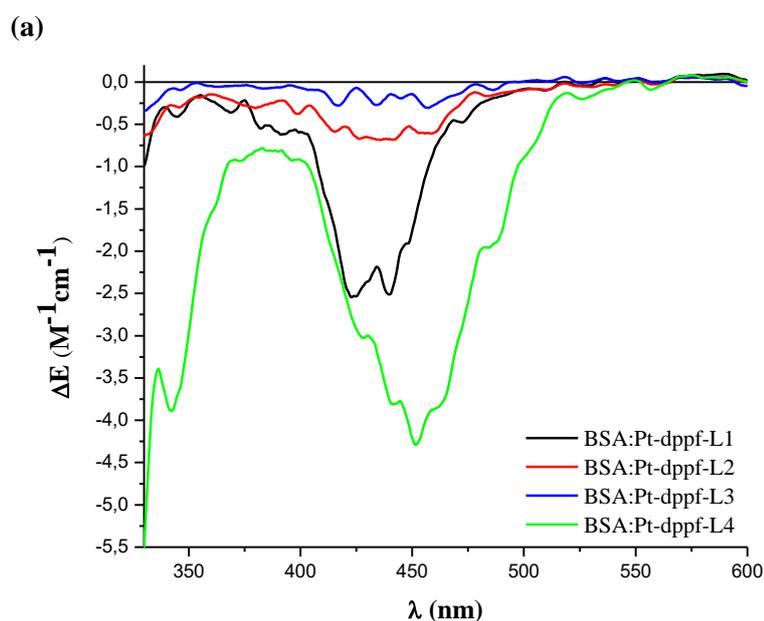


Figura 6.62: (a) Espectro de dicroísmo circular medido en un rango de 330-600 nm (2 cm de camino óptico) de BSA (100 μM) en presencia de los complejos $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ en relación molar 1:1 medido a tiempo cero y (b) luego de incubación durante 24 horas a 35°C .

Los espectros medidos a tiempo cero mostraron dos señales DCI negativas, entre 330-350 nm y entre 395-480 nm, las que dan cuenta de la rápida interacción covalente que

existiría entre la proteína y los complejos de Pd-dppf-L. La intensidad relativa de las señales DCI, que se asocia al grado de interacción, siguieron un patrón del tipo Pd-dppf-L2 > Pd-dppf-L4 > Pd-dppf-L3 > Pd-dppf-L1. Los espectros DC medidos luego de 24 horas de incubación a 35°C (figura 6.62b) mostraron una disminución casi total de la intensidad de ambas señales DCI, lo que indicaría una disminución en el tiempo de la interacción entre los complejos y la proteína.

En relación a los complejos Pt-dppf-L, la figura 6.63 muestra los espectros DC de BSA, medidos a tiempo cero y luego de 24 horas de incubación a 35°C, en presencia de estos complejos.



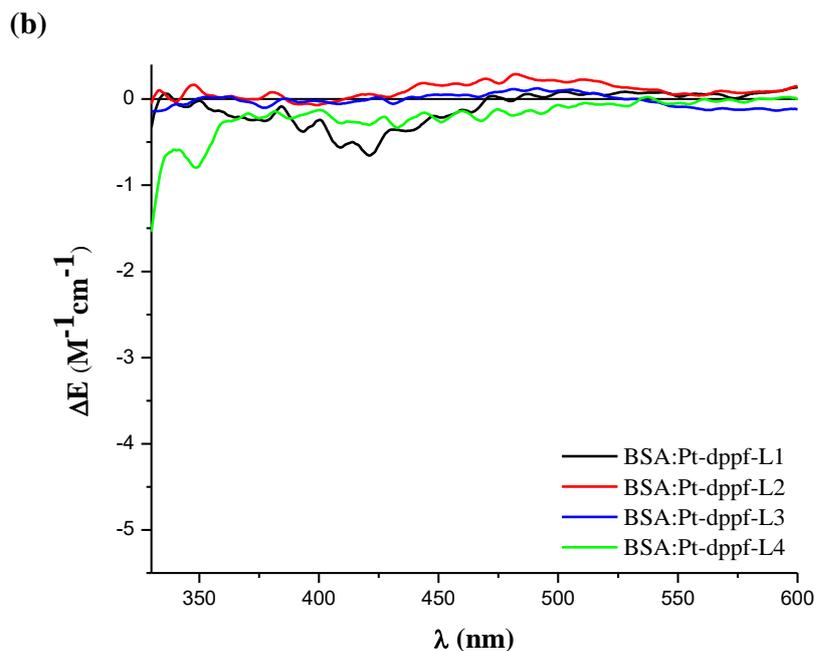


Figura 6.63: Espectros de dicroísmo circular medidos en un rango de 330-600 nm (2 cm de camino óptico) de BSA (100 μM) en presencia de los complejos $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ en relación molar 1:1 medidos a: (a) tiempo cero y (b) luego de incubación durante 24 horas a 35°C.

Los espectros medidos a tiempo cero mostraron en el complejo Pd-dppf-L4 dos señales DCI, y para los otros complejos se observó una única señal DCI (entre 400 - 513 nm). En relación a esta última, la variación de la intensidad relativa fue distinta a la observada en los complejos de paladio, observándose un patrón de Pd-dppf-L4 > Pd-dppf-L1 > Pd-dppf-L2 > Pd-dppf-L3. Los espectros registrados posteriormente al tiempo de incubación mostraron en todos los casos una disminución casi total de las señales DCI, similar a la observado en los complejos de Pd(II).

Los únicos antecedentes reportados sobre interacción de complejos metálicos que incluyen estas tiosemicarbazonas y albúmina, fueron los estudios realizados por B. Demoro y col. quienes estudiaron la interacción entre HSA y los complejos $[\text{Ru}_2(p\text{-cimen})_2(\text{L})_2]^{2+}$ [80]. En aquellos estudios se planteó, que si bien todos los complejos interaccionan con la proteína (en mayor o menor grado), posteriormente existe un reacomodo del complejo en la biomolécula que está determinado por el tipo de ligando tiosemicarbazona utilizado. Extrapolando este análisis hacia el sistema BSA:M-dppf-L, los resultados obtenidos indican que la interacción entre BSA y los complejos está

determinada por el tipo del ligando tiosemicarbazona que éste posea, pero también es dependiente del tipo de ión metálico utilizado, similar al comportamiento observado para los precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$.

6.3.7 Conclusiones parciales

Se obtuvieron ocho nuevos complejos organometálicos de paladio y platino con los ligandos bioactivos HL (tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldehído) de fórmula $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$, los que fueron caracterizados completamente en estado sólido y en solución. Todos los complejos mostraron actividad contra la forma infectiva de *T. cruzi* mostrando a nivel general un aumento de la actividad tripanosomicida en comparación al fármaco de referencia Nifurtimox y a los ligandos bioactivos libres. También mostraron ser activos contra la forma sanguínea de *T. brucei*, observándose en todos los casos un aumento considerable de la actividad en comparación a los HL libres que casi no poseen actividad contra este parásito. La selectividad en ambos tripanosomátidos aumentó considerablemente al incluir el fragmento dppf, obteniéndose valores de IS elevados. Se confirmó la generación de especies radicalarias en *T. cruzi* y la participación de los complejos en el reciclaje redox del parásito. Los complejos Pt-dppf-L1 y Pt-dppf-L2 generaron cambios redox intracelulares en *T. brucei*, causados probablemente por la activación de éstos a nivel celular, y la consecuente generación de EROS.

Los estudios de interacción con ADN sugieren que esta biomolécula podría ser un blanco de acción en los parásitos. Se observaron altos niveles de interacción, los cuales son dependientes de la naturaleza de HL y de M(II). Además, los estudios de interacción con BSA sugieren la idea de una rápida interacción con la proteína que se modifica en el tiempo dependiendo de las características de cada complejo.

6.4 Conclusiones generales

Se sintetizaron diez nuevos compuestos organometálicos que incluyen el fragmento M^{II} -1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (fragmento $\{M(dppf)\}$) y ligandos con actividad antiparasitaria *per se* (ligandos bioactivos). Todos ellos fueron caracterizados exhaustivamente en estado sólido y en solución utilizando técnicas que permitieron confirmar las fórmulas y estructuras de todos los compuestos.

Con respecto a la actividad antiparasitaria, todos los compuestos $\{M(dppf)\}$ resultaron ser activos contra *T. cruzi*. Todos los compuestos M-dppf-L resultaron también activos contra *T. brucei*. En forma general se observó un aumento de la actividad en comparación al ligando bioactivo en su forma libre y al fármaco de referencia Nifurtimox. Los estudios en modelos de células de mamífero revelaron que la inclusión del fragmento dppf aumenta considerablemente la selectividad hacia los parásitos tripanosomátidos.

Se confirmó para ambas series de compuestos que el mecanismo de acción antiparasitario de los ligandos bioactivo se mantiene en los complejos organometálicos.

Además, se evidenció para todos los complejos M-dppf-L la interacción con el ADN, como parte de un posible mecanismo de acción dual. Estos compuestos mostraron un alto nivel de interacción. Los complejos evaluados mostraron una alta afinidad por la proteína transportadora BSA.

Dadas las características químicas y biológicas observadas consideramos a estos complejos organometálicos como líderes para el diseño de nuevos agentes anti-tripanosomátidos.

6.5 Bibliografía

- [1] F. A. Cotton, G. Wilkinson, M. Murillo, *Advanced inorganic chemistry*, 6th Edition, Wiley, New York, (1999).
- [2] Joan Ribas Gispert, *Química de coordinación*, Ediciones Omega, (2000).
- [3] C. Housecroft, A.G. Sharpe, *Inorganic chemistry*, Pearson Education Limited, (2012).
- [4] G. Gary L Meissler, *Organometallic Chemistry*, Second edition, Oxford University Press, New York, (2010).
- [5] D.R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Bioorganometallic chemistry of ferrocene*, *Chem. Rev.*, 104 (2004) 5931–5986.
- [6] W.R. Cullen, J. Derek Woollins, *Ferrocene-containing metal complexes*, *Coord. Chem. Rev.*, 39 (1981) 1–30.
- [7] T. Hor, L.-T. Phang, *Substituted metal carbonyls: polynuclear heterometallic complexes of Cr, Mo, W and Mn supported by singly-bridging 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene*, *Polyhedron*, 9 (1990) 2305–2308.

- [8] M.I. Bruce, P.A. Humphrey, Omar bin Shawkataly, M.R. Snow, E.R.T. Tiekink, W.R. Cullen, Cluster chemistry Study of the pyrolysis of $\text{Ru}_3(\mu\text{-dppf})(\text{CO})_{10}$ (dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene) X-ray structures of $\text{Ru}_3(\mu\text{-H})\{\mu_3\text{-}(\eta^1, \eta^2\text{-C}_6\text{H}_4)\text{PPh}(\eta\text{-C}_5\text{H}_4)\text{Fe}(\eta\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)\}(\text{CO})_8$, $\text{Ru}_3(\mu\text{-P}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{-}\eta\text{-C}_5\text{H}_5\text{Fe}(\eta\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2))\{(\eta\text{-C}_5\text{H}_4)\text{Fe}(\eta\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)\}(\mu\text{-CO})(\text{CO})_8$, $\text{Ru}_3(\mu_3\text{-}\eta^1, \eta^1, \eta^2\text{-C}_6\text{H}_4)(\mu\text{-PPh}_2)(\mu\text{-PPhFc})(\text{CO})_7$, $\text{Ru}_3(\mu\text{-H})\{\mu_3(\eta^1, \eta^5\text{-PPh}_2\text{C}_5\text{H}_3)\text{Fe}(\eta\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)\}(\text{CO})_7$, and $\text{Ru}_4(\mu_4\text{-PFc})(\mu\text{-C}_6\text{H}_4)(\mu\text{-CO})(\text{CO})_{10}$ (Fc = $\text{Fe}(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)(\eta\text{-C}_5\text{H}_4)$), *Organometallics*, 9 (1990) 2910–2919.
- [9] M. Sato, M. Sekino, Synthesis and properties of the ruthenium vinylidene and acetylide complexes containing 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene, *J. Organomet. Chem.*, 444 (1993) 185–190.
- [10] G. Marr, T. Hunt, Unsymmetrically disubstituted ferrocenes: synthesis and reactivity of some 2-substituted ferrocenylphosphines, *J. Chem. Soc. C Org.*, (1969) 1070–1072.
- [11] A.W. Rudie, D.W. Lichtenberg, M.L. Katcher, A. Davison, Comparative study of 1,1'-bis(diphenylphosphino)cobaltocenium hexafluorophosphate and 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene as bidentate ligands, *Inorg. Chem.*, 17 (1978) 2859–2863.
- [12] A. Togni, T. Hayashi, Ferrocenes: homogeneous catalysis, organic synthesis, materials science, Weinheim - New York Basel - Cambridge . Tokyo, (2008).
- [13] M. Sato, M. Sekino, S. Akabori, $\text{Pd}(\text{BF}_4)_2$ complexes of 1,1'-bis(alkyl- or arylthio)- and 1,1'-bis(diphenylphosphino)-ferrocenes bond formation between the Fe and Pd atoms, *J. Organomet. Chem.*, 344 (1988) C31–C34.
- [14] A. Houlton, R.M.G. Roberts, J. Silver, R.V. Parish, Studies on gold(I) complexes of 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene, *J. Organomet. Chem.*, 418 (1991) 269–275.
- [15] P.K. Baker, S.G. Fraser, P. Harding, 1, 1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene complexes of molybdenum(II) and tungsten(II), *Inorg. Chim. Acta*, 116 (1986) L5–L6.
- [16] T. Hayashi, M. Konishi, Y. Kobori, M. Kumada, T. Higuchi, K. Hirotsu, Dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II): an effective catalyst for cross-coupling of secondary and primary alkyl Grignard and alkylzinc reagents with organic halides, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 158–163.
- [17] D.A. Clemente, G. Pilloni, B. Corain, B. Longato, M. Tiripicchio-Camellini, Chemistry of heterobimetallic metal complexes Part I synthesis, X-ray structure and

- solution chemistry of $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)_2\text{PtCl}_2]$, *Inorg. Chim. Acta*, 115 (1986) L9–L11.
- [18] B. Corain, B. Longato, G. Favero, D. Ajò, G. Pilloni, U. Russo, F.R. Kreissl, Heteropolymetallic complexes of 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf): comparative physicochemical properties of (dppf)MCl₂ (M = Co, Ni, Pd, Pt, Zn, Cd, Hg), *Inorg. Chim. Acta*, 157 (1989) 259–266.
- [19] B. Longato, B. Corain, G.M. Bonora, G. Pilloni, Reactivity of novel cis-platinum(II) complexes with nucleosides, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 75–79.
- [20] K. Karami, Z.M. Lighvan, M.D. Jahromi, J. Lipkowski, A.A. Momtazi-borojeni, Synthesis, electronic structure and molecular docking of new organometallic palladium (II) complexes with intercalator ligands: the influence of bridged ligands on enhanced DNA/serum protein binding and in vitro antitumoral activity, *J. Organomet. Chem.*, 827 (2017) 1–14.
- [21] H.H. Jaffé, The electrical effect of the *N*-oxide group in pyridine 1-oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3527–3531.
- [22] J. Jung, Y. Jung, O.-S. Park, Preparation of 2-chloropyridine, *Synth. Commun.*, 31 (2001) 2507–2511.
- [23] R.A. Jones, A.R. Katritzky, *N*-oxides and related compounds: the tautomerism of mercapto- and acylamino-pyridine 1-oxides, *J. Chem. Soc.*, (1960) 2937–2942.
- [24] E. Spinner, The infrared spectra of some *N*-heteroaromatic mercaptocompounds and of their *N*-methyl and *S*-methyl derivatives, *J. Chem. Soc.*, (1960) 1237–1242.
- [25] B.L. Barnett, H.C. Kretschmar, F.A. Hartman, Structural characterization of bis(*N*-oxopyridine-2-thionato)zinc(II), *Inorg. Chem.*, 16 (1977) 1834–1838.
- [26] M.K. Dewanjee, R.P. Robinson, R.L. Hellman, W.I. Ganz, A.N. Serafini, G.N. Sfakianakis, Technetium-99m-labeled platelets: comparison of labeling with a new lipid-soluble Sn(II)-mercaptopyridine-*N*-oxide and 99mTc-HMPAO, *Nucl. Med. Biol.*, 18 (1991) 461–465.
- [27] R. Xiong, J. Zuo, X. You, X. Huang, Synthesis and x-ray structure of the first lanthanide 2-mercaptopyridine *N*-oxide complex, tris-(1-hydroxy-2(1H)-pyridinethionato-*o*, *s*) bis [sulfinylbis (methane)] samarium(III), *Polyhedron*, 15 (1996) 3321–3324.
- [28] D.-Z. Niu, L.-L. Mu, Z.-S. Lu, B.-L. Song, B.-W. Sun, Synthesis and crystal structure of Pr(mpo)₃(DMSO)₂ (Hmpo = 2-mercaptopyridine *N*-oxide), *J. Chem. Crystallogr.*, 34 (2004) 195–198.

- [29] S. Pervaiz, S.K. Yadav, A.P. Kumar, C.C.C. Ng, Lanthanide metal complexes useful in treating cancer, (2014).
- [30] M.A. Robinson, Complexes of 1-hydroxy 2-pyridinethione, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 26 (1964) 1277–1281.
- [31] A. Hodge, K. Nordquest, E.L. Blinn, Oxovanadium(IV) complexes containing bidentate nitrogen-sulfur and oxygen-sulfur ligands, *Inorg. Chim. Acta*, 6 (1972) 491–498.
- [32] W. Tsagkalidis, D. Rodewald, D. Rehder, V. Vergopoulos, Bis(2-mercaptopyridine-N-oxide)oxovanadium(IV): synthesis, structure and its conversion to the dichloro complex, *Inorg. Chim. Acta*, 219 (1994) 213–215.
- [33] B. Kang, Y. Xu, J. Peng, D. Wu, X. Chen, Y. Hu, M. Hong, J. Lu, Cobalt complexes with pnictogen (phosphine or pyridine) and thiolato ligands syntheses, x-ray crystal structures and spectroscopic characterization, *Polyhedron*, 12 (1993) 871–878.
- [34] T. Hamaguchi, Y. Inoue, K. Ujimoto, I. Ando, Synthesis, crystal structure and electrochemistry of a ruthenium complex coordinated with an ambidentate 2-mercaptopyridinato N-oxide ligand, *Polyhedron*, 27 (2008) 2031–2034.
- [35] J. Shi, T. Wen, Y. Zheng, S. Zhong, D. Wu, Q. Liu, B. Kang, B. Wu, T. Mak, Palladium complexes with simultaneous O:S coordination, syntheses, structures and characterization of complexes with 2-mercaptophenol or 2-mercaptopyridine N-oxide, *Polyhedron*, 16 (1997) 369–375.
- [36] J.L. Davidson, P.N. Preston, M.V. Russo, Synthesis of 1-oxidopyridinium-2-thiolato- and pyridine-2-thiolato-complexes of nickel, palladium, and platinum, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1983) 783–786.
- [37] J.-H. Zhou, Y.-Z. Li, Z. Liu, X.-T. Chen, Bis-[2-mercapto-pyridine N-oxide(1-)- κ^2 N,O]-platinum(II), *Acta Crystallogr. Sect. E*, 61 (2005) m195–m197.
- [38] M. Vieites, P. Smircich, B. Parajón-Costa, J. Rodríguez, V. Galaz, C. Olea-Azar, L. Otero, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Gómez-Barrio, B. Garat, D. Gambino, Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 (2008) 723–735.
- [39] M. Vieites, P. Smircich, L. Guggeri, E. Marchán, A. Gómez-Barrio, M. Navarro, B. Garat, D. Gambino, Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol N-oxide gold(I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and

- Leishmania sp* insight into its mechanism of action, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 1300–1306.
- [40] I. Machado, L.B. Marino, B. Demoro, G.A. Echeverría, O.E. Piro, C.Q.F. Leite, F.R. Pavan, D. Gambino, Bioactivity of pyridine-2-thiolato-1-oxide metal complexes: Bi(III), Fe(III) and Ga(III) complexes as potent anti-Mycobacterium tuberculosis prospective agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 87 (2014) 267–273.
- [41] B. Rosenberg, Some Biological Effects of Platinum Compounds, *Platin. Met. Rev.*, 248 (2004) 119–133.
- [42] Z. Guo, P.J. Sadler, Medicinal inorganic chemistry, *Adv. Inorg. Chem.*, 49 (1999) 183–306.
- [43] A.G. Quiroga, C. Navarro Ranninger, Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes: Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs, *Coord. Chem. Rev.*, 248 (2004) 119–133.
- [44] H. Beraldo, Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos, *Quim Nova*, 27 (2004) 461–471.
- [45] A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, Palladium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 698–706.
- [46] N. Gómez, D. Santos, R. Vázquez, L. Suescun, Á. Mombrú, M. Vermeulen, L. Finkielstein, C. Shayo, A. Moglioni, D. Gambino, C. Davio, Synthesis, structural characterization, and pro-apoptotic activity of 1-indanone thiosemicarbazone platinum(II) and palladium(II) complexes: potential as antileukemic agents, *Chem. Med. Chem.*, 6 (2011) 1485–1494.
- [47] L. Otero, M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J.D. Maya, A. Morello, R.L. Krauth-Siegel, O.E. Piro, E. Castellano, M. González, D. Gambino, H. Cerecetto, Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 3322–3331.
- [48] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, C. Olea-Azar, E. Norambuena, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, U. Kemmerling, A. Morello, J. Diego Maya, D. Gambino,

- Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 411–418.
- [49] M. Vieites, L. Otero, D. Santos, J. Toloza, R. Figueroa, E. Norambuena, C. Olea-Azar, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, A. Morello, J.D. Maya, B. Garat, D. Gambino, Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 1033–1043.
- [50] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino, L. Otero, Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (2014) 4677–4689.
- [51] B.S. Parajón-Costa, A.C. González-Baró, E.J. Baran, Electrochemical and spectroscopic behaviour of bis(2-mercaptopyridine-N-oxide)oxovanadium(IV), *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 628 (2002) 1419–1424.
- [52] A.M. Heyns, The I.R and Raman spectra of sodium hexafluorophosphate monohydrate, NaPF₆·H₂O, *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.*, 33 (1977) 315–322.
- [53] U. Casellato, D. Ajó, G. Valle, B. Corain, B. Longato, R. Graziani, Heteropolymetallic complexes of 1,1'-bis(diphenylphosphino) ferrocene (dppf) II Crystal structure of dppf and NiCl₂(dppf), *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.*, 18 (1988) 583–590.
- [54] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.*, 7 (1971) 81–122.
- [55] C.E. Housecroft, S.M. Owen, P.R. Raithby, B.A.M. Shaykh, Preparation, molecular structure and solution properties of 1-[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladatetaborane, *Organometallics*, 9 (1990) 1617–1623.
- [56] D. Cauzzi, C. Graiff, C. Massera, G. Predieri, A. Tiripicchio, D. Acquotti, Chelating versus bridging behaviour and NMR fluxionality of dppf in the nido clusters [M₃Se₂(CO)₇(dppf)] [M = Fe or Ru, dppf = Fe(η⁵-C₅H₄PPh₂)₂] crystal structure of the chelated ruthenium derivative, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1999) 3515–3521.
- [57] D. Noh, E. Seo, H. Lee, H. Jang, M. Choi, Y.H. Kim, J. Hong, Syntheses and characterization of heterobimetallic complexes (dppf)Pt(dithiolate) (dppf:

- bis(diphenylphosphino)ferrocene); X-ray crystal structures of (dppf)PtL where L=dmit, phdt and i-mnt, *Polyhedron*, 20 (2001) 1939–1945.
- [58] S.O. Grim, R.L. Keiter, W. McFarlane, A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of tertiary phosphine complexes of platinum(II), *Inorg. Chem.*, 6 (1967) 1133–1137.
- [59] T.M. Miller, K.J. Ahmed, M.S. Wrighton, Complexes of rhenium carbonyl containing ferrocenyl-derived ligands: tunable electron density at rhenium by control of the redox state of the ferrocenyl ligand, *Inorg. Chem.*, 28 (1989) 2347–2355.
- [60] P. Appelt, J.P. da Silva, O. Fuganti, L. Aquino, B. Sandrino, K. Wohnrath, V. Santos, M. Cunha, A. Veiga, F.S. Murakami, D.F. Back, M.P. de Araujo, New heterobimetallic ruthenium (II) complexes [Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF₆: synthesis, molecular structure, electrochemistry, DFT, antioxidant and antibacterial potential, *J. Organomet. Chem.*, 846 (2017) 326–334.
- [61] E.R. Brown, R.F. Large, *Electrochemical methods*, Interscienc, New York, (1971).
- [62] X. Wu, E. Tiekink, I. Kostetski, N. Kocherginsky, A.. Tan, S.B. Khoo, P. Wilairat, M. Go, Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: investigations into the role of ferrocene, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27 (2006) 175–187.
- [63] M. Hocek, P. Štěpnička, J. Ludvík, I. Císařová, I. Votruba, D. Řeha, P. Hobza, Ferrocene-modified purines as potential electrochemical markers: synthesis, crystal structures, electrochemistry and cytostatic activity of (ferrocenylethynyl)- and (ferrocenylethyl)purines, *Chem. Eur. J.*, 10 (2004) 2058–2066.
- [64] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 60 (1983) 702-705.
- [65] X. Chen, Y. Hu, D. Wu, L. Weng, B. Kang, Syntheses and electrochemistry of some transition metal complexes with 2-mercaptopyridine N-oxide and crystal structure of bis(2-mercaptopyridine N-oxide)nickel(II), *Polyhedron*, 10 (1991) 2651–2657.
- [66] S.A. Ramírez, G.J. Gordillo, Adsorption and reduction of palladium–dimethylglyoxime complex, *J. Electroanal. Chem.*, 629 (2009) 147–151.
- [67] J. Benítez, L. Guggeri, I. Tomaz, G. Arrambide, M. Navarro, J. Costa Pessoa, B. Garat, D. Gambino, Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents, *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 609–616.

- [68] C.F. da Silva, P.B. da Silva, M.M. Batista, A. Daliry, R.R. Tidwell, M. de N.C. Soeiro, The biological *in vitro* effect and selectivity of aromatic dicationic compounds on *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105 (2010) 239–245.
- [69] J.F. Turrens, C.L. Newton, L. Zhong, F.R. Hernandez, J. Whitfield, R. Docampo, Mercaptopyridine-N-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts, *FEMS Microbiol. Lett.*, 175 (1999) 217–221.
- [70] W. Filgueira de Azevedo. Raquel Dias, Computational methods for calculation of ligand-binding affinity, *Curr. Drug Targets*, 9 (2008) 1031–1039.
- [71] R. Dias, W. Filgueira de Azevedo, Molecular docking algorithms, *Curr. Drug Targets*, 9 (2008) 1040–1047.
- [72] A. Merlino, M. Vieites, D. Gambino, E. Laura Coitiño, Homology modeling of *T. cruzi* and *L. major* NADH-dependent fumarate reductases: ligand docking, molecular dynamics validation, and insights on their binding modes, *J. Mol. Graph. Model.*, 48 (2014) 47–59.
- [73] G. Tabbi, C. Cassino, G. Cavigliolo, D. Colangelo, A. Ghiglia, I. Viano, D. Osella, Water stability and cytotoxic activity relationship of a series of ferrocenium derivatives ESR insights on the radical production during the degradation process, *J. Med. Chem.*, 45 (2002) 5786–5796.
- [74] G. Minotti, S.D. Aust, Redox cycling of iron and lipid peroxidation, *Lipids*, 27 (1992) 219–226.
- [75] T.S. Singh, S. Mitra, Interaction of cinnamic acid derivatives with serum albumins: A fluorescence spectroscopic study, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 78 (2011) 942–948.
- [76] P.A. Adams, M.C. Berman, Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin, *Biochem. J.*, 191 (1980) 95–102.
- [77] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, 358 (1992) 209–215.
- [78] D.C. Carter, B. Chang, J.X. Ho, K. Keeling, Z. Krishnasami, Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin, *Eur. J. Biochem.*, 226 (1994) 1049–1052.
- [79] A.I. Tomaz, T. Jakusch, T.S. Morais, F. Marques, R.F.M. de Almeida, F. Mendes, É.A. Enyedy, I. Santos, J.C. Pessoa, T. Kiss, M.H. Garcia, [Ru^{II}(η⁵-

- $C_5H_5)(bipy)(PPh_3)]^+$, a promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.*, 117 (2012) 261–269.
- [80] B. Demoro, R.F.M. de Almeida, F. Marques, C.P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodriguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino, A.I. Tomaz, Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism, *Dalton Trans.*, 42 (2013) 7131–7146.
- [81] X.C. Xia-Bing Zhang, Jia-Ming Ma, Ke-Lan Yong, Jing-Ci Lv, Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with loureirin B, *Spectroscopy*, 24 (2010) 547–557.
- [82] M. Dockal, D.C. Carter, F. Rüker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 3042–3050.
- [83] U. Kragh-Hansen, F. Hellec, B. de Foresta, M. le Maire, J.V. Møller, Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins, *Biophys. J.*, 80 (n.d.) 2898–2911.
- [84] H.Y. Shrivastava, B.U. Nair, Fluorescence resonance energy transfer from tryptophan to a chromium(III) complex accompanied by non-specific cleavage of albumin: a step forward towards the development of a novel photoprotease, *J. Inorg. Biochem.*, 98 (2004) 991–994.
- [85] L. Colina-Vegas, W. Villarreal, M. Navarro, C.R. de Oliveira, A.E. Graminha, P.I. da S. Maia, V.M. Deflon, A.G. Ferreira, M.R. Cominetti, A.A. Batista, Cytotoxicity of Ru(II) piano–stool complexes with chloroquine and chelating ligands against breast and lung tumor cells: interactions with DNA and BSA, *J. Inorg. Biochem.*, 153 (2015) 150–161.
- [86] L. Colina-Vegas, J.L. Dutra, W. Villarreal, J.H. de A. Neto, M.R. Cominetti, F. Pavan, M. Navarro, A.A. Batista, Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and Mycobacterium tuberculosis, *J. Inorg. Biochem.*, 162 (2016) 135–145.
- [87] D. Gambino, L. Otero, M. Vieites, M. Boiani, M. González, E.J. Baran, H. Cerecetto, Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: experimental and theoretical study, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 68 (2007) 341–348.

- [88] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faundez, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 4885–4893.
- [89] D. Kovala-Demertzi, A. Domopoulou, M. Demertzis, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, Coordinating properties of 2-acetylpyridine thiosemicarbazone palladium(II) complexes with neutral and deprotonated ligand X-ray structure of bromo(2-acetylpyridine thiosemicarbazonato) palladium(II), *Polyhedron*, 13 (1994) 1917–1925.
- [90] D. Kovala-Demertzi, A. Domopoulou, M.A. Demertzis, G. Valle, A. Papageorgiou, Palladium(II) complexes of 2-acetylpyridine N(4)-methyl, N(4)-ethyl and N(4)-phenyl-thiosemicarbazones crystal structure of chloro(2-acetylpyridine N(4)-methylthiosemicarbazonato) palladium(II) synthesis, spectral studies, *in vitro* and *in vivo* antitumour activity, *J. Inorg. Biochem.*, 68 (1997) 147–155.
- [91] K.I. Goldberg, J. Valdes-Martínez, G. Espinosa-Pérez, L.J. Ackerman, D.X. West, Palladium(II) and platinum(II) complexes of 6-methyl-2-acetylpyridine 3-hexamethyleneiminylthiosemicarbazones: A structural and spectral study, *Polyhedron*, 18 (1999) 1177–1182.
- [92] J.M. Vila, T. Pereira, A. Amoedo, M. Graña, J. Martínez, M. López-Torres, A. Fernández, The key role of sulfur in thiosemicarbazone compounds crystal and molecular structure of [Pd{4-MeOC₆H₄C(Me)-NN-C(S)NHPh}₂], *J. Organomet. Chem.*, 623 (2001) 176–184.
- [93] D. Cauzzi, C. Graiff, C. Massera, G. Predieri, A. Tiripicchio, D. Acquotti, Chelating versus bridging behaviour and NMR fluxionality of dppf in the nido clusters [M₃Se₂(CO)₇(dppf)] [M = Fe or Ru, dppf = Fe(η⁵-C₅H₄PPh₂)₂] crystal structure of the chelated ruthenium derivative, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1999) 3515–3521.
- [94] A. Davison, J.J. Bishop, Symmetrically disubstituted ferrocenes II complexes of ferrocene-1,1'-bis(dimethylarsine) and ferrocene-1,1'-bis(diphenylarsine) with Group VI carbonyls, *Inorg. Chem.*, 10 (1971) 826–831.
- [95] A. Davison, J.J. Bishop, Symmetrically disubstituted ferrocenes III complexes of ferrocene-1,1'-bis(dimethylarsine) and ferrocene-1,1'-bis(diphenylarsine) with the group VIII metals, *Inorg. Chem.*, 10 (1971) 832–837.

- [96] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sanchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 1534–1543.
- [97] C. Sarniguet, J. Toloza, M. Cipriani, M. Lapier, M. Vieites, Y. Toledano-Magaña, J. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, V. Moreno, J. Maya, C. Azar, D. Gambino, L. Otero, Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites, *Biol. Trace Elem. Res.*, 159 (2014) 379–392.
- [98] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, A. Morello, J. D. Maya, C. Moncada, E. Cabrera, R. di Maio, M. González, H. Cerecetto, ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofurán derivative analogues of Nifurtimox by electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction, *Free Radic. Res.*, 37 (2003) 993–1001.
- [99] C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, L. Otero, D. Gambino, M. González, H. Cerecetto, Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 61 (2005) 2933–2938.
- [100] L. Di, E.H. Kerns, Chapter 23: Lipophilicity methods, Second Ed., Academic Press, Boston, (2016) 299–306.
- [101] B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones, *Biol. Trace Elem. Res.*, 153 (2013) 371–381.
- [102] K. Makino, T. Hagiwara, A. Murakami, A mini review: fundamental aspects of spin trapping with DMPO, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.*, 37 (1991) 657–665.
- [103] J.D. Maya, S. Bollo, L.J. Nuñez-Vergara, J.A. Squella, Y. Repetto, A. Morello, J. Périé, G. Chauvière, *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives, *Biochem. Pharmacol.*, 65 (2003) 999–1006.
- [104] M.H. Tshako, M.J.M. Alves, W. Colli, Z. Brener, O. Augusto, Restricted bioreductive metabolism of a nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections, *Biochem. Pharmacol.*, 38 (1989) 4491–4496.

- [105] R.L.S. Gonçalves, R.F.S.M. Barreto, C.R. Polycarpo, F.R. Gadelha, S.L. Castro, M.F. Oliveira, A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 43 (2011) 651–661.
- [106] R. Krauth-Siegel, G. Coombs, Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets, *Parasitol. Today*, 15 (1999) 404–409.
- [107] S. Daunes, C. D’Silva, Glutathione derivatives active against *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. brucei brucei* *In Vitro*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 (2002) 434–437.
- [108] C. Pratt, S. Nguyen, M.A. Phillips, Genetic validation of *Trypanosoma brucei* glutathione synthetase as an essential enzyme, *Eukaryot. Cell*, 13 (2014) 614–624.
- [109] R.L. Krauth-Siegel, M.A. Comini, Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism, *Redox Control Cell Funct.*, 1780 (2008) 1236–1248.
- [110] A.J. Meyer, T.P. Dick, Fluorescent protein-based redox probes, *Antioxid. Redox Signal.*, 13 (2010) 621–650.
- [111] J. Franco, A. Medeiros, D. Benítez, K. Perelmuter, G. Serra, M.A. Comini, L. Scarone, *In vitro* activity and mode of action of distamycin analogues against African trypanosomes, *Eur. J. Med. Chem.*, 126 (2017) 776–788.
- [112] M.A. Comini, Measurement and meaning of cellular thiol:disulfide redox status, *Free Radic. Res.*, 50 (2016) 246–271.
- [113] M.A. Comini, L. Flohé, Trypanothione-based redox metabolism of trypanosomatids, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2013) 167–199.
- [114] B. Rosenberg, Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug, Verlag Helvetica Chimica Acta Ed., (1999) 1–27.
- [115] M.J. Waring, Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 269–282.
- [116] J. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition, Springer Science, New York, (2006).
- [117] M. Kurucsev, B. Nordén, DNA–drug interactions in circular dichroism: principles and applications, John Wiley & Sons Inc, New York, (2000).
- [118] V. Sequeira, Z. Quirol, Biomolecular studies by circular dichroism, *Front. Biosci.*, 16 (2011) 61–73.

- [119] B. Nordén, T. Kurucsev, Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism, *J. Mol. Recognit.*, 7 (1994) 141–155.
- [120] D. Cox, Lehninger: Principles of Biochemistry, 4^o Ed., Sarvien, New York, (2005).
- [121] N.C. Garbett, P.A. Ragazzon, J.B. Chaires, Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions, *Nat Protoc.*, 2 (2007) 3166–3172.
- [122] L. Chen, J. Liu, J. Chen, S. Shi, C. Tan, K. Zheng, L. Ji, Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{dpq})]^{2+}$, *J. Mol. Struct.*, 881 (2008) 156–166.
- [123] C. Acilan, B. Cevatemre, Z. Adiguzel, D. Karakas, E. Ulukaya, N. Ribeiro, I. Correia, J.C. Pessoa, Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 1861 (2017) 218–234.
- [124] Z. Chen, X. Wang, Y. Li, Z. Guo, Comparison of DNA binding and cleavage abilities between mono- and trinuclear copper(II) complexes of benzimidazole derivatives, *Inorg. Chem. Commun.*, 11 (2008) 1392–1396.
- [125] M. Pérez-Cabré, G. Cervantes, V. Moreno, M.J. Prieto, J.M. Pérez, M. Font-Bardía, X. Solans, Pd(II) and Pt(II) complexes with aromatic diamines: study of their interaction with DNA, *J. Inorg. Biochem.*, 98 (2004) 510–521.
- [126] W. Hu, Q. Luo, X. Ma, K. Wu, J. Liu, Y. Chen, S. Xiong, J. Wang, P.J. Sadler, F. Wang, Arene control over thiolate to sulfinate oxidation in albumin by organometallic ruthenium anticancer complexes, *Chem. Eur. J.*, 15 (2009) 6586–6594.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones y Perspectivas

Contenido

7.1 Conclusiones generales	387
7.2 Perspectivas	389
7.3 Consideraciones finales	390

7.1 Conclusiones generales

Los resultados generados en este Trabajo de Tesis pueden ser analizados desde dos puntos de vista: uno puramente Químico Inorgánico, relacionado con la síntesis y la caracterización de nuevos compuestos de coordinación, y otro Químico Medicinal, relacionado con la potencialidad de dichos compuestos como agentes terapéuticos para las tripanosomiasis americana y africana humana.

Desde el punto de vista Químico Inorgánico, se desarrollaron tres nuevas familias de compuestos con ligandos bioactivos. En conjunto, se obtuvieron cuatro nuevos complejos organometálicos Ru(II)-ciclopentadienilo con ligandos tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofuraldéhidó (HL) y clotrimazol (CTZ) de fórmula general $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)(\text{L})]$ y $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2(\text{CTZ})](\text{CF}_3\text{SO}_3)$, respectivamente; tres complejos que incluyeron el fragmento Re(I)-tricarbonilo y las tiosemicarbazonas bioactivas HL de fórmula general $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Br}(\text{HL})]$; y diez complejos organometálicos con el centro M(II)-1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (M = Pd o Pt) que incluyeron los ligandos *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) y las tiosemicarbazonas HL de fórmula general $[\text{M}^{\text{II}}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$, respectivamente. Todos los complejos se caracterizaron analítica, fisicoquímica y estructuralmente de forma exhaustiva y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas potencialmente relacionadas con la actividad biológica, como la lipofilia, la estabilidad y el comportamiento electroquímico. Los resultados obtenidos ampliaron el estudio de la química organometálica por parte del grupo de investigación que integro.

Desde el punto de vista de la Química Inorgánica Medicinal, se realizó, para las tres familias, el estudio de la actividad biológica *in vitro* sobre *T. cruzi* y *T. brucei*, y se incluyeron estudios de citotoxicidad sobre células mamíferas modelo. A nivel general, los mejores resultados obtenidos fueron en la serie de complejos que incluyeron el fragmento organometálico $\{\text{M}(\text{dppf})\}$. Se estudiaron diferentes blancos de acción probables de los 17 complejos desarrollados: inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana de *T. cruzi* (en el complejo que incluyó el ligando CTZ), generación de especies radicalarias en los parásitos de *T. cruzi* (en complejos que incluyen los ligandos HL), inhibición de la actividad de la enzima fumarato reductasa de *T. cruzi* (en los complejos con ligando Hmpo) y estudio de posibles cambios redox intracelulares en *T.*

brucei (en los complejos M-dppf-L). En algunos casos se estudió la interacción con ADN como probable nuevo blanco de acción emergente de la presencia de especies metálicas. Por otro lado, se estudió la interacción con albumina sérica bovina como modelo de proteína transportadora de fármacos.

La experiencia adquirida en los sistemas estudiados servirá como base para generar nuevos complejos potencialmente activos. Éstos se diseñarán realizando modificaciones racionales a los anteriores complejos, que permitan superar algunos inconvenientes presentados por ellos. Algunas de estas modificaciones posibles se indican en la sección 7.2.

Como resultado de gran significación tanto para la formación personal como para el grupo que integro, he adquirido experiencia e independencia en el desarrollo e interpretación de los estudios de caracterización, así como de evaluación biológica de los mismos. De esta forma este grupo de Química Inorgánica Medicinal expande sus posibilidades de desarrollar nuevos compuestos y de realizar estudios de mecanismo de acción de nuevos complejos metálicos bioactivos.

Parte del trabajo informado en esta tesis se plasmó en las publicaciones siguientes (apéndice 2):

1. “A new ruthenium cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites.” E. Rodríguez Arce, C. Sarniguet, T. Moraes, M. Vieites, I. Tomaz, A. Medeiros, M. Comini, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, F. Marques, M. García, L. Otero, D. Gambino, *Journal of Coordination Chemistry* (2015) 68, 2923 – 2937.
2. “Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites.” E. Rodríguez Arce, M. Fernández, C. Sarniguet, T. Moraes, I. Tomaz, C. Olea Azar, R. Figueroa, J.D. Maya, A. Medeiros, M. Comini, M. H. García, L. Otero, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry* (2015) 153, 306- 314.
3. “Aromatic amine *N*-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases.” E. Rodríguez Arce, M. F. Mosquillo, L. Pérez-Díaz, G.

Echeverría, O. Piro, A. Merlino, E. L. Coitiño, C. Maríngolo Ribeiro, C. Leite, F. Pavan, L. Otero, D. Gambino, *Dalton Transactions* (2015) 44,14453 – 14464.

4. “Rhenium(I) tricarbonyl compounds of bioactive thiosemicarbazones: synthesis, characterization and activity against *Trypanosoma cruzi*.” E. Rodríguez Arce, I. Machado, B. Rodríguez, M. Lapier, M. Zúñiga, J. D. Maya, C. Olea-Azar, L. Otero, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry* (2017) 170, 125- 133.

7.2 Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos surgen nuevas alternativas en cuanto a estrategias sintéticas que permitan obtener complejos que tengan la posibilidad de actuar por un mecanismo de acción múltiple.

En base a los resultados obtenidos y considerando características químicas y biológicas de los compuestos desarrollados, los complejos que mostraron los mejores resultados fueron aquellos que incluyeron el fragmento organometálico {M(dppf)}. En este sentido se plantean las siguientes perspectivas

- Obtener nuevos complejos con este centro organometálico incluyendo otros ligandos bioactivos. De esta manera obtener complejos con buena actividad y selectividad hacia parásitos tripanosomátidos.
- Incluir otros iones metálicos en este fragmento organometálico (rutenio, oro, níquel, entre otros) con estos mismos ligandos bioactivos desarrollados en este trabajo de tesis. De esta manera, se podrá comparar la influencia que tendría el ion metálico central sobre la actividad y selectividad de la actividad antiparasitaria.
- Continuar los estudios biológicos de los complejos {M(dppf)}, en particular, estudiar la participación de éstos en diferentes procesos metabólicos de los parásitos tripanosomátidos, por ejemplo, mediante estudios metabolómicos. Además, se plantea continuar con los estudios de interacción con ADN para conocer el mecanismo de interacción entre los complejos y la biomolécula utilizando otras técnicas como electroforesis en gel, medidas de viscosidad, etc..
- Realizar un acercamiento hacia la estrategia de encapsulamiento de fármacos, de manera de modificar favorablemente la solubilidad de los compuestos obtenidos,

lo que podría conducir a mejorar la biodisponibilidad y actividad biológica observada.

7.3 Consideraciones finales

Con estas propuestas se pretende avanzar hacia el desarrollo de compuestos metálicos con actividad contra *T. cruzi* y *T. brucei* que ameriten la realización de estudios *in vivo*. Todo el conocimiento en Química Inorgánica y en Química Medicinal generado incentivará a la comunidad científica del área a desarrollar nuevos complejos según la estrategia planteada por el grupo que integro, y que ejemplifica este Trabajo de Tesis. Se espera que el esfuerzo realizado conduzca, en un futuro, a algún compuesto metálico con potencialidad para ser introducido en fases clínicas o incluso en el mercado farmacéutico.